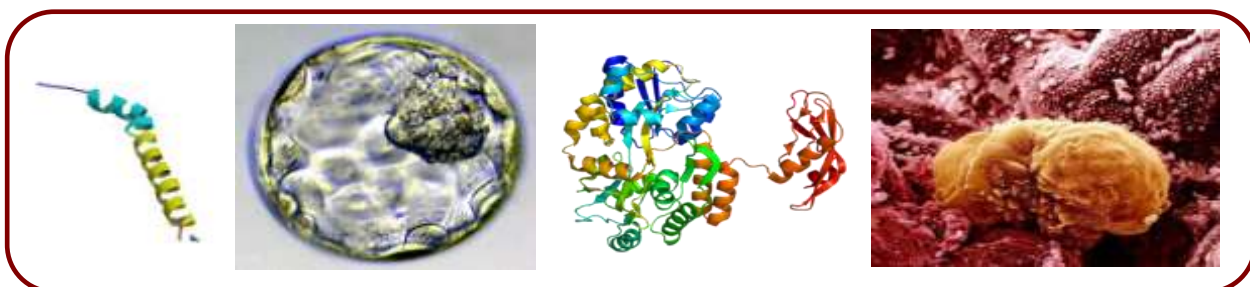




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ- ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ CRH-R1 ΚΑΙ CRH-R2
ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ CRH ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΙΣ**



Κασφίκη Σοφία- Ελένη

Α.Μ. 201220456

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2015

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της **Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής** της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών που στεγάζεται στο **Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Αλεξάνδρα**.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δημήτριος Λουτράδης, Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας (επιβλέπων), Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καλλιανίδης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρακάκης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
Κεφάλαιο 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΩΟΓΕΝΕΣΗ	11
2. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ	14
3. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	16
4. Στάδια ενδομητρίου κατά τον καταμηνιαίο κύκλο	20
5. ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΒΡΥΟΥ	21
5.1 Σχηματισμός Μοριδίου	21
5.2 Σχηματισμός βλαστοκύστης	23
6. ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΕΜΒΡΥΟΥ	23
6.1 Εναπόθεση του Εμβρύου	
6.2 Προσκόλληση του Εμβρύου	25
6.3 Διείσδυση του Εμβρύου	26
7. ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ- ΥΠΟΦΥΣΗ- ΓΟΝΑΔΕΣ	28
7.1 Υποθάλαμος	28
7.2 Πρόσθιος λοβός της υπόφυσης ή Αδενοϋπόφυση	29
7.3 Ορμόνες των θηλυκών γονάδων	29
7.4 Ρύθμιση έκκρισης ορμονών	30
8. ΚΟΡΤΙΚΟΕΚΛΥΤΙΝΗ (CRH, CORTICOTROPHIN RELEASING HORMONE)	32
8.1 Δομή του γονιδίου CRH	32
8.2 Οι υποδοχείς της CRH	33
8.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι του CRH-R1	35
8.4 Βιολογικός Ρόλος της CRH	36
8.4.1 Ο ρόλος της CRH στο στρες	36
8.4.2 Ο ρόλος της CRH στον άξονα HPA	37
8.4.3 Ο ρόλος της CRH στη φλεγμονή	39
8.4.4 Ο ρόλος της CRH στο αναπαραγωγικό σύστημα	40
8.4.4.1 Ο ρόλος της CRH στην ωοθήκη	40
8.4.4.2 Ο ρόλος της CRH στην μήτρα	42
A. Ο ρόλος της CRH στη δημιουργία του φθαρτού στο ενδομήτριο	42
B. Ο ρόλος της CRH στον τόνο του μυομητρίου και στον τοκετό	44
Γ. Ο ρόλος της CRH στην εμφύτευση του εμβρύου	44
8.4.4.3 Ο ρόλος της CRH στον πλακούντα	46
9. Φαρμακολογική στόχευσης του υποδοχέα CRH-R1	48

10. ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (IN VITRO FERTILIZATION)	49
A. Τεχνική Εξωσωματικής Γονιμοποίησης με φυσικό τρόπο	50
B. Ενδοκυτταρική Έγχυση Σπέρματος (ICSI)	
Κεφάλαιο 2- ΣΚΟΠΟΣ	54
Κεφάλαιο 3- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1.Βιολογικό Υλικό	56
2.Νομικά και Ηθικά Θέματα που λήφθηκαν υπ' όψιν για τη λήψη ανθρώπινων βλαστοκυστών για ερευνητικούς σκοπούς	56
3.Κριτήρια Επιλογής δοτριών βλαστοκυστών	57
4.Πρωτόκολλο εξωσωματικής γονιμοποίησης	58
4.1Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας	58
4.2 Ωοληψία	59
4.3 Γονιμοποίηση	59
4.4 Έλεγχος Γονιμοποίησης και Εμβρυική ανάπτυξη	60
4.5 Εμβρυομεταφορά	60
5. Εξαγωγή RNA από ανθρώπινες βλαστοκύστες	61
6. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	63
7. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ή Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Polymerase Chain Reaction)	65
7.1 Όψη των Φάσεων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	65
7.2 Η ποσοτικοποίηση με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με χρήση ιχνηθετών υβριδοποίησης (Hybprobes)	66
7.3 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων με βάση τη σχετική ποσοτική μέθοδο ή μέθοδο ΔΔCt με χρήση γονιδίων αναφοράς	67
7.4 Καμπύλη τήξης του προϊόντος (Melting Curve)	68
7.5 Ανίχνευση των μεταγράφων του υποδοχέα R1 και R2 με Real Time PCR	69
Κεφάλαιο 4- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1.Ανίχνευση του μετάγραφου του υποδοχέα CRH-R1 σε ανθρώπινες Βλαστοκύστες	73
2.Ανίχνευση του μετάγραφου του υποδοχέα CRH-R2 σε ανθρώπινες Βλαστοκύστες	77
Κεφάλαιο 5- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
5.2 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι το αποτέλεσμα μίας διαρκούς προσπάθειας έξι μηνών μετά από αλληλεπίδραση με πολλούς συναδέλφους της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου. Με εφελτήριο, λοιπόν, την ολοκλήρωση του κύκλου αυτού σπουδών καθώς και της παρούσας ερευνητικής πρότασης θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω τους ερευνητές με τους οποίους συνεργάστηκα τόσο για τη μεταφορά της τεχνογνωσίας, όσο και για τη επιστημονική τους οξυδέρκεια στην επιστημονική μου καθοδήγηση.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Δημήτριο Λουτράδη που με ενέταξε στην ερευνητική του ομάδα, μου έδειξε εμπιστοσύνη και με βοήθησε να ωριμάσω επιστημονικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, τους δύο εξεταστές της τριμελούς μου επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετέχουν σε αυτή καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη φοίτηση μου στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, τον Καθηγητή Καλλιανίδη Κωνσταντίνο και τον Καθηγητή Δρακάκη Πέτρο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη εργαστηρίου κ. Μαυρογιάννη Ντέπυ για την καθοριστική της συμβολή στα πειράματα αυτής της εργασίας καθώς και για τις πολύ εύστοχες παρατηρήσεις, τη συνετή καθοδήγηση και την παιδαγωγική της αγάπη.

Θα ήθελα να εκδηλώσω την αγάπη μου και τη μεγάλη εκτίμηση μου προς την υποψήφια μετα-διδάκτορα Ντινοπούλου Βάλια, όχι μόνο για τη μεταφορά της τεχνογνωσίας όσον αφορά τις τεχνικές, αλλά για το επιστημονικό ήθος, την υπομονή της και την δεκτικότητά της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για τη συμβολή τους και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Ιππικόγλου Ευθύμιο...με τις καθημερινές παρατηρήσεις του και την καθοδήγηση του έμαθα να έχω κριτική σκέψη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπημένη κ. Ζανιά Καλλιόπη που με συμβούλεψε να ακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό και η ζωή μου άλλαξε!

Τον κ. Σιδερή Μιχάλη που με στήριξε με τις συμβουλές του καθ'όλη την διάρκεια του προγράμματος.

Τον πολύ καλό φίλο και συνάδερφο Γιάννη Γρίβα για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη.

Τον αγαπημένο και παντοτινό φίλο, συμφοιτητή, συνάδερφο και καθοδηγητή Ερωτα Νικιτό ο οποίος έκανε την πορεία μου στο πρόγραμμα πιο εύκολη και ευχάριστη.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την στήριξη, αγάπη και εμπιστοσύνη που μου δίνουν από την ημέρα που γεννήθηκα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ορμόνη κορτικοεκλυτίνη (CRH, Corticotrophin Releasing Hormone) είναι ένα νευροπεπτίδιο με 41 αμινοξέα το οποίο πρωτοαπομονώθηκε από τον υποθάλαμο προβάτου. Η βασική της λειτουργία εστιάζεται στη ρύθμιση της έκκρισης της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH, Adrenocorticotrophic hormone) από την υπόφυση ενώ είναι ευρύτατα κατανεμημένη στον εγκέφαλο όπου συντονίζει τις ενδοκρινικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος (ΑΝΣ) στο στρες. Λειτουργεί, επίσης, ως διαμεσολαβητής μεταξύ ανοσοποιητικού, νευρικού και ενδοκρινικού συστήματος.

Η CRH, εκτός από την ευρύτατη κατανομή της στον εγκέφαλο, εντοπίζεται στα επινεφρίδια, στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, στις ενεργές φλεγμονώδεις περιοχές, στον πλακούντα, στη μήτρα, στις ωοθήκες, στο φθαρτό, στην τροφοβλάστη και στους ενδομήτριους αδένες.

Η ορμόνη CRH έχει δύο υποδοχείς, τον υποδοχέα της κορτικοεκλυτίνης 1 (CRH-R1) και τον υποδοχέα της κορτικοεκλυτίνης 2 (CRH-R2), που ανήκουν στην οικογένεια των G πρωτεϊνών και κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Σε μελέτες που έγιναν, βρέθηκε ότι σε μορίδια και βλαστοκύστες θηλυκών ποντικών εκφράζεται μόνο ο CRH-R1 υποδοχέας.

Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης, το μητρικό ενδομήτριο ανταποκρίνεται με χαρακτηριστικά οξείας, άσηπτης φλεγμονώδους αντίδρασης. Παρόλα αυτά μετά την εμφύτευση, το έμβρυο καταστέλλει αυτή την αντίδραση και αποτρέπει την απόρριψη. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα της εμβρυϊκής τροφοβλάστης και τα κύτταρα του φθαρτού παράγουν την ορμόνη CRH και εκφράζουν τον συνδέτη της προαποπτωτικής κυτταροκίνης Fas (FasL, CD95L). *In vitro* ευρήματα από την άλλη έδειξαν ότι όταν ο υποδοχέας CRH-R1 έχει μπλοκαριστεί από την ανταλαρμίνη, ανταγωνιστή του υποδοχέα CRH-R1, αυξάνει την διείσδυση της τροφοβλάστης κατά περίπου 60%.

Η ορμόνη CRH παίζει κρίσιμο ρόλο στην εμφύτευση και στην αποτροπή της απόρριψης του κυήματος ενώ προστατεύει το έμβρυο από την μητρική

ανοσοποιητική απάντηση, εξουδετερώνοντας τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης του μορίου Fas με τον FasL. *In vivo* μελέτες σε αρουραίους με χορήγηση ανταλαρμίνης έδειξαν αξιοσημείωτη μείωση θέσεων εμφύτευσης κατά 70% και μειωμένη έκφραση του συνδέτη Fas. Αυτό καταδεικνύει ότι όταν ο άξονας CRH/CRH-R1 δεν λειτουργεί σωστά υπάρχει μεγάλο ποσοστό υπευθυνότητας για καθ'έξιν αποβολές, προεκλαμψία και ανεπάρκεια πλακούντα.

Στην παρούσα μελέτη, σε συνέχεια των πειραματικών δεδομένων που απέδειξαν την ύπαρξη και των δύο υποδοχέων της CRH σε όλα τα στάδια άναπτυξης των ωοθυλακίων ποντικών, αλλά μόνο την ύπαρξη του υποδοχέα R1 στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης, εξετάστηκε η ύπαρξη μεταγραφικής δραστηριότητας των υποδοχέων της CRH (R1 και R2) σε ανθρώπινες πλεονάζουσες βλαστοκύστες γυναικών που συμμετείχαν σε πρόγραμμα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης. Το ερώτημα αυτό προσεγγίστηκε με τεχνικές μοριακής βιολογίας: απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες βλαστοκύστες, σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) και αλυσιδωτη αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) με τη μέθοδο των τυχαίων εξαμερών.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη διαειδική ύπαρξη του υποδοχέα R1 σε επίπεδο μεταγραφής στον άνθρωπο και στον ποντικό. Από την άλλη, αναφορικά με τον υποδοχέα R2, δεν βρέθηκαν μετάγραφα του υποδοχέα R2 στις ανθρώπινες βλαστοκύστες, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες. Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εκδεικτικά της πιθανής συμμετοχής του άξονα CRH/CRH-R1 στα προεμφυτευτικά στάδια της βλαστοκύστης στον άνθρωπο και συνολικά αξιολογώντας την ανίχνευση του R1 υποδοχέα στον ποντικό και στον άνθρωπο δείχνει έναν άξονα που είναι συντηρημένος εξελικτικά στα δύο αυτά θηλαστικά.

ABSTRACT

CRH (Corticotrophin Releasing Hormone) is a 41 amino acid neuropeptide, firstly isolated from sheep hypothalamus. CRH is basically implicated in the regulation of the secretion of ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) from pituitary gland and is widely dispersed in the brain, thus orchestrating endocrinological and behavioral Autonomous Nervous System (ANS) responses to stress. Of note, CRH acts additionally as mediator among immune, neurological and endocrinological system.

Besides its distribution to brain, CRH is localized to adrenal gland, human lymphocytes, inflammatory foci, placenta, uterus, ovary, corpus luteus, trophoblast and endometrium.

CRH transduces signals via its two receptors, CRH-R1 and CRH-R2, which are members of G-proteins superfamily, and are expressed by two separate genes. Studies in mouse embryos at the developmental stage of morulla and blastocyst demonstrated to express only CRH-R1 and not CRH-R2.

During implantation phase, the endometrium responds immunologically to the penetrating blastocyst. This immunologic response is characterized as acute, aseptic inflammatory response. Nevertheless, embryo suppresses this inflammatory response, preventing the miscarriage. It has been shown that trophoblast cells and lutenized cells secrete CRH and express the ligand of a proapoptotic cytokine Fas (CD95). *In vitro* findings depicted that while R1 receptor is blocked by a well-known antagonist, antalarmin, embryo penetration enhances by 60%.

To this extend, CRH exerts a protective role in embryo against mother's immune response by establishing immune T cell tolerance mediated by Fas/ FasL interactions. *In vivo* studies exhibited that mice administered with antalarmin have dominantly reduced implantation sites by 70% and dampened FasL expression. Thus, non functional CRH/ CRH-R1 axis is responsible for recurrent miscarriages, preeclampsia and placental incontinence.

This study was conducted with the aim of detecting CRH-R1 and R2 transcripts in human blastocysts, in the frame of continuing or verifying earlier studies that

demonstrated the expression of CRH-R1 and not CRH-R2 mRNA in mouse embryos at morulla and blastocyst developmental stage. This scientific question was approached by using molecular biology techniques, such as RNA extraction and cDNA synthesis from human blastocysts and then CRH-R1 and R2 identification by Real Time PCR using random hexamers.

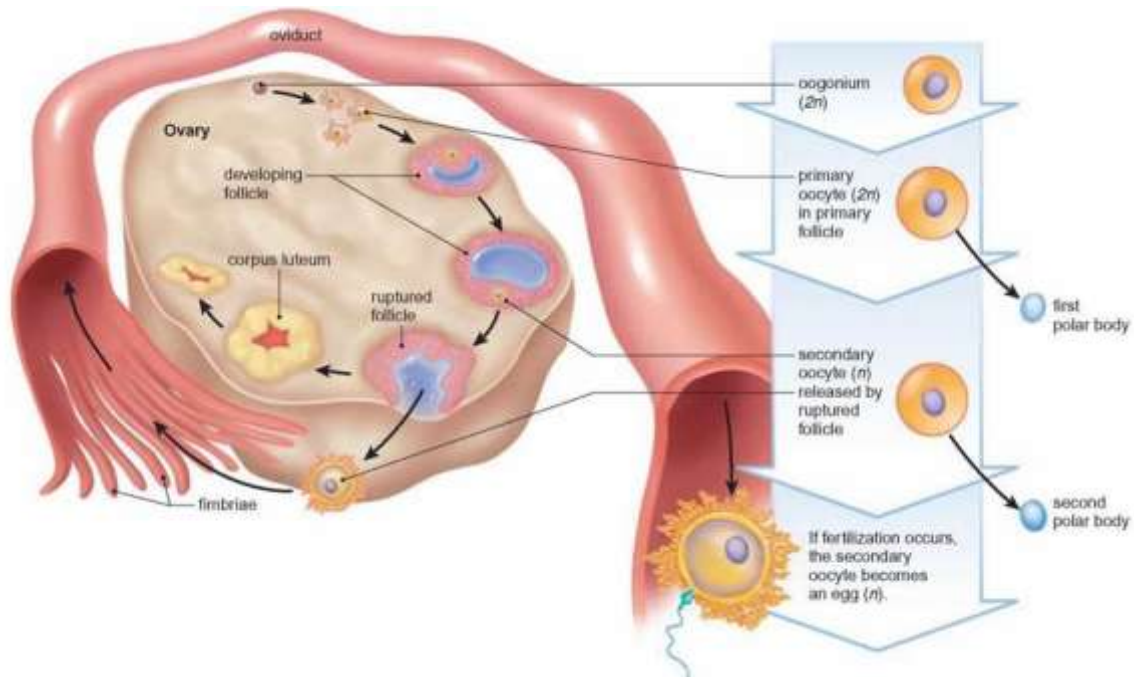
Data suggest a trans-species CRH-R1 detection in transcriptional level, since R1 receptor was identified in the blastocyst specimens. On the other hand, there weren't detected any CRH-R2 transcripts, corroborating previous studies. To sum up, the results are indicative of the possible role of CRH/ CRH-R1 axis in pre-implantation stages of the human blastocyst and confirms that this axis is conserved in mammals and specifically in human and mouse.

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ωογόνια (oogonia) που προέρχονται από τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (PGC) μεταναστεύουν στη γενετική ακρολοφία και διαφοροποιούνται σε ώριμα ωοκύτταρα (oocytes).



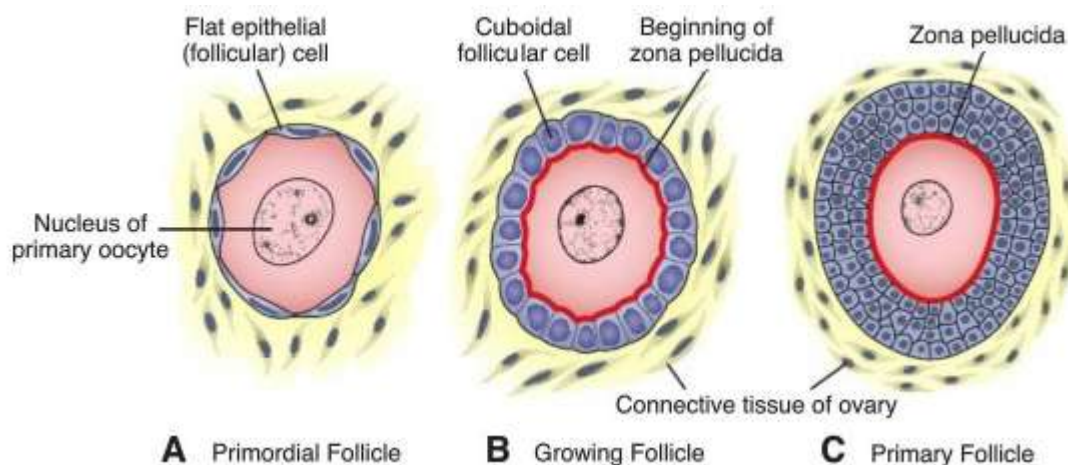
Εικόνα 1: Ωογένεση. Πηγή: Nature Journal

Αφότου τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα, που έχουν αναπτυχθεί στον λεκιθικό ασκό, μεταναστεύουν στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη κατά την 5^η- 6^η εβδομάδα της κύησης διαφοροποιούνται σε ωογόνια.

Τα ωογόνια στη συνέχεια διαιρούνται μιτωτικά μέχρι τον τρίτο μήνα της εμβρυϊκής ανάπτυξης και οργανώνονται σε δομές (αρχέγονα ωοθυλάκια, primordial follicles, Εικόνα 2Α) που αποτελούνται από μία στιβάδα αποπλατυσμένων επιθηλιακών κυττάρων που ονομάζονται κοκκιώδη κύτταρα (follicle cells) και προέρχονται από το επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης. Η πλειονότητα των ωογονίων συνεχίζουν να διαιρούνται, ενώ μερικά από αυτά σταματούν την κυτταρική διαίρεση στην πρόφαση της μείωσης I και ονομάζονται πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes). Στο στάδιο αυτό ο αριθμός τους ανέρχεται σε μερικά εκατομμύρια, ενώ πολλά από αυτά εκφυλίζονται, έτσι ώστε κατά τη γέννηση κάθε ωοθήκη να περιέχει ένα εκατομμύριο από αυτά. Τα ωοκύτταρα συνεχίζουν να εκφυλίζονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής και ο αριθμός τους κατά την έναρξη της

εφηβείας ανέρχεται σε 250.000 (1). Τα πρωτογενή ωκύτταρα παραμένουν σε αυτή τη φάση για αρκετά χρόνια. Κατά τη γέννηση μέσα στο στρώμα του ωθηκικού φλοιού περιέχεται ένας μεγάλος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων, μερικά από τα οποία παραμένουν σε αυτή την περιοχή καθόλη την αναπαραγωγική ηλικία (Εικόνα 1). Τα πρωτογενή ωκύτταρα δεν προχωρούν στη μετάφαση της μείωσης I, αλλά στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης I και παραμένουν εκεί λόγω της δράσης του ενζύμου OMI (Oocyte maturation inhibitor) που παράγεται από τα κοκκιώδη κύτταρα. Δεν είναι επιστημονικά γνωστό το αν η φάση της διπλοταινίας είναι το καταλληλότερο στάδιο για να προφυλλάξει τα ωάρια από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (2).

Στην εφηβεία, η έκλυση της FSH από την υπόφυση οδηγεί μερικά αρχέγονα ωοθυλάκια (γύρω στα 20 κάθε μήνα) να αναπτυχθούν περαιτέρω. Τα ωκύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος, το οποίο συνδέεται με την αύξηση του μεγέθους των κοκκιωδών κυττάρων (κυβοειδή ή κυλινδρικά) που το περιβάλλουν. Η παραπάνω δομή αποτελεί το μονόστιβο πρωτογενές ωοθυλάκιο.



Εικόνα 2: Θυλακική ωρίμανση. Πηγή: Langman's Medical Embryology

Η συνεχής έκκριση της FSH επαγεί τη διαίρεση των κοκκιωδών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν ένα πολύστιβο επιθήλιο που περιβάλλει το ωκύτταρο (Εικόνα 2B). Μεταξύ του ωκυττάρου και των κοκκιωδών κυττάρων δημιουργείται μία γλυκοπρωτεϊνική στιβάδα που ονομάζεται διάφανη ζώνη (zona pellucida). Σε αυτό το στάδιο το ωοθυλάκιο ονομάζεται πολύστιβο πρωτογενές ωοθυλάκιο (Εικόνα 2C). Τα περισσότερα ωοθυλάκια, σε αυτό το στάδιο επίσης, εκφυλίζονται με μία

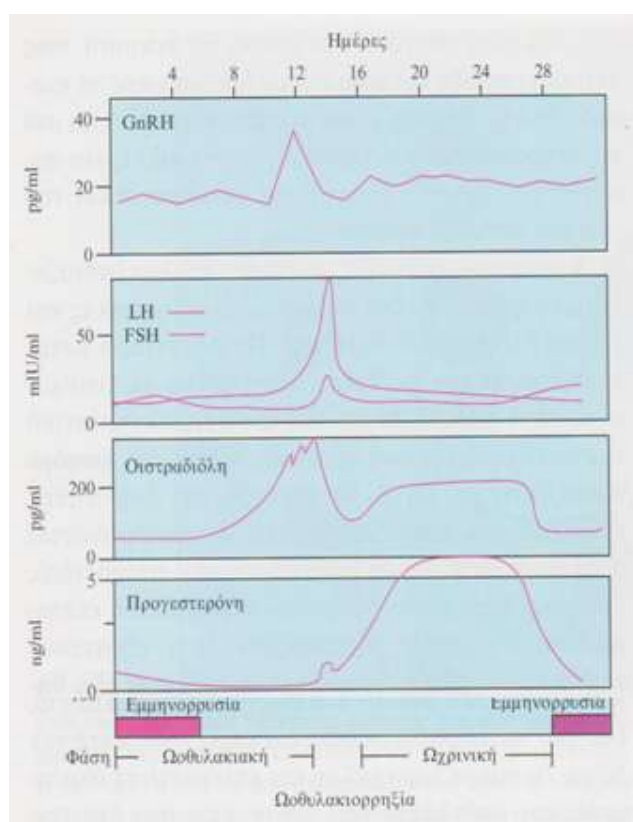
διαδικασία που ονομάζεται ατρησία ή οποία παρατηρείται και σε επόμενα στάδια διαφοροποίηση του ωοκυττάρου. Κατά την ατρησία τα συστατικά των ωοθυλακίων υφίστανται κυτταρική εκφύλιση και πλήρη απορρόφηση χωρίς να σχηματιστεί ουλή. Όταν όμως ένα μεγάλο ωοθυλάκιο υφίσταται ατρησία, δημιουργείται ευδιάκριτη ουλή, το ινώδες σωματίο.

Καθώς συνεχίζεται η ωοθυλακική ωρίμανση, η έξω στιβάδα των ωοθηκικών κοκκιωδών κυττάρων (granulosa cells) αρχίζει να διαφοροποιείται σε δύο στιβάδες. Η έσω στιβάδα (έσω θήκη, theca interna) αυξάνει σε μέγεθος και τα κύτταρα αυτής αρχίζουν να εκκρίνουν οιστρογόνα. Η έξω στιβάδα (έξω θήκη, theca externa) παραμένει λεπτή και συμπαγής. Παράλληλα λεπτές προεκβολές των κοκκιωδών κυττάρων επεκτείνονται κατά μήκος της διαφανούς ζώνης και αναδιπλώνονται με τις μικρολάχνες της πλασματικής μεμβράνης του ωοκυττάρου, εξασφαλίζοντας τη μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από τα κοκκιώδη κύτταρα στο ωοκύτταρο. Σε αυτό το στάδιο το ωοθυλάκιο ονομάζεται δευτερογενές (3).

Ανάμεσα στις στιβάδες των κοκκιωδών κυττάρων αναπτύσσεται μία κοιλότητα γεμάτη υγρό πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ που ονομάζεται άντρο (antrum). Το ωοκύτταρο τοποθετείται έκκεντρα και χωρίζεται από το υγρό από ένα κάλυμμα κοκκιωδών κυττάρων που ονομάζεται ωοφόρο λοφίδιο (cumulus oophorus). Το ωοθυλάκιο ονομάζεται τριτογενές ή γραφιανό (mature vesicular graafian follicle) και είναι έτοιμο για την ωοθυλακιορρηξία. Στο γραφιανό ωοθυλάκιο, το ωοκύτταρο επαγόμενο από την LH, συμπληρώνει το πρώτο στάδιο της μείωσης, όπου παράγεται απλοειδής γαμέτης (n) και ένα πολικό σωματίο (polar body) και ονομάζεται δευτερογενές ωοκύτταρο (secondary oocyte). Το πολικό σωματίο πρακτικά δεν έχει σχεδόν καθόλου κυτταρόπλασμα και βρίσκεται στον περιβιτελινικό χώρο, δηλαδή μεταξύ διάφανης ζώνης και κυτταρικής μεμβράνης του ωοκυττάρου. Το πολικό σωματίο, επίσης, μπορεί να διαιρεθεί μιτωτικά για ακόμη μία φορά.

Το ωοκύτταρο στη συνέχεια εισέρχεται στη Μείωση II, αλλά σταματά στο στάδιο της μετάφασης II τρεις ώρες πριν από την ωοθυλακιορρηξία. Η μείωση II ολοκληρώνεται μόνο όταν το ωοκύτταρο γονιμοποιείται, διαφορετικά το ωοκύτταρο αποπίπτει 24 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. Νέα ευρήματα από μετα-αναλύσεις απέδειξαν ότι ειδικές διαμορφώσεις της χρωματίνης, η γενετική ακεραιότητα καθώς και η συμμετοχή του κυτταροσκελετού είναι ενδεικτικές για την τάση του ωαρίου να συνεχίζει τη μειωτική διαίρεση (4).

2. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ



Εικόνα 3: Επίπεδα των ορμονών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας. Πηγή: Berne and Levy

Κατά την ωοθυλακιορρηξία, το ώριμο ωοθυλάκιο ή γραφیانό μεγαλώνει σε μέγεθος, τόσο ώστε προκαλεί παραμόρφωση της ωοθήκης. Το σημείο αυτό της παραμόρφωσης, που δεν έχει εμφανή αιμάτωση, ονομάζεται στίγμα (stigma).

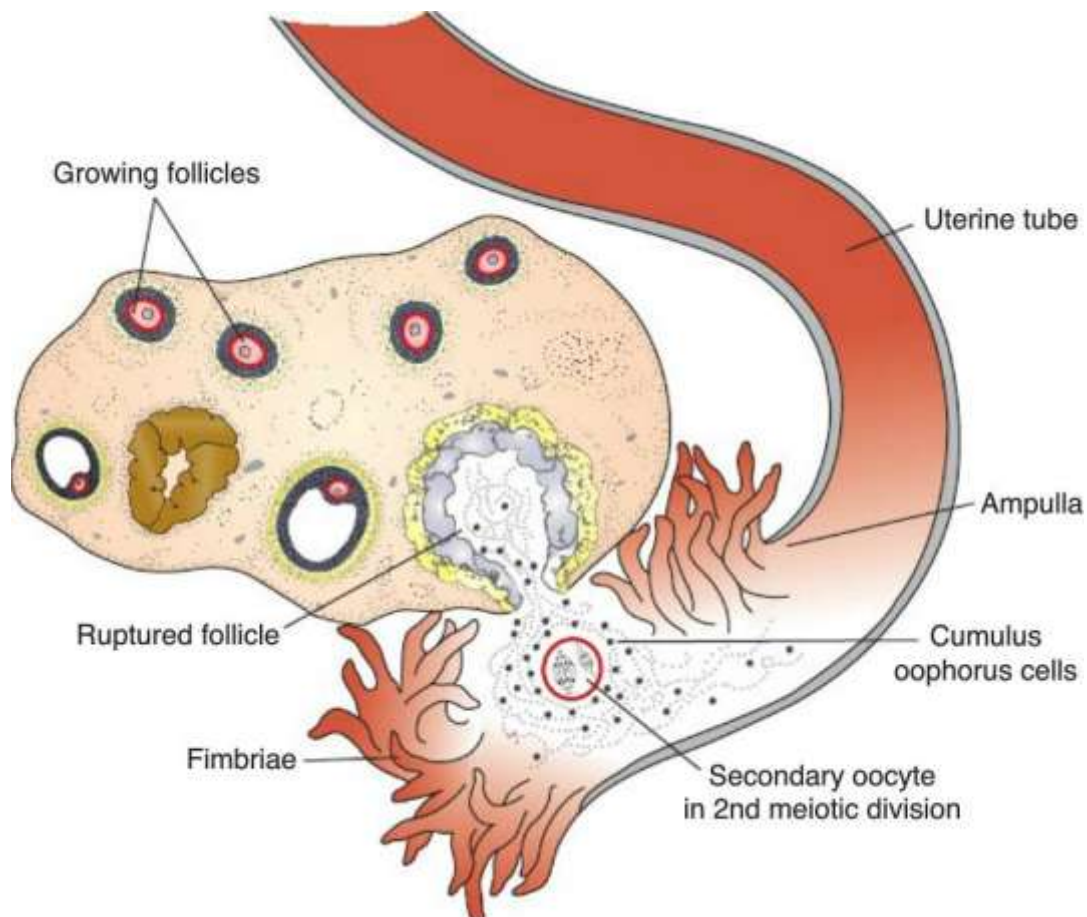
Το ερέθισμα για την ωοθυλακιορρηξία αποτελεί η έκκριση της LH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η LH επάγει τη συμπλήρωση της πρώτης φάσης της μειωτικής διαίρεσης, αλλά οδηγεί και στη ρήξη του ωοθυλακίου (5).

Πριν το ωοκύτταρο εγκαταλείψει την ωοθήκη αποσπάται από το τοίχωμα του ωοθυλακίου και κολυμπά στο ωοθυλακικό υγρό περιβαλλόμενο από το δίκτυο (ακτινωτό στέφανο, corona radiata) κοκκωδών κυττάρων (cumulus cells) που παραμένουν προσκολλημένα σε αυτό. Η περιοχή του τοιχώματος του ωοθυλακίου που είναι σε άμεση επαφή με το

επιθήλιο της ωθήκης, ρήγνυται και το ωθυλακικό υγρό εκκενώνεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Το απελευθερωθέν ωκύτταρο (ωθυλακιόρρηξία) μαζί με τον ακτινωτό στέφανο που το περιβάλλει προσλαμβάνεται από τον κώδωνα του αγωγού λόγω της κίνησης των κροσσών (Εικόνα 1). Με τη ρήξη του ωθυλακίου προκαλείται αιμορραγία στην περιοχή και το ωθυλάκιο γεμίζει με αιματόπηγμα. Μικρές ποσότητες αίματος απελευθερώνονται και στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Θεωρείται ότι σε αυτό οφείλεται και ο παροδικός κοιλιακός πόνος που αισθάνονται μερικές γυναίκες κατά την 14-16^η ημέρα του κύκλου.

Υπό την επίδραση και πάλι της LH, οι δομές του ωθυλακίου που παραμένουν στην ωθήκη μεταβάλλονται, υφίστανται σταδιακή οργάνωση και ίνωση (Εικόνα 3). Οι κυριότερες μεταβολές παρατηρούνται στα κοκκιώδη κύτταρα της έσω θήκης. Η LH επάγει σε αυτά τα κύτταρα που μετατρέπουν το ραγέν ωθυλάκιο σε μία ενδοκρινική δομή που καλείται ωχρο σωματίο (corpus luteum). Τα κοκκιώδη κύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος, παίρνουν ένα κίτρινο χρώμα και αρχίζουν να



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της ωθήκης, όπου προβάλλονται τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ωθυλακίου και της δομής που το διαδέχεται, του ωχρού σωματίου. Πηγή: Langman's Medical Embryology

εκκρίνουν οιστρογόνα και προγεστερόνη (Εικόνα 4). Πλέον τα κύτταρα αυτά θα καλούνται ωχρινικά κύτταρα (lutein cells). Το ωχρο σωματίο παρέχει το ορμονικό ισοζύγιο που βελτιστοποιεί τις συνθήκες για την εμφύτευση του γονιμοποιηθέντος ωαρίου και για τη μετέπειτα διατήρηση του ζυγώτη, έως ότου ο πλακούντας αναλάβει τη λειτουργία αυτή.

Το ωχρο σωματίο φέρει μία κεντρική περιοχή ουλοποίησης του αιμοπήγματος (fibrotic scar tissue) και όταν φθάσει στο μεγαλύτερο μέγεθός του την 20^η ημέρα του κύκλου, αποκτά μία ωοειδή μορφολογία και αρχίζει να εκφυλίζεται με την ελάττωση των ωχρινικών κυττάρων (ωχρινόλυση, luteolysis) και με την εμφάνιση κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε μειωμένη έκκριση οιστρογόνων και προγεστερόνης.

Το τελικό αποτέλεσμα της εκφύλισης του ωχρού σωματίου είναι ο σχηματισμός ωοειδούς μάζας από ακυτταρικό κολλαγονώδη ιστό που ονομάζεται λευκό σωματίο (corpus albicans), το οποίο παραμένει στην ωοθήκη, ελαττώνεται σε μέγεθος, αλλά τότε δεν εξαφανίζεται.

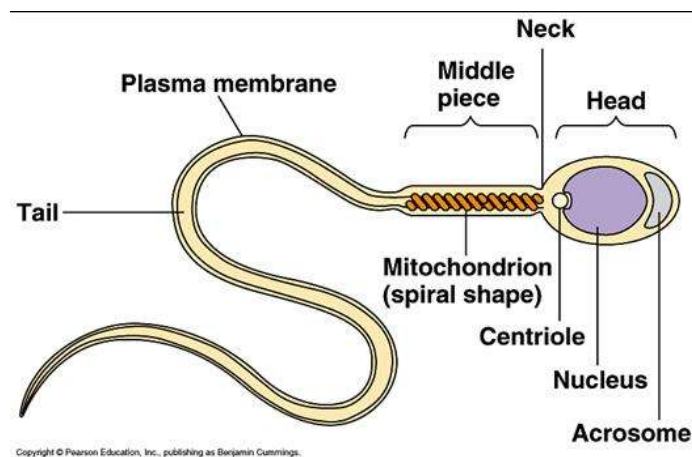
Στην περίπτωση που το ώριμο ωοκύτταρο γονιμοποιηθεί, δεν ακολουθεί εκφύλιση του ωχρού σωματίου λόγω της δράσης της χοριακής γοναδοτροπίνης που εκκρίνεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Το ωχρο σωματίο συνεχίζει να μεγαλώνει σε μέγεθος, δημιουργώντας το ωχρο σωματίο της κύησης (corpus luteum of pregnancy ή graviditatis). Τα ωχρινικά κύτταρα συνεχίζουν να παράγουν προγεστερόνη μέχρι το τέλος του 4^{ου} μήνα της κύησης. Η απομάκρυνση του ωχρού σωματίου της κύησης πριν την 9^η εβδομάδα της κύησης, συνήθως οδηγεί σε αποβολή του εμβρύου.

3. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η γονιμοποίηση, δηλαδή η σύντηξη του ωοκυττάρου με το σπερματοζωάριο, λαμβάνει χώρα στο τμήμα της ληκύθου, το πιο πλατύ μέρος του ωοαγωγού.

Τα σπερματοζωάρια δημιουργούνται από τις σπερματίδες μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται σπεματογένεση. Κατά τη διαδικασία αυτή τα

σπερματοζωάρια αποκτούν κεφαλή που αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα. Το ακρόσωμα περιβάλλει τη μισή σχεδόν πυρηνική επιφάνεια και περιλαμβάνει ένζυμα που διευκολύνουν τη διείσδυσή του στο ωάριο, όπως ακροσίνη, θρυψίνη, υαλουρονιδάσες και πρωτεάσες. Ο πυρήνας περιλαμβάνει το γενετικό υλικό του άρρενος που είναι συμπυκνωμένο στο μικρότερο δυνατό όγκο. Τα σπερματοζωάρια διαθέτουν ακόμη αυχένα, μέσο τμήμα και ουρά. Ο αυχένας συνδέει την κεφαλή με την ουρά, περιέχει το αξονικό νημάτιο που περιβάλλεται από ινίδια. Ο αυχένας περιλαμβάνει μιτοχόνδρια, ενζυμικά συστήματα γλυκολύσεως και οξειδώσεως και προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και την κινητικότητα του σπερματοζωαρίου. Η ουρά έχει μήκος 40-50 μm, αποτελείται ζεύγη ινιδίων και προσδίδει στο σπερματοζωάριο τη χαρακτηριστική κινητικότητά του.



Εικόνα 5: Δομή σπερματοζωαρίου.

Τα σπερματοζωάρια παραμένουν ζωντάνα στον ωαγωγό για αρκετές ημέρες. Το σπερματοζωάριο πρέπει να φθάσει και να συναντήσει το ωάριο μέσα σε 48 ώρες από τη στιγμή που θα εισέλθει στον κόλπο. Η επαφή σπερματοζωαρίου και ωαρίου διευκολύνεται από τις κινήσεις της μήτρας και του ωαγωγού. Μόνο το 1% των σπερματοζωαρίων που εισέρχονται στον κόλπο καταφέρνουν να φτάσουν στον τράχηλο της μήτρας.

Τα σπερματοζωάρια δεν είναι ικανά να γονιμοποιήσουν το ωάριο αμέσως μόλις καταφτάσουν στον ωαγωγό. Για να είναι αυτό εφικτό, θα πρέπει να γίνουν δύο διαδικασίες, να αποκτήσουν την ικανότητα γονιμοποίησης (capacitation) και να

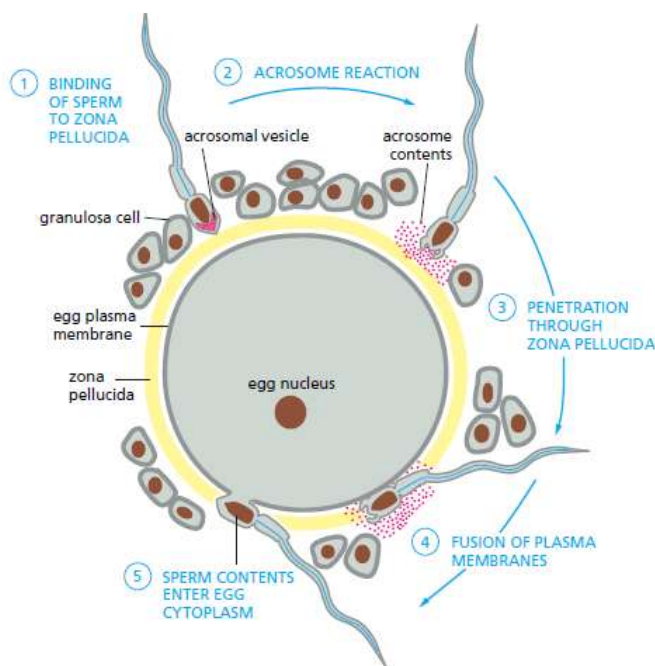
γίνει ακροσωμική αντίδραση (acrosome reaction). Η διαδικασία της απόκτησης της ικανότητας για γονιμοποίηση αναφέρεται στην περίοδο όπου το μικροπεριβάλλον του ωαγωγού προετοιμάζεται και διαρκεί γύρω στις 7 ώρες. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή απομακρύνεται η γλυκοπρωτεϊνική κάψα και οι σπερματικές πρωτεΐνες του πλάσματος των σπερματοζωαρίων που καλύπτουν το ακρόσωμα του σπερματοζωαρίου (Εικόνα 5). Η ικανότητα αποκτάται μέσω αλληλεπίδρασης του σπερματοζωαρίου με το επιθήλιο και τον βλεννογόνο του ωαγωγού. Ο ρυθμός με τον οποίο τα σπερματοζωάρια αποκτούν την ικανότητα γονιμοποίησης είναι αυστηρά ρυθμιζόμενος, ώστε η απελευθέρωση αυτών των σπερματοζωαρίων και συγχρονίζεται με την ωοθυλακιορρηξία (6).

Η ακροσωμική αντίδραση από την άλλη, αποτελείται από τρεις φάσεις: διείσδυση στον ακτινωτό στέφανο, διείσδυση στη διάφανη ζώνη, σύντηξη μεμβρανών σπερματοζωαρίου και ωαρίου (Εικόνα 6). Στην πρώτη φάση ο διασκορπισμός των κοκκιωδών κυττάρων επιτυγχάνεται με τη δράση της υαλουρονιδάσης και ενός διασκορπιστικού ενζύμου του ακτινωτού στεφάνου που βρίσκονται στην ακροσωμική καλύπτρα του σπερματοζωαρίου.

Η διάφανη ζώνη αποτελείται από ένα γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα που επιτρέπει και διατηρεί τη σύνδεση του σπερματοζωαρίου. Η πρόσδεση και η ακροσωμική αντίδραση επιτυγχάνονται με τη βοήθεια πρωτεϊνών-υποδοχέων ZP, με τη ZP3 να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο. Έχει αποδειχθεί ότι θηλυκοί ποντικοί ελλειμματικοί για το γονίδιο ZP3 παράγουν μη γόνιμα ωάρια που δεν έχουν διάφανη ζώνη (7). Η πρωτεΐνη ZP3 επιτρέπει την γονιμοποίηση ωαρίων από σπερματοζωάρια μόνο του ίδιου είδους.

Στη δεύτερη φάση, λοιπόν, αφού προσδεθεί το σπερματοζωάριο στη διάφανη ζώνη, ακροσωμικά ένζυμα, όπως η ακροσίνη, επιτρέπουν στο σπέρμα να διεισδύσει στη διάφανη ζώνη και να έρθει σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου. Ειδικότερα, αντισώματα έναντι της ακροσίνης (φυσικά αυτοαντισώματα ή αντισώματα παραγόμενα μετά από ανοσοποίηση σε ζώα εργαστηρίου) αποτελούν σημαντικό εργαλείο στην περαιτέρω κατανόηση της

διαδικασίας της γονιμοποίησης (8). Η διαπερατότητα της διαφανούς ζώνης μεταβάλλεται μόλις το σπερματοζωάριο έρχεται σε επαφή με το ωάριο, που οδηγεί στην απελευθέρωση των κοκκίων (cortical granules) της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου. Τελικά, η διάφανη ζώνη γίνεται αδιαπέραστη για επόμενο σπερματοζωάριο απενεργοποιώντας τους υποδοχείς ZP (αντίδραση ζώνης, zone reaction). Πολλά σπερματοζωάρια φαίνεται να προσδένονται στη διάφανη ζώνη, αλλά μόνο ένα απο αυτά καταφέρνει να διεισδύσει σε αυτή.



Εικόνα 6: Ακροσωμική αντίδραση. Πηγή: Alberts B., et al.

Στην τρίτη και τελευταία φάση, οι πλασματικές μεμβράνες των δύο γαμετών συντήκονται. Επειδή, το ακρόσωμα του σπερματοζωαρίου χάνεται κατά την ακροσωμική αντίδραση, η σύντηξη περιλαμβάνει την περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου πίσω από το ακρόσωμα. Στον άνθρωπο, τόσο η κεφαλή, όσο και η ουρά του σπερματοζωαρίου εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, εκτός

από την πλασματική μεμβράνη αυτού που παραμένει συντηγμένη με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου.

Από τη στιγμή που θα εισέλθει το σπερματοζωάριο στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, το ωάριο αποκρίνεται με τρεις τρόπους:

1. Το ωάριο με την απελευθέρωση των κοκκίων που περιέχουν λυσοσωμικά ένζυμα και αναφέρθηκαν παραπάνω, καθίσταται αδιαπέραστο από άλλα σπερματοζωάρια και έτσι δεν επιτρέπει την πολυσπερμία.
2. Το ωοκύτταρο ολοκληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και δημιουργείται ένα δεύτερο πολικό σώμα. Τα 23 χρωμοσώματα (22 απλοειδή και ένα φυλετικό X χρωμόσωμα) διατάσσονται στον προπυρήνα του ωαρίου.

3. Τέλος, ακολουθεί η μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου που περιλαμβάνει τις αρχικές κυτταρικές και μοριακές διαδικασίες που σχετίζονται με την εμβρυογένεση.

Το σπερματοζωάριο, εν τω μεταξύ, μετακινείται δίπλα στον θηλυκό προπυρήνα σχηματίζοντας έναν δεύτερο προπυρήνα. Η ουρά του σπερματοζωαρίου αποσπάται και αποδομείται. Οι δύο προπυρήνες έρχονται σε στενή επαφή και χαλαρώνουν τους πυρηνικούς φακέλους τους ενώ παράλληλα αντιγράφουν το γενετικό τους υλικό (Αντιγραφή DNA) και προετοιμάζονται για την πρώτη μιτωτική διαίρεση που θα οδηγήσει στη δημιουργία των δύο πρώτων θυγατρικών κυττάρων.

Η γονιμοποίηση παρουσιάζει 3 αποτελέσματα:

1. Δημιουργία διπλοειδούς κυττάρου από δύο απλοειδή γαμετικά κύτταρα. Το νέο διπλοειδές κύτταρο περιλαμβάνει ένα χρωμοσωμικό συνδυασμό από τους δύο γονείς που μαζί με την χιασματυπία της πρόφασης I, αποτελούν αίτια της γεντικής ποικιλομορφίας του πληθυσμού.
2. Καθορισμός του φύλου. Τα σπερματοζωάρια φέρουν είτε ένα X είτε ένα Y φυλετικό χρωμόσωμα. Οπότε ανάλογα με το σπερματοζωάριο που θα γονιμοποιήσει το ωάριο καθορίζεται και το φύλο (XX θηλυκό άτομα, XY αρσενικό άτομα).
3. Έναρξη κυτταροπλασματικής διαίρεσης. Αν το ωοκύτταρο δεν γονιμοποιηθεί αποπίπτει εντός 24 ωρών μετά την ωοθυλακιορρηξία.

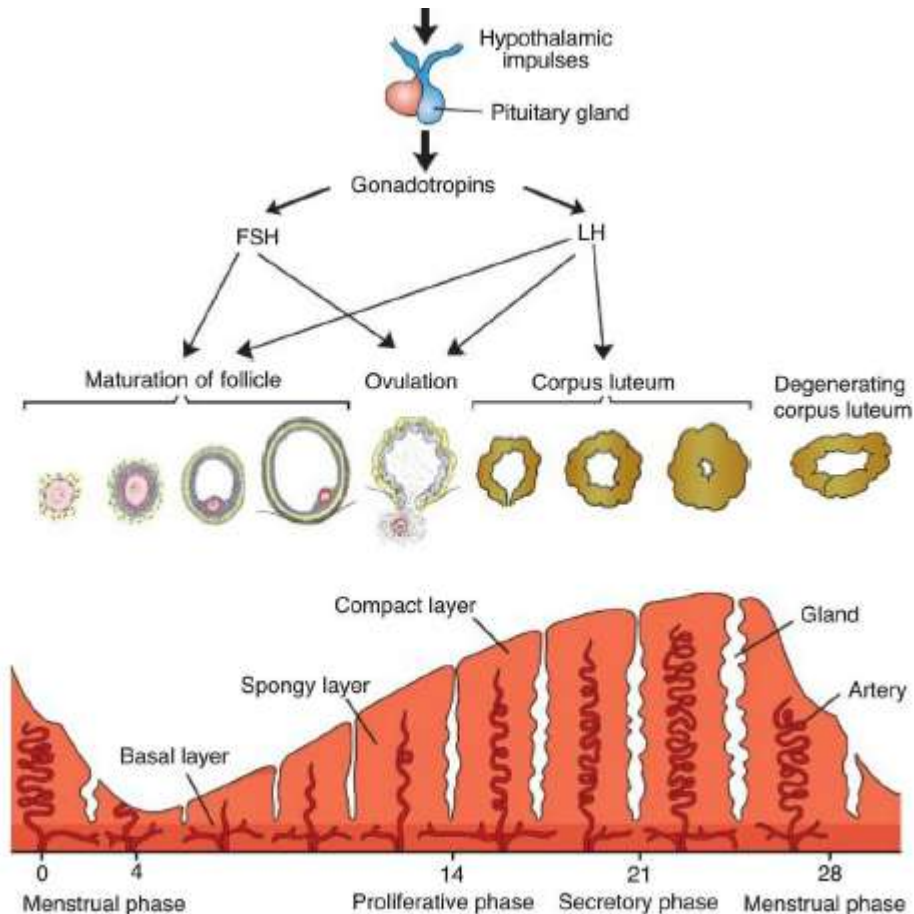
4. Στάδια ενδομητρίου κατά τον καταμηνιαίο κύκλο

Το ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του κύκλου περνά από τρεις φάσεις:

1. Παραγωγική φάση (Proliferative Phase)
2. Εκκριτική φάση (Secretory Phase)
3. Έμμηνη φάση (Menstrual Phase)

Η παραγωγική φάση ξεκινά μετά το τέλος του καταμηνιαίου κύκλου υπό την επίδραση των οιστρογόνων και παράλληλη ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η

εκκριτική φάση ξεκινά 2-3 μέρες πριν την ωοθυλακιορρηξία, αποκρινόμενη στην προγεστερόνη που παράγεται από το ωχρό σωματίο. Εάν το ώριμο ωοκύτταρο δεν γονιμοποιηθεί, η απόπτωση των κυττάρων του ενδομητρίου σηματοδοτεί την έναρξη του έπομενου κύκλου (Εικόνα 7).



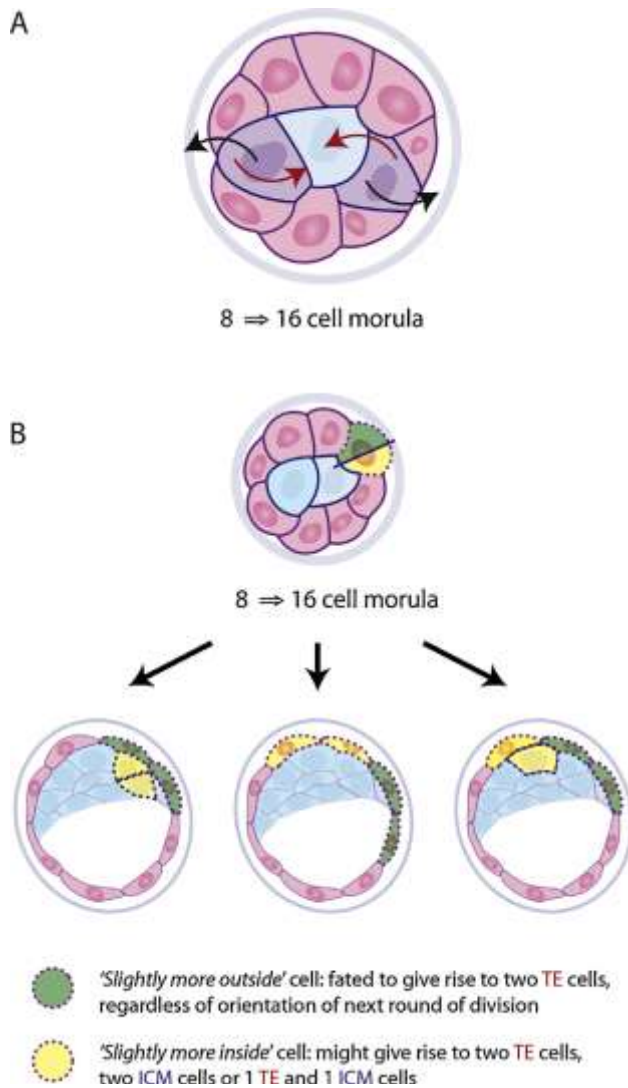
Εικόνα 7: Αλλαγές του ενδομητρίου σε απόκριση στις ορμόνες σε κάθε στάδιο του καταμηνιαίου κύκλου. Πηγή: Langman's Medical Embryology

Στην περίπτωση γονιμοποίησης του σπερματοζωαρίου, το ενδομήτριο γίνεται επιδεκτικό για την εμφύτευση του εμβρύου, αποκρινόμενο στην προγεστερόνη που παράγεται από το ωχρό σωματίο και συμμετέχει στο σχηματισμό του πλακούντα (placenta), ο οποίος λειτουργεί τόσο ως περιοχή ανταλλαγής ουσιών, όσο και σαν ενδοκρινές όργανο.

5. ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΒΡΥΟΥ

5.1 Σχηματισμός Μοριδίου

Αφότου το έμβρυο έχει φτάσει στο στάδιο των δύο κυττάρων, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, ακολουθεί μία σειρά μιτωτικών διαιρέσεων που οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα που μικραίνουν σε μέγεθος καθώς αυξάνεται ο αριθμός τους, ονομάζονται βλαστομερή (blastomeres). Μετά την 3^η μιτωτική διαίρεση, αυξάνουν την επαφή μεταξύ τους μέσω στενοσυνδέσμων, δημιουργώντας μία συμπαγή σφαίρα κυττάρων, μία διαδικασία που ονομάζεται σύμπληξη (compaction) (9). Τρεις μέρες μετά την γονιμοποίηση το συμπυγμένο έμβρυο διαιρείται ξανά και δημιουργεί το 16 κυττάρων μορίδιο (morula). Το έμβρυο καλείται μορίδιο μέχρι και το στάδιο των 32 κυττάρων. Τα εσωτερικά κύτταρα του μοριδίου συνιστούν την εσωτερική



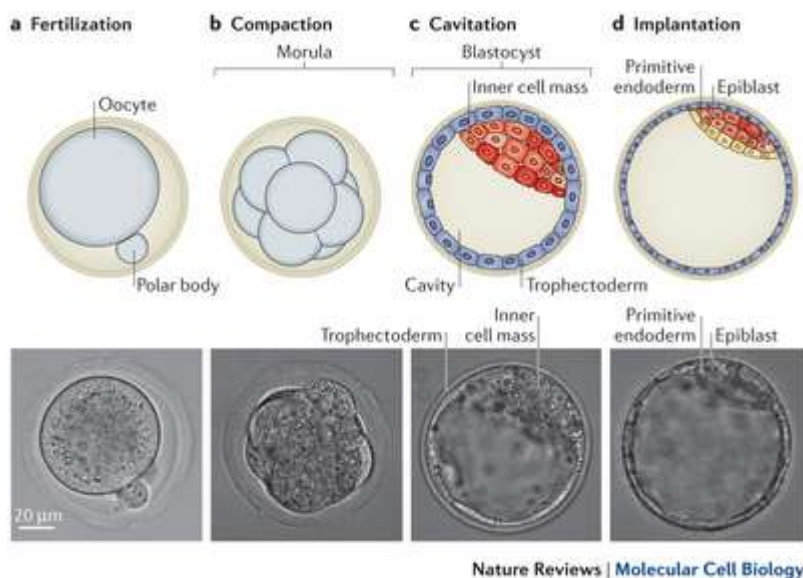
Εικόνα 8: Η κίνηση και το πεπρωμένο των βλαστομερών στο στάδιο του μοριδίου. Πηγή: Biggins JS., et al, 2015.

κυτταρική μάζα (ICM, Inner Cell Mass) και τα περιβάλλοντα κύτταρα συνιστούν την εξωτερική κυτταρική μάζα. Η εσωτερική κυτταρική μάζα σχηματίζει του ιστούς του εμβρύου (embryo propria), ενώ η εξωτερική κυτταρική μάζα σχηματίζει την τροφοβλάστη.

Έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια στο να διασαφηνιστεί ο ρόλος της γεωμετρίας και της μηχανικής στον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου και των θέσεων που παίρνουν στο έμβρυο τα βλαστομερή, αλλά και των δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ των. Συγκεκριμένα, μελέτες αναπτυξιακής βιολογίας σε έμβρυα ποντικών απέδειξαν ότι τα βλαστομερή μπορούν να

μετακινούνται εσωτερικά ή εξωτερικά (10). Τα βλαστομερή που βρίσκονται ελαφρώς προς το εσωτερικό ή το εξωτερικό θα αποτελέσουν στη συνέχεια τα κύτταρα της τροφοβλάστης, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται ελαφρώς προς το εσωτερικό τα αποτελέσουν τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Εικόνα 8) (11).

5.2 Σχηματισμός βλαστοκύστης



Εικόνα 9: Προεμφυτευτικά στάδια. Πηγή: Wennekamp., et al.2013

που καλείται βλαστόκοιλο (blastocoel) και το έμβρυο ονομάζεται πλέον βλαστοκύστη (blastocyst). Η εσωτερική κυτταρική μάζα ονομάζεται εμβρυοβλάστη (embryoblast) και βρίσκεται στον έναν πόλο του εμβρύου, ενώ στον άλλο πόλο βρίσκεται η εξωτερική κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη (trophoblast), η οποία αποτελείται από μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Μέσα σε 72 ώρες από την είσοδο του εμβρύου στη μήτρα το έμβρυο απεκδύει τη διάφανη ζώνη (hatching), γεγονός το οποίο επιτρέπει την εμφύτευση του εμβρύου (Εικόνα 9).

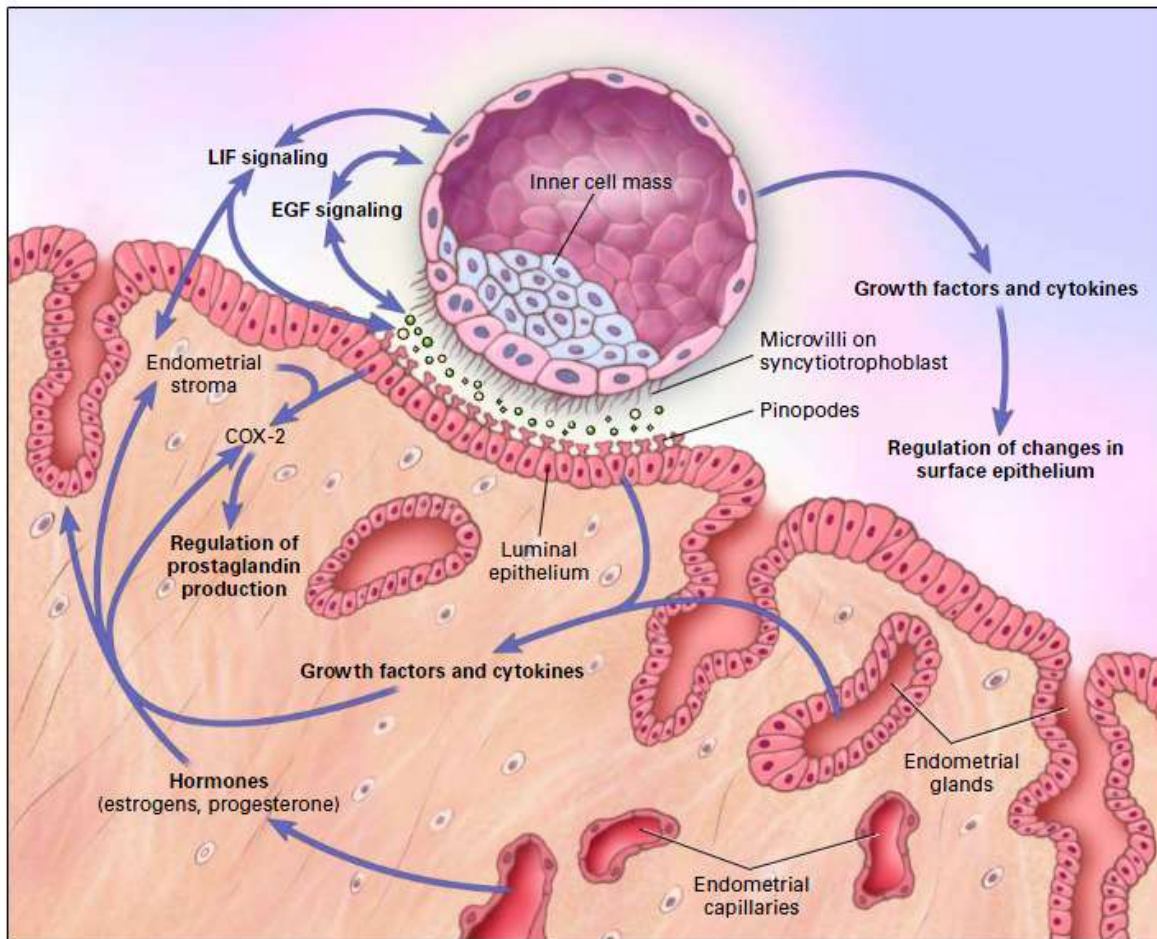
6. ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΕΜΒΡΥΟΥ

Η εμφύτευση ξεκινά 6 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Η επιτυχής εμφύτευση εξαρτάται απ' τον συγχρονισμό αναπτυξιακού σταδίου του εμβρύου και μοριακών

Κατά τη φάση, που το μορίδιο μεταναστεύει στην κοιλότητα του ενδομητρίου, υγρό διαπερνά τη διάφανη ζώνη, εισέρχεται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του μοριδίου και έτσι στο εσωτερικό αρχίζει να σχηματίζεται μία κοιλότητα

και κυτταρικών γεγονότων που επάγονται στο ενδομήτριο της μητέρας αυτοκρινώς ή παρακρινώς. Η εμφύτευση συνίσταται σε τρεις διαδοχικές διεργασίες: εναπόθεση (apposition), προσκόλληση (attachment), διείσδυση (penetration).

6.1 Εναπόθεση του Εμβρύου



Εικόνα 10: Εναπόθεση και προσκόλληση της βλαστοκύστης περίπου 6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση Πηγή: Norwitz., *et al.*, 2001

Η φάση αυτή συμπεριλαμβάνει την αρχική, ασταθή προσκόλληση της βλαστοκύστης στο τοίχωμα της μήτρας. Η εναπόθεση προϋποθέτει την αύξηση της οιστραδιόλης-17β που επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου, της προγεστερόνης αλλά και τη βιοσύνθεση της προσταγλανδίνης. Ειδικότερα, τα κύτταρα της τροφοβλάστης προσανατολίζουν και οδηγούν το έμβρυο σε συγκεκριμένη περιοχή του ενδομητρίου που μοιάζει με κρύπτη και ακολουθεί μία χαλαρή πρόσδεση του

εμβρύου με τα κύτταρα του ενδομητρίου. Οι διαδικασίες αυτές ελέγχονται παρακρινώς (12). Στο στάδιο αυτό και κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου της γυναίκας (Ενότητα 5) εμφανίζονται μικρές προεκβολές της εξωτερικής στιβάδας του ενδομητρίου, τα πινοπόδια (pinopodes), τα οποία αλληλεπιδρούν με τις μικρολάχνες (microvilli) της συγκυτιοτροφοβλάστης (Εικόνα 10). Αμφισβητείται, όμως, το εάν τα πινοπόδια μπορούν να αποτελέσουν κλινικό δείκτη για την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου (13). Η κυκλοξυγενάση (COX), ένζυμο που συμμετέχει στη μετατροπή του αραχιδονικού οξέως σε προσταγλανδίνη H₂ συναντάται σε δύο ισομορφές. Η COX-2 παράγεται στο σημείο εμφύτευσης της βλαστοκύστης και η παραγωγή της εξαρτάται από την προς εμφύτευση βλαστοκύστη.

Αρκετοί μοριακοί δείκτες έχουν χαρακτηριστεί ως ενδεικτικοί για την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου να δεχθεί τη βλαστοκύστη. Ο LIF (Leukemia Inhibiting Factor) αυξάνεται κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου και απουσία αυτού, παρουσιάζεται περιορισμένη γονιμότητα σε ποντίκια (14). Άλλα μόρια που εμπλέκονται είναι μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως οι μουκίνες (mucins) που επάγουν την αύξηση της έκφρασης υποδοχέων ολιγοσακχαριτών στην επιφάνεια της μήτρας (MUC1), οι αυξητικοί παράγοντες (TGF-α, TGF-β, PDGF), Ιντερλευκίνες 1 και 6 και προσταγλανδίνες (15).

6.2 Προσκόλληση του Εμβρύου

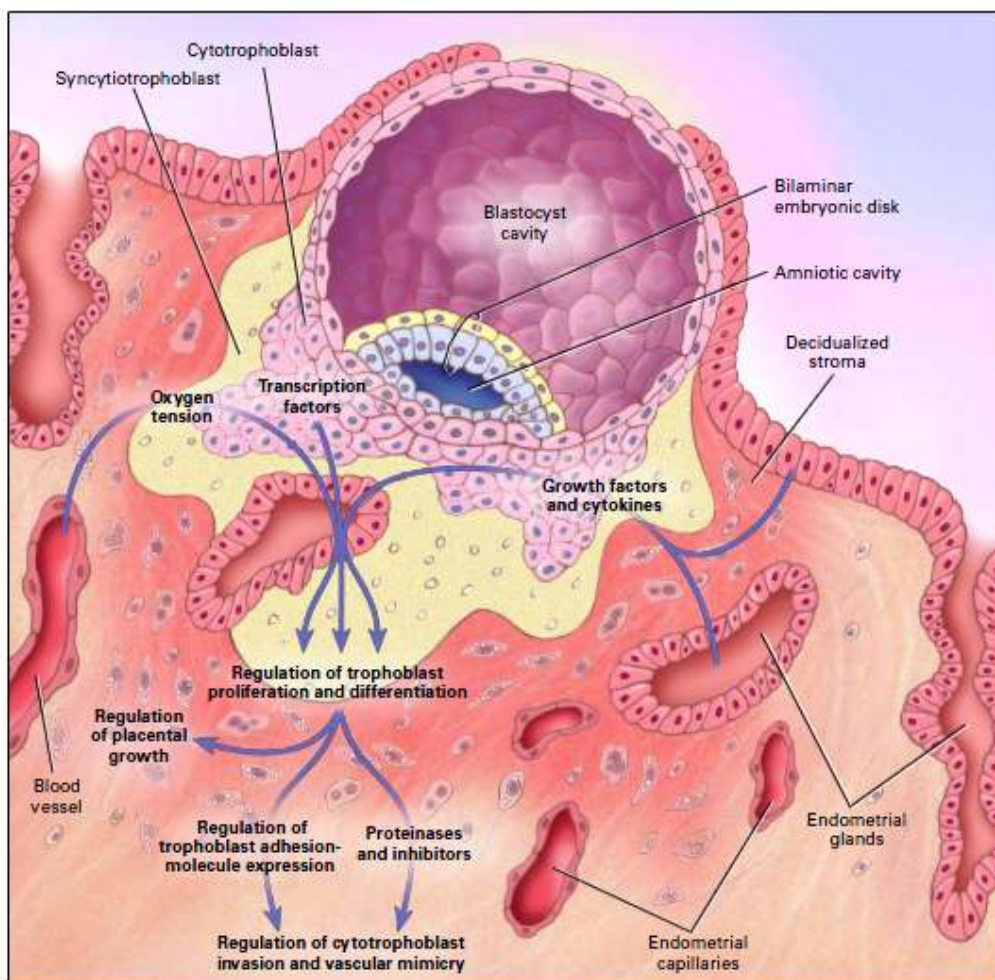
Στο στάδιο αυτό παρατηρείται αυξημένη φυσική επαφή μεταξύ βλαστοκύστης και επιθηλίου της μήτρας. Μελέτες δείχνουν ότι η προσκόλληση του εμβρύου προωθείται από μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως η L-σελεκτίνη των κυττάρων της τροφοβλάστης με υποδοχείς του επιθηλίου της μήτρας και η E-καντερίνη που βρίσκεται στα πινοπόδια στην επιφάνεια της μήτρας. Στη φάση αυτή, η χοριακή γοναδοτροπίνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης επάγει την έκφραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, τροφινίνη (trophinin) στα πινοπόδια, η οποία πρωτίστως συμμετέχει στην κυτταρική

προσκόλληση και κατά δεύτερον στη μεταγωγή του σήματος και την ενεργοποίηση του ErbB4 (Epidermal Growth Factor Receptor B4), ο οποίος προάγει την εμφύτευση και τον πολλαπλασιασμό. Τέλος, η τροφινίνη προωθεί την απόπτωση επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας που διαμεσολαβείται από την κασπάση 3 (16). Η χοριακή γοναδοτροπίνη εκτός από την επαγωγή της τροφινίνης, ρυθμίζει και τις ανοσολογικές αποκρίσεις που στην περίπτωση της εμφύτευσης έχουν τη μορφή άσηπτης φλεγμονής. Ειδικότερα, η hCG ρυθμίζει το ανοσοβιολογικό σύστημα, τοπικά, και ανοχοποιεί το ενδομήτριο έναντι του εισβάλλοντος εμβρύου.

Περαιτέρω προσκόλληση και εμφύτευση του εμβρύου γίνεται με τη βοήθεια ιντεγκρινών που εκφράζονται από τα κύτταρα της επιφάνειας του ενδομητρίου και συγκεκριμένα της ιντεγκρίνης ανβ3, ενώ πρωτεΐνες του εξωκυττάρου χώρου, όπως η λαμινίνη, το κολλαγόνο, η φιμπρονεκτίνη και η βιτρονεκτίνη βοηθούν στη μετακίνηση του εμβρύου προσκολλώμενες σε ιντεγκρίνες (17).

6.3 Διείσδυση του εμβρύου

Κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου, τα κύτταρα του ενδομητρίου λόγω της προγεστερόνης που εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο μεγεθύνουν και συσσωρεύουν γλυκογόνο και λιπίδια και ονομάζονται πλέον κύτταρα του φθαρτού υμένα. Η τροφοβλάστη αφού συνδεθεί καλά με τα κύτταρα του ενδομητρίου, διεισδύει μεταξύ και κάτω από τα κύτταρα του ενδομητρίου και λύει τη μεσοκυττάρια ουσία, ενώ με τη φαγοκυττάρωση απομακρύνει τα νεκρά κύτταρα του ενδομητρίου. Κατά την όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης, η μονόστιβη τροφοβλάστη που αποτελεί το εξωτερικό τοίχωμα της βλαστοκύστης μετατρέπεται σε δίστιβη. Η εξωτερική στιβάδα χαρακτηρίζεται από την απώλεια των πλάγιων κυτταρικών ορίων και καλείται συγκυτιοτροφοβλάστη. Η συγκυτιοτροφοβλάστη εκκρίνει χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) που είναι υπεύθυνη για τη συντήρηση του φθαρτού, μετά τη διακοπή της διέγερσής του από την υποφυσιακή LH.



Εικόνα 10: Διείσδυση της βλαστοκύστης περίπου 9-10 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση Πηγή: Norwitz., *et al.*, 2001

Η τροφοβλάστη είναι αυτή που ενεργοποιεί την κινάση p38 (MAPK) στο επιθήλιο του ενδομητρίου επάγοντας απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και διευκολύνοντας τη διείσδυση. Μέχρι η τροφοβλάστη να εγκαταστήσει αγγειακές συνδέσεις με το ενδομήτριο, που είναι το τελικό στάδιο της διείσδυσης, με τη βοήθεια της συγκυτιακής στιβάδας, ο φθαρτός υμένας (deciduum) λειτουργεί ως πηγή θρεπτικών ουσιών για το κύημα (Εικόνα 10). Κατόπιν ο φθαρτός υμένας παρέχει έναν ανοσολογικό φραγμό για την περαιτέρω εισβολή στο τοίχωμα της μητέρας (18). Μετά από ανοσοϊστοχημική μελέτη των αρτηριών κατά τη διείσδυση του εμβρύου, παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση και μερική απώλεια του αγγειακού λείου μυός, οίδημα και ρήξη του ενδοθηλίου (19).

Η τροφοβλάστη που συνεχίζει να αναπτύσσεται μαζί με ένα τμήμα του στρώματος του ενδομητρίου, το οποίο έχει μετατραπεί σε φθαρτό, σχηματίζει τον πλακούντα.

7. ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ- ΥΠΟΦΥΣΗ- ΓΟΝΑΔΕΣ

Η αναπαραγωγή του ανθρώπου απαιτεί ένα φυσιολογικό άξονα υποθαλάμου (hypothalamus) – υπόφυσης (pituitary gland) και γονάδων (genitalia), ο οποίος εξασφαλίζει τη δημιουργία των ώριμων γαμετών από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGC, primordial germ cells), με επακόλουθο την επιτυχή γονιμοποίηση και τέλος την ανάπτυξη του κυήματος.

Ο υποθάλαμος και η υπόφυση με τις συναφείς νευρικές και αγγειακές συνδέσεις σχηματίζουν μία μονάδα που εκφράζει την αλληλεπίδραση ενδοκρινικού και νευρικού συστήματος. Η μονάδα αυτή ρυθμίζει τον μεταβολισμό του ύδατος, την έκκριση του γάλακτος, την αύξηση του σώματος, την αναπαραγωγή, τη γαλουχία, την αύξηση και εκκριτική δραστηριότητα του θυροειδούς αδένα, των επινεφριδίων και των γεννητικών οργάνων.

7.1 Υποθάλαμος

Από ενδοκρινικής άποψης, ο υποθάλαμος μπορεί να θεωρηθεί ως κεντρικός σταθμός συλλογής και ολοκλήρωσης σημάτων από διαφορετικά κέντρα και διοχέτευσης αυτών στην υπόφυση. Οι νευρώνες του υποθαλάμου συνθέτουν και εκκρίνουν νευροορμόνες, οι οποίες αποθηκεύονται σε εκκριτικά κοκκία στις τελικές απολήξεις των νευραξόνων, απ' όπου απελευθερώνονται και δρουν σε απομακρυσμένα κύτταρα στόχους (νευροκρινικά). Οι εκλυτικές ή ανασταλτικές ορμόνες του υποθαλάμου αντιδρούν με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Ένα κλινικό παράδειγμα που αποδεικνύει την αναπαραγωγική λειτουργία του υποθαλάμου, αποτελεί η χορήγηση εκλυτικής ορμόνης υποθαλάμου σε γυναίκες που εμφανίζουν στειρώση λόγω υποθαλαμικής

ανεπάρκειας. Μετά από τη χορήγηση εκλυτικής ορμόνης είναι δυνατόν να αποκατασταθεί ο ωοθυλακιορρηκτικός κύκλος.

7.2 Πρόσθιος λοβός της υπόφυσης ή Αδενοϋπόφυση

Η υπόφυση βρίσκεται κάτω από τον υποθάλαμο σε ένα κοίλωμα του οστού, που ονομάζεται τουρκικό εφίππιο. Ο αδένας σχηματίζεται από τη συγχώνευση του οπίσθιου λοβού ή νευροϋπόφυση και τον πρόσθιο λοβό ή αδενοϋπόφυση. Ο πρόσθιος λοβός αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της υπόφυσης, περιέχει τουλάχιστον πέντε τύπους ενδοκρινικών κυττάρων, καθένας από τους οποίους είναι υπεύθυνος για την παραγωγή διαφορετικών ορμονών. Κάθε τύπος κυττάρου ρυθμίζεται από μία ή περισσότερες υποθαλαμικές νευροορμόνες. Ένας από τους τύπους κυττάρων του πρόσθιου λοβού παράγει ορμόνες που ρυθμίζουν τη λειτουργία των γονάδων, όπως η ωχρινοτρόπος (LH, Luteinizing Hormone) και θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH, Follicle Stimulating Hormone). Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης τελεί υπό τον αναδραστικό έλεγχο των περιφερικών στόχων τους.

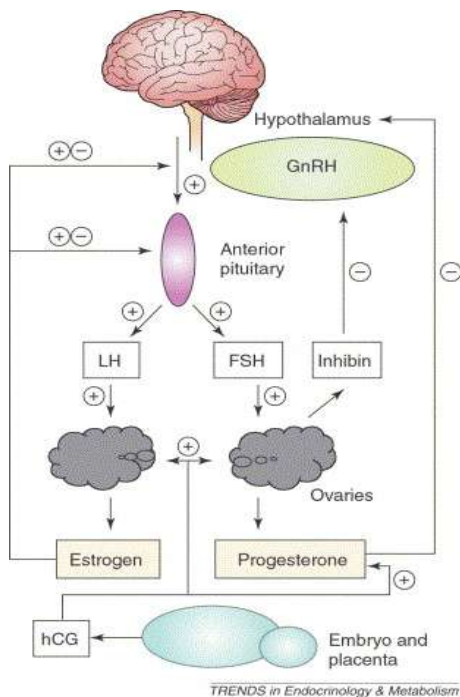
7.3 Ορμόνες των θηλυκών γονάδων

Οι ωοθήκες αποτελούνται από το ανατομικό μέρος, το οποίο περικλείει την αναπτυσσόμενη γεννητική σειρά, αποτρέποντας την έκθεση των γαμετών στα συστατικά του πλάσματος και του υγρού των ιστών και το λειτουργικό τμήμα που αποτελείται από τα ενδοκρινή κύτταρα που εκκρίνουν τις ορμόνες του φύλου. Οι πιο σημαντικές στεροειδείς ορμόνες για το θήλυ είναι η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη. Οι ορμόνες αυτές διεγείρουν την ανάπτυξη και λειτουργία των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, ρυθμίζουν την έκκριση των ορμονών του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση, τροποποιούν τη διάπλαση του σώματος και υποστηρίζουν το κύημα.

Στις ωοθήκες υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ενδοκρινικών κυττάρων. Τα κύτταρα που περιβάλλουν άμεσα τους γαμέτες και ονομάζονται κοκκώδη

κύτταρα που εκκρίνουν κυρίως οιστρογόνα και τα κύτταρα που είναι πιο απομακρυσμένα από τους γαμέτες και ονομάζονται κύτταρα θήκης και εκκρίνουν κυρίως ανδρογόνα. Μεταμορφωθέντα κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης, που ονομάζονται ωχρινοφόρα κύτταρα, εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες προγεστερόνη.

7.4 Ρύθμιση έκκρισης ορμονών

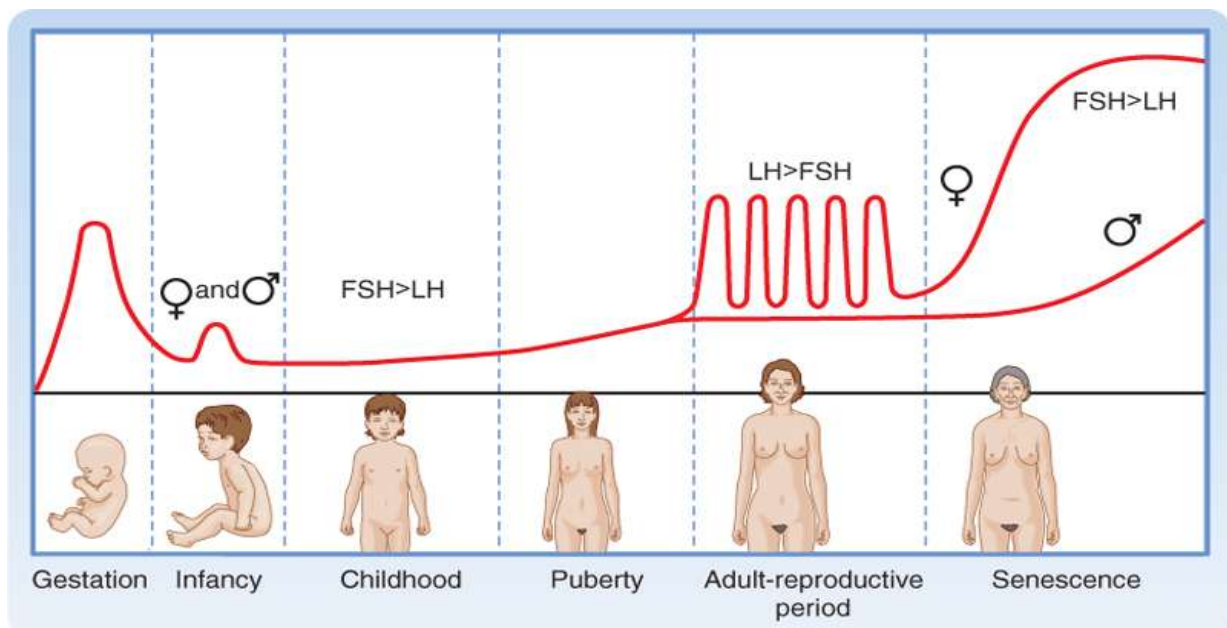


Εικόνα 11: Ρύθμιση έκκρισης ορμονών φύλου, Πηγή: Trends in Endocrinology & Metabolism

Η LH και η FSH είναι γλυκοπρωτεΐνες. Η LH διεγείρει κυρίως τα κύτταρα θήκης προκειμένου να συνθέσουν ανδρογόνα και σε μικρότερο βαθμό οιστρογόνα. Διεγείρει, επίσης, τα κοκκώδη κύτταρα αφού οι υποδοχείς για την LH εκφράζονται από τα κύτταρα αυτά κατά τη διάρκεια του κύκλου της γυναίκας και τη μεταφορά χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια και τη μετατροπή της σε πρεγνενολόνη (πρόδρομο μόριο). Η συνεχής διέγερση από την LH ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα του υποδοχέα και την απόκριση στην ορμόνη.

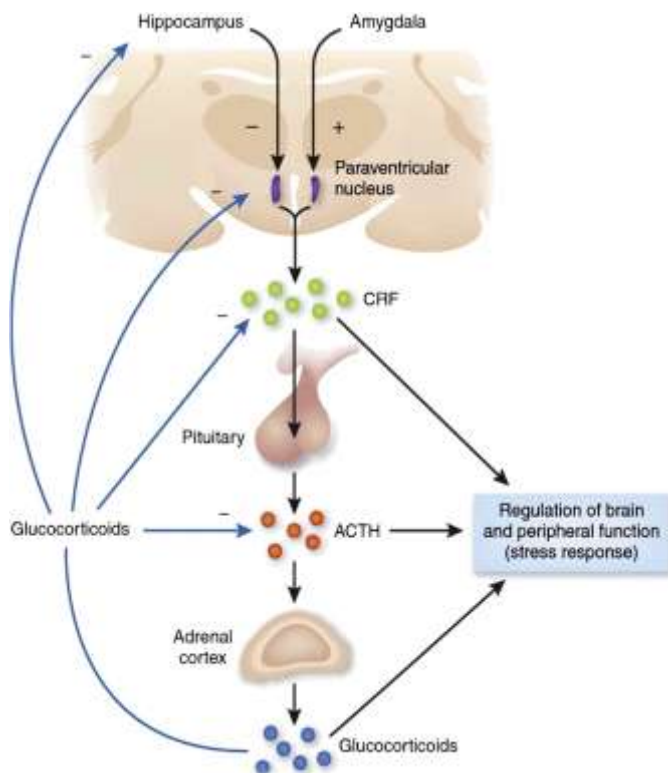
Η FSH διεγείρει την έκκριση οιστρογόνων από τα κοκκώδη κύτταρα, ενισχύει τη μεταγραφή της αρωματάσης, ένζυμο απαραίτητο για τη σύνθεση της οιστραδιόλης και αυξάνει τον αριθμό των υποδοχέων της LH στα κύτταρα στόχους ενισχύοντας την ευαισθησία τους στην LH (Εικόνα 11, 12).

Η οιστραδιόλη αναστέλλει ανάδρομα την έκκριση της LH και FSH. Η οιστραδιόλη δρα και στο επίπεδο του υποθαλάμου ελαττώνοντας την έκκριση της GnRH.



Εικόνα 12: Επίπεδα γοναδοτροπινών κατά τη διάρκεια της ζωής. Διακρίνονται οι παρωδικές κορυφώσεις κατά την κύηση και κατά την παιδική ηλικία καθώς και τα χαμηλά επίπεδα κατά την παιδική ηλικία. Λόγω της περιοδικής εμμηνορρύθμισης, διακρίνονται κυκλικές εκρήξεις όπου η LH ξεπερνά την FSH. Μετά την ηλικία των 50 αντιστρέφεται αυτό και υπερέχει η FSH. Πηγή: Berne and Levy

8. ΚΟΡΤΙΚΟΕΚΛΥΤΙΝΗ (CRH, CORTICOTROPHIN RELEASING HORMONE)



Εικόνα 13: Η κορτικοεκλυτίνη παράγεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (PVN, Paraventricular nucleus) και επάγει την έκκριση της ACTH στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μέσω του υποδοχέα R1. Η ACTH επάγει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών ορμονών (κορτιζόλη) από το φλοιό των επινεφριδίων. Πηγή: Contoreggi, 2014.

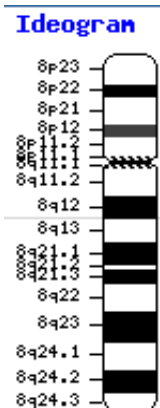
προκαλεί με τη σειρά της την έκφραση κορτικοειδών ορμονών και τη βιοσύνθεση ανδρογόνων από τα επινεφρίδια (Εικόνα 13). Η CRH είναι υπεύθυνη για ενδοκρινείς, αυτόνομες, ανοσολογικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις των θηλαστικών στο στρες.

8.1 Δομή γονιδίου CRH

Η CRH είναι μέλος μίας κατηγορίας πεπτιδίων όπως η σοβαγίνη (sauvagine), ουροτενσίνη (urotensin) και ουροκορτίνη (urocortin) που παρουσιάζουν παρόμοιες λειτουργίες. Το γονίδιο της ανθρώπινης CRH, εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8 (Εικόνα 14) και αποτελείται από 2 εξώνια που διαχωρίζονται από

Το Σεπτέμβριο του 1981 ο Vale W. και οι συνεργάτες, παρουσίασαν για πρώτη φορά στο επιστημονικό περιοδικό Science, την ύπαρξη ενός υποθαλαμικού πεπτιδίου του προβάτου 41 αμινοξέων (21). Το νευροπεπτίδιο αυτό ήταν η CRH, η οποία συντίθεται στο μικροκυτταρικό τμήμα του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου και ρυθμίζει τον άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- επινεφρίδια (HPA axis). Απελευθερώνεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης όπου και επάγει την έκκριση της κορτικοτροπίνης ACTH, η οποία

ένα ιντρόνιο. Το τελικό μήκος του μετάγραφου είναι 1,3kb. Η κορτικοεκλυτίνη δρα μέσω της πρόσδεσής της σε τρεις κυτταροπλασματικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες και την αδενυλική κυκλάση.



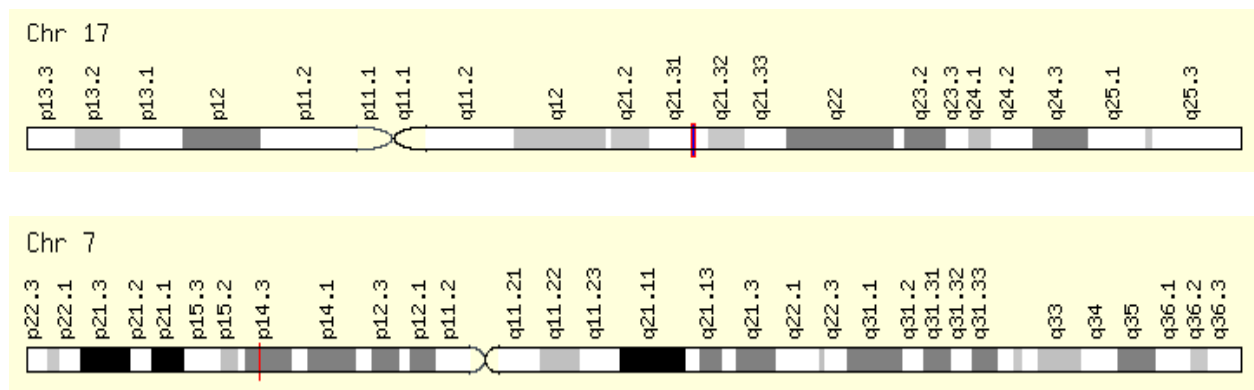
Εικόνα 14: Ο γενετικός τόπος του γονιδίου της CRH στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8. Πηγή: NCBI.

Η κορτικοεκλυτίνη εκτός από περιοχές του εγκεφάλου εκκρίνεται και δραστηριοποιείται και σε άλλες περιοχές του οργανισμού. Αρχικά παράγεται σχεδόν σε όλα τα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα όπως στη μήτρα, το ενδομήτριο, την ωοθήκη, το φθαρτό υμένα, την τροφοβλάστη, τη συγκυτιοτροφοβλάστη και στον πλακούντα. Η συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα είναι η κύρια παραγωγική

πηγή της κορτικοεκλυτίνης. Επιπρόσθετα, παράγεται στα σημεία της φλεγμονής, κυρίως από τα Τ λεμφοκύτταρα και επηρεάζει τόσο την έμφυτη όσο

και την προσαρμοστική ανοσία (22). Σε ότι αφορά τα αναπαραγωγικά όργανα του αρρενος, η CRH παράγεται από τους όρχεις ως καταστολέας της δράσης των κυττάρων Leydig (23).

8.2 Οι υποδοχείς της CRH

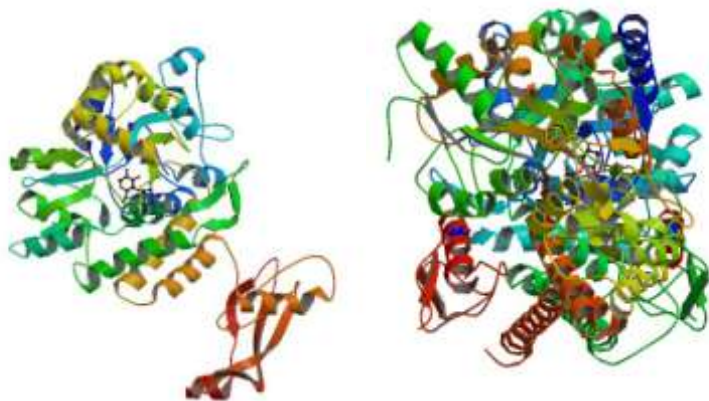


Εικόνα 15: Ο γενετικός τόπος του γονιδίου της CRH-R1 στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 και του CRH-R2 στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 7. Πηγή: Ensembl

Οι βιολογικές δράσεις της CRH και των ουροκορτινών ρυθμίζονται από δύο κυρίως υποδοχείς τον CRH-R1 και τον CRH-R2. Ο υποδοχέας CRH-R1 προσδένεται στην CRH με μεγάλη συγγένεια, το γονίδιο του οποίου έχει κλωνοποιηθεί από τον εγκέφαλο ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου. Μέσω εναλλακτικού ματίσματος

του, προκύπτουν 8 ισομορφές του υποδοχέα R1. Ο υποδοχέας CRH-R2 κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο και παρουσιάζει 3 εναλλακτικά μετάγραφα (Εικόνα 15). Οι υποδοχείς R1 και R2 εμφανίζουν μία ομολογία της τάξης του 70%. Τέλος, έχει βρεθεί και ένας τρίτος υποδοχέας ο CRH-R3 στον εγκέφαλο και την υπόφυση λυκόψαρου (24).

Το γονίδιο του υποδοχέα R1 εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμόσωματος 17, ενώ του υποδοχέα R2 στον μικρό βραχίονα του χρωμόσωματος 7. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, ο υποδοχέας R1 παρουσιάζει 8 ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος και το γονίδιό του αποτελείται από 14 εξώνια. Οι ισομορφές αυτές είναι οι CRH-R1α, β, c, d, e, f, g, h. Ο υποδοχέας R2, από την άλλη, έχει τρεις ισομορφές CRH-R2α, β, γ και μία ισομορφή που συναντάται στον στόμαχο (25). Στο επίπεδο της πρωτεΐνης, η πρωτεϊνική δομή του υποδοχέα R1 πρωτοπεριγράφηκε το 1993 και του R2 το 1995 (Εικόνα 16). Και οι δύο υποδοχείς συναντώνται τόσο σε διαμεμβρανική, όσο και σε διαλυτή μορφή. Στη διαλυτή μορφή τους διαθέτουν μόνο το εξωκυττάριο τμήμα και διατηρούν ακόμη την ικανότητα πρόσδεσης στη CRH, αλλά δεν μπορούν να κάνουν μεταγωγή σήματος.



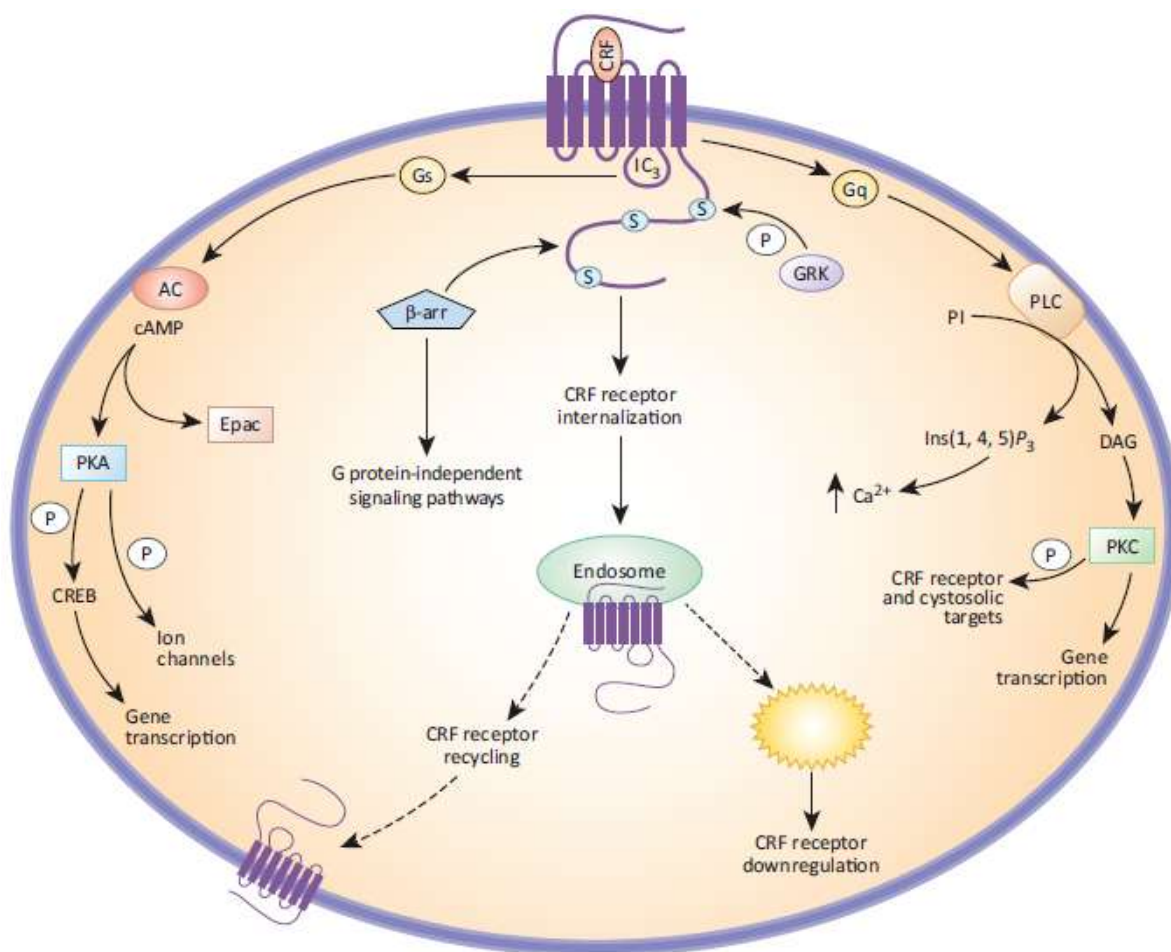
Εικόνα 16: Πρωτεϊνική δομή του υποδοχέα R1 στα αριστερά και του εξωκυττάριου τμήματος του R2 στα δεξιά σαν σύμπλοκο με την urocortin
1. Πηγή: IUPHAR/BPS, Protein Data Bank

Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Από την άλλη ο R2 υποδοχέας συναντάται στο χόριο της επιδερμίδας, στις ωοθήκες- ωοθυλάκια, στον φθαρτό υμένα, στον

Ο υποδοχέας R1 βρίσκεται στο ενδομήτριο, στο μυομήτριο, στην επιδερμίδα και το χόριο του δέρματος, στις ωοθήκες- ωοθυλάκια, στο φθαρτό υμένα, στον πλακούντα, στα κύτταρα Leydig, στην υπόφυση και εκφράζεται ευρέως στο

πλακούντα, στα κύτταρα Leydig, και στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου (μεταξύ φλοιού και θαλάμου) (26).

8.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι του CRH-R1



TRENDS in Pharmacological Sciences

Εικόνα 17: Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα CRH-R1. Πηγή: Valentino R., 2013

Ο υποδοχέας R1 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη και είναι υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνες B τάξης (GPCR). Στον εγκέφαλο, αφού προσδεθεί η κορτικοεκλυτίνη στον υποδοχέα R1, η πρωτεΐνη Gsa προσδένεται στον ενδοκυττάριο βρόχο του υποδοχέα, ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση που οδηγεί στον σχηματισμό cAMP και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο ο υποδοχέας R1, όσο και ο R2 συνδέονται με τις ίδιες Gs πρωτεΐνες (27). Κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την CRH-συσχετιζόμενη ενεργοποίηση της PKA είναι η ρύθμιση της νευρικής δραστηριότητας, η απελευθέρωση του ασβεστίου, η μεταγραφή γονιδίων και η

ανάπτυξη των δενδριτών των νευρικών κυττάρων. Ανεξάρτητα από την PKA, η cAMP μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι ERK-MAPK που προωθεί την εκδοκυττάρια κινητοποίηση του ασβεστίου.

Ο υποδοχέας R1 εκτός από την πρωτεΐνη Gsa, μπορεί να προσδεθεί και στην Gq, ενεργοποιώντας την φωσφολιπάση γ (PLC), προωθώντας έτσι την κινητοποίηση του ασβεστίου μέσω της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Το μονοπάτι αυτό φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων και της μακρόχρονης κατάθλιψης (Εικόνα 17).

Το οξύ στρες, καθώς και οι αγωνιστές της CRH, οδηγούν σε μία διαδικασία ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα R1. Κατά τη διαδικασία αυτή, ο υποδοχέας φωσφορυλιώνεται στον ενδοκυττάριο βρόχο από κινάσες του υποδοχέα που συνδέεται με G- πρωτεΐνες (GRKs). Αυτό το γεγονός οδηγεί στη στρατολόγηση της β- αρρεστίνης 2 που εμποδίζει την πρόσδεση της Gs πρωτεΐνης και προωθεί την πρόσδεση του υποδοχέα στα ενδοσώματα. Επιπρόσθετα η β- αρρεστίνη 2 αποτελεί ικρίωμα και για άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως Src, Akt, ERK και Rho (28).

8.4 Βιολογικός Ρόλος της CRH

8.4.1 Ο ρόλος της CRH στο στρες

Η CRH παίζει ρόλο στην ενορχήστρωση των αυτόνομων, ενδοκρινικών και συμπεριφορικών αποκρίσεων στο στρες. Απορυθμισμένα επίπεδα της CRH έχουν συσχετιστεί με τη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή (MDD, Major Depressing Disorder). Η υπερέκφραση της CRH μπορεί να οδηγήσει σε απορύθμιση των επιπέδων της ACTH και της κορτιζόλης στο MDD. Το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της CRH, είναι η αρνητική ρύθμιση του υποδοχέα της R1. Νεκροψία σε ασθενείς με MDD, έδειξε μειωμένα επίπεδα πρόσδεσης της CRH και χαμηλά επίπεδα υποδοχέα R1 στο μετωπιαίο φλοιό. Γενετικές μελέτες κατέδειξαν ότι πολυμορφισμοί SNPs στο γονίδιο του υποδοχέα R1 συσχετίζονται με το MDD (29).

Τα εγκεφαλικά- νευρονικά δίκτυα που ρυθμίζουν τις αποκρίσεις στο στρες συμπεριλαμβάνουν νευροδιαβιβαστές όπως η CRH, οπιοειδή πεπτίδια και ντοπαμίνη. Η CRH είναι ο κύριος διαμεσολαβητής που επηρεάζει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών, το μεταβολισμό, το ανοσιακό σύστημα, το καρδιαγγειακό και γαστρεντερικό σύστημα, τον ύπνο και την αναπαραγωγή.

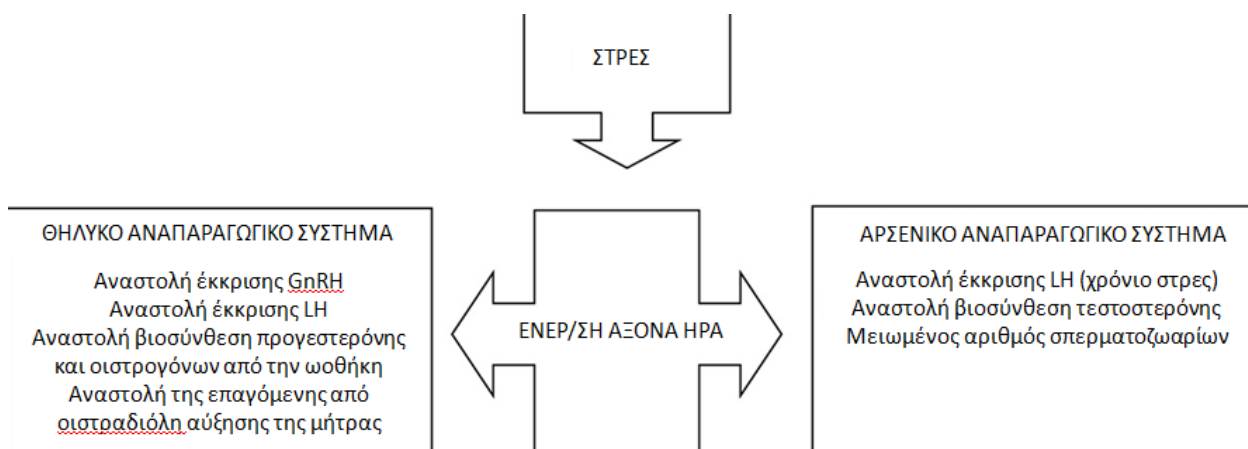
Η CRH επηρεάζει την αναπαραγωγή είτε άμεσα καταστέλλοντας του νευρώνες που παράγουν GnRH, είτε έμμεσα μέσω της β-ενδορφίνης. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν κατασταλτικό ρόλο στον άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- γονάδες. Κατά το στρες από τη φλεγμονή, παρατηρείται μείωση της λειτουργίας των γονάδων μέσω κυτταροκινών ή μέσω ενεργοποίησης των υποθαλαμικών δικτύων για έκκριση της CRH. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ψυχολογικό στρες σχετίζεται με τη μειωμένη γονιμότητα. Η CRH σε καταστάσεις στρες εισέρχεται στην ωοθήκη μέσω των συμπαθητικών νευρικών ινών τροποποιώντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και προκαλώντας συνθήκες πολυκυστικών ωοθηκών στους αρουραίους (30).

Η παρουσία του υποδοχέα R1 στην ωοθήκη μαζί με την CRH διαμεσολαβούμενη καταστολή της ωοθηκικής στεροειδογένεσης και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, δείχνει ότι ο άξονας CRH/CRH-R1 παίζει ρόλο σε καταστάσεις ανωρρηξίας λόγω οξέως ή χρόνιου στρες, μέσω της αύξησης της ωοθηκικής ή περιφερικής CRH.

8.4.2 Ο ρόλος της CRH στον άξονα HPA (Hypothalamic- Pituitary- Adrenal Axis)

Ο ενδοκρινικός αυτός άξονας ρυθμίζει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια μέσω αλληλεπιδράσεων με τον υποθάλαμο και την υπόφυση. Νευρικά ερεθίσματα που εκκρίνουν τα ανωτέρω κέντρα όπως σε συνθήκες στρες προκαλούν την έκκριση CRH και AVP. Το τελικό προϊόν του άξονα είναι τα γλυκοκορτικοειδή.

Οι συνθήκες στρες π.χ. προγεννητικό στρες ενεργοποιούν την CRH, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, καθώς και την αργινίνη- βαζοπρεσίνη (AVP) στον υποθάλαμο (31). Η CRH και η AVP, που παράγονται από μικροκυτταρικούς νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου, μέσω των υποδοχέων τους στην υπόφυση ενεργοποιούν την απελευθέρωση της ACTH, η οποία με τη σειρά της επάγει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από το φλοιό των επινεφριδίων. Η κυκλοφορούσα ACTH υποφυσιακής προέλευσης είναι το κλειδί ρυθμιστής της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. Άλλες ορμόνες (όπως οι κατεχολαμίνες, το νευροπεπτίδιο Υ και η CRH που προέρχεται από το μυελό των επινεφριδίων) επηρεάζουν επιπρόσθετα την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Έτσι, δημιουργείται ο άξονας υποθαλάμου- πρόσθιου λοβού υπόφυσης- φλοιού των επινεφριδίων. Και οι τρεις ορμόνες σχηματίζουν ένα σύστημα αρνητικής ανάδρασης. Τα νευροστεροειδή αλλοπρεγνανολόνη και THDOC έχει αποδειχθεί *in vivo* σε αρουραίους ότι ρυθμίζουν αρνητικά τον άξονα HPA και εμποδίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου της CRH (32). Η CRH, ενδοκρινικά δρα και στο ΚΝΣ, όπως στη διέγερση του συμπαθητικού συστήματος, στη μείωση του πυρετού, στην καταστολή της αναπαραγωγικής λειτουργίας (Εικόνα 18) και στην καταστολή της έκκρισης αυξητικής ορμόνης. Σε ότι αφορά το ρόλο του άξονα HPA στις αποκρίσεις στο στρες προς το τέλος της εγκυμοσύνης, φαίνεται οι αποκρίσεις του άξονα να είναι εξασθενημένες ή κατεσταλμένες σε ποντίκια,



Εικόνα 18: Άξονας HPA και στρες στο αναπαραγωγικό σύστημα. Πηγή: Kalantaridou SN., 2013

αρουραίους και ανθρώπους, όπου η CRH είναι λιγότερο αποτελεσματική στο να επάγει την έκκριση της ACTH.

8.4.3 Ο ρόλος της CRH στη φλεγμονή

Η ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος διατηρείται λόγω των φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών αποκρίσεων. Σε περιπτώσεις ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, διαταράσσεται η ομοιόσταση και ενεργοποιείται μία αντίδραση στρες που πυροδοτεί την έκκρισης της CRH και του HPA άξονα. Τα γλυκοκορτικοειδή που παράγονται τελικώς έχουν αντιφλεγμονώδη δράση. Παρόλα αυτά έχειδειχθεί ότι η CRH παρουσιάζει ανοσοτροποποιητική δράση, αφού άλλοτε παρουσιάζει επαγωγική και άλλοτε κατασταλτική δράση στη φλεγμονώδη αντίδραση. Την επαγωγική της δράση την παρουσιάζει επάγοντας τα μαστικά κύτταρα και τα μακροφάγα να εκκρίνουν VEGF, TNF- α , IL-1 β , IL-6 μέσω του υποδοχέα R1. Knock-down της CRH με τεχνολογίες RNA σίγησης απέδειξαν τη φλεγμονώδη δράση της στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (33). Την ανοσοκατασταλτική δράση την παρουσιάζει μέσω της έκλυσης της ACTH, των γλυκοκορτικοειδών και της λειτουργίας του συμπαθητικού συστήματος. Αυτή η αντιφλεγμονώδης δράση έχει παρατηρηθεί σε ινοβλάστες, όπου η CRH κατέστειλε τη διαμεσολαβούμενη από IL-1 α παραγωγή προσταγλανδίνης (34).

Έτσι, η αποκαλούμενη άνοσο-CRH, εντοπίζεται και σε εξω-εγκεφαλικές περιοχές, όπως στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και στις φλεγμονώδεις εκκρίσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εντοπισμός της CRH στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο θυρεοειδή αδένα ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto και στα T λεμφοκύτταρα από ζώα εργαστηρίου μοντέλα για τη Σκλήρυνση κατά πλάκας (Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα) (35). Ακόμα, η CRH, το m-RNA της ή και τα δύο, είναι παρόντα στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα και στα κύτταρα θύμου και σπλήνα. Αντισώματα έναντι της CRH

μειώνουν τη φλεγμονή και ασκούν ουδετεροποιητική δράση στον TNF-α, μια προάγουσα τη φλεγμονή κυτταροκίνη (36).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αποτελέσματα της δράσης της CRH στο αναπαραγωγικό σύστημα εστιάζονται κυρίως στην φλεγμονώδη δράση της, στην περίπτωση της ωογένεσης, της ωχρινόλυσης και της εμφύτευσης της βλαστοκύστης που αναλύονται διεξοδικά στις ενότητες που ακολουθούν. Ειδικότερα, η CRH του ενδομητρίου, σε συνδυασμό με άλλους τοπικούς παράγοντες, μπορεί να συμμετέχουν σε μια τοπική φλεγμονώδη απόκριση στην περιοχή της εμφύτευσης, καθιστώντας την επιφάνεια του ενδομητρίου κατάλληλη για την προσκόλληση της βλαστοκύστης. Περαιτέρω, έχει προταθεί ότι CRH συμμετέχει στην εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, αναστέλλοντας την τοπική ανοσοαπόκριση της μητέρας και επάγοντας ανοσολογική ανοχή μέσω του υποδοχέα Fas (37).

8.4.4 Ο ρόλος της CRH στο αναπαραγωγικό σύστημα

8.4.4.1 Ο ρόλος της CRH στην ωοθήκη

Η CRH στην ωοθήκη παράγεται από τη στιβάδα των κυττάρων της έσω θήκης που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο, από τα ωχρινοποιημένα κύτταρα του στρώματος και από μερικά κύτταρα του ωχρού σωματίου. Η CRH, επίσης, εκκρίνεται και στο ωοθυλακικό υγρό. Οι υποδοχείς της CRH, εντοπίζονται με τη σειρά τους στα κύτταρα της θήκης καθώς και στα στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο, αλλά και στο ωοφόρο λοφίδιο του ωοκυττάρου. Πιθανές πηγές παραγωγής της CRH είναι τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται στα κύτταρα του στρώματος και στο ωχρό σωμάτιο, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (38).

Στην ανθρώπινη ωοθήκη, η CRH και ο υποδοχέας R1, εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες από τα ώριμα ωοθυλάκια, αλλά όχι από τα ωοκύτταρα των πρωτογενών ωοθυλακίων, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι η CRH διαδραματίζει ρόλο στην ωρίμανση των ωοθυλακίων αυτοκρινώς ή παρακρινώς. Δεν υπάρχει

ένδειξη για παρουσία του υποδοχέα R2 στην ανθρώπινη φυσιολογική ωοθήκη, έχει ανιχνευτεί μόνο στα κύτταρα του στρώματος υπογόνιμων γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (39). Σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (μία κατάσταση στρες) παρουσιάζονται χαμηλά επίπεδα CRH που μπορεί να συσχετίζονται με ανωορρηξία. *In vitro* πειράματα έχουν αποδείξει ότι η CRH καταστέλλει την ωοθηκική στεροειδογένεση διαμεσολαβούμενη από την Ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και το IGF-I μονοπάτι. Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι η CRH στην ωοθήκη έχει αντι-αναπαραγωγική δράση που μπορεί να συσχετιστεί με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, που παρατηρείται σε γυναίκες με αυξημένα επίπεδα στρες. Οι φλεγμονώδεις δράσεις της CRH στην ωοθήκη, λόγω της επαγωγής της IL-1 απ' τα κύτταρα του στρώματος δείχνουν ότι διαδραματίζει ρόλο στα ασηπτικά φλεγμονώδη γεγονότα της ωοθήκης, όπως η ωχρινόλυση και η ωοθυλακιορρηξία. Τέλος, η συγκέντρωση της CRH είναι υψηλότερη σε ωοθήκες προ-εμμηνοπαυσιακών γυναικών, συγκριτικά με αυτές που έχουν εισέλθει στην εμμηνόπαυση, υποδηλώνοντας το ρόλο της σε φυσιολογικές ωοθηκικές λειτουργίες κατά την αναπαραγωγική περίοδο της γυναίκας (40).

Η CRH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας R1 σε καλλιέργειες ωοθυλακίων ποντικού βρέθηκε να εκφράζεται από ωοθυλάκια χωρίς άντρο, από ωοκύτταρα που έχουν ολοκληρώσει την πρώτη μειωτική διαίρεση και από ωοκύτταρα στη μετάφαση II. Η CRH, συμμετέχει στην αναστολή της πυρηνικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων του ποντικού στα πρωταρχικά στάδια απ' ότι στα τελευταία στάδια της διαδικασίας. Η επιβεβαίωση των ανωτέρω έγινε με χρήση ανταγωνιστών του υποδοχέα R1, όπως η ανταλαρμίνη, η οποία και αντέστρεψε τις ανασταλτικές δράσεις της CRH στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων (41). Σε άλλη μελέτη από καλλιέργεια ωοθυλακίων ποντικού καταδείχθηκε ότι και οι δύο υποδοχείς R1 και R2 εκφράζονται σε όλα τα στάδια του ωοθυλακίου χωρίς άντρο, καθώς και ότι ο υποδοχέας R1 εκφράζεται στα έμβρυα ποντικού στο στάδιο του μοριδίου και της

βλαστοκύστης (42). Ο υποδοχέας R2 δεν βρέθηκε να εκφράζεται. Η έκφρασή αυτή τόσο της CRH όσο και του R1 υποδοχέα από το προεμφυτευτικό έμβρυο καθώς και από την υπο έκδυση βλαστοκύστη, δείχνουν την πιθανότητα συμμετοχής του άξονα CRH/ CRH-R1 στην εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο.

Τέλος, περιφερειακοί παράγοντες του ΚΝΣ και νευρικές ίνες του συμπαθητικού συστήματος μπορούν να παράγουν CRH στην ωοθήκη και το αναπαραγωγικό σύστημα. Υψηλά επίπεδα στρες μπορεί να επάγουν τη δράση της CRH στην ωοθήκη και τους αγωγούς αφού τα όργανα αυτά νευρώνονται από νευρικές ίνες του συμπαθητικού συστήματος. Συνεπώς, ίσως τροποποιώντας τα επίπεδα στρες στον οργανισμό να μπορεί κανείς να βελτιστοποιήσει την ποιότητα των ωαρίων ή τα ποσοστά διαίρεση αυτών κατά την ωοθυλακιορρηξία ή την εξωσωματική γονιμοποίηση.

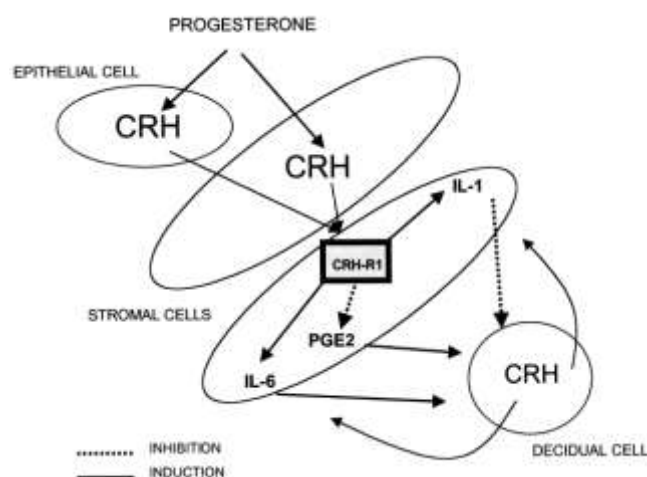
8.4.4.2 Ο ρόλος της CRH στην μήτρα

A. Ο ρόλος της CRH στη δημιουργία του φθαρτού στο ενδομήτριο

Το ενδομήτριο υφίσταται αλλαγές για να μπορέσει να γίνει επιδεκτικό στην εμφύτευση του εμβρύου. Οι αλλαγές αυτές επέρχονται λόγω της δράσης στεροειδών ορμονών που παράγονται από την ωοθήκη, καθώς και αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες. Η CRH έχει βρεθεί να εκφράζεται τόσο στη μήτρα ανθρώπου, όσο και αρουαίου και συγκεκριμένα μετά από ανοσοϊστοχημικές μεθόδους βρέθηκε η έκφραση της CRH σε επιθηλιακά και κύτταρα φθαρτού του στρώματος μήτρας, με τα επιθηλιακά κύτταρα να είναι η κύρια πηγή. Ο υποδοχέας R1 βρέθηκε στα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα ανθρώπινου ενδομητρίου και μυομητρίου, δείχνοντας ότι η CRH διαδραματίζει ρόλο στους κυτταρικούς αυτούς πληθυσμούς. Κατά τα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης αυξάνεται η συγγένεια του υποδοχέα για τη CRH και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του cAMP, ο οποίος έχει χαλαρωτική δράση στο μυομήτριο. Τόσο ο υποδοχέας R1, όσο και ο R2 βρέθηκαν να εκφράζονται στο ενδομήτριο (43), αλλά με ισχυρότερη έκφραση

στην περίπτωση γυναικών που είχαν ενδομητρίωση, συγκριτικά με τις φυσιολογικές (44).

Τρεις επαγωγείς της υποθαλαμικής CRH, ο 8-bromo-cAMP, η forskolin και ο EGF, ενεργοποιούν τον υποδοχέα της CRH στο ενδομήτριο. Επίσης, οι κυτταροκίνες IL-1 και IL-6 ενεργοποιούν τον υποκινητή της CRH που πιθανώς διαμεσολαβείται από τις προσταγλανδίνες. Από την άλλη τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τον υποκινητή της CRH στο ενδομήτριο (45).



Εικόνα 19: Η CRH στο ενδομήτριο, υπό τον έλεγχο της προγεστερόνης, δρα στα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου, προωθώντας τη δημιουργία του φθαρτού μέσω της παραγωγής PGE2 και IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα. Ο κατασταλτικός ρόλος της CRH στην έκκριση προσταγλανδινών από τα στρωματικά κύτταρα αποτελεί μηχανισμό ανάδρασης για τη ρύθμισης της διαδικασίας δημιουργίας του φθαρτού. Πηγή: Gravanis A., *et al.*, 2001

Οι αδένες του ενδομητρίου παράγουν μεγάλες ποσότητες CRH κυρίως κατά την ωθηλακιορρηξία (ωχρινική περίοδος του καταμηνιαίου κύκλου) συσχετίζοντας το βιολογικό της ρόλο με τη δημιουργία του φθαρτού και την εμφύτευση κατά την ωχρινική περίοδο του καταμηνιαίου κύκλου (46). Η CRH δεν εντοπίζεται στο στρώμα του ενδομητρίου παρά μόνο όταν διαφοροποιείται σε φθαρτό. Ειδικότερα, η CRH επάγει τη φθαρτοποίηση του στρώματος του

ενδομητρίου ενισχύοντας τη δράση της προγεστερόνης στη διαδικασία αυτή. Οι προσταγλανδίνες και οι ιντερλευκίνες αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της διαδικασίας αυτής. Το στρώμα του ενδομητρίου παράγει προσταγλανδίνη E2 (PGE2), IL-1 και IL-6. Στον άνθρωπο η PGE2 αυξάνει τη δημιουργία του φθαρτού από την προγεστερόνη, ενώ η IL-1 την καταστέλλει. Η άνω διαδικασία μπορεί να περιληπτικά σε τρεις φάσεις (Εικόνα 19):

1. Η προγεστερόνη, εκτός από τη δημιουργία του φθαρτού, επάγει την παραγωγή της CRH στο ενδομήτριο,

2. Η CRH συμμετέχει με τη σειρά της στη δημιουργία του φθαρτού καταστέλλοντας τη δράση του επαγωγέα PGE₂ και επάγοντας τη δράση του καταστολέα IL-1 και του επαγωγέα IL-6.
3. Οι PGE₂, IL-1, IL-6 ασκούν θετική δράση στην έκφραση της CRH, ολοκληρώνοντας το παρακρινές δίκτυο στο ενδομήτριο.

B. Ο ρόλος της CRH στον τόνο του μυομητρίου και στον τοκετό

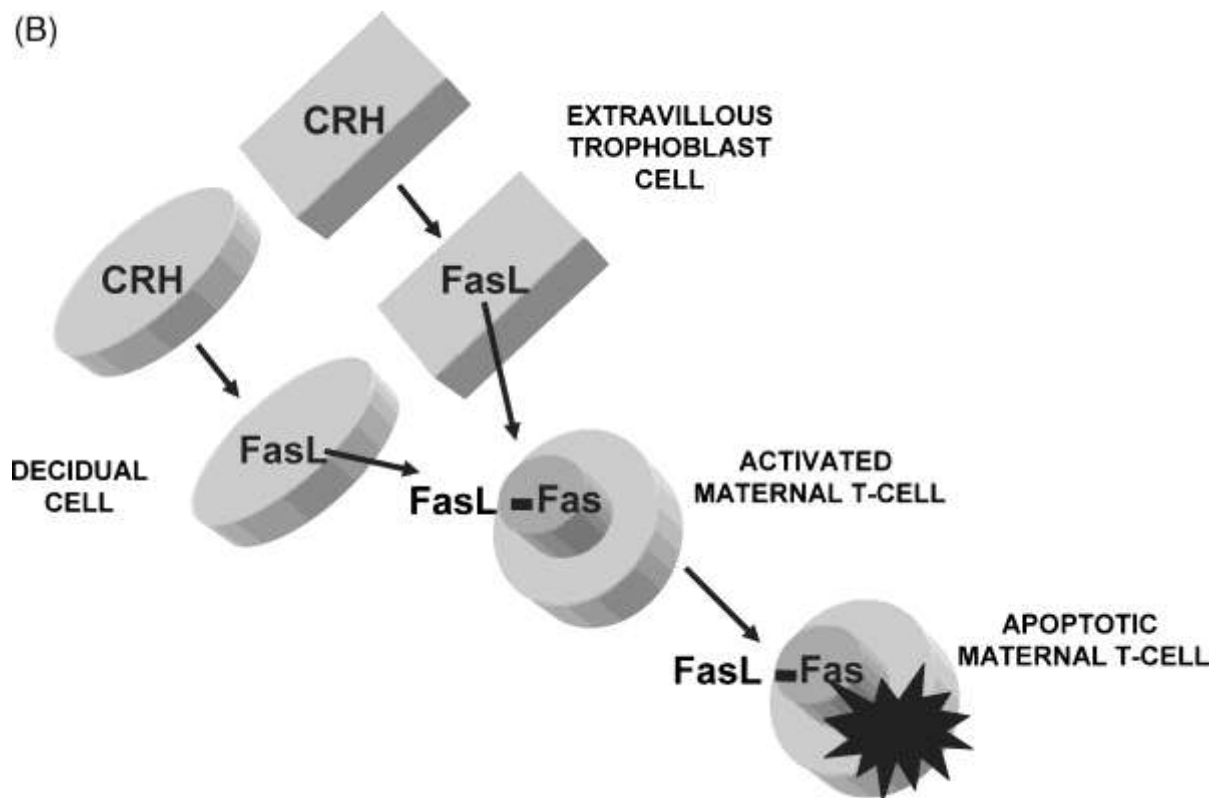
Η CRH στη μήτρα, εκτός από το ρόλο που διαδραματίζει στο ενδομήτριο, ρυθμίζει και τον τόνο του μυομητρίου. Ειδικότερα, αρκετές ισομορφές του υποδοχέα R1 έχουν βρεθεί να εκφράζονται στο μυομήτριο. Η CRH επάγει τη δράση της PGE₂, που είναι ισχυρός επαγωγές του τόνο του μυομητρίου και ρυθμίζει τη δράση της β-ενδορφίνης που έχει χαλαρωτικό ρόλο στις λείες μυϊκές ίνες. Η CRH του ενδομητρίου και η β-ενδορφίνη είναι σημαντικές για τη χαλάρωση της μήτρας και την προώθηση της εμφύτευσης του εμβρύου (47). Πριν τον τοκετό η CRH διατηρεί την άνω στιβάδα του μυομητρίου σε ηρεμία καθόλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Κατά τον τοκετό, όμως, το μυομήτριο γίνεται ευαίσθητο στα συσταλτικά σήματα από ορμόνες, όπως η οξυτοκίνη και οι προσταγλανδίνες. Η μείωση της πολικότητας των κυττάρων του μυομητρίου, αυξάνει τη σύσπαση αυτού πριν τον τοκετό και η CRH παίζει ρόλο στην αλλαγή αυτής της κατάστασης. Η CRH του πλακούντα φαίνεται να παίζει ρόλο στο χρόνο του τοκετού, αφού γυναίκες οι οποίες γέννησαν πρόωρα εμφάνισαν παράλληλα και υψηλά επίπεδα CRH στο πλάσμα. Το μετάγραφο της CRH βρέθηκε αυξημένο στο πλάσμα και στον πλακούντα γυναικών με προεκλαμψία συγκριτικά με τις γυναίκες που είχαν φυσιολογικό τοκετό (48).

Γ. Ο ρόλος της CRH στην εμφύτευση του εμβρύου

Ενδοκρινείς, αυτοκρινείς, παρακρινείς και αυτόνομοι παράγοντες απαιτούνται για το συγχρονισμό στην επικοινωνία και αλληλεπίδραση της προς εμφύτευση βλαστοκύστης και του ενδομητρίου. Υπό την επίδραση της προγεστερόνης και

των οιστρογόνων, ένα δίκτυο πεπτιδίων δρα στο ενδομήτριο για να το καταστήσει επιδεκτικό. Κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης λαμβάνουν χώρα γεγονότα τύπου άσηπτης φλεγμονώδους απόκρισης. Κατά την εμφύτευση η βλαστοκύστη εκκρίνει παράγοντες όπως τη CRH, IL-1, IL-6, LIF (Leukemia Inhibitory Factor) και PGE₂. Η IL-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση, αφού έρευνες έδειξαν ότι η αδρανοποίηση του υποδοχέα αυτής με εξουδετερωποιητικά αντισώματα στα ποντίκια εμπόδισε την εμφύτευση.

(B)



Εικόνα 20: Ο άξονας CRH/ FasL κατά την πρώιμη εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο ενδομήτριο υπό την επίδραση ορμονών και κυτταροκινών. Η CRH παράγεται από τα κύτταρα των λαχνών της τροφοβλάστης και τα κύτταρα του φθαρτού και ενεργοποιεί τον υποδοχέα Fas μέσω του υποδοχέα R1. Τα κύτταρα αυτά επάγουν στη συνέχεια απόπτωση στα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα της μητέρας που φέρουν τον υποδοχέα. Πηγή: Kalandaridou S., *et al.*, 2007

Στην αρχή της κύησης, τα σημεία εμφύτευσης στο ενδομήτριο αρουραίου έδειξαν αύξηση στα επίπεδα της CRH, καταδεικνύοντας το ρόλο του νευροπεπτιδίου αυτού στην εμφύτευση (49). Τα κύτταρα του φθαρτού καθώς και τα κύτταρα της τροφοβλάστης εκκρίνουν CRH που παράγεται ταυτόχρονα και από το προς εμφύτευση έμβρυο. Η CRH επάγει την έκφραση του προαποτωτικού παράγοντα FasL στα κύτταρα των λαχνών της τροφοβλάστης (EVT, extravillous trophoblast cells) καθώς και στα μητρικά κύτταρα του φθαρτού (Εικόνα 20). Η

CRH, με αυτό τον τρόπο, επάγει την απόπτωση των T λεμφοκυττάρων μέσω του υποδοχέα FasL επάγοντας ανοσοανοχή. Η διαδικασία αυτή διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα R1 και οδηγεί στην αρνητική ρύθμιση του CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1).

Ο FasL παράγεται από τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης του εμβρύου και από τα κύτταρα του φθαρτού στον πλακούντα. Ανωμαλίες στην εγκατάσταση της ανοσιακής ανοχής έναντι του εμβρύου οδηγούν σε αποβολή του εμβρύου. Προκαταρκτικά πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι η εμφύτευση μπορεί να



Εικόνα 21: Η ανταλαρμίνη μειώνει και δεν καταστέλλει πλήρως τη γονιμότητα σε αρουραίους Sprague-Dawley, όπως φαίνεται από τη μήτρα αυτών. Πηγή: Makrigiannakis A., et al., 2004

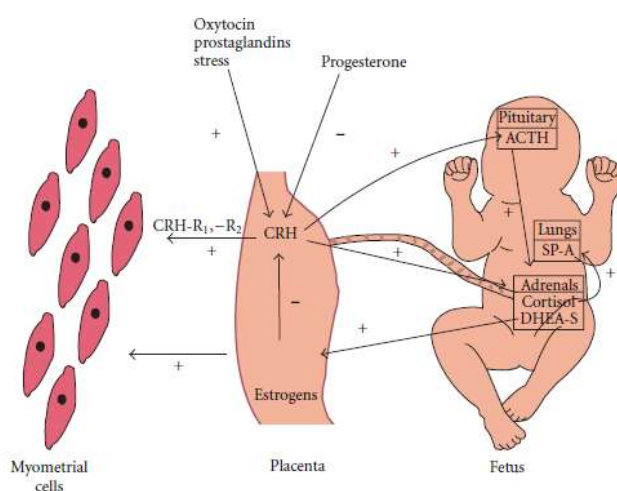
εμποδιστεί με τη χορήγηση εξουδετεροποιητικού αντισώματος έναντι της CRH. Το ίδιο απόδείχθηκε και με τη χρήση ανταλαρμίνης, ανταγωνιστή του υποδοχέα R1. Ειδικότερα, η χορήγηση ανταλαρμίνης σε έγγυους αρουραίους κατέληξε στη μείωση κατά 70% του αριθμού των θέσεων εμφύτευσης, χωρίς να εμποδίζει πλήρως την

εμφύτευση, δείχνοντας ότι η συγκεκριμένη διαδικασία διαμεσολαβείται και από άλλους μηχανισμούς (Εικόνα 21) (50). Προς επίρρωση αυτού, ελλειμματικά ποντίκια (Knock-out mice) τόσο για την CRH, όσο και για τον R1 υποδοχέα δεν είναι πλήρως στείρα. Ακόμη, ποντίκια που φέρουν άνευ νοήματος μεταλλαγές (nonsense) στο γονίδιο *fasl*, μπορούν να αναπαραχθούν, δείχνοντας ότι ο FasL στα κύτταρα της τροφοβλάστης δεν είναι απαραίτητος για την εγκατάσταση της ανοσιακής ανοχής, παρ' όλα αυτά είναι ο κύριος παράγοντας.

8.4.4.3 Ο ρόλος της CRH στον πλακούντα

Κατά την κύηση, ο πλακούντας και οι μεμβράνες του εμβρύου παράγουν CRH. Η σύνθεση της ορμόνης αυτής αυξάνεται προϊούσης της κύησης και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μητρικό και εμβρυακό αίμα καθώς και στο αμνιακό υγρό. Η CRH φτάνει σε επίπεδα 1000 φορές υψηλότερα 6-8 εβδομάδες πριν τον

τοκετό. Η δραστηριότητα της CRH στο πλάσμα της μητέρας εξασθενείται από την CRH-binding protein (CRH-BP) που παράγεται από το συκώτι και τον πλακούντα. Η CRH-BP είναι ένας διαλυτός παράγοντας υψηλής συγγένειας που ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητα του ελεύθερου προσδέτη. Η συγκέντρωση της CRH-BP μειώνεται το τελευταίο εξάμηνο της κύησης, επιτρέποντας στη CRH να αυξηθεί, οδηγώντας σε αύξηση της κορτιζόλης κατά το τελευταίο μισό της εγκυμοσύνης. Η CRH του πλακούντα έχει βρεθεί αυξημένη σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού. Ο λειτουργικός στόχος της CRH είναι ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση- επινεφρίδια του εμβρύου (βλ. Ενότητα 8.4.2). Η CRH του πλακούντα ενεργοποιεί την ACTH από την εμβρυική υπόφυση, η οποία κινητοποιεί τα επινεφρίδια να παράγουν DHEA (dehydroepiandrosterone) DHEA-S (dehydroepiandrosterone-sulphate) και κορτιζόλη. Η ACTH παράγεται επίσης και από τον πλακούντα ενεργοποιώντας τα κύτταρα των επινεφριδίων του εμβρύου. Η DHEA μεταβολίζεται σε οιστρογόνα στον πλακούντα και ευνοεί τον τοκετό. Η παραγόμενη κορτιζόλη ενεργοποιεί περαιτέρω τον πλακούντα να εκκρίνει CRH. Τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και το νιτρικό οξύ καταστέλλουν την παραγωγή της CRH. Η κορτιζόλη δρα στους πνεύμονες του εμβρύου που παράγουν SP-A (surfactant protein A), η οποία ενεργοποιεί τα φλεγμονώδη σήματα στη μήτρα που αυξάνουν την συσταλτικότητα του μυομητρίου (Εικόνα 22) (51).



Εικόνα 22: Ο ρόλος της CRH στον ανθρώπινο τοκετό. Η CRH παράγεται από τον πλακούντα σε απόκριση στην οξυτοκίνη, τις προσταγλανδίνες και το στρες. Πηγή: Vrachnis *et al.*, 2012

Η CRH του πλακούντα, τέλος, ασκεί αγγειοδιασταλτικές δράσεις στην μητρική αρτηρία. Κατά την εμφύτευση του εμβρύου, παρατηρείται μία αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων που περιβάλλουν το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Τριχοειδή του ενδομητρίου στο φθαρτό διαστέλλονται και αυτά. Ανοσορυθμιστές είναι αυτοί που ρυθμίζουν τις αγγειακές αλλαγές στο

ενδομήτριο. Η CRH μπορεί να συμμετέχει στην αγγειοδιαστολή στη μητρική κοιλότητα μέσω της επαγωγής σύνθεσης νιτρικού οξέως (52) και επαγωγής της συστολής των λείων μυικών ινών μέσω της PGE2 και της PGF2. Η έκκριση της CRH του πλακούντα επάγεται από γλυκοκορτικοειδή, κυτταροκίνες, συνθήκες ανοξίας, το στρες προεκλαμψίας και εκλαμψίας. Τέλος, η CRH συμμετέχει στην επαγωγή της λεπτίνης στην συγκυτιοτροφοβλάστη, που μπορεί να προωθεί την παροχή θρεπτικών, αλλά και τον ορμονικό μεταβολισμό του πλακούντα στην τελική φάση πριν τον τοκετό (53).

9. Φαρμακολογική στόχευση του υποδοχέα CRH-R1

Ο υποδοχέας της CRH, R1, όπως προαναφέρθηκε συναντάται σε αρκετά όργανα, όπως στις γονάδες, την καρδιά, το δέρμα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, καθώς και σε μερικά κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Μία ποικιλία, λοιπόν, παθολογιών που σχετίζονται με το στρες μπορεί να ανακουφιστούν με χρήση ανταγωνιστών έναντι του υποδοχέα R1. Ειδικότερα, ερευνητές έχουν δει τη CRH, ως φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπιση επαγόμενων από στρες αλλαγών στην κινητικότητα του εντέρου και το βλεννογόνο αυτού.

Η φαρμακολογική στόχευση της CRH στον εγκέφαλο στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι μόρια που θα καταστείλουν τη δράση της CRH στον εγκέφαλο μπορεί να έχουν αντικαταθλιπτική δράση. Βέβαια, λόγω της δυσκολίας στη σύνθεση και του κόστους, η ακαδημαϊκή κοινότητα δεν έχει επιδείξει το αναμενόμενο ενδιαφέρον. Επίσης, επειδή οι ανταγωνιστές αυτοί δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στον τρόπο χορήγησης αυτών (54). Παρόλα αυτά μέσα στο 2014, τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη θα ελέγξει την αποδοτικότητα του ανταγωνιστή για τον υποδοχέα R1 σε ασθενείς που πάσχουν από μετατραυματικό στρες (PTSD, posttraumatic stress disorder) (55). Η φαρμακολογική στόχευση και των δύο υποδοχέων έχει δοκιμαστεί και στο παρελθόν με δύο ανταγωνιστές τον aHel-CRF έναντι του R1 υποδοχέα και τον aSvg-30 (antisauvagine 30) και aStressin έναντι του R2 υποδοχέα. Συμπεριφορικές

μελέτες μετά από ενδοεγκεφαλοκοιλιακή χορήγηση των αντγωνιστών σε Balb/c ποντίκια, έδειξαν μειωμένη συμπεριφορά άγχους μετά από τη χορήγηση του ahel-CRF, και όχι μετά από τη χορήγηση της astressin (56).

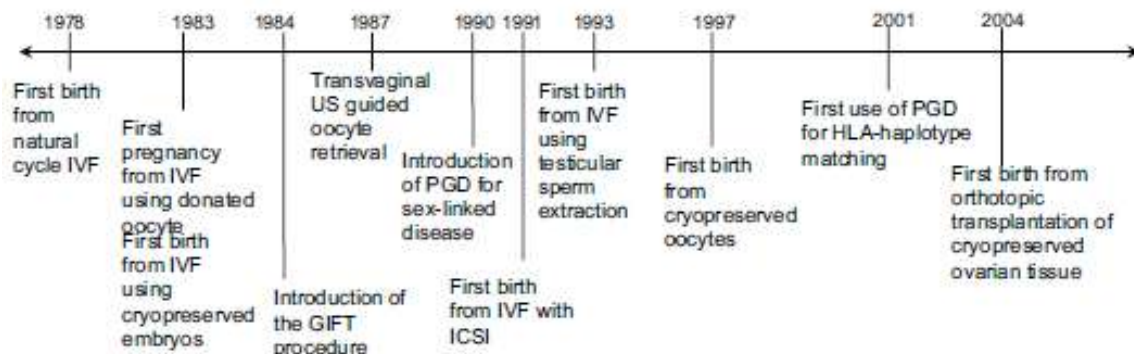
Τέλος, ο ρόλος της CRH στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις ελέγχθηκε και σε ένα επαγόμενο μοντέλο αρθρίτιδας σε ποντίκια, την AIA (Adjuvant- Induced Arthritis). Η χορήγηση ανταλαρμίνης, ανταγωνιστής του υποδοχέα R1, στους ποντικούς έδειξε καταστολή της φλεγμονής κυρίως στην περιφέρεια και μείωσε τα συμπτώματα της νόσου, δηλαδή την αποδόμηση του αρθρικού υμένα, το χόνδρο και την επίφυση των οστών της άρθρωσης. Η συγκεκριμένη μελέτη δείχνει τη θεραπευτική δυνατότητα των ανταγωνιστών του υποδοχέα R1 σε αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα (57).

10. ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (IN VITRO FERTILIZATION)

Η γέννηση της Louise Brown το 1978 ήταν το επισφράγισμα πολλών δεκαετιών ερευνητικής μελέτης στο χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART, Assisted Reproductive Technologies), γεγονός το οποίο χάρισε στον Robert G. Edwards, ερευνητή στο National Institute for Medical Research του Λονδίνου, το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 2010 (58). Ο Edwards τη δεκαετία του 1950 σκέφτηκε και εφάρμοσε πρώτος την εξωσωματική γονιμοποίηση ως θεραπεία για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας στα ζευγάρια. Από τότε περισσότερα από 4 εκατομμύρια έμβρυα έχουν γεννηθεί με τη βοήθεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Εικόνα 23).

Στις επόμενες δεκαετίες καινοτόμες τεχνολογικές επιτεύξεις οδήγησαν στην εισαγωγή τεχνικών όπως το ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection, Ενδοκυτταρική Έγχυση Σπέρματος), καθώς και χειρουργικές τεχνικές λήψης σπέρματος όπως, MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration), TESE (Testicular Sperm Extraction), PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας στους άνδρες. Συνεχιζόμενες προσπάθειες για αύξηση των ποσοστών επιτυχίας των τεχνικών υποβοηθούμενης

αναπαραγωγής οδήγησαν στην ανάπτυξη τεχνολογιών, όπως *in vitro* ωρίμανση των γαμετών, κρυοσυντήρηση ωοκυττάρων, υαλοποίηση (vitrification) και PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) (59).



Εικόνα 23: Χρονολόγιο των επιτευγμάτων στον χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Πηγή: Wang J., Sauer M., 2006.

A) Κλασική Τεχνική Εξωσωματικής Γονιμοποίησης

B) Ενδοκυτταρική Έγχυση Σπέρματος (ICSI)

Η τεχνική της εξωσωματικής γονιμοποίησης μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα στάδια:

1. Ορμονική πρόκληση ωογένεσης (Superovulation)

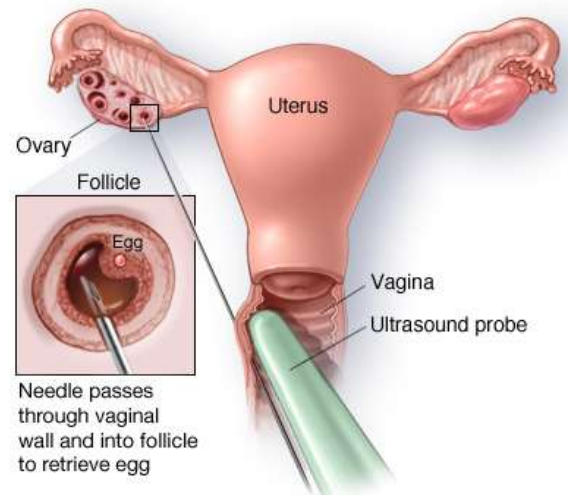
Χρησιμοποιούνται διάφορα πρωτόκολλα για την πρόκληση της ωογένεσης ανάλογα με την περίπτωση. Το πιο συνηθισμένο αφορά στην ημερήσια χορήγηση γοναδοτροπινών με σκοπό την επαγωγή της παραγωγής μεγάλου αριθμού ωοκυττάρων, που αύξανε τα ποσοστά της επιτυχημένης γονιμοποίησης. Υπερηχογραφικός έλεγχος και καθημερινή μέτρηση ορμονών βοηθούν στην παρακολούθηση της ωρίμανσης των ωοθυλακίων.

2. Ωοληψία (Oocyte Retrieval, OPU Oocyte Pick-up)

Η ωοληψία εκτελείται στα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής υπό ήπια αναισθησία. Με τη χρήση υπερηχογράφου και ειδικών καθετήρων, αναρροφώνται τα ωκύτταρα από τα αντίστοιχα ωοθυλάκιά τους (Εικόνα 24). Τα ωκύτταρα περιβαλλόμενα από τον ακτινωτό στέφανο τοποθετούνται σε καλλιεργητικό υλικό και στη συνέχεια στον κλίβανο επώασης μέχρι τη γονιμοποίηση.

3. Γονιμοποίηση- Εμβρυϊκή καλλιέργεια

Μετά και από τη λήψη σπερματοζωαρίων, οι δύο γαμέτες τοποθετούνται σε καλλιεργητικό υλικό ώστε να αλληλεπιδράσουν φυσικά (εξωσωματική γονιμοποίηση με φυσικό τρόπο) για 16-18 ώρες. Αφότου αξιολογηθεί και επιβεβαιωθεί η γονιμοποίηση με την εμφάνιση των δύο προπυρήνων (Εικόνα 25, στάδιο 1



Εικόνα 24: Ωοληψία Πηγή: Mayo Clinic

κυττάρου), το γονιμοποιημένο ωάριο επωάζεται για 24-72 ώρες για να διαπιστωθεί ότι διαιρείται και αναπτύσσεται φυσιολογικά. Στην περίπτωση που κρίνεται απαραίτητος προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος, πραγματοποιείται την 5-6 ημέρα ανάπτυξης του εμβρύου, στο στάδιο της βλαστοκύστης.



Εικόνα 25: Έμβρυο στο στάδιο του ενός κυττάρου, όπου απεικονίζονται οι δύο προπυρήνες. Πηγή: UNSW

4. Εμβρυομεταφορά

Η εμβρυομεταφορά είναι μία απλή διαδικασία που δεν απαιτεί αναισθησία. Με τη χρήση λεπτού καθετήρα και τη βοήθεια υπερήχου, τα έμβρυα μεταφέρονται στη μήτρα την 5-6^η ημέρα. Στην εξωσωματική γονιμοποίηση ο αριθμός των γονιμοποιημένων ωαρίων που μεταφέρονται στην ενδομήτρια κοιλότητα ορίζεται ως εξής: σε γυναίκες ηλικίας μέχρι και σαράντα ετών έως τρία γονιμοποιημένα ωάρια και σε γυναίκες ηλικίας άνω των σαράντα ετών έως τέσσερα γονιμοποιημένα ωάρια, όπως ορίζεται από το νόμο 3305/2005.

Στην περίπτωση όπου προκύψει μεγάλος αριθμός ωοκυττάρων ή εμβρύων συγκριτικά με αυτά τα οποία θα χρησιμοποιηθούν τελικά, αυτά μπορούν να κρυοσυντηρηθούν και να διατηρηθούν για μελλοντική γονιμοποίηση στην περίπτωση των ωοκυττάρων ή για μελλοντική εμβρυομεταφορά στην περίπτωση των εμβρύων.

Στην περίπτωση όπου το σπερματοζωάριο δεν μπορεί να γονιμοποιήσει το ωάριο με την εξωσωματική γονιμοποίηση, ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε με τη διαφορά ότι γίνεται μικρογονιμοποίηση, δηλαδή στο στάδιο της γονιμοποίησης χρησιμοποιούνται ειδικά ανάστροφα μικροσκόπια με μικροχειριστήρια, τα οποία διαθέτουν ειδικούς φακούς (Hoffman illumination) και θερμαινόμενη τράπεζα. Στα δύο μικροχειριστήρια τοποθετούνται υάλινα τριχοειδή, το ένα εκ των οποίων ακινητοποιεί το ωάριο (holding pipette) και το άλλο διεισδύει στο ωάριο (injection pipette) μεταφέροντας ένα καλής ποιότητας σπερματοζωάριο στο κυτταρόπλασμα. Ειδικότερα, με το τριχοειδές μικροένεσης αναρροφάται ένα σπερματοζωάριο καλής ποιότητας και ενίεται στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου με στερεοτακτικές κινήσεις.

Η τεχνική αυτή πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1991 (Εικόνα 23) και δίδει τη δυνατότητα σε σπερματοζωάρια ανίκανα για διείσδυση στο ωάριο να το γονιμοποιήσουν. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι μερικά από τα σπερματοζωάρια τα οποία είναι ανίκανα να γονιμοποιήσουν το ωάριο και μεταφέρουν το Y φυλετικό χρωμόσωμα, διαθέτουν κάποιες μεταλλαγές στον γενετικό τόπο AZF (azoospermia factor) του Y χρωμοσώματος που φαίνεται να σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Οπότε η τεχνητή έγχυση του σπερματοζωαρίου αυτού, με στοχαστικές διαδικασίες, θα οδηγήσει στη δημιουργία αρσενικού ατόμου που θα κληρονομήσει τις μεταλλαγές αυτές (60) (61).

Κεφάλαιο 2

ΣΚΟΠΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εστιάζει στην «αναπαραγωγική CRH» και τους υποδοχείς αυτής. Συγκεκριμένα, λόγω του γεγονότος ότι το νευροπεπτίδιο αυτό συμμετέχει στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, στόχος είναι η ανίχνευση της ύπαρξης υποδοχέων CRH-R1 και CRH-R2 σε προεμφυτευτικά στάδια. Ειδικότερα, θα μελετηθεί η ύπαρξη μεταγράφου και των δύο υποδοχέων σε ανθρώπινες βλαστοκύστες. Δεδομένου ότι μόνο ο υποδοχέας CRH-R1 έχει βρεθεί σε μορίδια και βλαστοκύστες ποντικού, η παρούσα μελέτη θα προσπαθήσει να ερευνήσει το ίδιο επιστημονικό ερώτημα σε ανθρώπους. Από τη μελέτη αυτή θα δοθεί η δυνατότητα να μελετηθεί ο ρόλος της CRH και οι αλληλεπιδράσεις αυτής με τους υποδοχείς σε προεμφυτευτικά στάδια.

Κεφάλαιο 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό Υλικό

Η συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποίησε για βιολογικό υλικό πλεονάζοντα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης, από γυναίκες που συμμετείχαν στο πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Ά Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του ΕΚΠΑ, Νοσοκομείο Αλεξάνδρα. Η μελέτη εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του νοσοκομείου Αλεξάνδρα, ενώ κάθε γυναίκα που συμμετείχε στη συγκεκριμένη μελέτη ενημερώθηκε και υπέγραψε φόρμα συγκατάθεσης.

2. Νομικά και Ηθικά Θέματα που λήφθηκαν υπ' όψιν για τη λήψη ανθρώπινων βλαστοκυστών για ερευνητικούς σκοπούς (62)

Στην ελληνική έννομη τάξη εφαρμόζεται ο νόμος 2619/1998, με τον οποίο κυρώθηκε η Σύμβαση του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα ανθρώπινα δικαιώματα και τη Βιοιατρική (Οβιέδο 1997). Με την ενσωμάτωσή της στο ελληνικό δίκαιο προβλέπονται συγκεκριμένες προβλέψεις για την έρευνα των εμβρύων *in vitro*.

3. Στις περιπτώσεις που ο νόμος επιτρέπει την έρευνα σε έμβρυα *in vitro*, θα εξασφαλίζεται η επαρκής προστασία του εμβρύου
4. Απαγορεύεται η δημιουργία ανθρώπινων εμβρύων για ερευνητικούς σκοπούς

Με τα ανωτέρω εφαρμόζονται οι γενικοί κανόνες για την προστασία της προσωπικότητας (άρθρ. 5 παρ. 1 Σ., άρθρ. 57 Α.Κ.), σε όποιον βαθμό τα έμβρυα μπορούν να θεωρηθούν «προϊόντα» του σώματος και στοιχεία της προσωπικότητας εκείνων που έδωσαν τους γαμέτες και η χρήσης του εξαρτάται από τη βούληση των τελευταίων.

Κατά την έρευνα πρέπει να τηρούνται και να ελέγχονται η αρχή της αναλογικότητας (καμία έρευνα μη αναγκαία) και η αρχή της προφύλαξης (καμία έρευνα χωρίς εκτίμηση των κινδύνων). Τέλος, τονίζεται η ανάγκη προστασίας των

προσωπικών (γενετικών) δεδομένων που συνδέονται γενετικά με το έμβρυο στις τράπεζες, όπου φυλάσσεται ο ιστός.

3. Κριτήρια Επιλογής γυναικών

Κριτήρια συμπερίληψης:

- Ηλικία 23 έως 40 ετών
- Δείκτης μάζας σώματος (BMI) 19-30
- Να έχει υποβληθεί σε λιγότερους από τέσσερις (4) προηγούμενους ανεπιτυχείς κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IVF, ICSI)
- Την 2η ή 3η μέρα του κύκλου, επίπεδα FSH <15 IU/L και E2<80 pg/ml (293,6 pmol/L)
- Απουσία ιστορικού προηγούμενης φτωχής απάντησης σε κύκλο IVF ή ICSI, όπως αυτό προκύπτει από επίπεδα E2 <500 pg/mL και/ή λιγότερο από τρία (3) αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και/ή λιγότερα από τέσσερα (4) ανακτηθέντα ωάρια και/ή φτωχή απάντηση, που είχε ως αποτέλεσμα την ακύρωση της προσπάθειας IVF ή ICSI
- Φυσιολογική ενδομητρική κοιλότητα

Κριτήρια αποκλεισμού:

- Παθολογικές καταστάσεις που αποτελούν αντένδειξη για φαρμακευτική διέγερση των ωοθηκών ή για εγκυμοσύνη, όπως ηπατική, νεφρική ανεπάρκεια, ενεργός θρομβοφλεβίτιδα ή θρομβοεμβολικό σύμβαμα, καρκίνος μαστού ή ωοθηκών
- Υποβλεννογόνια ινομυώματα, ενδοτοιχωματικά ινομυώματα που αλλοιώνουν την φυσιολογική μορφολογία της ενδομητρικής κοιλότητας ή ενδομητρικοί πολύποδες
- Ενδομητρίωση σταδίου III ή IV
- Υδροσάλπιγγες
- Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλική δυσπλασία τραχήλου (HSIL)
- Ιστορικό καθ' έξιν αποβολών που ορίζονται από τρεις ή περισσότερες αποβολές, συμπεριλαμβανομένων και των βιοχημικών κήσεων, στις οποίες η εγκυμοσύνη δεν αναπτύχθηκε στο επίπεδο του εμφανούς υπερηχογραφικά σάκου κύησης

-Ταυτόχρονη χορήγηση φαρμάκων που μπορεί να παρεμβάλλονται στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων της μελέτης (κορτικοστεροειδή, ακετυλοσαλικυλικό οξύ, αγωνιστές ντοπαμίνης και χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη-LMWH).

4. Πρωτόκολλο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης

4.1 Πρόκληση Ωοθυλακιορρηξίας

Καθώς σε ένα φυσικό καταμηνιαίο κύκλο συνήθως ένα ωοθυλάκιο ωριμάζει και διαρρηγνύεται για την παραγωγή του ωαρίου, για να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης χορηγούνται φαρμακευτικές ουσίες που προάγουν την ωρίμανση όλων των ωοθυλακίων για την παραγωγή περισσότερων ωαρίων.

Η ηλικία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Σε γυναίκες με ηλικία μικρότερη ή ίση των 35 ετών χρησιμοποιείται επιμυκησμένο πρωτόκολλο επαγωγής με αγωνιστή GnRH (long GnRH agonist protocol). Την 21^η ημέρα του προηγούμενου κύκλου γίνεται υπερηχογραφικός έλεγχος και έναρξη ενδορινικών ψεκασμών με GnRH αγωνιστή. Πριν την έναρξη της εξωγενούς χορήγησης γοναδοτροπινών γίνεται εκτίμηση της ωοθηκικής καταστολής με μέτρηση της οιστραδιόλης στον ορό και υπερηχογραφικό έλεγχο. Σε γυναίκες με ηλικία μεγαλύτερη από 35 έτη, χρησιμοποιείται βραχύ πρωτόκολλο πρόκλησης με αγωνιστή GnRH (short GnRH agonist protocol). Τη 2^η ημέρα του κύκλου γίνεται υπερηχογραφικός έλεγχος και έναρξη ενδοκρινικών ψεκασμών με GnRH αγωνιστή και την 3^η ημέρα ξεκινά η εξωγενής χορήγηση γοναδοτροπινών.

Η καθημερινή χορήγηση των γοναδοτροπινών βοηθά στην ωρίμανση των ωοθυλακίων και παρακολουθείται από τον θεράποντα ιατρό υπερηχογραφικά και με τη μέτρηση οιστραδιόλης στο αίμα με δυνατότητα αναπροσαρμογής των δόσεων για να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα. Όταν η μέση διάμετρος τουλάχιστον δύο ωοθυλακίων είναι μεγαλύτερη από 18mm και τα επίπεδα οιστραδιόλης 250pg/ml μέσος όρος το καθ'ένα, τότε γίνεται ενδομυϊκή έγχυση

10.000 IU χοριακής γοναδοτροπίνης hCG. Έτσι, ελέγχεται η ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθορίζεται η χρονική στιγμή της ωοληψίας και αποφεύγεται η υπερ-διέγερση.

4.2 Ωοληψία

Η ωοληψία πραγματοποιείται 34-36 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG. Η hCG συμβάλλει στην ωρίμανση του ωαρίου και στην απελευθέρωσή του από τα έσω τοιχώματα του ωοθυλακίου. Η συλλογή των ωαρίων διενεργείται με τη βοήθεια βελόνας και υπερηχογραφική καθοδήγηση. Η διάρκεια της όλης διαδικασίας είναι 10-20 λεπτά, κατά την οποία η ασθενής βρίσκεται σε αναλγησία ή ήπια αναισθησία. Τα ωάρια που αναρροφούνται τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια και μεταφέρονται στο εργαστήριο για να καθαριστούν, να καταμετρηθούν και να τοποθετηθούν σε καλλιεργητικό υλικό του οποίου οι θερμοκρασία και το χημικό περιβάλλον προσομοιάζουν στο περιβάλλον του σώματος. Κατόπιν, τα ωάρια τοποθετούνται στον επωαστή (37°C, 5% CO₂) για να ωριμάσουν μέχρι τη στιγμή που θα γονιμοποιηθούν.

Την ημέρα της ωοληψίας, ο σύζυγος δίδει το σπέρμα σε αποστειρωμένο δοχείο, το οποίο αξιολογείται ως προς την πυκνότητά του, την κινητικότητά του και προετοιμάζεται για τη γονιμοποίηση.

4.3 Γονιμοποίηση

Τα ωάρια που συλλέχθηκαν καθαρίζονται από τα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα και κρίνεται η ποιότητά τους λίγη ώρα πριν τη γονιμοποίηση. Η γονιμοποίηση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, με κλασική γονιμοποίηση IVF ή μικρογονιμοποίηση (ICSI) (βλ. Εισαγωγή, Ενότητα 8). Η επιλογή IVF ή ICSI εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα του σπέρματος. Σε περιπτώσεις χαμηλής ποιότητας σπέρματος επιλέγεται η μέθοδος της μικρογονιμοποίησης. Τα γονιμοποιημένα ωάρια μεταφέρονται στον επωαστή και μετά από 18-22 ώρες ελέγχονται ώστε να διαπιστωθεί η γονιμοποίησή τους.

4.4 Έλεγχος γονιμοποίησης και Εμβρυική ανάπτυξη

Την επόμενη μέρα της ωοληψίας (day 1) ελέγχονται τα ωάρια αν γονιμοποιήθηκαν. Η επιτυχής γονιμοποίηση υποδηλώνεται με την παρουσία δύο προπυρήνων στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Τα γονιμοποιημένα ωάρια μεταφέρονται σε νέο καλλιεργητικό υλικό και καλλιεργούνται στον επωαστή μέχρι την ημέρα της εμβρυομεταφοράς (embryo transfer)

Το επόμενο στάδιο της ανάπτυξης των εμβρύων είναι η διαίρεσή τους σε βλαστομερίδια. Τα έμβρυα αξιολογούνται καθημερινά όσον αφορά το μέγεθος, τον αριθμό, το σχήμα των βλαστομεριδίων και την ύπαρξη θραυσμάτων. Τις ημέρες 2 και 3 (day 2, 3) μετά την ωοληψία τα έμβρυα αποτελούνται από 4 και 8 βλαστομερίδια αντίστοιχα. Τα έμβρυα μεταφέρονται στη γυναίκα τη δεύτερη ή την τρίτη ημέρα. Υπάρχουν περιπτώσεις, όμως, που η εμβρυομεταφορά παρατείνεται ως την πέμπτη ημέρα μετά την ωοληψία, όπου το έμβρυο βρίσκεται στο αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης.

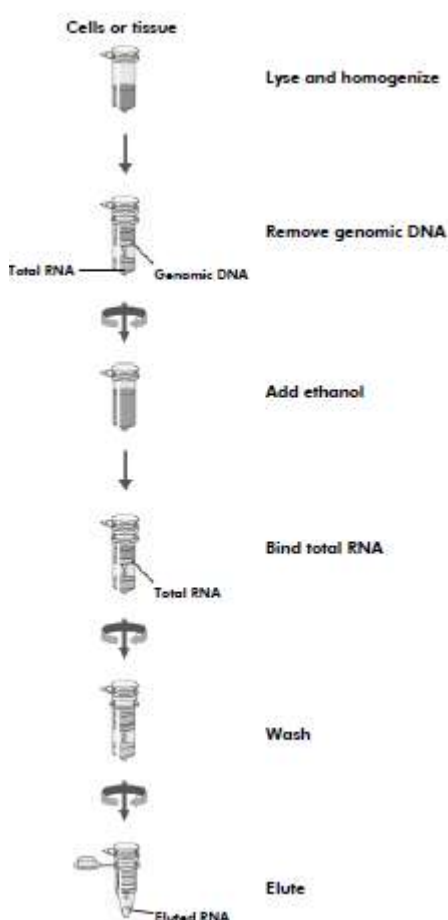
4.5 Εμβρυομεταφορά

Η διαδικασία της εμβρυομεταφοράς γίνεται χωρίς αναισθησία ή αναλγησία. Ο αριθμός των εμβρύων που θα μεταφερθούν εξαρτάται από την ηλικία της γυναίκας και τον αριθμό των προηγούμενων ανεπιτυχών εμβρυομεταφορών. Ο μέγιστος αριθμός εμβρύων που επιτρέπεται να μεταφερθούν είναι 2 στις γυναίκες μέχρι 35 ετών, 3 στις γυναίκες από 35-40 ετών και 4 στις γυναίκες πάνω από 41 ετών.

Τα έμβρυα με λίγο καλλιεργητικό υλικό αναρροφώνται σε καθετήρα εμβρυομεταφοράς που διαπερνά τον τράχηλο της μήτρας και με υπερηχογραφική καθοδήγηση τοποθετούνται στο ενδομήτριο κοντά στον πυθμένα της μήτρας. Ακολουθεί έλεγχος του καθετήρα για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της εμβρυομεταφοράς.

Τα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης που δε χρησιμοποιήθηκαν για εμβρυομεταφορά, χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό της παρούσης μελέτης. Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν βλαστοκύστες από 10 γυναίκες σε RNA later (Qiagen, 76104) (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Ενότητα 5) με σκοπό την εξαγωγή RNA.

5. Εξαγωγή RNA από ανθρώπινες βλαστοκύστες



Εικόνα 26: Διαδικασία εξαγωγής ολικού RNA. Πηγή: Qiagen

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των υποδοχέων R1 και R2 της CRH σε ανθρώπινες βλαστοκύστες πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο της μεταγραφής του. Για αυτό το λόγο έγινε εξαγωγή ολικού RNA από τις βλαστοκύστες με τη χρήση του RNeasy Plus Microkit (Qiagen, 74034), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε το παραπάνω Kit είναι διότι παρέχει υψηλής καθαρότητας και ποσότητας RNA για μετέπειτα χρήση σε ευαίσθητες τεχνικές όπως η Real Time PCR (PCR σε πραγματικό χρόνο) καθώς και ότι επιτρέπει την εξαγωγή αυτού από μικρό αριθμό κυττάρων, όπως στην περίπτωση της βλαστοκύστης. Η αρχή της διαδικασίας στηρίζεται στη χρήση στήλης συγγενείας που δεσμεύει ειδικά το RNA και το DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής (Εικόνα 26):

Α. Λύση των Βλαστοκύστεων

Οι βλαστοκύστες, οι οποίες διατηρήθηκαν σε διάλυμα RNA later (Qiagen, 76104), διάλυμα σταθεροποίησης και προστασίας του RNA από RNases φυγοκεντρούνται στα 2.500rpm, 5min, 4°C. Το ίζημα ελέγχεται στο μικροσκόπιο και απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο χωρίς να διαρραγεί το ίζημα. Προσθήκη 75ul διαλύματος RLT plus που προωθεί τη λύση των κυττάρων αφού

περιέχει γουανιδίνη (χαοτροπικός παράγων), β-μερκαπτοαιθανόλης που προστατεύει από τη δράση των RNases και 5ul από Carrier RNA, το οποίο είναι RNA με πολυαδενυλιωμένη ουρά και βοηθά στην μεγαλύτερη δυνατή σε ποσότητα απομόνωση RNA. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 250ul διαλύματος RLT plus και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση.

B. Απομάκρυνση του DNA από το διάλυμα

Το παραπάνω διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα που έχουν λυθεί, τοποθετείται σε στήλη συγγενείας gDNA Elimination Spin Column με σκοπό την ειδική απομάκρυνση του DNA και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000rpm, 1min.

Γ. Δέσμευση του ολικού RNA

Στο διάλυμα έκλουσης από την παραπάνω στήλη, προστίθεται 70% αιθανόλη που βοηθά στην αφυδάτωση και κατακρήμνιση του RNA και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε στήλη συγγενείας RNeasy Mini Elute για να προσδεθεί ειδικά το RNA σε αυτήν και φυγοκεντρείται στα 12.000rpm, 1min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρηση απομακρύνεται η ποσότητα που έχει εκλουστεί.

Δ. Πλύσεις

Ακολουθεί η προσθήκη 700ul διαλύματος πλύσης RW1 στη στήλη στην οποία έχει προσδεθεί το RNA και η στήλη φυγοκεντρείται στα 12.000rpm, 1min. Στη συνέχεια, σε μία δεύτερη πλύση τοποθετούνται 500ul διαλύματος RPE και φυγοκεντρώνται στα 12.000rpm, 1min. Τέλος, τοποθετούνται 500ul διαλύματος 80% αιθανόλης διαλυμένης σε RNase free water στη στήλη και γίνεται φυγοκέντρηση στα 12.000rpm, 2min. Η στήλη φυγοκεντρείται με ανοιχτό το καπάκι της στα 14.000rpm, 5min.

E. Έκλυση ολικού RNA

Τοποθετούνται στη στήλη 14ul RNase free water, αφήνεται σε ηρεμία για 5min και έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000rpm, 2min. Στο υδατικό διάλυμα έχει εκλουστεί το ολικό RNA από τις βλαστοκύστες που διατηρείται στους -80°C. Η

συγκέντρωση του RNA με αυτή τη διαδικασία από τις 10 βλαστοκύστες ήταν κατά μέσο όρο κοντά στα 4ug/ul.

6. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Στο επόμενο στάδιο θα παραχθεί ένα DNA αντίγραφο από το μόριο RNA, δηλαδή με καλούπι το RNA θα παραχθεί DNA. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός ενζύμου που έχει απομονωθεί από ογκοϊούς RNA και καλείται αντίστροφη μεταγραφάση, δηλαδή αντιστρέφει τη διαδικασία της μεταγραφής που λαμβάνει χώρα κατά τη γονιδιακή έκφραση. Για την ενζυμική αυτή αντίδραση κρίνονται απαραίτητα ολιγονουκλεοτίδια κατάλοιπα δεοξυθυμιδίνης (oligodT) τα οποία αναμειγνύονται με το ολικό RNA που εξήχθη, υβριδοποιούνται με τις πολυαδενυλιωμένη ουρά του mRNA, λειτουργώντας ως εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφάση. Οι εκκινητές αυτοί παρουσιάζουν ένα μειονέκτημα: επειδή η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινά από το 3' άκρο για να πολυμερίζει με την κατεύθυνση 5'→3', ενδέχεται να μη φτάσει στο 5' άκρο, ιδίως εαν το mRNA είναι μεγάλου μήκους. Γι' αυτό συντίθενται πολλά ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα μήκους 6-10 νουκλεοτιδίων (τυχαία εξαμερή, random hexamers) με τυχαίες αλληλουχίες και χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για τη σύνθεση του cDNA. Έτσι, η εκκίνηση της σύνθεσης ξεκινά από πολλά σημεία και όχι μόνο από το 3' άκρο. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι ένα υβρίδιο mRNA-cDNA, το οποίο τελικά περιορίζεται σε cDNA με τη χρήση RNase που διασπά το RNA (Εικόνα 27).

Για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA) χρησιμοποιήθηκε το SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, 11904-018) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, οι οποίες περιγράφονται ως εξής:

Α. Για κάθε ενζυμική αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδρώντα σε υδατικό διάλυμα:

Αντιδρώντα	Όγκος/ αντίδραση
------------	------------------

ΣΤ. Τερματισμός της αντίδρασης με επώαση στους 72°C για 15min και τοποθέτηση στον πάγο.

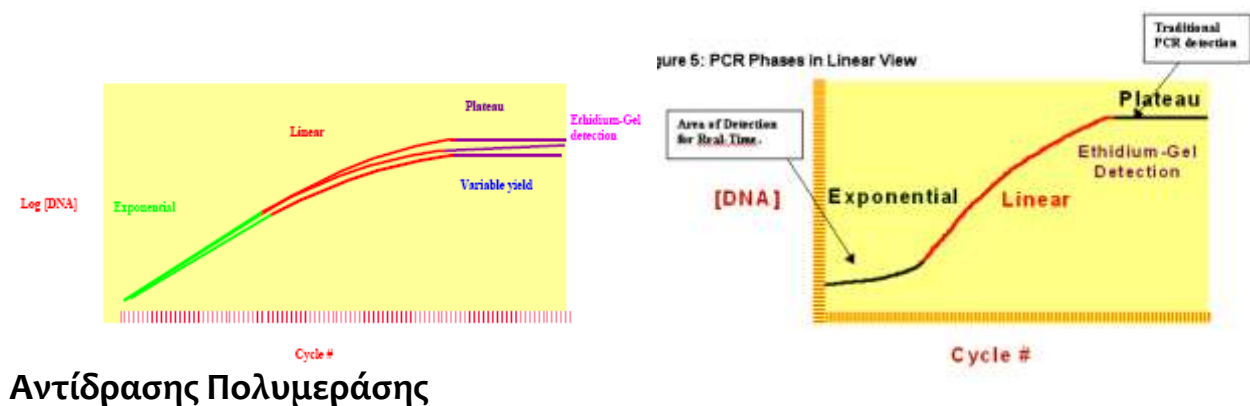
Ζ. Προσθήκη 1ul RNaseH και επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 20min για να αποδομηθεί- υδρολυθεί το μόριο του mRNA και να παραμείνει ως τελικό προϊόν μόνο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος cDNA.

7. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ή Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

Η Real-Time PCR είναι μια τεχνική που άρχισε να αναπτύσσεται πρόσφατα, και έχει βελτιώσει σημαντικά την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων. Κατά την real-time PCR ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται τα προϊόντα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της αντίδρασης. Οι μέθοδοι που είναι σήμερα διαθέσιμες χρησιμοποιούν φθορίζουσες ουσίες και ένα σύστημα μέτρησης (ανίχνευσης) του φθορισμού.

Το βασικότερο πλεονέκτημα της real-time PCR είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων (κύκλων) της αντίδρασης. Το να μπορούμε να μετρήσουμε την κινητική της αντίδρασης στα αρχικά της στάδια είναι σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο όπου χρησιμοποιούνται πηκτές (gels) αγαρόζης και τα προϊόντα που ηλεκτροφορούνται προέρχονται από την τελική φάση ή το τελικό σημείο της αντίδρασης.

7.1 Όψη των Φάσεων της Αλυσιδωτής



Εκθετική φάση: Γίνεται διπλασιασμός του προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (αν βέβαια η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης είναι 100%.

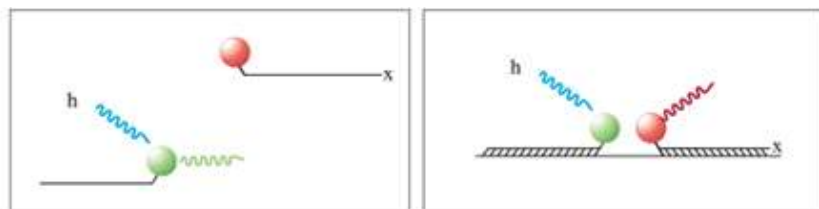
Γραμμική φάση: Τα αντιδραστήρια δεν είναι πλέον πλήρως διαθέσιμα σε κάθε κύκλο, η αντίδραση επιβραδύνεται και τα προϊόντα αρχίζουν να αποικοδομούνται. Στη φάση αυτή υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα. Στην Εικόνα 28 διακρίνονται τρία

Εικόνα 28: Τρεις φάσεις της PCR σε λογαριθμική και γραμμική όψη. Πηγή: Ginzinger, 2002

ακριβώς ίδια δείγματα, που στη γραμμική φάση ήδη παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές (μεταβλητότητα) μεταξύ τους.

Τελικό σημείο (Plateau): Είναι και το σημείο ανίχνευσης για την κλασσική PCR. Στο παράδειγμα της Εικόνας 27 φαίνεται ότι η αντίδραση έχει σταματήσει και στα τρία δείγματα (σε διαφορετική όμως στιγμή για το καθένα), δεν φτιάχνονται πλέον προϊόντα και αν παραμείνουν στον κυκλοποιητή αρκετά, θα αρχίσουν να αποικοδομούνται.

7.2 Η ποσοτικοποίηση με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με χρήση ιχνηθετών υβριδοποίησης (Hybprobes)



Εικόνα 29: Ποσοτικοποίηση στη Real Time PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδοποίησης (HybProbes). Πηγή: Idano Technology

Θεωρητικά, σε κάθε κύκλο της εκθετικής φάσης της αντίδρασης υπάρχει μια ποσοτική σχέση μεταξύ της αρχικής

ποσότητας της αλληλουχίας-στόχου (εκμαγείο) και της ποσότητας του προϊόντος της PCR. Η real-time PCR ανιχνεύει την συσσώρευση του προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση τα δεδομένα που λαμβάνονται κατά την εκθετική φάση μέσω του φθορισμού που ανιχνεύεται από τους ιχνηθέτες υβριδοποίησης.

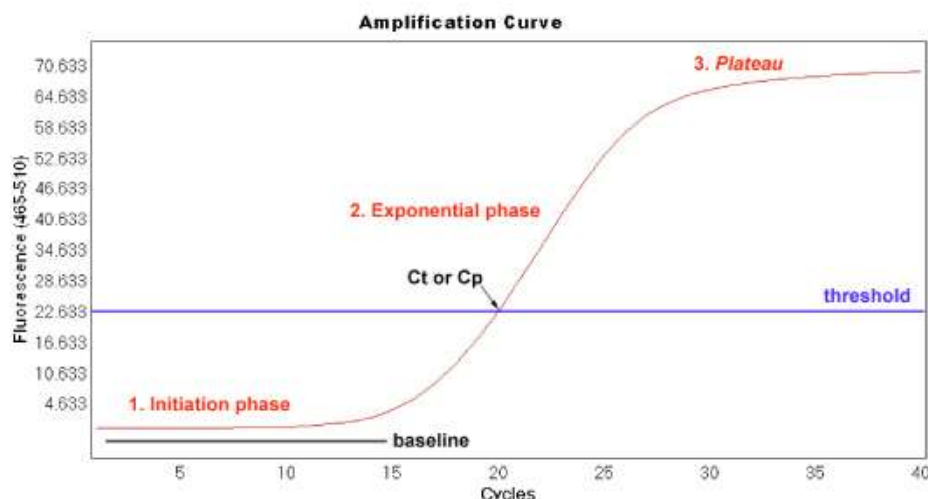
Οι ιχνηθέτες είναι σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς την αλληλουχία-στόχο και υβριδοποιούνται με αυτή κάπου μεταξύ των δύο εκκινητών (primers). Ο ένας ιχνηθέτης είναι σημασμένος στο 3' άκρο του με ένα χρωμοφόρο

αναφοράς (fluorescein), ενώ ο άλλος στο 5' άκρο του, που είναι σημειωμένο με ένα χρωμοφόρο «φωτοαποσβέστη» (Light Cycler Red 640). Ο «φωτοαποσβέστης» μειώνει (αποσβάνει) σημαντικά τον φθορισμό που εκπέμπεται από το χρωμοφόρο αναφοράς. Αυτό βασίζεται στο φυσικό φαινόμενο που ονομάζεται FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer): Μεταφορά ενέργειας φθορισμού μέσω συντονισμού. Το FRET είναι μια φασματοσκοπική διαδικασία κατά την οποία μεταβιβάζεται ενέργεια μεταξύ δύο μορίων που απέχουν μεταξύ τους 10-100 Å. Οι τελευταίοι διασπείρουν την ενέργεια που απορρόφησαν σαν θερμότητα και είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σαν ιχνηθέτες στην real-time PCR (Εικόνα 29). Ο φθορισμός ο οποίος ανιχνεύεται είναι ανάλογος του αριθμού της αλληλουχίας-στόχο που παρήχθη κατά το στάδιο της Real-Time PCR.

7.3 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων με βάση τη σχετική ποσοτική μέθοδο ή μέθοδο ΔΔCt με χρήση γονιδίων αναφοράς

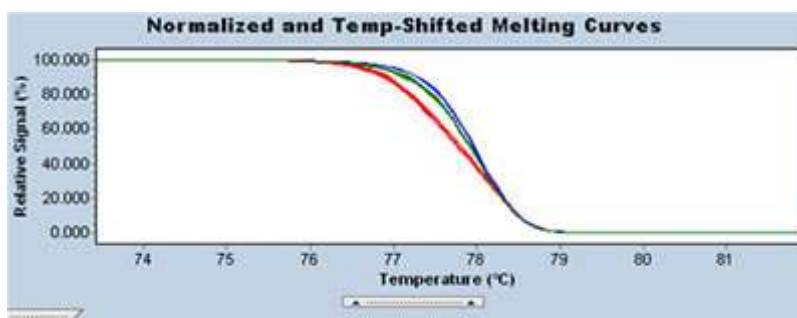
Το σημείο κατά το οποίο καταγράφεται φθορισμός από τον κυκλοποιητή ονομάζεται crossing point (Cp) και περιγράφει τον κύκλο αντίδρασης κατά τον οποίο ανυψώθηκε η καμπύλη πολλαπλασιασμού (amplification curve) από τη βάση του άξονα χ (Εικόνα 30).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό δείγμα ελέγχου ένα ενδογενές γονίδιο το G6PD (αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης), ώστε να κανονικοποιούνται διαφορές που σχετίζονται με την ποιότητα του RNA, και την αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής. Στην περίπτωση αυτή η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέθοδο ΔΔCt. Για παράδειγμα, για το γονίδιο-στόχο στο δείγμα 1 έστω Ct (στόχου1) και για το γονίδιο αναφοράς στο δείγμα 1 έστω Ct (αναφοράς1). Στην περίπτωση αυτή, συνολικά για το δείγμα 1 ορίσω σαν ΔCt(δείγμα1) τη διαφορά των δύο Ct, δηλαδή ΔCt(δείγμα1)= Ct(στόχου1)-Ct(αναφοράς1). Για να συγκρίνω τα δείγματα 1 και 2, κάνω το ίδιο και για το δείγμα 2, δηλ. ΔCt(δείγμα2)= Ct(στόχου2)- Ct(αναφοράς2). Ορίζουμε τώρα σαν ΔΔCt τη διαφορά ΔΔCt = ΔCt(δείγμα1)-ΔCt(δείγμα2). Άρα, και αν η απόδοση είναι 100%, η σχετική αναλογία του στόχου στα δύο δείγματα είναι $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Εικόνα 30: Φάσεις της καμπύλης πολλαπλασιασμού. Πηγή: Lazaro *et al.*, 2013

7.4 Καμπύλη τήξης του προϊόντος (Melting Curve)



Εικόνα 31: Παράδειγμα που απεικονίζει μία καμπύλη τήξης, την ταυτότητα του προϊόντος της Real-Time PCR. Πηγή: Roche

Επειδή στη Real-Time PCR τα προϊόντα δεν ταυτοποιούνται με βάση το μέγεθός τους είναι σκόπιμο να γνωρίζουμε αν έχει ληφθεί μόνο το κύριο προϊόν ή αν υπάρχουν και παραπροϊόντα. Για τον λόγο αυτό τα προϊόντα μετά το τέλος της αντίδρασης αποδιατάσσονται και ψύχονται γρήγορα. Η θερμοκρασία κατόπιν αρχίζει να αυξάνεται σταδιακά και καταγράφεται συνεχώς η ένταση φθορισμού. Κάποια στιγμή κοντά στην T_m (θερμοκρασία τήξης) του προϊόντος αρχίζει η απότομη πτώση του φθορισμού. Η θερμοκρασία τήξης είναι αυτή στην οποία η μισή ποσότητα DNA ή οι μισοί ιχνηθέτες της αλληλουχίας- στόχο έχουν υβριδοποιηθεί. Κατάλληλο λογισμικό υπολογίζει την αρνητική 1η παράγωγο της έντασης του φθορισμού και την απεικονίζει σαν μια κορυφή που αντιστοιχεί στην

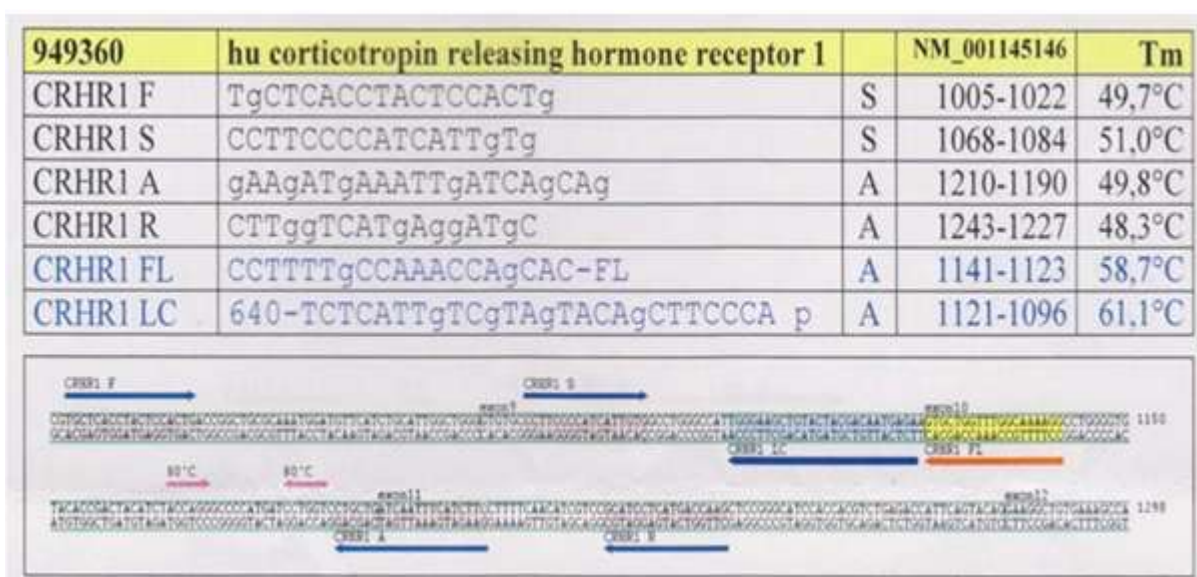
T_m του προϊόντος (Εικόνα 31). Αν υπήρχε και παραπροϊόν αυτό θα εμφανιζόταν σαν μια επιπλέον κορυφή. Η T_m κάθε προϊόντος αποτελεί ουσιαστικά και την ταυτότητα του προϊόντος για τη Real-Time PCR.

7.5 Ανίχνευση των μεταγράφων του υποδοχέα R1 και R2 με Real-Time PCR

Για την ανίχνευση των μεταγράφων και των δύο υποδοχέων χρησιμοποιήθηκε κυκλοποιητής Light Cycler 480 II της Roche και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή για τη χρήση αυτού. Η τεχνική ανίχνευσης που ακολουθήθηκε είναι με τη χρήση ανιχνευτών υβριδοποίησης (hybridization probes). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες 96 θέσεων (LightCycler 480 Multiwell Plate 96), οι οποίες καλύπτονται με ταινίες επικόλλησης (LightCycler 480 Sealing foils). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

Πίνακας: Διάλυμα Αντίδρασης		Πίνακας: Κατανομή Κύκλων		
LightCycler 480 H ₂ O, PCR grade	9,6ul	ΚΥΚΛΟΙ	°C	Χρόνος
LightCycler 480 Genotyping Master 5X (περιέχει 15mM MgCl ₂ , dNTP's και Taq DNA Πολυμεράση)	4ul	Προεπάση	95 °C	10:00 min
Primer sense 20pmol/μL	0,5ul	Αποδιάταξη	95 °C	10:00 min
Primer antisense 20pmol/μL	0,5ul	Υβριδισμός	*°C	20:00 min
Ανιχνευτής Υβριδοποίησης FL 20pmol/μL	0,2ul	Πολυμερισμός	72 °C	10:00 min
Ανιχνευτής Υβριδοποίησης LC 20pmol/μL	0,2ul	Αρ. Κύκλων	40	
cDNA	5ul	Θερ/σία Αναμονής	4 °C	
Σύνολο	20ul			
* Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ποικίλει ανάλογα με τον εκκινητή				

Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται τόσο τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ενζυμική αντίδραση πολυμερισμού, όσο και οι κύκλοι πολυμερισμού που περιλαμβάνουν τρία στάδια: αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation), υβριδισμό (annealing) και πολυμερισμό (extension). Η προεπώαση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, η οποία λόγω χημικής τροποποίησης είναι ανενεργή (Hot Start Master Mix). Το πρόγραμμα και τα αντιδραστήρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως έχουν και για τους δύο υποδοχείς καθώς και για το γονίδιο αναφοράς G6PD (αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης) με τη βοήθεια του οποίου κανονικοποιείται η τιμή του αγνώστου DNA-στόχου, με τις διαφορές να εντοπίζονται στη θερμοκρασία υβριδοποίησης και στις αλληλουχίες των εκκινητών και ανιχνευτών. Οι διαφορές αυτές απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα (Εικόνα 32, 33, 34):

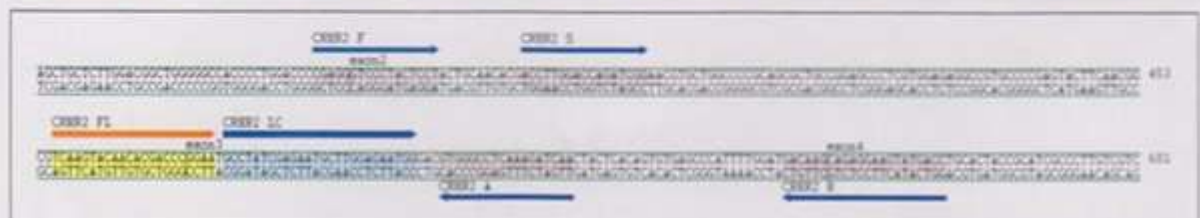


Εικόνα 32: Ζεύγη εκκινητών (primers) και ιχνηθετών (probes) ειδικά σχεδιασμένων για το γονίδιο human CRH-R1. Παρουσιάζεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης

<i>mu</i> G6PD		NM_009953	
G6PD S	CCAgATCgggACCTgCTg	326-343	58.8
G6PD A	AggCACTCTCTgTAGgCATTC	442-421	58.6
G6PD FL	AgTAgAgAgACcTgCCCCgAg-FL	368-389	63.1
G6PD LC	640-ACTTCAATgqCATCAAqTACAACACgACC p	391-419	64.4

Εικόνα 33: Ζεύγη εκκινητών (primers) και ιχνηθετών (probes) ειδικά σχεδιασμένων για το γονίδιο mouse G6PD. Παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης.

949360	hu corticotropin releasing hormone receptor 2		NM_001883	Tm
CRHR2 F	CgAgggTCCCTACTCCT	S	343-359	52,2°C
CRHR2 S	ACCTTggACCAgATCgg	S	371-387	53,2°C
CRHR2 A	TTgATCTTTgAggCCCAC	A	525-508	52,7°C
CRHR2 R	ggTCATACTTCCTCTgCTTgTC	A	575-554	54,0°C
CRHR2 FL	TCAAgtACAACACgACCCggAA-FL	S	456-477	60,8°C
CRHR2 LC	640-gCCTATCgAgAATgCTTggAgAATgg p	S	479-504	65,1°C



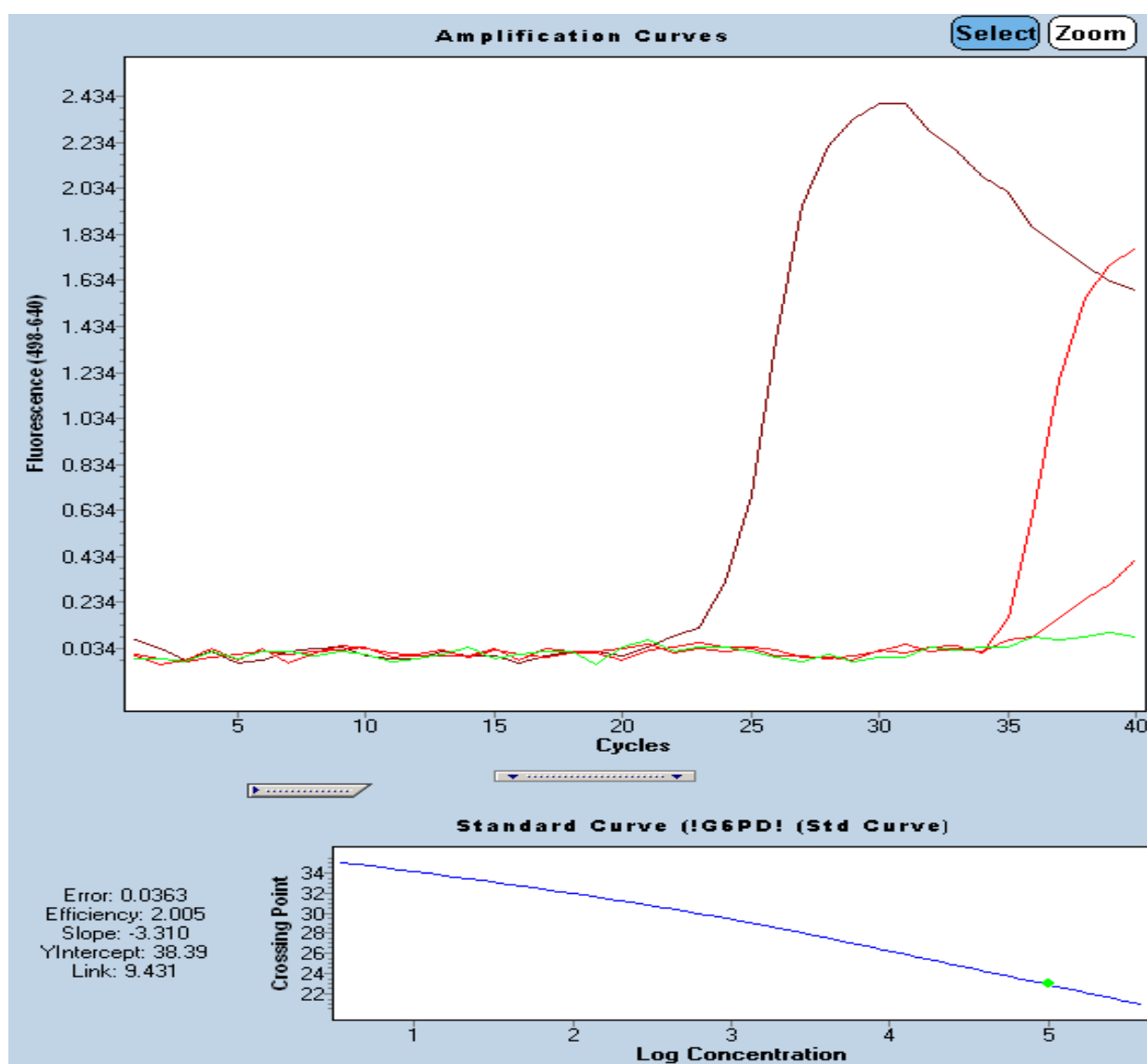
Εικόνα 34: Ζεύγη εκκνητών (primers) και ιχνηθετών (probes) ειδικά σχεδιασμένων για το γονίδιο human CRH-R2. Παρουσιάζεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης

Κεφάλαιο 4

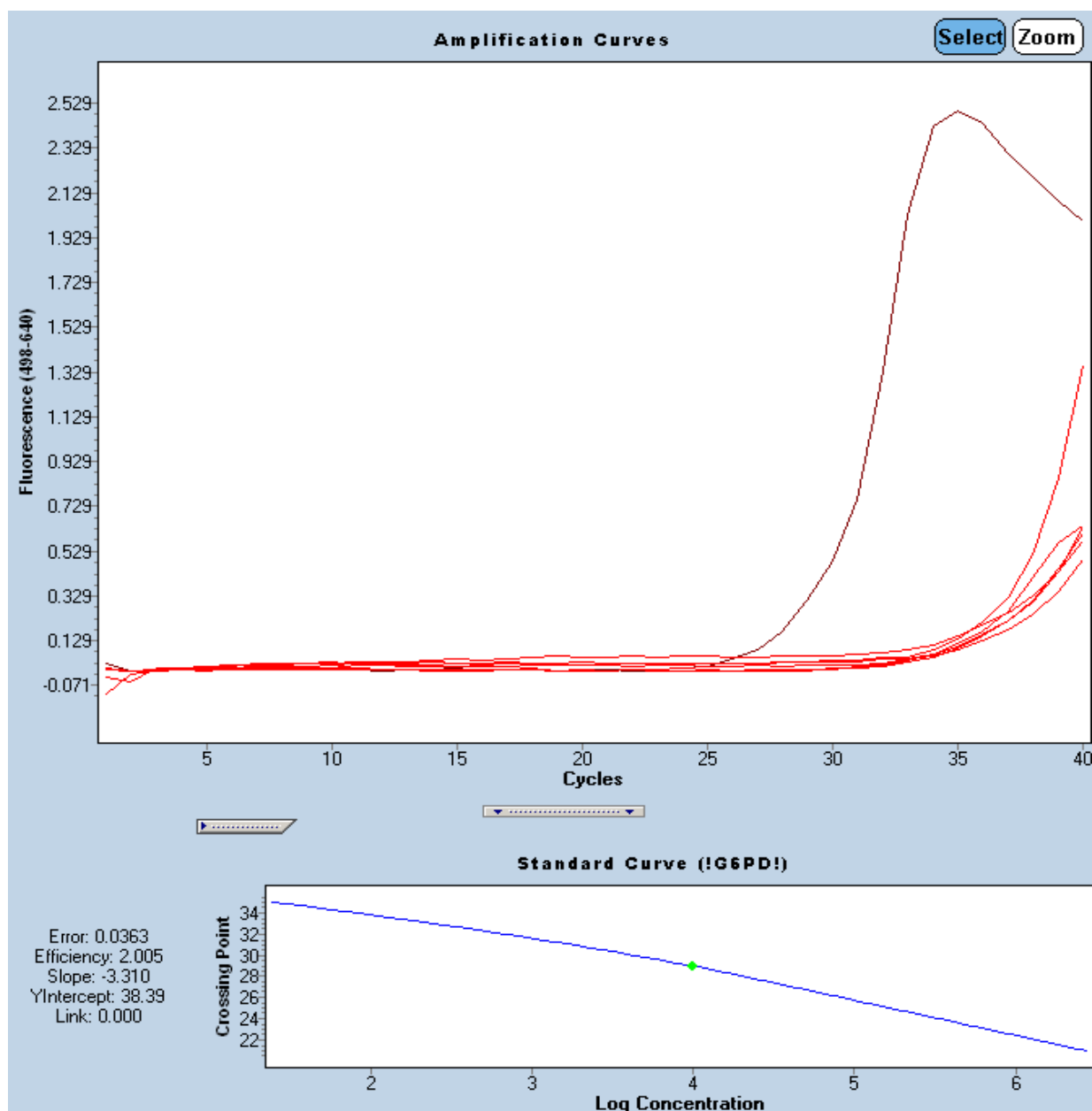
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανίχνευση του μεταγράφου του υποδοχέα CRH-R1 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες

Τα μεταγράφα του υποδοχέα CRH-R1 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες ανιχνεύθηκαν μετά από εξαγωγή ολικού RNA και αντίστροφης μεταγραφής αυτού σε cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Η μέθοδος ανίχνευσης των μεταγράφων έγινε με τη χρήση τυχαίων εξαμερών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή αντιπροσωπευτικών εικόνων του λογισμικού Light Cyclor 480 Software 1.5 και πινάκων.



Εικόνα 35: Καμπύλη πολλαπλασιασμού και πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο αναφοράς μ G6PD, όπως αυτή αποτυπώνεται με το λογισμικό Light Cyclor 480 Software 1.5 (Roche). Η εικόνα απεικονίζει την καμπύλη του γονιδίου αναφοράς μ G6PD και των προς εξέταση δειγμάτων από ανθρώπινες βλαστοκύστες.



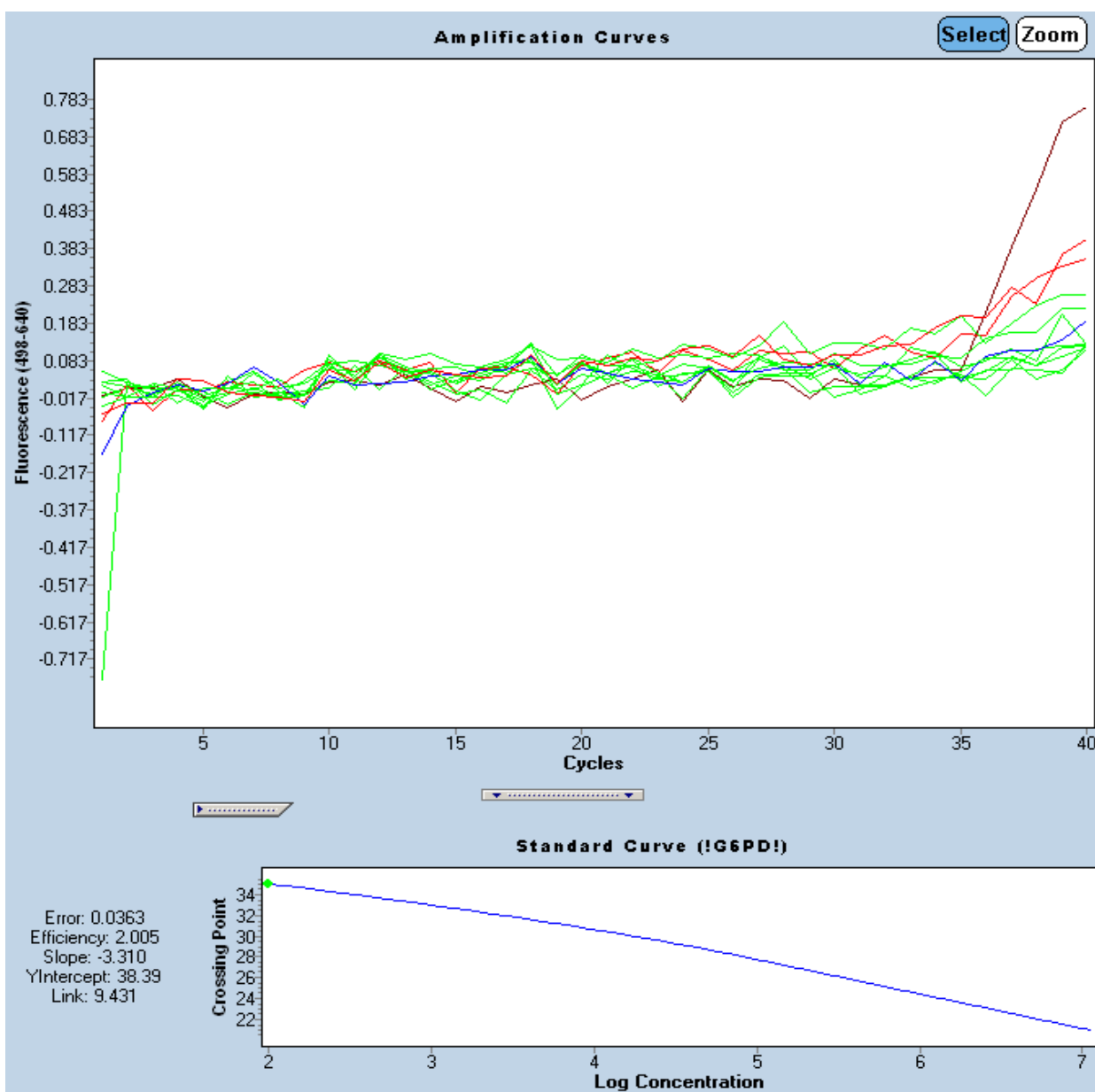
Εικόνα 36: Καμπύλη πολλαπλασιασμού και πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο του υποδοχέα CRH-R1, όπως αυτή αποτυπώνεται με το λογισμικό Light Cycler 480 Software 1.5 (Roche). Η εικόνα απεικονίζει την καμπύλη του γονιδίου αναφοράς *muG6PD* και των προς εξέταση δειγμάτων από ανθρώπινες βλαστοκύστες.

Η ανίχνευση μεταγράφων για το γονίδιο CRH-R1 εξετάστηκε σε 10 ανθρώπινες βλαστοκύστες. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 36 και στον Πίνακα 1. Όπως παρατηρείται στις αντιπροσωπευτικές εικόνες του λογισμικού, και οι δέκα βλαστοκύστες (S1-S10) εμφανίζουν θετικό προϊόν στον 35^ο κύκλο πολυμερισμού. Αυτό υποδηλώνει ότι σε ανθρώπινες βλαστοκύστες υπάρχει μεταγραφική δραστηριότητα για τον υποδοχέα CRH-R1.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα Real -Time PCR για το γονίδιο CRH-R1			
A/A	Όνομα δείγματος	Cp	Συγκέντρωση
1	S1	35	4,62E0
2	S2	35	4,62E0
3	S3	35	4,87E0
4	S4	35	4,87E0
5	S5	35	4,87E0
6	S6	35	2,45E1
7	S7	35	2,45E1
8	S8	35	2,45E1
9	S8	35	2,45E1
10	S10	35	2,45E1

2. Ανίχνευση του μεταγράφου του υποδοχέα CRH-R2 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες

Τα μεταγράφα του υποδοχέα CRH-R2 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες ανιχνεύθηκαν μετά από εξαγωγή ολικού RNA και αντίστροφης μεταγραφής αυτού σε cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Η μέθοδος ανίχνευσης των μεταγράφων έγινε με τη χρήση τυχαίων εξαμερών.



Εικόνα 37: Καμπύλη πολλαπλασιασμού και πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο του υποδοχέα CRH-R2, όπως αυτή αποτυπώνεται με το λογισμικό Light Cycler 480 Software 1.5 (Roche). Η εικόνα απεικονίζει την καμπύλη του γονιδίου αναφοράς miG6PD και των προς εξέταση δειγμάτων από ανθρώπινες βλαστοκύστες.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα Real -Time PCR για το γονίδιο CRH-R2			
A/A	Όνομα δείγματος	Cp	Συγκέντρωση
1	S1	0	0
2	S2	0	0
3	S3	0	0
4	S4	0	0
5	S5	0	0
6	S6	0	0
7	S7	0	0
8	S8	0	0
9	S8	0	0
10	S10	0	0

Η ανίχνευση μεταγράφων για το γονίδιο CRH-R2 εξετάστηκε σε 10 ανθρώπινες βλαστοκύστες. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην Εικόνα 37 και στον Πίνακα 2. Στις αντιπροσωπευτικές εικόνες του λογισμικού, δεν ανιχνεύεται θετικό προϊόν για τις βλαστοκύστες (S1-S10). Αυτό υποδηλώνει ότι σε ανθρώπινες βλαστοκύστες δεν υπάρχει μεταγραφική δραστηριότητα για τον υποδοχέα CRH-R2.

Κεφάλαιο 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η CRH αποτελεί ένα νευροορμονικό πεπτίδιο που ενεργοποιεί τον άξονα Υποθάλαμος- Υπόφυση- Επινεφρίδια (HPA axis) και αποτελεί μείζονα ρυθμιστή ποικίλων αλλαγών που επάγονται από το στρες. Ειδικότερα, αυξάνει το ρυθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων και μειώνει τα ποσοστά ανάπτυξης σε βλαστοκύστες ποντικών που υπέστησαν στρες κατά την ακινητοποίησή τους (63). Η σύνθεση και η έκκρισή της έχει βρεθεί και σε άλλους περιφερικούς ιστούς, καθώς και στους περισσότερους ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως σε ανθρώπινη ωοθήκη και ωοθυλακικό υγρό. Η CRH καθώς και οι δύο υποδοχείς της CRH-R1 και CRH-R2 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες λειτουργίες της ανθρώπινης ωοθήκης. Συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί στα κύτταρα της θήκης και του στρώματος, σε ανθρώπινο ωοθυλάκιο και στα κύτταρα του ωοφόρου λοφιδίου. Όσον αφορά στην ωοθυλακιογένεση, η CRH εμποδίζει την ωρίμανση των ωοθυλακίων γεγονός που μπορεί να αναστραφεί με την προσθήκη ανταλαρμίνης, ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα R1 της CRH. Η CRH, επίσης, παρουσιάζει κατασταλτικό ρόλο στην ωοθηκική στεοειδογένεση, ενώ εκκρίνεται και από την πλευρά του προς εμφύτευση εμβρύου και από την πλευρά της μητέρας (ενδομήτριο) υποδηλώνοντας το ρόλο που διαδραματίζει και στη διαδικασία εμφύτευσης του εμβρύου.

Στην παρούσα μελέτη, τέθηκε το ερώτημα εάν εκφράζονται οι δυο υποδοχείς της CRH, R1 και R2 στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου, με σκοπό να εξιχνιαστεί ο ρόλος του άξονα CRH/ CRH-R1 και R2 στην εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Για το λόγο αυτό, έγινε ωοληψία ωοκυττάρων από γυναίκες, τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα αφέθηκαν να ωριμάσουν και οι πλεονάζουσες ανθρώπινες βλαστοκύστες από γυναίκες που πληρούσαν συγκεκριμένα κριτήρια που τέθηκαν από τη μελέτη καταψύχθηκαν ακαριαία για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Στη συνέχεια, απομονώθηκε ολικό RNA το οποίο και μεταγράφη αντίστροφα σε cDNA. Το cDNA αποτέλεσε τη μήτρα για την ποσοτική ανάλυση των γονιδίων των δύο υποδοχέων με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).

Σε ότι αφορά τον υποδοχέα R1, ανιχνεύθηκαν μεταγράφα σε όλες τις ανθρώπινες βλαστοκύστες. Ειδικότερα, με την ανάλυση της Real Time PCR βρέθηκαν 5-25 μετάγραφα αυτού. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει την διαειδική ύπαρξη του συγκεκριμένου υποδοχέα και την εξελικτική συντήρηση του άξονα CRH/ CRH-R1 στα θηλαστικά (ποντικός και άνθρωπος), καθώς οι Dinoroulou *et al.* (41), απέδειξαν την ύπαρξη αυτού σε ώριμο mRNA από μορίδια και βλαστοκύστες ποντικών του είδους *Mus musculus* και στελέχους F1 (CBAX C57BL/6). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη του υποδοχέα R1 επιβεβαιώνεται από αδημοσίευτα αποτελέσματα των Lim LN *et al.*, οι οποίοι απέδειξαν την ύπαρξη του υποδοχέα R1 σε επίπεδο μετάγραφου και πρωτεΐνης σε ανθρώπινα έμβρυα στο στάδιο των 2, 4, 6, 8 κυττάρων και στο αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης (64).

Η ανίχνευση του υποδοχέα R1 της CRH σε ανθρώπινες βλαστοκύστες υποδηλώνει τη συμμετοχή του άξονα CRH/ CRH-R1 σε 3 σημαντικές διαδικασίες της βιολογίας αναπαραγωγής που είναι η προσκόλληση του εμβρύου στο ενδομήτριο (προεμφυτευτικά στάδια εμβρύου), η διαδικασία της φθαρτοποίησης καθώς και οι ανοσολογικοί μηχανισμοί ανοχής που λαμβάνουν χώρα κατά τη διείσδυση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Κατά την εμφύτευση, ένα δίκτυο διαμεσολαβητών δρα στο ενδομήτριο ώστε να το καταστήσει επιδεκτικό. Ειδικότερα, η CRH παράγεται τόσο από τη βλαστοκύστη όσο και από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου όπου μαζί με παράγοντες όπως η IL-1, IL-6, LIF και PGE₂, που ενεργοποιούν τον υποκινητή της CRH, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου. Η CRH-R1, από την άλλη, έχει ανιχνευτεί στα κύτταρα του στρώματος, στα επιθηλιακά κύτταρα στο ενδομήτριο καθώς και στο μυομήτριο και με την παρούσα μελέτη και στην προς εμφύτευση βλαστοκύστη. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι ο άξονας CRH/CRH-1 είναι ενεργός και στα δύο αλληλεπιδρώντα μέρη το ενδομήτριο και τη βλαστοκύστη, υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή του σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ελλειμματικά ποντίκια τόσο για την CRH όσο και για τον υποδοχέα R1 δεν είναι

πλήρως στείρα καθώς και ότι η χορήγηση ανταγωνιστή για τον υποδοχέα R1 (ανταλαρμίνη) σε αρουραίους μείωσε τον αριθμό θέσεων εμφύτευσης, χωρίς όμως να τις καταργεί (49). Τα παραπάνω δεδομένα, δείχνουν ότι ο υποδοχέας R1 εμπλέκεται στην εμφύτευση της αναπτυσσόμενης βλαστοκύστης, χωρίς όμως να είναι ο μοναδικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη διαδικασία αυτή.

Η απόκριση των κυττάρων του ενδομητρίου στην κύηση γίνεται με την έκκριση προγεστερόνης η οποία οδηγεί στη μεταβολή της δομής και λειτουργίας του ενδομητρίου που καλείται φθαρτοειδής αντίδραση ή φθαρτοποίηση. Αυτή, αρχικά αφορά μόνο το σημείο της εμφύτευσης, αλλά αργότερα επεκτείνεται σε όλο το ενδομήτριο. Η CRH δεν εντοπίζεται στο στρώμα του ενδομητρίου παρά μόνον μετά τη φθαρτοποίηση αυτού και είναι αυτή που επάγει τη διαδικασία *per se* (65). Ειδικότερα, η CRH διαμεσολαβεί, μέσω του υποδοχέα R1, την επαγομένη από προγεστερόνη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Η ανίχνευση του CRH-R1 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες δείχνει την αλληλεπίδραση και απόκριση της βλαστοκύστης στη μητρική CRH που παράγεται από το ενδομήτριο ισχυροποιώντας το σημαντικό ρόλο του άξονα στη διείσδυση του εμβρύου, αλλά και τη συμμετοχή της βλαστοκύστης στο μηχανισμό αυτό.

Η τοπικά εκκρινόμενη CRH στο ενδομήτριο σχετίζεται και με ανοσολογικά φαινόμενα όπως την εγκατάσταση ανοσοανοχής έναντι του εμβρύου, δηλαδή την καταστολή της ανοσοαπόκρισης του μητρικού ανοσιακού συστήματος. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την προαποπτωτική κυτταροκίνη Fas και τον υποδοχέα της FasL. Ο άξονας Fas/FasL εκτός από την εγκατάσταση της περιφερικής ανοχής στη μητέρα εμπλέκεται και στην εξασφάλιση ενός ανοσολογικού προνομίου (*immune privileged sites*) σε περιοχές, όπως η μήτρα για την προστασία από εντοπισμένη ανοσιακή απόκριση. Η CRH βρέθηκε να επάγει τον FasL διαμέσου του υποδοχέα της CRH-R1 μετά από πειράματα *in vitro* σε HeLa κύτταρα. Ειδικότερα, στην εμβryo-ενδομητριάκη επιφάνεια εκφράζεται ο αποπτωτικός παράγων FasL από τα κύτταρα της τροφοβλάστης και από τα κύτταρα του φθαρτού οδηγώντας στην τοπική

απόπτωση των δραστικών T λεμφοκυττάρων που φέρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του τον παράγοντα Fas. Παλαιότερες έρευνες απέδειξαν ότι διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν μεταλλαγές δίχως νοήματος (nonsense) ή παρανοηματικές μεταλλαγές (missense) στο γονίδιο *fasl* (66), μπορούν να αναπαραχθούν, αποδεικνύοντας και πάλι ότι το άξονας Fas/FasL δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην εμφύτευση του εμβρύου.

Συνολικά αξιολογώντας τη συμμετοχή του CRH-R1 στις τρεις προαναφερθείσες διαδικασίες, μπορεί να προταθεί ένα πιθανό μοντέλο συνεργιστικής δράσης του άξονα CRH/ CRH-R1 και του άξονα Fas/FasL τόσο στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου, όσο και στην προετοιμασία του ενδομητρίου και την τελική διείσδυση του εμβρύου. Τα αποτελέσματα μας επιτρέπουν να θέσουμε νέα ερωτήματα που μπορεί να αποτελέσουν μελλοντικούς στόχους. Ειδικότερα, η μελέτη της εμφύτευσης του εμβρύου σε διπλά διαγονιδιακά ποντίκια τόσο για τον υποδοχέα R1, όσο και για τον FasL, θα καταδείξει εάν αυτοί οι δύο μηχανισμοί είναι οι μόνοι ή οι κύριοι που ενορχηστρώνουν τις διαδικασίες εμφύτευσης. Επιπρόσθετα, είναι σημαντική η μέλετη της *in vivo* τοπολογίας της CRH και του υποδοχέα R1 με χρήση διαγονιδιακών ποντικών με φθορίζουσα CRH και φθορίζων υποδοχέα υπό μικροσκόπιο δύο φωτονίων. Η χρήση τεχνικών σίγησης (RNAi) ή ανταγωνιστών του υποδοχέα σε ανθρώπινες βλαστοκύστες μπορούν να βοηθήσουν στην εξιχνίαση του ρόλου του άξονα αυτού στην ανάπτυξη και εμφύτευση του εμβρύου σε φυσιολογικές καταστάσεις ή σε καταστάσεις οξέως ή χρόνιου στρες. Περαιτέρω μελέτη σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη χρήση ανοσοστυπώματος κατά Western θα επιβεβαιώσει την έκφραση του υποδοχέα R1 στις βλαστοκύστες και τέλος η χρήση μικροσυτοιχιών θα βοηθήσει στην εύρεση πιθανών μορίων στόχων ή διαμεσολαβητών καθώς και στην εύρεση πιθανών νέων μηχανισμών που εμπλέκονται βελτιώνοντας έτσι τα ποσοστά επιτυχίας της εγκυμοσύνης σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, που αποτελεί και άμεσο στόχο του πεδίου της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Σε ότι αφορά τον υποδοχέα R2, ανιχνεύεται σε εγκεφαλικές δομές όπως το διαφανές διάφραγμα, ο υποθάλαμος, η αμυγδαλή, ο διάμεσος πυρήνας της τελικής ταινίας του οπτικού θαλάμου (*stria terminalis*), ο ραχιαίος πυρήνας ραφής, το χοριοειδές πλέγμα, ρυθμίζοντας το φόβο, το άγχος και τη διέγερση. Εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την ουροκορτίνη παρά για τη CRH και ομολογία 71% με τον υποδοχέα R1. Ποντικοί ελλειμματικοί για τον υποδοχέα R2 εμφανίζουν υπερευεσθησία στο στρες, συμπεριφορά αυξημένου στρες και μειωμένη πρόσληψη τροφής (67). Από την άλλη μερικές ψυχιατρικές γενετικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση του γονιδίου του υποδοχέα R2 με κατάθλιψη, πανικό, διπολική διαταραχή και απόκριση σε θεραπεία με αντικαταθλιπτικά φάρμακα, ενώ άλλες παρουσιάζουν αντίθετα αποτελέσματα (68).

Στην παρούσα μελέτη, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο ανίχνευσης όπως και στην περίπτωση του υποδοχέα R1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν ανιχνεύεται ο υποδοχέας R2 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες επιβεβαιώνοντας τη μελέτη των Dinoroulou *et al.*, σύμφωνα με την οποία δεν ανιχνεύθηκε σε επίπεδο μεταγράφου ο υποδοχέας R2 σε έμβρυα ποντικών του είδους *Mus musculus* και στελέχους F1 (CBAX C57BL/6) στο αναπτυξιακό στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης, υποδηλώνοντας πιθανώς τη διαειδική μη συμμετοχή του υποδοχέα R2 στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου στον ποντικό.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο υποδοχέας R2 αν και έχει ανιχνευθεί σε μεταγραφικό επίπεδο σε μικρότερο βαθμό από τον R1 στα πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια του ποντικού, δεν εμπλέκεται στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου και στη διαδικασία της φθαρτοποίησης του ενδομητρίου. Πιθανώς, ο R2 υποδοχέας φαίνεται να συμμετέχει σε μικρότερο βαθμό στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων αφού κυρίως ρυθμίζεται από τον υποδοχέα R1, ενώ φαίνεται να συμμετέχει καθοριστικά στην εμπλοκή της CRH σε καταστάσεις στρες αφού η τοπολογία του δείχνει ότι παράγεται κυρίως στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην ανίχνευση των υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2, σε ανθρώπινες βλαστοκύστες, δεδομένου ότι το νευροπεπτίδιο της CRH διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη αυτή απέδειξαν την ύπαρξη του υποδοχέα R1 σε ανθρώπινες βλαστοκύστες επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα των Dinoroulou *et al.* και των Lim LN *et al.* Συνολικά τα δεδομένα αυτά, υποδηλώνουν τη διαειδική (άνθρωπος- ποντικός) συμμετοχή του άξονα CRH/CRH-R1 στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου, στους ανοσολογικούς μηχανισμούς ανοχής που λαμβάνουν χώρα στο ενδομήτριο κατά τη διείσδυση του εμβρύου, καθώς και στη διαδικασία φθαρτοποίησης αυτού.

Από την άλλη, τα δεδομένα από τον υποδοχέα R2, απέδειξαν τη μη ύπαρξη αυτού στις εν λόγω βλαστοκύστες, υποδηλώνοντας είτε τη συμμετοχή του σε πιο πρώιμα στάδια ανάπτυξης, όπως στην ανάπτυξη των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων στην ωοθήκη κατά τους Dinoroulou *et al.*, είτε τη διαμεσολάβησή του σε άλλες διαδικασίες, όπως το στρες, ο φόβος και το άγχος δεδομένης της σημαντικής ανίχνευσης του υποδοχέα αυτού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

5.2 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Σε συνέχεια των δεδομένων και των συμπερασμάτων, νέα ερωτήματα μπορεί να εξαχθούν από τη συγκεκριμένη μελέτη που μπορεί να αποτελέσουν μελλοντικές προοπτικές. Η χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής, όπως οι τεχνικές διαγένεσης, μπορούν να βοηθήσουν στην περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών εμφύτευσης του εμβρύου. Για παράδειγμα, διπλά διαγονιδιακά ποντίκια τόσο για τον υποδοχέα R1, όσο και για τον FasL, θα καταδείξουν εάν αυτοί οι δύο μηχανισμοί είναι οι μόνοι ή οι κύριοι ή δρουν συνεργιστικά για την ενορχήστρωση των μηχανισμών εμφύτευσης. Η μελέτη της *in vivo* δράσης της CRH και των υποδοχέων R1 και R2 μπορεί να προσεγγιστεί και με τη χρήση διαγονιδιακών

ποντικών με φθορίζουσα CRH και φθορίζων υποδοχέα υπό μικροσκόπιο δύο φωτονίων. Η χρήση τεχνικών σίγησης (RNAi) ή ανταγωνιστών του υποδοχέα σε ανθρώπινες βλαστοκύστες μπορούν να βοηθήσουν στην εξιχνίαση του ρόλου του άξονα αυτού στην ανάπτυξη και εμφύτευση του εμβρύου σε φυσιολογικές καταστάσεις ή σε καταστάσεις οξέως ή χρόνιου στρες. Περαιτέρω μελέτη σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη χρήση ανοσοστυπώματος κατά Western θα επιβεβαιώσει την έκφραση του υποδοχέα R1 στις βλαστοκύστες και τέλος η χρήση μικροσυστοιχιών θα βοηθήσει στην εύρεση πιθανών μορίων στόχων ή διαμεσολαβητών καθώς και στην εύρεση πιθανών νέων μηχανισμών που εμπλέκονται βελτιώνοντας έτσι τα ποσοστά επιτυχίας της εγκυμοσύνης σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, που αποτελεί και άμεσο στόχο του πεδίου της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹ Stevens A., Lowe J., 2008. *Ιστολογία του Ανθρώπου*, επιμέλεια Χ. Κίττας, 3 έκδοση, Ιαστρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.
- ² Sadler TW., 2015. *Langman's Medical Embryology*, 13th edition, Wolters Kluwer Health, Philadelphia, USA.
- ³ Sadler TW., 2015. *Langman's Medical Embryology*, 13th edition, Wolters Kluwer Health, Philadelphia, USA.
- ⁴ Coticchio G., et al., 2015. *Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization*, Hum Reprod Update. 2015 Jul-Aug;21(4):427-54.
- ⁵ Andersen CY., et al., 2014. *Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins*, Reprod Biol Endocrinol. 2014 Dec 28;12:128.
- ⁶ Aitken RJ., et al., 2013. *Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored*, Mol Hum Reprod. 2013 Dec;19(12):785-93.
- ⁷ Alberts B., et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, New York, USA
- ⁸ Vazquez-Levin MH., et al., 2014. *Antisperm antibodies: invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization*, Am J Reprod Immunol. 2014 Aug;72(2):206-18.
- ⁹ Slack J.M.W., 2007. *Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης*, δεύτερη έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Αλεξανδρούπολη.
- ¹⁰ Wennekamp S., et al., 2013. *A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo*, Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Jul;14(7):452-9.
- ¹¹ Biggins JS., et al., 2015. *Towards understanding the roles of position and geometry on cell fate decisions during preimplantation development*, Semin Cell Dev Biol. 2015 Sep 5. pii: S1084-9521(15)00165-2.

-
- ¹² Staun-Ram E., et al., 2005. *Human trophoblast function during the implantation process*, *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Oct 20;3:56.
- ¹³ Sengupta J., et al., 2014. *Multi-level and multi-scale integrative approach to the understanding of human blastocyst implantation*, *Prog Biophys Mol Biol*. 2014 Jan;114(1):49-60.
- ¹⁴ Hantak AM., et al., 2014. *Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation*, *Int J Dev Biol*. 2014;58(2-4):139-46.
- ¹⁵ Norwitz ER., et al., 2001. *Implantation and the survival of early pregnancy*, *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1400-8.
- ¹⁶ Yoshinaga K., 2014. *Progesterone and its downstream molecules as blastocyst implantation essential factors*, *Am J Reprod Immunol*. 2014 Aug;72(2):117-28.
- ¹⁷ Fukuda MN., et al., 2012. *Cell adhesion molecules in human embryo implantation*, *Sheng Li Xue Bao*. 2012 Jun 25;64(3):247-58.
- ¹⁸ Singh M., et al., 2011. *Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors*, *J Endocrinol*. 2011 Jul;210(1):5-14.
- ¹⁹ Yoshinaga K., 2014. *Progesterone and its downstream molecules as blastocyst implantation essential factors*, *Am J Reprod Immunol*. 2014 Aug;72(2):117-28.
- ²⁰ Berne R., Levy M., 2002. Αρχές Φυσιολογίας, επιμέλεια Κούβελας Ηλίας, τόμος 2, Πανεπιστημακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- ²¹ Vale W., et al., 1981. *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin*. *Science*. 1981 Sep 18;213(4514):1394-7.
- ²² Makrigiannakis A., et al., 2004. *Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation*, *Journal of Reproductive Immunology* 62 (2004) 53–59.
- ²³ Zoumakis E., et al., 1997. *Endometrial corticotropin-releasing hormone. Its potential autocrine and paracrine actions*, *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Sep 26;828:84-94.

-
- ²⁴ Kalantaridou S., et al., 2007. Reproductive corticotrophin releasing hormone, implantation and fetal immunotolerance, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5–6):461–481.
- ²⁵ Slominski A., et al., 2006. Corticotropin releasing hormone and the skin, *Front Biosci.* 2006 Sep 1;11:2230-48.
- ²⁶ Thomson M., 2012. The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth, *J Physiol Biochem.* 2013 Sep;69(3):559-73.
- ²⁷ Wypior G., et al., 2011. Expression of CRH, CRH-related peptide and CRH receptor in the ovary and potential CRH signalling pathways, *Journal of Reproductive Immunology* 90 (2011) 67– 73.
- ²⁸ Valentino R., et al., 2013. Sex- specific cell signaling: The corticotropin- releasing factor receptor model, *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Aug;34(8):437-44.
- ²⁹ Hsu D., et al., 2012. Variation in the corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene influences fMRI signal responses during emotional stimulus processing, *J Neurosci.* 2012 Feb 29;32(9):3253-60.
- ³⁰ Kiapekou E., et al., 2010. Update on the role of ovarian corticotropin-releasing hormone, *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Sep;1205:225-9.
- ³¹ Fan JM., et al., 2014. Prenatal stress, anxiety and depression: a mechanism involving CRH peptide family, *Neuro Endocrinol Lett.* 2014;35(6):429-39.
- ³² Brunton PJ., 2015. Neuroactive steroids and stress axis regulation: Pregnancy and beyond, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Aug 7 [Epub ahead of print].
- ³³ Zhu H., et al., 2011. Corticotropin-releasing factor family and its receptors: pro-inflammatory or anti-inflammatory targets in the periphery? *Inflamm Res.* 2011 Aug;60(8):715-21.
- ³⁴ Eunok Im, 2014. Corticotropin-releasing Hormone and Its Biological Diversity toward Angiogenesis, *Intest Res.* 2014 Apr;12(2):96-102.

-
- ³⁵ Benou C., et al., 2005. Corticotropin-releasing hormone contributes to the peripheral inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5407-13.
- ³⁶ Karanikas E., et al., 2008. Neuro-endocrinology of stress and immune mediated inflammation, *Psychiatriki* 2008, 19:43–51.
- ³⁷ Mastorakos, G., et al., 2006. Corticotropin releasing hormone and the immune/inflammatory response, *European Journal of Endocrinology* (2006) 155 S77–S84
- ³⁸ Kiapekou E., et al., 2010. Update on the role of ovarian corticotropin-releasing hormone, *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Sep;1205:225-9.
- ³⁹ Wypior G., et al., 2011. Expression of CRH, CRH-related peptide and CRH receptor in the ovary and potential CRH signalling pathways, *Journal of Reproductive Immunology* 90 (2011) 67– 73.
- ⁴⁰ Kalantaridou S., et al., 2007. Reproductive corticotrophin releasing hormone, implantation and fetal immunotolerance, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5–6):461–481.
- ⁴¹ Kalantaridou S., et al., 2004. Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone. Research and potential clinical utility of antalarmins (CRH receptor type 1 antagonists), *Am. J.Reprod. Immunol.* 51: 269–274.
- ⁴² Dinopoulou V., et al., 2013. The effect of CRH and its inhibitor, antalarmin, on in vitro growth of preantral mouse follicles, early embryo development, and steroidogenesis, *Endocrinology.* 2013 Jan;154(1):222-31
- ⁴³ Karteris E., et al., 2004. Expression and signalling characteristics of the corticotrophin-releasing hormone receptors during the implantation phase in the human endometrium, *J Mol Endocrinol.* 2004 Feb;32(1):21-32.
- ⁴⁴ Vergetaki A., et al., 2013. Differential expression of CRH, UCN, CRHR1 and CRHR2 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis, *PLoS One.* 2013 Apr 24;8(4):e62313.

-
- ⁴⁵ Makrigiannakis A., et al., 2004. *Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation*, Journal of Reproductive Immunology 62 (2004) 53–59.
- ⁴⁶ Vitoratos N., et al., 2006. “Reproductive” Corticotropin-Releasing Hormone, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1092: 310–318.
- ⁴⁷ Zoumakis E., et al., 1997. *Endometrial corticotropin-releasing hormone. Its potential autocrine and paracrine actions*, Ann N Y Acad Sci. 1997 Sep 26;828:84-94.
- ⁴⁸ Thomson M., 2013. *The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth*, J Physiol Biochem. 2013 Sep;69(3):559-73.
- ⁴⁹ Karalis K., et al., 1991. *Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo*, Science. 1991 Oct 18;254(5030):421-3.
- ⁵⁰ Makrigiannakis A., et al., 2001. *Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance*, Nat Immunol. 2001 Nov;2(11):1018-24.
- ⁵¹ Vrachnis N., et al., 2012. *Immune aspects and myometrial actions of progesterone and CRH in labor*, Clin Dev Immunol. 2012;2012:937618.
- ⁵² Grunt M, et al., 1993. *Effects of corticotropin-releasing factor on isolated rat heart activity*. Am J Physiol 1993; 264H: 1124–1129.
- ⁵³ Fahlbusch FB, et al., 2012. *Corticotropin-releasing hormone stimulates expression of leptin, 11beta-HSD2 and syncytin-1 in primary human trophoblasts*, Reprod Biol Endocrinol. 2012 Sep 12;10:80.
- ⁵⁴ Rivier J., et al., 2014. *Corticotropin-releasing factor peptide antagonists: design, characterization and potential clinical relevance*, Front Neuroendocrinol. 2014 Apr;35(2):161-70.
- ⁵⁵ Dunlop BW., et al., 2014. *Evaluation of a corticotropin releasing hormone type 1 receptor antagonist in women with posttraumatic stress disorder: study protocol for a randomized controlled trial*, Trials. 2014 Jun 21;15:240.

-
- ⁵⁶ Braus O., et al., 2001. *Pharmacological and chemical properties of astressin, antisauvagine-30 and alpha-helCRF: significance for behavioral experiments*, *Neuropharmacology*. 2001 Sep;41(4):507-16.
- ⁵⁷ Webster E.L., et al., 2002. *Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation*, *J. Rheumatol.* 29, 1252–1261.
- ⁵⁸ Höög Christer, 2010. Nobel Assembly at Karolinska Institutet, Advanced Information, Human *in vitro* Fertilization.
- ⁵⁹ Wang J., et al., 2006. *In vitro Fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement*, *Ther Clin Risk Manag.* 2006 Dec; 2(4): 355–364.
- ⁶⁰ Sheikha M.H., et al., 2013. *Multiplex PCR screening of Y chromosome microdeletions in azoospermic ICSI candidate men*, *Iran J Reprod Med.* 2013 Apr; 11(4): 335–338.
- ⁶¹ Chang P., et al., 1999. *Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons*, *Hum. Reprod.* (1999) 14 (11): 2689-2694.
- ⁶² Έκθεση για τη χρήση των βλαστοκυττάρων στη βιοϊατρική έρευνα και την κλινική ιατρική, Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής, Εισηγητές: Τ. Βιδάλης, Κ. Μανωλάκου.
- ⁶³ Liang B., et al., 2014. *Restraint Stress Impairs Oocyte Developmental Potential: Role of CRH-Induced Apoptosis of Ovarian Cells*, *Biol Reprod.* 2013 Sep 19;89(3):64.
- ⁶⁴ Lim LN, et al., 2003. *CRH and CRH R1 expression in preimplantation embryos*, Abstracts of the 19th Annual Meeting of the ESHRE, Madrid, Spain, 2003, p xviii57–58.
- ⁶⁵ Kalantaridou SN., et al., 2007. *The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance*, *Horm Metab Res.* 2007 Jun; 39 (6):474-7.
- ⁶⁶ Lynch DH., et al., 1994. *The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster*, *Immunity.* 1994 May;1(2):131-6.

⁶⁷ Bale TL., et al., 2000. *Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress*, Nat Genet. 2000 Apr; 24 (4):410-4.

⁶⁸ Wolf EJ., et al., 2013. *Corticotropin releasing hormone receptor 2 (CRHR-2) gene is associated with decreased risk and severity of posttraumatic stress disorder in women*, Depress Anxiety. 2013 Dec;30(12):1161-9.