

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ -ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Α΄ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ.ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ : ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΤΡΟΣ ΔΡΑΚΑΚΗΣ



Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ CRH, CRH-R1 ΚΑΙ CRH-R2 ΣΕ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΙΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
2016-2017

ΚΟΥΒΟΥΤΣΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : Δρ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΝΤΙΝΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ
ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΔΡΑΚΑΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΜΕΛΗ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΚΑΛΛΙΑΝΙΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών 'Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική' του τμήματος Ιατρικής Αθηνών. Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί τους αλλά και ανθρώπους που έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω την επιστημονική συνεργάτη της Α' Μαιευτικής και γυναικολογικής κλινικής και επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, Δρ. Ντινοπούλου Βασιλική για την αμέριστη υποστήριξή της καθώς και για τις στοχευμένες υποδείξεις της. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαυρογιάννη Δέσποινα για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και της παρούσας εργασίας στο σύνολό της, αλλά και τους καθηγητές του ΠΜΣ Λουτράδη Δημήτριο, Δρακάκη Πέτρο και Καλλιανίδη Κωνσταντίνο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και συμφοιτητές μου στο ΠΜΣ και στο εργαστήριο της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα για τη στήριξή τους και κυρίως τις Αθανασία, Εμμανουέλα και Τζωρτζίνα για την πολύτιμη συμβολή τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην προϊσταμένη μου και υπεύθυνη των κεντρικών εργαστηρίων της ιδιωτικής κλινικής 'Παναγιά Οδηγήτρια' Γρηγορέλη Λεμονιά αλλά και στον συνάδελφο μου Καστάνη Κυριάκο τόσο για το ενδιαφέρον τους όσο και για όλες τις αλλαγές που έκαναν στις βάρδιές τους καθ'όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης του ΠΜΣ και διεξαγωγής της παρούσας εργασίας προκειμένου να με διευκολύνουν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Ιωάννα, τον Σπύρο, την Ηλιάνα αλλά και όλους μου τους φίλους για την αμέριστη ηθική υποστήριξη και βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Χαράλαμπο και Αικατερίνη, καθώς και τον αδελφό μου Λυσίμαχο για την αμέριστη βοήθεια, υποστήριξη και συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς χωρίς αυτούς τίποτα δε θα ήταν εφικτό.

ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ

ΣΤΟΥΣ ΦΙΛΟΥΣ ΜΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ 1.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
SUMMARY.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ.....	10
1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	10
1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΙ.....	15
2. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΑΙΡΕΣΕΙΣ.....	17
3. ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.....	20
3.1. ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ.....	20
3.1.1. ΠΡΟΣΦΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ.....	21
3.1.2. ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ.....	21
3.1.3. ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ.....	22
3.2. ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ.....	23
3.3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ.....	24
4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ IN VITRO.....	27
5. Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΦΛΟΙΟΤΡΟΠΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ, CRH(CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE).....	30
5.1. CRH, ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	30
5.2. CRH, ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ –ΥΠΟΦΥΣΗ -ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ, (HYPOTHALAMIC- PITUITARY- ADRENAL AXIS, HPA AXIS) ΚΑΙ ΣΤΡΕΣ.....	31
5.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ CRH.....	34
5.3.1. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE RECEPTOR 1 (CRH-R1).....	36
5.3.2. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE RECEPTOR 2 (CRH-R1).....	36
5.3.3. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE BINDING PROTEIN (CRH-BP).....	37
5.3.4. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ CRH ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	38
5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	39
5.5. ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ, CRH ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	40
5.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	41
5.7. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ CRH.....	41

5.7.1. CRH ΚΑΙ ΦΘΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ.....	41
5.7.2. CRH ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ.....	42
5.7.3. CRH ΚΑΙ ΕΙΣΒΟΛΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ.....	42
5.8. CRH ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑ FAS/FASL.....	43
6. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	46
6.1. RNA-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA.....	46
6.2. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA (cDNA).....	48
6.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	50
6.4. REAL-TIME PCR.....	53
6.4.1. ΜΕΘΟΔΟΙ RT-PCR.....	55
6.4.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	58
ΜΕΡΟΣ 2.....	59
A. ΣΚΟΠΟΣ.....	59
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
B.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	60
B.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	60
B.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	60
B.2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ IN VITRO.....	61
B.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA.....	61
B.2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ Cdna.....	64
B.2.5 RT-PCR ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ G6PD.....	66
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
Γ.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ G6PD.....	70
Γ.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R1.....	71
Γ.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R2.....	72
Γ.4. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
Δ.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	
Δ.2. ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	
E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

ΜΕΡΟΣ 1

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η CRH (Corticotropin-releasing hormone, κορτικοεκκλιτίνη) είναι μια πεπτιδική ορμόνη, η οποία παράγεται από τον παρακωιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και στη συνέχεια μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, μέσω του πυλαίου αγγειακού συστήματος, όπου επάγει την έκκριση κορτικοτροπίνης. Πρόκειται για πεπτίδιο 41 αμινοξέων. Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευθεί δύο υποδοχείς της CRH μέσω των οποίων ασκεί τις δράσεις της ο CRH-Receptor1 (CRH-R1) και ο CRH-Receptor2 (CRH-R2). Εντοπίζεται στα επινεφρίδια, σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα καθώς και σε ενεργές φλεγμονώδεις περιοχές. Επιπλέον, εντοπίζεται στη μήτρα, τον πλακούντα, τις ωοθήκες, το φθαρτό, την τροφοβλάστη και τους ενδομήτριους αδένες. Η CRH που παράγεται από το φθαρτό και την τροφοβλάστη επάγει την έκκριση της FasL (προ-αποπτωτική κυτοκίνη). Κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης το ενδομήτριο έχει χαρακτηριστικά φλεγμονώδους απόκρισης, αλλά παρόλα αυτά το έμβρυο δεν αποβάλλεται ως ημι-αλλομόσχευμα. Σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του εμβρύου από τον οργανισμό της μητέρας έχει το σύστημα Fas/FasL, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση της περίσσειας T-λεμφοκυττάρων έπειτα από μια ανοσολογική αντίδραση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2, στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης σε έμβρυα ποντικού ώστε να ελεγχθεί η δράση της και η συμμετοχή της στην εμφύτευση.

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2 θα γίνει απομόνωση του ολικού RNA από βλαστοκύστες ποντικών, οι οποίες θα προέλθουν από έμβρυα τα οποία θα απομονωθούν μια μέρα μετά τη γονιμοποίηση και θα ωριμάσουν στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί η τεχνική της Real-Time PCR, αφού πρώτα θα γίνει σύνθεση cDNA από το ολικό RNA, ώστε να μελετηθεί αν εκφράζονται οι υποδοχείς CRH-R1 και CRH-R2, στο RNA στις βλαστοκύστες. Ταυτόχρονα, στη RT-PCR θα μελετήσουμε και το γονίδιο G6PD, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς.

SUMMARY

Corticotropin – releasing hormone (CRH) is a 41 amino acid peptide, which is produced by the paraventricular nucleus of the hypothalamus and it is carried, through the portal system, to the anterior lobe of the pituitary, where it stimulates corticotropes. Two receptors have been found in human, CRH-R1 and CRH-R2, through whom CRH exerts its actions. CRH is located in adrenals, human lymphocytes and active inflammatory regions. In addition, CRH has been found in the uterus, the placenta, the ovaries, the trophoblast, the deciduas and the uterine glands. CRH produced by the deciduas and the trophoblast induces the secretion of FasL (pre-apoptotic cytokine). During the implantation of the blastocyst, the endometrium has inflammatory response characteristics, nevertheless, the embryo is not rejected as a semi-allograft it is. During this procedure the role of Fas/FasL pathway is in great importance. Due to the Fas/FasL pathway the excess of T cells is removed, through an inflammatory reaction, leading to the acceptance of the embryo.

The purpose of this thesis is the study of CRH receptors' (CRH-R1, CRH-R2) expression in the developing stage of blastocyst in mice. In that way CRH action and importance in the implantation can be investigated.

For the study of CRH receptor's expression the RNA extraction technique has been used. Afterwards cDNA was formed and used in the molecular technique of Real - Time PCR (RT-PCR). In that way, the expression of both receptors was measured, whereas the G6PD expression levels were used as a control for the study.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Με τον όρο ωογένεση αναφερόμαστε στη δημιουργία, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γυναικείων γαμετών. Στους ανθρώπους η ωογένεση ξεκινάει κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ηλικία και ολοκληρώνεται μετά την εφηβεία (1). Η ωογένεση μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια :

1. Αδιαφοροποίητη φάση φυλετικής ανάπτυξης
2. Στάδιο αδιαφοροποίητων γονάδων
3. Φυλετική διαφοροποίηση (2)

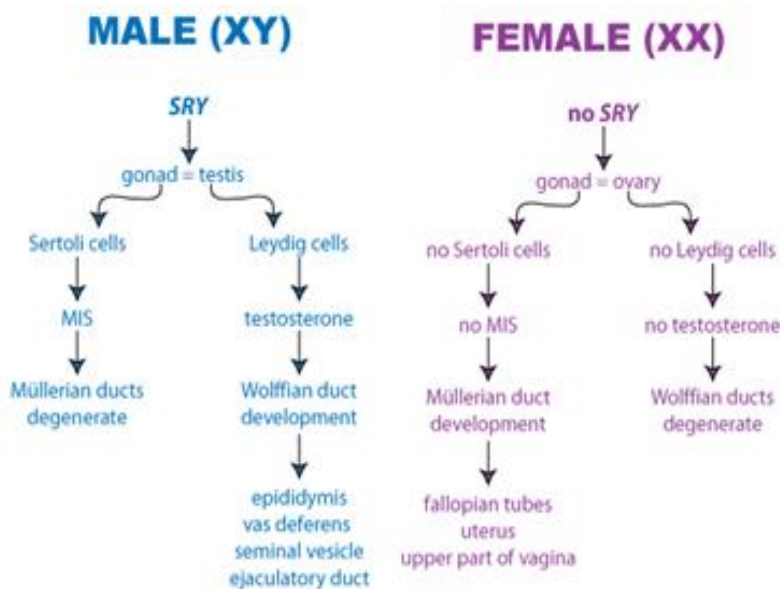
Το έμβρυο για περίπου 40 μέρες έχει αδιαφοροποίητο αναπαραγωγικό σύστημα (αμφιφυλετική φάση) και δεν είναι δυνατό να γίνει διάκριση αν και υφίστανται κάποιες κυτταρικές διαφορές, με κυριότερη την ύπαρξη πλήρως σχηματισμένων μεσонеφρικών και παραμεσонеφρικών πόρων. Κατά το τέλος της αδιαφοροποίητης φάσης της φυλετικής ανάπτυξης εμφανίζεται η αρχέγονη φυλετική οδός η οποία και στα δύο φύλλα αποτελείται από :

- Τις γονάδες
- Τα συστήματα γεννητικών πόρων (πόροι του Muller-παραμεσонеφρικοί- και πόροι του Wolf-μεσонеφρικοί-)
- Την κοινή έξοδο των πόρων του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος στο κοιλιακό τοίχωμα. (3)

Αρχικά, οι αδιαφοροποίητες γονάδες εμφανίζονται με τη μορφή ενός ζεύγους επιμήκων ακρολοφιών (γοναδικοί κρημνοί). Η γοναδική καταβολή εμφανίζεται σαν πάχυνση του εσωτερικού τοιχώματος του μεσόνεφρου. Κατά την ανάπτυξη, η γοναδική καταβολή χωρίζεται βαθμιαία από το μεσόνεφρο.

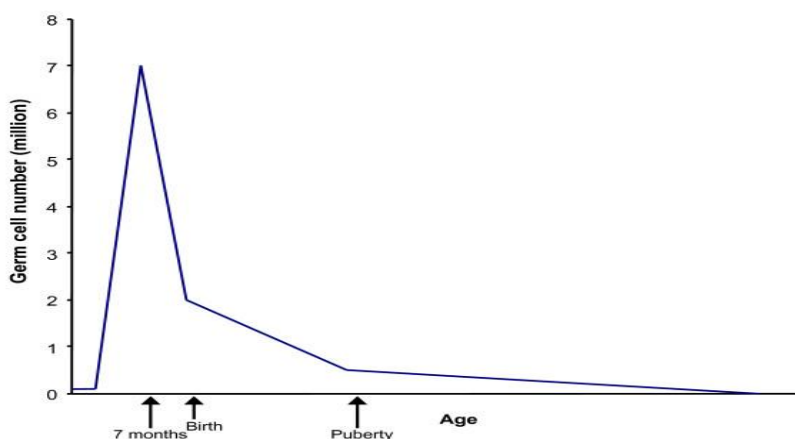
Παραμένει, όμως συνδεδεμένη μαζί του με το μεσόρχιο για τον όρχι και το μεσωοθηλάκιο για την ωοθήκη, τα οποία εμφανίζονται σε ένα πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται ανάμεσα στα ενδοδερμικά κύτταρα στο τοίχωμα του λεκιθικού σάκου κοντά στην αλλαντοΐδα (4). Στη συνέχεια, μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις και εισχωρούν στους γεννητικούς κρημούς κατά την 6^η βδομάδα ανάπτυξης (5).

Στον άνθρωπο η διαφοροποίηση των γονάδων σε αντρική ή γυναικεία γίνεται κατά την 6^η εβδομάδα εμβρυϊκής ζωής, μέσω της έκφρασης του γονιδίου SRY. Το γονίδιο SRY (sex-determining region Y gene, φυλοκαθοριστική περιοχή του γονιδίου Y) βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος Y και κατέχει καθοριστικό ρόλο στην φυλετική διαφοροποίηση (6). Παρουσία του SRY εκκρίνεται η AMH (anti-Müllerian hormone, αντι-Μυλλέριος ορμόνη) από τα κύτταρα Sertoli, η οποία αναστέλλει τη δράση των πόρων του Muller οδηγώντας τους σε υποστροφή (7). Επομένως απουσία του χρωμοσώματος Y οι πόροι του Muller δεν υποστρέφουν και οι πόροι του Wolf εμφανίζονται με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της γονάδας σε ωοθήκες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Διαφοροποίηση γονάδας παρουσία και απουσία του γονιδίου SRY

Από την 9^η εβδομάδα εμβρυϊκής ζωής εμφανίζονται τα ωογόνια στον φλοιό των ωοθηκών, ενώ η μείωση αρχίζει μεταξύ της 11^{ης} και 12^{ης} εβδομάδας με τη δημιουργία του πρωταρχικού ωοκυττάρου (1). Τα ωογόνια υφίστανται μίτωση μέχρι την 20^η – 24^η εβδομάδα κύησης οπότε και ο τελικός αριθμός ωογονίων φτάνει στο μέγιστο (περίπου 7 εκατομμύρια). Μέχρι και τον 6 μήνα μετά τον τοκετό τα ωογόνια αρχίζουν την πρόφαση της μείωσης και μετατρέπονται σε ωοκύτταρα 1^{ης} τάξεως (πρωτογενή) με μέγεθος 10 – 25 μm . Τα ωοκύτταρα αυτά, τα οποία διαχωρίζονται από το περιβάλλον τους μέσω μιας μεμβράνης που ονομάζεται βασικός υμένας, στη συνέχεια μεγαθύνονται (δευτερογενή ωοκύτταρα) και η διάμετρός τους φτάνει έως και 120 μm . Τα ωοκύτταρα 1^{ης} τάξεως έχουν χρόνο ζωής έως και 50 χρόνια. Ταυτόχρονα, από την έναρξη της ωογένεσης αρχίζει και η διεργασία φθοράς των ωοκυττάρων με αποτέλεσμα κατά τη γέννηση να υπάρχουν μόνο 2 εκατομμύρια πρωτογενή ωοκύτταρα, ενώ κατά την έναρξη της ήβης περίπου 400.000 (Εικόνα 2) (8).



Εικόνα 2. Αριθμός ωοκυττάρων (σε εκατομμύρια) σε συνάρτηση με την ηλικία

Μέχρι και την εφηβεία τα κύτταρα βρίσκονται σε μειωτική παύση. Αυτό σημαίνει ότι ενώ έχει πραγματοποιηθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση με την πραγματοποίηση της αντιγραφής του DNA, δεν ολοκληρώνεται εντός του εμβρύου, με αποτέλεσμα κατά τη στιγμή της γέννησης όλα τα ωάρια να περιέχουν 46 χρωμοσώματα. Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο από τα πρωτογενή ωοκύτταρα τα οποία προορίζονται για ωορρηξία (9). Τα ωάρια περιβάλλονται από ανατομικές δομές οι οποίες ονομάζονται ωοθυλάκια.

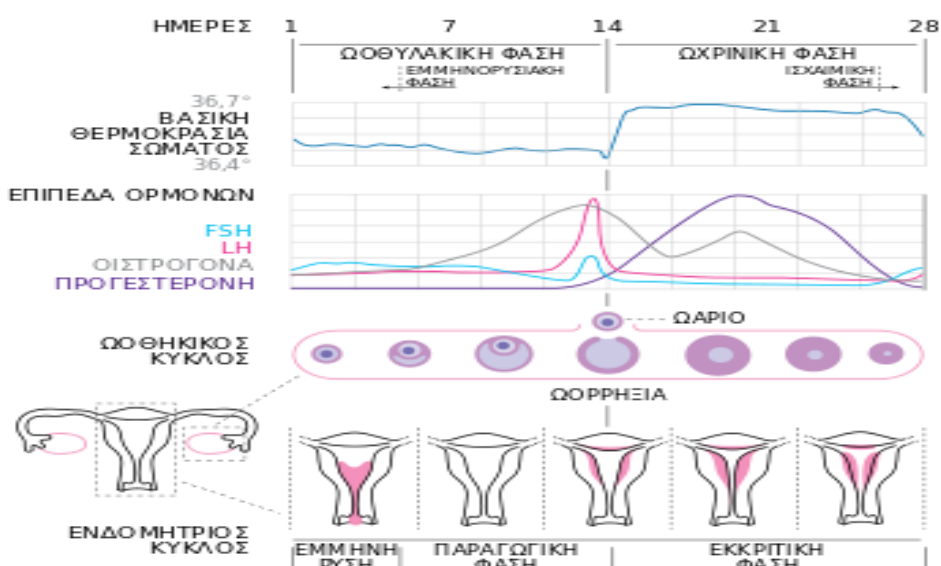
Τα ωοθυλάκια προέρχονται από αρχέγονα ωοθυλάκια αποτελούμενα από ένα πρωτογενές ωάριο και τα κοκκιώδη κύτταρα (9). Με την αύξηση της διαμέτρου του δευτερογενούς ωοθυλακίου, μια νέα στιβάδα κυττάρων συγκεντρώνεται έξω από το βασικό υμένα σχηματίζοντας την έσω θήκη. Στο στάδιο αυτό, τα κοκκιώδη κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν μικρές συλλογές υγρού, οι οποίες κατά το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης του ωοθυλακίου συγκεντρώνονται σε μόνο μια περιοχή, το άντρο (8).

Το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης του ωοθυλακίου αρχίζει με την έναρξη της ήβης και για την τελειοποίησή του χρειάζονται 75 – 85 μέρες. Ο πολλαπλασιασμός των κοκκιωδών κυττάρων συνεχίζεται και το ωοκύτταρο πλέον μετατοπίζεται και περιβάλλεται από ένα υμένα πάχους δύο έως τριών κυττάρων, ο οποίος ονομάζεται ωοφόρος δίσκος (8). Τα κύτταρα της έσω θήκης πολλαπλασιάζονται και ο συνδετικός ιστός που την περιβάλλει διαφοροποιείται στην έξω θήκη (10). Κατά το τέλος του δεύτερου σταδίου το ωοθυλάκιο ονομάζεται γραφιανό και έχει μέση διάμετρο 2 – 5 mm.

Το τελευταίο στάδιο στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου είναι η επιλογή ενός από τα γραφιανά ως κυρίαρχο κατά την 5^η – 7^η μέρα του κύκλου. Στο ωοθυλάκιο αυτό παρατηρείται μεγέθυνση των κυττάρων και αύξηση της παραγωγής υγρού στο άντρο, κάτι που οδηγεί στην ταχεία ανάπτυξή του με το μέγεθός του να φτάνει τα 10 – 20 mm κατά την ωοθυλακιορρηξία. Στο στάδιο αυτό ο βασικός υμένας υφίσταται πρωτεόλυση και ολοκληρώνεται η αρχική μειωτική διαίρεση του ωοκυττάρου. Αποτέλεσμα της ολοκλήρωσης αυτής είναι η παραγωγή δύο θυγατρικών κυττάρων ένα εκ των οποίων (ωοκύτταρο 2^{ης} τάξης) απελευθερώνεται στη σάλπιγγα, ενώ το άλλο το οποίο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο καταστρέφεται. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση συμβαίνει με την είσοδο του σπερματοζωαρίου και τη γονιμοποίηση. Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια του κύκλου οδηγούνται σε ατρησία, ενώ κατά μέσο όρο σε ωοθυλακιορρηξία οδηγούνται περίπου 450 ωοκύτταρα (8).

Σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία ωρίμανσης των ωαρίων κατέχουν οι ορμόνες, οι οποίες εμφανίζουν διακυμάνσεις στον ενδομήτριο κύκλο (Εικόνα 3). Οι γοναδοτροπίνες FSH (Follicle-Stimulating Hormone) και LH (Luteinizing Hormone), οι οποίες έχουν κύριο ρόλο στον ενδομήτριο κύκλο παράγονται από την υπόφυση προκειμένου να συμβάλλουν στον έλεγχο της λειτουργίας των γονάδων.

Η FSH (γλυκοπρωτεΐνη, η παραγωγή της οποίας ρυθμίζεται από την GnRH) αυξάνει την παραγωγή ανασταλτίνης, διεγείρει την ανάπτυξη ωοθυλακίων καθώς τα προετοιμάζει για τη δράση της LH και προάγει την παραγωγή οιστρογόνων από την LH. Η LH με τη σειρά της προάγει τη στεροειδογένεση και είναι υπεύθυνη για την ωοθυλακιορρηξία καθώς και για την έναρξη και τη συνέχιση της λειτουργίας του ωχρού σωματίου (11).



Εικόνα 3. Διακυμάνσεις ορμονών και της θερμοκρασίας σώματος κατά τον ενδομήτριο κύκλο

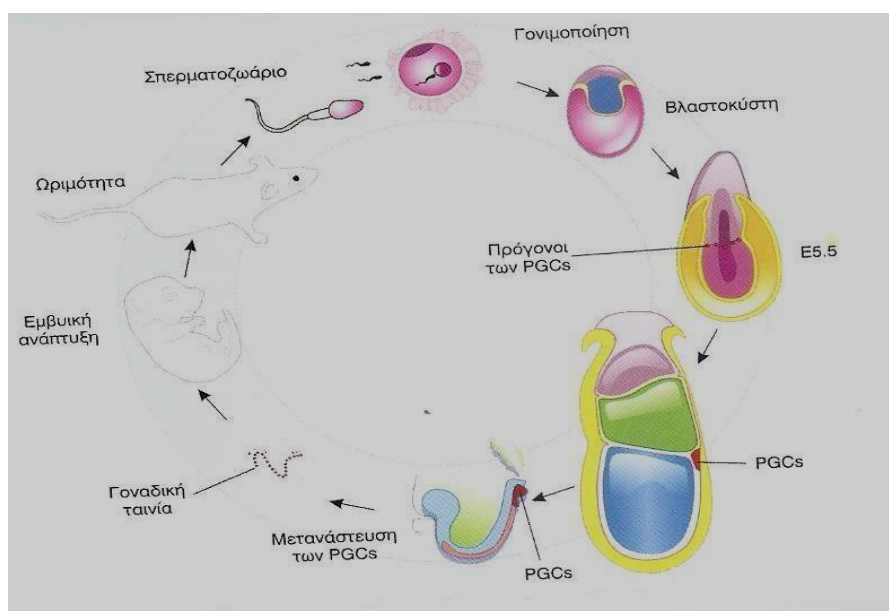
Αναλυτικότερα, λόγω υψηλών επιπέδων οιστρογόνων, εκλύεται από τον υποθάλαμο η GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone, εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών). Η GnRH ενεργοποιεί την απελευθέρωση από την πρόσθια υπόφυση χαμηλών συγκεντρώσεων γοναδοτροπινών (FSH, LH), οι οποίες διεγείρουν την ωρίμανση του ωοθυλακίου (ωοθυλακική φάση). Το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων. Η κορύφωση της αύξησης οιστρογόνων πυροδοτεί την απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας LH από την πρόσθια υπόφυση κατά το μέσο του κύκλου (ωοθυλακιορρηξία). Καθώς το ωοθυλάκιο ωριμάζει ελαττώνεται η έκκριση των οιστρογόνων, ενώ μετά την ωοθυλακιορρηξία (ωχρινική φάση) σχηματίζεται το ωχρό σωματίο, το οποίο αρχίζει να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων και προγεστερόνης, τα οποία με τη σειρά τους προετοιμάζουν το ενδομήτριο να δεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο (12).

Σε περίπτωση μη γονιμοποίησης τότε παρατηρείται πτώση της προγεστερόνης και το ωάριο με τον ενδομήτριο ιστό αποβάλλονται.

1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Η ωορρηξία στα ποντίκια γίνεται στο ανώτερο τμήμα του ωαγωγού λίγες ώρες μετά τη σύζευξη. Κατά τα πρώιμα προεμφυτευτικά στάδια τα έμβρυα βρίσκονται στον ωαγωγό και κατόπιν εισέρχονται στη μήτρα (13) κατά την 6^η μέρα ανάπτυξης δημιουργούνται οι πρώτες μορφές πρόδρομων γαμετικών κυττάρων, από τα οποία στη συνέχεια προέρχονται τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια (14).

Κατά την έναρξη του σταδίου της οργανογένεσης (περίπου 9^η ημέρα ανάπτυξης) γίνονται ορατές οι γενετικές ακρολοφίες από το μέσο τμήμα των οποίων σχηματίζονται οι γοναδικές ταινίες (13). Σε αυτό το στάδιο τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα (PGCs), τα οποία αποτελούν ένα συσσωμάτωμα 40 - 50 κυττάρων έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα της γοναδικής ταινίας (Εικόνα 4) όπου συνδέονται μεταξύ τους αποκτούν σφαιρικό σχήμα και διαφοροποιούνται σε αρχέγονο γοναδικό επιθήλιο και σχηματίζουν τις φυλετικές χορδές.



Εικόνα 4. Γονιμοποίηση και πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη στο ποντίκι. Σχηματική παρουσίαση της αρχής δημιουργίας των πρώτων μορφών PGCs κατά την 5η μέρα μετά τη γονιμοποίηση μέχρι και τη μετανάστευσή τους στη γοναδική ταινία την 9η και 10η μέρα.

Σε αυτό το στάδιο οι γονάδες είναι διδύναμα όργανα, τα οποία έχουν την ικανότητα να εξελιχθούν τόσο σε όρχι όσο και σε ωοθήκη. Όπως και στον άνθρωπο έτσι και στα αρσενικά ποντίκια με την ενεργοποίηση του γονιδίου SRY στο Y χρωμόσωμα παράγονται γονιδιακά προϊόντα τα οποία οδηγούν στη διόγκωση των φυλετικών χορδών και στη δημιουργία των κυττάρων Sertolli (από στοιχεία των φυλετικών χορδών) και πρώιμων σπερματογόνιων (από τα PGCs στον αναπτυσσόμενο όρχι). Αντίθετα λόγω μη ενεργοποίησης του SRY στα θηλυκά αρχίζει η διαδικασία της ωογένεσης, με την εξέλιξη των γονάδων να πραγματοποιείται αργότερα χρονικά από ότι στα αρσενικά.

Πιο συγκεκριμένα από τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα προκύπτουν τα διπλοειδή ωογόνια ενώ από τα υπόλοιπα τμήματα των φυλετικών χορδών σχηματίζονται τα κοκκώδη. Στη συνέχεια τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται μιτωτικά με την είσοδο τους στη μείωση να σηματοδοτεί την εξέλιξή τους σε απλοειδή πρώιμα ωοκύτταρα. Όμως τα ωοκύτταρα δεν ολοκληρώνουν τη μείωση I παρά μόνο μετά τη σεξουαλική ωρίμανση του ζώου. Αντίθετα σταματάνε στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Σταδιακά ορισμένα από τα πρώιμα ωοκύτταρα εισέρχονται στη μείωση II και φτάνουν μέχρι τη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο. Στα ποντίκια όμως η δεύτερη μειωτική διαίρεση δεν ολοκληρώνεται παρά μόνο μετά τη γονιμοποίηση παράγοντας το ώριμο ωάριο (14).

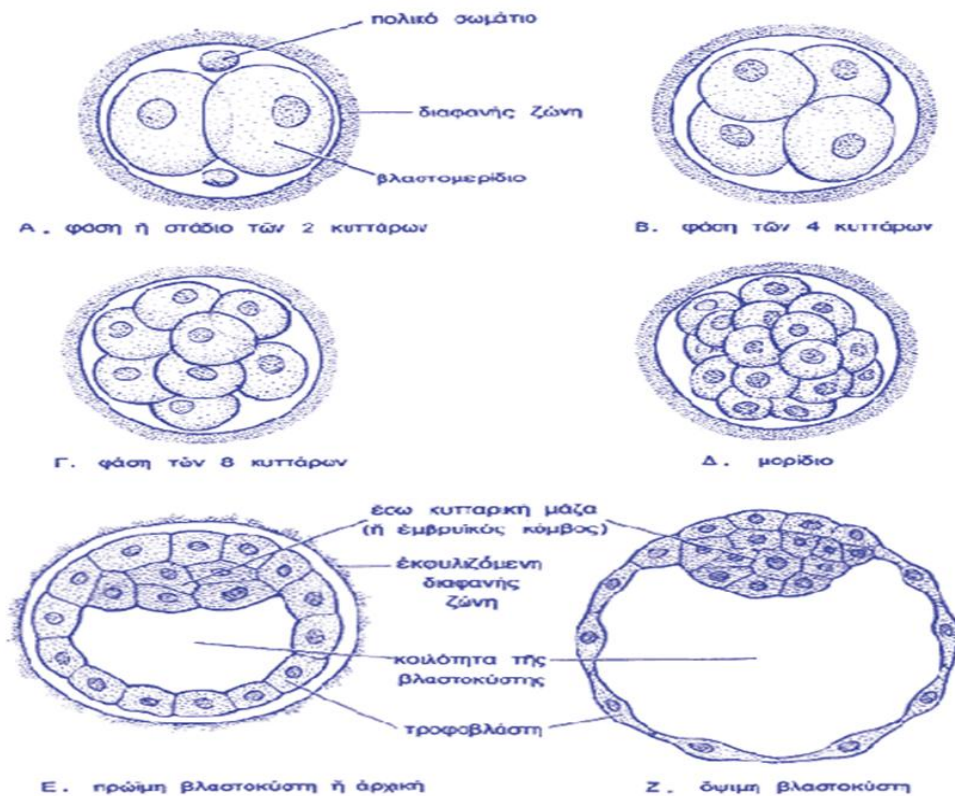
2. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΑΙΡΕΣΕΙΣ

Με τον όρο γονιμοποίηση εννοούμε την αλληλουχία μοριακών και κυτταρικών αντιδράσεων, η οποία αρχίζει όταν ένα σπερματοζωάριο έρχεται σε επαφή με το δευτερογενές ωοκύτταρο και ολοκληρώνεται με την ανάμειξη των πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων στην μετάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του ζυγώτη (15).

Κατά την έναρξη της γονιμοποίησης παρατηρούμε πρόσδεση πολλών σπερματοζωαρίων στη διάφανη ζώνη (το εξωτερικό περίβλημα του ωαρίου το οποίο προστατεύει το ωάριο και στη συνέχεια το έμβρυο τις πρώτες ημέρες της ζωής του από το εξωτερικό περιβάλλον) με ένα μόνο να καταφέρνει να προσδεθεί στη μεμβράνη του πλάσματος του ωαρίου. Αμέσως μετά την πρόσδεση του ενός σπερματοζωαρίου αρχίζει η είσοδος σπερματολυτικών ενζύμων στη διάφανη ζώνη ώστε να αποφευχθεί η πολυσπερμία. Ταυτόχρονα γίνεται η απορρόφηση του σπερματοζωαρίου εντός του ωαρίου και η ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Με την ένωση των πυρήνων του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου έχουμε την έναρξη της εμβρυογένεσης και τη δημιουργία του ζυγώτη (11). Περίπου 30 ώρες μετά τη γονιμοποίηση αρχίζει η αυλάκωση. Ο όρος αυλάκωση χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις πρώτες γρήγορες μιτωτικές διαιρέσεις του ζυγώτη. Η αυλάκωση διαιρεί τον ζυγώτη χωρίς αύξηση του μεγέθους του.

Τα στάδια της αυλάκωσης του ζυγώτη μέχρι το σχηματισμό της βλαστοκύστης είναι 5 (Εικόνα 5):

- *Στάδιο 2 κυττάρων.*
- *Στάδιο 4 κυττάρων.*
- *Στάδιο 8 κυττάρων.*
- *Μορίδιο*
- *Βλαστοκύστη*



Εικόνα 5. Στάδια αυλάκωσης του ζυγώτη

Ο ζυγώτης αρχικά είναι μονοκύτταρο έμβρυο το οποίο περιέχει δύο προπυρήνες (μητρικό και πατρικό) και στη συνέχεια διαιρείται σε δύο κύτταρα 24 περίπου ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Κατά τη διαδικασία της αυλάκωσης τα κύτταρα του εμβρύου πολλαπλασιάζονται εκθετικά με το μέγεθος τους να μικραίνει σε κάθε νέα διαίρεση, χωρίς να παρουσιάζεται κάποια αλλαγή στο μέγεθος του ζυγώτη. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται βλαστομερίδια. Μέχρι και το στάδιο των 8 κυττάρων (76 ώρες μετά τη γονιμοποίηση), τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα, καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν κάθε κυτταρικό τύπο. Θεωρείται, επίσης πως κάθε βλαστομερίδιο είναι ικανό εάν απομονωθεί, να σχηματίσει ένα πλήρες έμβρυο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις περιπτώσεις των μονοζυγωτικών διδύμων που οφείλονται στον διαχωρισμό των αρχικών αυτών κυττάρων. Περίπου την τέταρτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση ο ζυγώτης φτάνει στο στάδιο του μοριδίου και πλέον αποτελείται από 30 κύτταρα (βλαστομερίδια). Σε αυτό το στάδιο το μορίδιο εισέρχεται στη μήτρα, ενώ ταυτόχρονα η προγεστερόνη προκαλεί χαλάρωση στη συμβολή ωαγωγού - μήτρας.

Το τελευταίο στάδιο της αυλάκωσης είναι η βλαστοκύστη. Για την εισαγωγή του ζυγώτη σε αυτό το τελικό στάδιο σημαντικό ρόλο έχει η διαδικασία της σύμπτυξης (compaction). Πρόκειται για την αναδιοργάνωση των βλαστομεριδίων η οποία λαμβάνει χώρα κατά την 4^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Οφείλεται σε αλλαγές στη σύνδεση της E-cadherin (epithelial cadherin, επιθυλιακή καντχερίνη) και του υποκείμενου κυτταρικού φλοιού (16). Η επιθυλιακή καντχερίνη ανήκει στην υπερικογένεια των καντχερινών και έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συνάψεων πρόσφυσης ανάμεσα στα κύτταρα. Αποτέλεσμα της διαδικασίας της σύμπτυξης είναι να διαχωρίζονται τα βλαστομερίδια και ορισμένα να εντοπίζονται στο κέντρο του μοριδίου ενώ άλλα στην περιφέρεια του. Τα κεντρικά βλαστομερίδια αποτελούν την εσωτερική κυτταρική μάζα και συνδέονται με εσωχασματικές συνδέσεις, ενώ τα περιφερικά την εξωτερική και συνδέονται με αποφρακτικές συνδέσεις. Από την πρώτη παράγεται το μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου και ονομάζεται εμβρυοβλάστη και αποτελείται από περίπου 12 κύτταρα, ενώ η δεύτερη αποτελεί πηγή των υμένων και του πλακούντα και ονομάζεται τροφοβλάστη και αποτελείται από περίπου 100 κύτταρα (16).

3.ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

3.1. ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

Η εμφύτευση της βλαστοκύστης και η δημιουργία του πλακούντα είναι απαραίτητα στάδια για τη συνέχιση και επιτυχή ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης. Η διαδικασία της εμφύτευσης ξεκινάει όταν το ενδομήτριο (δεκτικό για εμφύτευση) έρχεται σε επαφή με τη βλαστοκύστη (17). Το ενδομήτριο μπορεί να πραγματοποιήσει την εμφύτευση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το οποίο ονομάζεται ‘παράθυρο εμφύτευσης’ και διαρκεί για περίπου 24 ώρες (18). Σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχή πραγματοποίηση της βλαστοκύστης είναι οι ακόλουθοι :

- Συμπεριφορά της τροφοβλάστης ως ψευδο-νεοπλαστικός ιστός, ο οποίος διηθεί το ενδομήτριο
- Έκκριση από την τροφοβλάστη πρωτεολυτικών ενεργών ενζύμων, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες και ενεργοποιητές πλασμινογόνου
- Έκφραση από την τροφοβλάστη ιντεγκρινών
- Έκκριση παραγόντων από το ενδομήτριο με αυτοκρινή και παρακρινή δράση για διευκόλυνση της διείσδυσης της τροφοβλάστης. (16)

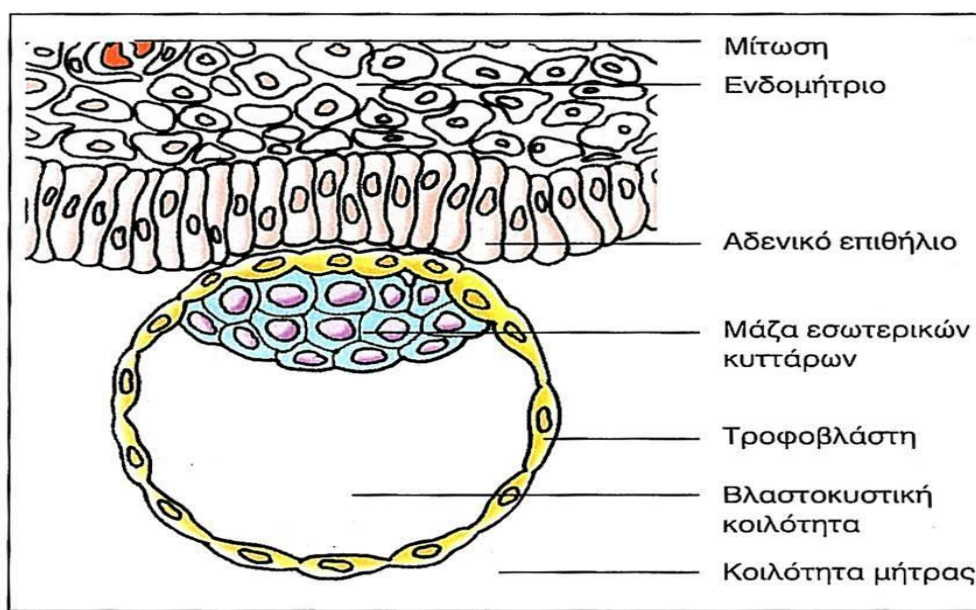
Τα στάδια εμφύτευσης της βλαστοκύστης είναι :

1. *Πρόσφυση* (aposition)
2. *Προσκόλληση* (adhesion)
3. *Διείσδυση* (invasion)

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της εμφύτευσης η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε *κυτταροτροφοβλάστη*, μία στιβάδα από μιτωτικά ενεργά κύτταρα, ακριβώς γύρω από το αμνίο και το λεκιθικό σάκο και σε *συγκυτιοτροφοβλάστη*, μία μη διαιρούμενη μιτωτικά μάζα από πολυπύρηνο κυτταρόπλασμα που εισβάλλει στο περιβάλλον στρώμα.

3.1.1. ΠΡΟΣΦΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

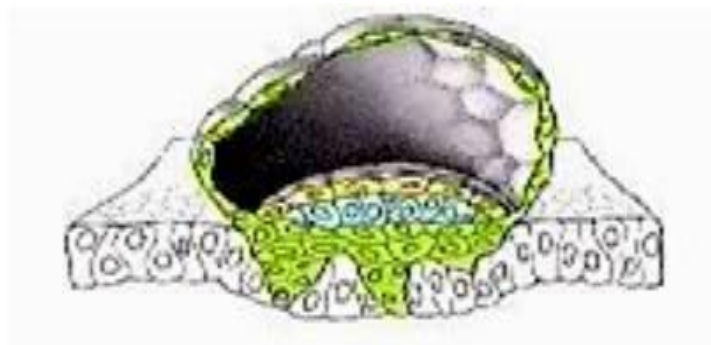
Το πρώτο στάδιο εμφύτευσης είναι η πρόσφυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Πραγματοποιείται κατά την 6^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση (16), όταν το ενδομήτριο βρίσκεται στην εκκριτική φάση του κύκλου. Χαρακτηρίζεται από την πρόσφυση των μεμβρανών των τροφοβλαστικών κυττάρων στις μεμβράνες του ενδομητρίου (Εικόνα 6) (19).



Εικόνα 6. Πρόσφυση βλαστοκύστης στο ενδομήτριο

3.1.2. ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

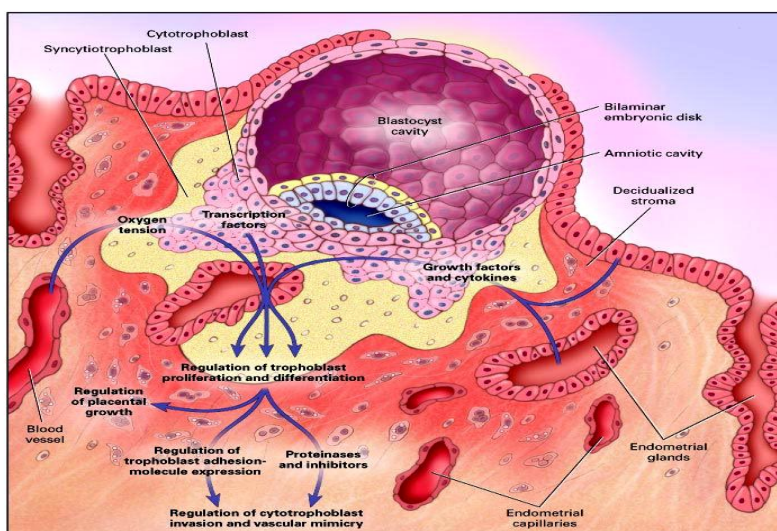
Το δεύτερο στάδιο είναι η έναρξη της διαδικασίας αλληλοδιείσδυσης μεταξύ των μικρολαχνών του ενδομητρίου και των κυτταρικών μεμβρανών της τροφοβλάστης (Εικόνα 7) (20). Η έναρξη της προσκόλλησης της βλαστοκύστης σηματοδοτείται από την τοπική αύξηση των αγγείων στο σημείο προσκόλλησης της. Πραγματοποιείται την 4^η μέρα στο ποντίκι και την 20^η -21^η στον άνθρωπο (21). Στο στάδιο αυτό μπορούμε να διακρίνουμε τη συγκυτιοτροφοβλάστη, η οποία εκκρίνει ουσίες με λυτική δράση, προκαλώντας ρήξη των αγγείων του ενδομητρίου συμβάλλοντας έτσι στη σταδιακή φθοροποίησή του.



Εικόνα 7. Προσκόλληση βλαστοκύστης στο ενδομήτριο

3.1.3. ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

Το τρίτο και τελευταίο στάδιο είναι αυτό της διείσδυσης. Κατά το στάδιο αυτό τροφοεκτοδερμικά κύτταρα από τη βλαστοκύστη μεταναστεύουν ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα μετατοπίζοντας τα και διεισδύοντας μέχρι το τοίχωμα των αγγείων (Εικόνα 8) (22). Στη θέση εμφύτευσης παρατηρείται αυξημένη διαβατότητα των κυττάρων και ελάττωση του αριθμού των δεσμοσωμάτων (μορφολογικές διαφοροποιήσεις, οι οποίες παρατηρούνται σε διάφορα σημεία των πλασματικών μεμβρανών μεταξύ κυττάρων και έχουν σκοπό να εξασφαλίζουν τη σύνδεση τους) (16).



Εικόνα 8. Διείσδυση βλαστοκύστης στο ενδομήτριο

3.2.ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

Καθοριστικό ρόλο στην εμφύτευση έχουν τα ωοθηκικά στεροειδή, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη, η έκφραση των οποίων προκαλεί μια σειρά παρακρινικών και αυτοκρινικών σημάτων που οδηγούν στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και τη διείσδυση της βλαστοκύστης σε αυτό (23) (Εικόνα 9). Η προετοιμασία του ενδομητρίου γίνεται κατά την παραγωγική φάση από την οιστραδιόλη, η οποία επάγει τη σύνθεση υποδοχέων προγεστερόνης και οιστραδιόλης στο στρώμα του ενδομητρίου (24). Ταυτόχρονα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου ώστε αυτό να φθαρτοποιηθεί (25). Η φθαρτοποίηση πραγματοποιείται κατά την εκκριτική φάση.

Η προγεστερόνη με τη σειρά της είναι σημαντικός παράγοντας για τη δημιουργία του ‘παράθυρου εμφύτευσης’ και επομένως τη διατήρηση της κύησης. Μια σημαντική μορφολογική αλλαγή που γίνεται στο ενδομήτριο κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης είναι η εμφάνιση των πινοποδίων. Τα πινοπόδια είναι προεξοχές κυτταρικών μεμβρανών των επιθυλιακών κυττάρων του ενδομητρίου, τα οποία εμφανίζονται την 5^η – 7^η μέρα μετά την ωοθυλακιωρηξία και παραμένουν για 2 περίπου μέρες, με την εμφάνιση τους να συμπίπτει με το ‘παράθυρο εμφύτευσης’ (25,26). Ο μηχανισμός λειτουργίας των πινοποδίων δεν είναι σαφής, η μορφολογία τους όμως και ο χρόνος εμφάνισης τους οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση (27). Σύμφωνα με έρευνες (22) η δημιουργία των πινοποδίων εξαρτάται από την έκφραση της προγεστερόνης. Πέραν των μορφολογικών αλλαγών (πινοπόδια) κατά τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου παρατηρείται και έκκριση προλακτίνης (28).

Μια από τις σημαντικότερες ορμόνες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι η χοριακή γοναδοτροπίνη. Η χοριακή γοναδοτροπίνη ελέγχει την έκφραση της προγεστερόνης διατηρώντας το ωχρό σωματίο, το οποίο είναι και η κύρια και πρωταρχική πηγή προγεστερόνης (29,30). Ταυτόχρονα διεγείρει τη δράση του αυξητικού παράγοντα IGF-II (Insulin-like growth factor II, Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας τύπου II) και αυξάνει την έκφραση του γονιδίου COX-2 (Cytochrome c oxidase subunit 2, υπομονάδα 2 του ενζύμου κυκλοοξυγενάσης) και του LIF (Leukemia inhibitory factor, ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας)

συμβάλλοντας έτσι τόσο στο μηχανισμό μετανάστευσης της τροφοβλάστης όσο και στην αγγειογένεση του φθαρτού (30,31,32).

3.3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

Η εμφύτευση απαιτεί την επικοινωνία μεταξύ του ενδομητρίου και της βλαστοκύστης, για την επίτευξη της οποίας ενεργοποιούνται μοριακοί μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια. Διάφοροι βιοχημικοί δείκτες έχουν προταθεί για την αναγνώριση της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου με κυριότερους στον άνθρωπο τις ιντεγκρίνες, την ινερλευκίνη-6, την βλεννογλυκοπρωτεΐνη-1, τη β-κατενίνη (33,34,35), αυξητικούς παράγοντες (36) και μια πληθώρα ακόμα γονιδίων (37) (Εικόνα 9).

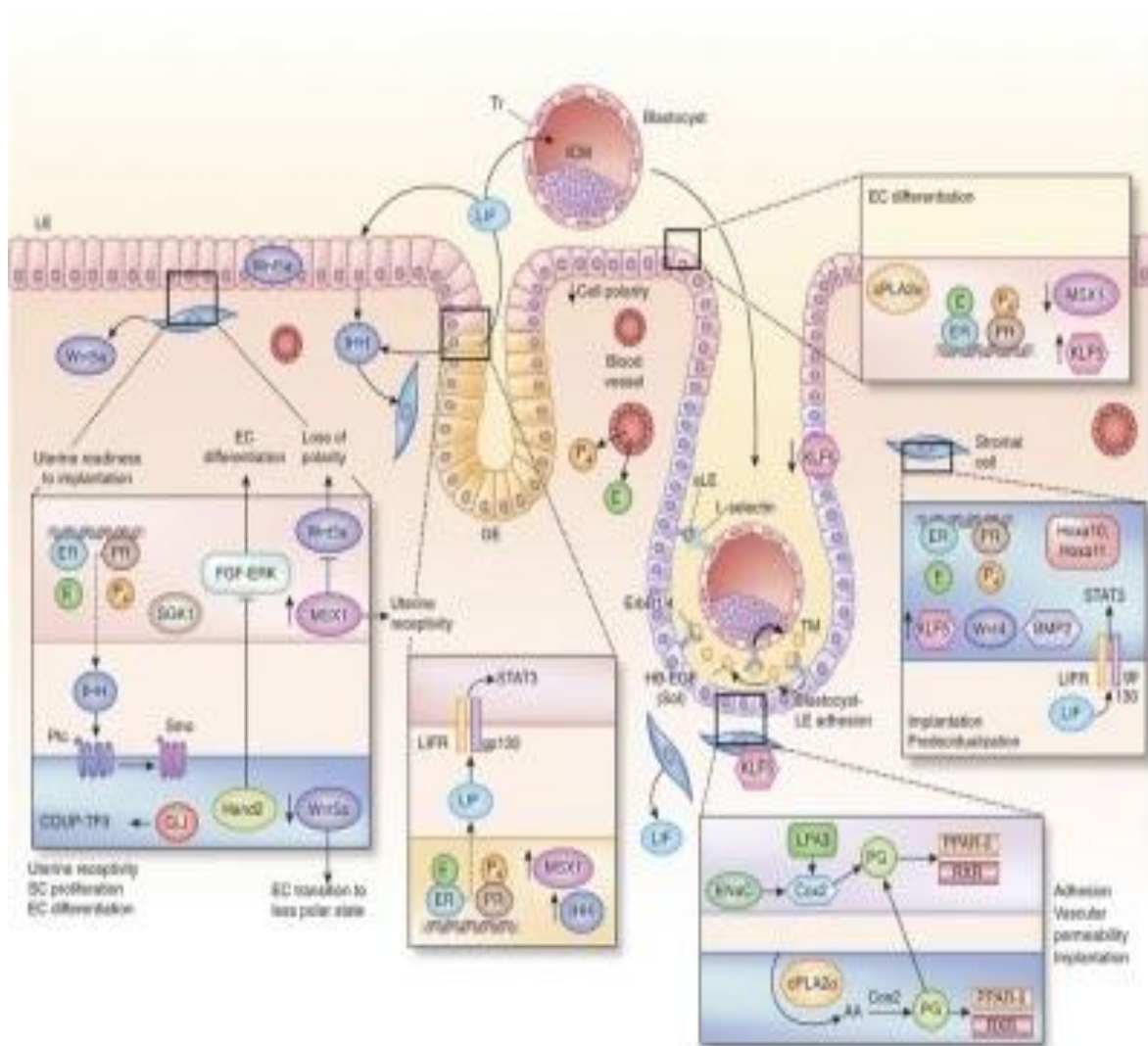
Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερή που συντίθενται μη ομοιοπολικά από μια υπομονάδα α και μια υπομονάδα β και μεταδίδουν την πληροφορία στην κυτταροσκελετική δομή των κυττάρων (38,39). Οι β-1 ιντεγκρίνες είναι παρούσες στο ενδομήτριο σε όλη τη διάρκεια του κύκλου και έχουν σημαντικό ρόλο στην επαναεπιθελίωση του ενδομητρίου μετά την έμμηνο ρύση καθώς δρουν ως υποδοχείς του κολλαγόνου (40). Εκφράζονται την 20^η – 24^η μέρα του κύκλου και είναι παρούσες στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου (40), ενώ μελέτες (41) έχουν δείξει πως βλαστοκύστες ποντικών με έλλειψη β-1 ιντεγκρινών αποτυγχάνουν να εμφυτευθούν.

Τα μέλη της οικογένειας της ιντερλευκίνης- 6 (IL6, IL11, LIF) δρουν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης (42). Εκφράζονται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, όταν δηλαδή το ενδομήτριο είναι υποδεκτικό στην εμφύτευση (43) με τους υποδοχείς της IL-6 και του LIF να εκφράζονται και από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης (44). Η έκφραση του LIF και της IL-11 ρυθμίζεται από τη χοριακή γοναδοτροπίνη στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, κάτι που ενισχύει την πρόταση ότι η έκκριση της χοριακής γοναδοτροπίνης από τη βλαστοκύστη διευκολύνει την εμφύτευση (32,45). Σύμφωνα με έρευνες ανώμαλη έκφραση IL-6 έχει αναφερθεί σε ασθενείς με καθ' εξιν αποβολές (46), ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου LIF έχουν βρεθεί σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα και επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης (47). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι γυναίκες με ισχυρή έκφραση του LIF έχουν περισσότερες πιθανότητες εμφύτευσης από ότι γυναίκες με μη επαρκή έκφραση (48).

Η β-κατενίνη εκφράζεται στο ενδομήτριο τόσο στην παραγωγική όσο και στην εκκριτική φάση αλληλεπιδρώντας με τη βλεννογυκοπρωτεΐνη -1, η οποία εκφράζεται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου και συμβάλλει στη διακυτταρική επικοινωνία (49,50). Η βλεννογυκοπρωτεΐνη -1 σε συνδυασμό με την β-κατενίνη εντοπίζονται στον πυρήνα ενώ ταυτόχρονα στο σημείο πρόσφυσης της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο δεν εκφράζεται καθόλου βλεννογλυκοπρωτεΐνη-1. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι συνδυαστικά η βλεννογλυκοπρωτεΐνη με τη β-κατενίνη διαταράσσουν τις συνδέσεις των κατερινών στον πυρήνα διευκολύνοντας τη διείσδυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (50). Οι κατερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην προσκόληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (51).

Οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη κυτταρική διαφοροποίηση με μέλη της οικογένειας να εμφανίζονται στη διαδικασία της εμφύτευσης.

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal growth factor) απαντάται στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου τόσο στην εκκριτική όσο και στην παραγωγική φάση, καθώς και στα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα (36). Ερευνητικά έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της δράσης του EGF οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση του γονιμοποιημένου ωαρίου (52). Ένα σύμπλοκο του EGF με την ηπαρίνη απαντάται σε μεγάλες ποσότητες πριν τη δημιουργία του ‘παραθύρου εμφύτευσης’ (53) ταυτόχρονα με την εμφάνιση των πινοποδίων στο ενδομήτριο (54). Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια έχουν δείξει ότι ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (IGF-1, Insulin-like growth factor 1,) συμμετέχει στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου της μήτρας (55) και η προσθήκη του σε in vitro καλλιέργειες βελτιώνει την ποιότητα του γονιμοποιημένου ωαρίου οδηγώντας σε βλαστοκύστες με μεγαλύτερο αριθμό τροφοεκτοδερμικών κυττάρων (56). Ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας τύπου 2 (IGF-2, Insulin-like growth factor 2) είναι σημαντικός για την ανάπτυξη του εμβρύου έως το στάδιο της βλαστοκύστης καθώς η απουσία του επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων της (57).



Εικόνα 9. Σχηματική συγκεντρωτική απεικόνιση των μηχανισμών (μοριακών και ορμονικών) που λαμβάνουν χώρα κατά την εμφύτευση του εμβρύου.

4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ IN VITRO

Η καλλιέργεια εμβρύων *in vitro* αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη και την κατανόηση της εμβρυογένεσης. Απαραίτητη είναι η κατανόηση των περιβαλλοντικών συνθηκών που απαιτούνται ώστε να πραγματοποιηθούν οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις του ζυγώτη και ο σχηματισμός η βλαστοκύστης. Ο μεγαλύτερος όγκος πληροφοριών για την *in vitro* καλλιέργεια εμβρύων προέρχεται από τη μελέτη εμβρύων ποντικών.

Η καλλιέργεια των εμβρύων *in vitro* γίνεται από τη στιγμή της γονιμοποίησης έως συνήθως το στάδιο της βλαστοκύστης (5^η – 6^η μέρα). Η πρώτη καλλιέργεια εμβρύου μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης έγινε το 1929 από τους Lewis και Gregory και αφορούσε γονιμοποιημένο ωάριο κουνελιού (58). Στη συνέχεια είκοσι χρόνια αργότερα, ο Hammond ήταν ο πρώτος, ο οποίος καλλιέργησε επιτυχώς έμβρυο ποντικού από το στάδιο των οχτώ κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης (59). Ενώ μόλις το 1958 ο McLaren και ο Biggers κατάφεραν να εμφυτεύσουν βλαστοκύστες από καλλιέργεια *in vitro*, οι οποίες αναπτύχθηκαν κανονικά σε υγιή έμβρυα (60).

Οι σημαντικότεροι παράγοντες για την επιτυχή ωρίμανση των εμβρύων *in vitro* είναι οι συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων καθώς και η σύσταση των καλλιεργητικών υγρών. Το περιβάλλον στο οποίο καλλιεργούνται τα έμβρυα πρέπει να είναι καλά προστατευμένο για να αποφευχθεί η εισροή βακτηριδίων. Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τις καλλιεργητικές συνθήκες των εμβρύων είναι :

- *Θερμοκρασία*. Σταθερή στους 37°
- *pH*. Σταθερά στην ουδέτερη τιμή από 7,2 έως 7,4
- *CO₂* . Η ρύθμιση του pH γίνεται με παροχή διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 5% της ατμόσφαιρας του κλιβάνου.
- *Υγρασία*. Διατηρείται σταθερή καθώς η αναπτυξιακή ικανότητα των εμβρύων επηρεάζεται σημαντικά από τα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα και του οξυγόνου.
- *Σύσταση καλλιεργητικών υγρών*. Πρόκειται για διαλύματα τα οποία περιέχουν θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των εμβρύων όπως άλατα,

γλυκόζη, αμινοξέα, βιταμίνες, πρωτεΐνες κ.α. Τα καλλιεργητικά υγρά διακρίνονται σε :

1. *Διαδοχικά καλλιεργητικά υγρά.* Περιέχουν διαφορετική σύνθεση ανά ημέρα ανάπτυξης και η χρήση τους στηρίζεται στο γεγονός ότι στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα τα έμβρυα εκτίθενται σε διαρκώς μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις ουσιών.
2. *Στατικά καλλιεργητικά υλικά.* Περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των εμβρύων, με τα έμβρυα να καλλιεργούνται σε ένα υγρό το οποίο είναι σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των εμβρύων *in vitro*.

Σε κάθε περίπτωση τα καλλιεργητικά υγρά εμπλουτίζονται με αντιβιοτικά, για την αποφυγή βακτηριακής μόλυνσης, ενώ δεν υπάρχουν έρευνες που να αποδεικνύουν ότι κάποιο από τα δύο είδη συνδέεται με την καλύτερη ανάπτυξη και ποιότητα των εμβρύων. Ένα χαρακτηριστικό εμπορικό σκεύασμα καλλιεργητικού υγρού για την ανάπτυξη εμβρύου ποντικού περιέχει άλατα (NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NaHCO₃, γαλακτικό νάτριο), αμινοξέα (αλβουμίνη) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη) (Εικόνα 10).

Number	Component	Concentration		ml of isotonic stock solution
		g/l	mM	
1	NaCl	6.384	109.23	9.15
2	KCl	0.356	4.78	0.40
3	CaCl ₂	0.189	1.71	0.20
4	KH ₂ PO ₄	0.162	1.19	0.10
5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294	1.19	0.10
6	NaHCO ₃	2.106	25.07	2.10
7	Sodium lactate	1.147	10.15	0.85
	Crystalline bovine			
8	albumin	1.000	—	—
9	Penicillin	100 U/ml	—	—
10	Streptomycin	50 µg/ml	—	—

Εικόνα 10. Παράδειγμα σύστασης καλλιεργητικού υγρού για *in vitro* ανάπτυξη εμβρύου ποντικού στα στάδια των δύο κυττάρων.

Η καλλιέργεια των εμβρύων *in vitro* χρησιμοποιείται ευρέως στις διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και προγεννητικού – προεμφυτευτικού ελέγχου. Πέραν όμως της αμιγώς ιατρικής χρήσης της, η διαδικασία καλλιέργειας *in vitro* συμβάλει σημαντικά στην έρευνα των σταδίων βιολογικής ανάπτυξης των εμβρύων με την καλλιέργεια εμβρύων πειραματόζων (ποντίκι, επίμυς, βάτραχος, zebra fish κ.λπ.) οδηγώντας στη δημιουργία ενός νέου κλάδου της βιολογίας, τη Βιολογία Ανάπτυξης (61).

Η Βιολογία Ανάπτυξης συνδυάζοντας τη Μοριακή και την Κυτταρική Βιολογία με τη Γενετική και τη Μορφολογία έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των ανθρώπινων εμβρύων και των λειτουργιών τους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τομέα που αναπτύχθηκε χάρη στη Βιολογία Ανάπτυξης, με την κατανόηση του γεγονότος ότι τα έμβρυα είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε βλάβες κατά τη περίοδο της οργανογένεσης, είναι η Τερατολογία (Teratology), η οποία μελετά τις επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων στα έμβρυα. Επιπλέον, σημαντική είναι η συμβολή της τόσο στην λειτουργική γονιδιωματική όσο και στην λειτουργική πρωτεϊνοματική καθώς η καλλιέργεια των εμβρύων και η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία νέων στοχευμένων θεραπειών(61).

Παράλληλα, μια από τις σημαντικότερες προσφορές της καλλιέργειας εμβρύων *in vitro* είναι και η δυνατότητα καλλιέργειας εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, η οποία βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης αλλά και βρήκε εφαρμογή στην στοχευμένη διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστοκυττάρων τόσο στην Αναγεννητική Ιατρική όσο και την Κυτταρική Θεραπεία (14).

5. Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΦΛΟΙΟΤΡΟΠΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ, CRH (CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE)

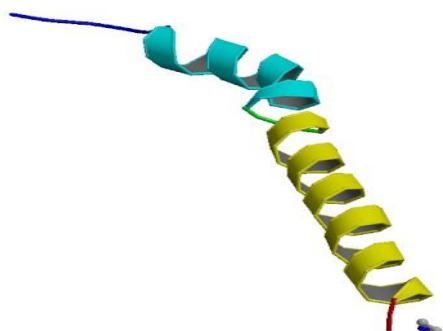
5.1. CRH, ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η CRH (Corticotropin-Releasing Hormone, Κορτικοεκλιτίνη) είναι μια πεπτιδική ορμόνη, η οποία παράγεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου.

Διεγείρει την έκκριση της POMC (Pro-opiomelanocortin, Προοπιομελανοκορτίνης) από τα κορτικοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Στη συνέχεια, η POMC διασπάται σε :

- N-τελικό αμινοξύ της προοπιομελανοκορτίνης (N-Terminal Peptide, NPP),
- γ-μελανοτροπίνη (γ-Melanotropin, γ-MSH)
- κορτικοτροπίνη ή αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη (Adrenocorticotropin Hormone, ACTH)(62)

Η CRH μεταφέρεται από τον υποθάλαμο στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, μέσω του πυλαίου αγγειακού συστήματος, όπου δρα στα κορτικοφόρα κύτταρα επάγοντας την έκκριση κορτικοτροπίνης (ACTH) (11).



Πρόκειται για ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που αποτελείται από ένα καρβοξυτελικό άκρο, ένα αμινοτελικό άκρο και μια ενδιάμεση περιοχή (Εικόνα 11) (63).

Εικόνα 11. Μοριακή δομή του μορίου της CRH.

Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευθεί δύο υποδοχείς της CRH μέσω των οποίων ασκεί τις δράσεις της, ο CRH-R1 (Corticotrophin-Releasing Hormone - Receptor 1, υποδοχέας 1 της κορτικοεκλυτίνης) και ο CRH-R2 (Corticotrophin-Releasing Hormone - Receptor 2, υποδοχέας 2 της κορτικοεκλυτίνης) (64), οι οποίοι κωδικοποιούνται από γονίδια του 7^{ου} και 17^{ου} χρωμοσώματος αντίστοιχα (65), τα οποία παρουσιάζουν ομολογία περίπου 70%. Το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας (80-85%), παρουσιάζεται στο διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα τους· ενώ το εξωκυττάριο τμήμα παρουσιάζει ομολογία μόλις 40% (66).

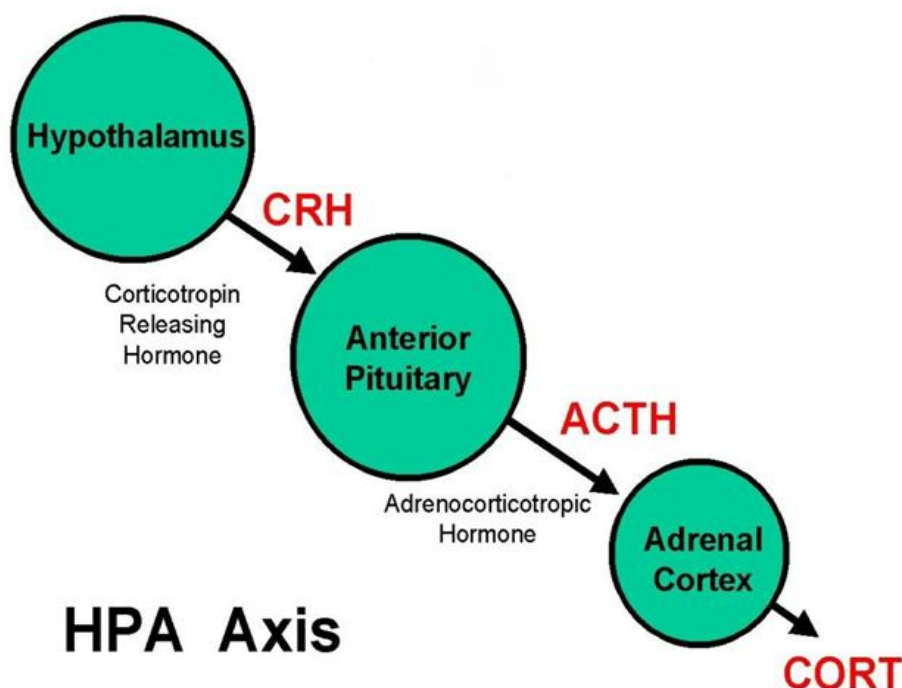
Υπάρχει και ένας τρίτος υποδοχέας της κορτικοεκλυτίνης είναι ο CRH-R3 (Corticotropin-Releasing Hormone- Receptor 3, υποδοχέας 3 της κορτικοεκλυτίνης), ο οποίος παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον CRH-R1 και έχει παρατηρηθεί σε ορισμένα είδη όπως το γατόψαρο (67). Η κορτικοεκλυτίνη εντοπίζεται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, στο περιφερικό νευρικό σύστημα, σε ιστούς πολλών συστημάτων (γαστρεντερικού, ανοσολογικού, αναπαραγωγικού) αλλά και στον πλακούντα (68,69).

5.2. CRH, ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ-ΥΠΟΦΥΣΗ-ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ (HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS/HPA AXIS) ΚΑΙ STRESS

Ο άξονας Υποθάλαμος – Υπόφυση – Επινεφρίδια (Hypothalamic – Pituitary – Adrenal axis, HPA axis) είναι ο ενδοκρινικός άξονας, ο οποίος ρυθμίζει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια μέσω αλληλεπιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται από εκλυόμενους νευροδιαβιβαστές και νευρικά ερεθίσματα (70).

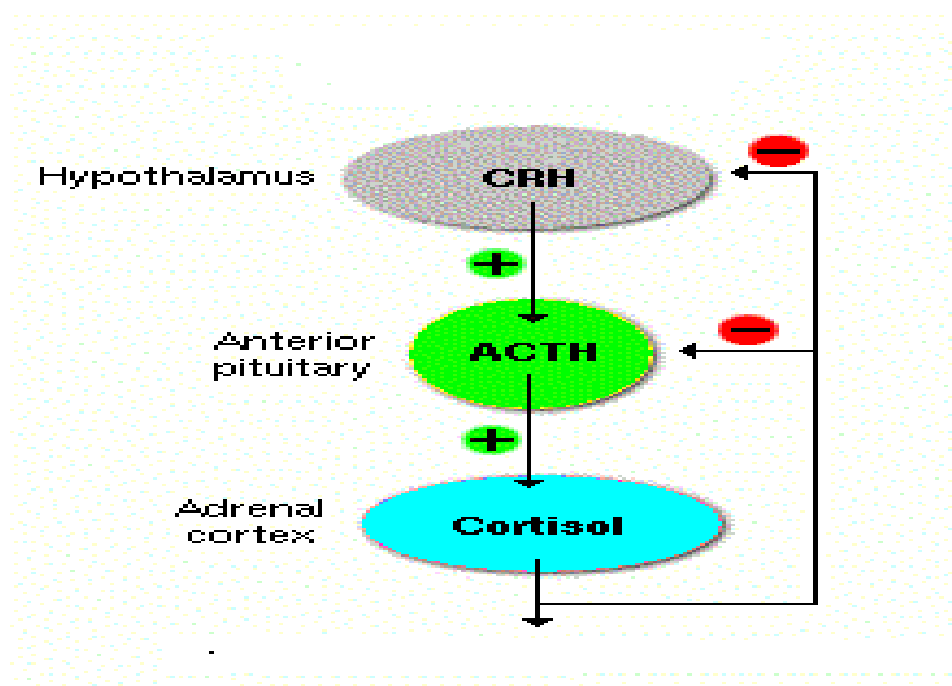
Ο υποθάλαμος είναι περιοχή του εγκεφάλου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο πολλών βασικών νευρικών και ενδοκρινικών λειτουργιών και συνδέεται με την υπόφυση (η οποία βρίσκεται κάτω από τον υποθάλαμο, μέσα στο τούρκικο εφίππιο) μέσω του χοανοειδούς δακτυλίου. Η υπόφυση απαρτίζεται από δύο λοβούς τον πρόσθιο και τον οπίσθιο. Τέλος, τα επινεφρίδια είναι ένα ζεύγος ενδοκρινών αδένων με κάθε αδέν να αποτελείται εξωτερικά από τον επινεφριδιακό φλοιό (ο οποίος εκκρίνει στεροειδείς ορμόνες) και τον επινεφριδιακό μυελό (ο οποίος εκκρίνει αμινορμόνες) (71).

Η κορτικοεκλυτίνη (CRH) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο και στη συνέχεια διεγείρει την έκκριση κορτικοτροπίνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση. Η ACTH με τη σειρά της οδηγεί σε έκκριση κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων (11) (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Δράσεις ορμονών (CRH και ACTH) στον HPA άξονα

Πιο συγκεκριμένα η CRH εισέρχεται στις πυλαίες φλέβες της υπόφυσης και μέσω αυτών μεταφέρεται στα κύτταρα που εκκρίνουν ACTH. Μόλις συνδεθεί με τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης διεγείρει τη σύνθεση ACTH όπως και την έκκρισή της από τα εκκριτικά κοκκία, χρησιμοποιώντας το ασβέστιο και το κυκλικό AMP (cAMP) ως δεύτερα μηνύματα (72). Η ACTH που εκκρίνεται ερεθίζει τον φλοιό των επινεφριδίων για να εκκρίνει κορτιζόλη. Η κορτιζόλη που παράγεται έχει επιπλέον και αρνητικοτροφοδοτικό έλεγχο πάνω στο σύστημα CRH-ACTH-κορτιζόλη του HPA άξονα καθώς δρα τόσο στον υποθάλαμο αναστέλλοντας την έκκριση CRH όσο και στην πρόσθια υπόφυση μειώνοντας την απόκρισή της στη CRH και επομένως τη σύνθεση και έκκριση της ACTH (Εικόνα 13) (11).



Εικόνα 13. Σύστημα CRH-ACTH-κορτιζόλης στον HPA άξονα. Δράση της CRH στην έκκριση ACTH και κορτιζόλης. Ανατροφοδοτικός έλεγχος της κορτιζόλης πάνω στο σύστημα.

Η έκκριση της κορτιζόλης γίνεται κατά ώσεις και εμφανίζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας. Αυτός ο τρόπος έκφρασης οφείλεται στην κατά παλμούς έκκριση της ACTH και της CRH αντίστοιχα. Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τον ημερήσιο ρυθμό έκφρασης της κορτιζόλης είναι το στρες (73).

Η κορτιζόλη είναι απαραίτητη για την επιβίωση σε καταστάσεις στρες για αυτό και ο κύριος ρόλος του HPA άξονα είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού μετά από έκθεση σε στρες. Η ενεργοποίηση του άξονα οδηγεί σε μια σειρά από αλλαγές τόσο στο περιφερικό νευρικό σύστημα όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα και γίνεται σε κεντρικό μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

Αρχικά, σε *κεντρικό επίπεδο*, όπως αναφέρθηκε, η απάντηση στο στρες γίνεται από τους νευρώνες της CRH μέσω του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Η κορτιζόλη, η οποία παράγεται από τα επινεφρίδια και απελευθερώνεται στο πλάσμα ασκεί αρνητικοτροφοδοτικό έλεγχο πάνω στο ίδιο το σύστημα του HPA άξονα δρώντας στον υποθάλαμο αναστέλλοντας την έκκριση της CRH αλλά και στην πρόσθια υπόφυση μειώνοντας την απόκριση στη CRH (Εικόνα 13) (11).

Σε *μοριακό επίπεδο*, αμέσως μετά την ενεργοποίηση του άξονα εκκρίνονται γλυκοκορτικοειδή, τα οποία καταστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών (70). Άμεση είναι η καταστολή των γονιδίων της ιντερλευκίνης-6, ενώ έμμεσα καταστέλλεται ο προφλεγμονώδης πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB, πυρηνικός παράγοντας ενίσχυσης κάππα ελαφριών αλυσίδων της ενεργοποίησης B κυττάρων) (70).

Τέλος σε *κυτταρικό επίπεδο*, η απάντηση στο στρες γίνεται και πάλι μέσω της παραγωγής των γλυκοκορτικοειδών τα οποία δρουν σε όλους τους τύπους λευκών κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δράσης τους είναι η λεμφόλυση και η ανακατανομή των T-λεμφοκυττάρων οδηγώντας τον οργανισμό σε λεμφοπενία (74). Επιπλέον, μείωση παρατηρείται τόσο στα ηωσινόφιλα όσο και στα βασεόφιλα με 5αποτέλεσμα να διαταράσσεται η απελευθέρωση της ισταμίνης (75). Αντίθετα, ο αριθμός των ουδετερόφιλων αυξάνεται με αποτέλεσμα να δυσχεραίνει η μετανάστευση τους στα σημεία φλεγμονής (74).

5.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ CRH

Οι υποδοχείς της CRH ανήκουν στη κατηγορία των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Οι υποδοχείς αυτοί αφού συνδεθούν με μια ή περισσότερες G πρωτεΐνες οδηγούν σε αναδιαμόρφωση του μεμβρανικού υποδοχέα.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η συνδεδεμένη G πρωτεΐνη, συγκεκριμένα η Gs, να ενεργοποιεί την αδενλική κυκλάση (μεμβρανικό ένζυμο). Η ενεργοποιημένη, πλέον, αδενλική κυκλάση καταλύσει τη μετατροπή του κυτοσολικού ATP (Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη) σε cAMP (cyclic Adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη), το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A, προκαλώντας αλληπάλληλες φωσφορυλιώσεις οδηγώντας στην έκκριση της ACTH (72). Όπως προαναφέρθηκε η CRH έχει δύο κύριους υποδοχείς τον CRH-R1 και τον CRH-R2 (Εικόνα 14).

	CRH-R1	CRH-R2
Chromosome	17q21.31	7p14.3
Amino acids	415-446	397-438
Splice Variants	CRH-R1a CRH-R1c, e, h: (N-terminal variants) CRH-R1b, f (intracellular variants) CRH-R1g, d: (transmembrane variants)	CRH-R2a CRH-R2b: (N-terminal variant) CRH-R2c: (N-terminal variant)
Central Distribution	Anterior pituitary Lateral hypothalamic nuclei Locus ceruleus Hippocampus/amygdala Thalamus Neocortex Cerebellum	Ventromedial hypothalamic nuclei Amygdala Bed nucleus Stria terminalis Lateral septum Dorsal raphe Brain stem
Peripheral Distribution	Adrenal gland Ovary/testis Skin	Peripheral vasculature Heart/skeletal muscles Gastrointestinal tract
Endogenous ligands	CRH Urocortin 1	Urocortin 1 Urocortin 2 and 3

Εικόνα 14. Πίνακας συνοπτικής παρουσίασης και σύγκρισης των υποδοχέων της CRH CRH-R1 και CRH-R2.

Η CRH ανήκει στην ίδια οικογένεια με τις ουροκορτίνες.

- Ουροκορτίνη 1 (UCN1). Αποτελείται από 40 αμινοξέα και η δομή της παρουσιάζει πολλές ομοιότητες δομικά με αυτό της CRH (76). Το μόριο εκφράζεται σε πολλές περιοχές όπως την υπόφυση, τον πλακούντα, τα επινεφρίδια και τον θύμο αδέν (76-79). Λειτουργεί ως ισχυρός επαγωγέας της έκκρισης της ACTH *in vitro* (80).
- Ουροκορτίνη 2 (UCN2). Αποτελείται από 38 αμινοξέα και εκφράζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (81), αλλά εμφανίζεται και σε άλλες περιοχές όπως το ενδομήτριο (82). Εμπλέκεται σε λειτουργίες όπως η καταστολή της όρεξης και η αγγειοδιασταλτική δράση (83).
- Ουροκορτίνη 3(UCN3). Αποτελείται από 38 αμινοξέα και εκφράζεται σε πολλές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (84), ενώ έχει παρόμοιες δράσεις με τον UCN2.

5.3.1. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE-RECEPTOR 1 **(CRH – R1)**

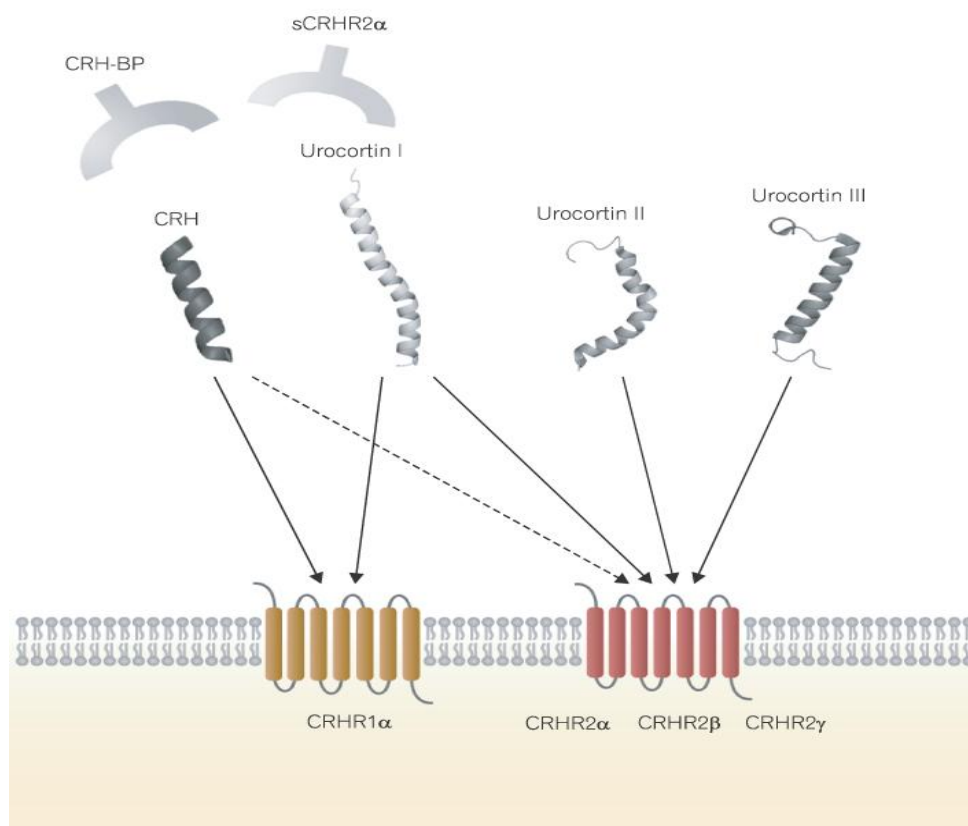
Ο CRH-R1, ο οποίος κωδικοποιείται από γονίδια του 17^{ου} χρωμοσώματος και είναι ο κύριος τύπος στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, είναι αυτός που μεσολαβεί για την δράση της CRH στην έκκριση της ACTH. Ο CRH-R1 αποτελείται από 415-420 αμινοξέα και έχει 8 ισομορφές τις CRH-R1α, CRH-R1β, CRH-R1c, CRH-R1d, CRH-R1e, CRH-R1f, CRH-R1g και CRH-R1h (65-68,85).

Οι υπότυποι του CRH-R1 εκφράζονται σε πολλούς ιστούς του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Πιο ειδικά, στο μυομήτριο μιας γυναίκας εκφράζονται οι CRFR1α και CRFR1β, ενώ στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ανιχνεύονται επιπρόσθετα στο μυομήτριο οι CRFR1c και CRFR1d (64). Παράλληλα, οι CRFR1α, CRFR1c και CRFR1d έχουν εντοπιστεί σε λίγα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, στο φθαρτό καθώς και στις εμβρυικές μεμβράνες (86). Τέλος στην εξωλαχνική τροφοβλάστη εκφράζεται ο CRFR1, χωρίς όμως να διακρίνεται κάποιος συγκεκριμένος υπότυπος. Επιπλέον, εκφράζεται στο γαστρεντερικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και στο δέρμα και στο λιπώδη ιστό (87). Η CRH και η ουροκορτίνη 1 δεσμεύονται κυρίως στον υποδοχέα 1, με τη CRH-BP (CRH-Binding protein, CRH-δεσμευτική πρωτεΐνη) και τον Scrhr2α (διαλυτή ισομορφή του CRHR2) να προσδένονται αντιστοίχως στη CRH και την ουροκορτίνη 1 ρυθμίζοντας τη δράση των προσδετών (Εικόνα 15).

5.3.2. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE-RECEPTOR 2 **(CRH – R2)**

Σε αντίθεση με τον CRH-R1, ο CRH –R2 κωδικοποιείται από γονίδια του 7^{ου} χρωμοσώματος και αποτελείται από 397-438 αμινοξέα. Έχει τρεις ισομορφές CRHR2α, CRHR2β και CRHR2γ (65) οι οποίες εμφανίζονται σε πολλούς ιστούς του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Πιο ειδικά, στο μυομήτριο μιας γυναίκας εμφανίζεται ο CRFR2β ενώ μετά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, στο μυομήτριο εκφράζεται ο CRFR2α (86). Επιπλέον, ο CRFR2β έχει εντοπιστεί σε λίγα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, στο φθαρτό και στις εμβρυικές μεμβράνες, ενώ τέλος, στα αγγεία των λαχνών έχει εντοπιστεί μόνο ο CRFR2β (65).

Αντίθετα με τον CRH-R1, ο CRH-R2 μπορεί και δεσμεύει όλες τις ουροκορτίνες, με την ουροκορτίνη 2 και 3 να δεσμεύονται αποκλειστικά σε αυτόν (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Στερεοδιαμόρφωση των δύο υποδοχέων της CRH καθώς και οι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν.

5.3.3. CORTICOTROPIN RELEASING HORMONE - BINDING PROTEIN (CRH-BP)

Η δράση της CRH τροποποιείται από την CRH-BP (corticotropin releasing hormone Binding Protein, CRH δεσμευτική πρωτεΐνη), μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία δεσμεύει και απενεργοποιεί τη CRH, ρυθμίζοντας την ικανότητά πρόσδεσής της (88). Εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου, αλλά συντίθεται και στον πλακούντα, το ήπαρ και τα επινεφρίδια (89). Η πρωτεΐνη αυτή δρα τροποποιώντας την ενεργοποίηση του HPA άξονα, καθώς περιορίζει την διαθεσιμότητα του ελεύθερου προσδέτη (CRH) και επάγει την ενδοκύττωσή του μη επιτρέποντας την πρόσδεση στους υποδοχείς αποτρέποντας επομένως την έκκριση της ACTH (88).

5.3.4 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ CRH ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Πρόκειται για ειδικούς τύπους ανταγωνιστή υποδοχέα (receptor antagonist) οι οποίοι μπλοκάρουν τις θέσεις πρόσδεσης για τη CRH. Είναι συνθετικοί και έχουν συνήθως πεπτιδική βάση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της CRH, οι οποίοι έχουν θεραπευτικές προοπτικές (90), ενώ εκτεταμένη έρευνα γίνεται για την πιθανή χρήση τους σε ασθένειες που σχετίζονται με το στρες (91) (εικόνα 16).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ανταλαρμίνη (παράγωγο πυρολοπυραμιδίνης, μη πεπτιδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα R1 της CRH), η οποία εκτός από την καταστολή όλων των φαινομένων που επάγονται από το στρες καταστέλλει και τη φλεγμονή, ενώ η χρόνια χρήση της δε συνοδεύεται από επινεφριδική ανεπάρκεια (92). Η χορήγηση ανταλαρμίνης σε επίμυς εμποδίζει την εμφύτευση του εμβρύου περιορίζοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση του ενδομητρίου κατά τη διαδικασία της διείσδυσης της βλαστοκύστης (86). Η ανταλαρμίνη και τα ανάλογά της πιθανώς εκπροσωπούν μια νέα τάξη μη στεροειδών φαρμάκων που δίνουν τη δυνατότητα αναστολής της εγκυμοσύνης σε πολύ αρχικά στάδια (93).

Disorder	
CRH-R1 antagonists	CRH-R2 antagonists
Anxiety	Cancer and AIDS-induced anorexia and cachexia
Melancholic depression	Atypical depression
Insomnia	Chronic pain and fatigue syndromes
Narcotic withdrawal	Excessive daytime sleepiness
Prevention of depression, PTSD (anti-excitotoxicity/kindling)	Hypotension
Neurodegeneration (anti-excitotoxicity)	
Epilepsy (anti-kindling)	
Autoimmune inflammatory disorders	
Allergy (asthma, eczema, urticaria)	
Migraine headache	
Irritable bowel disease	
Peptic ulcer	
Stress-induced metabolic syndrome manifestations, osteoporosis	
Stress-induced menstrual irregularities, infertility	
Prevention of premature labor	
Adjunct therapy in congenital adrenal hyperplasia	
Pituitary ACTH-secreting tumors	

PTSD, post traumatic stress disorder; ACTH, adrenocorticotrophic hormone.

Εικόνα 16. Πιθανές δράσεις των ανταγωνιστών των υποδοχέων 1 και 2 της CRH.

5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με επαγωγή φλεγμονής έδειξαν παρουσία της CRH σε φλεγμονώδες έκκριμα (94), αλλά και σε περιφερικούς ιστούς σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής (95), ενώ πειραματόζωα με μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης είναι περισσότερο επιρρεπή σε φλεγμονώδεις νόσους (96).

Μετά από ανοσοδιέγερση απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κυτοκίνες, όπως η Ιντερλευκίνη- 6 και η Ιντερλευκίνη- 1, οι οποίες ενεργοποιούν τον HPA άξονα και άρα την έκκριση CRH, ACTH και γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ισχυρά αντι-φλεγμονώδη φάρμακα με ειδική δράση (97). Δεσμεύονται στον υποδοχέα και ως σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μετακινούνται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και δεσμεύονται σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου στόχου τροποποιώντας τη λειτουργία του ή αποσταθεροποιώντας το mRNA του (98). Το μεγαλύτερο μέρος της αντι-φλεγμονώδους δράσης των γλυκοκορτικοειδών είναι η αλληλεπίδρασή τους με τον NF-κB, ο οποίος αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα στην έκφραση πολλών φλεγμονωδών γονιδίων, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η έκφραση τους (99). Ένας ακόμα μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών για καταστολή της φλεγμονής είναι η εμπόδιση της μετακίνησης των λεμφοκυττάρων και η αναστολή σύνθεσης των λεμφοκινών, οι οποίες αποτελούν παράγοντα διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων (100), με αποτέλεσμα ο οργανισμός να οδηγείται σε λεμφοπενία.

Πέραν της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών, η ενεργοποίηση του HPA άξονα οδηγεί σε έκλυση κατεχολαμινών τόσο από τον φλοιό των επινεφριδίων όσο και από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, η απουσία των οποίων έχει συνυφανθεί με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (100).

Τέλος, διεγερτική είναι η δράση της CRH στην παραγωγή Ιντερλευκινών (IL-1, IL-2, IL-6), οι οποίες ενεργοποιούν τον HPA άξονα αλλά και τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων (101,102).

5.5. ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ, CRH ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η CRH όπως και οι υποδοχείς της εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού (ενδομήτριο, μυομήτριο) καθώς και στον πλακούντα (φθαρτό, λαχνωτή και εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, ανοσοκύτταρα και αγγεία της περιοχής) (103), ενώ εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της κύησης με τη συγκέντρωσή της να αυξάνει με εκθετικό ρυθμό. Συγκεκριμένα, παρατηρείτε σημαντική αύξηση κατά το τέλος του πρώτου τριμήνου λόγω του πλακούντα και φτάνει σε υψηλά επίπεδα κατά το τρίτο τρίμηνο ρυθμίζοντας τον τοκετό, με τις τιμές να επανέρχονται σε μη ανιχνεύσιμες μετά την απομάκρυνση του πλακούντα (104,105). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι οι υποδοχείς της CRH σε μη-έγκυο μήτρα καθώς και στα πρώτα στάδια της κύησης, ασκούν μυοχαλαρωτική δράση στο μυομήτριο ενώ αντίθετα, στα τελευταία στάδια της κύησης ο ρόλος τους στρέφεται προς τη μυοσύσπαση (106,107).

Η μήτρα εκφράζει το γονίδιο της CRH στα επιθυλιακά της κύτταρα, ενώ από το στρώμα εκφράζεται μόνο κατά τη φθαρτοποίηση αν και η ύπαρξη υποδοχέων τόσο στα επιθυλιακά όσο και στα κύτταρα του στρώματος υποδηλώνει τοπική δράση (86).

Η CRH, λοιπόν όχι μόνο συμμετέχει στη διαδικασία της φθαρτοποίησης αλλά έχει και ενεργό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου καθώς εμπλέκεται στο σύστημα Fas/FasL (Fas/Fas ligand), το οποίο συμβάλει στη μη αποβολή του εμβρύου (108). Στο δεύτερο μισό της κύησης η CRH οδηγεί σε έκλυση θειικής-δεϊδροεπιανδροστερόνης (Dehydroepiandrosterone sulfate, DHEA-S) αλλά και σε αυξημένη παραγωγή κορτιζόλης. Η DHEA-S χρησιμοποιείται από τον πλακούντα για την παραγωγή οιστρογόνων (109,110) τα οποία μαζί με τις προσταγλαδίνες, οι οποίες εκκρίνονται λόγω της παρουσίας CRH έχουν ως αποτέλεσμα τη σύσπαση των μυϊκών ινών του ενδομητρίου και κατ' επέκταση την έναρξη του τοκετού (107).

5.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι οι τιμές της CRH στην ωοθήκη είναι υψηλότερες σε ποντίκια αναπαραγωγικής ηλικίας σε σχέση με γηραιότερα (111) κάτι που υποδηλώνει ότι η έκφρασή της είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών. Επιπλέον, πειράματα σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες, διαταραχή που σχετίζεται με μη σωστή ωοθηκική λειτουργία και επομένως την ελαττωμένη αναπαραγωγική λειτουργία, έδειξαν χαμηλότερες τιμές CRH σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (112), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η έκφραση της CRH είναι καθοριστικός παράγοντας σωστής ωοθηκικής λειτουργίας.

Μετάγραφα της CRH αλλά και του υποδοχέα της CRH-R1 έχουν ανιχνευθεί στα στρωματικά ωοθηκικά κύτταρα του ανθρώπου με έντονη έκφραση στα ώριμα ωοθυλάκια (113) κάτι που σε συνδυασμό με τη δράση της CRH σε φλεγμονώδη αντίδραση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η CRH συμμετέχει στην ωρίμανση των ωοθυλακίων, την ωορρηξία και την υποστροφή του ωχρού σωματίου, φαινόμενα τα οποία παρουσιάζονται ως φλεγμονώδη.

5.7. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ CRH

5.7.1. CRH ΚΑΙ ΦΘΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Φθαρτοποίηση ονομάζεται η διαφοροποίηση του στρώματος του ενδομητρίου σε φθαρτό και αποτελεί μια απαραίτητη διαδικασία για την επιτυχία της εμφύτευσης. Κύρια ορμόνη της διαδικασίας αυτής είναι η προγεστερόνη.

Η CRH συμμετέχει επίσης στη διαδικασία της φθαρτοποίησης καθώς τόσο η ίδια όσο και ο υποδοχέας της CRH-R1 έχουν εμφανιστεί σε στρωματικά κύτταρα της μήτρας (114). Η CRH λόγω της ενισχυτικής δράσης που έχει στην προγεστερόνη (115) δρα επαγωγικά στη διαδικασία της φθαρτοποίησης, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει την έκφραση της IL-1, της IL-6 και της προσταγλαδίνης E₂ (Prostaglandin E₂-PGE₂) (116,117), ουσιών απαραίτητων για τη διαδικασία της φθαρτοποίησης. Πειράματα επώασης στρωματικών κυττάρων με CRH έχουν δείξει επαγωγή έκλυσης IL-6 και καταστολή της PGE₂ (118).

5.7.2. CRH ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ

Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η αναστολή της CRH οδηγεί σε μείωση των θέσεων εμφύτευσης (119,120). Η CRH εκφράζεται τόσο στα κύτταρα του φθαρτού όσο και στην εμβρυϊκή τροφοβλάστη. Η CRH που εκκρίνεται επάγει, μέσω του υποδοχέα της CRH-R1 τη σύνθεση της πρωτεΐνης FasL, μιας προαποπτωτικής κυτταρίνης, η οποία μέσω της σύνδεσής της με την πρωτεΐνη Fas και τη δημιουργία του συστήματος Fas/FasL προκαλεί την απόπτωση εξασφαλίζει την επιτυχία της εμφύτευσης (αναλυτικά στην παράγραφο 5.8)

Πέραν της FasL η CRH συμβάλει στη διαδικασία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης μέσω της διεγερτικής δράσης που έχει στην έκλυση της IL-1 και της IL-6 παράγοντες οι οποίοι εκφράζονται από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης και όπως αναφέρθηκε νωρίτερα λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους συμβάλουν καθοριστικά στη διαδικασία της εμφύτευσης.

5.7.3. CRH ΚΑΙ ΕΙΣΒΟΛΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ

Η τροφοβλάστη διακρίνεται σε:

- *λαχνωτή τροφοβλάστη*. Αποτελεί το επιθηλιακό κάλυμμα των λαχνών
- *εξωλαχνωτή τροφοβλάστη*. Διεισδύει στο μητρικό ιστό και έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα του φθαρτού

Η CRH εκφράζεται τόσο στη λαχνωτή όσο και στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη. Η εισβολή της τροφοβλάστης όπως και όλη η διαδικασία της εμφύτευσης έχει τα χαρακτηριστικά φλεγμονώδους αντίδρασης. Η CRH που παράγεται από το φθαρτό και την τροφοβλάστη (86) εκφράζει το FasL και μέσω του συστήματος Fas/FasL (αναλυτικά στην παράγραφο 5.8) , οδηγεί στην καταστολή της ανοσοαντίδρασης και την επιτυχία της εμφύτευσης, εμποδίζοντας την απόρριψη.

Επίσης, η CRH οδηγεί στη έκκριση ιντερλευκινών, μόρια τα οποία λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους συμμετέχουν στην εμφύτευση (42), ενώ ρυθμίζει και την έκκριση προσταγλαδινών (118).

5.8. CRH ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑ FAS/FASL

Η πρωτεΐνη Fas είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια TNF (Tumor Necrosis Factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων) (121). Εκφράζεται στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, ενώ εμφανίζεται και σε πολλά άλλα όργανα (ήπαρ, καρδιά, νεφρά) (122). Αποτελείται από εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια περιοχή, με την ενδοκυττάρια να περιέχει αριθμό πρωτεϊνικών ακολουθιών οι οποίες χρησιμεύουν ως θέσεις αναγνώρισης από μόρια συνδέτες (ligands) (123).

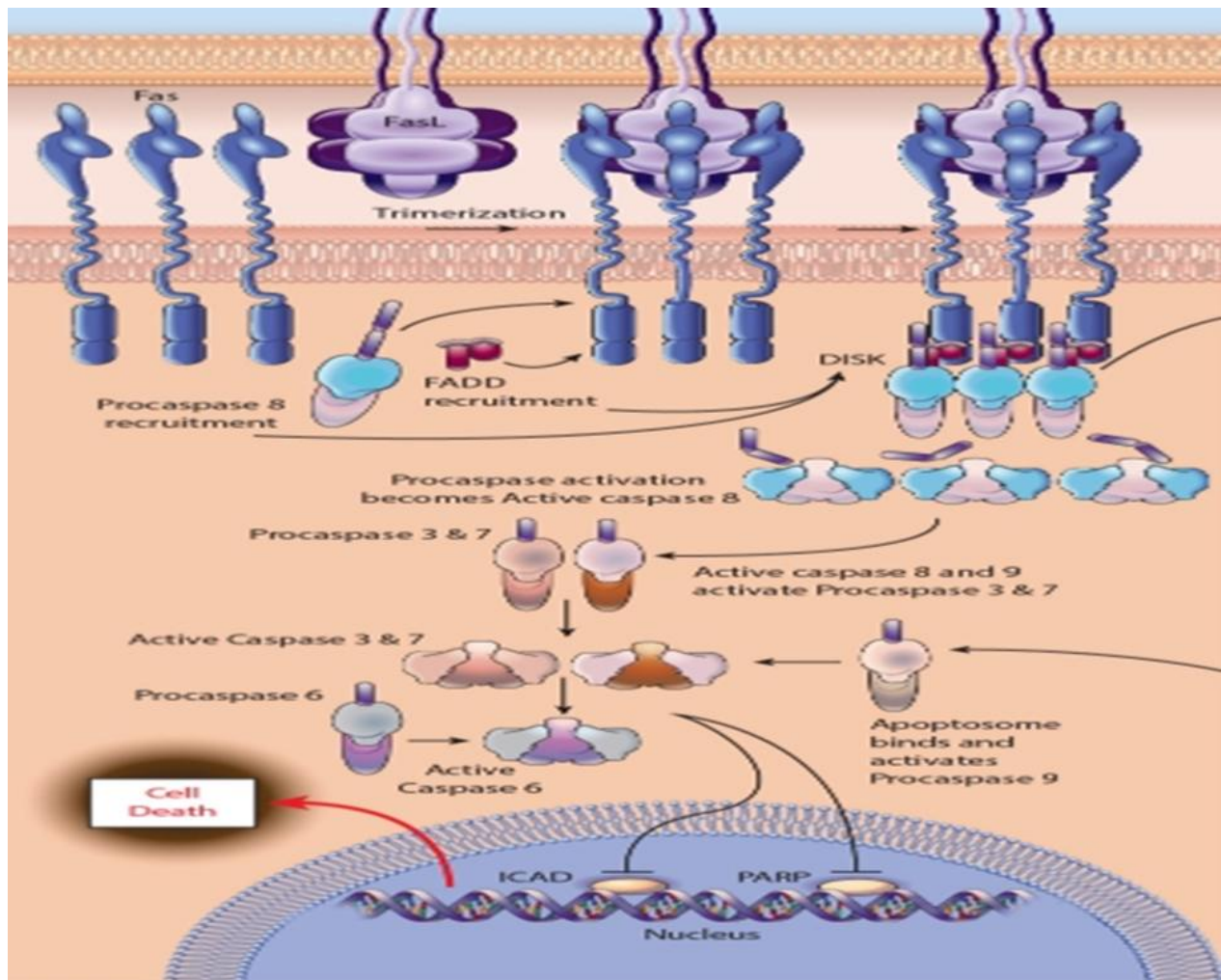
Η FasL (Fas ligand, συνδέτης της πρωτεΐνης Fas) είναι επίσης διαμεμβρανική πρωτεΐνη της ίδιας οικογένειας (124), η οποία εκφράζεται στα T- λεμφοκύτταρα (125) αλλά και σε περιοχές οι οποίες θεωρούνται προστατευμένες από το ανοσολογικό σύστημα όπως το μάτι, ο πλακούντας και η μήτρα (126,127). Ενεργοποιείται από το γονίδιο Fas ligand και αποτελεί προσδετικό μόριο του υποδοχέα Fas.

Κατά την ανοσολογική απόκριση και την αλληλεπίδραση των κυττάρων η FasL του ενός κυττάρου προσδένεται στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Fas ενός άλλου κυττάρου, δημιουργώντας το σύμπλεγμα Fas/FasL και ενεργοποιώντας τελικά την απόπτωση του δεύτερου.

Ο υποδοχέας Fas συνδέεται ενδοκυττάρια με την FADD (Fas-Associated protein with Death Domain , πρωτεΐνη Fas σχετιζόμενη με την περιοχή θανάτου). Μόλις η FasL συνδεθεί στον υποδοχέα Fas ενεργοποιείται η FADD και συνδέεται με την πρωτεΐνη FADD Adapter (Fas-Associated protein with Death Domain Adapter, πρωτεΐνη Fas σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της περιοχής θανάτου), η οποία φέρει την περιοχή DED (Death Effector Domain, περιοχή επίδρασης θανάτου). Το σύμπλεγμα με τη σειρά του συνδέεται στην προκασπάση-8 ή την προκασπάση-10 σχηματίζοντας το σύμπλεγμα DISC (Death-including Signaling Complex, σύμπλεγμα σηματοδότησης θανάτου). Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη διάσπαση των προκασπασών και τη δημιουργία ενεργών κασπασών 8 και 10 αντίστοιχα (128).

Οι κασπάσες έχουν σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση των αποπτωτικών σημάτων και διακρίνονται σε εναρκτήριες (ενεργές) και σε κασπάσες καθοριστές. Δρουν αποκόπτοντας τις πρωτεΐνες στο καρβοξυτελικό τμήμα των καταλοίπων του ασπαρτικού οξέως (129). Οι κασπάσες 8 και 10 ανήκουν στις εναρκτήριες κασπάσες

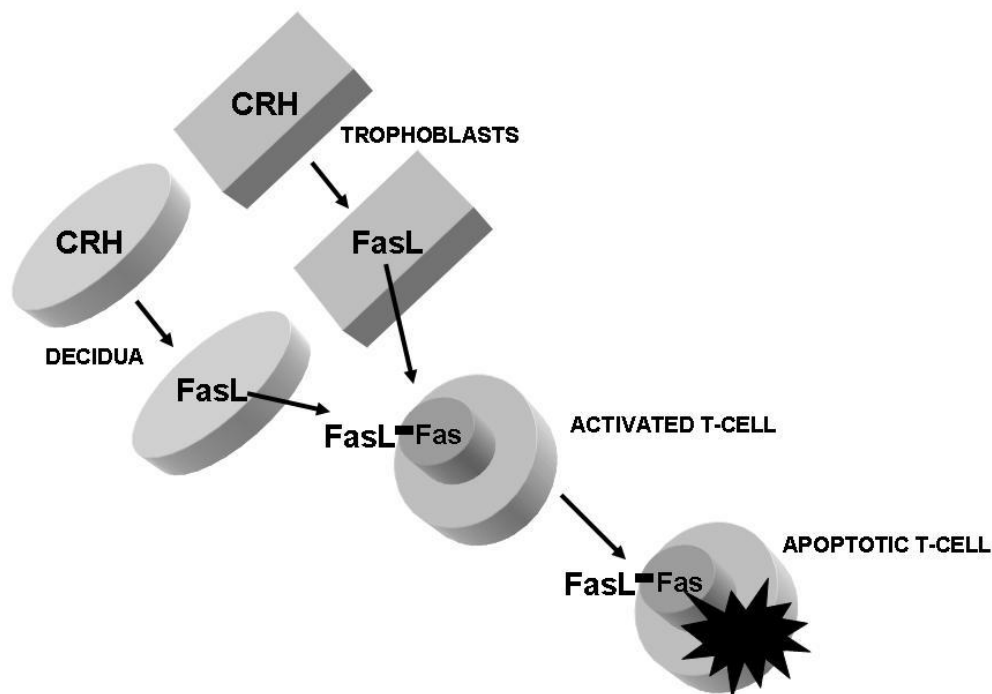
και μετά την δημιουργία τους ενεργοποιούν τις κασπάσες καθοριστές (κασπάση-3, κασπάση-7). Οι ενεργές κασπάσες καθοριστές μέσω τις ενεργοποίησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και μηνυμάτων οδηγούν στην κυτταρική απόπτωση



(Εικόνα 17).

Κατά τη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης το ενδομήτριο έχει χαρακτηριστικά φλεγμονώδους απόκρισης όμως τελικά το έμβρυο αναγνωρίζεται από τον οργανισμό ως ημι-αλλομόσχευμα και δεν απορρίπτεται. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αποδοχής του εμβρύου έχει το σύστημα Fas/FasL το οποίο με τη διαδικασία που περιγράφηκε είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση της περίσσειας των Τ-λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνται λόγω της παρουσίας του εμβρύου (108,130,131).

Πιο συγκεκριμένα, η CRH που παράγεται από το φθαρτό και την εξωλαχνωτή τροφοβλάστη επάγει μέσω του υποδοχέα της (CRH-R1) την έκφραση της FasL και επομένως την ενεργοποίηση του συστήματος Fas/FasL (Εικόνα 18) (86). Κατά την έναρξη της εμφύτευσης/φλεγμονής εισέρχονται στην περιοχή λεμφοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα, ως απόκριση στη φλεγμονή που δημιουργείται. Τα λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα αυτά δέχονται την επίθεση των κασπασών, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω του συστήματος Fas/FasL (Εικόνα 17). Το αποτέλεσμα είναι να υφίστανται απόπτωση και επομένως το έμβρυο να προστατεύεται και να μην απορρίπτεται (132).



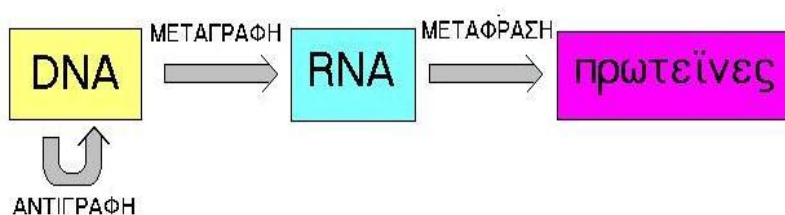
Εικόνα 18. Η έκφραση του FasL που επάγεται τόσο από την CRH στην τροφοβλάστη όσο και από τη CRH του ενδομητρίου οδηγεί στην ενεργοποίηση του συστήματος Fas/FasL και κατ'επέκταση στην απομάκρυνση της περίσσειας των T-λεμφοκυττάρων.

6. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

6.1. DNA-RNA-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Τα κληρονομικά χαρακτηριστικά κάθε ζωντανού οργανισμού καθορίζονται από το γονιδίωμά του, το οποίο αποτελείται από μια μακριά αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος. Αποτελεί την πλήρη σειρά χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού και περιλαμβάνει μια σειρά μορίων DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ). Το μόριο του DNA, το οποίο είναι το γενετικό υλικό όλων των γνωστών οργανισμών και των περισσότερων ιών, ανακαλύφθηκε το 1869 ενώ μόλις το 1944 αποδείχθηκε ότι φέρει την γενετική πληροφορία. Είναι δίκλωνο μόριο το οποίο αποτελείται από τρία συστατικά τη δεοξυριβόζη (σάκχαρο παράγωγο της ριβόζης), τέσσερις αζωτούχες βάσεις συνδεδεμένες μεταξύ τους κατά ζεύγη (αδενίνη - θυμίνη και γουανίνη – κυτοσίνη) και μια φωσφορική ομάδα. Το RNA (ριβονουκλεϊκό οξύ) είναι ένας εναλλακτικός τύπος νουκλεϊκού οξέος, ο οποίος αποτελεί το γενετικό υλικό ορισμένων ιών και παρότι μοιάζει με το DNA παρουσιάζει ορισμένες χημικές και δομικές διαφορές. Το μόριο του RNA περιέχει ουρακίλη αντί για θυμίνη, ενώ το σάκχαρο του είναι ριβόζη. Επιπλέον, πρόκειται για μονόκλωνο μόριο.

Η ροή της γενετικής πληροφορίας γίνεται μέσω της μεταγραφής του DNA σε RNA και της μετάφρασης του RNA σε πρωτεΐνες (Εικόνα 19).



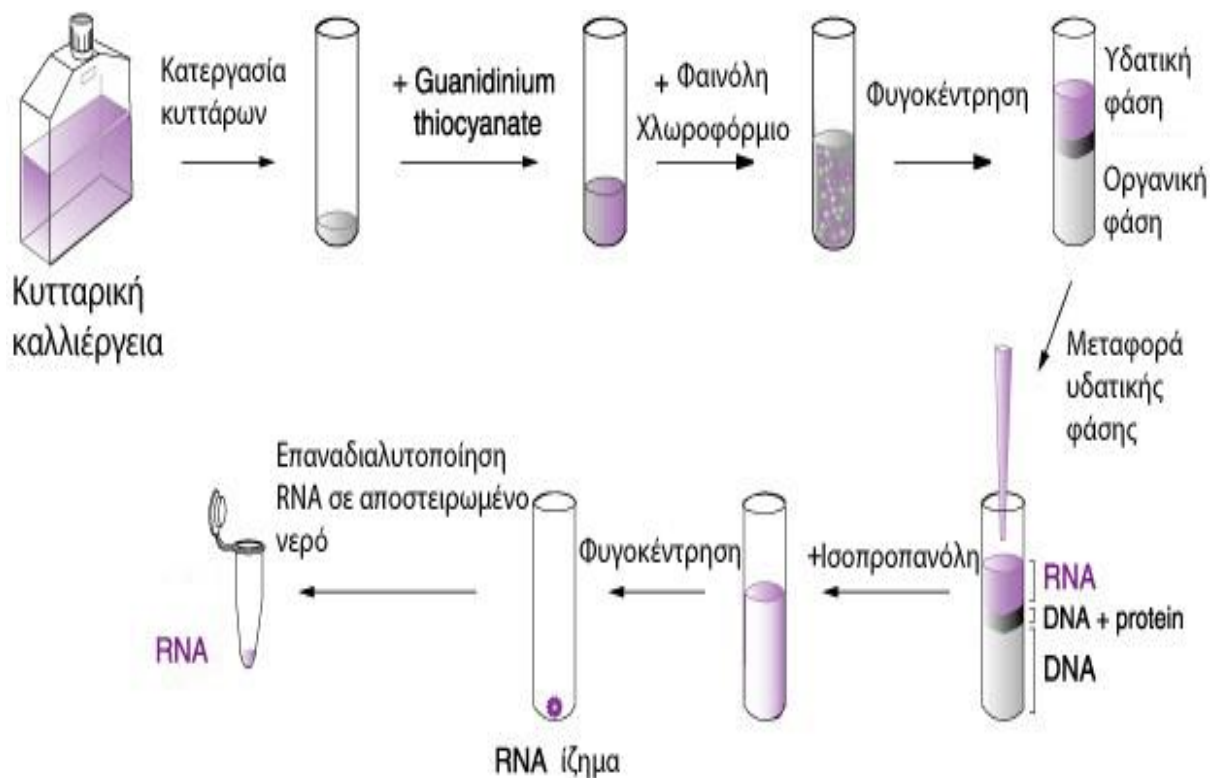
Εικόνα 19. Σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας της ροής της γενετικής πληροφορίας

Μέσω πειραματικών διαδικασιών μπορούμε να απομονώσουμε το γενετικό υλικό. Η απομόνωση του μπορεί να γίνει από όλους τους ιστούς και πραγματοποιείται κυρίως για :

1. Την ανίχνευση μεταλλάξεων
2. Την ανίχνευση πολυμορφισμών
3. Την μελέτη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών
4. Την μελέτη έκφρασης ενός γονιδίου

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε απομόνωση DNA είτε απομόνωση RNA. Η απομόνωση του RNA είναι πιο δύσκολη μέθοδος καθώς το μόριο (ως μονόκλωνο) έχει μεγαλύτερη αστάθεια, είναι όμως προτιμότερη σε περιπτώσεις προσπάθειας ανίχνευσης εναλλακτικού ματίσματος ή σε χωροχρονική μελέτη έκφρασης κάποιου γονιδίου. Οι συνηθέστεροι τόποι απομόνωσης RNA είναι η μέθοδος εκχύλισης σε μίγμα Guanidium thicyanate – Φαινόλη – Χλωροφόρμιο και η χρήση κάποιου έτοιμου εργαστηριακού σκευάσματος (Kit), τα οποία συνήθως περιέχουν υδατικό διάλυμα της θειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλη και κάποια έγχρωμη ουσία ή στήλες που περιέχουν φίλτρα.

Η μέθοδος μας επιτρέπει τη γρήγορη και ασφαλή απομόνωση του RNA. Τόσο η φαινόλη όσο και η θειοκυανική γουανιδίνη είναι ισχυροί αποδιατακτικοί παράγοντες, οι οποίοι συμβάλουν στην αποδιάταξη και επομένως την αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών, ενώ η προσθήκη χλωροφορμίου διαχωρίζει την ανόργανη υδάτινη από την οργανική φάση (Εικόνα 20). Τα περισσότερα έτοιμα σκευάσματα περιέχουν και κάποια έγχρωμη ουσία η οποία συγκεντρώνεται στην οργανική φάση κάνοντας ευκολότερο τον διαχωρισμό ή περιλαμβάνουν ειδικές στήλες με φίλτρα, οι οποίες χρησιμοποιούνται ώστε να διαχωρίζονται οι δύο φάσεις.



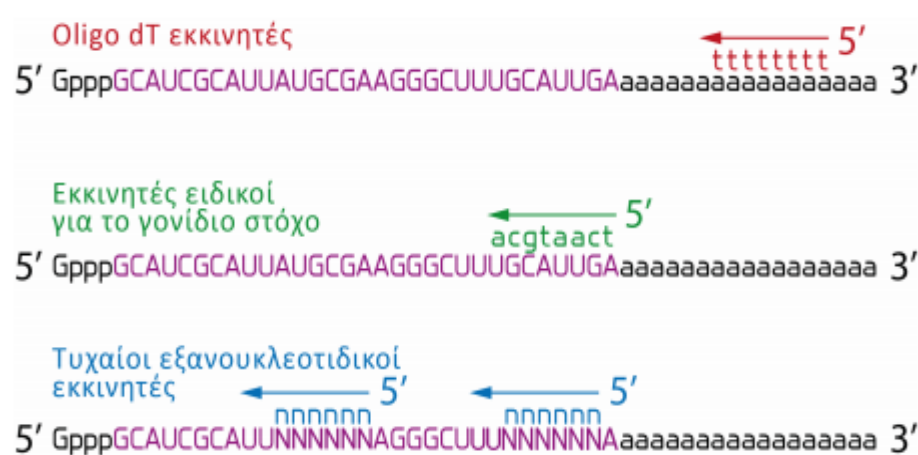
Εικόνα 20. Συνοπτικά στάδια απομόνωσης RNA από κυτταρική καλλιέργεια

6.2. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA (cDNA)

Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο και παρουσιάζει μεγάλη αστάθεια με αποτέλεσμα τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την απομόνωσή του αποικοδομείται εύκολα. Επομένως, κρίνεται ως ακατάλληλο υλικό για ορισμένες πειραματικές διαδικασίες όπως για παράδειγμα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για το λόγο αυτό, το RNA μετά την απομόνωσή του χρησιμοποιείται συνήθως ως εκμαγείο για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής.

Η αντίδραση αυτή, στο εργαστήριο πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή με απαραίτητα αντιδραστήρια το αρχικό RNA, τα dNTPs και τους κατάλληλους εκκινητές. Στη σύνθεση του c DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν 3 είδη εκκινητών (Εικόνα 21) :

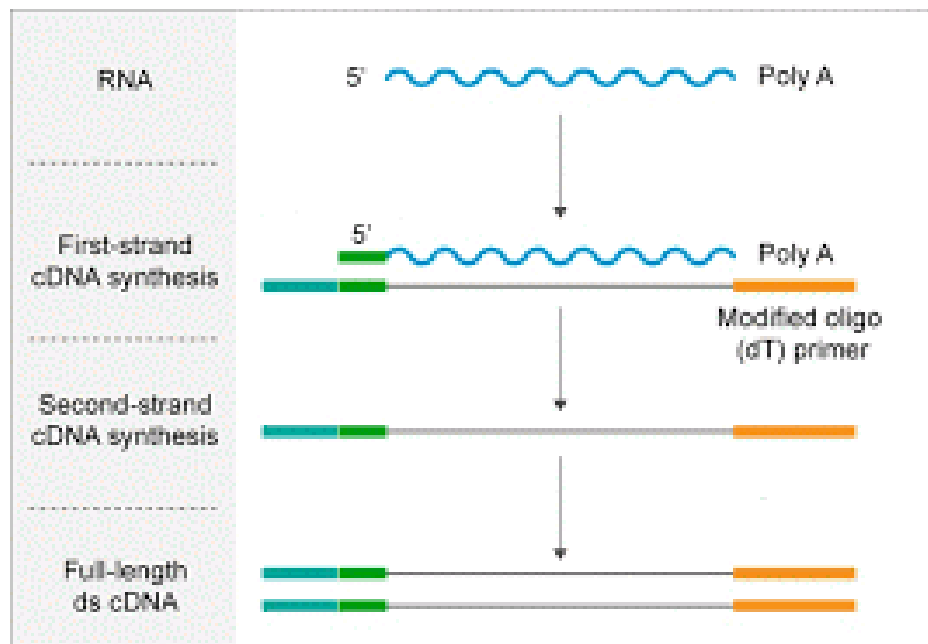
1. *Oligo-dT*. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης τα οποία υβριδίζονται στην πολύ Α ουρα. Με τη χρήση τους μπορούν να συντεθούν ακέραια μόρια RNA.
2. *Μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών*. Πρόκειται για μίγμα νουκλεοτιδίων 6 βάσεων με τυχαία σύνθεση. Είναι η προτιμότερη μέθοδος καθώς παρέχει πλήρη κάλυψη των περιοχών του RNA.
3. *Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο*. Είναι μια σπάνια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται όταν θέλουμε αυξημένη ευαισθησία και τον έλεγχο μικρού αριθμού γονιδίων.



Εικόνα 21. Είδη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δημιουργία cDNA

Η αντίδραση πραγματοποιείται συνήθως στους 45 °C - 55°C και για διάρκεια 15 λεπτών έως μίας ώρας ανάλογα το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Με τον τερματισμό της αντίδρασης έχουμε ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο το οποίο αποτελείται από την αρχική αλυσίδα του RNA και την αλυσίδα του συμπληρωματικού DNA (cDNA) (First stand cDNA synthesis, πρώτο βήμα σύνθεσης cDNA).

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της RNAase καταστρέφεται η αλυσίδα του RNA και έτσι επιτρέπεται στη μονόκλωνη πλέον αλυσίδα του cDNA (Second stand cDNA synthesis, δεύτερο βήμα σύνθεσης cDNA) να μετατραπεί σε δίκλωνο μόριο DNA (Full length dsDNA, πλήρους μήκους dsDNA) μέσω της υβριδοποίησης με συμπληρωματικά νουκλεοτίδια (oligo-dT, τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές, εκκινητές ειδικόι για το γονίδιο στόχο) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης DNA από RNA με τη χρήση εκκινητών Oligo-dT

6.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) είναι μια εργαστηριακή τεχνική η οποία μας επιτρέπει τον *in vitro* εκθετικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA. Η τεχνική μας επιτρέπει να παράγουμε επιλεκτικά εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μιμούμενη ουσιαστικά τη φυσική ικανότητα ενός κυττάρου να αντιγράφει το DNA του χρησιμοποιώντας ένζυμα, τις DNA πολυμεράσες.

Η αντίδραση προκειμένου να πραγματοποιηθεί απαιτεί μια σειρά αντιδραστηρίων :

1. *Δεοξυνουκλεοτίδια* (dNTPs). Πρόκειται για τα μονομερή που συνθέτουν το DNA και χρησιμοποιούνται σε επάρκεια ώστε να μη δημιουργηθεί έλλειψη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δρώντας ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό.
2. *Εκκινητές* (primers). Είναι ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (18-30 bp) και χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως εναρκτήρια τμήματα για τη σύνθεση του DNA. Σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου με το ελεύθερο 3'-υδροξύλιο προς το εσωτερικό του τμήματος-στόχου προς επέκταση.
3. *DNA πολυμεράση*. Πρόκειται για το ένζυμο που καταλύει τη σύνθεση μιας νέας αλυσίδας DNA προσθέτοντας δεοξυνουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3'-άκρο της με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, χρησιμοποιώντας μια άλλη αλυσίδα ως εκμαγείο. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η Taq πολυμεράση επειδή προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus Aquaticus*, το οποίο ζει σε θερμοκρασία άνω των 70°C με αποτέλεσμα να είναι θερμοανθεκτική και να λειτουργεί άριστα σε θερμοκρασίες 65°C-75°C.
4. *DNA-μήτρα*. Πρόκειται για το τμήμα του DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Η PCR μπορεί να χρησιμοποιήσει ως εκμαγείο διάφορα είδη DNA (γραμμικό ή κυκλικό, προκαρυωτικό ή ευκαριωτικό) καθώς και σε ελάχιστη αρχική ποσότητα δεδομένου του μεγάλου αριθμού αντιγράφων που δημιουργούνται.

Η δράση των περισσότερων θερμοανθεκτικών πολυμερασών είναι βέλτιστη σε ουδέτερο pH για το λόγο αυτό απαραίτητο στην αντίδραση είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως Tris-Cl), το οποίο στους 72°C όπου γίνεται και ο πολυμερισμός διατηρεί το pH στο 7,2. Τέλος, απαραίτητα στην αντίδραση είναι και τα κατιόντα Mg^{2+} για τη σωστή δράση και πιστότητα αντιγραφής του ενζύμου.

Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην κυκλική επανάληψη τριών βημάτων (Εικόνα 23) :

1. *Αποδιάταξη εκμαγείου* (Template Denaturation). Πραγματοποιείται στους 94°C- 95°C , θερμοκρασία στην οποία λύνονται οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τις 2 αντιπαράλληλες αλυσίδες.
2. *Πρόσδεση εκκινητών* (Primer Annealing). Γίνεται μείωση της θερμοκρασίας ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών εκατέρωθεν της αλληλουχίας που θα πολλαπλασιαστεί.

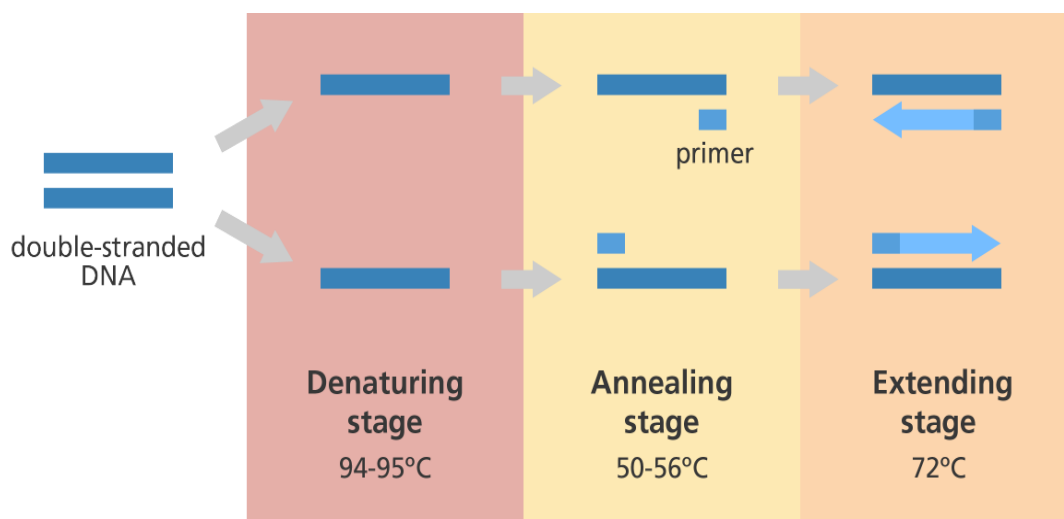
Η θερμοκρασία πρόσδεσης εξαρτάται από τα νουκλεοτίδια που αποτελούν την αλληλουχία και υπολογίζεται με βάση τον τύπο :

$$Tm = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

(όπου A=αδενίνη , T=θυμίνη, G=γουανίνη και C=κυτοσίνη) και είναι ιδανικά μεταξύ 55°C και 65°C.

3. *Επιμήκυνση αλυσίδας* (Chain Extension). Η Taq πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA προσθέτοντας δεοξυνουκλεοτίδια στο 3' ελεύθερο άκρο του εκκινητή με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Η θερμοκρασία πραγματοποίησης αυτού του βήματος είναι οι 72°C, όπου η πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.

Τα τρία αυτά βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα αντίγραφα σε κάθε επανάληψη να πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Η διαδικασία, συνήθως πραγματοποιείται σε 25 - 40 επαναλήψεις/κύκλους με κάθε στάδιο να διαρκεί περίπου 30 sec. Θεωρητικά μετά από n κύκλους τα αντίγραφα της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει θα είναι 2^n .

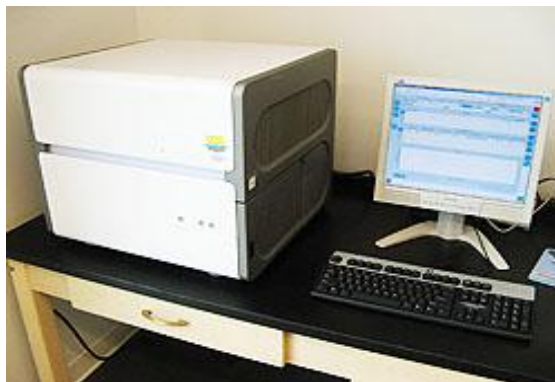


Εικόνα 23. Τα τρία βήματα της PCR και οι σύνηθες θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιούνται.

6.4. REAL-TIME PCR

Πρόκειται για μια παραλλαγή της κλασικής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πιο συγκεκριμένα για μια ποσοτική PCR, η οποία χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR, RT-PCR). Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, με την παρακολούθηση της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Σε κάθε κύκλο της PCR, γίνεται μέτρηση του φθορισμού με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης, η οποία επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί καθ' όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου απαιτούνται αντιδραστήρια ίδια με την κλασική τεχνική της PCR (όπως αναφέρθηκαν στην ενότητα 6.3) με επιπλέον προσθήκη μορίων φθορισμού για την ανίχνευση της αλληλουχίας και την παρακολούθηση της διαδικασίας. Επιπλέον, απαραίτητη είναι η παρουσία αυτοματοποιημένου μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητής) (Εικόνα 24), ειδικού για RT-PCR, συνδεδεμένου με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το μηχάνημα σε συνδυασμό με το λογισμικό του υπολογιστή παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

της φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η παρακολούθηση της τεχνικής σε πραγματικό χρόνο από τον ερευνητή.



Εικόνα 24. Μηχάνημα Light Cycler 480 της εταιρείας Roche

Η τεχνική της RT-PCR παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης :

1. *Ταχύτητα*
2. *Υψηλή ευαισθησία*
3. *Υψηλή επαναληψιμότητα*
4. *Μειωμένος κίνδυνος επιμόλυνσης*

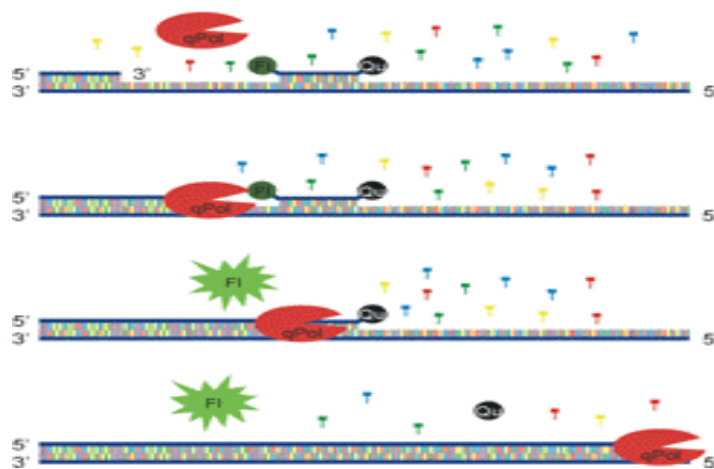
Παρ' όλα αυτά πρόκειται για μια τεχνική, η οποία απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά την ποιότητα του δείγματος αλλά και την επιλογή της μεθόδου (αναλυτικά 6.4.1). Επιπλέον, απαιτεί εξειδίκευση και εμπειρία στο χειρισμό του λογισμικού τόσο για τον σωστό προγραμματισμό της αντίδρασης αλλά και για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου βρίσκει εφαρμογές σε πολλά πεδία όπως την κλινική μικροβιολογία, τη μικροβιολογία τροφίμων, την κλινική ογκολογία και τη γονιδιακή θεραπεία, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως για :

- Ποσοτική μέτρηση DNA
- Χαρακτηρισμό άγνωστων μεταλλάξεων
- DNA sequencing
- Προσδιορισμό γονότυπου
- Μέτρηση της έκφρασης γονιδίων

6.4.1. ΜΕΘΟΔΟΙ RT-PCR

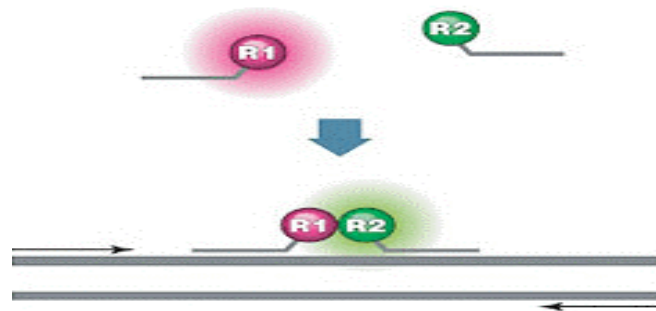
Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα χρωστικών ή ανιχνευτών (probes) να προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένα τμήματα DNA. Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται και εκπέμπουν φθορισμό σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ο οποίος ανιχνεύεται από το μηχάνημα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά βάση στην τεχνική της RT-PCR είναι τέσσερις :

1. *Ανιχνευτές υδρόλυσης (σύστημα TaqMan).* Πρόκειται για την πρώτη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και βασίζεται στη σύζευξη δύο διεργασιών. Κατά πρώτον, στην κατασκευή ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών με διπλή σήμανση (ανιχνευτές υδρόλυσης ή TaqMan) , οι οποίοι εκπέμπουν φθορισμό κατά τη διάσπασή τους με βάση την αρχή μεταφοράς ενέργειας φθορισμού μέσω συντονισμού – FRET (Forester Resonance Energy Transfer). Κατά δεύτερον, στην ανακάλυψη ότι η Taq πολυμεράση διαθέτει δραστηριότητα $5' \rightarrow 3'$ εξωνουκλεάσης και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση του ανιχνευτή που έχει σημειωθεί με φθορισμό. Ο ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής που χρησιμοποιείται είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιείται στην αλληλουχία στόχο μεταξύ των εκκινητών κατά τη φάση υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Στην ελεύθερη μορφή του δεν εκπέμπει φθορισμό, ενώ αντίθετα κατά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή σ έναν από τους κλώνους του μορίου-στόχου, αυτός διασπάται λόγω της δράσης της $5' \rightarrow 3'$ εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο και δεν επηρεάζει την εκθετική συσσώρευση του προϊόντος της PCR (Εικόνα 25).



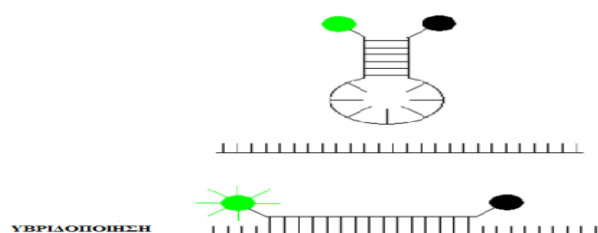
Εικόνα 25. Real-Time PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (σύστημα TaqMan)

2. *Ανιχνευτές υβριδοποίησης.* Χρησιμοποιούνται δύο ανιχνευτές ειδικοί για συγκεκριμένες αλληλουχίες. Κάθε ανιχνευτής φέρει μια μοναδική φθορίζουσα ομάδα αναφοράς, ο ένας φέρει μια μονάδα-δότη στο 3' άκρο και ο άλλος μια ομάδα-δέκτη στο 5' άκρο. Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται στις αλληλουχίες-στόχους σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους με το 3' άκρο του ενός κοντά στο 5' άκρο του δεύτερου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο δότης να διεγείρει τον δέκτη μέσω του φαινομένου FRET και να υπάρχει εκπομπή φθορισμού (Εικόνα 26).



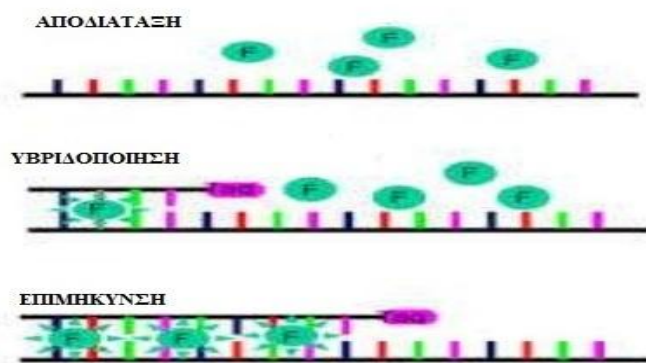
Εικόνα 26. Real-Time PCR με ανιχνευτές υβριδοποίησης, όπου R1 φθορίζουσα ομάδα-δότης και R2 φθορίζουσα ομάδα-δέκτης.

3. *Μοριακοί φάροι.* Πρόκειται για ανιχνευτές οι οποίοι όταν δεν είναι συνδεδεμένοι στην αλληλουχία στόχο υιοθετούν αυθόρμητα τη διαμόρφωση 'μίσχου-βρόγχου' με αποτέλεσμα η φθορίζουσα και η απορροφώσα ομάδα να βρίσκονται σε πολλή μικρή απόσταση μεταξύ τους. Μόλις όμως ο ανιχνευτής υβριδοποιηθεί στην αλληλουχία-στόχο η διαμόρφωσή του αλλάζει, οι δύο ομάδες απομακρύνονται και προκαλείται εκπομπή φθορισμού (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Real-Time PCR με μοριακούς φάρους.

4. *Παρεμβαλλόμενες χρωστικές.* Βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων χρωστικών (πχ. Βρωμιούχο αιθίδιο, SYBR Green I) να ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA. Η χρωστική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για αυτή τη μέθοδο είναι η SYBR Green I, η οποία είναι λιγότερο τοξική σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο. Κατά την πορεία της αντίδρασης, η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου αυξάνεται εκθετικά με παράλληλη αύξηση και της χρωστικής που ενσωματώνεται και επομένως του φθορισμού που εκπέμπεται. Στο τέλος κάθε κύκλου ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι εμφανώς αυξημένος σε σχέση με τον προηγούμενο κατά τη φάση της επιμήκυνσης, ενώ απουσιάζει κατά τη φάση της αποδιάταξης (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Real-Time PCR με παρεμβαλλόμενες χρωστικές.

Ανεξάρτητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται κάθε φορά η μέθοδος της RT-PCR ακολουθεί συγκεκριμένα βήματα, ελαφρώς παραλλαγμένα από την κλασική PCR:

1. *Αρχική αποδιάταξη* (pre-incubation). Ένας κύκλος στους 95°C για 3'-10'
2. *Ενίσχυση* (amplification). 35-45 κύκλοι με συνεχή επανάληψη τριών διαδοχικών σταδίων:
 - i. Αποδιάταξη (denaturation)
 - ii. Υβριδισμός (annealing)
 - iii. Επιμήκυνση (extension ή elongation)
3. *Ψύξη* (cooling). Ένας κύκλος στους 40°C για 10 sec -30 sec

Η συνολική διάρκεια της τεχνικής κυμαίνεται από 30' έως 2 ώρες.

6.4.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η κλασική PCR μας επιτρέπει να μετρήσουμε την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετά από έναν ορισμένο αριθμό κύκλων πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, στη RT-PCR έχουμε τη δυνατότητα να παρακολουθούμε την πορεία του προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο (κύκλο ορίου, threshold cycle-Ct) στο οποίο η ποσότητα του προϊόντος υπερβαίνει ένα ορισμένο όριο ανίχνευσης. Το όριο ανίχνευσης (threshold) επιλέγεται αυθαίρετα με βάση της διακύμανσης της τιμής του βασικού επιπέδου. Για την ποσοτική των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι :

1. *Μέθοδος πρότυπης καμπύλης.* Ένα δείγμα με γνωστή συγκέντρωση υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων. Σχεδιάζοντας την τιμή Ct ενός άγνωστου δείγματος πάνω στην πρότυπη καμπύλη είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου που έχει προστεθεί στο υπό μελέτη δείγμα. Ο υπολογισμός αυτός εκτελείται αυτόματα από το λογισμικό του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το θερμοκυκλοποιητή για τη RT-PCR. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό ιικού και βακτηριακού φορτίου σε βιολογικά υγρά.
2. *Μέθοδος συγκριτικού Ct.* Είναι μια μέθοδος σχετικού ποσοτικού προσδιορισμού με τα επίπεδα της έκφρασης του προϊόντος να υπολογίζονται μέσω αριθμητικού τύπου σε σχέση με έναν βαθμονομητή (γνωστό δείγμα-μάρτυρας). Η ποσότητα του στόχου σε σχέση με το βαθμονομητή και μετά από κανονικοποίηση για το ενδογενές γονίδιο υπολογίζεται από τον τύπο :

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ όπου } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} - \Delta Ct_{\text{ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗ}}$$

Ως ΔCt ορίζεται η διαφορά της τιμής Ct του γονιδίου στόχου από την τιμή Ct του γονιδίου με τη σταθερή έκφραση. Εξ ορισμού για το βαθμονομητή ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta Ct}=1$ οπότε η διαφορά στη έκφραση του γονιδίου στόχου σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Από αυτό προκύπτει ότι οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα-μάρτυρα.

ΜΕΡΟΣ 2

A.ΣΚΟΠΟΣ

Η διαδικασία της εμφύτευσης και η δημιουργία του πλακούντα είναι απαραίτητα στάδια για την επιτυχή έκβαση της κύησης. Η CRH, μέσω των υποδοχέων της, συμμετέχει σε όλες τις επιμέρους λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, ενώ έχει πολύ σημαντικό ρόλο και στην εμφύτευση της βλαστοκύστης. Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευτεί δυο υποδοχείς ο CRH-R1 και ο CRH-R2. Από παλαιότερες έρευνες γνωρίζουμε ότι το γονίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα 1 της CRH εκφράζεται στα προκοιλιακά και στα κοκκώδη κύτταρα σε αντίθεση με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2 το οποίο δεν εκφράζεται.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των δύο κύριων υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2, στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης σε έμβρυα ποντικού, ώστε να ελεγχθεί η δράση τους και η πιθανή συμμετοχή τους στην εμφύτευση. Για το λόγο αυτό, έγινε απομόνωση εμβρύων ποντικών στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) έγινε μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα 1 της CRH, CRH-R1 και τον υποδοχέα 2 της CRH, CRH-R2.

Η κατανόηση της δράσης της CRH μέσω των υποδοχέων της στη διαδικασία της εμφύτευσης είναι υψίστης σημασίας για την εξέλιξη της φαρμακευτικής αντιμετώπισης επαναλαμβανόμενων αποβολών, οι οποίες οφείλονται σε αποτυχία εμφύτευσης και ενδεχομένως ανοίγει νέους ορίζοντες στο μη επεμβατικό τερματισμό της κύησης.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 200 βλαστοκύστες ποντικού, οι οποίες χωρίστηκαν σε 10 δείγματα των 20 βλαστοκύστεων το καθένα.

Οι βλαστοκύστες αφαιρέθηκαν από θηλυκά γονιμοποιημένα ποντίκια ηλικίας 6 εβδομάδων. Όλα τα αρσενικά και θηλυκά ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν F1 υβρίδια από διασταύρωση C57BL/6 ♀ x CBA ♂ γονέων.

Όλα τα ποντίκια μέχρι και την ημέρα του πειράματος, εκτρέφονται στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας, συγκεκριμένων περιόδων εναλλαγής φωτός - σκότους και χωρίς περιορισμό στην πρόσληψη τροφής και νερού. Η μελέτη κατατέθηκε και εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου 'ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ' και από το Συμβούλιο Διαχείρισης των πειραματόζων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

B.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

B.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ EMBRYΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Αρχικά σε θηλυκά ποντίκια 5 εβδομάδων πραγματοποιήθηκε πρόκλησης ωορρηξίας με χορήγηση 5IU γοναδοτροφίνης από ορό αλόγου σε κατάσταση εγκυμοσύνης (PMSG, SigmaChemicalCo). Μετά από 48 ώρες χορηγήθηκαν 5IU hCG (Human Chorionic Gonadotropin, ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη) (SigmaChemicalCo), ενώ ακολούθησε *in vivo* γονιμοποίηση από αρσενικά ποντίκια 3 μηνών. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν με αυχενική μετατόπιση 20 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε άσηπτη αφαίρεση των σαλπίγγων. Έπειτα, οι σάλπιγγες τοποθετήθηκαν σε μέσο απομόνωσης το οποίο αποτελείται από διάλυμα wash D-PBS/BSA 9:1 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline με 10% Αλβουμίνη, παράγοντας V από ορό βοοειδούς) και ακολούθησε η απομόνωση εμβρύων κάτω από στερεοσκόπιο.

B.2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ *IN VITRO*

Μετά την απομόνωση τα έμβρυα ξεπλένονται δύο φορές (1 φορά σε DPBS:BSA και 1 σε Ham's Medium) και τοποθετούνται σε τρυβλία με 1ml καλλιεργητικό υγρό (Ham's Medium) αραιωμένο με 5mg/ml BSA. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες 37° C, 5%CO₂ και 95% υγρασία ώσπου να φτάσουν το στάδιο της βλαστοκύστης, για 5 με 6 ημέρες. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συλλέχθηκαν και φυλάχτηκαν σε κρυογενή σωληνάκια σε ομάδες των 20 βλαστικύστεων στους -80°C. Κάθε σωληνάκι περιείχε, επίσης το σταθεροποιητικό αντιδραστήριο RNA-Later (RNA Stabilization Reagent).

B.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2 στις βλαστοκύστες που απομονώθηκαν έγινε εξαγωγή του ολικού τους RNA, το οποίο περιέχει μεταφρασμένη όλη τη γενετική πληροφορία του οργανισμού.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου πακέτου αντιδραστηρίων (RNeasy Plus Micro Kit Cat No 74034), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (RNeasy® Micro Handbook, Qiagen,2007). Όλα τα στάδια της απομόνωσης του ολικού RNA έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου 15-25° C, ενώ όλα τα στάδια της φυγοκέντρωσης σε θερμοκρασία 20-25° C.

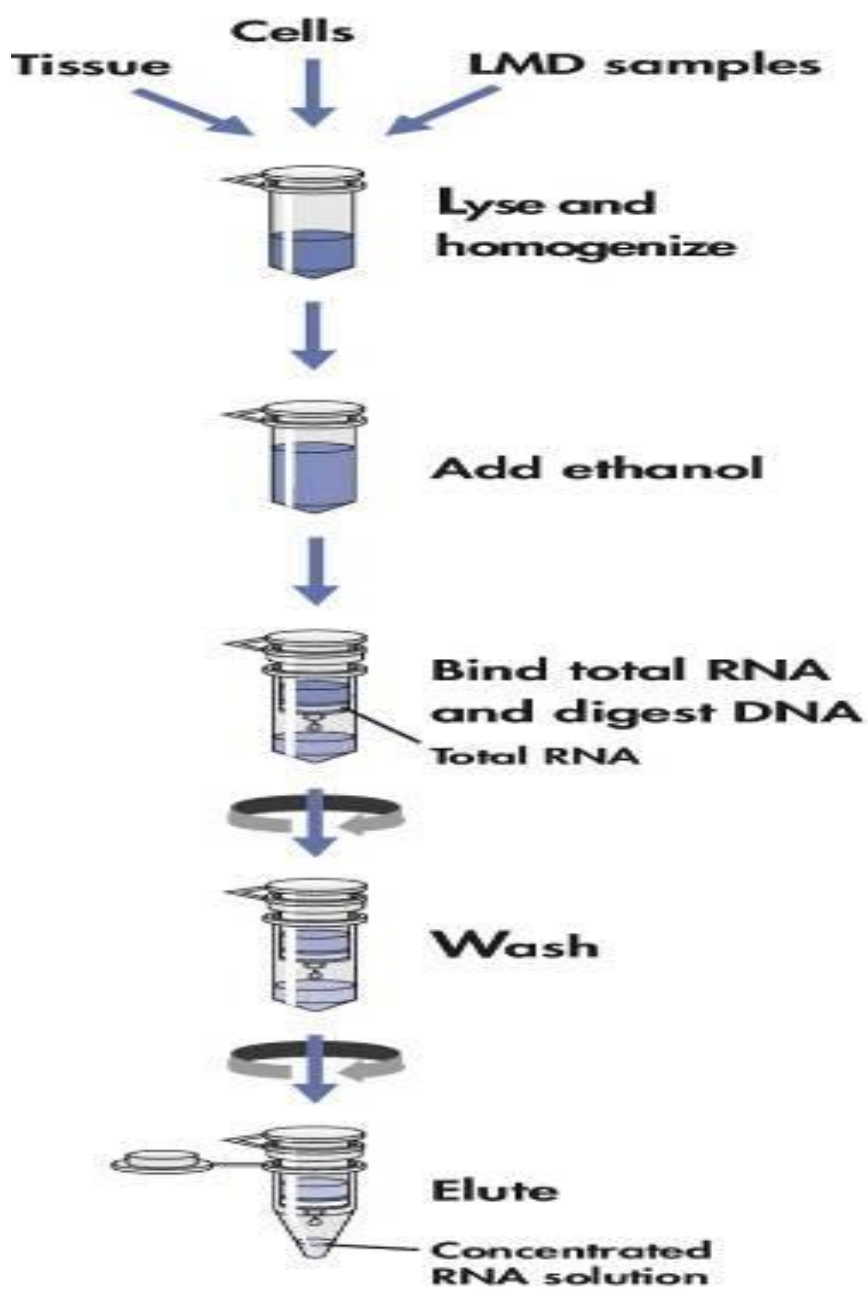
Το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA, το οποίο ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής βήματα (Εικόνα 29):

1. Γίνεται φυγοκέντρωση του δείγματος των κυττάρων στις 2500 rpm για 5 λεπτά. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκειμένου υγρού δια αναρρόφησης.
2. Προκειμένου να γίνει λύση των κυττάρων γίνεται προσθήκη 75 µl buffer RLT plus (με 1 % b-Mercaptoethanol) και 5µl carrier RNA (4ng/µl) λόγω του μικρού αριθμού δείγματος (< 500) και 250 µl buffer RLT.
3. Ανάμειξη με τη χρήση αυτόματου αναδευτήρα Vortex για 1 λεπτό.

4. Μεταφορά του συνόλου του δείγματος στην ειδική στήλη gDNA Eliminator spin column, η οποία περιλαμβάνεται στο kit και είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Έπεται φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.
5. Αφού πεταχτεί η στήλη, γίνεται προσθήκη 350μl αιθανόλης (διαλύματος 70 %) στο flow-through (το σωληνάριο συλλογής), ενώ πραγματοποιείται μεταφορά στην ειδική στήλη RNeasy Mini Elute, η οποία περιλαμβάνεται στο kit και είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml.
6. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.
7. Κρατώντας τη στήλη, αλλά σε καινούργιο σωληνάριο συλλογής γίνεται προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1.
8. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.
9. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500μl buffer RPE
10. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.
11. Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και γίνεται προσθήκη 500μl αιθανόλης σε αραιώση 80%.
12. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 2 λεπτά.
13. Γίνεται τοποθέτηση σε καινούργιο σωληνάριο συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 λεπτά.
14. Απομάκρυνση του σωληναρίου συλλογής και γίνεται τοποθέτηση της στήλης RNeasy Mini Elute σε βάση “eppendorf” και γίνεται προσθήκη 14μl RNase free water (H₂O ελεύθερο ριβονουκλεασών) .
15. Αναμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 14.000 rpm για 2 λεπτά.

Σε αυτό το στάδιο η στήλη απορρίπτεται καθώς το απομονωμένο RNA έχει περάσει στη βάση “eppendorf”. Αν δε χρησιμοποιηθεί άμεσα μπορούμε να διατηρήσουμε το δείγμα στους -20°C.

RNeasy Micro Procedure



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης ολικού mRNA με τη χρήση του εμπορικού kit 'RNeasy Micro Kit'.

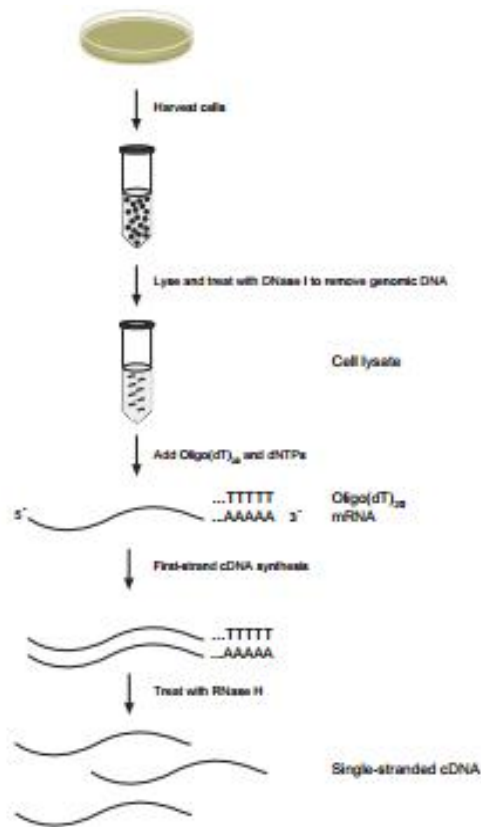
B.2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το RNA που απομονώνεται δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την τεχνική της Real-Time PCR δεδομένου ότι είναι μονόκλωνο μόριο και επομένως ασταθές και εύθραυστο. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής. Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το kit της Invitrogen (Εικόνα 30) για σύνθεση cDNA με τη βοήθεια του θερμοκυκλοποιητή Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) (εικόνα 31).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε ως εξής :

1. Για κάθε αντίδραση δημιουργείτε ένα μίγμα (1) το οποίο περιέχει :
 - i) 4μl RNA
 - ii) 1μl dNTP mix 10mM
 - iii) 5μl τυχαία εξαμερή (50ng/μl)
2. Επιπλέον, για κάθε δείγμα ετοιμάζεται ακόμα ένα μίγμα(2) το οποίο περιέχει :
 - i) 2μl RT buffer 10X
 - ii) 4μl MgCl₂ 25mM
 - iii) 2μl DTT 0.1Mm
 - iv) 1μl RNaseOUT (40U/μl)
3. Το μίγμα (1) ετοιμάζεται και παραμένει στους 65°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται στον πάγο για τουλάχιστον 1λεπτό ακόμα.
4. Το μίγμα (1) αναμιγνύεται με το δείγμα (2) και γίνεται σύντομη φυγοκέντρηση σε μεγάλο αριθμό στροφών.
5. Το νέο μίγμα (1+2) παραμένει στους 25°C για 2 λεπτά.
6. Γίνεται προσθήκη 1μl του αντιδραστηρίου SuperScript II RT.
7. Παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
8. Παραμονή του δείγματος στους 42°C για 50 λεπτά.
9. Παραμονή του δείγματος στους 72°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί παραμονή στον πάγο.
10. Προσθήκη στο δείγμα 1μl του αντιδραστηρίου RNase H και επώαση τους δείγματος στους 37°C για 20 λεπτά.

Σε περίπτωση που το δείγμα δε χρησιμοποιηθεί άμεσα μπορούμε να το αποθηκεύσουμε στους -20°C.



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης cDNA όπως δίνεται από την εταιρεία Invitrogen.



Εικόνα 31. Θερμοκυκλοποιητής Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

B.2.5 RT-PCR ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ G6PD

Το τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η πραγματοποίηση της Real-Time PCR (RT-PCR) προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς 1 και 2 της CRH, CRH-R1 και CRH-R2 και να γίνει η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων. Ταυτόχρονα, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το γονίδιο G6PD προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο δείκτης. Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Light Cycler 480 της εταιρείας Roche. Ενώ η τεχνική που πραγματοποιήθηκε είναι η SYBR GREEN (KAPA SYBR FAST qPCR).

Για κάθε δείγμα ετοιμάστηκε μίγμα (1) το οποίο περιείχε :

- i. 10μl KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix
- ii. 0,4 μl Forward Primer (10μM)
- iii. 0,4 μl Reverse Primer (10μM)
- iv. 4,2 μl LightCycler® 480 H₂O

Τέλος προστέθηκαν 5 μl από το cDNA που συντέθηκε στο προηγούμενο στάδιο για κάθε ένα από τα δείγματα με την διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω.

A. Μελέτη γονιδίου G6PD

Για τη μελέτη του γονιδίου G6PD χρησιμοποιήθηκαν οι primers της εταιρείας TIB MOLBIOL, οι οποίοι σημειώνονται με κόκκινο (όπου S και for είναι Forward Primer και όπου A και rev είναι Reverse Primer).

Πίνακας 1. Ζεύγη υποδοχέων για γονίδιο G6PD

943153	mu G6PD		NM_008062	Tm
mG6PD for	TAATgAgCTggTCATCCgTg	S	1213-1232	54,9°C
mG6PD rev	CAggCTTCCCTgAgTTCATC	A	1437-1418	55,7°C
mG6PD R	gAgTTCATCCTCCgAgAAA	A	1426-1406	55,5°C
mG6PD FL	AgCTggATCTAACTTATggCAACAgATACA-FL	S	1308-1337	61,4°C
mG6PD LC	640-gAATgTgAAgCTCCCTgATgCCTATg p	S	1339-1364	64,4°C

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του μηχανήματος της Roche, Light Cycler 480 πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της RT-PCR για όλα τα δείγματα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής :

1. Pre - incubation: 1 κύκλος για αρχική αποδιάταξη στους 95 ° C για 3 λεπτά.
2. Amplification : 40 κύκλοι για ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου κάθε ένας από τους οποίου πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις :
 - i. Αποδιάταξη (Denaturation) για 10 sec στους 95°C
 - ii. Υβριδισμός (Annealing) για 20 sec στους 56°C
 - iii. Επιμήκυνση (Extension) για 1sec στους 72°C
3. Cooling : 1 κύκλος στους 40°C για 10 sec για ψύξη

B. Μελέτη έκφρασης του υποδοχέα 1 του γονιδίου της CRH (CRH-R1)

Για τη μελέτη του CRH-R1, του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH χρησιμοποιήθηκαν οι primers της εταιρείας TIB MOLBIOL, οι οποίοι σημειώνονται με κόκκινο (όπου S και for είναι Forward Primer και όπου A και rev είναι Reverse Primer).

Πίνακας 2. Ζεύγη primers για τον υποδοχέα 1 της CRH (CRH-R1)

949573	hml Crhr1		NM_007762	TM
Crhr1 F	TGGCTATCAACACCAACAAAC	S	415-434	56,4°C
Crhr1 S	CAACACCACAAACAATggCTA	S	422-442	55,9°C
Crhr1 A	TgATgACggCAATgTggTAgT	A	555-535	57,1°C
Crhr1 R	CCACGAgggAgATgCAaT	A	588-571	56,3°C
Crhr1 FL	CTgggCAgCCCgTgTgAA-FL	S	467-484	63,4°C
Crhr1 LC	640-TATTCTgAgTgCCAggAgATTCTCAACgA p	S	486-514	64,6°C

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του μηχανήματος της Roche, Light Cycler 480 πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της RT-PCR. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής :

1. Pre - incubation: 1 κύκλος για αρχική αποδιάταξη στους 95 ° C για 3 λεπτά.
2. Amplification : 40 κύκλοι για ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου κάθε ένας από τους οποίου πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις :
 - iv. Αποδιάταξη (Denaturation) για 10 sec στους 95°C
 - v. Υβριδισμός (Annealing) για 20 sec στους 56°C
 - vi. Επιμήκυνση (Extension) για 1sec στους 72°C
3. Cooling : 1 κύκλος στους 40°C για 10 sec για ψύξη

Γ. Μελέτη έκφρασης του υποδοχέα 2 του γονιδίου της CRH (CRH-R2)

Για τη μελέτη του CRH-R2, του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2 της CRH χρησιμοποιήθηκαν οι primers της εταιρείας TIB MOLBIOL, οι οποίοι σημειώνονται με κόκκινο (όπου S και for είναι Forward Primer και όπου A και rev είναι Reverse Primer).

Πίνακας 3. Ζεύγη primers για τον υποδοχέα 2 της CRH (CRH-R2)

949573	mu Crhr2		NM_009953	Tm
Crhr2 F	TgCGAGAggACCAACAC	S	264-281	55,9°C
Crhr2 S	CCAgATCgggACCTgCTg	S	326-343	58,8°C
Crhr2 A	AggCACTCTCTgTAGgCATTC	A	442-421	58,6°C
Crhr2 R	CCAgTCTCTgAggCACT	A	452-436	57,0°C
Crhr2 FL	AgTAGAgAgACCGTgCCCCgAg-FL	S	368-389	63,1°C
Crhr2 LC	640-ACTTCAATggCATCAAgTACAACACgACC p	S	391-419	64,4°C

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του μηχανήματος της Roche, Light Cycler 480 πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της RT-PCR. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής :

1. Pre - incubation: 1 κύκλος για αρχική αποδιάταξη στους 95 ° C για 3 λεπτά.
2. Amplification : 40 κύκλοι για ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου κάθε ένας από τους οποίου πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις :
 - vii. Αποδιάταξη (Denaturation) για 10 sec στους 95°C
 - viii. Υβριδισμός (Annealing) για 20 sec στους 56°C
 - ix. Επιμήκυνση (Extension) για 1sec στους 72°C
3. Cooling : 1 κύκλος στους 40°C για 10 sec για ψύξη

Όσον αφορά τον υποδοχέα 2 της CRH (CRH-R2) έγινε επανέλεγχος των δειγμάτων και με τη χρήση ανιχνευτών (probes) προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος. Για κάθε ένα από αυτά τα δείγματα ετοιμάστηκε μίγμα (2) το οποίο περιείχε :

- i. 4μl LightCycler® 480 Genotyping Master Mix
- ii. 0,5 μl Forward Primer (10μM)
- iii. 0,5 μl Reverse Primer (10μM)
- iv. 0,2 μl από κάθε ανιχνευτή
- v. 9,6 μl LightCycler® 480 H₂O

Τέλος προστέθηκαν 5 μl από το cDNA που συντέθηκε στο προηγούμενο στάδιο για κάθε ένα από τα δείγματα με την διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω.

Οι κύκλοι που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την περίπτωση είναι οι εξής:

1. Pre - incubation: 1 κύκλος για αρχική αποδιάταξη στους 95 ° C για 3 λεπτά.
2. Amplification : 45 κύκλοι για ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου κάθε ένας από τους οποίου πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις :
 - i. Αποδιάταξη (Denaturation) για 10 sec στους 95°C
 - ii. Υβριδισμός (Annealing) για 20 sec στους 55°C
 - iii. Επιμήκυνση (Extension) για 10 sec στους 72°C
3. Cooling : 1 κύκλος στους 40°C για 30 sec για ψύξη

Για το γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι primers και οι probes primers της εταιρείας TIB MOLBIOL, οι οποίοι σημειώνονται με κόκκινο (όπου S και A είναι Forward Primer και Reverse Primer αντίστοιχα ενώ όπου FL και LC είναι οι ανιχνευτές).

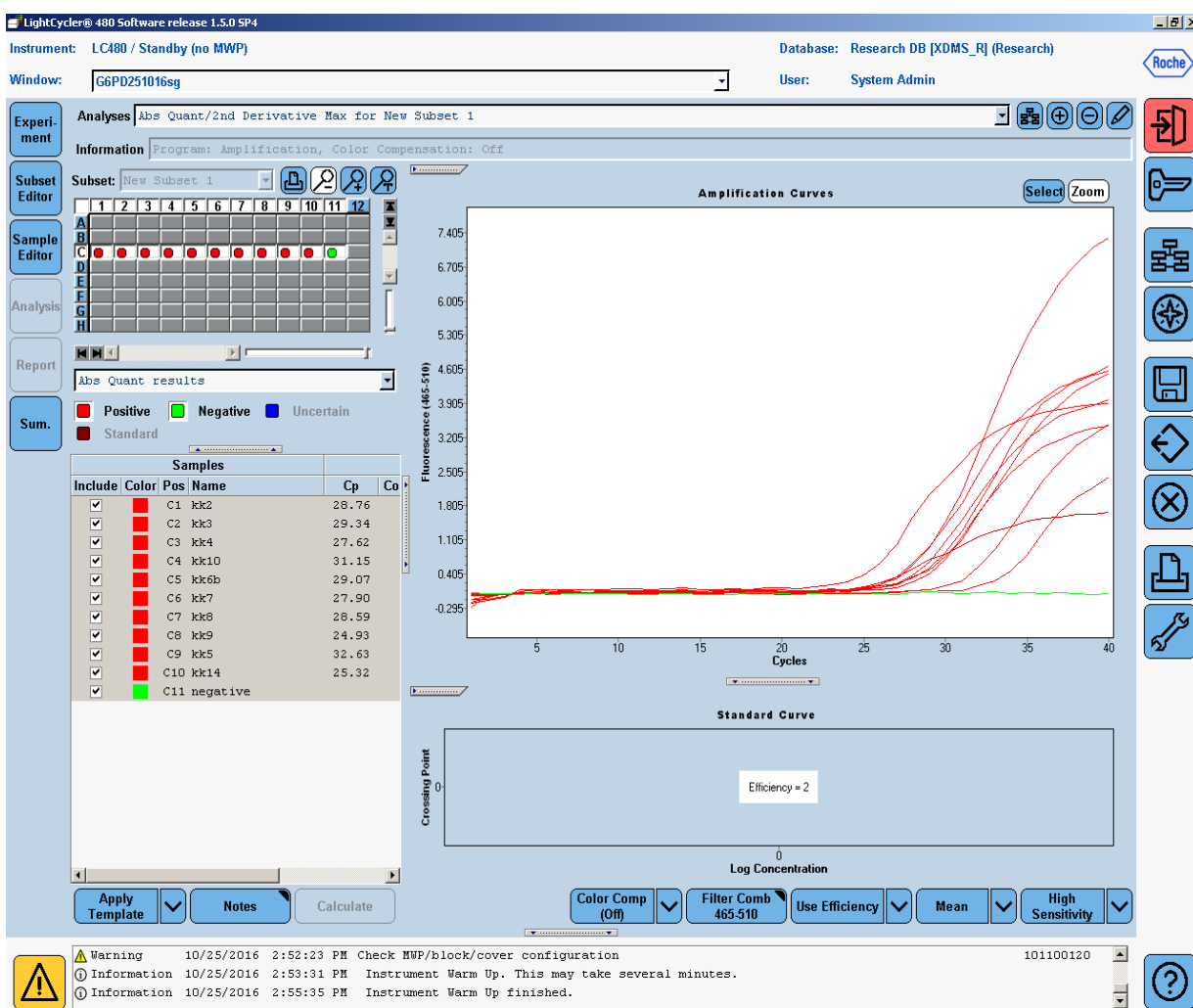
Πίνακας 4. Ζεύγη primers και probes για τον υποδοχέα 2 της CRH (CRH-R2)

949573	mu Crhr2		NM_009953	Tm
Crhr2 F	TgCCACAggACCACAACT	S	264-281	55,9°C
Crhr2 S	CCAgATCgggACCTgCTg	S	326-343	58,8°C
Crhr2 A	AggCACTCTCTgTAggCATTCC	A	442-421	58,6°C
Crhr2 R	CCCgTTCTCCAaggCACT	A	452-436	57,0°C
Crhr2 FL	AgTAgAgAgACCgTgCCCCgAg-FL	S	368-389	63,1°C
Crhr2 LC	640-ACCTCAATggCATCAAgTACAACACgACC p	S	391-419	64,4°C

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ G6PD

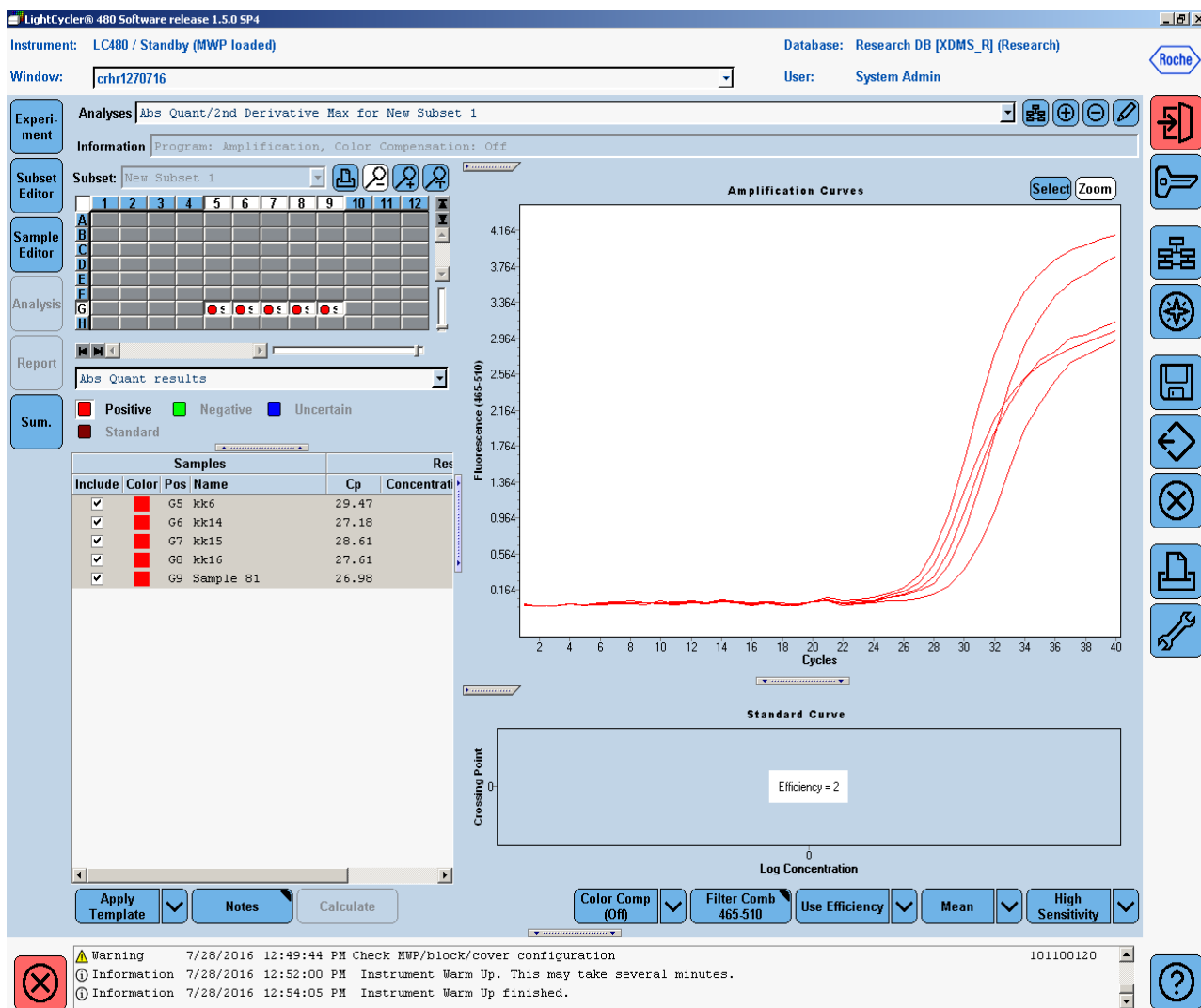
Σαν γονίδιο δείκτης χρησιμοποιήθηκε το G6PD, το οποίο γνωρίζουμε από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ότι εκφράζεται ήδη από το στάδιο της βλαστοκύστης (133). Με τον τρόπο αυτό βεβαιώνουμε ότι πράγματι έχει απομονωθεί DNA στα δείγματά μας. Επιπλέον, μπορούμε να το χρησιμοποιήσουμε ως γονίδιο αναφοράς σε περίπτωση που εκφράζεται κάποιο από τα υπό μελέτη γονίδια. Με την πραγματοποίηση των πειραμάτων παρατηρούμε ότι το γονίδιο G6PD παρουσιάζεται σε όλα τα δείγματα όπως ήταν αναμενόμενο (εικόνα 32).



Εικόνα 32. Ενδεικτική εικόνα αποτελεσμάτων για γονίδιο G6PD

Γ.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R1

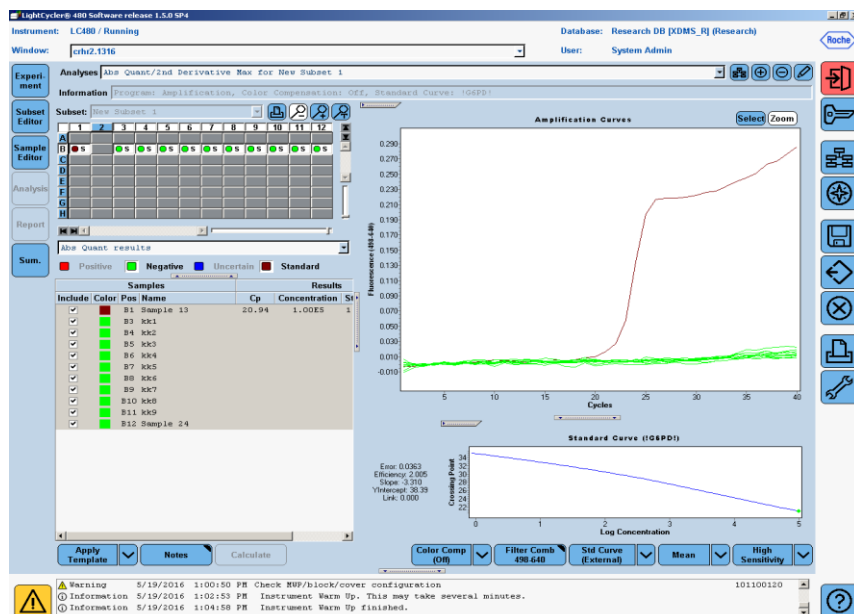
Το πρώτο από τα υπό μελέτη γονίδια είναι το γονίδιο του υποδοχέα της CRH, CRH-R1. Το συγκεκριμένο γονίδιο ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν (Εικόνα 33).



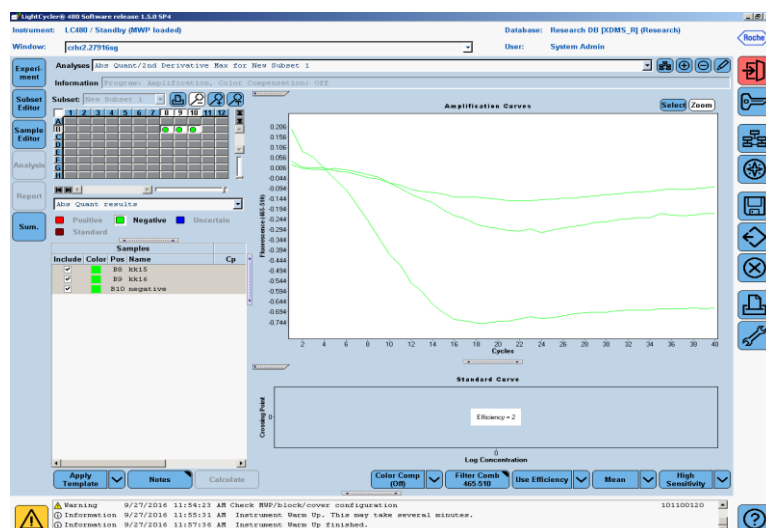
Εικόνα 33. Ενδεικτική εικόνα αποτελεσμάτων για το γονίδιο CRH-R1

Γ.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ CRH-R2

Το δεύτερο υπό μελέτη γονίδιο είναι το γονίδιο του υποδοχέα της CRH, CRH-R2. Το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράστηκε σε κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν (εικόνες 34,35). Ορισμένα από τα δείγματα ελέγχθηκαν και σε RT-PCR με τη χρήση ανιχνευτών υβριδοποίησης (probes) ώστε να επιβεβαιωθεί το αρνητικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 34. Ενδεικτική εικόνα αποτελεσμάτων για γονίδιο CRH-R2 με χρήση probes



Εικόνα 35. Ενδεικτική εικόνα αποτελεσμάτων για γονίδιο CRH-R2 με χρωστική SYBR GREEN

Γ.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στις παραπάνω ενότητες παρουσιάζονται φωτογραφίες, οι οποίες απεικονίζουν ορισμένα από τα αποτελέσματα. Σε αυτήν την ενότητα θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα από όλα τα δείγματα για κάθε υπό μελέτη γονίδιο. Για λόγους απλούστευσης τα δείγματα θα αναφέρονται με αρίθμηση 1 - 10 και όχι με τις πειραματικές τους ονομασίες. Στον παρακάτω πίνακα δίνεται η αρίθμηση για κάθε δείγμα.

Πίνακας 5. Αρίθμηση δειγμάτων.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
1	Kk2
2	Kk3
3	Kk4
4	Kk6
5	Kk6b
6	Kk7
7	Kk8
8	Kk14
9	Kk15
10	Kk16

Βάση βιβλιογραφίας αναμέναμε να υπάρχει παρουσία του γονιδίου G6PD σε όλα τα δείγματα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το γονίδιο τον υποδοχέα 2 της CRH (CRH-R2) δεν εκφράζεται σε κανένα δείγμα, ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH (CRH-R1) εκφράζεται σε όλα τα δείγματα. Ακολουθεί πίνακας με συνοπτική παρουσίαση όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν και αν υπήρχε ή όχι η έκφραση του υποδοχέα CRH-R1 και CRH-R2 καθώς και του γονιδίου-δείκτη G6PD.

Πίνακας 6. Παρουσία ή απουσία των υποδοχέων 1 και 2 της CRH καθώς και του γονιδίου G6PD σε όλα τα υπό ανάλυση δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑ	G6PD	CRH-R1	CRH-R2
1	•	•	—
2	•	•	—
3	•	•	—
4	•	•	—
5	•	•	—
6	•	•	—
7	•	•	—
8	•	•	—
9	•	•	—
10	•	•	—

Όπου :

- Παρουσία γονιδίου
- Απουσία γονιδίου

Η τεχνική, η οποία χρησιμοποιήθηκε (SYBR GREEN) μας δίνει ένα cp value για κάθε δείγμα με την εμφάνιση του γονιδίου. Το cp value αυτό αντιστοιχεί στον κύκλο στον οποίο εκφράστηκε κάθε γονίδιο σε κάθε περίπτωση (Ct). Στη συγκεκριμένη περίπτωση πήραμε σε κάθε δείγμα ένα cp value για το γονίδιο G6PD και ένα cp value για το γονίδιο του υποδοχέα 1 (CRH-R1). Τα cp value αυτά μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε προκειμένου να υπολογίσουμε το τελικό ratio εμφάνισης του υποδοχέα CRH-R1.

Για το ratio εμφάνισης του υποδοχέα CRH-R1 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συγκριτικού Ct και ο τύπος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ο οποίος διαμορφώνεται ως εξής :

$$\text{Ratio} = 2^{-(\text{cp target}-\text{cp reference})}$$

όπου cp target= cp value CRH cp reference=cp value G6PD.

Τα αποτελέσματα του ratio για όλα τα δείγματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ratio για το γονίδιο που κωδικοποιεί τον CRH-R1 (υπολογισμός τιμών SD και Median).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	cp value CRH-R1	cp value G6PD	ratio
1	27,77	28,76	1,98618499
2	27,08	29,34	4,78991482
3	27,10	27,62	1,43395525
4	29,47	23,44	0,01530344
5	26,95	29,07	4,34693945
6	26,06	27,90	3,58010028
7	26,79	28,59	3,48220225
8	27,18	25,32	0,27547628
9	28,61	24,02	0,04152143
10	27,61	22,51	0,02915728

SD	1,81698153
MEDIAN	1,71007012

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η CRH εντοπίζεται σε αρκετούς ιστούς διαφόρων συστημάτων ανάμεσά τους και το αναπαραγωγικό, ενώ εμφανίζεται και στον πλακούντα (65,66). Επιπλέον, συμμετέχει ενεργά στον HPA άξονα (άξονας Υποθάλαμος – Υπόφυση – Επινεφρίδια) καθώς με την έκκρισή της από τον υποθάλαμο οδηγεί στην έκκριση της ACTH από την υπόφυση και επομένως της κορτιζόλης από τα επινεφρίδια (11). Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευτεί δύο υποδοχείς της CRH, ο CRH-R1 και ο CRH-R2. Ο υποδοχέας 1 είναι αυτός που μεσολαβεί για τη δράση της CRH στην έκκριση της ACTH, ενώ η CRH δεσμεύεται κυρίως σε αυτόν. Εμφανίζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος καθώς και στις εμβρυικές μεμβράνες (85,86). Ο υποδοχέας 2, εμφανίζεται επίσης σε πολλούς ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος (86), ενώ αποτελεί κυρίως προσδέτη των ουροκορτινών και όχι της CRH. Η CRH συμμετέχει σε όλες τις επιμέρους λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και μαζί με τους υποδοχείς της έχουν ενεργό ρόλο σε διαδικασίες όπως η ωοθηκική λειτουργία, η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου, η διαδικασία εισβολής της τροφοβλάστης, και η μη αποβολή του εμβρύου. Σημαντικός είναι ο ρόλος της για την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Η διαδικασία της εμφύτευσης έχει χαρακτηριστικά φλεγμονής, με αποτέλεσμα η βλαστοκύστη να κινδυνεύει από απόρριψη, αντιθέτως μέσω της δράσης της CRH σε πολλαπλά επίπεδα το έμβρυο αναγνωρίζεται από τον οργανισμό ως ημι-αλλομόσχευμα και δεν απορρίπτεται.

Στην παρούσα έρευνα έγινε μελέτη της έκφρασης των δύο κύριων υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2 στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης σε έμβρυα ποντικών με στόχο να ελεγχθεί η δράση και η πιθανή συμμετοχή τους στην εμφύτευση. Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των εμβρύων ποντικών στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και με τη βοήθεια της μοριακής μηχανικής έγινε απομόνωση του ολικού RNA. Στη συνέχεια και μετά τη σύνθεση cDNA μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς 1 και 2 της CRH με τη βοήθεια τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Παράλληλα έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου G6PD προκειμένου να διασφαλιστεί η εγκυρότητα του αποτελέσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης εκφράζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1, σε αντίθεση με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2 ο οποίος δεν εκφράζεται.

Ο μικρός αριθμός δείγματος δε μας εμποδίζει να δεχτούμε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2 της CRH δεν εκφράζεται στο συγκεκριμένο στάδιο. Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος έγινε έλεγχος με δύο μεθόδους PCR πραγματικού χρόνου (παρεμβαλλόμενες χρωστικές-SYBR Green και ανιχνευτές υβριδοποίησης-probes), ενώ ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται η παρουσία γενετικού υλικού με την έκφραση του γονιδίου G6PD σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα (133) αποκλείοντας κάθε πιθανότητα εργαστηριακού λάθους. Παρά το μικρό αριθμό δείγματος, η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH είναι καθολική και μη αμφισβητήσιμη σε όλα τα δείγματα. Επιπλέον, η έκφραση του CRH-R1 συνάδει τόσο με τις βιβλιογραφικές αναφορές όσο και με προγενέστερες έρευνες (134,135).

Η διαδικασία της εμφύτευσης και η δημιουργία του πλακούντα είναι απαραίτητα στάδια για την επιτυχή έκβαση της κύησης. Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν τόσο ενδοκρινικοί όσο και μοριακοί μηχανισμοί. Καθοριστική σημασία στη διαδικασία αυτή έχουν οι ιντερλευκίνες και πιο συγκεκριμένα τα μέλη της οικογένειας της Ιντερλευκίνη-6, η οποία αποτελεί ισχυρό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (42). Σε περιπτώσεις ανοσοδιέγερσης, όπως είναι και η εμφύτευση της βλαστοκύστης η παρουσία Ιντερλευκινών οδηγεί στην ενεργοποίηση του HPA άξονα και επομένως στην έκκριση της CRH (90), η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε εκ νέου παραγωγή της Ιντερλευκίνης-6 και της Ιντερλευκίνης-1 (102) με αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονής. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης έχει και το σύστημα Fas/FasL το οποίο απομακρύνει την περίσσεια T-λεμφοκυττάρων (130-132) ενεργοποιώντας την απόπτωσή τους μέσω μιας σειράς ενδοκυτταρικών μονοπατιών και αποκρίσεων (128). Η CRH εμπλέκεται στο σύστημα Fas/FasL (108) καθώς μέσω του υποδοχέα της, CRH-R1 επάγει την έκκριση του FasL τόσο στα κύτταρα του φθαρτού όσο και στα κύτταρα της τροφοβλάστης ενεργοποιώντας το σύστημα Fas/FasL (86). Κατά την έναρξη της εμφύτευσης/φλεγμονής εισέρχονται στην περιοχή λεμφοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα, ως απόκριση στη φλεγμονή που δημιουργείται, τα οποία όμως δέχονται την επίθεση των ενεργών κασπασών μέσω του συστήματος Fas/FasL (Εικόνα 17) με αποτέλεσμα να υφίστανται απόπτωση. Επομένως, το έμβρυο προστατεύεται δεν απορρίπτεται και συνεχίζει η διαδικασία της κύησης (132).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συγκλίνουν με τα αποτελέσματα παλαιότερης έρευνας (135). Ο Lim και η ομάδα του ανίχνευσαν έκφραση του υποδοχέα CRH-R1 στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης όχι μόνο σε ποντίκια αλλά και σε ανθρώπινα έμβρυα. Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της nested PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription nested PCR) καθώς και αυτή της γονιδιακής αλληλούχισης (gene sequencing). Σε αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της RT-PCR ανιχνεύτηκε η παρουσία του CRH-R1 σε μίγμα εμβρύων προεμφυτευτικού σταδίου, το οποίο περιείχε μορίδια και βλαστοκύστες. Στα ίδια στάδια ανάπτυξης δεν ανιχνεύτηκε ο CRH-R2 (134).

Τα εργαστηριακά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνονται από τη βιβλιογραφία και μας επιτρέπουν να εξάγουμε με σχετική ασφάλεια το συμπέρασμα ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH εκφράζεται στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης. Επιπλέον, μπορούμε να δεχτούμε την εμπλοκή του υποδοχέα στη διαδικασία της εμφύτευσης και την εξέλιξη της κύησης. Ιδιαίτερη βάση ερευνητικά δίνεται στη συμβολή της στη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Όπως γνωρίζουμε από τις βιβλιογραφικές αναφορές ο υποδοχέας 1 της CRH εντοπίζεται τόσο στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα και τις εμβρυϊκές μεμβράνες (86) όσο και στα κύτταρα του ενδομητρίου (114). Μέσω του υποδοχέα 1, η CRH δρα με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο ενεργοποιώντας της έκφραση της πρωτεΐνης FasL τόσο στα κύτταρα της τροφοβλάστης όσο και του φθαρτού (86). Επομένως, η παρουσία του CRH-R1 είναι καθοριστική για την επιτυχή εμφύτευση της βλαστοκύστης και την εξέλιξη της κύησης. Ο καθοριστικός ρόλος του CRH-R1 έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά με τη χορήγηση της ανταλαρμίνης. Η ανταλαρμίνη αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα 1 της CRH και η χρήση της σε επίμυς έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την εμφύτευση του εμβρύου καταστέλλοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση στο ενδομήτριο κατά τη διείσδυσης της βλαστοκύστης (91,92), ενώ θεωρείται ότι τα ανάλογά της εκπροσωπούν μια νέα τάξη μη στεροειδών φαρμάκων, τα οποία παρέχουν τη δυνατότητα διακοπής της εγκυμοσύνης σε πολύ αρχικά στάδια (93).

Δ.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από την παρούσα εργασία προκύπτει ότι :

- Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH εκφράζεται στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης
- Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2 της CRH δεν εκφράζεται στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης

Από παλαιότερες έρευνες είναι γνωστό ότι στα προ-κοιλοτικά και στα κοκκώδη κύτταρα εκφράζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 σε αντίθεση με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 2, το οποίο δεν εκφράζεται (134). Συνεπώς, η έκφραση του CRH-R1 και η μη έκφραση του CRH-R2 ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης που υπάρχει κατά την ωρίμαση του ωαρίου υποδεικνύοντας τη χρήση του υποδοχέα CRH-R1 από τα αρχικά στάδια ωρίμανσης του ωαρίου ως το τελικό στάδιο ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου. Η βιβλιογραφική γνώση ενισχύει το εργαστηριακό αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας και μας επιτρέπει να δεχτούμε την έκφραση του υποδοχέα 1 της CRH στο στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης.

Δ.2. ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σήμερα, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί τόσο ιατρικά όσο και φαρμακευτικά στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συνεχίζει να υπάρχει ένα συνολικό ποσοστό 10%-15% υπογόνιμων ζευγαριών. Στο 40% αυτού ενέχεται γυναικείος παράγοντας, ενώ ένα 20% είναι άγνωστης αιτιολογίας. Το στρες ενοχοποιείται σε πολλές περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας. Σε καταστάσεις γενικευμένου στρες ενεργοποιείται ο HPA άξονας, επηρεάζοντας την έκφραση της CRH και της κορτιζόλης (73) οδηγώντας σε αύξηση της έκκρισης της κορτικοεκλυτίνης και των γλυκοκορτικοειδών. Οι ορμονικές και μοριακές μεταβολές οι οποίες αποτελούν απόρροια της ενεργοποίησης του HPA άξονα μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά όλα τα στάδια της κύησης (φθαρτοποίηση ενδομητρίου, εμφύτευση, εισβολή τροφοβλάστης). Πειράματα σε ποντίκια στα οποία προκλήθηκε αυξημένο στρες λόγω εγκλεισμού έδειξαν αναστολή στην εμφύτευση. Το ψυχολογικό στρες επηρέασε σημαντικά στάδια της εμφύτευσης, προκαλώντας καθυστέρηση τόσο στην εκκόλαψη

της βλαστοκύστης (hatching) όσο και στην αλληλεπίδραση της με το ενδομήτριο, επηρεάζοντας το 'παράθυρο εμφύτευσης' (136). Κατά κύριο λόγο η απάντηση στο στρες γίνεται από τους νευρώνες της CRH μέσω του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης (11). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας (137) του Wang X. και της ομάδας του η πρόκληση στρες μέσω υποξίας κατά τη διάρκεια της κύησης οδηγεί στην απομεθυλίωση περιοχών του γονιδίου CRH-R1 στο έμβρυο και σε μελλοντική ευαισθησία του στο άγχος, κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι το γονίδιο CRH-R1 εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης στο στρες. Ο έλεγχος, λοιπόν, της έκφρασης της CRH και κατ'επέκταση της δράσης του HPA άξονα μπορεί να οδηγήσει δυνητικά σε καταστολή του στρες και ενδεχομένως στην εξάλειψή του ως παράγοντα υπογονιμότητας.

Η κατανόηση της δράσης της CRH μέσω των υποδοχέων της συμβάλει στην εξέλιξη της φαρμακευτικής αντιμετώπισης του στρες και των αρνητικών του επιπτώσεων, όπως η υπογονιμότητα, με το ερευνητικό ενδιαφέρον να στρέφεται γύρω από τους ανταγωνιστές των υποδοχέων της CRH (91). Η διαδικασία της εμφύτευσης απαιτεί αλληλεπίδραση του εμβρύου και του ενδομητρίου. Η κατανόηση της δράσης της CRH, μέσω του υποδοχέα της, στη διαδικασία της εμφύτευσης από τη μεριά της βλαστοκύστης ανοίγει νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, αλλά και στο μη επεμβατικό τερματισμό της κύησης (93). Σε κάθε περίπτωση, η περαιτέρω εργαστηριακή έρευνα της έκφρασης και της βιολογικής λειτουργίας του υποδοχέα CRH-R1 μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των προεμφυτευτικών σταδίων του εμβρύου και της διαδικασίας της εμφύτευσης. Τόσο τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσο και η ήδη υπάρχουσα γνώση μας δείχνουν ότι ο υποδοχέας 1 της CRH σε συνάφεια με την έκκριση της CRH έχει ενεργό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος με κυριότερη τη σημαντική συμβολή του στην εμφύτευση της βλαστοκύστης. Η χρήση, λοιπόν, της CRH και η δημιουργία ανταγωνιστών αυτής και των υποδοχέων της θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον ένα πολύτιμο εργαλείο αντιμετώπισης των επαναλαμβανόμενων αποβολών που οφείλονται σε αποτυχία εμφύτευσης. Η έκφραση ή μη έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα (CRH-R1) θα μπορούσε ενδεχομένως να συμπεριληφθεί σε κάποιο ευρύτερο γενετικό προφίλ γυναικών με πολλαπλές αποβολές αλλά και γυναικών με αποτυχία κύησης μετά από επαναλαμβανόμενες IVF.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gondos B, Westergaard L., Byskov A.E. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary : Ultrastructural and squash preparation study, 1986, American journal of Obstetrics and Gynecology, 155: 189-195
2. Peters H., Byskov E.M, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and others primates, 1978, Clinics in Endocrinology and Metabolism, 7: 469-485
3. Bellairs R., Osmond M. Atlas of Chick Development (Third Edition) , 2014, Chapter 7: 67-76
4. Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the York sac to the primitive gonadal folds, 1948, Contrib Embryol 209 : 67-80
5. Blandan R.J., White B.J., Rumery R.E. Observations on the movements of the living primordial germ cells in the mouse, 1963, Fertility and Sterility, 14 : 482-489
6. Hawkins J.R. The SRY gene, 1993, Trends Endocrinol Metab, 4: 328-332
7. AMH anti-Mullerian hormone [Homo sapiens (humans)], ncbi – gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/268>)
8. Berne R.M., Levy M.N. Αρχές Φυσιολογίας, Τόμος II (5^η Έκδοση) Κεφάλαιο 50 : 353-389
9. Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του Ανθρώπου, Τόμος II (8^η Έκδοση) Κεφάλαιο 19: 839-902
10. Tallitsch R.B., Guastaferrri R. Ιστολογία, Κεφάλαιο 15 : 209-226
11. Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του Ανθρώπου, Τόμος I (8^η Έκδοση) Κεφάλαιο 10: 373-404
12. Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ. Βιολογία, Κεφάλαιο 11 : 761-846
13. Slack J.M.W., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης (2^η Έκδοση) Κεφάλαιο 10 : 151-187
14. Γεωργάτος Σ., Κούκλης Π., Λαζαρίδης Γ., Μελιδώνη Α. Τα Βλαστικά Κύτταρα, Εκδόσεις Εφυρα (2008), Κεφάλαιο 1: 17-52
15. The Online Free Dictionary by Farlex, Medical Dictionary
16. Κουλούκουσα Μ., Αυλάκωση-Εμφύτευση (emed.med.uoa.gr/eclass)

17. Nardo L.G., Li T.C., Edwards R.G. Introduction human embryo implantation failure and recurrent miscarriage : basic science and clinical practice, 2006, Reproductive BioMedicine Online, 13 : 11-12
18. Psychoyos A., Nikas G., Gravanis A. The role of prostaglandins in blastocyst implantation, 1995, Human Reproduction, 10: 30-42
19. Tabibzadeh S., Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion, 1995, Human Reproduction, 10: 1579-1602
20. Καλλιανίδης Κ., Γονιμοποίηση και Πρώιμη Εμβρυϊκή Ανάπτυξη, Διαλέξεις ΜΠΣ ‘Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική’
21. Sharkey A.M., Smith S.K. The endometrium as a cause of implantation failure. Best practice Research, 2003, Clinical Obstetrics and Gynaecology, 17: 289-307
22. Nikas G. Endometrial receptivity : changes in cell-surface morphology, 2000, Seminars in Reproductive Medicine, 18 : 229-235
23. Hooxemans D.A., Schats R., Lambalk C.B., Homburg R., Hompes G.A. Human embryo implantation : current knowledge and clinical implication in assisted reproductive technology, 2004, RBM Online, 9: 692-715
24. Garcia E., Bouchard P., De Brux J., Berdah J., Frydman R., Schaison G., Milgrom E., Perrot – Applant M., Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating, 1988, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 67: 80-87
25. Usadi R.S., Murray M.J., Bagnell R.C., Fritz M.A., Kavalik A.L., Meyer W.R., Lessey B.A., Temporal and morphologic characteristics of pinopode expression across the secondary phase of the endometrial cycle in normal cycling women with proven fertility, 2003, Fertility and Sterility, 79: 970-974
26. Nikas G., Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance, 1997, Annals of the New York Academy of science 816: 129-142
27. Aghajanova L., Stavreus-Evers A., Nikas G., Hovatta O., Lahdgem B.M. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium, 2003, Fertility and Sterility, 79: 808-814
28. Dunn C.L., Kelly R.W., Critchley H.O., Decidualisation of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation, 2003, Reproductive Biomedicine Online 7: 151-161

29. Spenser T.E., Bazer F.N., Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy, 2004, *Biology and Endocrinology*, 2 : 49
30. Zygmunt M., McKinnon T., Herr F., Lala P.K, Hen V.K., HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II mannose-6-phosphate receptor, 2005, *Molecular Human Reproduction*, 11: 261-267
31. Simon C., Martin J.C., Pellicer A., Paracrine regulators of implantation, 2000, *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynecology* 14: 815-826
32. Licht P., Russu V., Wildt C., On the role of human chorionic gonadotrophin in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation, 2001, *Seminars in Reproductive Medicine*, 19: 37-47
33. Simon C., Mercader A., Frances A., Hormonal regulation of serum and endometrial IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-1Ra: IL-1 endometrial microenvironment of the human embryo at the apposition phase under physiological and supraphysiological steroid level conditions, 1996, *Journal of Reproductive Immunology*, 31: 165-184
34. Giudice L.C., Potential biochemical markers of uterine receptivity, *Human Reproduction*, 14: 3-16
35. Lessey B.A, Assessment of endometrial receptivity, 2011, *Fertility and Sterility*, 96: 522-529
36. Hofman G.E., Scott R.T.Jr., Bergh P.A., Deligdisch, Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidue and placenta, 1991, *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 73: 882-7
37. Carson D., Thathiah A., Al-Shami R., Farach-Carson M.C., Vernon M., Yuan L., Fritz M., Lessey B., Changes in gene expression during the early to mid-luteal transition in human endometrium detected by high-density microarrayscreening, 2002, *Molecular Human Reproduction*, 8: 871-879
38. Sonnenberg A., Integrins and their ligands, 1993, *Curr Top Microbiol Immunol*, 184: 7-24
39. Lessey B.A, Damjanovich L., Coutlaris C., Castlbaum A., Albelda S.M., Buck C.A., Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle, 1992, *J.Clin Invest*, 90: 188-195
40. Quenby S., Anim-Somuah M., Kalumbi C., Farquharson R., Aplin J.D., Different types of recurrent miscarriage are associated with varying patterns of adhesion molecule expression in endometrium, 2007, *Biomedicine Online*, 14 : 224-234

41. Basak S., Dhar R., Das C., Steroids modulate the expression of alpha integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation , 2002, *Biology of Reproduction*, 66: 1784-1789
42. Dimitriadis E., Meukhorst E., Salamonsen L.A., Paiva P., Review LIF and IL-11 in trophoblast –endometrial interactions during the establishment of pregnancy placenta, 2010, 31: 99-104
43. Chen H.F., Lin C., Chao K.H., Wu M.Y., Yang Y.S., Ho H.N., Defective production of interleukin 11 by deciduas and chorionic villin humans an embryonic pregnancy, 2002, *Journal of clinical Endocrinology and metabolism*, 87: 2320-2328
44. Sharkey A.M., Dellow K., Blayeney M., MacNamee M., Chamock-Jones S., Smith S.K., Stage- specific expression of cytokine receptor messenger ribonucleic acids in human preimpantation embryos, 1995, *Biology of Reproduction*, 53: 974-981
45. Paiva P., Hanna N.J, Hincks C., Meeham K.L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A., Human chronic gonadotropin regulates EGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelium cells, providing a mechanism for enchancing endometrial receptivity, 2011, *Human Reproduction*, 26: 1153-1162
46. Lim k.j., Odulya O.A., Ajjan R.A., Li T.C., Weetman A.P., Cooke I.D., The role of T-helper cytokins in human reproduction, 2000, *Fertility and Sterility*, 73:136-142
47. Steck T., Giess R., Suetterlin M.W., Bolland M., Wrest S., Poehls U.G., Dielt J., LIF gene mutations in women with unexplains infertility and recurrent failure of implantation after the IVF and embryo transfer, 2004, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 112: 69-73
48. Serafini P.C., Silve I.D., Motta E.I., Rocha A.M., Baraacate C., Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome,2009, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7: 30
49. Li Y., Bharti A., Chen D., Gong J., Kufe D., Interaction of glucogen synthase kinase 3 beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin,1998, *Molecular and Cellular Biology*, 18: 7216-7224
50. Wen Y., Caffrey T.C., Wheelock M.J., Johnson K.R., Hollingsworth M.A., Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin, 2003, *Journal of Biological Chemistry*, 278 : 38029-38039
51. Gumbiner B.M., *Cell: Adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*, 1996, *Cell*, 84: 345-357

52. Dadi T.D., Li M.W., Lloyd K.C., Decreased growth factor expression through DNA interference inhibits development of mouse preimplantation embryos, 2009, Comparative Medicine, 59: 331-338
53. Yoo H.J., Barlow D.H., Mardon H.J., Temporal and spatial regulation of expression of heparin binding epidermal growth- factor like growth factor in the human endometrium : a possible role in blastocyst implantation, 1997, Development Genetics, 21: 102-108
54. Stavreus- Evers A., Aghajanova L., Brismar H., Eriksson H., Landgren B.M., Hovatta O., Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor- like growth factor pinopodes in human endometrium at the time of implantation, 2002, Molecular Human Reproduction, 8: 765-769
55. Over J., Over H., Immunolocalization of insulin-like growth factor I during preimplantation in rat uterus. Growth Hormone IGF.,2007, Research 17: 271-278
56. Yoshida M., Obata R., Tsujii H., Effect of relaxin and IGF I on the preimplantation development of Mongolian gerbil embryos in vitro, 2009, Medicine and Biology, 8: 39-43
57. Rappollee D.A., Sturm K.S., Behrendtseu O., Schultz G.A., Pedersen R.A., Werb Z., Insuline-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos, 1992, Genes and Development, 6: 939-952
58. Lewis WH, Gregory PW., Cinematographs of living developing rabbit-eggs, 1929, Science 69 : 226-229
59. Hammond J. Jr, Recovery and culture of tubal mouse ova, 1949 Nature 163: 28
60. McLaren A, Biggers JD., Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early as early embryos., 1958, Nature 182: 887-878
61. Slack J.M.W., Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης (2^η Έκδοση) , Ενότητα 1 : 3 – 9
62. Βενετίκου Μ., Παθολογία ενδοκρινών αδένων, Ενότητα 4: Ενδοκρινικό σύστημα – Φυσιολογία, Υπόφυση, Ανοικτά Ακαδημαϊκά μαθήματα, ΤΕΙ Αθήνας
63. Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J, Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor, 1983, Recent Prog Horm Res 39:245-270

64. Lovenberg, T.W., et al., Cloning and characterization of a functionally distinct corticotrophin-releasing factor receptor subtype from rat brain, 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92(3) : p.836-840
65. Meyer, A.H., et al., Localization of the human CRF2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis, 1997, Genomics, 40(1): p.189-190
66. Dautzenberg FM, Hauger RL, The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered, 2000, Trends Pharmacol Sci 23:71-77
67. Arai M. Characterization of three corticotrophin – factor receptor in catfish : a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis, 2001, Endocrinology, 142 : 446 - 454
68. Suda T., Immunoreactive corticotrophin and CRF in human hypothalamus , adrenal lung cancer and pheocromocytoma, 1984, J Clin Endocrinol Metab, 58: 919
69. Udelsman R., Functional CRF receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system, 1986, Nature, 319: 146
70. Chrousos G.P., Regulation and dysregulation of the HPA axis, the CRH perspective, 1992, Endocrinol Metab Clin North Am, 21: 833
71. Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του Ανθρώπου, Τόμος II (8^η Έκδοση), Παράρτημα Β, Γλωσσάριο 975-1006
72. Berne R.M., Levy M.N. Αρχές Φυσιολογίας, Τόμος II (5^η Έκδοση) Κεφάλαιο 46 : 299-316
73. Baunberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P., Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity of glucocorticoids, 1996, Endocr Rev, 17 245-261
74. Doukas J., Hechtman H.B., Shepro D., Endothelial secreted arachidonic acid metabolites modulate polymorphonuclear leucocyte chemotaxis and diapedesis in vitro, 1988, Blood, 71: 771-779
75. Schieimer R.P., Lichtenstein C.M., Gillespie E., Inhibition of baseophil histamine release by anti-inflammatory steroids, 1981, Nature, 292: 454-455
76. Zhao L., Donaldson C.J., Smith G.W., Vale W.W, The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN), 1998, Genomics, 50: 23-33
77. Pan W., Kastin A.J., Urocortin and the brain, 2008, Prog Neurobiol, 42: 148-156

78. Fukuda T., Takahashi K., Suzuki T., Saruta M., Watanabe M., Nakata T., Sasano H., Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders, 2005, *J Clin Endocrinol Metab*, 90:4671-4678
79. Kageyama K., Bradbury M.J., Zhao L., Blount A.L., Vale W.W., Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids, 1999, *Endocrinology*, 140: 5651-5658
80. Asaba K., Makino S., Hashimoto K., Effect of urocortin on ACTH secretion from rat anterior pituitary in vitro and in vivo : comparison with corticotropin-releasing hormone, 1998, *Brain Res*, 806: 95-103
81. Skorzewska A., Bidzinski A., Lehner M., Turzynska D., Sobolewska A., Wisłowska A., Maciejak P., Szyndler J., Płaznik A., The localization of brain sites of anxiogenic-like effects of urocortin-2, 2001, *Neuropeptides*, 45: 83-92
82. Novembri R., Urocortin2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response, 2011, *Mol Hum Reprod*, 17: 587-593
83. Kageyama K., Furukawa K., Miki I., Terui K., Motomura S., Suda T. Vasodilative effects of urocortin II via protein kinase A and a mitogen-activated protein kinase in rat thoracic aorta, 2003, *J Cardiovasc Pharmac*, 42: 561-565
84. Venihaki M., Sakihara S., Subramanian S., Dikkes P., Weninger S.C., Liapakis G., Graf T., Majzoub J.A., Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours, 2004, *Journal of Neuroendocrinology*, 16: 411-422
85. Karteris E., Grammatopoulos D., Randeva H., Hillhouse EW , Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the feto-placental unit, 2000, *J Clin Endocrinol Metab* 85:1989-1996
86. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP, Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance, 2001, *Nat Immunol* 2:1018- 24
87. Chatzaki E., Murphy L., Million M., Ohring C.V., Grave P.D., Petroski R., Tache Y, Grigoriadis D.E., Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies, 2004, *J. Neurochem*, 88: 1-11

88. Westphal N.J., Seasholtz A.F., Corticotropin releasing hormone-binding protein. The regulatory and function of a phylogenetically conserved binding protein, 2006, *Front Biosci*, 11: 1878-1891
89. Chatzaki E., Margioris A.N., Gravanis A., Expression and regulation of CRH binding protein (CRH – BP) in rat adrenals, 2002, *J. Neurochem*, 80: 81-90
90. Gilligan P.J., Li Y.W., Corticotropin-releasing factor antagonists : recent advance and exciting prospects for the treatment of human diseases, 2004, *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 7: 487-497
91. Zoumakis E., Grammatopoulos D.K., Chrousos G.P., Corticotropin-releasing hormone receptor antagonists, 2006, *European Journal of Endocrinology* 155: 85-91
92. Χρούσος Γ., Στρες, Εγκέφαλος και Υγεία , 2007 πηγή : Ηλιος, αποθετήριο Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών
93. Μαστοράκος Γ., Μαρκόπουλος Μ., Λιναρδή Α., Υπερκορτιζολαιμία στην εγκυμοσύνη, πηγή : e-endocrinology.gr
94. Karalis K, Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotrophin-releasing hormone in vivo, 1991, *Science* 254: 421-423
95. Karalis K., CRH and the immune system, 1997, *J. Neuroimmunol*, 72: 131-136
96. Sternberg E.M., Hill J.M., Chrousos G.P., A central nervous system defect in biosynthesis of CRH is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats, 1989, *Proc Natl Acad Sci*, 86: 4771
97. Fauci A.S., Glucocorticoid therapy mechanisms of action and clinical consideration, 1976, *Ann Intern Med*, 84:304
98. Boumpas D.T., Glucocorticoid therapy for immune mediated diseases : basic and clinical correlates, 1993, *Ann Intern Med*, 119 : 1198
99. Barnes P.J., Anti –inflammatory actions of glucocorticoids :molecular mechanisms. 1998, *Clin Sci*, 94: 557-572
100. Axelrod J., Catecholamines : effects of ACTH and adrenal corticoids , 1997, *Ann Acad Sci* 297: 275
101. McGillis J., Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by Corticotropin Releasing Factor , 1989, *J. Neuroimmunol*, 75 : 135-140
102. Angioni S., CRH modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells, 1993, *Life Sci* 53: 1735-1742
103. Clifton VL, Telfer JF, Thompson AJ, Cameron IT, Teoh TG, Lye SJ, Challis JR 1998 Corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin-

derived peptides are present in human myometrium. J Clin Endocrinol Metab 83:3716-21

104. Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, Brown LS, Jr., Frantz AG 1986 High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 63: 1199-203
105. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK 2002 Role of stress peptides during human pregnancy and labour. Reproduction 124:323-9
106. Chrousos G.P., CRH , stress and human reproduction : un update, 2010, Journal of Reproductive Immunology, 85 : 33-39
107. Karteris E., Grammatopoulos D.K., Randeve H.S., Hillhouse E.W., The role of CRH receptors in placenta and fetal membranes during human pregnancy, 2001, Mol Genet Metab, 72: 287 – 296
108. Soni S., et al., Fas-FasL system in molar pregnancy, 2011 Am J Reprod Immunol, 65(5) : p. 512-20
109. Smith R., Mesiano S., Chan E.C., Brown S., Jaffe R.B., CRH directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells, J. Endocrinol Metab, 83 :2916-2920
110. Grammatopoulos D.K., Placental CRH and its receptors in human pregnancy and labour : Still a scientific Enigma, 2008, J. Neuroendocrinol , 20 :432-438
111. Mastorakos G., Gizza G., Kvetnansky R., Bergamini G., Blackman M.R., Gord P.W., Chrousos G.P., Aging and acute stress decreases CRH in the ovary of Fisher 344/N rat, 1995, Life Sci 56: 1065-1071
112. Mastorakos G., Scopa C., Vryonidou A., Friedman T., Kattis D., Phenekos C., Merino M., Chrousos G.P., Presence of immunoreactive CRH in normal and polycystic human ovaries, 1994, J. Clin Endocrinol Metab, 79 : 1191
113. Asakura H., Zwain I.H., Yen .S.S., Expression of genes encoding CRF, type 1 CRH receptor and GRF binding protein and localization of the gene products in human ovaries, 1997, J.clin Endocrinol Metab, 82 :2720-2725
114. Di Blasio A.M., Giraldi F.P., Vigano P., Petraglia F., Vignali M., Cavagmini F., Expression of Corticotropin Releasing Hormone and its R1 receptor in human endometrial stromal cells, 1997, J Clin Endocrinol Metab, 82:1594 -1597
115. Makrigiannakis A., Margioris A.N., Chatzaki E., Zoumakis E., Chrousos G.P., Gravanis A., The decidualizing effect of progesterone may

- involve direct transcriptional activation of CRH from human endometrial stromal cells, 1999, *Mol Hum Reprod*, 5: 789-796
116. Frank G.R., Brar A.K., Cedars M.I., Handwerger S., Prostaglandin E₂ enhances human endometrial stromal cell differentiation, 1994, *Endocrinology* 134: 258-263
 117. Choudhuri R., Wood G.W., Production of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in the uterus of pseudopregnant mice, 1993, *Biol Reprod*, 49:596-603
 118. Zoumakis E., Margioris A.N., Stournaras C., Dermitzaki E., Angelakis E., Makrigiannakis A., Koumantakis E., Gravanis A., CRH interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma, 2000, *Mol Hum Reprod*, 6: 344-351
 119. Makrigiannakis A., Karamouti M., Drakakis P., Loutradis D., Antsaklis A., Fetal-maternal immunotolerance, 2008, *Ann J Reprod Immunol*
 120. Kalantaridou S.N., Zoumakis E., Makrigiannakis A., Godoy H., Chrousos G.P., The role of CRH in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance, 2007, *Horm Metab Res* 39:474-477
 121. Nagata S., Golstein P., The Fas death factor, 1995, *Science*, 267 : 1449-1456
 122. Nagafuji K., Shibuya T., Harada M., Mizuno S., Takenata K., Miyamoto T., Okamura T., Gondo H., Niho Y., Functional expression of Fas antigen (CD 95) on hematopoietic progenitor, 1995, *Blood*, 86:883-889
 123. Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Adomain in TNF receptors that mediates ligand independent receptor assembly and signaling, 2000, *Science* 288 : 2351 - 2354
 124. Suda T., Takahashi T., Goldstein P., Molecular cloning and expression of Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family., 1993, *Cell*, 75:1169-1178
 125. Suda T., Tanaka M., Miwa K., Apoptosis of mouse naïve T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation – induced resistance to Fas ligand, 1996, *J Immunol*, 157: 3918-3924
 126. Hunt J.S., Vassmer D., Ferguson T.A., Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus, 1997, *J Immunol*, 158: 4122-4128
 127. Runic R, et al., Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implication in placentation and fetal survival, 1996. *J Clin Endocrinol Metab* ,81: p. 3119–22

128. Kischel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex(DISC) with the receptor, 1995, EMBO J, 14 5579:5588
129. Abbas A., Lichtman A., Βασική Ανοσολογία, Λειτουργίες και Δυσλειτουργίες του Ανοσοποιητικού Συστήματος, 200, Εκδόσεις Πασχαλίδης
130. Ibrahim R., et al., Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism, 2006 Cancer, 106 : p. 1065-77
131. Shin M.J., et al., Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells, 2010, Int J Hematol, 92(2) : p. 262-70
132. Abrahams V.M., Straszewski-Chavez S.L., Guller S., Mor G, First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis, 2004, Mol Hum Reprod, 10:55-63
133. Kobayashi S., Isotani A., Mise N., Yamamoto M., Fujihara Y., Kaseda K., Nakanishi T., Ikawa M., Hamada H., Abe K., Okabe M. Comparison of Gene Expression in Male and Female Mouse Blastocysts Revealed Imprinting of the X-Linked Gene, *Rhox5/Pem*, at Preimplantation Stages, 2006, Current Biology, 16 : 166 – 17
134. Dinopoulou V., Partsinevelos G.A., Mavrogianni D., Anagnostou E., Drakakis P., Makrigiannakis A., Chrousos G.P., Loutradis D. The effect of CRH and its inhibitor, antalarmin, on in vitro growth of preant mouse follicles, early embryo development, and steroidogenesis, 2013, Endocrinology, 154 : 222-231
135. Lim L.N., Yao Y.Q., Mcveigh J.E., Sargent I.L., Barlow D.H., Linton E.A. CRH and CRH R1 expression in preimplantation embryos, 2003, Abstracts of the 19th Annual Meeting of the ESHRE, Madrid, Spain
136. Zhao L.H., Cui X.Z., Yuan H.J., Liang B., Zheng L.L., Liu Y.X., Luo M.J., Tan J.H., Restraint Stress Inhibits Mouse Implantation : Temporal Window and the Involvement of HB-EGF, Estrogen and Progesterone, 2013, PloS One, 8 : 11
137. Wang X., Meng F.S., Liu Z.Y., Fan J.M., Hao K., Chen X.Q., Du J.Z, Gestational Hypoxia Induces Sex-Differential Methylation of *Crhr1* Linked to Anxiety-like Behavior, Molecular Neurobiology, 2013, 48 : 544-555

