

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος του ενδοσωμικού αναστολέα Pepstatin A κατά τη διάρκεια της κύησης σε συγγενετικά ποντίκια balb/c»



Παπαδογιάννη Γεωργία ΑΜ:1652

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αθανασάκη Ειρήνη

Ηράκλειο 2012

Ευχαριστίες...

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ειρήνης Αθανασάκη.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αθανασάκη αρχικά για το ότι με δέχτηκε στο εργαστήριο και στη συνέχεια για την καθοδήγηση και τη βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας. Ένα επιπλέον ευχαριστώ για την τεράστια κατανόηση που έδειξε όλες αυτές τις φορές που οι απορίες μου διαδέχονταν η μία την άλλη! Κυρίως όμως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός πως μου *έδωσε την επιλογή* να ασχοληθώ με ένα θέμα που με ενδιαφέρει πολύ.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κατερίνα Μπακέλα, Μαρία Καλογνώμου, Αμαλία Ανθούση, Ιωάννα Ζέρβα, Μιρέλλα Γεωργούλη, Κατερίνα Βαρδάκη και Γιάννη Σκόρδο για την βοήθεια όσες φορές την χρειαζόμουν αλλά κυρίως για το ευχάριστο και ομαδικό κλίμα του εργαστηρίου που συνέβαλε και αυτό στην επιτυχή διεκπεραίωση της εργασίας.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το οφείλω στη Χριστιάνα Κυβελίδου καθώς εκείνη μου έμαθε πώς να δουλεύω μέσα σε ένα εργαστήριο, απαντούσε σε κάθε απορία μου με τεράστια υπομονή και γενικότερα ήταν παρούσα από το πρώτο πείραμα μέχρι και το τελευταίο πάντα πρόθυμη να βοηθήσει παρόλο που η ίδια υποστηρίζει πως έκανε απλώς τη δουλειά της! Ένα τελευταίο ευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη κατά την αγχωτική περίοδο των συνεντεύξεων για το μεταπτυχιακό όπου και πάλι ήταν εκεί χωρίς όμως αυτή τη φορά να κάνει απλώς τη δουλειά της.....

Περιεχόμενα

1. E	ΊΣΑΓΩΓΗ	4
1.1	Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας	4
1.1.1	Τάξης Ι μόρια ιστοσυμβατότητας	4
1.1.2	Τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας	5
1.1.3	Εκκρινόμενα τάξης Ι και τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας	5
1.2	Αντιγονοπαρουσίαση μέσω Τάξης ΙΙ μορίων	
	ιστοσυμβατότητας	6
1.2.1	Το ενδοσωμικό μονοπάτι	6
1.2.2	Διαδικασία φόρτωσης αντιγονικού πεπτιδίου σε τάξης ΙΙ μόρια.	7
1.3	Η ανοσολογία της κύησης	9
1.3.1	Ο σχηματισμός του πλακούντα	9
1.3.2	Η έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στα κύτταρα του	
	πλακούντα	.10
1.3.3	Ο ρόλος των διαλυτών ΜΗC μορίων στην εγκυμοσύνη	.12
1.3.4	Κυτοκίνες και εγκυμοσύνη	.13
1.4	Αναστολείς του ενδοσωμικού μονοπατιού	.15
1.4.1	Pepstatin A	15
1.5	Σκοπός της εργασίας	.16
2. Y	ΊΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
21	Χειοισμός πειοσματοζών.»	18
2.1		10
2.1.1		. 10
2.2	Εσωτερικός ανοσοφθορισμός	.19
2.2.1	Κυτταρομετρία ροής	.22
2.2.2	Προετοιμασία κυττάρων για παρατήρηση στο μικροσκόπιο	23
2.3	Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA)	24
2.4	Συνταγές διαλυμάτων	26

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1	Μακροσκοπικά αποτελέσματα από τη χορήγηση της ΡΕΡ-Α	.28
3.1	.1 Βιωσιμότητα εμβρύων	.28
3.1	.2 Βάρος εμβρύων	30
3.2 3.3	Ενδοκυτταρική ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-II μορίων σε μητρικά κύτταρα σπλήνας με κυτταρομετρία ροής Ενδοκυτταρική ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-II	31
3.4	μικροσκοπία Ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-II μορίων στο μητρ ορό	.46 Эко́ .54
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας

Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC) είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων του οποίου τα προϊόντα ευθύνονται για την διάκριση του εαυτού από τον μη-εαυτό. Έχει εντοπιστεί σε όλα τα θηλαστικά που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και συγκεκριμένα στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 ενώ στο ποντίκι στο χρωμόσωμα 17. Στον άνθρωπο το MHC αναφέρεται ως σύμπλεγμα HLA (Human Leukocyte Antigens complex) και στο ποντίκι ως σύμπλεγμα H-2 (Histocompatibility-2 complex). Η βασική λειτουργία των MHC μορίων είναι η δέσμευση αντιγόνων και η παρουσίασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό το επιτυγχάνουν μεταφέροντας τα αντιγόνα στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυιττάρων με σκοπό την αναγνώρισή τους από τα κατάλληλα T-λεμφοκύτταρα και την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης. Τα MHC μόρια χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα τάξης Ι και τα τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας.

1.1.1 Τάξης Ι μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα τάξης Ι μόρια ιστοσυμβατότητας είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Αποτελούνται από δύο αλυσίδες: μία βαριά με μοριακό βάρος 45kDa και μία ελαφριά με μοριακό βάρος 12kDa. Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από δύο μεταβλητές επικράτειες (α1,α2) και από μία σταθερή επικράτεια (α3) ενώ διαθέτει ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από τη β2-μικροσφαιρίνη. Οι α1,α2 και α3 αλυσίδες κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους H-2 K,D,L στο ποντίκι και από τους ΗLA-A, -B, -C στον άνθρωπο ενώ η β2-μικροσφαιρίνη κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 2 στο ποντίκι και από το χρωμόσωμα 15 στον άνθρωπο. Στον άνθρωπο έχουν επίσης βρεθεί και μη κλασσικά τάξης Ι μόρια τα οποία κωδικοποιούνται από τους γανιδιακόςονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς.

Η κύρια λειτουργία των τάξης Ι μορίων ιστοσυμβατότητας είναι η δέσμευση ενδογενών κυρίως πεπτιδικών αντιγόνων και η παρουσίασή τους στα CD8 + κύτταρα ή αλλιώς Τ-κυτταροτοξικά (Tc). Ενεργοποιείται έτσι η κυτταρική ανοσία που έχει ως τελικό σκοπό τη θανάτωση των κυττάρων που φέρουν τα συγκεκριμένα αντιγόνα.

1.1.2 Τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά, Β κύτταρα). Αποτελούνται από δύο αλυσίδες: μία βαριά αλυσίδα α με μοριακό βάρος 30-33 kDa και μία ελαφριά αλυσίδα β με μοριακό βάρος 27-29 kDa. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από δύο επικράτειες (α1,α2 και β1,β2) και έχει ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η α1 και η β1 αποτελούν τη μεταβλητή επικράτεια ενώ η α2 και η β2 τη σταθερή. Τα κλασσικά τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους H-2 I-A,I-E στο ποντίκι και από τους γονιδιακούς τόπους H-2 I-A,I-E στο ποντίκι από τους γονιδιακούς τόπους Η-2 I-A,I-E στο ποντίκι από τους γονιδιακούς τόπους H-2 I-A,I-E στο ποντίκι από τους β αλυσίδα.

Η κύρια λειτουργία των τάξης ΙΙ μορίων ιστοσυμβατότητας είναι η δέσμευση εξωγενών κυρίως αντιγόνων και η παρουσίασή τους στα CD4 + κύτταρα ή αλλιώς Τ-βοηθούς (Th). Ενεργοποιείται έτσι η χυμική ανοσία με σκοπό την παραγωγή ειδικού αντισώματος για το συγκεκριμένο αντιγόνο.

1.1.3 Εκκρινόμενα τάξης Ι και τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας

Ενώ τα τάξης Ι και τάξης ΙΙ μόρια που προαναφέρθηκαν εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, πλέον μπορούμε να μιλάμε και για τα διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας που ανιχνεύονται στον ορό, στα σωματικά υγρά (σάλιο, δάκρυα, ιδρώτας) καθώς και στα υπερκείμενα πολλών καλλιεργειών.

Πριν ακόμη γίνει γνωστή η ύπαρξη των μορίων αυτών, το 1967 ο Calne και οι συνεργάτες του κάνοντας πειράματα μεταμόσχευσης ήπατος σε χοίρους παρατήρησαν ότι ένα ζώο επέζησε για πολλούς μήνες χωρίς θεραπεία ανοσοκαταστολής (Calne, 1967). Θεωρήθηκε έτσι πως διαλυτοί παράγοντες εκκρίνονταν από το αλλομόσχευμα ήπατος οι οποίοι ήταν υπεύθυνοι για την ανάπτυξη της ανοχής. Αργότερα επιβεβαιώθηκε πως οι παράγοντες αυτοί ήταν διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας (van Rood et al., 1970).

Τα διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας μπορούν να παραχθούν με εναλλακτικό μάτισμα, με μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς που αποκόπτουν το διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα του μορίου, με πρωτεολυτική κοπή των μεμβρανικών MHC-I μορίων καθώς και με έκκριση ολόκληρων MHC μορίων είτε μέσω εξωσωμάτων είτε σε ελεύθερη μορφή.

Τέλος έχει αποδειχθεί πως τα διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας έχουν ποικίλες ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις όπως η επαγωγή της απόπτωσης των CD4+ κυττάρων (Nag et al., 1996), η ενεργοποίηση των CD8+ κυττάρων (Ge et al., 2002) και η αρνητική ρύθμιση της ενεργότητας των φυσικών φονιάδων (Webb et al. 1994).

1.2 Αντιγονοπαρουσίαση μέσω Τάξης ΙΙ μορίων ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια MHC τάξης ΙΙ δεσμεύουν πεπτίδια που προέρχονται από εξωγενή κυρίως αντιγόνα, τα οποία εισέρχονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα και ανώριμα δενδριτικά) μέσω φαγοκύττωσης, (μάκρο)πινοκύττωσης ή ενδοκύττωσης μέσω υποδοχέα (Sallusto et al., 1995). Στη συνέχεια υφίστανται επεξεργασία μέσω της ενδοκυτταρικής οδού.

1.2.1 Το ενδοσωμικό μονοπάτι

Από τη στιγμή που προσλαμβάνεται ένα αντιγόνο αποικοδομείται σε πεπτίδια μέσα στα διαμερίσματα της ενδοκυτταρικής οδού. Τα προσληφθέντα αντιγόνα αφού διασχίσουν το ενδοσωμικό μονοπάτι εμφανίζονται στην κυτταρική επιφάνεια με τη μορφή συμπλεγμάτων πεπτιδίου-τάξης ΙΙ μορίου. Η ενδοκυτταρική οδός περιλαμβάνει τρία διαμερίσματα αυξανόμενης οξύτητας: τα πρώιμα ενδοσώματα, τα όψιμα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα.

Αρχικά το αντιγόνο προσλαμβάνεται από τα πρώιμα ενδοσώματα που είναι τα λιγότερο όξινα (pH:6,0-6,5). Το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι μπορούν να ανακυκλώνουν πρωτεΐνες δηλαδή να τις στέλνουν πίσω στην κυτταρική μεμβράνη. Ένα παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης είναι ο υποδοχέας της τρανσφερίνης (TfR) ο οποίος μπορεί να μετακινείται προς την κυτταρική μεμβράνη μέσω σωληνίσκων που προέρχονται από τα πρώιμα ενδοσώματα (Geuze et al.,1984).

Στη συνέχεια το αντιγόνο μεταφέρεται στα όψιμα ενδοσώματα (pH:5,0-6,0) τα οποία χαρακτηρίζονται ως πολυκυστιδιακά λόγω του μεγάλου αριθμού των κυστιδίων τους που έχουν προκύψει από αυτοφαγία. Περιέχουν όξινες υδρολάσες καθώς και λυσοσωμικές μεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά το βασικό συστατικό τους είναι οι υποδοχείς 6-φωσφορικής μαννόζης (MPR) που μεταφέρουν τα λυσοσωμικά ένζυμα από τα λυσοσώματα στα ώριμα ενδοσώματα.

Τέλος το αντιγόνο μεταφέρεται στα λυσοσώματα που αποτελούν τα πιο όξινα διαμερίσματα (pH:4,5-5,0). Ο διαχωρισμός τους από τα ώριμα ενδοσώματα στηρίζεται στο ότι τα λυσοσώματα δε διαθέτουν MPR και στο γεγονός πως είναι η πηγή των λυσοσωμικών ενζύμων που μεταφέρονται στα ώριμα ενδοσώματα. Τέτοια ένζυμα είναι κυρίως οι LAMPs (lysosomeassociated membrane proteins) οι οποίες μεταφέρονται στα ώριμα ενδοσώματα μέσω των MPR.

Μέσω του ενδοσωμικού αυτού μονοπατιού το αντιγόνο αποικοδομείται επομένως σε πεπτίδια τα οποία μπορούν να φορτωθούν σε τάξης ΙΙ μόρια.



Εικόνα 1.2.1.1 Το ενδοσωμικό μονοπάτι

1.2.2 Διαδικασία φόρτωσης αντιγονικού πεπτιδίου σε τάξης ΙΙ μόρια

Η φόρτωση του αντιγονικού πεπτιδίου στα τάξης ΙΙ μόρια λαμβάνει χώρα στο ενδοσωμικό μονοπάτι και συγκεκριμένα σε διαμερίσματα που ονομάζονται MIICs (MHC class II compartments) (Neefjes et al, 1990).

Αρχικά τα τάξης ΙΙ μόρια συναρμολογούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ως ετεροδιμερή και διαμορφώνουν μια θέση πρόσδεσης πεπτιδίου (Brown et al., 1993). Η αποτελεσματική τους έξοδος από το ενδοπλασματικό δίκτυο εξασφαλίζεται από τη μη μεταβλητή αλυσίδα li (Bikoff et al., 1993) καθώς αυτή περιέχει ένα κυτταροπλασματικό μοτίβο διλευκίνης που κατευθύνει τα τάξης ΙΙ μόρια ως εννιαμερή στο ενδοσωμικό μονοπάτι. Η li περιλαμβάνει μία περιοχή CLIP η οποία καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης πεπτιδίου εμποδίζοντας έτσι την πρόωρη φόρτωση του πεπτιδίου στο τάξης II μόριο (Roche & Cresswell, 1990).

Στη συνέχεια, τα τάξης ΙΙ μόρια μεταφέρονται στα MIICs τα οποία μπορούν να οριστούν ως όψιμα ενδοσώματα καθώς περιέχουν όξινο pH, λυσοσωμικά ένζυμα και πρωτεάσες και γενικά διαθέτουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αποτελεσματική φόρτωση του αντιγονικού πεπτιδίου. Συγκεκριμένα, η li αποικοδομείται από ποικίλες ενδοσωμικές πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων των καθεψινών S και L με αποτέλεσμα να παραμένει μόνο το CLIP. Τα αντιγονικά πεπτίδια με τη σειρά τους έχουν μεταφερθεί και αυτά στα MIICs μέσω του ενδοσωμικού μονοπατιού. Η αντικατάσταση του CLIP από αντιγονικό πεπτίδιο απαιτεί χαμηλό pH, την αποικοδόμηση του ίδιου του CLIP και τη δράση του HLA-DM τάξης II μορίου που στη συγκεκριμένη περίπτωση έχει δράση τσαπερόνης (Mosyak et al., 1998). Τέλος, το σύμπλοκο τάξης ΙΙ μόριο-αντιγονικό πεπτίδιο μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη για να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης στα Τ λεμφοκύτταρα με σκοπό την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης.



Εικόνα 1.2.2.1 Η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης από MHC-II μόρια

1.3 Η ανοσολογία της κύησης

Η εγκυμοσύνη είναι το μόνο φυσικό παράδειγμα ανοσολογικής αντίδρασης που εμφανίζεται για καθορισμένη χρονική περίοδο στον οργανισμό και καταπολεμά τους κανόνες για την απόρριψη μοσχεύματος. Το έμβρυο φέρει τόσο μητρικά όσο και πατρικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας αποτελώντας έτσι ένα ημι-αλλομόσχευμα. Καθώς λοιπόν φέρει διαφορετικά τάξης Ι και τάξης ΙΙ μόρια από τη μητέρα θα έπρεπε φυσιολογικά να υπάρχει απόρριψη μοσχεύματος. Παρόλα αυτά, τα εμβρυικά «συστατικά» που αναπτύσσονται στη μήτρα όχι μόνο ξεφεύγουν από την ανοσολογική επίθεση της μητέρας αλλά υποστηρίζονται από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα.

1.3.1 Ο σχηματισμός του πλακούντα

Ο πλακούντας αποτελεί το θρεπτικό, μηχανικό και ανοσολογικό φίλτρο που όχι μόνο παρέχει στο έμβρυο όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξή του αλλά επιπλέον το προστατεύει από την ανοσολογική επίθεση της μητέρας. Η προστατευτική ικανότητα του πλακούντα περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς, οι σημαντικότεροι των οποίων είναι: η ανικανότητα των τροφοβλαστών να σκοτωθούν in vitro από αλλογενετικά Τ κυτταροτοξικά κύτταρα (Zuckermann & Head, 1987), από φυσικούς φονιάδες (Kolb et al., 1984) ή μέσω της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας (Zuckermann & Head, 1988).

Στο ποντίκι ο πλακούντας αρχίζει να σχηματίζεται κατά την 7^η μέρα της κύησης και ολοκληρώνεται την 10^η δεδομένου ότι η κύηση διαρκεί 20-21 μέρες. Αρχικά, μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης, κάποια κύτταρα του τροφοεξωδέρματος μεταναστεύουν γύρω από το έμβρυο αντικαθιστώντας τους υπάρχοντες γιγάντιους τροφοβλάστες. Πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν μία προεξοχή τροφοεξωδέρματος που διαπερνά το βλαστόκοιλο και σχηματίζει τον εξωπλακουντιακό κώνο. Τα κύτταρα του εξωπλακουντιακού κώνου θα ωριμάσουν και θα σχηματίσουν τον πλακούντα, έναν ιστό που αποτελείται από δύο κύριους κυτταρικούς πληθυσμούς: τους σπογγιοτροφοβλάστες και τους τροφοβλάστες του λαβυρίνθου που οργανώνονται σε μία εξωτερική και μία εσωτερική κυτταρική στιβάδα αντίστοιχα. Οι σπογγιοτροφοβλάστες βρίσκονται σε επαφή με τη μητρική κυκλοφορία και αποτελούνται από κύτταρα τόσο μητρικής όσο και εμβρυικής προέλευσης. Αντίθετα, ο λαβύρινθος δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον μητρικό οργανισμό και αποτελείται αποκλειστικά από κύτταρα εμβρυικής προέλευσης. Οι δύο αυτές στιβάδες περιβάλλονται από τον φθαρτό (Decidua) που αποτελείται μόνο από κύτταρα μητρικής προέλευσης.

Στον άνθρωπο η διαδικασία σχηματισμού του πλακούντα είναι παρόμια με αυτή του ποντικού. Η διαφορά βρίσκεται στο ότι ο πλακούντας δεν είναι μία ενιαία στιβάδα όπως στο ποντίκι αλλά αποτελείται από λάχνες. Σε κάθε μία εντοπίζεται μία εξωτερική στιβάδα κυττάρων, OI συγκυτιοτροφοβλάστες και μία εσωτερική, οι κυτοτροφοβλάστες. Or συγκυτιοτροφοβλάστες φαίνεται να είναι οι αντίστοιχοι σπογγιοτροφοβλάστες του ποντικού και οι κυτοτροφοβλάστες ο αντίστοιχος λαβύρινθος. Οι στιβάδες αυτές περιβάλλονται και πάλι από τον φθαρτό όπως και στο ποντίκι.



Εικόνα 1.3.1 Η δομή του πλακούντα στο ποντίκι και στον άνθρωπο

1.3.2 Η έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στα κύτταρα του πλακούντα

Μη κλασσικά τάξης Ι αντιγόνα έχουν βρεθεί να εκφράζονται φυσιολογικά στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα στον άνθρωπο, στον αρουραίο και στον ποντικό (Philott et al., 1988; Kanbour-Shakir et al., 1990; Kovats et al., 1990). Αντίθετα, δεν έχουν εντοπιστεί ακόμη τάξης ΙΙ αντιγόνα ούτε στην εσωτερική αλλά ούτε και στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα με εξαίρεση κάποια αραιά κατανεμημένα μακροφάγα (Chatterjee Hasrouni & Lala 1981; Raghupathy et al., 1981; Athanassakis-Vassiliadis et al., 1989). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκφραση των τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας είναι απαραίτητη για την αντιγονοπαρουσίαση και κατ' επέκταση για την έναρξη χυμικής ή κυτταρικής ανοσολογικής αντίδρασης. Θεωρείται έτσι πως η έκφραση τάξης ΙΙ μορίων στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα οδηγεί στην αντιγονοπαρουσίαση των εμβρυικών αντιγόνων(που είναι ξένα για τη μητέρα ακόμη και σε συγγενετικές σειρές) και κατά συνέπεια στην έναρξη ανοσολογικής αντίδρασης κατά του εμβρύου που έχει ως αποτέλεσμα την απόρριψή του. Σε σειρές που δεν είναι συγγενετικές, όπως συμβαίνει στον άνθρωπο, τα εμβρυικά τάξης ΙΙ μορίων από τον πλακούντα μπορεί να είναι άλλος ένας μηχανισμός προστασίας του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας και έτσι η έκφρασή τους να είναι η αιτία ορισμένων αποβολών.

Παρόλα αυτά, η έκφραση των τάξης Ι και τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στους σπογγιοτροφοβλάστες μπορεί να επαχθεί de novo έπειτα από χορήγηση ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) γεγονός που έχει σχετιστεί με την αποβολή του εμβρύου (Athanassakis-Vassiliadis et al, 1989 ; Vassiliadis et al., 1994). Πρόκειται για μία ιντερλευκίνη που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας στα γονίδια των μορίων ιστοσυμβατότητας επάγοντας έτσι την έκφρασή τους (Bhat et al., 2010 ; Koues et al., 2009). Από προηγούμενα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο βρέθηκε ότι η χορήγηση IFN-γ σε έγκυα συγγενετικά ποντίκια balb/c είχε αρνητική επίδραση τόσο στην ανάπτυξη του εμβρύου όσο και στον οργανισμό της μητέρας. Συγκεκριμένα αύξησε κατά τρεις φορές το ποσοστό των αποβολών σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια (χωρίς IFN-γ), μείωσε το βάρος των εμβρύων και των πλακούντων και προκάλεσε καθυστερημένη ανάπτυξη των ματιών των εμβρύων (Vassiliadis et al., 1994). Αντίστοιχα, στη μητέρα προκλήθηκε σπληνομεγαλία, πτώση του αιματοκρίτη, αύξηση της IgG αιμοσφαιρίνης, θρομβοκυττοπενία και vευροπενία (Vassiliadis et al., 1994).

Η IFN-γ φαίνεται να έχει παρόμοια επίπτωση και στον άνθρωπο όσον αφορά την επαγωγή της έκφρασης των τάξης Ι και τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στους συγκυτιοτροφοβλάστες. Επικρατεί και πάλι η υπόθεση πως η έκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση του εμβρύου ως αλλομόσχευμα από τη μητέρα καθώς έχει διαφορετικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας από εκείνη. Έτσι το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας επιτίθεται στο έμβρυο και πιθανόν να οδηγηθούμε σε αποβολή. Επιπλέον, σε ορό γυναικών που απέβαλαν στο 1° τρίμηνο της κύησης έχει βρεθεί αυξημένο ποσοστό IFN-γ σε σχέση με γυναίκες με ομαλή κύηση (Vassiliadis et al., 1998). Είναι επομένως φανερό πως η IFN-γ ευθύνεται για μεγάλο μέρος των καθ' έξιν αποβολών (αποβολές στο 1° τρίμηνο της κύησης) στον άνθρωπο καθώς και σε αποβολές στο ποντίκι και μία πιθανή εξήγηση είναι το γεγονός ότι επάγει την έκφραση τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα όπου φυσιολογικά δεν εκφράζονται.

Παρόλα αυτά έχει αποδειχθεί πως οι τροφοβλάστες μπορούν και εκφράζουν εσωτερικά τάξης ΙΙ μόρια χωρίς όμως να τα εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Έπειτα όμως από διέγερση με IFN-γ για μικρό χρονικό διάστημα τα τροφοβλαστικά κύτταρα μπορούν και εκκρίνουν HLA-DR μόρια στο μέσο της καλλιέργειας (Athanassakis et al., 2000; Ranella et al., 2005). Αυτό συμβαίνει γιατί σε μικρό χρονικό διάστημα η IFN-γ δεν προλαβαίνει να επάγει τη de novo σύνθεση τάξης ΙΙ μορίων οπότε προκαλεί την έκκριση των ήδη υπαρχόντων. Συγκεκριμένα τα ενδοκυττάρια αυτά τάξης ΙΙ μόρια εντοπίζονται στα διαμερίσματα του ενδοσωμικού μονοπατιού και με την επίδραση της IFN-γ απελευθερώνονται από το κύτταρο (Athanassakis et al., 2000; Athanassakis, 2001)

1.3.3 Ο ρόλος των διαλυτών ΜΗC μορίων στην εγκυμοσύνη

Και τα διαλυτά τάξης Ι αλλά και τα τάξης ΙΙ μόρια συμμετέχουν στην ανοσολογική ρύθμιση της εγκυμοσύνης ρυθμίζοντας όμως αντίθετα μονοπάτια. Συγκεκριμένα τα διαλυτά τάξης Ι μόρια σχετίζονται με τη μητρική ανοσοκαταστολή ενώ τα τάξης ΙΙ με τη μητρική ανοσοδιέγερση. Έτσι κατά το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τα διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια έχουν αυξημένη συγκέντρωση ώστε να υπάρχει η αντίστοιχη διέγερση της μητέρας προς το έμβρυο, να παράγει δηλαδή όλα τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και την ανάπτυξή του. Στο τρίτο όμως τρίμηνο της εγκυμοσύνης η συγκέντρωσή τους παραμένει σταθερή. Αντίθετα η συγκέντρωση των τάξης Ι μορίων είναι χαμηλή κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης αφού απαιτείται ανοσοδιέγερση, αλλά αυξάνεται στα δύο επόμενα έτσι ώστε η ανοσοκαταστολή να εξουδετερώσει τη διέγερση η οποία μπορεί να είναι επικίνδυνη για το έμβρυο και να οδηγήσει σε αποβολή. Επομένως σε κάθε στάδιο της εγκυμοσύνης ακολουθείται ένα διαφορετικό προφίλ παραγωγής των διαλυτών MHC μορίων το οποίο κυμαίνεται σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών. Σε περίπτωση που οι συγκεντρώσεις των ΜΗC μορίων στον ορό ξεπεράσουν αυτό το εύρος τιμών το αποτέλεσμα θα είναι η πρόωρη αποβολή του εμβρύου είτε οι συγκεντρώσεις αυτές είναι μικρότερες είτε είναι μεγαλύτερες του φυσιολογικού (Vassiliadis et al., 2001).

1.3.4 Κυτοκίνες και εγκυμοσύνη

Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Δεσμεύονται σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς σε κύτταρα-στόχους και ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω διέγερσης ή αναστολής του πολλαπλασιασμού ή/και της διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων καθώς και μέσω του ελέγχου έκκρισης αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών. Η σύνδεση μίας συγκεκριμένης κυτοκίνης στα κατάλληλα κύτταρα προκαλεί αύξηση της έκφρασης υποδοχέων κυτοκινών καθώς και έκκριση άλλων κυτοκινών που με τη σειρά τους επηρεάζουν άλλα κύτταρα-στόχους.

Όπως τα περισσότερα βιολογικά φαινόμενα, έτσι και η εγκυμοσύνη περιλαμβάνει τη δράση κυτοκινών οι οποίες έχουν μικρή διάρκεια ζωής και πιστεύεται ότι δρουν μόνο κοντά στη θέση παραγωγής τους. Κατά τη διάρκεια της κυοφορίας το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα δέχεται ερεθίσματα από τα πατρικά αλλοαντιγόνα που εισέρχονται στον μητρικό οργανισμό μέσω του ημι-αλλογενετικού εμβρύου. Στο ποντίκι τα αλλοαντιγόνα αυτά εκφράζονται στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα η οποία έρχεται σε άμεση επαφή με τη μητρική κυκλοφορία (McLaren, 1975; Raghupathy et al., 1981). Έτσι από τη στιγμή της γονιμοποίησης, μία πληθώρα κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων παράγονται στη μήτρα και δρουν αρμονικά για να εξασφαλίσουν την ανάπτυξη του εμβρύου (Hill, 1991; Lea et al., 1992; Lin et al., 1993; Delassus et al., 1994). Τέτοιες αλλαγές δεν συμβαίνουν μόνο στη μήτρα αλλά και σε άλλα σημεία του οργανισμού προκειμένου να διασφαλιστεί η επιβίωση και η ανάπτυξη του εμβρύου. Συγκεκριμένα, το προφίλ των κυτοκινών στον μητρικό ορό σχετίζεται με αυτό της μητρικής σπλήνας καθώς και με την τοπική παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα κύτταρα του φθαρτού (Athanassakis- Vassiliadis, 1993).

Οι κυτοκίνες, ανάλογα με τον τύπο κυττάρων από τον οποίο παράγονται μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: σε αυτές που παράγονται από Τ-βοηθούς τύπου 1 (Th1 κυτοκίνες) και σε αυτές που παράγονται από Τ-βοηθούς τύπου 2 (Th2 κυτοκίνες). Όπως συμβαίνει σχεδόν σε κάθε ανοσολογική απόκριση, έτσι και η εγκυμοσύνη ρυθμίζεται από τη λεγόμενη Th1/Th2 ισορροπία. Στις Th1 κυτοκίνες που σχετίζονται άμεσα με την εγκυμοσύνη ανήκουν ενδεικτικά οι : IL-2, IFN-γ, TNF-α οι οποίες παράγουν φλεγμονώδεις παράγοντες και στις Th2 κυτοκίνες ανήκουν οι : IL-3, IL-4, IL-10, GM-CSF που παράγουν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η

εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται ως ένα Th2-εξαρτώμενο φαινόμενο καθώς η επιτυχής έκβασή της σχετίζεται με παραγωγή Th2 κυτοκινών ενώ η εμβρυική απόρριψη με παραγωγή Th1 κυτοκινών (Wegmann et al., 1993). Παρόλο όμως που οι Th1 κυτοκίνες είναι βλαβερές στο μέσο της εγκυμοσύνης είναι χρήσιμες στα αρχικά της στάδια (Saito et al., 1999). Έτσι η ισορροπία τείνει είτε προς τις Th1 είτε προς τις Th2 κυτοκίνες ανάλογα με το στάδιο της εγκυμοσύνης (Athanassakis & Vassiliadis, 2002)

Κάθε κυτοκίνη έχει διαφορετικό ρόλο στην επιβίωση και στην ανάπτυξη του εμβρύου και ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης κάθε μέρα της εγκυμοσύνης στο ποντίκι (Athanassakis & Iconomidou, 1996):

Η **ιντερλευκίνη 2 (IL-2)** παράγεται πάντα σε χαμηλά επίπεδα που δεν διαφέρουν από αυτά των μη εγκύων ποντικών. Ενεργοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα αλλά ο ρόλος της κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν είναι ακόμα γνωστός.

Η **ιντερλευκίνη 3 (ΙL-3)** διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστών επηρεάζοντας άμεσα την ανάπτυξη του εμβρύου. Εμφανίζεται κατά τη 2^η,3^η μέρα της εγκυμοσύνης του ποντικού και παρουσιάζει μέγιστη έκφραση κατά τη 10^η μέρα.

Η **ιντερλευκίνη 4 (IL-4)** βοηθάει στην παραγωγή αντι-πατρικών αντισωμάτων από τη μητέρα ως αποτέλεσμα των ερεθισμάτων που εκείνη δέχεται από τα εμβρυικά αλλοαντιγόνα. Ο οργανισμός της μητέρας αρχίζει δηλαδή να αντιδρά και συμβαίνουν όλες οι απαραίτητες αλλαγές που προαναφέρθηκαν για την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. Ενισχύεται δηλαδή η χυμική ανοσία της μητέρας προς το έμβρυο παρόλο που η εγκυμοσύνη σχετίζεται κυρίως με την κυτταρική ανοσία. Η IL-4 αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με μέγιστη έκφραση κατά την 10^η και 12^η μέρα.

Η **ιντερλευκίνη 10 (ΙL-10)** καταστέλλει την ανοσολογική απόκριση της μητέρας μειώνοντας τη μεμβρανική έκφραση των τάξης ΙΙ μορίων. Επομένως έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στο έμβρυο αποτρέποντας μία πιθανή αποβολή (Chaouat et al., 1995). Η έκφρασή της γίνεται μέγιστη κατά την 7^η μέρα της κύησης.

Ο **GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)** έχει επικαλυπτόμενο ρόλο με την IL-3 διεγείρει δηλαδή τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστών. Η συγκέντρωσή του στη μήτρα είναι μειωμένη μέχρι την 5^η μέρα της κύησης αλλά κατά την 8^η μέρα επανεμφανίζεται στον ορό με μέγιστη έκφραση την 9^η μέρα της εγκυμοσύνης.

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF-α) παράγεται σε μικρές συγκεντρώσεις και παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της ωορρηξίας επάγοντας την παραγωγή προσταγλανδινών και οζιδίου του αζώτου που

απαιτούνται για τη ρήξη του ωοθυλακίου (Machelon & Emili, 1997). Παρόλα αυτά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να είναι εμβρυοτοξικός και να σταματήσει την ανάπτυξη του εμβρύου στο στάδιο των δύο κυττάρων (Athanassakis et al., 2000). Εντοπίζεται στον μητρικό ορό μετά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης με μέγιστη έκφραση τη 12^η μέρα.

Η **ιντερφερόνη γ (IFN-γ)** όπως έχει ήδη αναφερθεί επάγει την έκφραση των τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στην εξωτερική στιβάδα του πλακούντα έχοντας αρνητική επίδραση τόσο στον οργανισμό της μητέρας όσο και στο έμβρυο (Vassiliadis et al., 1994).Παρόλα αυτά η IFN-γ έχει πολύ σημαντικό ρόλο κυρίως μεταξύ της 6^{ης} και της 10^{ης} μέρας της κύησης στο ποντίκι με μέγιστη έκφραση την 7^η και την 9^η μέρα. Συγκεκριμένα διεγείρει τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστών του εξωπλακουντιακού κώνου με σκοπό το σχηματισμό του ώριμου πλακούντα (Athanassakis et al., 2000). Μετά την 9^η ημέρα τα επίπεδα έκφρασής της επανέρχονται στα φυσιολογικά καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα υπάρξουν τα προαναφερθέντα προβλήματα. Επιπλέον επάγει την παραγωγή οζιδίου του αζώτου όπως και ο TNF-α οδηγώντας στη ρήξη του ωοθυλακίου (Machelon & Emili, 1997).

1.4 Αναστολείς του ενδοσωμικού μονοπατιού

Οι ενδοσωμικοί αναστολείς είναι ουσίες οι οποίες μπλοκάρουν το ενδοσωμικό μονοπάτι αποτρέποντας έτσι τόσο την επεξεργασία του αντιγόνου όσο και τη μεταφορά των τάξης ΙΙ μορίων ιστοσυμβατότητας στην κυτταρική μεμβράνη αφού όπως προαναφέρθηκε και οι δύο κατηγορίες αυτές πρωτεϊνών δέχονται επεξεργασία στα ενδοσωμικά διαμερίσματα. Ανάμεσα στους αναστολείς αυτούς είναι η Pepstatin A.

1.4.1 Pepstatin A

Η Pepstatin A (PEP-A) είναι ένα πενταμερές πεπτίδιο που απομονώνεται από τον ακτινομύκητα (Umezawa et al., 1970) και είναι ένας φυσικός αναστολέας ασπαρτικών πρωτεασών όπως είναι ρενίνη, η πεψίνη καθώς και οι καθεψίνες D και E (Rich et al., 1985). Επιπλέον η PEP-A αναστέλλει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV εμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό του ιού (Von der Helm et al., 1989). Από τις παραπάνω πρωτεάσες οι καθεψίνες D και E φαίνεται πως έχουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του αντιγόνου και των τάξης II μορίων στον ενδοσωμικό μονοπάτι. Συγκεκριμένα, η καθεψίνη D είναι μία λυσοσωμική πρωτεΐνη (Barrett, 1979) που εντοπίζεται στα όψιμα ενδοσώματα, στα λυσοσώματα και στα MIICs κυστίδια. Αντίθετα η καθεψίνη E είναι μη λυσοσωμική (Bennett et al., 1992) και εντοπίζεται στα πολύ πρώιμα ενδοσώματα καθώς χρειάζεται σχεδόν ουδέτερο pH για να έχει πλήρη ενεργότητα (Thomas et al.,1989). Και οι δύο καθεψίνες παίζουν ρόλο στην έναρξη της αποικοδόμησης της μη μεταβλητής αλυσίδας των τάξης II μορίων (Maja et al.,1994; Zhang et al.,2000) αν και η πλήρης αποικοδόμησή της μεσολαβείται από τις κυστεϊνικές καθεψίνες S και L. Επιπλέον, όλες οι καθεψίνες συμμετέχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης του εξωγενούς αντιγόνου σε πεπτίδια που θα φορτωθούν στα τάξης II μόρια (Blum & Cresswell,1988; Mizuochi et al., 1994).

Επομένως χωρίς τις καθεψίνες D και E τα τάξης II μόρια δεν μπορούν να απαλλαγούν από τη μη μεταβλητή αλυσίδα και τα εξωγενή αντιγόνα δεν αποικοδομούνται πλήρως. Άρα η PEP-A αναστέλλοντας τη δράση των πρωτεασών αυτών μπλοκάρει το ενδοσωμικό μονοπάτι και δεν επιτρέπει στα τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας να βγουν στην κυτταρική μεμβράνη και να ξεκινήσουν την ανοσολογική απόκριση.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Η απουσία των εμβρυικών τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας από τον πλακούντα θεωρείται πως είναι άλλος ένας μηχανισμός προστασίας του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Παρόλα αυτά οι τροφοβλάστες μπορούν και εκφράζουν εσωτερικά τάξης ΙΙ μόρια χωρίς όμως να τα εκθέτουν στην επιφάνειά τους (Ranella et al., 2005). Συγκεκριμένα τα ενδοκυττάρια αυτά τάξης ΙΙ μόρια εντοπίζονται στα διαμερίσματα του ενδοσωμικού μονοπατιού και με την επίδραση της IFN-γ απελευθερώνονται από το κύτταρο (Athanassakis et al., 2000 ; Athanassakis,2001). Η έκκριση των μορίων αυτών ή η μεμβρανική τους έκφραση στους τροφοβλάστες θεωρείται πως δίνει το έναυσμα για μια μητρική ανοσολογική αντίδραση εναντίον του εμβρύου οδηγώντας έτσι σε αποβολή.

Καθώς τα ενδοκυττάρια αυτά τάξης ΙΙ μόρια πριν απελευθερωθούν βρίσκονται στα ενδοσώματα, με τη χρήση ενός ενδοσωμικού αναστολέα θα μπορούσαμε να τα εγκλωβίσουμε εντός του κυττάρου και έτσι αυτά να μην μπορούν ούτε να εκκριθούν ούτε να μεταφερθούν στην κυτταρική μεμβράνη. Επομένως η επαγόμενη από IFN-γ έκκριση ή μεμβρανική έκφρασή τους θα μπορούσε να αποφευχθεί προστατεύοντας έτσι το έμβρυο από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο τόσο in vitro όσο και σε συγγενετικά ποντίκια balb/c βρέθηκε ότι η PEP-A μπορεί και μπλοκάρει τη μεμβρανική έκφραση των τάξης ΙΙ μορίων στα κύτταρα του πλακούντα. Επομένως στόχος είναι να δούμε αν μπορεί να έχει την ίδια δράση στην περίπτωση που χορηγήσουμε και IFN-γ στο ποντίκι. Παρόλα αυτά, για την PEP-A δεν είχαμε ξεκάθαρη εικόνα σχετικά με την επίδρασή της στο μητρικό οργανισμό και γενικότερα στην έκβαση της εγκυμοσύνης επομένως χορηγώντας την σε έγκυα και μη ποντίκια θέλουμε να δούμε αρχικά την επίδρασή της απουσία IFN-γ πριν προχωρήσουμε στην ταυτόχρονη χορήγηση των δύο ουσιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χειρισμός πειραματόζωων

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συγγενετικά έγκυα και μη, θηλυκά ποντίκια balb/c από το ζωοτροφείο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα ποντίκια αυτά εκτρέφονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (18-25°C), υγρασία (-50%) και φωτοπερίοδο με 12 ώρες φως (από 6.30 π.μ. έως 18.30 μ.μ.) και 12 ώρες σκοτάδι. Αρχικά τα θηλυκά ποντίκια τοποθετούνταν σε κλουβί με αρσενικά και την επόμενη μέρα γινόταν έλεγχος για την ύπαρξη του κολπικού βύσματος (plug). Η μέρα αυτή ορίζεται ως η μηδενική μέρα της εγκυμοσύνης.

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιούσαμε 4 ποντίκια: 1 έγκυο και 1 control με PEP-A και 1 έγκυο και 1 control χωρίς PEP-A. Κατά την 9^η, 10^η και 11^η μέρα της εγκυμοσύνης χορηγούσαμε ενδοπεριτονιακά 100 μl PEP-A (συγκέντρωση 300 μg/ml σε PBS 1x) σε ένα έγκυο και σε ένα control θηλυκό ποντίκι. Οι ενέσεις γίνονταν τις μέρες αυτές καθώς την 9^η μέρα αρχίζει να αναπτύσσεται το ανοσοποιητικό σύστημα του εμβρύου. Τα 4 ζώα θανατώνονταν τη 12^η μέρα, όπου πλέον έχει αναπτυχθεί ο πλακούντας, και συλλεγόταν ο ορός καθώς και η σπλήνα τους. Τα δείγματα αυτά αργότερα εξετάζονταν για την ύπαρξη των IL-2,I L-4, IL-10 και GM-CSF κυτοκινών καθώς και τάξης ΙΙ μορίων. Επιπλέον στα έγκυα ποντίκια γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των εμβρύων και των αποβολών οι οποίες διαφέρουν από τα φυσιολογικά έμβρυα καθώς έχουν αρκετά μικρότερο μέγεθος και πολύ σκούρο κόκκινο χρώμα. Τέλος, από τα 2 έγκυα ποντίκια συλλέγονταν τα έμβρυα μαζί με τους πλακούντες τα οποία

2.1.1 Απομόνωση σπλενοκυττάρων

<u>Υλικά</u>

- Ψαλίδια
- Λαβίδες
- Μικρά τρυβλία petri
- Βελόνα από σύριγγα
- Πιπέτες pasteur
- HBSS θρεπτικό
- 15 ml tube

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

Αρχικά κάνουμε μία τομή στο δέρμα του ποντικιού με το ψαλίδι και με τη λαβίδα τραβάμε το δέρμα για να φανεί το περιτόναιο. Στη συνέχεια κόβουμε το περιτόναιο με το άλλο ψαλίδι και χρησιμοποιώντας τη δεύτερη λαβίδα απομακρύνουμε τη σπλήνα. Τοποθετούμε έπειτα τη σπλήνα σε ένα τρυβλίο petri μαζί με θρεπτικό HBSS και κρατώντας τη με τη λαβίδα ανοίγουμε ταυτόχρονα οπές με τη βελόνα. Μετακινώντας τη βελόνα στην επιφάνεια της σπλήνας, τα κύτταρα απομακρύνονται από τις οπές. Συλλέγουμε τότε τα κύτταρα σε 15 ml tube ενώ κάνουμε λίγα ακόμα πλυσίματα με HBSS στο τρυβλίο για να συλλέξουμε όσο το δυνατόν περισσότερα κύτταρα. Τέλος περιμένουμε να καθιζάνουν τυχόν μεμβράνες και ιστοί στο tube και μεταφέρουμε το υπερκείμενο που περιλαμβάνει τα κύτταρα σε άλλο tube.

2.2 Εσωτερικός ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια κατάλληλων αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά αντίστοιχα δεσμεύονται από ειδικές ανοσοσφαιρίνες που είναι σημασμένες με φθορίζουσες ουσίες όπως φθοριοσκεΐνη (FITC) ή φυκοερυθρίνη (PE). Τα δείγματα στη συνέχεια επεξεργάζονται από τον κυτταρομετρητή ροής (FACScan) και παρατηρούνται στο συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal). Ο ανοσοφθορισμός γίνεται στα σπλενοκύτταρα αμέσως μετά την απομόνωσή τους.

<u>Υλικά</u>

- Tubes 15ml
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Φυγόκεντρος Kubota
- 96 v-bottom plate
- FACScan
- Confocal

<u>Διαλύματα</u>

- PBS 1x
- Lysing RC
- Παραφορμαλδεΰδη (PFA) 4% σε PBS 1x
- Μεθανόλη (Met-OH) 20 % σε PBS 1x
- Blocking buffer: PBS 1x-BSA 3%
- Ab buffer: PBS 1x-BSA 0.1%

<u>Αντισώματα</u>

Πρώτα αντισώματα

- αIL-2 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- αIL-4 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- αIL-10 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- N22 (mouse anti-mouse), αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- αGM-CSF (mouse anti-mouse), αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%

Το N22 δεσμεύει τα τάξης ΙΙ μόρια ιστοσυμβατότητας.

> Δεύτερα αντισώματα

- IgG-FITC (goat anti-rat 200 $\mu g/0.5$ ml, fluorescein conjugated), $\alpha\rho\alpha i\omega\sigma\eta$ 1/300 $\sigma\epsilon$ PBS-BSA 0.1%
- IgG-PE (goat anti-mouse 200 μg/0.5 ml, phycoerythrin conjugated), αραίωση 1/1500 σε PBS-BSA 0.1%
 ή IgG-FITC (goat anti-mouse 200 μg/0.5 ml, fluorescein conjugated), αραίωση 1/750 σε PBS-BSA 0.1%

<u>Πειραματική Διαδικασία</u>

- 1) Φυγοκεντρούμε τα σπλενοκύτταρα στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- 2) Πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2 ml Lysing RC για να σπάσουν τα ερυθροκύτταρα.
- 3) Φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά και επαναδιαλύουμε την πελέτα με 1ml PBS 1x. Το PBS είναι ένα ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των κυττάρων μετά την προσθήκη οποιουδήποτε διαλύματος.
- 4) Κάνουμε άλλο ένα πλύσιμο με PBS 1x.
- 5) Προσθέτουμε 1 ml PFA 4% σε PBS 1x για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα και τα επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- 6) Προσθέτουμε 1ml PBS 1x και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- **7)** Κάνουμε άλλα 2 πλυσίματα με PBS 1x.
- 8) Προσθέτουμε 1 ml Met-OH 20% σε PBS 1x για να γίνει διάτρηση των κυττάρων και να μπορέσουν τα αντισώματα να εισχωρήσουν σε αυτά. Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- 9) Προσθέτουμε 1ml PBS 1x και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- **10)** Κάνουμε άλλα 2 πλυσίματα με PBS 1x.
- 11) Προσθέτουμε 2 ml PBS-BSA 3% για να κάνουμε blocking, να αποφύγουμε δηλαδή τη μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Συγκεκριμένα η BSA καλύπτει όλες τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση μόνο της πρωτεΐνης που θέλουμε. Επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 12) Προσθέτουμε 1ml PBS 1x και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- **13)** Κάνουμε άλλο ένα πλύσιμο με PBS 1x.
- 14) Χωρίζουμε το δείγμα στην plate και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- 15) Βάζουμε το πρώτο αντίσωμα και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 16) Προσθέτουμε 100 μΙ PBS 1x σε κάθε πηγαδάκι και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- **17)** Κάνουμε άλλα 2 πλυσίματα με PBS 1x.
- 18) Βάζουμε το δεύτερο αντίσωμα και επωάζουμε για 45 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

- 19) Προσθέτουμε 100 μΙ PBS 1x σε κάθε πηγαδάκι και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- **20)** Κάνουμε άλλα 2 πλυσίματα με PBS 1x.
- 21) Τοποθετούμε τα δείγματα σε FACS tubes και μετράμε στο FACScan.

2.2.1 Κυτταρομετρία ροής

Στη μέθοδο αυτή μια δέσμη laser χτυπάει κάθε κύτταρο ξεχωριστά δίνοντας στοιχεία τόσο για την ένταση φθορισμού όσο και για την μορφολογία του. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που θα επεξεργαστούν από τον κυτταρομετρητή ροής (FACScan) ρέουν με τη μορφή υγρού σε ειδικό κανάλι όπου υδροδυναμικά η ροή στενεύει σε διάμετρο αναγκάζοντας έτσι τα κύτταρα να διέλθουν ένα-ένα από οπή πριν συναντήσουν τη δέσμη laser. Κάθε κύτταρο δέχεται τότε ακτινοβολία, ένα μέρος της οποίας απορροφάται ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο και ανιχνεύεται υπό διαφορετικές γωνίες από φωτοανιχνευτές. Όταν η ανίχνευση του σκεδαζόμενου φωτός (Forward Light Scatter, FSC) η οποία μας πληροφορεί για την κοκκιότητα του κυττάρου.

Εκτός από τη σκέδαση του φωτός στην κυτταρομετρία ροής μελετάται και αναλύεται ο φθορισμός ο οποίος βασίζεται στις φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες έχουμε σημάνει τα κύτταρα μας (FITC και PE). Οι ουσίες αυτές εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος από αυτή που δέχονται, η οποία ανιχνεύεται από τα κανάλια FL-1 και FL-2. Το FL-1 κανάλι ανιχνεύει ακτινοβολία με μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο πράσινο χρώμα (FITC) ενώ το FL-2 κανάλι ανιχνεύει ακτινοβολία με μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο κόκκινο χρώμα (PE).

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, μέγεθος, κοκκιότητα και φθορισμός στο κόκκινο ή στο πράσινο επεξεργάζονται από υπολογιστή συνδεδεμένο με το FACScan από τον οποίο μπορούμε να πάρουμε τα αποτελέσματα.

2.2.2 Προετοιμασία κυττάρων για παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Μετά την επεξεργασία των κυττάρων από το FACScan, τα δείγματα προετοιμάζονταν για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

<u>Υλικά και διαλύματα</u>

- Eppendorf 1.5 ml
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πιπέτες Gilson 20μl
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Καλυπτρίδες
- Γλυκερόλη 20%

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

- 1) Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε PBS 1x μέσα σε eppendorf.
- 2) Φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά.
- 3) Ανακατεύουμε την πελέτα και τοποθετούμε λίγες σταγόνες από το δείγμα σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- 4) Απλώνουμε το δείγμα με τη χρήση καλυπτρίδας και το αφήνουμε να στεγνώσει για περίπου δέκα λεπτά στο σκοτάδι.
- 5) Βάζουμε πάνω στο δείγμα 15-20 μΙ γλυκερόλη 20% και σκεπάζουμε με την καλυπτρίδα.
- 6) Αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους στο ψυγείο μέχρι να τις παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο.

Κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο ακτινοβολία UV διέρχεται από την αντικειμενοφόρο πλάκα και έτσι τα σημασμένα κύτταρα φθορίζουν. Το μικροσκόπιο είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή όπου μπορούμε να δούμε τον φθορισμό των κυττάρων και να αποθηκεύσουμε τα δεδομένα μας.

2.3 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA)

Η ELISA είναι μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών σε υπερκείμενα καλλιεργειών καθώς και σε κυτταρικά διαλύματα όπως ο ορός με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες αυτές.

<u>Υλικά</u>

- Eppendorf 1.5 ml
- Tubes 15 και 50 ml
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- 96 flat bottom plate
- ELISA reader

<u>Διαλύματα</u>

- Coating buffer
- Washing buffer: PBS 1x-tween 20 0.05%
- Blocking buffer: PBS 1x-BSA 2%
- Ab buffer: PBS 1x-BSA 0.1%
- Υπόστρωμα-χρωμογόνο: TM^B substrate-Peroxidase solution H₂0₂
- H₂SO₄ 1M

<u>Αντισώματα</u>

Πρώτα αντισώματα

- αIL-2 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- αIL-4 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- αIL-10 (rat anti-mouse 0.5 mg/ml), αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- N22 (mouse anti-mouse), αραίωση 1/5000 σε PBS-BSA 0.1%
- αGM-CSF (mouse anti-mouse), αραίωση 1/5000 σε PBS-BSA 0.1%

Δεύτερα αντισώματα

- αlgG-peroxidase anti-rat, αραίωση 1/5000 σε PBS-BSA 0.1%
- algG-peroxidase anti-mouse, apaí ω oŋ 1/5000 oɛ PBS-BSA 0.1%

<u>Πειραματική διαδικασία</u>

- 1) Αραιώνουμε τους ορούς 1/1000 σε coating buffer και τους στρώνουμε στην plate με τελικό όγκο 100 μl σε κάθε πηγάδι. Βάζουμε 3 επαναλήψεις από κάθε ορό και εφόσον έχουμε 5 πρώτα αντισώματα κάθε ορός τοποθετείται σε 15 πηγάδια. Το coating buffer είναι διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεινών και βοηθά επομένως στην προσκόλληση των πρωτεινών στα πηγάδια της plate.
- 2) Εκτός από τους ορούς, στρώνουμε και coating buffer στην plate με όγκο 100 μl σε κάθε πηγάδι για να το έχουμε ως control. Όπως και με τα αντισώματα, βάζουμε 3 επαναλήψεις του coating buffer για κάθε αντίσωμα.
- 3) Επωάζουμε στους 4°C για 16-18 ώρες.
- 4) Κάνουμε 3 πλυσίματα με PBS-tween 20 0.05%. Το tween 20 είναι απορρυπαντικό και βοηθά έτσι στο ξέπλυμα του ορού μετά την προσθήκη κάθε διαλύματος. Σε κάθε πλύσιμο πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 200 μl PBS-tween 20 0.05%. σε κάθε πηγάδι.
- 5) Βάζουμε 100 μΙ από το 1° αντίσωμα σε κάθε πηγάδι και επωάζουμε για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Κάνουμε 3 πλυσίματα με PBS-tween 20 0.05%.
- 7) Βάζουμε 100 μΙ από το 2° αντίσωμα σε κάθε πηγάδι και επωάζουμε για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Κάνουμε 3 πλυσίματα με PBS-tween 20 0.05%.
- 9) Προσθέτουμε 100 μΙ από το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος σε αναλογία 1-1 και περιμένουμε μέχρι να εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της αντίδρασης.
- **10)** Προσθέτουμε 50 μΙ H₂SO₄ 1Μ για να τερματίσουμε την αντίδραση.
- 11) Μετράμε την απορρόφηση στα 450 nm.

2.4 Συνταγές διαλυμάτων

▶ **HBSS 1x**, V_{total}= 500 ml, pH: 7-7,5

50ml HBSS 10X 450ml nanopure H₂O 10-15 ml Sodium Bicarbonate

➢ PBS 10x, V_{total}= 1L

80g NaCl 14.4g Na₂PO₄2H₂O ή 12.7g NaH₂PO₄H₂O 2g KCl 2g KH2PO4 Συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι τα 1000ml και το φυλάσσουμε στους 4°C

> PBS 1x, V_{total}= 1L

100 ml PBS 10x 900 ml dH₂0 Φτιάχνουμε το pH στο 7,2-7,4 με NaOH 5N και φυλάσσουμε στους 4°C

➤ Lysing RC, V_{total}= 100ml

0.83g NH₄Cl 0.1g NaHCO₃ 0.036g EDTA 100ml dH₂O Ρυθμίζουμε το pH στο 7.4, βάζουμε πάραφιλμ και φυλάσσουμε στους 4°C

Coating buffer, V_{total}= 1L

Διαλύουμε 2.1g NaHCO₃ 0,025M σε 500ml H₂0 Διαλύουμε 2.65g Na₂CO₃ 0,025M σε 500ml H₂0 Προσθέτουμε τα δύο διαλύματα, ρυθμίζουμε το pH στο 9,6 και φυλάσσουμε στους 4°C

Blocking Solutions

PBS-BSA 3%, V_{total}= 12 ml

12ml PBS 1x 0.36g BSA (Bovine Serum Alboumin)

PBS-BSA 2%, V_{total}= 20ml

20ml PBS 1x 0,4g BSA (Bovine Serum Alboumin)

Φυλάσσουμε στους 4°C Για παρασκευή PBS-BSA 0,1% αραιώνουμε τα παραπάνω διαλύματα σε PBS 1x

> **PFA 4% in PBS,** V_{total} =5ml

5ml PBS 1x 0,2g Paraformaldeyde

Φυλάσσουμε στην κατάψυξη και όταν πρόκειται να τη χρησιμοποιήσουμε ξεπαγώνουμε και φυλάσσουμε στους 4°C

> Met-OH 20% in PBS 1x, V_{total}= 10 ml

8 ml PBS 1x 2 ml Methanol

Φυλάσσουμε στην κατάψυξη

PBS 1x-tween 20 0.05%, V_{total}=200 ml

200 ml PBS 1x 0,1 ml Tween 20

Φυλάσσουμε στους 4°

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μακροσκοπικά αποτελέσματα από τη χορήγηση της PEP-A

Όπως αναφέρθηκε, τη 12^η μέρα της εγκυμοσύνης γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των εμβρύων καθώς και των αποβολών των εγκύων ποντικιών ενώ τα έμβρυα μαζί με τους πλακούντες παρατηρούνταν στο στερεοσκόπιο και στη συνέχεια ζυγίζονταν.

3.1.1 Βιωσιμότητα εμβρύων

Χορήγηση pepstatin A

Συνολικά έγιναν ενέσεις PEP-A σε 4 έγκυα ποντίκια ενώ αντίστοιχα είχαμε και άλλα 4 έγκυα χωρίς PEP-A (untreated). Αθροιστικά, τα untreated ποντίκια είχαν 16 έμβρυα και 2 αποβολές ενώ τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας είχαν 23 έμβρυα και 7 αποβολές (Διαγράμματα 3.1.1.1a και 3.1.1.1b)



Διάγραμμα 3.1.1.1: Ο αριθμός των εμβρύων και των αποβολών (a) σε ποντίκια untreated και (b) σε ποντίκια με χορήγηση PEP-A

Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα η PEP-A να διπλασιάζει το ποσοστό των αποβολών από 11,1 σε 23,3% πριν τη 12^η ημέρα της εγκυμοσύνης. (Διάγραμμα 3.1.1.2)



Διάγραμμα 3.1.1.2 : Το ποσοστό των εμβρυικών αποβολών σε 4 ποντίκια μετά από χορήγηση PEP-A και σε 4 ποντίκια untreated πριν τη 12^η μέρα της εγκυμοσύνης.

Εκτός όμως από τις αποβολές, στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A υπήρχαν έμβρυα με ασαφές σχήμα σε σχέση με αυτά των untreated ποντικιών. Επιπλέον, ο πλακούντας δεν αποτελούσε ξεχωριστό κομμάτι αλλά ήταν κατά κάποιο τρόπο «ενιαίος» με το έμβρυο (Εικόνα 3.1.1.1 a και b).



Εικόνα 3.1.1.1 Απεικόνιση εμβρύων κατά τη 12^η μέρα της ανάπτυξής του από (a) untreated ποντίκι και (b) ποντίκι στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A.

3.1.2 Βάρος εμβρύων

Μετά την παρατήρηση στο στερεοσκόπιο πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους των εμβρύων, των πλακούντων καθώς και του συνολικού τους βάρους. Στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A παρατηρήθηκε μείωση του βάρους τόσο των εμβρύων όσο και των πλακούντων συγκριτικά με τα untreated ποντίκια (Διάγραμμα 3.1.2.1).



Διάγραμμα 3.1.2.1: Σύγκριση του βάρους των εμβρύων, των πλακούντων και του συνολικού τους βάρους ανάμεσα σε control ποντίκια και σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A.

Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα φυσιολογικά έμβρυα να βρίσκονται σε πιο όψιμο αναπτυξιακό στάδιο σε σχέση με τα έμβρυα των ποντικών στα οποία είχε χορηγηθεί PEP-A (Εικόνα 3.1.2.1a και 3.1.2.1b).



Εικόνα 3.1.2.1: Έμβρυο κατά τη 12^η μέρα της ανάπτυξής του από (a) untreated ποντίκι και (b) ποντίκι στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A υπήρξε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των βαρών των εμβρύων και των πλακούντων σε σχέση με τα untreated ποντίκια όπως επιβεβαιώθηκε και από τον υπολογισμό του συντελεστή μεταβλητότητας CV (Διάγραμμα 3.2.2.2). Το γεγονός αυτό υποδείκνυε πως η ανάπτυξη των εμβρύων δεν ήταν αρμονική καθώς κάποια αναπτύσσονταν πιο γρήγορα και κάποια πιο αργά σε αντίθεση με τα control που βρίσκονταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο.



Διάγραμμα 3.2.2.2: Οι αποκλίσεις μεταξύ των βαρών των εμβρύων και των πλακούντων σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A και σε untreated ποντίκια μέσω του συντελεστή μεταβλητότητας CV.

3.2 Ενδοκυτταρική ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-II μορίων σε μητρικά κύτταρα σπλήνας με κυτταρομετρία ροής

Συνολικά είχαμε 4 έγκυα ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί PEP-A, 4 έγκυα χωρίς PEP-A, 4 μη έγκυα με PEP-A και 4 μη έγκυα χωρίς PEP-A. Τα επίπεδα των IL-2, IL-4, IL-10 και GM-CSF κυτοκινών και των τάξης ΙΙ μορίων προσδιορίστηκαν μέσω της κυτταρομετρίας ροής που πραγματοποιήθηκε στα σπλενοκύτταρα μετά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Για τα αντισώματα αIL-2, αIL-4 και αIL-10 χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα το anti-rat FITC ενώ για τα αGM-CSF και N22 το anti-mouse PE ή FITC.

1) Έγκυο- Pepstatin A

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των κυττάρων εγκύου ποντικιού, στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A κατά την 9^η, 10^η και 11^η της εγκυμοσύνης, που εκφράζουν στο εσωτερικό τους τις παραπάνω κυτοκίνες καθώς και τάξης ΙΙ μόρια.

Density plots

Στα density plots απεικονίζονται μεμονωμένα τα ποσοστά φθορισμού ανάλογα με το εκάστοτε αντίσωμα. Στον άξονα χ απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στο πράσινο (FL-1) ενώ στον άξονα ψ η ένταση του φθορισμού στο κόκκινο (FL-2).



Διάγραμμα 3.2.1 : Το % φθορισμού άβαφων κυττάρων (χωρίς αντίσωμα) εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.3 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-Α στα οποία προστέθηκε μόνο το 2ο αντίσωμα (PE).



Διάγραμμα 3.2.2 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με ΡΕΡ-Α στα οποία προστέθηκε μόνο το 2° αντίσωμα (anti-rat FITC).



Διάγραμμα 3.2.4 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-2.



Διάγραμμα 3.2.5 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το alL-10.



Διάγραμμα 3.2.7 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αGM-CSF.

<u>Histograms</u>



Διάγραμμα 3.2.6 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-4



Διάγραμμα 3.2.8 : Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το N22 (MHC-II).

Σε κάθε ένα από τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται ο φθορισμός των άβαφων κυττάρων (unstained), ο φθορισμός των κυττάρων στα οποία προστέθηκε μόνο το 2° αντίσωμα και ο φθορισμός των κυττάρων στα οποία προστέθηκε το αντίσωμα που δεσμεύει τον παράγοντα που θέλουμε μαζί με το 2° αντίσωμα. Μπορούμε έτσι να υπολογίσουμε το ποσοστό του πραγματικού φθορισμού αφαιρώντας αυτό του 2^{ου} αντισώματος από το ποσοστό του 1^{ου}. Το ποσοστό που προκύπτει αναγράφεται πάνω δεξιά σε κάθε διάγραμμα. Στον άξονα χ απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στο πράσινο ή στο κόκκινο (FL-1 ή FL-2 αντίστοιχα) ενώ στον άξονα ψ οι κρούσεις (counts), δηλαδή ο αριθμός των κυττάρων.



Διάγραμμα 3.2.9: Η IL-2 σε ποσοστό 40,48% των κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A.







Διάγραμμα 3.2.11: Η IL-10 σε ποσοστό 87,69% των κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.12 : Ο GM-CSF σε ποσοστό 0,51% των κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.13 : Τα MHC-II μόρια σε ποσοστό 4,27% των κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A.

Τόσο στα παραπάνω density plots όσο και στα ιστογράμματα βλέπουμε πως το ΡΕ εμφανίζει μεγάλα ποσοστά φθορισμού όταν προστίθεται μόνο του στο δείγμα και γι' αυτό τα ποσοστά του GM-CSF και των τάξης ΙΙ μορίων εμφανίζονται τόσο μικρά.

2) Έγκυο χωρίς Pepstatin A

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των κυττάρων εγκύου ποντικιού στο οποίο δεν χορηγήθηκε PEP-A. Αντί για το PE χρησιμοποιήθηκε anti-mouse FITC.





Διάγραμμα 3.2.14: Το % φθορισμού άβαφων κυττάρων (χωρίς αντίσωμα) εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.15: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το 2° αντίσωμα (anti-rat FITC).



Διάγραμμα 3.2.16: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το 2° αντίσωμα (anti-mouse FITC).



Διάγραμμα 3.2.18: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-4.



Διάγραμμα 3.2.20: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αGM-CSF.



Διάγραμμα 3.2.17: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-2.



Διάγραμμα 3.2.19: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-10.



Διάγραμμα 3.2.21: Το % φθορισμού κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το N22 (MHC-II).



Διάγραμμα 3.2.22 : Η IL-2 σε ποσοστό 2,36% των κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.23 : Η IL-4 σε ποσοστό 7,35% των κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A.











Διάγραμμα 3.2.26: Τα MHC-II μόρια σε ποσοστό 6,16% των κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A.

Βλέπουμε πως και το anti-mouse FITC όπως και το PE εμφανίζει μεγάλα ποσοστά φθορισμού και γι' αυτό τα ποσοστά του GM-CSF και των τάξης ΙΙ μορίων εμφανίζονται πάλι τόσο μικρά.

3) Control- Pepstatin A

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των κυττάρων μη εγκύου ποντικιού (control) στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A.

Density plots



Διάγραμμα 3.2.27: Το % φθορισμού άβαφων κυττάρων (χωρίς αντίσωμα) control ποντικού με PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.28: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το anti-rat FITC.



Διάγραμμα 3.2.29: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το anti-mouse FITC.



Διάγραμμα 3.2.31: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-Α στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-4.



Διάγραμμα 3.2.33: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το α-GM-



Διάγραμμα 3.2.30: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αIL-2.



Διάγραμμα 3.2.32: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-Α στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το αlL-10.



Διάγραμμα 3.2.34: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού με PEP-Α στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το N**39**.









Διάγραμμα 3.2.36 : Η IL-4 σε ποσοστό 18,81% των κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A.







Διάγραμμα 3.2.38 : Ο GM-CSF σε ποσοστό 3,4% των κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.39 : Τα MHC-II μόρια σε ποσοστό 1,95% των κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A.

4) Control χωρίς Pepstatin A

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα ποσοστά φθορισμού των κυττάρων μη εγκύου ποντικιού (control) στο οποίο δεν χορηγήθηκε PEP-A.

Density plots



Διάγραμμα 3.2.40: Το % φθορισμού άβαφων κυττάρων (χωρίς αντίσωμα) control ποντικού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.41: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το anti-rat FITC.



Διάγραμμα 3.2.42: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε μόνο το anti-mouse FITC.



Διάγραμμα 3.2.44: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το



Διάγραμμα 3.2.46: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηίες τος ταθος ταθος τα α GM-CSF.



Διάγραμμα 3.2.43: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το



Διάγραμμα 3.2.45: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το



Διάγραμμα 3.2.47: Το % φθορισμού κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A στα οποία προστέθηκε ως 1° αντίσωμα το N22.



Διάγραμμα 3.2.48 : Η IL-2 σε ποσοστό 15,95% των κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.49 : Η IL-4 σε ποσοστό 11,41% των κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.50 : Η IL-10 σε ποσοστό 93,61% των κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.51 : Ο GM-CSF σε ποσοστό 1,61% των κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A.



Διάγραμμα 3.2.52 : Τα MHC-II μόρια σε ποσοστό 0,08% των κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP.

Όλα τα παραπάνω διαγράμματα είναι ενδεικτικά ενός εκ των τεσσάρων ποντικιών σε κάθε κατηγορία. Τα συνολικά ποσοστά του φθορισμού παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3.2.53 και 3.2.54 που απεικονίζουν τα ποσοστά φθορισμού των IL-2, IL-4 και IL-10 και τα ποσοστά των GM-CSF και N22 αντίστοιχα. Έχουμε δύο ξεχωριστά διαγράμματα γιατί στην περίπτωση των GM-CSF και N22 οι διαφορές είναι πολύ μικρές κάτι που οφείλεται στον υπερβολικό φθορισμό των anti-mouse PE και FITC που οδήγησαν σε πολύ μικρά ποσοστά των παραγόντων αυτών.

Στο διάγραμμα 3.2.53 βλέπουμε πως η IL-2 αυξάνεται με χορήγηση PEP κατά 47,09% μεταξύ εγκύων και κατά 32,04% μεταξύ μη εγκύων ποντικιών. Ταυτόχρονα όμως το standard deviation είναι πολύ μεγάλο καθώς υπήρχαν μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές της στα ποντίκια της ίδιας κατηγορίας. Η IL-4 αυξάνεται επίσης με χορήγηση PEP ωστόσο η διαφορά αυτή είναι πιο έντονη στα control από ότι στα έγκυα ποντίκια αφού αυξάνεται κατά 22,1% μεταξύ εγκύων και κατά 55,71% μεταξύ μη εγκύων ποντικιών. Η IL-10 βρίσκεται πάντα σε πολύ υψηλά επίπεδα, με πολύ μικρές διαφορές ανάμεσα στις 4 κατηγορίες ποντικιών και έχοντας υψηλότερη τιμή στα ποντίκια που δεν χορηγήθηκε PEP. Συγκεκριμένα μειώνεται με χορήγηση PEP κατά 2,17% μεταξύ εγκύων και κατά 2,91% μεταξύ μη εγκύων ποντικιών.



Διάγραμμα 3.2.53: Τα ποσοστά φθορισμού των IL-2, IL-4 και IL-10 στις 4 κατηγορίες ποντικιών.

Στο διάγραμμα 3.2.54 φαίνεται πως εκτός από πολύ μικρές τιμές έχουμε και πολύ μεγάλη τυπική απόκλιση κυρίως στις τιμές του N22. Όπως και στην περίπτωση της IL-2 οι τιμές των παραγόντων αυτών παρότι μικρές απέκλιναν μεταξύ τους ανάμεσα σε ποντίκια της ίδιας κατηγορίας. Παρόλα αυτά στο διάγραμμα βλέπουμε πως και ο GM-CSF τα τάξης ΙΙ μόρια αυξάνονται με χορήγηση PEP τόσο μεταξύ εγκύων όσο και μη εγκύων ποντικών. Συγκεκριμένα ο GM-CSF αυξάνεται κατά 18,84% μεταξύ εγκύων και κατά 74,5% μεταξύ εγκύων ποντικών ενώ οι τιμές αυτές για τα τάξης ΙΙ μόρια είναι αντίστοιχα 57,58% και 54,85%.



Διάγραμμα 3.2.54: Τα ποσοστά φθορισμού των GM-CSF και MHC-II μορίων στις 4 κατηγορίες ποντικιών.

3.3 Ενδοκυτταρική ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-II μορίων σε μητρικά κύτταρα σπλήνας με συνεστιακή μικροσκοπία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα δείγματα μετά την επεξεργασία από το FACScan παρατηρούνταν στο συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal).

1) Έγκυο- Pepstatin A

Στις εικόνες 3.3.1 ως 3.3.5 φαίνεται ο φθορισμός των κυττάρων εγκύου ποντικιού στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A, για κάθε παράγοντα.





Εικόνα 3.3.1: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-2.





Εικόνα 3.3.2: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-4. Παρόλο που τα κύτταρα φθορίζουν και στο εσωτερικό αλλά και στο εξωτερικό τους, παρατηρούμε κάποια spots εξωτερικά που υποδηλώνουν τοπική μεμβρανική έκφραση της IL-4.





Εικόνα 3.3.3: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-10. Παρατηρούμε πως ο φθορισμός είναι πολύ πιο έντονος στο εξωτερικό του κυττάρου υποδηλώνοντας μεμβρανική κυρίως έκφραση της IL-10.





Εικόνα 3.3.4: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά GM-CSF.





Εικόνα 3.3.5: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά MHC-II μόρια.

2) Έγκυο χωρίς Pepstatin A

Στις εικόνες 3.3.6 ως 3.3.10 φαίνεται ο φθορισμός των κυττάρων εγκύου ποντικιού στο οποίο δεν χορηγήθηκε PEP-A, για κάθε παράγοντα.





Εικόνα 3.3.6: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς ΡΕΡ-Α που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-2. Ο φθορισμός είναι λιγότερο έντονος από αυτόν των κυττάρων με χορήγηση ΡΕΡ-Α.





Εικόνα 3.3.7: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-4. Παρατηρούμε πως ο φθορισμός είναι πιο έντονος στο εξωτερικό του κυττάρου ενώ δεν υπάρχουν τα spots που εμφανίζονταν με τη χορήγηση PEP-A, υποδηλώνοντας μεμβρανική έκφραση και όχι μόνο τοπική.





Εικόνα 3.3.8: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-10.





Εικόνα 3.3.9: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά GM-CSF.





Εικόνα 3.3.10: Ο φθορισμός κυττάρων εγκύου ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά MHC-II μόρια. Ο φθορισμός στο εσωτερικό των κυττάρων είναι λιγότερο έντονος από αυτόν των κυττάρων με χορήγηση PEP-A.

3) Control- Pepstatin A

Στις εικόνες 3.3.10 ως 3.3.15 φαίνεται ο φθορισμός των κυττάρων μη εγκύου ποντικιού στο οποίο χορηγήθηκε PEP-A, για κάθε παράγοντα.





Εικόνα 3.3.11: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-2.





Εικόνα 3.3.12: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-4.





Εικόνα 3.3.13: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-10. Παρατηρούμε πως ο φθορισμός είναι πολύ πιο έντονος στο εξωτερικό του κυττάρου, παρόλο που εντοπίζεται και στο εσωτερικό, υποδηλώνοντας μεμβρανική κυρίως έκφραση της IL-10.





Εικόνα 3.3.14: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν GM-CSF. Ο φθορισμός είναι πολύ έντονος μόνο στο εξωτερικό του κυττάρου υποδηλώνοντας μεμβρανική έκφραση του GM-CSF.





Εικόνα 3.3.15: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού με χορήγηση PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά MHC-II μόρια. Παρατηρούμε πως ο φθορισμός είναι πολύ πιο έντονος στο εξωτερικό του κυττάρου, παρόλο που εντοπίζεται και στο εσωτερικό, υποδηλώνοντας μεμβρανική κυρίως έκφραση των MHC-II μορίων.

4) Control χωρίς Pepstatin A

Στις εικόνες 3.3.15 ως 3.3.20 φαίνεται ο φθορισμός των κυττάρων μη εγκύου ποντικιού στο οποίο δεν χορηγήθηκε PEP-A, για κάθε παράγοντα.





Εικόνα 3.3.16: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-2.





Εικόνα 3.3.17: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-4. Παρατηρούμε πως η ένταση του φθορισμού είναι μικρότερη από αυτή του φθορισμού κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε PEP-A.





Εικόνα 3.3.18: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά IL-10.





Εικόνα 3.3.19: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά GM-CSF.





Εικόνα 3.3.20: Ο φθορισμός κυττάρων control ποντικιού χωρίς PEP-A που εκφράζουν ενδοκυτταρικά MHC-II μόρια. Παρατηρούμε πως ο φθορισμός στο εξωτερικό του κυττάρου είναι κατά πολύ εντονότερος από αυτόν στο εξωτερικό των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε PEP-A.

3.4 Ανίχνευση IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF και MHC-ΙΙ μορίων στο μητρικό ορό

Στο διάγραμμα 3.4.1 απεικονίζονται τα ποσοστά των παραγόντων στους μητρικούς ορούς και των τεσσάρων κατηγοριών. Βλέπουμε πως ανάμεσα στα έγκυα ποντίκια η PEP-A μειώνει την IL-2 κατά 51,16%, την IL-4 κατά 52,28% και τον GM-CSF κατά 16,05% ενώ αυξάνει την IL-10 κατά 28,76% και τα διαλυτά MHC-II μόρια κατά 11,25%. Στα control ποντίκια, η PEP-A αυξάνει την IL-2 κατά 82,31% και την IL-4 κατά 59,33% ενώ μειώνει την IL-10 κατά 26,82%, τον GM-CSF κατά 16,05% και τα διαλυτά MHC-II μόρια κατά 48,88%. Παρατηρούμε επίσης πως η IL-2 και η IL-4 είναι αυξημένες στα control ποντίκια ενώ η IL-10 είναι κατά πολύ πιο αυξημένη στα έγκυα ποντίκια. Τέλος ο GM-CSF και τα διαλυτά MHC-II μόρια παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό στα control ποντίκια στα οποία δεν χορηγήθηκε PEP-A.



Διάγραμμα 3.4.1: Τα ποσοστά των IL-2, IL-4 IL-10, GM-CSF και MHC-II μορίων στον ορό στις 4 κατηγορίες ποντικιών.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να παρατηρήσουμε την επίδραση του ενδοσωμικού αναστολέα pepstatin Α στην εγκυμοσύνη συγγενετικών ποντικιών balb/c με τελικό στόχο να δούμε αν η ουσία αυτή μπορεί να μπλοκάρει την αρνητική επίδραση της IFN-γ στην ανάπτυξη των εμβρύων.

Από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο γνωρίζουμε πως η pepstatin A μειώνει την έκφραση των τάξης II μορίων ιστοσυμβατότητας στα κύτταρα του πλακούντα, τόσο in vitro όσο και in vivo, χωρίς όμως να έχουμε ξεκάθαρη εικόνα για την επίδρασή της στο μητρικό οργανισμό καθώς και στην έκβαση της εγκυμοσύνης. Επομένως στο πείραμα θέλαμε να δούμε μεμονωμένα την δράση της ουσίας αυτής σε έγκυα και μη ποντίκια πριν προχωρήσουμε σε ταυτόχρονη χορήγηση με IFN-γ.

Ξεκινώντας με την επίδραση της PEP-A στην έκβαση της εγκυμοσύνης παρατηρήσαμε πως διπλασιάζει το ποσοστό των αποβολών από 11,1 σε 23,3% ενώ ταυτόχρονα μειώνει το βάρος τόσο των εμβρύων όσο και των πλακούντων. Επιπλέον, υπήρξε μεγάλη απόκλιση ανάμεσα στα βάρη αυτά στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-A, υποδεικνύοντας πως ο αναστολέας αυτός διαταράσσει την ομαλή και ταυτόχρονη ανάπτυξη των εμβρύων. Ενώ φυσιολογικά τα έμβρυα θα έπρεπε να βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και να έχουν παρόμοια βάρη μεταξύ τους όπως συνέβη στα ποντίκια στα οποία δεν χορηγήθηκε ο αναστολέας, σε αυτά που χορηγήθηκε PEP άλλα έμβρυα ήταν πιο ανεπτυγμένα και άλλα όχι.

Όσον αφορά την ενδοκυττάρια έκφραση των κυτοκινών και των τάξης ΙΙ μορίων στα μητρικά σπλενοκύτταρα, παρατηρήθηκε πως η PEP-A αυξάνει την IL-2, την IL-4, τον GM-CSF και τα τάξης ΙΙ μόρια τόσο ανάμεσα στα έγκυα όσο και στα control ποντίκια ενώ μειώνει ελάχιστα την IL-10. Παρόλα αυτά η τυπική απόκλιση στις τιμές της IL-2 ήταν αρκετά μεγάλη καθώς οι τιμές τις διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους επομένως δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τα ποσοστά έκφρασής της. Από τις εικόνες όμως του Confocal βλέπουμε πως τουλάχιστον μεταξύ των εγκύων ποντικιών η PEP-A όντως αυξάνει την ενδοκυττάρια έκφραση της IL-2 αφού ο φθορισμός των κυττάρων αυτών είναι εντονότερος από τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε PEP-A. Όσον αφορά την IL-4, από τις εικόνες του Confocal βλέπουμε πως στα έγκυα ποντίκια χωρίς τον αναστολέα εμφανίζεται μεμβρανική έκφραση της κυτοκίνης, ενώ με τη χορήγηση του αναστολέα η έκφραση είναι κυρίως ενδοκυττάρια με εξαίρεση κάποια μεμβρανικά spots υποδηλώνοντας πως η PEP-Α εγκλωβίζει την IL-4 στο εσωτερικό του κυττάρου. Η επίδρασή της αυτή φαίνεται και στα μη έγκυα ποντίκια όπου ο φθορισμός στο εσωτερικό

του κυττάρου είναι εντονότερος παρουσία του αναστολέα και ασθενέστερος χωρίς αυτόν. Σχετικά με τον GM-CSF και τα τάξης ΙΙ μόρια, όπως αναφέρθηκε, τα ποσοστά τους ήταν πολύ μικρά λόγω του υπερβολικού φθορισμού του δεύτερου αντισώματος (anti-mouse PE και FITC) και έτσι οι τιμές τους ανάμεσα στις 4 κατηγορίες ποντικιών δεν διέφεραν σημαντικά. Από ότι φαίνεται όμως και οι δύο παράγοντες αυξάνονται με τη χορήγηση PEP-A επιβεβαιώνοντας έτσι πως ο αναστολέας αυτός μπλοκάρει το ενδοσωμικό μονοπάτι οδηγώντας σε συσσώρευση των τάξης ΙΙ μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου. Η κατανομή αυτή των τάξης ΙΙ μορίων φαίνεται και από τις εικόνες του Confocal. Συγκεκριμένα, στα έγκυα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε PEP-Α ο φθορισμός των κυττάρων που εκφράζουν τάξης ΙΙ μόρια είναι εντονότερος στο εσωτερικό τους από ότι στα κύτταρα των ποντικιών στα οποία δεν χορηγήθηκε PEP-A. Στα μη έγκυα ποντίκια η διαφορά φαίνεται στη μεμβρανική έκφραση των τάξης ΙΙ μορίων όπου είναι ασθενέστερη με την επίδραση του αναστολέα και εντονότερη χωρίς αυτόν υποδεικνύοντας πως η PEP-Α δεν επέτρεψε στα μόρια αυτά να βγουν στην κυτταρική μεμβράνη.

Η έκφραση των παραπάνω παραγόντων μελετήθηκε και στο μητρικό ορό. Παρατηρήσαμε πως η PEP-A μειώνει την έκκριση της IL-2 και της IL-4 ανάμεσα στα έγκυα ποντίκια ενώ αντίθετα την αυξάνει ανάμεσα στα μη έγκυα. Η IL-4 όπως έχει αναφερθεί έχει προστατευτικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και το γεγονός πως η PEP-A μειώνει την έκκρισή της συνδέεται με την εμβρυοτοξική δράση του αναστολέα. Επιπλέον η ΡΕΡ-Α αυξάνει την IL-10 στον ορό εγκύων ποντικών ενώ τη μειώνει ελάχιστα στον ορό των μη εγκύων. Ο GM-CSF μειώνεται σε κάθε περίπτωση με χορήγηση PEP-A κάτι που δικαιολογείται καθώς αυξάνεται ενδοκυττάρια. Ο παράγοντας αυτός είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πλακούντα επομένως ο αναστολέας εμποδίζοντας την έκκριση του GM-CSF ρυθμίζει αρνητικά την ανάπτυξη του εμβρύου και ίσως είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους τα βάρη των εμβρύων και των πλακούντων είναι μειωμένα με τη χορήγησή του. Τα διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια θεωρητικά θα έπρεπε να είναι μειωμένα λόγω του αναστολέα που τα εγκλωβίζει ενδοκυττάρια. Αυτό όμως επιβεβαιώθηκε μόνο στα μη έγκυα ποντίκια αφού στα έγκυα η PEP-A αύξησε την έκκριση των τάξης ΙΙ μορίων. Το γεγονός πως τα αυξημένα ποσοστά διαλυτών τάξης ΙΙ μορίων σχετίζονται με αποβολή του εμβρύου υποδεικνύει την εμβρυοτοξική δράση της PEP-A και συνδέεται με τον διπλασιασμό του ποσοστού των αποβολών.

Είναι επομένως φανερό πως η pepstatin Α παρόλο που μπορεί και μπλοκάρει τη μεμβρανική έκφραση των τάξης ΙΙ μορίων ιστοσυμβατότητας στα κύτταρα του πλακούντα, ταυτόχρονα προκαλεί άλλα προβλήματα που

οδηγούν είτε στην απόρριψη του εμβρύου είτε στη μη ομαλή ανάπτυξή του. Η απόρριψη του εμβρύου οφείλεται στην αυξημένη έκκριση τάξης ΙΙ μορίων στον μητρικό ορό. Όσον αφορά στη μη ομαλή ανάπτυξη, καθώς η PEP-A μπορεί και αναστέλλει το ενδοσωμικό μονοπάτι, είναι πιθανό να εγκλωβίζει στο κύτταρο ουσίες απαραίτητες για το έμβρυο όπως για παράδειγμα κυτοκίνες ή αυξητικούς παράγοντες. Η έκκριση των παραγόντων αυτών κατ' επέκταση μειώνεται και έτσι αναπτύσσονται ταχύτερα μόνο όσα έμβρυα «προλάβουν» να τους δεσμεύσουν ενώ αντίθετα τα υπόλοιπα καθυστερούν στην ανάπτυξή τους όπως επιβεβαιώθηκε από τις αποκλίσεις στα βάρη τόσο των εμβρύων όσο και των πλακούντων. Για όλους τους παραπάνω λόγους η pepstatin A κρίθηκε εμβρυοτοξική και επομένως, δεν προχωρήσαμε στην ταυτόχρονη χορήγησή της με IFN-γ. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως καθώς η pepstatin A ήδη χορηγείται σε ασθενείς με ΗΙV αφού αναστέλλει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού, δεν θα έπρεπε να χορηγείται σε ασθενείς γυναίκες κατά τη διάρκεια της κύησης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Athanassakis I., 2001. Soluble class I and class II MHC molecules as modulators of the maternal immune response during pregnancy. Am J Reprod Immunol 46:47–48.

Athanassakis I., Aifantis I., Baritakis S., Farmakiotis V., Koumantakis E. & Vassiliadis S. 2000. Nitric oxide production by pre-implantation embryos in response to embryotoxic factors. Cell Physiol Biochem 10:169–176.

Athanassakis I., Paflis M., Ranella A. & Vassiliadis S. 1999. Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. Transplantation Proc 31:1834–1837.

Athanassakis I., Papadimitriou L., Bouris G. & Vassiliadis S. 2000. Interferon- γ induces differentiation of ectoplacental cone cells to phenotypically distinct trophoblasts. Dev Immunol 24 : 663-672.

Athanassakis I., Ranella A. & Vassiliadis S., 2000. INF-γ facilitates release of class II-loaded intracellular pools in trophoblasts cells: a novel property in dependent of protein synthesis. J.Interferon Cytokine Res. 20: 823-830.

Athanassakis-Vassiliadis I. 1993. Lymphokine production by decidual cells in allogeneic and syngeneic murine pregnancy. Cytokine 4: 354.

Athanassakis-Vassiliadis I, Galanopoulos V.K., Grigoriou M. & Papamatheakis J. 1990. Induction of class II MHC antigen expression on the murine placenta by 5-azacytidine correlates with fetal abortion. Cell Immunol 128:438.

Athanassakis-Vassiliadis I., Thanos D. & Papamatheakis J. 1989. Induction of class II major histocompatibility antigens in murine placenta by 5- azacytidine and interferon-γ involves different cell populations. Eur Immunol 19:2341-2348. Athanassakis I. & Iconomidou B. 1996. Cytokine production in the serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation. Dev Immunol 4:247–255.

Athanassakis I. & Vassiliadis S. 2002. Interplay between T helper type 1 and type 2 cytokines and soluble major histocompatibility complex molecules: a paradigm in pregnancy. Immunology 107: 281–287.

Barrett A.J. 1979. Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. Ciba Found. Symp. 37.

Bennett K.T., Levine J.S., Ellis R.J., Peanasky I.M., Samloff J. Kay & B.M. Chain. 1992. Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by Cathepsin E. Eur. J. Immunol. 22:1519.

Bhat K.P., Truax A.D. & Greer S.F. 2010. Phosporylation and Ubiquitination of degron proximal residues is essential for CIITA transactivation and MHC class II expression. J Biol Chem 2010:1-18.

Bikoff E.K., Huang L.Y., Episkopou V., van Meerwijk J., Germain R.N. & Robertson E.J. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. J Exp Med 177: 1699–1712.

Blum J.S. & Cresswell P. 1988. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:3975–3979.

Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L. & Wiley D.C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364: 33–39.

Calne R.Y., White H.J., Yoffa D.E., Binns R.M., Maggin R.R., Herbertson R.M., Millard P.R., Molina V.P. & Davis D.R. 1967. Prolonged survival of liver transplants in the pig. Br. Med. J. 4: 645-648.

Chaouat G., Meliani A.A., Martal J., Raghupathy R., Elliot J.,

Mosmann T. & Wegmann T.G. 1995. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-γ J. Immunol. 154: 4261.

Chatterjee Hasrouni S. & Lala P.K. 1981. MHC antigens on mouse trophoblasts cells: paucity of la antigens despite the presence of H-2K and D. Immunology 127:2070-2073.

Delassus S., Coutinho G.C., Saucier C., Darche S. & Kourilsky P. 1994. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation. J. Immunol. 152: 2411.

Ge Q., Stone J.D., Thompson M.T., Cochran J.R., Rushe M., Eisen H.N., Chen J. & Stern J.L. 2002. Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules PNAS 99:13729-13734.

Geuze H.J., Slot J.W., Strous G.J., Peppard J., von Figura K., Hasilik A. & Schwartz A.L. 1984. Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. Cell 37: 195–204.

Hill J.A. 1991. Implications of cytokines in male and female sterility. In: Cellular and molecular biology of the maternofetal relationship, Chaouat G., and Mowbray J., Eds. Paris: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd :269-275.

Kanbour-Shakir A., Zhang X., Rouleau A., Armstrong D.T., Kunz H.W., McPherson T.A. & Gil T.J. III. 1990. Gene imprinting and major histocompatibility complex class I antigen expression in the rat placenta. Proc Natl Acad Sci USA 87: 444-448.

Kolb J.P., Chaouat G. & Chassoux D. 1984. Immunoactive products of placenta. III. Suppression of natural killing activity. J Immunol 132: 2305-2310.

Koues O.I., Dudley R.K., Mehta N.T. & Greer S.F. 2009. The 19S proteasome positively regulates histone methylation at cytokine inducible genes. Biochim Biophys Acta 1789:691-701.

Kovats S., Main E.K., Librach C., Stubblebine M., Fisher S.J & Demars, R. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. Science 248: 220-223.

Lea R.G., Flanders K.C., Harley C.B., Manuel J., Banwatt D. & Clark D.A. 1992. Release of a transforming growth factor (TGF)-2-related suppressor factor from post implantation murine decidual tissue can be correlated with the detection of a subpopulation of cells containing RNA for TGF-2. J. Immunol. 148: 778.

Lin H., Mossman T.R., Guilbert L., Tuntipopipat S., and Wegmann T.G.1993. Synthesis of T Helper-2 cytokines at the maternal fetal interface. J. Immunol. 151:4562.

Machelon V. & Emilie D. 1997. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. Eur Cyt Netw 8:137–43.

Maja A.M., Michael D.T. & Janice S.B. 1994. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. Proc Natl Acad Sci USA 91: 2171-2175.

McLaren A. 1975. Antigenic disparity: Does it affect placental size, implantation or population genetics. In: Immuobiology of trophoblast, Edwards R.G., Howe C.W.S., and Johnson M.H., eds (Cambridge: Cambridge University Press), p. 225.

Mizuochi T., Yee S.T., Kasai M., Muno D. & Kominami E. 1994. Both Cathepsin B and Cathepsin D are necessary for the processing of ovalbumin as well as for the degradation of class II MHC invariant chain. Immunol. Lett. 43:189–193.

Mosyak L., Zaller D.M. & Wiley D.C. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II

MHC molecules during antigen presentation. Immunity 9:377–383.

Nag B., Kendrick T., Arimilli S., Yu S.C.T.& Sriram S. 1996. Soluble MHC II-peptide complexes induce antigen-specific apoptosis in T cells. Cellular Immunology 170:25-33.

Neefjes J.J., Stollorz V., Peters P.J., Geuze H.J. & Ploegh H.L. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. Cell 61: 171–183.

Philpott K.L., Rastan S., Brown S., & Mellr A.L. 1988. Expression of class I genes in murine extra embryonic tissues. Immunology 64: 479-485.

Raghupathy R., Singh B., Leigh B.J. & Wegmann T.G. 1981. The ontogeny and turnover kinetics on paternal H-2K antigenic determinants on the allogeneic murine placenta. Immul 127: 2074-2079.

Ranella A., Vassiliadis S., Mastora C., Dionyssopoulou E. & Athanassakis I., 2005. Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. Hum. Immunol. 66: 43–55.

Rich D.H., Bernatowicz M.S., Agarwal N.S., Kawai M., Salituro F.G. & Schmidt P.G. 1985. Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected substrate enzyme inhibition. Biochemistry 24: 3165-3173.

Roche P.A. & Cresswell P. 1990. Invariant chain association with HLADR molecules inhibits immunogenic peptide binding. Nature 345: 615–618.

Saito S., Tsukaguchi N., Hasegawa T., Michimata T., Tsuda H. & NaritaN. 1999. Distribution of Th1, Th2 and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. Am J Reprod Immunol. 42:240–5.

Sallusto F., Cella M., Danieli C. & Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II

compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182: 389–400.

Thomas D. J., Richards A. D., Jupp R. A., Ueno E., Yamamoto K., Samloff I. M., Dunn B. M. & Samloff J. Kay. 1989. Stabilisation of Cathepsin E by ATP. FEBS Lett. 243:145.

Umezawa H., AoyagiT., Morishima H., Matsuzaki M. & Hamada M. 1970. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. J. Antibiot. 23: 259–262.

Van Rood J.J., van Leeuwen, A. & van Santen, M.C.T. 1970. Anti HL-A2 inhibitor in normal human serum. Nature 226: 366-367.

Vassiliadis S., Paflis M. & Athanassakis I. 2001.Serum soluble HLA class I and class II levels as an alternative diagnostic test for determining immune indexes required for normal pregnancies. Report. Fertil. Dev. 13, 427-433.

Vassiliadis S., Ranella A., Papadimitriou L., Makrygiannakis A. & Athanassakis I. 1998. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. Mediators of Inflammation 7: 69–72.

Vassiliadis S., Tsoukatos D. & Athanassakis I. 1994. Interferon-induced class II expression at the spongiotrophoblastic zone of the murine placenta is linked to fetal rejection and developmental abnormalities. Actal Physiol Scand 151: 485-495.

Von der Helm K.,Gurtler L., Eberle J. & Deinhardt F. 1989. Inhibition of HIV replication in cell culture by specific aspartic protease inhibitor pepstatin A. FEBS Letters 247:349-452.

Webb B.J., Bochan M.R., Montel A., Padilla L.M. & Brahmi Z. 1994. The lack of NK cytotoxicity associated with fresh HUCB may be due to the presence of soluble HLA in the serum. Cell Immunol. 159: 246–261.

Wegmann T.G., Guilbert L.J., & Mossmann T.R. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship:

Successful pregnancy is a Th2 phenomenon. Immunol.Today 14: 353.

Zhang T., Maekawa Y., Hanba J., Dainichi T., Nashed B.F., Hisaeda H., Sakai T., Asao T., Himeno K., Good R.A. & Katunuma N. 2000. Lysosomal Cathepsin B plays an important role in antigen processing, while Cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. Immunology 100:13-20.

Zuckermann F.A. & Head J.R. 1987. Murine trophoblasts resist cellmediated lysis. Resistance to allospecific cytoxic T lymphocytes. J Immonol 139: 2856-2864.

Zuckermann F.A. & Head, J.R. 1988. Murine trophoblasts resist cellmediated lysis. Resistance to cell-mediated cytotoxicity. Cell Immonol 116:274-286.