



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**



**ΕΚΦΡΑΣΗ, ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΟΡΜΟΝΗΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ
(CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE, CRH)
ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΖΟΥΜΑΚΗ, ΧΗΜΙΚΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1998

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΚΦΡΑΣΗ, ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΟΡΜΟΝΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CORTICOTROPIN-
RELEASING HORMONE, CRH) ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ
ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΖΟΥΜΑΚΗ, ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΑΡΤΙΟΣ 1998

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

...στους γονείς μου...

οφείλω να ευχαριστήσω

την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή

-τον επιβλέποντα της διατριβής Αν. Καθηγητή Φαρμακολογίας Αχιλλέα Γραβάνη για την απεριόριστη συμβολή, βοήθεια, συμπαράσταση και εμπιστοσύνη του

-τον Καθηγητή Βιοχημείας Χρήστο Στουρνάρα για την πολύτιμη συμβολή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου

-τον Καθηγητή Βιολογίας Νικόλαο Ανάγνου

-τον Αν. Καθηγητή Ανδρέα Μαργιωρή για την ανεκτίμητη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου

-τον Καθηγητή Ηλία Καστανά για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του

-τον Αν. Καθηγητή Ευγένιο Κουμαντάκη για την πολύτιμη συμβολή του στην προμήθεια βιολογικού υλικού

-τον Αν. Καθηγητή Στάθη Παπαβασιλείου

-την Αν. Καθηγήτρια Κυριακή Θερμού

-τον Αντώνη Μακρυγιαννάκη, «φυσική συνέχεια» της διατριβής του οποίου αποτέλεσε η παρούσα εργασία, που συμμετείχε σα δάσκαλος, συνεργάτης και φίλος σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της

-τη Ρένα Δερμιτζάκη για τη βοήθειά της στα πειράματα φθαρτοποίησης

-τους συναδέλφους και φίλους: Μανώλη Αγγελάκη, Γιάννη Αναγνωστάκη, Νίκο Αντωνάκη, Άννα Βασιλάκη, Μαρία Βενυχάκη, Γιάννα Καλλέργη, Τούλα Κουκουριτάκη, Γιώργο Λιαπάκη, Μανώλη Μαρκογιαννάκη, Γιώργο Παναγή, Μαίρη Παπαδοκωστάκη, Λίτσα Παπακωνσταντή, Ρένα Σκουλά, Άννα Τσαπάρα, Κατερίνα Χατζάκη, Άννα Χατζόγλου

-τη Michelin Αρμουτάκη, γραμματέα του Τομέα Βασικών Επιστημών

-τη φιλόλογο Βάλια Σερδάκη για τη φιλολογική επιμέλεια του κειμένου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ-ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΟΣ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ.....14

1.2 ΘΕΣΕΙΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ CRH

1.2.1 Κυτταρικοί Υποδοχείς.....22

1.2.2 Πρωτεΐνη πρόσδεσης της CRH (CRH-BP).....25

1.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH

1.3.1 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ).....27

1.3.2 Περιφερικοί ιστοί.....28

1.3.3 Ανοσοποιητικό σύστημα.....29

1.4 ΑΙΑΘΑΝΑΪΟΥΪΕΕΟ ΟΥΟΟΪΑ

1.4.1 Όρχεις.....31

1.4.2 Ωοθήκες.....32

1.4.3 Πλακούντας.....33

1.5 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

1.5.1 Ιστολογία μορφολογία.....36

1.5.2 Φυσιολογία.....37

1.5.3 Οπιοειδή πεπτίδια του ενδομητρίου.....41

1.6 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ.....42

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα.....46

2.2 Καλλιέργεια ενδομητρικών κυττάρων Ishikawa.....46

2.3 Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων.....	48
2.4 Συλλογή ανθρώπινου ενδομητρικού ιστού.....	48
2.5 Απομόνωση επιθηλιακών και στρωματικών ενδομητρικών κυττάρων	49
2.6 Συλλογή δείγματος και παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος για μέτρηση πεπτιδικών ορμονών με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό.....	50
2.7 Χρωματογραφία στήλης	50
α) Μικροκολώνα ανάστροφης φάσης C18 (Sep-pack)	
β) Χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography)	
2.8 Ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί.....	53
α) Προσδιορισμός ανοσοδραστικής εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (IR-CRH) σε θεραπευτικά υλικά καλλιιεργειών και κυτταρικά εκχυλίσματα	
β) Διάλυμα CRH για προετοιμασία πρότυπης καμπύλης	
2.9 Ανοσολογικοί προσδιορισμοί.....	56
Προσδιορισμός ανοσοδραστικής προλακτίνης (PRL) με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας σε υπερκείμενα καλλιιεργειών	
2.10 Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί.....	58
Προσδιορισμός Ιντερλευκίνης-6 (IL-6) σε θεραπευτικά υλικά καλλιιεργειών με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)	
2.11 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	61
2.12 NORTHERN BLOT ανάλυση του mRNA της CRH	62
α) Απομόνωση mRNA με τη μέθοδο της θειοκυανικής γουανιδίνης-όξινης φαινόλης	
β) Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή αγαρόζης	
γ) Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση	
δ) Μεταφορά και σταθεροποίηση του RNA σε νάιλον μεμβράνες υβριδισμού	
ε) Ραδιοσήμανση του ολιγονουκλετιδίου του mRNA της CRH με ³² P, υγρός υβριδισμός του RNA σε μεμβράνες υβριδοποίησης και αυτοραδιογραφία	
2.13 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	70
2.14 Ανοσοϊστοχημεία.....	71
2.15 Διαμόλυνση των κυττάρων Ishikawa με την 5' προαγωγό περιοχή του γονιδίου του hCRH.....	71
16 Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	73

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

3.1.1 Ανίχνευση του mRNA της CRH με Northern ανάλυση.....	76
3.1.2 Ανίχνευση της ανοσοαντιδρώσας CRH στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου ενδομητρίου.....	76
3.1.3 Ανοσοφθορισμός.....	76
3.1.4 Χαρακτηρισμός του μοριακού βάρους της ανοσοαντιδρώσας CRH με χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης.....	78
3.1.5 Ποσοτικός προσδιορισμός CRH.....	80
3.1.6 Καμπύλη αναφοράς του Ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού του ir-CRH.....	83
3.1.7 Βασική έκλυση CRH στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων Ishikawa.....	83

3.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΗΣ 5' ΠΡΟΑΓΥΓΟΥ ΠΕΡΙΟΧΗΣ (PROMOTER) ΟΟΥ ΓΟΙΕΔΙΟΥ ΟΗΣ hCRH ΣΕ ΔΕΑΙΟΛΥΘΕΝΤΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΚΑ ΕΥΘΟΑΡΑ ISHIKAWA.....

85

3.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΗ ΜΗΤΡΑ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ.....

93

3.3.1 Ανίχνευση του mRNA της CRH με Northern ανάλυση.....	95
3.3.2 Ανοσοϊστοχημεία.....	99
3.3.3 Χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης.....	99

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΗ ΦΘΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΗ ΦΘΑΡΤΟΠΟΙΗΣΗ.....

101

3.4.1 Μορφολογική διαφοροποίηση.....	103
3.4.2 Ανοσοφθορισμός για κυτοκερατίνες.....	105
3.4.3 Ανίχνευση προλακτίνης (PRL) στο θρεπτικό υλικό των καλλιέργειών.....	105
3.4.4 Προσδιορισμός IL-6 και PGE2 στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιέργειών.....	108

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....

112

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	124
6. ABSTRACT.....	125
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	126

Ζουμάκης Εμμανουήλ

Ημερομ. γέννησης 16/5/63

1988 Πτυχίο Χημικού Τμήματος, Παν/μίου Αθηνών

1989-1991 Στρατιωτική θητεία

1992: συμμετοχή σε επιδοτούμενα σεμινάρια του Ε.Κ.Τ. με τίτλο "Εκπαίδευση παραϊατρικού προσωπικού σε υψηλή εργαστηριακή τεχνολογία".

1995 Μάιος: παρακολούθηση σειράς μαθημάτων της FEBS, Χαλκιδική, με τίτλο "Methods in protein structure analysis".

1993-1998 εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, τμήμα Ιατρικής Παν/μίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή Φαρμακολογίας Αχιλλέα Γραβάνη

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Gravanis A. (1997). Endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its potential autocrine/paracrine actions. *Ann N Y Acad Sci.* 828:84-94

Markogiannakis E, Georgoulas V, Margioris A. N, **Zoumakis E**, Stournaras C, Gravanis A. (1997). Estrogens and glucocorticoids induce the expression of c-erbB2/NEU receptor in Ishikawa human endometrial cells. *Life Sci.* 61:1083-95

Makrigiannakis A, Psychoyos A, **Zoumakis E**, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A. (1997). Endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): expression, regulation and potential physiological implications. *Ann N Y Acad Sci.* 816:116-128

Zoumakis E, Margioris A. N, Makrigiannakis A, Stournaras C, Gravanis A. (1997). Human endometrium as a neuroendocrine tissue: Expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *J Endocrinol Invest* 20:158-167

Makrigiannakis A, **Zoumakis E**, Margioris AN, Stournaras C, Chrousos GP, Gravanis A. (1996). Regulation of the promoter of the human corticotropin-releasing hormone gene in transfected human endometrial cells. *Neuroendocrinology* 64:85-92

Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A. (1996). Corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and pregnant uterus: physiological implications. *Front Biosci.* 1:E1-E8 (<http://vega.crbm.cnrs-mop.fr/bioscience/1996/v1/e/zoumaki1/htmls/list.htm>)

Makrigiannakis A, Margioris AN, Le Goascogne C, **Zoumakis E**, Nikas G, Stournaras C, Psychoyos A, Gravanis A. (1995). Corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed at the implantation sites of the early pregnant rat uterus. *Life Sci.* 57:1869-75

Hatzoglou A, Gravanis A, Margioris A. N, **Zoumakis E**, Castanas E. (1995). Identification and characterization of opioid binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 80:418-423

Zoumakis E/Makrigiannakis A, Margioris A, Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A. (1995). The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80:185-189

ΚΕΦΑΛΑΙΑ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ

Gravanis A, **Zoumakis E**, Makrigiannakis A, Stournaras C, Margioris A. (1997). Molecular pharmacology of endometrial neuropeptides: Corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *Hellenic Forum on Bioactive Peptides.* 247-265, 1997

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Zoumakis E, Margioris A. N, Makrigiannakis A, Dermitzaki I, Fraidakis M, Gravanis A. (1997). Paracrine effects of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) on human endometrial stromal cell differentiation. 8th Meeting of the European Neuroendocrine Association, S8-7, 1S67, September 1997, Marseille-France

Markogiannakis E, Georgoulas V, **Zoumakis E**, Stournaras C, Gravanis A. Steroid hormones regulate the expression of erbB2 oncogene in endometrial adenocarcinoma cells. FEBS 96 Meeting, Barcelona, Spain, 1996

Makrigiannakis A, **Zoumakis E**, Margioris AN, Stournaras C, Chrousos GP, Gravanis A. Estrogen and glucocorticoids repress the activity of the 5'-flanking region of human corticotropin-releasing hormone gene in transiently transfected Ishikawa human endometrial cells. Abstract in 76th Endocrine Meeting, USA, 1995

Makrigiannakis A, Margioris AN, **Zoumakis E**, Le Goascogne C, Nikas G, Stournaras C, Psychoyos A, Gravanis A. (1995). The corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed at the implantation sites of the early pregnant rat uterus. Abstract in 76th Endocrine Meeting, USA, 1995

Zoumakis E, Margioris A. N, Makrigiannakis A, Stournaras C, Gravanis A. (1994). The corticotropin releasing hormone (CRH) gene is expressed in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. IIIrd European Congress of Endocrinology. European Journal of Endocrinology 1994 130.SUPPL 2

Makrigiannakis A, **Zoumakis E**, Markogiannakis E, Theodoropoulos P, Stournaras C, Margioris A, Gravanis A. 1993 The Corticotropin-Releasing Hormone is expressed in Ishikawa human endometrial cells. Abstract in 75th Endocrine Meeting, Las Vegas, ND, USA, 1993

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

- 5HT** 5- υδροξυ-τροπταμίνη (σεροτονίνη)
ACTH Adrenocorticotropin Hormone (Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)
α-MSH μελανοτρόπος ορμόνη
ANOVA Analysis of variance (Ανάλυση διασποράς)
AVP (arginine vasopressin) αργινίνη βασοπρεσίνη
BSA Bovine serum albumin (Αλβουμίνη ορού βοός)
cAMP (cyclic adenosine monophosphate) κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CPM Counts per minute (Κρούσεις ανά λεπτό)
CRE (cAMP response element) στοιχείο απόκρισης κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης
CRF (corticotropin releasing factor) παράγων έκλυσης κορτικοτροπίνης
CRH (corticotropin releasing hormone) ορμόνη έκλυσης κορτικοτροπίνης
CRH-BP (CRH-binding protein) πρωτεΐνη πρόσδεσης CRH
CRH-R (CRH-receptor) υποδοχέας CRH
DA Dopamine (Ντοπαμίνη)
DADLE (D-Ala,² D-Leu⁵) Enkephalin
DAGO (N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol) enkephalin
DEPC Diethylpyrocarbonate (Διαεθυλπυροκαρβονικός εστέρας)
DEX Dexamethasone (Δεξαμεθαζόνη)
DHPG 3, 4 dihydroxyphenylglucoaldehyde (3, 4 διϋδροξυφαινυλγλυκοαλδεϋδη)
DMEM Dulbecco's modified eagle medium (Θρεπτικό υλικό)
DMSO Dimethylsulfoxide (Διμεθυλσουλφοξειδίο)
DOPA Dihydroxyphenylalanine (Διϋδροξυφαινυλαλανίνη)
DOPAC Dihydroxyphenylacetic acid (Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ)
DSLET (D-Ser², Leu⁵) Enkephalin
DTT Dithiothreitol (Διθειοθρεϊτόλη)
DYN Dynorphin (Δυνορφίνη)
E Epinephrine (Επινεφρίνη)
EDTA Ethylenodiamino tetraacetic acid (Αιθυλενο-διαμινοτετραοξικό οξύ)
EGTA Ethyleneglycolbis (β-aminoethyl) ether N, N, N', N'-tetraacetic acid (Αιθυλενογλυκολ-διβ-αμινοαιθοξυ} N, N, N', N,' τετραοξικό οξύ)
ΚΝΣ Κεντρικό νευρικό σύστημα
ELISA Ανοσοενζυμική μέθοδος
ERE (estrogen response element) στοιχείο απόκρισης οιστρογόνων
FCS Fetal calf serum (Ορός εμβρύου βοός)
GH Growth hormone (Αυξητική ορμόνη)
GRE (glucocorticoid response element) στοιχείο απόκρισης γλυκοκορτικοειδών
HBSS Hanks balanced salt solution (Ρυθμιστικό διάλυμα)
HCG Human horionic gonadotropin (Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη)
hCRH (human CRH) ανθρώπιος CRH
HPA axis (hypothalamus-pituitary-adrenal axis) υποθαλαμο-υποφυσιακός επινεφριδιακός άξονας
HPG axis (hypothalamus-pituitary-gonadal axis) άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες
M Molar (Μοριακότητα)
IL (interleukin) ιντερλευκίνη
IL-1β Interleukin -1β (Ιντερλευκίνη-1β)

IL-1ra Interleukin-1 receptor antagonist (Ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1)
IL-6 Interleukin-6 (Ιντερλευκίνη-6)
IRMA Immunoradiometric method (Ανοσοραδιομετρική μέθοδος)
K_D Dissociation constant (Σταθερά διάστασης)
LHRH Luteinizing hormone releasing hormone (Εκλυτική ορμόνη της ωχρινοποιητικής ορμόνης)
LPH: Lipotropin (Λιπιδότροπος)
MEM: Minimum essential medium (Θρεπτικό υλικό)
MOPS: 3-(n-Morpholine)-propanosulfonic acid
mRNA: messenger RNA (Αγγελιοφόρο RNA)
MSH: Melanin stimulating hormone (Μελανοτροπίνη)
NIS: Non immune serum (Μη ανοσοενεργός ορός)
NBI: Norbinaltorfimine (Νορμπιναλοτορφιμίνη)
NE: Norepinephrine (Νορεπινεφρίνη)
NT: Neurotensin (Νευροτενσίνη)
NY: Neuropeptide Y (Νευροπεπτίδιο Y)
O.D.: Optical density (Οπτική πυκνότητα)
oCRH (ovine CRH) πρόβειος CRH
OXY: Oxytocin (Οξυτοκίνη)
PBS: Phosphate buffer saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
PKA (protein kinase A) πρωτεϊνική κινάση A
PKC (protein kinase C) πρωτεϊνική κινάση C
PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride (Φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο)
PNMT: Phenyl N methyl transferase (Φαινυλ-N-μεθυλ-τρασφεράση)
POMC (proopiomelanocortin) προοπιομελανοκορτίνη
promoter επαγωγέας
PVN (paraventricular nucleus) παρακοιλιακός πυρήνας
rCRH (rat CRH) CRH επίμυος
RIA: Radioimmuno assay (Ραδιοανοσολογική μέθοδος)
SDS: Sodium dodecyl sulfate (Μετά νατρίου άλας του θεικού δωδεκυλίου)
SEM: Standard Error of the mean (Τυπικό σφάλμα μέσω των όρων)
SP: Substance P (Ουσία P)
SRIF: Somatotropin release inhibited factor
stress ένταση
TNF (tumor necrosis factor)
TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Τρις-υδοξυμεθυλ-αμινομεθάνιο)
TSH: Thyroid stimulating hormone (Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη)
Tyr: Tyrosine (Τυροσίνη)
VIP: Vasoactive intestinal peptide (Αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο Υποθαλαμο-υποφυσιακός επινεφριδιακός (HPA) άξονας

Η ζωή είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διατήρηση της **ομοιόστασης**, μιας πολύπλοκης δυναμικής ισορροπίας, η οποία συνεχώς προσπαθεί να εξουδετερώσει εσωτερικούς ή εξωτερικούς, φυσικούς ή συναισθηματικούς παράγοντες έντασης (**stress**) (1). Αυτοί θέτουν σε ενέργεια κεντρικές και περιφερικές προσαρμοστικές απαντήσεις του οργανισμού, ειδικά σχεδιασμένες έτσι ώστε να διατηρήσουν την ομοιόσταση. Τέτοιοι ρυθμιστές είναι ενεργοί σε βασικές συνθήκες αλλά ενεργοποιούνται περαιτέρω, όταν παράγοντες stress οποιασδήποτε μορφής υπερβούν ένα συγκεκριμένο ελάχιστο ουδό ανοχής του οργανισμού. Στους ρυθμιστές αυτούς περιλαμβάνονται το σύστημα stress του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA άξονας) και το αυτόνομο (συμπαθητικό) νευρικό σύστημα (2).

Η υπόθεση ότι η έκλυση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης κορτικοτροπίνης (ACTH) από την υπόφυση ελέγχεται από τον υποθάλαμο, είχε ήδη προταθεί από τα τέλη της δεκαετίας του 1940 (3). Πειραματική επιβεβαίωση για την ύπαρξη κάποιου υποθαλαμικού εκλυτικού παράγοντα έγινε ήδη από το 1955, όταν δείχθηκε ότι υποθαλαμικά εκχυλίσματα επάγουν την έκλυση κορτικοτροπίνης από κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (4). Η ορμόνη έκλυσης της Κορτικοτροπίνης (Corticotropin-releasing hormone (factor)), (CRH και CRF είναι οι τρόποι με τους οποίους αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία) είναι πεπτίδιο 41 αμινοξέων που συντίθεται κυρίως στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και εκλύεται στην υποφυσιακή πυλαία κυκλοφορία ως ενδοκρινική απόκριση στο stress (5,6). Απομονώθηκε από πρόβειο υποθάλαμο και

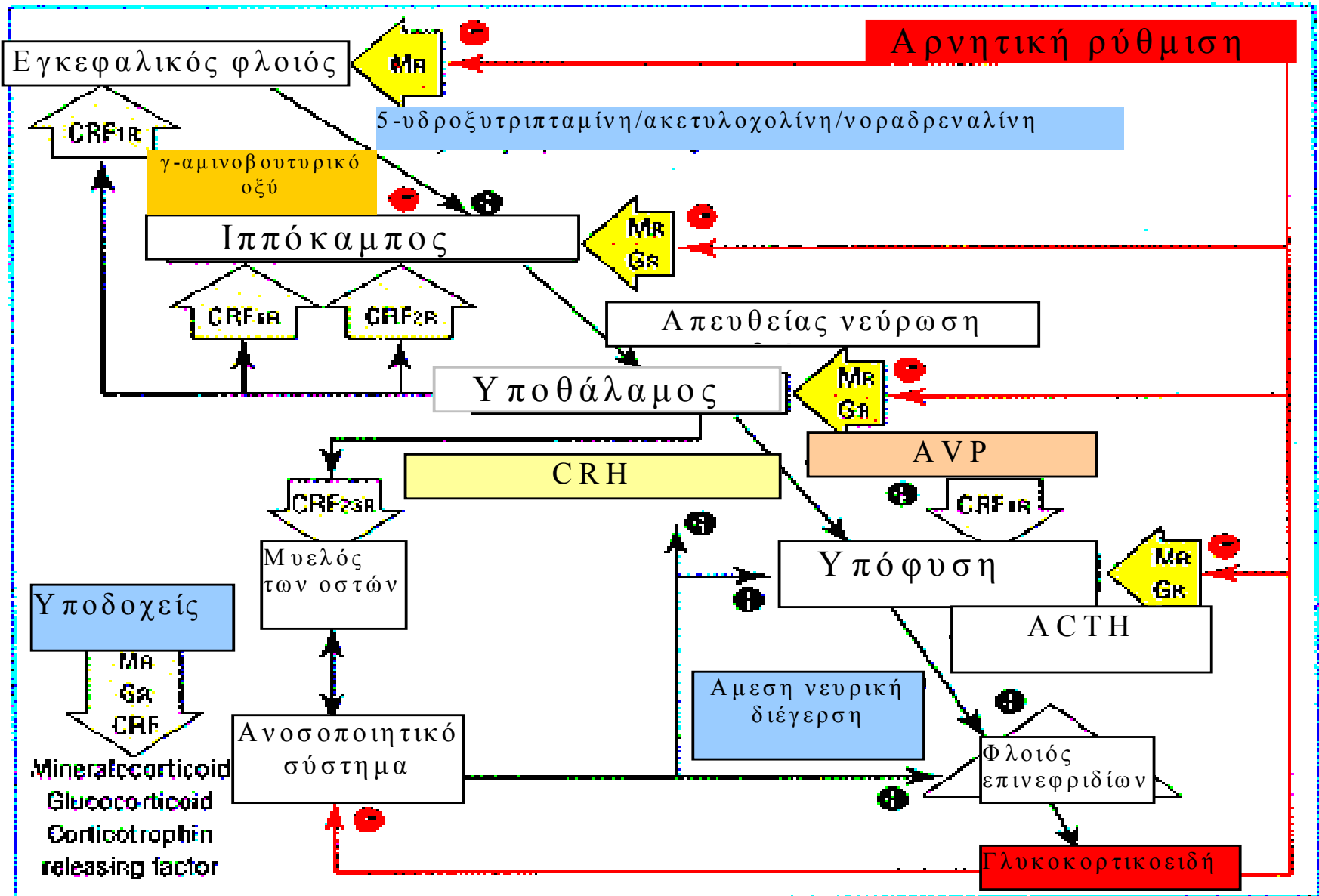
χαρακτηρίστηκε από τους Vale και συνεργάτες το 1981 (7,8). Η ονομασία του οφείλεται στην ιδιότητα του να παρουσιάζει, *in vitro* και *in vivo*, ισχυρή επαγωγική δράση στην έκλυση της κορτικοτροπίνης (ACTH), ισχυρότερη από οποιαδήποτε άλλη γνωστή ενδογενή ή συνθετική ουσία. Το 1983 χαρακτηρίστηκαν επίσης αντίστοιχα πεπτίδια προερχόμενα από τον άνθρωπο ή τον επίμυ (h/r CRH) (9). Έχουν ακριβώς την ίδια δομή και διαφέρουν από την πρόβειο (oCRH) σε επτά από τα 41 αμινοξέα. Τα προερχόμενα από βου και κάπρο αντίστοιχα πεπτίδια παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με την oCRH, ενώ το προερχόμενο από χοίρο πεπτίδιο παρουσιάζει αρκετά μεγάλη ομολογία με το ανθρώπινο (σχήμα 1.1).

Σήμερα είναι γνωστό ότι κύριος ρόλος της CRH είναι η ρύθμιση του υποθαλαμο-υποφυσιακού επινεφριδιακού (HPA) άξονα, μέσω διέγερσης της έκφρασης του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) και της επακόλουθης έκλυσης της επινεφριδιοτρόπου ορμόνης κορτικοτροπίνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση (εικόνα 1.2) (2). Αυτή οδηγεί σε παραγωγή και έκλυση της κορτιζόλης από το φλοιό των επινεφριδίων. Τα γλυκοκορτικοειδή, εκτός από τις βιολογικές τους δράσεις, ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση του άξονα τόσο σε επίπεδο υπόφυσης όσο και σε επίπεδο υποθαλάμου (εικ. 1.2). Έτσι καταστέλλουν την έκλυση της κορτικοτροπίνης και της CRH από την υπόφυση και τον υποθάλαμο αντίστοιχα (10).

Όπως πολλά άλλα νευροπεπτίδια και ορμόνες και η CRH συντίθεται σαν κλάσμα μιας προ-ορμόνης (prepro-CRH) η οποία στον άνθρωπο αποτελείται από 196 αμινοξέα (μοριακό βάρος 19 kDa) και, ενζυματικά, με τη δράση ενδοπεπτιδασών, καταλήγει στο τελικό πεπτιδικό προϊόν (σχήμα 1.3) (11). Μέσα στο κύτταρο η ενεργή πεπτιδική

μορφή αποθηκεύεται σε εκκριτικά κυστίδια και εκλύεται μετά από κατάλληλη εξωτερική διέγερση. Το γονίδιο της

Σχήμα 1.2 Υποθαλαμο-υποφυσιακός επινεφριδιακός άξονας



Σχήμα 1.1 Βαθμός ομολογίας πεπτιδίων με την 41 αμινοξέων ανθρώπινη CRH. Με έντονους χαρακτήρες απεικονίζονται οι μη συντηρημένες περιοχές. ¼που S,E,P..., τα διεθνή σύμβολα των αμινοξέων.

Πεπτίδιο	Αμινοξική ακολουθία	Βαθμός ομολογίας
CRH ανθρώπου/επίμυος	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII	41/41
CRH ιχθύος (<i>Catostomus commersoni</i>)	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKMMEI	39/41
CRH βατράχου (<i>Xenopus laevis</i>)	A EPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQIAQQAHSNRKLMDII	38/41
CRH ιχθύος (<i>Catostomus commersoni</i>)	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLVQQAHSNRKMMEI	38/41
CRH χοίρου	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLME	39/41
CRH κυνός	SEPPISLDLTFHLLREVLEMPGAEQLAQQAHSNRKLMEII	39/41
CRH αμμού	SQEPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHSNRKLDDI	34/41
Urotensin-I ιχθύος (<i>Catostomus commersoni</i>)	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRKYLD	22/41
Urotensin-I ιχθύος (<i>Platichthys flesus</i>)	SEDPMSIDLTFHMLRNMIHMAKMEGEREQAQINRNLLD	20/41
Urotensin-I ιχθύος (<i>Cyprinus carpio</i>)	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARNENQREQAGLNRKYLD	22/41
Urocortin επίμυος	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	18/41
Sauvagine βατράχου (<i>Phyllomedusa sauvagei</i>)	PPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLDIT	18/41
Urocortin ανθρώπου	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	17/41

ανθρώπινης CRH χαρτογραφείται στο μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 8 (8q13) και το μέγεθος του μεταγραφήματός του είναι περίπου 1.4 kb (12). Στον επαγωγέα (promoter) του γονιδίου (εικόνα 1.4) περιέχονται στοιχεία απόκρισης κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate {cAMP} response elements, CRE), συντηρημένα στον επίμου και στον αμνό (13,14). Είναι γνωστό ότι το cAMP επάγει την έκφραση του γονιδίου της CRH στον υποθάλαμο επίμυος, επιβεβαιώνοντας τη ρύθμιση της CRH μέσω πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) (15). Επί πλέον, ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) επάγουν επίσης την έκφραση του γονιδίου της CRH. Στον επαγωγέα του γονιδίου περιέχονται άδίσης στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών (GRE) και οιστρογόνων (ERE). ,χει παρατηρηθεί ειδική ιστική ρύθμιση του γονιδίου της CRH. Είναι γνωστό ότι τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν κατασταλτική δράση στην έκφραση του γονιδίου της CRH στον υποθάλαμο (16), ενώ αντίθετα στον ανθρώπινο πλακούντα έχουν επαγωγική δράση (17).

Σχήμα 1.3 Ακολουθία αμινοξέων (1-196) της ανθρώπινης prepro-CRH. Το τελικό προϊόν απαρτίζεται από τα αμινοξέα 154 έως 194 (έντονι χαρακτήρες). ¼που M,R,L..., τα διεθνή σύμβολα των αμινοξέων.

MRLPLLVSAG	VLLVALLPCP	PCRALLSRGP	VPGARQAPQ	40
PQPLDFFQPP	PQSEQPQQPQ	ARPVLLRMGE	EYFLRLGNLN	80
KSPAAPLSPA	SSLLAGGSGS	RPSPEQATAN	FFRVLLQQLL	120
LPRRSLDSPA	ALAERGARNA	LGGHQEAPER	ERRSEPPIS	160
LDLTFHLLRE	VLEMARAEQL	AQQAHSNRKL	MEIIGK	196

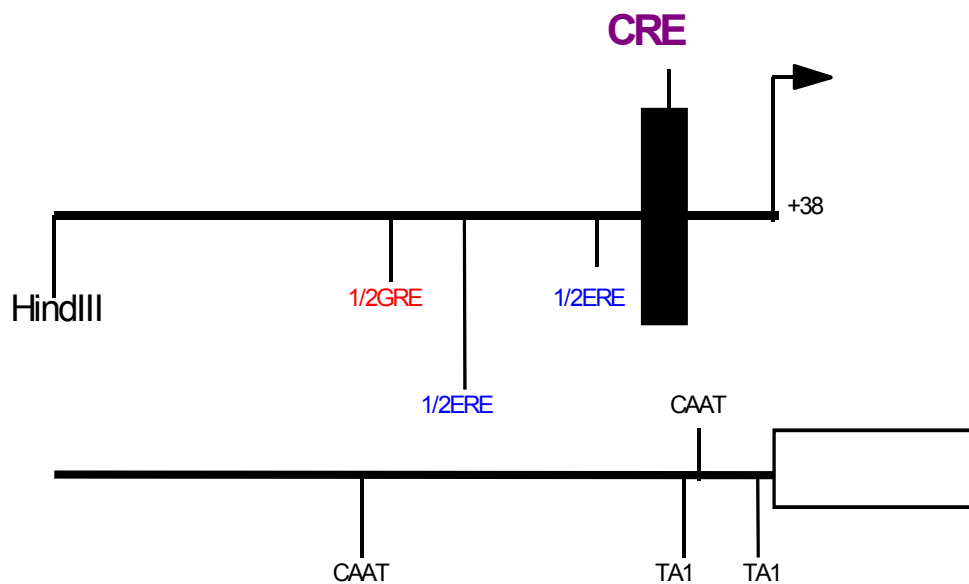
Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των τμημάτων του HPA άξονα, παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον HPA άξονα και άλλα συστατικά του συστήματος stress καθώς επίσης και τους άξονες που είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την ανοσοαπόκριση. ,τσι, η σύγχρονη βιβλιογραφία συνηγορεί σε επιπλέον εμπλοκή της CRH στην αυτόνομη, την ανοσολογική και τη συμπεριφορική απόκριση στο stress των θηλαστικών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ΚΝΣ και ανοσοποιητικού συστήματος αντιστοιχεί σε άμεση επικοινωνία ανάμεσα σε ιστούς του ανοσοποιητικού και ιστούς που εκλύουν ή είναι επιδεκτικοί στην έκλυση CRH (18). Είναι επίσης γνωστό ότι συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, κάτω από καταστάσεις stress, επάγουν την έκλυση γλυκοκορτικοειδών μέσω ενεργοποίησης του HPA άξονα. Πράγματι οι Ιντερλευκίνες (IL-1α, IL-1β και IL-6) (19), ο ογκονεκρωτικός παράγοντας (TNF) (20) και ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) (21)

επάγουν την σύνθεση και έκλυση της υποθαλαμικής CRH. Χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός, είναι γνωστό ότι υποστρώματα τύπου CRH εμφανίζουν αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (22). Μερικές από τις δράσεις της CRH στο αυτόνομο νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν: επαγωγή του συμπαθητικού τόνου στο μυελό των επινεφριδίων και έκλυση επινεφρίνης, αύξηση της κυκλοφορίας στα στεφανιαία αγγεία της καρδιάς, τους νεφρούς και επιλεγμένα αγγεία και καταστολή της καρδιακής παρασυμπαθητικής νευρικής λειτουργίας (23). Επιπλέον, η CRH ελαττώνει την έκλυση γαστρικού οξέος και αναστέλλει τη διαδικασία της πέψης καταστέλλοντας την παρασυμπαθητική κυκλοφορία. Τέλος, πειράματα συμπεριφοράς σε πειραματόζωα δείχνουν ότι η έκθεσή τους στην CRH αυξάνει την κίνηση, ελαττώνει την πρόσληψη τροφής, ενώ τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά ζώα καταστέλλει έντονα τη σεξουαλική ορμή και δραστηριότητα (24), μέσω γενικής αναστολής του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (HPG axis).

Η αμινοξική ακολουθία του πεπτιδίου είναι αρκετά συντηρημένη σε θηλαστικά και πτηνά, ενώ ομόλογα πεπτίδια (περίπου 50%) όπως η ουροτενσίνη-1 (urotensin I) και η σωβαζίνη (sauvagine) έχουν ανιχνευθεί σε ιχθείς και αμφίβια αντίστοιχα (σχήμα 1) (24-28). Το πρώτο απομονώθηκε από υπόφυση δύο ειδών ιχθύων, *Catostomus cyprinus* και *Catostomus catostomus*, ενώ το δεύτερο από δέρμα του βατράχου *Phyllomedusa sauvagei* της Νοτίου Αμερικής. Τα πεπτίδια αυτά επάγουν επίσης την έκλυση της ACTH, ενώ παρουσιάζουν ισχυρές αγγειοδιασταλτικές και υποτασικές ιδιότητες (26,28). Οι αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες της CRH μάλιστα παρουσιάζονται σημαντικά ασθενέστερες αυτών της ουροτενσίνης I και της σωβαζίνης (27). Η CRH παρουσιάζει επίσης μια μικρή ομολογία με την καλμοδουλίνη και το αγγειοτασινγόνο. Πρόσφατα, έγινε ο χαρακτηρισμός ενός νέου πεπτιδίου στα θηλαστικά που ονομάστηκε ουροκορτίνη (urocortin, 45% ομολογία) (29) (σχήμα 1.1). Φαίνεται λοιπόν

ότι νευροπεπτίδια τύπου-CRH συντίθενται για εκατομμύρια χρόνια από τους οργανισμούς με σκοπό την απόκριση στο stress (ενδοκρινική, ηλεκτροφυσιολογική, αυτόνομη, ανοσολογική, συμπεριφορική).

Εικόνα 1.4. Τμήμα του επαγωγέα του γονιδίου της hCRH. GRE: στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών ERE: στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων CRE: στοιχεία απόκρισης κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης



Ακριβώς λόγω των πολλαπλών λειτουργιών στις οποίες εξασκεί ρυθμιστικούς ρόλους, διαταραχή στην παραγωγή/ρύθμιση της CRH οδηγεί αναπόφευκτα σε διάφορες ασθένειες. Ανοσοαντιδρόν πεπτίδιο παράγεται από αρκετούς νευροενδοκρινικούς όγκους. Επιπλέον, πρόσφατα κλινικά δεδομένα εμπλέκουν την CRH στην αιτιολογία και παθοφυσιολογία ποικιλίας ενδοκρινικών και ψυχιατρικών ανωμαλιών (30-35). Ανώμαλη

λειτουργία του άξονα HPA και υπερέκκριση της CRH στο ΚΝΣ παρατηρείται σε ασθενείς με κατάθλιψη (32), ανησυχία (34), σύνδρομο χρόνιου stress (30,31), νευρογενή ανορεξία (33) και χρόνια αλκοολισμό (28,29). Χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε ασθενείς πάσχοντες από τη νόσο Alzheimer, σύνδρομο Parkinson, νόσο Huntington καθώς επίσης σε ασθενείς με πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση και όλες τις μορφές του συνδρόμου Cushing συμπεριλαμβανομένης και της σπάνιας μορφής του εκτόπου συνδρόμου Cushing (30,31,35). Χαρακτηριστικό είναι ότι ο ρυθμός μεταβολισμού της hCRH είναι πολύ ταχύτερος από αυτόν του oCRH. ,τσι ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής καθιστά την oCRH καταλληλότερο μέσο για τη διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Cushing (35). Παρά τη χρησιμοποίησή της όμως ως διαγνωστικού εργαλείου στη διαφοροποίηση αιτιών πρόκλησης υπερκορτιζολαιμίας και υποκορτιζολαιμίας, μόνο περιορισμένος θεραπευτικός ρόλος έχει αποδοθεί μέχρι τώρα στην CRH (35).

1.2 ΘΕΣΕΙΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ CRH

1.2.1 Κυτταρικοί Υποδοχείς

Οι δράσεις της CRH επιτελούνται μετά από σύνδεσή της με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές έλικες και ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των Gs-συνδεουσών πρωτεϊνών (36). Δύο τύποι υποδοχέων της CRH έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Ο πρώτος, CRH-R1, συνδέει την hCRH με υψηλή συγγένεια (Kd 0.95-2 nM) και κλωνοποιήθηκε από υπόφυση ανθρώπου (36), μυός (37) και εγκέφαλο επίμυος (Πίνακας 1.5) (38,39). Το γονίδιό του εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q12-q22) (40). Δύο διαφορετικές μορφές ματίσματος (splice variants) έχουν βρεθεί που κωδικοποιούν

πρωτεΐνες με 415 και 444 αμινοξέα αντίστοιχα. Η επικρατούσα μορφή είναι αυτή των 415 αμινοξέων. Στην N-τελική εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα υπάρχουν 5 ισχυρές θέσεις γλυκοζυλίωσης. Επιπλέον, στην πρώτη και δεύτερη ενδοκυτταρική αγκύλη (loop) και στην C-τελική αλυσίδα υπάρχουν θέσεις φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικής κινάσης C, ενώ στο τρίτο ενδοκυτταρικό τμήμα απαντούν θέσεις φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικής κινάσης A και καζεΐνικής κινάσης II. Ο πρώτος αυτός τύπος υποδοχέα παρουσιάζει περίπου 30% ομολογία με υποδοχείς αρκετών άλλων νευροπεπτιδίων όπως της καλσιτονίνης, της σεκρετίνης, του εντερικού αγγειοδραστικού πολυπεπτιδίου (VIP), της παραθυρεοειδικής ορμόνης και της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης.

Ο δεύτερος υποδοχέας (CRH-R2) έχει δύο φαρμακολογικά και ανατομικά διάφορες μορφές που διαφέρουν μόνο στη αμινο-τελική περιοχή. Ο πρώτος, CRH-R2a (Kd: 7.2-22 nM), κλωνοποιήθηκε από εγκέφαλο επίμυος (41), ενώ ο δεύτερος, CRH-R2b (Kd: 10-29 nM), απομονώθηκε από καρδιά και σκελετικό μυ μύς και ανθρώπου (42). Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες αποτελούνται από 411 και 431 αμινοξέα. Και στους δύο τύπους υπάρχουν θέσεις N-γλυκοζυλίωσης καθώς και θέσεις φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικής κινάσης C. Μέχρι στιγμής δεν είναι ακόμα γνωστή η τοπογράφηση του γονιδίου του δεύτερου τύπου υποδοχέα. Η χαμηλή συγγένεια της CRH για το δεύτερο αυτόν τύπο υποδοχέα αυξάνει την πιθανότητα ύπαρξης και άλλων ενδογενών αγωνιστών. ,να από αυτά είναι ίσως η ουροκορτίνη, ένα αρχέγονο CRH-τύπου νευροπεπτιδίο, το οποίο παρουσιάζεται ισχυρότερο από την CRH στην πρόσδεση και ενεργοποίηση του CRH-R2 υποδοχέα (43). Ενισχυτικό αυτής της υπόθεσης είναι ότι, σε αντίθεση με την CRH, η κατανομή του ανασοαντιδρώντος πεπτιδίου ουροκορτίνη στον εγκέφαλο συμπίπτει με την ανατομική κατανομή των υποδοχέων CRH-R2 (44). Είναι λοιπόν πιθανό μελλοντικές μελέτες για την αποσαφήνιση της συγγένειας ουροκορτίνης/CRHR-2 να οδηγήσουν και στη μετονομασία αυτού του

υπότυπου υποδοχέα, ώστε αυτή να αντανακλά επιτυχέστερα στις πραγματικές του ιδιότητες.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η CRH επάγει την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης στην υπόφυση (45), το σπλήνα (46) και σε αρκετές κυτταρικές σειρές (47,48), ενώ αυξάνεται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο η παραγωγή του κυκλικού AMP (cAMP). Όλοι οι υποδοχείς CRH έχουν θέσεις φωσφορύλιωσης πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), γεγονός που αναδεικνύει αυτήν τη βιοχημική οδό σε σημαντικότατο ρυθμιστή της δράσης της CRH. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι το σύστημα PKC είναι απαραίτητο για τη λειτουργική έκφραση του υποδοχέα της CRH, υποδηλώνοντας ακόμα μία διαπλοκή των συστημάτων PKC και αδενυλικής κυκλάσης (49).

Η έκφραση των υποδοχέων της CRH είναι ευρύτατη στους διάφορους ιστούς {κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (37-39,41,50), επινεφρίδια, αμφιβληστροειδής (42-44), σπλήνας (46), καρδιά και σκελετικοί μύς (53), ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων (55), δέρμα, ωοθήκες, πλακούντας, όρχεις και μυομήτριο (57)}, σηματοδοτώντας σημαντικούς βιολογικούς ρόλους της CRH στη φυσιολογία αυτών των οργάνων.

1.2.2 Πρωτεΐνη πρόσδεσης της CRH (CRH-BP)

Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ανοσοαντιδρώσας CRH (ir-CRH) ανιχνεύονται στην περιφερική κυκλοφορία και σε αγγεία που περιβάλλουν την πρόσθια υπόφυση (46). Ανιχνεύεται επίσης στο αίμα εγκύων γυναικών (47). Στην περίπτωση αυτή προέρχεται από τον πλακούντα και αυξάνεται θεαματικά στο τρίτο τρίμηνο της κύησης και κατά τον τοκετό. Η CRH του πλάσματος είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη μεταφοράς, η οποία είναι πρακτικά υπεύθυνη για το γεγονός ότι η CRH είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο αίμα υπό φυσιολογικές συνθήκες (58). Αυτή η πρωτεΐνη πρόσδεσης της

CRH (CRH-binding protein, CRH-BP), συνδέει με υψηλή συγγένεια (Kd: 0.4 nM) την hCRH, υψηλότερη ακόμα και από τη συγγένεια σύνδεσης της CRH με τον υποδοχέα τύπου I (Kd: 0,95-2 nM) (59). Έχει δειχθεί ότι η σύνδεση αυτή ανταγωνίζεται τους υποδοχείς στη δέσμευση της CRH και εξουδετερώνει την ικανότητα της CRH να διεγείρει την έκλυση της κορτικοτροπίνης από κύτταρα υπόφυσης *in vitro* και *in vivo*. Επιπλέον, η συγγένεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης αυτής με διάφορους ανταγωνιστές της CRH ποικίλλει σημαντικά, γεγονός που αντανακλά και σε σημαντικές φαρμακολογικές διαφοροποιήσεις της από τους υποδοχείς της CRH (59). Αποτελείται από 322 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 37 kDa (60). Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, ενώ εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου και στον ανθρώπινο πλακούντα. Στον άνθρωπο το γονίδιο της τοπογραφείται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q11.2-q13.3) (61). Είναι χαρακτηριστικό ότι σε αρκετές εγκεφαλικές δομές η CRH-BP εντοπίζεται μαζί με τον CRH και ενίοτε με τους υποδοχείς CRH (62). Υπολογίζεται ότι στον εγκέφαλο, περίπου 40-60% του πεπτιδίου CRH είναι συνδεδεμένο με την CRH-BP. Πράγματι, πιστεύεται ότι η CRH-BP επιτελεί σημαντικότατο φυσιολογικό ρόλο στον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητας και βιοδραστικότητας του πεπτιδίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα και την υπόφυση. Τελευταία έχει προταθεί η χορήγηση υποστρωμάτων που βοηθούν στην αποδέσμευση της CRH από την CRH-BP στον εγκέφαλο, σαν ένα σημαντικό βήμα στη θεραπεία ασθενειών που χαρακτηρίζονται από χαμηλές συγκεντρώσεις βιοδραστικής CRH στον εγκέφαλο, όπως η νόσος Alzheimer (63). Είναι επίσης πιθανός ο ρυθμιστικός ρόλος της στη βιοδραστικότητα της ουροκορτίνης με την οποία παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλη χημική συγγένεια (Kd: 0.1 nM). Στον άνθρωπο εκφράζεται επίσης στο ήπαρ και στον πλακούντα, όπου πιθανά ρυθμίζει την ενεργότητα της CRH κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ελάχιστα είναι γνωστά όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση της CRH-BP.

Πρόσφατα πειράματα σε καλλιέργεια κυττάρων υπόφυσης δείχνουν ότι η ενεργότητα του επαγωγέα (promoter) της CRH-BP επάγεται από την cAMP αλλά και από την ίδια την CRH (64).

Πίνακας 1.5. Θέσεις πρόσδεσης CRH, εαέότητες

Αύξουσα σειρά συγγενείας	μέγεθος (αμινοξέα)	Kd (nM)
1. CRH-BP □	322 □	0,4 □
2. CRH-R1 □	415 □	0,95-2 □
3. CRH-R2a □	411 □	7,2-22 □
4. CRH-R2b □	431 □	10-29 □

Ο χαρακτηρισμός τριών διαφορετικών δεσμευτικών περιοχών CRH (υποδοχείς, πρωτεΐνη), η διαφορετική τους κατανομή και οι διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητές τους, οδηγούν στην ύπαρξη ιδιότυπων λειτουργικών νευροβιολογικών συστημάτων για τη ρύθμιση και δράση της CRH (πίνακας 1.5).

1.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH

1.3.1 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Οι συγκεντρώσεις της CRH είναι πολύ μεγαλύτερες στον υποθάλαμο από ότι σε οποιαδήποτε άλλη περιοχή του εγκεφάλου (65). Πιο ειδικά, ανοσοαντιδρώσα CRH έχει ανιχνευτεί στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (PVN) καθώς και σε ορισμένες εξωυποθαλαμικές περιοχές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) (66) σε μικρότερες

συγκεντρώσεις στο θάλαμο, τα βασικά γάγγλια, τον ιππόκαμπο, τον προμήκη μυελό και την παρεγκεφαλίδα. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας “διπλής χρώσης” δείχνουν ότι σε νευρώνες πλούσιους σε CRH ενίοτε ανιχνεύονται και άλλοι χημικοί διαβιβαστές. Τέτοιοι είναι η αντιδιουρητική ορμόνη (αργινίνη-βασοπρεσσίνη (AVP)) (67), η ωκυτοκίνη (68), οι εγκεφαλίνες (69), η δυνορφίνη (70) και η νευροτενσίνη (71). Παρότι ο φυσιολογικός ρόλος αυτού του φαινομένου δεν έχει αποσαφηνιστεί, είναι πιθανό ότι στις περιπτώσεις αυτές συναντάται παρακρινής ή αυτοκρινής ρύθμιση του ενός πεπτιδίου από το άλλο. Παράλληλα, η εκπόλωση νευρώνων που περιέχουν πολλαπλά νευροπεπτίδια μπορεί να οδηγεί σε έκκριση πολλαπλών υποφυσιακών ορμονών. Η AVP είναι γνωστό ότι όχι μόνο επάγει την έκλυση κορτικοτροπίνης αλλά και ότι επιτείνει τις δράσεις της CRH στα κορτικοτρόφα υποφυσιακά κύτταρα.

Η ρύθμιση της έκλυσης της υποθαλαμικής CRH έχει μελετηθεί εκτεταμένα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Είναι γνωστές οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον άξονα HPA και στους άλλους άξονες του stress. ,τσι, έχει δειχθεί ότι η CRH ενεργοποιεί το κατεχολαμινεργικό σύστημα στο επίπεδο του *locus coeruleus* και ότι η επίδραση αυτή είναι παλίνδρομη (72). Η ίδια η CRH ασκεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στους νευρώνες CRH (73). Η σεροτονίνη, η ακετυλοχολίνη, οι κατεχολαμίνες και το νευροπεπτίδιο Υ επάγουν την έκλυση της CRH (73). Αντίθετα το σύστημα γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (74), η ενδοθηλίνη-3 (ET-3) (75), καθώς και τα ενδογενή οπιοειδή ασκούν κατασταλτικές δράσεις (76). Τα υποθαλαμικά ρυθμιστικά οπιοειδή πεπτίδια παράγονται από νευρώνες POMC στον τοξοειδή πυρήνα που εκλύουν ACTH, α-MSH και β-ενδορφίνη, όλα με κατασταλτικές δράσεις στην έκλυση CRH, ενώ νευρώνες CRH και AVP εκλύουν παράλληλα και τον κάππα-οπιοειδή αγωνιστή, δυνορφίνη (77). Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή που εκλύονται από το φλοιό των επινεφριδίων μετά από διέγερση με ACTH, ασκούν αρνητική παλίνδρομη

ρύθμιση τόσο στην υποφυσιακή έκλυση της ACTH όσο και στους υποθαλαμικούς νευρώνες CRH (76,77).

1.3.2 Περιφερικοί ιστοί

Εκτός από το ΚΝΣ, πεπτίδιο και mRNA του CRH ανιχνεύονται σε ένα σημαντικό αριθμό περιφερικών ιστών, όπως ο μυελός και φλοιός των επινεφριδίων (78-80), οι πνεύμονες (78,81), τα T και B λεμφοκύτταρα (82), ο θύμος αδένας (83,84), το πάγκρεας (85), το ήπαρ (86), ο στόμαχος, το δωδεκαδάκτυλο (87) και το δέρμα (88). Σε ανθρώπινο φυσιολογικό μυελό και φλοιό επινεφριδίων εντοπίζεται σε κύτταρα που δημιουργούν πυκνά συμπλέγματα στα όρια φλοιού και μυελού (78). Ανιχνεύεται επίσης σε όγκους των χρωμιόφιλων κυττάρων των επινεφριδίων, τα φαιοχρωμοκυττώματα, όπου τόσο το πεπτίδιο όσο και το mRNA εμφανίζουν συγκεντρώσεις αντίστοιχες αυτών του υποθαλάμου (79,80). Παράλληλα ανιχνεύονται θέσεις πρόσδεσης CRH. Στο πάγκρεας, η CRH ανιχνεύεται σε ορισμένα κύτταρα που εμφανίζουν τοπογραφική σχέση με κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνο (85). Ανοσοαντιδρόν πεπτίδιο ανιχνεύεται στο γαστρικό επιθήλιο και σε νευρικές ίνες στο δωδεκαδάκτυλο (87), ενώ πεπτίδιο και mRNA ανευρέθη επίσης στα T και B λεμφοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα (82). Στο δέρμα το γονίδιο της CRH εκφράζεται στα μελανοκύτταρα ενώ στα ίδια κύτταρα και στα κερατινοκύτταρα εκφράζεται επίσης το γονίδιο του υποδοχέα της CRH και της POMC (88). Έχει προταθεί έτσι να γίνει δεκτή η ύπαρξη ενός αντιστοίχου τοπικού άξονα HPA στο ανθρώπινο δέρμα (88).

1.3.3 Ανοσοποιητικό σύστημα

Σε κεντρικό επίπεδο η CRH εμφανίζεται να έχει αντι-φλεγμονώδεις και αναλγητικές ιδιότητες. Αυτές αποκαλύπτονται μέσα από αλληλεπιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και του άξονα HPA σε

πολλαπλά επίπεδα. Συστατικά του ανασοποιητικού συστήματος και κυρίως η IL-1 δρουν κατά κανόνα επαγωγικά στον άξονα HPA, διεγείροντας την έκλυση CRH. Τα παραγόμενα πεπτίδια ρυθμίζουν αμοιβαία την ανοσοαπόκριση. Τα γλυκοκορτικοειδή, τελικά προϊόντα του άξονα HPA, έχουν γνωστές ανοσοκατασταλτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ενώ παράλληλα ασκούν αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στο όλο σύστημα (89).

Η CRH παράγεται επίσης σε περιφερικές θέσεις φλεγμονής στον άνθρωπο και τον επίμυ (90,91). Πράγματι, ανοσοαντιδρώσα CRH και οι υποδοχείς της έχουν ανιχνευθεί στα T λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και επιδερμικά κύτταρα (82,88). Παράλληλα με τις αυξημένες συγκεντρώσεις ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου στην περιοχή της φλεγμονής, παρατηρείται και αύξηση του αριθμού των αντίστοιχων υποδοχέων του στα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Μιά τέτοια ταυτόχρονη θετική ρύθμιση υποδεικνύει πιθανότατα σημαντικές παρακρινείς/αυτοκρινείς δράσεις της περιφερικής CRH στη φλεγμονώδη αντίδραση. Καλά τεκμηριωμένη είναι η συμμετοχή της στην αντιμετώπιση του πόνου, γεγονός που επιτυγχάνεται με την επαγόμενη έκλυση οπιοειδών πεπτιδίων από τα φλεγμονώδη κύτταρα (92,93). Η CRH εδώ, σε αντίθεση με την συστηματική της έμμεση ανοσοκατασταλτική δράση, πιστεύεται ότι δρα σαν αυτοκρινής ή παρακρινής προ-φλεγμονώδης ρυθμιστής. Η τοπικά παραγόμενη CRH έχει δράσεις προ-φλεγμονώδους προ-κυτοκίνης, ενεργοποιεί δηλαδή τις φλεγμονώδεις δράσεις των κυτοκινών και άλλων ρυθμιστών, ενώ η ανοσοεξουδετέρωσή της οδηγεί σε καταστολή της φλεγμονής. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι και η περιφερική CRH παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (93). Πολύ πρόσφατα πειράματα, σε μια πρώτη προσπάθεια να αποσαφηνίσουν το ρόλο της περιφερικής CRH, δείχνουν ότι πιθανά δρα με διαφορετικό αποτέλεσμα, ανάλογα με την εκάστοτε τοπική της συγκέντρωση (94). Χαμηλές συγκεντρώσεις CRH είναι αντιφλεγμονώδεις, ενώ μεγάλες έχουν σαφείς

προ-φλεγμονώδεις δράσεις. Αυτό προϋποθέτει και την ύπαρξη δύο εντελώς διαφόρων μηχανισμών τοπικής δράσης της CRH στη φλεγμονώδη αντίδραση οι οποίοι χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης (94).

1.4 ΑΙΑΠΑΡΑΓΥΓΕΕΟ ΟΥΘΟΟΗΑ

1.4.1 Όρχεις

Ανοσοαντιδρώσα CRH ανιχνεύεται στους όρχεις αρκετών ειδών συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Ειδικότερα, αυτή εντοπίζεται στα κύτταρα Leydig, σε σπερματικά κύτταρα και σπερματοζωάρια (95-98). Στον άνθρωπο και τον επίμυ η CRH δρα μέσω ειδικών υποδοχέων αυτοκρινικά/παρακρινικά στα ίδια κύτταρα παραγωγής της, δηλαδή τα Leydig, καταστέλλοντας την επαγόμενη από γοναδοτροπίνη παραγωγή τεστοστερόνης (98). Στα ίδια κύτταρα εντοπίζεται και η σεροτονίνη (5HT), η οποία, σε αντιστοιχία με τον υποθάλαμο, επάγει την παραγωγή της ορχικής CRH (99). Χαρακτηριστικό είναι ότι στους όρχεις οι υποδοχείς της CRH δεν φαίνεται να συνδέονται με τις Gs πρωτεΐνες, έτσι οι δράσεις της επιτελούνται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνικής κινάσης C (100). Όπως θα περίμενε κανείς, η χοριονική γοναδοτροπίνη (hCG) και η LH επάγουν την έκλυση της ορχικής CRH, η οποία στη συνέχεια καταστέλλει την επαγωγική δράση τους στην παραγωγή τεστοστερόνης. Ότσι και στους όρχεις, παράλληλα με την κεντρική αντι-αναπαραγωγική δράση της σε επίπεδο υποθαλάμου, η CRH συμπεριφέρεται ως αντι-αναπαραγωγική ορμόνη και ως σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας των κυττάρων Leydig. Αν και δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί οι τοπικές παρακρινείς του δράσεις, τα δεδομένα συνηγορούν σε ελαττωμένη αναπαραγωγική λειτουργικότητα που προκαλείται από την CRH σε τοπικό, νευροενδοκρινικό και επίπεδο συμπεριφοράς, απαραίτητη κάτω από

συνθήκες stress. Ανώμαλη παραγωγή της ορχικής CRH πιθανά ευθύνεται για ορισμένες δυσλειτουργίες των ανδρικών γονάδων. Αντίθετα, διαφορετική εικόνα παρατηρείται στο μυ όπου, πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι, η CRH διεγείρει, κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, την παραγωγή τεστοστερόνης από πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων Leydig (101,102).

1.4.2 Ωοθήκες

Όπως καταδεικνύεται από πειράματα ανοσοούστοχημείας, στις φυσιολογικές ωοθήκες ανθρώπου και επίμου, ανοσοαντιδρώσα CRH εντοπίζεται στα θυλακώδη και στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν το ωοθηλάκιο σε όλη τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου (103,104). Ανιχνεύεται επίσης στα ωοκύτταρα και το ωοθηλακικό υγρό. Επιπλέον λειτουργικοί υποδοχείς ανιχνεύονται στα ίδια κύτταρα και στον ωοφόρο δίσκο καθώς και στο ωχρο σωματίο. Πρόσφατα ανιχνεύθηκαν και τα μεταγραφήματα της CRH και του τύπου I υποδοχέα της στα θυλακώδη και στα στρωματικά ωοθηκικά κύτταρα του ανθρώπου (105). Με ανοσοφθορισμό ανιχνεύεται επίσης στα ανοσοαντιδρώσα CRH-BP στα ίδια κύτταρα αλλά όχι και το μεταγράφημά της, υπονοώντας ότι πιθανά αυτή προέρχεται από την περιφερική κυκλοφορία (105).

Ο βιολογικός ρόλος της CRH στις ωοθήκες παραμένει άγνωστος. Αξιολογώντας τις φυσιολογικές της δράσεις σε άλλα συστήματα, συμπεραίνεται ότι κατ' αντιστοιχία, πιθανά παρεμβαίνει σε τοπικά φλεγμονώδη φαινόμενα (ωορρηξία και ωχρινοποίηση) που συμβαίνουν στις γονάδες (103). Είναι πιθανή η δράση της σαν προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη, άμεσα ή και έμμεσα, μέσω ενεργοποίησης της Ιντερλευκίνης-1β. Ο δεύτερος ρόλος που αποδίδεται στην ωοθηκική CRH είναι η συμμετοχή της στη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών, σε αντιστοιχία με την επίδρασή της στη βιοσύνθεση τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig των όρχεων.

Πράγματι, είναι γνωστός ο κατασταλτικός ρόλος της στη βιοσύνθεση των ωοθηκικών στεροειδών ορμονών 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. 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 (105). Η συγκέντρωση της ανοσοαντιδρώντος 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 (106). 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 (104).

1.4.3 Πλακούντας

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η CRH ανιχνεύεται σε ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Πράγματι έχει τεκμηριωθεί ότι εμβρυϊκοί (πλακουντιακή τροφοβλάστη, το χόριο και άμνιο) και μητρικοί (φθαρτός) ιστοί περιέχουν ανοσοαντιδρώσα CRH (107,108). Εκτός από το πεπτίδιο 41-αμινοξέων, ανιχνεύονται και άλλες ανοσοδραστικές μορφές, μεγαλύτερου μοριακού βάρους, που πιθανά αναπαριστούν πρόδρομα μόρια. Ο πλακούντας αποτελεί και την κύρια πηγή παραγωγής ανοσοαντιδρώσας CRH στην κυκλοφορία τόσο της μητέρας όσο και του

εμβρύου. Χαρακτηριστικό είναι ότι ανάμεσα σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, σημαντική παραγωγή CRH στον πλακούντα παρατηρείται μόνο στον άνθρωπο. Η CRH-BP επίσης παράγεται από τον ανθρώπινο πλακούντα και πιθανά αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες ρύθμισης της CRH κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (109,110). Ανιχνεύεται κυρίως στο αμνιακό επιθήλιο, στο χόριο και στο συγκύτιο καθώς και στο φθαρτό. Σημαντικός αριθμός ομοιογενών υποδοχέων εντοπίζονται κυρίως στην κυτιοτροφοβλάστη, ενώ χημική συγγενείά τους με την ανθρώπινη CRH (Kd: 1.25 nM) παραπέμπει πιθανότατα στον υποδοχέα τύπου I (111-113).

Στον πλακούντα η έκλυση της CRH επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες σε αντιστοιχία με τον υποθάλαμο (114). Τα γλυκοκορτικοειδή όμως επάγουν την έκφραση του γονιδίου της CRH σε αντίθεση με την κατασταλτική δράση τους στο επίπεδο του υποθαλάμου (115). Η Ιντερλευκίνη-1, όπως και στον υποθάλαμο, διεγείρει την παραγωγή και έκλυση της πλακουντιακής CRH (116). Οι κυτοκίνες επίσης διεγείρουν την έκλυση των προσταγλανδινών E2 και F2α, ενώ αυτές με τη σειρά τους επάγουν την έκλυση της CRH και της ACTH (117). Αντίθετα, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών, πιθανότατα εξισορροπώντας έτσι την άμεση επαγωγική τους δράση στην παραγωγή της πλακουντιακής CRH. Το νευροπεπτίδιο Y, η αγγειοτενσίνη II, η αργινίνη βασοπρεσσίνη και η ωκυτοκίνη αυξάνουν την έκλυση CRH σε καλλιέργειες κυττάρων τροφοβλάστης (118). Από τους νευροδιαβιβαστές, η νορεπινεφρίνη και η ακετυλοχολίνη είναι οι πλέον ισχυροί επαγωγείς της έκλυσης CRH (118,119). Η προγεστερόνη τέλος παρουσιάζει δόσοεξαρτώμενες κατασταλτικές δράσεις (120,121). ,τσι κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η παραγωγή της πλακουντιακής CRH αντικατοπτρίζει ένα ισοζύγιο και ρυθμίζεται θετικά από την κορτιζόλη και αρνητικά από την προγεστερόνη.

Ο βιολογικός ρόλος της πλακουντιακής CRH δεν έχει αποσαφηνιστεί. Πιθανά συμμετέχει στη συστηματική ρύθμιση του άξονα HPA της μητέρας στις ανάγκες της εγκυμοσύνης ή στην ανάπτυξη της εμβρυικής ζώνης των επινεφριδίων του κυήματος. Ήλλη σημαντικότερη λειτουργία είναι η συμμετοχή της στη διευκόλυνση του τοκετού, ρυθμίζοντας την ευερεθιστότητα και συσπαστικότητα του μυομητρίου μέσω της αύξησης των προσταγλανδινών και της ευαισθητοποίησης του μυομητρίου στην ωκυτοκίνη (108,124).

Τελευταία έχει δειχθεί ότι στον πλακούντα εκφράζεται και το γονίδιο της ουροκορτίνης και παράγεται ανοσοαντιδρόν πεπτιδίο (125), γεγονός που υποστηρίζει τη θεωρία ότι οι αναπαραγωγικοί ιστοί εκφράζουν μεγάλο αριθμό νευροενδοκρινών πεπτιδίων με πολλαπλούς, διαπλεκόμενους, μηχανισμούς δράσης.

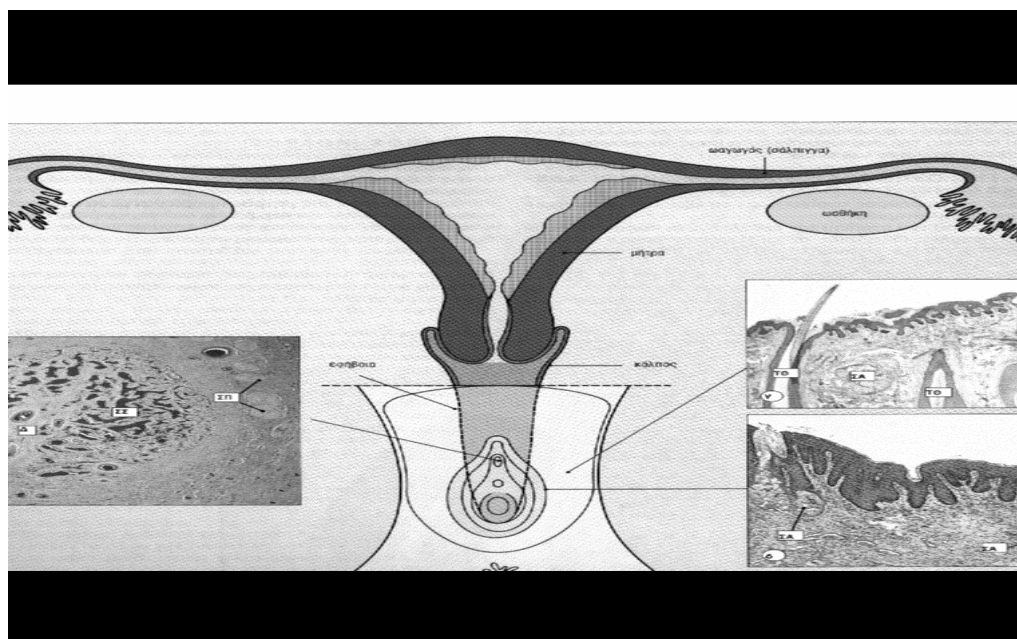
Συμπερασματικά, η CRH που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε πριν από 16 περίπου χρόνια, αποτελεί τώρα το επίκεντρο μιας οικογένειας από καινούρια ευρύτατα διαδεδομένα βιοδραστικά μόρια, τα οποία δρουν μέσω ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχέων του τύπου που περιγράψαμε, μια πρωτεΐνη που έχει την ιδιότητα να εξουδετερώνει τη βιολογική δραστηριότητα του πεπτιδίου και ένα νέο συγγενές ξεχωριστό υπόστρωμα, η ουροκορτίνη. Η διερεύνηση αυτού του περίπλοκου ρυθμιστικού συστήματος ως συνόλου βρίσκεται ακόμα στα πρώτα της βήματα και από αυτήν αναμένονται σημαντικές πληροφορίες που θα βοηθήσουν στην πληρέστερη κατανόηση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών/δυσλειτουργιών του οργανισμού, τόσο σε κεντρικό όσο και περιφερικό επίπεδο.

1.5 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

1.5.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ/ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το γεννητικό σύστημα του θήλεος αποτελείται από τα εσωτερικά γεννητικά όργανα και συγκεκριμένα τις ωοθήκες, τους ωαγωγούς (σάλπιγγες), τη μήτρα και τον κόλπο, καθώς και από τα εξωτερικά γεννητικά όργανα, δηλαδή το εφήβαιο, το αιδοίο και την κλειτορίδα (εικ. 1.6). Η μήτρα είναι ένα μυώδες όργανο στο οποίο καταλήγουν οι δύο ωαγωγοί και διαιρείται σε τρία τμήματα, τον πυθμένα, το σώμα και τον τράχηλο. Το σώμα και ο πυθμένας της μήτρας έχουν τοιχώματα από δέσμες λείου μυϊκού ιστού που διατάσσονται σε τρεις στοιβάδες (μυομήτριο), ενώ επενδύονται από το ενδομήτριο, ένα εξειδικευμένο βλεννογόνο αποτελούμενο από αδένες και στηρικτικό στρώμα.

Εικόνα 1.6. Γεννητικό σύστημα θήλεως. Διακρίνονται οι ωοθήκες, οι ωαγωγοί (σάλπιγγες), η μήτρα και ο κόλπος.

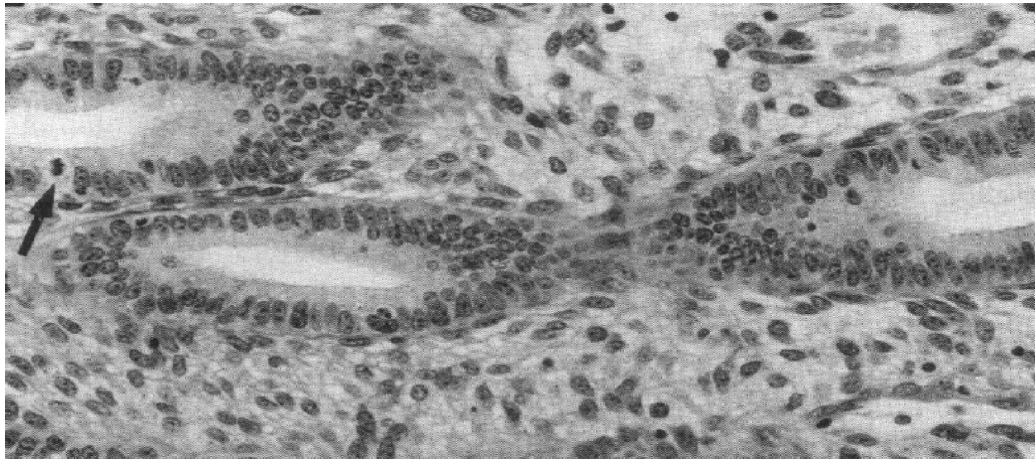


1.5.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το ενδομήτριο, σε αντιδιαστολή με τους υπόλοιπους επιθηλιακούς ιστούς, δεν έχει στατική μορφολογία. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας, η ιστολογική εικόνα του φυσιολογικού ενδομητρίου ποικίλλει καθημερινά, ακολουθώντας ένα κανονικό κυκλικό ρυθμό, τον έμμηνο κύκλο. Οι κυκλικές αυτές αλλαγές είναι άμεσα συνδεδεμένες με την ορμονική λειτουργία των ωοθηκών, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζονται από την κυκλική έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών της υπόφυσης και συγκεκριμένα της ωοθηλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Έτσι δημιουργείται ένας μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης, ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (HPG axis). Κατά την διάρκεια της εμμηνορρυσίας παρατηρείται απόπτωση της επιφανειακής, λειτουργικής, στοιβάδας του ενδομητρίου με τη μορφή αιμορραγίας και παραμένει μόνο το βασικό ενδομήτριο. Η αυξανόμενη έκκριση οιστρογόνων από τις ωοθήκες, οδηγεί σε διέγερση της μιτωτικής δραστηριότητας του βασικού τμήματος των ενδομητρικών αδένων και του στρώματος. Σε αυτή την παραγωγική (οιστρογονική) φάση, αποκαθίσταται και παχύνεται η λειτουργική ενδομήτρια στοιβάδα που αποτελείται από ευθείς σωληνωτούς αδένες μέσα στο στρώμα (εικ. 1.7). Η ακόλουθη ωορρηξία που συμπίπτει με τη μέγιστη συγκέντρωση εκλυόμενης LH και FSH από την υπόφυση, οδηγεί στην έναρξη της εκκριτικής φάσης του έμμηνου κύκλου. Κάτω από την επίδραση της προγεστερόνης, το ενδομήτριο φτάνει στο υψηλότερο σημείο της

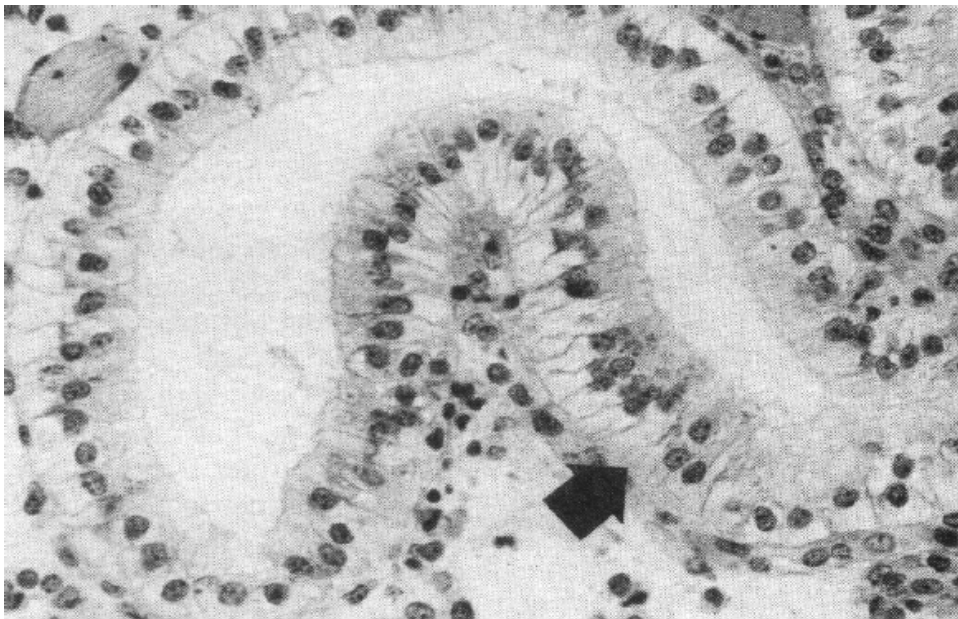
Εικόνα 1.7. Ενδομήτριο κατά την παραγωγική φάση (7η μέρα του κύκλου). Στην παραγωγική (οιστρογονική) φάση, αποκαθίσταται η λειτουργική ενδομήτρια στοιβάδα που αποτελείται από

ευθείς σωληνωτούς αδένες μέσα στο στρώμα. Το στρώμα εμφανίζεται διογκωμένο και με έντονη αγγείωση. (Ann NY Acad Sci 622:10, 1991)



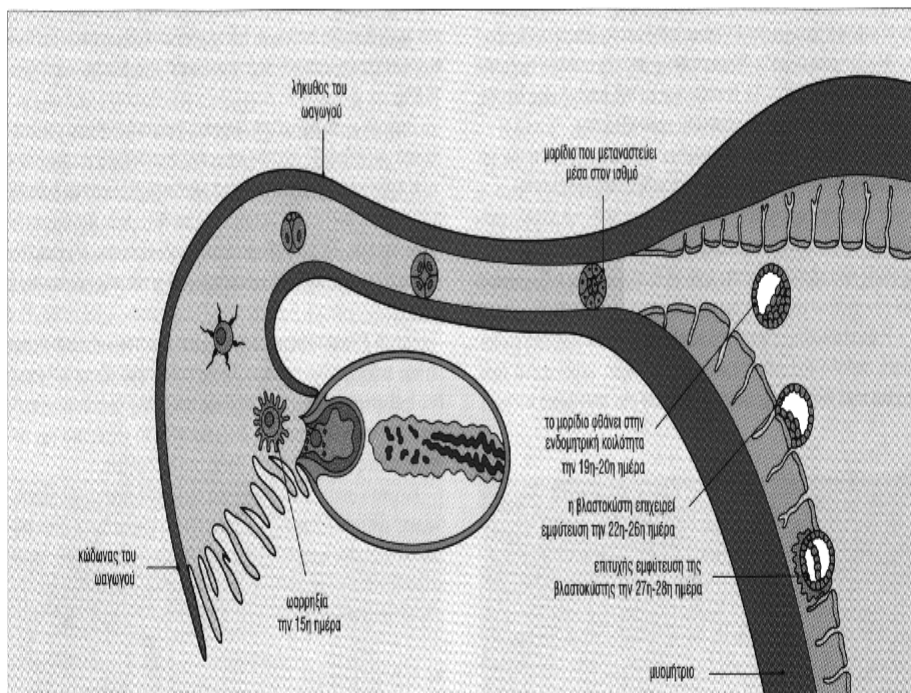
μορφολογικής του ανάπτυξης και εκκριτικής δραστηριότητας (εικ. 1.8). Το πάχος του βλεννογόνου γίνεται διπλάσιο από αυτό της παραγωγικής φάσης. Η επιφάνεια παρουσιάζεται ανώμαλη και πορώδης. Η διόγκωση των τριχοειδών γύρω από τους αδένες προκαλεί υπεραιμία. Αυτή η άσηπτη, εξοιδηματική, φλεγμονώδης αντίδραση που προετοιμάζει το ενδομήτριο για το επερχόμενο γονιμοποιημένο ωάριο, οδηγεί στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και αποβλέπει στην επιτυχή εμφύτευσή του γονιμοποιημένου ωαρίου στην ενδομητρική κοιλότητα και την έναρξη της κύησης (εικ. 1.9). Ο όρος εμφύτευση περιλαμβάνει εφαρμογή, εναπόθεση (apposition), σύνδεση (attachment) και τέλος εισβολή (nidation) της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, σε μια διαδικασία στην οποία συμμετέχουν ενεργά τόσο η βλαστοκύστη όσο και το ενδομήτριο. Η εμφύτευση που διευκολύνεται με την ταυτόχρονη χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών του μυομητρίου, απαιτεί ένα μορφολογικά και γενετικά φυσιολογικό έμβρυο και ένα

Εικόνα 1.8. Ενδομήτριο κατά την εκκριτική φάση (17η μέρα του κύκλου). Το πάχος του βλεννογόνου γίνεται διπλάσιο από αυτό της παραγωγικής φάσης. Η επιφάνεια παρουσιάζεται ανώμαλη και πορώδης. Οι αδένες εμφανίζουν σχηματισμούς “S” και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα. (Ann NY Acad Sci 622:16, 1991)



επιδεκτικό ενδομήτριο. Εάν δεν λάβει χώρα εμφύτευση του ωαρίου και εγκυμοσύνη, η έλλειψη ορμονικής υποστήριξης από τις ωοθήκες οδηγεί σε υποστρόφη και απόπτωση των νεκρωμένων αδένων και κυττάρων του στρώματος. Η αποβολή τους μαζί με αίμα ως εμμηνορρυσιακά απόβλητα σηματοδοτεί και την έναρξη του επόμενου έμμηνου κύκλου.

Εικόνα 1.9. Γονιμοποίηση και εμφύτευση. Διακρίνεται η πορεία του ωαρίου από τις ωοθήκες έως την εμφύτευση του στην ενδομητρική κοιλότητα.



1.5.3 ΟΠΙΟΕΙΔΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Είναι γνωστή η συμμετοχή των οπιοειδών πεπτιδίων στην κεντρική ρύθμιση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Η ταυτόχρονη έκφρασή τους στα γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα σηματοδοτεί και το σημαντικότερο περιφερικό φυσιολογικό τους ρόλο. Πρόσφατα καταδείξαμε ότι τα γονίδια της προεγκεφαλίνης, προδυνορφίνης και προοπιομελανοκορτίνης εκφράζονται στη μήτρα (126-128). Στο ανθρώπινο ενδομήτριο τα μεγέθη των μεταγραφημάτων των γονιδίων της

προδυνορφίνης και προοπιομελανοκορτίνης είναι 2,3 και 1,2 Kb αντίστοιχα, όμοια δηλαδή αυτών της υπόφυσης. Η εκλυόμενη β-ενδορφίνη παρουσιάζει κανονικό μοριακό βάρος ενώ η εκλυόμενη δυνορφίνη έχει μοριακό βάρος περίπου 8 kD (126,128). Η ρύθμιση των ενδομητρικών οπιοειδών πεπτιδίων παρουσιάζει ομοιότητες με αυτήν του υποθαλάμου και της υπόφυσης. Συγκεκριμένα, η έκλυση της β-ενδορφίνης καταστέλλεται από τα οιστρογόνα, τα γλυκοκορτικοειδή και τη μifeπριστόνη (RU486), ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από την προγεστερόνη και την GnRH (127). Αντίθετα, η έκλυση της δυνορφίνης επάγεται από την GnRH, ενώ δεν επηρεάζεται από τις στεροειδείς ορμόνες (128). Είναι λοιπόν πιθανόν οι τοπικές δράσεις των οπιοειδών στη μήτρα να ακολουθούν εντελώς ξέχωρες βιολογικές οδούς, που είναι ειδικές για κάθε οικογένεια ενδογενών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα ενδομητρικά κύτταρα είναι επιδεκτικά στη δράση των οπιοειδών πεπτιδίων καθώς εκφράζουν τους κ1, κ2 και κ3 οπιοειδείς υποδοχείς (129). Είναι γνωστό ότι η β-ενδορφίνη αυξάνει τη συγκέντρωση του υποδοχέα των οιστρογόνων στα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα, επηρεάζοντας έτσι τη δεκτικότητα του ενδομητρίου στη δράση των οιστρογόνων (128). Εκτός από το ενδομήτριο, τα ενδομητρικά οπιοειδή πεπτίδια ίσως επιδρούν και στο μυομήτριο, καθώς είναι γνωστές οι μυοχαλαρωτικές δράσεις τους στις λείες μυϊκές ίνες. Είναι λοιπόν πιθανό ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της συσταλτικότητας του μυομητρίου, επιτείνοντάς την αρχικά, λόγω μείωσης της β-ενδορφίνης που προκαλείται από την αύξηση των οιστρογόνων μέχρι την ωορηξία, γεγονός απαραίτητο τόσο για την απαιτούμενη μετακίνηση του ωαρίου στις σάλπιγγες, όσο και την αντίστοιχη προώθηση του σπερματοζωαρίου. Κατά τη δεύτερη φάση του κύκλου αντίθετα, η μείωση των οιστρογόνων, αυξάνει τα επίπεδα της παραγόμενης β-ενδορφίνης, οι μυοχαλαρωτικές δράσεις της οποίας είναι τώρα απαραίτητες για την ακόλουθη εναπόθεση/εμφύτευση της βλαστοκύστης. Είναι επίσης γνωστό ότι τα οπιοειδή πεπτίδια έχουν

ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες οι οποίες είναι δυνατό να βοηθούν στη μη απόρριψη της φέρουσας και ξένο (πατρικό) γενετικό υλικό εμφυτευόμενης βλαστοκύστης (126, 128).

1.6 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Η έκφραση της CRH και των υποδοχέων της σε αναπαραγωγικούς ιστούς (πλακούντας, ωοθήκες, όρχεις), υποδηλώνει ότι εκτός από τις καλά τεκμηριωμένες αντιαναπαραγωγικές δράσεις του πεπτιδίου σε κεντρικό επίπεδο, ίσως αυτό υπεισέρχεται και στη φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος σε περιφερικό επίπεδο. Όπως δείξαμε σε προηγούμενες εργασίες μας (126-128), τα ανθρώπινα επιθηλιακά ενδομητρικά κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο της POMC και εκλύουν τα τελικά της προϊόντα. Είναι λοιπόν πιθανή η ύπαρξη ενός τοπικού CRH/POMC άξονα και στο ενδομήτριο και η ακόλουθη συμμετοχή του σε σημαντικά φαινόμενα της ενδομητρικής κοιλότητας.

Ως εκ τούτου, στόχο του παρόντος ερευνητικού προγράμματος αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης, της ρύθμισης και του βιολογικού ρόλου της CRH στο ενδομήτριο. Έτσι μελετήθηκε η παρουσία του μεταγραφήματος της CRH και του τελικού πεπτιδικού προϊόντος στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στη μήτρα του επίμυος. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση παραγόντων της φυσιολογίας του ενδομητρίου (στεροειδών ορμονών, προγεστερόνης, προσταγλανδινών, κυτοκινών) στη ρύθμιση της ενδομητρικής CRH. Τέλος, διερευνήθηκε η αυτόνομη ή, από κοινού με άλλους παράγοντες, συμμετοχή της CRH σε βασικά φυσιολογικά φαινόμενα της αναπαραγωγικά ενεργής ενδομητρικής κοιλότητας, όπως η φθαρτοποίηση και η εμφύτευση του ωαρίου.

Πιο συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν:

α) η **έκφραση του γονιδίου της CRH** σε ανθρώπινα φυσιολογικά και αδενοκαρκινικά επιθηλιακά ενδομητρικά κύτταρα καθώς και στη μήτρα του επίμυος με Northern ανάλυση του αντίστοιχου mRNA

β) ο **κυτταρικός εντοπισμός του ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου** στο ανθρώπινο ενδομήτριο και τη μήτρα του επίμυος με ανοσοφθορισμό/ανοσοούστοχημεία

γ) το **μέγεθος του εκλυόμενου τελικού προύοντος/πεπτιδίου** με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

ε) η **παραγωγή/έκλυση του πεπτιδίου** σε βασικές συνθήκες από καλλιέργεια ανθρώπινων ενδομητρικών κυττάρων

στ) η **ρύθμιση της έκλυσης του πεπτιδίου** από καλλιέργεια ανθρώπινων ενδομητρικών κυττάρων

ζ) η **ρύθμιση της δραστηριότητας του επαγωγέα του γονιδίου της CRH** από τις στεροειδείς ορμόνες, τις ιντερλευκίνες και τις προσταγλανδίνες

η) η ***in vitro* επίδραση της CRH στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων** του ανθρώπινου ενδομητρίου και ο πιθανός μηχανισμός δράσης της CRH στη φθαρτοποίηση

θ) η ***in vitro* επίδραση της CRH σε παράγοντες που συμμετέχουν στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου**, όπως οι ιντερλευκίνες και η προσταγλανδίνη E2

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες Sprague-Dawley (Charles Rivers, Italy) βάρους 220-250 gr. Τα πειραματόζωα είχαν τοποθετηθεί σε κλωβό κατά την ανάπτυξη, σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 23-25 °C και με κύκλο φωτός-σκότους 14-10 ωρών. Τρέφονταν με σταθερή τροφή πειραματοζώων και έπιναν νερό κατά βούληση. Θηλυκά ζώα αφέθησαν όλη τη νύκτα από κοινού με ενήλικα αρσενικά. Επιβεβαίωση της συνουσίας έγινε το επόμενο πρωί (1η ημέρα κύησης) με την ανίχνευση σπερματοζωαρίων στις κοιλικές εκκρίσεις. Είναι τεκμηριωμένο ότι στους επίμυες, η εμφύτευση του ωαρίου αρχίζει 96 με 106 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και συνδυάζεται με αύξηση της εξοιδημάτωσης στη θέση εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Έτσι, στις 9:00 πμ της 6ης ημέρας κύησης, τα ζώα δέχθηκαν ενδοφλέβια 0,5 χιλιοστόλιτρα διαλύματος Evans blue (1% σε ορό), χρωστική που επιτρέπει την οπτική παρατήρηση αυτού του φαινομένου χρωματίζοντας κυανές τις θέσεις εμφύτευσης. 15 λεπτά αργότερα τα ζώα θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό και αφαιρέθηκε η μήτρα. Έγινε διαχωρισμός των θέσεων εμφύτευσης (κυανόχρωων) και των ενδιάμεσων (άχρωων) περιοχών. Μέρος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για ανοσοϊστοχημεία ενώ τα υπόλοιπα καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο για Northern ανάλυση του μεταγραφήματος της CRH.

2.2. Καλλιέργεια ενδομητρικών κυττάρων Ishikawa

Τα κύτταρα Ishikawa είναι σειρά προερχόμενη από καλά διαφοροποιημένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου (130). Εκφράζουν τον υποδοχέα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης *in vitro*, ενώ αποκρίνονται στα οιστρογόνα με αύξηση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού και αύξηση της συγκέντρωσης των υποδοχέων της προγεστερόνης (131,132). Εκφράζουν επίσης τα γονίδια των POMC,

PDYN ενώ εκλύουν τα τελικά τους προϊόντα (126-128). Τέλος ανιχνεύονται σε αυτά οπιοειδείς υποδοχείς (129). Αποτελούν κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδομητρικής φυσιολογίας και προς το σκοπό αυτό έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα (126-129, 131-134).

Υλικά

MEM: Minimum Essential Medium (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

L-γλουταμίνη: L-glutamine (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Hepes: N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA (Sigma, USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή: Πλάκες Neubauer και Malassez

Μέθοδος

Τα κύτταρα Ishikawa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/HAM'S F-12 απουσία ορού, συμπληρωμένο με 10mM L-γλουταμίνη, 15 mM Hepes και 1% αντιβιοτικό -αντιμυκωτικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης για την αναστολή πιθανών μολύνσεων.

Υψηλής πυκνότητας καλλιέργειες κυττάρων Ishikawa εκτέθηκαν σε διάλυμα Trypsin-HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) που περιείχε 0.05% E.D.T.A. (το μετά νατρίου άλας του αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικού οξέος) για 10-15' στους 37 °C. Τά ληφθέντα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 75-cm² φλάσκες (10⁶ κύτταρα/φλάσκα) σε θρεπτικό υλικό DMEM/HAM'S F-12, απουσία

ορού, που περιείχε τις διάφορες ουσίες που εκτέθηκαν οι καλλιέργειες. Για τις ουσίες οι οποίες είχαν διαλυματοποιηθεί σε αιθανόλη, για ακρίβεια, η αιθανόλη προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό του δείγματος ελέγχου (control) σε τελική συγκέντρωση 0,1%. Στο θρεπτικό υλικό γινόταν αντικατάσταση κάθε 48 ώρες, για περισσότερες από οκτώ (8) συναπτές ημέρες. Για τη μέτρηση του περιεχομένου των πρωτεϊνών και των ανοσοδραστικών πεπτιδίων τα κύτταρα ελήφθησαν με έκθεση σε διάλυμα Trypsin-HBSS που περιείχε 0,05% EDTA.

2.3 Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες των κυττάρων Ishikawa μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας, σύμφωνα με τη μέθοδο του αιματοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer-Levy). Η μέτρηση γινόταν σε μικροσκόπιο ορατού φωτός (100X) (Olympus, BH, Japan).

2.4 Συλλογή ανθρώπινου ενδομητρικού ιστού

Η προμήθεια των ιστών έγινε από την μαιευτική/γυναικολογική κλινική του ΠΕΠΑΓΝΗ υπό την εποπτεία του διευθυντή της κλινικής Αν. Καθηγητή Ευγένιου Κουμαντάκη.

Αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση (διαγνωστική απόξεση, υστερεκτομή) ακολούθησε η διαδικασία συλλογής του ιστού, η οποία εκτελέστηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες στους 4 °C.

Ο ιστός καθαρίστηκε από τυχόν λίπος, όταν επρόκειτο για υστερεκτομή, διανοίχθηκε η μήτρα και συλλέχθηκε το ενδομήτριο με απόξεση. Το ενδομήτριο τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Corning 15 ml που περιείχε θρεπτικό υλικό, HAM'S F-10, 10% F.C.S., PH: 7,4 και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο σε πάγο, όπου τεμαχίστηκε και καθαρίστηκε εκ νέου

από τα πήγματα αίματος με έκπλυση με ισότονο διάλυμα HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).

Κάθε ιστός συνοδεύεται απαραίτητα από τις σχετικές πληροφορίες. Ο ορός εμβρίου μόσχου (FCS) πριν τη χρησιμοποίησή του στο διάλυμα απενεργοποιήθηκε με επώαση σε υδατόλουτρο 57 °C, για τριάντα λεπτά (30').

2.5 Απομόνωση επιθηλιακών και στρωματικών ενδομητρικών κυττάρων

Η διαδικασία πρωτογενούς καλλιέργειας επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων εκτελέστηκε σε αποστειρωμένο περιβάλλον, σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 10% ορό εμβρίου μόσχου (MEM+10%FCS), 10μg/ml χοίρεια κρυσταλλική ινσουλίνη (Nordisk-USA, Bethesda MD) και 1% αντιβιοτικό-αντιμυκητιακό διάλυμα (Gibco).

Η απομόνωση περιελάμβανε τα εξής στάδια:

1. Επίδραση με Κολλαγενάση τύπου I 0.25% για 90 λεπτά στους 37° C, με έντονη ανάδευση
2. Διαχωρισμό των αδένων από το στρώμα με ανοξειδωτο ατσάλινο φίλτρο με πόρους διαμέτρου 45 μm.
3. Απομάκρυνση των αδένων από το φίλτρο και καθίζηση με φυγοκέντρηση.
4. Διαχωρισμό των επιθηλιακών κυττάρων από τα στρωματικά λαμβάνοντας υπ' όψη την ταχύτερη πρόσδεση των στρωματικών κυττάρων σε ειδικά επεξεργασμένη για κυτταροκαλλιέργεια πλαστική επιφάνεια στους 37° C.

2.6 Συλλογή δείγματος και παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος για μέτρηση πεπτιδικών ορμονών με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό

Υλικά

HCl (Merck, Germany)

Ομογενοποιητής teflon-glass: RW-20 (IKA-WERCK, Germany)

Ξέστρο κυττάρων (Costar, Europe LTD, The Netherlands)

Φυσιολογικός ορός: χλωριούχο νάτριο 0,9%

Μέθοδος

Το θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιεργειών (από φλάσκες καλλιεργειών επιφάνειας 75 cm²) συλλέχθηκε υπό στείρες συνθήκες, φυγοκεντρήθηκε (800g x 10 λεπτά), το υπερκείμενο οξινίστηκε με HCl 0.1N (1 ml HCl/ 5 ml θρεπτικού υλικού) και διατηρήθηκε στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Τα κύτταρα ελήφθησαν με απόξεση, συλλέχθηκαν με φυσιολογικό ορό 0,9% και φυγοκεντρήθηκαν. Στο ίζημα προστέθηκε HCl 0.1N, ομογενοποιήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (10000 rpm x 20', 4 °C) και το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα που συλλέχθηκε διατηρήθηκε στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.7 Χρωματογραφία στήλης

α) Μικροκολώνα ανάστροφης φάσης C18 (Sep-pack)

Υλικά

Ακετονιτρίλιο (Merck, Germany)

HCl (Merck, Germany)

Μικροκολώνα Sep-pack C18 (Waters associated, MA, USA)

Συσκευή συγκέντρωσης υπό κενό Speed-Vac model SVC-100H (Savant, N.Y.)

Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκχύλιση πεπτιδίων και άλλων ουσιών ανάλογα με την πολικότητά τους. Για την πραγματοποίηση της τεχνικής ακολουθούνται τα επόμενα βήματα. Αρχικά η κολώνα εκπλένεται με 10 ml ακετονιτριλίου και 20 ml HCl 0.1 N και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενεργοποίησή της και η δημιουργία τέτοιων συνθηκών ώστε οι χημικές ενώσεις που μας ενδιαφέρουν να παραμείνουν στη μικροκολώνα. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα στην κολώνα και στο στάδιο αυτό γίνεται η κατακράτηση των υδρόφοβων πεπτιδίων. Ακολουθεί έκπλυση της κολώνας με άλλα 20 ml HCl 0.1N οπότε αποβάλλονται οι υψηλής πολικότητας χημικές ενώσεις. Τα υδρόφοβα πεπτίδια εκκλύονται με 3 ml διαλύματος ακετονιτριλίου/HCl 0.01N (4:1). Τα δείγματα στη συνέχεια συγκεντρώνονται υπό κενό σε συσκευή συγκέντρωσης (Centrivar Concentrator, Labconco Corp. USA) και διατηρούνται στους -20°C μέχρι της τελικής τους ανάλυσης.

β) Χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography)

Υλικά

Δεξτράνη: Sephadex G-50 (Pharmacia, Sweden)

Ουρία (Harnstoff, NY)

Κυανούν της Δεξτράνης: Blue-Dextran (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA (Sigma, USA)

Εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης: CRH (Sigma, USA)

Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση του μοριακού βάρους διαφόρων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1959 από τους Porath και Flotin. Συγκεκριμένα σε κολώνα

0.9 x 60 cm, της Pharmacia προστέθηκε μείγμα Sephadex G-50 το οποίο είχε προηγουμένως διαβραχεί με διάλυμα οξεικού οξέος 0.1N που περιείχε 0.5% αλβουμίνη ορού βοός σε θερμοκρασία δωματίου για 16-24 περίπου ώρες. Ο ολικός όγκος της στήλης ήταν περίπου 40 ml (bed volume, V_b). Ο νεκρός όγκος της στήλης ($V_0=11,8$ ml) προσδιορίστηκε με Κυανούν της Δεξτράνης και ο ολικός όγκος ($V_t=45$ ml) με 6M ουρία.

Μετά την παραπάνω διαδικασία επιστοιβάχθηκαν στην επιφάνεια του πηκτώματος είτε κυτταρικά εκχυλίσματα ομογενοποιημάτων κυττάρων τα οποία είχαν φυγοκεντρηθεί στις 10.000 x g για 10 λεπτά και είχε συλλεχθεί το υπερκείμενο, ή θρεπτικά υγρά καλλιέργειών από τα οποία είχαν απομονωθεί τα προαναφερόμενα πεπτίδια με μικροκολώνα ανάστροφης φάσης C18 (Sep-pack). Και στις δυο περιπτώσεις τα δείγματα είχαν επαναδιαλυματοποιηθεί σε 0.5 ml διαλύματος οξεικού οξέος 0.1N, 0.5% αλβουμίνη ορού βοός και 6 M ουρία προκειμένου να επιτευχθεί η αποδιάταξη του πεπτιδίου. Η έκλουση της στήλης έγινε με διάλυμα οξεικού οξέος 0.1 N, 0.05% σε αλβουμίνη ορού βοός με ρυθμό ροής 1.5 ml/ώρα. Συλλέχθηκαν κλάσματα 1 ml, συγκεντρώθηκαν υπό κενό και διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι του προσδιορισμού τους με ραδιοανοσολογική μέθοδο. Κατά την παραπάνω διαδικασία ο διαχωρισμός των πεπτιδικών μορίων εξαρτάται από την ικανότητά τους να εισέρχονται στους πόρους του υλικού πλήρωσης (πολυμερισμένα δεξτράνια). Συγκεκριμένα, μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους του υλικού της στατικής φάσης και εκλούνται στα αρχικά κλάσματα, ενώ τα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια εισέρχονται στους πόρους του πηκτώματος και η έκλουσή τους καθυστερεί περισσότερο.

2.8 Ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί

α) Προσδιορισμός ανοσοδραστικής εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (IR-CRH) σε θεραπευτικά υλικά καλλιεργειών και κυτταρικά εκχυλίσματα

Υλικά και συσκευές

Μονοβασικό φωσφορικό νάτριο: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, USA)

Άνυδρο διβασικό φωσφορικό νάτριο: Na_2HPO_4 (Sigma, USA)

Triton X-100 (Sigma, USA)

BSA (Sigma, USA)

Αδρανοποιημένος ανοσο-ανενεργός ορός κονίκλου (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Αζίδιο του νατρίου (Sigma, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της CRH ανθρώπου και επίμους από ορό κονίκλου (Neosystem laboratorie, France)

$[\text{}^{125}\text{I-Tyr }^0\text{]-CRH}$ (NEN, USA)

CRH (Sigma, USA)

Δεύτερο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών κονίκλου: GARGG από ορό αίγας (Peninsula, USA)

Μετρητής γ-ακτινοβολίας Packard (USA)

Διαλύματα

Το αντίσωμα για την CRH είχε παρασκευαστεί από ορό κονίκλου και ο τελικός τίτλος χρησιμοποίησής του ήταν 1:7500. Το αντίσωμα παρουσίαζε 100% διασταυρούμενη αντίδραση με τη συνθετική ανθρώπινη CRH, CRH επίμους και με πρόβειο CRH, ενώ δεν παρουσίαζε καμία αντίδραση με την ωκυτοκίνη, την ουσία P, την αργινίνη-βαζοπρεσίνη, την εκλυτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης και την εκλυτική ορμόνη της LHRH. Τα 50 μl του λυοφιλοποιημένου ορού διαλύονταν σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και χρησιμοποιούνταν 100 μl έτσι, ώστε η τελική αραιώσή του στο σωληνάκι αντίδρασης να είναι η προαναφερόμενη.

Διάλυμα CRH για προετοιμασία πρότυπης καμπύλης

Φυσιολογικός ορός: χλωριούχο νάτριο 0.9%

Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0.01N

Ανθρώπινη αλβουμίνη 2%

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την επαναδιαλυματοποίηση των δειγμάτων όσο και για την αραίωση της CRH (μετά τη διάλυσή της σύμφωνα με τα προηγούμενα) και του αντισώματος, ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών διάλυμα 0.1M

Φωσφορικό διάλυμα 0.1 M

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1M
Na ₂ HPO ₄ άνυδρο	0.1M
Triton X-100	0.2%
Αλβουμίνη ορού βοός (BSA)	0.05%
Μη ανοσοδραστικός ορός κονίκλου (NIS: Rabbit serum)	1:100
NaN ₃	0.02%

Το διάλυμα μετά την παρασκευή του φυλάσσεται στους 4 °C

Ως ραδιενεργό χρησιμοποιήθηκε [¹²⁵I-Tyr⁰]-CRH με ειδική δραστικότητα την ημέρα αναφοράς 2200 Ci/ mmol το οποίο βρισκόταν σε μορφή διαλύματος σε ακετονιτρίλιο: νερό (35:65), 0.05 M β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2 % τριφθοροοξικό οξύ και 0.2% BSA.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της CRH βασίζεται σε ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό (RIA) με σημασμένο αντιγόνο. Ο διαχωρισμός του δεσμευμένου από το ελεύθερο αντιγόνο πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του διπλού αντισώματος όπου το δεύτερο αντίσωμα προερχόταν από αίγα και είχε προκληθεί κατά ανοσοσφαιρινών κονίκλου.

Η μέθοδος αποτελείται από τα επόμενα στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων CRH, επαναδιαλυματοποίηση των λυοφιλοποιημένων αγνώστων δειγμάτων σε κατάλληλο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος των φωσφορικών (250μl) και λήψη 100 μl για το κάθε σωληνάκι αντίδρασης (κάθε δείγμα τοποθετούνταν εις διπλούν).

2. Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης προστίθενται 100 μl διαλύματος αντισώματος, τα δείγματα ανακινούνται ισχυρά σε μηχανή στροβιλισμού και επωάζονται για 20 ± 4 ώρες στους 4°C .

3. Προστίθενται 100 μl με περίπου 10000 κρούσεις ανά λεπτό (cpm) ραδιενεργής CRH και ακολουθεί δεύτερη επώαση για 20 ± 4 ώρες στους 4°C .

4. Προστίθενται 100 μl GARGG και 100 μl ανοσοανεργού ορού κουνελιού σε τελική αραίωση ίδια με αυτή του αντισώματος και τα δείγματα επωάζονται ξανά για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε $1700 \times g$ στους 4°C , αποχύεται το υπερκείμενο και το ίζημα κάθε δείγματος μετράται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας για 1 λεπτό και καταγράφονται οι κρούσεις.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβανόταν από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων CRH. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 1 πικογραμμάριο (pg)/σωλήνα αντίδρασης και η εκτόπιση του ραδιενεργού κατά 50% από την μη ιωδιωμένη CRH ήταν μεταξύ 20-25 pg. Ο συντελεστής διακύμανσης μέσα στην ίδια τεχνική (intra-assay coefficient of variation) ήταν 4.4% και ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των διαφόρων επαναλήψεων της τεχνικής (inter-assay coefficient of variation) ήταν 6.6%. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης της κυτταροκαλιέργειας.

2.9 Ανοσολογικοί προσδιορισμοί

A) Προσδιορισμός ανοσοδραστικής προλακτίνης (PRL) με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας σε υπερκείμενα καλλιιεργειών

Υλικά και συσκευές

Σφαίρες πολυστυρενίου επικεκαλυμμένες με αβιδίνη διαστάσεων 6 mm (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Διάλυμα αντισώματος κατά της PRL, σημασμένο με εστέρες ακριδινίου (φιαλίδιο που περιείχε 10 ml μονοκλωνικού αντισώματος μύς κατά της PRL σημασμένο με εστέρες ακριδινίου και πολυκλωνικό αντίσωμα από αίγα κατά της PRL ενωμένο με βιοτίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES με σταθεροποιητές πρωτεϊνών και 0.1% αζίδιο του νατρίου) (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Μηδενικής συγκέντρωσης διάλυμα PRL από λυοφιλοποιημένο ορό ίππου που περιείχε 0.1% αζίδιο του νατρίου και 0.2% EDTA (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων ανθρώπινης PRL σε λυοφιλοποιημένο ορό ίππου που περιείχαν 0.1% αζίδιο του νατρίου και 0.2% EDTA (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε απορρυπαντικό σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Διαλύματα ελέγχου γνωστών συγκεντρώσεων ανθρώπινης PRL σε λυοφιλοποιημένο ορό ίππου που περιείχαν 0.1% αζίδιο του νατρίου και 0.2% EDTA (Nichols Institute, Diagnostics, B.V.).

Το μονοκλωνικό αντίσωμα για την PRL ήταν παρασκευασμένο από ορό μύς και παρουσίαζε υψηλή συγγένεια και ειδικότητα μόνο για την αμινοτελική περιοχή της PRL ενώ το πολυκλωνικό είχε παρασκευαστεί από ορό αιγός και είχε την

ικανότητα να δεσμεύεται μόνο στην καρβοξυτελική περιοχή της PRL.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό της PRL βασίζεται σε ανοσομετρικό προσδιορισμό διπλού αντισώματος (μέθοδος sandwich) με τη χρήση χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα το μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με εστέρες του ακριδινίου ενώ το πολυκλωνικό είναι συζευγμένο με βιοτίνη. Η προσθήκη στο μείγμα αντίδρασης των επικεκαλυμμένων με αβιδίνη σφαιρών πολυστυρενίου επιτρέπει τη δημιουργία ενός συμπλέγματος μορφής “sandwich” μέσω των υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Οι εστέρες του ακριδινίου οξειδώνονται μετά από κατεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου και ένα αλκαλικό διάλυμα και μεταβαίνουν σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η επιστροφή του οξειδωμένου προϊόντος στη βασική κατάσταση έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός το οποίο καταγράφεται από το μετρητή φωταύγειας και εκφράζεται σε σχετικές μονάδες φωτός RLU (Relative Light Units).

Η μέτρηση της PRL έχει τα κάτωθι στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων PRL, επαναδιαλυματοποίηση των λυοφιλοποιημένων αγνώστων δειγμάτων σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού και λήψη 200 μl για το κάθε σωληνάκι αντίδρασης (κάθε δείγμα τοποθετούνταν εις διπλούν).

2. Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης προστίθενται 100 μl διαλύματος σημασμένου αντισώματος. Τα δείγματα ανακινούνται ελαφρά σε μηχανή στροβιλισμού, προστίθεται από μια σφαίρα πολυστυρενίου με το ακινητοποιημένο αντίσωμα και επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Προστίθεται 0.5 ml διαλύματος έκπλυσης και ακολουθεί έκπλυση των σφαιρών τρεις φορές με απιονισμένο νερό σε αυτόματη συσκευή έκπλυσης.

4. Κάθε δείγμα μετράται σε λουμινόμετρο για 2 δευτερόλεπτα.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβανόταν από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων PRL. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0.5 pg/ml. Ο συντελεστής διακύμανσης intra-assay coefficient of variation ήταν 3.8% και ο συντελεστής διακύμανσης inter-assay coefficient of variation ήταν 7.0%. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/mg ολικής πρωτεΐνης της κυτταροκαλιέργειας.

2.10 Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί

Προσδιορισμός ιντερλευκίνης-6 (IL-6) σε θρεπτικά υλικά καλλιέργειών με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)

Υλικά και συσκευές

Μικροπλάκες 96-οπών επικεκαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα μύς κατά της ιντερλευκίνης IL-6 (Quantikine, R&D systems)

Πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-6 σημασμένο με φυτική υπεροξειδάση (Quantikine, R&D systems)

Λυοφιλοποιημένη ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-6 σε ρυθμιστική πρωτεϊνική βάση με συντηρητικά (Quantikine, R&D systems)

Διάλυμα χρώματος με σταθεροποιημένο υπεροξείδιο του υδρογόνου και χρωμογόνο (τετραμεθυλβενζιδίνη) (Quantikine, R&D systems)

Διάλυμα τερματισμού: 2N θειικό οξύ

Συγκεντρωμένο διάλυμα έκπλυσης που περιείχε απορρυπαντικό και συντηρητικό

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Μέθοδος

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό της IL-6 βασίζεται σε ποσοτικό ανοσοενζυματικό προσδιορισμό τύπου “sandwich”. Συγκεκριμένα οι μικροπλάκες ELISA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επικεκαλυμμένες με μονοκλωνικά αντισώματα κατά της IL-6. Η προσθήκη στις κυψελίδες των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων καθώς και των αγνώστων δειγμάτων επιτρέπει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ ιντερλευκίνης-ακίνητοποιημένου αντισώματος (αντιγόνο-αντίσωμα). Μετά την απομάκρυνση της μη δεσμευμένης πρωτεΐνης προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τις μετρούμενες ιντερλευκίνες, το οποίο είναι σημασμένο με φυτική υπεροξειδάση και συνδέεται με την ακίνητοποιημένη ιντερλευκίνη σχηματίζοντας σύμπλοκο μορφής “sandwich”. Η προσθήκη χρωμογόνου διαλύματος (τετραμεθυλβενζιδίνη) οδηγεί στην ανάπτυξη χρώματος το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας της δεσμευμένης ιντερλευκίνης. Η αντίδραση διακόπτεται και η ένταση του χρώματος μετράται σε φωτόμετρο ELISA.

Η όλη διαδικασία αποτελείται από τα επόμενα στάδια:

1. Προσθήκη 200 μl δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ιντερλευκινών και αγνώστων δειγμάτων σε κάθε μικροκυψελίδα (κάθε δείγμα τοποθετούνταν εις διπλούν), επικάλυψη της πλάκας και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Απόχυση του υγρού και έκπλυση (με διάλυμα έκπλυσης) των κυψελίδων τρεις φορές.

3. Προσθήκη 200 μl πολυκλωνικού αντισώματος δεσμευμένου με ένζυμο, επικάλυψη της πλάκας και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Ακολουθεί έκπλυση όπως στο στάδιο 2.
5. Προσθήκη 200 μl χρωμογόνου και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη 50 μl 2N θειϊκού οξέος.
7. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 450 nm σε φωτόμετρο ELISA.

Το χρώμα παραμένει σταθερό για χρονικό διάστημα 30 λεπτών μετά τη διακοπή της αντίδρασης.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβανόταν από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ιντερλευκινών. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν περίπου 1 pg/ml. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικά για την IL-6 και δεν παρουσίαζαν διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες. Ο συντελεστής διακύμανσης intra-assay coefficient of variation ήταν 4.4% και ο συντελεστής διακύμανσης inter-assay coefficient of variation 3.6% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ mg ολικής πρωτεΐνης της κυτταροκαλιέργειας.

2.11 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Υλικά και συσκευές

Διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G-250: Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)

Διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA), 1mg/ ml

Φυσιολογικός ορός: χλωριούχο νάτριο 0.9%

Φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001)

Μέθοδος

Μετά το τέλος κάθε πειραματισμού τα κύτταρα συλλέγονταν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ομογενοποιούνταν σε διάλυμα HCl 0.1 N και το ποσό των ολικών πρωτεϊνών προσδιοριζόταν με τη μέθοδο Bradford. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που χρησιμοποιείται στην τεχνική μπορεί να υπάρχει σε δύο διαφορετικές χρωματικές μορφές, κόκκινη και μπλε, ανάλογα και με το pH του διαλύματος. Μετά τη σύνδεσή της με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των υπολειμμάτων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας η κόκκινη μορφή μετατρέπεται σε μπλε προκαλώντας μια μετατόπιση στο μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm όπου και γίνεται η μέτρηση τελικά. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, γεγονός το οποίο παρέχει μεγάλη ευαισθησία κατά τη μέτρηση της πρωτεΐνης. Η σύνδεση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (περίπου σε 2 λεπτά) και υπάρχει πολύ καλή σταθερότητα του χρώματος για περίπου 1 ώρα μετά την προσθήκη της χρωστικής.

Η διαδικασία απαιτεί τα επόμενα στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA (0,1,2,4,8,16,32 μg) σε φυσιολογικό ορό.
2. Σε πλάκα 96 οπών τοποθετούνται 160 μl των γνωστών και αγνώστων δειγμάτων σε κάθε μικροκυψελίδα (κάθε δείγμα τοποθετούνταν εις διπλούν).
3. Προστίθενται 40 μl χρωστικής Bio-Rad και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση του μείγματος.
4. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 595 nm σε φωτόμετρο ELISA.

Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβανόταν από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ο συντελεστής διακύμανσης

intra-assay coefficient of variation ήταν 1-2% και ο συντελεστής διακύμανσης inter-assay coefficient of variation ήταν 4-5%. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg ολικής πρωτεΐνης/ ml.

2.12 NORTHERN BLOT ανάλυση του mRNA της CRH

α) Απομόνωση mRNA με τη μέθοδο της θειοκυανικής γουανιδίνης-όξινης φαινόλης

Υλικά και συσκευές

Θειοκυανική γουανιδίνη: Guanidinium Thyocyanate (Sigma, USA)

Κιτρικό νάτριο: sodium citrate (Sigma, USA)

Lauryl Sarcosyl (Sigma, USA)

2-Μερκαπτοαιθανόλη (Sigma, USA)

Φαινόλη (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Οξικό νάτριο (Merck, Germany)

Χλωροφόρμιο (Merck, Germany)

Ισοαμυλική αλκοόλη (Merck, Germany)

Απόλυτη αιθανόλη (Merck, Germany)

8-υδροξυκινολίνη (Sigma, USA)

Φυγόκεντρος (Sigma, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα Μετουσίωσης

Θειοκυανική γουανιδίνη	4M
Κιτρικό νάτριο pH 7.0	25 mM
Lauryl Sarcosyl	0.5%
2-Μερκαπτοαιθανόλη	0.1M

Διαλύεται η γουανιδίνη στους 65 °C υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά τα υπόλοιπα συστατικά. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς την προσθήκη 2-μερκαπτοαιθανόλης για 3 μήνες, ενώ μετά την προσθήκη της τελευταίας για 1 μήνα.

Παρασκευή όξινης φαινόλης

Η φαινόλη που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία αυτή είναι κρυσταλλική και πρέπει πριν από τη χρήση της να εξισορροπηθεί με νερό. Συγκεκριμένα 1 Kgr φαινόλης τήκεται στους 65 °C, προστίθεται σε αυτήν 1 gr 8-υδροξυκινολίνη και 1 lt αποστειρωμένου νερού και εκτελείται ισχυρή ανάδευση. Το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία στους 4 °C για ένα βράδυ. Στη συνέχεια αφαιρείται η υδατική φάση, προστίθεται ίσος όγκος νερού, αναδεύεται ισχυρά και αφήνεται και πάλι σε ηρεμία. Την επομένη, μετά την αφαίρεση της υδατικής φάσης, ελέγχεται το pH της οργανικής το οποίο πρέπει να μην υπερβαίνει το 5.0. Η όξινη φαινόλη φυλάσσεται στους 4 °C και μπορεί να διατηρηθεί έως και 2 μήνες ().

Μέθοδος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του mRNA της CRH βασίστηκε στη μέθοδο των Chomczynski και Sacchi (1987). Τα κύτταρα και οι ιστοί είχαν καταψυχθεί στους -80 °C πριν από τη χρήση τους. Τα παγωμένα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα μετουσίωσης (1 ml) σε glass-Teflon ομογενοποιητή και στη συνέχεια προστέθηκαν στο ομογενοποιημένο μείγμα διαδοχικά 0.1 ml 2 M οξικό νάτριο pH 4.0, 1 ml φαινόλη (κορεσμένη με νερό) και 0.2 ml μείγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (49:1),

με καλή ανάμειξη μετά την προσθήκη του κάθε αντιδραστηρίου. Το τελικό εναιώρημα αναδεύτηκε για 10 δευτερόλεπτα σε μηχανή στροβιλισμού και έμεινε σε πάγο για 15 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000 x g για 20 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση το RNA βρισκόταν στην υδατική φάση, ενώ το DNA και οι πρωτεΐνες στην ενδιάμεση και στη φαινολική φάση. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο, αναμείχθηκε με 2 όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου οξικό νάτριο 3M pH 5.4 και τοποθετήθηκε στους -80 °C για 1 ώρα το λιγότερο, για να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση του RNA. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση σε 12.000 x g για 25 λεπτά στους 4 °C και το προκύπτον ίζημα επαναδιαλυματοποιήθηκε σε αιθανόλη 70%, φυγοκεντρήθηκε σε 12.000 x g για 5 λεπτά στους 4 °C και το RNA διαλύθηκε σε νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC). Η ποιότητά του ελέγχθηκε φωτομετρικά (260/280 nm) και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

β) Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή αγαρόζης

Υλικά

MOPS: 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικό οξύ (Sigma, USA)

EDTA: νατριούχο άλας του αιθυλενοδιάμινο-τετραοξικού οξέος (Sigma, USA)

Οξικό νάτριο (Sigma, USA)

Αγαρόζη (Sigma, USA)

Φορμαλδεΐδη 37% (Merck, Germany)
 Γλυκερόλη (Merck, Germany)
 Φορμαμίδη (Sigma, USA)
 Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA)
 Κυανούν του ξυλενίου (Sigma, USA)
 Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma, USA)

Διαλύματα

20x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (20 x FRB) (Διάλυμα Α)

MOPS 41.8 gr

Οξικό νάτριο 6.8 gr

EDTA 7.32 gr

Ρύθμιση του pH στο 7.0 με 1N NaOH

Προσθήκη νερού μέχρι τα 500 ml. Το διάλυμα διηθείται, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και φυλάσσεται στους 4 °C σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Διάλυμα μετουσίωσης για την τοποθέτηση του δείγματος στην πηκτή αγαρόζης (Διάλυμα Β) (Loading buffer)

Φορμαμίδη 50%

Φορμαλδεΐδη 18%

Γλυκερόλη 5%

FRB 1x

Κυανούν της βρωμοφαινόλης 0.25% (w/v)

Κυανούν του ξυλενίου 0.25% (w/v)

Συμπλήρωση με νερό μέχρι τον απαιτούμενο όγκο. Το διάλυμα μετά την παρασκευή του φυλάσσεται στους -20 °C.

Μέθοδος

Προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης

2 gr αγαρόζης διαλύθηκαν σε 100 ml αποστειρωμένου νερού με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι 50-60 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτό διαδοχικά 6.5 ml διάλυμα FRB 1x, 23.5 ml φορμαλδεΐδη 37% και 15 μl βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml. Το μείγμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει μέχρι να ετοιμαστούν τα δείγματα του RNA.

γ) Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση

Υπολογίζεται η ποσότητα του RNA που υπάρχει στα δείγματα (τοποθετήθηκε ίση ποσότητα από όλα τα δείγματα σε κάθε πηγάδι της πηκτής ηλεκτροφόρησης, περίπου 20 μgr). Τα δείγματα αραιώνονται με αποστειρωμένο νερό κατεργασμένο με DEPC. Στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά 35 μl διάλυμα B (ο συνολικός όγκος δείγματος-διαλύματος B δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 45 μl), βράζονται για 3 λεπτά στους 95 °C και αφήνονται να ψυχθούν τουλάχιστον για 3 λεπτά σε πάγο. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων η πηκτική τοποθετήθηκε για 5 λεπτά σε πεδίο 5V/cm, ακολούθησε η τοποθέτηση των διαλυμάτων στα πηγάδια και η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε 3V/cm σε 1x διαλύματος FRB. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε σε 6-7 ώρες περίπου.

δ) Μεταφορά και σταθεροποίηση του RNA σε νάιλον μεμβράνες υβριδισμού

Υλικά και συσκευές

Whatman 3MM (Amersham, USA)

Μεμβράνη υβριδισμού (Amersham, USA)

Stratalinker UV 1800 (Stratagene, Ca, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα 20 x SSC

Χλωριούχο νάτριο 175.3gr

Κιτρικό νάτριο $3\text{ H}_2\text{O}$ 88.2gr

Νερό μέχρι τα 800 ml, ρύθμιση του pH στο 7.0 με λίγες σταγόνες 10N NaOH. Συμπλήρωση του όγκου σε 1 Lt και αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

Μέθοδος

Η πηκτή μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης εκπλένεται με διάλυμα 2x SSC για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθεί η μεταφορά του RNA σε μεμβράνη με τριχοειδική διαπήδυση. Συγκεκριμένα, σε κατάλληλο υποδοχέα τοποθετείται ποσότητα 20x SSC, και διυγραμένο χαρτί Whatman του οποίου τα άκρα είναι εμβαπτισμένα σε SSC. Πάνω από αυτό τοποθετείται η πηκτή και ακολούθως η νάυλον μεμβράνη (ίδιων διαστάσεων με την πηκτή), η οποία έχει προηγουμένως διαβραχεί με νερό και για 2 τουλάχιστον λεπτά με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθεί η τοποθέτηση 2 φύλλων Whatman 3MM ίδιων διαστάσεων, φύλλων απορροφητικού χαρτιού με ύψος τουλάχιστον 8 cm και ομοιόμορφου βάρους 500 gr περίπου. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 16-20 ώρες. Η μεμβράνη υβριδισμού εκπλένεται για την απομάκρυνση ίχνων πηκτής αγαρόζης, εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 1 λεπτό, στα 1200 Joule (UV-linker, Stratagene, USA) και σε θερμοκρασία 80 °C για 2 ώρες, τοποθετείται σε σελλοφάνη και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη στιγμή του υβριδισμού.

ε) Ραδιοσήμανση του ολιγονουκλετιδίου του mRNA της CRH με ^{32}P , υγρός υβριδισμός του RNA σε μεμβράνες υβριδοποίησης και αυτοραδιογραφία

Υλικά

Ιχνηλάτης mRNA CRH: συνθετικό 48-ολιγονουκλεοτίδιο

5x Tailing Buffer (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση: Tdt (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη: ^{32}P -dATP (ειδική δραστικότητα 800 mCi/mmol) (Amersham, USA)

EDTA (Sigma, USA)

Κολώνα Sephadex G-25 0.9 x 2.8 cm: NAP-5 column (Pharmacia)

SDS (Sigma, USA)

Film X-omat (Kodak)

Μονοβασικό φωσφορικό νάτριο άνυδρο (Sigma, USA)

Διβασικό φωσφορικό νάτριο ένυδρο (Sigma, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA (Sigma, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα 5x Tailing Buffer

Κακοδυλικό κάλιο pH 7.2 0.5M

Χλωριούχο Κοβάλτιο 10 mM

DTT 1 mM

Το διάλυμα φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Διάλυμα προϋβριδισμού και υβριδισμού

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.5M

BSA 1% w/v

SDS 10% v/v

Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα έκπλυσης της μεμβράνης

SDS 5%

EDTA 1 mM

Διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7.2

Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Μέθοδος

0.1 μg του ιχνηλάτη του mRNA της CRH αποδιατάχθηκε με βρασμό για 3 λεπτά στους 95 °C και τοποθετήθηκε σε πάγο για άλλα 3 λεπτά. Ακολούθησε διαδοχική προσθήκη 10 μl 5x Tailing buffer, 2 μl TdT, 3 μl ³²P και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 50 μl με αποστειρωμένο νερό. Το όλο μείγμα θερμάνθηκε στους 37 °C για 1 ώρα και προστέθηκαν σε αυτό 2 μl EDTA 0.5M με pH 8.0. Ο καθαρισμός του ολιγονουκλεοτιδίου πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιώντας στήλη 0.9 x 2.8 cm. Το υλικό πλήρωσης ήταν Sephadex G-25, ο νεκρός όγκος της στήλης 0.5 ml και ο όγκος του εκλουόμενου δείγματος 1 ml. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σήμανσης η μεμβράνη υβριδισμού εκπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό για 5 λεπτά και τοποθετήθηκε με διάλυμα υβριδισμού σε ογκομετρικό κύλινδρο στους 42 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το διάλυμα, προστέθηκε νέο με την ποσότητα του ραδιοσημασμένου ιχνηλάτη και επανατοποθετήθηκε στην ίδια θερμοκρασία για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης η μεμβράνη εκπλύθηκε διαδοχικά με διάλυμα έκπλυσης προθερμασμένο στους 65 °C ως εξής:

α) 1 φορά για χρονικό διάστημα 2 λεπτών.

β) 2-3 φορές για χρονικά διαστήματα 12 λεπτών και εκτέθηκε, με τη χρήση ενισχυτικής οθόνης σήματος, σε film Kodak X-omat στους -70°C το οποίο εμφανίστηκε σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

2.13 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός εκτελέστηκε σύμφωνα με την κλασσική μέθοδο που έχει εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, τα ανθρώπινα ενδομητρικά επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα, καθώς επίσης και τα κύτταρα Ishikawa, καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες διαστάσεων 22 X 22 mm, σε HAMF12/DMEM απουσία ορού. Μονιμοποιήθηκαν και έγιναν διαπερατά με επίδραση διαλύματος ακετόνης/μεθανόλη (σε αναλογία 1:1 κατ' όγκο) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά στους 4°C με αντιορό κονίκλου κατά της ανθρώπινης CRH και ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS για 3 λεπτά κάθε φορά. Η τελική αραίωση του πρώτου αντισώματος ήταν 1:250. Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε IgG κατσίκας κατά αντιορού κουνελιού σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC, Ortho Diagnostic Systems, USA). Ως δείγμα ελέγχου, κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως παραπάνω, αλλά δεν επώαστηκαν με αντιορό CRH ενώ επώαστηκαν κανονικά με το δεύτερο αντίσωμα. Η ανάλυση των φθοριζουσών περιοχών έγινε με μικροσκόπιο εξοπλισμένο με φωτισμό που διεγείρει το φθορισμό (Leitz Dialux 2 OEB microscope, Vetzar, Germany). Τέλος, για τη φωτογράφιση χρησιμοποιήθηκε φιλμ Kodak 3200 ASA.

2.14 Ανοσοϊστοχημεία

Τα τμήματα της μήτρας του κάθε επίμυος μονιμοποιήθηκαν σε 0.1 M ισότονου φωσφορικού διαλύματος (PBS) με pH:7.4 που περιείχε 4% παραφορμαλδεΐδη για 9 ώρες στους 4 °C. Εμβαπτίσθηκαν όλη τη νύκτα σε PBS, αφυδατώθηκαν με αιθανόλη, εμποτίσθηκαν με βουτανόλη και τοποθετήθηκαν σε παραπλάστ. Ελήφθησαν τομές πάχους 7 χιλιοστών και μετά την απομάκρυνση της παραφίνης ενυδατώθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS, επώασθηκαν σε 3% ορό αίγας για 20 λεπτά και στη συνέχεια επώασθηκαν με τον CRH αντιορό για 90 λεπτά σε RT. Μετά επώασθηκαν με το σύμπλεγμα βιοτίνης-δευτέρου αντισώματος (biotin-GARGG 1:200) και άλλα 30 λεπτά με το σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης υπεροξειδάσης (1.6:100). Η δράση της υπεροξειδάσης εμφανίστηκε με την αντίδραση 3,3'-διαμινο-βενζυδίνης (0.5 mg/ml). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τομές που επώασθηκαν με εξουδετερωποιημένο (μη ανοσοδραστικό) CRH αντιορό κονίκλου.

2.15 Διαμόλυνση των κυττάρων Ishikawa με την 5' προαγωγό περιοχή του γονιδίου της hCRH

Ο επαγωγέας της CRH που χρησιμοποιήθηκε είναι τμήμα της 5' προαγωγού περιοχής του γονιδίου της ανθρώπινης CRH από τη θέση HindIII στα -918 με +38 bp του εξονίου 1. Κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλη θέση στο πλασμίδιο pA3luc της λουσιφεράσης, το οποίο παρουσιάζει απειροελάχιστη, μη ειδική, ενεργότητα λουσιφεράσης απουσία προαγωγού. Εκτελέστηκε παροδική διαμόλυνση των ανθρώπινων ενδομητρικών αδενοκαρκινικών κυττάρων Ishikawa με τον επαγωγέα της hCRH, ο οποίος περιείχε τμήμα της 5' περιοχής του γονιδίου της hCRH (-918 με +38 bp του εξονίου 1) συνδεδεμένο με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης. Κοντά στη θέση εισαγωγής του επαγωγέα της hCRH

περιλαμβάνεται περιοχή που περιέχει κασέττα με τριμερές σήμα τερματισμού SV40 poly(A), το οποίο εξουδετερώνει τη δραστικότητα της λουσιφεράσης επιτρέποντας έτσι μετρήσεις υψηλής ευαισθησίας. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pA3luc χωρίς τον επαγωγέα της CRH. Πράγματι, σε κύτταρα διαμολυθέντα με αυτό, παρουσιάστηκε απειροελάχιστη, μη ειδική, ενεργότητα λουσιφεράσης, ακόμη και μετά από επώαση με στεροειδή ή προστανοειδή. Τα κύτταρα Ishikawa καλλιεργήθηκαν όπως ήδη έχει περιγραφεί σε τρυβλία (petri) 60 mm στους 37 °C υπό ατμόσφαιρα 95% αέρα - 5% CO₂, μέχρι να φθάσουν το 70% της πληρότητας της καλλιέργειας. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με HAMF12/MEM απουσία ορού προ της διαμόλυνσης με το σύμπλεγμα pA3luc hCRH 0.9-λιποφεκτίνη. Τα DNAs που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση ήταν pA3luc hCRH 0.9 (5 μg) και RAS-βgal (1 μg) ανά τρυβλίο. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της απόδοσης της διαμόλυνσης των κυττάρων δια του υπολογισμού στα ίδια κυτταρικά ομογενοποιημένα διαλύματα της δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Χρησιμοποιήθηκε συνολικό ποσό 6 μg DNA ανά τρυβλίο. Το DNA διαλυματοποιήθηκε σε 100μl ύδατος και αναμείχθηκε με ίσο όγκο ύδατος που περιείχε 25 μg λιποφεκτίνης. Το μείγμα λιποφεκτίνης-DNA (200 μl) προστέθηκε στα τρυβλία με τις καλλιέργειες των κυττάρων Ishikawa για 6 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν για 6-18 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη φαρμάκων. Μετά το τέλος της επώασης επιτελέστηκε λύση των κυττάρων και μετρήθηκε η δραστικότητα της λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο (Lumac/3M Biocounter, Model 2010A, the Netherlands) σύμφωνα με τη μέθοδο της Promega (Promega, Madison, Wisc., USA). 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστέθηκαν σε 100 μl αντιδραστηρίου λουσιφεράσης που περιείχε 20 mM τρικίνη, 1.07 mM

(MgCO₃)₄Mg(OH)₂5H₂O, 2.67 mM MgSO₄,), 1 mM EDTA, 33.3 mM διθειοθρεϊτόλη, 270 μM συνένζυμο A, 470 μM λουσιφερίνη και 530 μM ATP (pH 7.8). Τέλος η δραστηριότητα της λουσιφεράσης μετρήθηκε για 10" στο λουμινόμετρο. Η β-γαλακτοσιδάση μετρήθηκε επίσης σύμφωνα με τη μέθοδο της Promega. 150 μl κυτταρικού εκχυλίσματος επωάστηκαν στους 37 °C σε ολικό όγκο 300 μl από 0.1 M φωσφορικό νάτριο (pH: 7.5), 0.67 mg/ml ο-νιτριφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτη, 1 mM MgCl₂ και 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Η αντίδραση περατώθηκε με την προσθήκη 500 μl Na₂CO₃ 1M και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 420 nM.

2.16 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τη συγγραφή της παρούσας χρησιμοποιήθηκε IBM-συμβατός ηλεκτρονικός υπολογιστής με επεξεργαστή Pentium 130 MHz. Ως επεξεργαστής κειμένου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Word 7 και για τις γραφικές παραστάσεις τα Excel 7 και Origin 4.1. Για την επεξήγηση όρων της ξενόγλωσσας βιβλιογραφίας χρησιμοποιήθηκε το λεξικό «Dorland's medical dictionary» (28th edition, W.B. Saunders Co, Philadelphia) ενώ για την απόδοση ξενόγλωσσων όρων στην ελληνική η «Αγγλοελληνική ορολογία βιοχημείας μοριακής βιολογίας βιοτεχνολογίας» της EBEE.

Για τη στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία απλής (one-way) και παραγοντικής (factorial) ανάλυσης της μεταβλητότητας (ANOVA), καθώς και unpaired t-test στις περιπτώσεις που οι παρατηρήσεις μας ήταν παραμετρικές (σύγκριση απόλυτων τιμών). Για τις περιπτώσεις που τα αποτελέσματα εκφράζονταν "επί τοις εκατό" σε σχέση με κάποια μέτρηση αναφοράς ("διατάξιμες" παρατηρήσεις), χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές διαδικασίες και συγκεκριμένα οι Mann-Whitney και Kruskal-Wallis για τον έλεγχο ομοιογένειας

των δειγμάτων. Κάθε πείραμα έγινε τουλάχιστον τρεις φορές με σκοπό τον περιορισμό του προτύπου σφάλματος. Για να εξασφαλιστεί η ορθότητα των στατιστικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα NCSS (number cruncher statistica system, 4.21, Kaysville, Utah) και Statistica 4.5 (StatSoft Inc, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έκφραση του γονιδίου της CRH στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου ενδομητρίου

3.1.1 Ανίχνευση του mRNA της CRH με Northern ανάλυση

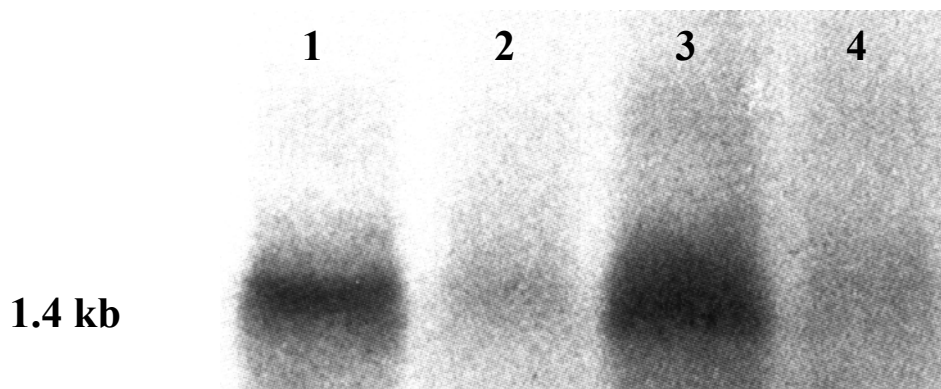
Παρασκευάσματα εμπλουτισμένα σε poly(A)-RNA προερχόμενα από φυσιολογικά ενδομητρικά κύτταρα, ενδομητρικά αδενοκαρκινικά κύτταρα Ishikawa, ανθρώπινο πλακούντα και υποθάλαμο επίμυος υπεβλήθησαν σε υβριδισμό τύπου Northern, χρησιμοποιώντας σαν ιχνηλάτη (probe) ένα συνθετικό 48-ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί στα αμινοξέα 22-27 της αλληλουχίας της ανθρώπινης CRH. Ο ανθρώπινος πλακούντας και ο υποθάλαμος επίμυος αποτελούν δύο ιστούς στους οποίους έχει τεκμηριωθεί καλά η έκφραση του γονιδίου της CRH ενώ η ομολογία της αλληλουχίας των μεταγραφημάτων της CRH στον άνθρωπο και στον επίμυ είναι υψηλή (περίπου 90%). Έτσι οι δύο αυτοί ιστοί επιλέχθησαν σαν θετικά δείγματα αναφοράς. Όπως φαίνεται στην εικ 3.1, το mRNA της CRH ταυτοποιήθηκε στα εκχυλίσματα των κυττάρων Ishikawa (ζώνη 1) και στα φυσιολογικά ενδομητρικά κύτταρα (ζώνη 2). Το μέγεθος του mRNA της CRH ήταν περίπου 1.4 κιλοβάσεις (Kb), όμοιο ή ταυτόσημο με αυτό του ανθρώπινου πλακούντα και του υποθαλάμου επίμυος (ζώνες 3 και 4 αντίστοιχα).

3.1.2 Ανίχνευση της ανοσοαντιδρώσας CRH στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου ενδομητρίου

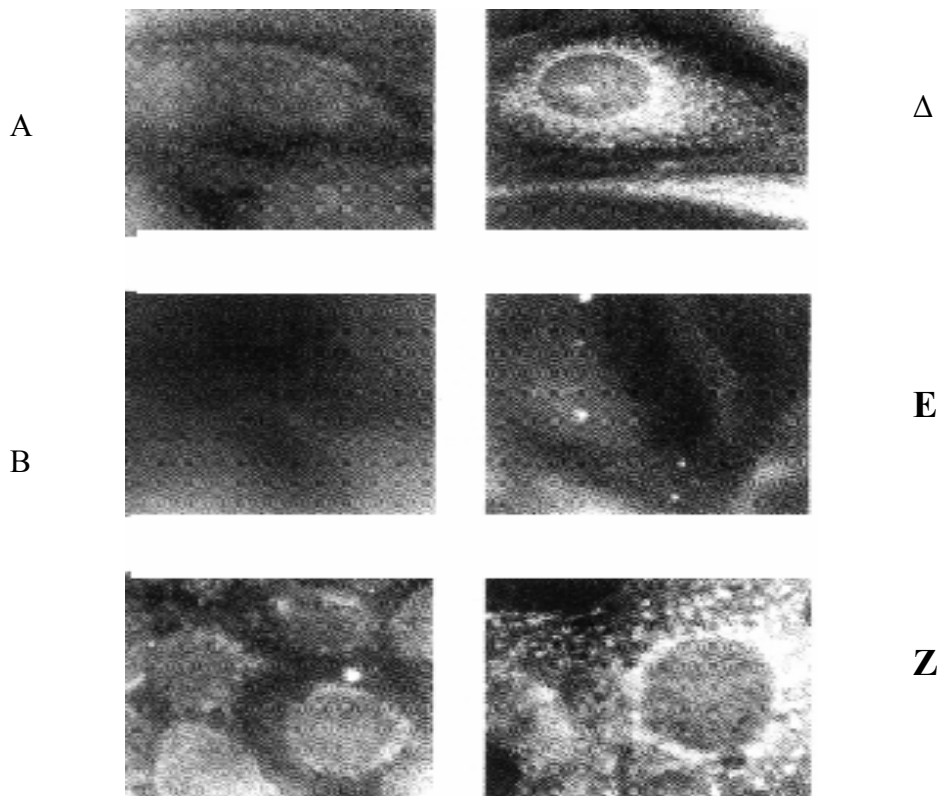
3.1.3 Ανοσοφθορισμός

Στην εικ. 3.2 φαίνεται η μορφολογία της τοπογράφησης της CRH σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου φυσιολογικού ενδομητρίου και ενδομητρικών αδενοκαρκινικών

κυττάρων Ishikawa, μετά από διαδοχική επώαση με κατάλληλα αντισώματα, όπως περιγράφεται στο Κεφ. «Υλικά και Μέθοδοι». Στα φυσιολογικά αδενικά ενδομητρικά κύτταρα (εικ. 3.2 Δ) καθώς επίσης και στα ενδομητρικά αδενοκαρκινικά κύτταρα Ishikawa (εικ. 3.2 Ζ), εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα περιοχές θετικές σε ανοσοαντιδρώσα CRH υπό τη μορφή εκκριτικών κοκκίων. Αντίθετα, τέτοιες περιοχές δεν είναι ορατές στα φυσιολογικά ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα (εικ. 3.2 Ε). Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα σύνδεσης της φθορίζουσας ουσίας, σαν δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επώασθηκαν μόνο με το σύμπλεγμα δευτέρου αντισώματος-FITC. Όπως φαίνεται στην εικ. 2(Α,Β,Γ), σε όλες αυτές τις περιπτώσεις είναι χαρακτηριστική η μη εμφάνιση εντοπισμένου κυτταρικού φθορισμού.



Εικόνα 3.1. Northern blot ανάλυση του poly(A) RNA των ενδομητρικών κυττάρων. 1. Κύτταρα Ishikawa 2. Φυσιολογικό ενδομήτριο 3. Ανθρώπινος πλακούντας 4. Υποθάλαμος αρουραίου



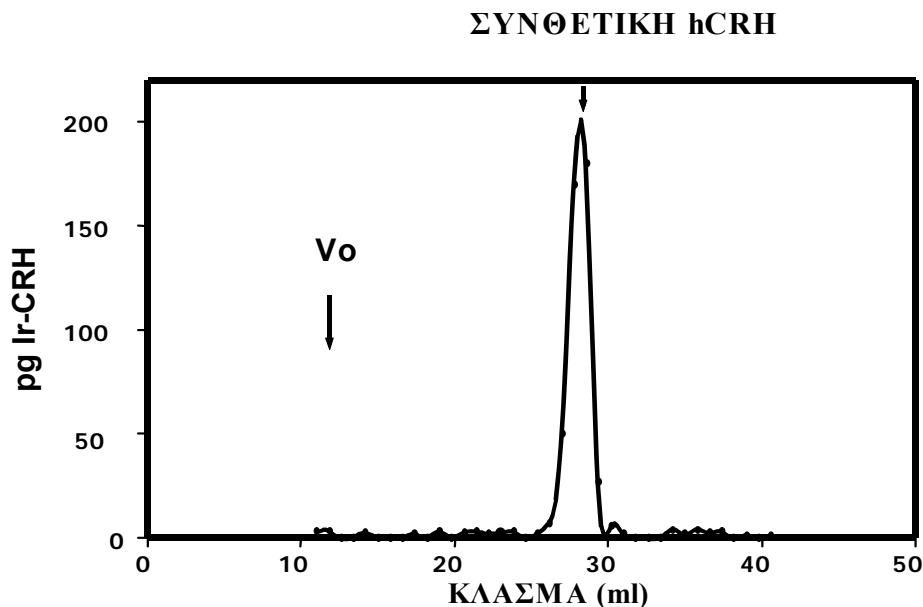
Εικόνα 3.2. Εντοπισμός του ανοσοαντιδρώσας CRH με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού στα φυσιολογικά και καρκινικά ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα ενδομητρικά κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδα εκτέθηκαν σε αντιγόνο CRH. Ο συνδεδεμένος αντιγόνος σημάνθηκε στη συνέχεια με Φλουορεσκίνη (FITC). Οι δεξιά φωτογραφίες (Δ, E, Z) παρουσιάζουν τη χρώση των επιθηλιακών, στρωματικών ενδομητρικών κυττάρων και κυττάρων Ishikawa αντίστοιχα, παρουσία αντιγόνου CRH και FITC, ενώ οι φωτογραφίες αριστερά (A, B, Γ) τα ίδια κύτταρα απουσία αντιγόνου CRH και παρουσία FITC (μεγένθυση X 1000).

3.1.4 Χαρακτηρισμός του μοριακού βάρους του ανοσοαντιδρώντος CRH με χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης

Η βαθμονόμηση της κολώνας έγινε με τη χρήση Κυανού της Δεξτράνης και συνθετικής 41-αμινοξέων ανθρώπινης CRH. Το Κυανού της Δεξτράνης είναι ένας έγχρωμος πολυσακχαρίτης μεγάλου μοριακού βάρους. Έτσι ο όγκος που μεσολαβεί από την έναρξη της χρωματογράφης μέχρι την έκλουσή του αντιστοιχεί στον «Νεκρό όγκο» της στήλης. Η έκλυση ανιχνεύθηκε με μέτρηση της

απορόφησης των κλασμάτων της στήλης στα **595 nM** και έτσι ο όγκος αυτός υπολογίστηκε σε **11,8 ml** (εικ. 3.3). Στη συνέχεια, κάτω από τις ίδιες σταθερές συνθήκες, έγινε χρωματογράφιση της συνθετικής **CRH** και των βιολογικών δειγμάτων. Στα κλάσματα της στήλης έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας του **Ir-CRH** με **RIA** όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Ποσότητα του ραδιενεργά σημασμένου πεπτιδίου χρωματογραφήθηκε επίσης προκειμένου να ελεγχθεί και η δική του χρωματογραφική εικόνα.



Εικ 3.3. Βαθμονόμηση κολώνας χρωματογραφίας με Κυανούν της Δεξτράνης και συνθετική **hCRH**. Συλλέχθηκαν δείγματα όγκου ενός χιλιοστόλιτρου. Τα βέλη δείχνουν το νεκρό όγκο (**Vo**) και τη θέση έκλυσης της συνθετικής 41-αμινοξέων **CRH** (**hCRH**).

Το κύριο κλάσμα της ανοσοαντιδρώσας CRH που ανιχνεύεται στα εκχυλίσματα του ανθρώπινου φυσιολογικού ενδομητρίου παρουσιάζει την ίδια χρωματογραφική εικόνα με τη συνθετική 41-αμινοξέων ανθρώπινη CRH (εικ.3.4 α). Επιπλέον, το κύριο κλάσμα της ανοσοαντιδρώσας CRH του θρεπτικού μέσου και κυτταρικού εκχυλίσματος των κυττάρων Ishikawa, παρουσιάζει την ίδια χρωματογραφική εικόνα με τη συνθετική 41-αμινοξέων ανθρώπινη CRH (εικ. 3.4β και 3.4γ). Αυτό το χρωματογραφικό προφίλ υποδηλώνει ότι η ενδομητρική ανοσοαντιδρώσα CRH είναι αυθεντική ανθρώπινη CRH. Παράλληλα, στο χρωματογράφημα των κυτταρικών εκχυλισμάτων φυσιολογικών ενδομητρικών κυττάρων και κυττάρων Ishikawa (εικ. 3.4α και 3.4γ), ανιχνεύεται επίσης ένα μικρό ποσό ir-CRH με Μοριακό Βάρος περίπου 10 Kdalton. Το χρωματογραφικό αυτό εύρημα ίσως να αντιστοιχεί στο πρόδρομο μόριο pgrproCRH. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από το γεγονός ότι στο θρεπτικό υλικό δεν ανιχνεύθηκε ir-CRH τέτοιου Μοριακού Βάρους καθ' όσον το μεγάλο αυτό μόριο δεν εκκρίνεται.

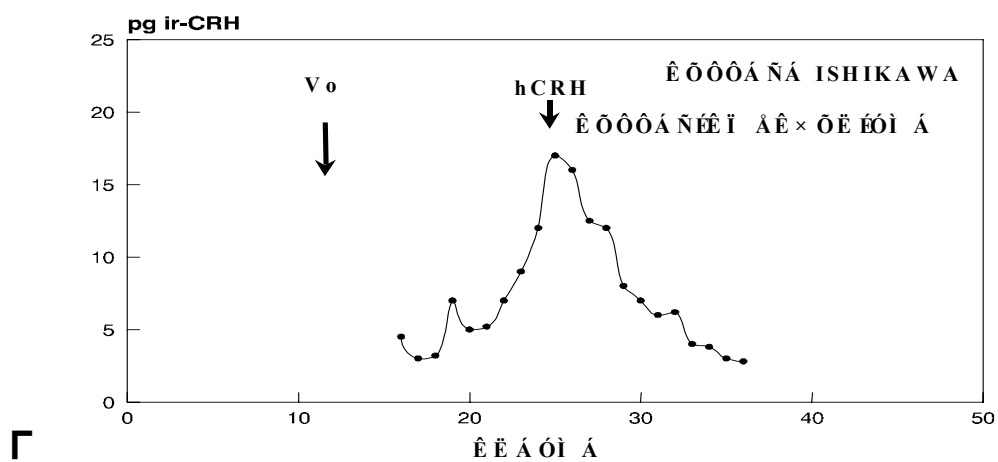
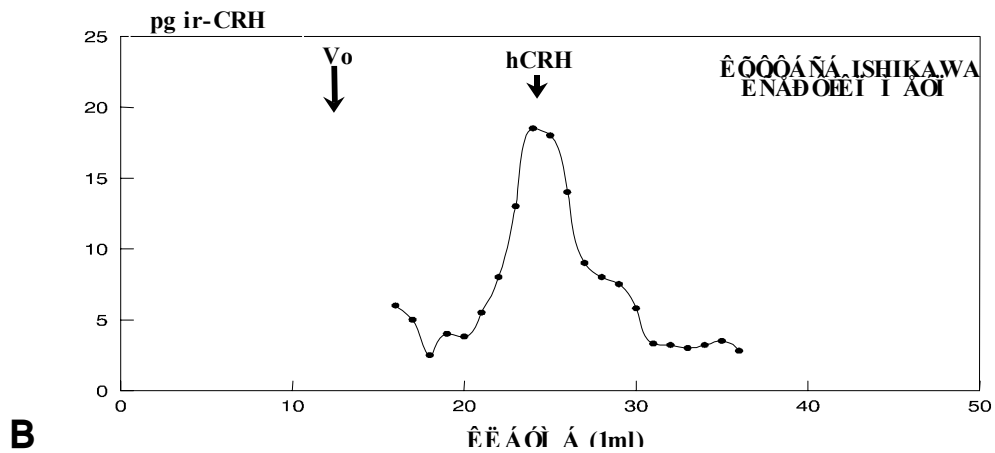
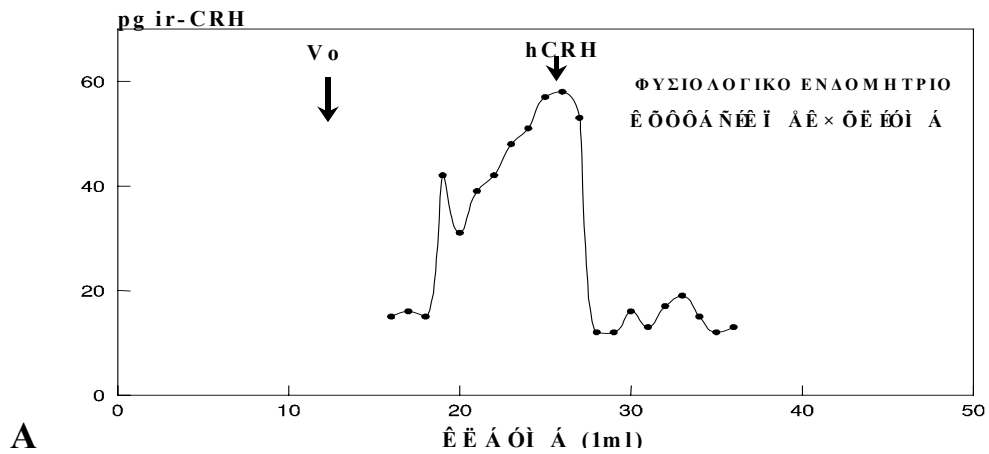
3.1.5 Ποσοτικός προσδιορισμός CRH

Προκειμένου να ελεγχθεί η τυχόν απώλεια ποσότητας ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων, έγιναν διαδοχικά τα παρακάτω πειράματα:

-γνωστές ποσότητες συνθετικής hCRH διαλυματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υλικό και ακολούθησε η ίδια διαδικασία επεξεργασίας όπως στα άγνωστα δείγματα δηλαδή οξινοποίηση, φυγοκέντρηση, αποθήκευση στους -80°C ,

συμπήκνωση με μικροκολώνα Sep-pak, ξήρανση με λυοφιλοποιητή και επαναδιαλυματοποίηση.

-σε άλλα δείγματα γνωστών ποσοτήτων hCRH, ακολούθησαν τμήματα της παραπάνω πλήρους διαδικασίας έτσι ώστε να

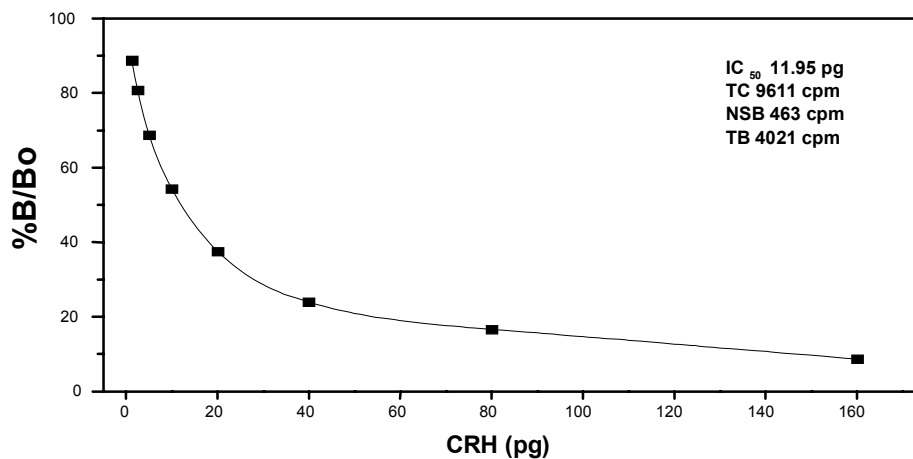


Εικ 3.4. Χρωματογραφία στήλης Μοριακής διήθησης με Sephadex G-50 : α) εκχυλίσματος φυσιολογικών επιθηλιακών ενδομητρικών κυττάρων β) θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κυττάρων Ishikawa. γ) εκχυλίσματος κυττάρων Ishikawa. Συλλέχθηκαν δείγματα όγκου ενός χιλιοστόλιτρου. Τα βέλη

δείχνουν το νεκρό όγκο (V_0) και τη θέση έκλουσης της 41-αμινοξέων ανθρώπινης CRH (hCRH).

εξακριβωθεί το συγκεκριμένο στάδιο στο οποίο τυχόν εμφανίζονται απώλειες

-τέλος, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (θερμοκρασία επωαστή, μεταβολίτες που παράγονται από τα κύτταρα) δείγματα γνωστών ποσοτήτων hCRH αφού διαλυματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, τοποθετήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειών παρουσία ή απουσία κυττάρων και τοποθετήθηκαν στον επωαστή για διάφορα χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 3.5. Καμπύλη αναφοράς. TC: ολικός αριθμός κρούσεων, **NSB:** μη ειδική σύνδεση, **TB:** ολική σύνδεση, **cpm:** αριθμός κρούσεων ανά λεπτό

Βρέθηκε ότι σε όλα τα στάδια επεξεργασίας, οι απώλειες ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου είναι ασήμαντες (επανάκτηση σχεδόν 100%) ενώ οι συνθήκες καλλιέργειας (για διάστημα μεγαλύτερο των 24 ωρών) οδηγούν σε απώλεια του 10% περίπου της συνολικής ποσότητας. Τα

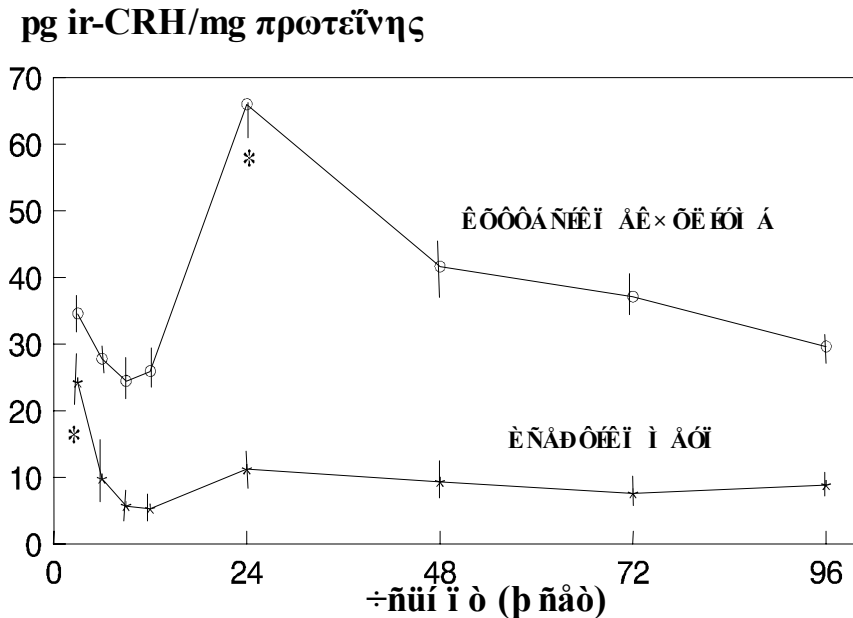
παραπάνω έχουν ληφθεί υπόψη στον ποσοτικό προσδιορισμό του πεπτιδίου.

3.1.6 Καμπύλη αναφοράς του Ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού του ir-CRH

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (εικ. 3.5) χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες συνθετικής CRH, όπως περιγράφεται στο Κεφ. «Υλικά και Μέθοδοι».

3.1.7 Βασική έκλυση CRH στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων Ishikawa

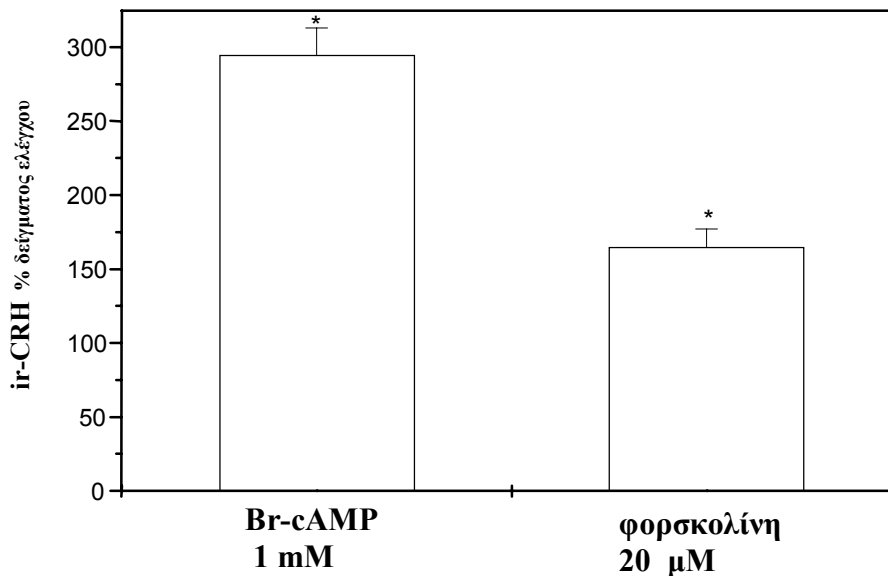
Ανοσοαντιδρώσα CRH ταυτοποιήθηκε στα εκχυλίσματα και στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων Ishikawa (εικ. 3.6). Ειδικότερα η περιεκτικότητα ir-CRH στα κυτταρικά εκχυλίσματα από καλλιέργειες 12 ωρών ήταν 25.9 ± 2.4 pg/mg ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης (mean \pm SEM, n=6). Η υψηλότερη περιεκτικότητα ir-CRH παρατηρήθηκε μετά από 24 ώρες καλλιέργειας (65.9 ± 3.4 pg/mg πρωτεΐνης, mean \pm SEM, n=6, $p < 0.001$). Ανοσοαντιδρώσα CRH εκλύεται από τα κύτταρα Ishikawa στο θρεπτικό μέσο, υπό βασικές συνθήκες καλλιέργειας. Η έκλυση του ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου στο θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας παρουσίασε τη μέγιστη τιμή μετά από 3 ώρες καλλιέργειας (24.2 ± 5.2 pg/mg πρωτεΐνης, mean \pm SEM, n=6, $p < 0.05$), ενώ στη συνέχεια ελαττώθηκε προοδευτικά και παρέμεινε σταθερή στο χρονικό διάστημα από 24 έως 96 ώρες (11.19 ± 0.22 pg/mg πρωτεΐνης). Αυτό οφείλεται στη δυναμική της καλλιέργειας και έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις, όπως στην βασική έκλυση β-ενδορφίνης από τα ίδια κύτταρα (126-128).



Εικ 3.6. Περιεκτικότητα ανοσοαντιδρώσας CRH (ir-CRH) στο κυτταρικό εκχύλισμα και στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων Ishikawa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε διάφορους χρονικές περιόδους και τα επίπεδα της ir-CRH μετρήθηκαν με Ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι". Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν pg ir-CRH ανά mg ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης, μέση τιμή ± μέση τυπική απόκλιση (SEM), (ο) κυτταρικό εκχύλισμα (*) θρεπτικό μέσο.

Δύο γνωστοί επαγωγείς της υποθαλαμικής και πλακουντιακής CRH, η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και η φορσκολίνη (γνωστός επαγωγέας του ενδοκυττάρου cAMP) χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του κυτταρικού μας μοντέλου. Το cAMP είναι γνωστό ότι αυξάνει το επίπεδο του mRNA της CRH και του πεπτιδίου τόσο στον υποθάλαμο όσο και στον πλακούντα. Όπως φαίνεται στην εικ. 3.7, στα κύτταρα Ishikawa το cAMP και η φορσκολίνη αυξάνουν κατά

288±15% και 165±12% αντίστοιχα τη συγκέντρωση της ir-CRH σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (mean±SEM, n=6, p<0.05), πιστοποιώντας έτσι και τη λειτουργικότητα του συστήματος μας.



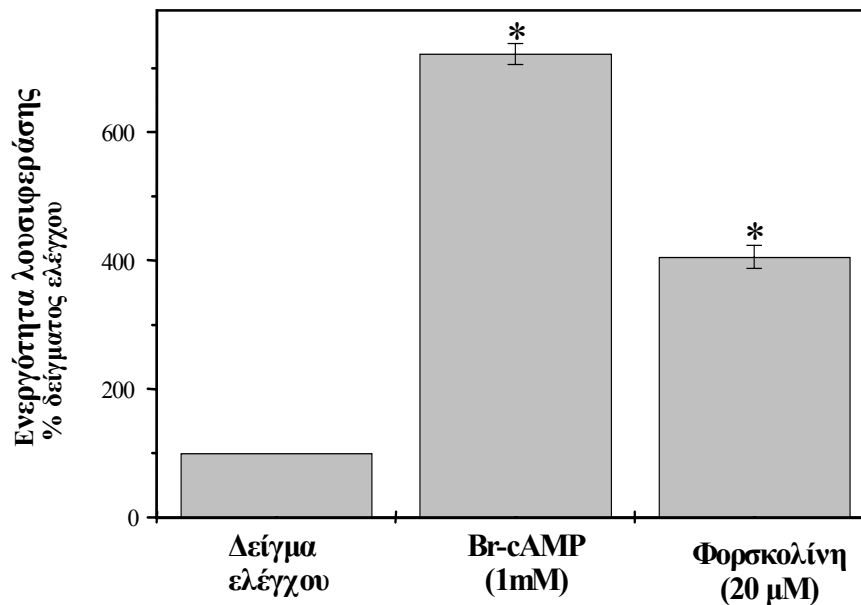
Εικόνα 3.7. Επίδραση 8-Br-cAMP και φορσκολίνης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία 1 mM 8-Br-cAMP ή 20 μM φορσκολίνης και μετρήθηκε η ir-CRH στο θρεπτικό μέσο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή ± μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) από το δείγμα ελέγχου.

3.2 Ρύθμιση της δραστηριότητας της 5' προαγωγού περιοχής (promoter) του γονιδίου της hCRH σε διαμολυθέντα ενδομητρικά κύτταρα Ishikawa

Τα κύτταρα Ishikawa διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pAzluc hCRH0.9, το οποίο περιείχε τμήμα της 5' περιοχής του γονιδίου της hCRH (-918 με +38 bp του εξονίου 1) συνδεδεμένο με το γονίδιο

αναφοράς της λουσιφεράσης, όπως περιγράφεται στο κεφ. «Υλικά και μέθοδοι». Στη συνέχεια εκτέθηκαν για διάφορες χρονικές περιόδους σε διάφορες συγκεντρώσεις γνωστών ρυθμιστών της CRH σε άλλα συστήματα καθώς και παραγόντων της ενδομητρικής φυσιολογίας, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Μετά το τέλος της επώασης, επιτελέστηκε λύση των κυττάρων και μετρήθηκε η δραστικότητα της λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο. Η αποδοτικότητα της διαμόλυνσης εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό στα ίδια κυτταρικά ομογενοποιημένα της δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης, με το γονίδιο της οποίας είχαν ταυτόχρονα διαμολυνθεί τα κύτταρα. Σα δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα διαμολυθέντα με το ίδιο πλασμίδιο από το οποίο απουσιάζει ο επαγωγέας της CRH.

Για το έλεγχο της λειτουργικότητας του συστήματος τα διαμολυθέντα κύτταρα εκτέθηκαν σε γνωστούς επαγωγείς της υποθαλαμικής CRH (εικ. 3.8). Ευρέθη ότι το cAMP και η FSK επάγουν τη δραστικότητα της 5' προαγωγού περιοχής κατά $710 \pm 45\%$ και $412 \pm 42\%$ (mean \pm SEM, n=6, p<0.01) αντίστοιχα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά, εκτός από επιβεβαίωση της λειτουργικότητας του συστήματος, πιστοποιούν και την αυξημένη ευαισθησία του, η οποία μας επιτρέπει τη μελέτη της δράσης ουσιών που είτε παρουσιάζουν μικρές αποκρίσεις είτε οι δράσεις τους σε επίπεδο γονιδίου, δηλαδή σε αρχικά στάδια του μηχανισμού συνθέσεως, δεν αντιστοιχούν σε ανάλογες διακυμάνσεις του ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου και συνεπώς θα ήταν αδύνατο να ανιχνευθούν με μέτρηση του πεπτιδίου με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό.



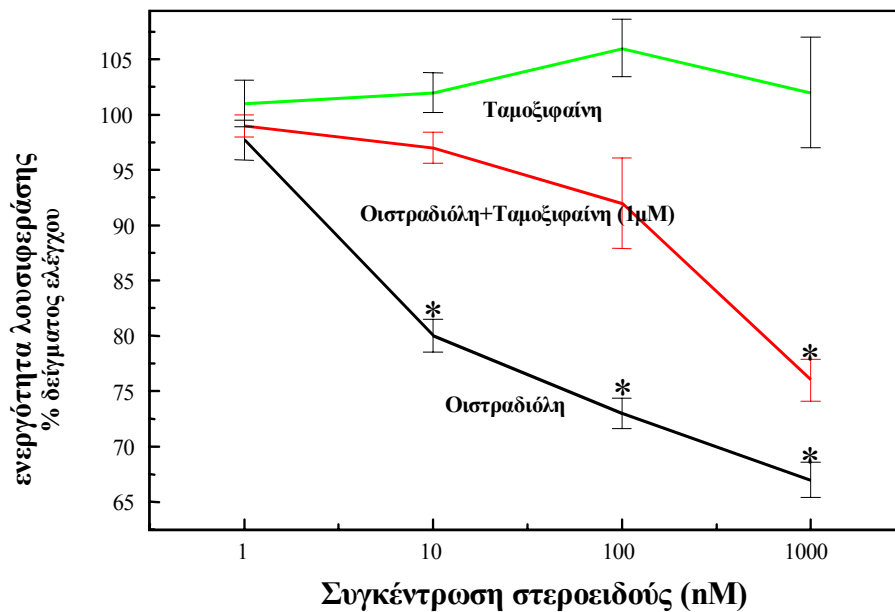
Εικόνα 3.8. Επίδραση 8-Br-cAMP και φορσκολίνης. Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία 1 mM 8-Br-cAMP ή 20 μM φορσκολίνης και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή ± μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

Μελετήθηκε η επίδραση των οιστρογόνων, γνωστών καταστολέων της υποθαλαμικής CRH (135). Ευρέθη ότι η οιστραδιόλη ελαττώνει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα τη λουσιφεράσης κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο (εικ. 3.9). Η μεγαλύτερη δράση της οιστραδιόλης παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 nM ($70 \pm 1,2\%$ του δείγματος ελέγχου, $mean \pm SEM$, $n=6$, $p < 0.05$). Το αντιοιστρογόνο Ταμοξιφαίνη μόνο του, δεν επηρέασε τη δραστηριότητα της λουσιφεράσης μη επέχοντας έτσι αγωνιστικές δράσεις. Αντίστροφα, 100-πλάσια συγκέντρωση (1000 nM) Ταμοξιφαίνης ανέστρεψε πλήρως την ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης. Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα επέχουν δόσο-εξαρτώμενη ρυθμιστική-ανασταλτική

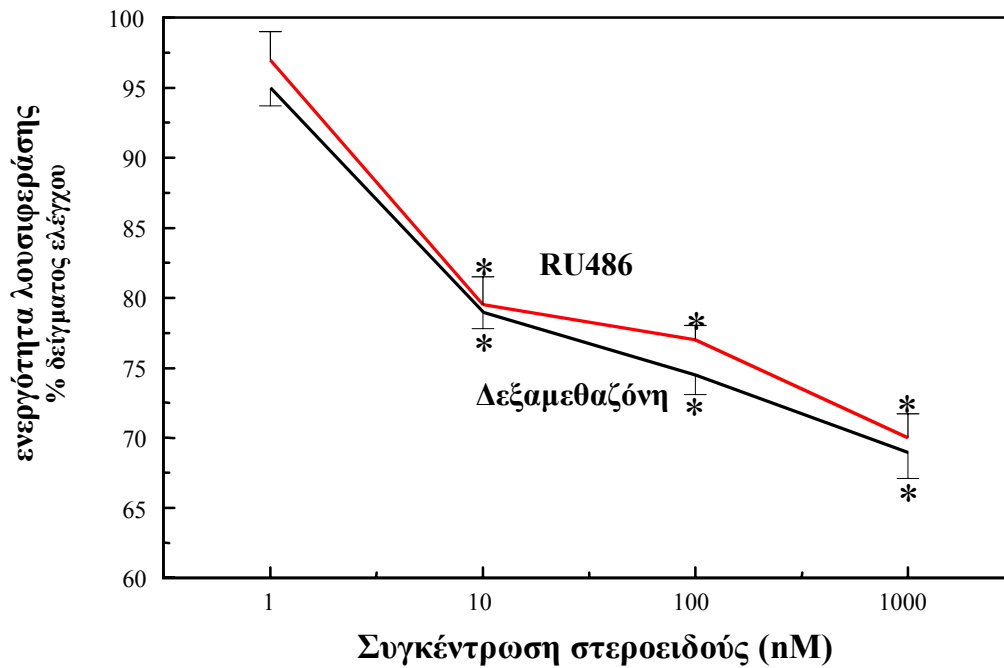
δράση στην έκφραση του γονιδίου της CRH στα κύτταρα Ishikawa, δράση η οποία φαίνεται ότι επιτελείται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων, δεδομένου ότι αναστρέφεται από το αντιοιστρογόνο Ταμοξιφαίνη. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικ. 11, η οιστραδιόλη αδυνατεί να καταστείλει την επαγόμενη από φορσκολίνη ή EGF ενεργότητα του επαγωγέα. Αυτό υποδηλώνει ότι η οιστρογονική δράση δεν σχετίζεται με τις βιολογικές οδούς του cAMP και EGF (δηλαδή των υποδοχέων και μεταβιβαστών σχετιζομένων με PKA ή Tyg-phosphorylated Rx) αλλά είναι άμεση επί των λειτουργικών ημιπαλινδρομικών EREs που εμπεριέχονται στον επαγωγέα του γονιδίου της CRH. Πράγματι, η τοπολογία του επαγωγέα απεικονίζει την ύπαρξη EREs, όπως φαίνεται στο κεφ. Υλικά και Μέθοδοι.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών, γνωστών ρυθμιστών του γονιδίου της CRH στον πλακούντα και στον υποθάλαμο. Σε αντιστοιχία με τον υποθάλαμο το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη κατέστειλε τη δραστηριότητα του επαγωγέα κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο (εικ. 3.10). Η μεγαλύτερη δράση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 nM ($72 \pm 1,2\%$ του δείγματος ελέγχου, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=6$, $p < 0.05$). Το συνθετικό αντιγλυκοκορτικοειδές/ αντιπρογεστερονοειδές RU486 παρουσίασε αγωνιστικές δράσεις καταστέλοντας επίσης τη δραστηριότητα του επαγωγέα κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μεγαλύτερη δράση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 nM ($73 \pm 2\%$ του δείγματος ελέγχου, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=6$, $p < 0.05$). (εικ. 3.10). Σε αντίθεση με τα οιστρογόνα, η δεξαμεθαζόνη κατέστειλλε την επαγόμενη από φορσκολίνη ή EGF ενεργότητα του επαγωγέα (εικ. 3.11 α β). Η μεγαλύτερη δράση της δεξαμεθαζόνης παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 nM (από 405 ± 6 σε $337 \pm 2\%$ ή από 158 ± 5 σε $103 \pm 3\%$ του δείγματος ελέγχου, για την επαγόμενη από

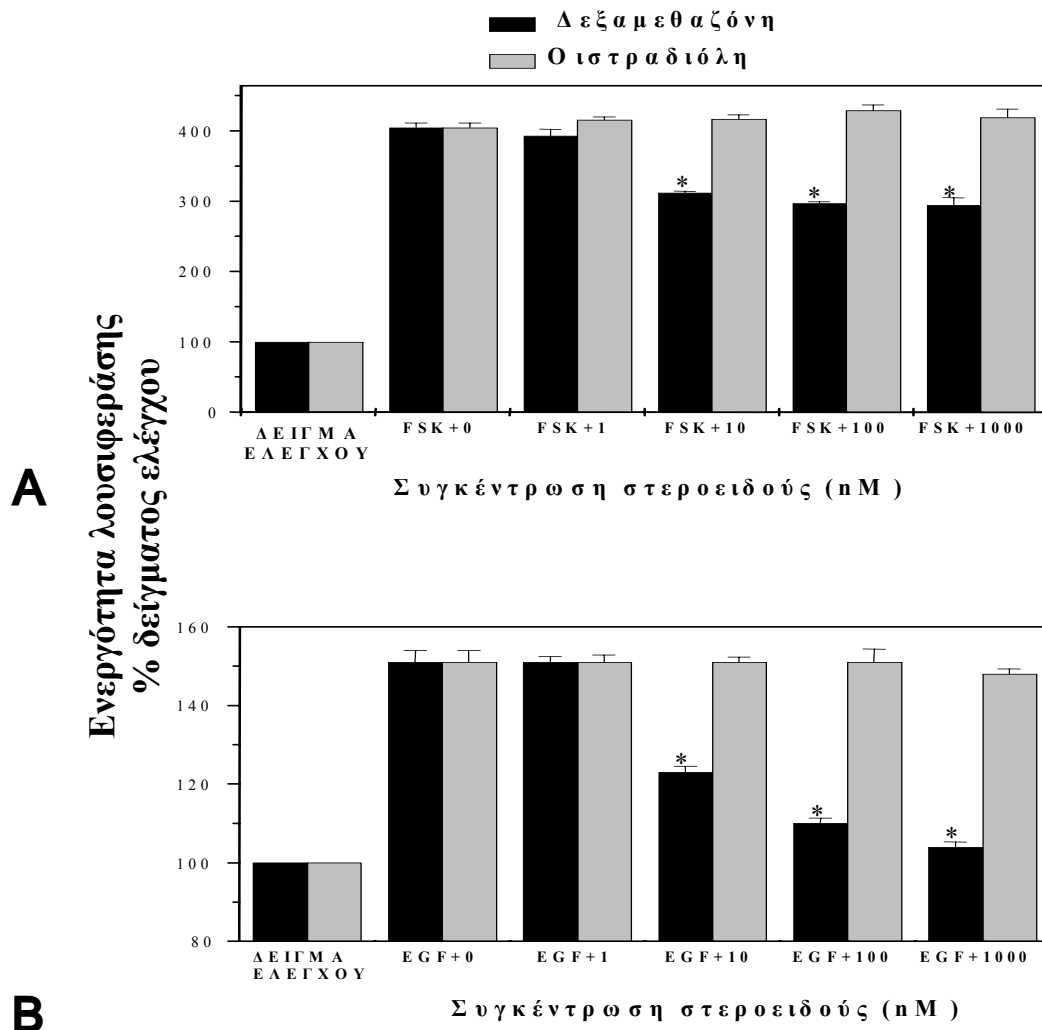
φορσκολίνη ή EGF ενεργότητα του επαγωγέα αντίστοιχα. $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=6$, $p<0.05$). Αυτό υποδηλώνει ότι η δράση των γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται με τις βιολογικές οδούς του cAMP και EGF.



Εικόνα 3.9. Καμπύλες δόσοαπόκρισης οιστρογόνων. Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων οιστραδιόλης, ταμοξιφαίνης και συνδυασμού των και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

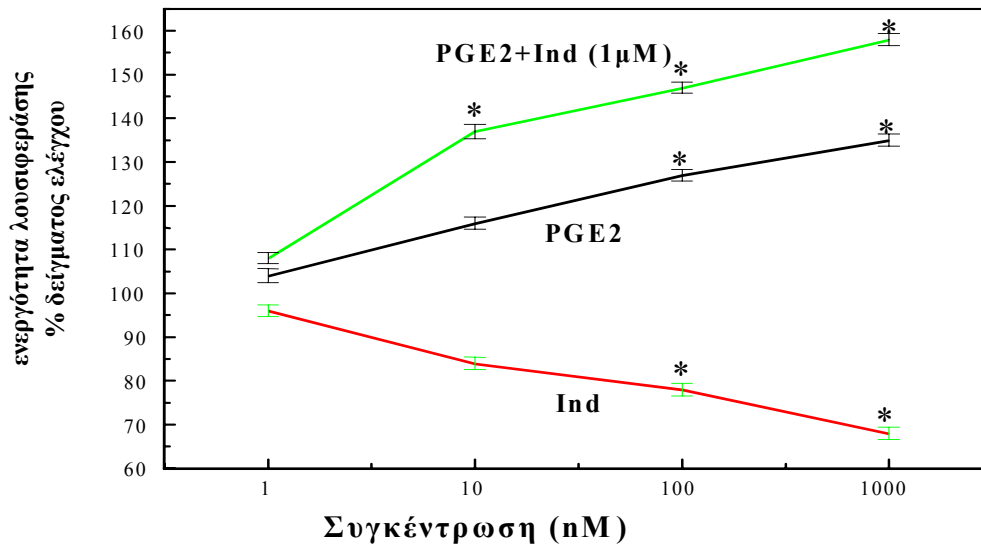


Εικόνα 3.10. Καμπύλες δοσοαπόκρισης γλυκοκορτικοειδών. Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης, RU486 και συνδυασμού των και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.



Εικόνα 3.11. A) Επίδραση στεροειδών στον επαγωγέα της CRH μετά από έκθεση σε φορσκολίνη (FSK). Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία οιστραδιόλης ή δεξαμεθαζόνης παρουσία 20 μ M φορσκολίνης και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου. **B) Επίδραση στεροειδών στον επαγωγέα της CRH μετά από έκθεση σε EGF.** Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία οιστραδιόλης ή δεξαμεθαζόνης παρουσία 5 nM EGF και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

Σε αντίστοιχα πειράματα ευρέθη επίσης ότι η PGE₂ αυξάνει στατιστικώς σημαντικά της δραστικότητα της λουσιφεράσης. Στη συγκέντρωση 1 μM PGE₂ παρατηρήθηκε αύξηση 30±1.4% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (mean±SEM, n=6, p<0.05). Αντίθετα, σε συγκέντρωση 1μM η ινδομεθακίνη ελαττώνει στατιστικώς σημαντικά τη δραστικότητα της λουσιφεράσης κατά 30±2% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (mean±SEM, n=6, p<0.05). Προκειμένου να ελεγχθεί πειραματικά η δράση των προστανοειδών, τα κύτταρα προεπώστηκαν με ινδομεθακίνη και στη συνέχεια εκτέθηκαν στην PGE₂. Στην περίπτωση αυτή, η PGE₂ αύξησε περισσότερο την ενεργότητα του επαγωγέα. Η μεγαλύτερη δράση παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 100 nM (151±1.3% του δείγματος ελέγχου, mean±SEM, n=6, p<0.05). (εικ. 3.12). Τα τελευταία αποτελέσματα υπονοούν ότι η ενδογενής PGE₂ έχει ρυθμιστική-διεγερτική δράση στην έκφραση του γονιδίου του hCRH στα ανθρώπινα ενδομητρικά κύτταρα Ishikawa.



Εικόνα 3.12. Καμπύλες δόσοαπόκρισης προστανοειδών. Τα διαμολυθέντα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ινδομεθακίνης, PGE2 και PGE2 μετά από προεπώαση με 1 µM ινδομεθακίνη και μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέση τιμή \pm μέση τυπική απόκλιση (SEM), επί τοις εκατό του δείγματος ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

3.3 Έκφραση της CRH στη μήτρα του επίμους

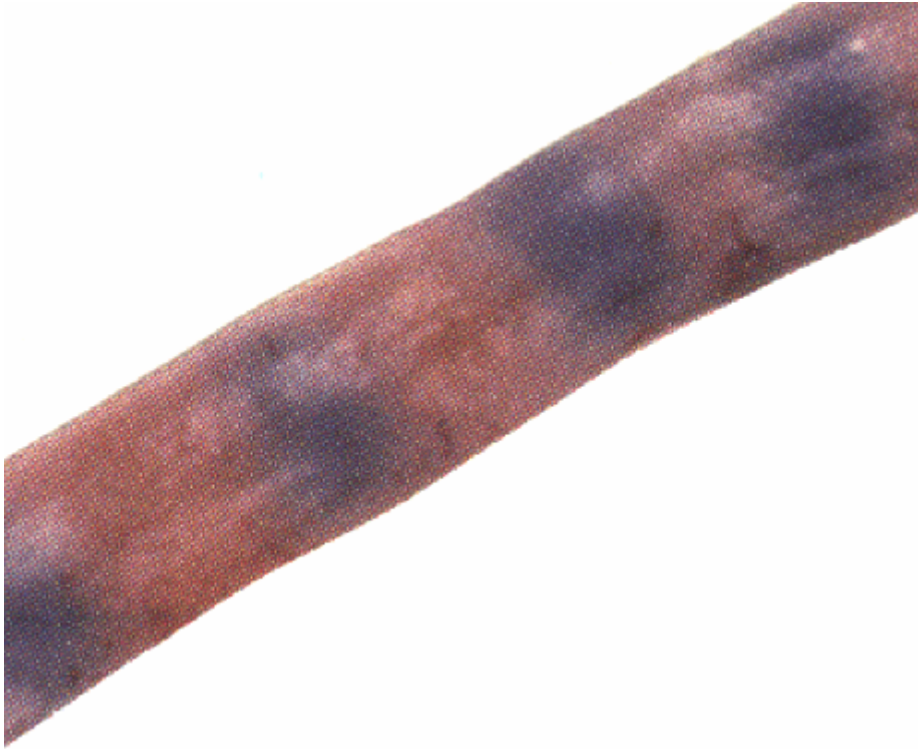
Η *in vivo* διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της CRH, για λόγους δεοντολογίας επέβαλε τη χρήση πειραματοζώων. Η επιλογή του επίμους έγινε αφενός λόγω της αξιοσημείωτης αντιστοιχίας που παρουσιάζει το σύστημα της CRH του επίμους, σε επίπεδο υποθαλάμου, σε σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό και αφεαίρου για λόγους φυσιολογίας του γεννητικού συστήματος του επίμους. Συγκεκριμένα, η φθαρτοποίηση στον επίμυ, σε αντίθεση με τον άνθρωπο, λαμβάνει χώρα μόνο στην περιοχή (περιοχές) της εμφύτευσης και όχι σε ολόκληρη την ενδομητρική

επιφάνεια. Αυτή η σημαντική διαφορά επιτρέπει και το διαχωρισμό των θέσεων εμφύτευσης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Επιβεβαίωση της συνουσίας έγινε με την ανίχνευση σπερματοζωαρίων στις κολπικές εκκρίσεις. Είναι τεκμηριωμένο ότι στους επίμυες, η εμφύτευση του ωαρίου αρχίζει 96 με 106 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και συνδιάζεται με αύξηση της εξοιδημάτωσης στη θέση εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Έτσι στις 9:00 πμ της 6ης ημέρας κύησης τα ζώα δέχθηκαν ενδοφλέβια 0,5 χιλιοστόλιτρα διαλύματος Evans blue, χρωστική που συνδέεται με πρωτεΐνες του αίματος και καθώς στις θέσεις εμφύτευσης παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση αιμοφόρων αγγείων, επιτρέπει την οπτική παρατήρηση αυτού του φαινομένου χρωματίζοντας κυανές τις θέσεις εμφύτευσης. Έγινε διαχωρισμός των θέσεων εμφύτευσης (κυανόχρωων) και των ενδιαμέσων (άχρωων) περιοχών (εικ. 3.13). Μέρος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για ανοσοϊστοχημεία ενώ τα υπόλοιπα καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο για Northern ανάλυση του μεταγραφήματος της CRH.

Εικόνα 3.13 Τμήμα κέρατος της μήτρας του επίμυος σε πρώιμο στάδιο κύησης μετά από χρώση με **Evans blue**. Μετά την επιβεβαίωση της συνουσίας τα ζώα δέχθηκαν ενδοφλέβια 0,5

χιλιοστόλιτρα διαλύματος Evans blue (1% σε ορό), χρωστική που χρωματίζει κυανές τις θέσεις εμφύτευσης. Διακρίνονται 4 περιοχές εμφύτευσης (κυανού χρωματισμού) καθώς και οι ενδιάμεσες περιοχές.

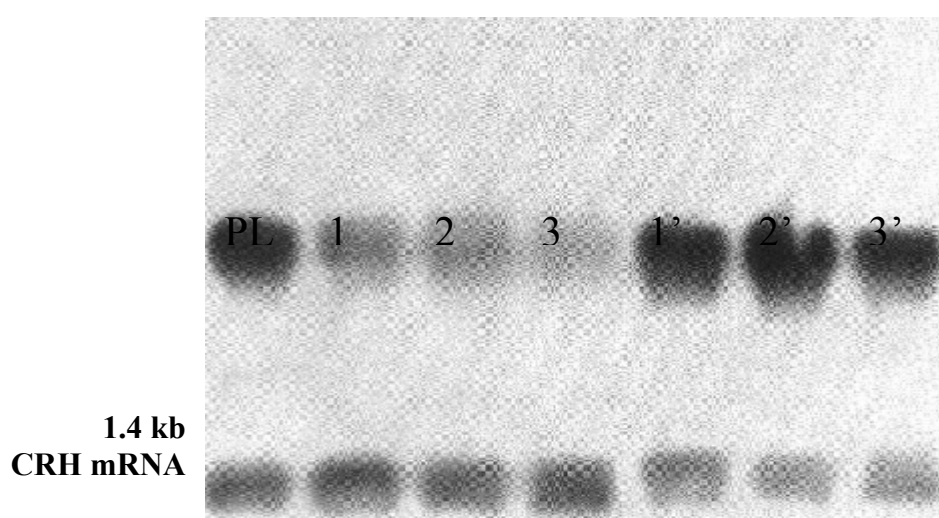


3.3.1 Ανίχνευση του mRNA της CRH με Northern ανάλυση

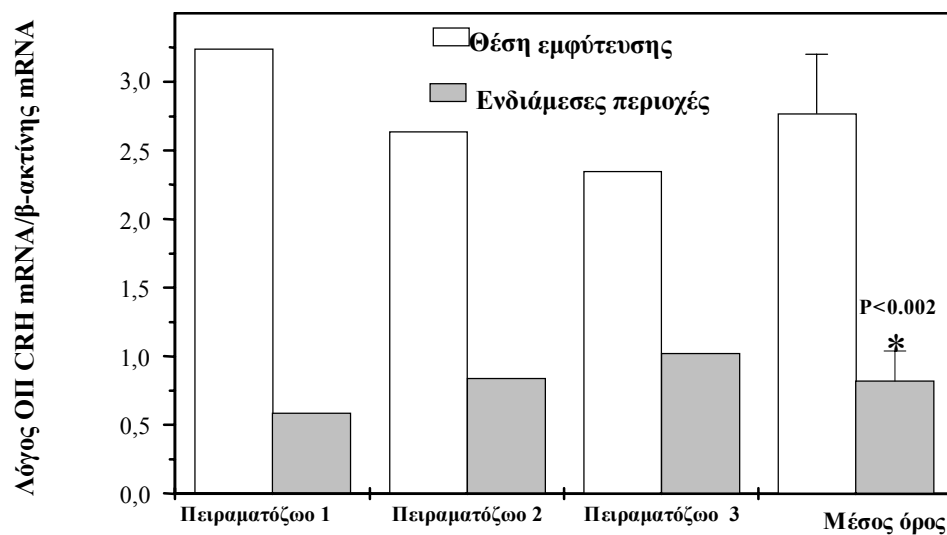
Παρασκευάσματα ολικού RNA προερχόμενου από τις μήτρες τριών επίμυων στις οποίες είχε προηγηθεί διαχωρισμός των θέσεων εμφύτευσης (κυανόχρωων) και των ενδιάμεσων (άχρωων) περιοχών και ολικό RNA από ανθρώπινο πλακούντα υπεβλήθησαν σε υβριδισμό τύπου Northern, χρησιμοποιώντας σαν ιχνηλάτη (probe) ένα συνθετικό 48-ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί στα αμινοξέα 22-27

της αλληλουχίας του ανθρώπινου CRH. Ο ανθρώπινος πλακούντας επιλέχθηκε σαν θετικό δείγμα αναφοράς. Όπως φαίνεται στην εικ. 3.14, το mRNA της CRH ταυτοποιήθηκε στα εκχυλίσματα όλων ανεξαιρέτως των ελεγχόμενων δειγμάτων. Το μέγεθος του mRNA της CRH ήταν περίπου 1.4 κιλοβάσεις (Kb), όμοιο ή ταυτόσημο με αυτό του ανθρώπινου πλακούντα.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε υβριδοποίηση της ίδιας μεμβράνης με ιχνηλάτη της β-ακτίνης επίμυος και μετρήθηκε η ένταση των αυτοραδιογραφημάτων με ανάλυση εικόνας χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό υπολογιστή. Σε κάθε περίπτωση, η ένταση του μεταγραφήματος της CRH διαιρέθηκε με την ένταση του μεταγραφήματος της β-ακτίνης. Υπολογίστηκε έτσι ότι η συγκέντρωση του mRNA της CRH στις θέσεις εμφύτευσης είναι περίπου 350% υψηλότερη συγκριτικά με αυτήν των ενδιαμέσων περιοχών της μήτρας του επίμυος (εικ. 3.15)



Εικόνα 3.14. Northern ανάλυση ολικού RNA προερχομένου από τη μήτρα επίμυων σε αρχικό στάδιο κήσης. Ζώνες 1, 2, 3: ενδιάμεσες των θέσεων εμφύτευσης περιοχές της μήτρας τριών επίμυων, 1',2',3': αντίστοιχες (κυανόχρωες) θέσεις εμφύτευσης της μήτρας των ίδιων πειραματοζώων. PL: ανθρώπινος πλακούντας



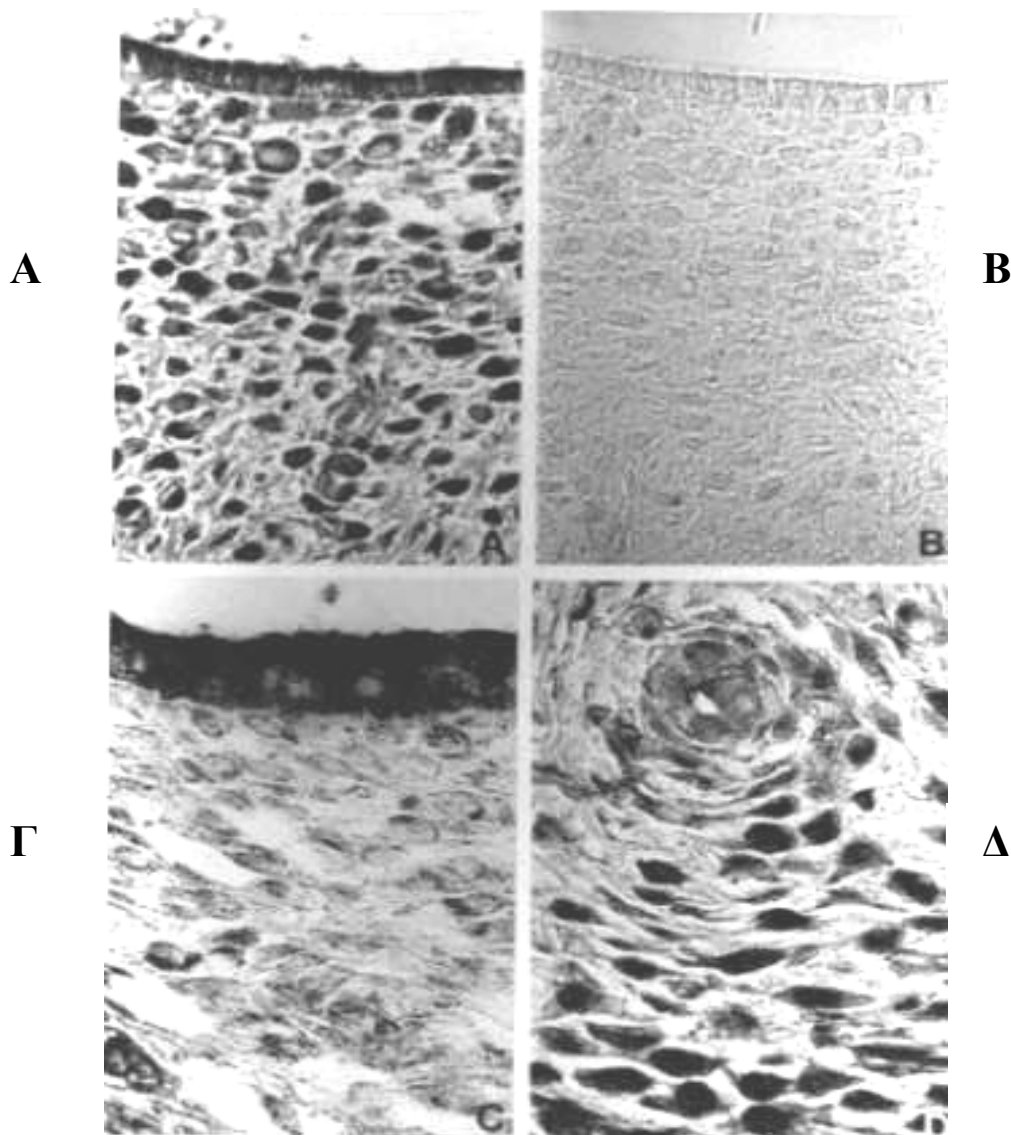
Εικόνα 3.15 Σύγκριση των συγκεντρώσεων του mRNA της CRH στις θέσεις εμφύτευσης σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στις αντίστοιχες ενδιάμεσες περιοχές της μήτρας τριών επίμυων σε αρχικό στάδιο κύησης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν κανονικοποιημένη οπτική πυκνότητα (ΟΠ) του μεταγραφήματος της CRH (οπτική πυκνότητα του μεταγραφήματος της CRH διηρημένη με την οπτική πυκνότητα του μεταγραφήματος της β-ακτίνης). Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.02$) από το δείγμα ελέγχου.

3.3.2 Ανοσοϊστοχημεία

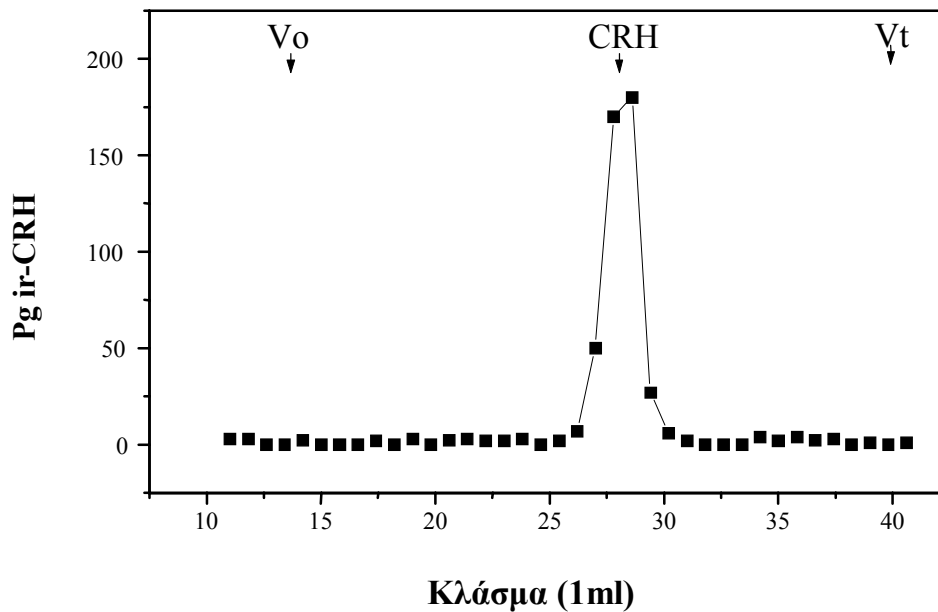
Μετά τον διαχωρισμό των θέσεων εμφύτευσης (κυανόχρωων) και των ενδιάμεσων (άχρωων) περιοχών της μήτρας του επίμυος (εικ. 3.13) έγινε ανοσοϊστοχημεία για CRH όπως περιγράφεται στο κεφ. Υλικά και μέθοδοι, σελ. 53. Όπως φαίνεται στην εικ. 3.16, ir-CRH εντοπίζεται στο επιθήλιο τόσο στις θέσεις εμφύτευσης (Α) καθώς και στις ενδιάμεσες περιοχές (Γ). Τα στρωματικά κύτταρα είναι έντονα θετικά σε ir-CRH στις θέσεις εμφύτευσης (Α, Δ) αλλά ανεπαίσθητα ή καθόλου στις ενδιάμεσες περιοχές (Γ). Η ήδη παρατηρούμενη αυξημένη συγκέντρωση του mRNA της CRH στις θέσεις εμφύτευσης, φαίνεται να διατηρείται και σε επίπεδο πεπτιδίου.

3.3.3 Χαρακτηρισμός του μοριακού βάρους της ανοσοαντιδρώσας CRH στη μήτρα του επίμυος με χρωματογραφία στήλης μοριακής διήθησης

Το κύριο κλάσμα της ανοσοαντιδρώσας CRH που ανιχνεύεται στα εκχυλίσματα του μήτρας του επίμυος παρουσιάζει την ίδια χρωματογραφική εικόνα με τη συνθετική 41-αμινοξέων ανθρώπινη CRH (εικ. 3.17). Αυτό το χρωματογραφικό προφίλ υποδηλώνει ότι η ανοσοαντιδρώσα CRH είναι αυθεντική CRH 41 αμινοξέων.



Εικόνα 3.16 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της *ir-CRH* στη μήτρα του επίμυος κατά την εμφύτευση. Οι περιοχές A, B και Δ αντιστοιχούν στις θέσεις εμφύτευσης ενώ η Γ στις ενδιάμεσες περιοχές. Χρησιμοποιήθηκε αντιορός κονίκλου κατά της CRH (περιοχές A, Γ, Δ) καθώς και ανοσοεξουδετερωμένος αντιορός (περιοχή B, δείγμα αναφοράς). Μεγένθυση X900.



Εικόνα 3.17 Χρωματογραφία στήλης Μοριακής διήθησης με Sephadex G-50 εκχυλίσματος από μήτρα επίμυος. Συλλέχθηκαν δείγματα όγκου ενός χιλιοστόλιτρου. Τα βέλη δείχνουν το νεκρό όγκο (V_0) και τη θέση έκλουσης της 41-αμινοξέων ανθρώπινης CRH (hCRH).

3.4 Επίδραση της CRH στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων. Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της CRH στη φθαρτοποίηση

Η συμμετοχή της CRH στη φλεγμονή έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί. Ειδικότερα η CRH έχει ανιχνευθεί σε φλεγμονώδεις θέσεις ενώ ανοσοεξουδετέρωση της CRH με ειδικά αντισώματα κατά της CRH μετριάξει τη φλεγμονώδη αντίδραση (90,94). Η προετοιμασία του ενδομητρίου για την εμφύτευση της επερχόμενης

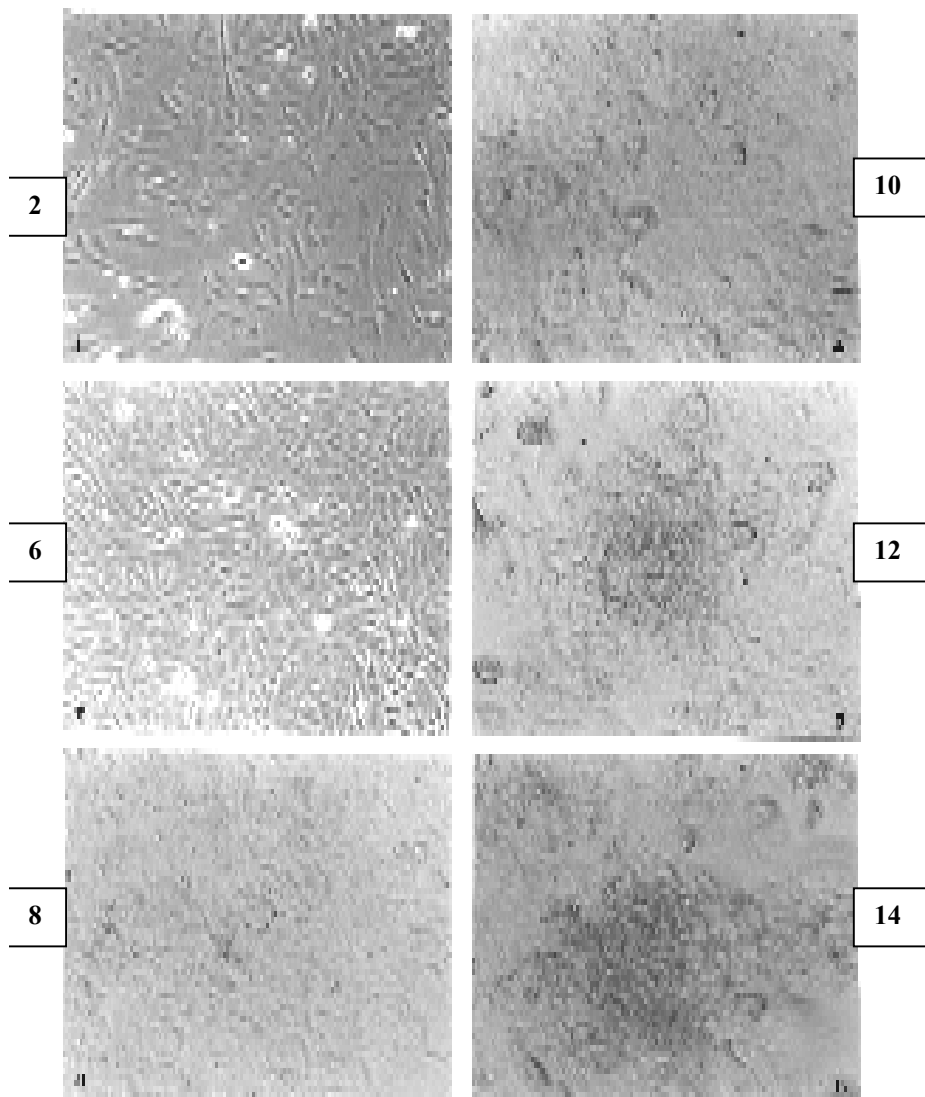
βλαστοκύστης (φθαρτοποίηση) έχει χαρακτηριστικά άσηπτης φλεγμονής και είναι απαραίτητη για την ομαλή εμφύτευση του ωαρίου (141). Δείξαμε ήδη ότι στον επίμυ οι συγκεντρώσεις του mRNA της CRH και του πεπτιδίου είναι σημαντικότερα αυξημένες στις θέσεις εμφύτευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρόλος της CRH στην εμφύτευση είναι σημαντικός. Έτσι μελετήθηκε *in vitro* η επίδραση της CRH στη φθαρτοποίηση των ανθρώπινων στρωματικών ενδομητρικών κυττάρων, τα οποία είναι γνωστό ότι μετατρέπονται σε φθαρτοποιημένα κύτταρα κατά την εκκριτική φάση.

Είναι γνωστό ότι κύριος παράγοντας φθαρτοποίησης του ενδομητρίου είναι η προγεστερόνη (141). Φθαρτοποίηση όμως επιτελείται και από άλλους παράγοντες όπως το cAMP και η PGE2, ενώ η IL-1 ασκεί ανασταλτική επίδραση στη φθαρτοποίηση (141). Χαρακτηριστικό είναι ότι οι παράγοντες αυτοί είναι ρυθμιστές της CRH στον υποθάλαμο και όπως καταδείξαμε και στο ενδομήτριο. Έτσι, προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της CRH στη φθαρτοποίηση, μελετήθηκε η επίδραση της στην έκλυση των ουσιών αυτών.

Συλλέχθηκε ανθρώπινος φυσιολογικός ιστός από παραγωγικό ενδομήτριο και διαχωρίστηκαν τα στρωματικά κύτταρα, όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.5. Στη συνέχεια έγινε πρωτογενής καλλιέργεια στρωματικών κυττάρων. Τα κύτταρα αφέθησαν να καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια καλλιέργειας (plateau) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις CRH, aheICRH και ινδομεθακίνης για διάφορες χρονικές περιόδους. Κάθε 2 ημέρες γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού των καλλιεργειών ενώ η προσθήκη των φαρμάκων καθημερινά.

3.4.1 Μορφολογική διαφοροποίηση

Όπως φαίνεται στην εικ. 3.18, η CRH προκαλεί σημαντικές μορφολογικές διαφοροποιήσεις στα στρωματικά κύτταρα, τα οποία ήδη από την 6η ημέρα αρχίζουν να χάνουν τα χαρακτηριστικά του στρωματικού κυττάρου (ατρακτοειδείς σχηματισμοί) γεγονός εμφανέστερο πέραν της 8ης ημέρας. Από τη 12η ημέρα είναι επίσης εμφανής η τάση σχηματισμού «αδενικών δομών» σε διάφορα κομβικά σημεία.



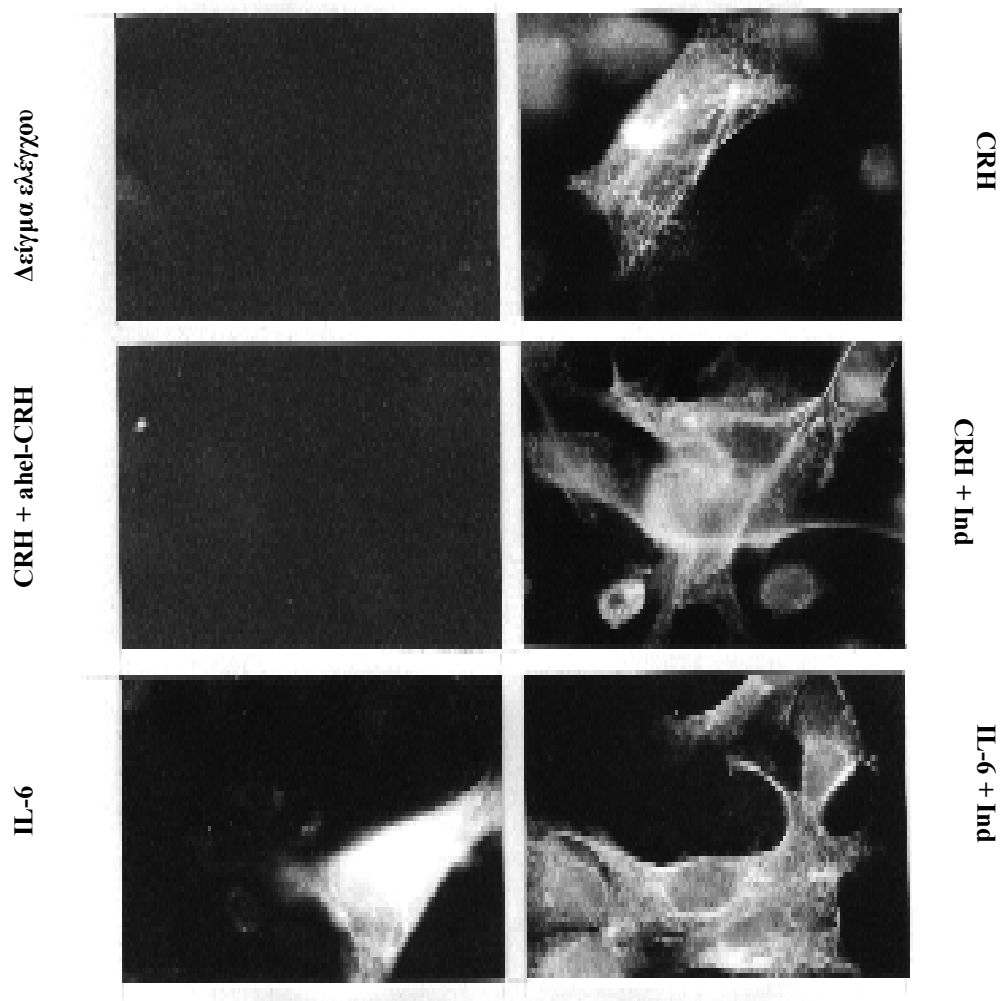
Εικόνα 3.18 Μορφολογική διαφοροποίηση στρωματικών κυττάρων σε φθαρτικά μετά από επίδραση με **CRH**, στο χρονικό διάστημα **2-14** ημερών. Μεγένθυση X400

3.4.2 Ανοσοφθορισμός για κυτοκερατίνες

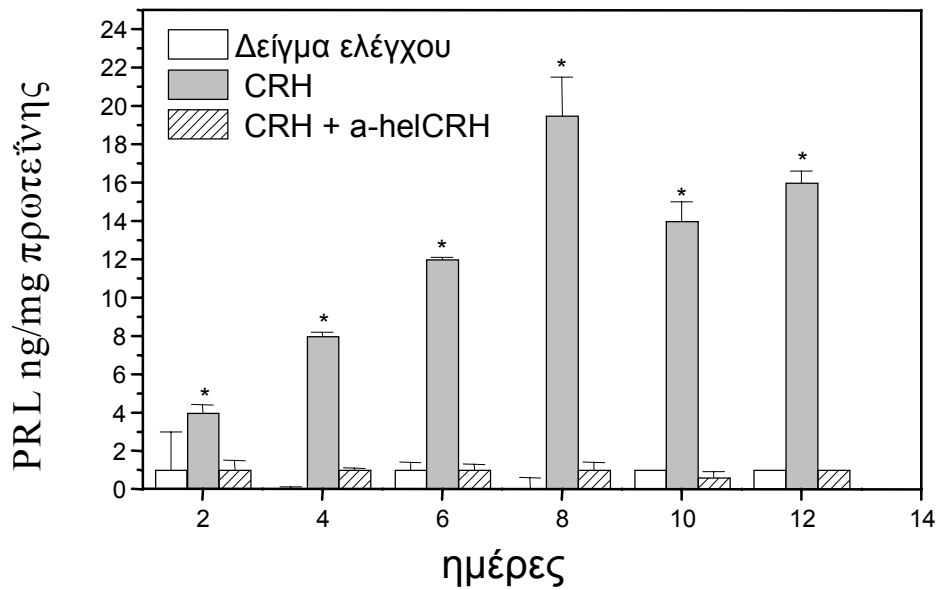
Επιβεβαίωση της φθαρτοποίησης έγινε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για κυτοκερατίνες, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες που εκφράζονται εκλεκτικά στα φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα ενώ δεν εκφράζονται στα μη φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικ. **3.19**, η **CRH** επάγει την παραγωγή κυτοκερατινών σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (κύτταρα μη εκτεθέντα σε οιονδήποτε παράγοντα). Η δράση της **CRH** πιθανά επιτελείται μέσω των υποδοχέων **CRH** καθώς ταυτόχρονη συνεπώαση με τον ανταγωνιστή **ahCRH**, την προλαμβάνει. Ενδιαφέρον είναι ότι η δράση της **CRH** δεν αντιστρέφεται με ταυτόχρονη συνεπώαση με ινδομεθακίνη (**Ind**), υποδηλώνοντας ότι δεν εξαρτάται από τη σύνθεση ενδογενών προστανοειδών. Σε άλλα πειράματα, επίδραση με **IL-6** φαίνεται να επάγει την έκφραση κυτοκερατινών, δράση που επίσης δεν εξαρτάται από τη σύνθεση ενδογενών προστανοειδών, αφού δεν αντιστρέφεται με ταυτόχρονη συνεπώαση με ινδομεθακίνη.

3.4.3 Ανίχνευση προλακτίνης (PRL) στο θρεπτικό υλικό των καλλιιεργειών

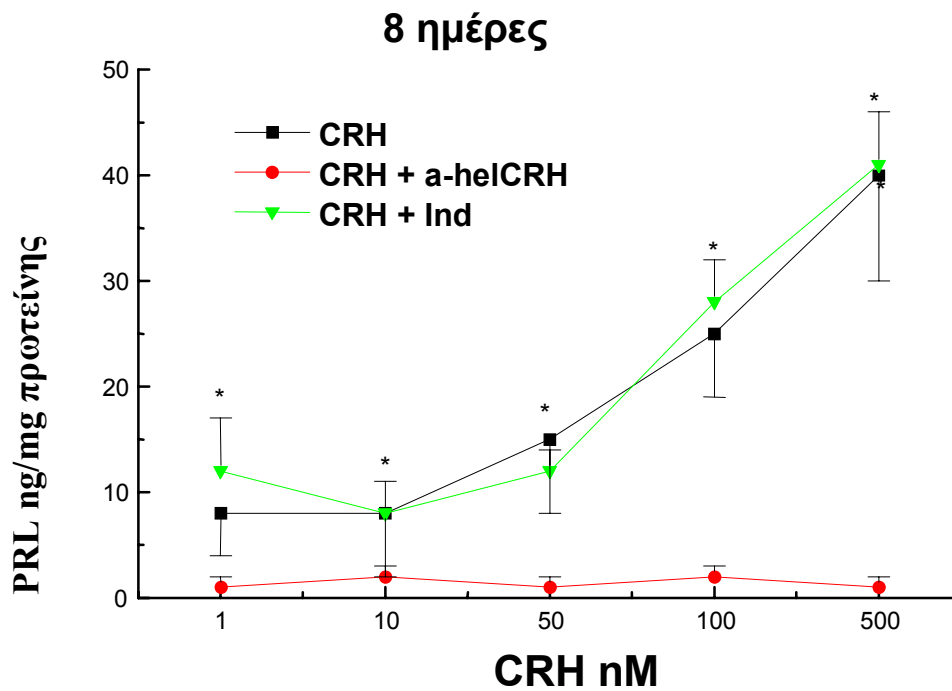
Περαιτέρω επιβεβαίωση της φθαρτοποίησης έγινε με μέτρηση της εκλυομένης προλακτίνης στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιιεργειών, δεδομένου ότι η προλακτίνη παράγεται εκλεκτικά από τα φθαρτοποιημένα στρωματικά και επιθηλιακά κύτταρα και όχι από τα στρωματικά κύτταρα. Οπως φαίνεται στις εικ. 3.20 και 3.21, η επίδραση με CRH αυξάνει θεαματικά, με χρονο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, την έκλυση της προλακτίνης, δράση που αναστρέφεται μετά από συνεπώαση των κυττάρων με α -hclCRH.



Εικόνα 3.19 Ανοσοφθορισμός για κυτοκερατίνες σε στρωματικά κύτταρα μετά από επίδραση με **CRH** ή **IL-6** παρουσία ή απουσία **ahelCRH** ή ινδομεθακίνης (**Ind**). Μεγένθυση X600



Εικόνα 3.20 Έκλυση προλακτίνης από στρωματικά κύτταρα μετά από επίδραση CRH *in vitro*. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100 nM CRH παρουσία ή απουσία a-helCRH και μετρήθηκε η ποσότητα της εκλυομένης προλακτίνης (PRL) στο θρεπτικό υλικό με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε νανογραμμάρια (ng) προλακτίνης ανά χιλιοστογραμμάρια ολικής πρωτεΐνης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική απόκλιση ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.



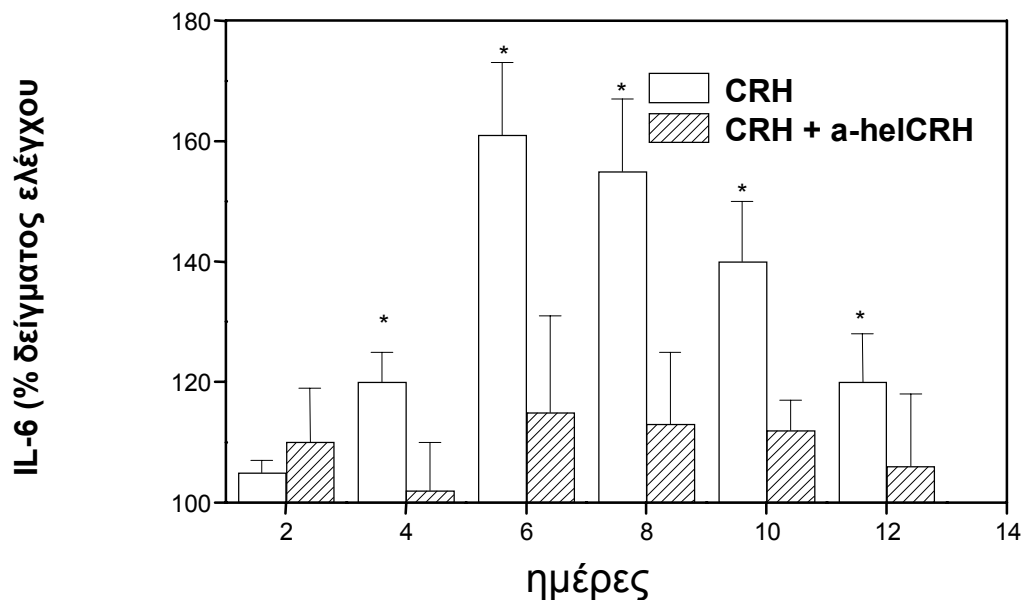
Εικόνα 3.21 Έκλυση προλακτίνης από στρωματικά κύτταρα μετά από επίδραση CRH *in vitro*. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις CRH παρουσία ή απουσία α-helCRH και μετρήθηκε η ποσότητα της εκλυομένης προλακτίνης (PRL) στο θρεπτικό υλικό με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε νανογραμμάρια (ng) προλακτίνης ανά χιλιοστογραμμάρια ολικής πρωτεΐνης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική απόκλιση ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

3.4.4 Προσδιορισμός IL-6 και PGE2 στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλιεργειών

Η IL-6 καθώς και η PGE2 είναι σημαντικοί ρυθμιστές της CRH στον υποθάλαμο και στον πλακούντα και όπως δείξαμε και στο ενδομήτριο. Επιπλέον είναι γνωστή η επαγωγική δράση της PGE2 στη φθαρτοποίηση ενώ κάποιος αντίστοιχος πιθανός ρόλος για την IL-6 δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό της από την

CRH επαγόμενης φθαρτοποίησης ελέγξαμε σε πρώτο στάδιο την επίδραση της στην έκλυση της IL-6 και της PGE2.

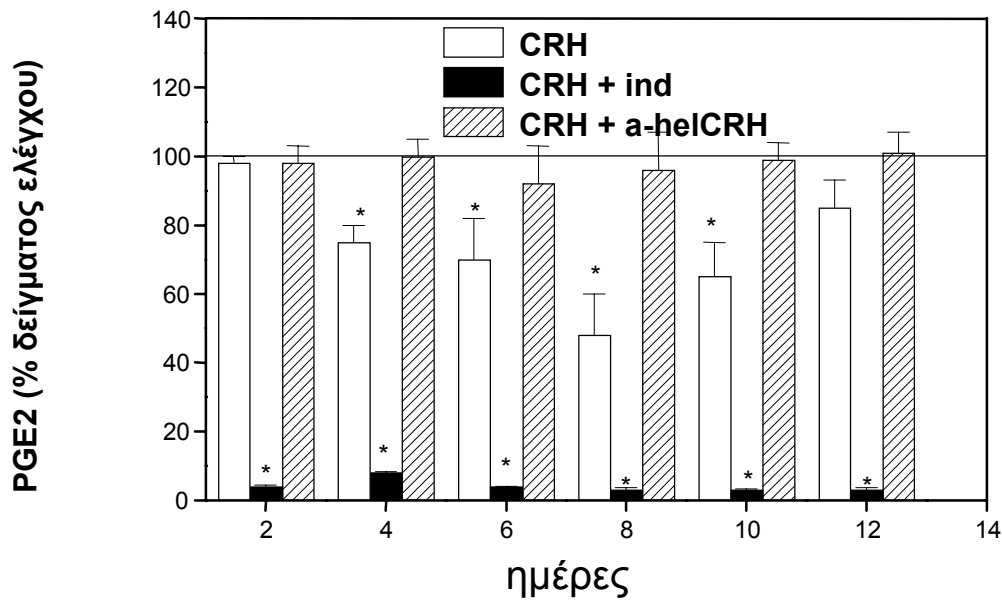
Όπως φαίνεται στην εικ. 3.22, η CRH επάγει στατιστικώς σημαντικά την έκλυση της IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα. Η μέγιστη δράση παρατηρείται μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας ($160 \pm 12\%$ του δείγματος ελέγχου, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=6$, $p < 0.05$). Η δράση της CRH πιθανά επιτελείται μέσω υποδοχέων καθώς ταυτόχρονη συνεπώαση με τον ανταγωνιστή α -hclCRH, την αντιστρέφει.



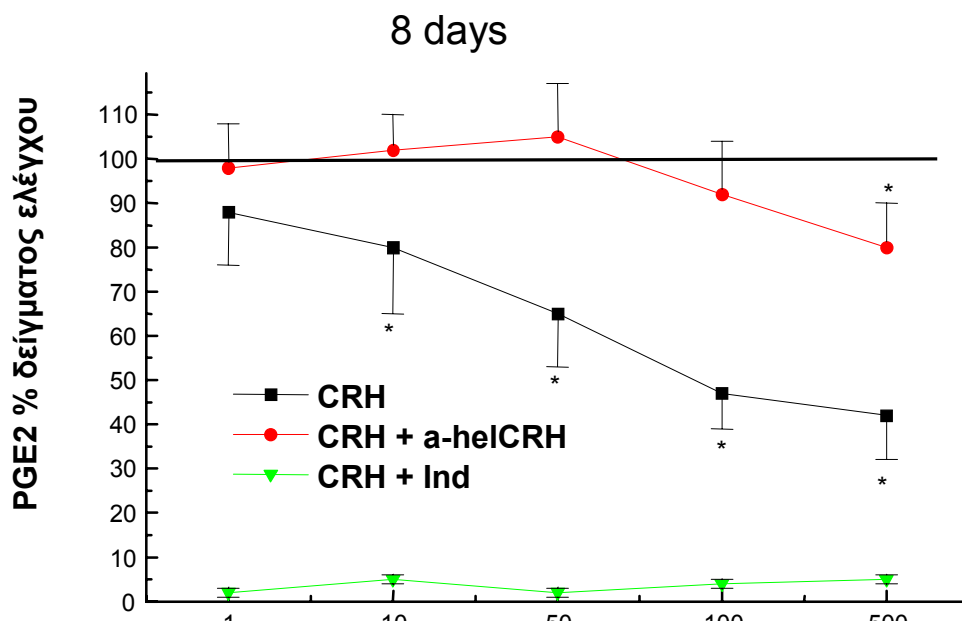
Εικόνα 3.22 Έκλυση IL-6 από στρωματικά κύτταρα μετά από επίδραση CRH. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100 nM CRH παρουσία ή απουσία α -hclCRH και μετρήθηκε η ποσότητα της εκλυομένης IL-6 στο θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε % του δείγματος ελέγχου. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική απόκλιση ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

Τέλος, όπως φαίνεται στις εικ. 3.23 και 3.24, η CRH καταστέλλει στατιστικώς σημαντικά την έκλυση της PGE2 από τα στρωματικά κύτταρα. Η μέγιστη δράση παρατηρείται μετά από 8 ημέρες καλλιέργειας ($48 \pm 8\%$ του δείγματος ελέγχου, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n=6$, $p < 0.05$). Η δράση

της CRH πιθανά επιτελείται μέσω CRH υποδοχέων καθώς ταυτόχρονη συνεπώαση με τον ανταγωνιστή α -helCRH, την αντιστρέφει.



Εικόνα 3.23 Έκλυση PGE2 από στρωματικά κύτταρα μετά από την επίδραση CRH *in vitro*. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100 nM CRH παρουσία ή απουσία α -helCRH ή ινδομεθακίνης (Ind) και μετρήθηκε η ποσότητα της εκλυόμενης PGE2 στο θρεπτικό υλικό με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε % του δείγματος ελέγχου. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική απόκλιση ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.



Εικόνα 3.24 Έκλυση PGE2 από στρωματικά κύτταρα μετά από την επίδραση CRH in vitro. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις CRH παρουσία ή απουσία α -helCRH ή ινδομεθακίνης (Ind) και μετρήθηκε η ποσότητα της εκλυομένης PGE2 στο θρεπτικό υλικό με ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε % του δείγματος ελέγχου. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική απόκλιση ($p < 0.05$) από το δείγμα ελέγχου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας ξέχωρης βιολογικής οδού δράσης της CRH στη φθαρτοποίηση, η οποία είναι ανεξάρτητη της ενδογενούς παραγωγής προστανοειδών. Επιπλέον, η CRH καταστέλλει την παραγωγή προστανοειδών επέχοντας έτσι κατασταλτικές δράσεις στον γνωστότερο μηχανισμό της φθαρτοποίησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το γονίδιο της CRH εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο, πριν και κατά την εγκυμοσύνη (αλλά σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς) πράγμα που δηλώνει και τη σημασία της CRH στη φυσιολογία του ενδομητρίου. Πράγματι, ευρέθη ότι το mRNA της CRH και το πεπτιδικό του τελικό προϊόν ανιχνεύονται στα φυσιολογικά ανθρώπινα ενδομητρικά αδενικά κύτταρα καθώς επίσης και στα καλά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινικά ενδομητρικά κύτταρα Ishikawa. Το μέγεθος του μεταγραφήματος είναι 1.4 Kb, όμοιο με αυτό του ανθρώπινου πλακούντα και του υποθαλάμου επίμυος. Μελέτη έμμεσου ανοσοφθορισμού για την εντόπιση της CRH στα φυσιολογικά ενδομητρικά κύτταρα και στα κύτταρα Ishikawa απεκάλυψε κυτταρόπλασμα πλούσιο σε εκκριτικά κοκκία έντονα θετικά για ir-CRH. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν την πρώτη διεθνώς ανακοίνωση της έκφρασης της CRH στα φυσιολογικά και στα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου ενδομητρίου. Επιπλέον, το εύρημά μας ότι το κύριο μέρος της ir-CRH που ανιχνεύεται στα φυσιολογικά ενδομητρικά κύτταρα αντιστοιχεί στη μεγέθους 41-αμινοξέων υποθαλαμική CRH, υποδηλώνει ότι το κυκλικά μεταβαλλόμενο ανθρώπινο ενδομήτριο διαθέτει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για τη μετα-μεταφραστική επεξεργασία του πρόδρομου μορίου p_{repro}CRH, αποφέροντας έτσι το βιοδραστικό τελικό προϊόν. Είναι ενδιαφέρον, ότι η καρκινική κυτταρική σειρά Ishikawa διατηρεί τα ένζυμα αυτά. Έτσι τα κύτταρα Ishikawa αποτελούν κατάλληλο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της ρύθμισης της ενδομητρικής CRH.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η ir-CRH εντοπίζεται στα αδενικά ενδομητρικά κύτταρα και όχι στα στρωματικά ενδομητρικά κύτταρα. Πρόσφατα, ανιχνεύθηκε

ανοσοϊστοχημικά ir-CRH σε ανθρώπινα στρωματικά ενδομητρικά κύτταρα, *in vitro* διαφοροποιημένα σε φθαρτικά (decidua) κύτταρα υπό την επίδραση μίγματος προγεσταγόνων, οιστρογόνων και ρελαξίνης (138). Τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα σε συνδυασμό με τα δικά μας υποδηλώνουν ότι τα επιθηλιακά (αδενικά) ενδομητρικά κύτταρα φαίνεται ότι αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής της ενδομητρικής CRH στη μη εγκύμονα μήτρα, ενώ η διαφοροποίηση σε φθαρτικά κύτταρα των φυσιολογικά μη εκφραζόντων την CRH στρωματικών κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης της.

Το mRNA της CRH και το πεπτιδικό του τελικό προϊόν ανιχνεύονται επίσης στο ενδομήτριο του επίμυος. Το μέγεθος του μεταγραφήματος είναι 1.4 Kb, όμοιο με αυτό του ανθρώπινου πλακούντα και του υποθαλάμου επίμυος. Ανοσοϊστοχημική μελέτη για την εντόπιση της CRH και χρωματογραφία μοριακής διήθησης για προσδιορισμό του μοριακού βάρους της εκλυομένης ir-CRH έδωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα με το ανθρώπινο ενδομήτριο. Έτσι η ήδη τεκμηριωμένη αξιοσημείωτη ομοιομορφία του επίμυος με τον ανθρώπινο οργανισμό όσον αφορά το σύστημα της CRH στον υποθάλαμο, φαίνεται ότι διατηρείται και στη μήτρα. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις τόσο του mRNA της CRH όσο και του ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου βρέθηκαν σημαντικότερα αυξημένες στις θέσεις εμφύτευσης σε σχέση με τις υπόλοιπες ενδιάμεσες περιοχές της μήτρας του επίμυος.

Ο ρόλος της CRH στη φυσιολογία του ενδομητρίου είναι ακόμα υποθετικός. Εν τούτοις, δεδομένου ότι η παραγωγή της CRH στην ενδομητρική κοιλότητα είναι συνεχής, ο ρόλος της πιθανολογείται ότι είναι σημαντικός. Πράγματι, στο κυκλικά εναλασσόμενο ενδομήτριο, τα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το νευροπεπτίδιο αυτό, ενώ ενωρίς κατά την

εγκυμοσύνη τα φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα αναλαμβάνουν την έκφρασή του. Έκτοτε, φαίνεται ότι ο πλακούντας αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής της ενδομητρικής CRH.

Σύμφωνα με παλαιότερες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου μας, τα ανθρώπινα επιθηλιακά ενδομητρικά κύτταρα εκφράζουν επίσης το γονίδιο της προοπιομελανοκορτίνης και συνθέτουν και εκλύουν τα τελικά της προϊόντα (126-128). Επιπλέον τα οιστρογόνα ελαττώνουν την έκλυση της ενδομητρικής β-ενδορφίνης κατά χρονο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, δράση η οποία επιτελείται μέσω οιστρογονικών υποδοχέων. Το εύρημά μας ότι τα οιστρογόνα ελαττώνουν την έκφραση του γονιδίου της CRH σε κύτταρα Ishikawa που διαμολύθηκαν με την προαγωγό περιοχή του γονιδίου της CRH υποδηλώνει σε συνδιασμό με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα ότι: α) τα οιστρογόνα κατά πάσα πιθανότητα ελαττώνουν την έκλυση των ενδομητρικών οπιοειδών που προέρχονται από την POMC μέσω αναστολής της ενδομητρικής CRH και β) η ενδομητρική CRH πιθανώς επέχει αυτοκρινείς/παρακρινείς δράσεις στην έκκριση των ενδομητρικών οπιοειδών πεπτιδίων που προέρχονται από την POMC, γεγονός που παρατηρείται σε άλλους περιφερικούς ιστούς όπως ο πλακούντας και οι όρχεις. Πράγματι στον ανθρώπινο πλακούντα και στους όρχεις η τοπικά παραγόμενη CRH επάγει την έκκριση των πλακουντιακών και ορχικών οπιοειδών πεπτιδίων των προερχομένων από την POMC (139).

Η συμμετοχή της CRH στην φλεγμονώδη αντίδραση έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί. Ειδικότερα η CRH έχει ανιχνευθεί σε φλεγμονώδεις θέσεις και ανοσοεξουδετέρωση της CRH με ειδικά αντισώματα μετριάξει τη φλεγμονώδη αντίδραση (140). Η

προετοιμασία του ενδομητρίου για την εμφύτευση της επερχόμενης βλαστοκύστης έχει χαρακτηριστικά άσηπτης φλεγμονής (141). Είναι γνωστό ότι αρκετοί φλεγμονώδεις ρυθμιστές παράγονται από το ενδομήτριο, όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 ενώ στα ενδομητρικά κύτταρα εκφράζονται οι υποδοχείς των IL-1 και TNF α (137). Επιπλέον και η βλαστοκύστη εκκρίνει IL-1 και PGE $_2$ (141). Η προερχόμενη από τη βλαστοκύστη IL-1 είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την εμφύτευση. Στον μυ η εξουδετέρωση της έχει σαν αποτέλεσμα την αποτυχία της εμφύτευσης (142). Επιπλέον, η μέτρηση του επιπέδου της IL-1 στο αμνιακό υγρό αποτελεί δείκτη επιτυχούς εμφυτεύσεως (143). Πιθανολογείται λοιπόν ότι η CRH συμμετέχει στη ρύθμιση των ανοσολογικών φαινομένων που λαμβάνουν μέρος στην ενδομητρική κοιλότητα καθώς και στην εμφύτευση της βλαστοκύστης. Είναι γνωστό ότι η ανθρώπινη βλαστοκύστη εκκρίνει PGE $_2$ και IL-1 (141). Η PGE $_2$, η IL-1 και η IL-6 επάγουν την έκφραση της CRH στον πλακούντα και στον υποθάλαμο (136, 141) και όπως δείξαμε και στα ενδομητρικά κύτταρα Ishikawa. Το γονίδιο της POMC εκφράζεται στο ενδομήτριο και το παράγωγό της η β -ενδορφίνη, έχει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (126). Με αυτά τα δεδομένα πιθανολογούμε ότι συμβαίνει η παρακάτω ακολουθία γεγονότων κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης: η βλαστοκύστη εκλύει PGE $_2$ και IL-1 στην περιοχή της εμφύτευσης οι οποίες μεταξύ των άλλων επάγουν την παραγωγή CRH από το ενδομήτριο. Η ενδομητρική CRH συμμετέχει στα τοπικά φαινόμενα (φλεγμονώδη και άλλα) της εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Πράγματι οι συγκεντρώσεις τόσο του mRNA της CRH όσο και του ανοσοαντιδρώντος πεπτιδίου βρέθηκαν σημαντικότερα αυξημένες στις θέσεις εμφύτευσης σε σχέση με τις υπόλοιπες ενδιάμεσες περιοχές της μήτρας του επίμυος. Ταυτοχρόνως η ενδομητρική CRH ίσως καταστέλλει τη φλεγμονώδη αντίδραση

μέσω της αύξησης που προκαλεί τοπικά (ενδομητρικά) της β-ενδορφίνης, η οποία έχει τοπική ανοσοκατασταλτική δράση στη θέση της εμφύτευσης, εμποδίζοντας έτσι την απόρριψη της βλαστοκύστης (ημι-αλλομόσχευμα) καθ' όσον αυτή περιέχει και πατρικό γονιδιακό υλικό (σχήμα 4.1).

Έχει τεκμηριωθεί βιβλιογραφικά ότι η ενδομητρική μικρονεοαγγείωση υπεισέρχεται στα πρώιμα γεγονότα της εμφύτευσης (141). Μία άλλη πιθανή θέση δράσης του ενδομητρικού CRH είναι η συμμετοχή του στην ενδομητρική νεοαγγείωση. Πράγματι, η περιφερική CRH έχει δειχθεί ότι έχει αγγειοδιασταλτικές δράσεις (144). Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης παρατηρείται μεγάλη αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων που περιβάλλουν το εμφυτευμένο έμβρυο. Τα ενδομητρικά τριχοειδή που είναι γειτονικά στην πρωτογενή φθαρτοποιημένη ζώνη διαστέλλονται. Έχει προταθεί ότι τοπικοί φλεγμονώδεις διαβιβαστές ρυθμίζουν τις αγγειακές αλλαγές στο ενδομήτριο κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης (141). Έτσι, η ενδομητρική CRH ίσως αποτελεί τμήμα αυτής της αλυσίδας γεγονότων τα οποία βρίσκονται πιθανώς υπό τον έλεγχο παραγόντων προερχομένων από τη βλαστοκύστη (σχήμα 4.1).

Η ενδομητρική CRH ίσως παίζει τοπικό ρόλο στη ρύθμιση του μυομητρικού τόνου. Ειδικότερα, έχουν ανιχνευθεί υποδοχείς της CRH στο ανθρώπινο μυομήτριο (57). Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί βιβλιογραφικά ότι η CRH και η ωκυτοκίνη έχουν συνεργητικές δράσεις στην ρύθμιση της μυομητρικής συσταλτικότητας στην οποία συμμετέχουν και οι προσταγλανδίνες (145). Τελικά, η CRH ίσως συμμετέχει στη ρύθμιση του μυομητρικού τόνου μέσω της δράσης του στην παραγωγή της ενδομητρικής β-ενδορφίνης, η οποία επέχει μυοχαλαρωτικές δράσεις στις λείες μυϊκές ίνες (σχήμα 4.2) (146). Είναι λοιπόν πιθανό ότι συμμετέχουν και στην ρύθμιση της

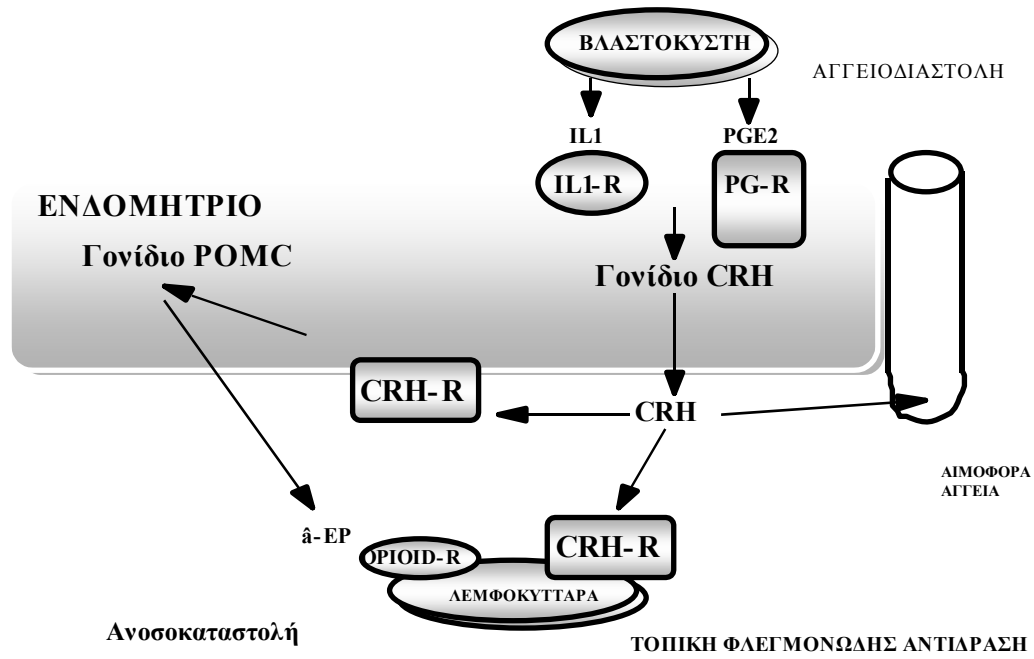
συσταλτικότητα του μυομητρίου. Κατά την παραγωγική φάση, η αύξηση των οιστρογόνων μέχρι την ωορηξία καταστέλλει την παραγωγή της ενδομητρικής β-ενδορφίνης και επιτείνει ακόλουθα τις μυομητρικές συσπάσεις, γεγονός απαραίτητο τόσο για την απαιτούμενη μετακίνηση του ωαρίου στις σάλπιγγες όσο και την αντίστοιχη προώθηση των σπερματοζωαρίων. Κατά τη δεύτερη φάση του κύκλου αντίθετα, η μείωση των οιστρογόνων ανεβάζει τα επίπεδα της παραγόμενης β-ενδορφίνης, οι μυοχαλαρωτικές δράσεις της οποίας είναι τώρα απαραίτητες για την ακόλουθη εναπόθεση/εμφύτευση της βλαστοκύστης. Είναι γνωστό ότι στα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης αυξάνει η συγγένεια του υποδοχέα της CRH στο μυομήτριο, ώστε να γίνει υψηλότερη αυτής της CRH-BP (57). Σε αυτό το στάδιο, η προερχόμενη κυρίως από τον πλακούντα CRH πιθανότατα επεμβαίνει, από κοινού με άλλους παράγοντες, στη συσπαστικότητα της μήτρας και τη διευκόλυνση του τοκετού.

Η συμμετοχή της CRH στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων είναι ένας άλλος μηχανισμός δράσης της ενδομητρικής CRH. Πρόσφατα έγινε ο χαρακτηρισμός του CRH-R1 στα στρωματικά κύτταρα (147). Η δράση της CRH επιτελείται πιθανότατα μέσω αυτού του υποδοχέα, δεδομένου ότι ταυτόχρονη συνεπώαση των κυττάρων με περίσσεια του ανταγωνιστή της CRH, α -helicalCRH, εξουδετερώνει αυτή τη δράση. Επιπλέον, στα στρωματικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν πρόσφατα το γονίδιο της CRH καθώς και το τελικό πεπτιδικό προϊόν (147). Χωρίς να έχουν υπολογιστεί οι ακριβείς συγκεντρώσεις, αποδεικνύεται ότι η προερχόμενη από στρωματικά κύτταρα CRH δεν επαρκεί για τη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων. Έτσι συμπεραίνουμε ότι μόνο η επιθηλιακή CRH συμμετέχει ουσιαστικά σε αυτή τη διαδικασία (σχήμα 4.3). Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της CRH στη φθαρτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της έκλυσης IL-6 και PGE₂, δύο παραγόντων οι οποίοι συμμετέχουν τόσο στη ρύθμιση της ενδομητρικής

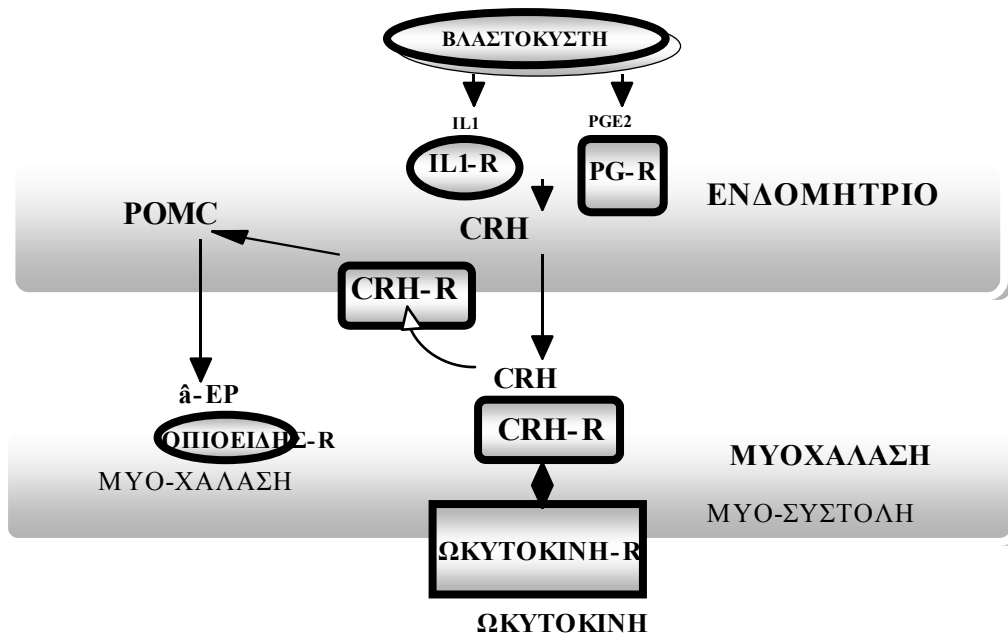
CRH όσο και στη διαδικασία της φθαρτοποίησης (148, 149). Διαπιστώσαμε ότι η επώαση των στρωματικών κυττάρων με CRH επάγει την έκλυση της IL-6 ενώ αντίθετα καταστέλλει αυτήν της PGE2. Σε κάθε περίπτωση, η δράση της CRH επιτελείται μέσω CRH-R1, δεδομένου ότι ταυτόχρονη συνεπώαση των κυττάρων με περίσσεια του ανταγωνιστή της CRH, α -helicalCRH, εξουδετερώνει αυτή τη δράση. Επιπλέον, η επίδραση στην φθαρτοποίηση και στην έκλυση της IL-6 δεν επηρεάζεται από την ινδομεθακίνη γεγονός που δείχνει ότι δεν εξαρτάται από τα προστανοειδή. 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 φθαρτοποίησης.

Για πολλά χρόνια στο ανθρώπινο ενδομήτριο αποδίδονταν μόνο ιδιότητες οργάνου, στόχου πολλών ορμονών, κυρίως ωοθηκικών. Τελευταία όμως του αποδίδονται αξιοσημείωτες εκκριτικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά πολύπλοκου νευροενδοκρινικού οργάνου. Δείξαμε ότι τα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο της CRH ενώ συνθέτουν και εκλύουν το τελικό βιοδραστικό πεπτιδικό προϊόν. Η έκφραση της ενδομητρικής CRH τελεί υπό τον έλεγχο των στεροειδών ορμονών, προστανοειδών και ιντερλευκινών. Δεδομένων των ιδιοτήτων της περιφερικής CRH και ιδιαίτερα της συμμετοχής της στην αντίδραση της φλεγμονής, 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

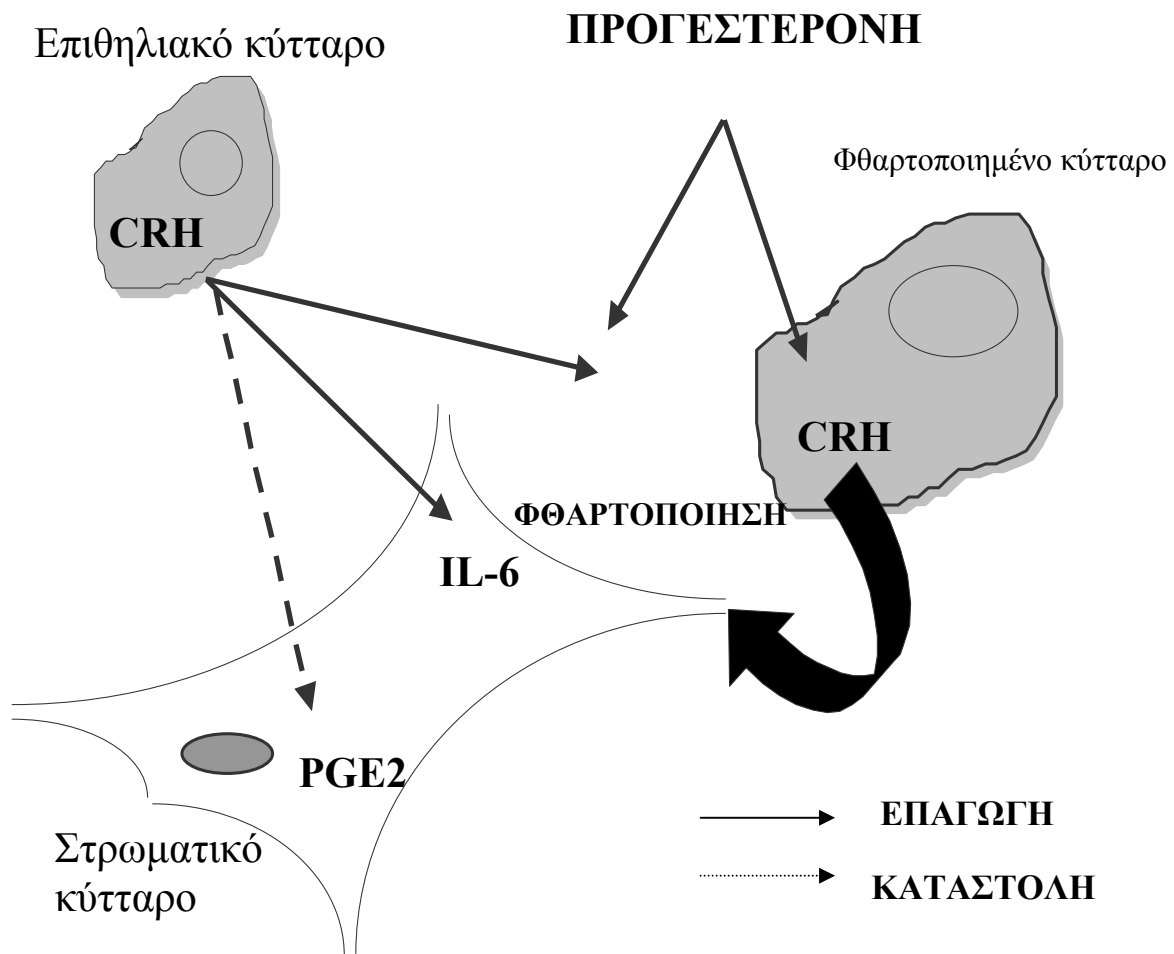
εμφύτευση της βλαστοκύστης ε) στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων μέσω μίας νέας βιολογικής οδού που δεν περιλαμβάνει ενδογενή προστανοειδή και στ) στον έλεγχο της φθαρτοποίησης που προκαλείται από την PGE2



Σχήμα 4.1 Συμμετοχή του ενδομητρικού συστήματος **CRH-POMC** σε ανοσολογικά φαινόμενα σε πρώιμο στάδιο κύησης. (IL-1 : ιντερλευκίνη-1, X-R : υποδοχέας)



Σχήμα 4.2 Συμμετοχή του ενδομητρικού συστήματος **CRH-POMC** στην ενδομητρική συσταλτικότητα. (**IL-1** : ιντερλευκίνη-1, **X-R** : υποδοχέας, **PG**: προσταγλανδίνες)



Σχήμα 4.3 Συμμετοχή της ενδομητρικής CRH στη φθαρτοποίηση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για πολλά χρόνια στο ανθρώπινο ενδομήτριο αποδίδονταν μόνο ιδιότητες οργάνου, στόχου πολλών ορμονών, κυρίως ωοθηκικών. Τελευταία όμως του αποδίδονται αξιοσημείωτες εκκριντικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά πολύπλοκου νευροενδοκρινικού οργάνου. Δείξαμε ότι τα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο της CRH ενώ συνθέτουν και εκλύουν το τελικό βιοδραστικό πεπτιδικό προϊόν. Η έκφραση της ενδομητρικής CRH τελεί υπό τον έλεγχο των στεροειδών ορμονών, προστανοειδών και ιντερλευκινών. Δεδομένων των ιδιοτήτων της περιφερικής CRH και ιδιαίτερα της συμμετοχής της στην αντίδραση της φλεγμονής, 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 μίας νέας βιολογικής οδού που δεν περιλαμβάνει ενδογενή προστανοειδή και στ) στον έλεγχο της φθαρτοποίησης που προκαλείται από την PGE₂.

SUMMARY

Human endometrium was considered for many years as a passive target tissue of ovarian steroid hormones. Recent experimental findings show that this intriguing tissue possesses remarkable secretory properties and characteristics of a neuroendocrine organ. Indeed, epithelial cells of human and rodent endometrium express the corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptide precursors genes, i.e. proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin and releases their end-products. Normal stromal cells of the endometrium do not seem to express CRH unless they differentiate to decidual cells. These endometrial neuropeptides are under the control of steroid hormones, prostanoids and interleukins. Considering the involvement of CRH in pro-inflammatory phenomena it is postulated that endometrial CRH, in association with uterine prostanoids/cytokines and opioids, may participate in intrauterine inflammatory processes of early pregnancy, such as stroma decidualization and blastocyst implantation. Additionally, given the myo-relaxant actions of opioids these endometrial neuropeptides may partake in the regulation of myometrial contractility. Finally, endometrial CRH may participate in a local feed-back loop between epithelial and stromal endometrial cells. This involves a balance between the induction of stroma decidualization via a prostaglandin-independent pathway and the inhibition of decidualization via its inhibitory effect on PGE₂, leading to the subsequent inhibition of PGE₂-dependent decidualization pathways.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North America*. 3:451-66, 1994
2. Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North America*. 21:833-58, 1992
3. Harris GW. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev* 28:139, 1948
4. Saffran M and Schally AV. The release of corticotropin by anterior pituitary tissue in vitro. *Can J Biochem Physiol* 33:408-415, 1955
5. Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology*. 110:272-8, 1982
6. Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Vale W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*. 111:928-31, 1982
7. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* 213:1394, 1981

8. Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Nat Acad Sci.* 78:6517-21, 1981
9. Spiess J. Rivier J. Vale W. Sequence analysis of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor with the o-phthalaldehyde strategy. *Biochemistry.* 22:4341-6, 1983
10. Feek CM, Marante DJ, Edwards CR The hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Endocrinol Metab* 12:597-618, 1983
11. 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.* 2:775-9, 1983
12. Arbiser JL. Morton CC. Bruns GA. Majzoub JA. Human corticotropin releasing hormone gene is located on the long arm of chromosome 8. *Cytogenet Cell Genet* 47:113-6, 1988
13. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Hormonal regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression: implications for the stress response and immune/inflammatory reaction. *Endocr Rev* 15:409-420, 1994
14. Vamvakopoulos NC, Karl M, Mayol V, Gomez T, Stratakis CA, Margioris A, Chrousos GP. Structural analysis of the regulatory region of the human corticotropin releasing hormone gene. *FEBS Lett* 7:1-5, 1990

15. Emanuel RL, Girard DM, Thull DL, Majzoub JA. Second messengers involved in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA and peptide in cultured rat fetal hypothalamic primary cultures. *Endocrinology* 126:3016-3021, 1990
16. Labrie F. Giguere V. Proulx L. Lefevre G. Interactions between CRF, epinephrine, vasopressin and glucocorticoids in the control of ACTH secretion. *J Steroid Biochem.* 20:153-60, 1984
17. Robinson BG. Emanuel RL. Frim DM. Majzoub JA. Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. *Proc Nat Acad Sci* 85:5244-8, 1988
18. Saphier D. Neurophysiological and endocrine consequences of immune activity. *Psychoneuroendocrinology.* 14:63-87, 1989.
19. Tsagarakis S. Gillies G. Rees LH. Besser M. Grossman A. Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 49:98-101, 1989
20. Calogero AE. Bernardini R. Gold PW. Chrousos GP. Regulation of rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro: potential clinical implications. *Adv Exp Med & Biol.* 245:167-81, 1988.
21. Bernardini R. Calogero AE. Ehrlich YH. Brucke T. Chrousos GP. Gold PW. The alkyl-ether phospholipid platelet-activating factor is a stimulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Endocrinology* 125:1067-73, 1989

22. Wei ET, Kiang JG. Peptides of the corticoliberin superfamily attenuate thermal and neurogenic inflammation in rat pawskin. *Eur J Pharmacol* 168:81-6, 1989
23. Fisher LA. Central actions of corticotropin-releasing factor on autonomic nervous activity and cardiovascular functioning. *Ciba Foundation Symposium*. 172:243-53; discussion 253-7, 1993.
24. Owens MJ, Nemeroff CB. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43:425-473, 1991
25. Pallai PV, Mabilia M, Goodman M, Vale W, Rivier J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. *Proc Natl Acad Sci* 80:6770-6774, 1983
26. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Comparison of the biologic actions of corticotropin-releasing factor and sauvagine. *Regulatory Peptides*. 4:107-14, 1982
27. Lederis K, Letter A, McMaster D, Moore G, Schlesinger D. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science*. 218:162-5, 1982
28. Lederis K, Letter A, McMaster D, Ichikawa T, MacCannell KL, Kobayashi Y, Rivier J, Rivier C, Vale W, Fryer J. Isolation, analysis of structure, synthesis, and biological actions of urotensin I neuropeptides. *Can J Biochem & Cell Biol*. 61:602-14, 1983

29. Turnbull AV. Vale W. Rivier C. Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, inhibits edema due to thermal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 303:213-6, 1996
30. Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am J Psychiatry*. 141:619-27, 1984
31. Wetterberg L. The relationship between the pineal gland and the pituitary-adrenal axis in health, endocrine and psychiatric conditions. *Psychoneuroendocrinology*. 8:75-80, 1983.
32. Banki CM Bissette G Arato M O'Connor L Nemeroff CB CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 144:873-7, 1987
33. Krahn DD. Gosnell BA. Corticotropin-releasing hormone: possible role in eating disorders. *Psych Med* 7:235-45, 1989.
34. Owens MJ. Vargas MA. Nemeroff CB. The effects of alprazolam on corticotropin-releasing factor neurons in the rat brain: implications for a role for CRF in the pathogenesis of anxiety disorders. *J Psych Res*. 27:209-20, 1993.
35. Freda PU. Wardlaw SL. Bruce JN. Post KD. Goland RS. Differential diagnosis in cushing syndrome. Use of corticotropin-releasing hormone. *Medicine*. 74:74-82, 1995

36. Chen R. Lewis KA. Perrin MH. Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 90:8967-71, 1993
37. Vita N. Laurent P. Lefort S. Chalon P. Lelias JM. Kaghad M. Le Fur G. Caput D. Ferrara P. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett* 335:1-5, 1993
38. Perrin MH. Donaldson CJ. Chen R. Lewis KA. Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 133:3058-61, 1993
39. Chang CP. Pearse RV 2d. O'Connell S. Rosenfeld MG. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*. 11:1187-95, 1993
40. Polymeropoulos MH, Torres R, Yanovski JA, Chandrasekharappa SC, Ledbetter DH The human corticotropin-releasing factor receptor (CRHR) gene maps to chromosome 17q12-q22. *Genomics* 28:123-124, 1995
41. Lovenberg TW. Liaw CW. Grigoriadis DE. Clevenger W. Chalmers DT. De Souza EB. Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. Published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci* 92:5759, 1995
42. Vale W. Vaughan J. Perrin M. Corticotropin-releasing factor (CRF) family of ligands and their receptors. *Endocrinologist*. 7:S 3-S 9, 1997

43. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor
Nature 378:287-292, 1995
44. Dieterich KD. Lehnert H. De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: an overview. *Exp Clin Endocrinol & Diabet.* 105:65-82, 1997.
45. Labrie F. Gagne B. Lefevre G. Corticotropin-releasing factor stimulants adenylate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Sci* 31:1117-21, 1982
46. Webster EL. Battaglia G. De Souza EB. Functional corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in mouse spleen: evidence from adenylate cyclase studies. *Peptides.* 10:395-401, 1989
47. Axelrod J. Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science.* 224:452-9, 1984
48. Dieterich KD. DeSouza EB. Functional corticotropin-releasing factor receptors in human neuroblastoma cells. *Brain Res* 733:113-8, 1996
49. Lutz-Bucher B, Felix JM, Koch B Activation of protein kinase C differentially regulates corticotropin-releasing factor-stimulated peptide secretion and cyclic AMP formation of intermediate and anterior pituitary cells in culture. *Peptides* 11:1183-1189, 1990
50. 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* 136:4139-4142, 1995

51. Smets G, Van-Gompel J, Meyer C, Abs R, de-Menten Y, Kloppel G. Corticotropin-releasing hormone receptors on human pituitary cells: autoradiography at the light microscopical level, quantification and immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 26:107, 1992

52. Xiong Y, Xie LY, Abou-Samra AB. Signaling properties of mouse and human corticotropin-releasing factor (CRF) receptors: decreased coupling efficiency of human type II CRF receptor. *Endocrinology*. 136:1828, 1995

53. Kishimoto T, Pearce RV 2nd, Lin CR, Rosenfeld MG. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 92:1108, 1995

54. Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 92:836, 1995

55. Grigoriadis DE, Heroux JA, De Souza EB. Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor receptors in the central nervous, endocrine and immune systems. *Ciba Found Symp* 172:85, discussion 101-7, 1993

56. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 90:8967, 1993

57. 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* 76:736, 1993
58. Behan DP, Cepoi D, Fischer WH, Park M, Sutton S, Lowry PJ, Vale W. Characterization of a sheep brain corticotropin releasing factor binding protein (*Brain Research* 709 (1996) 265-274) (BRES 11959). *Brain Res.* 732:267, 1996
59. Sutton SW, Behan DP, Lahrichi SL, Kaiser R, Corrigan A, Lowry P, Potter E, Perrin MH, Rivier J, Vale WW. Ligand requirements of the human corticotropin-releasing factor-binding protein. *Endocrinology* 136:1097-1102, 1995
60. Potter E, Behan DP, Fischer WH, Linton EA, Lowry PJ, Vale WW. Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* 349:423-426, 1991
61. Vamvakopoulos NC, Sioutopoulou TO, Durkin SA, Nierman WC, Wasmuth JJ, McPherson JD. Mapping the human corticotropin releasing hormone binding protein gene (CRHBP) to the long arm of chromosome 5 (5q11.2-q13.3). *Genomics* 25:325-327, 1995
62. Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 16:362-382, 1995

63. Behan DP, Heinrichs SC, Troncoso JC, Liu XJ, Kawas CH, Ling N, De Souza EB Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature* 378:284-287, 1995

64. Behan DP, Potter E, Lewis KA, Jenkins NA, Copeland N, Lowry PJ, Vale WW Cloning and structure of the human corticotrophin releasing factor-binding protein gene. *Genomics* 16:63-68, 1993 Published erratum appears in *Genomics* 19:198, 1994

65. Fehm HL. Born J. Effects of corticotropin releasing hormone on human brain function: an analysis based on auditory evoked potentials. *Hormone Metabol Res* 16:75-9, 1987.

66. Swanson LW. Sawchenko PE. Rivier J. Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 36:165-86, 1983.

67. Alonso G. Szafarczyk A. Balmefrezol M. Assenmacher I. Immunocytochemical evidence for stimulatory control by the ventral noradrenergic bundle of parvocellular neurons of the paraventricular nucleus secreting corticotropin releasing hormone and vasopressin in rats. *Brain Res* 397:297-307, 1986

68. Papadopoulos GC. Karamanlidis AN. Michaloudi H. Dinopoulos A. Antonopoulos J. Parnavelas JG. The coexistence of oxytocin and corticotropin-releasing factor in the hypothalamus: an immunocytochemical study in the rat, sheep and hedgehog. *Neurosci Lett* 62:213-8, 1985

69. Sakanaka M. Magari S. Shibasaki T. Inoue N. Co-localization of corticotropin-releasing factor- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus and adjacent areas. *Brain Res.* 487:357-62, 1989
70. Roth KA. Weber E. Barchas JD. Chang D. Chang JK. Immunoreactive dynorphin-(1-8) and corticotropin-releasing factor in subpopulation of hypothalamic neurons. *Science.* 219:189-91, 1983
71. Ceccatelli S. Eriksson M. Hokfelt T. Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 49:309-23, 1989
72. Calogero AE. Gallucci WT. Chrousos GP. Gold PW. Catecholamine effects upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *J Clin Invest* 82:839-46, 1988
73. Calogero AE. Gallucci WT. Gold PW. Chrousos GP. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. *J Clin Invest* 82:767-74, 1988
74. Calogero AE. Gallucci WT. Chrousos GP. Gold PW. Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res* 463:28-36, 1988

75. Calogero AE. Raiti F. Nicolosi G. Burrello N. D'Agata R. Mantero F. Effects of endothelin-1 and endothelin-3 on rat hypothalamic corticotrophin-releasing hormone and pituitary ACTH release in vitro. *J Endocrinol.* 140:419-24, 1994
76. Plotsky PM. Opioid inhibition of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation of rats *Regulatory Peptides.* 16:235-42, 1986
77. Overton JM. Fisher LA. Modulation of central nervous system actions of corticotropin-releasing factor by dynorphin-related peptides. *Brain Res* 488:233-40, 1989
78. Suda T. Tomori N. Tozawa F. Demura H. Shizume K. Mouri T. Miura Y. Sasano N. Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 58:919-24, 1984
79. Venihaki M, Gravanis A, Margioris AN Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 138:698-704, 1997
80. Venihaki M, Ain K, Dermitzaki E, Gravanis A, Margioris AN. KAT45, a new noradrenergic human pheochromocytoma cell line producing corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* In press, 1998

81. Dammrich J, Ormanns W, Kahaly G, Schrezenmeir J. Multiple peptide hormone producing adenocarcinoma of lung with neurotensin and CRF-like immunoreactivity. *Pathol Res Pract* 183:670, 1988

82. Kravchenko IV, Furalev VA. Secretion of immunoreactive corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B-lymphocytes in response to cellular stress factors. *Biochem Biophys Res Comm.* 204:828-34, 1994

83. Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci* 90:7104-8, 1993

84. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demoura H, Shizume K. Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59:861, 1984

85. Petrusz P, Merghenthaler I, Maderdrut L, Vigh S, Schally A. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the vertebrate endocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:1721, 1983

86. Rosen LB, Majzoub JA, Adler GK. Effects of glucocorticoid on corticotropin-releasing hormone gene regulation by second messenger pathways in NPLC and AtT-20 cells. *Endocrinology.* 130:2237-44, 1992

87. Petrusz P, Merghenthaler I, Ordroneau P, Maderdrut L, Vigh S, Schally A. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the gastro-entero-pancreatic endocrine system. *Peptides* 5:71, 1984

88. Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M. Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett* 374:113-116, 1995

89. Plotsky PM. Otto S. Sapolsky RM. Inhibition of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation by delayed glucocorticoid feedback. *Endocrinology*. 119:1126-30, 1986

90. Karalis K, H Sano, J Redwine, S Listwark, R Wilder, Chrousos G. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421, 1991

91. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, Chrousos G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 139:403-413, 1998

92. Hargreaves KM. Dubner R. Costello AH. Corticotropin releasing factor (CRF) has a peripheral site of action for antinociception. *Eur J Pharmacol* 170:275-9, 1989

93. Schafer M. Mousa SA. Stein C. Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation. *Eur J Pharmacol* 323:1-10, 1997

94. Correa SG. Riera CM. Spiess J. Bianco ID. Modulation of the inflammatory response by corticotropin-releasing factor. *Eur J Pharmacol* 319:85-90, 1997

95. Yoon DJ, Sklar C, David R. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology* 122:759, 1988
96. Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Hutchinson B. Structural characterization and localization of corticotropin-releasing factor in testis. *Biochim Biophys Acta* 995:10, 1989
97. Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* 127:1541-3, 1990
98. Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J* 7:299, 1993
99. Tinajero JC, Fabbri A, Dufau ML. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology*. 130:1780-8, 1992
100. Ulisse S, Fabbri A, Dufau ML. Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J Biol Chem* 264:2156-63, 1989
101. Huang BM, Stocco DM, Hutson JC, Norman RL. Corticotropin-releasing hormone stimulates steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Biol Reprod* 53:620, 1995
102. Huang BM, Stocco DM, Norman RL. The cellular mechanisms of Corticotropin-releasing hormone (CRH)-stimulated steroidogenesis in mouse Leydig cells are similar to those for LH. *J Androl* 18:528-34, 1997

103. 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
104. Mastorakos G, Scopa C, Vryonidou A, Friedman T, Kattis D, Phenekos C, Merino M, Chrousos G. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1191, 1994
105. Asakura H. Zwain IH. Yen SS. Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRF-binding protein and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2720-5, 1997.
106. 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
107. Grino M, Chrousos G, Margioris A. The corticotropin-releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 148:1208, 1987
108. Margioris AN. Corticotropin releasing hormone and the placenta and fetal membranes. In: Brennecke S., Rice G. (eds.), *Molecular aspects of placental and fetal membrane autacoids*, CRC Press (publs) vol 12, p. 277, 1993

109. Linton EA, Perkins AV, Woods RJ, Eben F, Wolfe CD, Behan DP, Potter E, Vale WW, Lowry PJ. Corticotropin releasing hormone-binding protein (CRH-BP): plasma levels decrease during the third trimester of normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 76:260, 1993
110. Petraglia F, Potter E, Cameron VA, Sutton S, Behan DP, Woods RJ, Sawchenko PE, Lowry PJ, Vale W. Corticotropin-releasing factor-binding protein is produced by human placenta and intrauterine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:919, 1993
111. Hatzoglou A. Margioris AN. Bakogeorgou E. Gravanis A. Castanas E. Identification, characterization and localization of corticotropin-releasing hormone receptors in human placenta. *Life Sci.* 59:1871, 1996
112. Saeed BO. Weightman DR. Self CH. Characterization of corticotropin-releasing hormone binding sites in the human placenta. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research.* 17(4):647-66, 1997
113. Clifton VL. Owens PC. Robinson PJ. Smith R. Identification and characterization of a corticotrophin-releasing hormone receptor in human placenta. *European Journal of Endocrinology.* 133(5):591-7, 1995
114. Frim D, Emanuel R, Robinson B, Smas C, Adler G, Majzoub J. Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in human placenta. *J. Clin. Invest.* 82:287, 1988
115. Robinson B, Emanuel R, Frim D, Majzoub J. Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. *Proc Natl Acad Sci* 85:5244, 1988

116. Coukos G, Monzani A, Saletti C, Petraglia F. Noradrenaline and interleukin-1 stimulate CRF secretion from human placental cells in culture. *Medicina* 8:441, 1988
117. Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* 328:717, 1987
118. Margioris AN, Grino M, Protos P, Gold P, Chrousos G. Corticotropin-releasing hormone and oxytocin stimulate the release of placental proopiomelanocortin peptides. *J Clin Endocrinol Metab.* 66:922, 1988
119. Petraglia F, Sutton S, Vale W. Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol* 160:247-251, 1989
120. Jones SA. Brooks AN. Challis JR. Steroids modulate corticotropin-releasing hormone production in human fetal membranes and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 68:825-30, 1989
121. Karalis K. Majzoub JA. Regulation of placental corticotropin-releasing hormone by steroids. Possible implications in labor initiation. *Ann NY Acad Sci.* 771:551-5, 1995
122. Campbell EA, Linton EA, Wolfe CD, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ. Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:1054, 1987

123. Margioris AN, Grino M, Rabin D, Chrousos GP. Human placenta and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Adv Exp Med Biol* 245:389, 1988

124. Quartero HW, Fry CH. Placental corticotrophin releasing factor may modulate human parturition. *Placenta* 10:439, 1989

125. Petraglia F, Florio P, Gallo R, Simoncini T, Saviozzi M, Di Blasio AM, Vaughan J, Vale W. Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3807-3810, 1996

126. Gravanis A, Makrigiannakis A, Stournaras C, Margioris A. Interactions between steroid hormones and endometrial opioid peptides. *Ann NY Acad Sci* 734:245-256, 1994

127. Makrigiannakis A, Margioris A, Markogiannakis E, Stournaras C, Gravanis A. Steroid Hormones regulate the release of immunoreactive β -endorphin from Ishikawa human endometrial cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:584-589, 1992

128. Makrigiannakis A, Margioris A, Stournaras C, Gravanis A. Estrogens inhibit the secretion of immunoreactive β -endorphin from human endometrium. *EBBS Newsletter.* 32:20-22, 1991

129. Hatzoglou A, Gravanis A, Margioris AN, Zoumakis E, Castanas E. Identification and characterization of opioid binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 80:418-423, 1995

130. Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H, Hayashi K. Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1985 Jul, 37:1103-11, 1985
131. Gravanis A, Gurbide E. Effects of estradiol on deoxyribonucleic acid polymerase alpha activity in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. J Clin Endocrinol Metab, 63:356-9, 1986
132. Holinka CF, Hata H, Gravanis A, Kuramoto H, Gurbide E. Effects of estradiol on proliferation of endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). J Steroid Biochem, 1986 Nov, 25:781-6, 1986
133. Yoshizumi N, Satoh K, Nishiya I. The effects of progestogens on a human endometrial cancer cell line Ishikawa and a human breast cancer cell line MCF-7. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 61:220-7, 1985
134. Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurbide E. Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). Cancer Res 46:2771-4, 1986
135. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. J Clin Invest, 92:1896-902, 1993
136. Lyson K; McCann SM Alpha-melanocyte-stimulating hormone abolishes IL-1- and IL-6-induced corticotropin-releasing factor release from the hypothalamus in vitro. Neuroendocrinology 58:191-5, 1993

137. Frank GR, Brar AK, Jikihara H, Cedars MI, Handwerger S. Interleukin-1 beta and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible autoregulator of decidualization in humans. *Biol Reprod*, 52:184-91, 1995
138. Petraglia F, Tabanelli S, Galassi C, Garuti GC, Mancini A, Genazzani A, Gurbide E. Human decidua and in vitro decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive CRF and CRF mRNA. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1427, 1992
139. Laatikainen TJ. Corticotropin-releasing hormone and opioid peptides in reproduction and stress *Ann Med* 23:489-96, 1991
140. Karalis K, H Sano, J Redwine, S Listwark, R Wilder, Chrousos G. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421, 1991
141. Psychoyos A; Nikas G; Gravanis A The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Hum Reprod*, 10 Suppl 2:30-42, 1995
142. Simon C, Frances A, Piquette G, Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan M. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 134:521, 1994
143. Sheth KV, Roca GL, Al-Sedairy S, Parhar R, Hamilton G, Al-Abdul Jabbar F. Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation. *Fertil Steril* 55:952, 1991

144. Grunt M, Glaser J, Schmidhuber H, Pauschinger P, Born J. Effects of corticotropin-releasing factor on isolated rat heart activity. *Am J Physiol* 264: H1124, 1993.
145. Quartero HW, Noort WA, Fry CH, Keirse MJ. Role of prostaglandins and leukotrienes in the synergistic effect of oxytocin and corticotropin-releasing hormone (CRH) on the contraction force in human gestational myometrium. *Prostaglandins*, 42:137-50, 1991
146. Olson G, Olson R, Kastin A. Endogenous opiates. *Peptides* 10:1253-1280, 1989
147. Di Blasio AM, Giraldi FP, Vigano P, Petraglia F, Vignali M, Cavagnini F Expression of corticotropin-releasing hormone and its R1 receptor in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1594-1597, 1997
148. Frank GR, Brar AK, Cedars MI, Handwerger S Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 134:258-263, 1994
149. Choudhuri R, Wood GW. Production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in the uterus of pseudopregnant mice. *Biol Reprod* 49:596-603, 1993

