



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ «ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ-ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗ»**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ
CRH, CRH-R1 ΚΑΙ CRH-R2 ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ
ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ ΣΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΔΥΟ, ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΚΑΙ
ΟΚΤΩ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Λουτράδης Δημήτριος:** Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».
- **Δρακάκης Πέτρος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».
- **Ντόμαλη Αικατερίνη:** Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».

“Human subtlety will never devise an invention more beautiful, more simple or more direct than does nature because in her inventions nothing is lacking, and nothing is superfluous.”

Leonardo da Vinci

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τους παρακάτω φίλους, συνεργάτες και συγγενείς οι οποίοι συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

- Τον αξιότιμο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Διευθυντή της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κο Δημήτριο Λουτράδη, που μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετάσχω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα Αναπαραγωγικής και Αναγεννητικής Ιατρικής.
- Τη Μοριακή Βιολόγο της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής κα Δέσποινα Μαυρογιάννη για την πολύτιμη καθοδήγησή της και την επίβλεψη του πειραματικού σκέλους της εργασίας.
- Τον γυναικολόγο Χαράλαμπο Θεοφανάκη για τη συνεισφορά του στο εργαστηριακό μέρος της εργασίας.
- Το συνάδελφο και συμφοιτητή μου Ράμι Ραουάσντε για τη σημαντική συμβολή του στην εφαρμογή των εργαστηριακών τεχνικών.
- Τις φίλες και συνεργάτιδες στην καθ' ημέρα πράξη: Αννέτα Σώζου, Μαρία Λιόση, Άννα Ραπάνη και Βάσω Παπαχριστοφή.
- Τις πολύ καλές μου φίλες Τζένη και Εύα για τη στήριξη και την αγάπη που απλόχερα μου προσέφεραν.
- Τον σύντροφό μου Χρήστο για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, τις συμβουλές που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που έδειχνε στις ικανότητές μου.
- Τη μητέρα μου Ενριέτα, τον πατέρα μου Γιώργο και τον αδελφό μου Νίκο γιατί χωρίς τη βοήθεια, υποστήριξη και αγάπη τους τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|-----------|
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 6 |
| 1. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ..... | 7 |
| 1.1 ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ..... | 7 |
| 1.2 ΤΑ ΕΣΩ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ..... | 8 |
| 1.2.1 Μήτρα..... | 8 |
| 1.2.2 Ωαγωγοί..... | 9 |
| 1.2.3 Ωοθήκες..... | 10 |
| 1.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ..... | 10 |
| 1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά..... | 10 |
| 1.3.2 Οιστρικός κύκλος και ορμονικός έλεγχος των σταδίων του..... | 11 |
| 1.4 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΑΡΞΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ..... | 14 |
| 1.4.1 Μεταφορά γαμετών και γονιμοποίηση..... | 14 |
| 1.4.2 Προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου..... | 19 |
| 1.4.3 Εμφύτευση του προ-εμβρύου και σχηματισμός κυλίνδρου..... | 21 |
| 2. Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ..... | 24 |
| 2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ CRH..... | 24 |
| 2.1.1 Γονίδιο και δομή της CRH..... | 24 |
| 2.1.2 Τοπολογία έκφρασης της CRH..... | 26 |
| 2.1.3 Η απόκριση στο στρες..... | 26 |
| 2.1.4 CRH, ΥΓΕ άξονας και στρες..... | 27 |
| 2.1.5 Ο ρόλος της CRH στη φλεγμονή..... | 28 |
| 2.1.6 Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων..... | 29 |
| 2.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ CRH..... | 30 |
| 2.2.1 Ο υποδοχέας τύπου I της CRH (CRH-R1)..... | 30 |
| 2.2.2 Ο υποδοχέας τύπου II της CRH (CRH-R2)..... | 32 |
| 2.2.3 Η CRH-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRF-binding protein, CRF-BP)..... | 33 |
| 2.2.4 Σηματοδότηση μέσω των CRFRs..... | 34 |
| 2.2.5 Ανταγωνιστές των CRFRs..... | 35 |
| 3. CRH ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ..... | 36 |
| 3.1 ΘΕΣΕΙΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ CRH..... | 36 |
| 3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΓΟΝΑΔΩΝ (ΥΥΓ)..... | 37 |
| 3.3 ΩΟΘΗΚΙΚΗ CRH..... | 38 |
| 3.4 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΚΗ CRH..... | 39 |
| 3.4.1 CRH και φθαρτοποίηση του ενδομητρίου..... | 39 |
| 3.4.2 CRH και εμφύτευση βλαστοκύστης..... | 41 |
| 3.4.3 CRH και διείσδυση τροφοβλάστης..... | 43 |
| 3.4.4 CRH και αγγειακή λειτουργία του ενδομητρίου..... | 44 |
| 3.4.5 CRH και μυομήτριο..... | 44 |
| 3.5 ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗ CRH..... | 45 |
| 3.5.1 Πλακουντιακή CRH και άξονας ΥΓΕ μητέρας και εμβρύου..... | 46 |
| 3.5.2 Πλακουντιακή CRH και τοκετός..... | 47 |

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 49

| | |
|---|-----------|
| 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 50 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 51 |
| 2.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ MUS MUSCULUS..... | 51 |
| 2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥΣ IN VITRO..... | 52 |
| 2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ | 53 |
| 2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA..... | 55 |
| 2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA) | 58 |
| 2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL-TIME PCR) | 61 |
| 2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ | 68 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 72 |
| 3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R1 | 72 |
| 3.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R2 | 75 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 77 |
| 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 81 |
| 6. SUMMARY | 83 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 85 |

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

1.1 ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η μελέτη της ανάπτυξης και της φυσιολογίας των θηλαστικών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι, εκτός των άλλων, αφορά άμεσα τον άνθρωπο ως θηλαστικό. Η ανάπτυξη και φυσιολογία των θηλαστικών έχει μελετηθεί κυρίως στο ποντίκι, ένα τρωκτικό, του οποίου ο τελευταίος κοινός πρόγονος με τον άνθρωπο έζησε πριν από περίπου 90 εκατομμύρια χρόνια. Εντούτοις, παρουσιάζει πολύ όμοια φυσιολογία με εκείνη του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό, και επιπλέον το σχετικά μικρό του μέγεθος, η γρήγορη ανάπτυξή του, ο μικρός κύκλος ζωής του, η δυνατότητά του να δίνει αρκετούς απογόνους σε σύντομο χρονικό διάστημα και το υψηλό ποσοστό ομολογίας του γονιδιώματός του με αυτό του ανθρώπου, καθιστούν το ποντίκι ένα άριστο πρότυπο μελέτης της φυσιολογίας και γενετικής του ανθρώπου. Με γενετικές μελέτες στο ποντίκι έχει ταυτοποιηθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και στην εκδήλωση πλήθους ανωμαλιών και ασθενειών, όπως διάφορες μορφές καρκίνου, ο διαβήτης, καρδιαγγειακά, νευροεκφυλιστικά και αυτοάνοσα νοσήματα.

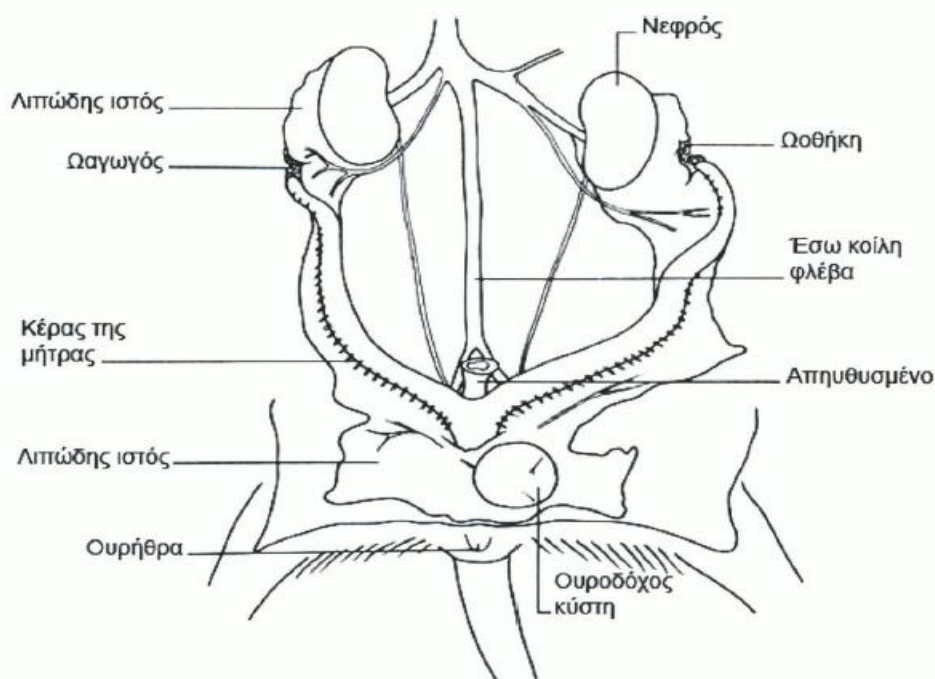
Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος του ποντικιού στην έρευνα για την ανθρώπινη αναπαραγωγή. Είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο για την μελέτη της φυσιολογίας της κύησης καθώς και ασθενειών που σχετίζονται με αυτήν, όπως η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR), η προεκλαμψία και ο διαβήτης κύησης. Σε αυτό έχει συμβάλει η εισαγωγή νέων, μη επεμβατικών διαγνωστικών τεχνικών που διευκολύνουν την απεικόνιση φυσιολογικών, αιμοδυναμικών και μεταβολικών χαρακτηριστικών, ακόμη και σε θηλαστικά μικρού μεγέθους. Παράλληλα, η συνεχής βελτίωση της διαχείρισης, της φροντίδας και των μεθόδων αναισθησίας των κυοφορούντων ποντικιών, μειώνει το φυσιολογικό τους στρες και παρέχει πιο αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα. Η γνώση μας πάνω στην αναπαραγωγική ιατρική αυξήθηκε ραγδαία και σε κυτταρικό, μοριακό και γενετικό επίπεδο. Με τη χρήση του ποντικιού ως μοντέλο, μελετήθηκαν η βιολογία του πλακούντα, η λειτουργία των ωοθηκών και η γονιμότητα, ο ρόλος των μη-κωδικών RNA στη γαμετογένεση, ο μεταβολισμός των ωαρίων και των εμβρύων, η γονιμοποίηση, η κρυσταλλοποίηση, οι οδοί μεταγωγής σήματος, η δυναμική της χρωματίνης, η επιγενετική, η αναπαραγωγική γήρανση και η φλεγμονή. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν

σε βελτίωση των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και έθεσαν τις βάσεις για ακόμα σημαντικότερες ανακαλύψεις στον τομέα αυτό μελλοντικά.

1.2 ΤΑ ΕΣΩ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ

ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

Στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ποντικών παρατηρείται δίκερος μήτρα, καθότι η συγκόλληση των πόρων του Muller γίνεται μόνο στα κατώτερα τμήματα. Κάθε ένα κέρασ καταλήγει σε ελικοειδή ωαγωγό, ο οποίος με τη σειρά του οδηγεί στην ωοθήκη (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1 Μετωπική τομή του αναπαραγωγικού συστήματος θηλυκού ποντικιού (Προσαρμοσμένο από Margaret J. Cook, *The Anatomy of the Laboratory Mouse*)

1.2.1 Μήτρα

Η μήτρα είναι το κοίλο μυώδες όργανο στο οποίο εμφυτεύεται το προ-έμβρυο και αναπτύσσεται μέχρι τον τοκετό. Στη μήτρα διακρίνονται από πάνω προς τα κάτω δύο κέρατα, το σώμα και ο τράχηλος ή αυχέννας. Το τοίχωμα της μήτρας αποτελείται από τρία στρώματα: τον έξω ορογόνο χιτώνα (περιμήτριο), το μεσαίο στρώμα (μυομήτριο) και το ενδομήτριο. Το περιμήτριο αποτελεί τη συνέχεια του περιτόναιου και βρίθκει από χαλαρό συνδετικό ιστό και λεμφαγγεία. Το μυομήτριο είναι ο μυϊκός χιτώνας της μήτρας και αποτελείται από δύο στιβάδες: την εξωτερική λεπτή στιβάδα

και την εσωτερική παχύτερη στιβάδα. Το ενδομήτριο, το οποίο επενδύει τη μητρική κοιλότητα, περιλαμβάνει τον βλεννογόνο χιτώνα της μήτρας. Ο βλεννογόνος, ο οποίος βρίσκεται σε στενή σχέση με το μυομήτριο, αποτελείται από το καλυπτικό επιθήλιο που είναι μονόστιβο κυλινδρικό και το χορίο, στο οποίο βρίσκονται οι μητριαίοι αδένες. Οι αδένες αυτοί εκκρίνουν κυρίως βλέννα και γλυκογόνο, που χρησιμεύει για τη θρέψη τους κυήματος στην αρχή της κύησης. Ο αριθμός των αδένων ελαττώνεται σταδιακά με κατεύθυνση από τα κέρατα της μήτρας προς το σώμα της¹.

Οι κυκλικές μεταβολές της μήτρας στη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, αφορούν κυρίως το ενδομήτριο. Κατά τη διάρκεια του οίστρου το ενδομήτριο παχύνεται, υπεραιμεί και εξοιδαίνεται, ενώ τα κύτταρα του επιθηλίου εμφανίζουν μεγάλη εκκριτική δραστηριότητα. Στη διάρκεια του μέτοιστρου οι μητριαίοι αδένες υπερπλάσσονται, επιμηκύνονται και γίνονται περισσότερο ελικοειδείς. Η εκκριτική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων συνεχίζεται ενώ η εξοίδηση του ενδομητρίου υποχωρεί. Στη φάση του δίοιστρου κορυφώνεται η υπερπλασία των μητριαίων αδένων. Σε περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση των ωαρίων, το ενδομήτριο συρρικνώνεται, οι μητριαίοι αδένες βραχύνονται και γίνονται ευθείς, η δε εκκριτική δραστηριότητα αναστέλλεται^{2,3}.

1.2.2 Ωαγωγοί

Πρόκειται για δύο μυώδεις ελικοειδείς σωλήνες, καθένας από τους οποίους φέρνει σε επαφή την αντίστοιχη ωοθήκη με τη μήτρα. Για περιγραφικούς λόγους στους ωαγωγούς διακρίνονται: α) το ωοθηκικό άκρο, που σχηματίζει τον κώδωνα, β) η λήκυθος (μοίρα του ωαγωγού προς την ωοθήκη) και γ) ο ισθμός (μοίρα του ωαγωγού προς το κέρα της μήτρας)¹. Το τοίχωμα του ωαγωγού αποτελείται από τρεις χιτώνες, οι οποίοι από έξω προς τα μέσα είναι ο ορογόνος, ο μυϊκός και ο βλεννογόνος χιτώνας. Ο ορογόνος χιτώνας βρίσκεται γύρω από τον ωαγωγό, συνδέεται δε με το μυϊκό χιτώνα με στοιβάδα αραιού συνδετικού ιστού και φέρει αγγεία και λείες μυϊκές ίνες. Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από κυκλοτερείς και επιμήκειες λείες μυϊκές ίνες. Ο βλεννογόνος επενδύεται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο που αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων: α) κροσσωτά και β) εκκριτικά κύτταρα. Η αριθμητική σχέση κροσσωτών και εκκριτικών κυττάρων μεταβάλλεται ανάλογα με τον κύκλο και βρίσκεται υπό τον ορμονικό έλεγχο των ωοθηκών⁴.

1.2.3 Ωοθήκες

Οι ωοθήκες των ενηλίκων ποντικών αποτελούνται εξωτερικά από το επιπολής ή βλαστικό επιθήλιο και εσωτερικά από τη φλοιώδη και μυελώδη μοίρα. Μεταξύ του επιπολής επιθηλίου και της φλοιώδους μοίρας παρεμβάλλεται στοιβάδα ακανόνιστου πυκνού συνδετικού ιστού, ο ινώδης χιτώνας. Το επιπολής επιθήλιο προέρχεται από το επιθήλιο του σπλαχνικού κοιλώματος του εμβρύου και με την ηλικία διαφοροποιείται από πλακώδες σε κυβοειδές. Η φλοιώδης μοίρα της ωοθήκης αποτελείται από συνδετικό στρώμα, με πολυπληθή ατρακτοειδή συνδετικά κύτταρα, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται δικτυωτές ίνες. Ανάμεσα στα κύτταρα του στρώματος αναπτύσσονται ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια εξέλιξης: αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή ωοθυλάκια, ώριμα ωοθυλάκια, ωχρά σωματίδια και λευκά σωματίδια. Η μυελώδης μοίρα της ωοθήκης αποτελείται και αυτή από συνδετικό στρώμα, που σταδιακά μεταπίπτει σε ινοελαστικό ιστό, όπου περιέχονται τα μείζονα στελέχη των αγγείων και των νεύρων της ωοθήκης, λείες μυϊκές ίνες και μερικά πολυεδρικά ηωσινόφιλα κύτταρα⁴.

1.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΘΗΛΥΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Στο θηλυκό ποντίκι η ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος ολοκληρώνεται μεταξύ της 6^{ης} και 8^{ης} εβδομάδας ζωής του⁵. Ο οίστρος παρουσιάζεται για πρώτη φορά στην ηλικία των 40-65 ημερών. Ένας οιστρικός κύκλος διαρκεί 4-5 ημέρες. Η κυοφορία των ζώων διαρκεί 19-21 ημέρες το δε μέγεθος της τοκετομάδος ποικίλλει από 3 έως 12 νεογνά. Οι μητέρες μετά τον τοκετό εκδηλώνουν πολύ σύντομα οίστρο (συνήθως 12 έως 18 ώρες αργότερα). Η αναπαραγωγική ικανότητα του θηλυκού ποντικίου σταματά την 450^η – 550^η ημέρα. Από το δέκατο μήνα της ηλικίας τους αρκετά θηλυκά παρουσιάζουν διαταραχές του οιστρικού κύκλου. Οι διαταραχές αυτές αφορούν κυρίως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δύο συνεχόμενων κύκλων, οφείλονται δε στην παρατεταμένη έκκριση οιστρογόνων, καθώς και στην καθυστέρηση ωοθυλακιωρρηξίας.

1.3.2 Οιστρικός κύκλος και ορμονικός έλεγχος των σταδίων του

Ο οιστρικός κύκλος αποτελεί την έκφραση της αλληλεπίδρασης του κεντρικού νευρικού συστήματος με ορμόνες του υποθαλάμου (GnRH), του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης (FSH και LH) και των ωοθηκών (στεροειδείς ορμόνες), εκδηλώνεται δε με διαδοχικές φυσιολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στα ενήλικα θηλυκά ζώα, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ο οιστρικός κύκλος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, καθένα από τα οποία διαρκεί περίπου 24 ώρες.

Πρόοιτρος

Αποτελεί το στάδιο εκείνο του οιστρικού κύκλου, στη διάρκεια του οποίου πραγματοποιείται η ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων, υπό την επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH)². Η αύξηση των συγκεντρώσεων της FSH και της LH στο πλάσμα παρατηρείται 15 έως 18 ώρες από την έναρξη του πρόοιστρου. Η αύξηση αυτή είναι άμεσα εξαρτημένη από τη δράση της γοναδοτρόπου εκλυτικής ορμόνης του υποθαλάμου (GnRH) στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο γίνεται με τη μορφή ρυθμικών ώσεων, που μεταδίδονται μάλιστα και στο ρυθμό έκκρισης των γοναδοτροπινών.

Η FSH δρώντας στα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου προκαλεί την ενεργοποίηση ενζυμικού συστήματος υπεύθυνου για την αρωματοποίηση των ανδρογόνων, που εκκρίνονται από τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου, και τη μετατροπή τους σε οιστρογόνα⁶. Επιπλέον συμβάλλει στην αύξηση των υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα προκειμένου να διασφαλιστεί η λειτουργία του ωχρού σωματίου που σχηματίζεται αργότερα, ενώ παίζει ρόλο και στην αποκόλληση του ωαρίου με τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν, από την υπόλοιπη μάζα των κοκκωδών κυττάρων του ωοθυλακίου^{7,8}.

Η LH προκαλεί την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου, ενώ συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και των προσταγλανδινών, καθώς και την ενεργοποίηση του πρωτεολυτικού συστήματος του ωοθυλακικού υγρού, συμβάλλοντας έτσι στη ρήξη του ωοθυλακίου⁹.

Η συνδυασμένη δράση των γοναδοτροπινών στα κύτταρα του ωοθυλακίου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των οιστρογόνων. Τα παραγόμενα οιστρογόνα και κυρίως η 17β-οιστραδιόλη, δρουν ως ισχυροί μιτωτικοί παράγοντες, προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, την αύξηση των υποδοχέων της FSH, εντονότερη αρωματοποίηση των ανδρογόνων και τελικά αύξηση

της συγκέντρωσής τους¹⁰. Κατά τον τρόπο αυτό, οι τιμές της οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ των σταδίων του δίοιστρου και του πρόοιστρου αυξάνονται για να φτάσουν στη μέγιστη συγκέντρωσή τους λίγο πριν την έκκριση του «κύματος» της LH. Η αύξηση της συγκέντρωσης των οιστρογόνων πυροδοτεί την έναρξη του "εκκριτικού κύματος" της LH μέσω του μηχανισμού θετικής παλίνδρομης ρύθμισης με αύξηση των υποδοχέων GnRH στην υπόφυση και ευαισθητοποίηση της στην αυξημένη έκλυση γοναδοτρόπων ορμονών, ενώ ασκεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στην έκλυση της FSH¹¹.

Σε αντίθεση με την οιστραδιόλη, η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο πλάσμα μειώνεται, ακολουθώντας την κενотоπιώδη εκφύλιση του ωχρού σωματίου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού του οιστρικού κύκλου, η προγεστερόνη εκκρίνεται τόσο από την ωοθήκη όσο και από τα επινεφρίδια σε αναλογία 1:1. Η μείωση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης των γοναδοτρόπων ορμονών και κυρίως της LH, λόγω αναστολής της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που ασκεί στον άξονα υπαθαλάμου-υπόφυσης. Σημαντική αύξηση της προγεστερόνης σημειώνεται 17 ώρες μετά την έναρξη του πρόοιστρου. Η αύξηση αυτή οφείλεται στη δράση της LH στα κοκκώδη κύτταρα επηρεάζει δε τη θετική παλίνδρομη δράση των οιστρογόνων στην LH⁹.

Οίστρος

Στο στάδιο αυτό του οιστρικού κύκλου ολοκληρώνεται η ωρίμανση των ωοθυλακίων και πραγματοποιούνται οι ωοθυλακιορρηξίες, κατά τη διάρκεια του σκότους, 10-12 ώρες μετά την έκκριση της μέγιστης τιμής της LH. Στο διάστημα αυτό το θηλυκό ζώο δέχεται την επίβασή του από το αρσενικό εκδηλώνοντας συγκεκριμένη συμπεριφορά¹².

Η ωοθυλακιορρηξία είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης αλληλεπίδρασης των γοναδοτροπινών, των στεροειδών ορμονών, των προσταγλανδινών, καθώς και των πρωτεολυτικών ενζύμων. Ενεργοποιείται 18 περίπου ώρες μετά την έναρξη του πρόοιστρου μετά την εκδήλωση της αυξημένης τιμής της LH και πραγματοποιείται τις πρώτες πρωινές ώρες της ημέρας του οίστρου.

Το πρωί του σταδίου του οίστρου σημειώνεται δεύτερη αύξηση της συγκέντρωσης της FSH, μεγαλύτερη από αυτή που σημειώνεται στη διάρκεια του πρόοιστρου, και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της LH, της προγεστερόνης και της ινχιμπίνης¹³. Η συγκέντρωση της LH στο πλάσμα, 8 ώρες μετά την έναρξη του οίστρου, βρίσκεται στα κατώτερα επίπεδα. Χαμηλή είναι και η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο

πλάσμα όπου φτάνει στις μικρότερες τιμές της στη μέση περίπου του σταδίου του οίστρου. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης αρχίζει να αυξάνεται από το μέσο περίπου του οίστρου, παραγόμενη από τα κοκκώδη κύτταρα του ρηχθέντος ωοθυλακίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης αναστέλλει την έκλυση της LH, μέσω του μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης³.

Μέτοιστρος

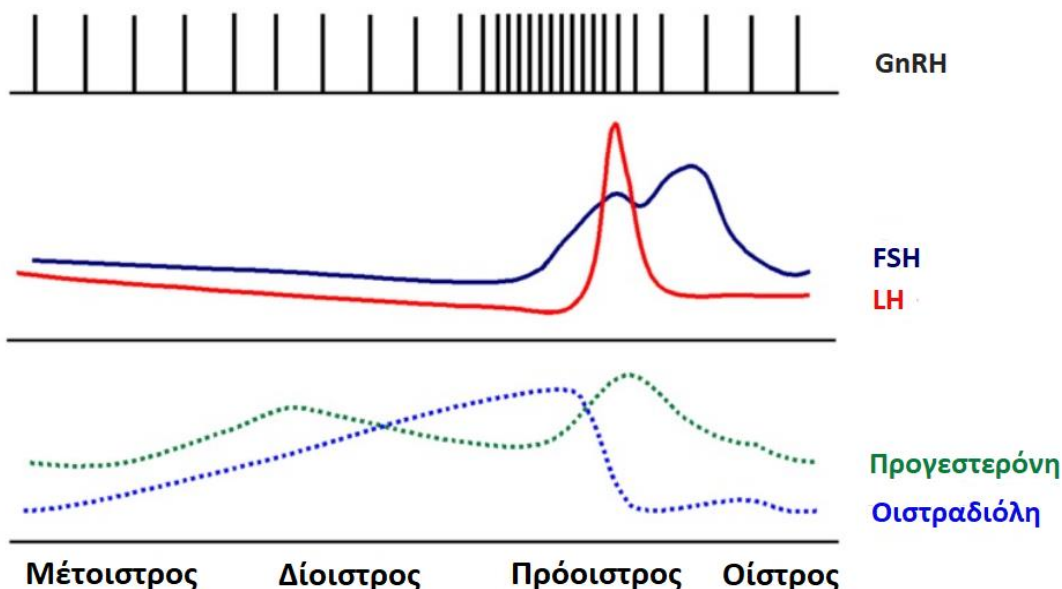
Ακολουθεί το στάδιο του οίστρου και κατά τη διάρκειά του λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των ωχρών σωματίων. Πρόκειται για μικρούς αδένες που αναπτύσσονται αμέσως μετά τη ρήξη των ωοθυλακίων και οι οποίοι σαν κύρια λειτουργία έχουν την έκκριση της προγεστερόνης. Μετά το προωθυλακιόρρηκτικό κύμα της LH ενεργοποιείται η διαδικασία διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων των ωοθυλακίων σε ωχρινικά. Η διαφοροποίηση αυτή περιλαμβάνει αύξηση της διαμέτρου των κυττάρων, αύξηση της αναλογίας κυτοπλάσματος-πυρήνα και εμφάνιση σταγονιδίων λιπιδίων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή προγεστερόνης¹⁴.

Κατά τη διάρκεια του μέτοιστρου, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης εξακολουθεί να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, ενώ αργότερα αρχίζει προοδευτικά να αυξάνεται. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης εξακολουθεί να αυξάνεται, ενώ 17 ώρες από την έναρξη του μέτοιστρου έως 5 ώρες μετά την έναρξη του διοίστρου, εμφανίζει τη μέγιστη τιμή της¹⁵. Η συγκέντρωση της FSH εμφανίζεται μειωμένη στη διάρκεια του μέτοιστρου, ενώ η LH είναι σε χαμηλά, αλλά επαρκή για τη λειτουργία του ωχρού σωματίου, επίπεδα.

Δίοιστρος

Αποτελεί το στάδιο της αναπαραγωγικής ηρεμίας. Τα ωχρά σωματία βρίσκονται σε πλήρη ανάπτυξη, ενώ η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο αίμα διατηρείται σε ψηλά επίπεδα μέχρι 5 ώρες μετά την έναρξη του πρόοιστρου, οπότε αρχίζει να μειώνεται ακολουθώντας την εκφύλιση και τη μετατροπή των ωχρών σωματίων σε ουλώδη ιστό, τα λευκά σωματία. Σε περίπτωση κυοφορίας το ωχρό σωματίο παραμένει σε λειτουργία υπό την επίδραση της χοριακής γοναδοτροπίνης, οπότε συνεχίζεται η παραγωγή της προγεστερόνης, μιας ορμόνης απαραίτητης για τη διατήρηση της κυοφορίας. Μείωση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης αναστέλλει την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας των εκκριτικών ώσεων της GnRH και τη σταδιακή αύξηση των γοναδοτροπινών¹⁶.

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης αρχίζει να αυξάνεται από το τελευταίο τρίτο του διοίστρου¹⁵. Αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της σταδιακής αύξησης των γοναδοτροπινών (FSH, LH), μέσω του μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης.



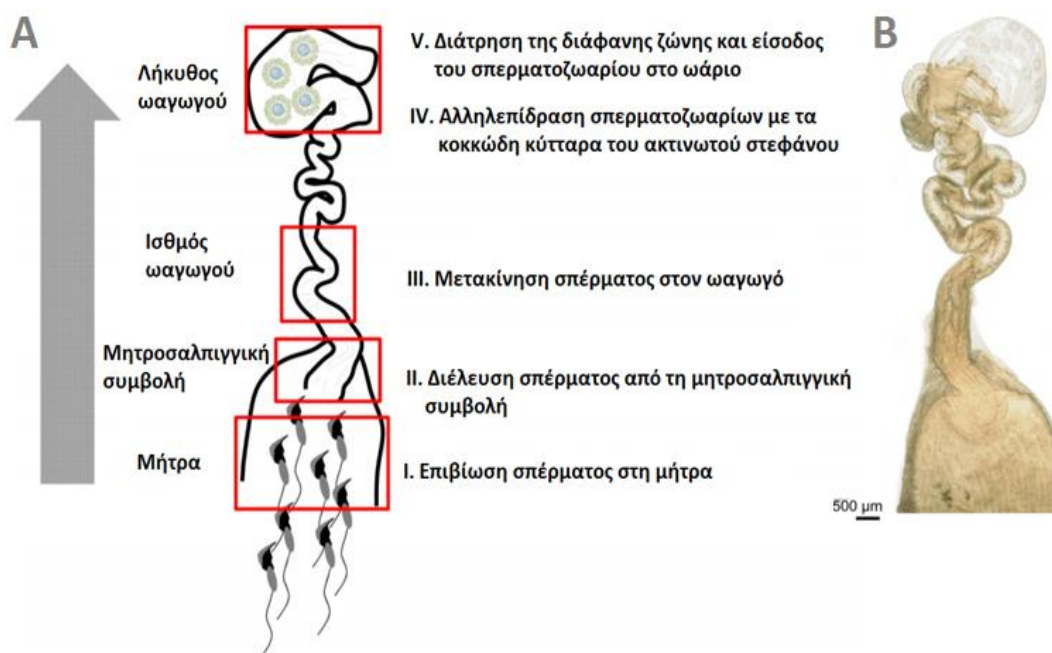
Εικόνα 2 Διάγραμμα ορμονικού προφίλ για κάθε στάδιο του οιστρικού κύκλου

1.4 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΑΡΞΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

1.4.1 Μεταφορά γαμετών και γονιμοποίηση

Ως γονιμοποίηση ορίζεται η συνένωση δύο ώριμων ετερόφυλων γεννητικών κυττάρων που καταλήγει στο σχηματισμό ζυγωτού. Η μελέτη της γονιμοποίησης στα θηλαστικά είναι ιδιαίτερα δύσκολη διότι η σύντηξη των γαμετών γίνεται μέσα στο σώμα του θηλυκού. Από τα πρώτα όμως *in vitro* πειράματα, διαπιστώθηκε ότι τα τα σπερματοζώαρια είναι αδύνατο να διαπεράσουν τις προστατευτικές μεμβράνες του ωαρίου και να το γονιμοποιήσουν. Την ικανότητα αυτή την αποκτούν μόνο κατά την παραμονή τους για κάποιο χρονικό διάστημα εντός της αναπαραγωγικής οδού του θηλυκού. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ενεργοποίηση και καθιστά τα σπερματοζώαρια ικανά να διατρήσουν τη διάφανη ζώνη του ωαρίου και να εισχωρήσουν μέσα σε αυτό¹⁷.

Οι κυριότεροι φραγμοί που καλούνται να υπερνικήσουν τα σπερματοζωάρια αφότου εισέλθουν στην αναπαραγωγική οδό του θηλυκού, έτσι ώστε να επιτευχθεί γονιμοποίηση, είναι το περιβάλλον της μήτρας, η μητροσαλπγγική συμβολή, το περιβάλλον των ωαγωγών, ο ακτινωτός στέφανος (κυτταρικός φραγμός προστασίας) και η διάφανη ζώνη (ακυτταρικός φραγμός προστασίας) του ωοκυττάρου (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3 Επισκόπηση της πορείας του σπέρματος εντός του αναπαραγωγικού συστήματος θηλυκού ποντικού (Προσαρμοσμένο από Yoshitaka Fujihara, et al., *Exp. Anim.* 67(2), 91–104, 2018)

Λίγο πριν και κατά τη διάρκεια του οίστρου στον οιστρικό κύκλο το θηλυκό ποντίκι απελευθερώνει χημικά σήματα που ονομάζονται φερομόνες. Σαν συμπεριφορική αντίδραση στις φερομόνες αυτές, το αρσενικό ζευγαρώνει με το θηλυκό απελευθερώνοντας εκατομμύρια σπερματοζωάρια στο αναπαραγωγικό του σύστημα. Τα σπερματοζωάρια κολυμπούν από τον κόλπο στη μήτρα και από εκεί στους ωαγωγούς. Το σπερματικό πλάσμα προστατεύει τα σπερματοζωάρια από πιθανή οξείδωση και παρέχει μια ρυθμιστική επίδραση για την εξουδετέρωση του εχθρικού, όξινου περιβάλλοντος της μήτρας. Επιπλέον, διάφορες πρωτεΐνες που περιέχονται στο σπερματικό πλάσμα, διευκολύνουν τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων προς τους ωαγωγούς μέσω της διέγερσης της τοπικής μυϊκής δραστηριότητας, ενώ παράλληλα ορισμένα ένζυμα ενθαρρύνουν την κινητικότητά τους.

Τα σπερματοζωάρια που καταφέρνουν να επιβιώσουν στη μήτρα, φτάνουν στη μητροσαλπγγική συμβολή, στο σημείο δηλαδή που η μήτρα συνδέεται με τον ωαγωγό. Η μητροσαλπγγική συμβολή είναι ιδιαίτερος στενή στα ποντίκια, δημιουργώντας έναν ανατομικό φραγμό, ο οποίος μειώνει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που θα φτάσουν τελικά στους ωαγωγούς (περίπου 100 σπερματοζωάρια). Η καλή μορφολογία και κινητικότητα των σπερματοζωαρίων δεν επαρκεί για περάσουν από το φραγμό αυτό. Έρευνες καταδεικνύουν ότι επιπλέον παράγοντες, όπως για παράδειγμα επιφανειακές πρωτεΐνες του σπέρματος, απαιτούνται ώστε να αλληλεπιδράσουν με τη μητροσαλπγγική συμβολή και να επιτρέψουν τη διέλευση¹⁹.

Καθώς το σπερματοζωάριο περνά τη μητροσαλπγγική συμβολή και εισέρχεται στον ισθμό του ωαγωγού, προσκολλάται στο επιθήλιο του ισθμού και παραμένει εκεί ως τη στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας, δημιουργώντας έτσι μια δεξαμενή σπερματοζωαρίων. Αυτή η δέσμευση των σπερματοζωαρίων είναι σημαντική τόσο για τη διατήρηση της βιωσιμότητάς τους, όσο και για την παρεμπόδιση της πρόωρης ενεργοποίησής τους, η οποία θα έπλητε ή ακόμη και θα απέτρεπε τη γονιμοποίηση. Επιπλέον, αυτή η αποθήκευση σπέρματος προλαμβάνει μια κατάσταση πολυσπερμίας, επιτρέποντας σε λίγα μόνο σπερματοζωάρια κάθε φορά να φτάσουν στη λήκυθο και στο ωάριο. Ο ωαγωγός παρέχει ένα «καταφύγιο» για το σπέρμα, καθώς το περιβάλλον του είναι περισσότερο φιλικό σε σχέση με αυτό του κόλπου και της μήτρας^{19,20}. Η απελευθέρωση του σπέρματος από τη δεξαμενή του ισθμού, φαίνεται να διαμεσολαβείται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν σήματα που προέρχονται από το σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων-ωοκυττάρου, συστατικά των ωαγωγών που τροποποιούν την ικανότητα πρόσδεσης του σπέρματος, αλλαγές στα επίπεδα προγεστερόνης και οιστραδιόλης, καθώς και την "ενεργοποίηση" και "υπερενεργοποίηση" των σπερματοζωαρίων. Η "ενεργοποίηση" χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή απομάκρυνση ή/και διαφοροποίηση ουσιών που έχουν προσροφηθεί ή ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Οι μεταβολές αυτές επιτρέπουν ενδοκυττάρια εισροή ιόντων ασβεστίου, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της αντίδρασης του ακροσώματος, και παράλληλα ευθύνονται για την τροποποίηση της κίνησης του μαστιγίου τους, διαδικασία που είναι γνωστή ως "υπερενεργοποίηση".

Τα σπερματοζωάρια που απελευθερώνονται από τον ισθμό του ωαγωγού κινούνται προς το ωάριο, το οποίο μετά την ωοθυλακιορρηξία παραλαμβάνεται από

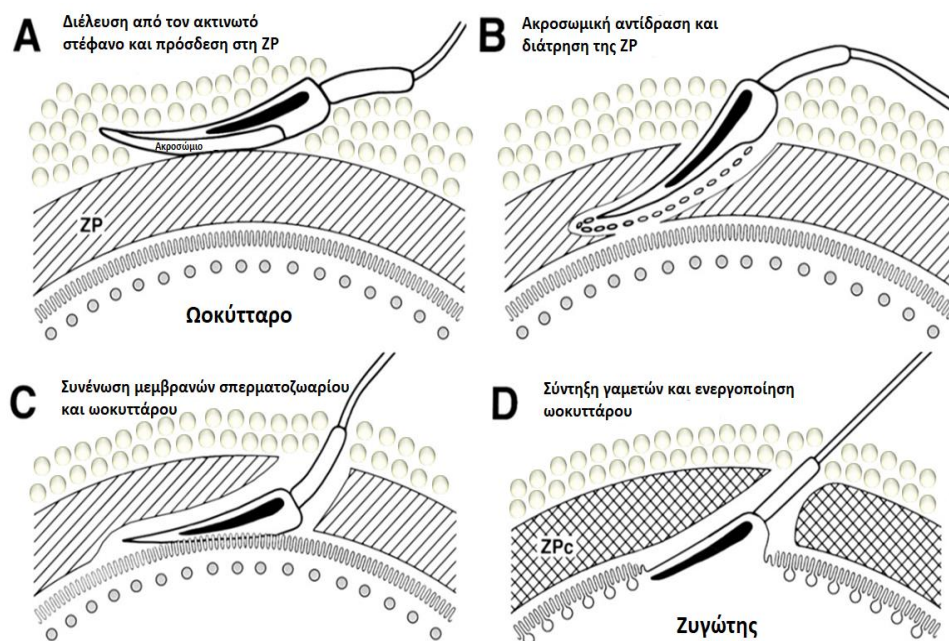
τους κροσσούς του ωαγωγού και παραμένει στη λήκυθο. Η κίνησή τους οφείλεται σε χημειοτακτικά και θερμοτακτικά ερεθίσματα. Ο πρώτος φραγμός που συναντούν τα σπερματοζωάρια όταν πλησιάσουν το ωάριο είναι ο ακτινωτός στέφανος, τα θυλακιακά κύτταρα, δηλαδή, που κατά την ωοθυλακιορρηξία έφυγαν μαζί με το ωάριο. Η διέλευση των σπερματοζωαρίων δια μέσου των κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου οφείλεται στη συνδυασμένη δράση των ενζύμων που απελευθερώνονται κατά την ακροσωμική αντίδραση του σπερματοζωαρίου και εκείνων που προέρχονται από το βλεννογόνο του ωαγωγού.

Το δεύτερο στάδιο της γονιμοποίησης είναι η διέλευση του σπερματοζωαρίου δια μέσου της διαφανούς ζώνης (zona pellucida), που αποτελεί τον δεύτερο (ακυτταρικό) φραγμό προστασίας του ωοκυττάρου. Ένα από τα σπερματοζωάρια, με το ακροσώμιό του, αναγνωρίζει τη διάφανη ζώνη και ενώνεται με αυτή μέσω των υποδοχέων της, που ευαισθητοποιούνται και είναι εξειδικευμένοι σε κάθε ζωικό είδος. Η αναγνώριση της διαφανούς ζώνης από το σπερματοζωάριο γίνεται από ειδικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, που είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την προσκόλλησή τους στο ωοκύτταρο. Η διάτρηση της διαφανούς ζώνης γίνεται από το ακροσώμιο του σπερματοζωαρίου και αφού έχει ενεργοποιηθεί η ακροσωμική αντίδραση, δηλαδή η απελευθέρωση εξειδικευμένων ενζύμων του ακροσώματος (ακροσίνης, υαλουρονιδάσης, πρωτεασών), τα οποία καταστρέφουν τη διάφανη ζώνη. Η λύση της διαφανούς ζώνης και η υπερκινητικότητα που αποκτά το σπερματοζωάριο κατά την ακροσωμική αντίδραση αποτελούν τις δύο προϋποθέσεις για την είσοδό του στο ωάριο. Μετά τη διέλευση της διαφανούς ζώνης από αυτό το ένα σπερματοζωάριο, επέρχεται απώλεια της ευαισθησίας των υποδοχέων της και αλλαγή της δομής της με αποτέλεσμα να αρχίσει να γίνεται αδιαπέραστη από άλλα σπερματοζωάρια, αποτρέποντας την πολυσπερμία.

Το τρίτο στάδιο της γονιμοποίησης είναι η συνένωση των κυτταρικών μεμβρανών του σπερματοζωαρίου και του ωοκυττάρου που πραγματοποιείται σε καθορισμένες θέσεις του σπερματοζωαρίου με τη βοήθεια ουσιών, όπως η φμπρονεκτίνη.

Ακολουθεί το τέταρτο στάδιο κατά το οποίο πραγματοποιείται η είσοδος ολόκληρου του σπερματοζωαρίου μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου, αφού το σπερματοζωάριο εγκαταλείψει την κυτταρική του μεμβράνη στην επιφάνεια του ωοκυττάρου. Η συνένωση των δύο γαμετών αποτελεί την αρχή μιας αλληλουχίας φαινομένων που είναι:

- Η αντίδραση του φλοιού του ωοκυττάρου: Η συνένωση των γαμετών προκαλεί απελευθέρωση Ca^{2+} , που συνεπάγεται απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων από κοκκία του φλοιού του ωοκυττάρου με τελικό αποτέλεσμα την τροποποίηση της μοριακής δομής της διαφανούς ζώνης, που γίνεται πλήρως αδιαπέραστη στα υπεράριθμα σπερματοζώαρια.
- Η ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης του ωοκυττάρου: Λίγο μετά την είσοδο της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, ολοκληρώνεται στο ωοκύτταρο η δεύτερη μειωτική διαίρεση που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων διαφορετικού μεγέθους, από τα οποία το ένα διατηρεί σχεδόν το σύνολο του κυτταροπλάσματος του ωοκυττάρου και υλικό του πυρήνα και είναι το ώριμο ωάριο, ενώ το δεύτερο θυγατρικό κύτταρο λαμβάνει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και το υλικό του πυρήνα και είναι το δεύτερο πολικό σωματίο.
- Ο σχηματισμός των προπυρήνων: Ο σχηματισμός των προπυρήνων αρχίζει να εμφανίζεται με τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου. Ο άρρην προπυρήνας (με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων) έρχεται σε επαφή με τον θήλυ προπυρήνα (με επίσης απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων) και η ουρά του σπερματοζωαρίου αποκόπτεται και εκφυλίζεται. Ο πυρήνας που προέρχεται από τη συνένωση των δύο προπυρήνων περιέχει διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (40 χρωμοσώματα στο ποντίκι) από τα οποία τα μισά προέρχονται από το ωάριο και τα άλλα μισά από το σπερματοζώαριο.



Εικόνα 4 Τα στάδια γονιμοποίησης (Προσαρμοσμένο από William J. Snell, et. al., Cell, Vol. 85, 629–637, May 31, 1996)

1.4.2 Προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου

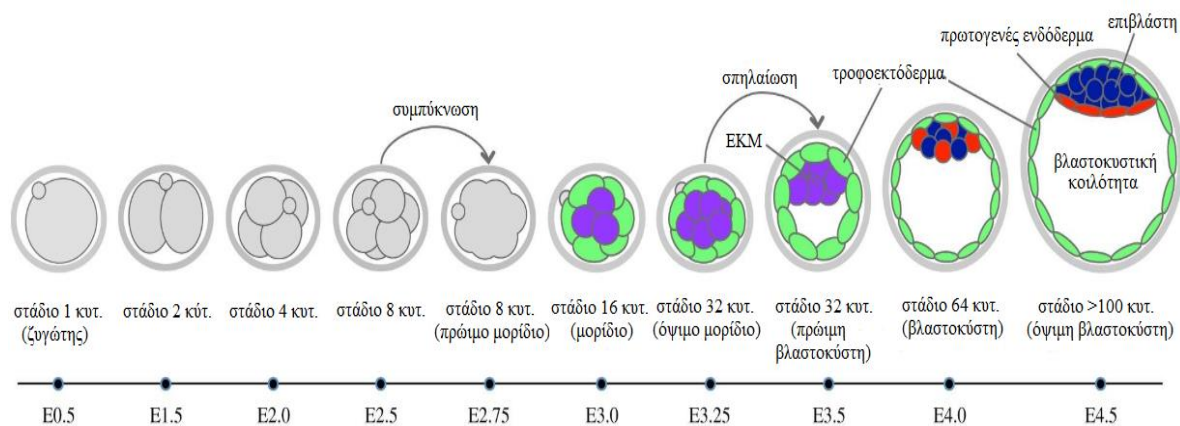
Η γονιμοποίηση στα θηλαστικά, η σύντηξη του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου, δημιουργεί το ζυγώτη, το πρώτο κύτταρο από το οποίο θα προέλθει ολόκληρος ο οργανισμός. Ο ζυγώτης χαρακτηρίζεται ως ολοδύναμο κύτταρο, δηλαδή κύτταρο που μπορεί να δώσει γένεση σε όλους τους εξωεμβρυϊκούς και εμβρυϊκούς ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου, που θα σχηματίσουν τελικά ολόκληρο τον οργανισμό. Ο ζυγώτης είναι ένα κύτταρο με πυρήνα πατρικής και μητρικής προέλευσης και κυτταρόπλασμα μητρικής προέλευσης. Το γονιδίωμά του παραμένει ανενεργό και η πρωτεϊνοσύνθεσή του κατευθύνεται από mRNA που έχουν μεταγραφεί κατά την ωογένεση. Πρόκειται δηλαδή για κύτταρο μητρικής επίδρασης αφού τα χαρακτηριστικά του εξαρτώνται αποκλειστικά από το γονότυπο της μητέρας και όχι από τον εμβρυϊκό γονότυπο. Το εμβρυϊκό γονιδίωμα αρχίζει να εκφράζεται στο στάδιο των δύο κυττάρων.

Μετά τη γονιμοποίηση λαμβάνουν χώρα αλληπάλληλες κυτταρικές αυλακώσεις, ένας ιδιαίτερος τύπος κυτταρικής διαίρεσης που δε συνοδεύεται από κυτταρική αύξηση οπότε τα θυγατρικά κύτταρα είναι μικρότερα από τα μητρικά. Η αυλάκωση διαρκεί λιγότερο στον ποντικό και γενικότερα στα έμβρυα των θηλαστικών καθώς πρόκειται για έμβρυα, όπως και αυτά των ερπετών και των πτηνών, που διαθέτουν κάποια πηγή θρέψης, σε αντίθεση με έμβρυα άλλων ειδών που είναι ελεύθερα, χωρίς εξωκυττάρια λέκιθο, και στα οποία η αυλάκωση διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ο ρυθμός της πρώιμης ανάπτυξης των θηλαστικών χαρακτηρίζεται αργός σε σύγκριση με άλλους ζωικούς οργανισμούς. Η πρώτη αυλάκωση, 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, ακολουθείται ανά 12 ώρες από τις δύο επόμενες ασύγχρονες αυλακώσεις σε διαφορετικά επίπεδα του χώρου - ισημερινό και μεσημβρινό - δημιουργώντας πρότυπο περιστροφικής αυλάκωσης. Μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων τα μεγάλα θυγατρικά κύτταρα των αυλακώσεων, τα βλαστομερίδια, παρουσιάζουν ευδιάκριτο σχήμα. Στη συνέχεια όμως παρατηρείται συμπίεσή τους με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των διακυτταρικών τους επαφών. Το φαινόμενο αυτό καλείται συμπίκνωση. Σημαντικός για τη σύμπτυξη είναι και ο σχηματισμός χασμοσυνδέσμων στο στάδιο αυτό, οι οποίοι επιτρέπουν τη διάχυση ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους σε ολόκληρο το προ-έμβρυο.

Από τη συμπίκνωση μέχρι το στάδιο των 32 κυττάρων το προ-έμβρυο καλείται μορίδιο. Κατά την περίοδο αυτή σχηματίζονται δεσμοσώματα και στενοσύνδεσμοι

που δημιουργούν έναν αδιαπέραστο φραγμό ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό του προ-εμβρύου. Διαδοχικά κύματα ασύμμετρων διαιρέσεων που ξεκινούν από το στάδιο των 8 κυττάρων επιφέρουν την πρώτη διαφοροποίηση στην επιλογή πεπρωμένου από τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται εσωτερικά του προ-εμβρύου θα δώσουν την Εσωτερική Κυτταρική Μάζα της βλαστοκύστης, ενώ τα εξωτερικά θα δώσουν τον πρώτο εξωεμβρυϊκό ιστό, το τροφοεκτόδερμα, από το οποίο θα προκύψει στη συνέχεια ο πλακούντας. Στο εσωτερικό του προ-εμβρύου αρχίζει σταδιακά να σχηματίζεται το βλαστοκόιλο, μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό, και ολοκληρώνεται περίπου στις 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (E3), και ενώ το προ-έμβρυο κατέρχεται από τον ωαγωγό προς τη μήτρα. Ο σχηματισμός του βλαστοκόιλου σηματοδοτεί την έναρξη του σταδίου της βλαστοκύστης στις 3,5 ημέρες (E3,5) μετά τη γονιμοποίηση. Η βλαστοκύστη αποτελείται από μια στιβάδα μεγάλων τροφοεκτοδερμικών κυττάρων (TK) με επιθηλιακή μορφολογία που βρίσκονται εξωτερικά και περιβάλλουν ένα συσσωμάτωμα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων. Το τελευταίο ονομάζεται Εσωτερική Κυτταρική Μάζα - ΕΚΜ . Στο στάδιο της βλαστοκύστης το προ-έμβρυο περιλαμβάνει 64 κύτταρα, εκ των οποίων το ένα τέταρτο μόνο εντοπίζεται στην ΕΚΜ και τα υπόλοιπα στο τροφοεκτόδερμα.



Εικόνα 5 Η πορεία της πρώιμης ανάπτυξης από τη γονιμοποίηση μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης στο ποντίκι

Το τροφοεκτόδερμα συνιστά ιστό εξωεμβρυϊκό. Τα κύτταρα της ΕΚΜ είναι κύτταρα πλειοδύναμα. Αυτό σημαίνει ότι διαθέτουν το αναπτυξιακό δυναμικό να δώσουν γένεση σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Δεν μπορούν όμως να δώσουν τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς.

Τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος και της ΕΚΜ εκτελούν ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης με χρονική αφετηρία τις E3,5. Η διαφοροποίηση είναι η προοδευτική διαδικασία απόκτησης των εξειδικευμένων δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του κυττάρου. Έτσι, τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος που εφάπτονται με την ΕΚΜ σχηματίζουν το πολικό τροφοεκτόδερμα (ΠΤ), ενώ από τα υπόλοιπα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα αναπτύσσεται το τοιχωματικό τροφοεκτόδερμα (ΤΤ). Τα κύτταρα του πολικού τροφοεκτοδέρματος αναπτύσσονται κανονικά, ενώ αυτά του τοιχωματικού διπλασιάζουν το DNA τους χωρίς να διαιρούνται, με αποτέλεσμα να μετασχηματίζονται σε γιγάντια πολυπλοειδή κύτταρα. Ταυτόχρονα, τα εξωτερικά κύτταρα της ΕΚΜ που βρίσκονται προς την πλευρά του βλαστοκόιλου διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας μια στιβδα πρωτογενούς ενδοδέρματος. Το πρωτογενές ενδόδερμα (ΠΕ), είναι εξωεμβρυϊκός ιστός και δε συμβάλλει στη μετέπειτα συγκρότηση του εμβρυϊκού οριστικού ενδοδέρματος. Την ίδια στιγμή τα υπόλοιπα κύτταρα της ΕΚΜ πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και διαφοροποιούνται σε έναν, επίσης πλειοδύναμο, κυτταρικό πληθυσμό, το πρωτογενές εξώδερμα ή αλλιώς επιβλάστη. Η επιβλάστη, σχηματισμένη και τοποθετημένη άνωθεν του πρωτογενούς ενδοδέρματος μια ημέρα μετά το σχηματισμό της, ύστερης πια, βλαστοκύστης, γύρω στις E4,5, αποτελεί χρονικά τον τελευταίο πλειοδύναμο κυτταρικό πληθυσμό του αναπτυσσόμενου προ-εμβρύου, διακριτό όμως αναπτυξιακά, λειτουργικά και μοριακά από τα βλαστομερίδια και τα κύτταρα της ΕΚΜ. Από την επιβλάστη θα προέλθει ολόκληρο το έμβryo. Στις E4,5 τοποθετείται και η εμφύτευση του προ-εμβρύου.

Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του προ-εμβρύου, από τη γονιμοποίηση έως τη βλαστοκύστη, το κύημα παραμένει εγκλεισμένο στη διαφανή ζώνη. Η διαφανής ζώνη έχει πιθανόν δύο σημαντικές λειτουργίες, Πρωταρχικά, παρεμποδίζει τη διάσπαση της συνοχής των βλαστομεριδίων κατά τη διάρκεια των πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων, πριν δηλαδή τη συνένωση και τη δημιουργία του μοριδίου. Η διαφανής ζώνη πιθανόν επίσης να παρεμποδίζει τη συνένωση δύο διαφορετικών γενετικά κυνημάτων, που θα είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός χμαιρικού εμβρύου.

1.4.3 Εμφύτευση του προ-εμβρύου και σχηματισμός κυλίνδρου

Μετά την είσοδό της στη μήτρα, η βλαστοκύστη υποστηρίζεται διατροφικά από τις εκκρίσεις της μήτρας, παρόλο που αυτή η φάση της ανάπτυξης του προ-εμβρύου διαρκεί ένα πολύ σύντομο μόνο χρονικό διάστημα. Για να επιτευχθεί η εμφύτευση, το

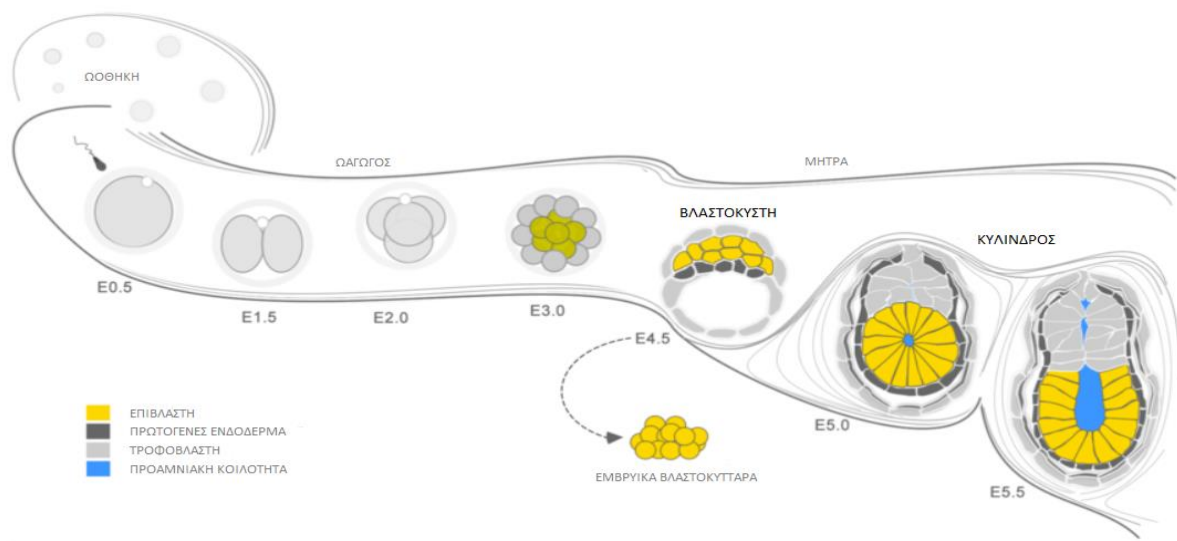
έμβρυο πρέπει να «εκκολαφθεί» από τη διαφανή ζώνη, ώστε να μπορεί να δημιουργήσει άμεσες μεμβρανικές επαφές με τα κύτταρα του τοιχώματος της μήτρας. Μέσα σε λίγες ώρες από τη στιγμή της εναπόθεσης, εμφανίζεται αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στην υποκείμενη του προ-εμβρύου περιοχή του στρωματικού ιστού της μήτρας. Η διαδικασία αυτή συνδέεται με τη δημιουργία οιδήματος, τοπικές αλλαγές στη σύνθεση του ενδοκυττάρου στρώματος και στη μορφολογία των στρωματικών κυττάρων και στον προοδευτικό σχηματισμό και ανάπτυξη τριχοειδών αγγείων. Αυτή η αντίδραση του στρώματος ονομάζεται πρωτογενής αντίδραση δημιουργίας του φθαρτού. Στη συνέχεια η δημιουργία του φθαρτού επεκτείνεται δημιουργώντας έναν μεγαλύτερο δευτερογενή φθαρτό ιστό, καθώς προετοιμάζεται το μεγαλύτερο τμήμα του πλακούντα.

Λίγες μόλις ώρες μετά την εναπόθεση του προ-εμβρύου στο ενδομήτριο της μήτρας, το επιφανειακό επιθήλιο που βρίσκεται κάτω το προ-έμβρυο αρχίζει να φθείρεται. Οι διαδικασίες που επιτελούνται στο τροφοεκτόδερμα φαίνεται να «μεταφέρονται» μεταξύ των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων, προκαλώντας την απομόνωση τους και στη συνέχεια την απόπτωσή τους. Κάποια κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος συγχωνεύονται δημιουργώντας το συγκύτιο (συγκυτιοτροφοβλάστη), ενώ κάποια άλλα διατηρούν την ατομικότητα τους (κυτταροτροφοβλάστη) και λειτουργούν ως μια πηγή πολλαπλασιασμού για τη δημιουργία περισσότερων τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο αδενικός ιστός της μήτρας και ο ιστός του φθαρτού που βρίσκεται πιο κοντά προς το τροφοβλαστικό τμήμα του προ-εμβρύου που διεισδύει, καταστρέφονται. Ταυτόχρονα, υπάρχει μαζική απελευθέρωση πρωτογενών μεταβολικών υποστρωμάτων (λιπιδίων, υδατανθράκων, νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών), τα οποία προσλαμβάνονται από το προ-έμβρυο προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξή του. Στο ποντίκι, το προ-έμβρυο διεισδύει μόνο κατά ένα μέρος στο στρώμα, με αποτέλεσμα να προεκβάλει σε διαφορετικό κάθε φορά βαθμό στην κοιλότητα της μήτρας. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία της εμφύτευσης στο ποντίκι χαρακτηρίζεται ως εκκεντρική.

Η δημιουργία του ιστού του φθαρτού και η διάτρησή του από το προ-έμβρυο ολοκληρώνει τη διαδικασία της εμφύτευσης, οδηγώντας στην απαρχή της δημιουργίας του πλακούντα και στη μεταφορά των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών από τη μητέρα στο έμβρυο.

Στο μετεμφυτευτικό στάδιο τα εσωτέρα κύτταρα της επιβλάστης καθίστανται ταχέως αποπτωτικά και πεθαίνουν, ελευθερώνοντας χώρο για να δημιουργηθεί η

προαμνιακή κοιλότητα (ΠΚ). Ταυτόχρονα, τα εξωτερικά κύτταρα της επιβλάστης που περιβάλλουν τη σχηματιζόμενη κοιλότητα σχηματίζουν ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο στις 5,5 ημέρες πλέον είναι καλά σχηματισμένο. Η δημιουργία του μετεμφυτευτικού επιθηλίου της επιβλάστης σηματοδοτεί το αναπτυξιακό στάδιο του κυλίνδρου, που διαρκεί μέχρι τις 6,5 ημέρες. Η επιβλάστη αποτελεί τον αμεσότερο κυτταρικό πρόγονο της γαστριδίωσης και των παραγώγων της, που είναι τα τρία εμβρυϊκά βλαστικά δέρματα: το εμβρυϊκό εξώδερμα, το εμβρυϊκό μεσόδερμα και το εμβρυϊκό ενδόδερμα, από τα οποία θα σχηματισθεί ολοκληρωσ ο οργανισμός.



Εικόνα 6 Πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη ποντικού

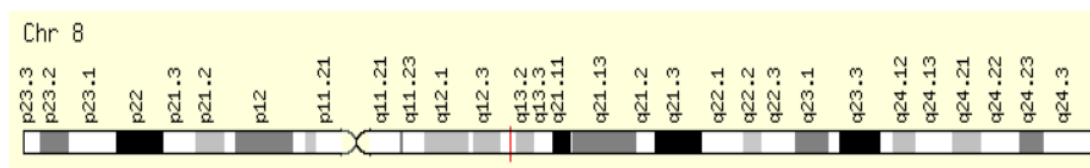
2. Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ CRH

Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης, CRH (corticotropin releasing hormone), είναι ένα νευροπεπτίδιο που απομονώθηκε για πρώτη φορά από πρόβειο υποθάλαμο και χαρακτηρίστηκε από τον Vale και τους συνεργάτες του²⁵. Οφείλει την ονομασία της στην ιδιότητά της να παρουσιάζει *in vivo* και *in vitro* ισχυρή επαγωγική δράση στην έκλυση της κορτικοτροπίνης (adrenocorticotropin hormone, ACTH) από την υπόφυση. Γι' αυτό το λόγο αναγνωρίστηκε αρχικά ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο και κύριος ρυθμιστής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ άξονας). Σήμερα είναι γνωστό ότι εκτός του υποθαλάμου η CRH παράγεται σε μια ποικιλία νευρωνικών και μη κυττάρων σε ολόκληρο το σώμα, και μαζί με τα ομόλογα πεπτίδια της αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές και συντονιστές των συμπεριφορικών, ενδοκρινικών και ανοσολογικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι στο στρες.

2.1.1 Γονίδιο και δομή της CRH

Το γονίδιο της CRH στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 8, στη θέση 8q13 και αποτελείται από δύο εξώνια μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ένα εσώνιο 800 ζευγών βάσεων²⁶. Ολόκληρη η κωδική αλληλουχία εμπεριέχεται στο δεύτερο εξώνιο. Ανοδικά της κωδικής περιοχής βρίσκονται δύο *cis*-ρυθμιστικές περιοχές που αποκρίνονται στο cAMP και δύο περιοχές που πιθανώς αντιστοιχούν στο CAAT box και στο TATA box. Καθοδικά της κωδικής περιοχής, μετά το κωδικό λήξης, εντοπίζονται δύο θέσεις πολυαδενυλίωσης. Το εσώνιο περιέχει μία αλληλουχία που δεσμεύει το μεταγραφικό παράγοντα σίγασης του RE1 (REST/NRSF), ο οποίος δρα περιορίζοντας την έκφραση της CRH στα νευρωνικά κύτταρα. Το γονίδιο της CRH έχει μελετηθεί σε πολλούς οργανισμούς όπως ο αρουραίος, το ποντίκι, το πρόβατο και ο βάτραχος και φαίνεται ότι η δομή του είναι αρκετά συντηρημένη.



Εικόνα 7 Θέση του γονιδίου της CRH στο χρωμόσωμα

Το γονίδιο της CRH ρυθμίζεται με τις κλασσικές ενοκυτταρικές βιοχημικές οδούς παραγωγής κυκλικού cAMP, με ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και την παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG), με ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και ακόλουθη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-jun στη θέση σύνδεσης AP-1 στο πυρηνικό DNA. Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την παραγωγή του mRNA της CRH στον υποθάλαμο. Το γονίδιο της CRH ρυθμίζεται άμεσα από οιστρογόνα, πιθανώς μέσω των διαφόρων οιστρογονικών απαντητικών στοιχείων που εντοπίζονται πάνω στην περιοχή ρύθμισής του. Ρύθμισης του γονιδίου της CRH παρατηρείται και σε επίπεδο ιστού. Για παράδειγμα, τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν τα επίπεδα του mRNA της υποθαλαμικής CRH στο ποντίκι, ενώ αντίθετα αυξάνουν την έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου της CRH στον πλακούντα²⁷. Η έκκριση της CRH επηρεάζεται και μεταβάλλεται από διάφορα ερεθίσματα, όπως τα συναισθήματα, ο πόνος και οι μεταβολές τις αρτηριακής πίεσης.

Το πεπτίδιο της CRH αποτελείται από 41 αμινοξέα και όπως όλα τα νευροπεπτίδια, προέρχεται από ένα μεγαλύτερο πρόδρομο μόριο (proCRH). Το πρόδρομο πεπτίδιο αποτελείται από 196 αμινοξέα και πρωτεολύεται από μια ενδοπεπτιδάση για να δώσει το ώριμο μόριο. Η αμινοτελική περιοχή είναι συντηρημένη και περιέχει μια υδρόφοβη σηματοδοτική αλληλουχία η οποία απαιτείται για την έκκριση του μορίου. Το κεντρικό τμήμα του μορίου περιέχει 124 αμινοξέα άγνωστης λειτουργίας. Η αλληλουχία των 41 αμινοξέων του ώριμου πεπτιδίου βρίσκεται στην καρβοξυτελική περιοχή της proCRH και αποκόπτεται από την υπόλοιπη ακολουθία σε μια συντηρημένη περιοχή πλούσια σε αργινίνες και λυσίνες. Η αλληλουχία των αμινοξέων στην CRH, τόσο στην τελική μορφή όσο και στο προ-πεπτίδιο, δεν έχει σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών. Η διατήρηση της χημικής δομής στην διάρκεια της εξέλιξης αποτελεί ακόμα ένα ισχυρό στοιχείο για την σημαντικότητα της CRH κατά την εξελικτική διαδικασία.



Εικόνα 8 Δευτεροταγής δομή της CRH

2.1.2 Τοπολογία έκφρασης της CRH

Η CRH αρχικά αναγνωρίστηκε ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο και κύριος ρυθμιστής του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια (Y-Y-E). Αργότερα έγινε γνωστό ότι η CRH εκφράζεται σε ποικίλα νευρωνικά και μη κύτταρα σε ολόκληρο το σώμα. Έχει ανιχνευτεί σε πολλές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, στον φλοιό των επινεφριδίων, στα λεμφοκύτταρα, στο πάγκρεας, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στο δέρμα, στους ινοβλάστες του δέρματος, στον εγκέφαλο, στο νωτιαίο μυελό, στο μυελό των επινεφριδίων, στην καρδιά, στα ούλα, στους πνεύμονες, στους όρχεις και στα περισσότερα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος όπως στους αδένες του ενδομητρίου, στις φυσιολογικές ωθήκες, στο φυσιολογικό πλακούντα, στην τροφοβλάστη, συγκιοτροφοβλάστη στο φθαρτό, κατά την εγκυμοσύνη και ακόμα και στην μήτρα μη εγκύων θηλυκών. Η CRH έχει επίσης εντοπισθεί σε πληθώρα όγκων και καρκινωμάτων του ανθρώπου, όπως στον καρκίνο των ωοθηκών, στο μελάνωμα και στον καρκίνο του μαστού. Επίσης εμφανίζεται και σε πολλές πειφερειακές περιοχές φλεγμονής. Ανάλογα με το σημείο έκκρισής της η CRH διαφοροποιείται λειτουργικά.

2.1.3 Η απόκριση στο στρες

Ο όρος στρες περιγράφει το σύνολο των προσαρμοστικών απαντήσεων των διαφόρων συστημάτων του οργανισμού που κινητοποιούνται για την αντιμετώπιση ποικίλων στρεσογόνων ερεθισμάτων που διαταράσσουν την ομοιόσταση του οργανισμού. Ως στρεσογόνο χαρακτηρίζεται ένα οποιοδήποτε ερέθισμα τείνει να μεταβάλει την ομοιόσταση του οργανισμού, όπως η πείνα, η δίψα, το κρύο, η ζέστη, ο φόβος, το άγχος, η κόπωση, η λοίμωξη, η φλεγμονή κτλ.

Ο οργανισμός αποκρίνεται στο στρες με ένα πολύπλοκο ρεπερτόριο συμπεριφορικών και φυσιολογικών δράσεων που περιγράφονται ως 'fight or flight response'-αντίδραση πάλης ή φυγής- όρος που αρχικά δόθηκε από τον Cannon. Το σύνολο των προσαρμογών στη συμπεριφορά του ατόμου περιλαμβάνει την αύξηση της επαγρύπνησης και της ετοιμότητας, την ενδυνάμωση της προσαρμογής και της εκλεκτικής μνήμης, την επαγωγή της ονομαζόμενης αναλγησίας του στρες και την καταστολή των ενεργειακά δαπανηρών ενδοκρινολογικών προγραμμάτων της πρόσληψης τροφής και της αναπαραγωγής. Οι σωματικές αλλαγές έχουν επίσης στόχο την εξοικονόμηση ενέργειας με την ανακατανομή αυτής προς το κεντρικό νευρικό σύστημα, την καρδιά και τους μυς. Κατά τη διάρκεια του στρες, η καρδιακή

λειτουργία και η αναπνοή επιταχύνονται, ο καταβολισμός αυξάνεται και τα καύσιμα του οργανισμού χρησιμοποιούνται για να τροφοδοτήσουν τις παραπάνω λειτουργίες.

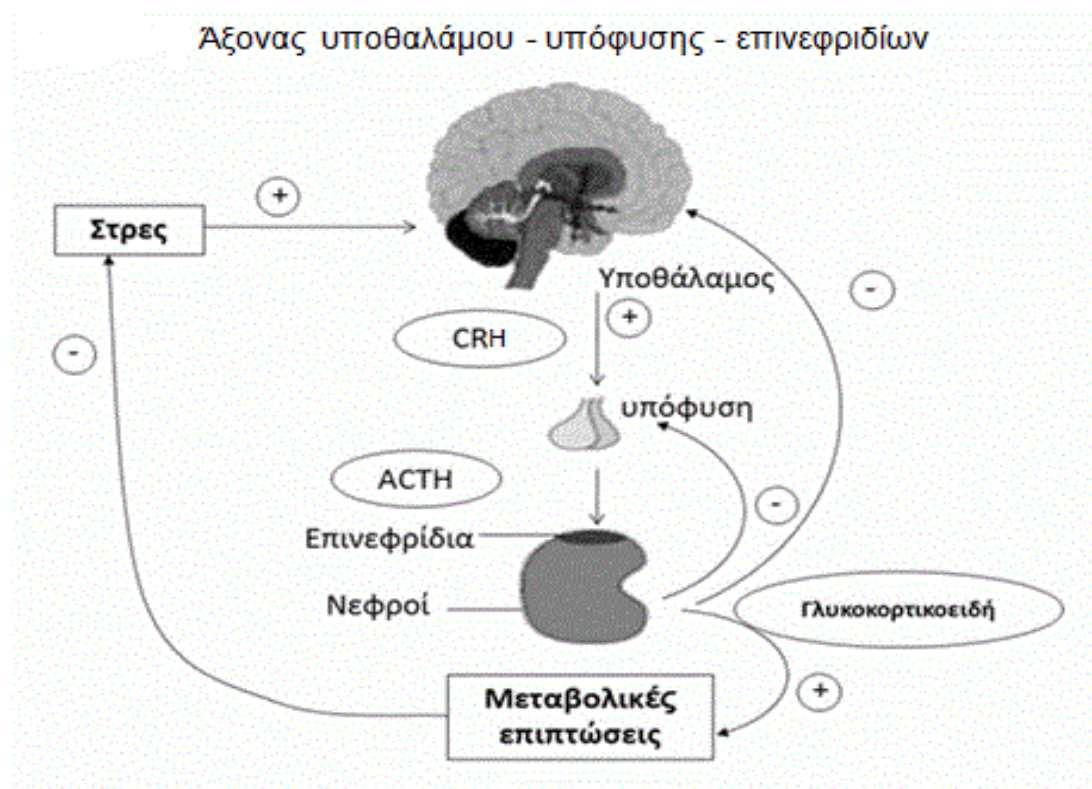
Η ενεργοποίηση της CRH αποτελεί για τα θηλαστικά, τον κύριο μεσολαβητή της έναρξης και απόκρισης του ΥΥΕ άξονα στο στρεσογόνο ερέθισμα. Οι ανατομικές δομές που μεσολαβούν την απάντηση στο στρεσογόνο ερέθισμα βρίσκονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και τους περιφερικούς ιστούς. Οι κύριοι παράγοντες δράσης της απόκρισης βρίσκονται στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, τα κορτικοφόρα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και τα επινεφρίδια. Αυτές οι δομές αναφέρονται ως ΥΥΕ άξονας. Εκτός από τον ΥΥΕ άξονα, το νευρικό και το συμπαθητικό σύστημα, οι εγκεφαλικοί νοραδρενεργικοί νευρώνες, τα συμπαθητικά επινεφριδιομυελικά κυκλώματα και το παρασυμπαθητικό σύστημα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αποκρίσεων σε στρεσογόνα ερεθίσματα.

2.1.4 CRH, ΥΥΕ άξονας και στρες

Ο υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός (ΥΥΕ) άξονας είναι ο κυριότερος ενδοκρινικός άξονας ο οποίος διαμεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες. Η επίδραση ενός στρεσογόνου παράγοντα ενεργοποιεί νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (ΠΚΠ) του υποθαλάμου που εκλύουν την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) η οποία μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας εισέρχεται στα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης όπου διεγείρει την έκφραση του γονιδίου και την παραγωγή της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) και συνεπώς την απελευθέρωση αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) και άλλων πεπτιδικών προϊόντων προερχόμενων από την POMC όπως η β-ενδορφίνη και η μελανοτροπίνη (MSH). Οι δράσεις της CRH στην υπόφυση διαμεσολαβούνται από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς ευρισκόμενους στα φλοιοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης^{28,29}.

Μετά την απελευθέρωσή της στη συστηματική κυκλοφορία, η ACTH ενεργοποιεί τους μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου 2 της μελανοκορτίνης (MC2) στον φλοιό των επινεφριδίων διεγείροντας την παραγωγή και έκκριση γλυκοκορτικοειδών (κορτικοστερόνης στα τρωκτικά και κορτιζόλης στα πρωτεύοντα). Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα και συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης και στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Επίσης, αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της βασικής λειτουργίας του

ΥΥΕ άξονα και της λήξης της αντίδρασης ασκώντας αρνητική ανάδραση τόσο στο επίπεδο της υπόφυσης όσο και στο επίπεδο του υποθαλάμου³⁰.



Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση του ΥΥΕ άξονα

2.1.5 Ο ρόλος της CRH στη φλεγμονή

Η CRH συντονίζει τις ενδοκρινικές και ανοσολογικές αποκρίσεις με δύο τρόπους: έναν αντιφλεγμονώδη, με την έκκριση της CRH από το κεντρικό νευρικό σύστημα μετά τη διέγερση γλυκοκορτικοειδών και κατεχολαμίνης, και έναν προφλεγμονώδη, μέσω της άμεσης δράσης της CRH που εκκρίνεται σε περιφερικούς ιστούς

Πολλαπλοί μεσολαβητές-ουσίες στη γενική κυκλοφορία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα στη διάρκεια του stress/φλεγμονής. Τρεις κυτταροκίνες –ο TNF-α, η IL-1 και η IL-6– μετέχουν στη διεγερτική δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα. Κάποιες από τις διεγερτικές δράσεις των κυτταροκινών στον ΥΥΕ άξονα ασκούνται έμμεσα από την ενεργοποίηση κεντρικών κατεχολαμινεργικών οδών. Ακόμα, ενεργοποίηση περιφερικών, σωματοαισθητικών και σπλαχνικών ανιουσών νευρικών ινών οδηγεί στη διέγερση αμφοτέρων των κατεχολαμινεργικών και CRH νευρωνικών συστημάτων μέσω ανιουσών νωτιαίων οδών.

Αντίστροφα, ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα έχει ανασταλτική δράση στη φλεγμονώδη/ανοσολογική απόκριση δεδομένου ότι τα στοιχεία της ανοσολογικής απόκρισης αναστέλλονται από την κορτιζόλη. Μεταβολές στην κυκλοφορία και τη λειτουργία των λευκοκυττάρων, μειώσεις στην παραγωγή κυτταροκινών και μεσολαβητών της φλεγμονής και αναστολή στη δράση των τελευταίων σε ιστούς στόχους αποτελούν κάποιες από τις κύριες ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Η υπερβολική απάντηση του ΥΥΕ άξονα στη φλεγμονή μπορεί να μιμηθεί την κατάσταση stress ή να προκαλέσει υπερκορτιζολαιμία. Έτσι, μπορεί να αυξηθεί η ευαλωτότητα σε λοιμώδεις παράγοντες και όγκους αλλά και να αυξηθεί η αντίσταση σε αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις παθήσεις. Αντίστροφα, ελαττωματική (μειωμένη) απάντηση του άξονα μπορεί να προκαλέσει έλλειψη γλυκοκορτικοειδών και έτσι να οδηγήσει σε αντίσταση σε λοιμώξεις και νεοπλασίες, αλλά και σε αυξημένη ευαλωτότητα σε αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις παθήσεις³¹.

Η αποκαλούμενη και ως «άνοσος» CRH, εντοπίζεται και σε εξω-εγκεφαλικές περιοχές, όπως στα ανοσολογικά βοηθητικά κύτταρα και στις φλεγμονώδεις εκκρίσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εντοπισμός της CRH και στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και στο θυρεοειδή αδένα ασθενών με θυρεοειδίτιδα Hashimoto³². 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 ανοσοουδετεροποιητική δράση στον TNF-α, μια προάγουσα τη φλεγμονή κυτταροκίνη³³. Οι συγκεντρώσεις της CRH στις φλεγμονώδεις εστίες είναι τόσο υψηλές όσο και στο υποφυσιακό πυλαίο σύστημα.

2.1.6 Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων

Αρκετά χρόνια μετά τον χαρακτηρισμό της CRH ένας αριθμός συγγενών προς αυτήν πεπτιδίων ανακαλύφθηκαν και εντάχθηκαν στην οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων. Σε αυτήν ανήκουν, εκτός από τη CRH, η ουροτενσίνη I (στους ιχθείς), η σωβαζίνη (στα αμφίβια), και οι ουροκορτίνες I, II και III (στα θηλαστικά). Τα παραπάνω πεπτίδια διαθέτουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τα οποία στηρίζουν την υπόθεση της κοινής καταγωγής τους από ένα πρόδρομο αρχέγονο πεπτίδιο. Συγγενή πεπτίδια της CRH εμφανίζονται τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά. Τα ασπόνδυλα εκκρίνουν δύο ομόλογα της CRH που ονομάζονται διουρητικές ορμόνες.

2.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ CRH

Οι δράσεις των CRF πεπτιδίων διαμεσολαβούνται από ειδικούς υποδοχείς και τροποποιούνται από την CRH-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRH binding protein, CRH-BP). Οι CRFRs ανήκουν στην υπεροικογένεια των συζευγμένων με G-πρωτεΐνη διαμεμβρανικών υποδοχέων με το τυπικό πρότυπο 7 διαμεμβρανικών περιοχών. Στα περισσότερα είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχουν ανιχνευθεί δύο υποδοχείς, οι CRH-R1 και CRH-R2^{34,35}, οι οποίοι κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια και παρουσιάζουν περίπου 70% αμινοξική ομολογία. Το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας παρουσιάζεται στο διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα τους, ενώ το εξωκυττάριο τμήμα και ειδικά το αμινοτελικό άκρο παρουσιάζει ένα μόλις 40% ομολογίας³⁶. Απαντώνται σε διάφορες ισομορφές ο καθένας, γεγονός που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα. Οι CRFRs παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς και διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες όσον αφορά τους προσδέτες τους.

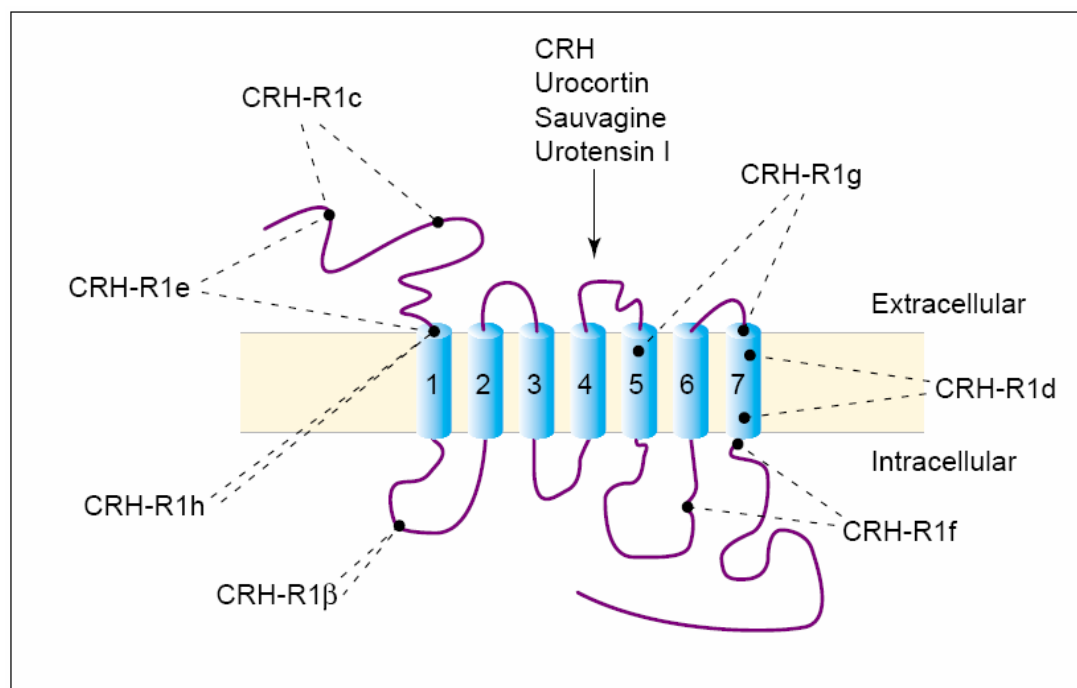
2.2.1 Ο υποδοχέας τύπου I της CRH (CRH-R1)

Ο CRH-R1 (CRH-R1α) υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη 415 αμινοξέων, η οποία διαπερνάει την πλασματική μεμβράνη 7 φορές σχηματίζοντας δομές α-έλικας. Ο CRH-R1 προσδένει την CRH, την ουροκορτίνη, την ουροτενσίνη I και τη σωμαζίνη με σχεδόν ίδια συγγένεια αλλά έχει μικρή ή καθόλου συγγένεια προς τις ουροκορτίνες II και III. Κατανέμεται ευρέως τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και στην περιφέρεια. Στον εγκέφαλο εκφράζεται κυρίως στο φλοιό, στέλεχος, υπόκαμπο, αμυγδαλή, υπόφυση και υποθάλαμο. Στην περιφέρεια εντοπίζεται σε ποικίλες περιοχές, μεταξύ των οποίων στα συστήματα του ανοσοποιητικού, γαστρεντερικού, αναπαραγωγικού, στα επινεφρίδια, στο δέρμα, και στο λιπώδη ιστό^{37,38}. Η κύρια λειτουργία του υποδοχέα φαίνεται να είναι η διαμεσολάβηση της φυσιολογικής απάντησης του οργανισμού στο στρες.

Στον άνθρωπο, το γονίδιο του CRH-R1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 στη θέση 17q21.31, ενώ στο ποντίκι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στην περιοχή E1; 11 67.77 cM. Το γονίδιο περιέχει τουλάχιστον 14 εξόνια και εκτείνεται σε 42.669 ζεύγη βάσεων^{39,40}. Διάφορα πειραματικά δεδομένα, καταδεικνύουν ότι το γονίδιο CRH-R1 βρίσκεται υπο την επίδραση τόσο της CRH όσο και της ουροκορτίνης I (UCN-I), οι οποίες δρουν μέσω ξεχωριστών σηματοδοτικών

μονοπατιών δημιουργώντας ένα βρόχο θετικής ανατροφοδότησης, ρυθμίζοντας έτσι τη μεταγραφή του υποδοχέα. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι επίσης σημαντικοί ρυθμιστές του CRH-R1 γονιδίου, αφού έχει αποδειχθεί ότι η δεξαμεθαζόνη δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης στην πρόσθια υπόφυση των τρωκτικών. Τόσο στον άνθρωπο όσο και στον ποντικό, δεν παρατηρείται TATA box στον υποκινητή του CRH-R1. Έτσι, τον κρίσιμο ρόλο του ελέγχου της έναρξης της μεταγραφής ενδέχεται να παίζουν οι θέσεις SP1, που φαίνεται να συγκεντρώνονται γύρω από θέσεις εκκίνησης της μεταγραφής.

Έχουν χαρακτηριστεί 8 ισομορφές του υποδοχέα (CRH-R1α, R1β, R1c, R1d, R1e, R1f, R1g και R1h) στον άνθρωπο, που οφείλονται σε εναλλακτικό μάτισμα του mRNA⁴¹. Το ολοκληρωμένο προϊόν του γονιδίου του CRH-R1, είναι η CRH-R1β ισομορφή, μια πρωτεΐνη 444 αμινοξέων που είναι ανεπαρκής στη σύνδεση του προσδέτη και στις ιδιότητες μεταβίβασης σήματος. Με την εκτομή του εξονίου 6 το οποίο κωδικοποιεί ένα ένθεμα 29 αμινοξέων στον πρώτο ενδοκυτταρικό βρόχο, προκύπτει το CRH-R1α mRNA. Η CRH-R1α πρωτεΐνη, περιλαμβάνει 415 αμινοξέα και είναι η μόνη λειτουργική ισομορφή του υποδοχέα. Ομοίως, οι υπόλοιπες ισομορφές, των οποίων η λειτουργία δεν είναι ακόμη σαφής, προκύπτουν από προσθήκες ή απαλοιφές αμινοξέων (**Εικόνα 10**) στο βασικό γονιδιακό προϊόν.



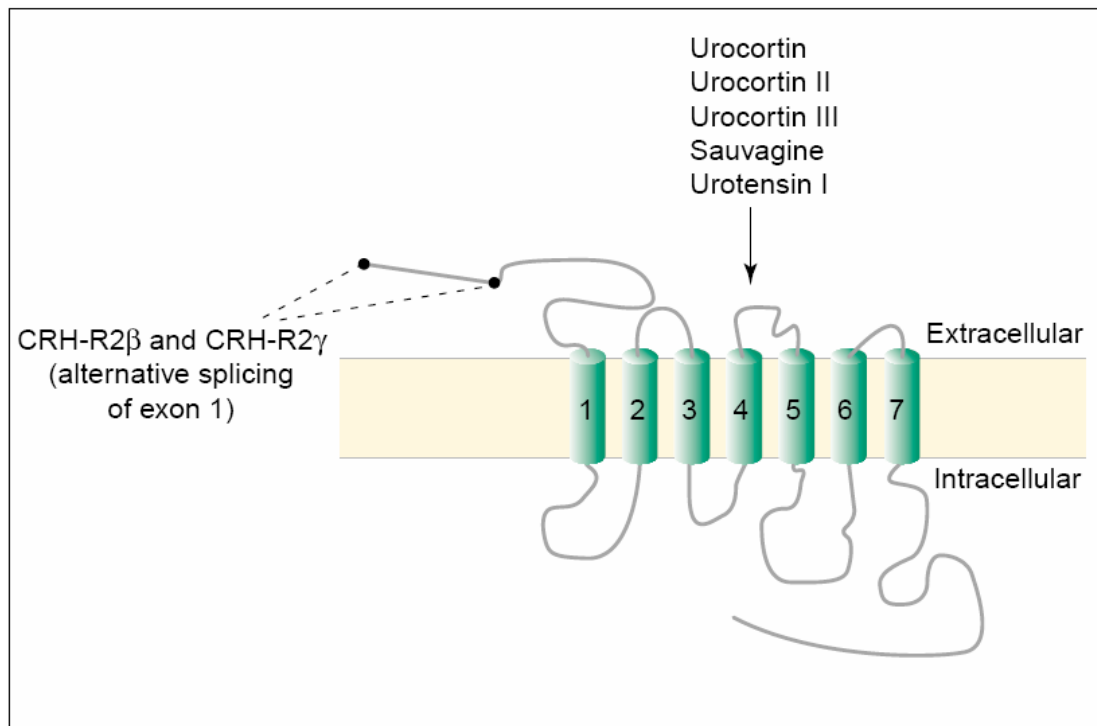
Εικόνα 10 Ο υποδοχέας CRF-R1. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις θέσεις όπου υπάρχουν αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μεταξύ των διαφόρων ισομορφών.

2.2.2 Ο υποδοχέας τύπου II της CRH (CRH-R2)

Ο CRH-R2 υποδοχέας είναι μία πρωτεΐνη η οποία έχει τρεις λειτουργικές ισομορφές (CRH-R2α, -R2β, -R2γ) που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου και διαθέτουν μοναδική κατανομή στους ιστούς. Ο CRH-R2α, εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στον υποθάλαμο, στο πλάγιο διάφραγμα, στο ραφιοειδή πυρήνα στο μεσεγκέφαλο, στον οσφρητικό βολβό και στην υπόφυση. Ο CRH-Rβ ανιχνεύεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες), αλλά κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας)⁴². Το mRNA του CRH-Rβ βρέθηκε επίσης στους πνεύμονες, στο σπλήνα, στο θύμο αδένα, στο δέρμα και στο λιπώδη ιστό. Ο CRH-Rγ έχει ανιχθευθεί μόνο στη μεταιχμιακή περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου. Αντίθετα με τον CRH-R1 ο CRH-R2 δεσμεύει όλες τις ουροκορτίνες, τη σωβαζίνη και την ουροτενσίνη I με σημαντικά υψηλότερη συγγένεια από εκείνη προς τη CRH γεγονός που προτείνει ότι αυτά τα πεπτίδια μπορεί να είναι οι ενδογενείς του προσδέτες.

Στον άνθρωπο το γονίδιο του CRH-R2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 στη θέση 7p14.3, ενώ στο ποντίκι εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην περιοχή B3; 27.33 cM. Το γονίδιο περιέχει 16 εξόνια και εκτείνεται σε 42.968 ζεύγη βάσεων. Από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA προκύπτουν 6 μετάγραφα όμως μόνο τα τρία δίνουν λειτουργική πρωτεΐνη. Το γονίδιο του CRH-R2 διαθέτει τρεις ξεχωριστούς υποκινητές. Η διάταξη του 5'-άκρου του γονιδίου είναι παρόμοια με αυτή του CRH-R1 γονιδίου καθότι δεν διαθέτει λειτουργικό TATA box ή CCAAT box, αλλά περιέχει αρκετές θέσεις πρόσδεσης SP1 πρωτεϊνών. Οι θέσεις αυτές συνιστούν έναν υποτυπώδη υποκινητή. Κάθε ένας από τους υποκινητές περιέχει ορισμένες συναινετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες που μας παρέχουν πληροφορίες για τη φυσιολογία του CRH-R2.

Η δομική σύγκριση των διαφόρων ισομορφών του υποδοχέα έδειξε ότι 377 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου είναι ταυτόσημα και ότι διαφέρουν μόνο στο αμινοτελικό άκρο που αντιστοιχεί σε τμήμα της πρώτης εξωκυττάριας περιοχής και φαίνεται να είναι κριτικής σημασίας για τη σύνδεση του προσδέτη (Εικόνα 11). Για παράδειγμα, ο CRH-R2α έχει 34 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο. Αυτά αντικαθιστώνται από 61 αμινοξέα για το σχηματισμό του CRH-R2β ή από 20 αμινοξέα για το σχηματισμό του CRH-Rγ. Έτσι τα συγγενή με τη CRH πεπτίδια ενεργοποιούν την CRH-R2β δέκα φορές πιο ισχυρά από τις άλλες 2 ισομορφές⁴³.



Εικόνα 11 Ο υποδοχέας CRH-R2. Οι ισομορφές CRH-R2β και γ διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο αλλά διαθέτουν ταυτόσημες εξοκυττάριες και ενδοκυττάριες έλικες καθώς και διαμεμβρανικά τμήματα.

Οι υποδοχείς CRH-R2 έχουν αγχολυτικές ιδιότητες εξισορροπώντας κατά κάποιο τρόπο την δράση των υποδοχέων CRH-R1⁴⁴. Ο CRH-R2 επίσης διαμεσολαβεί στις ανορεξιογόνες δράσεις της CRH και της ουροκορτίνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορμόνες όπως η λεπτίνη που είναι υπεύθυνες για τη μείωση της όρεξης μπορούν να αυξήσουν την έκφραση του mRNA του CRH-R2 στον υποθάλαμο και μέσω αυτής της ρύθμισης καθώς βέβαια και με άλλους μηχανισμούς επιτυγχάνουν τα ανορεξιογόνα αποτελέσματά τους⁴⁵. Επιπλέον, ο CRH-R2 διαμεσολαβεί στις αιμοδυναμικές δράσεις της ουροκορτίνης στο καρδιαγγειακό. Η έκφραση του mRNA του υποδοχέα CRH-R2 στο καρδιαγγειακό σύστημα φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από τα αυξημένα επίπεδα TNF-α και IL-1 στο πλάσμα ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φλεγμονής.

2.2.3 Η CRH-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRF-binding protein, CRF-BP)

Τα βιολογικά αποτελέσματα της CRH ρυθμίζονται όχι μόνο από τους υποδοχείς του, αλλά και από μία υψηλής συγγένειας πρωτεΐνη τη CRH-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRH-Binding Protein, CRH-BP). Πρόκειται για μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη 37

KDa που απομονώθηκε από το πλάσμα ανθρώπου και δεσμεύεται στη CRH αλλά και στην ουροκορτίνη. Στον άνθρωπο η CRH-BP εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, αμυγδαλή, υποθάλαμος), αλλά συντίθεται και στην περιφέρεια, όπως στον πλακούντα, στο ήπαρ και στα επινεφρίδια, και εκλύεται στην κυκλοφορία⁴⁶. Αντιθέτως στα τρωκτικά, η CRH-BP δεν ανιχνεύεται στο αναπαραγωγικό σύστημα αλλά μόνο στον εγκέφαλο και την υπόφυση⁴⁷.

Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή δρα σαν ένας τροποποιητής της ενεργοποίησης του άξονα ΥΥΕ και των ενδοκρινικών, αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων της CRH, περιορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του ελεύθερου προσδέτη και επάγοντας την ενδοκύττωση και καταβολισμό του πεπτιδίου⁴⁸. Ο ρόλος της περιφερικώς απαντώμενης CRH-BP, η οποία προσδέεται ισχυρά στη CRH, είναι η αντιμετώπιση της υπερέκκρισης της CRH από τον πλακούντα κατά το τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Ο ρόλος τον οποίο διαδραματίζει η προσδεσμένη σε μεμβράνη CRH-BP στο ΚΝΣ είναι, πιθανώς, η τροποποίηση της λειτουργίας των υποδοχέων της CRH μέσω ρύθμισης της συγκέντρωσης της ορμόνης στους υποδοχείς της. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της CRH-BP εμφανίζονται σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τις λειτουργίες της γνώσης και του στρες, ενώ παράλληλα η απομόνωσή της από το αρθρικό υγρό προερχόμενο από ασθενείς με αρθρίτιδα αποτελεί ένδειξη του πιθανού ρόλου που θα μπορούσε να διαδραματίσει στην ανοσοθεραπεία.

2.2.4 Σηματοδότηση μέσω των CRFRs

Η πρόσδεση των αγωνιστών στα εξωκυττάρια τμήματα των CRFRs έχει σαν αποτέλεσμα τη αλλαγή της στερεοδιάταξης των υποδοχέων σε μια ενεργή κατάσταση, αυξάνοντας έτσι την συγγενείά τους για την Gs πρωτεΐνη. Κατά συνέπεια ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση και η πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA) καθώς και άλλα εξαρτώμενα από το κυκλικό AMP (cAMP) ενδοκυττάρια μονοπάτια⁴⁹. Επιπρόσθετοι δεύτεροι αγγελιοφόροι μπορεί να εμπλέκονται στη σηματοδότηση των CRH-Rs. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές G πρωτεΐνες προσδέονται σε CRH-R1 υποδοχείς ενδογενώς εκφραζόμενους στον πλακούντα και στον εγκεφαλικό φλοιό. Στα κύτταρα Leydig και στον πλακούντα οι CRH-R1 υποδοχείς μπορεί να σηματοδοτούν επίσης μέσω των Gq πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας έτσι την φωσφολιπάση C (PLC) και το σχηματισμό φωσφατιδίων ινοσιτόλης⁵⁰. Ο CRH-R2β επίσης επάγει το σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης, ενώ έχει δειχθεί ακόμη ότι CRH-R1 υποδοχείς στον εγκεφαλικό φλοιό μπορούν να συζευχθούν με Gs

και με Gq πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας έτσι τόσο το μονοπάτι του cAMP όσο και της PLC⁵¹.

2.2.5 Ανταγωνιστές των CRFRs

Τα τελευταία 10 χρόνια παρουσιάζουν μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον ουσίες με ανταγωνιστικές δράσεις στους υποδοχείς της CRH. Και αυτό διότι η CRH έχει χαρακτηριστικά πλειοτροπικού παράγοντα, που εκφράζεται σε σημαντικό αριθμό περιοχών του ΚΝΣ, αλλά και σε πολλούς περιφερειακούς ιστούς του ανοσοποιητικού και αναπαραγωγικού συστήματος. Πρόσφατα πειραματικά και κλινικά δεδομένα έδειξαν ότι η CRH συμμετέχει σε σημαντικό αριθμό φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών μηχανισμών, κυρίως σε μηχανισμούς που έχουν σχέση με το άγχος, την κατάθλιψη, τη νευρογενή ανορεξία, τη νόσο του Alzheimer, αλλά και την εξάρτηση. Επίσης η περιφερική CRH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής, ιδιαίτερα της νευρογενούς φλεγμονής, καθώς και στους μηχανισμούς που ελέγχουν την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο κατά τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης και τη διαδικασία του τοκετού.

Η πρώτη γενιά ανταγωνιστών της CRH που αναφέρθηκαν ήταν πεπτίδια⁵². Πρόσφατα έχουν συντεθεί μικρομοριακοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές που ήδη ελέγχονται σε προ-κλινικές και κλινικές μελέτες. Οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές της CRH είναι ασθενώς αλκαλικά μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος, δύο χαρακτηριστικά που θεωρούνται σημαντικά για φάρμακα με στόχο το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές της CRH παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους πεπτιδικούς ανταγωνιστές της CRH, καθότι είναι υψηλής ανθεκτικότητας στη βιοαποδόμηση και άρα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια δράσης, έχουν μικρά μοριακά βάρη και επομένως κοστίζουν λιγότερο, ενώ διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία διαταραχών του ΚΝΣ⁵³.

Οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές διακρίνονται σε αρκετές κατηγορίες ανάλογα με το βασικό σκελετό της χημικής τους δομής: πυρραζολόνες, θειαζόλια, πυρραζόλια, ανιλνοπυριμιδίνες, ανιλνοτριάζίνες, περιμιδίνες και δικυκλικοί ανταγωνιστές. Οι διαφορές τους εντοπίζονται στις υποκαταστάσεις και εισαγωγές ή αποχωρήσεις ετεροατόμων έξω από τον κεντρικό πυρήνα της ένωσης. Το κοινό χαρακτηριστικό σε όλες τις κατηγορίες ενώσεων είναι ένα 2,4 διωδροποκατεστημένος ή 2,4,6 τριωποκατεστημένος φαινολικός δακτύλιος.

3. CRH ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

3.1 ΘΕΣΕΙΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ CRH

Η CRH και οι υποδοχείς της έχουν αναγνωρισθεί στο ανδρικό και γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Η «αναπαραγωγική» CRH είναι μια μορφή της «ιστικής» CRH που βρίσκεται σε περιφερικούς ιστούς. Συμμετέχει σε διάφορες αναπαραγωγικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν και στοιχεία φλεγμονής, ενεργώντας σαν αυτοκρινής ή και παρακρινής ρυθμιστής. Έτσι η «ωθητική» και η «ενδομητρική» CRH μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της στεροειδογένεσης, στις φλεγμονώδεις διαδικασίες της ωοθήκης, όπως η ωορρηξία και η ωχρινοποίηση, και στις ενδομητρικές φλεγμονώδεις διαδικασίες, όπως η φθαρτοποίηση και η εμφύτευση της βλαστοκύστης.

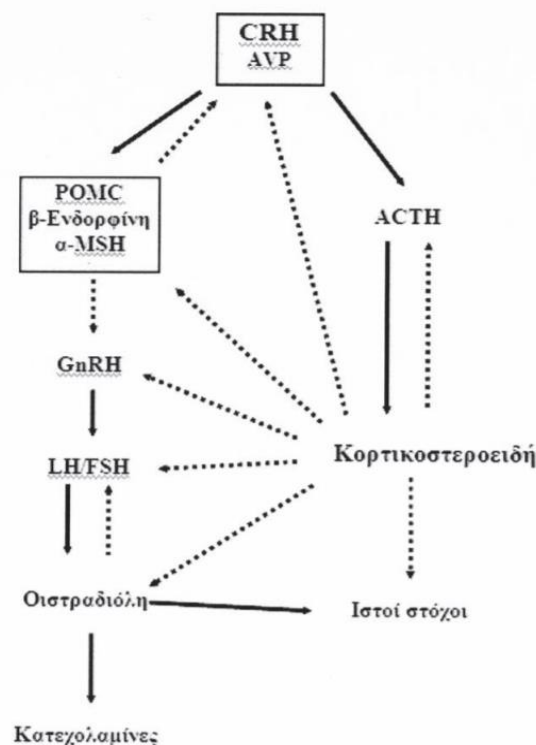
Πίνακας 1 Αναπαραγωγική CRH: θέσεις παραγωγής, προτεινόμενες λειτουργίες και πιθανή συμμετοχή σε παθοφυσιολογικά φαινόμενα

| Αναπαραγωγική CRH | Πιθανοί ρόλοι στη γυναικεία φυσιολογία | Πιθανοί ρόλοι στη γυναικεία παθοφυσιολογία |
|--|--|--|
| Ωοθήκες <ul style="list-style-type: none"> • Θήκη • Στρώμα • Ωάριο | <ul style="list-style-type: none"> • Ωρίμανση των ωοθυλακίων • Παραγωγή στεροειδών • Φλεγμονώδη τύπου φαινόμενα (ωορρηξία, ωχρινόλυση) • Αναστολή της παραγωγής των στεροειδών του φύλου | <ul style="list-style-type: none"> • Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια • Ανωορρηκτικοί κύκλοι • Δυσλειτουργία του ωχρού σωματίου • Ωοθηκική δυσλειτουργία |
| Μήτρα <ul style="list-style-type: none"> • Ενδομήτριοι αδένες • Φθαρτός | <ul style="list-style-type: none"> • Φλεγμονώδη τύπου φαινόμενα (φθαρτοποίηση, εμφύτευση βλαστοκύστης) • Μητρική ανοσολογική ανοχή | <ul style="list-style-type: none"> • Υπογονιμότητα • Αυτόματη αποβολή • Αποτυχία εμφύτευσης |
| Βλαστοκύστη <ul style="list-style-type: none"> • Εξωλαχνωτή τροφοβλάστη | <ul style="list-style-type: none"> • Εμφύτευση βλαστοκύστης • Μητρική ανοσολογική ανοχή • Διείσδυση τροφοβλάστης | <ul style="list-style-type: none"> • Αυτόματη αποβολή |
| Πλακούντας <ul style="list-style-type: none"> • Κυτταροτροφοβλάστη • Συγκυτιοτροφοβλάστη • Άμνιο • Χορίο | <ul style="list-style-type: none"> • Ρύθμιση της εμβρυοπλακουντικής κυκλοφορίας • Εμβρυϊκή στεροειδογένεση επινεφριδίων • Επαγωγή τοκετού • Μητρική υπερκορτιζολαμία | <ul style="list-style-type: none"> • Πρόωρος τοκετός • Καθυστερημένος τοκετός • Προεκλαμψία και εκλαμψία |

3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΓΟΝΑΔΩΝ (ΥΥΓ)

Ο κύριος ρυθμιστής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών είναι η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH), που παράγεται από τον υποθάλαμο και εκκρίνεται στο πυλαίο σύστημα της υπόφυσης. Η GnRH διεγείρει την υπόφυση ώστε να εκκρίνει ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) και ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) και, εν συνεχεία, διεγείρεται η ωοθήκη ώστε να εκκρίνει οιστραδιόλη και προγεστερόνη.

Η CRH σε συνέργεια με τα CRH-επαγόμενα πεπτίδια όπως είναι η β-ενδορφίνη αναστέλλουν την έκκριση της υποθαλάμιας GnRH, ενώ τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την έκκριση της LH και μετέπειτα της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης και καθιστούν τους ιστούς-στόχους ανθεκτικούς στην οιστραδιόλη. Έτσι, ο άξονας ΥΥΕ είναι υπεύθυνος για την υποθαλαμική αμηνόρροια που προκαλείται από στρες, η οποία παρατηρείται σε άγχος, κατάθλιψη, κακή διατροφή, διαταραχές διατροφής και χρόνια εντατοκή άσκηση καθώς επίσης και στον υπογοναδισμό του συνδρόμου Cushing λόγω ανασταλτικής δράσης των κορτικοειδών στην υπόφυση. Η κατάσταση πλήρους καταστολής της GnRH έχει ως αποτέλεσμα ατελή ωχρινική φάση κατά την ωρίμανση του ωοθυλακίου και αμηνόρροια⁵⁴.



Εικόνα 12 Αλληλεπιδράσεις του ΥΥΕ άξονα με τον ΥΥΓ άξονα. Οι συνεχείς γραμμές υποδηλώνουν θετική επίδραση ενώ οι διακεκομμένες αναστολή.

3.3 ΩΟΘΗΚΙΚΗ CRH

Όπως καταδεικνύεται από πειράματα ανοσοϊστοχημείας, στις φυσιολογικές ωοθήκες ανθρώπου και ποντικίου, ανοσοαντιδρώσα CRH εντοπίζεται στα κοκκώδη και στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν το ωοθηλάκιο σε όλη τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Ανιχνεύεται επίσης στα ωοκύτταρα και το ωοθηλακικό υγρό. Επιπλέον, λειτουργικοί υποδοχείς υπάρχουν στα ίδια κύτταρα και στον ωοφόρο δίσκο καθώς και στο ωχρο σωματίο. Έχουν ανιχνευθεί επίσης τα μετάγραφα της CRH και του τύπου I υποδοχέα της στα κοκκώδη και στα στρωματικά ωοθηκικά κύτταρα του ανθρώπου. Με ανοσοφθορισμό έχει εντοπιστεί η ανοσοαντιδρώσα CRH-BP στα ίδια κύτταρα αλλά όχι και το μετάγραφό της, υπονοώντας ότι πιθανά αυτή προέρχεται από την περιφερική κυκλοφορία³⁹.

Οι κύριοι βιολογικοί ρόλοι που αποδίδονται στη CRH των ωοθηκών είναι η παρέμβασή της σε τοπικά φλεγμονώδη φαινόμενα (ωορρηξία και ωχρινοποίηση) και η επίδρασή της στη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών. Η CRH δρα σαν προφλεγμονώδης κυτοκίνη, άμεσα ή και έμμεσα, μέσω της ενεργοποίησης της ιντερλευκίνης-1β. Επιπλέον, είναι γνωστός ο ανασταλτικός ρόλος της στη βιοσύνθεση των ωοθηκικών στεροειδών ορμονών (οιστραδιόλης και προγεστερόνης) από τα κύτταρα της έσω θήκης, δράση που μπορεί να είναι άμεση ή να ρυθμίζεται και πάλι από την τοπική παραγωγή κυτοκινών και τυχόν άλλων ρυθμιστών. Σε αυτή την ιδιότητα της ωοθηκικής CRH πιθανότατα οφείλεται η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, η οποία παρατηρείται σε γυναίκες που εκτίθενται σε έντονο ψυχολογικό στρες. Η CRH-BP πιθανά λειτουργεί ως εξω-ωοθηκικός ρυθμιστής που ελέγχει τις ποσότητες της ελεύθερης ωοθηκικής CRH που μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα της στο διαμέρισμα των θυλακωδών κυττάρων. Στα ανωτέρω συμπεράσματα οδηγούν ο εντοπισμός της CRH-BP στα ίδια κύτταρα με την CRH καθώς και η υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης που παρουσιάζει αυτή σε σχέση με τον υποδοχέα της CRH. Η συγκέντρωση της ανοσοαντιδρώσας ωοθηκικής CRH είναι υψηλότερη στους νεώτερους, αναπαραγωγικά ενεργούς οργανισμούς, σε σχέση με τους ηλικιωμένους, υποδηλώνοντας ότι η ωοθηκική CRH είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας. Στην παραπάνω υπόθεση συνηγορούν και οι παρατηρούμενες χαμηλές συγκεντρώσεις ωοθηκικής CRH σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη αναπαραγωγική λειτουργία^{55,56,57}.

3.4 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΚΗ CRH

Το γονίδιο της CRH εκφράζεται στο ενδομήτριο τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικίου, πριν και κατά τη διάρκεια της κύησης (αλλά σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς), γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία της CRH στη φυσιολογία του ενδομητρίου. Τα αδενικά κύτταρα του ενδομητρίου παράγουν CRH και στις δύο φάσεις του κύκλου, με τις συγκεντρώσεις της όμως να είναι σημαντικά υψηλότερες στην ωχρινική απ' ό,τι στην ωοθυλακική φάση, ενώ η παραγωγή CRH από το στρώμα προϋποθέτει την φθαρτοποίηση από την προγεστερόνη. Υποδοχείς CRH εντοπίζονται στο επιθήλιο και το στρώμα του ενδομητρίου (CRH-R1α), το μυομήτριο (CRH-R1) και τον τράχηλο της μήτρας (CRH-R1 και CRH-R2). Η CRH και οι υποδοχείς της έχουν ανιχθευθεί στην τροφοβλάστη και το φθαρτό. Η ρύθμιση έκφρασης του γονιδίου γίνεται θετικά από την προγεστερόνη και αρνητικά από τα οιστρογόνα και την κορτιζόλη, οπότε υπάρχει μια ένδειξη για τη συμμετοχή της αύξησης της κορτιζόλης, λόγω στρες, στην αποτυχία εμφύτευσης.

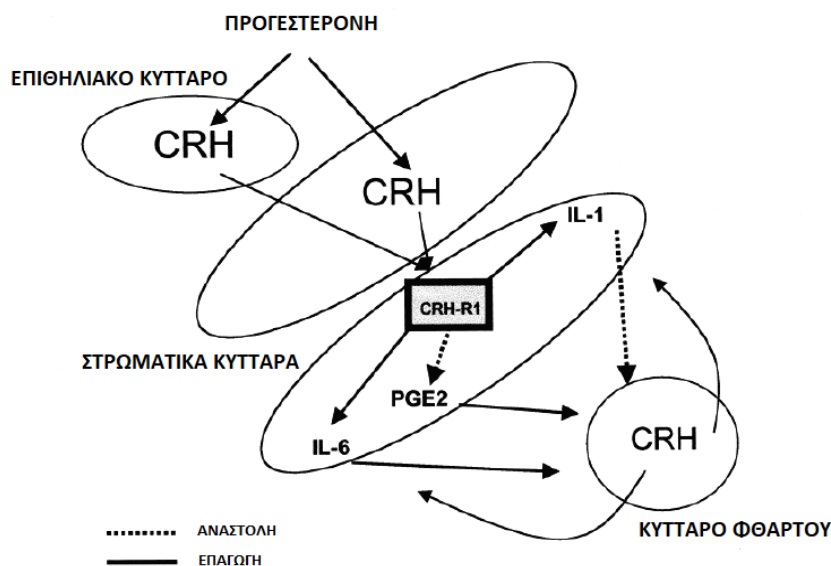
Ο ρόλος της CRH στη φυσιολογία του ενδομητρίου και της κύησης, έχει αρχίσει να μελετάται και να προσδιορίζεται τα τελευταία χρόνια. Δεδομένης της έκφρασης της CRH στο ανοσοποιητικό σύστημα και των ποικίλων ρόλων της στη λειτουργία του, υποθέτουμε ότι η ενδομητρική CRH, από κοινού με τα οπιοειδή, τα προστανοειδή και τις ιντερλευκίνες της μήτρας, συμμετέχει σε βασικότατα φαινόμενα της φυσιολογίας της αναπαραγωγής που λαμβάνουν χώρα σε πρώιμα στάδια της κύησης και συγκεκριμένα: α) σε ενδομητρικά ανοσολογικά/φλεγμονώδη φαινόμενα β) στη ρύθμιση της μυομητρικής συσταλτικότητας γ) στη ρύθμιση της ενδομητρικής νεοαγγείωσης δ) στην εμφύτευση της βλαστοκύστης ε) στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων μέσω μιας νέας βιολογικής οδού που δεν περιλαμβάνει ενδογενή προστανοειδή και στ) στον έλεγχο της φθαρτοποίησης που προκαλείται από την PGE2.

3.4.1 CRH και φθαρτοποίηση του ενδομητρίου

Η έναρξη της φθαρτοποίησης των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου συμβαίνει αυθόρμητα κατά την ωχρινική φάση. Στο ενδομήτριο, ένα φαινόμενο με χαρακτηριστικά σηπτικής φλεγμονώδους αντίδρασης λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του σώματος προς φθαρτό υμένα. Η CRH διεγείρει τη φθαρτοποίηση και ενισχύει τη φθαρτοποιητική επίδραση της προγεστερόνης. Σε διεσπαρμένες ανθρώπινες καλλιέργειες στρωματικών κυττάρων ενδομητρίου, η CRH

καθίσταται ανιχνεύσιμη μόνο μετά τη διαδικασία της φθαρτοποίησης που προκαλείται από ένα μίγμα προγεστερόνης, ρελαζίνης και οιστρογόνων⁶².

Οι προγεστίνες διεγείρουν την έκφραση της CRH του ενδομητρίου με τρόπο που εξαρτάται από το cAMP. Σε στρωματικά κύτταρα, η CRH μπορεί να μεσολαβήσει μέσω του υποδοχέα CRH-R1, στην εξαρτώμενη από το cAMP φθαρτοποιητική δράση της προγεστερόνης, η οποία εμποδίζεται από αναστολείς του cAMP. Εκτός από την προγεστερόνη, αρκετοί τοπικά παραγόμενοι προ-φλεγμονώδεις ανοσολογικοί παράγοντες επίσης ασκούν φθαρτοποιητικές δράσεις. Έτσι, προσταγλανδίνες και ιντερλευκίνες είναι σημαντικά μέλη αυτής της κατηγορίας ρυθμιστών. Το στρώμα του ενδομητρίου παράγει αρκετούς φλεγμονώδεις παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της προσταγλανδίνης E2 (PGE2), της IL-1 και της IL-6. Στον άνθρωπο, η PGE2 ενισχύει την επίδραση της προγεστερόνης στη φθαρτοποίηση, ενώ η IL-1 την αναστέλλει. Έχει διαπιστωθεί ότι η επώαση στρωματικών κυττάρων με CRH επάγει την έκλυση της IL-6 ενώ αναστέλλει αυτήν την PGE2 (Εικόνα 13). Σε κάθε περίπτωση η δράση επιτελείται μέσω του CRH-R1. Η IL-6 με τη σειρά της επάγει την έκλυση του CRH από τα επιθηλιακά κύτταρα, δημιουργώντας θετική παλλίνδρομη ρύθμιση ανάμεσα σε επιθήλιο και στρώμα. Αντίθετα η κατασταλτική δράση της CRH στην έκλυση PGE2, η οποία επίσης επάγει την επιθηλιακή CRH και επιπλέον συμμετέχει θετικά στη φθαρτοποίηση, αντικατοπτρίζει πιθανότατα ένα μηχανισμό ελέγχου της φθαρτοποίησης⁶³.



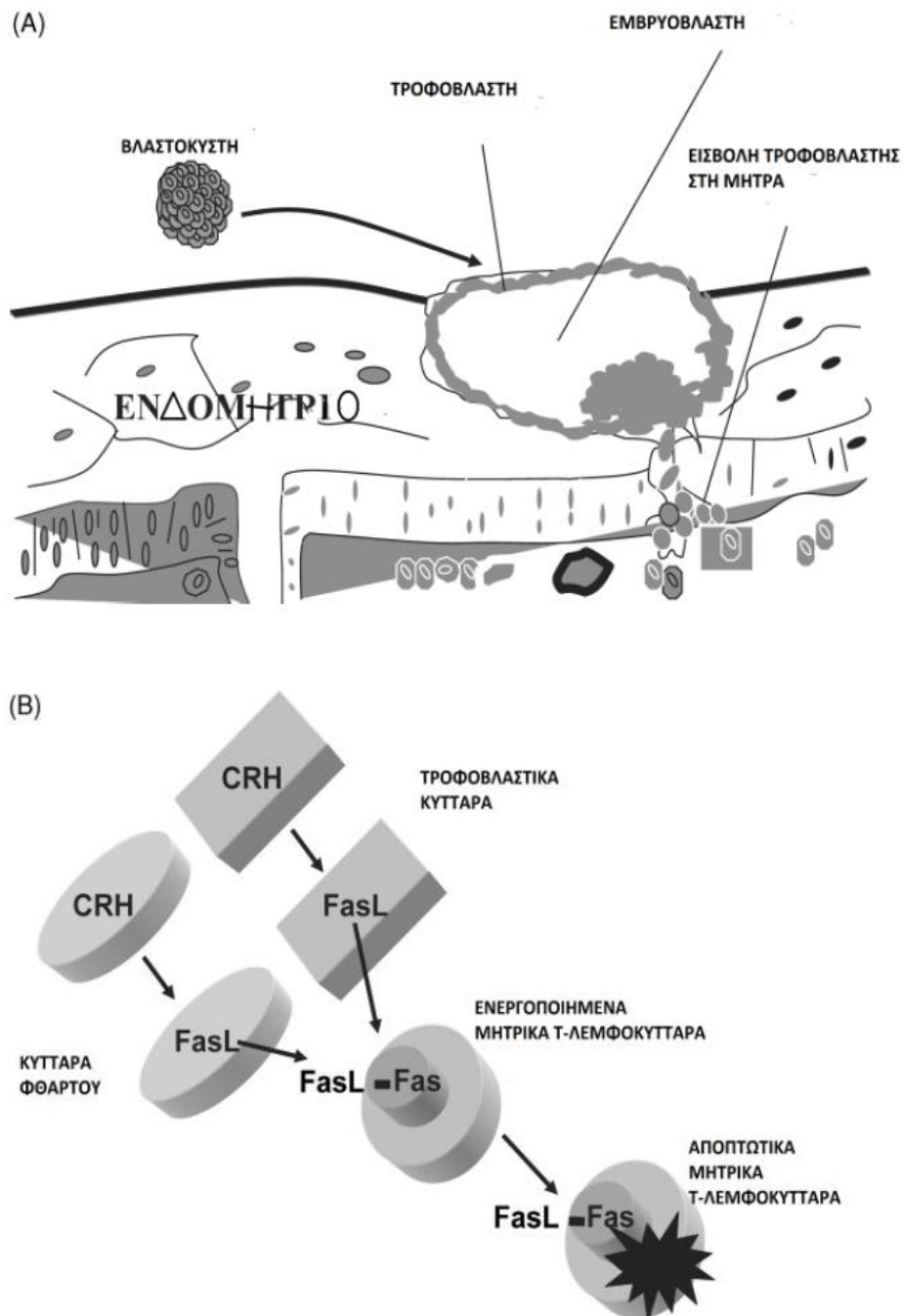
Εικόνα 13 Ενδομητρική CRH υπο τη ρύθμιση της προγεστερόνης

3.4.2 CRH και εμφύτευση βλαστοκύστης

Η εμφύτευση είναι μια δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει χρονικά και τοπικά συντονισμένες αλληλεπιδράσεις πολλών ενδοκρινών, παρακρινών και αυτοκρινών παραγόντων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές απαιτούνται για το συντονισμό της επικοινωνίας μεταξύ της βλαστοκύστης και ενός υποδεκτικού ενδομητρίου. Το παράθυρο εμφύτευσης ορίζεται ως το περιορισμένο χρονικό διάστημα κατά το οποίο το περιβάλλον της μήτρας είναι ευνοϊκό για την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Υπό την επίδραση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων, ένα περίπλοκο δίκτυο πεπτιδίων που δρουν τοπικά, ενεργεί στο ενδομήτριο ώστε να ρυθμίσει την υποδεκτικότητά του, δηλαδή την ικανότητά του να φιλοξενήσει τη βλαστοκύστη. Κατά τη διάρκεια εμφύτευσης της βλαστοκύστης, η ανταπόκριση του μητρικού ενδομητρίου στην εισβολή του ημιαλλομοσχεύματος έχει χαρακτηριστικά οξείας, άσηπτης φλεγμονώδους απόκρισης. Ωστόσο, μόλις το έμβρυο εμφυτευθεί, καταστέλλει την απόκριση αυτή και εμποδίζει την απόρριψη. Ταυτόχρονα το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας καταστέλλει την αντίδραση μοσχεύματος κατά του ξενιστή η οποία προέρχεται από το έμβρυο.

Νωρίς κατά την εγκυμοσύνη, οι θέσεις εμφύτευσης στο ενδομήτριο του αρουραίου, περιέχουν 3,5 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις CRH σε σχέση με τις περιοχές γύρω από το σημείο εμφύτευσης, αποδεικνύοντας το ρόλο της CRH στην διαδικασία. Ο φθαρτός και τα κύτταρα της τροφοβλάστης εκφράζουν και απελευθερώνουν CRH, δηλαδή η CRH παράγεται ταυτόχρονα τόσο από τη μητρική όσο και από την εμβρυϊκή πλευρά της εμφύτευσης. Η CRH διεγείρει την έκφραση του αποπτωτικού μορίου Fas-L στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη και στα μητρικά κύτταρα του φθαρτού στην εμβρυομητρική διάμεση επιφάνεια επικοινωνίας. Ακολούθως προάγεται η απόπτωση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα Fas. Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί κατασταλτικά στην ενεργοποίηση του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος τοπικά και προστατευτικά στην εμβρυϊκής προέλευσης εξωλαχνωτή τροφοβλάστη (**Εικόνα 14**). Η χορήγηση ανταλαρμίνης, ενός ανταγωνιστή των υποδοχέων CRH-R1, σε ποντίκια, μειώνει σημαντικά την έκφραση του Fas-L στην εμβρυϊκή τροφοβλάστη και το μητρικό φθαρτό, τις θέσεις εμφύτευσης και τον αριθμό των ζώντων εμβρύων. Ο αποκλεισμός του CRH-R1 είχε αντι-εμφυτευτικό αποτέλεσμα όταν χορηγήθηκε σε πολύ πρώιμο στάδιο της κύησης. Ωστόσο, η ανταλαρμίνη δεν καταργεί εντελώς την εμφύτευση γεγονός που μαρτυρά την παρουσία και άλλων μηχανισμών. Αυτό ήταν συμβατό με

την παρατήρηση ότι CRH- και CRH-R1-ανεπαρκή ποντίκια δεν είναι απολύτως στείρα. Χορήγηση ανταλαρμίνης στα ποντίκια μετά την ημέρα 5 και μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης δεν είχε καμία αμβλωτική ή τοξική δράση, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι, μεταγενέστεροι μηχανισμοί στήριξης της ανοσοανοχής της μητέρας οι οποίοι επαρκούν για να αποφευχθεί η ολική αποτυχία της εγκυμοσύνης⁶⁶.

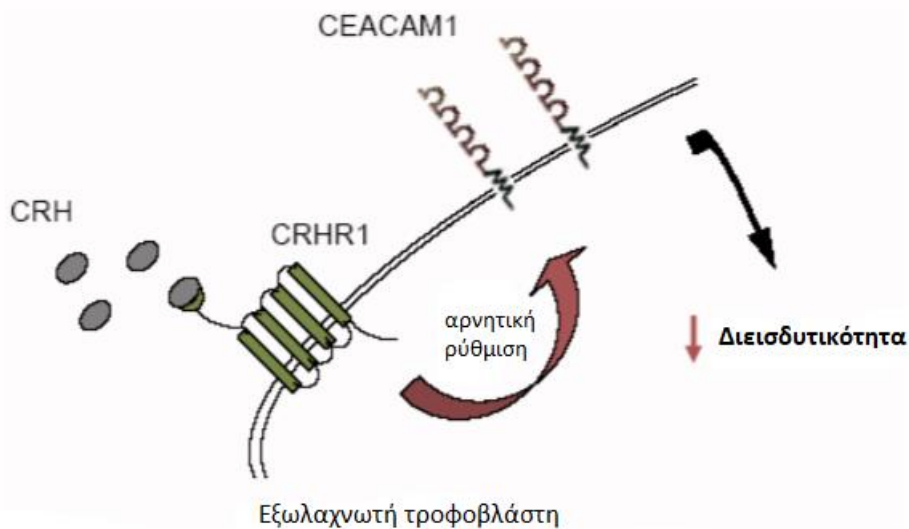


Εικόνα 14 (Α) Η πρώτη φάση της εμφύτευσης. (Β) Η συμμετοχή του συστήματος CRH/Fas στην πρώτη φάση της εμφύτευσης.

3.4.3 CRH και διείσδυση τροφοβλάστης

Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από μελέτες διεισδυτικότητας υποδεικνύουν ότι η CRH αναστέλλει τη διεισδυτικότητα των κυττάρων της εξωλαχνωτής τροφοβλαστης (ΕΛΤ). Η δράση αυτή της CRH διαμεσολαβείται ειδικά από τον υποδοχέα CRH-R1, καθώς η προσθήκη ανταλαρμίνης, ενός ειδικού CRF-R1 αναστολέα, την απέτρεψε πλήρως. Η επίδραση της CRH στη διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών σχετίζεται άμεσα με την ελάττωση της έκφρασης του διασυνδευτικού μορίου CEACAM1 στα κύτταρα αυτά (**Εικόνα 15**). Το πεπτίδιο CEACAM1 εντοπίζεται στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, είναι μέλος της οικογένειας του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ομο- και ετερο-τυπικές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις⁷⁷. Πρόκειται δηλαδή για αλληλεπιδράσεις τόσο με άλλα μόρια CEACAM1 όσο και με διαφορετικά μόρια κυτταρικής διασύνδεσης που βρίσκονται στην επιφάνεια παρακείμενων κυττάρων. Έτσι το CEACAM1 μπορεί να συμμετέχει στους μηχανισμούς που μεσολαβούν στην προσκόλληση της διεισδυτικής τροφοβλάστης στους μητρικούς ιστούς, είτε με την αλληλεπίδραση του με επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου τα οποία επίσης εκφράζουν το ίδιο μόριο, είτε με την πρόσδεση του στην E-σελεκτίνη η οποία εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, για την προώθηση της ενδαγγειακής διείσδυσης⁷⁴.

Η διείσδυση των κυττάρων ΕΛΤ μέχρι το κατάλληλο επίπεδο μέσα στη μήτρα είναι σημαντική για την ομαλή έκβαση της εγκυμοσύνης. Υπέρμετρη διείσδυση μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογική προσκόλληση του πλακούντα στο μυομήτριο (η κατάσταση αυτή ονομάζεται στριφός πλακούντας), στην επέκταση του πλακούντα μέσα στο μυομήτριο, ή στη διείσδυση μέσω του μυομητρίου στο βλεννογόνο της μήτρας ή ακόμα και σε παρακείμενα όργανα. Διαταραχή στη διείσδυση της τροφοβλάστης έχει επίσης ενοχοποιηθεί στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Στην κατάσταση αυτή, το χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό γνώρισμα είναι το αποτέλεσμα της περιορισμένης διάμεσης και ενδαγγειακής διείσδυσης των τροφοβλαστών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα της CRH στο μητρικό πλάσμα έχουν βρεθεί αυξημένα σε περιπτώσεις προεκλαμψίας, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα CRH-R1. Αν και το αίτιο αυτής της αύξησης είναι άγνωστο, έχει προταθεί ότι διαταραχές στη λειτουργία του CRH/CRH-R1 συστήματος μπορεί να ενέχονται στην παθοφυσιολογία της πλακουντιακής ισχαιμίας που χαρακτηρίζει την προεκλαμψία^{75,76,77}.



Εικόνα 15 Σύνοψη της δράσης των CRH και CEACAM1 στη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων ΕΛΤ

3.4.4 CRH και αγγειακή λειτουργία του ενδομητρίου

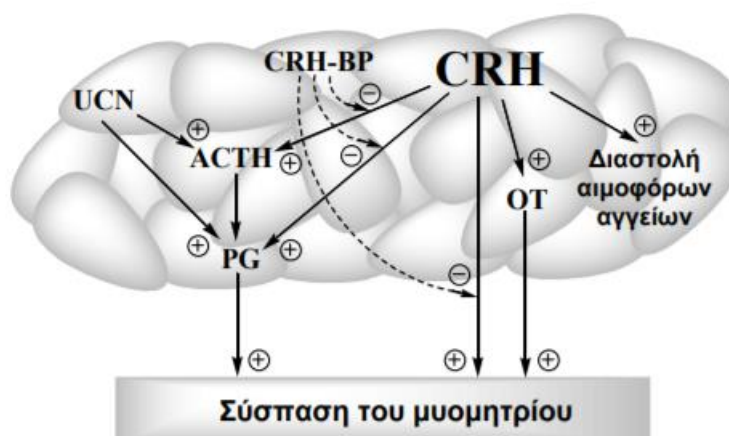
Η CRH ασκεί μια ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση επί της αρτηρίας της μήτρας. Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, υπάρχει μια σημαντική αύξηση στην αγγειακή διαπερατότητα που περιβάλλει το εμφυτευόμενο έμβρυο. Τα ενδομητρικά τριχοειδή αγγεία που βρίσκονται παρακείμενα της πρωτεύοντος ζώνης του φθαρτού, διαστέλλονται. Οι τοπικοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τις αγγειακές μεταβολές στο ενδομήτριο. Πειραματικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ενδομητρική CRH μπορεί να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος αυτών των γεγονότων, τα οποία είναι υπό τον άμεσο έλεγχο των παραγόντων που προέρχονται από τη βλαστοκύστη. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η CRH μπορεί να προκαλέσει αγγειοδιαστολή μέσα στην κοιλότητα της μήτρας είναι μέσω σύνθεσης νιτρικού οξειδίου.

3.4.5 CRH και μυομήτριο

Πέραν του ενδομητρίου η CRH φαίνεται να διαδραματίζει κάποιον ρόλο και στη ρύθμιση του μυομητρίου. Διάφορες isoμορφές των CRH υποδοχέων με διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες έχουν προσδιοριστεί στο ανθρώπινο μυομήτριο. Σύγκριση της συγγένειας των υποδοχέων της CRH του μυομητρίου με εκείνες της υπόφυσης ή της CRH-BP υποδηλώνει ότι, στη μη έγκυο, η ισορροπία για σύνδεση είναι υπέρ της

συνδεδεμένης πρωτεΐνης, αλλά κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της εγκυμοσύνης, μια μεταβολή στην συγγένεια του υποδοχέα μεταβάλλει την δέσμευση υπέρ του μυομητρικού υποδοχέα.

Η CRH μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση των PGE2 και προσταγλανδινών F2α (PGF2α), οι οποίοι είναι ισχυροί επαγωγείς του μυομητρίου. Φαίνεται επίσης, ότι η CRH μπορεί να ρυθμίσει διαφορετικά τη σύνθεση των ενδομητρικών PGE2. Νωρίς στην εγκυμοσύνη, η CRH αναστέλλει την παραγωγή της PGE2 από το στρώμα του ενδομητρίου, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παύση της μυομητριακής δραστηριότητας που είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική εμφύτευση της αναπτυσσόμενης βλαστοκύστης. Αργότερα κατά την εγκυμοσύνη, η CRH διεγείρει τη σύνθεση των PGE2 του πλακούντα και του φθαρτού που ενισχύσουν την ωρίμανση του τραχήλου και τη συσταλτικότητα του μυομητρίου στο πλαίσιο της προετοιμασίας για τον τοκετό^{ha}(**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16 Παρακρινής δράση της CRH επί τον έλεγχο της σύσπασης του μυομητρίου. Συνεχής γραμμή δηλώνει ενεργοποίηση ενώ διακεκομμένη γραμμή αναστολή. (Προσαρμοσμένο από Reis et al., 1999)

3.5 ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗ CRH

Η συγκέντρωση της CRH στο πλάσμα της μητέρας αυξάνει κατά την κύηση, ήδη από την 8^η με 10^η εβδομάδα, φτάνοντας σε 100πλάσια επίπεδα κατά τον όγδοο και ένατο μήνα. Τα επίπεδά της επανέρχονται στο φυσιολογικό μέσα σε 24 ώρες από τον τοκετό. Η αύξηση της CRH είναι αποτέλεσμα της περιφερικής παραγωγής από τη συγκυτιοτροφοβλάστη, το φθαρτό και τις εμβρυϊκές μεμβράνες (κυρίως από τον πλακούντα) και όχι από τον υποθάλαμο της μητέρας. Τα γλυκοκορτικοειδή, οι ευοδωτικές της φλεγμονής κυτοκίνες (IL-1, IL-6, TNF-α) και η ανοξία διεγείρουν την

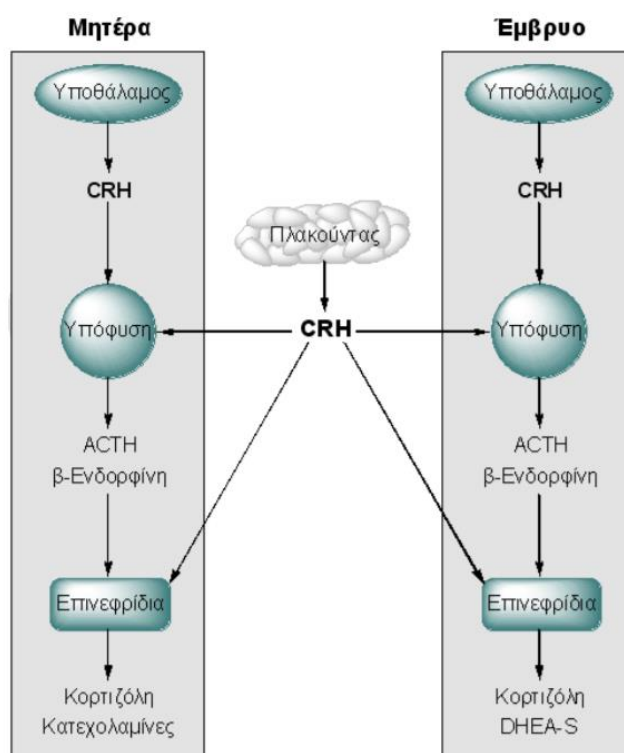
παραγωγή CRH από τον πλακούντα, ενώ τα οιστρογόνα την καταστέλλουν. Στον πλακούντα ανιχνεύονται οι υποδοχείς CRH τύπου 1 και 2. Μοναδικό χαρακτηριστικό της κύησης στον άνθρωπο, αποτελεί η παραγωγή από το ήπαρ και τον πλακούντα της CRH-προσδένουσας πρωτεΐνης (CRH-BP). Η CRH-BP κυκλοφορεί στο πλάσμα και στο αμνιακό υγρό ελαττώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και συνακόλουθα τις συστηματικές επιδράσεις των αυξημένων επιπέδων της CRH. Τα επίπεδα της CRH-BP πλάσματος παραμένουν στα προ κύησης επίπεδα έως το τρίτο τρίμηνο της κύησης. Μεταξύ 34^{ης} και 35^{ης} εβδομάδας ελαττώνονται κατά το 1/3, οδηγώντας σε αύξηση του ελεύθερου κλάσματος της CRH, που φθάνει τη μέγιστη τιμή του κατά τον τοκετό.

3.5.1 Πλακουντιακή CRH και άξονας ΥΥΕ μητέρας και εμβρύου

Το ελεύθερο κλάσμα της CRH διεγείρει την παραγωγή ACTH από τη μητέρα, αποτελώντας το κύριο ερέθισμα για τη δραστηριότητα του μητρικού ΥΥΕ άξονα κατά την κύηση, καθότι οι υποφυσιακές ορμόνες ασκούν μικρή επίδραση μετά την επίτευξη της εμφύτευσης. Στα επινεφρίδια, η παραγωγή κορτιζόλης από τη στηλιδωτή ζώνη αυξάνει λόγω αύξησης της μητρικής ACTH. Η ολική και ελεύθερη κορτιζόλη πλάσματος αυξάνει σταθερά φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στο 3^ο τρίμηνο, όπου παρατηρούνται τιμές 2-3 φορές πολλαπλάσιες των επιπέδων προ της κύησης. Παρόμοια επίπεδα παρατηρούνται στη νόσο του Cushing, τη μείζονα κατάθλιψη, τη νευρική ανορεξία και την υπερβολική άσκηση. Αυτή η υπερκορτιζολαιμία που ακολουθείται από μια παροδική καταστολή της υποθαλαμικής έκκρισης της CRH στην περίοδο μετά τον τοκετό, πιθανώς να μπορεί να εξηγήσει την κατάθλιψη και τα αυτοάνοσα φαινόμενα που μπορούν να συμβούν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η πλακουντιακή CRH επάγει επίσης την αγγειοδιαστολή των αρτηριών της μήτρας και ρυθμίζει την εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία μέσω της ενεργοποίησης της οδού του NO/cGMP.

Η δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα σε συνεργασία με εκείνη του πλακούντα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη, την ωρίμανση και την ομοιοστασία του εμβρύου και τελικά για την προετοιμασία που θα εξασφαλίσει την επιβίωση του νεογέννητου. Η εμβρυϊκή υπόφυση ωριμάζει πρώτη, ενώ η δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα του εμβρύου ξεκινά στο μέσο της κύησης. Η παραγόμενη από τον εμβρυϊκό υποθάλαμο και τον πλακούντα CRH διεγείρει τη σύνθεση ACTH από την υπόφυση του εμβρύου. Η ACTH ελέγχει τη λειτουργική ανάπτυξη του φλοιού των επινεφριδίων του

εμβρύου, παίζοντας ρόλο στην αγγειογένεση και την έκφραση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη στεροειδογένεση. Τα ένζυμα της στεροειδογένεσης είναι αυξημένα στα επινεφρίδια του εμβρύου. Το εμβρυϊκό επινεφρίδιο χαρακτηρίζεται από την παρουσία της εμβρυϊκής ζώνης. Η τελευταία αποτελεί το βασικό τόπο σύνθεσης της DHEA-S, του υποστρώματος δηλαδή της σύνθεσης των οιστρογόνων στον πλακούντα. Στη μεταβατική ζώνη των επινεφριδίων του εμβρύου γίνεται de novo σύνθεση κορτιζόλης μετά την 28^η εβδομάδα της κύησης. Στα τελικά στάδια της κύησης η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξάνεται προς όφελος της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ιδιαίτερα της ωρίμανσης των πνευμόνων.

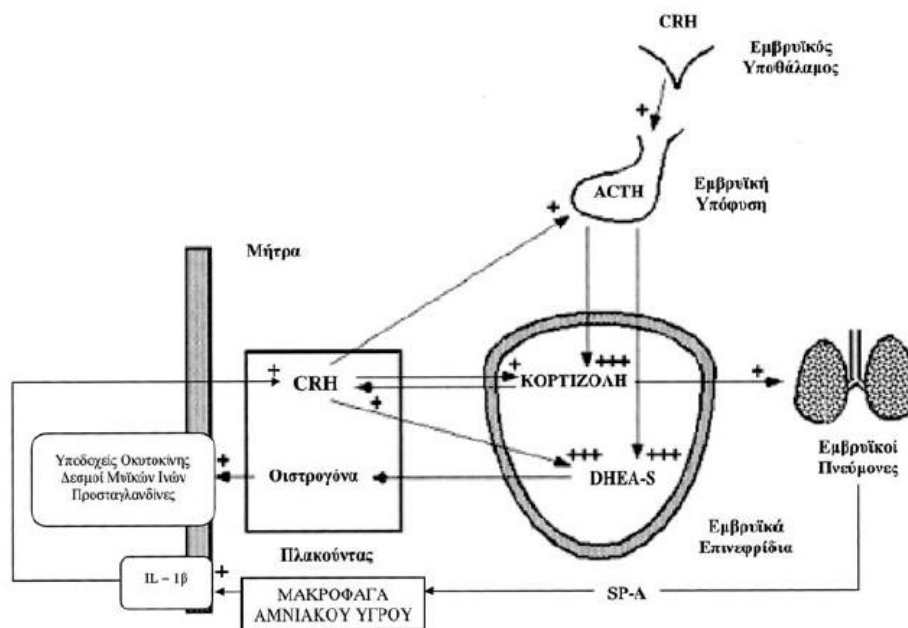


Εικόνα 17 Δράση της CRH του πλακούντα επί του άξονα ΥΥΕ της μητέρας και του εμβρύου (Προσαρμοσμένο από Reis et al., 1999)

3.5.2 Πλακουντιακή CRH και τοκετός

Σύμφωνα με την υπόθεση της παρουσίας ενός βιολογικού ρολογιού κατά τη διάρκεια της κύησης, η CRH του πλακούντα αποτελεί τον αφέτη χρόνο που καθορίζει την εξέλιξη της κύησης και πιθανώς τον χρόνο του τοκετού (πρόωρος, φυσιολογικός, με παράταση). Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της CRH, έχει υποτεθεί η άμεση επίδραση αυτής στην έναρξη του τοκετού. Κατά τον τοκετό αυξάνουν σημαντικά οι τύπου 1 υποδοχείς της CRH στο

μυομήτριο και τις εμβρυϊκές μεμβράνες. Κατά τις τελευταίες ώρες πριν τη γέννηση, η συγκέντρωση της εμβρυϊκής ελεύθερης κορτιζόλης αυξάνει απότομα. Η κορτιζόλη ανταγωνίζεται την προγεστερόνη στη ρύθμιση του γονιδίου της CRH στον πλακούντα κατά το τέλος της κύησης, όπου αντίθετα από ότι συμβαίνει στην υπόφυση η κορτιζόλη δρα ευοδωτικά στην έκκριση της πλακουντιακής CRH. Η κορτιζόλη δρα ακυρώνοντας την ανασταλτική δράση της προγεστερόνης στα ένζυμα που ενεργοποιούν τις προσταγλανδίνες, παίζοντας ρόλο στη ρύθμιση του χρόνου του τοκετού. Τα επινεφρίδια του εμβρύου απαντούν στην παραγόμενη από την εμβρυϊκή υπόφυση ACTH και την CRH του πλακούντα, με την παραγωγή θειϊκής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA-S). Η DHEA-S με τη σειρά της αρωματοποιείται στον πλακούντα σε οιστρογόνα. Η τοπική αύξηση συγκέντρωσης των οιστρογόνων στο αμνιακό υγρό ή η αύξηση του πηλίκου οιστρογόνων/προγεστερόνης ευοδώνει τις συσπάσεις του μυομητρίου. Το έμβρυο σηματοδοτεί την έναρξη του τοκετού μέσω της αυξημένης έκκρισης της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης A (SP-A) από τους πνεύμονες στο αμνιακό υγρό. Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιεί τα μακροφάγα του αμνιακού υγρού με αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης της IL-1β και την ευόδωση των συσπάσεων του μυομητρίου (Εικόνα 18). Κατά τον τοκετό η CRH διαμερισματοποιεί πιθανόν την απάντηση του μυομητρίου προωθώντας της συσπάσεις στον πυθμένα της μήτρας μέσω της σύνθεσης των προσταγλανδινών, ενώ προκαλεί χαλάρωση του κατώτερου τμήματος της μήτρας.



Εικόνα 18 Πλακουντιακή CRH και έναρξη τοκετού

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η προεμφυτευτική ανάπτυξη, η διαδικασία της εμφύτευσης και η δημιουργία του πλακούντα αποτελούν τρία κρίσιμα στάδια για την επιτυχή έκβαση μιας κύησης. Η «αναπαραγωγική» CRH είναι μια μορφή της «στικής» CRH που εντοπίζεται σε περιφερικούς ιστούς και συμμετέχει σε όλες τις επιμέρους λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Ένας από τους σημαντικότερους βιολογικούς ρόλους της αναπαραγωγικής CRH είναι η συμμετοχή της στην εμφύτευση της βλαστοκύστης και στις λειτουργίες του πλακούντα. Η πιθανότητα να διαδραματίζει κάποιον ρόλο και στην προεμφυτευτική εμβρυϊκή ανάπτυξη μένει να διερευνηθεί μελλοντικά. Η CRH δρα στα κύτταρα-στόχους της με τη βοήθεια δύο διαφορετικών υποδοχέων: του CRH-R1 και του CRH-R2. Ένας μικρός αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι το στρες επηρεάζει σημαντικά την προεμφυτευτική αλλά και μετεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων του ποντικίου, ωστόσο ο μηχανισμός με τον οποίο το στρες επιδρά στο προ-έμβρυο κατά την παραμονή του στον ωαγωγό παραμένει άγνωστος. Έτσι, μένει να διερευνηθεί εάν τα αυξημένα επίπεδα της CRH σε καταστάσεις στρες επηρεάζουν άμεσα ή εμμεσα την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Επιπλέον, η κατανόηση της δράσης της CRH μέσω των υποδοχέων της στη διαδικασία της εμφύτευσης είναι υψίστης σημασίας για την εξέλιξη της φαρμακευτικής αντιμετώπισης καθ' ἑξιν αποβολών που οφείλονται σε αποτυχία εμφύτευσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των δύο κύριων υποδοχέων της CRH, CRH-R1 και CRH-R2, σε έμβρυα ποντικίου στο στάδιο των 2, 4 και 8 κυττάρων και βλαστοκύστης. Για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση εμβρύων ποντικού στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Ακολούθησε η απομόνωση του ολικού mRNA των εμβρύων, η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης και τέλος η εφαρμογή της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ MUS MUSCULUS

Αρχή της μεθόδου

Η επίτευξη της γονιμοποίησης των ποντικών αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό στάδιο της μελέτης. Οι ωοθήκες των θηλυκών αρχικά διεγείρονται εξωγενώς με σκοπό την πολλαπλή ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων τους. Ακολουθεί το ζευγάρωμα των θηλυκών με τους αρσενικούς ποντικούς και η γονιμοποίηση.

Υλικά

- 20 θηλυκά και 20 αρσενικά ποντίκια, όλα F1 υβρίδια από τη διασταύρωση C57BL/6♀xCBA♂ γονέων
- PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Chemical Co): χρησιμοποιείται για πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας.
- HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma Chemical Co): συμβάλλει στην ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων και την παραγωγή στεροειδών από τις γονάδες

Πειραματική διαδικασία

Τα πειραματόζωα διατηρήθηκαν μέχρι τη στιγμή της θυσίας τους στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Pasteur) σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας, συγκεκριμένων περιόδων εναλλαγής φωτός-σκότους και χωρίς περιορισμό στην πρόσληψη τροφής και νερού, σύμφωνα με το αυστηρό πρωτόκολλο εκτροφής που τηρεί το εν λόγω Ινστιτούτο. Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στα θηλυκά ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων πραγματοποιήθηκε μέσω ενέσιμης ενδο-κοιλιακής χορήγησης 5 IU γοναδοτροπίνης από ορό κυοφορούσας φοράδας (PMSG, SigmaChemicalCo). Μετά από 48 ώρες ακολούθησε η χορήγηση 5 IU HCG (Human Chorionic Gonadotropin, ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη), η οποία συμβάλλει στη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων και την παραγωγή στεροειδών από τις γονάδες. Για την επίτευξη της κύησης, θηλυκοί και αρσενικοί ποντικοί τοποθετήθηκαν στο ίδιο κλουβί σε αναλογία 1:1. Μετά το πέρας

της νύχτας (20 ώρες μετά), διαπιστώθηκε η σεξουαλική συνεύρεση μέσω παρατήρησης για την ύπαρξη σχηματισθέντος κολπικού «πώματος». Για τη συλλογή του βιολογικού υλικού τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με έκταση του αυχένα.

2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥΣ IN VITRO

Αρχή της μεθόδου

Για τη συλλογή προ-εμβρύων ποντικού οι θηλυκοί ποντικοί θυσιάζονται και αφαιρούνται οι σάλπιγγές τους. Με παρακέντηση συλλέγονται τα γονιμοποιημένα ωάρια που βρίσκονται στο στάδιο του ζυγώτη και μεταφέρονται σε καλλιεργητικό μέσο όπου συνεχίζεται η διαίρεσή τους.

Υλικά και συσκευές

- DPBS pH 7,3 (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1x, Gibco): χρησιμοποιείται στο καλλιεργητικό υλικό ως θρεπτικό μέσο. Περιέχει φωσφορικά ιόντα καλίου σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου.
- BSA (Bovine Serum Albumin, παράγοντας V, Sigma-Aldrich): χρησιμοποιείται στο καλλιεργητικό υλικό ως θρεπτικό μέσο. Είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία προέρχεται από τα βοειδή.
- Υαλουρονιδάση: επιτυγχάνει τον καθαρισμό των εμβρύων απομονώνοντας τα κοκκώδη κύτταρα
- Ham's καλλιεργητικό μέσο (Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine, Gibco)
- Τρυβλία petri 60x15 mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)
- Στερεοσκόπιο
- Κλίβανος (ρυθμισμένες συνθήκες: 37 °C, 5% CO₂ και 95% υγρασία)

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, έγινε προετοιμασία του πάγκου εργασίας με τοποθέτηση δοχείου με οινόπνευμα και φιλτραρισμένο αποστειρωμένο νερό σε αναλογία 1:1, ανατομικής λαβίδας, χειρουργικού ψαλιδιού, λαβίδας μικροχειρουργικής και καλλιεργητικού τρυβλίου με DPBS εμπλουτισμένο με BSA σε αναλογία 9:1. Τα γονιμοποιημένα θηλυκά θυσιάστηκαν με «αυχενική μετατόπιση», που είχε ως αποτέλεσμα τη διατομή της αυχενικής μοίρας του νωτιαίου μυελού. Μετά τη διάνοιξη της περιτοναϊκής

κοιλότητας αφαιρέθηκαν οι ωαγωγοί, οι οποίες τοποθετήθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα DPBS/BSA. Οι ωαγωγοί έχουν χαρακτηριστική μορφή σπειράματος και εμπεριέχουν τα γονιμοποιημένα ωάρια.

Ακολούθησε η απομόνωση των γονιμοποιημένων ωαρίων (προ-εμβρύων), με μηχανικό διαχωρισμό, ο οποίος έγινε με τη χρήση λαβίδας που συγκρατεί τον ωαγωγό και υποδερμικής βελόνας που τεμαχίζει τον ωαγωγό και επιτρέπει τη διάνοιξή του. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή παρακολούθηση στο στερεοσκόπιο. Στο κέντρο καλλιεργητικού τρυβλίου προστέθηκαν 10μL υαλουρονιδάσης. Τα γονιμοποιημένα ωάρια επώαστηκαν για 30sec με την υαλουρονιδάση προκειμένου να απαλλαγθούν από τα κοκκώδη κύτταρα της περιφέρειας. Στη συνέχεια αναρροφήθηκαν με γύλινη πιπέτα και ακολούθησε η διαδικασία 2-3 πλύσεων σε καινούργια καλλιεργητικά τρυβλία με διάλυμα DPBS/BSA. Τα προ-έμβρυα τοποθετήθηκαν τελικά ανά ομάδες των 20 εμβρύων στο κέντρο καλλιεργητικών τρυβλίων τα οποία περιείχαν 1mL καλλιεργητικού μέσου Ham's και 5mg/mL BSA σε αναλογία 9:1. Για τη διατήρηση της υγρασίας προστέθηκαν 4mL καλλιεργητικού μέσου στην περιφέρεια κάθε τρυβλίου. Τα τρυβλία με τα προ-έμβρυα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με ρυθμισμένες συνθήκες: 37 °C, 5% CO₂ και 95% υγρασία.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

Αρχή της μεθόδου

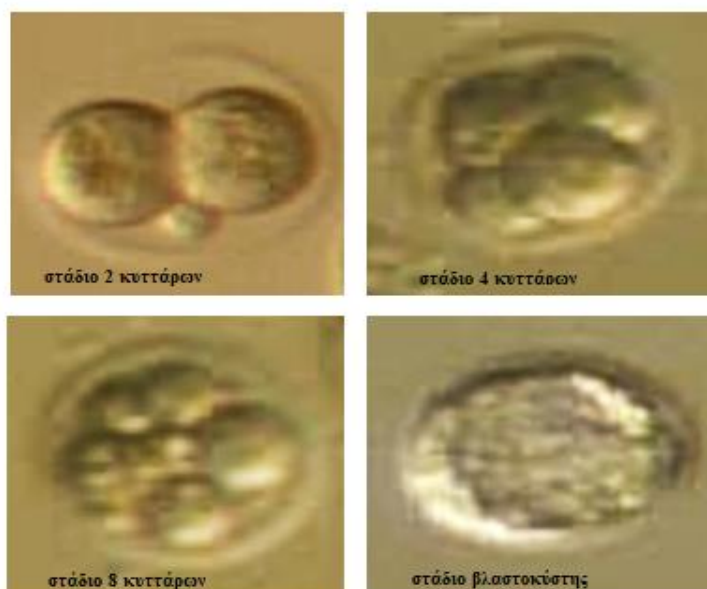
Για τους σκοπούς της μελέτης απομονώνεται ένας επιθυμητός αριθμός προ-εμβρύων από κάθε αναπτυξιακό στάδιο ενδιαφέροντος. Τα προ-έμβρυα φυλάσσονται σε κατάλληλες συνθήκες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

Υλικά

- RNA later: αναστέλλει την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου, το σταθεροποιεί και το προστατεύει στις συνθήκες κατάψυξης (-80°C)
- Σωληνάρια eppendorf των 1,5 mL

Πειραματική διαδικασία

Τα προ-έμβρυα που συλλέχθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης ήταν στο στάδιο των 2, 4 και 8 κυττάρων και στο στάδιο μοριδίου-βλαστοκύστης. Τα προ-έμβρυα σταδίου μοριδίου και βλαστοκύστης εξετάστηκαν ως μία ομάδα λόγω των βραχέων χρονικών διαστημάτων εξέλιξης που τα χωρίζουν. Η αξιολόγηση της πρόωμης εμβρυϊκής ανάπτυξης γινόταν κάθε 24 ώρες από την έναρξη της καλλιέργειας και ολόκληρη η διαδικασία ολοκληρώθηκε σε 96 ώρες. Κατά τη διάρκεια κάθε αξιολόγησης υπό το στερεοσκόπιο γινόταν ταυτόχρονα και η συλλογή προ-εμβρύων στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια ενδιαφέροντος. Τα προ-έμβρυα τοποθετήθηκαν ανά 10 σε σωληνάρια erpendorf των 1,5 mL μαζί με 20μL RNA later το οποίο σταματάει την περαιτέρω εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα προ-έμβρυα φυλάχθηκαν στη συνέχεια στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους.



Εικόνα 19 Έμβρυα ποντικού στο στάδιο 2, 4, 8 κυττάρων και βλαστοκύστης, όπως παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο

Πίνακας 2 Ημέρες κατά τις οποίες ελήφθησαν τα διάφορα εμβρυϊκά στάδια στην παρούσα μελέτη

| Εμβρυϊκό στάδιο | Ημέρες μετά τη γονιμοποίηση |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Στάδιο ενός κυττάρου (ζυγώτης) | 0-1 |
| Στάδιο 2 κυττάρων | 1 |
| Στάδιο 4 κυττάρων | 2 |
| Στάδιο 8 κυττάρων | 2 |
| Στάδιο μοριδίου-βλαστοκύστης | 4 |

2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιείται με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου πακέτου αντιδραστηρίων (NucleoSpin® RNA XS), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκεκριμένο «kit» είναι κατάλληλο για την απομόνωση ολικού RNA (έως 45μg) από 1 έως 500.000 κύτταρα. Η μεθοδολογία του kit συνδυάζει τις ιδιότητες της επιλεκτικής σύνδεσης μιας ειδικής μεμβράνης που έχει ως βάση το διοξείδιο του πυριτίου με την ταχύτητα της τεχνολογίας της μικρο-περιστροφής (microspin technology). Ίχνη DNA που πιθανόν ανευρίσκονται κατά την απομόνωση του ολικού RNA απομακρύνονται μετά από επεξεργασία με δεσοξυριβοζονουκλεάση (DNase). Με τον τρόπο αυτό απομονώνονται μόρια RNA που απαρτίζονται από περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια, γεγονός που ευνοεί την απομόνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), καθώς το ριβοσωμικό (rRNA, ribosomal RNA) και το μεταφορικό (tRNA, transfer RNA), τα οποία αποτελούν συνολικά το 15-20% του ολικού RNA, απαρτίζονται από λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια και ως εκ τούτου εξαιρούνται από τη διαδικασία της απομόνωσης. Όλα τα στάδια της απομόνωσης του ολικού RNA γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου 15-25°C, ενώ όλα τα στάδια της φυγοκέντρησης σε θερμοκρασία 20-25°C.

Υλικά και συσκευές

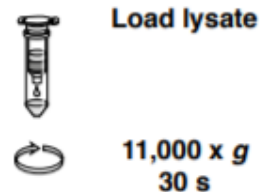
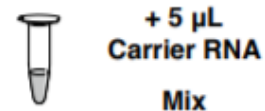
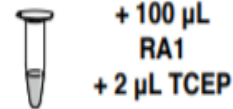
- RA1 (Lysis Buffer): χρησιμοποιείται για τη διάλυση των κυτταρικών δομών και την ομογενοποίηση των κυττάρων
- TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine): αποδιατακτικό διάλυμα. Πρόκειται για έναν αναγωγικό παράγοντα ο οποίος χρησιμοποιείται για τη λύση και την ομογενοποίηση των κυττάρων.
- Carrier RNA working solution: χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή ακόμη και μικρής ποσότητας RNA
- Μωβ στήλη (NucleoSpin® Filter – violet ring): συγκρατεί το DNA
- 70% EtOH (αιθανόλη 70%): ρυθμίζει τις συνθήκες προσκόλλησης του RNA και την κατακρήμνισή του.
- Μπλε στήλη (NucleoSpin® RNA XS Column - light blue ring): συγκρατεί το RNA







- DNase: ένζυμο το οποίο υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο DNA οδηγώντας στην αποκοδόμησή του.
- Ρυθμιστικό διάλυμα για την DNase
- MDB (Membrane Desalting Buffer) χρησιμοποιείται για την αφαλάτωση και την απομάκρυνση όλων των συστατικών πέραν του RNA.
- RA2 Buffer: αδρανοποιεί την rDNase.
- RA3 (Wash Buffer): χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πιθανών υπολλειμάτων.
- dH₂O
- Vortex
- Φυγόκεντρος
- Καταψύκτης

Πειραματική διαδικασία

Το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA, το οποίο ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- 1. Παραλάβη βιολογικού υλικού από τους -80°C**
- 2. Λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων:** προσθήκη **100μL Buffer RA1** και **2μL TCEP** στα δείγματα εμβρύων και ανάμιξη με τη χρήση αυτόματου αναδευτήρα τύπου δίνης (vortex) 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα. Η ομογενοποίηση συμβάλλει στην ελάττωση της γλοιότητας του προϊόντος της κυτταρικής λύσης.
- 3. Προσθήκη Carrier RNA:** προσθήκη **5 μL Carrier RNA working solution** και ανάμιξη με τη χρήση vortex 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα.
- 4. Διήθηση διαλύματος λύσης:** τοποθέτηση **μωβ στήλης** σε σωληνάριο συλλογής των 2mL, μεταφορά όλης της ποσότητας του μίγματος, πωματισμός και φυγοκέντρηση για 30s στα 11.000g. Κατά τη διεργασία αυτή απομακρύνονται κυτταρικά συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους.



5. **Ρύθμιση της δεσμευτικής ικανότητας του RNA:** απόρριψη του **NucleoSpin® Filter (violet ring)**, προσθήκη **100 μL αιθανόλης 70%** στο προϊόν της κυτταρικής λύσης και ανάμιξη με πιπέτα (5 φορές).  **+ 100 μL
70% EtOH
Mix**
6. **Δέσμευση RNA:** τοποθέτηση της **μπλε στήλης** σε σωληνάριο συλλογής, μεταφορά του προϊόντος λύσης στη στήλη, πωματισμός και φυγοκέντρηση στα **11.000g** για **30 sec**. Η στήλη αυτή έχει ως βάση το διοξείδιο του πυριτίου.  **11,000 x g
30 s** 
7. **Έκπλυση της μεμβράνης πυριτίου:** προσθήκη **100μL MDB**, πωματισμός του σωληναρίου και φυγοκέντρηση για **30 sec** στα **11.000g** ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Επαναχρησιμοποίηση του σωληναρίου συλλογής και στο επόμενο βήμα.  **+ 100 μL
MDB**  **11,000 x g
30 s**
8. **Δημιουργία μίγματος επώασης με βάση τη δεσοξυριβονουκλεάση (DNase):** σε αποστειρωμένο σωληνάριο προστίθενται **3μL ανασυσταμένης rDNase** σε **27μL ρυθμιστικού διαλύματος για την rDNase**. Ήπια ανάμιξη με απλή αναστροφή του σωληναρίου (αποφυγή χρήσης vortex καθώς το ένζυμο αυτό είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε φυσικούς χειρισμούς).
9. **Πέψη DNA:** τοποθέτηση **25μL του μίγματος επώασης με βάση τη DNase** με πιπέτα απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης. Μετά την ενστάλαξη το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για **15 λεπτά**.  **+ 25 μL
rDNase
reaction
mixture**
**RT
15 min**
10. **Πρώτη έκπλυση:** προσθήκη **100 μL Buffer RA2** στη στήλη η οποία είναι τοποθετημένη σε καινούργιο σωληνάριο. Πωματισμός του σωληναρίου και παραμονή του σε θερμοκρασία δωματίου για **2 λεπτά**. Έπειτα, φυγοκέντρηση για **30 sec** στα **11.000g**. Απόρριψη του υποκείμενου διηθήματος. Το Buffer RA2 αδρανοποιεί την rDNase. **+ 100 μL
RA2**
**RT
2 min**
**11,000 x g
30 s**

11. Δεύτερη έκπλυση: προσθήκη **400μL Buffer RA3** στη στήλη, πωματισμός του σωληναρίου και φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000g. Απόρριψη του υποκείμενου διηθήματος και επαναχρησιμοποίηση του σωλήνα συλλογής στο επόμενο βήμα.



+ 400 μL
RA3



11,000 x g
30 s

12. Τρίτη έκπλυση: προσθήκη **200μL Buffer RA3** στη στήλη πωματισμός του σωληναρίου και φυγοκέντρηση για 2 min στα 11.000g ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο, απαλλαγμένο από νουκλεάσες σωληνάριο συλλογής των 1,5mL.

+ 200 μL
RA3

11,000 x g
2 min

13. Έκπλυση RNA υψηλής καθαρότητας: προσεκτική ενστάλαξη **10μL H₂O (RNase-free)**, πωματισμός σωληναρίου και φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000g. Απόρριψη της στήλης.



+ 10 μL
RNase-free
H₂O



11,000 x g
30 s

14. Φύλαξη του RNA στους -80°C.

2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

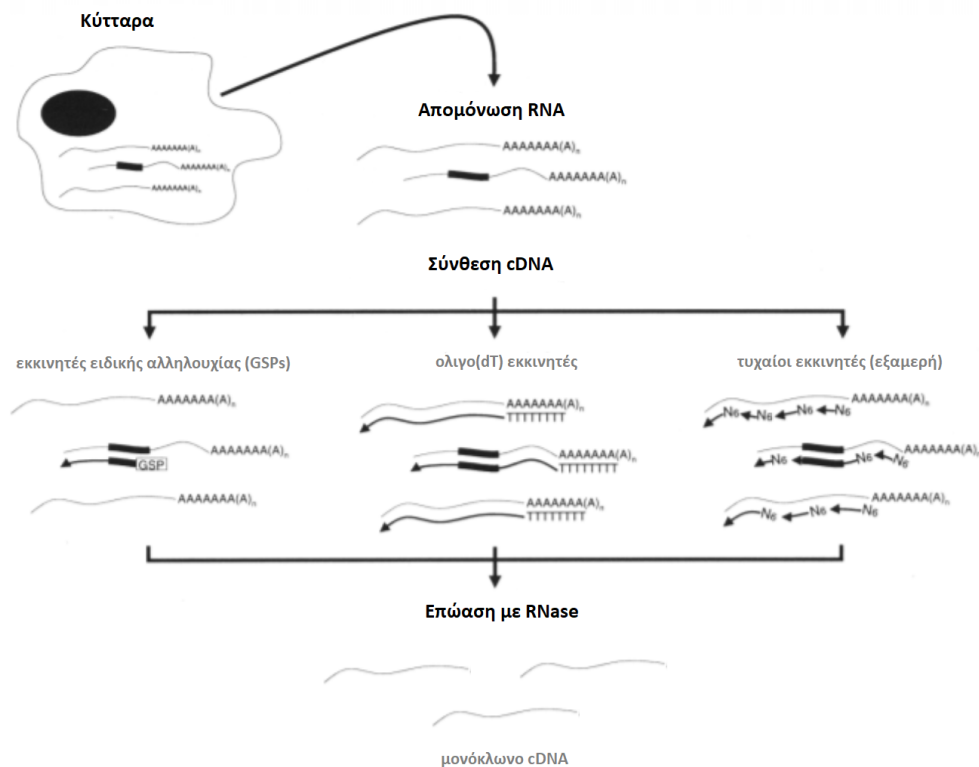
Αρχή της μεθόδου

Το ολικό RNA που απομονώνεται από τα προ-έμβρυα αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής δημιουργείται μια cDNA βιβλιοθήκη. Η σύνθεσή της αντανακλά το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στον κυτταρικό πληθυσμό από τον οποίον απομονώθηκε το mRNA. Έτσι, οι cDNA βιβλιοθήκες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα της έκφρασης κάθε γονιδίου.

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκαν μόρια RNA που απαρτίζονται από περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια, ώστε το ριβοσωμικό (rRNA) και το μεταφορικό (tRNA), τα οποία συνίστανται από μικρότερο αριθμό νουκλεοτιδίων, αποκλείστηκαν με τη διαδικασία αυτή. Συνεπώς το απομονωθέν RNA αποτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Ωστόσο, ακόμα και αν στο τελικό προϊόν ανευρίσκεται μια ποσότητα rRNA ή tRNA, αυτά δεν αποτελούν υπόστρωμα προς σύνθεση του cDNA κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, αφού ως εκκινητής

χρησιμοποιείται μικρή αλληλουχία δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, αποτελούμενη από περίπου 20 μονοφωσφορικές θυμιδίνες, οι οποίες προσδένονται στο mRNA λόγω της αλληλουχίας αδενίνης poly-A που διαθέτει στο 3' άκρο του. Στη συνέχεια η αντίστροφη μεταγραφή αντιγράφει το RNA σε μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, σχηματίζοντας έτσι μια υβριδική έλικα DNA/RNA. Η έκθεση της υβριδικής έλικας DNA/RNA σε αλκαλικό διάλυμα οδηγεί σε εκλεκτική αποδόμηση του RNA κλώνου στα επιμέρους νουκλεοτίδια του. Κατόπιν, το μονόκλωνο cDNA αντιγράφεται σε δίκλωνο cDNA από το ένζυμο DNA πολυμεράση.

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο Superscript II First Strand Synthesis System for RT-PCR, της εταιρίας Invitrogen. Το kit αυτό είναι κατάλληλο για χρήση σε δείγματα από 1ng έως 5mg mRNA, ενώ η σύνθεση του cDNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τυχαίους εκκινητές (εξαμερή), είτε με ολιγο(dT) εκκινητές, είτε με ειδικούς εκκινητές για την αλληλουχία ενδιαφέροντος (GSPs) (Εικόνα 20). Για τη δεδομένη πειραματική διαδικασία επιλέγεται σύνθεση του συμπληρωματικού DNA με χρήση τυχαίων εξαμερών ως εκκινητών. Η μέθοδος των τυχαίων εξαμερών είναι η πιο μη ειδική, όσον αφορά τους εκκινητές και εφαρμόζεται όταν το mRNA βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση.



Εικόνα 20 Σύνθεση cDNA με τρεις διαφορετικές μεθόδους

Υλικά και συσκευές

- dNTPs (deoxynucleotides-ATP, GTP, TTP, CTP): απαιτούνται για τον υβριδισμό.
- Τυχαία εξαμερή: δρουν ως εκκινητές για την έναρξη της σύνθεσης του πρώτου κλώνου cDNA.
- RT-Buffer 10x (Real Time Buffer)
- MgCl₂: αποτελεί συμπράγοντα της αντίστροφης μεταγραφάσης και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας στο διάλυμα.
- DTT (διθειοθρεϊτόλη): πρόκειται για αντιδραστήριο οξειδοαναγωγής, το οποίο καταστρέφει τους δισουλφιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της δευτεροταγούς δομής του RNA, ενώ παράλληλα προστατεύει τις ομάδες θειόλης του DNA.
- RNaseOUT (Recombinant RNase Inhibitor): προστατεύει από την υποβόθμιση του RNA στόχου εξαιτίας της επιμόλυνσης από τη ριβονουκλεάση.
- SS RT (Superscript II Reverse Transcriptase): ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση του cDNA.
- E. coli RNase H: αποικοδομεί την αλυσίδα του RNA ενός RNA/DNA υβριδίου.
- Θερμοκυκλοποιητής

Πειραματική διαδικασία

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του πακέτου αντιδραστηρίων, χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο πειραματικό πρωτόκολλο:

1. Παραλαβή του RNA από τους -80°C και προσωρινή τοποθέτηση του σε cooler.
2. Παρασκευή για κάθε αντίδραση ενός μίγματος (1) το οποίο περιέχει:
 - i. 4μL RNA
 - ii. 1μL dNTP mix 10mM
 - iii. 5μL τυχαία εξαμερή (50ng/μL)
3. Τοποθέτηση του eppendorf με το μίγμα (1) στον κυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια παραμονή του στο cooler για τουλάχιστον 1 λεπτό

ακόμα. Με τον τρόπο αυτό, αποδιατάσσεται κάθε δευτεροταγής δομή του RNA στο αρχικό δείγμα. Αποφεύγεται η προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης και του αναστολέα της ριβονουκλεάσης στο στάδιο αυτό, λόγω του κινδύνου μετουσίωσης αυτών από την υψηλή θερμοκρασία με πιθανή συνέπεια τη μείωση της δραστηριότητά τους. Επιπλέον, αποφεύγεται η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης καθώς περιέχει δισθενή κατιόντα που μπορεί να επιφέρουν αλλοιώσεις στο RNA με την άνοδο της θερμοκρασίας.

4. Παρασκευή για κάθε αντίδραση ενός μίγματος (2) το οποίο περιέχει:
 - i. 2μL RT buffer 10X
 - ii. 4μL MgCl₂ 25mM
 - iii. 2μL DTT 0,1mM
 - iv. 1μL RNaseOUT (40U/μL)
5. Ανάμιξη του μίγματος (1) με το μίγμα (2), ήπια ανάδευση με πιπέττα και επώαση του νέου μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2min.
6. Προσθήκη στο μίγμα 1μL SuperScript II RT και εν συνεχεία επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
7. Τοποθέτηση του μίγματος στο θερμοκυκλοποιητή στους 42°C για 50min και έπειτα στους 70°C για 15min. Ακολουθεί παραμονή του μίγματος στο cooler.
8. Προσθήκη στο μίγμα 1μL RNase H, με σκοπό την απομάκρυνση των προσωρινών τμημάτων RNA από τα υβρίδια cDNA/RNA και την αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20min.
9. Αποθήκευση του δείγματος στους -20°C μέχρι τη χρήση.

2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ

ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL-TIME PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η Real Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR, δηλαδή επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό με πολλαπλούς γύρους αντιγραφής της αλληλουχίας-στόχου, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων

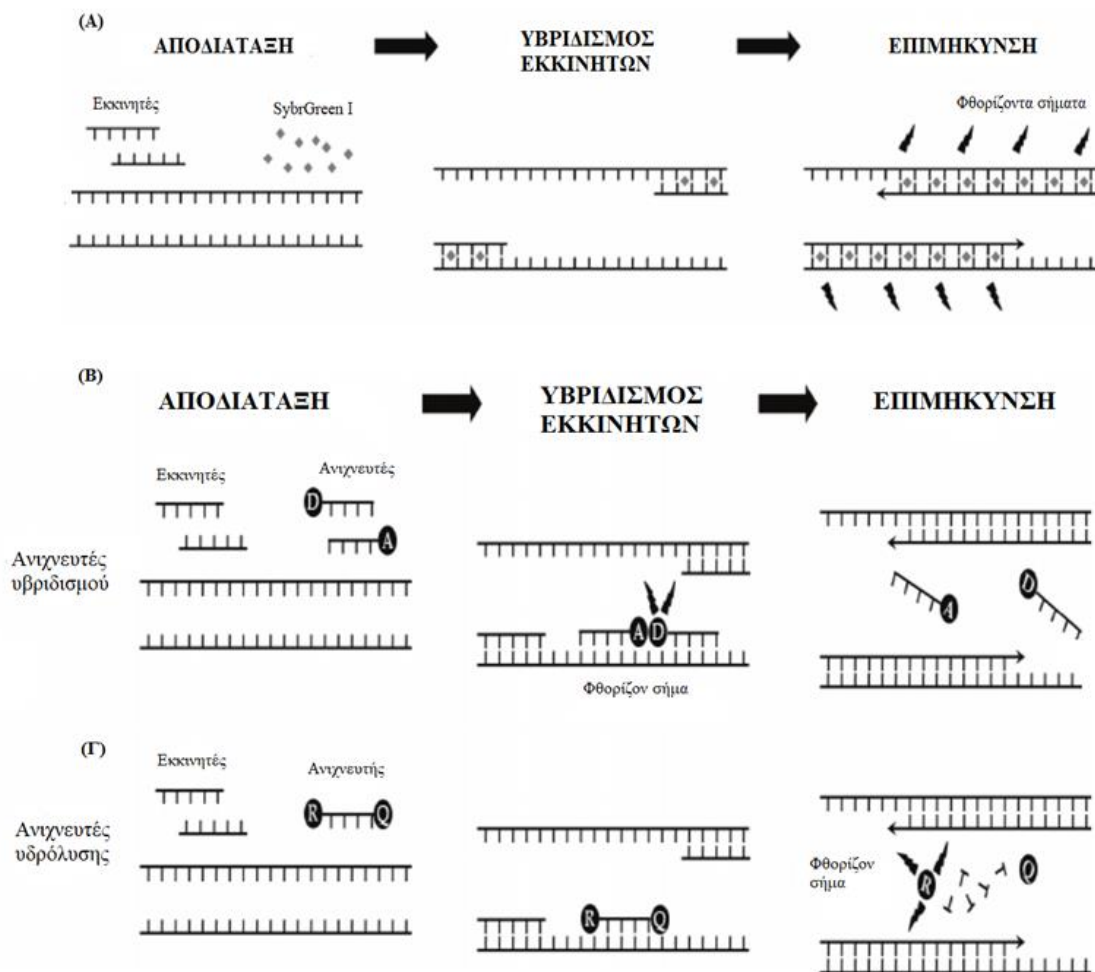
τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA, στα άκρα της αλληλουχίας στόχου σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Ωστόσο, ως μέθοδος παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, αλλά και προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων, διότι χρησιμοποιεί φθορίζοντες ανιχνευτές.

Οι ανιχνευτές είναι ευαίσθητα φθορίζοντα oligονουκλεοτίδια, ειδικά σχεδιασμένα ώστε να υβριδίζονται με την αλληλουχία στόχο και να εκπέμπουν φθορίζοντα σήματα. Τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια των κύκλων της Real-Time PCR, συσχετίζονται με την ποσότητα του προϊόντος που υπάρχει στην αντίδραση, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον άμεσο υπολογισμό της ποσότητας της νουκλεϊκής αλληλουχίας-στόχου. Τα πιο κοινά συστήματα ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στη Real-Time PCR είναι: α) η SYBR green I χρωστική, β) οι ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis probes) και γ) οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes).

Η SYBR green I είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520nm. Η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσής της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (**Εικόνα 21-A**).

Στο σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές υβριδισμού χρησιμοποιούνται τέσσερα oligονουκλεοτίδια: δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο προϊόν της αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις. Επιπλέον, ο πρώτος ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δότης ενέργειας, ενώ ο άλλος ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δέκτης ενέργειας. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, οι δύο ανιχνευτές προσδένονται στο προϊόν, με αποτέλεσμα τη γειτνίαση των δύο φθορίζόντων μορίων και τη μεταξύ τους μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού (FRET). Η μεταφορά ενέργειας από την μια χρωστική (δότης) στην άλλη (δέκτης) οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού DNA που παράγεται κατά την αντίδραση (**Εικόνα 21-B**).

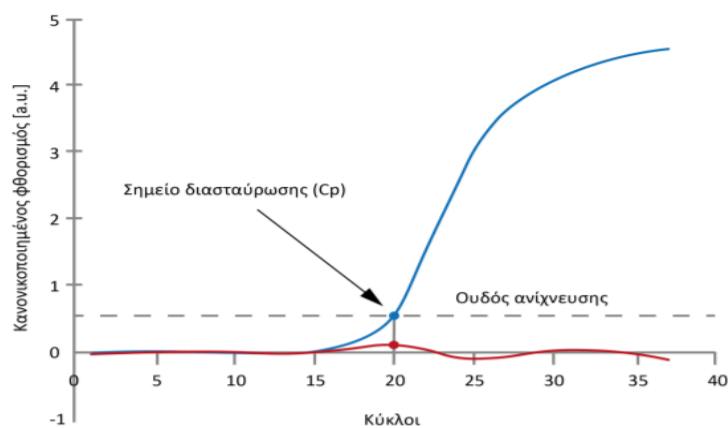
Στο σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές υδρόλυσης γίνεται χρήση τριών ολιγονουκλεοτιδίων: δύο εκκινητών και ενός ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές υδρόλυσης είναι ολιγονουκλεοτίδια που αναγνωρίζουν και προσδέονται ειδικά σε εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR. Φέρουν στο 5' άκρο τους μια χρωστική που φθορίζει και στο 3' άκρο τους μια δεύτερη χρωστική η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη. Έτσι, όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος δεν παρατηρείται φθορισμός. Όμως, ο πολυμερισμός κατά την αντίδραση ενίσχυσης, οδηγεί στην αποκοπή του άκρου του άκρου του ανιχνευτή, από τη πολυμεράση, και κατ'έπекταση στη διακοπή της αλληλοεξουδετέρωσης του σήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Καθώς ο πολυμερισμός συνεχίζεται αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή που απελευθερώνονται και, συνεπώς, αυξάνεται παράλληλα η ένταση του φθορισμού. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη με το προϊόν του DNA που παράγεται (Εικόνα 21-Γ).



Εικόνα 21 Συστήματα ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στη Real-Time PCR.

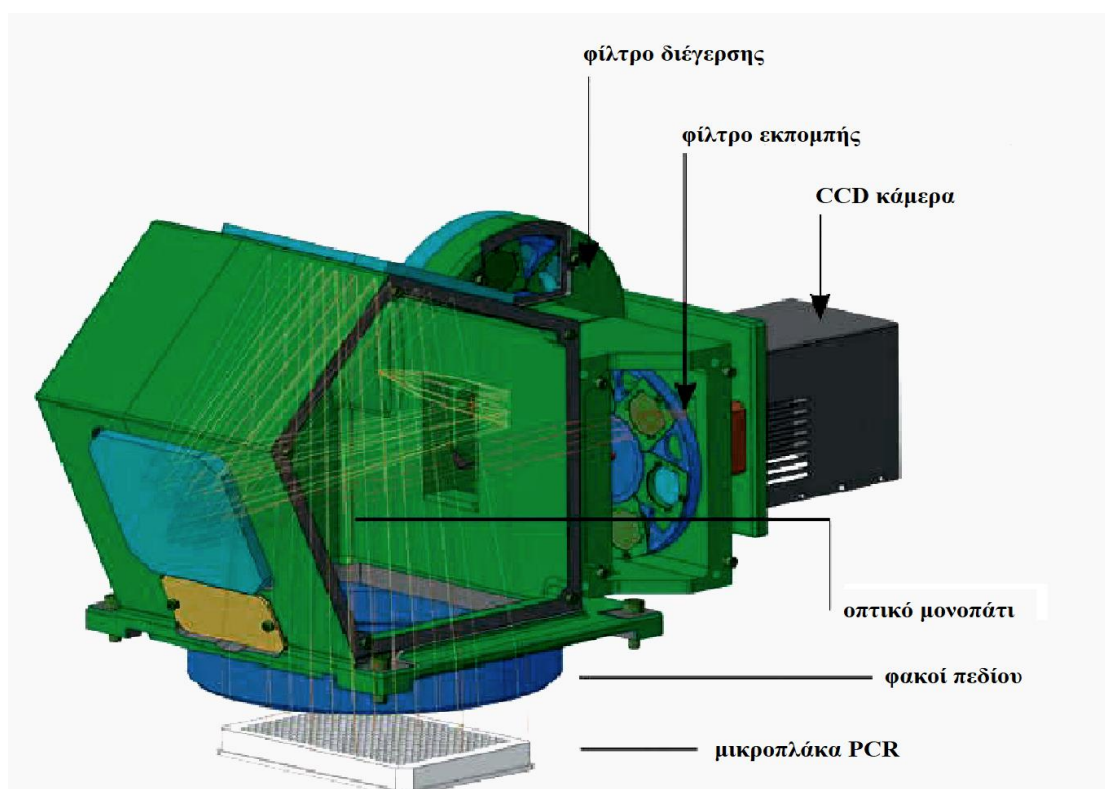
Στη Real-Time PCR ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις (**Εικόνα 22**): την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle) ή C_p (crossing point). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_t είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή C_t τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.



Εικόνα 22 Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR

Οι συσκευές της Real Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Για την Real-Time PCR της παρούσας εργασίας χρησιμοποιείται η συσκευή Light Cycler 480 της εταιρίας Roche. Η συσκευή επιτρέπει τη διενέργεια της αντίδρασης της αντίδρασης Real-Time PCR σε σύντομο χρονικό διάστημα, χάρη στην χρησιμοποίηση ενός εξελιγμένου συστήματος μεταφοράς και ομοιόμορφης κατανομής θερμότητας (Therma-base™). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 40 κύκλους, με ποσοστό βεβαιότητας 99,7%. Απαιτούνται 40min για τη διενέργεια 40 κύκλων της αντίδρασης σε μικροπλάκα 384 θέσεων και λιγότερο από 60min σε μικροπλάκα 96 θέσεων. Το οπτικό σύστημα της συσκευής (**Εικόνα 23**) εξασφαλίζει την ομοιόμορφη ανάγνωση του εκπεμπόμενου σήματος, τόσο από τα κεντρικά όσο και από τα περιφερικά φρεάτια. Αποτελείται δε, από την πηγή φωτός (υψηλής έντασης LED που εκπέμπει σε ευρύ φάσμα), τα φίλτρα και την κεφαλή ανίχνευσης. Διαθέτει 5 διαφορετικά φίλτρα διέγερσης φθορισμού (440nm, 465nm, 498nm, 533nm και 618nm) και 6 διαφορετικά φίλτρα για την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φθορισμού (488nm, 510nm, 610nm, 640nm και 660nm). Ένας ευέλικτος συνδυασμός των built-in φίλτρων για συγκεκριμένες



Εικόνα 23 Το οπτικό σύστημα του LightCycler® 480

διαδικασίες διέγερσης και εκπομπής διευκολύνει τη χρήση μιας ποικιλίας φθορίζοντων χρωστικών και μορφών ανίχνευσης για κάθε εφαρμογή της PCR σε πραγματικό χρόνο. Η ειδική διάταξη των οπτικών εξαρτημάτων και η βέλτιστη εστιακή απόσταση εξασφαλίζουν άριστο συγκεκριμένο σήμα διέγερσης και ενιαία δεδομένα δέσμησης ολόκληρης της πλάκας των δειγμάτων, ανεξάρτητα από τη θέση του δείγματος. Η συσκευή Light Cycler 480 είναι συνδεδεμένη με ένα υπολογιστή που συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα της αντίδρασης.

Οι κυριότερες εφαρμογές της συσκευής Light Cycler 480 είναι η ανίχνευση γονιδίων, η ποσοτικοποίηση αυτών και η γονοτύπηση. Στην προκειμένη περίπτωση η συσκευή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς CRH-R1 και CRH-R2. Παράλληλα, πραγματοποιείται Real-Time PCR και για το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Το *muG6PD*, όντας ένα γονίδιο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς, χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, με τη βοήθεια του οποίου κανονικοποιείται η τιμή του άγνωστου DNA-στόχου. Για την ποσοτικοποίηση των παραπάνω γονιδίων χρησιμοποιείται η φθορίζουσα ουσία SYBR green I.

Υλικά και συσκευές

- Luna Universal qPCR Master Mix (2x): περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ενίσχυση (μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων με τη μορφή τριφωσφορικών δεσοξυνουκλεοτιδίων και ανασυνδυασμένη Taq πολυμεράση) και ποσοτικοποίηση του DNA εκτός από τους εκκινητές και το εκμαγείο DNA. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται σε σύστημα μη ειδικής ανίχνευσης με χρήση SYBR Green I χρωστικής.
- Εκκινητές (Forward και Reverse-10μM): είναι ειδικά σχεδιασμένοι για κάθε ένα από τα υπό μελέτη γονίδια
- Nuclease-free Water
- cDNA
- Eppendorf 0,5 mL
- Μικροπλάκα χωρητικότητας 96 θέσεων για τον LightCycler 480
- Ταινίες επικόλλησης με τις οποίες επικαλύπτονται οι μικροπλάκες (Roche)
- Συσκευή LightCycler 480
- Φυγόκεντρος (Universal 320, Hettish Zentrifugen)

Πίνακας 3 Χαρακτηριστικά των ξενυγών εκκνητητών, που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για κάθε ένα από τα υπο μελέτη γονίδια

| Γονίδιο | Τύπος εκκνητητή | Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων | Μήκος εκκνητητή | Αριθμός πρόσβασης στη GenBank | Θέση | Θερμοκρασία επαναδιάταξης (°C) |
|----------|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|
| muCRH-R1 | Forward | CAACACCACAACAATGGCTA | 21 | NM_007762 | 422-442 | 55,9 |
| | Reverse | TGATGACGGCAATGTTAGT | 21 | | 555-535 | 57,1 |
| muCRH-R2 | Forward | CCAGATCGGGACCTGCTG | 18 | NM_009953 | 326-343 | 58,8 |
| | Reverse | AGGCACTCTCTGTAGGCATTCC | 22 | | 442-421 | 58,6 |
| muG6PD | Forward | TAATGAGCTGGTCATCCGTG | 20 | NM_008062 | 1213-1232 | 54,9 |
| | Reverse | CAGGCTTCCCTGAGTTCATC | 20 | | 1437-1418 | 55,7 |

Πειραματική διαδικασία

Κάθε δείγμα cDNA αναμείχθηκε με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και τοποθετήθηκε σε διαφορετική θέση στη μικροπλάκα. Ο συνολικός όγκος του προκύπτοντος μίγματος ήταν 20μL και αποτελούνταν από:

- i. 10μL Luna Universal qPCR Master Mix (2x)
- ii. 0,5μL forward primer
- iii. 0,5μL reverse primer
- iv. 4μL H₂O
- v. 5μL cDNA

Σε κάθε σειρά συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα, που στερούνταν το υπό μελέτη cDNA (negative control) προς αποκλεισμό πιθανής επιμόλυνσης του αρχικού δείγματος με DNA η οποία δύναται να στρεβλώσει το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Επιπλέον, εκτός από τα υπό μελέτη δείγματα στη μικροπλακέτα τοποθετήθηκε δείγμα cDNA γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο αναφοράς *muG6PD*. Η μικροπλάκα φυγοκεντρείται για 1min στις 1000 και στη συνέχεια τοποθετείται στον κυκλικό θερμοποιητή, όπου πραγματοποιείται η real-time PCR.

Οι συνθήκες της αντίδρασης Real-Time PCR προγραμματίστηκαν ως εξής:

- α) Ένας κύκλος στους 95°C για 10min προς αρχική αποδιάταξη (pre-incubation).
- β) Σαράντα κύκλοι για ενίσχυση (amplification), ο καθένας αποτελούμενος από τρεις επιμέρους φάσεις:
 - i. Φάση αποδιάταξης (denaturation): 95°C για 10sec
 - ii. Φάση υβριδισμού (annealing): 56°C για το CRH-R1, 56°C για το CRH-R2 και 56°C για το G6PD για 20sec
 - iii. Φάση επιμήκυνσης (extension ή elongation): 72°C για 10sec
- γ) Ένας κύκλος στους 4°C για 30sec για ψύξη (cooling).

2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές

επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία. Για την ανίχνευση των πολλαπλασιασμένων προϊόντων μετά την αντίδραση Real-Time PCR στην παρούσα εργασία, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο.

Υλικά και συσκευές

- Αγαρόζη: πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη και χρησιμοποιείται σε καλλιεργητικά μέσα και για την παρασκευή πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA.
- 1x TBE (Tris-borate-EDTA): ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση, διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.
- Βρωμιούχο αιθίδιο: ουσία που καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm.
- Διάλυμα «φόρτωσης» 10x: περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας, τη γλυκερόλη και μία χρωστική (μπλε της βρωμοφαινόλης) που μετακινείται στο πήκτωμα με ταχύτητα περίπου ίδια με τα μόρια DNA. Η παρουσία της γλυκερόλης διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Επιπλέον, η χρωστική χρωματίζει τα δείγματα, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία του φορτώματος στο πήκτωμα αγαρόζης. Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι μπλε ορατές ζώνες μάς προσφέρουν μια αδρή εκτίμηση του ρυθμού μετακίνησης των μορίων DNA στο πήκτωμα.
- 100 bp DNA ladder (Nippon Genetics): μάρτυρας μοριακών βαρών με μόρια DNA που διαφέρουν κατά 100 bp, ο οποίος μας βοηθά να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται.
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Εκμαγείο για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

➤ Ηλεκτρονικός ζυγός

Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση πηκτώματος. Στην παρούσα εργασία παρασκευάζεται πήκτωμα αγορόζης συγκέντρωσης 3%, το οποίο είναι κατάλληλο για διαχωρισμό γονιδίων μικρού μοριακού βάρους.
2. Ζυγίζονται 3g αγορόζης στον ηλεκτρονικό ζυγό και προστίθενται σε 100mL TBE 1x. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγορόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανεπαρκής διάλυση της αγορόζης σε αυτό το στάδιο παρασκευής του πηκτώματος οδηγεί σε ποιοτικά κακή ηλεκτροφόρηση.
3. Η κωνική φιάλη με την αγορόζη ψύχεται στους 50°C. Στο στάδιο αυτό προστίθενται 10μL βρωμιούχου αιθιδίου και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
4. Η ρευστή αγορόζη τοποθετείται στο εκμαγείο. Το εκμαγείο έχει προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία και τοποθετώντας τα «χτένια», που χρησιμεύουν ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Η ρευστή αγορόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip. Μετά το πέρας 30min σχηματίζεται το γαλακτόχρωμο πήκτωμα και αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτένια».
5. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξιαμενή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του) σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 1 mm. Κατά την πλήρωση της δεξιαμενής εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.
6. Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται κατάλληλα με την ανάμιξή τους με διάλυμα «φόρτωσης» 10X.

7. Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου. Στην πρώτη θέση του πηκτώματος τοποθετείται συνήθως το DNA ladder.
8. Τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού συνδέονται στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης. Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται πάντα απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων, προκειμένου τα μόρια του DNA (αρνητικά φορτισμένα) να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πήκτωμα. Στη συνέχεια η τάση στο τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 90 Volt.
9. Η πρόοδος της μετανάστευσης των μορίων DNA στο πήκτωμα εκτιμάται από τη μετακίνηση των χρωστικών του διαλύματος φόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν κριθεί ότι έχει επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος.
10. Το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο. Με την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία τα μόρια του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες.
11. Η φωτογράφιση του πηκτώματος γίνεται με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.

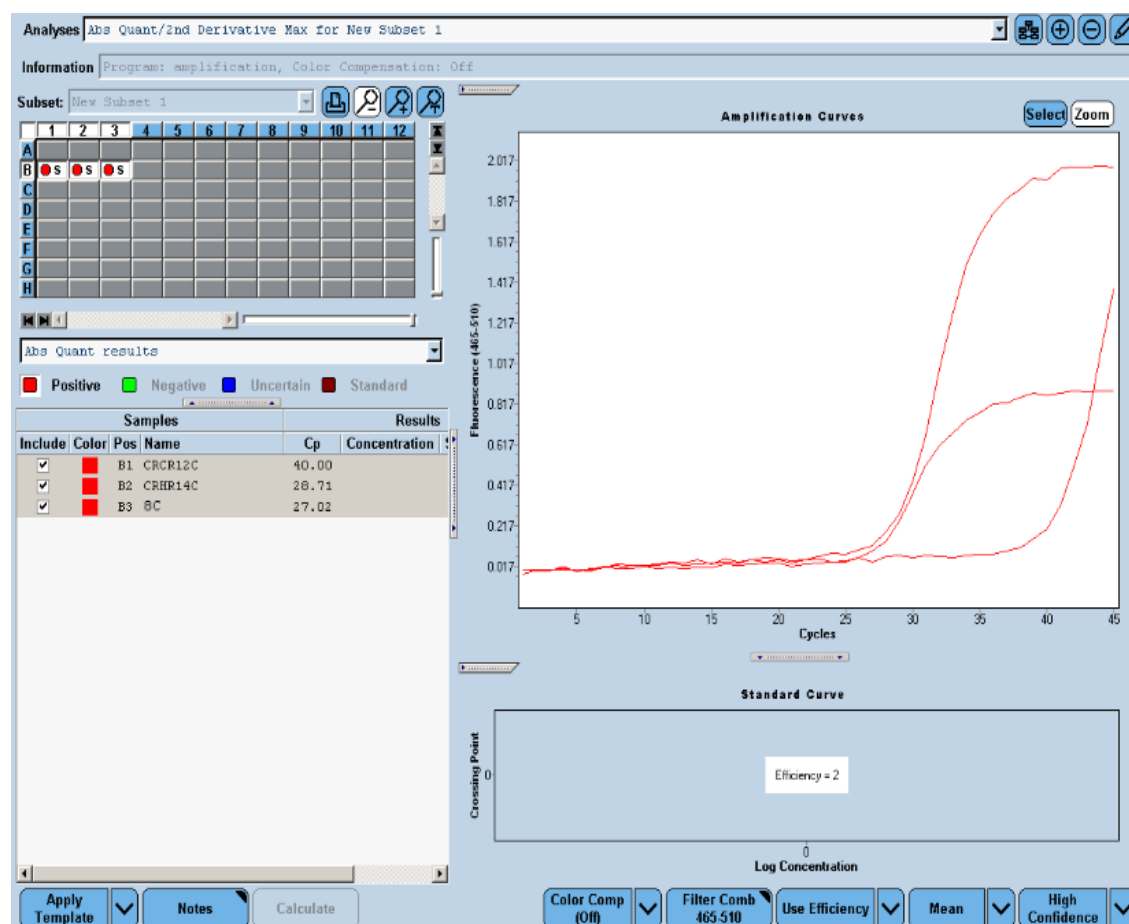
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R1

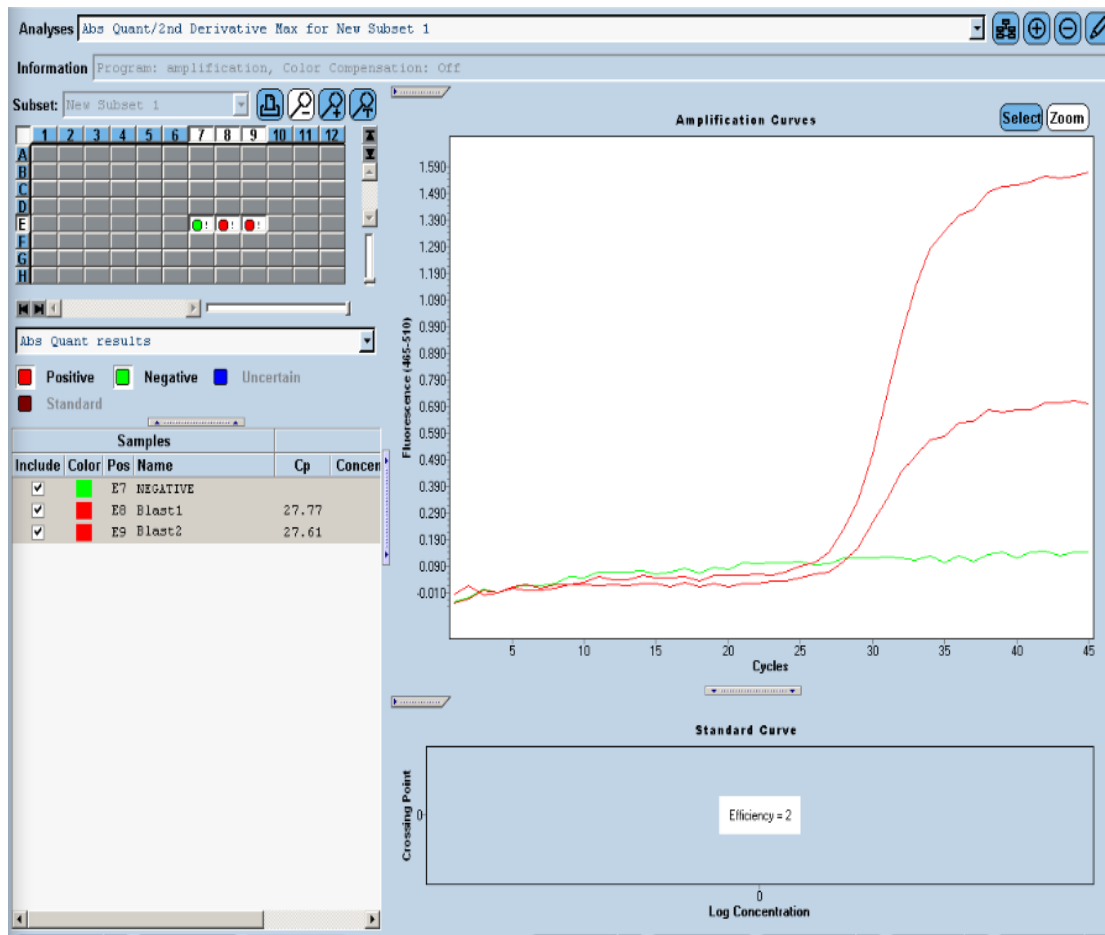
Το γονίδιο CRH-R1 ανιχνεύθηκε σε όλα τα υπό μελέτη εμβρυικά στάδια όπως φαίνεται και στον ακόλουθο συγκεντρωτικό πίνακα:

Πίνακας 4 Αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR για το γονίδιο CRH-R1 σε 4 εμβρυικά στάδια

| Εμβρυικό στάδιο | Τιμή C_p |
|---------------------|--------------------------------|
| Στάδιο 2 κυττάρων | 40.00 |
| Στάδιο 4 κυττάρων | 28.71 |
| Στάδιο 8 κυττάρων | 27.02 |
| Στάδιο βλαστοκύστης | 27.69 (ΜΟ από 27.77 και 27.61) |



Εικόνα 24 Οι καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν στα στάδια των 2, 4 και 8 κυττάρων για το γονίδιο CRH-R1



Εικόνα 25 Οι καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν σε δύο διαφορετικά δείγματα σταδίου βλαστοκύστης και σε δείγμα αρνητικού control, για το γονίδιο CRH-R1

Το C_p αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχανήμα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Εάν θεωρήσουμε ότι στο σημείο του C_p η αντίδραση είναι ακόμη στην εκθετική φάση, δηλαδή σε κάθε κύκλο τα προϊόντα της PCR διπλασιάζονται, τότε η απόδοση της αντίδρασης είναι ίση με 2. Επομένως, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο, μπορούν να υπολογιστούν τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου σε κάθε δείγμα, με μοναδικές άγνωστες παραμέτρους το C_p και τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p :

$$N_o = N_t / (E + 1)^{C_p} \quad (1)$$

όπου N_o είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο αρχικό δείγμα, N_t είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p , E (Efficiency) είναι η απόδοση της

αντίδρασης (στην εκθετική φάση $E = 2$) και C_p το σημείο διασταύρωσης, δηλαδή ο κύκλος της αντίδρασης κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνά τον ουδό του βασικού επιπέδου.

Το C_p υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα. Τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_p υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Επομένως δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στο στάδιο των 2 κυττάρων το C_p βρέθηκε ίσο με 40.00, ενώ στα στάδια 4, 8 κυττάρων και βλαστοκύστης οι τιμές του ήταν 28.71, 27.02 και 27,69 αντίστοιχα. Το σημείο διασταύρωσης λοιπόν, για το στάδιο των 2 κυττάρων επιτυγχάνεται 12 κύκλους πιο αργά σε σχέση μετά υπόλοιπα εμβρυϊκά στάδια που το φτάνουν περίπου στον 28° κύκλο. Η διαφορά των 12 κύκλων φαντάζει μικρή όμως με βάση τον τύπο (1), αντιστοιχεί σε διαφορά της τάξης δισεκατομμυρίων μεταγράφων αρχικού δείγματος. Έτσι, μπορούμε να συνοψίσουμε λέγοντας ότι ο CRH-R1 εμφανίζει παρόμοια, ισχυρή έκφραση στα στάδια 4 και 8 κυττάρων και βλαστοκύστης, ενώ η έκφραση του είναι πολύ ασθενής στο στάδιο των 2 κυττάρων (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5 Παρουσία και έκφραση του CRH-R1 υποδοχέα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου

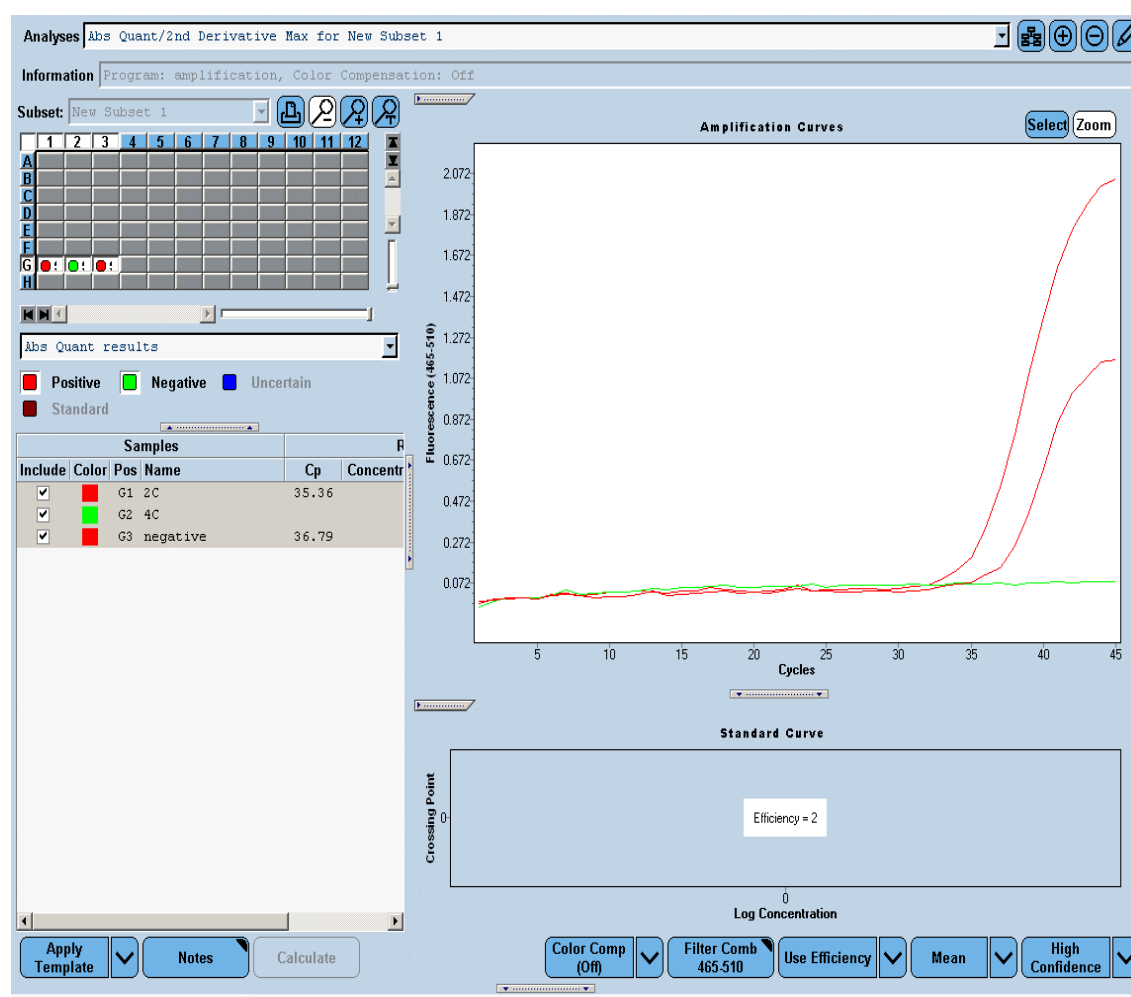
| Εμβρυϊκό στάδιο | Έκφραση υποδοχέα CRH-R1 |
|-----------------|-------------------------|
| 2-κυττάρων | Ασθενής |
| 4-κυττάρων | Ισχυρή |
| 8-κυττάρων | Ισχυρή |
| Βλαστοκύστη | Ισχυρή |

3.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRH-R2

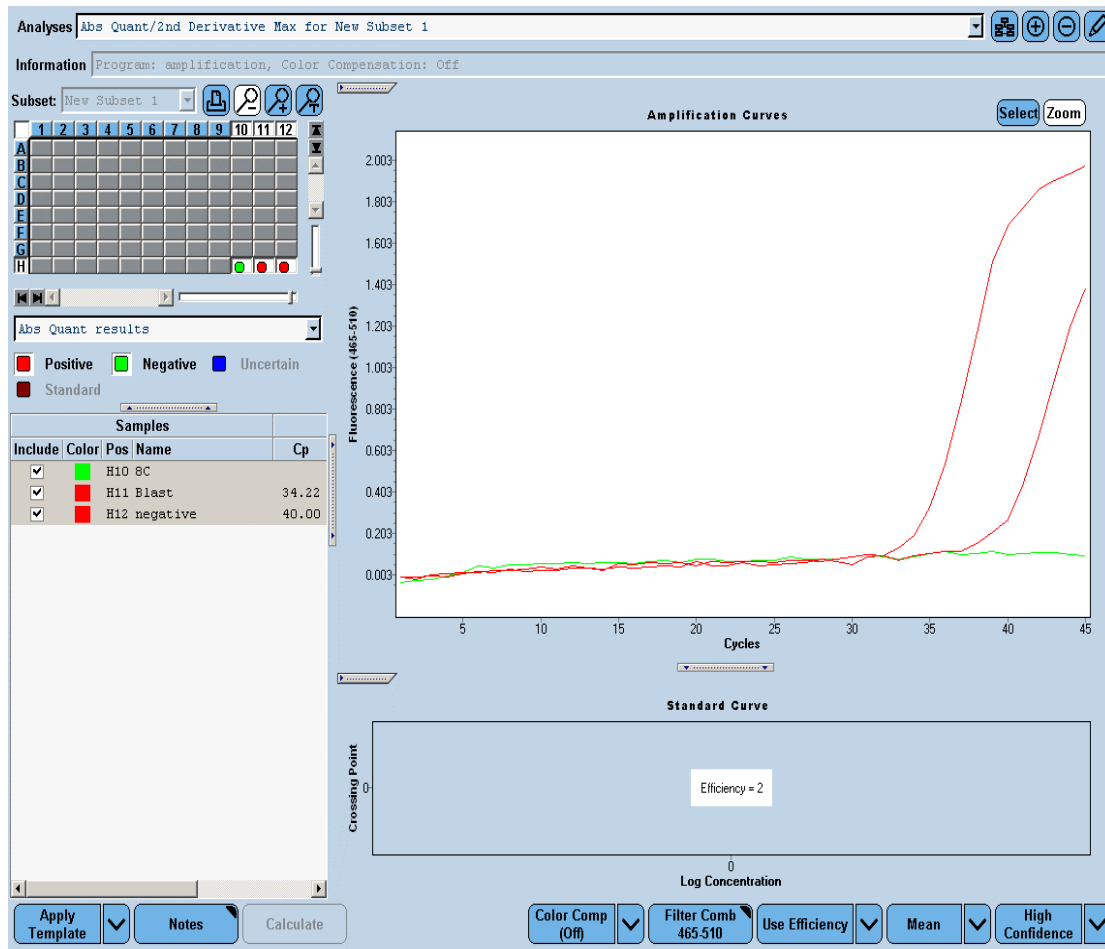
Το γονίδιο CRH-R2 ανιχνεύθηκε σε ορισμένα μόνο από τα υπό μελέτη εμβρυικά στάδια όπως φαίνεται και στον ακόλουθο συγκεντρωτικό πίνακα:

Πίνακας 6 Αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR για το γονίδιο CRH-R1 σε 4 εμβρυικά στάδια

| Εμβρυικό στάδιο | Τιμή C_p |
|---------------------|------------|
| Στάδιο 2 κυττάρων | 35.36 |
| Στάδιο 4 κυττάρων | - |
| Στάδιο 8 κυττάρων | - |
| Στάδιο βλαστοκύστης | 34.22 |



Εικόνα 26 Οι καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν στα στάδια των 2 και 4 κυττάρων και σε δείγμα αρνητικού control, για το γονίδιο CRH-R2



Εικόνα 27 Οι καμπύλες ενίσχυσης που προέκυψαν στα στάδια των 8 κυττάρων, βλαστοκύστης και σε δείγμα αρνητικού control, για το γονίδιο CRH-R2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ασθενής έκφραση του γονιδίου CRH-R2 παρατηρήθηκε στο στάδιο των 2 κυττάρων όπου $C_p=35.36$ και στο στάδιο της βλαστοκύστης όπου $C_p=34.22$. Η έκφραση του γονιδίου απουσίαζε παντελώς στο στάδιο των 4 και 8 κυττάρων (Πίνακας 7). Θετική ήταν η αντίδραση και στα 2 αρνητικά control μας γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε επιμολύνσεις των αρχικών δειγμάτων.

Πίνακας 7 Παρουσία και έκφραση του CRH-R2 υποδοχέα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου

| Εμβρυϊκό στάδιο | Έκφραση υποδοχέα CRH-R1 |
|-----------------|-------------------------|
| 2-κυττάρων | Ασθενής |
| 4-κυττάρων | - |
| 8-κυττάρων | - |
| βλαστοκύστη | Ασθενής |

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των θηλαστικών στο στρες, κυρίως μέσω της υποθαλαμικής ορμόνης CRH, η οποία επάγει την έκκριση της ACTH από την υπόφυση και κατ' επέκταση την έκκριση της κορτιζόλης από τα επινεφρίδια. Έτσι, η CRH ασκεί ένα ευρύ φάσμα δράσεων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα αλλά και στην περιφέρεια, συντονίζοντας τη φυσιολογία διαφόρων συστημάτων του οργανισμού. Οι δράσεις της αυτές επιτυγχάνονται μέσω της ενεργοποίησης ειδικών υποδοχέων που εκφράζονται στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων-στόχων. Δύο είναι οι κύριοι υποδοχείς της CRH που ανιχνεύονται στα θηλαστικά: ο CRH-R1 και ο CRH-R2. Οι υποδοχείς αυτοί διαφέρουν τόσο ως προς τη συγγένεια πρόσδεσης της CRH, με τον CRH-R1 να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια, όσο και ως προς την τοπολογία εκφρασής τους.

Τόσο η CRH όσο και οι υποδοχείς της, έχουν εντοπιστεί στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Η CRH συμμετέχει σε όλες τις επιμέρους λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος που περιλαμβάνουν και στοιχεία φλεγμονής, ενεργώντας σαν αυτοκρινής ή και παρακρινής ρυθμιστής. Φαίνεται λοιπόν, πως κατέχει ενεργό ρόλο σε διαδικασίες όπως η ωοθυλακιωρηξία, η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου, η διαδικασία εισβολής της τροφοβλάστης και η εμφύτευση της βλαστοκύστης.

Η διαδικασία της εμφύτευσης και η δημιουργία του πλακούντα είναι καθοριστικά στάδια για την επιτυχή έκβαση μιας κύησης. Η εμφύτευση, ώντας μια ανοσοδιεγερτική διαδικασία, διεγείρει την παραγωγή Ιντερλευκινών, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ και σε έκκριση της CRH. Η CRH στη συνέχεια οδηγεί σε εκ νέου παραγωγή της Ιντερλευκίνης-6 και της Ιντερλευκίνης-1 με αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονής. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης έχει και το σύστημα Fas/FasL το οποίο απομακρύνει την περίσσεια T-λεμφοκυττάρων ενεργοποιώντας μια σειρά ενδοκυτταρικών αποπτωτικών μονοπατιών. Η CRH εμπλέκεται στο σύστημα Fas/FasL, καθώς μέσω του υποδοχέα της CRH-R1 επάγει την έκκριση του FasL τόσο στα κύτταρα του φθαρτού όσο και στα κύτταρα της τροφοβλάστης ενεργοποιώντας το σύστημα Fas/FasL. Κατά την έναρξη της εμφύτευσης/ εισέρχονται στην περιοχή

λεμφοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα ως απόκριση στη φλεγμονή που δημιουργείται, τα οποία όμως δέχονται την επίθεση των ενεργών κασπασών μέσω του συστήματος Fas/FasL με αποτέλεσμα να υφίστανται απόπτωση. Επομένως, το έμβρυο προστατεύεται, δεν απορρίπτεται και η κύηση προχωράει φυσιολογικά.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των δύο κύριων υποδοχέων της CRH, τον CRH-R1 και CRH-R2 στα προεμφυτευτικά εμβρυϊκά στάδια των 2 κυττάρων, 4 κυττάρων, 8 κυττάρων και βλαστοκύστης, σε έμβρυα ποντικίου. Στόχος της εργασίας ήταν να ελεγχθεί η δράση και πιθανή συμμετοχή τους τόσο στην εμφύτευση όσο και στην άμεση απόκριση στις εναλλαγές της μητρικής CRH κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε λήψη εμβρύων ποντικών στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια και με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών έγινε απομόνωση του ολικού RNA. Στη συνέχεια και μετά τη σύνθεση cDNA, έγινε σχετική ποσοτικοποίηση του mRNA των υποδοχέων 1 και 2 που υπήρχε στα αρχικά δείγματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το γονίδιο του υποδοχέα CRH-R1 παρουσιάζει σημαντική έκφραση στα στάδια των 4 και 8 κυττάρων και στο στο στάδιο της βλαστοκύστης, ενώ το γονίδιο CRH-R2 δεν εμφανίζει αξιόλογη έκφραση σε κανένα από τα υπό μελέτη εμβρυϊκά στάδια. Για ένα ασφαλές συμπέρασμα ωστόσο, τόσο για την έκφραση του CRH-R1 όσο και για την απουσία έκφρασης του CRH-R2 απαιτούνται μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Η έκφραση του CRH-R1 που παρατηρήθηκε στο στάδιο της βλαστοκύστης συνάδει με προγενέστερες έρευνες του εργαστηρίου μας αλλά και με βιβλιογραφικές αναφορές, γεγονός που μας επιτρέπει να εξάγουμε με σχετική ασφάλεια το συμπέρασμα ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα 1 της CRH εκφράζεται στο στάδιο της βλαστοκύστης και ότι ο υποδοχέας 1 εμπλέκεται στη διαδικασία της εμφύτευσης και στην εξέλιξη της κύησης. Όπως γνωρίζουμε από βιβλιογραφικές αναφορές, ο CRH-R1 εντοπίζεται τόσο στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα και τις εμβρυϊκές μεμβράνες όσο και στα κύτταρα του ενδομητρίου. Μέσω του CRH-R1, η CRH δρα με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο ενεργοποιώντας την έκφραση της πρωτεΐνης FasL τόσο στα κύτταρα της τροφοβλάστης όσο και του φθαρού. Ο καθοριστικός ρόλος του CRH-R1 στην εμφύτευση έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά και με τη χορήγηση ανταλαρμίνης. Η ανταλαρμίνη αποτελεί ανταγωνιστή του CRH-R1 και η χρήση της σε επίμυς έχει αποδειχτεί ότι εμποδίζει την εμφύτευση του

εμβρύου περιορίζοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση στο ενδομήτριο κατά τη διείσδυση της βλαστοκύστης, ενώ θεωρείται ότι τα ανάλογά της εκπροσωπούν μια νέα τάξη μη στεροειδών φαρμάκων που δύναται να αναστείλουν την εγκυμοσύνη στα πολύ αρχικά στάδιά της. Δεδομένου του ελπιδοφόρου μέλλοντος των ανταγωνιστών της CRH στη θεραπεία της κατάθλιψης και των διαταραχών άγχους, πρέπει να εξετασθεί σοβαρά η ικανότητά τους να προκαλούν υπογονιμότητα ή πρώιμες αποβολές. Παρ' όλα αυτά, η χορήγηση ανταλαρμίνης σε ποντίκια, μετά την 5^η μέρα της κύησης και μέχρι το τέλος της, δεν επηρέασε τα έμβρυα και καθυστέρησε τον τοκετό. Επομένως, η έλλειψη εμβρυοτοξικής επίδρασης κατά τη μέση και τελική φάση της κύησης, υποδηλώνει ότι οι ανταγωνιστές της CRH θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την προσταδία του εμβρύου από το μητρικό άγχος ή/και για την πρόληψη του πρόωρου τοκετού.

Το αποτέλεσμα της ισχυρής έκφρασης του υποδοχέα CRH-R1 στα στάδια των 4 και 8 κυττάρων, ενισχύεται από μία μόνο παλαιότερη σχετική μελέτη, στην οποία ωστόσο χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας⁷⁸. Η παρούσα εργασία αποτελεί δηλαδή μία πρώτη επιβεβαίωση της παρουσίας του υποδοχέα 1 σε τόσο πρώιμα στάδια ανάπτυξης, με τη μέθοδο της Real-Time PCR και αυτό διότι η πλειονότητα των υπόλοιπων ερευνών εστιάζει στη μελέτη της έκφρασης της ορμόνης και των υποδοχέων της είτε στη μήτρα της μητέρας είτε στο έμβρυο αφού πρώτα έχει εξελιχθεί σε βλαστοκύστη και έχει εισέλθει στην κοιλότητα της μήτρας. Επομένως, κρίνεται χρήσιμη η πραγματοποίηση μελλοντικών πειραμάτων, με τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της εργασίας αυτής όσον αφορά την έκφραση των δυο υποδοχέων σε έμβρυα ποντικού σταδίων 2-, 4- και 8-κυττάρων. Επιπλέον θεωρείται χρήσιμη και η συνεχής μελέτη της έκφρασης της ίδιας της CRH στα ίδια έμβρυα από το αρχικό στάδιο των προπυρήνων μέχρι και το στάδιο της πλήρους εμφύτευσης της βλαστοκύστης.

Η απουσία του CRH-R2 από τα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια είναι επίσης ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία⁸⁰. Δεδομένου ότι ο CRH-R2 εμφανίζει χαμηλή έκφραση στα προκοιλικά και στα γραφιανά ωοθυλάκια του ποντικίου, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι σε αντίθεση με τον CRH-R1, ο CRH-R2 μπορεί να εμπλέκεται σε μικρότερο βαθμό στην ωοθυλακική ανάπτυξη και στην επακόλουθη ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου με αυτοκρινή και/ή παρακρινή τρόπο, αν όχι καθόλου.

Σήμερα, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στη δυνατότητα της ιατρικής να διαγιγνώσκει και να θεραπεύει προβλήματα υπογονιμότητας, εξακολουθούν να

υφίστανται περιπτώσεις που εντάσσονται στην ανεξήγητη ή ιδιοπαθή υπογονιμότητα και οι συχνότητά τους κυμαίνεται στο 10%-15%. Το στρες ενοχοποιείται σε πολλές περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας. Σε καταστάσεις γενικευμένου στρες ενεργοποιείται ο άξονας ΥΥΕ, επηρεάζοντας την έκφραση της CRH και της κορτιζόλης, οδηγώντας σε αύξηση της κορτικοεκλυτίνης και των γλυκοκορτικοειδών. Οι ορμονικές μεταβολές που απορρέουν από την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ μπορεί να επηρεάζουν σημαντικά όλα τα στάδια της κύησης (φθαρτοποίηση ενδομητρίου, εμφύτευση, εισβολή τροφοβλάστης). Πειράματα σε ποντίκια στα οποία προκλήθηκε έντονο στρες λόγω εγκλεισμού, έδειξαν αναστολή στην εμφύτευση. Το στρες επηρέασε σημαντικά στάδια της εμφύτευσης, προκαλώντας καθυστέρηση τόσο στην εκκόλαψη της βλαστοκύστης όσο και στην αλληλεπίδρασή της με το ενδομήτριο, μεταβάλλοντας το «παράθυρο εμφύτευσης. Η κατανόηση, επομένως, των μηχανισμών με τους οποίους ο άξονας ΥΥΕ επηρεάζει την προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων, μπορεί να οδηγήσει δυνητικά σε τρόπους αντιμετώπισης του στρες ως παράγοντα υπογονιμότητας.

Μία από τις πλέον ενδιαφέρουσες προκλήσεις της Αναπαραγωγικής Ιατρικής είναι η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης και η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη βελτίωση των πιθανοτήτων επιτυχούς εμφύτευσης. Είναι σημαντικό οι μελλοντικές μελέτες στο πεδίο αυτό να εστιάσουν τόσο στον ρόλο της CRH όσο και σε άλλα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης όπως είναι οι ιντερλευκίνες (IL-1 και IL-6), οι ιντεργκρίνες (ανβ3 και ανβ5), ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF) και η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂). Μια επιπρόσθετη ερευνητική κατεύθυνση με πιθανά ενθαρρυντικά αποτελέσματα είναι η μελέτη του ρόλου της CRH στη δράση των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα PBMCs προάγουν την διείσδυση εμβρύου in vitro, δράση που ενισχύεται από την hCG αλλά και από τη CRH. Πρόσφατη μελέτη⁷⁹, έδειξε ότι η ενδομήτρια έγχυση αυτόλογων PBMCs ενισχυμένα με CRH και hCG αυξάνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης (Repeated Implantation Failure, RIFs). Η χρήση της CRH ως μία θεραπεία στις γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης φαίνεται να αποτελεί μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση. Εάν το παράδειγμα αυτό μπορεί να τεκμηριωθεί με

περισσότερες κλινικές μελέτες, νέες και αποτελεσματικότερες μέθοδοι βελτίωσης της πιθανότητας εμφύτευσης θα γίνουν διαθέσιμες.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η CRH (Corticotropin-releasing hormone, κορτικοεκλυτίνη), είναι ένα νευροπεπτίδιο 41 αμινοξέων, που συντίθεται στον υποθάλαμο και ρυθμίζει τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Οι βιολογικές λειτουργίες της CRH επιτυγχάνονται μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων της, του CRH-R1 (α , β , γ , c-h) και του CRH-R2 (α , β , γ). Οι CRH υποδοχείς ενεργοποιούνται επίσης και από άλλους ενδογενείς αγωνιστές, όπως η ουροκορτίνη (UCN). Η CRH είναι ένας πολύ σημαντικός ρυθμιστής του στρες στα θηλαστικά. Αν και αρχικά έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, όπου και αναστέλλει την φλεγμονώδη αντίδραση, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι ο CRH εκφράζεται εξίσου σε αρκετούς περιφερικούς ιστούς ρυθμίζοντας την επίδραση στο στρες και επάγοντας τοπικά φλεγμονή. Ο CRH συμμετέχει στην ανθρώπινη φυσιολογία, από την στιγμή που η παθολόγηση θεωρείται διαταραχή της ομοιόστασης, άρα και συνθήκη στρες.

Η CRH και οι υποδοχείς της εκφράζονται σε διάφορες θέσεις του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών, των ενδομητρικών αδένων, του φθαρτοποιημένου στρώματος, της τροφοβλάστης, της συγκυτιοτροφοβλάστης και του πλακούντα. Η CRH εκκρίνεται σε περιοχές φλεγμονής δρώντας ως προφλεγμονώδης παράγοντας. Η αναπαραγωγική CRH έχει αποδειχθεί ότι δρα ως αυτοκρινής και παρακρινής ρυθμιστής και συμμετέχει στην ωοθυλακιορρηξία, στη φθαρτοποίηση, στην εμφύτευση του εμβρύου και στη διατήρηση της κύησης. Η CRH που παράγεται από το φθαρτό και την τροφοβλάστη προάγει την έκκριση της FasL (προ-αποπτωτική κυτοκίνη). Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης, το ενδομήτριο έχει χαρακτηριστικά φλεγμονώδους απόκρισης, ωστόσο το έμβρυο δεν απορρίπτεται ως ημι-αλλομόσχευμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας ο ρόλος του μονοπατιού Fas/FasL είναι καθοριστικής σημασίας. Λόγω του μονοπατιού Fas/FasL η περίσσεια των T λεμφοκυττάρων απομακρύνεται μέσω μιας φλεγμονώδους αντίδρασης, οδηγώντας στην ανοσολογική ανοχή του εμβρύου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς CRH-R1 και CRH-R2, στα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια των 2-, 4- και 8 κυττάρων και της βλαστοκύστης, εμβρύων ποντικών. Για τη συλλογή των εμβρύων, θηλυκά ποντίκια αφέθηκαν να ζευγαρώσουν με αρσενικά ίδιας ηλικίας και στελέχους κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια τα θηλυκά θυσιάστηκαν, οι ωαγωγοί τους αφαιρέθηκαν και οι ζυγώτες συλλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν. Έμβρυα στο στάδιο των 2-, 4- και 8-κυττάρων και βλαστοκύστες συλλέχθηκαν έπειτα από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, το ολικό RNA εξήχθη από τα έμβρυα και με την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής κατασκευάστηκε η cDNA βιβλιοθήκη. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου Real-Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης. Τα ενισχυμένα προϊόντα υποβλήθηκαν κατόπιν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, μόνο ο υποδοχέας CRH-R1 εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στα στάδια των 4 και 8 κυττάρων και στις βλαστοκύστες. Η ανίχνευση του CRH-R1 στις βλαστοκύστες συνάδει με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών. Ωστόσο, η ανίχνευση του CRH-R1 στα 2 πρωιμότερα στάδια, είναι ένα νέο εύρημα το οποίο επιβεβαιώνεται μόνο από μία προηγούμενη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε διαφορετική τεχνική. Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του υποδοχέα 1 σε αυτά τα πρώιμα στάδια. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η CRH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση των βλαστοκύστεων και μπορεί να επηρεάζει και πρωιμότερα αναπτυξιακά στάδια. Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους η CRH επηρεάζει την εξέλιξη της προεμφυτευτικής ανάπτυξης, μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε τρόπους αντιμετώπισης του στρες ως παράγοντα υπογονιμότητας.

6. SUMMARY

CRH (Corticotropin Releasing Hormone) is a 41-amino acid neuropeptide, synthesised in the hypothalamus, regulating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and its expression and biological functions are mediated by its membrane receptors, CRH-R1 (α , β , γ , c-h) and CRH-R2 (α , β , γ). CRH receptors are also activated by other endogenous agonists, such as urocortin (UCN). CRH is a very important regulator of stress in mammals. Although initially reported to be expressed in the CNS where it inhibits the inflammatory reaction, several studies have shown that CRH is as well expressed in several peripheral tissues mediating the stress effect and stimulating local inflammation. CRH is involved in human pathophysiology since pathogenesis is considered a disturbance of homeostasis, and therefore a stress condition.

CRH and its receptors are expressed in several sites of the female reproductive system, including the ovaries, endometrial glands, decidualized stroma, trophoblast, syncytiotrophoblast and placental decidua. CRH is secreted at inflammatory sites, acting as proinflammatory factor. Reproductive CRH has been shown to serve as an autocrine and paracrine modulator and to participate in ovulation, decidualization, embryo implantation and maintenance of human pregnancy. CRH produced by the deciduas and the trophoblast induces the secretion of FasL (pre- apoptotic cytokine). During the implantation of the blastocyst, the endometrium has inflammatory response characteristics, nevertheless, the embryo is not rejected as a semi-allograft it is. During this procedure the role of Fas/FasL pathway is in great importance. Due to the Fas/FasL pathway the excess of T cells is removed, through an inflammatory reaction, leading to the acceptance of the embryo.

The purpose of this study was to investigate the expression of genes encoding the CRH-R1 and CRH-R2 in the preimplantation developmental stages of 2-, 4-, and 8-cells and blastocyst in mice. For the collection of embryos, female mice were allowed to mate with males of the same age and strain overnight. The females were then sacrificed, their oviducts were removed and zygotes were collected and cultured. Two-, four- and eight-cell embryos and blastocysts were collected after specific hours. Subsequently, total RNA was extracted from the embryos and reverse transcribed to cDNA. The reverse transcription reaction was followed by the

technique of Real-Time PCR. The amplified products were electrophoresed on a 3% agarose gel containing ethidium bromide.

According to the results, only CRH-R1 is significantly expressed at the four- and eight-cell stage embryo as well as the blastocysts. The detection of CRH-R1 in blastocysts is consistent with findings of previous studies. However, the detection of CRH-R1 in the other two earlier stages, is a novel finding that is confirmed only by one previous study, in which a different technique was used. Thus, further studies are needed to clarify the presence of the receptor 1 in those earlier stages. These findings suggest that CRH plays an important role in blastocyst implantation and that it may also affect earlier developmental stages. Therefore, understanding the mechanisms by which CRH affects preimplantation development, may potentially lead to ways to treat stress as an infertility factor.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Greene EC. Viscera. In: Anatomy of the rat. Hafner publishing Co., New York 1968:85-107
2. Σμοκοβίτης Α. Γεννητικό σύστημα του θηλυκού. Στο: Φυσιολογία. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1990:436-504
3. Τσακάλωφ Π. Φυσιολογία της αναπαραγωγής του θηλυκού ζώου. Στο: Μαιευτική των κατοικίδιων ζώων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 1982: 5-85
4. Garven HSD. Reproduction. In: A student's histology. E-S Livingston, Edinburg and London 1965:522-572
5. Havenaar R, Meijer JC, Morton DB, Ritskes-Hoitinga J, Zwart P. Biology and husbandry of laboratory animals. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beyen AC (eds). Principles of laboratory animal science. Elsevier, Amsterdam 1993:17-74
6. McNatty KP, Macris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, theca tissue and stromal tissue from human ovary in vitro. J Clin Endoc Metabol 1979;49:687-699
7. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexe from mouse preovulatory follicles. Nature 1979;281:483-484
8. Jacobs HS. Latest developments in growth hormone facilitation of ovulation induction. Abstracts, VI World Congress I VF and alternate assisted reproduction. Jerusalem Israel, April 2-7, 1989:11
9. Σέγκος ΧΓ. Φυσιολογία του γεννητικού συστήματος. Στο: Γυναικολογική Ενδοκρινολογία, 2η εκδ. Λίτσας, Αθήνα 1992:63-132
10. Richards JS. Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. Recent Prog Horm Res 1979;35:343-373
11. Watanabe G, Taya K, Sasamoto S. Dynamics of ovarian inhibin secretion during the estrous cycle of the rat. J Endocrinol 1990; 126:151 -157

12. Arrington LR. Reproduction and breeding. In: Introductory laboratory animal science. 2nd ed. The Interstate Printers and Publishers Inc, Illinois 1978:41-60
13. Knox LK, Schwartz NB. RU 486 blocks the secondary surge of follicle-stimulating hormone in the rat without blocking the drop in serum inhibin. *Biol Reprod* 1992;46:220-225
14. Strauss JF, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res* 1981;18:99-157
15. Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B, Cairoli F. Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *An Ree* 1994;238:163-176
16. Flier JS, Underhill LH. Gonadotropin-releasing hormone: Role of pulsative secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 1986;315:1459-1468
17. Yosh. Fujihara, H. Miyata, M. Ikawa: Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Exp Anim.* 2018; 67(2): 91–104
18. Bonnie S. Dunbar, M.G. O'Rand: A Comparative Overview of Mammalian Fertilization, Springer Science+Business Media New York 1991:151-216
19. Suarez SS, Pacey AA.: Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 2006 Jan-Feb;12(1):23-37.
20. Ishikawa Y, Usui T, Yamashita M, Kanemori Y, Baba T.: Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Mouse Oviduct. *Biol Reprod.* 2016 Apr;94(4):89.
21. Snell WJ, White JM: The molecules of mammalian fertilization. *Cell.* 1996 May 31;85(5):629-37.
22. Aleksandar I. Mihajlovic and Alexander W. Bruce. The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biol.* 2017 Nov; 7(11): 170210.
23. Johnson, MH.; Everitt, B. *Essential Reproduction.* Wiley-Blackwell; Oxford: 2000.
24. Kaufman, M.H. *The atlas of mouse development.* London: Academic Press; 1992.

25. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981, 213(4514):1394-1397.
26. Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, Notake M, Takahashi H, Shimizu S, Horikawa S, Numa S: Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J* 1983, 2(5):775-779.
27. King BR, Smith R, Nicholson RC. Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Aug 30;194(1-2):19-28.
28. Baker C, Richards LJ, Dayan CM, Jessop DS: Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *J Neuroendocrinol* 2003, 15(11):1070-1074
29. Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris A, Stournaras C, Gravanis A: Corticotropin releasing hormone (CRH) in normal and pregnant uterus: physiological implications. *Front Biosci* 1996, 1:e1-8.
30. Vitoratos N, Papatheodorou DC, Kalantaridou SN, Mastorakos G: "Reproductive" corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1092:310-318.
31. Elenkov J, Webster EL, Torpy DJ, Chrousos GP. Stress, corticotrophin releasing hormone, glucocorticoids and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann NY Acad Sci* 1999, 876:1–11
32. Crofford LJ, Sano H, Karalis K et al. Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Immunol* 1993, 151:1587–1596
33. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin releasing hormone in vivo. *Science* 1991, 254:421–423
34. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW 1993 Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8967-71

35. Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB 1996 Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 137:72-7
36. Dautzenberg FM, Hauger RL 2002 The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-7
37. Chatzaki E, Murphy BJ, Wang L, Million M, Ohning GV, Crowe PD, Petroski R, Tache Y, Grigoriadis DE 2004 Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. *J Neurochem* 88:1-11
38. Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J 2004 Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145:941-50
39. Mastorakos G, Scopa CD, Vryonidou A, Friedman TC, Kattis D, Phenekos C, Merino MJ, Chrousos GP: Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79(4):1191-1197.
40. Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW: Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 1993, 133(6):3058-3061.
41. Grammatopoulos DK, Dai Y, Randeva HS, Levine MA, Karteris E, Easton AJ, Hillhouse EW: A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol* 1999, 13(12):2189-2202.
42. Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB: CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 1995, 136(9):4139-4142.
43. Valdenaire O, Giller T, Breu V, Gottowik J, Kilpatrick G: A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1352(2):129-132.

44. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF: Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000, 24(4):410-414.
45. Pellemounter MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, Grigoriadis DE, Ling N, Foster AC: Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 293(3):799-806.
46. Behan DP, Maciejewski D, Chalmers D, De Souza EB: Corticotropin releasing factor binding protein (CRF-BP) is expressed in neuronal and astrocytic cells. *Brain Res* 1995, 698(1-2):259-264.
47. Potter E, Behan DP, Linton EA, Lowry PJ, Sawchenko PE, Vale WW: The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(9):4192-4196.
48. Suda T, Iwashita M, Tozawa F, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K 1988 Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1278-83.
49. Dautzenberg FM, Higelin J, Teichert U 2000 Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Eur J Pharmacol* 390:51-9.
50. Kiang JG, Ding XZ, Gist ID, Jones RR, Tsokos GC 1998 Corticotropin-releasing factor induces phosphorylation of phospholipase C-gamma at tyrosine residues via its receptor 2beta in human epidermoid A-431 cells. *Eur J Pharmacol* 363:203-10.
51. Dieterich KD, Grigoriadis DE, De Souza EB 1996 Homologous desensitization of human corticotropin-releasing factor1 receptor in stable transfected mouse fibroblast cells. *Brain Res* 710:287-92.

52. Curtis AL, Grigoriadis DE, Page ME, Rivier J, Valentino RJ: Pharmacological comparison of two corticotropin-releasing factor antagonists: in vivo and in vitro studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 268(1):359-365.
53. Holsboer F: The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 1999, 33(3):181-214.
54. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW (1998) Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* 129: 229-240.
55. Mastorakos G, Webster E, Friedman T, Chrousos G. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding in the rat ovaries. *J Clin Invest* 92:961, 1993.
56. Asakura H. Zwain IH. Yen SS. Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRFbinding protein and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2720-5, 1997.
57. Mastorakos G. Cizza G. Kvetnansky R. Bergamini E. Blackman MR. Gold PW. Chrousos GP. Aging and acute stress decrease corticotropin releasing hormone in the ovary of the Fischer 344/N rat. *Life Sci.* 56:1065-71, 1995.
58. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN, Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A: The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80(1):185-189.
59. Zoumakis E, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Margioris AN, Angelakis E, Koumantakis E, Gravanis A: Cycle and age-related changes in corticotropin-releasing hormone levels in human endometrium and ovaries. *Gynecol Endocrinol* 2001, 15(2):98-102
60. Hillhouse EW, Grammatopoulos D, Milton NG, Quartero HW: The identification of a human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76(3):736-741.

61. Makrigiannakis A, Psychoyos A, Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A: Endometrial corticotropin-releasing hormone: expression, regulation, and potential physiological implications. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 816:116-128.
62. Makrigiannakis A, Margioris AN, Zoumakis E, Stournaras C, Gravanis A: The transcription of corticotropin-releasing hormone in human endometrial cells is regulated by cytokines. *Neuroendocrinology* 1999, 70(6):451-459.
63. Ferrari A, Petraglia F, Gurbide E: Corticotropin releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 54(5-6):251-255.
64. Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Gravanis A: Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 2000, 6(4):344-351.
65. Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP: Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2006, 17(5):178-185.
66. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP: Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2001, 2(11):1018-1024.
67. Bamberger AM, Schulte HM, Thuncke I, Erdmann I, Bamberger CM, Asa SL: Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(9):3173-3175.
68. Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A: Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(6):2188-2194.
69. Athanassakis I, Farmakiotis V, Papadimitriou L: Uterine cytokine production during the menstrual cycle and preimplantation stages in mice. *Dev Immunol* 1999, 7(1):33-42.

70. Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA: Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 1995, 373(6513):427-432.
71. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G: First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004, 10(1):55-63.
72. Bamberger AM, Minas V, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Loning T, Charalampopoulos I, Brummer J, Wagener C, Bamberger CM et al: Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 2006, 168(1):141-150.
73. Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W: Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991, 5(5):344-366.
74. Bamberger AM, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A: The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 2000, 156(4):1165-1170.
75. Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Gotze J, Brummer J, Schulte HM, Wagener C, Loning T: Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol* 1998, 152(6):1401-1406.
76. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A: A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994, 101(8):669-674.
77. Perkins AV, Linton EA, Eben F, Simpson J, Wolfe CD, Redman CW: Corticotrophin-releasing hormone and corticotrophin-releasing hormone binding protein in normal and pre-eclamptic human pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1995, 102(2):118-122.

78. Lim L.N. YYQ, Mcveigh J.E., Sargent I.L., Barlow D.H., Linton E.A. : CRH and CRH R1 expression in preimplantation embryos. In: Abstracts of the 19th Annual Meeting of the ESHRE. Madrid, Spain; 2003: p xviii57.

79. Makrigiannakis A, BenKhalifa M, Vrekoussis T, Mahjub S, Kalantaridou SN, Gurgan T: Repeated implantation failure: a new potential treatment option. Eur J Clin Invest 2015.

80. Dinopoulou V1, Partsinevelos GA, Mavrogianni D, Anagnostou E, Drakakis P, Makrigiannakis A, Chrousos GP, Loutradis D: 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.