



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ
ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) ΣΤΗ
ΘΕΣΗ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΜΗΝΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ
ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) ΣΤΗ
ΘΕΣΗ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΜΗΝΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

Η έγκριση της 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)

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τους παρακάτω φίλους, συνεργάτες και δασκάλους οι οποίοι συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

- Τον επιβλέποντα της διατριβής Επίκουρο Καθηγητή Αντώνη Μακρυγιαννάκη για την επιστημονική, οικονομική και ανθρώπινη συμβολή του.
- Τον Καθηγητή Αχιλλέα Γραβάνη για την πολυδιάστατη και διαρκή του στήριξη.
- Τον Καθηγητή Ευγένιο Κουμαντάκη που ως μέλος της 3μελούς επιτροπής επέβλεψε και συμπαραστάθηκε στη πορεία της διατριβής.
- Τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής: Καθηγητές Ανδρέα Μαργιωρή, Χρήστο Στουρνάρα και Επίκουρους Καθηγητές Χρήστο Τσατσάνη και Γιώργο Λιαπάκη για τον πάντα γόνιμο διάλογό τους και την επίβλεψη της διατριβής.
- Τον Γιάννη Χαραλαμπίδουλο για την ανεκτίμητη καθοδήγηση και φιλία του.
- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Τζαρδή για την πολύτιμη γνώση και το ενδιαφέρον που μου μετέδωσε πάνω στην ιστοπαθολογία.
- Τις εργαζόμενες στο Τμήμα Παθολογοανατομίας Κατερίνα Δαριβιαννάκη, Κατερίνα Κουράκη και Ρένα Χατζάκη, χωρίς τη συμβολή των οποίων ένα σημαντικό μέρος της διατριβής θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί.
- Τους συνεργάτες της 1ης Γυναικολογικής Κλινικής του Μονάχου: Καθηγητή Klaus Friese, Drs. Udo Jeschke και Γιάννη Μυλωνά, για την φιλοξενία και γόνιμη συνεργασία τους.
- Τους φίλους και συνεργάτες στη καθ' ημέρα πράξη: Γιώργο Πέτσα, Ιάκωβο Λαζαρίδη, Αριάδνη Ανδρουλιδάκη, Ισμήνη Αλεξάκη, Άντα Ρολάκη, Όλγα Ρασούλη, Ειρήνη Δερμιτζάκη, Βάσω Ζαχαριουδάκη, Βαρβάρα Βέργου, Νίκη Μαστροδήμου, Κώστα Γκουντέλια.
- Τη γραμματέα του Τομέα Μητέρας-Παιδιού Βαγγελιώ Ξυδάκη.
- Τη γραμματεία Μεταπτυχιακών Σπουδών: Κατερίνα Τζωράκη, Δέσποινα Σπυριδάκη, Σοφία Φλουρή.

Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα: Βασίλειος
Επώνυμο: Μηνάς
Πατρώνυμο: Εμμανουήλ
Ημερομηνία γεννήσεως: 11 Δεκεμβρίου 1979
Τόπος γεννήσεως: Κομοτηνή
Διεύθυνση κατοικίας: Ηράκλειο Κρήτης
Τηλέφωνο εργασίας: 281-0-394598
E-mail: minasv@med.uoc.gr

Εκπαίδευση

2003 Πτυχίο Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής
2004-2007 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής
2006-2007 Αγροτικός Ιατρός, Κέντρο Υγείας Περάματος

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά
Γερμανικά

Διακρίσεις

Διάκριση	Απονέμων Οργανισμός	Ημερομηνία
Υποτροφία κληροδοτήματος «Μανασσάκη»	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής	03/2006
Υποτροφία κληροδοτήματος «Μανασσάκη»	Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής	03/2005
Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης	Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας	11/2005
Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης	Ελληνική Εταιρεία Ενδοκρινολογίας	04/2005
Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης	European Society for Clinical Investigation	04/1005
Βράβευση εισόδου στην Ιατρική Σχολή	Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών	10/1997

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

- 1) **Minas V**, Mylonas I, Schiessl B, Mayr D, Schulze S, Friese K, Jeschke U, Makrigiannakis A (2007) Expression of the blood-group-related antigens Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x and Lewis y in term placentas of normal, preeclampsia, IUGR- and HELLP-complicated pregnancies. *Histochem Cell Biol*
- 2) Makrigiannakis A, **Minas V** (2007) Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 14: 102-109
- 3) Makrigiannakis A, Semmler M, Briese V, Eckerle H, **Minas V**, Mylonas I, Friese K, Jeschke U (2007) Maternal serum corticotropin-releasing hormone and ACTH levels as predictive markers of premature labor. *Int J Gynaecol Obstet* 97: 115-119
- 4) Bamberger CM, **Minas V**, Bamberger AM, Charalampopoulos I, Fragouli Y, Schulte HM, Makrigiannakis A (2007) Expression of urocortin in the extravillous human trophoblast at the implantation site. *Placenta* 28: 127-132
- 5) Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, Chatzaki E, **Minas V**, Gravanis A, Margioris AN (2007) The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell Mol Life Sci*
- 6) Dermitzaki E, Tsatsanis C, **Minas V**, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Venihaki M, Androulidaki A, Lambropoulou M, Spiess J, Michalodimitrakis E, Gravanis A, Margioris AN (2007) Corticotropin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals, in a CRF receptor type-specific manner. *Endocrinology* 148: 1524-1538
- 7) Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, **Minas V**, Gravanis A, Margioris AN (2006) Peripheral factors in the metabolic syndrome: the pivotal role of adiponectin. *Ann N Y Acad Sci* 1083: 185-195
- 8) Makrigiannakis A, **Minas V**, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 17: 178-185
- 9) Loutradis D, Patsoula E, **Minas V**, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, Makrigiannakis A (2006) FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Genet* 23: 177-184
- 10) Chatzaki E, **Minas V**, Zoumakis E, Makrigiannakis A (2006) CRF receptor antagonists: utility in research and clinical practice. *Curr Med Chem* 13: 2751-2760
- 11) Charalampopoulos I, Androulidaki A, **Minas V**, Chatzaki E, Tsatsanis C, Notas G, Xidakis C, Kolios G, Kouroumalis E, Margioris AN, Gravanis A (2006) Neuropeptide urocortin and its receptors are expressed in rat Kupffer cells. *Neuroendocrinology* 84: 49-57

- 12) Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, **Minas V**, Dermitzaki E, Lasaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A (2006) Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci* 1088: 139-152
- 13) Bamberger AM, **Minas V**, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Loning T, Charalampopoulos I, Brummer J, Wagener C, Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, Makrigiannakis A (2006) Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 168: 141-150
- 14) Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, **Minas V**, Gravanis A, Margioris AN (2005) Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 1254-1263
- 15) **Minas V**, Loutradis D, Makrigiannakis A (2005) Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online* 10: 205-216
- 16) Kiapekou E, Loutradis D, Patsoula E, Koussidis GA, **Minas V**, Bletsas R, Antsaklis A, Michalis S, Makrigiannakis A (2005) Prolactin receptor mRNA expression in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Reprod Biomed Online* 10: 339-346
- 17) **Minas V**, Rolaki A, Kalantaridou S, Sidiropoulos J, Mitrou S, Jeschke U, Paraskevaidis E, Fountzilias G, Chrousos GP, Pavlidis N, Makrigiannakis A. Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation (*under revision*).
- 18) **Minas V**, Jeschke U, Kalantaridou S, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K, Makrigiannakis A. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts. A role for CRH and Urocortin (*under revision*).

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- 1) **V. Minas**, AM. Bamberger, I. Charalampopoulos, CM. Bamberger, A. Makrigiannakis. Urocortin is expressed at the implantation site of the human blastocyst. 39th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI), 2005, Athens, Greece.
- 2) Xidakis C, Notas G, Charalampopoulos I, Androulidaki A, Chatzaki E, **Minas V**, Tsatsanis C, Kolios G, Margioris AN, Gravanis A, Kouroumalis E. Rat Kupffer cells express neuropeptide urocortin and its receptors: Autocrine effects on inflammatory cytokines. *Journal of Hepatology* 42: 638 Suppl. 2 Apr 2005. 40th Annual Meeting Of The European Association For The Study Of The Liver April 13–17, 2005 Paris, France.

3) A. Makrigiannakis, **V. Minas**. Factors involved in implantation. 13th World Congress on IVF Assisted Reproduction & Genetics. Istanbul, Turkey, May 26-29, 2005.

4) **V Minas**, B Schiessl, D Mayr, S Schulze, K Friese, U Jeschke, A Makrigiannakis. Expression of Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X and Lewis Y in term placentas of normal, preeclampsia-, IUGR- and Hellp-complicated pregnancies. 5th Mediterranean Congress on Reproductive Medicine, 2006 – Heraklion (Crete), Greece.

5) U Jeschke, U Karsten, A Hammer, **V Minas**, A Makrigiannakis, S Schulze, I Mylonas, K Friese. Immunohistochemical detection of oligosaccharide expression and galectin-1 binding in the human placenta. IFPA Meeting 2006 - 12th International Federation of Placenta Associations Meeting Kobe, Japan.

6) **V. Minas**, S. Sifakis, E. Augoustinakis, G. Petsas, K. Venianaki, M. Bamberger, E. Koumantakis, A. Makrigiannakis. Modulation of human trophoblast invasion through corticotropin-releasing hormone. Gynecological Endocrinology 22: Supplement Number 1, (P236) 2006. 12th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence, March 2-5, 2006.

Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

1) I. Charalampopoulos, A. Androulidaki, A. Chatzaki, **V. Minas**, C. Tsatsanis, G. Notas, K. Xidakis, G. Kolios, I. Kouroumalis, A.N. Margioris and A. Gravanis. Rat Kupffer cells express neuropeptide urocortin and its receptors: Autocrine effects on inflammatory cytokines. 56th Conference of the Greek Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2004, Larisa, Greece.

2) E. Kiapekou, D. Loutradis, E. Patsoula, A. Makrigiannakis, E. Zapanti, G. Koussidis, **V. Minas**, P. Bletsas, A. Antsaklis, S. Michalas. Expression of the Prolactin receptor in mice oocytes and pre-implantation embryos. 32nd Greek Conference of Endocrinology and Metabolism, 2005, Patra, Greece.

3) **V Minas**, I Charalampopoulos, N Avlonitis, VI Alexaki, I Lazaridis, T Calogeropoulou, C Tsatsanis, A. Margioris, E Castanas A Gravanis. Structure-specific neuroprotective effects of synthetic neurosteroid analogs: pharmacologic evaluation. 57th Conference of the Greek Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2005, Athens, Greece.

(4) **V Minas**, I Charalampopoulos, A Makrigiannakis. Corticotropin-Releasing Hormone modulates human trophoblast invasion through CEACAM-1 regulation. 57th Conference of the Greek Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2005, Athens, Greece.

(5) E. Dermitzaki, C. Tsatsanis, M. Venihaki, **V. Minas**, A. Androulidaki, I. Charalampopoulos, A. Gravanis, A.N. Margioris. Differential effects of Corticotropin-Releasing Factor receptor 1 (CRF1) and 2 (CRF2) in catecholamine secretion and production in adrenomedullary chromaffin cells. 57th Conference of the Greek Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2005, Athens, Greece.

(6) V. Zacharioudaki, C. Tsatsanis, A. Androulidaki, E. Dermitzaki, I. Charalampopoulos, **V. Minas**, A. Gravanis, A.N. Margioris. Adiponectin is a strong pro-inflammatory agent in macrophages and promotes their tolerance to pro-inflammatory stimuli, including its own. 57th Conference of the Greek Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2005, Athens, Greece.

Συντμήσεις

a-Sauv: anti-Sauvagine

ACTH: Adrenocorticotropin Hormone (Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)

AIF: Apoptosis inducing factor (Παράγοντα Επαγωγής της Απόπτωσης)

ANOVA: Analysis of variance (Ανάλυση διασποράς)

Ant: Antalarmin (Ανταλαρμίνη)

API: Activating protein 1 (Ενεργοποιητική πρωτεΐνη 1)

APS: Ammonium PerSulfate (Υπερθειικό αμμώνιο)

BH: Bcl-2 Homology Domains (Τμήματα ομόλογα της Bcl-2)

bp: base pairs

BSA: Bovine serum albumin Fraction V (Αλβουμίνη ορού βοός)

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate (Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

cDNA: copy DNA (Αντίγραφο DNA)

CEA: Carcinoembryonic antigen (Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο)

CEACAM1: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1

(Σχετιζόμενο με το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο μόριο κυτταρικής προσκόλλησης 1)

CRE: cAMP response element (Παράγοντας απάντησης στο cAMP)

CREB: cAMP response element binding protein (Πρωτεΐνη συνδεόμενη με τον παράγοντα απάντησης στο cAMP)

CRH/CRF: Corticotropin Releasing Hormone / Corticotropin Releasing Factor (Εκλυτική ορμόνη / παράγοντας της κορτικοτροπίνης)

CRFBP: CRF-Binding Protein (Συνδετική πρωτεΐνη του CRF)

CRFR: CRF Receptor (Υποδοχέας του CRF)

DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (τετραϋδροχλωρική 3,3'-διαμινοβενζιδίνη)

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole (Διχλωριούχο 4',6-Διαμιδινο-2-φαινιλινδόλη)

DD: Death Domain (Τμήμα που ενεργοποιεί τα αποπτωτικά σήματα)

DHEA: Dihydroepiandrosterone (Διυδροεπιανδροστερόνη)

DHEAS: Dihydroepiandrosterone Sulphate (Θεική Διυδροεπιανδροστερόνη)

DISC: Death Inducing Signaling Complex (Σύμπλοκο που σηματοδοτεί την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υλικό)

DMSO: Dimethyl sulfoxide (Διμεθυλσουλφοξύδιο)

DNA: Desoribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)

DNase I: Deoxyribonuclease I (Δεοξυριβονουκλεάση τύπου I)

dNTP: Deoxyribonucleoside triphosphate (Τριφωσφορικό δεοφυριβονουκλεοσίδιο)

DRs: Death receptors (Υποδοχείς θανάτου)

DTT: Dithiothreitol (Διθειοθρεϊτόλη)

ECL: Enhanced Chemiluminescence (Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)

ECM: Extracellular matrix (Εξωκυττάρια ουσία)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

ELISA: Ezyme-linked immunoabsorbent assay (Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση)

ETP: Elective termination of pregnancy (Επιλεκτική διακοπή κύησης)

EVT: Extravillous trophoblast (Εξωλαχνωτή τροφοβλάστη)

FACS: Fluorescence activated cell sorter (Κυτταρομετρητής ροής)

FADD: Fas-associated death domain (Σχετιζόμενη με το Fas αλληλουχία κυτταρικού θανάτου)

FasL: Fas Ligand (Προσδέτης του Fas υποδοχέα)
FBS: Fetal bovine serum (Ορός εμβρύου βοός)
FCS: Fetal Calf Serum (Ορός εμβρύου βοός)
FITC: Fluorescein isothiocyanate (Ισοθειοκυανιούχος φλουοροσκεΐνη)
FSH: Follicle stimulating hormone (θυλακιοτρόπου ορμόνης)
GnRH: Gonadotropin releasing hormone (Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών)
GPCRs: G-protein coupled receptors (Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη υποδοχείς)
HBSS: Hanks Balanced Salt Solution (Διάλυμα αλάτων)
hCG: Human chorionic gonadotropin (Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη)
HELLP: Hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count syndrome (Σύνδρομο αιμόλυσης, αυξημένων ηπατικών ενζύμων και μειωμένων αιμοπεταλίων)
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (N-2 υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ)
HGPRT: Hypoxanthine-guanine-phospho-ribosyl transferase (Υποξανθίνο-γουανίνο-φωσφο-ρυβοσλική τρανσφεράση)
HRP: Horseradish Peroxidase (Υπεροξειδάση του ραπανιού)
hyEVT: Hybridoma EVT (Υβριδική εξωλαχνωτή τροφοβλάστη)
I: Ionomycin (Ινομυκίνη)
IKK: Inhibitor of nuclear factor kB kinase (Ανασολέας της κινάσης του NFkB)
IL: Interleukin (Ιντερλευκίνη)
IFN-γ: Interferon-γ (Ιντερφερόνη-γ)
Ins(1,4,5)P3: Tri-phosphate inositol (τριφωσφορική ινοσιτόλη)
IRS: Immuno-reactive score (Ανοσοδραστική βαθμολογία)
IUGR: Intrauterine growth retardation (Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης)
kb: kilobases
kDa: Kilodalton
KGM: Keratinocyte Growth Medium (Θρεπτικό υλικό)
LH: Leutenizing hormone (ωχρινοτρόπος ορμόνη)
LHRH: Luteinizing Hormone –Releasing Hormone (Εκλυτική Ορμόνη της Ωχρινοποιητικής Ορμόνης)
LPS: Lipopolysacharide (Λιποπολυσακχαρίτης)
mAbs: Monoclonal antibodies (Μονοκλωνικά αντισώματα)
MAP: Mitogen Activated Protein (Πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες)
MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα)
MFI: Mean fluorescent intensity (Μέση ένταση φθορισμού)
MHC-I: Major Histocompatibility Complex I (Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας κλάσης I)
MMPs: Matrix metalloproteinases (Πρωτεάσες που διασπούν τη μεσοκυττάρια ουσία)
mRNA: messenger RNA (Αγγελιοφόρο RNA)
NFkB: Nuclear Factor kB (Πυρηνικός παράγοντας kB)
NK cells: Natural killer cells (Κύτταρα φυσικοί φονείς)
NO: Nitric Oxide (Ελεύθερη ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου)
OD: Optical Density (Οπτική πυκνότητα)
PBS: Phosphate Buffer Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
PGE₂: Prostaglandin E₂ (Προσταγλανδίνη E₂)
PI: Propidium Iodide (Ιωδιούχο προπίδιο)

PKA: Protein kinase A (Πρωτεϊνική κινάση Α)
PKC: Protein kinase C (Πρωτεϊνική κινάση C)
PLC: Phospholipase C (Φωσφολιπάση C)
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride (Φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο)
POMC: Proopiomelanocortin (προ-οπιο-μελανοκορτίνη)
Real-time PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου
RNA: Ribonucleic Acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
RPM: Rounds per min. (Στροφές ανά λεπτό)
RPMI: RPMI Medium 1640 (Θρεπτικό υλικό)
RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (Μέθοδος εκλεκτικής επέκτασης του DNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης)
SD: Standard deviation of means (Τυπική απόκλιση μέσων όρων)
SDS: Sodium dodecyl sulfate (Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου)
SE: Standard error of mean (Τυπικό σφάλμα μέσων όρων)
TBS-T: Tris buffered saline-Tween (Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween)
TdT: (Δεοξυνουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση)
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (N,N,N',N'-Τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη)
Th: T helper (βοηθητικά T λεμφοκύτταρα)
TNF: Tumor Necrosis Factor (Ογκονεκρωτικός παράγοντας)
TNF α : Tumor Necrosis Factor α (Ογκονεκρωτικός παράγοντας α)
TNFR: TNF Receptor (Υποδοχέας του TNF)
TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Τρις-υδροξυ μεθυλ αμινομεθάνιο)
TRITC: Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (Τετρα-μεθυλ-ροδαμινο-ισο-θειοκυανίδιο)
TPA: Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
Triton: t-Octylphenoxypropoxyethanol (t-Οκτυλ φαινοξυ πολυαιθοξυ αιθανόλη)
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling
U: Units (Μονάδες)
uNK: Uterine natural killer cells (Μητριαία κύτταρα φυσικοί φονείς)
UCN: Urocortin (Ουροκορτίνη)
ΕΛΤ: Εξωλαχνωτή τροφοβλάστη
ΘΔ: Θερμοκρασία δωματίου
ΥΥΓ: Υποθαλαμο-υποφυσιο-γοναδικός άξονας
ΥΥΕ: Υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακός άξονας

Περίληψη

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) και τα ομόλογά του πεπτιδία ουροκορτίνες (UCNI, UCNI^{II}, UCNI^{III}) αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές και συντονιστές των συμπεριφορικών, ενδοκρινικών και ανοσολογικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι στο στρες. Οι δράσεις τους διαμεσολαβούνται μέσω δύο κύριων τύπων υποδοχέων των CRFR1 και CRFR2. Τα πεπτιδία και οι υποδοχείς τους εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και σε πλήθος ιστών της περιφέρειας, συμπεριλαμβανομένου σχεδόν του συνόλου των ιστών της αναπαραγωγικής οδού.

Ο βιολογικός ρόλος του «αναπαραγωγικού» συστήματος των CRF πεπτιδίων μελετάται και προσδιορίζεται τα τελευταία χρόνια. Μέχρι στιγμής έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή των πεπτιδίων, ως παρακρινείς και αυτοκρινείς ρυθμιστές, σε σημαντικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος όπως η ωορρηξία, η ωχρινοποίηση, η εμφύτευση της βλαστοκύστης, η φθαρτοποίηση του στρώματος του ενδομητρίου, η λειτουργία της εμβryo-πλακουντιακής κυκλοφορίας και η έναρξη του τοκετού. Επίσης προτείνεται ότι τοπική δυσλειτουργία του συστήματος των CRF πεπτιδίων μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές των ανωτέρω διαδικασιών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος των πεπτιδίων CRF και CEACAM1 στη φυσιολογία της τροφοβλαστικής διείσδυσης καθώς και ο ρόλος των πεπτιδίων CRF, Ucn και των προ-αποπτωτικών Fas/FasL, στην διαταραχή της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης, όπως αυτή εκδηλώνεται κλινικά με τις αυτόματες αποβολές. Η μελέτη επεκτάθηκε στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης εξωλαχνωτής τροφοβλάστης (ΕΛΤ) και φθαρτικών λεμφοκυττάρων ως πιθανό στοιχείο των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που συνθέτουν την παθοφυσιολογία αυτής της κλινικής οντότητας.

Διαπιστώθηκε ότι ο CRF ελαττώνει τη διεισδυτική ικανότητα απομονωμένων κυττάρων ΕΛΤ. Η δράση αυτή ήταν ειδική μέσω του CRFR1 υποδοχέα και οφειλόταν σε ελάττωση της έκφρασης του διασυνδευτικού μορίου CEACAM1 στην επιφάνεια των κυττάρων. Αποκλεισμός της λειτουργίας του CEACAM1 στα ίδια κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση της διεισδυτικότητάς τους. Επίσης χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά εξωλαχνωτών τροφοβλαστών που δεν

εκφράζει το CEACAM1 μόριο. Διαμόλυνση των κυττάρων αυτών με το *CEACAM1* γονίδιο, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της διεισδυτικής τους ικανότητας.

Η UCN εκφράζεται στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου και συγκεκριμένα στην ΕΛΤ σε φυσιολογικούς πλακούντες πρώτου τριμήνου. Οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση CRF και UCN στη θέση εμφύτευσης, αυξημένη έκφραση FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού και αυξημένη έκφραση Fas στην ΕΛΤ. Τα ανωτέρω μόρια μελετήθηκαν σε επίπεδο πεπτιδίου και mRNA. Επιπρόσθετα, οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση της διάμεσης ΕΛΤ. Τέλος, τα πεπτίδια CRF και UCN ενισχύουν την ικανότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση στην κυτταρική σειρά εξωλαχνωτής τροφοβλάστης.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή παρουσιάζει νέα δεδομένα στο ρόλο των CRF και UCN στην εμφύτευση της ανθρώπινης βλαστοκύστης και την ακόλουθη πλακουντιοποίηση, καθώς και στην διαταραχή των διαδικασιών αυτών.

Summary

The corticotropin-releasing factor (CRF) and its family molecules the urocortins (UCNI, UCNII, UCNIII) are the major regulators and coordinators of the behavioral, endocrine and immune responses of the human organism to stress. The effects of these peptides are mediated by two types of receptors the CRFR1 and CRFR2. The peptides and their receptors are localized in the central nervous system, as well as in a variety of peripheral tissues, including almost all of the tissues of the reproductive tract.

The biological role of the “reproductive” CRF system is under investigation. The peptides have been found to participate as paracrine and/or autocrine modulators in important functions of the reproductive system, such as ovulation, lutealization, blastocyst implantation, decidualization, function of embryo-placental circulation and parturition. In addition, defects of the local CRF system, is thought to be involved in the pathophysiology of the above functions.

In the present study, the role of CRF and CEACAM1 peptides in the physiology of trophoblast invasion as well as the role of CRF, UCN and pro-apoptotic Fas/FasL peptides in implantation failure were investigated. The study also examined the effect of decidual lymphocytes on extravillous trophoblasts (EVT) as a potential element of the cellular and molecular mechanisms involved in the pathophysiology of miscarriages.

The data presented here, report that CRF reduces the invasive potential of isolated EVT cells. This effect was mediated by CRFR1 and was owed to down-regulation of the expression of the adhesion molecule CEACAM1 in the surface of the cells. Blocking of CEACAM1 in the same cells resulted to significant reduction of their invasiveness. In addition, an EVT-based cell line which does not express CEACAM1 was employed. Transfection of these cells with the *CEACAM1* gene, led to significant increase of their invasiveness.

Next, the following findings were reported. UCN is expressed at the implantation site of the human embryo and more specifically in the EVT of 1st trimester normal placentas. Spontaneous abortion in human is associated with increased expression of CRF and UCN at the implantation site, increased expression of FasL in the decidual leukocytes and increased expression of Fas in EVT cells. The

aforementioned molecules were examined both at the level of transcript and translational products. In addition, spontaneous abortions are associated with increased apoptosis of interstitial EVT cells. Finally, the CRF and UCN peptides augment the ability of decidual lymphocytes to induce Fas-mediated apoptosis in the EVT-based cell line.

In conclusion, the present study reports novel findings on the role of CRF and UCN in human blastocyst implantation and subsequent placentation, as well as in the impairment of the above procedures.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Το αναπαραγωγικό σύστημα του θήλεως	2
1.1.1. Γενικά	2
1.1.2. Η μήτρα και το ενδομήτριο	2
1.1.3. Η φυσιολογία του καταμήνιου κύκλου	3
1.2. Η εμφύτευση της βλαστοκύστης και η πλακουντιοποίηση	7
1.2.1. Η γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια ανάπτυξης	7
1.2.2. Το εμβρυομητρικό όριο	11
1.2.2.1. Γενικά	11
1.2.2.2. Τα κύτταρα του εμβρυομητρικού ορίου	13
1.3. Οι αυτόματες αποβολές	16
1.3.1. Γενικά	17
1.3.2. Αιτιολογικοί παράγοντες και κλινική κατάταξη	18
1.3.3. Παθοφυσιολογία	18
1.4. Η Απόπτωση	21
1.4.1. Τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης	21
1.4.2. Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης	24
1.4.2.1. Τα κύρια μοριακά μονοπάτια της απόπτωσης	24
1.4.2.2. Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών	25
1.4.2.3. Το σύστημα Fas/FasL	27
1.4.2.4. Οι κασπάσες	28
1.4.3. Η απόπτωση στην τροφοβλάστη	29
1.4.3.1. Η απόπτωση στην λαχνωτή τροφοβλάστη	29
1.4.3.2. Η απόπτωση στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη	30
1.5. Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων και οι υποδοχείς τους	31
1.5.1. Γενικά	31
1.5.2. Ο παράγοντας έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRF)	32
1.5.3. Οι ουροκορτίνες (UCNs)	32
1.5.4. Χαρακτηριστικά και ρύθμιση των γονιδίων CRF και UCN	33
1.5.5. Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων (CRFRs, CRF-BP)	34

1.5.5.1. Γενικά	34
1.5.5.2. Ο CRFR1	34
1.5.5.3. Ο CRFR2	35
1.5.5.4. Η CRFBP	37
1.5.5.5. Σηματοδότηση μέσω των CRFRs	37
1.5.6. Τα CRF πεπτίδια και οι υποδοχείς τους στον πλακούντα	38
1.5.6.1. Έκφραση στον πλακούντα	38
1.5.6.2. Συμμετοχή στη φυσιολογία του πλακούντα	40
1.5.6.3. Συμμετοχή στη παθοφυσιολογία του πλακούντα	43
1.6. Τα διασυνδεδετικά μόρια	45
1.6.1. Γενικά	45
1.6.2. Το CEACAM1	45
2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ	47
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
3.1. Βιολογικά υλικά	51
3.1.1. Υλικά και συσκευές για το χειρισμό των βιολογικών υλικών	51
3.1.2. Ανθρώπινοι πλακούντες	51
3.1.3. Κυτταρικές σειρές	52
3.1.3.1. Κυτταρική σειρά ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG-3	52
3.1.3.2. Κυτταρική σειρά ανθρώπινης εξωλαχνωτής τροφοβλάστης AC1M88	53
3.1.4. Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες	54
3.1.4.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός του ανθρώπινου πληθυσμού ΕΛΤ.	54
3.1.4.2. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των ανθρωπίνων φθαρτικών λεμφοκυττάρων.	55
3.2. Μέθοδοι	56
3.2.1. Έμμεση ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης	56
3.2.2. Έμμεση ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα AC1M88	58
3.2.3. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα πρωτογενών καλλιιεργειών και μονιμοποιημένους ιστούς και μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy).	59
3.2.4. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot Analysis)	61
3.2.5. Κυτταρομετρία ροής για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών	66
3.2.6. Παροδικές διαμολύνσεις των AC1M88 κυττάρων	67

3.2.7. Μελέτες διεισδυτικότητας	68
3.2.8. Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης.	69
3.2.8.1. Μέθοδος ApoPercentage	69
3.2.8.2. Χρώση με Ανεξίνη V και Ιωδιούχο Προπίδιο	71
3.2.8.3. Μέθοδος TUNEL	72
3.2.8.4. Μέθοδος M30	74
3.2.9 Απομόνωση RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα και ομογενοποιημένους ιστούς	75
3.2.10. Μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	76
3.2.11. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού χρόνου (Real time PCR)	78
3.2.12. Ανάλυση του υποκινητή της UCN	79
3.2.13. Στατιστική ανάλυση	80
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
4.1. Η επίδραση του CRF στη διεισδυτική ικανότητα της ανθρώπινης τροφοβλάστης.	82
4.1.1. Ο CRF ελαττώνει τη διεισδυτικότητα των EVT κυττάρων μέσω του CRFR1	82
4.1.2. Ο CRF ελαττώνει την έκφραση της πρωτεΐνης CEACAM1 στους ΕΛΤ μέσω του CRFR1	83
4.1.3. Το CEACAM1 αυξάνει τη διεισδυτικότητα των AC1M88 κυττάρων	85
4.1.4. Η αναστολή της λειτουργίας του CEACAM1 προκαλεί ελάττωση της διεισδυτικότητας της ΕΛΤ	88
4.2. Η έκφραση της UCN στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου	89
4.2.1. Το πεπτίδιο της UCN εκφράζεται στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου	89
4.2.2. Το πεπτίδιο και mRNA της UCN εκφράζονται σε απομονωμένους ΕΛΤ	92
4.2.3. Ο υποκινητής της urocortin ενεργοποιείται από την TPA/ιονομυκίνη	93
4.3. Οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση CRH και UCN στη θέση εμφύτευσης, αυξημένη έκφραση FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού και απόπτωση των ΕΛΤ	93
4.3.1. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη έκφραση των CRF και UCN στο εμβryo-μητρικό όριο	93
4.3.2. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα των μεταγραφημάτων των πλακουντιακών FasL και Fas	96
4.3.3. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με την εμφάνιση του FasL πεπτιδίου στα φθαρτικά λευκοκύτταρα καθώς και με αυξημένη έκφραση του Fas πεπτιδίου στα κύτταρα ΕΛΤ	96
4.3.4. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση	99

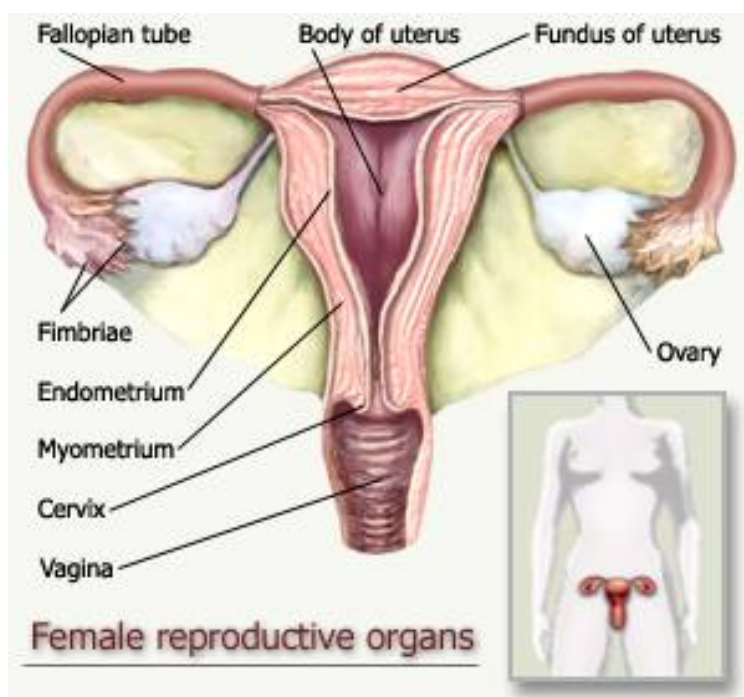
της διάμεσης ΕΛΤ	
4.3.5. Τα πεπτίδια CRF και UCN επάγουν την έκφραση του FasL σε φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονωμένα από πλακούντες από διακοπές κνήσεως μέσω του CRFR1	103
4.3.6. Τα πεπτίδια CRF και UCN ενισχύουν την ικανότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων από διακοπές κνήσεως να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση των AC1M88 κυττάρων (hyEVT)	106
4.3.7. Τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα που απομονώνονται από πλακούντες αποβολών επάγουν ισχυρά την απόπτωση των AC1M88 κυττάρων	108
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112
5.1. Γενικά	113
5.2. Ο CRF τροποποιεί τη διεισδυτική ικανότητα της ΕΛΤ μέσω ρύθμισης της έκφρασης του μορίου CEACAM1.	114
5.3. Η UCN εκφράζεται στην ΕΛΤ στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου.	118
5.4. Οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση CRH και UCN στη θέση εμφύτευσης, αυξημένη έκφραση FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού και αυξημένη έκφραση Fas στους ΕΛΤ.	121
5.5. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση της διάμεσης ΕΛΤ.	122
5.6. Τα πεπτίδια CRF και UCN ενισχύουν την ικανότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση σε μια κυτταρική σειρά ΕΛΤ.	124
5.7. Προοπτικές.	133
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το αναπαραγωγικό σύστημα του θήλεως

1.1.1. Γενικά

Το γεννητικό σύστημα της γυναίκας απαρτίζεται από τα έσω και έξω γεννητικά όργανα. Τα έξω αποτελούνται από το αιδοίο, δηλαδή τα μικρά και μεγάλα χείλη του αιδοίου και την κλειτορίδα ενώ τα έσω περιλαμβάνουν τις ωοθήκες, τους ωαγωγούς, τις σάλπιγγες, την μήτρα και τον κόλπο (**Εικόνα 1**).

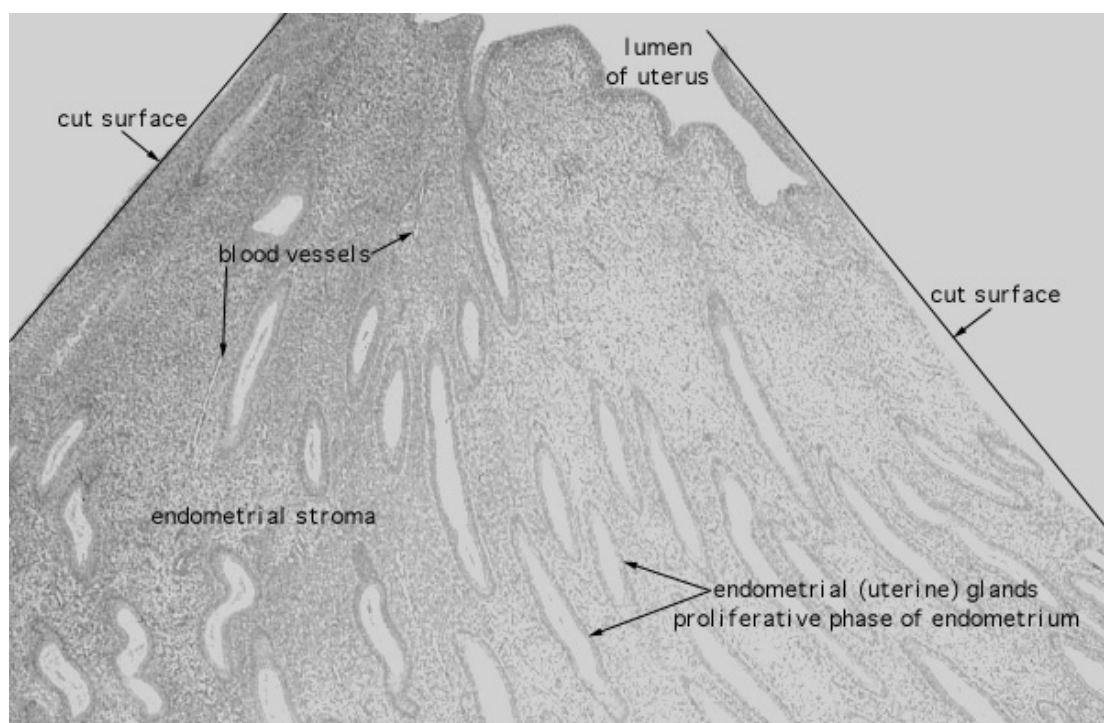


Εικόνα 1. Τα γυναικεία έσω αναπαραγωγικά όργανα.

1.1.2. Η μήτρα και το ενδομήτριο

Η μήτρα είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο. Το τοίχωμά του ονομάζεται μυομήτριο και σχηματίζεται από τρεις στιβάδες λείων μυϊκών ινών. Η κοιλότητα της μήτρας επενδύεται από βλενογόνο χιτώνα, το ενδομήτριο. Το ενδομήτριο αποτελείται από στρώμα και αδένες με κυλινδρικό αδενικό επιθήλιο. Χωρίζεται σε τρεις στιβάδες, τη βασική, τη διάμεση και την επιφανειακή. Η επιφανειακή στιβάδα

αποτελείται από κυλινδρικό επιθήλιο, οι σωληνωειδείς καταδύσεις του οποίου προς το ενδομήτριο σχηματίζουν τους αδένες του ενδομητρίου (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Βιοψία του ενδομητρίου (παραγωγική φάση) στην οποία παρουσιάζονται οι σωληνωειδείς καταδύσεις του επιθηλίου που σχηματίζουν τους ενδομήτριους αδένες (βέλη κάτω δεξιά).

1.1.3. Η φυσιολογία του καταμήνιου κύκλου

Στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, τα αναπαραγωγικά όργανα υφίστανται κυκλικές αλλαγές κάτω από τον έλεγχο του υποθαλαμο-υποφυσιακο-γοναδικού άξονα (ΥΥΓ άξονας). Ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (gonadotropin releasing hormone, GnRH). Η GnRH ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών, δηλαδή της ωχρινοτρόπου (leutenizing hormone, LH) και της θυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone FSH) από την υπόφυση. Οι τελευταίες προάγουν την ωρίμανση των ωαρίων και διεγείρουν την παραγωγή οιστρογόνων και προγεστερόνης από τις ωοθήκες. Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη με τη σειρά τους δρουν στα όργανα στόχους του αναπαραγωγικού συστήματος (δηλαδή τους μαστούς, τη μήτρα και τον κόλπο) και προκαλούν τις

αλλαγές που συνιστούν τον καταμήνιο κύκλο. Ένας τυπικός κύκλος διαρκεί 28 ημέρες και φυσιολογικά χωρίζεται σε τρεις φάσεις.

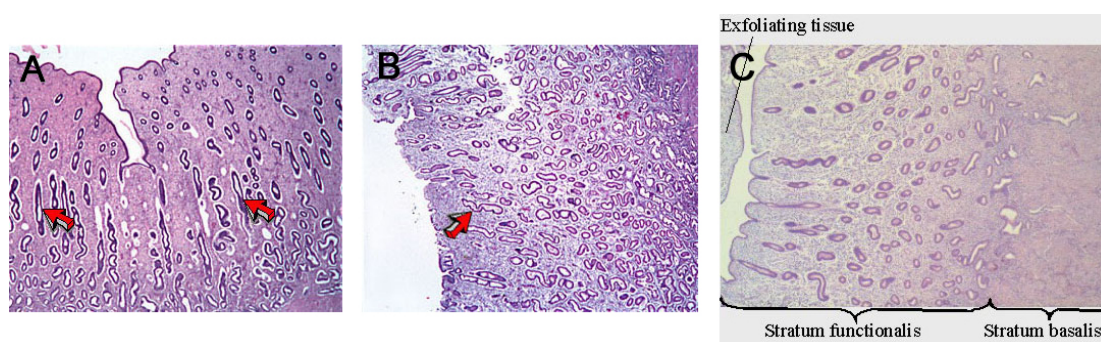
(α) Η θυλακιώδης φάση διαρκεί από την πρώτη ημέρα της εμμηνου ρύσεως έως την ημέρα πριν από την προ-ωορρηκτική αιχμή της LH. Κατά το πρώτο μισό αυτής της φάσης, η έκκριση της FSH από την υπόφυση αυξάνει ελαφρά, προκαλώντας έτσι την ανάπτυξη ενός αριθμού ωοθυλακίων (3 έως 30). Καθώς τα επίπεδα της FSH στο πλάσμα ελαττώνονται, ένα ωοθυλάκιο επιλέγεται για ωορρηξία και εξακολουθεί να ωριμάζει ενώ τα υπόλοιπα υφίστανται ατρησία. Παράλληλα τα επίπεδα της LH στο πλάσμα αυξάνουν με αργό ρυθμό ενώ η έκκριση προγεστερόνης και οιστρογόνων από τις ωοθήκες παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Επτά ημέρες πριν από την αιχμή της LH η έκκριση των οιστρογόνων από το επιλεγμένο ωοθυλάκιο αυξάνει σημαντικά μέχρι την ημέρα της αιχμής της LH. Νωρίς στην αρχή της θυλακιώδους φάσης το ενδομήτριο είναι λεπτό (περίπου 2 mm), με στενούς ευθύς αδένες και πυκνό στρώμα. Οι ανώτερες στιβάδες του ενδομητρίου έχουν αποπέσει, γεγονός που εκδηλώνεται ως έμμηνος ρύση. Κάτω από τη δράση των αυξανόμενων επιπέδων των οιστρογόνων το ενδομήτριο εισέρχεται στη λεγόμενη παραγωγική φάση. Η βασική στιβάδα του ενδομητρίου δίνει, με εκτεταμένες μιτώσεις, γένεση σε νέο ιστό, την λειτουργική στιβάδα. Το ενδομήτριο φτάνει σε πάχος τα 11 mm, οι αδένες του επιμηκύνονται και συσπειρώνονται (**Εικόνα 3A**).

(β) Η φάση της ωοθυλακιωρρηξίας λαμβάνει χώρα την 14η ημέρα ενός τυπικού κύκλου. Η υπόφυση απελευθερώνει στη κυκλοφορία μεγάλη ποσότητα της LH, με αποτέλεσμα την πλήρη ωρίμανση του ωοθυλακίου και την ωορρηξία 36 με 48 ώρες μετά την αιχμή της LH.

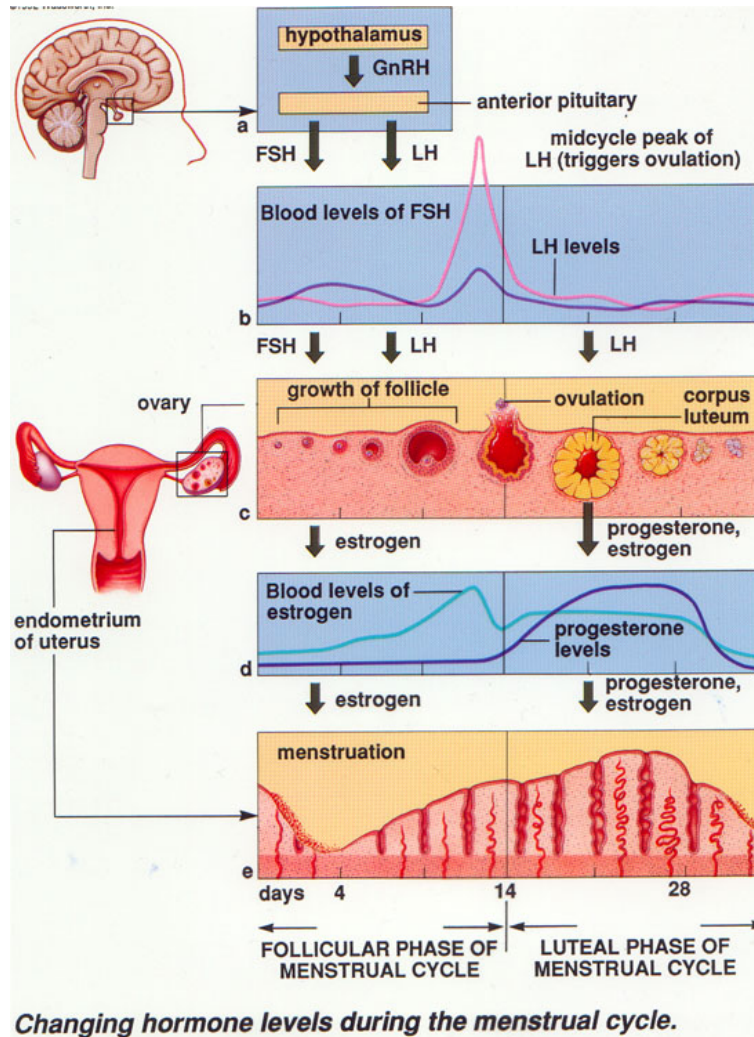
(γ) Στην τρίτη ωχρινική φάση του κύκλου, το ωοθυλάκιο οργανώνεται για να σχηματίσει το ωχρο σωματίο. Το ωχρο σωματίο παράγει προγεστερόνη και οιστρογόνα για 14 περίπου ημέρες. Στη φάση αυτή η προγεστερόνη δρα στο ενδομήτριο και το προετοιμάζει για να δεχθεί τη βλαστοκύστη στη περίπτωση που συμβεί γονιμοποίηση του ωαρίου. Κατά την εκκριτική -όπως καλείται για το ενδομήτριο- αυτή φάση, οι αδένες διατείνονται, εκκρίνουν πλήθος ουσιών, η αγγειοβρίθεια του οργάνου αυξάνει και το στρώμα αρχίζει να διαφοροποιείται προς φθαρτό (**Εικόνα 3B**). Εάν δεν συμβεί γονιμοποίηση, το ωχρο σωματίο υποστρέφει σχηματίζοντας το ανενεργό λευκό σωματίο. Η δράση της προγεστερόνης στο ενδομήτριο παύει, το στρώμα γίνεται οίδηματώδες, η λειτουργική στιβάδα του

ενδομητρίου και οι αδένες της νεκρώνονται, αποπίπτουν και ακολουθεί η έμμηνος ρύση και ένας νέος κύκλος (**Εικόνα 3C**).

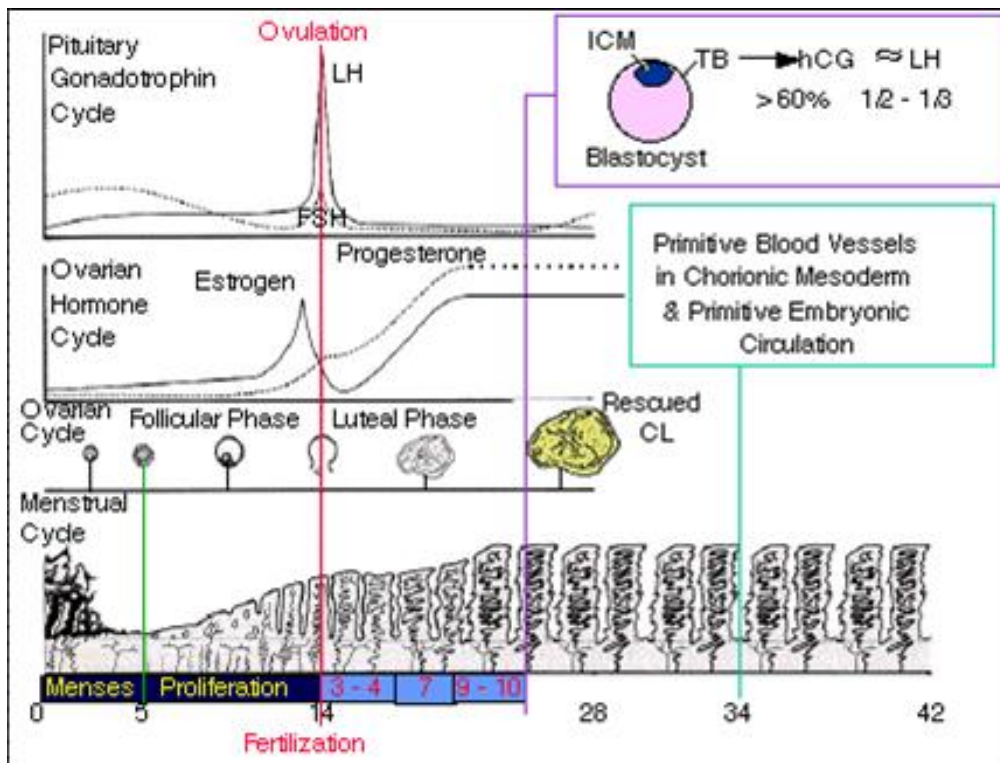
Στην περίπτωση που υπάρξει εγκυμοσύνη, οι ιστοί του αναπτυσσόμενου κήματος παράγουν την χοριακή γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotropin, hCG). Η ορμόνη αυτή αποτελεί το εμβρυικό σήμα που ειδοποιεί τον μητρικό οργανισμό ότι η εγκυμοσύνη έχει αρχίσει. Η hCG δρα στο ωχρό σωματίδιο διατηρώντας το σε λειτουργική κατάσταση, με αποτέλεσμα η απαραίτητη για τη διατήρηση της κύησης παραγωγή προγεστερόνης και οιστρογόνων να συνεχίζεται μέχρι τον τοκετό (**Εικόνες 4, 5**).



Εικόνα 3. Ιστολογική εικόνα του ενδομητρίου. (A) Παραγωγική φάση, (B) Εκκριτική φάση, (C) 1η ημέρα της εμμήνου ρήσεως: διακρίνεται η βασική και λειτουργική στιβάδα του ενδομητρίου (stratum functionalis και stratum basalis αντίστοιχα), καθώς επίσης ένα τμήμα της λειτουργικής στιβάδας που αποπίπτει (αριστερά). Τα βέλη δείχνουν ενδομήτριους αδένες.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της φυσιολογίας του τυπικού καταμήνιου κύκλου, διάρκειας 28 ημερών. Από πάνω προς τα κάτω απεικονίζονται η λειτουργία του υποθαλάμου, τα επίπεδα των γοναδοτροπινών της υποφύσεως στο πλάσμα, οι αλλαγές του ωθηλακίου στην ωθήκη, τα επίπεδα των στεροειδών της ωθήκης στο πλάσμα και οι αλλαγές του ενδομητρίου.



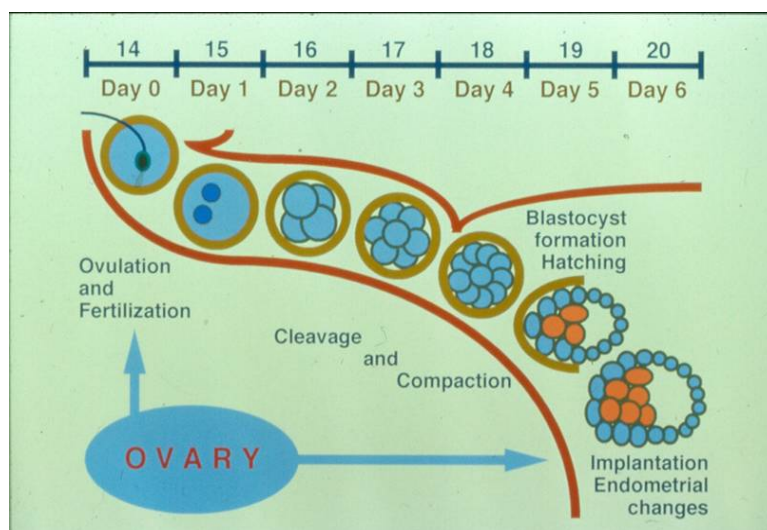
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού κύκλου που διακόπτεται από εγκυμοσύνη. Η γονιμοποίηση του ωαρίου συμβαίνει τη 14η ημέρα του κύκλου, η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο ενδομήτριο την 10 ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και σχεδόν αμέσως αρχίζει η παραγωγή hCG από την τροφοβλάστη (TB).

1.2. Η εμφύτευση της βλαστοκύστης και η πλακουντιοποίηση

1.2.1. Η γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια ανάπτυξης

Μετά την ωορρηξία το ωάριο μετακινείται μέσω τις σάλπιγγας της σύστοιχης ωοθήκης προς τη μήτρα. Εάν συμβεί συνουσία στον κατάλληλο χρόνο, το ωάριο γονιμοποιείται από τα σπερματοζώαρια μέσα στη σάλπιγγα 24 με 48 ώρες μετά την ωορρηξία. Συνεπώς, τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του κήματος, από τον ζυγώτη (γονιμοποιημένο ωάριο) έως το μορίδιο (στάδιο των 16 κυττάρων), επισυμβαίνουν καθώς το κήτημα κατέρχεται στον ωαγωγό. Στο στάδιο αυτό το κήτημα περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη, ένα προστατευτικό κάλυμμα που εμποδίζει τη προσκόλληση του αναπτυσσόμενου εμβρύου στο τοίχωμα των ωαγωγών. Το μορίδιο εισέρχεται στη κοιλότητα της μήτρας περίπου 2-3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Η εμφάνιση της

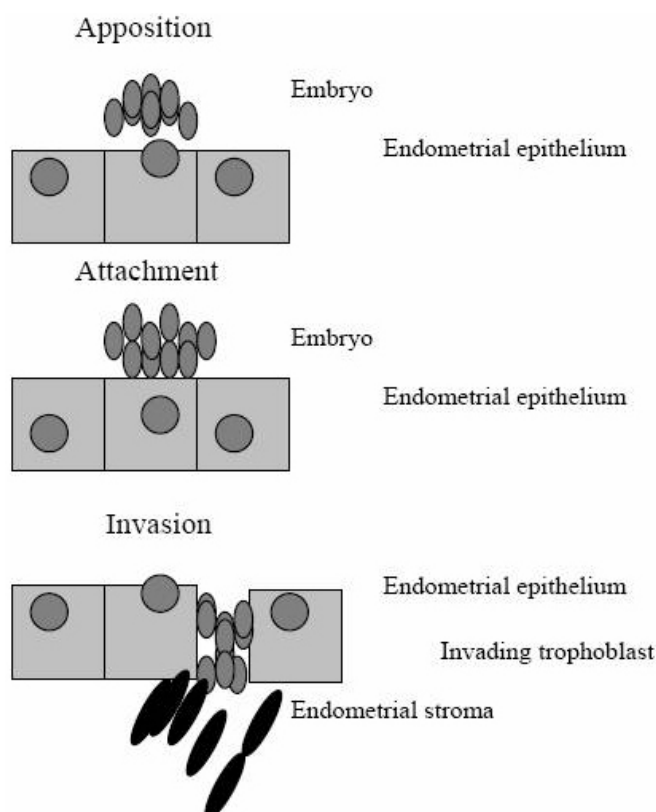
γεμάτης υγρό εσωτερικής κοιλότητας ανάμεσα στη κυτταρική μάζα σηματοδοτεί τη μετάβαση του εμβρύου από το στάδιο του μοριδίου σε αυτό της βλαστοκύστης. Αυτό το γεγονός συνοδεύεται από τη διαφοροποίηση των εμβρυικών κυττάρων σε τροφοβλάστη και σε έσω κυτταρική μάζα. Η πρώτη θα δώσει γένεση στις εξωεμβρυικές δομές συμπεριλαμβανομένου του πλακούντα, ενώ η δεύτερη θα σχηματίσει το έμβρυο. Η τροφοβλάστη διαφοροποιείται περαιτέρω προς συγκυτιοτροφοβλάστη προς τα έξω και κυτταροτροφοβλάστη προς τα έσω. Μέσα σε 72 ώρες από την είσοδο της βλαστοκύστης στη κοιλότητα της μήτρας, η διαφανής ζώνη απομακρύνεται και αποκαλύπτεται το εξωτερικό περίβλημα της βλαστοκύστης αποτελούμενο από ένα μονό στοίχο συγκυτίου (πολυπυρηνικός σχηματισμός) την συγκυτιοτροφοβλάστη (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Η πρώτη εβδομάδα της κύησης. Το κύημα κατέρχεται τον ωαγωγό και εμφυτεύεται στη μήτρα την 6η-7η ημέρα μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου.

Η εμφύτευση της βλαστοκύστης στη μήτρα συμβαίνει περίπου 6 με 7 ημέρες μετά από τη γονιμοποίηση. Σε αντιστοιχία με ό,τι έχει διαπιστωθεί σε πολλά είδη πρωτεύοντων, η εμφύτευση στον άνθρωπο περιλαμβάνει τρία στάδια (**Εικόνα 7**). Το πρώτο ονομάζεται επίθεση (apposition) και είναι η αρχική, ασταθής προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Η προσκόλληση επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση μικρολαχνών της επιφάνειας της συγκυτιοτροφοβλάστης με μικροπροσεκβολές της επιφάνειας του επιθηλίου της μήτρας, γνωστές ως πινοπόδια. Η απόθεση, και συνεπώς η εμφύτευση, συνήθως συμβαίνουν στο άνω και πρόσθιο

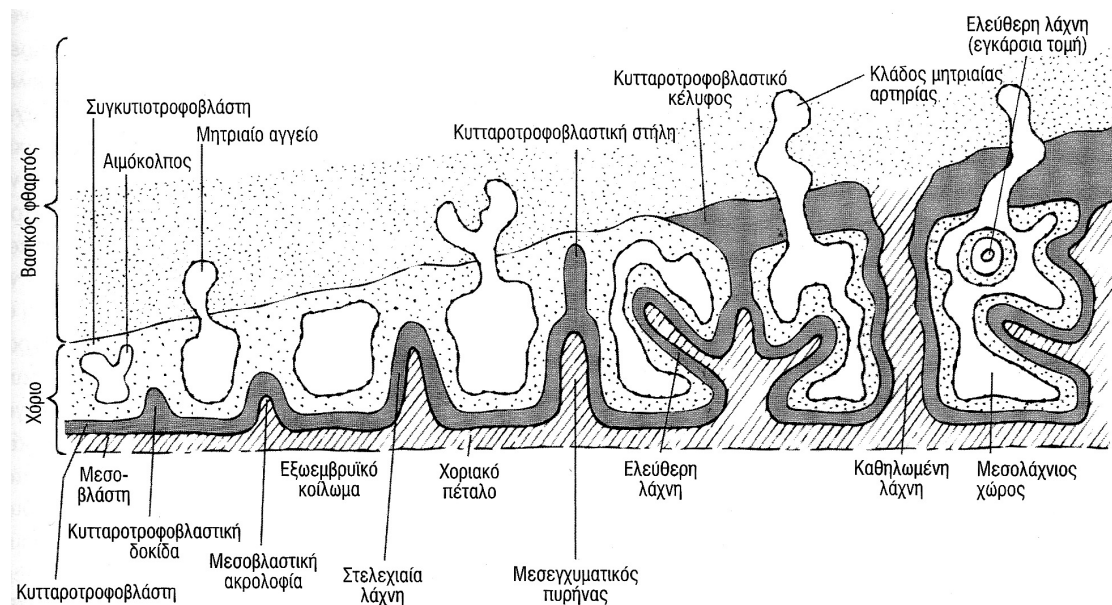
τοίχωμα της μήτρας. Το δεύτερο στάδιο, η σταθερή προσκόλληση (attachment), χαρακτηρίζεται από αυξημένη φυσική αλληλεπίδραση ανάμεσα στη βλαστοκύστη και το επιθήλιο της μήτρας. Σύντομα μετά το στάδιο αυτό, η συγκυτιοτροφοβλάστη διαπερνά το επιθήλιο της μήτρας και αρχίζει η διείσδυση (invasion). Όταν η διαδικασία της εμφύτευσης φτάνει στο τελευταίο αυτό στάδιό της, ο εμβρυικός πόλος της βλαστοκύστης έχει ήδη στραφεί προς το ενδομήτριο (Hertig et al, 1959).



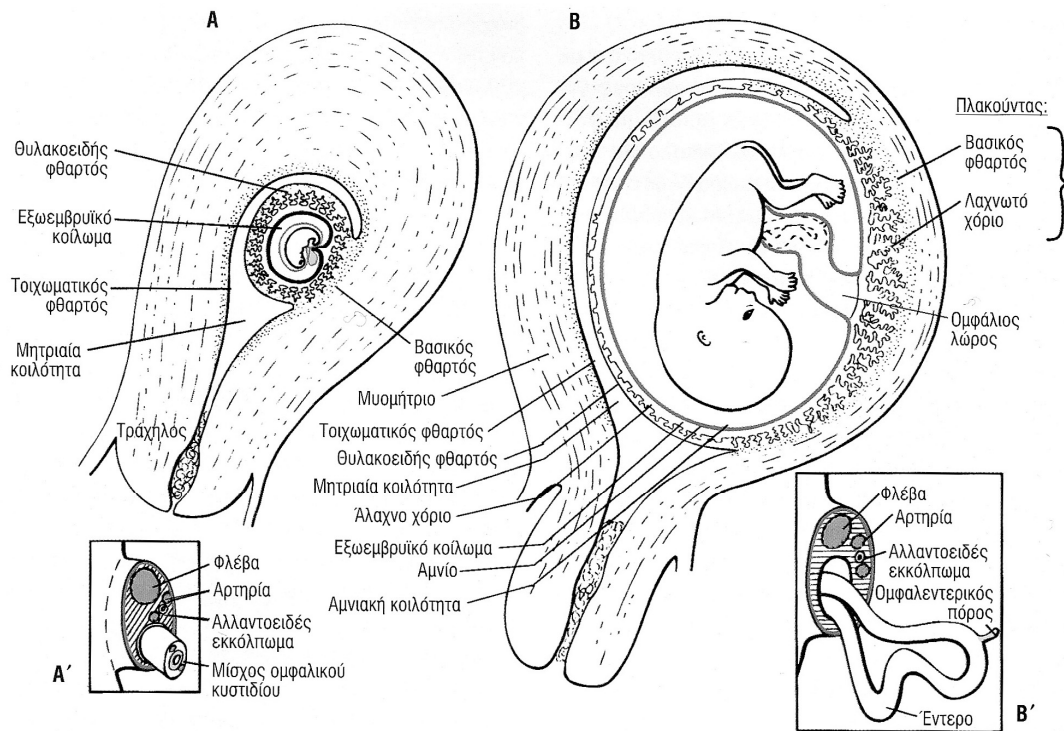
Εικόνα 7. Τα τρία στάδια της εμφύτευσης. Από πάνω προς τα κάτω επίθεση (apposition), σταθερή προσκόλληση (attachment) και διείσδυση (invasion).

Κατά την 10η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η βλαστοκύστη έχει πλήρως εμφυτευτεί μέσα στο στρωματικό ιστό (φθαρτός) του ενδομητρίου και το επιθήλιο έχει αναπτυχθεί εκ νέου για να επικαλύψει τη θέση της εμφύτευσης. Από την 10η ημέρα έως και την ολοκλήρωση των τριών πρώτων εβδομάδων της εγκυμοσύνης, ο τροφοβλαστικός ιστός παρουσιάζει μεγάλη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και ενισχύεται σταδιακά από μια μεσεγγυματική στιβάδα. Ο σχηματισμός που προκύπτει ονομάζεται χόριο. Από το χόριο εφορούν προς τον φθαρτό με ακτινοειδή διάταξη, σχηματισμοί οι οποίοι καλούνται χοριακές λάχνες. Κάθε λάχνη έχει έναν αγγειοφόρο

μεσεγχυματικό πυρήνα που καλύπτεται από κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Ορισμένες από τις χοριακές λάχνες σταδιακά εμφανίζουν στη κορυφή τους πυκνούς σωρούς τροφοβλαστικών κυττάρων που ονομάζονται κυτταροτροφοβλαστικές κυτταρικές στήλες (cytotrophoblastic cell columns) και έρχονται σε επαφή με το διαβρωμένο ενδομήτριο. Ο πυρήνας των συγκεκριμένων λαχνών επεκτείνεται μέσα στις κυτταρικές στήλες για να προσκολληθεί στο φθαρτό σχηματίζοντας τελικά τις καθηλωμένες λάχνες (anchoring villi). Οι τελευταίες παρέχουν την απαραίτητη στήριξη του αναπτυσσόμενου πλακουντιακού ιστού πάνω στο τοίχωμα της μήτρας. Οι περισσότερες λάχνες ωστόσο, διατηρούν ελεύθερες κορυφές στον μεσολάχινο χώρο αποτελώντας έτσι τις ελεύθερες λάχνες (floating villi). Πέρα από τη στηρικτική λειτουργία των καθηλωμένων λαχνών, οι λάχνες στο σύνολό τους είναι υπεύθυνες για την ανταλλαγή αερίων ανάμεσα στη μητρική και εμβρυική κυκλοφορία καθώς και τη πρόσληψη των απαραίτητων για το έμβρυο θρεπτικών ουσιών. Η λειτουργική ανάπτυξη των χοριακών λαχνών ολοκληρώνεται με το τέλος του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης (Εικόνες 8, 9).



Εικόνα 8. Απλοποιημένο σχήμα με τα τα γεγονότα της 2ης και 3ης εβδομάδας που οδηγούν στο σχηματισμό του πλακούντα. Η κυτταροτροφοβλάστη παράγει την συγκυτιοτροφοβλάστη, εμφανίζονται οι αιμόκολλοι, σχηματίζεται το χώριο και αναπτύσσονται οι χοριακές λάχνες.

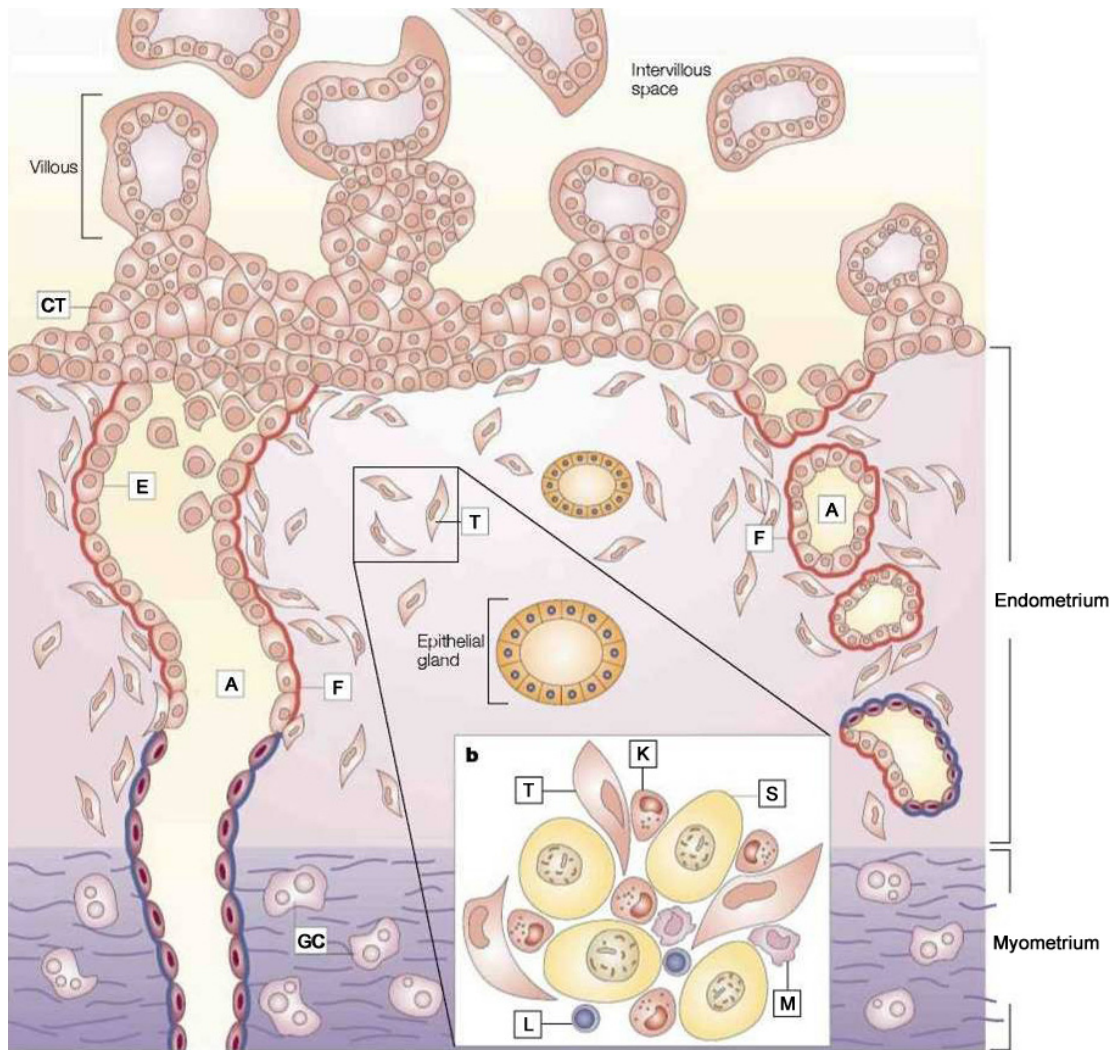


Εικόνα 9. Η ανάπτυξη του πλακούντα. Α: Τρίτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Οι λάχνες έχουν σχηματιστεί και ο φθαρτός διακρίνεται σε βασικό, θυλακοειδή και τοιχωματικό. Στο Α' φαίνονται τα περιεχόμενα του ομφαλικού δακτυλίου. Β: Όγδοη εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Το εξωεμβρυϊκό κοίλωμα εξαφανίζεται και η μητριαία κοιλότητα περιορίζεται. Σχηματίζεται το λαχνωτό και άλαχνο χόριο. Στο Β' φαίνεται ο ομφαλικός δακτύλιος και η φυσιολογική ομφαλοκήλη.

1.2.2. Το εμβρυομητρικό όριο

1.2.2.1. Γενικά

Το σημείο όπου οι μητρικοί και οι προερχόμενοι από τη βλαστοκύστη εξωεμβρυϊκοί ιστοί έρχονται σε άμεση επαφή, χαρακτηρίζεται ως εμβρυομητρικό όριο. Πρόκειται για μια ζώνη κυττάρων διαφορετικών τύπων με προέλευση είτε από τη μητέρα (ενδομήτριο και μυομήτριο) είτε από το έμβρυο (τροφοβλάστη). Οι κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στο εμβρυομητρικό όριο είναι η εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, τα φθαρτικά κύτταρα, κύτταρα του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και τα κύτταρα που δομούν τους ενδομήτριους αδένες και αγγεία και το μυομήτριο (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της ιστολογίας του εμβρυομητρικού ορίου. Οι πλακουντιακές λάχνες καλύπτονται από την συγκυτιοτροφοβλάστη (έξω στίχος κυττάρων) και τη κυτταροτροφοβλάστη (έσω). Το στρώμα κάθε λάχνης περιέχει εμβρυικά αγγεία, ινοβλάστες και εμβρυικά μακροφάγα (κύτταρα Hofbauer). Το μητρικό αίμα στον μεσολάχινο χώρο φτάνει στον πλακούντα μέσω των μητρικών σπειροειδών αρτηριών (A). Η λαχνωτή κυτταροτροφοβλάστη αυξάνεται εστιακά στις κορυφές των καθηλωμένων λαχνών σχηματίζοντας τις κυτταροτροφοβλαστικές κολώνες (CT). Στο εμβρυομητρικό όριο, οι κολώνες αυτές σχηματίζουν ένα κατά τόπους συνεχόμενο κάλυμμα. Από αυτές τις θέσεις η EAT εισέρχεται στο φθαρτό ως διάμεση EAT (T) για να περιβάλλει και να καταστρέψει το μυικό ιστό των μητριαίων αρτηριών και να τον αντικαταστήσει με ινώδες υλικό (F). Η ενδαγγειακή EAT (E) μετακινείται προς τα κάτω στις αρτηρίες αντικαθιστώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η EAT φτάνει μέχρι το έσω μυομήτριο όπου συντήκονται και σχηματίζουν τα γιγαντιαία κύτταρα του εδάφους του πλακούντα (GC). Κάτω και δεξιά

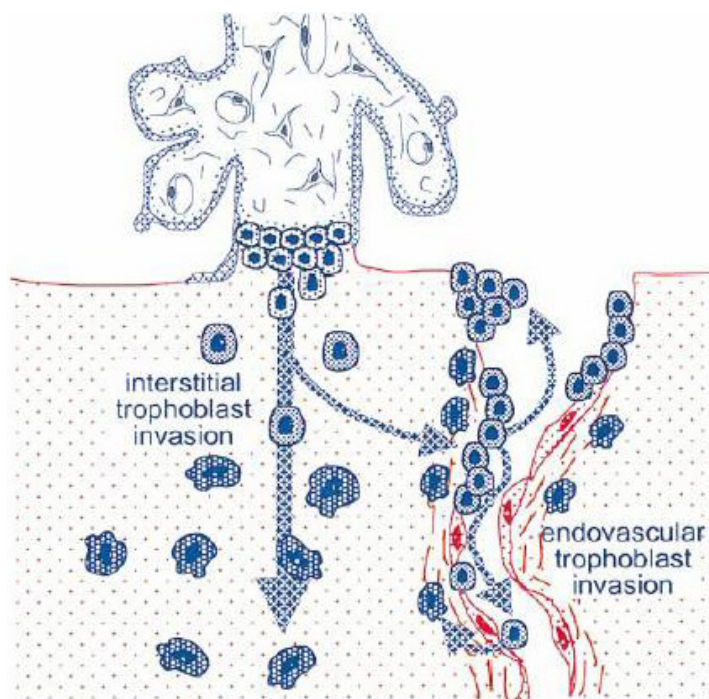
παρουσιάζεται σε μεγέθυνση το στρώμα του ενδομητρίου στο εμβρυομητρικό όριο. Διακρίνονται τα κύτταρα της διάμεσης ΕΛΤ (T) μεταξύ των μεγάλων στρωματικών κυττάρων (S). Τα μητρικά λευκοκύτταρα περιλαμβάνουν τα uNK κύτταρα (K), μερικά μακροφάγα (M) και λίγα T κύτταρα (L).

1.2.2.2. Τα κύτταρα του εμβρυομητρικού ορίου

(i) Οι στήλες των τροφοβλαστικών κυττάρων στις κορυφές των καθηλωμένων λαχνών δίνουν γένεση στην **εξωλαχνωτή ή διεισδυτική τροφοβλάστη** (extravillous ή invasive trophoblast) (ΕΛΤ) (Pijnenborg et al, 1981) (**Εικόνα 9**). Με τον όρο ΕΛΤ χαρακτηρίζονται όλα τα τροφοβλαστικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται έξω από τις πλακουντιακές λάχνες. Πρόκειται για κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, αλλά διαθέτουν την ικανότητα να διεισδύουν στον μητρικό ιστό φτάνοντας σε βάθος ως το έσω τριτημόριο του μυομητρίου. Η ΕΛΤ διακρίνεται σε δύο κύριους πληθυσμούς: (α) την διάμεση τροφοβλάστη (interstitial trophoblast), η οποία διεισδύει στο διάμεσο ιστό της μήτρας δηλαδή το φθαρτό, φτάνοντας ως το έσω τριτημόριο του μυομητρίου, και (β) την ενδαγγειακή τροφοβλάστη (endovascular trophoblast), η οποία εισέρχεται και μετακινείται μέσα στις μητριαίες αρτηρίες αντικαθιστώντας σταδιακά το ενδοθήλιό τους. Τα κύτταρα της διάμεσης ΕΛΤ που φτάνουν στο μυομήτριο, συντήκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τα γιγαντιαία κύτταρα του εδάφους πλακούντα (placental-bed giant cells).

Ο πληθυσμός της ΕΛΤ εξασφαλίζει αφ' ενός την ισχυρή πρόσφυση του πλακούντα –και άρα την απαραίτητη στήριξη του εμβρύου– στη μήτρα, αφ' ετέρου την επάρκεια της παροχής μητρικού αίματος προς το έμβρυο. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με το μετασχηματισμό των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών (Pijnenborg et al, 1983). Η διάμεση τροφοβλάστη περιβάλλει τα τοιχώματα των μητριαίων αγγείων και συμμετέχει στην καταστροφή του μυϊκού τους ιστού. Παράλληλα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ένας υποπληθυσμός της διάμεσης τροφοβλάστης, ακολουθεί ένα παρακλάδι της αρχικής οδού διάμεσης διείσδυσης, για να διαπεράσει τα τοιχώματα των παρακείμενων στο εμβρυομητρικό όριο αρτηριών και να εισέρθει στον αυλό τους (Hees et al, 1987; Kam et al, 1999; Blankenship et al, 1993). Πιστεύεται δηλαδή, ότι τα κύτταρα της ενδαγγειακής τροφοβλάστης αντιπροσωπεύουν ένα τελικό στάδιο διαφοροποίησης των διάμεσων τροφοβλαστών, των προερχόμενων από τις κυτταροτροφοβλαστικές κολώνες (Pijnenborg et al, 1983;

Damsky et al, 1992; Fisher et al, 1993) (**Εικόνα 10**). Εκεί, η ενδαγγειακή πλέον τροφοβλάστη αντικαθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ο μετασχηματισμός αυτός των αρτηριών φτάνει φυσιολογικά σε τέτοιο βάθος μέσα στο μυομήτριο όπως και η διάμεση τροφοβλάστη. Παράλληλα η ενδαγγειακή τροφοβλάστη επιπωμάτωση τον αυλό των μητριαίων αρτηριών με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ροή του μητρικού αίματος προς τους μεσολάχιους χώρους κατά το μεγαλύτερο μέρος του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης (Hustin et al, 1987; Jauniaux et al, 1991; Jaffe et al, 1993; Burton et al, 1999). Η πλήρης έναρξη της εμβρυομητρικής κυκλοφορίας συμβαίνει προς το τέλος του πρώτου τριμήνου (10η με 12η εβδομάδα), με την απομάκρυνση των τροφοβλαστικών «πωμάτων». Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζει την προστασία του πλακούντα από το οξειδωτικό στρες κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του, οπότε και είναι ιδιαίτερα ευάλωτος (Watson et al, 1998). Ο μετασχηματισμός των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών είναι καίριος για την ομαλή ανάπτυξη του κύηματος. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διάμετρος των αγγείων να αυξάνει ενώ η ενδοτικότητα τους να ελαττώνεται σημαντικά. Με τη δράση της ΕΛΤ στο σύνολό της, οι μητριαίες σπειροειδής αρτηρίες μετατρέπονται σε σωλήνες χαμηλής ενδοτικότητας που έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στις ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις αίματος της εμβryo-πλακουντιακή μονάδας (Pijnenborg et al, 1980; Brosens et al, 2002; Kam et al, 1999).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της επικρατούσας θεωρίας για την προέλευση της ενδαγγειακής τροφοβλάστης. Τα βέλη απεικονίζουν την πορεία που ακολουθεί η ΕΛΤ διεισδύοντας στο διάμεσο ιστό (φθαρτός, μυομήτριο) και στα αγγεία.

(ii) Η αντίδραση της φθαρτοποίησης, δηλαδή της διαφοροποίησης του στρώματος του ενδομητρίου σε φθαρτό, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της προγεστερόνης και είναι καίρια για την επιτυχία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Ο τύπος του κυττάρου που προκύπτει ονομάζεται **φθαρτοποιημένο ή φθαρτικό στρωματικό κύτταρο (Εικόνα 9)**. Ένας σημαντικός αριθμός δεδομένων σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τη λειτουργία των κυττάρων αυτών έχει ανακοινωθεί έως σήμερα (Brag A, 2002). Είναι πλέον σαφές ότι ο φθαρτός λειτουργεί σαν ένα ενδοκρινές όργανο παράγοντας πληθώρα ορμονών, αυξητικών παραγόντων, ιντερλευκινών και άλλων κυττοκινών, πολλές μάλιστα από τις οποίες απαντώνται φυσιολογικά στο ανοσοποιητικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτό πιστεύεται ότι τα φθαρτικά κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση και προαγωγή της εμφύτευσης αλληλεπιδρώντας παρακρινώς αλλά και με άμεση κυτταρική επαφή τόσο με τα ανοσοποιητικά κύτταρα του φθαρού όσο και με τη διεισδύουσα ΕΛΤ και ρυθμίζοντας ποικίλες λειτουργίες τους (Dunn et al, 2003).

(iii) Το ενδομήτριο του ανθρώπου φιλοξενεί έναν σημαντικό αριθμό **λευκοκυττάρων**, ο οποίος μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου

(King et al, 2000). Στην παραγωγική φάση του ενδομητρίου, τα λευκοκύτταρα αποτελούν περίπου το 10% των κυττάρων στο στρώμα, στην εκκριτική φάση το 20%, ενώ στα πρώτα στάδια της κύησης ο αριθμός τους ανεβαίνει στο 30% των κυττάρων του φθαρού (Bulmer et al, 1991). Ο μεγαλύτερος λευκοκυτταρικός πληθυσμός του ενδομητρίου, αποτελείται από κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK cells) που ονομάζονται μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα, ή αλλιώς μητριαία NK κύτταρα (uterine NK cells, uNK cells). Τα κύτταρα αυτά συνιστούν πάνω από το 70% του πληθυσμού των λευκοκυττάρων που βρίσκονται στον φθαρό κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Το υπόλοιπο 30% αποτελείται από τα μακροφάγα του πλακούντα και λίγα T λεμφοκύτταρα (περίπου 20% και 10% του συνολικού λευκοκυτταρικού πληθυσμού αντίστοιχα) (Εικόνα 9). Η διαδικασία της διήθησης του ενδομητρίου από λευκοκύτταρα βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των στεροειδών της ωοθήκης και κυρίως της προγεστερόνης, όπως και η ίδια η φθαροποίηση.

Ο ρόλος των uNK κυττάρων στη λειτουργία του ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Μελέτες που έχουν γίνει πάνω σε ανθρώπινο υλικό προτείνουν δύο βασικές λειτουργίες για τα κύτταρα αυτά. Πρώτον η ρύθμιση της πλακουντιακής και τροφοβλαστικής ανάπτυξης μέσω της παραγωγής κυττοκινών, οι οποίες συμμετέχουν στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του φθαρού και συνεπόμενα της ΕΛΤ (Jokhi et al, 1994; Saito et al, 1993). Η δεύτερη σημαντική λειτουργία που αποδίδεται στα NK κύτταρα, είναι τοπικός ανοσορυθμιστικός ρόλος. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την πρόσφατη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των uNK κυττάρων, η οποία κατέδειξε την υπερπαραγωγή μορίων με ανοσορυθμιστικό ρόλο, όπως είναι η galectin-1 και η glycodelin A (Koopman et al, 2003). Τέλος, μια πιθανή λειτουργία των uNK κυττάρων είναι η συμμετοχή στη ρύθμιση της διείσδυσης των τροφοβλαστών στη μήτρα, μέσω της κυτταρο-εξαρτώμενης κυττοτοξικότητας. Τα ανθρώπινα uNK έχουν κυττοτοξική δράση απέναντι σε κλασικά κύτταρα-στόχους των NK κυττάρων, αν και λιγότερο ισχυρή από τα περιφερικά NK κύτταρα (Ritson et al, 1989; Manaseki et al, 1989). Οι ανθρώπινοι τροφοβλάστες είναι ανθεκτικοί στη λύση από φυσιολογικά uNK κύτταρα *in vitro* εκτός κι αν τα τελευταία ενεργοποιηθούν με ιντερλευκίνη-2 (IL-2) (King et al, 1990). Η τελευταία ωστόσο δε συντίθεται σε σημαντικά ποσά στον πλακούντα (Jokhi et al, 1994). Επίσης μοντέλα ποντικών στερούμενα της κυττοτοξικής δράσης των NK κυττάρων παρουσιάζουν φυσιολογικές θέσεις εμφύτευσης (Croy et al, 1990; Stallmach et al, 1995). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι

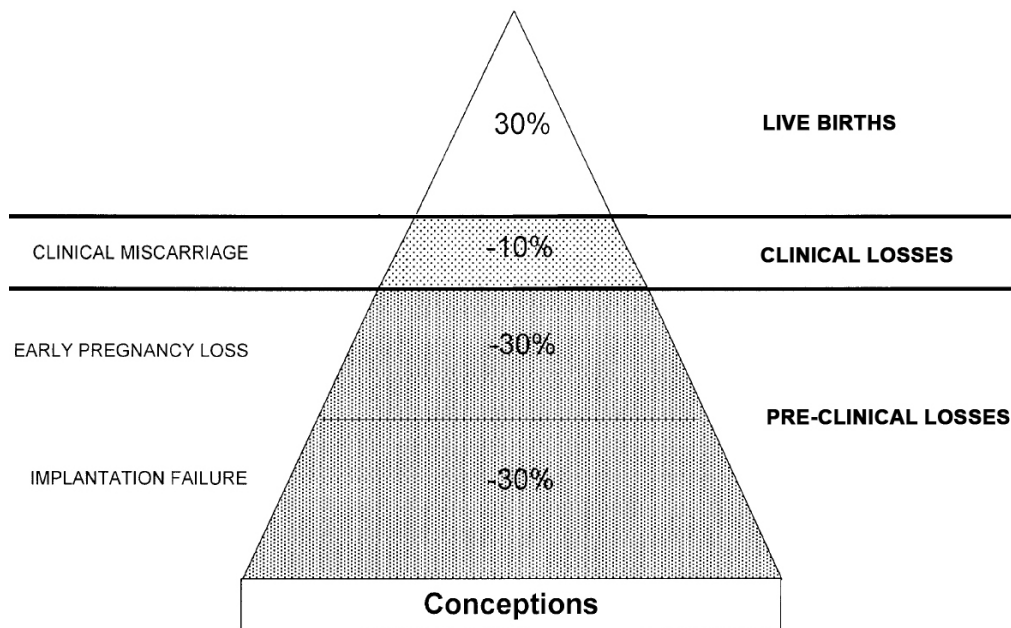
κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η κυττοτοξικότητα κατά της τροφοβλάστης δεν είναι μια από τις πρωταρχικές λειτουργίες των NK κυττάρων.

Ανεξαρτήτως των επιμέρους λειτουργιών του κάθε ενός από τους τύπους κυττάρων που ανευρίσκονται στο εμβρυομητρικό όριο, η ανάγκη της παρουσίας του φθαρτού για την ομαλή εξέλιξη της εμφύτευσης και πλακουντιοποίησης είναι σαφής. Το γεγονός αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό από το παράδειγμα των έκτοπων κήσεων ή των περιπτώσεων όπου η βλαστοκύστη εμφυτεύεται πάνω από τον ινώδη ιστό της ουλής μιας προηγούμενης καισαρικής τομής. Σε αυτές τις καταστάσεις, η διείδυση των τροφοβλαστών στους υποκείμενους ιστούς είναι ανεξέλεγκτη (Wheeler JE et al, 2002).

1.3. Οι αυτόματες αποβολές

1.3.1. Γενικά

Ο όρος «αυτόματη αποβολή» αναφέρεται στην απώλεια του κηήματος πριν από την ολοκλήρωση των 20 εβδομάδων κηήσεως και χωρίς την παρεμβολή εξωγενών ιατρογενών παραγόντων. Περίπου το 20% των εγκύων γυναικών παρουσιάζονται με διάφορου βαθμού αιμορραγία πριν από την ολοκλήρωση της 20ης εβδομάδας της κηήσής τους. Τα μισά περίπου από αυτά τα περιστατικά καταλήγουν σε αυτόματη αποβολή (Everett et al, 1997). Επίσης, υπολογίζεται ότι το 20% των διαγνωσμένων κηήσεων καταλήγουν σε αυτόματη αποβολή. Ωστόσο όταν οι γυναίκες παρακολουθήθηκαν με τακτικές μετρήσεις χοριακής γοναδοτροπίνης, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αυτό ανερχόταν σε 31% (Wilcox et al, 1988). Σήμερα είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός κηήσεων χάνονται προτού γίνει δυνατή η εντόπισή τους. Τα κλινικά συμπτώματα των απωλειών αυτών εκλαμβάνονται ως καθυστερημένη ή έντονη έμμηνος ρύση. Με βάση τα ανωτέρω στοιχεία, το αποτέλεσμα των συλλήψεων παρουσιάζεται με τη μορφή πυραμίδας όπου στη βάση βρίσκονται οι διάφορες μορφές απώλειας της κηήσεως και στη κορυφή οι επιτυχείς εγκυμοσύνες (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Σχηματική παρουσίαση της πορείας των συλλήψεων στον άνθρωπο. Περίπου 70% των συλλήψεων χάνονται προτού ολοκληρωθεί η εγκυμοσύνη. Στη πλειονότητά τους οι απώλειες αυτές συμβαίνουν πριν από την «καθυστέρηση» του φυσιολογικού κύκλου και έτσι δεν γίνονται αντιληπτές.

1.3.2. Αιτιολογικοί παράγοντες και κλινική κατάταξη

Οι παράγοντες οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί σαν αίτια αποβολών χωρίζονται σε μητρικούς και εμβρυικούς. Οι μητρικοί παράγοντες περιλαμβάνουν ανεπάρκεια του τραχήλου, ανωμαλίες της μήτρας, υποθυρεοειδισμός, σακχαρώδη διαβήτης, χρόνια νεφρίτις, οξεία λοίμωξη, τραύμα, χρήση κοκαΐνης, ανοσολογικοί παράγοντες και ισχυρό συναισθηματικό σοκ. Στα εμβρυικά αίτια συγκαταλέγονται η παθολογική ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ επίσης παρατηρούνται αποβολές φυσιολογικών εμβρύων χωρίς να είναι δυνατή η εντόπιση κάποιου αιτιολογικού παράγοντα (Cunningham FG et al, 2001; Garcia-Enguidanos et al, 2002; Rasch et al, 2003).

Οι αυτόματες αποβολές κατηγοριοποιούνται κλινικά σε απειλούμενες (όπου παρουσιάζεται κολπική αιμόρροια κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης), αναπόφευκτες (διάταση του τραχήλου χωρίς αποβολή των προϊόντων της κύησης), ατελής (αποβολή μέρους των προϊόντων της κύησης), τελείες (αποβολή όλων των προϊόντων της κύησης), παλίνδρομες (κατακράτηση στη μήτρα νεκρού κυήματος),

σηπτικές (επιπλοκή της εγκυμοσύνης από ενδομήτρια μόλυνση) και καθ' έξην (τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες απώλειες κύησης).

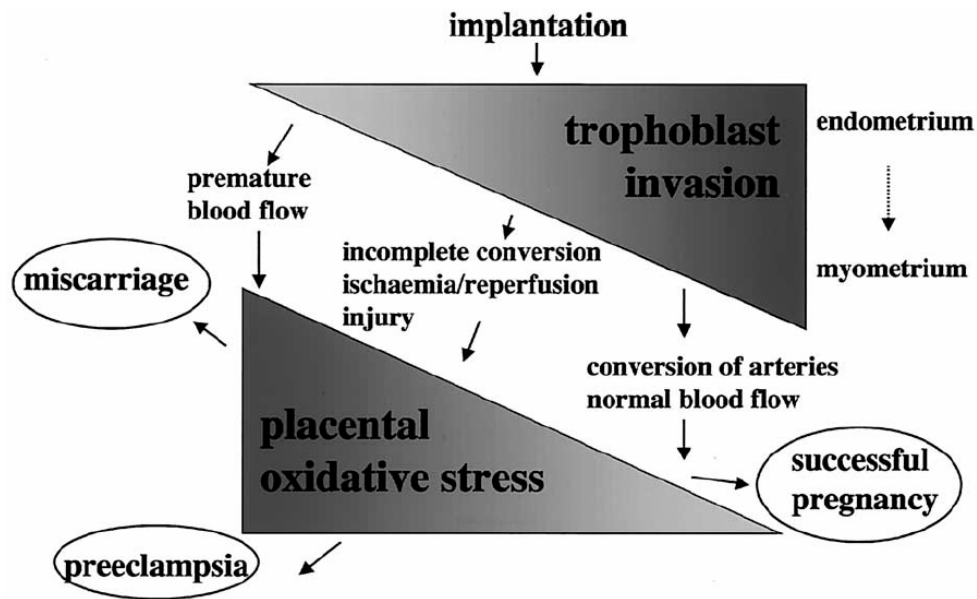
1.3.3. Παθοφυσιολογία

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, το εμβryo-μητρικό όριο αποτελεί ένα σύμπλεγμα ιστών στο σχηματισμό των οποίων συμμετέχουν κύτταρα που ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας καθώς και μη άνοσα κύτταρα μητρικής και εμβρυϊκής προέλευσης. Ξεκινώντας από το σχηματισμό ενός υποδεκτικού ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης, μέχρι την διείσδυση της τροφοβλάστης στη μήτρα και το σχηματισμό του πλακούντα, ένα περίπλοκο δίκτυο τοπικά δρώντων πεπτιδίων είναι υπεύθυνο για την ομαλή εξέλιξη των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης (de Ziegler et al, 1998; Ma et al, 2003; Ertzeid et al, 2001; Valbuena et al, 2001).

Οι μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι λειτουργούν στο εμβryo-μητρικό όριο και ενέχονται στην παθοφυσιολογία των αυτόματων αποβολών είναι σε μεγάλο μέρος άγνωστοι. Παλαιότερες μελέτες συσχέτισαν τις αυτόματες αποβολές με μια ιδιαίτερα ελαττωματική –συγκεκριμένα ελλιπή– διείσδυση της τροφοβλάστης στη μήτρα στους ιστούς της μήτρας και κυρίως τις σπειροειδείς αρτηρίες (Hustin et al, 1990; Michel et al, 1990). Πιο πρόσφατα καταδείχθηκε η πρόωρη έναρξη της ροής του μητρικού αίματος προς τον πλακούντα σαν ένα πολύ σημαντικό στοιχείο της παθοφυσιολογίας των αποβολών (Jauniaux et al, 2003; Hempstock et al, 2003).

Με τα ως τώρα διαθέσιμα στοιχεία, η προτεινόμενη υπόθεση για την αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στην αυτόματη αποβολή περιγράφεται ως εξής: Ελαττωμένη διείσδυση της ΕΛΤ έχει σαν αποτέλεσμα την ατελή φραγή του αυλού των σπειροειδών αρτηριών κατά τις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης (Jauniaux et al, 2005). Ο περιορισμός της τροφοβλαστικής διείσδυσης μπορεί να αφορά τόσο την διάμεση όσο και την ενδαγγειακή ΕΛΤ, αφού η ενδαγγειακή διείσδυση πιστεύεται ότι συνιστά παρακλάδι της διάμεσης διείσδυσης. Συνεπώς, διαταραχή της τελευταίας πιθανόν προηγείται της αποτυχίας της ενδαγγειακής διείσδυσης (Kaufmann et al, 2003). Τα ανωτέρω μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωμη διάνοιξη του αυλού των μητριάων αρτηριών λόγω απελευθέρωσης του ανεπαρκούς τροφοβλαστικού βύσματος και έναρξη της ροής του μητρικού αίματος προς τον μεσολάχινο χώρο. Αυτά τα φαινόμενα είναι κοινά τόσο σε ευπλοειδικά όσο και σε

ανευπλοειδικά αποβληθέντα κυήματα (Greenwold et al, 2003). Όπως είναι αναμενόμενο, η αθρόα είσοδος του μητρικού αίματος στο μεσολάχνιο χώρο προκαλεί βλάβη στις λάχνες τόσο άμεσα με τη μηχανική δράση της αιματικής ροής, όσο και έμμεσα με τη δράση του οξειδωτικού στρες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το οξειδωτικό στρες που αναπόφευκτα ασκείται στον πλακούντα με την έναρξη της αιματικής ροής κατά τη 10η-12η εβδομάδα της κύησης, θεωρείται σημαντικό για την ομαλή περαιτέρω ανάπτυξη του οργάνου (Chen et al, 2003; Genbacev et al, 1997; Graham et al, 2000; Frendo et al, 2001; Kudo et al, 2003; Burton et al, 2004). Στην περίπτωση όμως των αυτόματων αποβολών, το οξειδωτικό στρες συμβαίνει νωρίτερα, σε μια περίοδο κατά την οποία πιθανολογείται ότι οι αντι-οξειδωτικοί προστατευτικοί μηχανισμοί του πλακούντα δεν έχουν αναπτυχθεί επαρκώς (Watson et al, 1997; Watson et al, 1998; Jauniaux et al, 2000). Σαν αποτέλεσμα οι λάχνες αρχίζουν να ατροφούν, ο πλακούντας σταδιακά μετατρέπεται σε ένα λεπτό κέλυφος και η κύηση διακόπτεται. Αυτά τα γεγονότα θεωρούνται υπεύθυνα για ένα μεγάλο ποσοστό αυτόματων αποβολών ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή όχι διαφορετικών αιτιολογικών παραγόντων (Jauniaux et al, 2000; Jauniaux et al, 2005). Τέλος, η περιγραφόμενη υπόθεση μπορεί να προσφέρει μια μηχανιστική ερμηνεία για ορισμένες όψιμες επιπλοκές της κύησης που σχετίζονται με ελαττωμένη τροφοβλαστική διείσδυση, και συγκεκριμένα την προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου (intrauterine growth retardation, IUGR). Έχει μάλιστα προταθεί, ότι οι αυτόματες αποβολές, η IUGR και η προεκλαμψία αντιπροσωπεύουν ένα φάσμα διαταραχών δευτερογενών της διαφόρου βαθμού ανεπάρκειας της τροφοβλαστικής διείσδυσης και του συνεπόμενου πλακουντιακού οξειδωτικού στρες (Burton et al, 2004) (**Εικόνα 12**).



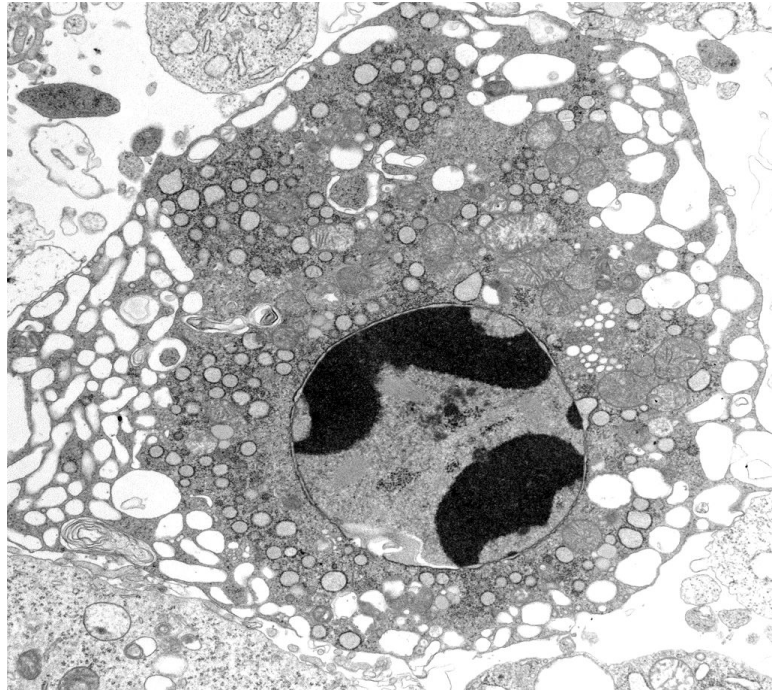
Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση της θεωρίας για τη σχέση ανάμεσα στην έκταση της τροφοβλαστικής διείσδυσης, στο οξειδωτικό στρες του πλακούντα και στην έκβαση της κύησης. Προς τα δεξιά απεικονίζεται η επαρκής τροφοβλαστική διείσδυση, η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη πρόιμου οξειδωτικού στρες στον πλακούντα και επιτρέπει την φυσιολογική ολοκλήρωση της κύησης. Στα αριστερά, ανεπαρκής τροφοβλαστική διείσδυση συνεπάγεται πρόιμη έναρξη της ροής αίματος και οξειδωτικού στρες στον πλακούντα, με τελικό αποτέλεσμα την αποβολή. Ανάμεσα στα δύο αυτά όρια τοποθετείται ένα φάσμα διαταραχών της τροφοβλαστικής διείσδυσης που μπορεί να οδηγήσει σε προεκλαμψία ή/και IUGR.

1.4. Η απόπτωση

1.4.1. Τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης

Ο όρος «απόπτωση» χαρακτηρίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα την οργανωμένη απομάκρυνση των θανόντων κυττάρων. Η απόπτωση αναγνωρίζεται σαν ένα σημαντικό στοιχείο στην απομάκρυνση κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε τοξικούς παράγοντες καθώς και στην ανάπτυξη και διατήρηση της δομής και οργάνωσης των διαφόρων ιστών (Kerr et al, 1972).

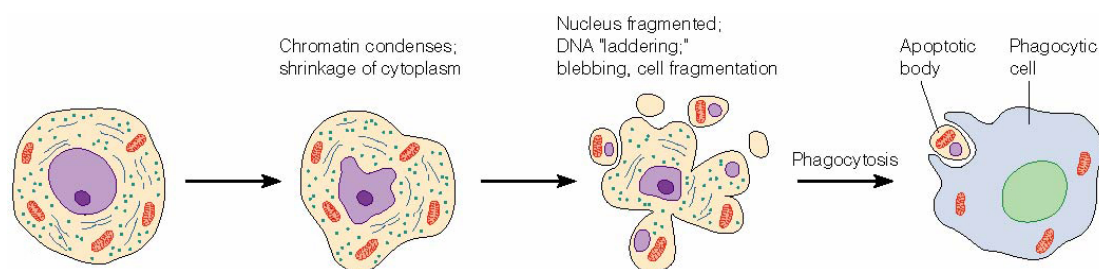
Σε αντίθεση με την νέκρωση όπου το κύτταρο διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας τα συστατικά του και προκαλώντας τοπική φλεγμονή και νέκρωση παρακείμενων κυττάρων, η απόπτωση χαρακτηρίζεται ως «σιωπηλός» κυτταρικός θάνατος. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν αποκαλύψει τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (Kerr et al, 1972; Searle et al, 1975) (**Εικόνα 13**). Στα πρώτα στάδια παρατηρείται σύμπτυξη της χρωματίνης, η οποία ενώνεται σε πυκνές μάζες μέσα στον πυρήνα. Στη συνέχεια το κυτταρόπλασμα συρρικνώνεται και τα οργανίδια του κυττάρου συγκεντρώνονται στον διαρκώς μειούμενο όγκο του κυττάρου. Παράλληλα χάνονται τα εξειδικευμένα μεμβρανικά στοιχεία του κυττάρου, (μικρολάχνες, σύνδεσμοι με γειτονικά κύτταρα) και η επαφή του με γειτονικά κύτταρα, και το κυτταρόπλασμα γίνεται κενοτοπιόδες (blebbing). Το πυρηνικό περίβλημα του κυττάρου συστρέφεται και τελικά διασπάται σε ξεχωριστά τμήματα, τα οποία διαχέονται στο κυτταρόπλασμα. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη επίσης συστρέφεται με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό μεμονωμένων ακέραιων τμημάτων που ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια και περιέχουν τα διάφορα συστατικά του κυττάρου. Τα αποπτωτικά σωμάτια τέλος φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται ταχέως από τα γειτονικά κύτταρα.



Εικόνα 13. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ενός αποπτωτικού καρκινικού κυττάρου. Διακρίνεται η συμπύκνωση της χρωματίνης (μαύρες μάζες στον πυρήνα), η συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, και η εμφάνιση περιφερικά πολυάριθμων κενотоπίων (blebs) σε αυτό.

Πέρα από τις μορφολογικές αλλαγές, η διαδικασία της απόπτωσης διακρίνεται από συγκεκριμένες βιοχημικές αλλαγές στις οποίες υπόκειται το αποπτωτικό κύτταρο. Η πλέον χαρακτηριστική από αυτές είναι ο κατακερματισμός του γενώματος του κυττάρου σε ολιγομερή των 180-200 bp. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί κεντρικό γνώρισμα της απόπτωσης και για το λόγο αυτό η εντόπιση του κατακερματισμένου σε ολιγομερή DNA ενός κυττάρου, το ταυτοποιεί σαν αποπτωτικό (Wyllie et al, 1987). Παράλληλα με τον κατακερματισμό του γενώματος, ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών του κυττάρου κόβονται είτε διασπώνται προκειμένου να προχωρήσει η διαδικασία της απόπτωσης. Σημαντική επίσης θεωρείται η οξינוποίηση του κυτταροπλάσματος, πιθανόν από την ενεργοποίηση εξαρτώμενων από το pH ενζύμων (Meisenholder et al, 1996). Τέλος, ανάμεσα στα σημαντικά βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, συγκαταλέγεται η αναστροφή στοιχείων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και συγκεκριμένα των φωσφατιδυλσερινών. Τα μόρια αυτά φυσιολογικά βρίσκονται στο έσω πέταλο της δίστιβης μεμβράνης, αλλά μετακινούνται στο έξω από τα πρώτα μόλις στάδια της απόπτωσης με αποτέλεσμα να

ευοδώνεται η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων (Fadok et al, 1992; Schlegel et al, 1993) (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση των κυρίων γεγονότων της απόπτωσης, έως την φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματίων.

1.4.2. Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

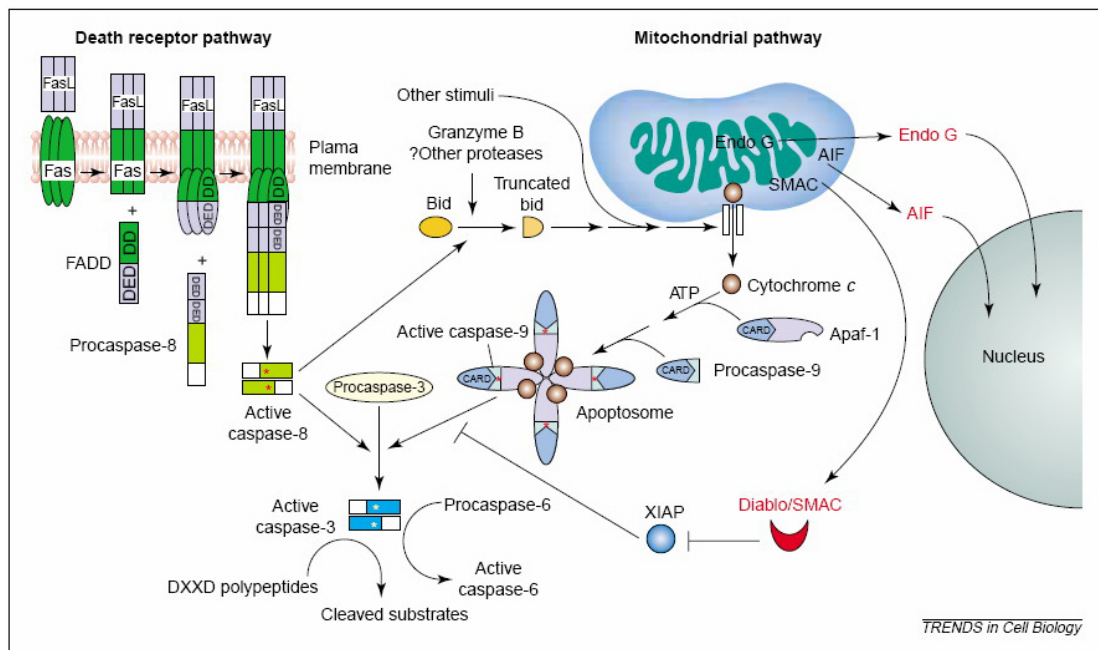
1.4.2.1. Τα κύρια μοριακά μονοπάτια της απόπτωσης

Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται αυστηρά από συγκεκριμένα γονίδια. Έχει περιγραφεί ένα πλήθος αποπτωτικών μοριακών μονοπατιών τα οποία διαπλέκονται μεταξύ τους και αλληλεξαρτώνται κατά τέτοιο ώστε γίνεται σαφές ότι δεν είναι δυνατή η περιγραφή τους ξεχωριστά. Ωστόσο διακρίνονται δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές (**Εικόνα 15**).

A) Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιείται από κάποια διαταραχή στην ομοίωση του ίδιου του κυττάρου. Στο μονοπάτι αυτό τα μιτοχόνδρια έχουν κεντρικό ρόλο και γι' αυτό χαρακτηρίζεται και ως μιτοχονδριακό μονοπάτι. Όταν δοθεί το ερέθισμα από ένα αποπτωτικό σήμα, τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν από το εσωτερικό τους μια σειρά από πεπτίδια που συμπεριλαμβάνουν το κυτόχρωμα c και την Smac/DIABLO (Ashe et al, 2003; Du et al, 2000; Verhagen et al, 2000). Τα μόρια αυτά ενεργοποιούν συγκεκριμένες πρωτεάσες, τις κασπάσες, οι οποίες αποτελούν τις πρωτεΐνες-εκτελεστές της απόπτωσης. Επίσης οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες ενεργοποιούν τον Παράγοντα Επαγωγής της Απόπτωσης (AIF, apoptosis inducing factor), ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα και προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA (Susin et al, 1999; Lorenzo et al, 1999).

B) Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται με τη σύνδεση μορίων-σημάτων σε υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του αποπτωτικού κυττάρου, τους

λεγόμενους «υποδοχείς θανάτου» (death receptors, DRs). Τα δυο καλύτερα μελετημένα μοντέλα είναι του υποδοχέα Fas με τον προσδέτη FasL (Fas Ligand) και του υποδοχέα TNFR με τον προσδέτη TNF (Tumor Necrosis Factor). Η σύνδεση του προσδέτη με τον υποδοχέα του, προκαλεί την άμεση ενεργοποίηση μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου (κασπάσες, IKK-inhibitor of NFκB kinase complex) και την έναρξη αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Kaufmann et al, 2001; Hengartner et al, 2000).



Εικόνα 15. Περιληπτική παρουσίαση του εξωγενούς (death receptor pathway) και ενδογενούς (mitochondrial pathway) αποπτωτικού μονοπατιού.

1.4.2.2. Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών διακρίνονται σε αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, BOO/DIVA, A1/Bfl-1, NR-13) και προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (χωρίζονται περαιτέρω σε δυο ομάδες, τις multidomain proteins: Bax, Bak, Bok/Mtd και τις «BH3 domain only» πρωτεΐνες: Bid, Bim, Bik, Bad, Blk, Hrk, Nix, BNip3, Noxa, PUMA). Οι περισσότερες Bcl-2 πρωτεΐνες περιέχουν τέσσερα κοινά τμήματα, τα Bcl-2 homology (BH) domains 1-4 (BH1, BH2, BH3, BH4). Τα τμήματα BH1, BH2 και BH4 είναι απαραίτητα για την αντι-αποπτωτική δράση των πρωτεϊνών, ενώ το BH3 για την προ-αποπτωτική δράση.

Επίσης, σχεδόν όλες οι Bcl-2 πρωτεΐνες περιέχουν ένα υδρόφοβο C-τελικό τμήμα που πιστεύεται ότι είναι απαραίτητο για τη σύνδεσή τους με τις ενδοκυττάρειες μεμβράνες (Hengartner et al, 2000).

Ο μηχανισμός δράσης των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα περίπλοκος και δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Τα πεπτίδια αυτά έχουν την ιδιότητα να ομοδιμερίζονται ή να ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους και φαίνεται ότι με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται η δράση τους στην απόπτωση. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bad ετεροδιμερίζονται με τις αντι-αποπτωτικές Bcl-2 και Bcl-xL (Reed et al, 1997). Η αναλογία ανάμεσα στην έκφραση της Bcl-2 και της Bax φαίνεται να είναι ένα κρίσιμο σημείο για την αποπτωτική διαδικασία. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL συνδέονται και με άλλες πρωτεΐνες εκτός από τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, γεγονός που πιθανόν αποτελεί τμήμα ενός ρυθμιστικού μηχανισμού της βιολογικής δράσης των πρωτεϊνών αυτών (Hacker et al, 1995).

Οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για να προστατεύσουν τα κύτταρα από τα κυτταροτοξικά ερεθίσματα. Οι Bcl-2 και Bcl-xL δρουν σαν κανάλια, μεταφέροντας ιόντα και πρωτεΐνες μέσω των μεμβρανών του κυττάρου (Muchmore et al, 1996). Έτσι, είναι πιθανό οι πρωτεΐνες Bcl-2 να λαμβάνουν μέρος στην διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια («megapore» openings) και στην απελευθέρωση πρωτεασών (κυτόχρωμα c, apoptosis-inducing factor), οι οποίες ενεργοποιούν την απόπτωση. Επιπρόσθετα, με τη διάνοιξη των πόρων στα μιτοχόνδρια, παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα αποθηκευμένα ιόντα Ca^{2+} και μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Η απελευθέρωση των μορίων αυτών οδηγεί στην ενεργοποίηση των πρωτεασών κυστεΐνης-ασπαραγινικού (κασπάσες), τα μόρια-εκτελεστές της απόπτωσης. Έχει προταθεί ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 αναχαιτίζει τη διάνοιξη οπών στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της Bax την αυξάνει (Susin et al, 1996). Πρέπει να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 ή της Bcl-xL αναστέλλει την προ-αποπτωτική δράση του Bax. Παραδόξως, έχει αναφερθεί ότι μεγάλη ποσότητα της πρωτεΐνης Bcl-2 μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε ορισμένες περιπτώσεις. Αντίστοιχα, αυξημένες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών Bax και Bak έχουν και κυτταροπροστατευτική δράση, αναδεικνύοντας έτσι την πολυπλοκότητα του συστήματος (Yuan et al, 2000).

1.4.2.3. Το σύστημα Fas/FasL

Το Fas/FasL σύστημα είναι από τα πλέον μελετημένα συστήματα που σχετίζονται με την απόπτωση. Ο υποδοχέας Fas είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I μεγέθους ~ 45kDa, η οποία ανήκει στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων του TNF (TNFR-1, Fas, CD40, CD27, RANK, TRAIL). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν παραπλήσιες δομές και μία ενδοκυτταρική αλληλουχία στο C-τελικό άκρο του μορίου που καλείται «αλληλουχία θανάτου» (death domain, DD). Ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών από τους προσδέτες τους επάγει απόπτωση στο κύτταρο που φέρει τον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Στην περίπτωση του υποδοχέα Fas, ο προσδέτης ονομάζεται Fas Ligand (FasL) και είναι μια διαμεμβρανική τύπου II πρωτεΐνη (Suda et al, 1993).

Με την πρόσδεση του FasL στον υποδοχέα Fas, ο τελευταίος τριμερίζεται και επάγει το σχηματισμό του συμπλόκου που σηματοδοτεί την επαγωγή του θανάτου (Death Inducing Signaling Complex, DISC). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τα πεπτιδία Fas, FasL, FADD (Fas-associated death domain protein) και την κασπάση 8 ή 10 (Kischkel et al, 1995). Ακολούθως, ο ολιγομερισμός των ανωτέρω εκκινητών κασπασών οδηγεί στην πρωτεολυτική τους ενεργοποίηση και στην εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος με την ενεργοποίηση επόμενων πεπτιδίων-στόχων (Wajant et al, 2002).

Ο επαγόμενος από το Fas/FasL σύστημα κυτταρικός θάνατος έχει διάφορους ρόλους, τόσο προστατευτικούς όσο και επιζήμιους για τον οργανισμό (Green et al, 1997). Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος του συστήματος αφορά την περιφερική απαλοιφή T κυττάρων, μια προστατευτική διαδικασία κατά την οποία περίσσεια λεμφοκυττάρων απομακρύνεται μετά από μια ανοσολογική αντίδραση. Σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων, επάγεται η έκφραση των πεπτιδίων Fas και FasL στην επιφάνειά τους και έτσι προκαλείται απόπτωση των ενεργοποιημένων T κυττάρων με την μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Green et al, 1997; Singer et al, 1994; Ettinger et al, 1995).

Μια επιπρόσθετη προστατευτική δράση του συστήματος είναι η συμμετοχή στην εξασφάλιση του «ανοσολογικού προνομίου» περιοχών όπως ο οφθαλμός, ο κερατοειδής, ο εγκέφαλος, οι όρχεις και η μήτρα. Σε όλες αυτές τις περιοχές εκφράζεται το σύστημα Fas/FasL και υποστηρίζεται ότι χρησιμοποιείται από τα κύτταρα των αντίστοιχων ιστών για την προστασία τους από μια ενδεχόμενη

εντοπισμένη ανοσολογική αντίδραση. Τα εισερχόμενα στη περιοχή λεμφοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα δέχονται επίθεση από το τοπικά παραγόμενο FasL, υφίστανται απόπτωση και έτσι προστατεύεται ο ιστός από μια φλεγμονώδη αντίδραση και καταστροφή (Wajant et al, 2002; Abrahams et al, 2004; Griffith et al, 1996; Bellgrau et al, 1995). Χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα, αντίστοιχη διαφυγή από το ανοσολογικό σύστημα –επιζήμια για τον οργανισμό αυτή τη φορά– αποκτούν διάφοροι τύποι καρκίνου. Με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα προστατεύονται από την κυτταροτοξική δράση των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (Houston et al, 2004).

Τέλος ένας σαφώς αναγνωρισμένος ρόλος του Fas/FasL συστήματος αφορά τη συμμετοχή του στη κυτταροτοξική δράση των T και NK λεμφοκυττάρων και την επαγωγή από αυτά του θανάτου των κυττάρων στόχων (Brunner et al, 2003).

1.4.2.4. Οι κασπάσες

Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που ενέχονται τόσο στην εκκίνηση όσο και στην εκτέλεση της απόπτωσης. Ονομάζονται κασπάσες διότι είναι ειδικές πρωτεάσες με στόχους κατάλοιπα κυστεΐνης (cysteine aspartate-specific proteases, caspases). Διακρίνονται σε κασπάσες εκκινήτες και κασπάσες εκτελεστές. Η ενεργοποίηση των τελευταίων αναφέρεται συχνά σαν το σημείο του μονοπατιού όπου το κύτταρο είναι υποχρεωμένο να οδηγηθεί σε απόπτωση. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί 14 κασπάσες στα θηλαστικά, από τις οποίες 11 ομόλογες παρουσιάζονται στον άνθρωπο (Ashe et al, 2003). Οι κασπάσες εκφράζονται ως προένζυμα και ωριμάζουν σε πλήρως λειτουργικές πρωτεάσες με δύο διαδοχικά γεγονότα πρωτεόλυσης. Έχουν την ικανότητα να αυτό-ενεργοποιούνται ή να ενεργοποιούνται από άλλες κασπάσες, στα πλαίσια ενός καταρράκτη αλληλεπιδράσεων. Οι κασπάσες-εκκινήτες ενεργοποιούνται είτε από το ενδογενές, είτε από το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι. Οι υποδοχείς θανάτου με τη βοήθεια πρόσθετων μορίων ενεργοποιούν τις κασπάσες 2, 8, ή 10, ενώ ενδογενή αποπτωτικά σήματα καταλήγουν στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Η ενεργοποίηση των κασπασών-εκκινήτων είναι το πρώτο βήμα ενός αυστηρά ελεγχόμενου, μη αντιστρεπτού, αυτο-ενισχυόμενου πρωτεολυτικού μονοπατιού. Οι κασπάσες-εκκινήτες είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τόσο τις κασπάσες-εκτελεστές όσο και τις ίδιες ενισχύοντας έτσι τον καταρράκτη της ενεργοποίησης αυτής της οικογένειας

πρωτεασών. Συνεπώς, η ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών είναι κοινή τόσο για το εξωγενές όσο και για το ενδογενές μονοπάτι (Ashe et al, 2003). Έως σήμερα, έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός μορίων-στόχων των εκτελεστών κασπασών. Εν συντομία, μέσω πρωτεολυτικών διαδικασιών, οι κασπάσες ενεργοποιούν είτε αναστέλλουν πρωτεΐνες-στόχους οι οποίες έχουν σημαντικούς ρόλους στην διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας (Sahara et al, 1999; Kothakota et al, 1997), στον κυτταρικό θάνατο (Clem et al, 1998; Cheng et al, 1997), στο μεταβολισμό του DNA (Sakahira et al, 1998; Enari et al, 1998), στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Levkau et al, 1998; Zhou et al, 1998) και στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση (Widmann et al, 1998; Rudel et al, 1997).

1.4.3. Η απόπτωση στην τροφοβλάστη

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η τροφοβλάστη διακρίνεται σε δύο κύριους πληθυσμούς: (α) την λαχνωτή τροφοβλάστη, η οποία αποτελεί το επιθηλιακό κάλυμμα των λαχνών, και (β) την εξωλαχνωτή τροφοβλάστη που διεισδύει στο μητρικό ιστό και έρχεται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του φθαρού, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια, έχει ανακοινωθεί σε ένα αριθμό μελετών η εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων, ή/και στοιχείων της απόπτωσης και στους δύο τροφοβλαστικούς πληθυσμούς.

1.4.3.1. Η απόπτωση στην λαχνωτή τροφοβλάστη

Στην λαχνωτή τροφοβλάστη πιστεύεται ότι η απόπτωση έχει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στη διαδικασία ανανέωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων, καθώς και στη διαδικασία σχηματισμού του συγκυτίου, μια διαδικασία που χαρακτηρίζει τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Ο σχηματισμός του συγκυτίου φαίνεται ότι σχετίζεται με την ενεργοποίηση των εναρκτήριων σταδίων του αποπτωτικού μονοπατιού στα υποκείμενα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Παράλληλα, η ενεργοποίηση των τελικών σταδίων της απόπτωσης στην συγκυτιοτροφοβλάστη, έχει συσχετιστεί με την απομάκρυνση των συγκυτιακών κόμβων (syncytial knots) από τα συγκεκριμένα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή θεωρείται σημαντική για την ανανέωση του λαχνωτού τροφοβλαστικού ιστού (Huppertz et al, 1998; Huppertz et al, 1999; Huppertz et al,

2001; Black et al, 2004; Mayhew et al, 2001). Τέλος, έχει ανακοινωθεί ότι η απόπτωση στη λαχνωτή τροφοβλάστη αυξάνεται στις δύο πιο κοινές σχετιζόμενες με τον πλακούντα νόσους, δηλαδή την προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Ωστόσο η σημασία του φαινομένου αυτού στην παθοφυσιολογία των δύο νόσων δεν είναι γνωστή (Smith et al, 1997; Allaire et al, 2000; Erel et al, 2001; Ishihara et al, 2002).

1.4.3.2. Η απόπτωση στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη

Ο ρόλος της απόπτωσης στην φυσιολογία της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης, έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Τα πεπτίδια Fas και FasL έχουν εντοπιστεί στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη σε πλακούντες πρώτου αλλά και τρίτου τριμήνου (Murakoshi et al, 2003; Uckan et al, 1997; Hammer et al, 2000). Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 εντοπίζεται κυρίως στα ανώτερα τμήματα των τροφοβλαστικών κολωνών, δηλαδή στους πολλαπλασιαζόμενους τροφοβλάστες και στα πρώτα θυγατρικά κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα για διαίρεση. Επίσης η πολλαπλασιαζόμενη τροφοβλάστη δεν παρουσιάζει κανένα σημείο απόπτωσης ή έκφρασης των υποδοχέων θανάτου Fas και TNF-R1. Οι τελευταίοι κάνουν την εμφάνισή τους χαμηλότερα στο μονοπάτι διεύθυνσης της ΕΛΤ και συγκεκριμένα στον πρώτο πληθυσμό των θυγατρικών κυττάρων που έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Στα βαθύτερα στρώματα του φθαρτού καθώς και στο μυομήτριο, εντοπίζονται λίγοι μεμονωμένοι εξωλαχνωτοί τροφοβλάστες σε τελικά στάδια της απόπτωσης (Huppertz et al, 1998; Kadyrov et al, 2003; von Rango et al, 2003). Η ρύθμιση της απόπτωσης της ΕΛΤ είναι άγνωστη, αλλά πιστεύεται ότι τα φθαρτικά κύτταρα και τα ανοσοκύτταρα του φθαρτού παίζουν σημαντικό ρόλο. Αυτή η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην τροφοβλάστη και στα μητρικά κύτταρα αυξάνει την πολυπλοκότητα της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου στον πλακούντα (Parham et al, 2004).

Η απόπτωση της ΕΛΤ στην προεκλαμψία και στην IUGR έχει μελετηθεί από διάφορες ομάδες ερευνητών, ωστόσο οι μελέτες δεν συμφωνούν μεταξύ του. Έχει ανακοινωθεί ότι σε περιπτώσεις IUGR και προεκλαμψίας, η ΕΛΤ παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης. Δεδομένου ότι, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, οι νόσοι αυτές σχετίζονται με ελαττωμένη τροφοβλαστική διεύθυνση, θεωρήθηκε ότι η παρατηρούμενη αύξηση της απόπτωσης αποτελεί σημαντικό αιτιολογικό

παράγοντα (Dempsey et al, 1972; Demir et al, 1989; DiFederico et al, 1999). Πιο πρόσφατα ωστόσο, τα ανωτέρω ευρήματα αμφισβητήθηκαν, καθώς παρατηρήθηκε ότι η απόπτωση της ΕΛΤ ελαττώνεται σε περιπτώσεις IUGR και προεκλαμψίας, σε σύγκριση με φυσιολογικούς πλακούντες (Kadyrov et al, 2003). Η ακριβής συμπεριφορά των τροφοβλαστικών κυττάρων σε αυτές τις νόσους, καθώς και η σημασία της απόπτωσης στην παθοφυσιολογία τους απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

1.5. Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων και οι υποδοχείς τους

1.5.1. Γενικά

Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων περιλαμβάνει τα πεπτίδια εκλυτικό παράγοντα/ορμόνη της κορτικοτροπίνης (corticotropin-releasing factor/hormone, CRF/CRH) και τις ουροκορτίνες 1, 2, 3 (urocortins, UCN1, UCN2, UCN3) στα θηλαστικά, καθώς και τις urotensin1 (στους ιχθείς) και sauvagine (στα αμφίβια). Πρόκειται για ομόλογα πεπτίδια με αρκετά συντηρημένη αμινοξική ακολουθία (εικόνα 16).

Peptide	Sequence	Length	Identity (%)
hCRF	SEEPPI S LDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMETI	41	100
oCRF	SQEPPI S LDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPI S IDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRKYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLS S IDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPIS S IDLSELLRKMIETIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI	40	48
hSRP	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
hSCP	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAAANHLMAQI	38	32
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRAKAAAANAQLMAQI	38	26

Εικόνα 16. Η αλληλουχία των μελών της οικογένειας των πεπτιδίων του CRF. Τα αμινοξέα τα οποία συντηρούνται σε όλα τα πεπτίδια είναι χρωματισμένα με πράσινο χρώμα.

1.5.2. Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF)

Ο CRF, ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων, απομονώθηκε για πρώτη φορά από πρόβειο υποθάλαμο και χαρακτηρίστηκε από τον Vale και τους συνεργάτες του (Vale et al, 1981; Spiess et al, 1981). Οφείλει την ονομασία του στην ιδιότητά του να παρουσιάζει in vivo και in vitro ισχυρή επαγωγική δράση στην έκλυση της κορτικοτροπίνης (adrenocorticotropin hormone, ACTH) από την υπόφυση. Γι' αυτό το λόγο αναγνωρίστηκε αρχικά ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο και κύριος ρυθμιστής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ άξονας). Συγκεκριμένα, ο CRF συντίθεται στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και εκκρίνεται στην πυλαία κυκλοφορία για να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) και την παραγωγή και έκκριση της ACTH από την υπόφυση (Vale et al, 1983). Εκτός του υποθαλάμου ο CRF παράγεται σε μια ποικιλία νευρωνικών και μη κυττάρων σε ολόκληρο το σώμα. Το πεπτίδιο ανευρίσκεται σε πολλές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, στο φλοιό των επινεφριδίων, στα λεμφοκύτταρα, στο πάγκρεας, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στη γαστρεντερική οδό, στο δέρμα και σχεδόν σε όλους τους ιστούς που σχετίζονται με την αναπαραγωγή συμπεριλαμβανομένων των γονάδων, της μήτρας και του πλακούντα (Dautzenberg et al, 2002). Σήμερα είναι γνωστό ότι ο CRF καθώς και τα ομόλογά του πεπτίδια αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές και συντονιστές των συμπεριφορικών, ενδοκρινικών και ανοσολογικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι στο στρες (Chrousos et al, 1995).

1.5.3. Οι ουροκορτίνες (UCNs)

Η UCN1 (ή απλά UCN) αποτελείται από 40 αμινοξέα και παρουσιάζει ~ 45% ομολογία με τον ανθρώπινο CRF (Vaughan et al, 1995). Το πεπτίδιο εντοπίζεται σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου και κυρίως στον ιππόκαμπο, σε ένα μικρός πληθυσμό νευρώνων του μετωπιαίου φλοιού, και στην περιοχή Edinger-Westphal (Bittencourt et al, 1999). Περισσότερο ευρεία είναι η έκφρασή της στην περιφέρεια όπου το πεπτίδιο ανευρίσκεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, του λιπώδους ιστού και των συστημάτων ανοσοποιητικό, γαστρεντερικό, καρδιαγγειακό, αναπαραγωγικό (Slominski et al, 2001; Seres et al, 2004; Bamberger

et al, 1998; Bamberger et al, 2000; Baigent et al, 2001; Parkes et al, 2001; Florio et al, 2004).

Η UCN2 ή stresscopin-related peptide είναι ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων (Reyes et al, 2001). Εκφράζεται σε πολύ συγκεκριμένες περιοχές στον εγκέφαλο. Στα τρωκτικά έχει εντοπιστεί στο μακροκυτταρικό τμήμα του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθάλαμου, τον υπεροπτικό και τοξοειδή πυρήνα και τους κινητικούς πυρήνες του στελέχους και του νωτιαίου μυελού (Mano-Otagiri et al, 2004). Στην περιφέρεια, το mRNA της UCN2 έχει ανιχνευτεί στη καρδιά, στον πνεύμονα, στους μύες, στο στομάχι, στο δέρμα, στα επινεφρίδια, στο ενδομήτριο και στον πλακούντα (Chen et al, 2004; Hsu et al, 2001; Imperatore et al, 2006; Slominski et al, 2004).

Η UCN3 ή stresscopin (Lewis et al, 2001) αποτελείται επίσης από 38 αμινοξέα. Εκφράζεται κεντρικά κυρίως στον υποθάλαμο, στον μέσο πυρήνα της αμυγδαλής και στο στέλεχος (Suda et al, 2004). Στην περιφέρεια το mRNA της UCN3 ανιχνεύεται στους μύες, στο δέρμα, στα επινεφρίδια, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στην καρδιά, στα β-κύτταρα του παγκρέατος και στο λιπώδη ιστό (Hsu et al, 2001; Saruta et al, 2005; Takahashi et al, 2004; Li et al, 2003; Zhao et al, 1998).

1.5.4. Χαρακτηριστικά και ρύθμιση των γονιδίων CRF και UCN

Τα γονίδια των CRF και UCN αποτελούνται από δύο εξόνια και ένα ιντρόνιο. Τα προ- πεπτίδια και των δύο κωδικοποιούνται από το αντίστοιχο δεύτερο τους εξόνιο, ενώ το πρώτο εξόνιο περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της 5'-μη μεταφραζόμενης περιοχής (Zhao et al, 1998). Τα δύο γονίδια περιέχουν παρόμοιες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές τους. Έχει δειχθεί ότι για να ενεργοποιηθεί η έκφραση του CRF στον υποθάλαμο απαιτείται φωσφορυλίωση του CREB (cAMP response element binding protein) (Chen et al, 2001). Μελέτες σε κύτταρα PC12 για τη ρύθμιση της έκφρασης της UCN1 από τον CREB υποστηρίζουν ανάλογο λειτουργικό ρόλο του CRE στον υποκινητή της UCN (Zhao et al, 1998). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το REST/NRSF ρυθμίζει την έκφραση του CRF (Seth et al, 2001), ενώ η αλληλουχία τύπου NRSE/RE1 στον υποκινητή της UCN φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή της (Zhao et al, 1998). Και τα δύο γονίδια περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Bln-2, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του CRF (Ramkumar et al, 1999). Όσον αφορά την UCN δεν υπάρχει ανάλογη πληροφορία. Επιπλέον, τα γονίδια των πεπτιδίων CRF περιέχουν

στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών. Έχει αναφερθεί ρύθμιση του mRNA της UCN1 και της UCN2 σε περιφερικούς ιστούς από γλυκοκορτικοειδή (Chen et al, 2003).

1.5.5. Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων (CRFRs, CRF-BP)

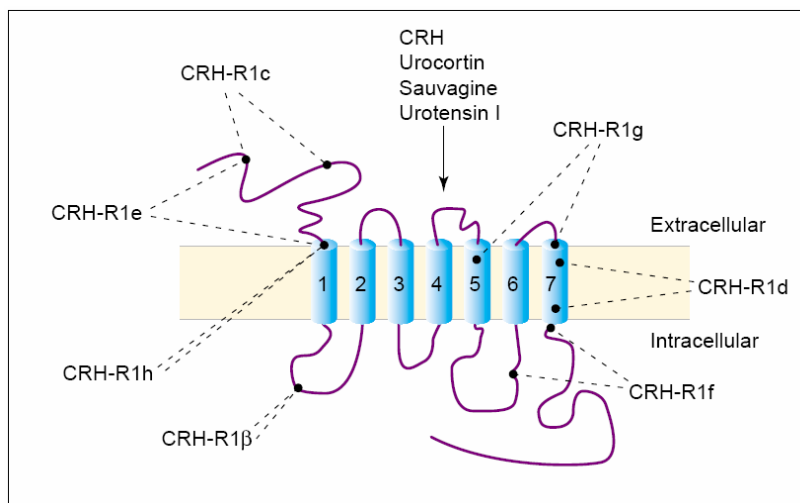
1.5.5.1. Γενικά

Οι δράσεις των CRF πεπτιδίων διαμεσολαβούνται ειδικών υποδοχέων (CRF Receptors, CRFRs) και τροποποιούνται από την CRF-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRF-binding protein, CRFBP). Οι CRFRs ανήκουν στην υπεροικογένεια των συζευγμένων με G-πρωτεΐνη διαμεμβρανικών υποδοχέων (G-protein coupled receptors, GPCRs), με το τυπικό πρότυπο 7 διαμεμβρανικών περιοχών. Στα περισσότερα είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχουν ανιχνευθεί δύο υποδοχείς, οι CRFR1 (Chen et al, 1993) και CRFR2 (Liaw et al, 1996), οι οποίοι κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια και παρουσιάζουν περίπου 70% αμινοξική ομολογία. Το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας παρουσιάζεται στο διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα τους (80-85%), ενώ το εξωκυττάριο τμήμα και ειδικά το αμινοτελικό άκρο παρουσιάζει ένα μόλις 40% ομολογίας (Dautzenberg et al, 2002). Απαντώνται σε διάφορες ισομορφές ο καθένας, γεγονός που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα. Στους τελεοϊχθύες έχει απομονωθεί και ένας τρίτος CRF υποδοχέας (CRFR3) ο οποίος είναι περίπου 85% ομόλογος με τον CRFR1 (Arai et al, 2001). Οι CRFRs παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς και διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες όσον αφορά τους προσδέτες τους.

1.5.5.2. Ο CRFR1

Ο CRFR1 αποτελείται από 415-420 αμινοξέα και είναι ο κύριος τύπος στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης όπου μεσολαβεί για τη δράση του CRF στην επαγωγή της έκκρισης ACTH. Υπάρχει μια λειτουργική ισομορφή του CRFR1 και πολλές μη λειτουργικές (Hauger et al, 2003). Ο CRFR1 προσδένει τον CRF και τις UCN1, urotensin I και sauvagine με περίπου όμοια συνάφεια ($K_d \sim 1-2nM$), αλλά δεν αναγνωρίζει τις UCN2 και 3. Ο υποδοχέας ανευρίσκεται σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, κυρίως στο φλοιό, στέλεχος, ιππόκαμπος, αμυγδαλή,

υπόφυση και υποθάλαμο. Η έκφρασή του στον υποθάλαμο επάγεται από το στρες (Sanchez et al, 1999). Στην περιφέρεια, εντοπίζεται σε ποικίλες περιοχές, μεταξύ των οποίων στα συστήματα του ανοσοποιητικού, γαστρεντερικού, αναπαραγωγικού, στα επινεφρίδια, στο δέρμα, και στο λιπώδη ιστό, (Chatzaki et al, 2004; Slominski et al, 2004; Seres et al, 2004). Τέλος ο CRFR1 έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους (Reubi et al, 2003) (**Εικόνα 17**).

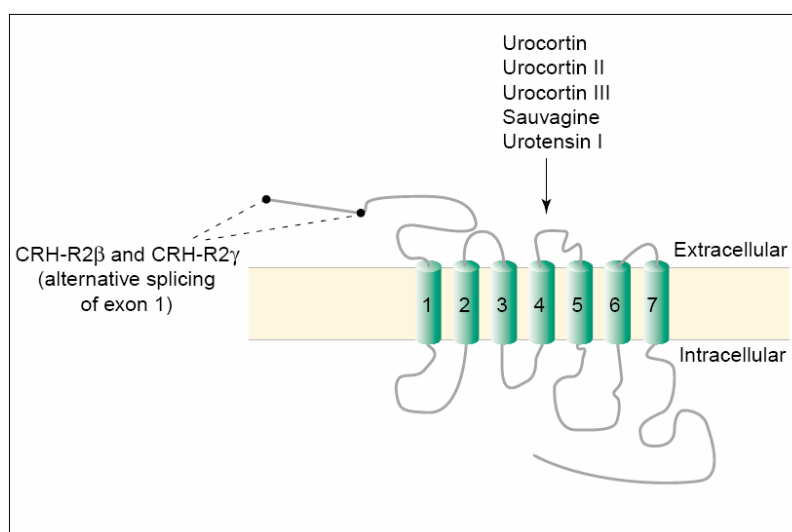


Εικόνα 17. Ο υποδοχέας CRFR1. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις θέσεις όπου υπάρχουν αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μεταξύ των διαφόρων ισομορφών.

1.5.5.3. Ο CRFR2

Ο CRFR2, μια πρωτεΐνη 397-438 αμινοξέων, έχει τρεις λειτουργικές ισομορφές, τις CRFR2α-γ. Παρόλο που το αμινοτελικό άκρο καθώς και η ιστική κατανομή των τριών ισομορφών διαφέρει, δεν παρουσιάζουν σημαντικές φαρμακολογικές διαφορές μεταξύ τους. Η UCN1 έχει 40 φορές περίπου μεγαλύτερη συγγένεια για τον CRFR2 απ' ότι έχει ο CRF. Τα πεπτίδια UCN2 και UCN3 προσδένονται αποκλειστικά και με μεγάλη συγγένεια στον CRF2 (Reyes et al, 2001; Lewis et al, 2001). Το γεγονός πάντως ότι η συγγένεια της UCN3 για τον CRF2 είναι 10 φορές περίπου μικρότερη από εκείνη της UCN1 ή της UCN2 δημιουργεί υπόνοιες για την ύπαρξη κάποιου τρίτου CRF υποδοχέα και στα θηλαστικά (Hoare et al, 2005). Ο CRF2α, εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (υποθάλαμος, πλάγιο

διάφραγμα, ραφιοειδής πυρήνας στον μεσεγκέφαλο, οσφρητικός βολβός) και στην υπόφυση (Lovenberg et al, 1995). Ο CRF2β ανιχνεύεται κατά κύριο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας, αναπαραγωγικό σύστημα) και λιγότερο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες) (Perrin et al, 1999). Ο CRF2c έχει ανιχνευθεί μόνο στην μεταιχμιακή περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου (Kostich et al, 1998). Τέλος, ο CRFR2, όπως και ο CRFR1, έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους (Reubi et al, 2003) (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18. Ο υποδοχέας CRFR2. Οι isoμορφές CRFR2β και γ διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο (το οποίο φαίνεται να είναι σημαντικό για τη πρόσδεση του προσδέτη) αλλά διαθέτουν ταυτόσημες εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας έλικες καθώς και διαμεμβρανικά τμήματα.

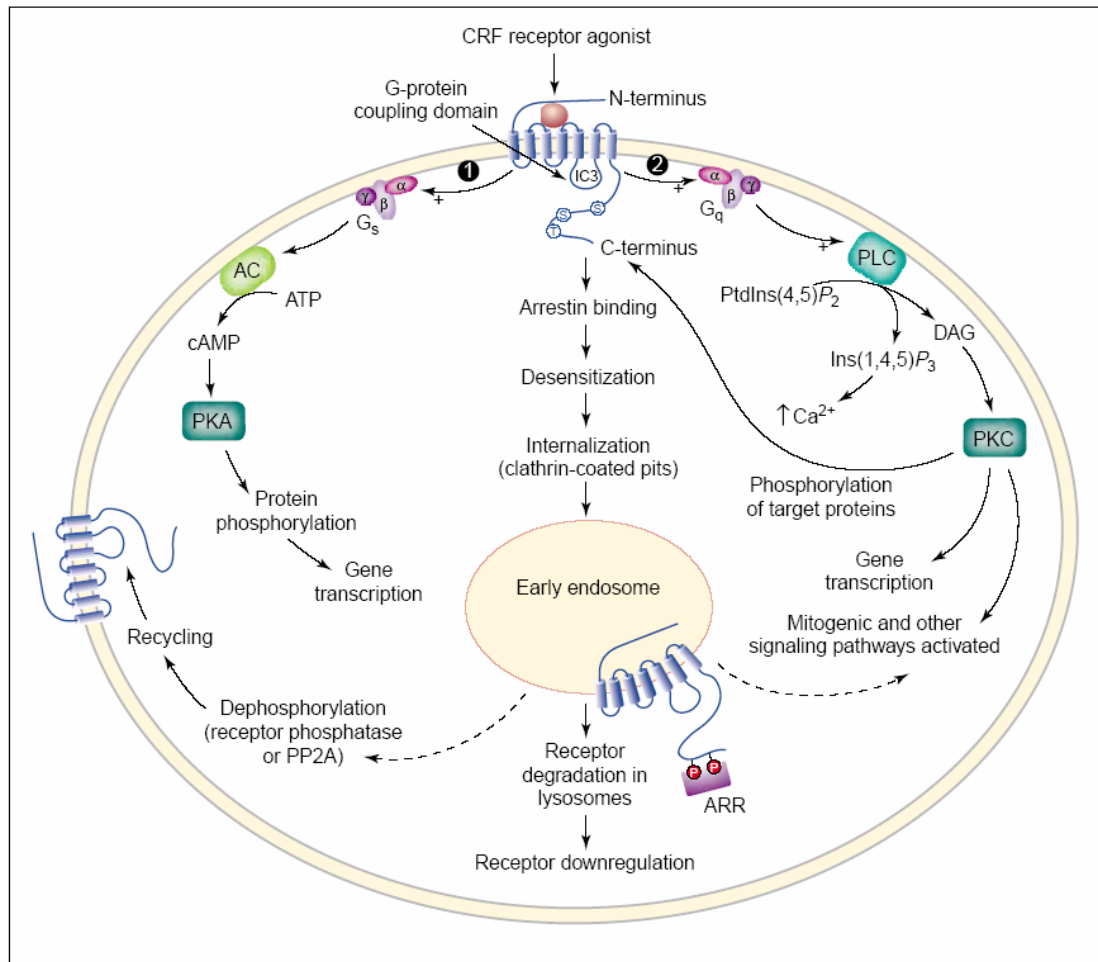
Πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξη μίας διαλυτής μορφής του υποδοχέα CRFR2 στον εγκέφαλο ποντικού, ο **sCRFR2α** (Chen et al, 2005). Πρόκειται για προϊόν εναλλακτικού ματίσματος (splice variant) του mRNA του CRFR2 στο οποίο λείπει το εξόνιο 6. Η συγγένειά του για τα πεπτίδια CRF και UCN1 είναι μεγάλη και η παρουσία του μεταβάλλει την ικανότητα των CRF και UCN1 να επάγουν την ενεργοποίηση των διαμεμβρανικών CRF.

1.5.5.4. Η CRFBP

Οι δράσεις των CRF πεπτιδίων τροποποιούνται από την CRF-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRF-binding protein, CRF-BP), μια γλυκοπρωτεΐνη 37 kDa. Στον άνθρωπο η CRF-BP εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, αμυγδαλή, υποθάλαμος), αλλά συντίθεται και στην περιφέρεια, όπως στον πλακούντα, στο ήπαρ και στα επινεφρίδια, και εκλύεται στην κυκλοφορία (Chatzaki et al, 2002). Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή δρα σαν ένας τροποποιητής της ενεργοποίησης του άξονα ΥΥΕ και των ενδοκρινικών, αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων του CRF, περιορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του ελεύθερου προσδέτη και επάγοντας την ενδοκύττωση και καταβολισμό του πεπτιδίου (Suda et al, 1988; Westphal et al, 2006).

1.5.5.5. Σηματοδότηση μέσω των CRFRs

Η πρόσδεση των αγωνιστών στα εξωκυττάρια τμήματα των CRFRs έχει σαν αποτέλεσμα τη αλλαγή της στερεοδιάταξης των υποδοχέων σε μια ενεργή κατάσταση, αυξάνοντας έτσι την συγγενείά τους για την Gs πρωτεΐνη. Κατά συνέπεια ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση και η πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA) καθώς και άλλα εξαρτώμενα από το κυκλικό AMP (cAMP) ενδοκυττάρια μονοπάτια (Dautzenberg et al, 2000). Επιπρόσθετοι δεύτεροι αγγελιοφόροι μπορεί να επιπλέκονται στη σηματοδότηση των CRFRs. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές G πρωτεΐνες προσδένονται σε CRFR1 υποδοχείς ενδογενώς εκφραζόμενους στον πλακούντα και στον εγκεφαλικό φλοιό, ή υπερκφραζόμενους σε HEK 293 κύτταρα (Grammatopoulos et al, 2000; Grammatopoulos et al, 2001; Karteris et al, 2001). Στα κύτταρα Leydig και στον πλακούντα οι CRFR1 υποδοχείς μπορεί να σηματοδοτούν επίσης μέσω των Gq πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας έτσι την φωσφολιπάση C (PLC) και το σχηματισμό φωσφατιδίων ινοσιτόλης (Grammatopoulos et al, 2000). Ο CRFR2β επίσης επάγει το σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης [Ins(1,4,5)P₃] (Kiang et al, 1998), ενώ έχει δειχθεί ακόμη ότι CRFR1 υποδοχείς στον εγκεφαλικό φλοιό μπορούν να συζευχθούν με Gs και με Gq πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας έτσι τόσο το μονοπάτι του cAMP όσο και της PLC (Dieterich et al, 1996) (**εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του CRF και η ρύθμισή τους. Οι CRFRs μεταβιβάζουν το σήμα τους κυρίως μέσω των Gs πρωτεϊνών γεγονός που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα cAMP. Επιπρόσθετα, και οι δύο CRFRs μπορούν να συζευχθούν με Gq πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PLC.

1.5.6. Τα CRF πεπτίδια και οι υποδοχείς τους στον πλακούντα

1.5.6.1. Έκφραση στον πλακούντα

Όλα τα CRF πεπτίδια και οι υποδοχείς τους έχουν εντοπιστεί σε διάφορες περιοχές της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού ή/και στον πλακούντα.

Ο CRF εκφράζεται στους ενδομήτριους αδένες κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου, στο μυομήτριο, στον φθαυτό, στα ανοσοκύτταρα και αγγεία της περιοχής και στη λαχνωτή και εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, (Petraglia et al, 1987; Clifton et al, 1998; Petraglia et al, 1992; Makrigiannakis et al, 2001; Riley et al, 1991;

Warren et al, 1995; Zoumakis et al, 2001). Επίσης εκκρίνεται στη κυκλοφορία της εγκύου γυναίκας και η συγκέντρωσή του αυξάνει με εκθετικό ρυθμό κατά τη πρόοδο της κύησης (Goland et al, 1986; Campbell et al, 1987).

Η UCN εκφράζεται σε αντίστοιχες θέσεις με τον CRF στο αναπαραγωγικό σύστημα. Έτσι έχει εντοπιστεί στους ενδομήτριους αδένες, στο μυομήτριο, στο φθαρτό, στα ανοσοκύτταρα και αγγεία της περιοχής και στη λαχνωτή τροφοβλάστη. Η έκφρασή της στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη δεν έχει ακόμη μελετηθεί. (Clifton et al, 2000; Petraglia et al, 1996; Sehringer et al, 2004; Florio et al, 2002). Η UCN επίσης ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα στη κυκλοφορία της εγκύου, αλλά η συγκέντρωσή της δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της κύησης (Clifton et al, 2000).

Πρόσφατα, οι UCN2 και UCN3 εντοπίστηκαν στη λαχνωτή τροφοβλάστη στον ανθρώπινο πλακούντα. Η UCN2, αλλά όχι η UCN3, εντοπίστηκε επίσης στα μητρικά και εμβρυικά αγγεία. Τέλος η UCN2 εντοπίστηκε στο μυομήτριο της εγκύου μήτρας (Imperatore et al, 2006; Karteris et al, 2004).

Οι CRFRs εκφράζονται στους ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος με τις διάφορες ισομορφές τους να παρουσιάζουν ξεχωριστή χωροχρονική ρύθμιση. Οι CRFR1α, CRFR2α και σε μικρότερο βαθμό ο CRFR1β, εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο (Karteris et al, 2004). Το μυομήτριο της μη-εγκύου γυναίκας εκφράζει τους CRFR1α, CRFR1β και CRFR2β. Στην έγκυο μήτρα, και μετά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, στο μυομήτριο εμφανίζεται ο CRFR2α, ενώ στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ανιχνεύονται επιπρόσθετα στο μυομήτριο οι CRFR1γ και CRFR1δ (Grammatopoulos et al, 1999; Grammatopoulos et al, 1998). Οι CRFR1α, CRFR1γ, CRFR1δ και CRFR2β έχουν εντοπιστεί στη συγκύτιοτροφοβλάστη, σε λίγα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, στο φθαρτό καθώς και στις εμβρυικές μεμβράνες, ενώ στα αγγεία των λαχνών εντοπίζεται μόνο ο CRFR2β (Karteris et al, 2000; Florio et al, 2000). Ο CRFR1 (χωρίς να διακρίνεται κάποιος ξεχωριστός υπότυπος), αλλά όχι ο CRFR2, εκφράζεται στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη (Makrigiannakis et al, 2001).

Η CRF-BP, τέλος, έχει εντοπιστεί στο μυομήτριο, στο φθαρτό και στον πλακούντα (Wetzka et al, 2003; Sehringer et al, 2005; Klimaviciute et al, 2006).

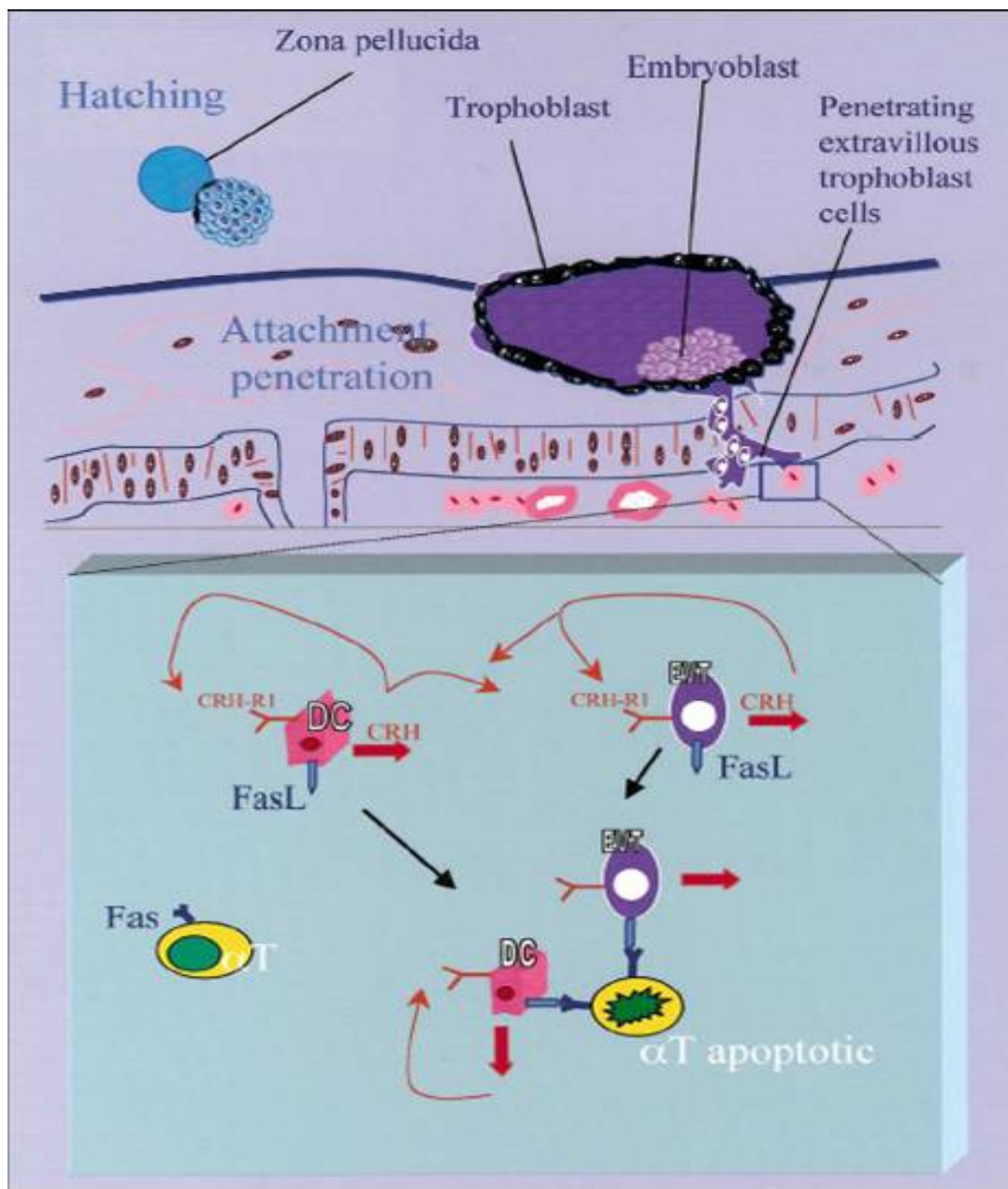
1.5.6.2. Συμμετοχή στη φυσιολογία του πλακούντα

Ο βιολογικός ρόλος των CRF πεπτιδίων στη φυσιολογία της εγκυμοσύνης, έχει αρχίσει να μελετάται και να προσδιορίζεται τα τελευταία χρόνια. Δεδομένης της έκφρασης των CRF πεπτιδίων στο ανοσοποιητικό σύστημα και των ποικίλων ρόλων τους στη λειτουργία του (Gravanis and Margioris, 2005), έχει προταθεί ότι τα πεπτίδια αυτά ελέγχουν σημαντικές αναπαραγωγικές λειτουργίες με φλεγμονώδη χαρακτήρα, όπως η φθαρτοποίηση, η εμφύτευση και ο τοκετός (Kalantaridou et al, 2003). Οι περισσότερες πληροφορίες από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα, αφορούν τον πλακουντιακό CRF, λιγότερες την UCN1 και ελάχιστες την UCN2, ενώ καμία μελέτη δεν έχει περιγράψει κάποια λειτουργία για την πλακουντιακή UCN3.

Ο CRF έχει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του στρώματος του ενδομητρίου σε φθαρτό. Συγκεκριμένα, ο CRF επάγει τη φθαρτοποίηση των στρωματικών ενδομήτριων κυττάρων και ενισχύει την αντίστοιχη δράση της προγεστερόνης. Παράλληλα ρυθμίζει την έκφραση των ιντερλευκινών 1 και 6 και της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂) που παράγονται τοπικά και επηρεάζουν την αυτή διαδικασία (Ferrari et al, 1995; Zoumakis et al, 2000; Makrigiannakis et al, 1999).

Παράλληλα, υποστηρίζεται ένας ρόλος για τον CRF στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και τη συνεπόμενη διείσδυση της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης στους ιστούς της μήτρας. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι κατά την εμφύτευση, η απόκριση του ενδομητρίου στη διείσδυση του εμβρυικού ημιαλλομοσχεύματος έχει τα χαρακτηριστικά μίας οξείας, άσηπτης φλεγμονώδους αντίδρασης. Ωστόσο, το έμβρυο μόλις εμφυτευτεί, καταστέλλει την αντίδραση αυτή και εμποδίζει την απόρριψη. Ταυτόχρονα, το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας καταστέλλει την αντίδραση μοσχεύματος κατά του ξενιστή (graft versus host reaction) η οποία προέρχεται από το ανοσολογικό σύστημα του εμβρύου (Gill et al, 1986). Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται προκειμένου να αποφευχθεί η απόρριψη του εμβρύου από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας έχουν αποτελέσει ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Διάφορες ομάδες έχουν περιγράψει και προτείνει μια σειρά από τέτοιους μηχανισμούς (Ober et al, 1998; Mellor et al, 2001; Thellin et al, 2000). Μελετώντας το ίδιο ερώτημα, προηγούμενα αποτελέσματα της δικής μας ομάδας, έδειξαν ότι ο CRF επάγει την έκφραση του FasL στην ΕΑΤ. Με τον τρόπο αυτό ο CRF ενισχύει την ικανότητα της ΕΑΤ να προκαλεί την απόπτωση των

γειτονικών ενεργοποιημένων μητρικών Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα Fas (Makrigiannakis et al, 2001). Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί τοπικά κατασταλτικά απέναντι στην ενεργοποίηση του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος και προστατευτικά απέναντι στην εμβρυϊκή προέλευσης ΕΛΤ (εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση των πρώτων σταδίων της εμφύτευσης. Ο CRF που παράγεται τοπικά από την ΕΛΤ και τα φαρμακικά κύτταρα δρα παρακρινώς και αυτοκρινώς μέσω του CRFR1 επάγοντας την έκφραση του FasL και ενισχύει την ικανότητα των κυττάρων ΕΛΤ να προκαλούν απόπτωση των ενεργοποιημένων μητρικών Τ κυττάρων

(εκφράζουν τον υποδοχέα Fas στην επιφάνειά τους). DC: φθαρτικό κύτταρο, EVT: ΕΛΤ, αΤ: ενεργοποιημένο Τ κύτταρο.

Ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος των ουροκορτινών στα ανωτέρω περιγραφόμενα φαινόμενα (φθαρτοποίηση, εμφύτευση και τροφοβλαστική διείσδυση), παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συγκεκριμένες δράσεις του CRF μεσολαβούνται μέσω του CRFR1 (Makrigiannakis et al, 2001) και η UCN1 ενεργοποιεί τον υποδοχέα αυτό με αντίστοιχη με τον CRF ισχύ (Perrin et al, 1998). Για το λόγο αυτό έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η UCN1 είναι πολύ πιθανό να ενέχεται μαζί με τον CRF στη ρύθμιση των φαινομένων αυτών (Florio et al, 2004).

Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο CRF και η UCN φαίνεται να ελέγχουν από κοινού έναν αριθμό λειτουργιών:

(α) Τα δύο νευροπεπτίδια συμμετέχουν στη ρύθμιση της συσπαστικότητας του μυομητρίου παρουσιάζοντας τόσο άμεση όσο και έμμεση (για παράδειγμα ο CRF προάγει την παραγωγή μυοσυσπαστικών προσταγλανδινών και οξυτοκίνης από τον πλακούντα) δράση στα μυικά κύτταρα (Grammatopoulos et al, 1994; Grammatopoulos et al, 1996; Grammatopoulos et al, 1998; Jones et al, 1989; Florio et al, 1996; Grammatopoulos et al, 2000).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη μη-έγκυο μήτρα και στα πρώτα στάδια της κύησης, τα νευροπεπτίδια ασκούν μυοχαλαρωτική δράση στο μυομήτριο. Αντίθετα, στα τελευταία στάδια της κύησης ο ρόλος τους στρέφεται προς τη μυοσύσπαση (Hillhouse et al, 2002).

(β) Οι CRF και UCN ενέχονται στη ρύθμιση της αιματικής ροής της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας λειτουργώντας σαν αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες. Η δράση τους φαίνεται να διαμεσολαβείται από ένα εξαρτώμενο από το οξείδιο του αζώτου/cGMP ενδοκυττάριο μονοπάτι, με τη UCN να παρουσιάζεται σαν ο περισσότερο ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας (Clifton et al, 1995; Leitch et al, 1998).

(γ) Τέλος, ο πλακουντιακός CRF συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας των εμβρυικών επινεφριδίων μέσω της επαγωγής απελευθέρωσης θεϊκής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA-S), αλλά και της ενεργοποίησης του εμβρυικού ΥΥΕ άξονα και της απελευθέρωσης εμβρυικής κορτιζόλης. Ο ανθρώπινος πλακούντας χρησιμοποιεί την παρεχόμενη από τα εμβρυικά επινεφρίδια DHEA-S σαν

το κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση οιστρογόνων, τα οποία είναι απαραίτητα για τις φυσιολογικές αλλαγές που οδηγούν στον τοκετό. Ως εκ τούτου το νευροπεπτίδιο CRF συμμετέχει στους μηχανισμούς τους υπεύθυνους για την ωρίμανση διαφόρων εμβρυικών οργάνων και την προετοιμασία του τοκετού (Karteris et al, 2001; Smith et al, 1998).

Λόγω των ανωτέρω περιγραφόμενων λειτουργιών, έχει προταθεί ότι οι CRF και UCN ενέχονται στους φυσιολογικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τον χρόνο τοκετού (Grammatopoulos et al, 1999; McLean et al, 1995; Challis et al, 1995). Στην υπόθεση αυτή συνάδουν επίσης τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης η οποία προτείνει ότι οι πλακουντιακοί CRF και UCN αυξάνουν τοπικά την δράση πρωτεασών που διασπών τη μεσοκυττάρια ουσία (matrix metalloproteinases, MMPs). Με το τρόπο αυτό τα νευροπεπτίδια ευοδώνουν την ρήξη των μεμβρανών και συνεπώς την έναρξη και πρόοδο του τοκετού (Li et al, 2005).

1.5.6.3. Συμμετοχή στη παθοφυσιολογία του πλακούντα

Δεδομένου του πολύπλευρου φυσιολογικού ρόλου των CRF πεπτιδίων στον πλακούντα, είναι αναμενόμενο διαταραχές στην έκφραση και λειτουργία του συστήματος, να προκαλούν διαταραχές στη λειτουργία του πλακούντα και συνεπώς στην πορεία της κύησης.

Σε συμφωνία με την υπόθεση ότι τα CRF πεπτίδια ελέγχουν τον χρόνο τοκετού, αναφέρονται αυξημένα επίπεδα CRF στο πλάσμα γυναικών με πρόωρο τοκετό (Warren et al, 1992; Majzoub et al, 1999; Korebrits et al, 1998; Hobel et al, 1999). Επίσης έχουν εντοπιστεί ελαττωμένα επίπεδα CRF-BP στο μητρικό πλάσμα σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού, ενώ ιδιαίτερα χαρακτηριστικό είναι το εύρημα ότι η χορήγηση ανταλαρμίνης, ενός CRFR1 ειδικού ανταγωνιστή, μπορεί να καθυστερήσει τον τοκετό στο πρόβατο (Berkowitz et al, 1996; Chan et al, 1998). Για το λόγο αυτό έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι πρόωρη υπερ-ενεργοποίηση του CRF συστήματος κατά τα τελικά στάδια της κύησης μπορεί να συσχετίζεται με τη παθογένεση του πρόωρου τοκετού (Challis et al, 1995).

Διαταραχές του συστήματος των CRF πεπτιδίων έχουν επίσης συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Ένας αριθμός μελετών έχει εντοπίσει αυξημένα επίπεδα CRF στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (Laatikainen et al, 1991; Jeske et al, 1990; Warren et al, 1995), άλλες μελέτες αναφέρουν υψηλά επίπεδα

CRF και παράλληλα χαμηλά επίπεδα CRF-BP (Petraglia et al, 1996; Perkins et al, 1995), ενώ μια πρόσφατη μελέτη εντόπισε επίσης αυξημένα επίπεδα UCN στο μητρικό και στο εμβρυικό πλάσμα (Florio et al, 2006). Αναφέρεται τέλος, ότι σε πλακούντες προερχόμενους από κύησεις με προεκλαμψία ή/και IUGR, η ρύθμιση του τόνου των εμβryo-πλακουντιακών αγγείων από τα CRF πεπτίδια είναι ελαττωματική. Το πρόβλημα αυτό προκύπτει πιθανόν λόγω της παρατηρούμενης ελάττωσης της έκφρασης του πλακουντιακού CRFR1 αλλά και διαταραχής της ρύθμισης του μονοπατιού του NO/cGMP από τους CRF και UCN (Karteris et al, 2005; Karteris et al, 2003). Η ακριβής σχέση των CRF πεπτιδίων με τη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεν έχει αποσαφηνιστεί. Για παράδειγμα δεν είναι γνωστό εάν η αύξηση στην έκφραση του CRF είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου, ή αποτέλεσμα της απάντησης του πλακούντα στο υποξικό περιβάλλον που προκύπτει από την ελαττωματική πλακουντιακή κυκλοφορία. Δεδομένης της αγγειοδιασταλτικής δράσης του CRF, έχει προταθεί η υπόθεση ότι στην προεκλαμψία ο υποξικός πλακούντας παίρνει μέρος σε ένα σύνδρομο στρες απελευθερώνοντας CRF. Ο τελευταίος μπορεί να βελτιώνει την παροχή αίματος από τη μήτρα προς τον πλακούντα, προστατεύοντας έτσι το έμβρυο από ένα εχθρικό περιβάλλον (Florio et al, 2002).

Πρόσφατα, τα CRF πεπτίδια συσχετίστηκαν με τις αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο. Οι Madhappan και συνεργάτες μελέτησαν την έκφραση των πεπτιδίων CRF, UCN, τρυπτάση και IL-8 σε ομογενοποιημένο πλακουντιακό υλικό, προερχόμενο από γυναίκες με αυτόματες αποβολές, ή καθ' ἑξιν αυτόματες αποβολές. Διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση των πεπτιδίων αυτών σε όλες τις περιπτώσεις γυναικών με αποβολές συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα. Οι παρατηρήσεις αυτές ερμηνεύτηκαν από τους μελετητές ως αποτέλεσμα συστημικών ή ενδομήτριων στρεσογόνων συνθηκών που είχαν σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση των πλακουντιακών CRF και UCN. Σύμφωνα με την υπόθεση, τα νευροπεπτίδια με τη σειρά τους επάγουν την απελευθέρωση τρυπτάσης και IL-8 από τα μαστικά κύτταρα, μορίων δηλαδή που μπορούν να οδηγήσουν την κύηση σε αποβολή (Madhappan et al, 2003).

1.6. Τα διασυνδεδετικά μόρια

1.6.1. Γενικά

Ένας μεγάλος αριθμός ομάδων μορίων διασύνδεσης έχουν εντοπιστεί στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου και πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης και της πλακουντιοποίησης. Τα μόρια που έχουν μελετηθεί ως τώρα είναι οι σελεκτίνες, γκαλεκτίνες, προτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης, ιντεγκρίνες, καντχερίνες, Muc-1, και το σύμπλοκο των τροφινίνη-ταστίνη-βυστίνη (Dey et al, 2004). Από τα μόρια αυτά τα πλέον μελετημένα είναι οι ιντεγκρίνες, λόγω της ιδιότητάς τους να λειτουργούν ως υποδοχείς πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Τα μόρια αυτά εμπλέκονται στις διαδικασίες αλληλεπίδρασης κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας, αλλά και κυττάρου-κυττάρου και έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε αρκετά μονοπάτια μεταγωγής σημάτων στα κύτταρα (Giancotti et al, 1999).

1.6.2. Το CEACAM1

Το σχετιζόμενο με το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο διασυνδεδετικό μόριο 1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1) ανήκει στην οικογένεια των καρκινοεμβρυικών αντιγόνων (carcinoembryonic antigen, CEA) και στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Thompson et al, 1991). Οι γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια εκφράζονται σε επιθηλιακούς ιστούς, όπως ο βλενογόγγος του κόλου, όπως επίσης σε κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (Thompson et al, 1991). Το CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) (Beauchemin et al, 1999) είναι το ανθρώπινο ομόλογο του διασυνδεδετικού μορίου cell-CAM (C-CAM) του επίμου (Aurivillius et al, 1990) το οποίο έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως σύνδεσμος για το ενδοθηλιακό διασυνδεδετικό μόριο E-selectin (Kuijpers et al, 1992). Σε αντίθεση με τα περισσότερα γονίδια της CEA οικογένειας, το CEACAM1 γονίδιο προϋποθέτει το σχηματισμό ενός ενδοκυττάριου τμήματος του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος, το οποίο περιέχει μοτίβα αλληλουχιών που αλληλεπιδρούν με μόρια μεταγωγής ενδοκυττάριας ουσίας, για παράδειγμα το pp60 και το c-src (Barnett et al, 1989; Brummer et al, 1995; Hinoda et al, 1988). Έχει προηγουμένως δειχθεί ότι το CEACAM1 εκφράζεται στον φυσιολογικό ανθρώπινο πλακούντα και συγκεκριμένα στην ΕΛΤ, ενώ απουσιάζει από τα υπόλοιπα κύτταρα ατου εμβryo-μητρικού ορίου

(Bamberger et al, 2000). Λόγο της παρατήρησης αυτής έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το CEACAM1 πιθανά εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις της ΕΛΤ με τα μητρικά ιστικά στοιχεία κατά την εμφύτευση και πλακουντιοποίηση (Bamberger et al, 2000).

2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Τα CRF πεπτίδια παράγονται από διάφορους πληθυσμούς κυττάρων του πλακούντα, από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του. Ο ρόλος τους στη φυσιολογία της κύησης είναι πολυδιάστατος. Έως τώρα έχει περιγραφεί ένας αριθμός μηχανισμών με τους οποίους τα CRF πεπτίδια συμμετέχουν στη ρύθμιση σημαντικών διαδικασιών όπως για παράδειγμα η φθαρτοποίηση, η εμφύτευση, η πλακουντιοποίηση, η λειτουργία του μυομητρίου και των μητριάων αγγείων και ο τοκετός. Η σημασία δε της απώλειας της εύρυθμης λειτουργίας του CRF συστήματος στις ανωτέρω διαδικασίες, μόλις έχει αρχίσει να διερευνάται και να αποσαφηνίζεται.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστίασε στα πρώτα στάδια της κύησης, χρησιμοποιώντας πλακουντιακό υλικό 1ου τριμήνου και πιο ειδικά ηλικίας 7-10 εβδομάδων, προερχόμενο είτε από αυτόματες αποβολές είτε από φυσιολογικές κύσεις. Είναι γνωστό ότι στη περίοδο αυτή, ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εμφύτευσης της βλαστοκύστης και της διείσδυσης της ΕΛΤ στη μήτρα, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του προ-αποπτωτικού μορίου FasL (Makrigiannakis et al, 2001). Ο πλακούντας ολοκληρώνει ουσιαστικά την ανάπτυξή του μέσα στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, και συνεπώς το συγκεκριμένο διάστημα είναι καίριας σημασίας για την ομαλή εξέλιξη της κύσεως. Χαρακτηριστικά, η χορήγηση ανταλαρμίνης στους αρουραίους κατά την πρώτη εβδομάδα της κύησης έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση των θέσεων εμφύτευσης κατά ~50%. Παράλληλα, ανακοινώθηκε πρόσφατα αύξηση της έκφρασης των πεπτιδίων CRF και Ucn σε πλακούντες αποβληθέντων κυημάτων, υποδεικνύοντας την διαταραχή της λειτουργίας του CRF συστήματος σαν ένα παράγοντα σχετιζόμενο με διαταραχές της εμφύτευσης (Madhappan et al, 2003). Επιπρόσθετα, η παρουσία του μορίου διασύνδεσης CEACAM1 ειδικά στα κύτταρα της διεισδυτικής ΕΛΤ τροφοβλάστης, υποδηλώνει πιθανό ρόλο για το μόριο αυτό στη διαδικασία διείσδυσης της ΕΛΤ στον μητρικό ιστό.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε: (α) η διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων CRF και CEACAM1 στη φυσιολογία της τροφοβλαστικής διείσδυσης, (β) η διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων CRF, Ucn και των προ-αποπτωτικών Fas/FasL, στην διαταραχή της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης, όπως αυτή εκδηλώνεται κλινικά με τις αυτόματες αποβολές. Η μελέτη επεκτάθηκε στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ΕΛΤ και φαρτικών λεμφοκυττάρων ως πιθανό στοιχείο των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που συνθέτουν την παθοφυσιολογία αυτής της κλινικής οντότητας.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

- η ρύθμιση της έκφρασης του πεπτιδίου CEACAM1 από το CRF.
- η ρύθμιση της διεισδυτικότητας των κυττάρων ΕΛΤ από το CEACAM1 και κατά συνέπεια από τον CRF.
- η έκφραση της Ucn στη θέση εμφύτευσης σε φυσιολογικούς πλακούντες 1ου τριμήνου.
- η ρύθμιση του γονιδίου της Ucn από τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια των cAMP/PKA και diacylglycerol/PKC σε κύτταρα πλακουντιακής προέλευσης.
- η έκφραση των CRF, Ucn, Fas, FasL σε πλακούντες 1ου τριμήνου προερχόμενους από αυτόματες αποβολές σε σύγκριση με την έκφραση των ίδιων μορίων σε φυσιολογικούς πλακούντες αναφοράς (επιλεκτική διακοπή κύησης) της ίδιας ηλικίας.
- η απόπτωση της ΕΛΤ σε πλακούντες 1ου τριμήνου προερχόμενους από αυτόματες αποβολές σε σύγκριση με την απόπτωση της ΕΛΤ σε πλακούντες αναφοράς.
- η έκφραση του FasL πεπτιδίου σε πρωτογενείς καλλιέργειες φθαρτικών λεμφοκυττάρων απομονωμένων είτε από πλακούντες αποβολών είτε από πλακούντες αναφοράς.
- η ρύθμιση της έκφρασης του FasL πεπτιδίου από τα CRF και Ucn πεπτίδια σε πρωτογενείς καλλιέργειες φθαρτικών λεμφοκυττάρων.
- η κυτταροτοξική δράση των πρωτογενών καλλιεργειών φθαρτικών λεμφοκυττάρων απέναντι σε μια κυτταρική σειρά ΕΛΤ, καθώς και ο ρόλος των CRF, Ucn και FasL στη δράση αυτή.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένος και φρέσκος πλακουντιακός ιστός, καθώς και οι κυτταρικές σειρές JEG3 του ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος και AC1M88 της ανθρώπινης ΕΛΤ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βιολογικά υλικά

3.1.1. Υλικά και συσκευές για το χειρισμό των βιολογικών υλικών

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
DMEM-F12 (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
RPMI 1640 (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
Keratinocyte Growth Medium (KGM) (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
Ορός εμβρύου βοός: FCS (Fetal Calf Serum) (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη: Penicillin/Streptomycin (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
Αλβουμίνη ορού βοός, Bovine Serum Albumin (BSA), (Sigma-Aldrich, USA)
Τρυψίνη: Trypsin 0,25% (GIBCO-BRL Co,MD, USA)
Thioglycollate (Topley House, Wash Lane, Bury, England)
PMA (Sigma-Aldrich, USA)
Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus, Japan)
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)
Επωαστικός κλίβανος Forma (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
DMSO (Sigma, USA)
Χρωστική Trypan Blue (Seromed Biochrom, Germany).
Δεοξυριβονουκλεάση τύπου I (DNase I) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)
HEPES, N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
HBSS: Hanks Balanced Salt Solution (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
MgCl₂ (Sigma-Aldrich, USA)
Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden)
PBS, phosphate buffered saline (pH = 7,4) (Sigma-Aldrich, USA)
Φυκόλη Histo-Paque (Sigma-Aldrich, USA)
Μεταλλικός ηθμός (sieve) με πόρους διαμέτρου 45 μm

3.1.2. Ανθρώπινοι πλακούντες

Οι πλακούντες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη προέρχονταν από Καυκάσιες γυναίκες ηλικίας 22-35 ετών οι οποίες είτε απέβαλαν αυτόματα (17 περιπτώσεις) είτε υπεβλήθησαν σε επιλεκτική, νόμιμη διακοπή της εγκυμοσύνης τους

για κοινωνικο-οικονομικούς λόγους (30 περιπτώσεις). Τα δείγματα λήφθηκαν με την ενυπόγραφη συγκατάθεση των γυναικών. Η ηλικία της κύησης και στις δύο ομάδες ήταν 7-12 εβδομάδες, όπως καθορίστηκε από το ιστορικό της εμμήνου ρύσεως και με τη βοήθεια υπερήχων. Οι γυναίκες προέρχονταν από τη μεσαία αστική τάξη και είχαν μέσο ή ανώτερο μορφωτικό επίπεδο. Τα δείγματα συλλέχθηκαν με απόξεση. Στις περιπτώσεις των αυτόματων αποβολών, η απόξεση πραγματοποιήθηκε μέσα σε 24 ώρες από τη διάγνωση. Καμία από τις αποβολές δεν προκλήθηκε φαρμακευτικά. Τα ίδια κριτήρια αποκλεισμού εφαρμόστηκαν και στις δύο ομάδες. Συγκεκριμένα, αποκλείστηκαν: γυναίκες οι οποίες λάμβαναν οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή, είχαν γενετικές ανωμαλίες, περιπτώσεις κυήσεων με ανωμαλίες χρωμοσωμικές, ορμονικές, ή ανατομικές, περιπτώσεις σχετιζόμενες με μολύνσεις, αυτοάνοσες παθήσεις, ή άλλες συστηματικές ή τοπικές νόσους. Τα δείγματα δεν είχαν κανένα διακριτικό που να αναφέρει τη γυναίκα από την οποία προέρχονταν.

Αμέσως μετά τη λήψη τους τα δείγματα: είτε βυθίστηκαν σε HBSS και χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα εντός 20 λεπτών, είτε βυθίστηκαν απ' ευθείας σε φορμόλη 10% για να εγκλειστούν αργότερα σε παραφίνη, είτε τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για αργότερη χρήση, είτε χρησιμοποιήθηκαν κατευθείαν για τη δημιουργία κρυοτομών σε κρυοστάτη. Οι κρυοτομές πάχους 5-10 μm λήφθηκαν σε σειρά, τοποθετήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες, στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες, μονιμοποιήθηκαν σε ακετόνη για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά αποθηκεύτηκαν στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως ότου χρησιμοποιηθούν. Οι τομές παραφίνης πάχους 5-6 μm λήφθηκαν επίσης σε σειρά, τοποθετήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου έως να χρησιμοποιηθούν.

3.1.3. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν η κυτταρική σειρά ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG-3 και η κυτταρική σειρά της ανθρώπινης εξωλαχνωτής τροφοβλάστης AC1M88.

3.1.3.1. Κυτταρική σειρά ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG-3

Η κυτταρική σειρά JEG-3 προέρχεται από κύτταρα χοριοκαρκινώματος του ανθρώπου. Τα κύτταρα αυτά προσομοιάζουν τον γονότυπο της

κυτταροτροφοβλάστης. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS και 1% Penicillin/Streptomycin σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%. Τα πειράματα γίνονται σε παρόμοιες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων. Τα θρεπτικά υλικά των καλλιεργειών ανανεώνονται ανά 48 ώρες και τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για πείραμα όταν φτάνουν σε πυκνότητα 80% περίπου. Η αποκόλληση των JEG-3 από τις φλάσκες καλλιέργειας γίνεται με τη χρήση τρυψίνης. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση σε κάθε πείραμα πραγματοποιείται με τη μέθοδο αιμοκυτταρομετρίας. Συγκεκριμένα, 10μl από τα ανασηκωμένα κύτταρα αναμιγνύονται με 90μl Trypan Blue, τοποθετούνται σε πλάκα Neubauer και γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x. Ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων τοποθετείται σε νέες φλάσκες για ανακαλλιέργεια ή στα κατάλληλα υποστρώματα για την εκτέλεση συγκεκριμένων πειραμάτων. Τα κύτταρα καταψύχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα στους -80 °C, έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα να πραγματοποιούνται στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιείται ως εξής: κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5×10^6 κυττάρων τοποθετείται σε σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης, και τους προστίθεται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση το κατάλληλο για κατάψυξη υλικό (FCS με 20% DMSO) σε αναλογία 1:1. Η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιείται σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους. Αντίθετα η απόψυξη τους είναι γρήγορη κι άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάρια με τα κύτταρα θερμαίνονται στους 37°C και διαλύονται άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ίδιας θερμοκρασίας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και επανακαλλιέργεια όπως ανωτέρω.

3.1.3.2. Κυτταρική σειρά ανθρώπινης εξωλαχνωτής τροφοβλάστης AC1M88

Η κυτταρική σειρά AC1M88 αποτελείται από έναν κλώνο υβριδικών κυττάρων για το σχηματισμό των οποίων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα εξωλαχνωτής τροφοβλάστης και κύτταρα χοριοκαρκινώματος ανθρώπου (Gaus et al, 1997; Funayama et al, 1997). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε προκειμένου να ξεπεραστεί η τεχνική δυσκολία που προκαλεί η αδυναμία

πολλαπλασιασμού της πρωτογενούς ΕΛΤ στη μελέτη του κυτταρικού αυτού τύπου. Τα αρχικά κύτταρα ήταν ΕΛΤ προερχόμενη από ανθρώπινο πλακούντα. Για την αθανατοποίησή τους υβριδοποιήθηκαν με τα κατάλληλα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα του ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος. Προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν είχαν υβριδοποιηθεί μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα με απαλοιφή του γονιδίου της τρανσφεράσης της υποξανθινο-γουανινο-φωσφο-ριβουσυλης (hypoxanthine-guanine-phospho-ribosyl transferase, HGPRT). Τα μη υβριδοποιημένα κύτταρα καταστράφηκαν μετά από επώαση με αζασερίνη, ενώ τα υβρίδια διέθεταν το ένζυμο HGPRT χάρη στο γονιδίωμα της ΕΛΤ. Τα AC1M88 κύτταρα καλλιεργούνται θρεπτικό υλικό DMEM-F12 με 10% FCS και 1% Penicillin/Streptomycin. Οι συνθήκες ατμόσφαιρας καθώς και ο χειρισμός των κυττάρων είναι όμοιος με ό,τι αναφέρθηκε ανωτέρω για τα JEG-3 κύτταρα.

3.1.4. Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν: (α) πρωτογενείς καλλιέργειες διεισδυτικής εξωλαχνωτής τροφοβλάστης από πλακούντες 1ου τριμήνου προερχόμενους από φυσιολογικές διακοπές κύσεων και (β) πρωτογενείς καλλιέργειες φθαρτικών λεμφοκυττάρων από πλακούντες 1ου τριμήνου προερχόμενους είτε από αυτόματες αποβολές, είτε από φυσιολογικές διακοπές.

3.1.4.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός του ανθρώπινου πληθυσμού ΕΛΤ.

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες διεισδυτικής εξωλαχνωτής τροφοβλάστης πρώτου τριμήνου αποκτήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Makrigiannakis et al, 2001; Aboagye-Mathiesen et al, 1997). Δέκα πλακούντες ελήφθησαν από υγιείς γυναίκες μετά από νόμιμη διακοπή των κύσεων τους (7η-9η εβδομάδα της κύησης). Οι πλακούντες πλύθηκαν με στείρο PBS μέχρι το υπερκείμενο να μην περιέχει σχεδόν καθόλου αίμα. Ο ιστός κόπηκε σε μικρά κομμάτια με τη χρήση λεπτών λεπίδων και πλύθηκε εκ νέου με στείρο PBS. Ακολούθησε επώαση των ιστών με 0,125% τρυψίνη και 0,2 mg/ml DNAάση I διαλυμένα σε PBS περιέχων 5 mM MgCl₂. τα κύτταρα τα οποία απελευθερώθηκαν από αυτή την επώαση, συγκεντρώθηκαν και πέρασαν από δίστοιβο φίλτρο μουσλίνης. Η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε με FCS. Το φιλτραρισμένο υλικό φυγοκεντρήθηκε και

οι κυτταρικές πελέτες πλύθηκαν με PBS. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 70% Percoll με πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα/ml, τοποθετήθηκαν κάτω από 20 ml PBS περιέχον 25% Percoll. Δέκα ml PBS τοποθετήθηκαν πάνω από το διάλυμα των 25% Percoll. Τα κύτταρα διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές/min για 20 min. Τα κύτταρα από τη μεσαία φάση (πυκνότητα 1.048-1.062 g/ml) συγκεντρώθηκαν, εκπλύθηκαν σε PBS και συλλέχθηκαν σε πυκνότητα 10^6 κύτταρα/ml σε θρεπτικό μέσο KGM περιέχον 10% FCS. Τα κύτταρα αναγνωρίστηκαν σαν τροφοβλάστες με κυτταρομετρία ροής και ανοσοκυτταροχημική χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) κατά της κυττοκερατίνης (mAbs MNF116 και 35βH11, σε αραιώση 1:100, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) και E-καντχερίνης (mAb HECD-1, Takara Shuzo Co., Shiga, Japan), τα οποία χρωματίζουν μόνο την τροφοβλάστη στον πλακούντα (Fisher et al, 1989). Οι απομονωμένοι τροφοβλάστες χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω σαν εξωλαχνωτοί τροφοβλάστες δίνοντας θετική χρώση για μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας κλάσης I (MHC-I) (χρησιμοποιώντας το αντι-MHC mAb W6/32, σε αραιώση 1:50, DakoCytomation) και αρνητική για το υαλουρονικό οξύ (χρησιμοποιώντας το mAb NDOG1, αραιωμένο 1:10, Serotec, Kidlington, UK), όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (Makrigiannakis et al, 2001; Bamberger et al, 2000; Fisher et al, 1989). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε KMG περιέχον 10% FCS και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη σε επωαστήρα κυτταρικών καλλιιεργειών σε σταθερή ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 37°C. Τα ποσοστά των θετικών για τα ανωτέρω μόρια κυττάρων πριν από τη καλλιέργεια για 3-5 γενιές ήταν τα ακόλουθα: 97 ± 2% για κυττοκερατίνη, 97 ± 2% για E-καντχερίνη και 96 ± 2% για MHC-I. Τα αντίστοιχα ποσοστά έπειτα από τη καλλιέργεια για 3-5 γενιές ήταν τα ακόλουθα: 92 ± 2% για κυττοκερατίνη, 92 ± 2% για E-καντχερίνη και 91 ± 2% για MHC-I.

3.1.4.2. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των ανθρωπίνων φθαρτικών λεμφοκυττάρων.

Τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν ακολουθώντας ένα κοινό πρωτόκολλο το οποίο έχει περιγραφεί παλαιότερα (Olivares et al, 2002). Συγκεκριμένα τα διάφορα δείγματα, τα οποία λήφθηκαν από αυτόματες αποβολές ή διακοπές κυήσεων, επεξεργάστηκαν χωριστά έτσι ώστε να μην προκληθούν λευκοκυτταρικές αλλογονικές αντιδράσεις. Τα δείγματα πλύθηκαν σχολαστικά με

PBS. Στη συνέχεια κόπηκαν με λεπτές λεπίδες, πέρασαν μέσα από ηθμό με πόρους διαμέτρου 45 μm και συγκεντρώθηκαν σε μικρό όγκο RPMI 1640. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 1600 στροφές/min για 15 min, η κυτταρική πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 20 ml RPMI 1640 και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου. Η πελέτα κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10 ml RPMI 1640 τα οποία ακολούθως τοποθετήθηκαν πάνω από 5 ml φυκόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 1700 στροφές/min για 30 min για να γίνει ο διαχωρισμός των κυττάρων. Τα κύτταρα της μεσαίας φάσης συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια με πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin). Οι καλλιέργειες κρατήθηκαν για 2 ώρες στους 37 °C σε 5% CO₂. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει μόνο φθαρτικά λεμφοκύτταρα, αφού όλοι οι υπόλοιποι τύποι των κυττάρων του πλακούντα έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στο πλαστικό έδαφος στις φλάσκες καλλιέργειών. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται, επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (ως ανωτέρω) και κρατείται, ως μια πρωτογενής καλλιέργεια φθαρτικών λεμφοκυττάρων πλέον, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ στους 37 °C. Η καθαρότητα των καλλιέργειών για λεμφοκύτταρα (άνω του 96%) επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας είτε την ηλεκτρονικά επιλεγμένη λεμφοκυτταρική πύλη, είτε διπλό ανοσοφθορισμό με αντισώματα κατά των CD56 (B&D Biosciences) και CD3 (DAKO) λεμφοκυτταρικών δεικτών. Το ποσοστό ζωντανών λεμφοκυττάρων στις καλλιέργειες καθορίστηκε μικροσκοπικά με τη χρήση trypan blue. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο καλλιέργειες που περιείχαν πάνω από 90% ζωντανά λεμφοκύτταρα.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Έμμεση ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης

Υλικά – Συσκευές

Kit ανοσοϊστοχημειών βιοτίνης-στρεπταβιδίνης με υπεροξειδάση (BioGenex)

Ευλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H₂O₂/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)

Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτός (Olympus)

Αντισώματα αντι-CRF/αντι-Ucn (Phoenix Pharmaceuticals), αντι-κυτταροκερατίνη-7 (Novocastra), αντι-Fas (Serotec)

Αιματοξυλίνη (BioGenex)

Glycergel (Dako)

Μέθοδος

Για την ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε το kit έμμεσης ανοσοϊστοχημείας της BioGenex το οποίο αξιοποιεί την ιδιότητα της πρόσδεσης μορίων βιοτίνης με στρεπταβιδίνη και χρησιμοποιεί το ένζυμο της υπεροξειδάσης (προερχόμενο από το χρένο). Το kit περιλαμβάνει διάλυμα καζεΐνης (PowerBlock) για την κάλυψη των με ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων, το συνδεδεμένο με βιοτίνη Multilink δευτεροταγές αντίσωμα το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόσδεση αντισωμάτων που έχουν αναπτυχθεί σε επίμυ, κόνικλο, ή ινδικό χοιρίδιο. Επίσης παρέχεται το συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη ένζυμο υπεροξειδάση, καθώς και τα υλικά ανίχνευσης της χρώσης, δηλαδή το χρωμογόνο τετραϋδροχλωρική 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB), ο διαλύτης της DAB και το H₂O₂ απαραίτητο για την αντίδραση.

Για την συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία είχαν μονιμοποιηθεί σε 4% φορμόλη και εμβαπτισθεί σε παραφίνη. Τομές πάχους 4-6 μm κοπήκαν σε σειρά από τα μπλοκ της παραφίνης και επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια η παραφίνη απομακρύνθηκε με θέρμανση των ιστών στους 56°C για 1 ώρα και τρεις πλύσεις με 100% ξυλόλη διάρκειας 5 min η κάθε μια. Οι ιστοί ενυδατώθηκαν με τη χρήση διαλυμάτων αιθανόλης σε νερό (3 x 5 min σε 100% αιθανόλη, 3 x 5 min σε 96% αιθανόλη, 5 min σε 80% αιθανόλη, 5 min σε 70% αιθανόλη) και τέλος εκπλύθηκαν για 5 min σε TBS ή PBS. Τα πλακίδια θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 x 5 min μέσα σε διάλυμα κιτρικού οξέως 10 mM σε νερό με pH 6.0 (η διόρθωση του pH έγινε με τη χρήση NaOH). Αφού αφέθησαν να κρυσώσουν για 20 λεπτά, οι ιστοί ξεπλήθθηκαν σε TBS/PBS και οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης καλύφθηκαν με τη χρήση του PowerBlock για 10 λεπτά. Έπειτα, οι ιστοί επώασθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (ΘΔ) με ένα εκ των πρωτοταγών αντισωμάτων με τις ακόλουθες συνθήκες:

Αντι-CRF: αραιώση 1/250, χρόνος επώασης 1 ώρα

Αντι-Ucn: αραιώση 1/250, χρόνος επώασης 1 ώρα

Αντι-κυτταροκερατίνη-7: αραιώση 1/30, χρόνος επώασης 1 ώρα

Αντι-Fas: αραιώση 1/250, χρόνος επώασης 1 ώρα

Για την εξακρίβωση της ειδικότητας της χρώσης, παραλήφθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα σε ορισμένους ιστούς. Μετά το χρόνο αυτό, οι ιστοί εκπλύθηκαν σε TBS για 10 min και επώαστηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα Multilink για 20 min. Ακολουθεί έκπλυση για 10 min με TBS και επώαση με το ένζυμο της υπεροξειδάσης για 20 min, έκπλυση με TBS, επώαση με το διάλυμα χρωμογόνου (σε 5 ml διαλύτη προστίθενται 4 σταγόνες DAB και 2 σταγόνες H₂O₂) για 5 min, έκπλυση με νερό βρύσης για 10 min, επώαση με αιματοξυλίνη για αντίχρωση των πυρήνων για 1 min, έκπλυση με νερό βρύσης για 10 min και τέλος κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδες με τη χρήση ειδικής κόλλας γλυκερόλης Glycergel. Οι ιστοί φωτογραφήθηκαν κάτω από μικροσκόπιο ορατού φωτός.

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των υπό εξέταση πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας ημι-ποσοτικής μεθόδου. Ο δείκτης IRS (immuno-reactive score) με εύρος από 0 έως 12 υπολογίζεται από το γινόμενο της έντασης της χρώσης (βαθμονομημένη ως 0 = καθόλου χρώση, 1 = αδύναμη χρώση, 2 = χρώση μέτριας έντασης, 3 = χρώση ισχυρής έντασης) και του ποσοστού των κυττάρων θετικών για τη χρώση (0 = κανένα χρωσμένο κύτταρο, 1 = χρωσμένα κύτταρα <10% επί του συνόλου των εξεταζομένων κυττάρων, 2 = 11-50% των κυττάρων, 3 = 51-80% των κυττάρων και 4 = >81% των κυττάρων) (Remmele et al, 1986).

3.2.2. Έμμεση ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα AC1M88

Υλικά – Συσκευές

Kit ανοσοϊστοχημειών βιοτίνης-στρεπταβιδίνης με αλκαλική φωσφατάση (BioGenex)

Αντικειμενοφόρες πλάκες καλλιέργειας (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)

Μεθανόλη/PBS/TBS (Merck)

Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτός (Olympus)

Φυσιολογικός ορός γίδας (GIBCO)

Αντίσωμα αντι-CEACAM1 (Mab 4D1/C2, ευγενική χορηγία της Dr. AM Bamberger)

Αιματοξυλίνη (BioGenex)

Glycergel (Dako)

Μέθοδος

Για τη χρώση των AC1M88 κυττάρων με ανοσοκυτταροχημεία, τα κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από επώαση με τρυψίνη, 24 ώρες μετά από τον οποιοδήποτε χειρισμό τον οποίο είχαν υποστεί και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλλιέργειας, όπου παρέμειναν για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με επώαση με μεθανόλη για 5 min και ακετόνη για 30 sec και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι πλάκες πλύθηκαν με TBS, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min με φυσιολογικό ορό γίδας αραιωμένου 1:20 σε TBS και ακολούθως με το ειδικό κατά του CEACAM1 αντίσωμα Mab 4D1/C2 σε συγκέντρωση 1μg/ml για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε επώαση με το κατάλληλο βιοτυνιλιωμένο δεύτερο αντίσωμα και ανίχνευση της χρώσης με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Τέλος τα κύτταρα επώαστηκαν με αιμοτοξιλίνη για την αντίχρωση των πυρήνων τους και οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με τη χρήση μέσου γλυκερίνης/ζελατίνης.

3.2.3. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα πρωτογενών καλλιιεργειών και μονιμοποιημένους ιστούς και μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy).

Υλικά – Συσκευές

Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Γερμανία)

Ανάστροφο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με laser ιόντων αργού-κρυπτού (Zeiss IM35)

Powerblock™ (BioGenex)

Ευλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H₂O₂/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)

Αντισώματα αντι-Ucn (Phoenix Pharmaceuticals), αντι-FasL (Santa Cruz), συνδεδεμένο με FITC αντι-Fas (Dako), αντι-rabbit FITC/αντι-mouse TRITC (Chemicon), αντι-κυτταροκερατίνη-7 (Novocastra), αντι-rabbit Cy-3 (Dianova), συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη αντι-CD45 (Coulter Instrumentation)

DAPI (Molecular Probes)

Μέθοδος

Το μικροσκόπιο συνεστίασης είναι ένα μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιεί ακτίνες laser για την εστίαση. Με τις ακτίνες laser είναι δυνατή η

εστίαση και φωτογράφιση ενός συγκεκριμένου επιπέδου της τομής/κυττάρου. Εκτός της υψηλής διακριτής ικανότητας της μεθόδου, οι ιδιότητές της προσφέρουν την δυνατότητα συγκρότησης της τρισδιάστατης δομής του με διαδοχικές εστιάσεις σε διάφορα επίπεδα.

Για τον ανοσοφθορισμό σε απομονωμένους ΕΛΤ, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες. Μετά από μονιμοποίηση με ακετόνη για 10 λεπτά στους -20°C , τα κύτταρα επώασθηκαν με το διάλυμα PowerBlock για 10 min για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης και ακολούθως με αντίσωμα κατά της Ucpn σε αραιώση 1/100 σε TBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανοσοδραστικότητα της Ucpn ανιχνεύθηκε μετά από επώαση των κυττάρων με σημασμένο με FITC δευτεροταγές αντίσωμα κατά των αντισωμάτων κόνικλου για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και φωτογραφήθηκαν κάτω από το μικροσκόπιο συνεστίασης.

Για τα πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τομές παγωμένου ιστού. Οι τομές αφέθησαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες, μονιμοποιήθηκαν εκ νέου σε ακετόνη για 10 min και ενυδατώθηκαν σε PBS. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης καλύφθηκαν με το διάλυμα καζεΐνης PowerBlock για 10 min. Στη συνέχεια οι τομές επώαστηκαν με ένα εκ των παρακάτω αντισωμάτων ή συνδυασμό αντισωμάτων στις συνθήκες που αναφέρονται:

- (α) Αντι-Ucpn: αραιώση 1/100 + Αντι-κυτταροκερατίνη-7: αραιώση 1/10, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ
- (β) Αντι-FasL: αραιώση 1/75, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ
- (γ) Συνδεδεμένο με FITC αντι-Fas: αραιώση 2 $\mu\text{g/ml}$, χρόνος επώασης 16 ώρες, 4°C

Μετά από έκπλυση σε PBS οι τομές επώαστηκαν αντίστοιχα με τα παρακάτω αντισώματα ή συνδυασμούς αντισωμάτων στις συνθήκες που αναφέρονται:

- (α) Αντι-rabbit FITC: αραιώση 1/200 + Αντι-mouse TRITC: αραιώση 1/200, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ
- (β) Αντι-rabbit Cy-3: αραιώση 1/800, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ
- (γ) Αντι-κυτταροκερατίνη-7: αραιώση 1/10, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ

Μετά από έκπλυση σε PBS οι τομές (α) επώαστηκαν με DAPI και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες, ενώ οι (β) και (γ) επώαστηκαν αντίστοιχα με τα παρακάτω αντισώματα στις συνθήκες που αναφέρονται:

(β) Συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη αντι-CD45: αραιώση 1/50, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ

(γ) Αντι-mouse TRITC: αραιώση 1/200, χρόνος επώασης 1 ώρα, ΘΔ

Μετά από έκπλυση σε PBS οι τομές (β) και (γ) επώαστηκαν με DAPI και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Οι τομές φωτογραφήθηκαν είτε κάτω από μικροσκόπιο συνεστίασης είτε κάτω από απλό ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

3.2.4. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot Analysis)

Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες αποδιάταξης με χρήση SDS, μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, υβριδοποίησή της με το αντίστοιχα κάθε φορά αντίσωμα και ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης με σύστημα χημειοφωταύγειας ECL.

Συλλογή δειγμάτων

Υλικά

Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου: SDS (Serva)

Tris (Bio-Rad Labs)

NaCl, HCl, Bacitracin, Leupeptin, μη ιονικό απορρυπαντικό P-40: NP40, φαινυλομεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο: PMSF, γλυκερόλη, διθειοθρεϊτόλη: DTT (Sigma)

Αζίδιο του νατρίου: Sodium Azide (Merck)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Διάλυμα λύσης: 1,50 mM Tris + 150 mM NaCl + 0.1 % SDS + 1 % μη ιονικό απορρυπαντικό P-40 (NP40) + 0.02 % αζίδιο του νατρίου

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8 μόνο με Tris και NaCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Πριν τη χρήση προστίθενται οι ειδικοί αναστολείς πρωτεασών 0.1 μg/100 ml PMSF, 200 μg/ml Bacitracin, 10 μg/ml Leupeptin.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6, 12 ή 24 οπών σε συγκέντρωση ανάλογη του κυτταρικού τύπου κάθε φορά με θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, το αρχικό υλικό αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό πειραμάτων περιέχον τις προς μελέτη ουσίες. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και ακολούθως μαζεύονται, φυγοκεντρώνονται και εκπλένονται μία φορά με PBS. Κατόπιν, προστίθεται το διάλυμα λύσης και τα κύτταρα αφήνονται σε συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά στον πάγο. Για την απομάκρυνση των στερεών υπολλειμάτων, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 12.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά. Τα υπερκείμενα (που περιέχουν τις προς μελέτη πρωτεΐνες) συλλέγονται και φυλάσσονται στους -80 °C.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Υλικά

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x)

Tris.HCl (0,125M)

SDS 4% (w/v)

β-μερκαπτοαιθανόλη 4% (w/v) (Sigma)

Γλυκερόλη 10% (w/v)

Κυανούν της βρωμοφανόλης 0,02% (w/v) (Sigma)

Στα δείγματα προστίθεται ίσου όγκου διάλυμα μετουσίωσης 2x. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά στους 100 °C, τοποθέτηση στον πάγο για 3 λεπτά και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Με την διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται αποδιάταξη της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης, ενώ διατηρείται μόνο η πρωτοταγής της δομή και επικαλύπτεται με SDS. Το SDS χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικός παράγοντας και επιπλέον προσδίδει στην πρωτεΐνη αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο σχηματίζοντας σύμπλοκα μαζί της σε καθορισμένη κατά βάρος αναλογία 14g SDS/g πρωτεΐνης.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης

Υλικά και συσκευές

Tris/HCl (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) (Merk, Germany)

Γλυκίνη (GIBCO, ΗΠΑ)

Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS): $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sigma, ΗΠΑ)

Ακρυλαμίδιο (Serva, Γερμανία)

Δισ-ακρυλαμίδιο: N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (Promega, ΗΠΑ)

Tween-20 (Merk Germany)

SDS (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)

TEMED (N,N,N,N τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη) (Serva, Γερμανία)

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Biorad, ΗΠΑ)

Τροφοδοτικό (Hoefler, ΗΠΑ)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Amersham)

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%

Ακρυλαμίδιο 29.2% (w/v), Δισ-ακρυλαμίδιο 0.8% (w/v)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (1λίτρο)

Tris/HCl 30.3g, Γλυκίνη 144.2g, SDS 10g, pH 8.3

Διάλυμα διαχωρισμού

Tris.HCl 1.5M, SDS 0.4 (w/v), pH 8.8

Διάλυμα επιστοίβαξης

Tris.HCl 0.5M, SDS 0.4% (w/v), pH 6.8

Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (30ml): Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 12 ml + διάλυμα διαχωρισμού 7.5 ml + απεσταγμένο νερό 9.9 ml + APS 10% 300μl + TEMED 12μl + SDS 10% 300μl

Πήκτωμα επιστοίβαξης (10ml): Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.7ml + διάλυμα επιστοίβαξης 1.25 ml + απιονισμένο νερό 6.8ml + APS 10% 100μl + TEMED 10μl + SDS 10% 100μl

Αρχικά παρασκευάζεται το πηκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται στην συνέχεια το πηκτωμα επιστοιβαξης και τοποθετείται το κατάλληλο 'χτένι' με τον αντίστοιχο αριθμό εσοχών όπου φορτώνονται τα δείγματα των πρωτεϊνών καθώς και ένας δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker). Τα δείγματα κινούνται με βάση το μοριακό τους βάρος σε ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται αρχικά 150V και μετά την διέλευση τους από το διάλυμα επιστοιβαξης στα 280V. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης διότι το φορτίο/μονάδα μάζας είναι σταθερό. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων διαρκεί 1-2 ώρες.

Μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Υλικά και συσκευές

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Σουηδία)

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell)

Χαρτί Wattman 3mm (Amersham ΗΠΑ)

Μεθανόλη, Tween-20 (Merk, Γερμανία)

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 500ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x προστίθενται σε 1lt μεθανόλης και ο όγκος ρυθμίζεται στα 5lt.

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφορητική διαδικασία η πηκτική πολυακρυλαμιδίου απομακρύνεται από την συσκευή. Διαχωρίζεται η πηκτική επιστοιβαξης και λαμβάνεται μόνο η πηκτική διαχωρισμού που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες. Τοποθετείται στο διχτυωτό πλέγμα της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών σε μορφή 'σάντουιτς' που αποτελείται από τα εξής: χαρτί wattman, πηκτική πολυακρυλαμιδίου, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ξανά χαρτί wattman. Το πλέγμα τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 0.8mA για 1.5 ώρα. Οι πρωτεΐνες στην πηκτική πολυακρυλαμιδίου όπως αναφέρθηκε είναι αρνητικά φορτισμένες. Προς τον θετικό πόλο τοποθετείται η νιτροκυτταρίνη. Οι πρωτεΐνες λόγω του αρνητικού τους φορτίου μεταφέρονται από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Όταν τελειώσει η διαδικασία της μεταφοράς η μεμβράνη μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C ή να επωαστεί με το κατάλληλο αντίσωμα για τον προσδιορισμό κάποιας πρωτεΐνης.

Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη

Υλικά και συσκευές

Ξηρό γάλα (Regilait) χωρίς λιπαρά

Πρώτο αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που θα μελετηθεί κάθε φορά

Δεύτερο αντίσωμα κατά του πειραματοζώου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα

Συστημα χημειοφωταύγιας ECL (Amersham USA)

Φίλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (Kodak)

Διαλύμα TBS-T (10x) (Tris/HCl 20mM + NaCl 137mM + Tween-20 0.1%, pH 7.6)

Διάλυμα αφαίρεσης πρωτεϊνών (Stripping buffer) (Tris/HCl 62.5mM + β-μερκαπτοαιθανόλη + 100mM SDS 2%, pH 6.7)

Αντισώματα

Αντι-FasL (Q20, Santa Cruz) σε αραιώση 1:400

Αντι-CEACAM1 (4D1/C2) σε συγκέντρωση 1 µg/ml (ευγενική χορηγία της Dr. AM Bamberger)

Αντι-Actin (Chemicon, MAB1501) σε αραιώση 1:1000

Anti-mouse (IM0817), anti-rabbit (IM0831) (Immunotech, Γαλλία) και anti-goat (sc-2020, Santa Cruz) δεύτερα αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση του χρένου (HRP).

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με ξηρό γάλα 5% σε TBS-T για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T. Η μεμβράνη επωάζεται στη συνέχεια με πρωτοταγές αντίσωμα ειδικό για κάθε πρωτεΐνη μέχρι την επόμενη ημέρα στους 4°C υπό ανάδευση. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T και επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα για μία ώρα σε ΘΔ. Η μεμβράνη εκπλένεται με TBS-T και επωάζεται τέλος με το σύστημα χημειοφωταύγιας ECL για 1 λεπτό. Ακολουθεί έκθεση στο φίλμ και εμφάνιση σε εμφανιστικό μηχάνημα. Η ένταση της κάθε ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και μετράται με την χρήση του λογισμικού Tina Scan. Η ποσότητα της κάθε πρωτεΐνης κανονικοποιείται ως προς την ποσότητα της ακτίνης στο ίδιο δείγμα, όπως αυτή εκφράζεται από την ένταση της αντίστοιχης ζώνης. Σε πολλές περιπτώσεις είναι

αναγκαίο να γίνει αντίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών στην ίδια νιτροκυτταρίνη. Αυτό επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης για 30 λεπτά στους 50°C με το διάλυμα αφαίρεσης των συνδεδεμένων πρωτεϊνών (αντισωμάτων) (stripping). Ακολουθεί έκπλυση με TBS-T και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας.

3.2.5. Κυτταρομετρία ροής για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών

Υλικά - Συσκευές

Κυτταρομετρητής Beckton-Dickinson FACSAArray (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

Software προγράμματα CELLQuest (Beckton-Dickinson) και ModFit LT (Verify Software, Topsham, MN)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, USA)

Ionomycin (I) (Sigma-Aldrich, USA)

r/hCRF (Tocris)

hUCN (Sigma-Aldrich)

Antalarmin (ευγενική χορηγία του Dr. GP Chrousos)

Αντι-FasL (Q20, Santa Cruz) σε αραιώση 1:200

Αντι-CEACAM1 (4D1/C2) σε συγκέντρωση 1 µg/ml (ευγενική χορηγία της Dr. AM Bamberger)

Αντι-rabbit και αντι-mouse συζευγμένα με FITC (Chemicon) σε αραιώση 1:200

Η κυτταρομετρία ροής είναι η τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου ή αλλου στοιχείου (π.χ. κυτταρικών οργανιδίων, διαλυτής πρωτεΐνης, βακτηριδίου κλπ). Οι μετρήσεις αυτές γίνονται σε κάθε κύτταρο ή στοιχείο που βρίσκεται σε ροή και περιβάλλεται από ένα σύστημα περιρροής. Επίσης χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό κυττάρων σε ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, ο όγκος και το δυναμικό ή το pH των κυττάρων (φυσικοχημικές ιδιότητες). Ο κυτταρομετρητής ροής λειτουργεί ως εξής: Τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα μπροστά από μια δέσμη φωτός, συνήθως από ένα laser, και κατατάσσονται ανάλογα με δύο παραμέτρους: (α)

Τα μορφολογικά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που προκαλούν διασκόρπιση της δέσμης φωτός και (β) Την εκπομπή φθορισμού από χημικές ενώσεις των κυττάρων. Με την ανάπτυξη αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ενώσεις είναι δυνατή η μέτρηση πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργούνται με θρεπτικό υλικό σε πλάκες 6, 12 ή 24 οπών σε συγκέντρωση ανάλογη του κυτταρικού τύπου κάθε φορά. Στη συνέχεια, το αρχικό υλικό αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό πειραμάτων περιέχον τις προς μελέτη ουσίες. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και ακολούθως μαζεύονται, φυγοκεντρώνονται και εκπλένονται μία φορά με PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται είτε με το αντι-FasL είτε με το αντι-CEACAM1 αντίσωμα για 1 ώρα. Έπειτα εκπλένονται με PBS και επωάζονται με το κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα. Για το αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από επιλεκτικές διακοπές κνήσεων και τα οποία είχαν επωαστεί με PMA και ionomycin. Στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο παραλείποντας το πρωτοταγές αντίσωμα. Τα δείγματα εξετάζονται εντός 20 λεπτών με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSArray και αναλύονται με το πρόγραμμα CELLQuest και ModFit LT.

3.2.6. Παροδικές διαμολύνσεις των AC1M88 κυττάρων

Υλικά και συσκευές

Αντιδραστήριο LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Karlsruhe, Germany)

Φορέας pcDNA3.1(-) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)

Μέθοδος

Οι διαμολύνσεις των AC1M88 κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με το αντιδραστήριο LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Μια ημέρα πριν από τη διαμόλυνση τα κύτταρα στρώθηκαν σε πλάκες των 6 θέσεων σε μια συγκέντρωση 500.000 κυττάρων/θέση. Έπειτα από 24 ώρες, το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με 0.8 ml θρεπτικού υλικού ελεύθερου από FCS, σε κάθε θέση. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 1 µg πλασμιδίου DNA με το PLUS αντιδραστήριο και lipofectamine, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα από 3 ώρες επώασης με το μείγμα αυτό, προστέθηκε σε κάθε θέση 1 ml θρεπτικού περιέχον 20%

FCS. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από 24 ώρες. Η κατασκευή των φορέων που περιείχαν το γονίδιο του CEACAM1/L στο πλασμίδιο pcDNA3.1(-) περιγράφηκε πρόσφατα (Ebrahimnejad et al, 2004). Ο φορέας pcDNA3.1(-) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικό κοντρόλ για τα πειράματα διαμόλυνσης.

3.2.7. Μελέτες διεισδυτικότητας

Υλικά και συσκευές

CRF (Sigma)

Antalarmin (ευγενική προσφορά του Dr. GP Chrousos)

αντι-CEACAM1 αντίσωμα (ευγενική προσφορά της Dr. AM Bamberger)

κιτ Matrigel™ (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)

Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτός (Olympus)

Μέθοδος

Η διεισδυτική ικανότητα των απομονωμένων κυττάρων EAT (έπειτα από επώαση με 100 nM CRF ή/και 1 μM ανταλαρμίνης) και των κυττάρων AC1M88 (έπειτα από την διαμόλυνση με τους φορείς του CEACAM1/L γονιδίου και την επώαση με το αντι-CEACAM1 αντίσωμα), μελετήθηκε με τους θαλάμους διείσδυσης Matrigel™ (πλάκες των 24 θέσεων) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εικοσι τέσσερις ώρες μετά από τη διαμόλυνση με τον φορέα ή με το πλασμίδιο αναφοράς, τα κύτταρα επώασθηκαν με τρυψίνη, συλλέχθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκαν στις θέσεις διείσδυσης του κιτ (25.000 κύτταρα/θέση). Για να είναι δυνατή η σύγκριση, ο ίδιος αριθμός κυττάρων τοποθετήθηκε στον ίδιο αριθμό θέσεων χωρίς μεμβράνη matrigel. Όλα τα τεστ πραγματοποιήθηκαν παράλληλα. Έπειτα από επώαση σε επωαστήρα κυτταρικών καλλιιεργειών, παρουσία CRF ή/και ανταλαρμίνης ή αντι-CEACAM1 αντισώματος για 24 ώρες (απομονωμένη EAT) ή 48 ώρες (AC1M88), τα κύτταρα που δεν είχαν διεισδύσει τη μεμβράνη απομακρύνθηκαν από την άνω επιφάνειά της και τα κύτταρα στη κάτω επιφάνεια χρώστηκαν με υλικά του κιτ. Οι μεμβράνες αποκολλήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα κύτταρα που είχαν περάσει μέσα από τις μεμβράνες μετρήθηκαν σε 3 οπτικά πεδία της κεντρικής περιοχής των μεμβρανών. Η δράση του υπο εξέταση γονιδίου στο διεισδυτικό δυναμικό των κυττάρων παρουσία ή απουσία του αντι-CEACAM1 αντισώματος, υπολογίστηκε σε σύγκριση με τον αριθμό των

κυττάρων που παρατηρήθηκαν μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο αναφοράς (=100%). Για τα κύτταρα ΕΛΤ, η δράση του CRF ή/και της ανταλαρμίνης, ή του αντι-CEACAM1 αντισώματος στη διεισδυτικότητά τους, υπολογίστηκε σε σύγκριση με τον αριθμό των κυττάρων που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα χωρίς προσθήκη των ανωτέρω μορίων.

3.2.8. Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης.

3.2.8.1. Μέθοδος ApoPercentage

Υλικά – Συσκευές

APOpercentage kit (Biocolor, UK)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Φωτόμετρο ELISA (Chantilly, VA)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, USA)

Ionomycin (I) (Sigma-Aldrich, USA)

r/hCRF (Tocris)

hUCN (Sigma-Aldrich)

Antalarmin (ευγενική χορηγία του Dr. GP Chrousos)

Αντίσωμα κατά του Fas υποδοχέα (blocking αντίσωμα) (SM1/23, ALEXIS Biotechnologies)

Μέθοδος

Η μέτρηση της κυτταρικής απόπτωσης με την μέθοδο APOpercentage στηρίζεται στη χρήση μιας χρωστικής που εισέρχεται εκλεκτικά στα κύτταρα που οδεύουν προς απόπτωση. Στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, η φωσφοτιδυλοσερίνη της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας εξέρχεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Το φαινόμενο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μιας «βιοχημικής τρύπας» στη μεμβράνη των κυττάρων γεγονός που εκμεταλλεύεται η συγκεκριμένη μέθοδος. Συγκεκριμένα, η ειδικά σχεδιασμένη χρωστική εισέρχεται μέσα στα κύτταρα, ακριβώς λόγω της αναστροφής αυτής των λιπιδίων της μεμβράνης, αλλά δεν μπορεί να εξέλθει. Έτσι, παγιδεύεται εντός των κυττάρων έως την πλήρη λύση τους.

Για το συγκεκριμένο πείραμα, τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκες 96 οπών με επίπεδη βάση (96-well plates, flat bottom well type). Η χρωστική ApoPercentage που χρησιμοποιείται έχει έντονο κόκκινο χρώμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων και η φωτογράφησή τους ακόμα και με ένα κοινό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Ο προτεινόμενος χρόνος παραμονής της χρωστικής στα με τα κύτταρα είναι από μισή έως μία ώρα. Τα αποπτωτικά κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα, ενώ τα ζωντανά κύτταρα παραμένουν λευκά. Τα κύτταρα ξεπλένονται κατόπιν με PBS δύο φορές και προστίθεται Dye Release Reagent (παρέχεται από το kit), το οποίο λύει τα κύτταρα και απελευθερώνει στο σχηματιζόμενο διάλυμα την χρωστική μετά από 10 λεπτά ανάδευσης. Το χρώμα μετράται σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 550nm (με μήκος κύματος αναφοράς τα 620nm). Για την ελαχιστοποίηση του εύρους λάθους, χρησιμοποιείται μια τριπλέτα οπών στην πλάκα για κάθε συνθήκη του πειράματος.

Στα πειράματα που έγιναν μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των διαφόρων προσθετικών ουσιών στην απόπτωση της κυτταρικής σειράς της ΕΛΤ (AC1M88). Οι πλάκες των 96 οπών επιστρώθηκαν με 2×10^4 τροφοβλάστες/οπή. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 8 ώρες μέσα σε επωαστήρα κυτταρικών καλλιιεργειών προκειμένου να προσκολληθούν σταθερά στο έδαφος της πλάκας. Ακολούθως επώαστηκαν για 32 ώρες με τις διάφορες ουσίες (CRF, Ucn, a-Fas, antalarmin, PMA+I).

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση των φθαρτικών λεμφοκυττάρων στη κυτταρική σειρά της ΕΛΤ AC1M88. Οι πλάκες επιστρώθηκαν ως ανωτέρω και παρέμειναν για 8 ώρες μέσα σε επωαστήρα. Οι τροφοβλάστες βρίσκονταν μέσα σε 100 ml του θρεπτικού τους υλικού DMEM/F12, ενώ σε ορισμένες συνθήκες προστέθηκαν εξ αρχής μέσα στο θρεπτικό υλικό 2μg από το αντίσωμα κατά του Fas υποδοχέα. Έπειτα από τη συμπλήρωση των 8 ωρών προσθέτονταν σε κάθε οπή και πάνω από τους τροφοβλάστες 2×10^5 φθαρτικά λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα μια αναλογία κυττάρων στόχων προς κυττάρων δραστών ίση με 1 προς 20 περίπου. Τα λεμφοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα και προέρχονταν από πλακούντες αποβολών, δεν υπεβλήθησαν σε κάποια προηγούμενη διαδικασία. Τα λεμφοκύτταρα που προέρχονταν από επιλεκτικές διακοπές κνήσεως είτε δεν υπεβλήθησαν επίσης σε καμία διαδικασία, είτε υπεβλήθησαν σε διάφορες επώσεις ανάλογα με τη συνθήκη. Συγκεκριμένα, είτε προ-επώαστηκαν με 10 ng/ml PMA και 1 μg/ml ionomycin (I), είτε με 100 nM CRF ± antalarmin, είτε με 100 nM Ucn ± antalarmin. Όλες οι επώσεις διήρκησαν 24 ώρες. Τα κύτταρα τα οποία δεν

υπέστησαν κάποια προ-επώαση παρέμειναν μέσα στο θρεπτικό τους υλικό για 24 ώρες, διάστημα κατά το οποίο γίνονταν παράλληλα οι 24ωρες προ-επώσεις των λεμφοκυττάρων των άλλων συνθηκών. Οι τροφοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα συνεπώαστηκαν μέσα στις πλάκες των 96 οπών για 24 ώρες, είτε μέσα σε θρεπτικό υλικό μόνο, είτε με την παρουσία των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την προ-επώασή τους. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, οι οπές τις πλάκας εκπλύθηκαν ήπια για να απομακρυνθούν τα υπερκείμενα λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια προστέθηκε η χρωστική του kit και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες οι οδηγίες του κατασκευαστή όπως αναφέρθηκε ανωτέρω.

3.2.8.2. Χρώση με Ανεξίνη V και Ιωδιούχο Προπίδιο

Υλικά – Συσκευές

Ανεξίνη-V (Annexin-V) και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA 92121, USA)

Κυτταρομετρητής Beckton-Dickinson FACSArray (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

Software προγράμματα CELLQuest (Beckton-Dickinson) και ModFit LT (Verify Software, Topsham, MN)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, USA)

Ionomycin (I) (Sigma-Aldrich, USA)

r/hCRF (Tocris)

hUCN (Sigma-Aldrich)

Antalarmin (ευγενική χορηγία του Dr. GP Chrousos)

Αντίσωμα κατά του Fas υποδοχέα (blocking αντίσωμα) (SM1/23, ALEXIS Biotechnologies)

Μέθοδος

Η μέθοδος της χρώσης με Annexin-V και PI βασίζεται στην ιδιότητα της Annexin-V να προσδέεται στα λιπίδια φωσφατιδυλοσερίνης. Αυτά βρίσκονται φυσιολογικά στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, αλλά μετακινούνται στην εξωτερική πλευρά στα πρώτα στάδια της απόπτωσης. Επίσης η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ιδιότητα του PI να εισέρχεται μέσα σε

νεκρωτικά κύτταρα. Έτσι εκτιμάται το ποσοστό αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων ως προς τα ζώντα φυσιολογικά κύτταρα. Η Annexin-V είναι συζευγμένη με φθορίζουσα χρωστική (FITC) για την ακριβή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων ακολουθήθηκαν τα ίδια ακριβώς βήματα τα οποία περιγράφονται στην παράγραφο της ποσοτικής εκτίμησης της απόπτωσης με την μέθοδο ApoPercentage, έως το σημείο της ήπιας έκπλυσης των πλακών 96 οπών για την απομάκρυνση των υπερκείμενων λεμφοκυττάρων. Ακολούθως, εκπλένονται βίβια οι οπές για να συλλεχθούν οι προσκολλημένοι στην πλάκα τροφοβλάστες (AC1M88). Οι τελευταίοι συλλέγονται σε PBS στους 4°C, φυγοκεντρώνονται και η κυτταρικές πελέτες επαναδιαλύονται σε 100 μl διαλύματος πρόσδεσης (binding buffer, παρέχεται από το kit). Ακολουθεί η επώαση για 20 min με 5 μl annexin-V και 5 μl PI, αραίωση του διαλύματος με 400 μl διαλύματος πρόσδεσης και μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής. τα δείγματα εξετάζονται εντός 20 λεπτών με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSArray και αναλύονται με το πρόγραμμα CELLQuest και ModFit LT.

3.2.8.3. Μέθοδος TUNEL

Υλικά – Συσκευές

Ανάστροφο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με laser ιόντων αργού-κρυπτού (Zeiss IM35)
In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (kit εντοπισμού της απόπτωσης με φθορισμό) (Roche, USA)

Ευλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H₂O₂/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)

PowerBlock™ (BioGenex)

Αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (Novocastra)

Anti-mouse TRITC αντίσωμα (Chemicon)

DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindole) (Molecular Probes)

Μέθοδος

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης αποτελεί ο κατακερματισμός του DNA. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό θραυσμάτων DNA (nicks) τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρώση των ελεύθερων 3'-OH άκρων τους με τροποποιημένα νουκλεοτίδια, στην συγκεκριμένη περίπτωση dUTP

σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση (TdT) καταλύει τον πολυμερισμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3'-άκρο των θραυσμάτων DNA, ως εκ τούτου και το όνομα της μεθόδου TUNEL (TdT-mediated dUTP-nick end labeling).

Στη παρούσα μελέτη, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης, προερχόμενες από το πλακουντιακό υλικό που συλλέχθηκε όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Πριν την εφαρμογή της μεθόδου, οι τομές επεξεργάστηκαν κατά τον τρόπο που περιγράφεται στη παράγραφο των ανοσοϊστοχημειών σε τομές παραφίνης, έως το σημείο του αποκλεισμού των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στον ιστό με τη χρήση διαλύματος καζεΐνης PowerBlock. Ακολούθως εφαρμόστηκε η μέθοδος TUNEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ένα μέρος από το διάλυμα του ενζύμου (TdT) και 9 μέρη από τα σημασμένα νουκλεοτίδια (fluorescein-dUTP) αναμειγνύονται για το σχηματισμό του διαλύματος εργασίας. Οι ιστοί επωάζονται για 1 ώρα με το διάλυμα εργασίας στο σκοτάδι στους 37°C και σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υδρατμούς. Ακολουθεί ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 όπως αναφέρεται στην παράγραφο των ανοσοφθορισμών και κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας DAPI για μη ειδική χρώση των πυρήνων.

Για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 16 διαφορετικά μπλοκ ιστών (n=8 για τις αποβολές και n=8 για τις διακοπές κύησης). Από κάθε μπλοκ εξετάστηκαν 5 έως 8 τομές με απόσταση μεταξύ τους άνω των 50 μm. Σε κάθε τομή επιλέχθηκαν τυχαία πεδία μικροσκοπίου σε μεγέθυνση x400 σε περιοχές όπου η διάμεση ΕΛΤ διεισδύει στον φθαρτό. Στα πεδία αυτά μετρήθηκαν ο ολικός αριθμός των κυττάρων διάμεσης ΕΛΤ και ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων διάμεσης ΕΛΤ. Σε κάθε τομή ο αριθμός των ολικών τροφοβλαστών που μετριόνταν με την ανωτέρω μέθοδο ήταν τουλάχιστον 300. Ο αριθμός των αποπτωτικών πυρήνων των θετικών για κυτταροκερατίνη ΕΛΤ εκφράστηκε σαν το επί τοις εκατό ποσοστό των ολικών ΕΛΤ θετικών για κυτταροκερατίνη που μετρήθηκαν σε κάθε τομή. Κάθε τομή εκτιμήθηκε από δύο ερευνητές. Η μη ειδική χρώση αποκλείστηκε με την παράληψη του ενζύμου της μεθόδου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως επίσης με την παράληψη του αντισώματος κατά της κυτταροκερατίνης. Η φωτογράφιση έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

3.2.8.4. Μέθοδος M30

Υλικά – Συσκευές

Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Γερμανία)

Αντίσωμα M30 CytoDEATH (Alexis)

Συνδεδεμένο με Cy-3 αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης (Micomet)

Συνδεδεμένο με Cy-2 αντι-mouse αντίσωμα (Dianova)

Ευλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H₂O₂/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)

PowerBlock™ (BioGenex)

Μέθοδος

Ένα από τα πρώτα γεγονότα της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός των πρωτεϊνικών δομών του κυττάρου. Η ενεργοποίηση των κασπασών εκτελεστών έχει σαν αποτέλεσμα την ενζυμική λύση διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων και η κυτταροκερατίνη-18. Η λύση της τελευταίας αποδίδει θραύσματα με συνέπεια την αποκάλυψη επιτόπων που στο ακέραιο μόριο δεν είναι προσβάσιμοι (νεοεπίτοποι). Κατά τα πρώτα στάδια της απόπτωσης είναι δυνατή η αναγνώριση των νεοεπιτόπων αυτών, σε αντίθεση με τη νέκρωση όπου το κύτταρο απελευθερώνει ή περιέχει μόνο ακέραιη κυτταροκερατίνη-18. Πάνω στο γεγονός αυτό βασίζεται η μέθοδος M30 που ουσιαστικά αποτελεί την ανοσοϊστοχημική/ανοσοκυτταροχημική αναγνώριση των θραυσμάτων της κυτταροκερατίνης-18 σε αποπτωτικά κύτταρα που την εκφράζουν, δηλαδή σε κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης.

Στη παρούσα μελέτη, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης, προερχόμενες από το πλακουντιακό υλικό που συλλέχθηκε όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Πριν την εφαρμογή της μεθόδου, οι τομές επεξεργάστηκαν κατά τον τρόπο που περιγράφεται στη παράγραφο των ανοσοϊστοχημειών σε τομές παραφίνης, έως το σημείο του αποκλεισμού των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στον ιστό με τη χρήση διαλύματος καζεΐνης PowerBlock. Ακολούθως, οι τομές με το αντίσωμα M30, στη συνέχεια με το δευτεροταγές συνδεδεμένο με Cy-2 αντι-mouse αντίσωμα και τέλος με το συνδεδεμένο με Cy-3 αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης. Στο μεσοδιάστημα των βημάτων έγιναν πλύσεις με PBS. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν 1/200 και όλες οι επώσεις έγιναν για 1 ώρα σε ΘΔ. Τέλος έγινε κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας DAPI για μη ειδική χρώση των πυρήνων.

Για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 16 διαφορετικά μπλοκ ιστών (n=8 για τις αποβολές και n=8 για τις διακοπές κύησης). Η μελέτη των ιστών έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο της μεθόδου TUNEL. Η φωτογράφιση έγινε με μικροσκόπιο συνεστίασης.

3.2.9 Απομόνωση RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα και ομογενοποιημένους ιστούς

Υλικά και συσκευές

Trizol (Trizol reagentTM, Sigma, USA)

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη (Merck, Γερμανία)

Μέθοδος

Τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνται σε 1.500 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά. Ξεπλένονται με PBS και κατόπιν διαλύονται σε 1 ml Trizol (ανά 5-10 εκατομμύρια κύτταρα) που περιέχει μίγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Αντίστοιχα κόβονται τα επιθυμητά τμήματα των ιστών και ομογενοποιούνται με τη χρήση ομογενοποιητή και αποστειρωμένων εμβόλων. Τα ομογενοποιημένα των ιστών διαλύονται σε 1 ml Trizol (ανά 5-10 εκατομμύρια κύτταρα) που περιέχει μίγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Τα δείγματα στη συνέχεια ακολουθούν κοινή πορεία ως εξής. Αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο. Μετά από ισχυρή ανάδευση (15sec), το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 15 λεπτά. Ο διαχωρισμός των φάσεων ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μίγμα σε 3 φάσεις: Στην οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιέχει τις πρωτεΐνες, στην μεσόφαση που περιέχει το DNA και στην υδατική φάση (άχρωμη) που περιέχει το RNA. Για την κατακρήμνιση του RNA, η υδατική φάση, η οποία μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, επωάζεται με 500μl ισοπροπανόλης για 5- 10 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το RNA εκπλένεται κατόπιν με 1ml αιθανόλης 75%, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 50μl H₂O. Για καλύτερη διάλυση θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 65°C. Για την εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA μετρούνται οι απορροφήσεις στα 260 nm και στα 280 nm, όπου απορροφούν αντίστοιχα το RNA

και το DNA. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων δίνει την καθαρότητα του RNA, ενώ η ποσότητα υπολογίζεται βάση της απορρόφησης στα 260nm (τιμή απορρόφησης 1nm αντιστοιχεί σε 40μg/ml RNA). Τα δείγματα του RNA φυλάσσονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.2.10. Μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Υλικά και συσκευές

Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT (Life Technologies, ΗΠΑ)

Ένζυμο πολυμεράσης: Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, ΗΠΑ)

Διθειοθρεϊτόλη (Sigma, ΗΠΑ)

Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTPs (Life Technologies, ΗΠΑ)

Τυχαία εξαμερή: random hexamers (Life Technologies, ΗΠΑ)

Tris acetate, οξικό κάλιο, οξικό μαγνήσιο, MgCl_2 (Life Technologies, ΗΠΑ)

Δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Life Technologies, ΗΠΑ)

Συσκευή PCR

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Διάλυμα διθειοθρεϊτόλης: Το διάλυμα περιέχει 0,1 M διθειοθρεϊτόλης

Διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs): Το διάλυμα περιέχει 10 mM μίγματος ολιγονουκλεοτιδίων

Διάλυμα τυχαίων εξαμερών (random hexamers): Το διάλυμα περιέχει 50 ng/μl μίγματος τυχαίων εξαμερών, που είναι πρωταρχικά τμήματα συμπληρωματικά της 5' – 3' poly- (A) περιοχής του mRNA

Διάλυμα σύνθεσης cDNA: Το διάλυμα περιέχει 250 mM Tris acetate (pH 8,4), 375 mM οξικό κάλιο, 40 mM οξικό μαγνήσιο

Διάλυμα MgCl_2 : Το διάλυμα περιέχει 50 mM MgCl_2

Εκκινητές (primers) για:

Urocortin

sense, 5'-CAGGCGAGCGGCCGCG-3'

antisense, 5'-CTTGCCCACCGAGTCGAAT-3'

CRF

sense, 5'-CAACTTTTTCCGCGTGTTGCT-3'

antisense, 5'-ATGGCATAAGAGCAGCGTTAT-3'

FasL

TaqMan probe, 5'-TCCAACCTCAAGGTCCATGCCTCTGG-3'

Sense, 5'-AAAGTGGCCCCATTTAACAGGC -3'

Antisense, 5'-AAAGCAGGACAATTCCATAGGTG-3'

Fas

TaqMan probe, 5'-AATCATCAAGGAATGCACACTCACCAGCA-3'

sense, 5'-ACT GTGACCCTTGCACCAAAT-3'

antisense, 5'-GCCACCCCAAGTTAGATCTGG-3'

Ακτίνη

sense, 5'-CATCCTGTCCGGCAATGCCAGG-3'

antisense, 5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3'

Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (RT-PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος για τον προσδιορισμό του mRNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος χωρίζεται σε δύο μέρη: Στην μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και στην ενίσχυση-σύνθεση μεγάλης ποσότητας του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το cDNA. Η μετατροπή του RNA σε cDNA γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή. Το ένζυμο για να ξεκινήσει τη σύνθεση του cDNA χρειάζεται ένα πρωταρχικό τμήμα συμπληρωματικό της 5' – 3' poly-(A) περιοχής του mRNA. Η σύνθεση γίνεται με την προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs). Το cDNA που προκύπτει χρησιμοποιείται για την αντιγραφή συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από πρωταρχικά τμήματα (primers) ειδικά για το γονίδιο που θέλουμε να αντιγραφεί. Η διαδικασία γίνεται παρουσία ειδικής θερμοάαντοχης πολυμεράσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικά: α. Αποδιάταξη του cDNA στους 95°C, β. Ψύξη του DNA στους 25°C για την επικόλληση των primers στα συμπληρωματικά κομμάτια του DNA και γ. Αντιγραφή συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από τα primers παρουσία dNTPs και της πολυμεράσης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, ούτως ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του γονιδίου. Το προϊόν διαχωρίζεται και ταυτοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Η απομόνωση του RNA από τα ΕΛΤ κύτταρα και τους ομογενοποιημένους ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Trizol όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Ένα μικρογραμμάριο από το συνολικό RNA που προκύπτει σε κάθε δείγμα υπόκειται στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση στις συνθήκες του προγράμματος Thermo-Script PCR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή σε τελικό όγκο 20μl. Από το προϊόν (cDNA) χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με δύο μικρόλιτρα ως υπόστρωμα για την Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Για την αντίδραση PCR απαιτούνται 2 mM MgCl₂, one strength PCR buffer, 0.2 mM sense και antisense primers, 0.2 mM dNTPs και 2.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase. Ο όγκος της τελικής αντίδρασης είναι 50 μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε Perkin Elmer DNA Thermal Cycler.

Οι εκκινήτες (primers) για κάθε γονίδιο που ελέγχθηκε αναφέρονται στα Υλικά. Η σύνθεση των ολογονουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε από την MWG-Biotech AG (Munche, Germany). Οι συνθήκες του PCR (denaturation-annealing-extension) για κάθε γονίδιο είναι οι κατωτέρω:

Ucn (145 bp) 60 s σε 95 °C, 60 s σε 60 °C, και 60 s σε 72 °C για 40 κύκλους

CRF (244 bp) 60 s σε 95 °C, 60 s σε 60 °C, και 60 s σε 72 °C για 35 κύκλους

Ακτίνη (174 bp) 60 s σε 95 °C, 60 s σε 55 °C και 60 s σε 72 °C για 35 κύκλους

Για την ανίχνευση του DNA, 10μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης τοποθετούνται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση και αφήνεται να διαχωριστεί το DNA. Πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των γονιδίων είναι εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται και χρώνει το DNA, το οποίο ανιχνεύεται σε συσκευή υπεριώδους φωτός.

3.2.11. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Για την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση του mRNA των FasL και Fas, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Πραγματικού χρόνου. Για την αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση των FasL και Fas προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε το κιτ TaqMan EZ RT-PCR (PE Applied Biosystems). Οι συνθήκες των αντιδράσεων είχαν ως εξής: 2 min στους 50°C, 30 min at 60°C, 5 min at 95°C, 35 κύκλοι με 20 sec στους 94°C, και 60 sec στους 60°C. Από τις καμπύλες των αποτελεσμάτων υπολογίζεται ο αριθμός επαναλήψεων του μορίου με τον τύπο: $\text{fold increase} = 2^{-(\Delta CtA - \Delta CtB)}$.

3.2.12. Ανάλυση του υποκινητή της UCN

Υλικά και Συσκευές

Ανθρώπινο γενωμικό DNA (Boehringer, Germany)

Pfu πολυμεράση (Strata-gene, Heidelberg, Germany)

NucleoTrap® kit (Macherey-Nagel, Germany)

Περιοριστικά ενζύμα Sac και HindIII (Promega, Mannheim, Germany)

TPA (εστέρας φορβόλης), ιονομυκίνη, φορσκολίνη (Sigma)

Φωτόμετρο Berthold (Berthold, Germany)

Primers για τον υποκινητή της Ucn

sense, 5'-CTGCAGTGGTAATGAGTAA-3'

antisense, 5'-GCTGAAGACGCCTTGG-3'

Ο υποκινητής της UCN κατασκευάστηκε ως ακολούθως: ένα κλάσμα μεγέθους 2365 bp της 5' περιοχής του ανθρώπινου γονιδίου της UCN ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ανθρώπινο γενωμικό DNA. Η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 10 pmol 5'- και 3'-primers, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U Pfu πολυμεράσης σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl. Τα βήματα της PCR ήταν ως εξής: 2 λεπτά στους 95 °C, ακολουθούμενα από 4 κύκλους στους 68, 66, 64, και 62 °C, και 25 κύκλους στους 60 °C. Το ενισχυμένο προϊόν επανακτήθηκε από το γέλη αгарόζης με τη χρήση του NucleoTrap® kit και εισήχθηκε σε ένα φορέα. Ένα κλάσμα μεγέθους 945 bp το οποίο περιείχε την αλληλουχία του υποκινητή της UCN κόπηκε από τον φορέα αυτό με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων Sac και HindIII (Promega, Mannheim, Germany). Το κλάσμα μεταφέρθηκε σε ένα φορέα PCR script και έπειτα σε ένα pGL3 βασικό φορέα, ο οποίος είχε προηγουμένως κοπεί με τα ίδια ένζυμα. Η σωστή σύνδεση και αλληλουχία επιβεβαιώθηκαν με DNA sequencing. Για τα πειράματα διαμολύνσεων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG3. Τα κύτταρα

τοποθετήθηκαν σε πλάκες των 12 θέσεων με συγκέντρωση 2×10^5 κύτταρα/θέση και διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς το οποίο προέκυψε από την ανωτέρω διαδικασία. Ακολουθήθηκε το γενικό πρωτόκολλο για DOTAP διαμολύνσεις (Boehringer, Mannheim, Germany). Μετά από 24 ώρες διέγερσης με TPA, ιονομυκίνη ή φορσκολίνη, μετρήθηκε η δραστηριότητα της λουσιφεράσης στα κύτταρα αφού αυτά υπεβλήθησαν σε λύση, με τη χρήση ενός Berthold φωτομέτρου.

3.2.13. Στατιστική ανάλυση

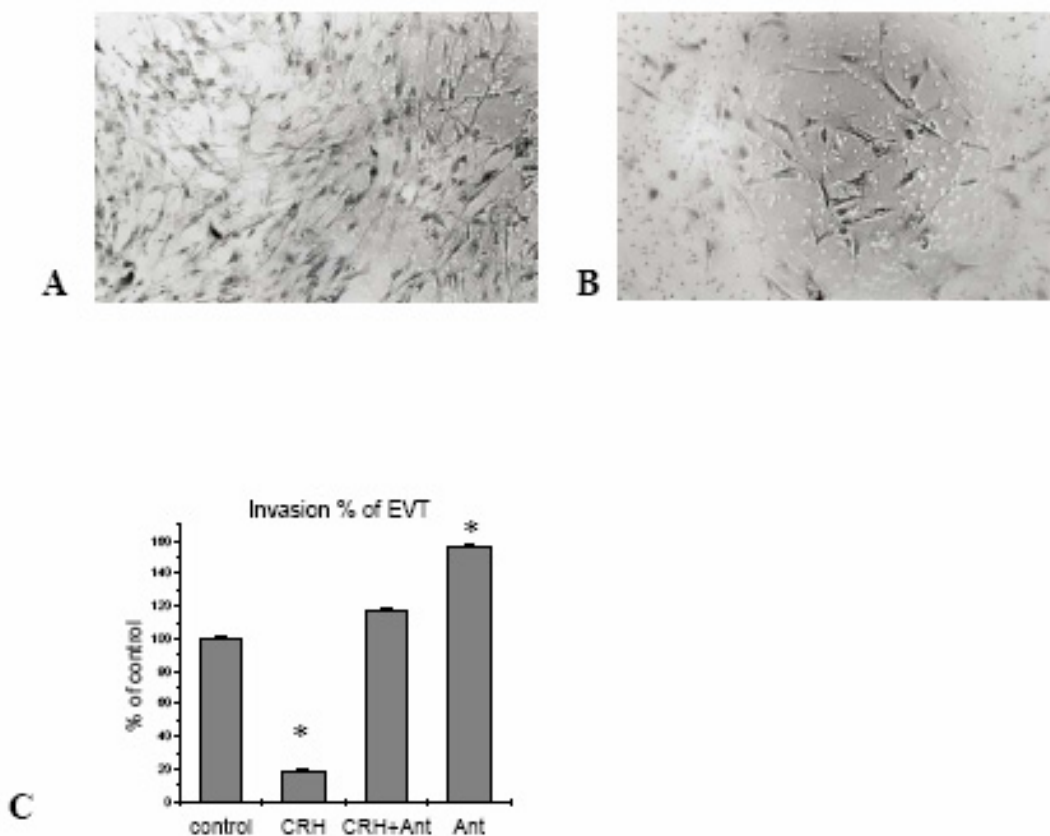
Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες απλής (one-way) και παραγοντικής (factorial) ανάλυσης της μεταβλητότητας (ANOVA). Για τη συγκριτική μελέτη απόλυτων τιμών χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι Student's test (t-test), post hoc, Fisher's least significance difference και Newman-Keuls. Τέλος, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που είναι εκφρασμένα ως προς το επί τοις εκατό σε σχέση με τις μετρήσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis για τον έλεγχο της ομοιογένειας των δειγμάτων. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τα προγράμματα NCSS και Statistica. Η τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντική.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Η επίδραση του CRF στη διεισδυτική ικανότητα της ανθρώπινης τροφοβλάστης

4.1.1. Ο CRF ελαττώνει τη διεισδυτικότητα των κυττάρων ΕΛΤ μέσω του CRFR1.

Η επίδραση του CRF στη διεισδυτικότητα κυττάρων πλακουντιακής προέλευσης, μελετήθηκε με τη χρήση απομονωμένων κυττάρων ΕΛΤ σε in vitro πειράματα διεισδυτικότητας. Η προσθήκη 100 nM CRF για 24 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση στη διεισδυτικότητα των ΕΛΤ (κατά $80\pm 6,2\%$) σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς (κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε εξωγενής CRF) (**εικόνα 1**). Με τη χρήση ανταλαρμίνης, ενός ειδικού ανταγωνιστή του CRFR1, διαπιστώθηκε ότι η συγκεκριμένη δράση του CRF μεσολαβείται ειδικά από τον CRFR1. Συγκεκριμένα, συνεπώαση των κυττάρων με 100 nM CRF και 1 μ M ανταλαρμίνης για 24 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα την άρση της ανασταλτικής δράσης του CRF στη διείσδυση των ΕΛΤ. Επιπλέον, επώαση των κυττάρων με 1 μ M ανταλαρμίνης για 24 ώρες, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας των ΕΛΤ. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αναστολή της δράσης του παραγόμενου από την ΕΛΤ CRF (κατά $61\pm 5,4\%$) σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς (**εικόνα 1**).

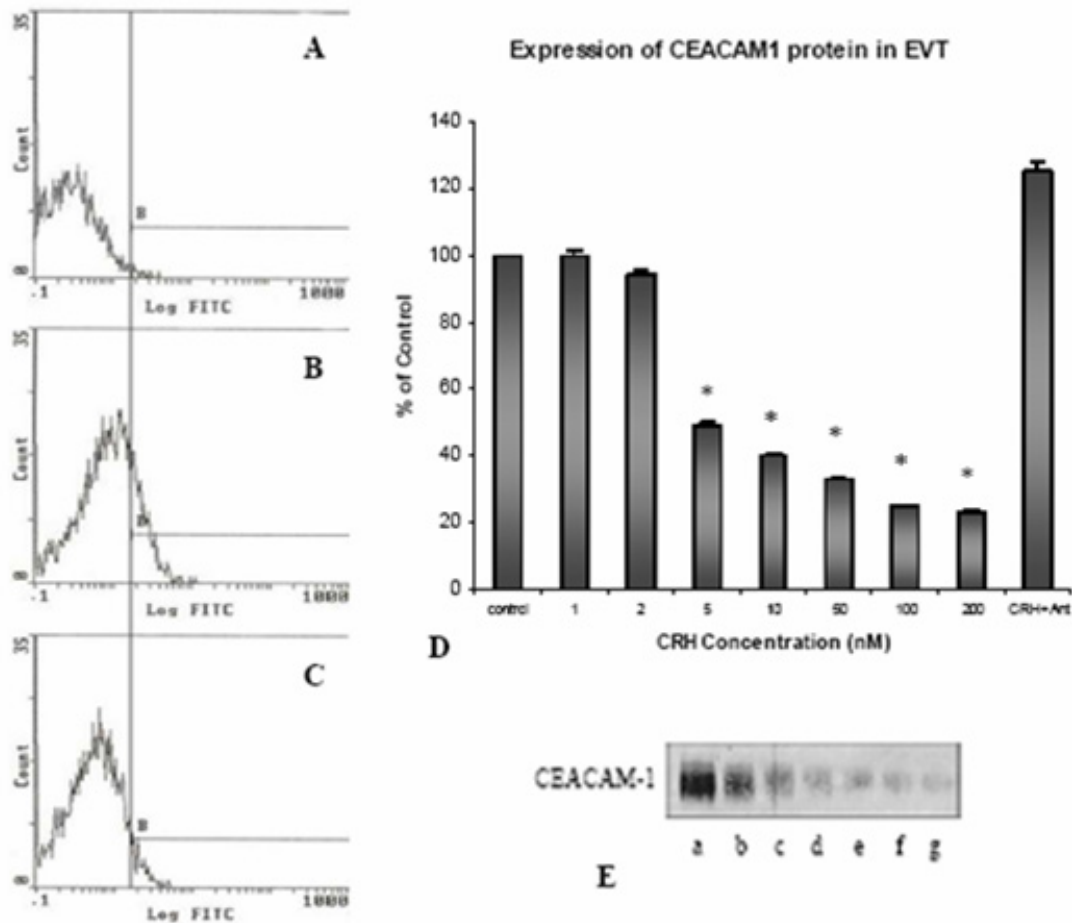


Εικόνα 1. *In vitro* μελέτη της διεισδυτικότητας απομονωμένων ΕΛΤ - Δράση του CRF με ή χωρίς ανταλαρμίνη. Α: συνθήκες αναφοράς, Β: επώαση με CRF, C: μετά από την επώαση με 100 nM CRF για 24 ώρες παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση στη διεισδυτικότητα των ΕΛΤ γεγονός το οποίο αναστράφηκε με την προσθήκη 1 μM ανταλαρμίνης (Ant). Επίσης όταν η ανταλαρμίνη χρησιμοποιήθηκε μόνη της, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη διεισδυτικότητα των ΕΛΤ, καθώς τα κύτταρα αυτά συνθέτουν και εκκρίνουν CRF. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (επι τοις εκατό της αναφοράς) που προέκυψαν από πέντε ξεχωριστά πειράματα (*, $p < 0.005$).

4.1.2. Ο CRF ελαττώνει την έκφραση της πρωτεΐνης CEACAM1 στους ΕΛΤ μέσω του CRFR1.

Η επίδραση του CRF στην έκφραση του CEACAM1 στους ΕΛΤ μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 2). Επώαση των ΕΛΤ με CRF για 24 ώρες προκάλεσε ελάττωση της έκφρασης της CEACAM1 πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη δράση παρατηρήθηκε στα 100 nM CRF. Πράγματι, επώαση με 10, 50 ή 100 nM CRF για 24 ώρες ελάττωσε την μέση ένταση

φθορισμού (mean fluorescent intensity, MFI) για την έκφραση της CEACAM1 πρωτεΐνης κατά 2.5-, 3- και 4-φορές αντίστοιχα. Η δράση αυτή του CRF επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανοσοτύπωσης (εικόνα 2E). Η προσθήκη 1 μ M ανταλαρμίνης στο διάλυμα περιέχων CRF ανέστρεψε πλήρως την ανωτέρω δράση του CRF οδηγώντας στη διαπίστωση ότι για την εμφάνιση του φαινομένου μεσολαβεί ο CRFR1 (εικόνα 2D).

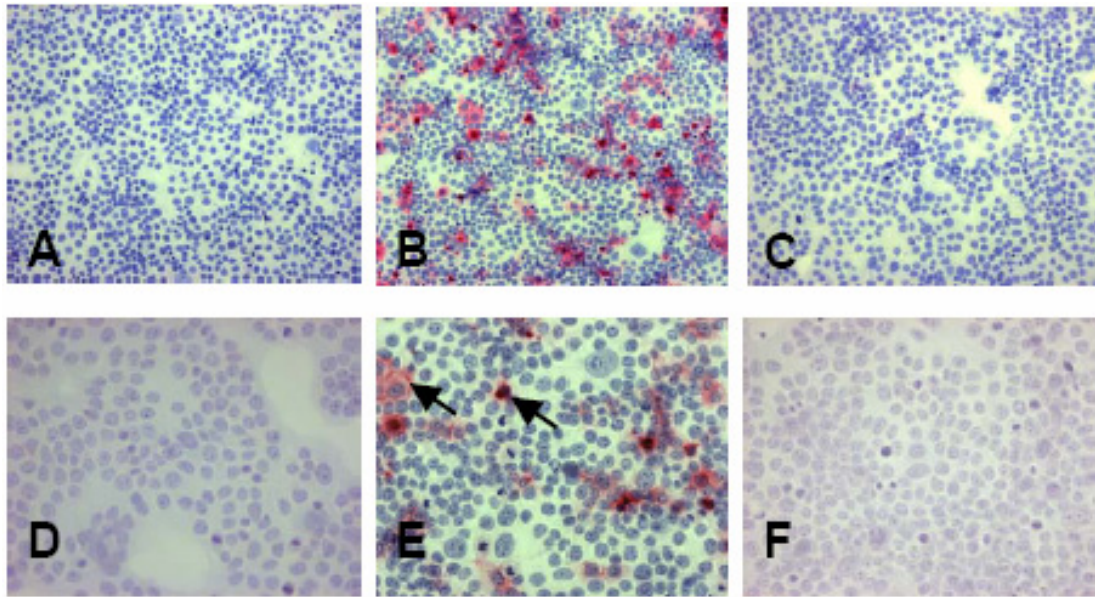


Εικόνα 2. Ρύθμιση της έκφρασης του CEACAM1 πεπτιδίου στους ΕΛΤ από τον CRF. A, B, C, D: Μελέτη με κυτταρομετρία ροής της έκφρασης του CEACAM1. A: αρνητικό κοντρόλ, B: έκφραση του μορίου χωρίς τη προσθήκη καμίας ουσίας, C: έκφραση του μορίου μετά απο επώαση με 100 nM CRF, D: ποσοτικοποίηση της δοσοεξαρτώμενης επίδρασης του CRF στην έκφραση του CEACAM1. Η μέγιστη δράση του CRF παρατηρήθηκε μετά από επώαση με 100 nM CRF για 24 ώρες. Σε αυτή τη συγκέντρωση η έκφραση του CEACAM1 ελαττώθηκε κατά 4 φορές, μία δράση η οποία μεσολαβείται από τον CRFR1 καθώς η προσθήκη 1 μ M ανταλαρμίνης την ανέστρεψε. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (επι τοις εκατό του κοντρόλ) που προέκυψαν από πέντε ξεχωριστά πειράματα (*, $p < 0.005$). E:

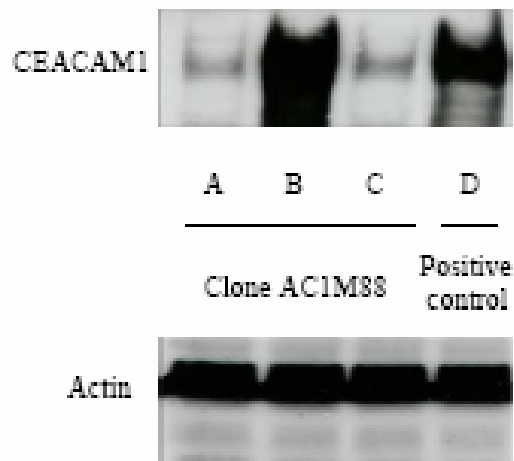
Ανάλυση της έκφρασης του CEACAM1 με ανοσοτύπωση μετά από επώαση 24 ωρών με CRF με ή χωρίς ανταλαρμίνη. a: 100 nM CRF + 1 μ M ανταλαρμίνης, b: κοντρόλ, c: 5 nM CRF, d: 10 nM CRF, e: 50 nM CRF, f: 100 nM CRF, g: 200 nM CRF.

4.1.3. Το CEACAM1 αυξάνει τη διεισδυτικότητα των AC1M88 κυττάρων.

Για την μελέτη της επίδρασης του CEACAM1 στη διεισδυτικότητα κυττάρων πλακουντιακής προέλευσης, χρησιμοποιήθηκαν AC1M88 κύτταρα. Τα τελευταία διαμολύνθηκαν είτε με ένα φορέα έκφρασης της κλασικής (μακράς) μορφής του μορίου (CEACAM1/L), είτε με το αντίστοιχο πλασμίδιο αναφοράς. Η αποτελεσματικότητα των διαμολύνσεων μελετήθηκε με ανοσοτύπωση και ανοσοκυτταροχημεία (εικόνες 3 και 4). Στην ανοσοκυτταροχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του CEACAM1 4D1/C2, το οποίο δεν προσδένεται σε άλλα μέλη της οικογένειας CEA. Η ειδικότητα του αντισώματος αυτού έχει μελετηθεί λεπτομερειακώς σε προηγούμενη εργασία (Drzeniek et al, 1991). Η ανάλυση της έκφρασης του μορίου με ανοσοκυτταροχημεία κατέδειξε την παρουσία ανοσοδραστικού CEACAM1 στα διαμολυσμένα με CEACAM1/L κύτταρα, ενώ τα μη διαμολυσμένα και τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη (εικόνα 3). Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διείσδυσης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των μεθόδων, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

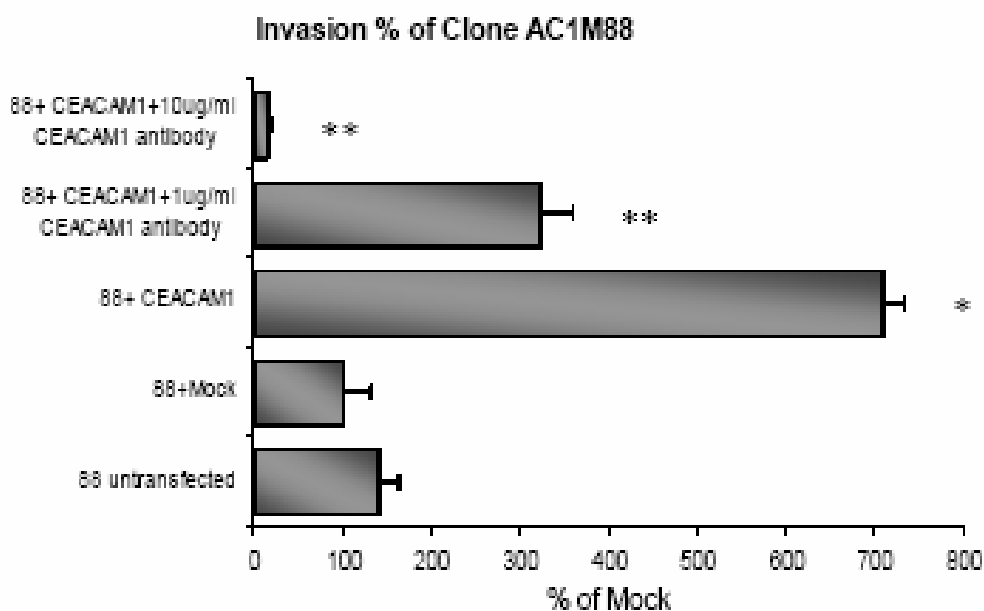


Εικόνα 3. Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του CEACAM1 στα κύτταρα AC1M88. A-C: Μεγέθυνση x100. A: μη διαμολυσμένα κύτταρα, B: διαμολυσμένα με CEACAM1 κύτταρα, χρώση για CEACAM1, C: διαμολυσμένα με πλασμίδιο αναφοράς. D-F: Μεγέθυνση x200: D: μη διαμολυσμένα κύτταρα, E: διαμολυσμένα με CEACAM1 κύτταρα, χρώση για CEACAM1 (βέλη), F: διαμολυσμένα με πλασμίδιο αναφοράς.



Εικόνα 4. Ανάλυση με ανοσοτύπωση της έκφρασης του CEACAM1 στα πλακουντιακά υβριδικά κύτταρα (κλώνος AC1M88) με τη χρήση του αντισώματος 4D1/C2 κατά του CEACAM1. A-C: πλακουντιακά υβριδικά κύτταρα (κλώνος AC1M88). A: μη διαμολυσμένα κύτταρα, B: διαμολυσμένα με CEACAM1 κύτταρα, C: διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα, D: θετικό κοντρόλ (G361 κύτταρα).

Τα κύτταρα AC1M88 δεν εκφράζουν ενδογενώς το CEACAM1 (όπως διαπιστώνεται από τα πειράματα ανοσοτύπωσης) και έχουν μικρή διεισδυτική ικανότητα. Επομένως τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης της διαμόλυνσης με CEACAM1 στην κυτταρική διεισδυτικότητα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η διαμόλυνση των ανωτέρω κυττάρων με το φορέα έκφρασης του CEACAM1 προκάλεσε αύξηση στη διεισδυτικότητά τους (σε σύγκριση με τα μη διαμολυσμένα και με τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα) (εικόνα 5). Πράγματι, η διαμόλυνση των AC1M88 κυττάρων με το φορέα έκφρασης του CEACAM1 οδήγησε σε αύξηση της διεισδυτικότητάς τους κατά 7 φορές σε σύγκριση με τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα. Για να επιβεβαιώσουμε ότι το CEACAM1 ήταν υπεύθυνο για το παρατηρούμενο αποτέλεσμα, τα διαμολυσμένα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ενός ειδικού αντι-CEACAM1 αντισώματος, το οποίο ανέστειλε ισχυρά τη διεισδυτική ικανότητα των διαμολυσμένων με CEACAM1 κυττάρων (εικόνα 6).

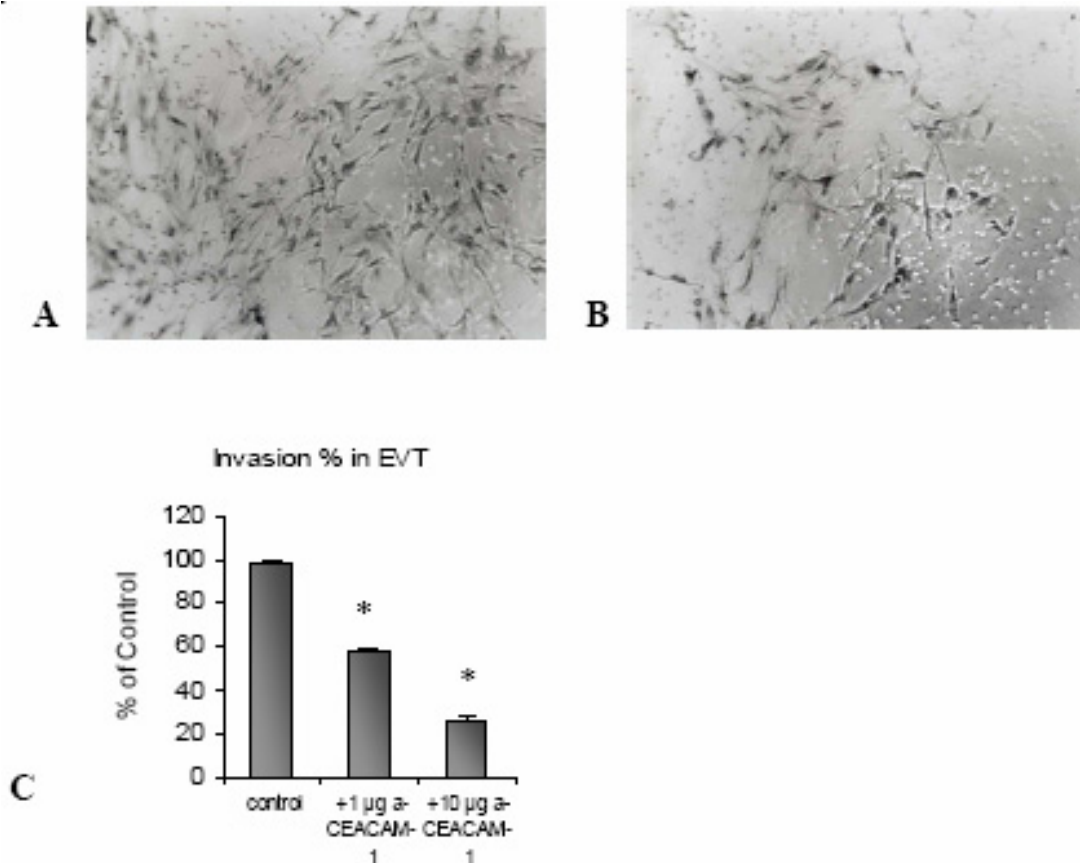


Εικόνα 5. *In vitro* μελέτη της διεισδυτικότητας των κυττάρων AC1M88. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη διεισδυτικότητα των διαμολυσμένων με CEACAM1 AC1M88 κυττάρων (88+CEACAM1) σε σύγκριση με τα μη διαμολυσμένα (88 untransfected) και τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα (88+Mock). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν

τους μέσους όρους \pm SE (επι τοις εκατό των συνθηκών αναφοράς) που προέκυψαν από τρία ξεχωριστά πειράματα (*, $p < 0.05$ σε σύγκριση με τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο αναφοράς κύτταρα, **, $p < 0.05$ σε σύγκριση με τα διαμολυσμένα με CEACAM1 κύτταρα).

4.1.4. Η αναστολή της λειτουργίας του CEACAM1 προκαλεί ελάττωση της διεισδυτικότητας της ΕΛΤ.

Η πιθανή επίδραση του ενδογενούς CEACAM1 στη διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών μελετήθηκε με τη χρήση απομονωμένης διεισδυτικής ΕΛΤ σε in vitro πειράματα διείσδυσης. Τα απομονωμένα από πλακούντα πρώτου τριμήνου κύτταρα ΕΛΤ εκφράζουν ενδογενώς το μόριο CEACAM1 (όπως διαπιστώνεται από πειράματα κυτταρομετρίας ροής και ανοσοτύπωσης, **εικόνα 2**) και έχουν μεγάλη διεισδυτική ικανότητα. Κατά συνέπεια τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης του ενδογενούς CEACAM1 στη διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών. Η επώαση των κυττάρων ΕΛΤ με διάφορες συγκεντρώσεις ειδικού αντι-CEACAM1 αντισώματος για 24 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της διεισδυτικής τους ικανότητας (στο $60 \pm 5,5\%$ των επιπέδων των συνθηκών αναφοράς σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ CEACAM1) (**εικόνα 6**).



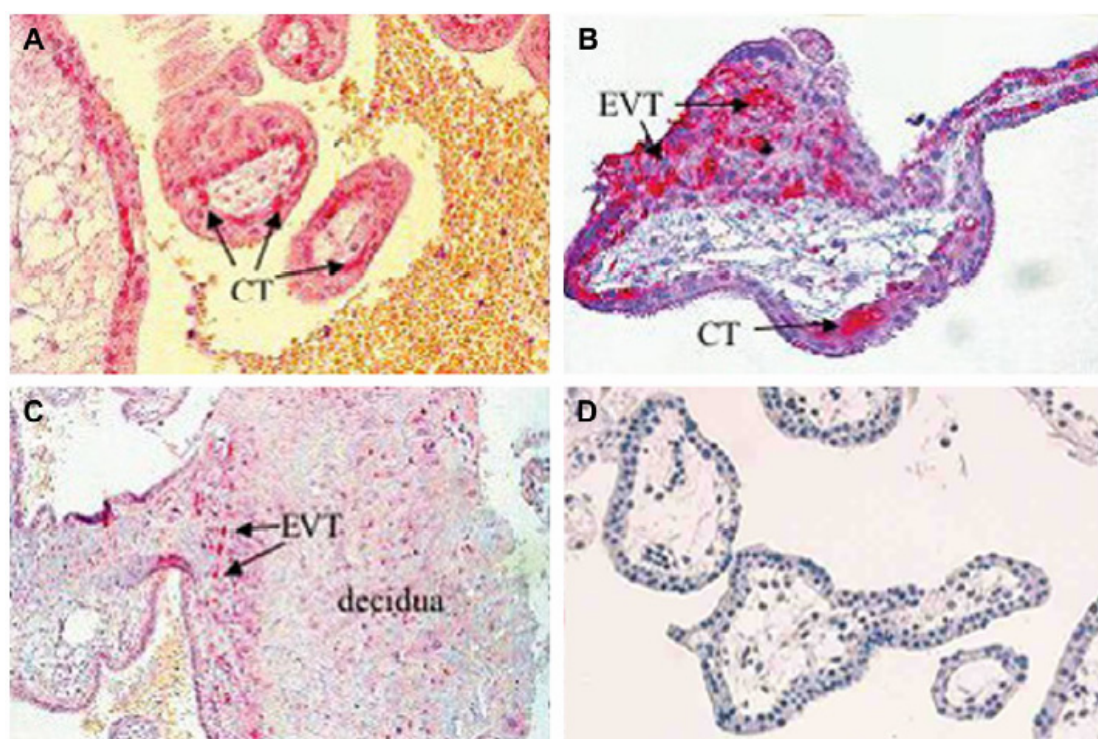
Εικόνα 6. *In vitro* μελέτη της διεισδυτικότητας των κυττάρων ΕΛΤ μετά από ανοσοουδετεροποίηση του ενδογενώς παραγόμενου CEACAM1 με ειδικό αντίσωμα. Α: συνθήκες αναφοράς (απουσία αντι-CEACAM1), Β: επώαση με 10 µg/ml αντι-CEACAM1 ειδικού αντισώματος, C: ποσοτικοποίηση του φαινομένου, δηλαδή της επίδρασης της ανοσοουδετεροποίησης του CEACAM1 (μετά από επώαση με 1 ή 10 µg/ml αντι-CEACAM1 αντισώματος για 24 ώρες) πάνω στη διεισδυτικότητα των κυττάρων ΕΛΤ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (επί τοις εκατό των συνθηκών αναφοράς) που προέκυψαν από τρία ξεχωριστά πειράματα) ($p < 0.05$).

4.2. Η έκφραση της UCN στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου

4.2.1. Το πεπτιδίο της UCN εκφράζεται στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου.

Η έκφραση του πεπτιδίου της UCN στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου μελετήθηκε με τις τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε

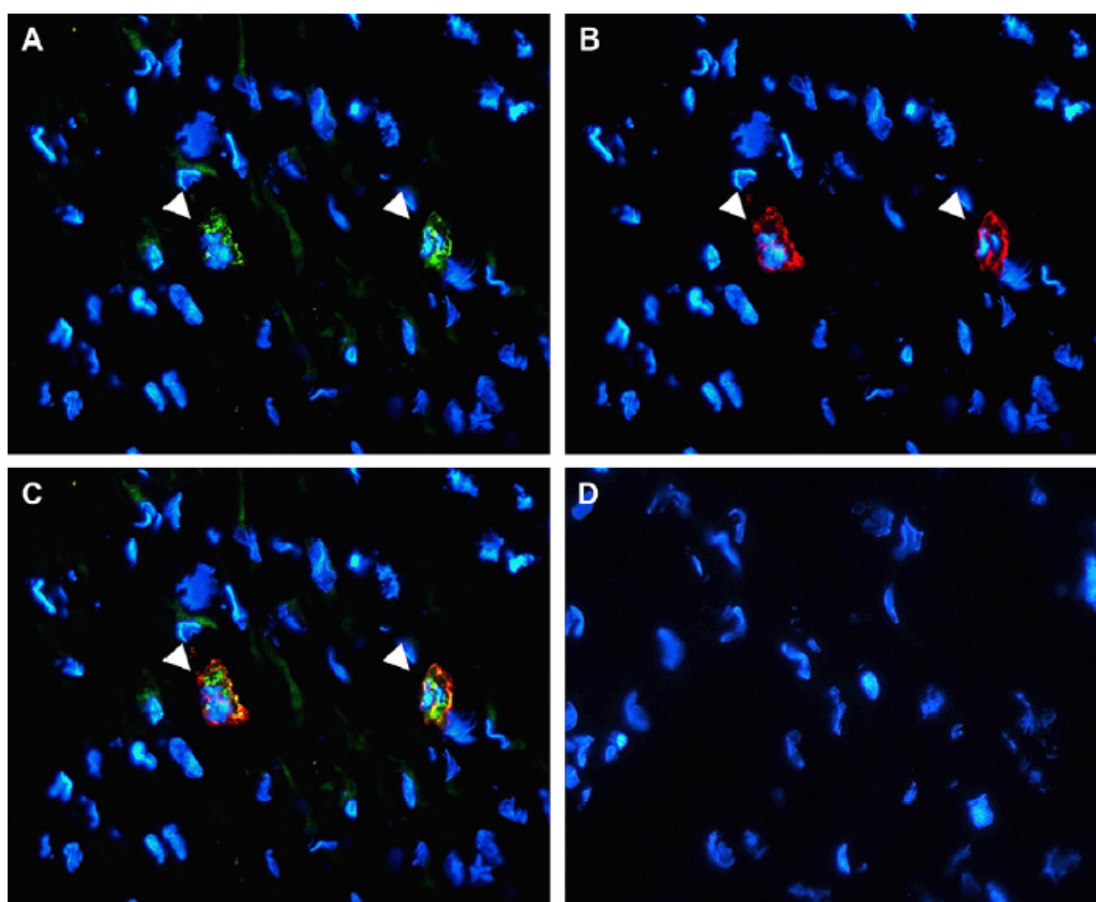
μονιμοποιημένους ιστούς πλακούντα 1ου τριμήνου. Το πεπτιδίο εντοπίστηκε σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς του πλακούντα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης, όπως αυτά αξιολογήθηκαν από την ένταση της χρώσης, ποικίλαν. Εντοπίστηκε αδύναμη χρώση στη συγκυτιοτροφοβλάστη, ενώ η κυτταροτροφοβλάστη ήταν ισχυρά θετική (**Εικόνα 7A, B**). Τα κύτταρα ΕΛΤ έδειξαν έντονη χρώση για την UCN σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (**Εικόνα 7B, C**). Τα φθαρτικά κύτταρα παρουσίαζαν σποραδικά έκφραση του μορίου (**Εικόνα 7C**). Η μη ειδική χρώση αποκλείστηκε με την παράλειψη του πρωτοταγούς αντισώματος (**Εικόνα 7D**).



Εικόνα 7. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της UCN στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου. A, B: Το πεπτιδίο εκφράζεται έντονα στην κυτταροτροφοβλάστη και την ΕΛΤ των ελεύθερων λαχνών και ασθενώς στην εξωτερική στιβάδα κυττάρων που σχηματίζεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη (x400). C: Το πεπτιδίο εκφράζεται έντονα στην διάμεση ΕΛΤ που εντοπίζεται σε μια καθηλωμένη λάχνη καθώς και στον φθαρτό, (x200). D: Αρνητικό κοντρόλ (παράλειψη πρώτου αντισώματος) (x400). CT: κυτταροτροφοβλάστη, EVT: ΕΛΤ, decidua: φθαρτός.

Για να επιβεβαιωθεί η έκφραση του πεπτιδίου στην ΕΛΤ, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις διπλού φθορισμού σε παγωμένες τομές πλακούντα

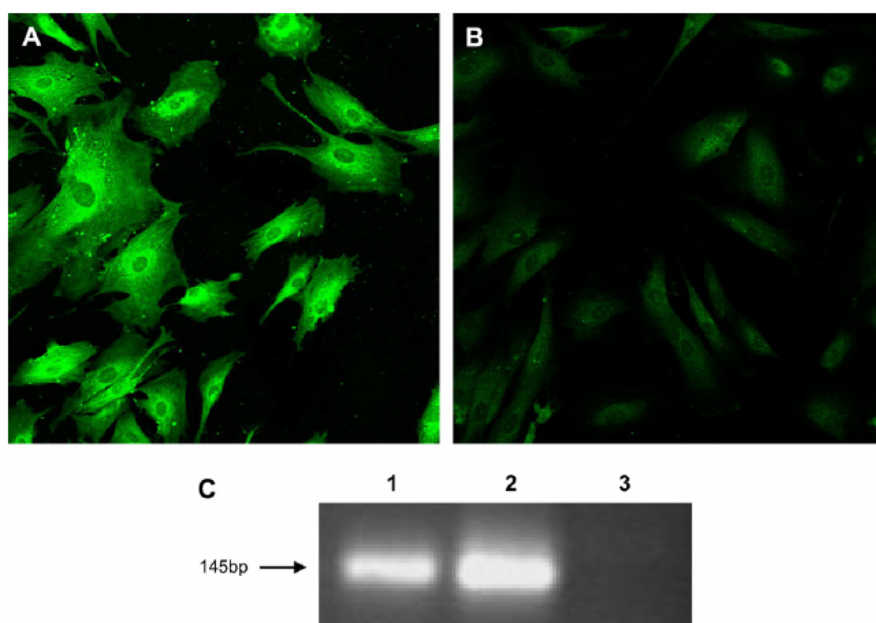
1ου τριμήνου. Χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 ενός δείκτη ειδικού για κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης. Το πεπτίδιο αυτό εκφράζεται στη κυτταροτροφοβλάστη των λαχνών, ενώ στο φθαρτό χαρακτηρίζει την ΕΛΤ καθώς και τα επιθηλιακά κύτταρα των ενδομήτριων αδένων. Τα τελευταία διακρίνονται εύκολα από τα κύτταρα ΕΛΤ λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας και διάταξής τους. Τα κύτταρα στις περιοχές του φθαρτού τα οποία ήταν θετικά και για τις δύο χρώσεις αναγνωρίστηκαν ως κύτταρα ΕΛΤ περιέχοντα το πεπτίδιο της UCN (κεφαλές βελών) (**Εικόνα 8A-C**). Η μη ειδική χρώση αποκλείστηκε με την παράλειψη του πρωτοταγούς αντισώματος (**Εικόνα 8D**).



Εικόνα 9. Χρώση διπλού ανοσοφθορισμού με αντισώματα κατά της UCN και της κυτοκερατίνης-7 σε πλακούντα 1ου τριμήνου. Ο πράσινος φθορισμός αποκαλύπτει την έκφραση της urocortin στη θέση εμφύτευσης (A), ενώ τα θετικά για κυτταροκερατίνη κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα (B). Κύτταρα με διπλή χρώση είναι ΕΛΤ που εκφράζουν και τα δύο πεπτίδια (C) (κεφαλές βελών). (D) Αρνητικό κοντρόλ (παράλειψη των πρωτοταγών αντισωμάτων) (μεγέθυνση: x400).

4.2.2. Το πεπτιδίο και mRNA της UCN εκφράζονται σε απομονωμένους ΕΛΤ.

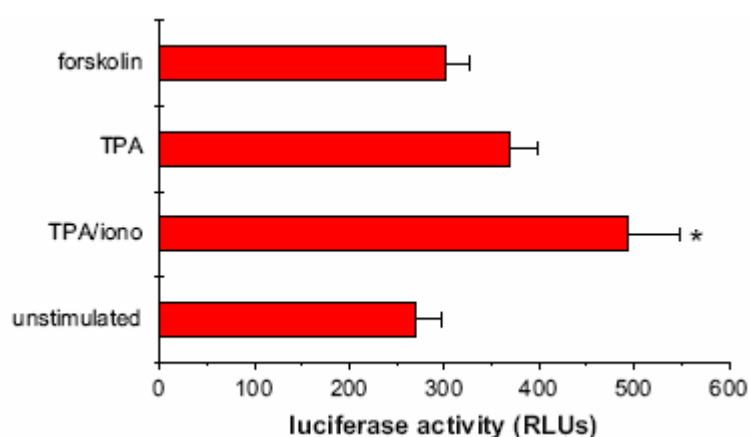
Η έκφραση του πεπτιδίου και mRNA της UCN μελετήθηκαν τέλος σε απομονωμένα κύτταρα ΕΛΤ. Τα κύτταρα απομονώθηκαν από πλακούντες 1ου τριμήνου και ετέθησαν σε καλλιέργεια. Το πεπτιδίο εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των ΕΛΤ με ανοσοφθορισμό (εικόνα 9Α). Η μη ειδική χρώση αποκλείστηκε με την παράλειψη του πρωτοταγούς αντισώματος (Εικόνα 9Β). Η έκφραση του γονιδίου στα ίδια κύτταρα διαπιστώθηκε με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ενισχύοντας το cDNA των κυττάρων με τους κατάλληλους εκκινητές, προέκυψε μία ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους (145 bp) (Εικόνα 9C, στήλες 1 και 2 αντίστοιχα).



Εικόνα 9. Έμμεσος ανοσοφθορισμός (A, B) και RT-PCR (C), που δείχνουν την έκφραση του πεπτιδίου και του mRNA της UCN αντίστοιχα σε απομονωμένα κύτταρα ΕΛΤ. A: Εικόνα μονιμοποιημένων ανθρώπινων κυττάρων ΕΛΤ χρωσμένα με φθορισμό (FITC) για την UCN. B: Εικόνα αρνητικού κοντρούλ (παράλειψη πρωτοταγούς αντισώματος) (μεγέθυνση x600). C: Στήλη 1 = ΕΛΤ, στήλη 2 = πλακούντας 1ου τριμήνου (θετικό κοντρούλ), στήλη 3 = αρνητικό κοντρούλ (-RT).

4.2.3. Ο υποκινητής της urocortin ενεργοποιείται από την TPA/ιονομυκίνη.

Μελετήθηκε η συμμετοχή δύο σημαντικών μονοπατιών μεταγωγής ενδοκυττάρων σημάτων, του cAMP/PKA και του diacylglycerol/PKC, στη ρύθμιση του υποκινητή της UCN σε κύτταρα πλακουντιακής προέλευσης (JEG3). Οι TPA ή φορσκολίνη από μόνες τους δε μπορούσαν να ενεργοποιήσουν το γονίδιο αναφοράς UCN-λουσιφεράσης (**Εικόνα 10**). Αντίθετα, η συνδυασμένη δράση των TPA/ιονομυκίνη είχαν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της δράσης του υποκινητή της UCN κατά 1.83 φορές.



Εικόνα 10. Ρύθμιση του υποκινητή της ανθρώπινης UCN στα JEG3 κύτταρα χοριοκαρκινώματος. Επώαση με TPA/ιονομυκίνη είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή της UCN κατά 1.83 φορές (n=3, *P < 0.05). unstimulated: κύτταρα χωρίς την επίδραση οποιουδήποτε παράγοντα.

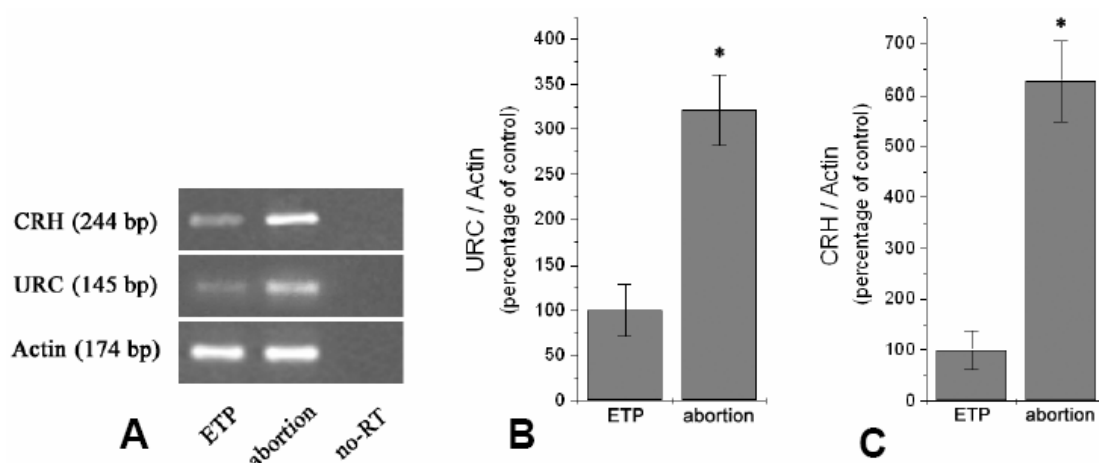
4.3. Οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση CRF και UCN στη θέση εμφύτευσης, αυξημένη έκφραση FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού και απόπτωση των ΕΛΤ.

4.3.1. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη έκφραση των CRF και UCN στο εμβryo-μητρικό όριο.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση των νευροπεπτιδίων CRF και UCN με τις αυτόματες αποβολές και ο πιθανός ρόλος των μορίων αυτών στους

μηχανισμούς που ενέχονται στη παθοφυσιολογία των αποβολών. Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των CRF και UCN στις αυτόματες αποβολές 1ου τριμήνου σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς της ίδιας ηλικίας οι οποίοι λήφθηκαν από επιλεκτικές διακοπές κύησης.

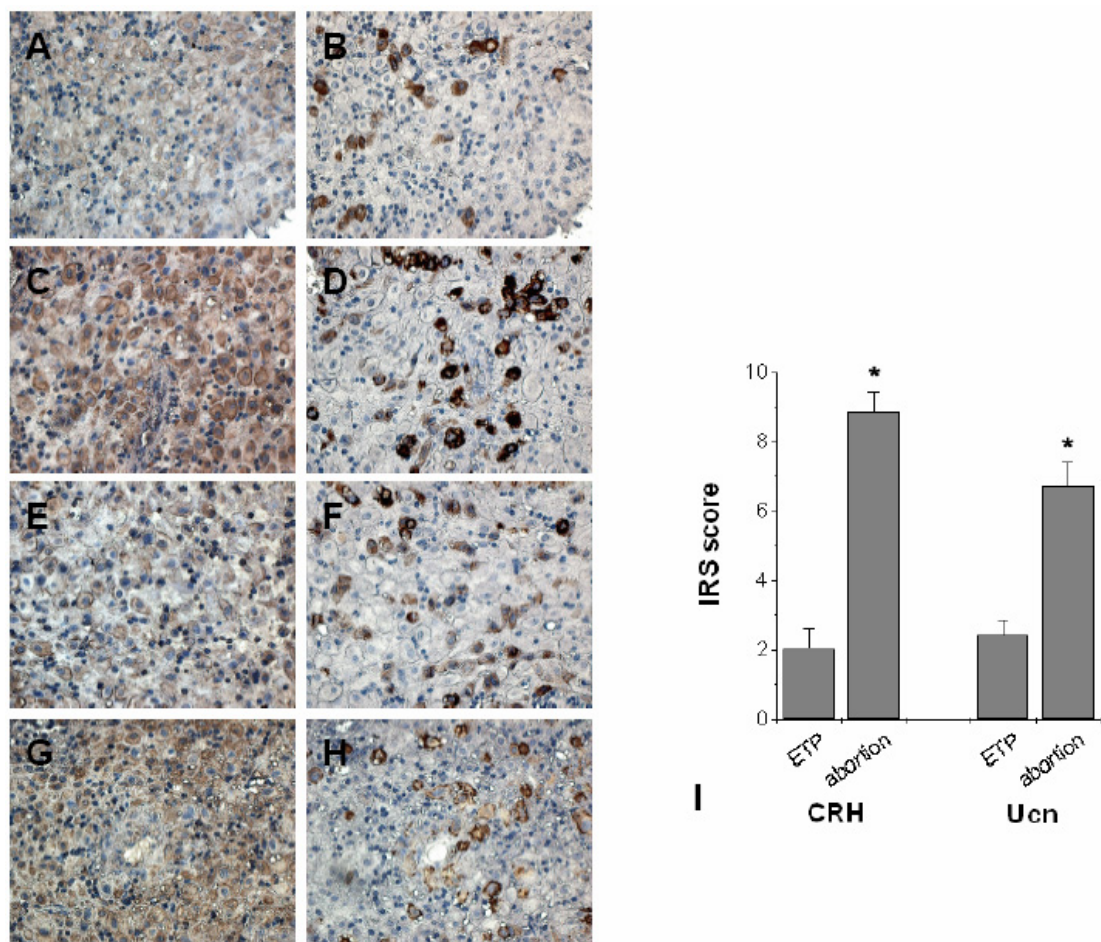
Έγινε ημι-ποσοτική σύγκριση των επιπέδων των μεταγραφημάτων με τη χρήση RT-PCR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA από πλακούντες αποβολών (n=11) και διακοπές κύησης (n=11). Η ένταση των ζωνών που προέκυψαν (244bp για το CRF και 145bp για τη UCN) κανονικοποιήθηκε έναντι της ακτίνης (174bp). Διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων των μεταγραφημάτων CRF και UCN κατά 6.2 και 3.4 φορές αντίστοιχα στις αποβολές σε σχέση με τις διακοπές κύησης (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Έκφραση των mRNA των CRF και UCN σε πλακούντες από αποβολές και διακοπές κύησης. A: RT-PCR για τα CRF, UCN, και ακτίνη σε πλακουντιακό ολικό mRNA. B, C: Ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγραφημάτων. Η ένταση των ζωνών κανονικοποιήθηκε ως προς την ακτίνη. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (επι τοις εκατό των συνθηκών αναφοράς / διακοπή κύησης) (*, $p < 0.05$). ETP: επιλεκτική διακοπή κύησης (elective termination of pregnancy), abortion: αυτόματες αποβολές.

Έπειτα τέθηκε το ερώτημα εάν τα αυξημένα επίπεδα των μεταγραφημάτων αντιστοιχούσαν σε αυξημένα επίπεδα πεπτιδίων καθώς και η θέση των παραγόμενων πεπτιδίων. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημεία σε περιοχές εμφύτευσης από αποβολές (n=8) και διακοπές κύησης (n=8). Οι περιοχές αυτές αναγνωρίστηκαν με τη χρώση σειριακών τομών με αντίσωμα κατά της

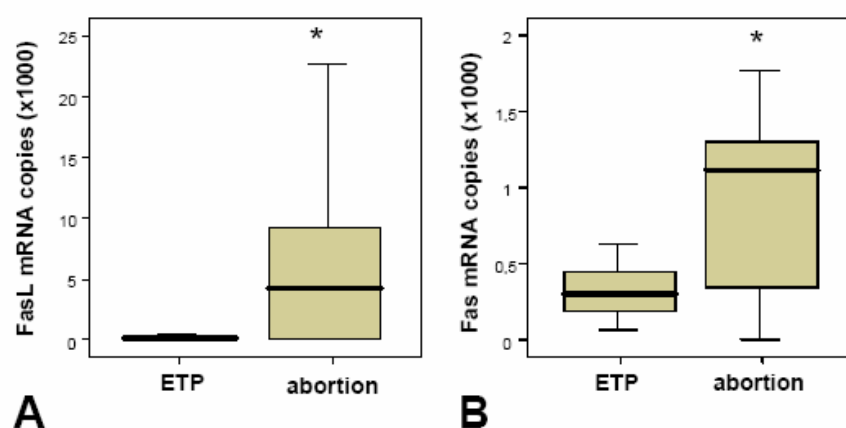
κυτταροκερατίνης-7, γεγονός που επέτρεψε τον εντοπισμό κυττάρων ΕΛΤ μέσα στο φθαρτό (εικόνα 12B, D, F, H). Η ένταση της χρώσης εκτιμήθηκε με την ημιποσοτική μέθοδο IRS. Διαπιστώθηκε αύξηση του δείκτη IRS κατά 4.3 φορές για το CRF (εικόνα 12A, C, I) και 2.8 για τη UCN (εικόνα 12E, G, I) στις αποβολές συγκριτικά με τις διακοπές κύησης.



Εικόνα 12. Έκφραση των πεπτιδίων CRF και UCN σε πλακούντες από αποβολές και διακοπές κύησης. A-H: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την έκφραση των πλακουντιακών CRF (A, C), UCN (E, G) και κυτταροκερατίνης-7 στις αντίστοιχες σειριακές τομές (B, D, F, H). Οι ιστοί προήλθαν από διακοπές κύησης (A, B, E, F) (n=8) και αυτόματων αποβολών (C, D, G, H) (n=8) (x400). I: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (*, $p < 0.05$).

4.3.2. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα των μεταγραφημάτων των πλακουντιακών FasL και Fas.

Τα επίπεδα του mRNA των FasL και Fas στον πλακούντα εκτιμήθηκαν με real time PCR. Χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA από ομογενοποιημένα πλακούντα προερχόμενου από αποβολές (n=11) και διακοπές κύησης (n=11). Στους πλακούντες των αποβολών ο μέσος όρος των μεταγραφημάτων των FasL και Fas ήταν αντίστοιχα 19 και 2.8 φορές υψηλότερα σε σχέση με τις διακοπές κύησης (εικόνα 13A, B).

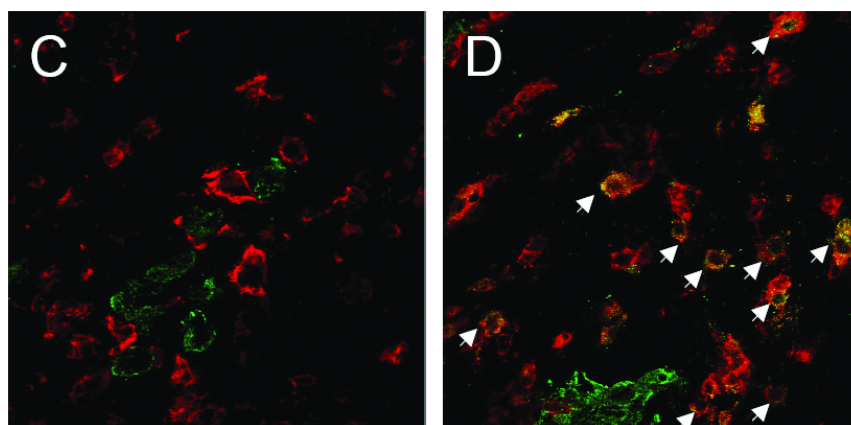


Εικόνα 13. Έκφραση των mRNA των FasL και Fas στον πλακούντα. A, B: Διαγράμματα box-plot των απόλυτων αριθμών των μεταγραφημάτων του FasL (A) και του Fas (B) σε διακοπές κύησης (n=11) και αυτόματες αποβολές (n=11). Τα παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν το εύρος τιμών μεταξύ της 25ης και 75ης εκατοστιαίας θέσης και η οριζόντια γραμμή τον μέσο όρο. Οι γραμμές που εκτείνονται πέρα των πλαισίων ορίζουν την 5η και 95η εκατοστιαία θέση (*, p<0.05).

4.3.3. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με την εμφάνιση του FasL πεπτιδίου στα φθαρτικά λευκοκύτταρα καθώς και με αυξημένη έκφραση του Fas πεπτιδίου στα κύτταρα ΕΛΤ.

Για τη μελέτη της έκφρασης των FasL και Fas πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν διπλός ανοσοφθορισμός και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Αρχικά χρώστηκαν σειριακές τομές του πλακουντιακού υλικού με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 ώστε να αναγνωριστούν και να επιλεγούν οι τομές εκείνες οι οποίες περιείχαν

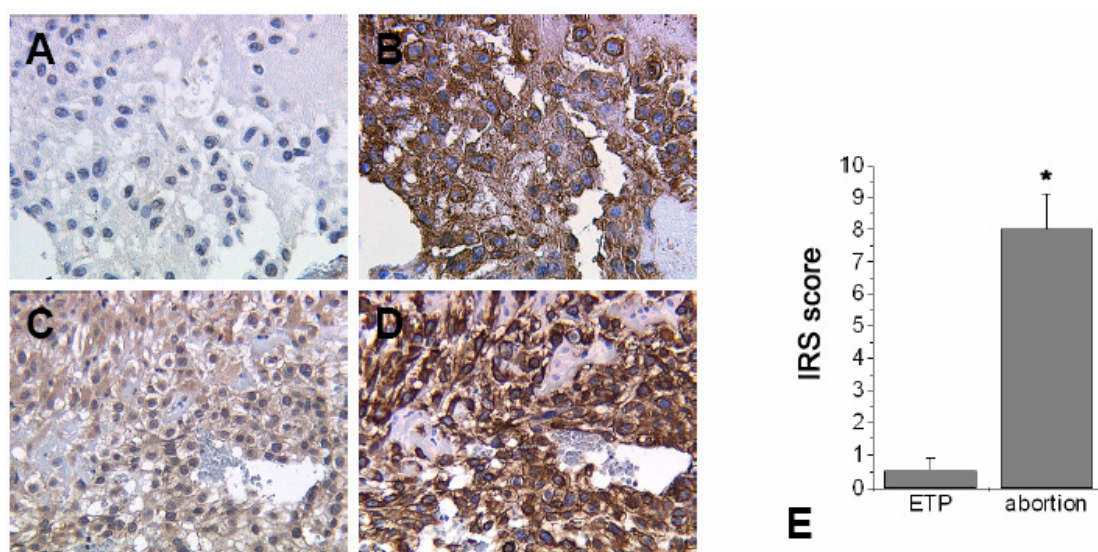
φθαρτικό ιστό και διεισδυτική ΕΛΤ. Στον φθαρτικό ιστό από διακοπές κήσεως (n=8) το FasL πεπτίδιο εντοπίστηκε μόνο στα κύτταρα ΕΛΤ (**εικόνα 14Α**). Αντίθετα, σε όλα τα δείγματα αποβολών (n=8) εμφανίστηκε ένας δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός μέσα στο φθαρτό θετικός για το πεπτίδιο. Αυτά τα κύτταρα αναγνωρίστηκαν ως φθαρτικά λευκοκύτταρα εκφράζοντα FasL, με τη χρήση ενός δεύτερου αντισώματος κατά του ειδικού λευκοκυτταρικού δείκτη CD45 (**εικόνα 14Β**). Συγκεκριμένα, στα δείγματα που εξετάστηκαν, το ποσοστό των FasL-θετικών λευκοκυττάρων στον συνολικό φθαρτικό λευκοκυτταρικό πληθυσμό κυμαινόταν από 0.4%-1.1% στους φυσιολογικούς πλακούντες και από 30.6%-41.1% στους πλακούντες αποβολών. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην ένταση του φθορισμού για το FasL στην ΕΛΤ μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων.



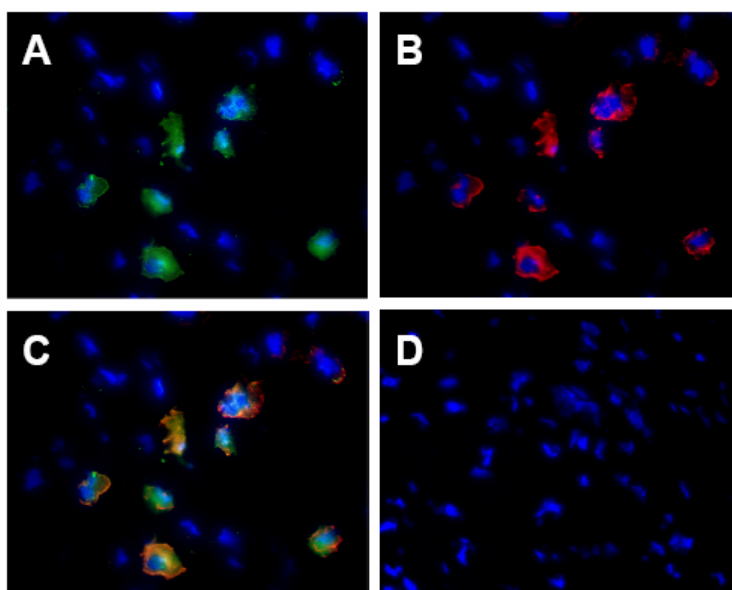
Εικόνα 14. Έκφραση του πεπτιδίου FasL στα φθαρτικά λευκοκύτταρα. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες με μικροσκόπιο συνεστίασης από δείγματα φθαρτού από διακοπές κήσεως (n=8) (C) και αποβολές (n=8) (D). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατά του FasL (πράσινος φθορισμός) και του λευκοκυτταρικού δείκτη CD45 (κόκκινος φθορισμός). Τα φθαρτικά λευκοκύτταρα που εκφράζουν FasL χρωματίζονται κίτρινα και είναι παρόντα μόνο στις αποβολές (x400).

Δεδομένης της έκφρασης FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού στις αποβολές, εξετάστηκε εάν τα κύτταρα ΕΛΤ εκφράζουν το FasL πεπτίδιο για να διαπιστωθεί εάν είναι δυνατό να υποστούν απόπτωση επαγόμενη από το FasL των πρώτων. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη σε φθαρτούς διακοπών κήσεως (n=8) και αποβολών (n=8). Στην πρώτη περίπτωση, λίγα ΕΛΤ κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν αδύναμα το πεπτίδιο (**εικόνα 15Α**). Αντίθετα στις αποβολές

η πλειοψηφία των κυττάρων ΕΛΤ ήταν θετική για το πεπτιδίον του υποδοχέα Fas (εικόνα 15C). Τα κύτταρα ΕΛΤ μέσα στο φθαρτό χαρακτηρίστηκαν με τη χρώση σειριακών τομών με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (εικόνα 15B, D). Τα επίπεδα έκφρασης εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Ο δείκτης παρουσίασε αύξηση στις αποβολές κατά 16 φορές σε σχέση με τις διακοπές κύησης (εικόνα 15E). Η έκφραση του υποδοχέα Fas στα κύτταρα ΕΛΤ στις αποβολές επιβεβαιώθηκε επιπλέον με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού σε παγωμένους ιστούς (εικόνα 16).



Εικόνα 15. A-D: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του πεπτιδίου Fas στην ΕΛΤ. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του Fas (A, C) και της κυτταροκερατίνης-7 (B, D) σε σειριακές τομές από διακοπές κύησης (A, B) και αποβολές (C, D). Λίγα μόνο κύτταρα ΕΛΤ βρέθηκαν να εκφράζουν το Fas πεπτιδίον φυσιολογικά στον φθαρτό 1ου τριμήνου, ενώ τα περισσότερα από αυτά ήταν θετικά για το πεπτιδίον στις περιπτώσεις των αποβολών (x200). E: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (*, $p < 0.05$).

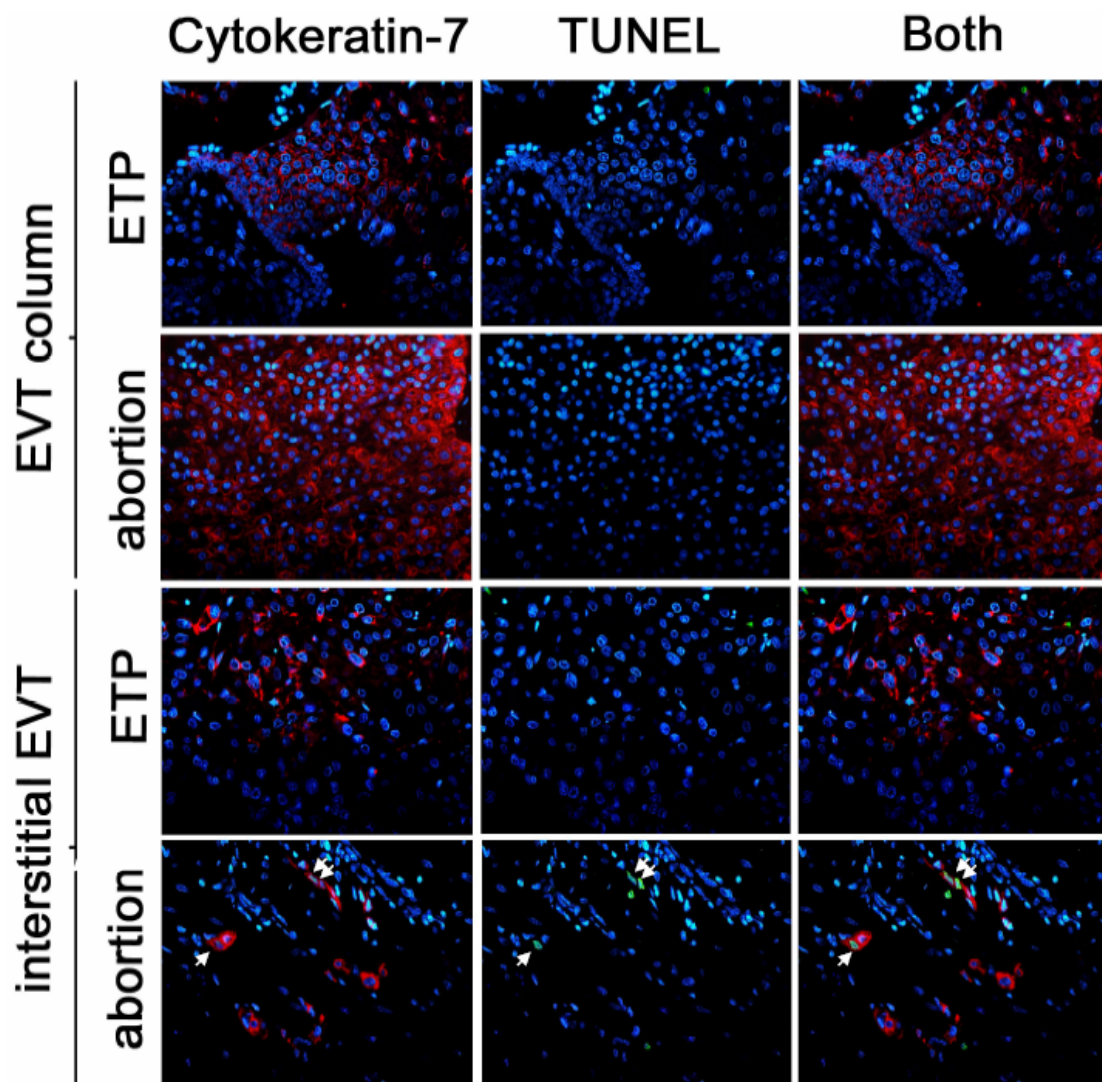


Εικόνα 16. A-D: Έκφραση του πεπτιδίου Fas στην ΕΛΤ με διπλό ανοσοφθορισμό. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της έκφρασης του Fas (Α, πράσινος φθορισμός) και της κυτταροκερατίνης-7 (Β, κόκκινος φθορισμός) σε τομές από αποβολές. Τα κύτταρα που εκφράζουν και τα δύο πεπτίδια αναγνωρίζονται ως ΕΛΤ (C). Η απουσία μη ειδικής δέσμευσης διαπιστώθηκε με τη παράλειψη του πρωτοταγούς αντισώματος (D) (x400).

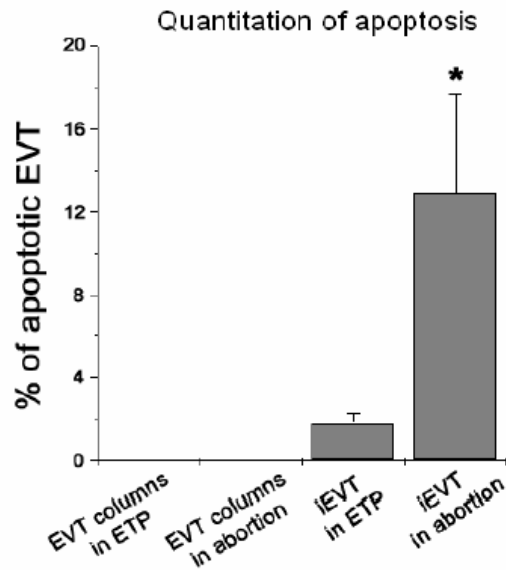
4.3.4. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση της διάμεσης ΕΛΤ.

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν τα αυξημένα επίπεδα του FasL στα λευκοκύτταρα και του Fas στην ΕΛΤ στις αποβολές συνοδεύονται από επίσης αυξημένα επίπεδα απόπτωσης της ΕΛΤ. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες φθορισμού σε τομές παραφίνης από διακοπές κήσεως (n=8) και αποβολές (n=8). Εφαρμόστηκαν δύο από τις πλέον κοινές μεθόδους για την εκτίμηση της απόπτωσης, οι μέθοδοι TUNEL (εικόνες 16, 17) και M30 (εικόνες 18, 19), ενώ για να αναγνωριστούν τα κύτταρα ΕΛΤ έγινε διπλός φθορισμός με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους δεν διέφεραν σημαντικά. Στις διακοπές κήσεως εντοπίστηκαν διάσπαρτα στο φθαρτό λίγοι αποπτωτικοί διάμεσοι ΕΛΤ (<2% επί του συνολικού αριθμού διάμεσων ΕΛΤ που μετρήθηκαν) (εικόνες 16, 17, 18, 19). Επίσης παρατηρήθηκε ένα πολύ μικρό ποσοστό αρνητικών για την κυτταροκερατίνη-7 αποπτωτικών κυττάρων με διάσπαρτη κατανομή μέσα στο φθαρτικό ιστό και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Στις

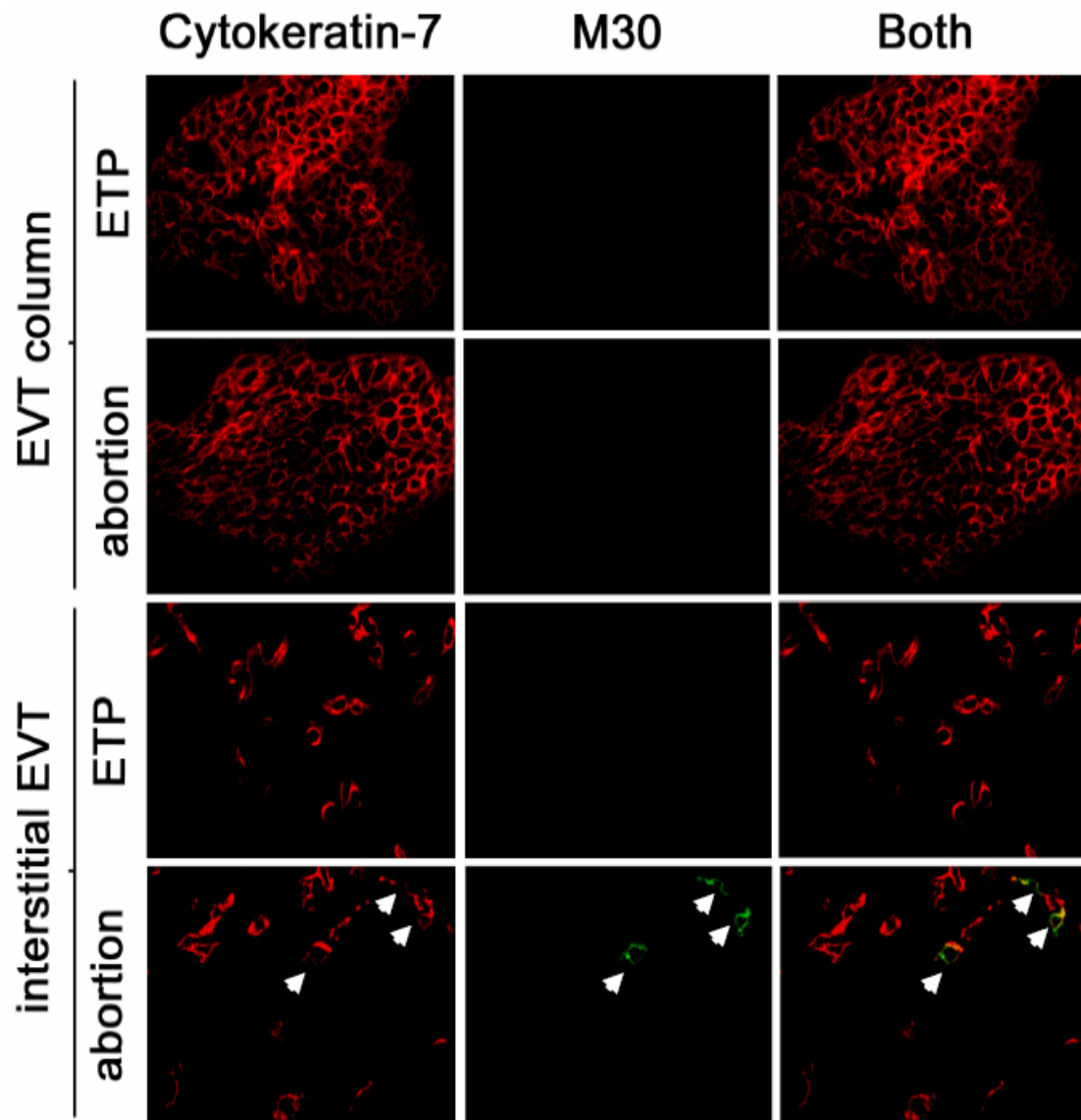
αποβολές εντοπίστηκε αυξημένο ποσοστό αποπτωτικών διάμεσων ΕΛΤ διάσπαρτων στον φθαρτό (12.9±4.8% στη μέθοδο TUNEL και 13.7±2.9% στη μέθοδο M30). Σε ορισμένους ιστούς εντοπίστηκαν κολώνες τροφοβλαστικών κυττάρων. Στις περιοχές αυτές δεν εντοπίστηκαν αποπτωτικά κύτταρα ΕΛΤ σε καμία από τις δύο ομάδες δειγμάτων (εικόνες 16, 17, 18, 19).



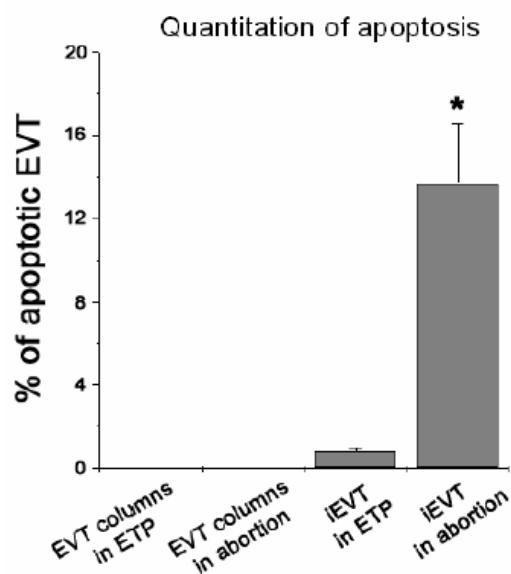
Εικόνα 16. Εντοπισμός αποπτωτικών κυττάρων ΕΛΤ με TUNEL. Έγινε διπλός φθορισμός με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (cytokeratin-7, κόκκινος φθορισμός) και TUNEL (πράσινος φθορισμός) σε τροφοβλαστικές κολώνες (EVT column) και διάμεσο τροφοβλαστικό ιστό (interstitial EVT) σε πλακούντες από διακοπές κύησης (ETP) και αποβολές (abortion). Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν τα αποπτωτικά κύτταρα ΕΛΤ (x400).



Εικόνα 17. Ποσοτικοποίηση της απόπτωσης στους ΕΛΤ με τη μέθοδο TUNEL. Κανένας αποπτωτικός πυρήνας δεν εντοπίστηκε μέσα στις τροφοβλαστικές κολώνες στις διακοπές κυήσεως (EVT columns in ETP) ή στις αποβολές (EVT columns in abortion). Στην πρώτη ομάδα λιγότερο από 2% των διάμεσων τροφοβλαστών ήταν αποπτωτικοί, ενώ στις αποβολές το αντίστοιχο ποσοστό ανερχόταν στο 12.9±4.8%. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± SE (*, $p < 0.05$).



Εικόνα 18. Εντοπισμός αποπτωτικών κυττάρων ΕΛΤ με M30. Έγινε διπλός φθορισμός με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (cytokeratin-7, κόκκινος φθορισμός) και αντίσωμα M30 (πράσινος φθορισμός) σε τροφοβλαστικές κολώνες (EVT column) και διάμεσο τροφοβλαστικό ιστό (interstitial EVT) σε πλακούντες από διακοπές κύησης (ETP) και αποβολές (abortion). Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν τα αποπτωτικά κύτταρα ΕΛΤ (x400).

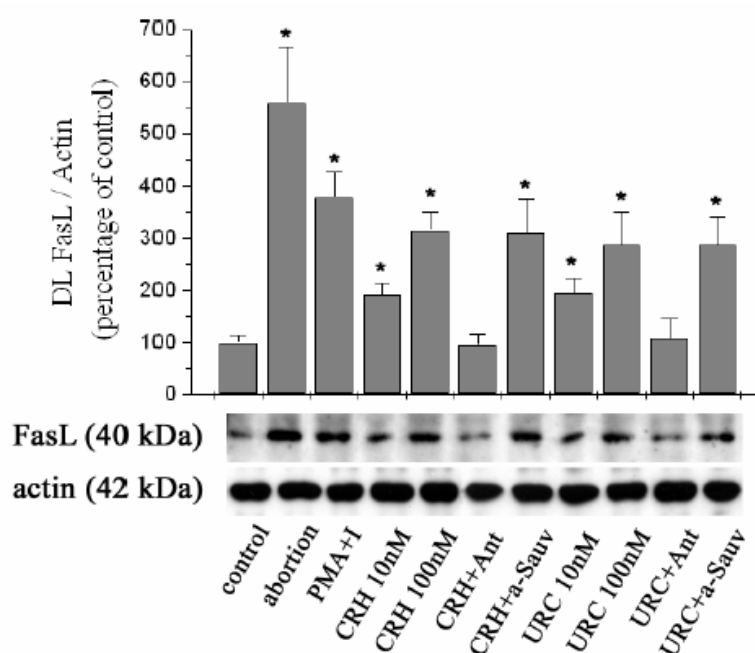


Εικόνα 19. Ποσοτικοποίηση της απόπτωσης στους ΕΛΤ με τη μέθοδο M30. Κανένα αποπτωτικό κύτταρο δεν εντοπίστηκε μέσα στις τροφοβλαστικές κολώνες στις διακοπές κυήσεως (EVT columns in ETP) ή στις αποβολές (EVT columns in abortion). Στην πρώτη ομάδα λιγότερο από 2% των διάμεσων τροφοβλαστών ήταν αποπτωτικοί, ενώ στις αποβολές το αντίστοιχο ποσοστό ανερχόταν στο 13.7±2.9%. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± SE (*, p<0.05).

4.3.5. Τα πεπτίδια CRF και UCN επάγουν την έκφραση του FasL σε φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονωμένα από πλακούντες από διακοπές κυήσεως μέσω του CRFR1.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα CRF και UCN που παρατηρούνται στις αποβολές ενεργοποιούν τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα για να εκφράσουν FasL και να προκαλέσουν απόπτωση στους ΕΛΤ. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοτύπωσης (**εικόνα 20**) και κυτταρομετρίας ροής (**εικόνα 21**). Μετά από επώαση 24 ωρών με 10ng/ml PMA και 1μg/ml ιονομυκίνης τα επίπεδα του πεπτιδίου FasL στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα αυξήθηκαν σημαντικά. Λεμφοκύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από διακοπές κυήσεως και κρατήθηκαν για 24 ώρες σε καλλιέργεια χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα αναφοράς (control). Τα κύτταρα αυτά μελετήθηκαν ως προς την έκφραση FasL παράλληλα με τα κύτταρα τα οποία υπέστησαν τις διάφορες επώσεις και τα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από αποβολές (**εικόνες 20, 21**). Η ένταση της ζώνης των 40kDa, η

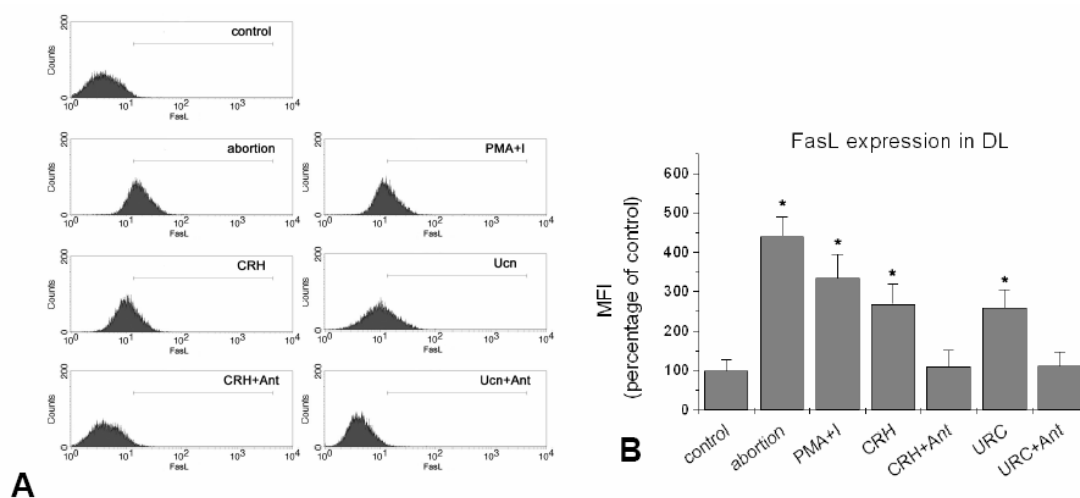
οποία αντιστοιχεί στη μεμβρανική μορφή του πεπτιδίου FasL, κανονικοποιήθηκε έναντι της ακτίνης. Τα δύο νευροπεπτιδία CRF και UCN σε συγκεντρώσεις 10nM ή 100nM έπειτα από 24 ώρες επώασης, προκάλεσαν σημαντική αύξηση της έκφρασης του FasL σε λεμφοκύτταρα απομονωμένα από διακοπές κύησης (n=4) σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς. Διαμεσολαβητής του φαινομένου αυτού ήταν ο CRFR1 αφού η προσθήκη της ανταλαρμίνης σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη εκείνης των πεπτιδίων, αναιρέσει τη δράση τους. Αντίθετα η προσθήκη ενός ειδικού ανταγωνιστή του CRFR2, της anti-sauvagine, δεν είχε καμία επίδραση στη δράση των νευροπεπτιδίων (εικόνα 20). Τα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από πλακούντες αποβολών (n=4) χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλυσης της έκφρασης του FasL αφού είχαν διατηρηθεί σε καλλιέργεια με πλήρες θρεπτικό υλικό για 24 ώρες και παράλληλα με τα λεμφοκύτταρα από τις διακοπές κύησης. Τα λεμφοκύτταρα των αποβολών βρέθηκαν να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα FasL σε σύγκριση με τα λεμφοκύτταρα από διακοπές κύησης τα οποία είχαν επωαστεί με CRF ή UCN όπως περιγράφεται ανωτέρω (εικόνα 20).



Εικόνα 20. Μελέτη με ανοσοτύπωση για την επίδραση των CRF και UCN στην έκφραση του πεπτιδίου FasL στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα. Τα απομονωμένα από φυσιολογικούς πλακούντες (ETP) λεμφοκύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα FasL (control), σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα από αποβολές (abortion). Τα πρώτα κύτταρα ενεργοποιούνται από τα PMA+I, CRF, UCN, αυξάνοντας σημαντικά την έκφραση του FasL μετά από 24 ώρες

επώασης. Οι εντάσεις των ζωνών κανονικοποιήθηκαν έναντι της ακτίνης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (επί τοις εκατό του control) \pm SE (*, $p < 0.05$). Ant: ανταλαρμίνη, a-Sauv: anti-sauvagine.

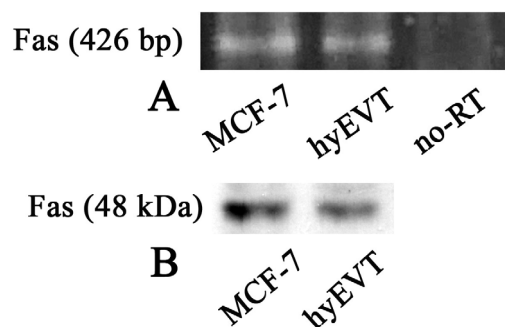
Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοτύπωσης επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα επίπεδα του FasL πεπτιδίου εκτιμήθηκαν με τον δείκτη της μέσης έντασης φθορισμού, MFI (mean fluorescent intensity). Επώαση των λεμφοκυττάρων φυσιολογικών πλακούντων με 100nM CRF ή UCN είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση του δείκτη MFI κατά 2.7 και 2.6 φορές αντίστοιχα συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς. Η προσθήκη 1μM ανταλαρμίνης (συγκέντρωση 10 φορές υψηλότερη εκείνης των νευροπεπτιδίων) ανέστρεψε πλήρως τη δράση των νευροπεπτιδίων. Ο δείκτης MFI για την έκφραση του FasL στα λεμφοκύτταρα από αποβολές ήταν 4.4 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, και κατά συνέπεια υψηλότερος επίσης από εκείνον των λεμφοκυττάρων φυσιολογικών πλακούντων που είχαν πρώτα επωαστεί με CRF ή UCN (**εικόνα 21**).



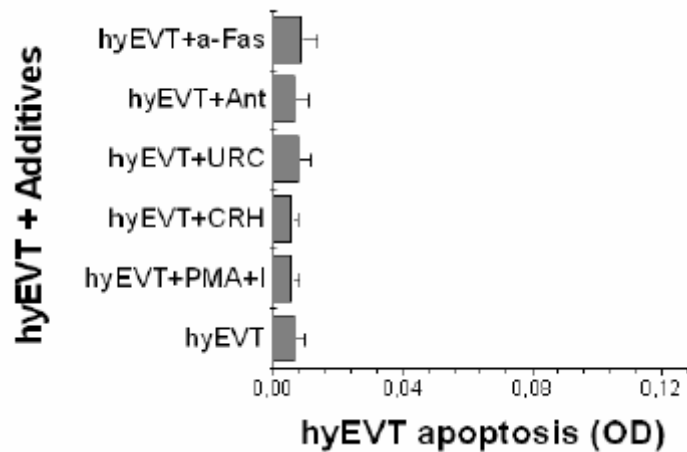
Εικόνα 21. A: Μελέτη με κυτταρομετρία ροής για την επίδραση των CRF και UCN στην έκφραση του πεπτιδίου FasL στα φαρτικά λεμφοκύτταρα. control: λεμφοκύτταρα απομονωμένα από διακοπές κύησης χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη, abortion: λεμφοκύτταρα απομονωμένα από αποβολές χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη. B: Ποσοτικοποίηση (χρήση του δείκτη MFI) της έκφρασης του FasL στα λεμφοκύτταρα από διακοπές κύησης (control), από αποβολές (abortion), και λεμφοκύτταρα από διακοπές κύησης μετά από επώαση με CRF ή UCN \pm ανταλαρμίνη. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (επί τοις εκατό του control) \pm SE (*, $p < 0.05$).

4.3.6. Τα πεπτίδια CRF και UCN ενισχύουν την ικανότητα των φαρμακών λεμφοκυττάρων από διακοπές κήσεως να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση των AC1M88 κυττάρων (hyEVT).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των λεμφοκυττάρων προερχόμενων από τις δύο ομάδες δειγμάτων να προκαλούν απόπτωση των ΕΛΤ. Επίσης μελετήθηκε η δράση των CRF και UCN στο φαινόμενο αυτό, δεδομένης της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν την έκφραση του FasL στα φαρμακά λεμφοκύτταρα όπως δείχθηκε ανωτέρω. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ΕΛΤ AC1M88 (αναφέρονται στις εικόνες ως hyEVT: hybridoma EVT), η οποία βρέθηκε να εκφράζει τον υποδοχέα Fas (**εικόνα 22**). Αρχικά εξετάστηκε η πιθανότητα τοξικής δράσης των διαφόρων χρησιμοποιούμενων ουσιών πάνω στα AC1M88. Εξετάστηκε με τη μέθοδο APOPercentage η απόπτωση των AC1M88 μετά από 32 ώρες επώαση με τα πρόσθετα μόρια (CRF, UCN, PMA+ιονομυκίνη, αντι-Fas αντίσωμα, ανταλαρμίνη). Διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε καμία τοξική δράση για τα μόρια αυτά πάνω στα AC1M88 κύτταρα (**εικόνα 23**).



Εικόνα 22. Μελέτη με RT-PCR (A) και ανοσοτύπωση (B) της έκφρασης του mRNA και του πεπτιδίου αντίστοιχα του υποδοχέα Fas στη κυτταρική σειρά AC1M88. Ως υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA από κύτταρα MCF-7, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα.



Εικόνα 23. Μελέτη με APOPercentage της απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων μετά από επώαση με CRF, UCN, PMA+ιονομυκίνη, ανταλαρμίνη (Ant) και αντι-Fas αντίσωμα (a-Fas). Κανένα από τα χρησιμοποιούμενα μόρια δεν προκάλεσε απόπτωση στη κυτταρική σειρά μετά από επώαση 24 ωρών. Η απόπτωση των AC1M88 ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο APOPercentage και εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD, optical density). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE πέντε διαφορετικών πειραμάτων.

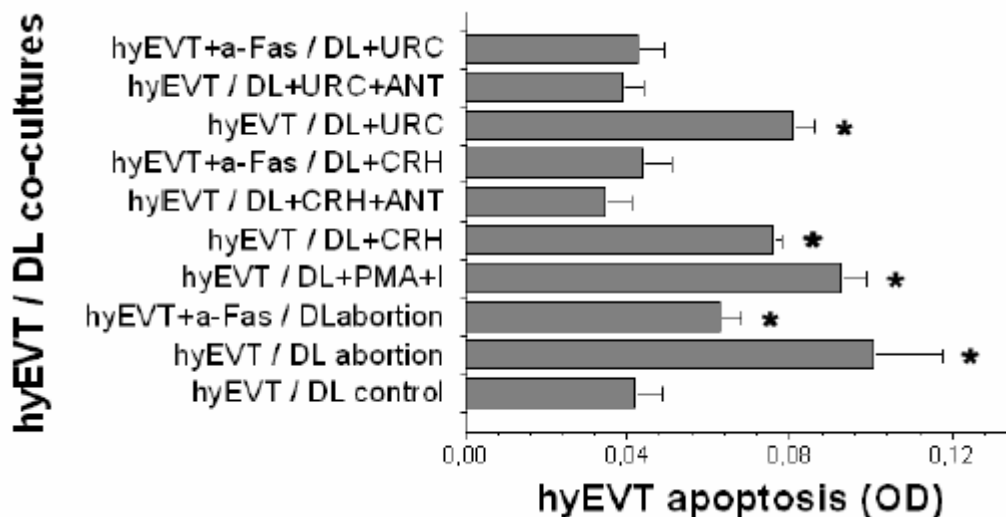
Ακολούθησε η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των φαρτικών λεμφοκυττάρων απέναντι στα AC1M88 κύτταρα καθώς και του πιθανού ρόλου των CRF και UCN. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι APOPercentage (**εικόνα 24**) και κυτταρομετρίας ροής με χρώση annexin-V/PI (**εικόνα 25**). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους ήταν παρόμοια για όλες τις συνθήκες. Μετά από 24 ώρες συν-καλλιέργειας με φαρτικά λεμφοκύτταρα από διακοπές κήσεως και χωρίς πρόσθετες ουσίες, τα AC1M88 κύτταρα παρουσίασαν απόπτωση στο $13,5 \pm 2,1\%$ του πληθυσμού τους. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν λεμφοκύτταρα τα οποία προέρχονταν από διακοπές κήσεως αλλά είχαν επιπρόσθετα επωασθεί με 100nM CRF ή UCN για 24 ώρες πριν την έναρξη της συν-καλλιέργειας. Η τελευταία έγινε παρουσία 100nM CRF ή UCN αντίστοιχα και διήρκησε 24 ώρες. Το ποσοστό απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων αυξήθηκε στο $25,8 \pm 2,2\%$ στην περίπτωση του CRF και $25,1 \pm 1,9\%$ για την UCN. Διαμεσολαβητής της δράσης αυτής των νευροπεπτιδίων ήταν ο CRFR1 καθώς η προσθήκη ανταλαρμίνης την ανέστρεψε πλήρως.

Έπειτα εξετάστηκε εάν η παρατηρούμενη απόπτωση των AC1M88 κυττάρων οφειλόταν στην ενεργοποίηση του Fas υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων. Για

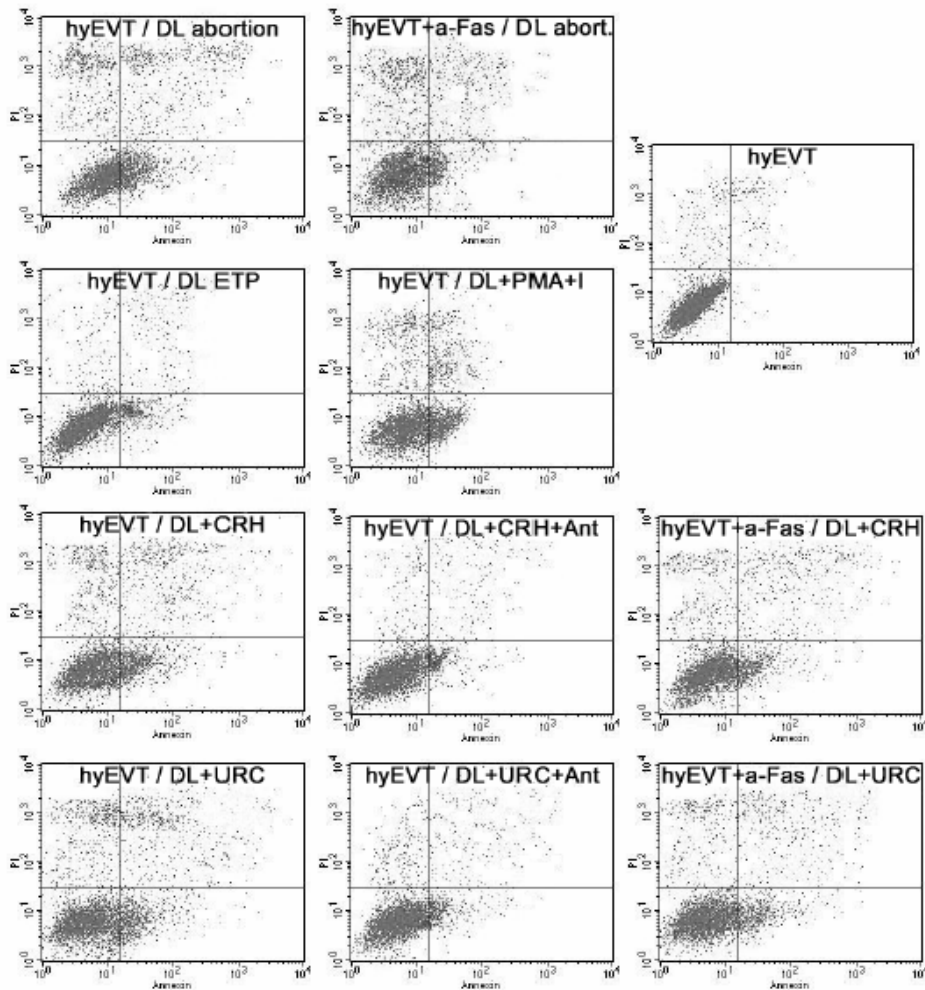
το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό αντι-Fas αντίσωμα το οποίο εμποδίζει την πρόσδεση του προσδέτη FasL στον υποδοχέα. Τα κύτταρα AC1M88 επώαστηκαν για 8 ώρες με 2μg/ml του αντι-Fas αντισώματος και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν με λεμφοκύτταρα από διακοπές κήσεως τα οποία είχαν προηγούμενα ενεργοποιηθεί με CRF ή UCN όπως περιγράφεται ανωτέρω. Τα κύτταρα κρατήθηκαν σε συν-καλλιέργεια για 24 ώρες παρουσία αντι-Fas και του αντίστοιχου νευροπεπτιδίου. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων στα επίπεδα που παρατηρούνταν μετά από συν-καλλιέργεια με μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα φυσιολογικών πλακούντων (διακοπές κήσεως) (εικόνες 24, 25).

4.3.7. Τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα που απομονώνονται από πλακούντες αποβολών επάγουν ισχυρά την απόπτωση των AC1M88 κυττάρων.

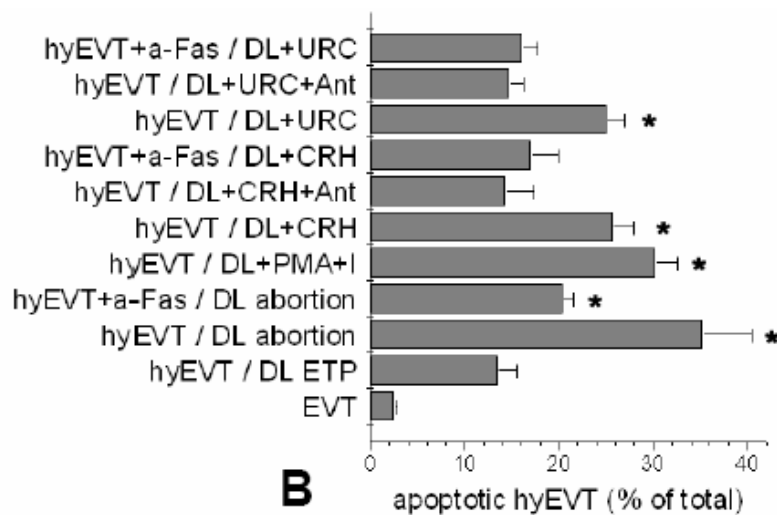
Τα λεμφοκύτταρα από πλακούντες αποβολών τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια με πλήρες θρεπτικό μέσο για 24 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν στα διάφορα πειράματα. Τα κύτταρα αυτά προκαλούσαν μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης στην κυτταρική σειρά AC1M88 μετά από 24 ώρες συν-καλλιέργειας ($35,2 \pm 5,2\%$) σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα με CRF ή UCN λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς πλακούντες. Το ποσοστό των αποπτωτικών AC1M88 μειώθηκε σημαντικά ($20,4 \pm 3,1\%$) με την προσθήκη 2μg/ml αντι-Fas σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε ανωτέρω για τα λεμφοκύτταρα φυσιολογικών πλακούντων (εικόνες 24, 25).



Εικόνα 24. Απόπτωση στα AC1M88 κύτταρα μετά από συν-καλλιέργεια με φαρτικά λεμφοκύτταρα. Κύτταρα AC1M88 ± 8 ώρες προ-επώαση με αντι-Fas (a-Fas) καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με λεμφοκύτταρα από διακοπές κήσεως ± πρόσθετα πεπτίδια/ανταγωνιστές (hyEVT ± a-Fas / DL ± additives). Τα φαρτικά λεμφοκύτταρα επώαστηκαν με τα αντίστοιχα πρόσθετα πεπτίδια/ανταγωνιστές για 24 ώρες πριν από τις συν-καλλιέργειες. Τα λεμφοκύτταρα από αποβολές καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 24 ώρες πριν από τις συν-καλλιέργειες. Η απόπτωση των AC1M88 ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο APOPercentage και εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD, optical density). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± SE τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων (*, $p < 0.05$).



A



B

Εικόνα 25: Απόπτωση στα AC1M88 κύτταρα μετά από συν-καλλιέργεια με φθαρτικά λεμφοκύτταρα. Α: Αντιπροσωπευτικά γραφήματα ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής κυττάρων AC1M88 χρωσμένων με annexin-V-FITC (άξονας «χ») και PI (άξονας «ψ») μετά από συν-

καλλιέργεια με φθαρτικά λεμφοκύτταρα κατά τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην εικόνα 23. Β: Ποσοτικοποίηση της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ο αποκλεισμός της Fas-επαγόμενης απόπτωσης που προκαλείται από λεμφοκύτταρα αποβολών στα AC1M88 κύτταρα, δεν απέκλεισε πλήρως την κυτταροτοξική δράση των πρώτων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων (*, $p < 0.05$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Γενικά

Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την εμφύτευση της βλαστοκύστης και την ακόλουθη ανάπτυξη του κυήματος στον άνθρωπο έχουν αποτελέσει τα τελευταία χρόνια πεδίο έντονου ενδιαφέροντος στη βασική έρευνα. Το έμβρυο είναι το προϊόν της διασταύρωσης δύο γενετικά διάφορων οργανισμών με αποτέλεσμα να αποτελεί για τη μητέρα ένα ημι-αλλομόσχευμα. Συνεπώς η κυοφορία θέτει το πρόβλημα της συνύπαρξης κατά τη διάρκεια της κύησης δύο γενετικά διαφορετικών οργανισμών, ενάντια στους ανοσολογικούς κανόνες που διέπουν την απόρριψη των αντιγονικά ασύμβατων ιστών. Το ερώτημα για το πώς επιτυγχάνεται αυτό διατυπώθηκε για πρώτη φορά στη κλασική δημοσίευση του Medawar το 1953: «πώς η έγκυος μητέρα κατορθώνει να θρέψει μέσα στο σώμα της για πολλές εβδομάδες ή μήνες ένα έμβρυο το οποίο είναι ένα αντιγονικά ξένο σώμα;» (Medawar PB, 1953). Έκτοτε έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στο τομέα της αναπαραγωγικής ανοσολογίας και ενδοκρινολογίας. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν σήμερα ότι καταστάσεις όπως η υπογονιμότητα, οι καθ' ἑξίν αποβολές, ο πρόωρος τοκετός, η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, το σύνδρομο HELLP, η προεκλαμψία είναι πιθανό να σχετίζονται με τοπικές ανοσολογικές ή/και ενδοκρινολογικές διαταραχές του μικροπεριβάλλοντος της μήτρας (Makrigiannakis et al, 2006; Sargent et al, 2006; Castracane et al, 2000). Η άποψη αυτή ενισχύεται από την καλά εδραιωμένη πλέον γνώση ότι το ενδομήτριο δεν είναι απλά ένα παθητικό όργανο-στόχος ορμονών, όπως πιστευόταν για πολλά χρόνια, αλλά διαθέτει αξιοσημείωτες εκκριτικές ιδιότητες καθώς παράγει μια πληθώρα κυττοκινών και ορμονών (Zoumakis et al, 1997).

Ένας από τους παράγοντες που οδήγησαν στο χαρακτηρισμό του ενδομητρίου σαν ένα περίπλοκο νευροενδοκρινικό όργανο, ήταν η εντόπιση σε αυτό των νευροπεπτιδίων CRF και UCN. Είναι γνωστό ότι τα πεπτίδια αυτά παράγονται και εκκρίνονται σε πληθώρα ιστών της περιφέρειας όπου εμπλέκονται στη ρύθμιση διάφορων διαδικασιών μεταξύ των οποίων και της ανοσολογικής απάντησης (Baigent et al, 2001). Ο βιολογικός ρόλος των «αναπαραγωγικών» CRF και UCN έχει αρχίσει να μελετάται και να προσδιορίζεται τα τελευταία χρόνια. Μέχρι στιγμής έχει αναγνωριστεί μια ποικιλία ρόλων που αφορούν κυρίως τη συμμετοχή ως παρακρινείς και αυτοκρινείς ρυθμιστές σημαντικών μηχανισμών της φυσιολογίας του ενδομητρίου, του πλακούντα και της κύησης γενικότερα (Florio et al, 2004; Kalantaridou et al, 2003).

Σκοπό της παρούσας διαδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων CRF και UCN στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης και της τροφοβλαστικής διείδυσης.

5.2. Ο CRF τροποποιεί τη διειδυτική ικανότητα της ΕΛΤ μέσω ρύθμισης της έκφρασης του μορίου CEACAM1

Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από μελέτες διειδυτικότητας με τη χρήση Matrigel υποδεικνύουν ότι ο CRF αναστέλλει τη διειδυτικότητα των ΕΛΤ. Η δράση αυτή του CRF διαμεσολαβείται ειδικά από τον υποδοχέα CRFR1, καθώς η προσθήκη ανταλαρμίνης, ενός ειδικού CRFR1 αναστολέα, την ανέστρεψε πλήρως. Η επώαση των τροφοβλαστών μόνο με ανταλαρμίνη αύξησε κατά ένα μέρος τη διειδυτικότητα των ΕΛΤ, γεγονός το οποίο πιθανόν οφείλεται στον αποκλεισμό της δράσης του παραγόμενου από τους τροφοβλάστες CRF. Επιπρόσθετα, η επίδραση του CRF στη διειδυτικότητα των τροφοβλαστών σχετίζεται άμεσα με την ελάττωση της έκφρασης του διασυνδετικού μορίου CEACAM1 στα κύτταρα αυτά.

Η διείδυση των κυττάρων ΕΛΤ μέχρι το κατάλληλο επίπεδο μέσα στη μήτρα είναι σημαντική για την ομαλή έκβαση της εγκυμοσύνης. Υπέρμετρη διείδυση μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογική προσκόλληση του πλακούντα στο μυομήτριο (η κατάσταση αυτή ονομάζεται στριφός πλακούντας, placenta accreta), στην επέκταση του πλακούντα μέσα στο μυομήτριο (placenta increta), ή στη διείδυση μέσω του μυομητρίου στον βλεννογόνο της μήτρας ή ακόμα και σε παρακείμενα όργανα (placenta percreta). Διαταραχή στη διείδυση της τροφοβλάστης έχει επίσης ενοχοποιηθεί στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Στη κατάσταση αυτή, το χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό γνώρισμα είναι το αποτέλεσμα της περιορισμένης διάμεσης και ενδαγγειακής διείδυσης των τροφοβλαστών (Brosens et al, 1977; Meekins et al, 1994).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα του CRF στο μητρικό πλάσμα έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα σε περιπτώσεις προεκλαμψίας, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα CRFR1 (Karteris et al, 2003; Perkins et al, 1995). Αν και το αίτιο αυτής της αύξησης είναι άγνωστο, έχει προταθεί ότι διαταραχές στη λειτουργία του CRF/CRFR1 συστήματος μπορεί να ενέχονται στη παθοφυσιολογία της πλακουντιακής ισχαιμίας που χαρακτηρίζει την

προεκλαμψία (Karteris et al, 2005). Τα ευρήματά της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν έναν επιπρόσθετο πιθανό ρόλο για τον CRF στην ανάπτυξη της νόσου. Προτείνεται συγκεκριμένα ότι αλλαγές στα επίπεδα της έκφρασης του CRF τοπικά στο ενδομήτριο και στον πλακούντα μπορεί να απορυθμίζουν τη διείσδυση των τροφοβλαστών. Για παράδειγμα, περίσσεια παραγόμενου CRF μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ρηχή διάμεση τροφοβλαστική διείσδυση.

Έχει προηγουμένα ανακοινωθεί από την ερευνητική μας ομάδα η ειδική εντόπιση του πεπτιδίου CEACAM1 στην ΕΛΤ σε πλακούντα πρώτου τριμήνου (Bamberger et al, 2000). Το πεπτίδιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει ομο- και ετερο-τυπικές κυτταρο-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Πρόκειται δηλαδή για αλληλεπιδράσεις τόσο με άλλα μόρια CEACAM1 όσο και με διαφορετικά μόρια κυτταρικής διασύνδεσης που βρίσκονται στην επιφάνεια παρακείμενων κυττάρων (Rojas et al, 1990; Turbide et al, 1991). Συνεπώς είναι πιθανή η συμμετοχή του CEACAM1 στους μηχανισμούς που μεσολαβούν για τη προσκόλληση της διεισδυτικής τροφοβλάστης στους μητρικούς ιστούς. Πράγματι, το CEACAM1 μπορεί να μεσολαβεί για τη προσκόλληση των τροφοβλαστών στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, τα οποία επίσης εκφράζουν το ίδιο μόριο (Bamberger et al, 1998). Επιπρόσθετα, η πρόσδεση του CEACAM1 στην E-σελεκτίνη η οποία εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (Kuijpers et al, 1992), πιθανόν να συμμετέχει στη πρόσδεση των ΕΛΤ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μητρικών αγγείων. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να αποτελεί μέρος της διαδικασίας της ενδαγγειακή διείσδυσης και αντικατάστασης των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ενδαγγειακή ΕΛΤ (Zhou et al, 1997).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, περιγράφουν επίσης την επίδραση του CEACAM1 μορίου στη διεισδυτική ικανότητα των τροφοβλαστών. Η έκφραση του μορίου σε μια βασισμένη στην ΕΛΤ υβριδική κυτταρική σειρά (AC1M88) αυξάνει τη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων αυτών σε ένα *in vitro* πειραματικό μοντέλο. Το μοντέλο αυτό σχεδιάστηκε ώστε να προσομοιάζει την κυτταρική αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix, ECM). Η σημασία της παρουσίας λειτουργικού CEACAM1 για το διεισδυτικό δυναμικό των τροφοβλαστών, έγινε φανερό από τη σημαντική μείωση της διείσδυσης έπειτα από την αναστολή της λειτουργίας του CEACAM1 απομονωμένων ΕΛΤ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό αντι-CEACAM1 αντίσωμα. Είναι γνωστό ότι η διάμεση τροφοβλαστική διείσδυση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την

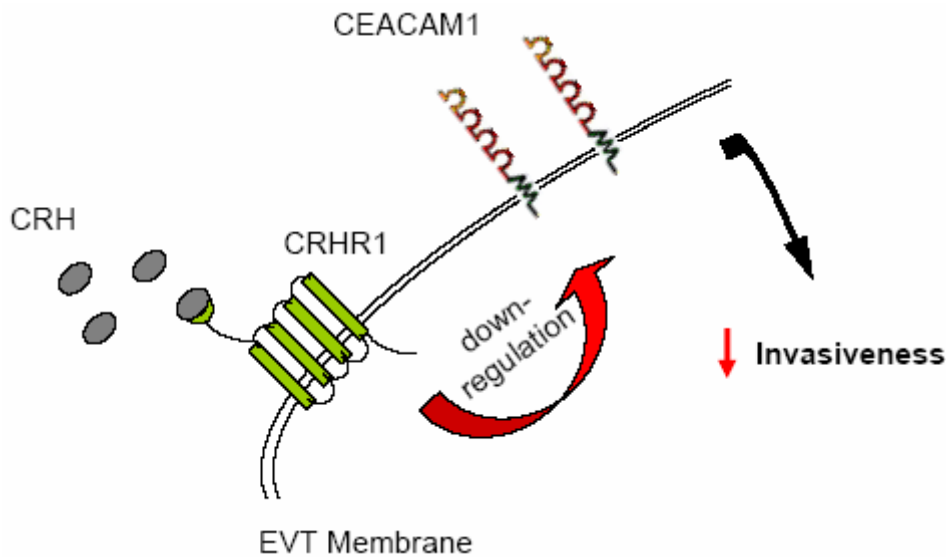
αλληλεπίδραση των τροφοβλαστών με την ECM, η οποία με τη σειρά της προϋποθέτει αλληλεπιδράσεις των ιντεγκρινών με την ECM. Ένας σημαντικός όγκος δεδομένων υποδεικνύει ότι το CEACAM1 τροποποιεί και αλληλεπιδρά με τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ιντεγκρινών σε πολλά κυτταρικά συστήματα συμπεριλαμβανομένων των ΕΛΤ. Έχει δειχθεί ότι αντισώματα κατά του CEACAM1 επηρεάζουν τη λειτουργία των β_1 και β_2 ιντεγκρινών σε ουδετερόφιλα και Β λεμφοκύτταρα (Nair et al, 2001; Skubitz et al, 2000; Greicius et al, 2003). Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των β_3 ιντεγκρινών και του CEACAM1 στα κοκκιοκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα και στη διεισδυτική τροφοβλάστη (Brummer et al, 2001). Παρόμοια με τα αποτελέσματα που περιγράφονται εδώ, έχει προηγουμένα δειχθεί ότι το CEACAM1 ενισχύει τη διεισδυτικότητα των μελανοκυττάρων σε μελέτες διείσδυσης σε Matrigel. Αυτή η δράση ήταν εξαρτώμενη από τις ιντεγκρίνες και η μελέτη πρότεινε έναν λειτουργικό ρόλο για την αλληλεπίδραση του CEACAM1 με την ιντεγκρίνη β_3 στην κυτταρική διείσδυση (Ebrahimnejad et al, 2004). Επιπλέον, η παξιλίνη, μια πρωτεΐνη σημαντική για τη λειτουργία των εστιακών κυτταρικών συνδέσεων (focal adhesions), σχετίζεται με το CEACAM1 σε κοκκιοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας (Ebrahimnejad et al, 2000). Το CEACAM1 μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεϊνικές τυροσινικές φωσφατάσες SHP-1 και SHP-2 και τις τυροσινικές κινάσες της src οικογένειας (Budt et al, 2002; Skubitz et al, 1995; Beauchemin et al, 1997), οι οποίες συμμετέχουν στη σηματοδότηση των ιντεγκρινών (Felsenfeld et al, 1999; Inagaki et al, 2000; Oh et al, 1999). Στα κοκκιοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, το CEACAM1 συσχετίζεται με την ταλίνη, μια κύρια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών (Ebrahimnejad et al, 2000; Muller et al, 2005). Πρόσφατα, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η οστεοποντίνη, μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη της ECM, και το CEACAM1 δρουν σαν ένα λειτουργικό σύμπλοκο για να ενισχύσουν την διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών (Briese et al, 2005). Από τα ανωτέρω γίνεται φανερό ότι το CEACAM1 είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με τις ιντεγκρίνες ή/και με ρυθμιζόμενες από τις ιντεγκρίνες κυτταρικές λειτουργίες και με αυτό τον τρόπο να επηρεάσει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με την ECM.

Η έκφραση του cell-CAM105 (ομόλογο του CEACAM1 μόριο στον επίμυ) έχει περιγραφεί στην επιφάνεια του τροφεκτοδέρματος της βλαστοκύστης (Svalander et al, 1987), όπως επίσης στην κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου της μήτρας του

επίμυ (Svalander et al, 1990). Ωστόσο, το cell-CAM105 είτε χάνεται είτε αποκρύπτεται από την επιφάνεια των τροφοβλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης που βρίσκεται σε στάδιο εμφύτευσης (Svalander et al, 1987). Για το λόγο αυτό προτάθηκε η υπόθεση ότι στο συγκεκριμένο είδος η διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών σχετίζεται με ελάττωση της έκφρασης του μορίου. Η παρούσα μελέτη, επικεντρώθηκε σε ΕΛΤ απομονωμένους από ανθρώπινο πλακούντα πρώτου τριμήνου. Συνεπώς, δεν είναι δυνατή η άμεση σύγκριση των δύο πειραματικών μοντέλων. Ωστόσο, η παρουσία του CEACAM1 στη θέση εμφύτευσης στον ανθρώπινο πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης και η θετική ρύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης από το μόριο, υποδηλώνουν ότι μάλλον η παρουσία και όχι η απουσία του CEACAM1 είναι σημαντική για τα πρώτα στάδια της πλακουντιοποίησης στον άνθρωπο (Bamberger et al, 2000).

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, η ανταλαμίνη αύξησε την τροφοβλαστική διείσδυση. Ωστόσο, σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς η αύξηση αυτή ήταν μερική (κατά 60%), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι επιπρόσθετοι μηχανισμοί έχουν ρυθμιστικό ρόλο για την τροφοβλαστική διείσδυση. Κατά συνέπεια, οι CRF ανταγωνιστές, οι οποίοι πιθανόν στο μέλλον να αποδειχτούν πολύτιμοι στην θεραπεία της κατάθλιψης και των αγχωδών διαταραχών, πρέπει να εξεταστούν προσεκτικά για τις δράσεις τους στην φυσιολογία της αναπαραγωγής.

Συνοπτικά, τα ευρήματά της παρούσας διδακτορικής διατριβής δείχνουν ότι ο CRF ελαττώνει τη διεισδυτική ικανότητα των εξωλαχνωτών τροφοβλαστών. Αυτή η δράση οφείλεται στην CRFR1-επαγόμενη ελάττωση της έκφρασης του CEACAM1 στην επιφάνεια των κυττάρων. Τέλος, το CEACAM1 προάγει την διείσδυση των τροφοβλαστών (**εικόνα 1**). Η απορύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης εξαιτίας ενός ελαττωματικού CRF/CRFR1 συστήματος είναι πιθανόν να εμπλέκεται στη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας και άλλων καταστάσεων που οφείλονται σε διαταραχές της πλακουντιοποίησης.



Εικόνα 1. Σύνοψη της δράσης των CRF και CEACAM1 στη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων ΕΛΤ (EVT). Η ενεργοποίηση του CRHR1 από τον CRF στα κύτταρα ΕΛΤ προκαλεί ελάττωση της έκφρασης του πεπτιδίου CEACAM1 στη μεμβράνη των κυττάρων. Σαν αποτέλεσμα η διεισδυτική ικανότητα (invasiveness) των τροφοβλαστών ελαττώνεται σημαντικά.

5.3. Η UCN εκφράζεται στην ΕΛΤ στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου

Η παρούσα μελέτη εντοπίζει την έκφραση του mRNA και του πεπτιδίου της UCN στα ανθρώπινα κύτταρα ΕΛΤ, δηλαδή στο κατ' εξοχήν διεισδυτικό τμήμα του πλακούντα. Επιπρόσθετα, η έκφραση του πεπτιδίου της UCN ήταν έντονη στη κυτταροτροφοβλάστη και ασθενής στη συγκύτιοτροφοβλάστη, γεγονός το οποίο διαπιστώθηκε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε πλακούντα πρώτου τριμήνου. Ακόμη, προπαρασκευαστικά αποτελέσματα προέκυψαν πάνω στη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της UCN από δύο σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής ενδοκυττάρων σημάτων, των μονοπατιών του cAMP/PKA και της διακυλογλυκερόλης/PKC. Τα αποτελέσματά δείχνουν ότι σε κύτταρα πλακουντιακής προέλευσης ο υποκινητής της UCN, μπορούσε να ενεργοποιηθεί από το μονοπάτι της διακυλογλυκερόλης/PKC αλλά όχι και από εκείνο του cAMP/PKA.

Προηγούμενες μελέτες πάνω στην πλακουντιακή έκφραση της UCN ανέφεραν παρουσία του mRNA της UCN σε πλακούντες πρώτου τριμήνου καθώς και

σε τελειόμηνους πλακούντες. Επίσης εξέτασαν την ακριβή εντόπιση του πεπτιδίου σε τελειόμηνο πλακουντιακό ιστό (Petraglia et al, 1996; Clifton et al, 2000; Watanabe et al, 1999; Sehringer et al, 2004). Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η συγκυτιοτροφοβλάστη, η κυτταροτροφοβλάστη και ο φθαρτός του τελειόμηνου πλακούντα εκφράζουν ανοσοδραστική UCN. Αντίθετα με την έντονη χρώση της UCN που παρατηρήθηκε στη συγκυτιοτροφοβλάστη του τελειόμηνου πλακούντα (Petraglia et al, 1996), αναφέρεται εδώ ότι στον πλακούντα πρώτου τριμήνου η UCN εκφράζεται ασθενώς στην συγκυτιοτροφοβλάστη. Στη παρούσα μελέτη, η κυτταροτροφοβλάστη παρουσίασε ισχυρή χρώση για την UCN, σε αντίθεση με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών τα οποία καταδείκνυαν ασθενή παρουσία του πεπτιδίου μόνο σε μερικούς κυτταροτροφοβλάστες (Clifton et al, 2000). Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται σε μεθοδολογικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στη παρούσα και προηγούμενες μελέτες, για παράδειγμα στη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων, ή στην εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών αποκάλυψης αντιγονικών επιτόπων. Ωστόσο, τα ευρήματα μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύουν πραγματικές μεταβολές στην έκφραση της UCN ανάμεσα σε πλακούντες πρώτου και τρίτου τριμήνου, μια παρατήρηση η οποία απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Έκφραση της UCN παρατηρήθηκε επίσης στα ΕΛΤ κύτταρα σε τομές παραφίνης. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε με διπλό ανοσοφθορισμό με χρώση για UCN και κυτταροκερατίνη-7 σε παγωμένες τομές, όπως επίσης σε απομονωμένα κύτταρα ΕΛΤ σε καλλιέργεια.

Αρκετοί λειτουργικοί ρόλοι έχουν προταθεί για την πλακουντιακή UCN. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το πεπτίδιο έχει τοπική παρακρινή και αυτοκρινή δράση, όπως είναι η ρύθμιση της παραγωγής πλακουντιακών ορμονών, της λειτουργίας του μυομητρίου και του τόνου των πλακουντιακών αγγείων (Florio et al, 2004). Πιο συγκεκριμένα, οι Petraglia et al έδειξαν ότι τόσο η UCN όσο και ο CRF μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκκριση ACTH και PGE₂ από τροφοβλαστικά κύτταρα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Petraglia et al, 1999). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για την activin A (Reis et al, 2002). Επιπρόσθετα, η UCN προάγει την αγγειοδιαστολή των πλακουντιακών αγγείων (Leitch et al, 1998) και την ενεργοποίηση της MAP κινάσης (mitogen activated protein kinase) στα μυομητρικά κύτταρα (Grammatopoulos et al, 2000). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο εάν το πεπτίδιο έχει λειτουργικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου. Η ερευνητική μας ομάδα έχει προηγούμενα προτείνει ότι η ενεργοποίηση του CRFR1 από τον CRF στη θέση εμφύτευσης του ανθρώπινου εμβρύου, προάγει τη διαδικασία εμφύτευσης της

βλαστοκύστης (Makrigiannakis et al, 2001). Επίσης, όπως δείχνεται ανωτέρω, ο CRF τροποποιεί την διείσδυση της ανθρώπινης τροφοβλάστης ενεργώντας μέσω του CRFR1. Επειδή η UCN είναι ένας ισχυρός αγωνιστής του CRFR1 είναι πιθανό να συμμετέχει παράλληλα με τον CRF σε αυτά τα φαινόμενα. Οι Madhappan et al έχουν προηγουμένα αναφέρει συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της UCN στον πλακούντα και την επιτυχή εμφύτευση της ανθρώπινης βλαστοκύστης. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκαν αυξημένα επίπεδα UCN σε κατάλοιπα κύησης από γυναίκες με αυτόματες αποβολές, σε σύγκριση με περιπτώσεις διακοπών κύησης (Madhappan et al, 2003). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι Li και Challis πρόσφατα ανακοίνωσαν ότι η UCN προάγει την έκκριση της μεταλλοπρωτεάσης-9 (MMP-9) σε συγκυτιοτροφοβλάστες και χοριονικούς τροφοβλάστες τελειόμηνων πλακούντων. Διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η UCN εμπλέκεται στην ρήξη των υμένων κατά την έναρξη του τοκετού (Li et al, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα, είναι δελεαστικό να προτείνει κανείς ένα ρόλο για την UCN στην τροφοβλαστική διείσδυση μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας από την ΕΛΤ.

Τέλος, προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν πάνω στη ρύθμιση του υποκινητή της UCN. Υπολογιστική ανάλυση του ανθρώπινου γονιδίου της UCN έχει προηγουμένα καταδείξει την παρουσία ενός αριθμού περιοχών προ του σημείου έναρξης της μεταγραφής που μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Αυτές οι περιοχές περιλαμβάνουν ένα παράγοντα απάντησης στο cAMP (cAMP response element, CRE) στη θέση -40bp και μια θέση πρόσδεσης της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης 1 (activating protein 1, AP1) στη θέση -310bp (Zhao et al, 1998). Επειδή η περιοχή CRE και η περιοχή πρόσδεσης της AP1 αποτελούν σημαντικούς μεταγωγείς των απαντήσεων των γονιδίων στην ενεργοποίηση των PKA και PKC αντίστοιχα, στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η απάντηση του υποκινητή της UCN σε ερεθίσματα τα οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τα δύο μονοπάτια. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν προτείνουν ότι σε κύτταρα πλακουντιακής προέλευσης (κύτταρα ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος, JEG3), ο υποκινητής της UCN είναι πιθανότερο να ενεργοποιείται από παράγοντες άνωθεν του AP1 μεταγραφικού παράγοντα (διακυλογλυκερόλη/PKC), παρά της CRE-προσδένουσας πρωτεΐνης (cAMP/PKA).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη παρούσα μελέτη προτείνουν ότι η UCN εκφράζεται έντονα στο διεισδυτικό κομμάτι του

πλακουντιακού ιστού, δηλαδή στην ΕΛΤ. Η λειτουργική σημασία του γεγονότος αυτού απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, η παρουσία των CRF υποδοχέων στο εμβryo-μητρικό όριο (Makrigiannakis et al, 2001) επιτρέπει την υπόθεση για έναν τοπικό ρόλο της UCN στα ενδομήτρια φαινόμενα που σχετίζονται με την εμφύτευση της βλαστοκύστης και την πλακουντιοποίηση.

5.4. Οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση CRF και UCN στη θέση εμφύτευσης, αυξημένη έκφραση FasL στα λευκοκύτταρα του φθαρτού και αυξημένη έκφραση Fas στην ΕΛΤ

Έχει προηγουμένα δειχθεί ότι οι αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση των πεπτιδίων CRF και UCN σε ομογενοποιημένα πλακούντα (Madhappan et al, 2003), ο δε CRF έχει συνδεθεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις με τη ρύθμιση της έκφρασης του προ-αποπτωτικού FasL (Dermitzaki et al, 2002; Makrigiannakis et al, 2001). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν ομογενοποιημένα πλακούντα για τα επίπεδα έκφρασης mRNA των *CRF*, *UCN*, *FasL* και *Fas* γονιδίων αλλά και μονιμοποιημένος ιστός για την έκφραση των αντίστοιχων πεπτιδίων. Στους ιστούς προερχόμενους από αυτόματες αποβολές διαπιστώθηκαν: (α) αυξημένα επίπεδα CRF και UCN με εντόπιση στο εμβryo-μητρικό όριο και (β) αυξημένα επίπεδα FasL και Fas με εντόπιση στα φθαρτικά λευκοκύτταρα και στην ΕΛΤ αντίστοιχα.

Ένας αριθμός μελετών έχει ανακοινώσει ότι το FasL που συντίθεται από τα κύτταρα ΕΛΤ επάγει την απόπτωση ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων, προάγοντας έτσι την επιβίωση του εμβρύου και την εξέλιξη των αρχικών σταδίων της κύησης (Makrigiannakis et al, 2001; Abrahams et al, 2004; Kauma et al, 1999; Uckan et al, 1997; Runic et al, 1996). Στη σχετική μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έχει δειχθεί ότι στην ανωτέρω διαδικασία σημαντικό ρόλο παίζει ο CRF, καθώς επάγει την έκφραση του FasL στην ΕΛΤ (Makrigiannakis et al, 2001). Στην παρούσα μελέτη, παρά τη σημαντική αύξηση των CRF και UCN στο φθαρτό, δεν εντοπίστηκαν διαφορές στην έκφραση του FasL στην ΕΛΤ στις αποβολές, σε σύγκριση με φυσιολογικούς πλακούντες. Αντίθετα, βρέθηκε ότι στους πλακούντες αποβολών, τα φθαρτικά λευκοκύτταρα εξέφραζαν FasL το οποίο απουσίαζε από τον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό στους φυσιολογικούς πλακούντες. Επίσης, στις αποβολές

μεγάλο μέρος της ΕΛΤ ήταν έντονα θετικό για τον υποδοχέα Fas σε αντίθεση με τα λίγα κύτταρα που παρουσίαζαν αδύναμη χρώση υπό φυσιολογικές συνθήκες. Είναι συνεπώς πιθανό, τα λευκοκύτταρα και η ΕΛΤ του πλακούντα να συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση των FasL και Fas μεταγραφημάτων αντίστοιχα, που ανιχνεύονται στα ομογενοποιημένα δείγματα από πλακούντες αποβολών.

Πρόσφατα οι Tayade et al χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο τον χοίρο του εμπορίου, ανακοίνωσαν ότι το FasL, σε επίπεδο μεταγραφήματος, εκφράζεται εν αφθονία στα λεμφοκύτταρα που διηθούν τις θέσεις εμφύτευσης αποβαλόμενων εμβρύων. Αντιθέτως, τα αντίστοιχα επίπεδα ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε λεμφοκύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από τις θέσεις εμφύτευσης υγιών εμβρύων (Tayade et al, 2006). Στη μελέτη αυτή περιγράφηκε επιπλέον το εύρημα αυξημένων επιπέδων του μεταγραφήματος του Fas υποδοχέα στους τροφοβλάστες που απομονώθηκαν από θέσεις εμφύτευσης αποβαλόμενων εμβρύων. Τα αποτελέσματα των Tayade et al είναι μεν αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής, ωστόσο ο συσχετισμός των δύο μελετών είναι δύσκολος, εξαιτίας των διαφορών ανάμεσα στα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, ο χοίρος ανήκει στη κατηγορία των ειδών με επιθηλιοχοριακή πλακουντιοποίηση, ενώ ο άνθρωπος στη κατηγορία των ειδών με αιμοχοριακή πλακουντιοποίηση. Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στον άνθρωπο, στον πλακούντα του χοίρου δεν υπάρχει διεισδυτική τροφοβλάστη, διότι το επιθήλιο της μήτρας δεν διαπερνάται καθόλου από τροφοβλαστικά κύτταρα.

5.5. Οι αυτόματες αποβολές σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση της διάμεσης ΕΛΤ

Με γνώμονα τις ανωτέρω παρατηρήσεις, μελετήθηκε η υπόθεση ότι στις αποβολές η ΕΛΤ πιθανόν είναι ευάλωτη σε μια επαγόμενη από το λευκοκυτταρικό FasL κυτταροτοξική επίθεση. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων ΕΛΤ είναι σημαντικά υψηλότερο σε πλακούντες από αποβολές απ' ό,τι σε φυσιολογικούς πλακούντες. Συγκεκριμένα, ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα ΕΛΤ εντοπίστηκαν στους φυσιολογικούς πλακούντες πρώτου τριμήνου.

Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός ότι και στις δύο ομάδες πλακουντιακού υλικού δεν εντοπίστηκε κανένα αποπτωτικό κύτταρο στις κολώνες

ΕΛΤ. Μια πιθανή ερμηνεία για το εύρημα αυτό είναι ότι μέσα στις τροφοβλαστικές κολώνες, τα φθαρτικά λευκοκύτταρα μπορεί να μην είναι ικανά να έρθουν σε άμεση επαφή με τα κύτταρα της ΕΛΤ, αλλά να επιτίθενται στα τελευταία βαθύτερα μέσα στο φθαρτό, καθώς αυτά διεισδύουν μέσα στους μητρικούς ιστούς. Μια δεύτερη ερμηνεία για το ίδιο φαινόμενο παρέχεται από προηγούμενες μελέτες πάνω στην απόπτωση της ΕΛΤ. Οι Huppertz et al, χρησιμοποίησαν φυσιολογικούς πλακούντες για να μελετήσουν την απόπτωση της πολλαπλασιαζόμενης ΕΛΤ, (δηλαδή τα κύτταρα που διατηρούν την ικανότητα της μιτωτικής διαίρεσης και βρίσκονται στα βασικά επίπεδα των τροφοβλαστικών κολωνών) και της διεισδυτικής τροφοβλάστης που έχει χάσει την ικανότητά της να διαιρείται. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής, οι συγγραφείς δεν εντόπισαν αποπτωτικά κύτταρα στον πρώτο πληθυσμό, σε αντίθεση με τον δεύτερο όπου υπήρχαν λίγα αποπτωτικά κύτταρα (Huppertz et al, 1998). Τα ευρήματα αυτά συσχετίστηκαν με την αφθονία της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στην πολλαπλασιαζόμενη ΕΛΤ, σε συνδυασμό με την απουσία των «υποδοχέων θανάτου» Fas και TNF-R1 στα ίδια κύτταρα (Huppertz et al, 2006). Έχοντας δημοσιεύσει τα αποτελέσματά τους σε μία περίληψη και όχι πλήρη δημοσίευση, οι Huppertz et al, δεν διευκρινίζουν την ηλικία των δειγμάτων πλακούντα που εξετάστηκαν. Ωστόσο, η παρούσα καθώς και παλαιότερες (Huppertz et al, 1998; Murakoshi et al, 2003; DiFederico et al, 1999) μελέτες πάνω στην απόπτωση της πολλαπλασιαζόμενης και διάμεσης ΕΛΤ, συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό, ανεξάρτητα από την πιθανά διαφορετική ηλικία ή/και προέλευση (αυτόματη αποβολή, διακοπή εγκυμοσύνης, φυσιολογικός τοκετός) των πλακούντων.

Η υπόθεση της συμμετοχής του συστήματος των Fas/FasL πεπτιδίων στην σχετιζόμενη με τις αποβολές απόπτωση των πλακουντιακών κυττάρων έχει υποστηριχθεί από προηγούμενες μελέτες. Οι Ejima et al παρατήρησαν ότι μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση LPS, διάφορα κύτταρα στον πλακούντα του μυός υφίστανται απόπτωση επαγόμενη από τον Fas υποδοχέα (Ejima et al, 2000). Μεταγενέστερες μελέτες σε κουνέλια (Liu et al, 2003) και μύες (Savion et al, 2002) συνέδεσαν την τεχνητά προκαλούμενη αποβολή με την απόπτωση κυττάρων του πλακούντα καθώς και την έκφραση στον ίδιο ιστό πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την απόπτωση.

Τα ευρήματα των ανωτέρω μελετών υποστηρίζουν ένα πιθανό ρόλο για την απόπτωση κυττάρων του πλακούντα στους μηχανισμούς που ενέχονται στις αποβολές. Ωστόσο οι συγγραφείς δεν χρησιμοποίησαν, παράλληλα με την ανίχνευση

της απόπτωσης, ειδικά αντισώματα σήμανσης για την διάκριση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών. Σαν αποτέλεσμα η παρατηρούμενη αύξηση της απόπτωσης στις περιπτώσεις των αποβολών, αναφέρθηκε σαν αύξηση της απόπτωσης συνολικά στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς του πλακούντα, χωρίς να είναι όμως δυνατή η διάκριση του καθενός από αυτούς. Επιπλέον, στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, η αποβολή δεν είναι αυτόματη αλλά προκλητή, με τη χρήση κάποιου χημικού παράγοντα. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ενέχονται είναι συνεπώς διαφορετικοί από εκείνους στις αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο. Στη πρώτη περίπτωση ο πλακούντας υπόκειται σε μια γενικευμένη τοξική δράση ενός μόνο παράγοντα (για παράδειγμα ενός λιποπολυσακχαρίτη ή της κυκλοφωσφαμίδης που χρησιμοποιήθηκαν στις αναφερόμενες μελέτες), ενώ στη δεύτερη η αιτιολογία είναι πολυπαραγοντική και πολύ λίγο γνωστή.

Περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Kokawa et al, οι οποίοι διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στη συγκυτιοτροφοβλάστη και στον φθαρτό σε ανθρώπινους πλακούντες μετά από αυτόματες αποβολές (Kokawa et al, 1998). Τέλος, εκτεταμένη απόπτωση των κυττάρων ΕΛΤ σε πλακούντες τρίτου τριμήνου έχει συσχετισθεί με την παθογένεση της προεκλαμψίας (DiFederico et al, 1999).

5.6. Τα πεπτίδια CRF και UCN ενισχύουν την ικανότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση σε μια κυτταρική σειρά ΕΛΤ

Ακολούθως διερευνήθηκε ένας πιθανός ρόλος για τα πεπτίδια CRF και UCN στην μεταγωγή των ανωτέρω φαινομένων. Έχει παλαιότερα δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του CRFR1 επάγει την έκφραση του FasL στην ΕΛΤ και στα PC12 κύτταρα (Makrigiannakis et al, 2001; Dermitzaki et al, 2002). Επιπρόσθετα, πρόσφατα ανακοινώθηκε η έκφραση υψηλών επιπέδων των CRF και UCN πεπτιδίων σε ομογενοποιημένα πλακούντων που ελήφθησαν μετά από αυτόματες αποβολές (Madhappan et al, 2003). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε στη παρούσα μελέτη. Με βάση τα δεδομένα αυτά, εξετάστηκε η υπόθεση ότι ο CRF ή/και η UCN επάγουν την έκφραση του FasL στα φθαρτικά λευκοκύτταρα ενισχύοντας έτσι την ικανότητα των τελευταίων να προκαλούν απόπτωση στην ΕΛΤ. Η μελέτη εστιάστηκε στα φθαρτικά

λεμφοκύτταρα για δύο λόγους. Πρώτον τα κύτταρα αυτά αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό φθαρτικών λευκοκυττάρων (περίπου 80%) στον πλακούντα πρώτου τριμήνου. Σαν αποτέλεσμα οι πρωτογενείς τους καλλιέργειες αποδίδουν ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων για την διεξαγωγή πειραμάτων. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους μια ειδική υποκατηγορία των κυττάρων φυσικών φονέων της μήτρας (uterine natural killer cells, uNK) καθώς και λίγα κυτταροτοξικά T κύτταρα. Δεύτερον, τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα είναι τεχνικά εύκολο να απομονωθούν σε πρωτογενείς καλλιέργειες υψηλής καθαρότητας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης προτείνουν έναν λειτουργικό ρόλο για τα νευροπεπίδια CRF και UCN στην κυτταροτοξική δράση των φθαρτικών λεμφοκυττάρων έναντι των ΕΛΤ. Διαπιστώθηκε ότι τα νευροπεπίδια CRF και UCN επάγουν, με παρόμοια ισχύ, την έκφραση του συνδεδεμένου στη κυτταρική μεμβράνη FasL (μοριακού βάρους ~ 40kDa) σε φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονωμένα από φυσιολογικούς πλακούντες πρώτου τριμήνου. Για τη δράση αυτή μεσολαβεί ο CRFR1, καθώς η προσθήκη του αντίστοιχου ανταγωνιστή ανταλαμίνη είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή του φαινομένου. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα από υλικό αποβολών εκφράζουν υψηλά επίπεδα του FasL χωρίς να έχουν εκτεθεί *in vitro* σε εξωγενή χορήγηση CRF ή UCN. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε τα προαναφερθέντα *in situ* δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία το πεπτίδιο FasL εκφράζεται στα λευκοκύτταρα σε πλακούντες από αποβολές αλλά δεν ανιχνεύεται στα λευκοκύτταρα φυσιολογικών πλακούντων από διακοπή κύησης.

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των λεμφοκυττάρων πάνω στους τροφοβλάστες χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο κυτταρικών συν-καλλιιεργειών αποτελούμενο από πρωτογενείς καλλιέργειες φθαρτικών λεμφοκυττάρων και μια υβριδική κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος και εξωλαχνωτής τροφοβλάστης (AC1M88). Η τελευταία ελέγχθηκε για την έκφραση του υποδοχέα Fas πριν από το σχεδιασμό των αντίστοιχων πειραμάτων. Παρατηρήθηκε ότι οι CRF και UCN προκάλεσαν σημαντική αύξηση στην κυτταροτοξικότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων προερχόμενα από φυσιολογικούς πλακούντες, έναντι των AC1M88 κυττάρων. Το γεγονός αυτό έγινε αντιληπτό με τη μέτρηση αυξημένων ποσοστών απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων μετά τη συν-καλλιιεργεία τους με τα συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς. Οι τελευταίες ορίζονται ως συν-καλλιιεργεία AC1M88 κυττάρων με φθαρτικά λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς πλακούντες και χωρίς την χρήση εξωγενούς CRF ή UCN. Το

περιγραφόμενο φαινόμενο αναστράφηκε τόσο με τη χρήση της ανταλαρμίνης πάνω στα λεμφοκύτταρα, όσο και με τον αποκλεισμό της λειτουργίας του Fas υποδοχέα στους τροφοβλάστες, με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Συμπερασματικά, η παρατηρούμενη αύξηση της απόπτωσης οφειλόταν στην επαγωγή της έκφρασης του λεμφοκυτταρικού FasL από τους CRF και UCN.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι τα απομονωθέντα από πλακούντες αποβολών λεμφοκύτταρα ήταν ικανά να επάγουν υψηλά ποσοστά απόπτωσης στη τροφοβλαστική κυτταρική σειρά, χωρίς να εκτεθούν προηγούμενα σε οποιονδήποτε παράγοντα πέραν του θρεπτικού τους υλικού. Ο λειτουργικός αποκλεισμός του υποδοχέα Fas των τροφοβλαστών με τη χρήση του ειδικού αντισώματος πριν τη συν-καλλιέργεια, ελάττωσε και εδώ σημαντικά την απόπτωσή τους. Ωστόσο, σε αυτή τη περίπτωση τα ποσοστά της απόπτωσης δεν έφτασαν στα επίπεδα που παρατηρούνταν στις συνθήκες αναφοράς. Για το λόγο αυτό διατυπώνεται η υπόθεση ότι στις αποβολές διάφοροι παράγοντες δρουν στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα επάγοντας έναν αριθμό κυτταροτοξικών μηχανισμών πέραν εκείνου της επαγωγής της έκφρασης του λεμφοκυτταρικού FasL από τα νευροπεπτίδια CRF και UCN. Για παράδειγμα τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να περιλαμβάνουν συστατικά κυτταροτοξικών κυστιδίων όπως το granzyme B και η περφορίνη. Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα στα uNK κύτταρα και στα CD56^{dim} NK κύτταρα του περιφερικού αίματος (Koopman et al, 2003) όπως επίσης σε υψηλά επίπεδα στον φθαρτό (Rukavina et al, 1995; Gulan et al, 1997).

Η κυτταροτοξικότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων απέναντι στους τροφοβλάστες έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης παλαιότερα. Έχει βρεθεί ότι *in vitro* και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι τροφοβλάστες είναι ανθεκτικοί απέναντι στη κυτταροτοξική δράση των uNK κυττάρων. Ωστόσο, τα τελευταία μπορούν να ενεργοποιηθούν με τη χρήση της ιντερλευκίνης-2 και να ασκήσουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση σε συν-καλλιέργειες με τροφοβλάστες (King et al, 1990). Περαιτέρω διερεύνηση της συμπεριφοράς των λεμφοκυττάρων απέναντι στη τροφοβλάστη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρωτογενών καλλιιεργειών κυτταροτροφοβλαστών καθώς και της κυτταρικής σειράς του ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG3. Διαπιστώθηκε ότι τόσο τα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, όσο και τα φθαρτικά λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τελειόμηνους πλακούντες, γίνονταν ιδιαίτερα κυτταροτοξικά απέναντι και στους δύο ανωτέρω τύπους τροφοβλαστών, μετά την ενεργοποίησή τους με ιντερλευκίνη-2 (Abadia-

Molina et al, 1996). Πρόσφατα, οι Olivares et al χρησιμοποίησαν σε μια αντίστοιχη μελέτη φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονωμένα είτε από υλικό αποβολών, είτε από φυσιολογικούς πλακούντες της ίδιας ηλικίας (πρώτου τριμήνου), και την κυτταρική σειρά του ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος JEG-3. Τα JEG-3 κύτταρα, τα οποία προσομοιάζουν την ανθρώπινη κυτταροτροφοβλάστη, τοποθετήθηκαν σε συν-καλλιέργεια με τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα και μετά την απομάκρυνση των τελευταίων, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της απόπτωσης και νέκρωσης των πρώτων. Βρέθηκε ότι στη περίπτωση που τα JEG-3 κύτταρα συγκαλλιεργούνταν με φθαρτικά λεμφοκύτταρα από αυτόματες αποβολές, το ποσοστό των τροφοβλαστών που υφίστατο απόπτωση ήταν σημαντικά υψηλότερο από τη περίπτωση που χρησιμοποιούνταν λεμφοκύτταρα φυσιολογικών πλακούντων από διακοπές εγκυμοσύνης. Παράλληλα, τα επίπεδα της νέκρωσης των JEG-3 κυττάρων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ιδιαίτερα χαμηλά, χωρίς σημαντικές μεταβολές (Olivares et al, 2002).

Στις μελέτες που περιγράφονται ανωτέρω, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τύποι τροφοβλαστών. Είναι συνεπώς αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα αποτελέσματα αυτών των μελετών καθώς και της παρούσης βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό συμφωνίας. Ένα γενικό συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί με την ανασκόπηση όλων των αποτελεσμάτων των σχετικών με την αλληλεπίδραση τροφοβλαστών και λεμφοκυττάρων, είναι το εξής: παρόλο που τα λεμφοκύτταρα του φθαρτού διαθέτουν τον «εξοπλισμό» για να σκοτώσουν τους τροφοβλάστες, φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης, η κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων αναστέλεται. Μια ευρέως αποδεκτή θεωρία η οποία ερμηνεύει τη «σιγή» των φθαρτικών λεμφοκυττάρων, καθώς και την ανθεκτικότητα των τροφοβλαστών στην κυτταροτοξική δράση των πρώτων στη πορεία της φυσιολογικής κύησης, είναι το παράδειγμα των Th1/Th2 κυττοκινών. Η επιτυχής εγκυμοσύνη έχει συσχετισθεί με την μετακίνηση της ισορροπίας έκφρασης των προ-φλεγμονωδών (προερχόμενων από τα T helper 1 κύτταρα) και αντι-φλεγμονωδών (από τα T helper 2 κύτταρα) κυττοκινών προς την πλευρά των δεύτερων. Αυτή η ισορροπία αφορά τόσο στην έκφραση των εν λόγω κυττοκινών στην περιφέρεια όσο και στο περιβάλλον της μήτρας. Αντίθετα, όταν προεξάρχει η παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών των Th1 κυττάρων, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε καταστάσεις στρες ή φλεγμονών, τότε ευνοείται η απόρριψη των τροφοβλαστών (Lin et al, 1993; Marzi et al, 1996; Tangri et al, 1994; Piccinni et al, 1998). Πρόσφατα μελετήθηκε η δράση της

ιντερφερόνης- γ (IFN- γ), του παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α (tumor necrosis factor, TNF- α) και των ιντερλευκινών 6 και 10 στην έκφραση του υποδοχέα Fas σε πρωτογενείς καλλιέργειες τροφοβλαστών πρώτου τριμήνου. Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση των ανωτέρω κυττοκινών στην ευαισθησία των τροφοβλαστών στην Fas-επαγόμενη απόπτωση. Διαπιστώθηκε ότι οι IFN- γ και TNF- α (Th1 κυττοκίνες) προάγουν την έκφραση του Fas στους τροφοβλάστες και καθιστούν τα κύτταρα ιδιαίτερα ευάλωτα στην Fas-επαγόμενη απόπτωση. Αντίθετα, οι ιντερλευκίνες 6 και 10, οι οποίες ανήκουν στις Th2 κυττοκίνες, ενισχύουν την αντίσταση των τροφοβλαστών σε αυτή τη μορφή απόπτωσης (Aschkenazi et al, 2002).

Στην παρούσα μελέτη διατυπώνεται η υπόθεση ότι η περίσσεια των CRF και UCN που ανιχνεύεται στις αποβολές είναι πιθανά επιζήμια για τους τροφοβλάστες. Οι Madhappan et al προτείνουν ότι καταστάσεις οι οποίες προκαλούν στρες στο περιβάλλον της μήτρας πιθανόν επάγουν την τοπική παραγωγή και απελευθέρωση CRF και UCN και έτσι αντιπροσωπεύουν ένα αιτιολογικό σύνδεσμο ανάμεσα στο στρες και την αποβολή (Madhappan et al, 2003). Την αντίθετη άποψη εκφράζουν οι Florio et al οι οποίοι υποθέτουν ότι ο πλακούντας ανταποκρίνεται στο στρες με την απελευθέρωση CRF, που σκοπό έχει τη προστασία του εμβρύου από ένα εχθρικό περιβάλλον (Florio et al, 2002). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προσθέτουν νέα δεδομένα σε αυτή τη διχογνωμία αποκαλύπτοντας έναν, φαινομενικά τουλάχιστον, παράδοξο μηχανισμό. Τα πεπτίδια CRF και UCN επάγουν *in vitro* την έκφραση του FasL στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα και έτσι ενισχύουν την ικανότητα τους να προκαλούν απόπτωση των εξωλαχνωτών τροφοβλαστών. Δεδομένου ότι τα δύο νευροπεπτίδια παράγονται στη θέση εμφύτευσης και υπό φυσιολογικές συνθήκες τα λεμφοκύτταρα του φθαρτού δεν εκφράζουν το FasL πεπτίδιο, ο περιγραφόμενος μηχανισμός φαίνεται να είναι λειτουργικός στις αποβολές, αλλά όχι στη φυσιολογική κύηση. Στη τελευταία περίπτωση, ο CRF φαίνεται να επάγει την επιβίωση των κυττάρων ΕΛΤ μέσω ενός αντίθετου μηχανισμού (Makrigiannakis et al, 2001). Συγκεκριμένα, νωρίς κατά τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης και πλακουντιοποίησης, ο CRF δρα με αυτοκρινή και παρακρινή μηχανισμό στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, επάγοντας την έκφραση του τροφοβλαστικού FasL. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται απόπτωση των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων που συρρέουν στη περιοχή και φέρουν στην επιφάνειά τους τον Fas υποδοχέα, και τελικά η τροφοβλάστη προστατεύεται από την κυτταροτοξική τους δράση.

Γίνεται λοιπόν εμφανής ένας διπλός, αντιφατικός ρόλος για το νευροπεπτίδιο CRF και πιθανόν και την UCN μέσα στην έγκυο μήτρα. Μια πιθανή ερμηνεία για αυτό το φαινόμενο είναι η εξής: Σε ένα ενδομήτριο περιβάλλον με φυσιολογική έκφραση ορμονών και κυττοκινών, όπου για παράδειγμα η ισορροπία κλίνει προς τις Th2 κυττοκίνες, η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών μηχανισμών των λεμφοκυττάρων του φθαρτού παρεμποδίζεται. Ο CRF, εκφραζόμενος σε φυσιολογικά επίπεδα, δρα προς όφελος των κυττάρων ΕΛΤ και η επιβίωση των τελευταίων ευνοείται. Αντίθετα, σε ένα ενδομήτριο περιβάλλον όπου το κύημα οδηγείται προς την αποβολή, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων είναι επιτρεπτή. Τα αυξημένα επίπεδα των CRF και UCN ενεργοποιούν ευχερώς τα λεμφοκύτταρα αποτελώντας έτσι επιζήμιους παράγοντες για την επιβίωση της τροφοβλάστης. Επιπλέον, ένα τέτοιο περιβάλλον πιθανόν καθιστά την ΕΛΤ περισσότερο ευάλωτη στην κυτταροτοξική δράση των γειτονικών λεμφοκυττάρων, όπως καταδεικνύεται από την αύξηση της έκφρασης του τροφοβλαστικού υποδοχέα Fas. Σε κάθε περίπτωση, το σύστημα των πεπτιδίων CRF, UCN και των υποδοχέων τους χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη πολυπλοκότητα, με αποτέλεσμα να αποκαλύπτονται συχνά διττοί ρόλοι για τα εν λόγω πεπτίδια (Hillhouse et al, 2002).

Μια ακόμη σημαντική διάσταση της δράσης των CRF και UCN που διαπιστώνεται στη παρούσα μελέτη, αφορά τον ανοσορυθμιστικό ρόλο των πεπτιδίων στο εμβryo-μητρικό όριο. Γίνεται φανερό ότι τα νευροπεπτίδια έχουν απευθείας δράση πάνω στα λεμφοκύτταρα της περιοχής, ρυθμίζοντας την έκφραση του FasL στην επιφάνεια των κυττάρων. Η δυνατότητα των CRF και UCN να τροποποιούν τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, έχει προηγουμένα αναφερθεί (Tsatsanis et al, 2006; Singh et al, 1989; Singh et al, 1990; Angioni et al, 1993). Σε συστημικό επίπεδο ο CRF έχει έμμεση ανοσοκατασταλτική δράση, με την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ και την συνεπόμενη απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών. Αντίθετα, σε τοπικό επίπεδο διαπιστώνεται ότι ο CRF που παράγεται σε φλεγμαίνοντες ιστούς δρα παρακρινώς ή/και αυτοκρινώς σαν μια ισχυρή προ-φλεγμονώδης κυττοκίνη (Gravanis and Margioris, 2005; Zhao et al, 2002; Venihaki et al, 2003; Karalis et al, 1991). Σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι οι CRF και UCN ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων του φθαρτού, μέσω της επαγωγής έκφρασης του FasL. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να λειτουργεί είτε άμεσα με τη μεσολάβηση της ενεργοποίησης μόνο του CRFR1, είτε έμμεσα για

παράδειγμα μέσω μιας πιθανής CRFR1-εξαρτώμενης παραγωγής λεμφοκυτταρικών προ-φλεγμονωδών κυττοκινών. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει έναν ανοσορυθμιστικό ρόλο για τον περιφερικό CRF και το συγγενικό πεπτίδιο UCN.

Ένα **σημαντικό ερώτημα** το οποίο προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται ανωτέρω είναι εάν η απόπτωση των τροφοβλαστών που εντοπίζεται *in situ* στις αυτόματες αποβολές προηγείται ή ακολουθεί τον εμβρυικό θάνατο. Πρέπει να σημειωθεί ότι εκ των πραγμάτων τα δείγματα των αποβολών συλλέχθηκαν αφού είχε τεθεί η αντίστοιχη διάγνωση. Επομένως ο χρόνος που μεσολάβησε από το θάνατο του εμβρύου έως τη συλλογή των δειγμάτων μπορεί να ποικίλλει και είναι οπωσδήποτε διαφορετικός από εκείνον στην περίπτωση των επιλεκτικών διακοπών κύησης. Στην τελευταία περίπτωση είναι αυτονόητο ότι τα δείγματα ελήφθησαν ακριβώς τη στιγμή του προκαλούμενου από τη διαδικασία εμβρυικού θανάτου. Είναι συνεπώς πιθανό η απόπτωση των ΕΛΤ να είναι μέρος της διαδικασίας που οδηγεί στην απομάκρυνση του αχρείαστου πλέον φθαρτικού ιστού μίας εγκυμοσύνης που έχει διακοπεί, παρά μέρος της διαδικασίας της υπεύθυνης για την ελαττωματική πλακουντιοποίηση που ενοχοποιείται για την αυτόματη διακοπή της κύησης.

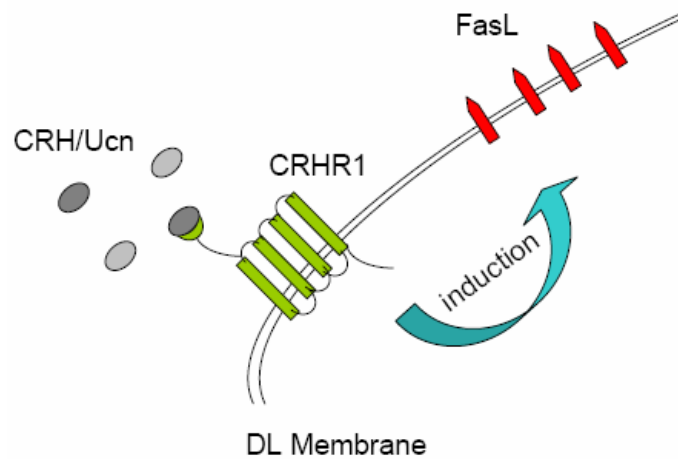
Σε μία προσπάθεια να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, η παρούσα μελέτη φέρνει στην επιφάνεια ορισμένες αξιοσημείωτες παρατηρήσεις:

Στο υλικό που μελετήθηκε, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα ποσοστά απόπτωσης σε κυτταρικούς πληθυσμούς του φθαρτού πλην των ΕΛΤ μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στους πλακούντες αποβολών, προκαλείται απόπτωση ειδικά στους εκφράζοντες Fas ΕΛΤ, και για το φαινόμενο αυτό μπορούν να ενοχοποιηθούν τα εκφράζοντα FasL φθαρτικά λευκοκύτταρα. Επιπρόσθετα διαπιστώνεται ότι η απόπτωση πιθανά δεν είναι η διαδικασία η οποία ενεργοποιείται για την απομάκρυνση του περιττού φθαρτού μετά την αυτόματη διακοπή μιας εγκυμοσύνης. Ταυτόχρονα, τα *in vitro* αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν σαφώς ότι ο CRF και η UCN είναι ικανά να προκαλέσουν την έκφραση του FasL στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα και έτσι να ενισχύσουν την ικανότητά τους να προκαλούν απόπτωση των ΕΛΤ. Ως εκ τούτου, σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε CRH ή/και UCN, όπως οι πλακούντες αποβολών, ένα τέτοιο φαινόμενο είναι δυνατόν να συμβεί. Οι δε συνθήκες που απαγορεύουν την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων στην φυσιολογική εγκυμοσύνη μπορούν μόνο να υποτεθούν βάσει της τρέχουσας γνώσης. Οι Madhappan et al πρότειναν ότι τα αυξημένα επίπεδα πεπτιδίων CRF και

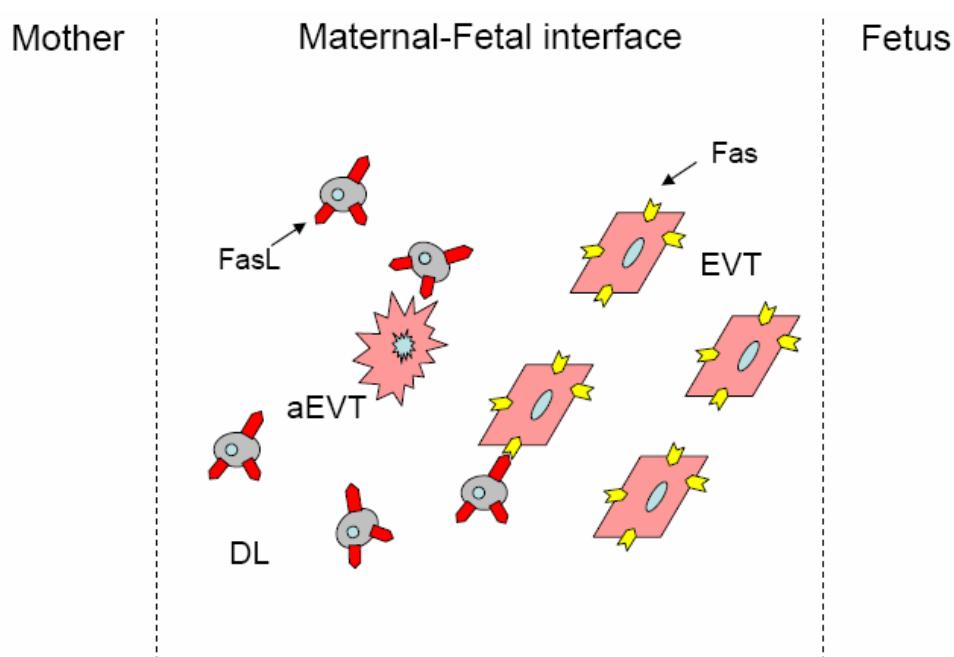
UCN που εντόπισαν στους πλακούντες αποβολών, ενεργοποιούν τα μαστοκύτταρα του ενδομητρίου τα οποία εκκρίνουν μόρια όπως η τρυπτάση και η IL-8 που μπορούν να προκαλέσουν αυτόματη αποβολή (Madhappan et al, 2003). Λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα αυτά, προτείνεται εδώ ένας επιπρόσθετος λεπτομερής μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίον η περίσσεια CRF και UCN μπορεί να είναι παράγοντας επιζήμιος για τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης. Σύμφωνα με το ανωτέρω σκεπτικό τα *in vitro* και *in situ* δεδομένα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία και προτείνουν ένα φαινόμενο που είναι πιθανό να συμβαίνει στους πλακούντες αποβολών και να προηγείται του εμβρυικού θανάτου.

Από την άλλη πλευρά δεν πρέπει να παραγνωριστεί η πιθανότητα ένας τέτοιος μηχανισμός για οποιοδήποτε λόγο, συμπεριλαμβανομένης της ανάγκης απομάκρυνσης περιττού ιστού, να ενεργοποιείται μόνο μετά τον θάνατο του εμβρύου. Συμπερασματικά και οι δύο εκδοχές είναι ικανές να ισχύουν *in vivo* και η παρούσα μελέτη, πέρα από την παροχή συγκεκριμένων ενδείξεων, δεν είναι σε θέση απαντήσει οριστικά στο ερώτημα. Για το σκοπό αυτό απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με στόχο τη συλλογή υλικού αποβολών από ασθενείς οι οποίες βρίσκονται κάτω από στενή υπερηχογραφική παρακολούθηση (κάθε 24 ώρες τουλάχιστον). Το υλικό αυτό, που ωστόσο θα ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να συλλεχθεί, θα λαμβανόταν πολύ κοντά στο χρονικό σημείο του εμβρυικού θανάτου.

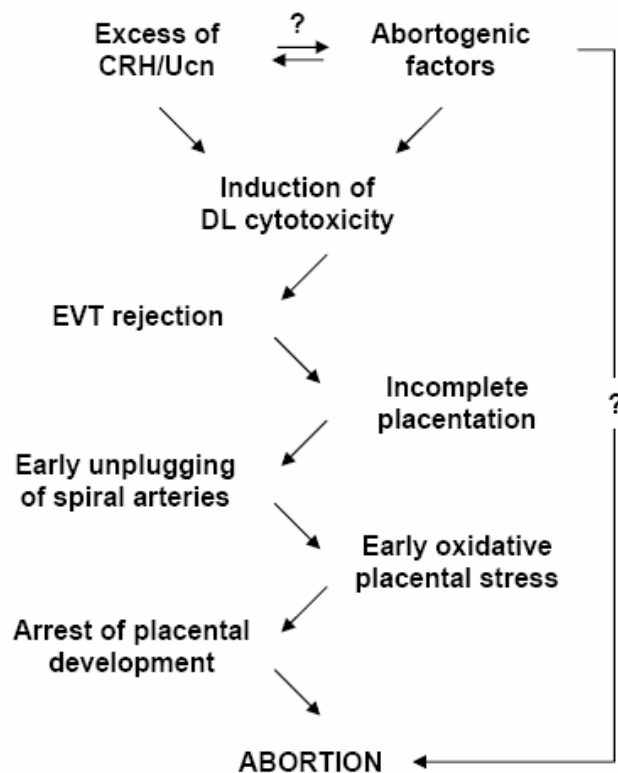
Συνοπτικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη παρούσα διατριβή συσχετίζουν τις αυτόματες αποβολές στους ανθρώπους με την ενεργοποίηση των φθαρτικών λεμφοκυττάρων από τους CRF και UCN (**εικόνα 2**) και την κυτταροτοξική δράση των πρώτων πάνω στους ΕΛΤ (**εικόνα 3**). Προτείνεται ότι ο ανωτέρω μηχανισμός είναι πιθανό να διαταράσσει την φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα κατά τα πρώιμα στάδια της κύησης αποτελώντας τμήμα της αλληλουχίας των γεγονότων που οδηγούν στην αυτόματη αποβολή (**εικόνα 4**). Ωστόσο, αναγνωρίζεται η σημαντική ανάγκη περαιτέρω μελετών προκειμένου να διευκρινιστεί με σαφήνεια η σχέση αιτίας και αιτιατού ανάμεσα στον περιγραφόμενο μηχανισμό και τις αυτόματες αποβολές.



Εικόνα 2. Τα νευροπεπτίδια CRF και UCN που παράγονται στον φθαρό δρουν τοπικά μέσω του CRFR1 στα λεμφοκύτταρα της περιοχής επάγοντας σε αυτά την έκφραση της μεμβρανικής μορφής του FasL πεπτιδίου.



Εικόνα 3. Στις αυτόματες αποβολές τα φθαρικά λεμφοκύτταρα (DL) είναι δυνατό να επιτίθενται στους εξωλαχνωτούς τροφοβλάστες (EVT) προκαλώντας απόπτωση (aEVT) μέσω της αλληλεπίδρασης του συστήματος Fas/FasL και πιθανά και άλλων μηχανισμών.



Εικόνα 4. Προτεινόμενο μοντέλο για τον μηχανισμό με τον οποίο οι CRF και UCN πιθανά εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία των αυτόματων αποβολών.

5.7. Προοπτικές.

Μία από τις πλέον ενδιαφέρουσες προκλήσεις της Αναπαραγωγικής Ιατρικής είναι η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης και της ακόλουθης πλακουντιοποίησης. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών της πλακουντιοποίησης αναμένεται να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση καταστάσεων οι οποίες σχετίζονται με ελαττωματική πλακουντιοποίηση.

Στη παρούσα μελέτη περιγράφεται ένας μηχανισμός με τον οποίο το νευροπεπτίδιο CRF συμμετέχει στη ρύθμιση της φυσιολογικής διείσδυσης των κυττάρων ΕΛΤ στη μήτρα μέσω ρύθμισης του μορίου CEACAM1. Ωστόσο ο ρόλος του CRF στη ρύθμιση της διεισδυτικότητας των τροφοβλαστών είναι πιθανά ευρύτερος και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Για παράδειγμα, σημαντικά μόρια τα

οποία έχουν συσχετιστεί με τη διεισδυτικότητα των κυττάρων αυτών είναι οι ιντεγκρίνες. Πρώιμα αποτελέσματα από το εργαστήριό μας δείχνουν ότι ο CRF ρυθμίζει την έκφραση συγκεκριμένων ιντεγκρινών στην ΕΛΤ. Ακόμα περισσότερο άγνωστος είναι ο πιθανός ρόλος της UCN στους συγκεκριμένους μηχανισμούς, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκαν και οι UCNII, UCNIII στον ανθρώπινο πλακούντα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πρόσθετα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της διάμεσης διείσδυσης των τροφοβλαστών όπως η οστεοποντίνη, και οι μεταλλο-πρωτεΐνες πιθανόν να σχετίζονται με τα ανωτέρω νευροπεπτίδια.

Στη παρούσα μελέτη περιγράφεται επίσης ένας μηχανισμός, ο οποίος είναι πιθανό να αποτελεί μέρος των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της μήτρας και σχετίζονται με τις αυτόματες αποβολές. Ωστόσο, πολλά σημεία είναι ακόμα ασαφή και απαιτούν εκτεταμένη διερεύνηση. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια επιπρόσθετων μελετών με τέτοιο σχεδιασμό ώστε το υλικό που λαμβάνεται από τις αποβολές, να λαμβάνεται το δυνατόν συντομότερα μετά τον εμβρυικό θάνατο. Με αυτό τον τρόπο θα διευκρινιστεί ο ακριβής ρόλος του περιγραφόμενου μηχανισμού στη διαδικασία των αυτόματων αποβολών. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο CRF περιορίζει τη διεισδυτική ικανότητα της ΕΛΤ, είναι σημαντικό μελλοντικές μελέτες στο πεδίο να εστιάσουν στις αιτίες που πυροδοτούν την τοπική υπερπαραγωγή των CRF και UCN στις αποβολές. Είναι πιθανό, η αύξηση των επιπέδων των CRF (ή/και UCN) να σχετίζεται με μια ελαττωματική πλακουντιοποίηση, τόσο έμμεσα λόγω της δράσης στα φθαρτικά λεμφοκύτταρα, όσο και άμεσα λόγω της επίδρασης πάνω στη διεισδυτικότητα των τροφοβλαστών. Η συγκεκριμένη υπόθεση βρίσκεται υπό μελέτη στο εργαστήριό μας.

Επιπρόσθετες ερευνητικές κατευθύνσεις προς την κατανόηση των διαταραχών πλακουντιοποίησης σε μοριακό επίπεδο είναι οι εξής: (α) Η μελέτη της ρύθμισης σε τόπο και χρόνο της έκφρασης των «υποδοχέων θανάτου» στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη. Όπως συζητήθηκε ανωτέρω, υπάρχουν ήδη δεδομένα που προτείνουν ότι οι υποδοχείς αυτοί παρουσιάζουν διάφορη έκφραση στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της διεισδυτικής τροφοβλάστης. (β) Η διερεύνηση των μηχανισμών αναστολής της κυτταροτοξικότητας των φθαρτικών λεμφοκυττάρων στη φυσιολογική κύηση, καθώς και της ενεργοποίησης διαφόρων κυτταροτοξικών μηχανισμών στις αποβολές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abadia-Molina AC, Ruiz C, Montes MJ, King A, Loke YW, Olivares EG** 1996 Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *J Reprod Immunol* 31:109-23
- Aboagye-Mathiesen G, Zdravkovic M, Toth FD, Ebbesen P** 1997 Effects of human trophoblast-induced interferons on the expression of proto-oncogenes c-fms/CSF-1R, EGF-R and c-erbB2 in invasive and non-invasive trophoblast. *Placenta* 18:155-61
- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G** 2004 First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10:55-63
- Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA** 2000 Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 96:271-6
- Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, Cossarizza A, Franceschi C, Muscettola M, Genazzani AD, Surico N, Genazzani AR** 1993 Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 53:1735-42
- Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB** 2001 Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 142:446-54
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G** 2002 Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 66:1853-61
- Ashe PC, Berry MD** 2003 Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:199-214
- Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MB, Bock E, Obrink B** 1990 The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett* 264:267-9
- Baigent SM** 2001 Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809-20
- Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Gotze J, Brummer J, Schulte HM, Wagener C, Loning T** 1998 Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol* 152:1401-6
- Bamberger AM, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A** 2000 The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 156:1165-70

- Bamberger CM, Bamberger AM** 2000 The peripheral CRH/urocortin system. *Ann N Y Acad Sci* 917:290-6
- Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergun S, Beil FU, Schulte HM** 1998 Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 83:708-11
- Barnett TR, Kretschmer A, Austen DA, Goebel SJ, Hart JT, Elting JJ, Kamarek ME** 1989 Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol* 108:267-76
- Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarstrom S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M, Lin SH, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Obrink B, Shively JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watt S, Zimmermann W** 1999 Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 252:243-9
- Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A** 1997 Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 14:783-90
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC** 1995 A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-2
- Berkowitz GS, Lapinski RH, Lockwood CJ, Florio P, Blackmore-Prince C, Petraglia F** 1996 Corticotropin-releasing factor and its binding protein: maternal serum levels in term and preterm deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 174:1477-83
- Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE** 1999 Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 415:285-312
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B** 2004 Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 11:90-8
- Blankenship TN, Enders AC, King BF** 1993 Trophoblastic invasion and the development of uteroplacental arteries in the macaque: immunohistochemical localization of cytokeratins, desmin, type IV collagen, laminin, and fibronectin. *Cell Tissue Res* 272:227-36
- Brar A** 2002 Decidua as an endocrine organ. In: Glasser S, Aplin J, Giudice L, Tabibzadeh S (eds) *The Endometrium*. Taylor and Francis, London, pp. 308-323
- Briese J, Oberndorfer M, Patschenik C, Schulte HM, Makrigiannakis A, Loning T, Bamberger AM** 2005 Osteopontin (OPN) is colocalized with the adhesion molecule

- CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J Clin Endocrinol Metab*
- Brosens IA** 1977 Morphological changes in the utero-placental bed in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol* 4:573-93
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA** 2002 The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 187:1416-23
- Brummer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Loning T, Bamberger AM, Wagener C** 2001 cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol* 159:537-46
- Brummer J, Neumaier M, Gopfert C, Wagener C** 1995 Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-55
- Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N** 2003 Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15:167-76
- Budt M, Cichocka I, Reutter W, Lucka L** 2002 Clustering-induced signaling of CEACAM1 in PC12 cells. *Biol Chem* 383:803-12
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D** 1991 Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 6:791-8
- Burton GJ, Jauniaux E** 2004 Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11:342-52
- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL** 1999 Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 181:718-24
- Campbell EA, Linton EA, Wolfe CD, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ** 1987 Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1054-9
- Castracane VD** 2000 Endocrinology of preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 43:717-26
- Challis JR** 1995 CRH, a placental clock and preterm labour. *Nat Med* 1:416
- Chan EC, Falconer J, Madsen G, Rice KC, Webster EL, Chrousos GP, Smith R** 1998 A corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist delays parturition in sheep. *Endocrinology* 139:3357-60
- Chatzaki E, Margioris AN, Gravanis A** 2002 Expression and regulation of corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals. *J Neurochem* 80:81-90

- Chatzaki E, Murphy BJ, Wang L, Million M, Ohning GV, Crowe PD, Petroski R, Tache Y, Grigoriadis DE** 2004 Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. *J Neurochem* 88:1-11
- Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W** 2004 Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 145:2445-57
- Chen A, Vaughan J, Vale WW** 2003 Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 17:1622-39
- Chen AM, Perrin MH, Digruccio MR, Vaughan JM, Brar BK, Arias CM, Lewis KA, Rivier JE, Sawchenko PE, Vale WW** 2005 A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2620-5
- Chen CP, Aplin JD** 2003 Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta* 24:316-25
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW** 1993 Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8967-71
- Chen Y, Hatalski CG, Brunson KL, Baram TZ** 2001 Rapid phosphorylation of the CRE binding protein precedes stress-induced activation of the corticotropin releasing hormone gene in medial parvocellular hypothalamic neurons of the immature rat. *Brain Res Mol Brain Res* 96:39-49
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM** 1997 Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966-8
- Chrousos GP** 1995 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351-62
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM** 1998 Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:554-9
- Clifton VL, Gu Q, Murphy VE, Schwartz J, Madsen G, Smith R, Qing G** 2000 Localization and characterization of urocortin during human pregnancy. *Placenta* 21:782-8
- Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Giles WB, Boura AL, Robinson PJ, Smith R** 1995 Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal-placental

- circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2888-93
- Clifton VL, Telfer JF, Thompson AJ, Cameron IT, Teoh TG, Lye SJ, Challis JR** 1998 Corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin-derived peptides are present in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3716-21
- Croy BA, Chapeau C** 1990 Evaluation of the pregnancy immunotrophism hypothesis by assessment of the reproductive performance of young adult mice of genotype scid/scid.bg/bg. *J Reprod Fertil* 88:231-9
- Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD** 2001 Spontaneous abortion. In: Cunningham FG, Williams JW. *Williams obstetrics*. 21st ed. New York: McGraw-Hill:856-69
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ** 1992 Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 89:210-22
- Dautzenberg FM, Hauger RL** 2002 The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-7
- Dautzenberg FM, Higelin J, Teichert U** 2000 Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Eur J Pharmacol* 390:51-9
- de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C** 1998 The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 39:149-66
- Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A** 1989 Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 136:190-203
- Dempsey EW** 1972 The development of capillaries in the villi of early human placentas. *Am J Anat* 134:221-37
- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN** 2002 Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:12280-7
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H** 2004 Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341-73
- Dieterich KD, Grigoriadis DE, De Souza EB** 1996 Homologous desensitization of human corticotropin-releasing factor1 receptor in stable transfected mouse fibroblast cells. *Brain Res* 710:287-92

- DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ** 1999 Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 155:293-301
- Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C, Haubeck HD** 1991 Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett* 56:173-9
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X** 2000 Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42
- Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO** 2003 Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 7:151-61
- Ebrahimnejad A, Flayeh R, Unteregger G, Wagener C, Brummer J** 2000 Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 260:365-73
- Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst AK, Wagener C, Bamberger AM, Brummer J** 2004 CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 165:1781-7
- Ejima K, Koji T, Tsuruta D, Nanri H, Kashimura M, Ikeda M** 2000 Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides: possible involvement of Fas/Fas ligand system. *Biol Reprod* 62:178-85
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S** 1998 A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50
- Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K** 2001 Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet* 73:229-35
- Ertzeid G, Storeng R** 2001 The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 16:221-5
- Ettinger R, Panka DJ, Wang JK, Stanger BZ, Ju ST, Marshak-Rothstein A** 1995 Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. *J Immunol* 154:4302-8
- Everett C** 1997 Incidence and outcome of bleeding before the 20th week of pregnancy: prospective study from general practice. *Bmj* 315:32-4
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM** 1992 Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-16

- Felsenfeld DP, Schwartzberg PL, Venegas A, Tse R, Sheetz MP** 1999 Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1:200-6
- Ferrari A, Petraglia F, Gurbide E** 1995 Corticotropin releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54:251-5
- Fisher SJ, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J, Damsky CH** 1989 Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 109:891-902
- Fisher SJ, Damsky CH** 1993 Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* 4:183-8
- Florio P, Arcuri F, Ciarmela P, Runci Y, Romagnoli R, Cintorino M, Di Blasio AM, Petraglia F** 2002 Identification of urocortin mRNA and peptide in the human endometrium. *J Endocrinol* 173:R9-14
- Florio P, Franchini A, Reis FM, Pezzani I, Ottaviani E, Petraglia F** 2000 Human placenta, chorion, amnion and decidua express different variants of corticotropin-releasing factor receptor messenger RNA. *Placenta* 21:32-7
- Florio P, Lombardo M, Gallo R, Di Carlo C, Sutton S, Genazzani AR, Petraglia F** 1996 Activin A, corticotropin-releasing factor and prostaglandin F2 alpha increase immunoreactive oxytocin release from cultured human placental cells. *Placenta* 17:307-11
- Florio P, Severi FM, Ciarmela P, Fiore G, Calonaci G, Merola A, De Felice C, Palumbo M, Petraglia F** 2002 Placental stress factors and maternal-fetal adaptive response: the corticotropin-releasing factor family. *Endocrine* 19:91-102
- Florio P, Torricelli M, De Falco G, Leucci E, Giovannelli A, Gazzolo D, Severi FM, Bagnoli F, Leoncini L, Linton EA, Petraglia F** 2006 High maternal and fetal plasma urocortin levels in pregnancies complicated by hypertension. *J Hypertens* 24:1831-40
- Florio P, Vale W, Petraglia F** 2004 Urocortins in human reproduction. *Peptides* 25:1751-7
- Frendo JL, Therond P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB, Evain-Brion D** 2001 Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142:3638-48
- Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Füzesi L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG** 1997 Parent cell lines for trophoblast hybridization II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPT-negative mutants of the choriocarcinoma cell line JEG-3. *Trophoblast Res* 10:191-201

- Garcia-Enguidanos A, Calle ME, Valero J, Luna S, Dominguez-Rojas V** 2002 Risk factors in miscarriage: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 102:111-9
- Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG** 1997 Parent cells for trophoblast hybridization I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human chorion laeve. *Trophoblast Res* 10:181-190
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ** 1997 Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277:1669-72
- Giancotti FG, Ruoslahti E** 1999 Integrin signaling. *Science* 285:1028-32
- Gill TJ, 3rd** 1986 Immunological and genetic factors influencing pregnancy and development. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 10:116-20
- Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, Brown LS, Jr., Frantz AG** 1986 High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1199-203
- Graham CH, Postovit LM, Park H, Canning MT, Fitzpatrick TE** 2000 Adriana and Luisa Castellucci award lecture 1999: role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion. *Placenta* 21:443-50
- Grammatopoulos D, Dai Y, Chen J, Karteris E, Papadopoulou N, Easton AJ, Hillhouse EW** 1998 Human corticotropin-releasing hormone receptor: differences in subtype expression between pregnant and nonpregnant myometria. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2539-44
- Grammatopoulos D, Milton NG, Hillhouse EW** 1994 The human myometrial CRH receptor: G proteins and second messengers. *Mol Cell Endocrinol* 99:245-50
- Grammatopoulos D, Stirrat GM, Williams SA, Hillhouse EW** 1996 The biological activity of the corticotropin-releasing hormone receptor-adenylate cyclase complex in human myometrium is reduced at the end of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:745-51
- Grammatopoulos DK, Chrousos GP** 2002 Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13:436-44
- Grammatopoulos DK, Dai Y, Randeve HS, Levine MA, Karteris E, Easton AJ, Hillhouse EW** 1999 A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol* 13:2189-202
- Grammatopoulos DK, Hillhouse EW** 1999 Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 354:1546-9

- Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Kanellopoulou KA, Hillhouse EW** 2001 Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem* 76:509-19
- Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW** 2000 Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol Endocrinol* 14:2076-91
- Gravanis A, Margioris AN** 2005 The corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in inflammation: potential therapeutic applications. *Curr Med Chem* 12:1503-12
- Green DR, Ware CF** 1997 Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5986-90
- Greenwold N, Jauniaux E, Gulbis B, Hempstock J, Gervy C, Burton GJ** 2003 Relationship among maternal serum endocrinology, placental karyotype, and intervillous circulation in early pregnancy failure. *Fertil Steril* 79:1373-9
- Greicius G, Severinson E, Beauchemin N, Obrink B, Singer BB** 2003 CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol* 74:126-34
- Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA** 1996 CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5:7-16
- Gulan G, Podack ER, Rukavina D, Gudelj L, Rubesa G, Petrovic O, Johnson PM, Christmas SE** 1997 Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 38:9-18
- Hacker G, Vaux DL** 1995 Apoptosis. A sticky business. *Curr Biol* 5:622-4
- Hammer A, Dohr G** 2000 Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 46:83-90
- Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM** 2003 Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* 306:794-803
- Hees H, Moll W, Wrobel KH, Hees I** 1987 Pregnancy-induced structural changes and trophoblastic invasion in the segmental mesometrial arteries of the guinea pig (*Cavia porcellus* L.). *Placenta* 8:609-26

- Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ** 2003 The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 34:1265-75
- Hengartner MO** 2000 The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-6
- Hertig AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC** 1959 Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 23:202-11
- Hillhouse EW, Grammatopoulos DK** 2002 Role of stress peptides during human pregnancy and labour. *Reproduction* 124:323-9
- Hinoda Y, Neumaier M, Hefta SA, Drzeniek Z, Wagener C, Shively L, Hefta LJ, Shively JE, Paxton RJ** 1988 Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6959-63
- Hoare SR, Sullivan SK, Fan J, Khongsaly K, Grigoriadis DE** 2005 Peptide ligand binding properties of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor: pharmacology of endogenously expressed receptors, G-protein-coupling sensitivity and determinants of CRF2 receptor selectivity. *Peptides* 26:457-70
- Hobel CJ, Dunkel-Schetter C, Roesch SC, Castro LC, Arora CP** 1999 Maternal plasma corticotropin-releasing hormone associated with stress at 20 weeks' gestation in pregnancies ending in preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 180:S257-63
- Houston A, O'Connell J** 2004 The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 4:321-6
- Hsu SY, Hsueh AJ** 2001 Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7:605-11
- Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P** 1998 Apoptosis along the invasive trophoblastic pathway. *Placenta* 19:A35
- Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P** 1998 Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 110:495-508
- Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P** 1999 Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 79:1687-702
- Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC** 2006 Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195:29-39
- Huppertz B, Tews DS, Kaufmann P** 2001 Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol* 205:215-53
- Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP** 1990 Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta* 11:477-86

- Hustin J, Schaaps JP** 1987 Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 157:162-8
- Imperatore A, Florio P, Torres PB, Torricelli M, Galleri L, Toti P, Occhini R, Picciolini E, Vale W, Petraglia F** 2006 Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 195:288-95
- Inagaki K, Yamao T, Noguchi T, Matozaki T, Fukunaga K, Takada T, Hosooka T, Akira S, Kasuga M** 2000 SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *Embo J* 19:6721-31
- Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T** 2002 Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 186:158-66
- Jaffe R, Woods JR, Jr.** 1993 Color Doppler imaging and in vivo assessment of the anatomy and physiology of the early uteroplacental circulation. *Fertil Steril* 60:293-7
- Jauniaux E, Burton GJ** 2005 Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss. *Placenta* 26:114-23
- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ** 2003 Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 162:115-25
- Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S** 1991 In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1:435-45
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ** 2000 Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111-22
- Jeske W, Soszynski P, Lukaszewicz E, Debski R, Latoszevska W, Rogozinski W, Snochowska H, Zgliczynski S** 1990 Enhancement of plasma corticotropin-releasing hormone in pregnancy-induced hypertension. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122:711-4
- Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke YW** 1994 Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol* 153:4427-35
- Jones SA, Challis JR** 1989 Local stimulation of prostaglandin production by corticotropin-releasing hormone in human fetal membranes and placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 159:192-9

- Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kaufmann P, Huppertz B** 2003 Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 24:540-8
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Mastorakos G, Chrousos GP** 2003 Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 997:129-35
- Kam EP, Gardner L, Loke YW, King A** 1999 The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod* 14:2131-8
- Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP** 1991 Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421-3
- Karteris E, Goumenou A, Koumantakis E, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK** 2003 Reduced expression of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 alpha in human preeclamptic and growth-restricted placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:363-70
- Karteris E, Grammatopoulos D, Randeve H, Hillhouse EW** 2000 Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1989-96
- Karteris E, Grammatopoulos DK, Randeve HS, Hillhouse EW** 2001 The role of corticotropin-releasing hormone receptors in placenta and fetal membranes during human pregnancy. *Mol Genet Metab* 72:287-96
- Karteris E, Hillhouse EW, Grammatopoulos D** 2004 Urocortin II is expressed in human pregnant myometrial cells and regulates myosin light chain phosphorylation: potential role of the type-2 corticotropin-releasing hormone receptor in the control of myometrial contractility. *Endocrinology* 145:890-900
- Karteris E, Papadopoulou N, Grammatopoulos DK, Hillhouse EW** 2004 Expression and signalling characteristics of the corticotrophin-releasing hormone receptors during the implantation phase in the human endometrium. *J Mol Endocrinol* 32:21-32
- Karteris E, Randeve HS, Grammatopoulos DK, Jaffe RB, Hillhouse EW** 2001 Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4512-9
- Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK** 2005 Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway by corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-related peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3680-7
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B** 2003 Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69:1-7

- Kaufmann SH, Hengartner MO** 2001 Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-34
- Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A** 1999 Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2188-94
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57
- Kiang JG, Ding XZ, Gist ID, Jones RR, Tsokos GC** 1998 Corticotropin-releasing factor induces phosphorylation of phospholipase C-gamma at tyrosine residues via its receptor 2beta in human epidermoid A-431 cells. *Eur J Pharmacol* 363:203-10
- King A** 2000 Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 6:28-36
- King A, Loke YW** 1990 Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2-stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 129:435-48
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME** 1995 Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14:5579-88
- Klimaviciute A, Calciolari J, Bertucci E, Abelin-Tornblom S, Stjernholm-Vladic Y, Bystrom B, Petraglia F, Ekman-Ordeberg G** 2006 Corticotropin-releasing hormone, its binding protein and receptors in human cervical tissue at preterm and term labor in comparison to non-pregnant state. *Reprod Biol Endocrinol* 4:29
- Kokawa K, Shikone T, Nakano R** 1998 Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 19:21-6
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL** 2003 Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198:1201-12
- Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR** 1998 Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1585-91
- Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL** 1998 Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 12:1077-85
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT** 1997 Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-8

- Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL, Redman CW** 2003 Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta* 1638:63-71
- Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJ, Nagel G, van der Schoot CE, Grunert F, Roos D** 1992 CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J Cell Biol* 118:457-66
- Laatikainen T, Virtanen T, Kaaja R, Salminen-Lappalainen K** 1991 Corticotropin-releasing hormone in maternal and cord plasma in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 39:19-24
- Leitch IM, Boura AL, Botti C, Read MA, Walters WA, Smith R** 1998 Vasodilator actions of urocortin and related peptides in the human perfused placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4510-3
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R** 1998 Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1:553-63
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW** 2001 Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7570-5
- Li C, Chen P, Vaughan J, Blount A, Chen A, Jamieson PM, Rivier J, Smith MS, Vale W** 2003 Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 144:3216-24
- Li W, Challis JR** 2005 Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6569-74
- Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB** 1996 Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 137:72-7
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG** 1993 Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 151:4562-73
- Liu Z, Sun QH, Yang Y, Liu JM, Peng JP** 2003 Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. *Cytokine* 24:201-9

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G** 1999 Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6:516-24
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB** 1995 CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136:4139-42
- Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK** 2003 Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2963-8
- Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiannis V, Athanassiou A, Theoharides TC** 2003 High levels of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase, and interleukin-8 in spontaneous abortions. *Endocrinology* 144:2285-90
- Majzoub JA, McGregor JA, Lockwood CJ, Smith R, Taggart MS, Schulkin J** 1999 A central theory of preterm and term labor: putative role for corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 180:S232-41
- Makrigiannakis A, Margioris AN, Chatzaki E, Zoumakis E, Chrousos GP, Gravanis A** 1999 The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5:789-96
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP** 2006 Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab*
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP** 2001 Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2:1018-24
- Manaseki S, Searle RF** 1989 Natural killer (NK) cell activity of first trimester human decidua. *Cell Immunol* 121:166-73
- Mano-Otagiri A, Shibasaki T** 2004 Distribution of urocortin 2 and urocortin 3 in rat brain. *J Nippon Med Sch* 71:358-9
- Marzi M, Viganò A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M** 1996 Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106:127-33
- Mayhew TM** 2001 Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 16:1213-24

- McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R** 1995 A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* 1:460-3
- Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A** 1994 A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 101:669-74
- Medawar PB** 1953 Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 7:320-338
- Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA** 1996 Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 271:16260-2
- Mellor AL, Munn DH** 2001 Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol* 13:213-8
- Michel MZ, Khong TY, Clark DA, Beard RW** 1990 A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 97:984-8
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW** 1996 X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381:335-41
- Muller MM, Singer BB, Klaile E, Obrink B, Lucka L** 2005 Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood* 105:3925-34
- Murakoshi H, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T** 2003 Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocr J* 50:199-207
- Nair KS, Zingde SM** 2001 Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol* 208:96-106
- Ober C** 1998 HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet* 62:1-5
- Oh ES, Gu H, Saxton TM, Timms JF, Hausdorff S, Frevert EU, Kahn BB, Pawson T, Neel BG, Thomas SM** 1999 Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol Cell Biol* 19:3205-15
- Olivares EG, Munoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gomez-Molina F, Abadia-Molina AC** 2002 Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67:1211-7
- Parham P** 2004 NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 200:951-5
- Parkes DG, Weisinger RS, May CN** 2001 Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides* 22:821-7
- Perkins AV, Linton EA, Eben F, Simpson J, Wolfe CD, Redman CW** 1995 Corticotrophin-releasing hormone and corticotrophin-releasing hormone binding

- protein in normal and pre-eclamptic human pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 102:118-22
- Perrin MH, Sutton S, Bain DL, Berggren WT, Vale WW** 1998 The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin. *Endocrinology* 139:566-70
- Perrin MH, Vale WW** 1999 Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885:312-28
- Petraglia F, Florio P, Benedetto C, Gallo C, Woods RJ, Genazzani AR, Lowry PJ** 1996 High levels of corticotropin-releasing factor (CRF) are inversely correlated with low levels of maternal CRF-binding protein in pregnant women with pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 81:852-6
- Petraglia F, Florio P, Benedetto C, Marozio L, Di Blasio AM, Ticconi C, Piccione E, Luisi S, Genazzani AR, Vale W** 1999 Urocortin stimulates placental adrenocorticotropin and prostaglandin release and myometrial contractility in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1420-3
- Petraglia F, Florio P, Gallo R, Simoncini T, Saviozzi M, Di Blasio AM, Vaughan J, Vale W** 1996 Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3807-10
- Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W** 1987 Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* 328:717-9
- Petraglia F, Tabanelli S, Galassi MC, Garuti GC, Mancini AC, Genazzani AR, Gurrpide E** 1992 Human decidua and in vitro decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF messenger ribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1427-31
- Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S** 1998 Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4:1020-4
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I** 1983 Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4:397-413
- Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I** 1980 Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1:3-19
- Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G** 1981 Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2:71-91

- Ramkumar T, Adler S** 1999 A requirement for the POU transcription factor, Brn-2, in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol Endocrinol* 13:1237-48
- Rasch V** 2003 Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:182-8
- Reed JC** 1997 Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-6
- Reis FM, Luisi S, Florio P, Degrassi A, Petraglia F** 2002 Corticotropin-releasing factor, urocortin and endothelin-1 stimulate activin A release from cultured human placental cells. *Placenta* 23:522-5
- Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E** 1986 Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409:127-47
- Reubi JC, Waser B, Vale W, Rivier J** 2003 Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3312-20
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE** 2001 Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2843-8
- Riley SC, Walton JC, Herlick JM, Challis JR** 1991 The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1001-7
- Ritson A, Bulmer JN** 1989 Isolation and functional studies of granulated lymphocytes in first trimester human decidua. *Clin Exp Immunol* 77:263-8
- Rojas M, Fuks A, Stanners CP** 1990 Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca²⁺(+)-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 1:527-33
- Rudel T, Bokoch GM** 1997 Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-4
- Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER** 1995 Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 33:394-404
- Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, Dipasquale B, Guller S** 1996 Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3119-22

- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y** 1999 Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401:168-73
- Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, Ichijo M** 1993 Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 5:559-63
- Sakahira H, Enari M, Nagata S** 1998 Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-9
- Sanchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR** 1999 Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol* 408:365-77
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW** 2006 Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 13:680-6
- Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H** 2005 Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* 26:1196-206
- Savion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A, Toder V** 2002 Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 47:118-27
- Schlegel RA, Stevens M, Lumley-Sapanski K, Williamson P** 1993 Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunol Lett* 36:283-8
- Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JF** 1975 An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 116:129-38
- Sehringer B, Zahradnik HP, Deppert WR, Simon M, Noethling C, Schaefer WR** 2005 Evaluation of different strategies for real-time RT-PCR expression analysis of corticotropin-releasing hormone and related proteins in human gestational tissues. *Anal Bioanal Chem* 383:768-75
- Sehringer B, Zahradnik HP, Simon M, Ziegler R, Noethling C, Schaefer WR** 2004 mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing hormone, urocortin, CRH-binding protein and CRH receptors in human term gestational tissues determined by real-time quantitative RT-PCR. *J Mol Endocrinol* 32:339-48
- Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M** 2004 Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89:965-70
- Seth KA, Majzoub JA** 2001 Repressor element silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) can act as an enhancer as well as a

- repressor of corticotropin-releasing hormone gene transcription. *J Biol Chem* 276:13917-23
- Singer GG, Abbas AK** 1994 The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1:365-71
- Singh VK** 1989 Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J Neuroimmunol* 23:257-62
- Singh VK, Leu SJ** 1990 Enhancing effect of corticotropin-releasing neurohormone on the production of interleukin-1 and interleukin-2. *Neurosci Lett* 120:151-4
- Skubitz KM, Campbell KD, Ahmed K, Skubitz AP** 1995 CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 155:5382-90
- Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP** 2000 Synthetic peptides of CD66a stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Immunol* 164:4257-64
- Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J** 2004 Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145:941-50
- Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET** 2001 Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb J* 15:1678-93
- Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB** 1998 Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2916-20
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM** 1997 Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 177:1395-401
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W** 1981 Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6517-21
- Stallmach T, Ehrenstein T, Isenmann S, Muller C, Hengartner H, Kagi D** 1995 The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur J Immunol* 25:3342-8
- Suda T, Iwashita M, Tozawa F, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K** 1988 Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1278-83
- Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T** 2004 Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 25:1689-701

- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S** 1993 Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-78
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G** 1999 Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-6
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G** 1996 Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184:1331-41
- Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Obrink B** 1987 Trophoblast surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development* 100:653-60
- Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Obrink B** 1990 Expression of cellCAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones. *J Reprod Fertil* 88:213-21
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S** 2004 Urocortins as cardiovascular peptides. *Peptides* 25:1723-31
- Tangri S, Wegmann TG, Lin H, Raghupathy R** 1994 Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immunol* 152:4903-11
- Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA** 2006 Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol* 176:148-56
- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E** 2000 Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 12:731-7
- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W** 1991 Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5:344-66
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermizaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN** 2006 Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 176:1869-77
- Turbide C, Rojas M, Stanners CP, Beauchemin N** 1991 A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266:309-15
- Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barnes E, Good RA** 1997 Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 3:655-62

- Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohi J, Pellicer A, Simon C** 2001 Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril* 76:962-8
- Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J** 1983 Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog Horm Res* 39:245-70
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J** 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-7
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al.** 1995 Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378:287-92
- Venihaki M, Zhao J, Karalis KP** 2003 Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 141:3-9
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL** 2000 Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53
- von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM** 2003 Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta* 24:929-40
- Wajant H** 2002 The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296:1635-6
- Warren WB, Gurewitsch ED, Goland RS** 1995 Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenal hormones in pregnancies complicated by chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 172:661-6
- Warren WB, Patrick SL, Goland RS** 1992 Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 166:1198-204; discussion 1204-7
- Warren WB, Silverman AJ** 1995 Cellular localization of corticotropin releasing hormone in the human placenta, fetal membranes and decidua. *Placenta* 16:147-56
- Watanabe F, Oki Y, Ozawa M, Masuzawa M, Iwabuchi M, Yoshimi T, Nishiguchi T, Iino K, Sasano H** 1999 Urocortin in human placenta and maternal plasma. *Peptides* 20:205-9
- Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E, Burton GJ** 1997 Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta* 18:295-9

- Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ** 1998 Susceptibility of human placental syncytiotrophoblastic mitochondria to oxygen-mediated damage in relation to gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1697-705
- Westphal NJ, Seasholtz AF** 2006 CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front Biosci* 11:1878-91
- Wetzka B, Sehringer B, Schafer WR, Biller S, Hor C, Benedek E, Deppert WR, Zahradnik HP** 2003 Expression patterns of CRH, CRH receptors, and CRH binding protein in human gestational tissue at term. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111:154-61
- Wheeler JE, Gersel DJ, Kraus FT** 2002 in *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract* (ed. Kurman RJ) 630-633 & 1111-1113 (Springer, New York)
- Widmann C, Gibson S, Johnson GL** 1998 Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 273:7141-7
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC** 1988 Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 319:189-94
- Wyllie AH** 1987 Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153:313-6
- Yuan J, Yankner BA** 2000 Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-9
- Zhao L, Donaldson CJ, Smith GW, Vale WW** 1998 The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics* 50:23-33
- Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW** 1998 Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6785-90
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH** 1997 Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 99:2139-51
- Zoumakis E, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Margioris AN, Angelakis E, Koumantakis E, Gravanis A** 2001 Cycle and age-related changes in corticotropin-releasing hormone levels in human endometrium and ovaries. *Gynecol Endocrinol* 15:98-102
- Zoumakis E, Margioris AN, 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* 20:158-67
- Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Gravanis A** 2000 Corticotrophin-releasing hormone (CRH)

interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 6:344-51