



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



**ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΔΙΑΛΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ CRF ΚΑΙ UCN ΣΤΗΝ  
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΤΗΣ ΕΞΩΛΑΧΝΩΤΗΣ  
ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ  
ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ  
ΝΟΣΩΝ ΜΕ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΟΠΩΣ Η  
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΕΤΣΑΣ**  
**ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

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)

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003, 03ΕΔ626.

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Μακρυγιαννάκης Αντώνιος (Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

**Συμβουλευτική Επιτροπή:**

Μακρυγιαννάκης Αντώνιος (Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος (Καθηγητής Χημείας)

Τσατσάνης Χρήστος (Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Χημείας)

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Μακρυγιαννάκης Αντώνιος (Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος (Καθηγητής Χημείας)

Τσατσάνης Χρήστος (Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Χημείας)

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος (Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

Μακρυδήμας Γεώργιος (Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

Ρελάκης Κωνσταντίνος (Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας)

Παπακωνσταντή Ευαγγελία (Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας)

*...στους γονείς μου*

*...στην αδερφή μου*

*...στην Alice μου*

*Ο χρόνος που πέρασες με το τριαντάφυλλό σου  
είναι αυτό που το κάνει ξεχωριστό για σένα.*

**Antoine de Saint – Exupéry**

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ από καρδιάς τον καθηγητή μου Αντώνη Μακρυγιαννάκη για την αμέριστη και σε όλα τα επίπεδα υποστήριξή του που ήταν καθοριστικής σημασίας για την πραγματοποίηση αυτού του έργου. Η απόφασή του να με εμπιστευθεί ως έναν από τους πρώτους φοιτητές που στελέχωσαν το νεοσύστατο εργαστήριο της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής πριν από μερικά χρόνια, όταν οι γνώσεις και η τεχνική μου κατάρτιση στο πεδίο της εργαστηριακής έρευνας ήταν ελάχιστες, υπήρξε ιδιαίτερα τιμητική. Η ευρεία επιστημονική του γνώση, η μακροχρόνια ερευνητική του εμπειρία αλλά και η απέραντη αισιοδοξία του μπροστά στα εμπόδια και τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν, αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχία της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Ευχαριστώ τους κκ Τσατσάνη Χρήστο και Μαυροθαλασσίτη Γεώργιο, οι οποίοι ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, με καίριες παρεμβάσεις, εποικοδομητική κριτική και εύστοχες παρατηρήσεις βοήθησαν στην υπερπήδηση πολλών εμποδίων που στη διάρκεια αυτής της προσπάθειας συχνά ανέκυπταν. Ρόλο εξίσου σημαντικό στην πορεία αυτών των χρόνων έπαιξαν οι συνεργάτες της 1<sup>ης</sup> Γυναικολογικής Κλινικής του Μονάχου και ιδιαίτερα ο αναπληρωτής καθηγητής Udo Jeschke, του οποίου η συμβολή στη διεκπεραίωση του παρόντος έργου υπήρξε πραγματικά καθοριστική. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα επίσης να εκφράσω στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, αναπληρωτή καθηγητή Ρελάκη Κωνσταντίνο και επίκουρη καθηγήτρια Παπακωνσταντή Ευαγγελία, για την κριτική μελέτη της διατριβής καθώς και στη γραμματέα Μεταπτυχιακών Σπουδών Κα Σοφία Φλουρή για την καθοδήγηση σε θέματα διαδικαστικά.

Από τον κατάλογο των ευχαριστιών δεν θα μπορούσα να παραλείψω το συνεργάτη στο εργαστήριο Βασίλη Μηνά ο οποίος ανέλαβε τη «μύησή» μου στο χώρο της εργαστηριακής έρευνας απαντώντας στην έκκληση μου για βοήθεια κάθε φορά που τη χρειάστηκα αλλά και τα υπόλοιπα παιδιά: Άντα Ρολάκη, Κατερίνα Βεργετάκη, Ειρήνη Ταλιούρη, Γιάννη Χαραλαμπόπουλο, Αριάδνη Ανδρουλιδάκη και Όλγα Ρασούλη τόσο για την πρακτική βοήθειά τους όσο και για την παρουσία τους που έκανε τις ώρες δουλειάς στο εργαστήριο πιο ανθρώπινες.

Τελειώνοντας θα ήθελα να αφιερώσω λίγες γραμμές σε δικούς μου ανθρώπους και φίλους που με στήριξαν και εύχομαι να συνεχίσουν να με στηρίζουν σε κρίσιμες στιγμές της ζωής και της διαδρομής μου. Πολλά ευχαριστώ, για τόσα που δεν έχει νόημα να γραφτούν εδώ, στους: Μανώλη, Εύα, Constance, Ιγνάτιο, Ράνια, Ισμήνη, Ειρήνη, Έφη,

Ελεάνα, Ελένη, Ειρήνη, Όλγα, Ανέστη και Μαίρη. Κι ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στο Νίκο τόσο για την ουσιαστική επικοινωνία όσο και για τη βοήθειά του στη μορφή και τη γλωσσική επεξεργασία του κειμένου.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Χρήστο και Μαρία, την αδερφή μου Σταυρούλα και την Alice μου, γιατί αποτέλεσαν όλα αυτά τα χρόνια το στήριγμα και την κινητήρια δύναμη πίσω από όλες τις προσπάθειές μου. Χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να έχω καν αποτολμήσει αυτό το εγχείρημα, πόσο μάλλον να έχω φθάσει στο σημείο να το ολοκληρώσω σήμερα.



## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **Προσωπικά στοιχεία:**

Όνομα: Γεώργιος

Επώνυμο: Πέτσας

Ημερομηνία γέννησης: 30 Ιουνίου 1977

Τόπος γέννησης: Θεσσαλονίκη

Διεύθυνση: Ερωφίλης 1, Ηράκλειο, Τ.Κ. 71305

Τηλέφωνο: 6948-570659

E-mail: petsas1977@yahoo.gr

**Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος:** Αρ. αδείας: 5184 / 7.8.2003 (7/8/2003), Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ηρακλείου

**Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας Μαιευτικής-Γυναικολογίας:** Αρ. απόφασης: 1341 / 2.4.2013 (2/4/2013), Περιφέρεια Κρήτης

**Ξένες Γλώσσες:** Αγγλικά (πολύ καλά), Γαλλικά (λίγο)

### **Γνώσεις Η/Υ:**

Χρήση Υπολογιστή και Διαχείριση Αρχείων (Windows XP), Επεξεργασία Κειμένου (Word 2002), Υπολογιστικά Φύλλα (Excel 2002), Διαχείριση Πληροφοριών και Επικοινωνίες (Internet Explorer & Outlook Express), Παρουσιάσεις (PowerPoint 2002), Βάσεις Δεδομένων (Access 2002)

### **Εκπαίδευση-Τίτλοι Σπουδών:**

Απολυτήριο λυκείου (1995), βαθμός: 18 κ 3/11.

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης (Ιούλιος 2003), βαθμός: 7 κ 55/100

### **Επαγγελματική δραστηριότητα - εμπειρία:**

- 3 μήνες κλινικής άσκησης –Νευρολογία, Ψυχιατρική, ΩΡΛ, Οφθαλμολογία- στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο L K H του Graz (Αυστρία) στο πλαίσιο του προγράμματος ERASMUS / SOCRATES
- Τρίμηνη εκπαίδευση στα Τμήματα Παθολογικό- Χειρουργικό- Καρδιολογικό και στα αντίστοιχα Εξωτερικά Ιατρεία και Τμήματα Επειγόντων Περιστατικών του Γενικού Νοσοκομείου Σύρου « Βαρδάκειο και Πρώϊο », 24/ 5/ 2004 – 23/ 8/ 2004.
- Υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι. Αρκεσίνης Αμοργού, 24/ 8/ 2004 – 25/ 10/ 2004

- Ασκούμενος σε θέση Ειδικευόμενου Βοηθού στο Χειρουργικό Τμήμα του Γ.Ν.- Κ.Υ. Σητείας, 1/ 11/ 2004 – 31/7/2005
- Ασκούμενος σε θέση υπεράριθμου Ειδικευόμενου Βοηθού στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Πα.Γ.Ν.Η., 1/8/2005 – 31/1/2006
- Ασκούμενος σε θέση Ειδικευόμενου Βοηθού στη Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Γ.Ν. Αγ. Νικολάου, 3/ 9/ 2007– 9/2/2009
- Στρατιωτική θητεία ως ιατρός στο σώμα του Ελληνικού Στρατού Ξηράς 10/2/2009- 10/1/2010
- Ασκούμενος σε θέση Ειδικευόμενου Βοηθού στη Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πα.Γ.Ν.Η, 17/ 5/ 2010– 18/12/2012
- Ασκούμενος σε θέση υπεράριθμου Ιατρού στη Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πα.Γ.Ν.Η, 19/ 12/ 2012– 4/8/2013

#### **Διακρίσεις/Υποτροφίες:**

1. Υπότροφος ως νέος ερευνητής στα πλαίσια του ερευνητικού συμβολαίου ή δραστηριότητας ΠΕΝΕΔ 2003, 03ΕΔ626, προκειμένου να συμμετέχω στην υλοποίηση του έργου: ‘Κυτταρική σηματοδότηση και ανάπτυξη: in vivo και in vitro μελέτη του ρόλου των γονιδίων ETS και CRF στην ανάπτυξη και παθολογία του πλακούντα και του εμβρύου’ του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΙΤΕ (Φεβρουάριος 2006-Ιανουάριος 2009)
2. Χορηγία ‘ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ’ για ενθάρρυνση της έρευνας στο χώρο της Γυναικολογίας στην Ελλάδα, για το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008. Τίτλος έργου: Μηχανισμοί ωοθυλακιογένεσης & ωοθυλακικής δυσλειτουργίας στην πρόωρη εμμηνόπαυση: Ο ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Wilms (WT1) και του μορίου προσκόλλησης N-Cadherin

#### **Συμμετοχή σε Συλλόγους:**

1. Αντιπρόεδρος του Συλλόγου Ειδικευομένων και Υπεράριθμων Ιατρών του Γ.Ν. Αγ. Νικολάου (2007-2008)
2. Αναπληρωματικό μέλος του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γ.Ν. Αγ. Νικολάου (2007-2008)
3. Μέλος του Greek National Chapter of Mediterranean Society for Reproductive Medicine
4. Τακτικό μέλος του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πα.Γ.Ν.Η (2011)

**Συγγραφικό έργο:**

- Makrigiannakis A, Petsas G and Chrousos G P (2007), Eclampsia and Pre-Eclampsia. In: George Fink, (Editor-in-Chief) *Encyclopedia of Stress, Second Edition*, volume 1, pp. 880-884. Oxford: Academic Press.

**Ανακοινώσεις σε διεθνή περιοδικά:**

1. Minas V, Rolaki A, Kalantaridou SN, Sidiropoulos J, Mitrou S, Petsas G, Jeschke U, Paraskevaïdis EA, Fountzilas G, Chrousos GP, Pavlidis N and Makrigiannakis A. Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br J Cancer* 2007; 97(5):637-45
2. Makrigiannakis A, Karamouti M, Petsas G, Makris N, Nikas G, Antsaklis A. The expression of receptivity markers in the fallopian tube epithelium. *Histochem Cell Biol* 2009; 132(2): 159-67
3. Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, Relakis K, Jeschke U. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011; 90(1): 96-104
4. Petsas G, Jeschke U, Richter DU, Minas V, Hammer A, Kalantaridou S, Toth B, Tsatsanis C, Friese K, Makrigiannakis A. Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2012; 18(11): 535-45

**Ανακοινώσεις σε ελληνικά περιοδικά:**

- Πέτσας Γ., Κούκουρα Ο., Σηφάκης Σ., Δελημπαλταδάκης Γ., Κουμαντάκης Ε. Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και κύηση. Θέματα Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τόμος Κ, τ-1, 2006

**Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια:**

1. Anastasakis E., Petsas G., Koukoura O., Delibaltadakis G. Laparoscopic resection of ovarian cysts. 14<sup>th</sup> Annual Congress of the International Society for Gynecologic Endoscopy. London-United Kingdom, 3-6 April 2005
2. Minas V., Sifakis S., Augoustinakis E., Petsas G., Venianaki K., Bamberger A.M., Koumantakis E., Makrigiannakis A. Modulation of human trophoblast invasion through Corticotropin –Releasing Hormone. 12<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology. Florence, 2-5 March 2006

3. Sifakis S., Koukoura O., Mantas N., Papadopoulou E., Petsas G., Konstantinidou A. Prenatal diagnosis of Ivemark syndrome. 17<sup>th</sup> World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. Florence, 7-11 October 2007
4. Minas V., Karamouti M., Rolaki A., Kalantaridou SN., Mitrou S., Petsas G., Paraskevaïdis E., Pavlidis N., Makrighiannakis A. Intratumoral CRH modulates immune-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. 11<sup>th</sup> International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia. Delphi, 25-27 September 2008
5. Vergetaki A., Taliouri E., Neofytou E., Petsas G., Kardari I., Jeschke U., Friese K., Makrighiannakis A. Overexpression of CRH, UCN, CRHR1 and CRHR2 in ectopic endometrium of women with endometriosis. MSRM International Meeting: «Endometriosis-Current Management and Future Trends». Agios Nikolaos-Crete, 21-23 October 2011
6. Vergetaki A., Jeschke U., Taliouri E., Petsas G., Kardari I., Friese K., Makrighiannakis A. The effect of CRH on galectin-1 pattern in endometriosis and galectin-1 expression in ectopic endometrium of women with endometriosis. MSRM International Meeting: «Endometriosis-Current Management and Future Trends». Agios Nikolaos-Crete, 21-23 October 2011
7. Taliouri E., Vergetaki A., Vrekoussis T., Petsas G., Neofytou E., Agorastos T., Makrighiannakis A. Possible correlation between endometriosis and cervical cancer-immune mediated mechanisms? MSRM International Meeting: «Endometriosis-Current Management and Future Trends». Agios Nikolaos-Crete, 21-23 October 2011
8. Petsas G., Jeschke U., Richter D.U., Minas V., Hammer A., Kalantaridou S., Toth B., Tsatsanis C., Friese K., Makrighiannakis A. Aberrant expression of corticotrophin-releasing hormone in preeclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. MSRM International Meeting: «Controversies in Human Reproduction». Agios Nikolaos-Crete, 28-30 September 2012

#### **Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια:**

1. Πέτσας Γ., Πλεξουσάκης Εμμ., Παπανικολάου Κλ., Βλαχάκη Ελ., Χρυσάφης Εμμ., Δελημπαλταδάκης Γ. Μικρού και μετρίου βαθμού κατώσεις θώρακα. Η αντιμετώπισή τους σε μικρό επαρχιακό Νοσοκομείο. 3<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής . Αθήνα, 25-27 Φεβρουαρίου 2005
2. Πλεξουσάκης Εμμ., Χρυσάφης Εμμ., Βάρδας Κ., Παπανικολάου Κλ., Πέτσας Γ., Βλαχάκη Ελ., Δελημπαλταδάκης Γ. Η πρακτική της αντιμετώπισης των ελαφρών Κ.Ε.Κ.

- σε μικρό επαρχιακό Νοσοκομείο. 3<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής. Αθήνα, 25-27 Φεβρουαρίου 2005
3. Πλεξουσάκης Εμμ., Κούκουρα Ο., Ξηροτύρης Θ., Χρυσάφης Εμμ., Πέτσας Γ., Βλαχάκη Ελ., Δελημπαλταδάκης Γ. Εκτίμηση, αντιμετώπιση και έκβαση των μετρίων και βαρέων Κ.Ε.Κ. σε μικρό επαρχιακό Νοσοκομείο. 3<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής. Αθήνα, 25-27 Φεβρουαρίου 2005
  4. Πέτσας Γ., Βλαχάκη Ελ., Χρυσάφης Εμμ., Αναστασάκης Ελ., Πλεξουσάκης Εμμ., Δελημπαλταδάκης Γ. Επιλογή ασθενών για λαπαροσκοπική αφαίρεση κύστεων ωοθηκών. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005
  5. Πλεξουσάκης Εμμ., Χρυσάφης Εμμ., Πέτσας Γ., Βλαχάκη Ελ., Δελημπαλταδάκης Γ., Ατζαράκη Αικ. Κάκωση χοληδόχου πόρου κατά τη λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή. Πρόβλημα και των πεπειραμένων χειρουργών. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005
  6. Βλαχάκη Ελ., Χρυσάφης Εμμ., Πέτσας Γ., Τσικανδυλάκης Γ., Πλεξουσάκης Εμμ., Δελημπαλταδάκης Γ. Νέκρωση επιπλόου – λαπαροσκοπική αντιμετώπιση. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005
  7. Δελημπαλταδάκης Γ., Βλαχάκη Ελ., Χρυσάφης Εμμ., Πέτσας Γ., Πλεξουσάκης Εμμ., Ατζαράκη Αικ. Χειρουργική αντιμετώπιση της βουβωνοκήλης – « Η επιστροφή του ασώτου ». 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005
  8. Σηφάκης Σ., Κούκουρα Ο., Παπαδοπούλου Ε., Χατζάκη Α., Πέτσας Γ., Saravaia MJ, Κουμαντάκης Ε. Αμυλοειδική πολυνευροπάθεια πορτογαλικού τύπου: προγεννητικός έλεγχος και ζητήματα γενετικής συμβουλευτικής. 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής. Αθήνα,
  9. Καραμούτη Μ., Βαρδάκη Ε., Ρολάκη Α., Πέτσας Γ., Μηνάς Β., Ασκοξυλάκης Κ., Μακρυγιαννάκης Α. Ο CRH παράγοντας, που παράγεται από τα κύτταρα του ωοθηκικού καρκίνου, διευκολύνει την ανοσο-διαφυγή των κυττάρων αυτών, μέσω ρύθμισης της έκφρασης του FasL. 2<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό – Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής–Γυναικολογίας. Ηράκλειο, 5-7 Οκτωβρίου 2007
  10. Karamouti M., Petsas G., Nikas G., Makris G., Antsaklis A., Makrigiannakis A. The fallopian tube epithelium expresses markers of receptivity for embryo implantation. The 7<sup>th</sup> Athens Congress on Women's Health & Disease. Athens, 11-13 September, 2008

11. Δρακάκη Ν., Ζερβάκης Α., Πέτσας Γ., Αλεξίου Μ., Νικολετάκης Γ., Ζιούτος Κ., Ματαλλιωτάκης Ι., Μανιδάκης Α-Γ. Αποτελέσματα κυτταρολογικής εξέτασης κολπικού-τραχηλικού επιχρίσματος σε καπνίστριες. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία. Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαΐου 2012
12. Δρακάκη Ν., Ζερβάκης Α., Πέτσας Γ., Αλεξίου Μ., Νικολετάκης Γ., Ζιούτος Κ., Ματαλλιωτάκης Ι., Μανιδάκης Α-Γ. Κύηση και τοκετός στην εφηβική ηλικία στην Κρήτη. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία. Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαΐου 2012

#### **Περίληψεις ερευνητικών εργασιών σε διεθνή περιοδικά:**

1. Minas V., Sifakis S., Augoustinakis E., Petsas G., Venianaki K., Bamberger A.M., Koumantakis E., Makrigiannakis A. Modulation of human trophoblast invasion through Corticotropin –Releasing Hormone. Gynecological Endocrinology. Vol 22, Supplement Number 1, 2006
2. Sifakis S., Koukoura O., Mantas N., Papadopoulou E., Petsas G., Konstantinidou A. Prenatal diagnosis of Ivemark syndrome. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. Vol 30, Number 4, 2007
3. Minas V., Karamouti M., Rolaki A., Kalantaridou SN., Mitrou S., Petsas G., Paraskevaïdis E., Pavlidis N., Makrigiannakis A. Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. International Journal of Endocrinology and Metabolism. Vol 7, Supplement 2, 2008

#### **Περίληψεις ερευνητικών εργασιών σε ελληνικά περιοδικά:**

- Σηφάκης Σ., Κούκουρα Ο., Παπαδοπούλου Ε., Χατζάκη Α., Πέτσας Γ., Saravaia MJ, Κουμαντάκης Ε. Αμυλοειδική πολυνευροπάθεια πορτογαλικού τύπου: προγεννητικός έλεγχος και ζητήματα γενετικής συμβουλευτικής. Περιγεννητική Ιατρική και Νεογνολογία. Τόμος 2, Τεύχος 1, Ιανουάριος-Μάρτιος 2007

#### **Επιστημονική δραστηριότητα:**

- Εκπαιδευτής στο Ι.Ε.Κ. Σητείας με σύμβαση εργασίας ωρομίσθιου υπαλλήλου στο μάθημα Γυναικολογία – Παιδιατρική της ειδικότητας Νοσηλευτικής – Τραυματολογίας για το Εαρινό εξάμηνο 2004-2005
- Συμμετοχή στα Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πα.Γ.Ν.Η για τα ακαδημαϊκά έτη 2005-2006 και 2006-2007
- Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής διοργάνωσης Ημερίδας με θέμα: « Καρκινοπαθής ασθενής. Τριτοβάθμια αντιμετώπιση σε Νοσοκομείο δευτεροβάθμιας φροντίδας ». Σητεία, 16 Σεπτεμβρίου 2005

- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής (Local Organizing Committee) της 5<sup>ης</sup> Ετήσιας Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (5<sup>th</sup> MSRSM Annual Meeting) με θέμα: « Recent advances in Reproduction-The Cutting Edge ». Heraklion, 27-29 April 2006
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής διοργάνωσης 2<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Ενδομητρίωσης. Ηράκλειο, 24-26 Νοεμβρίου 2006
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής διοργάνωσης 2<sup>ου</sup> Διαπανεπιστημιακού-Διανοσοκομειακού Συνεδρίου Μαιευτικής-Γυναικολογίας . Ηράκλειο, 5-7 Οκτωβρίου 2007
- Μέλος τριμελούς επιτροπής παράδοσης-παραλαβής τροφίμων Γ.Ν Αγ. Νικολάου για το χρονικό διάστημα 1/12/07-31/12/07
- Διδασκαλία μαθήματος: ‘Στοιχεία Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Στοιχεία Παιδιατρικής’ στην Επαγγελματική Σχολή Βοηθών Νοσηλευτών του Γ.Ν. Αγ. Νικολάου για το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008
- Διδασκαλία μαθήματος: ‘Στοιχεία Μαιευτικής-Γυναικολογίας’ στην Επαγγελματική Σχολή Βοηθών Νοσηλευτών του Γ.Ν. Αγ. Νικολάου για το ακαδημαϊκό έτος 2008-2009
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής (Local Organizing Committee) της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRSM International Meeting) με θέμα: «Implantation-Recurrent Miscarriages: Science and Clinical Aspects». Chania-Crete, 24-26 September 2010
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής διοργάνωσης Ημερίδας με θέμα: « Ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης ». Ηράκλειο, 05 Δεκεμβρίου 2010
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής διοργάνωσης Ημερίδας με θέμα: « Καρκίνος τραχήλου της μήτρας ». Άγιος Νικόλαος, 16 Οκτωβρίου 2011
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής (Local Organizing Committee) της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRSM International Meeting) με θέμα: «Endometriosis-Current Management and Future Trends». Agios Nikolaos-Crete, 21-23 October 2011
- Συμμετοχή στα Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πα.Γ.Ν.Η για τα ακαδημαϊκά έτη 2010-2011, 2011-2012 και 2012-2013
- Συμμετοχή ως συντονιστής στο Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πα.Γ.Ν.Η για το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012

- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής του 5<sup>ου</sup> Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής-Γυναικολογίας με θέμα: «Σύγχρονη Μαιευτική-Γυναικολογία της Νεαρής Ηλικίας». Ηράκλειο, 31 Μαρτίου-1 Απριλίου 2012
- Συμμετοχή ως ερευνητής στη μελέτη PERSIST (PERgoveris In Stratified Treatment) της εταιρίας Merck Serono, μια φάσης ΙΙΒ, πολυκεντρική, πολυεθνική, τυχαιοποιημένη, ανοικτή μελέτη για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της ωοθηκικής διέγερσης με τη χρήση του GONAL-f από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5 ακολουθούμενο από το Pergoveris από την ημέρα 6, έναντι της χρήσης του Pergoveris από την ημέρα 1 σε γυναίκες μεταξύ 36 και 40 ετών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (Assisted Reproductive Technique-ART)
- Μέλος Τοπικής Οργανωτικής Επιτροπής (Local Organizing Committee) της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRM International Meeting) με θέμα: «Controversies in Human Reproduction». Agios Nikolaos-Crete, 28-30 September 2012

#### **Παρακολούθηση συνεδρίων-σεμιναρίων:**

1. Παρακολούθηση επιστημονικής εκδήλωσης « Καρκίνος των Ωοθηκών ». Ηράκλειο, 19 Νοεμβρίου 2003
2. Παρακολούθηση επιστημονικής εκδήλωσης « Καρκίνος του Ενδομητρίου ». Ηράκλειο, 10 Δεκεμβρίου 2003
3. Εκπαίδευση στη Μονάδα Τηλεϊατρικής του Σισμανόγλειου Γ.Π.Ν. με αντικείμενο « Τηλεϊατρική και εκμάθηση χειρισμού συστήματος ». Αθήνα, 24-30 Ιουνίου 2004
4. Παρακολούθηση 7<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Ιωάννινα, 19-22 Μαΐου 2005
5. Παρακολούθηση 1<sup>ου</sup> Διαπανεπιστημιακού – Διανοσοκομειακού Συνεδρίου Μαιευτικής – Γυναικολογίας. Ηράκλειο, 9-11 Σεπτεμβρίου 2005
6. Παρακολούθηση Ημερίδας με θέμα: « Καρκινοπαθής ασθενής. Τριτοβάθμια αντιμετώπιση σε Νοσοκομείο δευτεροβάθμιας φροντίδας ». Σητεία, 16 Σεπτεμβρίου 2005
7. Παρακολούθηση Ενέργειας Συνεχιζόμενης Επαγγελματικής Κατάρτισης με θέμα: « Χρήση Υπερήχων στη Μαιευτική - Γυναικολογία ». Ηράκλειο, 3-19 Οκτωβρίου 2005
8. Παρακολούθηση επιστημονικής εκδήλωσης « Υπερτασική Νόσος στην Κύηση - Προεκλαμψία ». Ηράκλειο, 15 Φεβρουαρίου 2006
9. Παρακολούθηση επιστημονικής εκδήλωσης « Ανώμαλη Κολπική Αιμόρροια ». Ηράκλειο, 29 Μαρτίου 2006



10. Παρακολούθηση 8<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου της ομάδας Έρευνας Συνδετικού Ιστού και Εξωκυττάριου Χώρου της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Ηράκλειο, 14-15 Απριλίου 2006
11. Παρακολούθηση 5<sup>ης</sup> Ετήσιας Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (5<sup>th</sup> MSRM Annual Meeting) με θέμα: « Recent advances in Reproduction-The Cutting Edge ». Heraklion, 27-29 April 2006
12. Παρακολούθηση Workshop με θέμα: « MSRM Diploma Course in Ultrasound in Gynaecology and Reproductive Medicine (Part 1) ». Heraklion, 27-29 April 2006
13. Παρακολούθηση Ημερίδας με θέμα: « Αντιμετώπιση του τραυματία. Μια διαρκής πρόκληση ». Σητεία, 6 Μαΐου 2006
14. Παρακολούθηση Ημερίδας με θέμα: « Προγεννητικός έλεγχος και γενετική προσέγγιση σκελετικών δυσπλασιών ». Ηράκλειο, 21 Οκτωβρίου 2006
15. Παρακολούθηση 2<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ενδομητρίωσης. Ηράκλειο, 24-26 Νοεμβρίου 2006
16. Παρακολούθηση επιστημονικής εκδήλωσης «Αιματολογικές παθήσεις στην Κύηση ». Ηράκλειο, 20 Ιουνίου 2007
17. Παρακολούθηση 2<sup>ου</sup> Διαπανεπιστημιακού – Διανοσοκομειακού Συνεδρίου Μαιευτικής – Γυναικολογίας. Ηράκλειο, 5-7 Οκτωβρίου 2007
18. Παρακολούθηση 3<sup>rd</sup> Advanced Course of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. Αθήνα, 8-9 Δεκεμβρίου 2007
19. Παρακολούθηση 1<sup>ου</sup> Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής – Γυναικολογίας. Ηράκλειο, 12-13 Απριλίου 2008
20. Παρακολούθηση Workshop της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRM Workshop) με θέμα: «New Trends on Controlled Ovarian Stimulation and Ovulation Induction». Heraklion, 3-4 May 2008
21. Παρακολούθηση Διεθνούς Συμποσίου με θέμα: «Preventive ART Fertility Preservation and Pre-Implantation Diagnosis». Chania, 12-14 September 2008
22. Συμμετοχή σε σεμινάριο του μέτρου: «Κατάρτιση ανθρώπινου δυναμικού της Δημόσιας Διοίκησης και μελέτες υποστήριξης του εκσυγχρονισμού της Δημόσιας Διοίκησης» του έργου: «Κατάρτιση Επαγγελματιών Υγείας σε Καινοτόμες Πρακτικές και Μεθόδους με τη Χρήση Ψηφιακών Εργαλείων» με αντικείμενο κατάρτισης: «Πρακτικές διοίκησης και ασφάλειας και εμπιστευτικότητας στη διακίνηση και επεξεργασία της πληροφορίας στην υγεία: ηλεκτρονικός ιατρικός φάκελος ασθενούς» συνολικής διάρκειας 30 ωρών. Ηράκλειο, 1-10 Οκτωβρίου 2008

23. Παρακολούθηση 3<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ενδομητρίωσης. Ηράκλειο, 17-19 Οκτωβρίου 2008
24. Παρακολούθηση 14<sup>ου</sup> Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου. Γεωργιούπολη, 29 Οκτωβρίου-1 Νοεμβρίου 2008
25. Παρακολούθηση Δορυφορικού Συμποσίου με τίτλο: «Νεότερες εξελίξεις στον εμβολιασμό έναντι του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας». Γεωργιούπολη, 1 Νοεμβρίου 2008
26. Παρακολούθηση Συνεδρίου με θέμα: «Καθ' ἑξιν εκτρώσεις». Θεσσαλονίκη, 22-23 Νοεμβρίου 2008
27. Παρακολούθηση σειράς σεμιναρίων διάρκειας 132 ωρών με θέματα: Ερευνητική μεθοδολογία - Διοίκηση της έρευνας και της καινοτομίας - Αποτίμηση της τεχνολογίας - Εκμετάλλευση ερευνητικής και τεχνολογικής γνώσης και ενσωμάτωσή της στη διαδικασία της οικονομικής και κοινωνικής ανάπτυξης, στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 της Γενικής Γραμματείας Έρευνας & Τεχνολογίας. Επιστημονικό & Τεχνολογικό Πάρκο Κρήτης, 2008
28. Παρακολούθηση 8<sup>ης</sup> Επιστημονικής Συνάντησης με θέμα: «Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και αντιμετώπιση του γυναικολογικού καρκίνου». Θεσσαλονίκη, 20-22 Μαρτίου 2009
29. Παρακολούθηση της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRM International Meeting) με θέμα: «Implantation-Recurrent Miscarriages: Science and Clinical Aspects». Chania-Crete, 24-26 September 2010
30. Παρακολούθηση Ημερίδας με θέμα: « Ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης ». Ηράκλειο, 05 Δεκεμβρίου 2010
31. Παρακολούθηση της 45<sup>ης</sup> Ετήσιας Επιστημονικής Συνάντησης (Annual Scientific Meeting) της ESCI. Heraklion-Crete, 13-16 April 2011
32. Παρακολούθηση των Επιστημονικών Συναντήσεων 2010-2011 του Ασκληπιείου Κρήτης και της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Εταιρίας Κρήτης. Ηράκλειο, Οκτώβριος 2010-Ιούνιος 2011
33. Παρακολούθηση Ημερίδας της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Εταιρίας Κρήτης με θέμα: «Καρκίνος τραχήλου μήτρας» . Αγ. Νικόλαος, 16 Οκτωβρίου 2011
34. Παρακολούθηση της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRM International Meeting) με θέμα: «Endometriosis-Current Management and Future Trends». Agios Nikolaos-Crete, 21-23 October 2011

35. Παρακολούθηση του 5<sup>ου</sup> Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής-Γυναικολογίας με θέμα: «Σύγχρονη Μαιευτική-Γυναικολογία της Νεαρής Ηλικίας». Ηράκλειο, 31 Μαρτίου-1Απριλίου 2012
36. Παρακολούθηση της Διεθνούς Συνάντησης της Μεσογειακής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (MSRM International Meeting) με θέμα: «Controversies in Human Reproduction». Agios Nikolaos-Crete, 28-30 September 2012

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) και οι υποδοχείς του εκφράζονται στον ανθρώπινο πλακούντα. Πρόσφατα διαταραχές στη λειτουργία του συστήματος αυτού έχουν συσχετισθεί με έναν αριθμό επιπλοκών της κύησης, μεταξύ των οποίων και η προεκλαμψία. Στόχο της παρούσας διατριβής αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου του CRF στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας μέσω επαγόμενης από τα μακροφάγα απόπτωσης της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης (EVT). Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του CRF ήταν αυξημένη στα EVT κύτταρα της περιοχής της εμβρυομητρικής αλληλεπίδρασης σε πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία (1.8 φορές αύξηση;  $P < 0.05$ ). Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός αποπτωτικών EVT κυττάρων σε προεκλαμπτικούς πλακούντες συγκριτικά με φυσιολογικούς πλακούντες αναφοράς της ίδιας ηλικίας κύησης ( $P < 0.05$ ) καθώς και ύπαρξη φθαρτικών μακροφάγων θετικών για τον προσδέτη Fas (FasL) μόνο στους προεκλαμπτικούς πλακούντες. *In vitro* μελέτες της επίδρασης του CRF σε ανθρώπινα μακροφάγα έδειξαν ότι ο CRF αύξησε την έκφραση του FasL στα κύτταρα αυτά, επιδρώντας στην ικανότητά τους να επάγουν απόπτωση μιας θετικής για τον υποδοχέα Fas υβριδικής κυτταρικής σειράς EVT. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου διαταραχές στην έκφραση του CRF στην προεκλαμψία, ενεργοποιούν τα θετικά για τον προσδέτη Fas φθαρτικά μακροφάγα, διαταράσσοντας έτσι τη διεισδυτικότητα των EVT κυττάρων και συνακόλουθα την πλακουντοποίηση.

## SUMMARY

Corticotropin-releasing factor (CRF) and its receptors are expressed in human placenta. Recently impaired function of this system has been associated with a number of complications of pregnancy, including preeclampsia. The aim of the study was to test the hypothesis that CRF participates in the pathophysiology of preeclampsia through induction of macrophage-mediated apoptosis of extravillous trophoblasts (EVT). We found that expression of CRF was increased in EVT of placental bed biopsy specimens from preeclamptic pregnancies (1.8-fold increase;  $P < 0.05$ ). In addition, significantly higher numbers of apoptotic EVT were detected in preeclamptic placentas compared to normal ones ( $P < 0.05$ ) and only in preeclamptic placentas decidual macrophages were found to be FasL positive. *In vitro* studies on the effect of CRF on human macrophages suggested that CRF induced the expression of FasL protein in human macrophages and potentiated their ability to induce apoptosis of a Fas-expressing EVT-based hybridoma cell-line in cocultures. These findings demonstrate a possible mechanism by which aberrant expression of CRF in preeclampsia may activate FasL positive decidual macrophages, impair the physiological turnover of EVT and eventually disturb placentation

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ

**ACTH:** Adrenocorticotropin Hormone

**AIF:** Apoptosis Inducing Factor

**ANOVA:** Analysis of variance

**Ant:** Antalarmin

**APS:** Ammonium Persulfate

**BH:** Bcl-2 Homology Domains

**bp:** base pairs

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**cAMP:** Cyclic adenosine monophosphate

**CEACAM1:** Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1

**CRE:** cAMP response element

**CREB:** cAMP Response Element Binding Protein

**CRH/CRF:** Corticotropin Releasing Factor

**CRFBP:** CRF-Binding Protein

**CRFR:** CRF Receptor

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-phenylindole

**DD:** Death Domain

**DHEA-S:** Dihydroepiandrosterone Sulphate

**DISC:** Death Inducing Signaling Complex

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DNA:** Desoribonucleic acid

**DNase I:** Deoxyribonuclease I

**dNTP:** Deoxyribonucleoside triphosphate

**DRs:** Death Receptors

**DTT:** Dithiothreitol

**ECL:** Enhanced Chemmiluninescence

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**ELISA:** Ezyme-linked immunoabsorbent assay

**EVT:** Extravillous trophoblast  
**FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorter  
**FADD:** Fas-associated Death Domain  
**FasL:** Fas Ligand  
**FBS:** Fetal Bovine Serum  
**FCS:** Fetal Calf Serum  
**FITC:** Fluorescein isothiocyanate  
**GPCRs:** G-protein coupled receptors  
**HBSS:** Hanks Balanced Salt Solution  
**HEPES:** 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
**HGPRT:** Hypoxanthine-guanine-phospho-ribosyl transferase  
**HLA-G:** Hman leukocyte antigen-G  
**hyEVT:** Hybridoma EVT  
**IDO:** Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase  
**IKK:** Inhibitor of Nuclear Factor kB kinase  
**IL:** Interleukin  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon- $\gamma$   
**IRS:** Immuno-reactive Score  
**ISNT:** *In situ* nick translation  
**IUGR:** Intrauterine Growth Restriction  
**kb:** kilobases  
**kDa:** Kilodalton  
**KGM:** Keratinocyte Growth Medium  
**LPS:** Lipopolysacharide  
**MMP:** Matrix Metalloproteinase  
**mRNA:** messenger RNA  
**NK cells:** Natural Killer cells  
**NO:** Nitric Oxide  
**OD:** Optical Density  
**PAI-1:** Plasminogen activator inhibitor-1  
**PBS:** Phosphate Buffer Saline  
**PBMCs:** Peripheral blood mononuclear cells  
**PGE2:** Prostaglandin E2  
**PI3K/Akt pathway:** Phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B pathway

**PI:** Propidium Iodide  
**PIGF:** Placenta Growth Factor  
**PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate  
**PMSF:** Phenylmethylsulfonyl fluoride  
**POMC:** Proopiomelanocortin  
**pro-UPA:** Pro-urokinase-type Plasminogen Activator  
**RNA:** Ribonucleic Acid  
**RPM:** Rounds per min.  
**RPMI:** RPMI Medium 1640  
**sFlt-1:** Soluble fms-like tyrosine kinase-1  
**SD:** Standard deviation of means  
**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate  
**SE:** Standard error of mean  
**TBS-T:** Tris buffered saline-Tween  
**TdT:** Terminal deoxynucleotidyl Transferase  
**TEMED:** N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine  
**Th:** T helper cells  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**TNFR:** TNF Receptor  
**TRIS:** Tris(hydroxymethyl) aminomethane  
**TRITC:** Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate  
**TPA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)  
**Triton:** t-Octylphenoxyethoxyethanol  
**U:** Units  
**uNK:** Uterine Natural Killer cells  
**UCN:** Urocortin  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**WHO:** World Health Organization

### **ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ**

**ΕΛΤ:** Εξωλαχνωτή τροφοβλάστη  
**ΘΔ:** Θερμοκρασία δωματίου  
**ΜΒ:** Μοριακό Βάρος  
**ΥΥΕ:** Υποθαλαμο-υποφυσο-επινεφριδιακός άξονας



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>26</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>27</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων και οι υποδοχείς τους.....</b>	<b>27</b>
1.1.1 Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) .....	27
1.1.2 Οι ουροκορτίνες (UCNs).....	28
1.1.3 Χαρακτηριστικά και ρύθμιση των γονιδίων CRF και UCN .....	29
1.1.4 Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων (CRFRs, CRFBP) .....	29
1.1.4.1 Ο CRFR1 .....	30
1.1.4.2 Ο CRFR2 .....	31
1.1.4.3 Η CRFBP.....	32
1.1.5 Τα CRF πεπτίδια και οι υποδοχείς τους στον πλακούντα .....	32
1.1.5.1 Έκφραση CRF πεπτιδίων στον πλακούντα.....	32
1.1.5.2 Συμμετοχή των CRF πεπτιδίων στη φυσιολογία του πλακούντα .....	33
1.1.5.3 Συμμετοχή των CRF πεπτιδίων στην παθοφυσιολογία του πλακούντα .....	36
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ.....</b>	<b>38</b>
<b>1.2 Η πλακουντοποίηση .....</b>	<b>38</b>
1.2.1 Το εμβρυομητρικό όριο .....	40
1.2.1.1 Τα κύτταρα του εμβρυομητρικού ορίου .....	41
1.2.1.2 Μικροπεριβάλλον στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ .....</b>	<b>46</b>
<b>1.3 Η απόπτωση .....</b>	<b>46</b>
1.3.1 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης.....	48
1.3.1.1 Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών .....	49
1.3.1.2 Οι κασπάσες .....	50
1.3.1.3 Το σύστημα Fas/FasL.....	51
1.3.2 Η απόπτωση στην τροφοβλάστη .....	53
1.3.3 Ο ρόλος των μακροφάγων στη ρύθμιση της απόπτωσης στην τροφοβλάστη .....	55
1.3.3.1 Η κάθαρση των αποπτωτικών σωματιών.....	55
1.3.3.2 Μακροφάγα και κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων .....	56
1.3.3.3 Τα μακροφάγα της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου .....	57
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ .....</b>	<b>59</b>
<b>1.4 Η προεκλαμψία.....</b>	<b>59</b>
1.4.1 Παθοφυσιολογία.....	59
1.4.2 Απόπτωση στην τροφοβλάστη και προεκλαμψία.....	64
1.4.3 Το σύστημα Fas/FasL στην προεκλαμψία.....	65
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>68</b>
<b>2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ - ΤΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ .....</b>	<b>69</b>
<b>3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Βιολογικά υλικά.....</b>	<b>71</b>
3.1.1 Πλακουντιακοί ιστοί.....	71
3.1.2 Κυτταρικές σειρές .....	72
3.1.3 Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες .....	73
<b>3.2 Μέθοδοι .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 Έμμεση ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης.....	74
3.2.2 <i>In situ</i> nick translation (ISNT) assay σε κρυοτομές ιστών .....	76
3.2.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένους ιστούς και μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy). .....	77
3.2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot Analysis).....	77
3.2.5 Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης.....	82

3.2.5.1	Μέθοδος APOPercentage .....	82
3.2.5.2	Χρώση με Ανεξίνη V και Ιωδιούχο Προπίδιο .....	83
3.2.6	Στατιστική ανάλυση .....	85
<b>4</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Μελέτη της έκφρασης των CRF, Fas και FasL σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες .....</b>	<b>86</b>
4.1.1	Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του CRF στον πλακούντα.....	86
4.1.2	Η προεκλαμψία σχετίζεται με την εμφάνιση του FasL πεπτιδίου στα φθαρτικά μακροφάγα.....	87
4.1.3	Η προεκλαμψία δεν σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του Fas πεπτιδίου στα EVT κύτταρα.....	88
<b>4.2</b>	<b>Μελέτη της απόπτωσης σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες</b>	<b>90</b>
<b>4.3</b>	<b>Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του FasL από το CRF πεπτίδιο σε μακροφάγα περιφερικού αίματος .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4</b>	<b>Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των μακροφάγων του περιφερικού αίματος στην κυτταρική σειρά AC1M88 καθώς και ο ρόλος του πεπτιδίου CRF στη δράση αυτή.....</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>95</b>
<b>5.1</b>	<b>Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση CRF στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου και παρουσία θετικών για τον προσδέτη Fas φθαρτικών μακροφάγων.....</b>	<b>96</b>
<b>5.2</b>	<b>Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση της EAT .....</b>	<b>98</b>
<b>5.3</b>	<b>Ο ρόλος των μακροφάγων της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου στην προεκλαμψία.....</b>	<b>99</b>
<b>5.4</b>	<b>Το πεπτίδιο CRF ενισχύει την ικανότητα των φθαρτικών μακροφάγων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση σε μια υβριδική κυτταρική σειρά EVT .....</b>	<b>101</b>
<b>5.5</b>	<b>Μελλοντικές προοπτικές.....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>105</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>129</b>

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Deoxyribonucleic acid (DNA) is a nucleic acid that contains the genetic instructions used in the development and functioning of all known organisms and many viruses. In eukaryotes, DNA is often compacted into chromosomes to allow storage of large quantities of information. DNA is often compacted into chromosomes to allow storage of large quantities of information. DNA is often compacted into chromosomes to allow storage of large quantities of information.

Chemically, DNA consists of two strands of single sugar and phosphate groups, held together by hydrogen bonds. These two strands run in opposite directions to each other and are therefore antiparallel. Attached to each sugar is one of four types of molecules called nucleobases (the sequence of these bases is the code that encodes information). The strands are held together using the genetic code which specifies the sequence of the amino acids within proteins. The process of copying one's DNA into the related RNA is a process called transcription.

While cells, DNA is organized into long structures called chromosomes. These chromosomes are duplicated before cells divide, in a process called DNA replication. Eukaryotes (organisms with a nucleus, plants, fungi, and protists) store most of their DNA inside the cell nucleus and some of their DNA is organized into mitochondria or chloroplasts. In contrast, prokaryotes do not have a nucleus and their DNA is organized into chromosomes within the cytoplasm. Within the chromosomes, chromatin proteins such as histones compact DNA into a 30-nm fibre. These compact structures prevent unnecessary access to DNA and occur primarily during transcription and replication of DNA and are not involved in other parts of DNA metabolism.

DNA exists in many possible conformations that include A-DNA, B-DNA, and Z-DNA forms, although only B-DNA and Z-DNA have been directly observed in functional organisms (1). The conformation that DNA adopts is dependent on the hydration level, DNA sequence, the ionic strength and direction of supercoiling. Chemical results are consistent with the helix pitch and concentration of nucleotides and the presence of polyanions in solution (2).

The first published report of A-DNA X-ray diffraction patterns — and also B-DNA used analysis based on Patterson functions that provided only a limited amount of structural information — were proposed by Wilkins et al. in 1953. The model of the X-ray diffraction pattern of DNA was proposed by Watson and Crick in 1953. The model of the X-ray diffraction pattern of DNA was proposed by Watson and Crick in 1953. The model of the X-ray diffraction pattern of DNA was proposed by Watson and Crick in 1953.

While the B-DNA form is most common under the conditions based in cells, it is not a well-defined conformation that occurs in the high hydration and pressure of living cells. The corresponding X-ray diffraction patterns are characteristic of molecules in high hydration with a significant degree of flexibility (3,4).

Compared to B-DNA, the A-DNA form is a much more compact, often more globular, conformation. It is a more compact, often more globular, conformation. It is a more compact, often more globular, conformation. It is a more compact, often more globular, conformation. It is a more compact, often more globular, conformation.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

### 1.1 Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων και οι υποδοχείς τους

Η οικογένεια των CRF νευροπεπτιδίων περιλαμβάνει τα πεπτίδια: εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (corticotropin-releasing factor, CRF) και τις ουροκορτίνες (UCNs-UCN 1, UCN 2 and UCN 3) στα θηλαστικά, καθώς και τις urotensin (στους ιχθείς) και sauvagine (στα αμφίβια). Πρόκειται για ομόλογα πεπτίδια με αρκετά συντηρημένη αμινοξική ακολουθία (**Εικόνα 1**).

Peptide	Sequence	Length	Identity (%)
hCRF	SEEPPI <del>SLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLM</del> EII	41	100
oCRF	SQEPPI <del>SLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAH</del> SNRKL <del>LDIA</del>	41	83
URO	NDDPPI <del>SIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLN</del> RKYL <del>DEV</del>	41	54
hUCN	DNPSLS <del>IDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRI</del> IF <del>DSV</del>	40	43
SVG	ZGPPI <del>SIDLSELLLRKMIEIEKQEKEKQQAANNR</del> LL <del>LDTI</del>	40	48
hSRP	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
hSCP	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRQAANAHLMAQI	38	32
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRKAANAQLMAQI	38	26

**Εικόνα 1.** Η αλληλουχία των μελών της οικογένειας των CRF πεπτιδίων. Τα αμινοξέα τα οποία συντηρούνται σε όλα τα πεπτίδια είναι χρωματισμένα με πράσινο χρώμα.

#### 1.1.1 Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF)

Ο CRF, ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων, απομονώθηκε για πρώτη φορά από πρόβειο υποθάλαμο και χαρακτηρίστηκε από τους Vale και συν. (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).

### 1.1.2 Οι ουροκορτίνες (UCNs)

Η UCN 1 (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 συμπεριλαμβανόμενων 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 UCN 2 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 UCN 2 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 UCN 3 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 UCN 3 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).

### 1.1.3 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 της ενεργοποίησης της έκφρασης του CRF στον υποθάλαμο προηγείται 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 Brn-2, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του CRF (Ramkumar et al, 1999). Όσον αφορά στην UCN δεν υπάρχει ανάλογη πληροφορία. Επιπλέον, τα γονίδια των πεπτιδίων CRF περιέχουν στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών. Έχει αναφερθεί ρύθμιση του mRNA της UCN 1 και της UCN 2 σε περιφερικούς ιστούς από γλυκοκορτικοειδή (Chen et al, 2003).

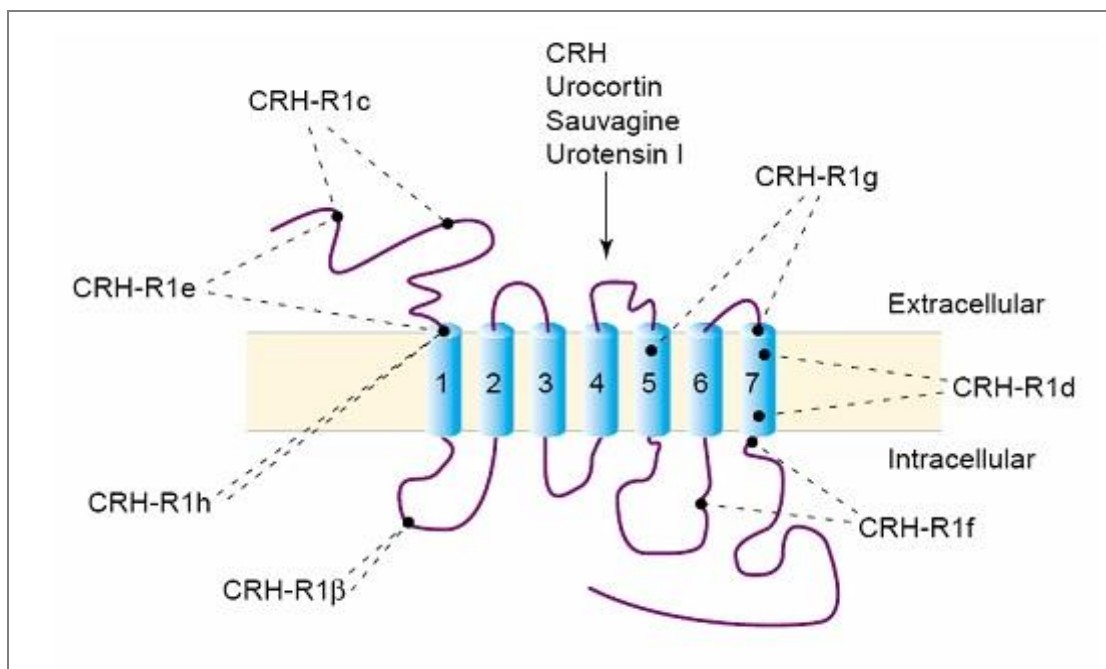
### 1.1.4 Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων (CRFRs, CRFBP)

Οι δράσεις των CRF πεπτιδίων διαμεσολαβούνται μέσω ειδικών υποδοχέων (CRF Receptors, CRFRs) και τροποποιούνται από την CRF-προσδένουσα πρωτεΐνη (CRFbinding 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 στους προσδέτες τους.

#### 1.1.4.1 Ο CRFR1

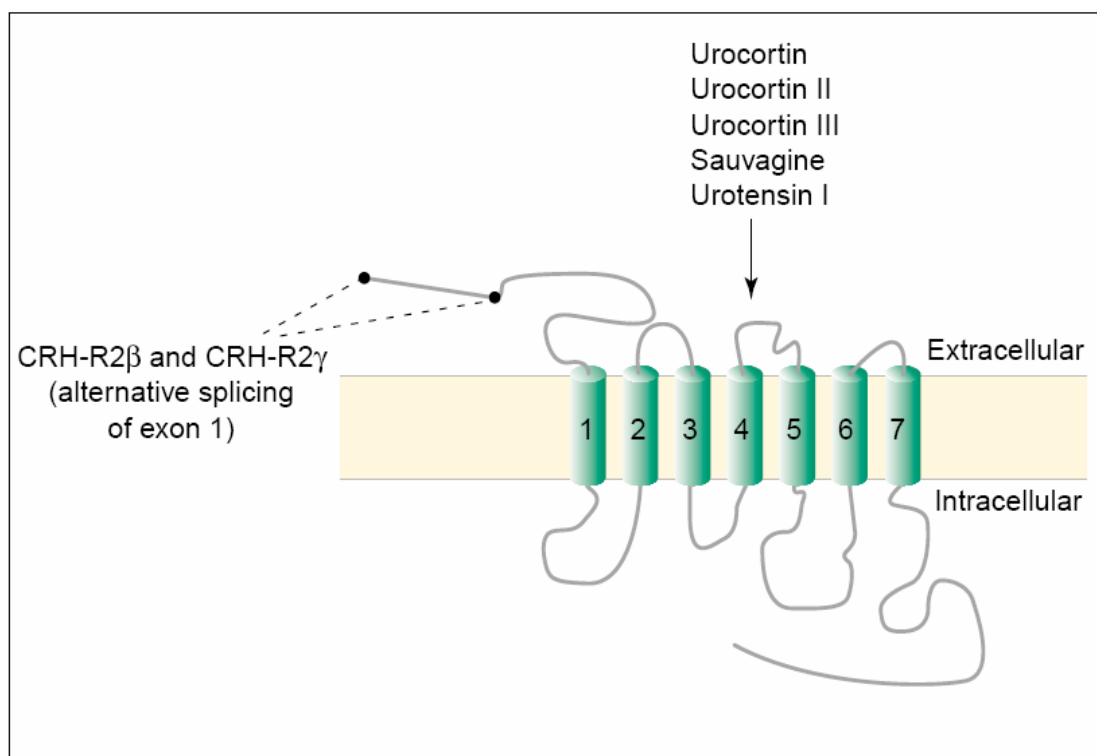
Ο CRFR1 αποτελείται από 415-420 αμινοξέα και είναι ο κύριος τύπος υποδοχέα στα κορτικοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης όπου μεσολαβεί για τη δράση του CRF στην επαγωγή της έκκρισης της ACTH. Υπάρχει μια λειτουργική ισομορφή του CRFR1 και πολλές μη λειτουργικές (Hauger et al, 2003). Ο CRFR1 προσδένει τον CRF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



**Εικόνα 2.** Ο υποδοχέας CRFR1. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις θέσεις όπου υπάρχουν αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μεταξύ των διάφορων ισομορφών.

### 1.1.4.2 Ο CRFR2

Ο CRFR2, μια πρωτεΐνη 397-438 αμινοξέων, έχει τρεις λειτουργικές ισομορφές, τις CRFR2a-c. Παρόλο που η ιστική κατανομή των τριών ισομορφών διαφέρει, δεν παρουσιάζουν σημαντικές φαρμακολογικές διαφορές μεταξύ τους. Η UCN 1 έχει 40 φορές περίπου μεγαλύτερη συγγένεια για τον CRFR2 απ' ότι έχει ο CRF. Τα πεπτίδια UCN 2 και UCN 3 προσδένονται αποκλειστικά και με μεγάλη συγγένεια στον CRF2 (Reyes et al, 2001; Lewis et al, 2001). Το γεγονός ότι η συγγένεια της UCN 2 για τον CRFR2 είναι 10 φορές περίπου μικρότερη από εκείνη της UCN 1 ή της UCN 2 δημιουργεί υπόνοιες για την ύπαρξη κάποιου τρίτου CRF υποδοχέα και στα θηλαστικά (Hoare et al, 2005). Ο CRFR2a, εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (υποθάλαμος, πλάγιο διάφραγμα, ραφιοειδής πυρήνας στον μεσεγκέφαλο, οσφρητικός βολβός) και στην υπόφυση (Lovenberg et al, 1995). Ο CRFR2b ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας, αναπαραγωγικό σύστημα) και λιγότερο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες) (Perrin et al, 1999). Ο CRFR2c 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 3**).



**Εικόνα 3. Ο υποδοχέας CRFR2.** Οι ισομορφές CRFR2b και c διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο 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 sCRFR2a (Chen et al, 2005). Πρόκειται για προϊόν εναλλακτικού ματίσματος (splice variant) του mRNA του CRFR2 στο οποίο λείπει το εξόνιο 6. Η συγγενεία του για τα πεπτίδια CRF και UCN 1 είναι μεγάλη και η παρουσία του μεταβάλλει την ικανότητα των CRF και UCN 1 να επάγουν την ενεργοποίηση των διαμεμβρανικών CRFRs.

### **1.1.4.3 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). Το σύμπλοκο της CRFBP με τα πεπτίδια δεν έχει βιολογική δραστηριότητα. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή δρα σαν ένας τροποποιητής των ενδοκρινών, 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).

## **1.1.5 Τα CRF πεπτίδια και οι υποδοχείς τους στον πλακούντα**

### **1.1.5.1 Έκφραση CRF πεπτιδίων 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, στο μυομήτριο, στο φθαρτό, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος 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). Εκκρίνεται τέλος στη κυκλοφορία της εγκύου και η συγκέντρωσή του αυξάνει εκθετικά 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 (Clifton et al, 2000; Petraglia et al, 1996; Sehringer et al, 2004; Florio et al, 2002; Bamberger et al, 2006). Ανιχνεύεται, επίσης, σε χαμηλά επίπεδα στη κυκλοφορία της εγκύου, αλλά η συγκέντρωσή της δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της κύησης (Clifton et al, 2000).

Πρόσφατα, οι UCN 2 και UCN 3 εντοπίστηκαν στη λαχνωτή τροφοβλάστη στον ανθρώπινο πλακούντα. Η UCN 2, αλλά όχι η UCN 3, εντοπίστηκε και στα μητρικά και εμβρυικά αγγεία. Τέλος η UCN 3 εντοπίστηκε στο μυομήτριο της εγκύμονος μήτρας (Imperatore et al, 2006; Karteris et al, 2004).

Οι CRFRs εκφράζονται σε ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος με τις διάφορες ισομορφές τους να παρουσιάζουν ξεχωριστή χωροχρονική ρύθμιση. Οι CRFR1a, CRFR2a και σε μικρότερο βαθμό ο CRFR1b, εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο (Karteris et al, 2004). Το μυομήτριο της μη-εγκύου γυναίκας εκφράζει τους CRFR1a, CRFR1b και CRFR2b. Στην έγκυο μήτρα, και μετά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, στο μυομήτριο εμφανίζεται ο CRFR2a, ενώ στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ανιχνεύονται επιπρόσθετα στο μυομήτριο οι CRFR1c και CRFR1d (Grammatopoulos et al, 1999; Grammatopoulos et al, 1998). Οι CRFR1a, CRFR1c, CRFR1d και CRFR2b έχουν εντοπιστεί στη συγκύτιοτροφοβλαστη, σε λίγα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, στο φθαρτό καθώς και στις εμβρυϊκές μεμβράνες, ενώ στα αγγεία των λαχνών εντοπίζεται μόνο ο CRFR2b (Karteris et al, 2000; Florio et al, 2000). Ο CRFR1, αλλά όχι ο CRFR2, εκφράζεται στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη (Makrigiannakis et al, 2001).

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

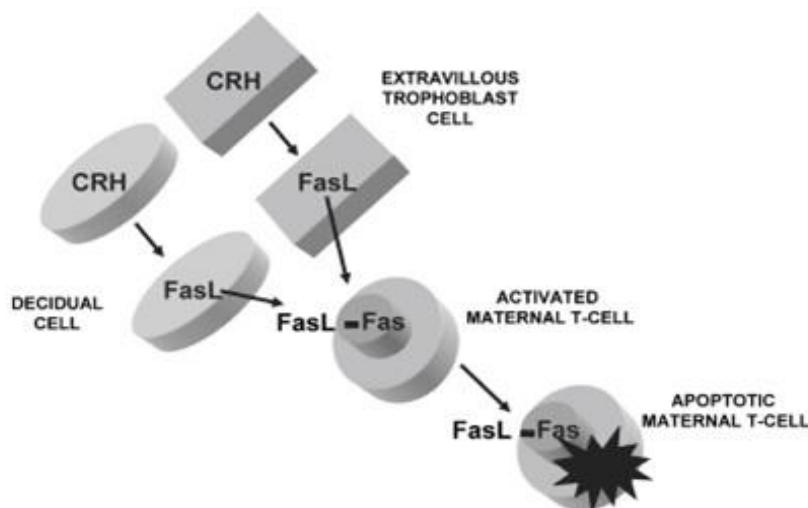
#### **1.1.5.2 Συμμετοχή των CRF πεπτιδίων στη φυσιολογία του πλακούντα**

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 της βλαστοκύστης και ο τοκετός (Kalantaridou et al, 2003). Οι περισσότερες πληροφορίες από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα, αφορούν τον πλακουντιακό CRF και λιγότερες τις UCNs.

Ο CRF έχει σημαντικό ρόλο στη φθαρτοποίηση του στρώματος του ενδομητρίου. Συγκεκριμένα, ο CRF επάγει τη φθαρτοποίηση των στρωματικών ενδομητρίων 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 τη διαδικασία αυτή (Makrigiannakis et al, 1999; Zoumakis et al, 2000).

Παράλληλα, υποστηρίζεται ο ρόλος του CRF στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και τη συνακόλουθη διείσδυση της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης στους ιστούς της μήτρας. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι κατά την εμφύτευση, η απόκριση του ενδομητρίου στη διείσδυση του εμβρυϊκού 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 ενδιαφέρον πεδίο έρευνας στο χώρο της αναπαραγωγικής ανοσολογίας. 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 ερευνητικής μας ομάδας, έδειξαν ότι ο CRF επάγει την έκφραση του FasL στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη (ΕΛΤ). Με τον τρόπο αυτό ο CRF ενισχύει την ικανότητα της ΕΛΤ να προκαλεί την απόπτωση γειτονικών ενεργοποιημένων μητρικών Τα-λεμφοκυττάρων, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα Fas (Makrigiannakis et al, 2001). Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί κατασταλτικά στην ενεργοποίηση του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος τοπικά και προστατευτικά στην εμβρυϊκής προέλευσης ΕΛΤ (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4. Ο ρόλος του CRF στην εμφύτευση.** Ο CRF που παράγεται τοπικά από την ΕΛΤ και τα φθαρτικά κύτταρα δρα παρακρινώς και αυτοκρινώς επάγοντας την έκφραση του FasL και ενισχύει την ικανότητα των κυττάρων της ΕΛΤ να προκαλούν απόπτωση των ενεργοποιημένων μητρικών T-κυττάρων.

Ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος των ουροκορτινών στα ανωτέρω φαινόμενα (φθαρτοποίηση, εμφύτευση και τροφοβλαστική διείδυση), αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας. Είναι γνωστό ότι οι συγκεκριμένες δράσεις του CRF μεσολαβούνται μέσω του CRFR1 (Makrigiannakis et al, 2001) και ότι η UCN ενεργοποιεί τον υποδοχέα αυτό με αντίστοιχη με τον CRF ισχύ (Perrin et al, 1998). Για το λόγο αυτό έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η UCN είναι πολύ πιθανό να ενέχεται μαζί με τον CRF στη ρύθμιση των φαινομένων αυτών (Florio et al, 2004). Πρόσφατα, η ερευνητική μας ομάδα ανακοίνωσε την έκφραση της UCN στην ΕΛΤ στη θέση εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης (Bamberger et al, 2006).

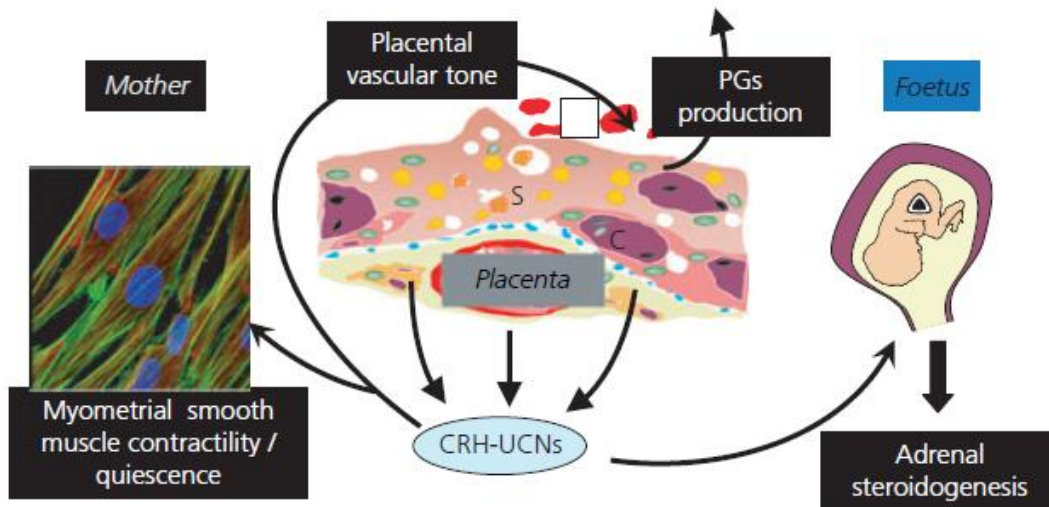
Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο CRF και η UCN φαίνεται να ελέγχουν από κοινού έναν αριθμό λειτουργιών:

Συγκεκριμένα, τα δύο νευροπεπτίδια συμμετέχουν στη ρύθμιση της τονικότητας του μυομητρίου παρουσιάζοντας τόσο άμεση όσο και έμμεση δράση στα μυϊκά 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).

Επίσης, οι CRF και UCN ενέχονται στη ρύθμιση της αιματικής ροής της εμβρυοπλακουντικής μονάδας λειτουργώντας ως αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες. Η δράση τους φαίνεται να διαμεσολαβείται από ένα εξαρτώμενο από το μονοξειδίο του αζώτου (NO)/cGMP ενδοκυττάριο μονοπάτι, με τη UCN να παρουσιάζεται ως ο περισσότερο ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας (Clifton et al, 1995; Leitch et al, 1998).

Τέλος, ο πλακουντιακός CRF συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας των εμβρυϊκών επινεφριδίων μέσω επαγωγής της απελευθέρωσης θειϊκής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA-S), αλλά και της ενεργοποίησης του εμβρυϊκού ΥΥΕ άξονα και της απελευθέρωσης εμβρυϊκής κορτιζόλης. Ο ανθρώπινος πλακούντας χρησιμοποιεί την παρεχόμενη από τα εμβρυϊκά 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 εμβρυϊκών

οργάνων και την προετοιμασία του τοκετού (Karteris et al, 2001; Smith et al, 1998) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5. Ιστοί στόχοι των πλακουντιακών CRF πεπτιδίων κατά τη διάρκεια της κύησης.** Πιθανές δράσεις του CRF και των UCNs περιλαμβάνουν ρύθμιση της τονικότητας του μυομητρίου, έλεγχο του αγγειακού τόνου του πλακούντα, παραγωγή προσταγλανδινών και επινεφριδικών στεροειδών καθώς και πιθανά πολλές άλλες άγνωστες μέχρι σήμερα λειτουργίες.

### 1.1.5.3 Συμμετοχή των CRF πεπτιδίων στην παθοφυσιολογία του πλακούντα

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

Σε συμφωνία με την υπόθεση ότι τα CRF πεπτιδία 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 CRFBP 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 στα τελικά στάδια της κύησης μπορεί να συσχετίζεται με τη παθογένεση του πρόωρου τοκετού (Challis et al, 1995).

Πρόσφατα, τα CRF πεπτιδία συσχετίστηκαν με τις αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο. Οι Madhappan και συν. μελέτησαν την έκφραση των πεπτιδίων CRF, UCN, τρυπτάση και IL-8 σε ομογενοποιημένο πλακουντιακό υλικό, προερχόμενο από γυναίκες με αυτόματες αποβολές ή καθ' ἑξίν 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 συστηματικών 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 που μπορούν να οδηγήσουν την κύηση σε αποβολή (Madhappan et al, 2003). Πρόσφατα αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας αποσαφήνισαν τον πιθανό ρόλο των CRF πεπτιδίων στις καθ' έξιν αποβολές. Η έκφραση των CRF και UCN φάνηκε να είναι αυξημένη σε φθαρτούς από περιπτώσεις καθ' έξιν αποβολών. Επιπλέον, οι φθαρτοί αυτοί περιέχουν λευκοκύτταρα θετικά για τον FasL και κύτταρα ΕΛΤ τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του παράγοντα Fas καθώς και αυξημένα ποσοστά απόπτωσης. *In vitro*, ο CRF φάνηκε να επάγει την έκφραση του FasL σε φθαρτικά λεμφοκύτταρα από πλακούντες γυναικών που υποβλήθηκαν σε εκλεκτική διακοπή κύησης, ενισχύοντας την ικανότητα των κυττάρων αυτών να επάγουν απόπτωση μιας υβριδικής κυτταρικής σειράς ΕΛΤ (Minas et al, 2007).

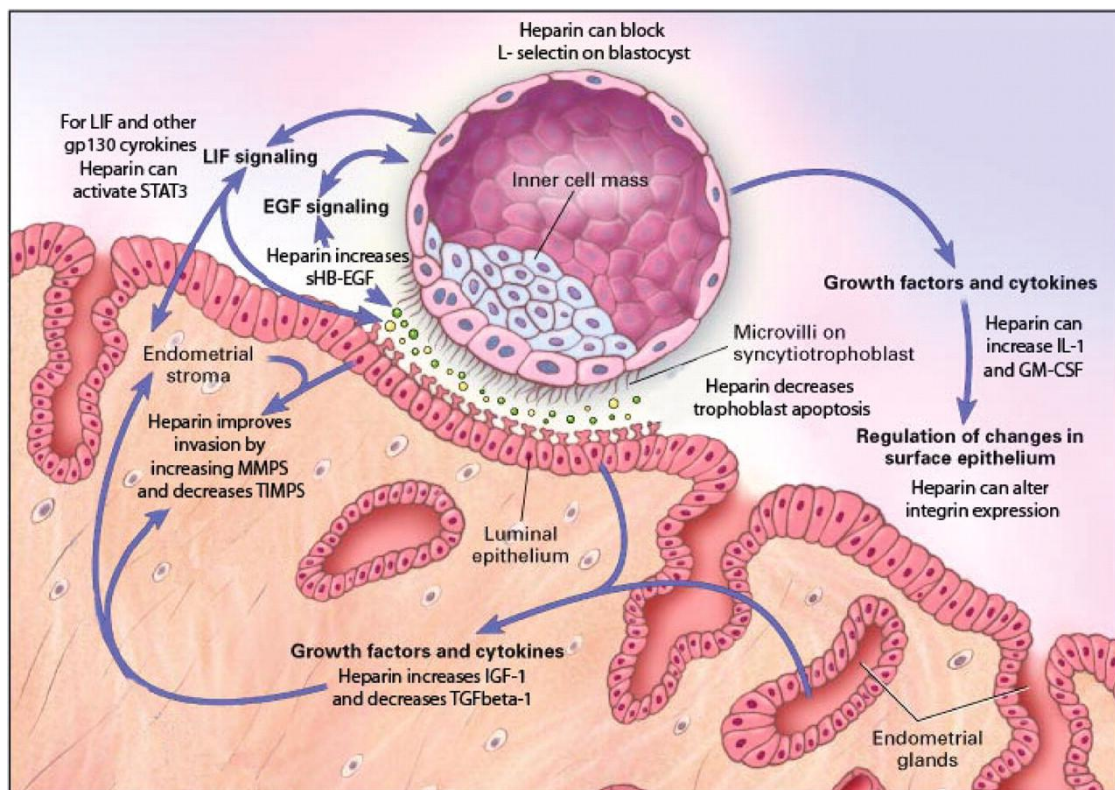
Διαταραχές του συστήματος των CRF πεπτιδίων έχουν επίσης συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Ένας αριθμός μελετών έχει εντοπίσει αυξημένα επίπεδα CRF στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (Laatikainen et al, 1991; Jeske et al, 1990; Warren et al, 1995), άλλες μελέτες αναφέρουν υψηλά επίπεδα CRF και παράλληλα χαμηλά επίπεδα CRFBP (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 προεχρόμενους από κυήσεις 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 NO/cGMP μονοπατιού από τους CRF και UCN (Karteris et al, 2005; Karteris et al, 2003). Η ακριβής, ωστόσο, σχέση των CRF πεπτιδίων με τη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### 1.2 Η πλακουντοποίηση

Η πλακουντοποίηση, η οποία αποτελεί την πρώτη δοκιμή της οργανογενετικής ικανότητα του εμβρύου, επιτυγχάνει δύο κρίσιμα γεγονότα: την προσκόλληση του εμβρύου στη μήτρα και την αναγκαία για την ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών συστατικών αλληλεπίδραση μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας.

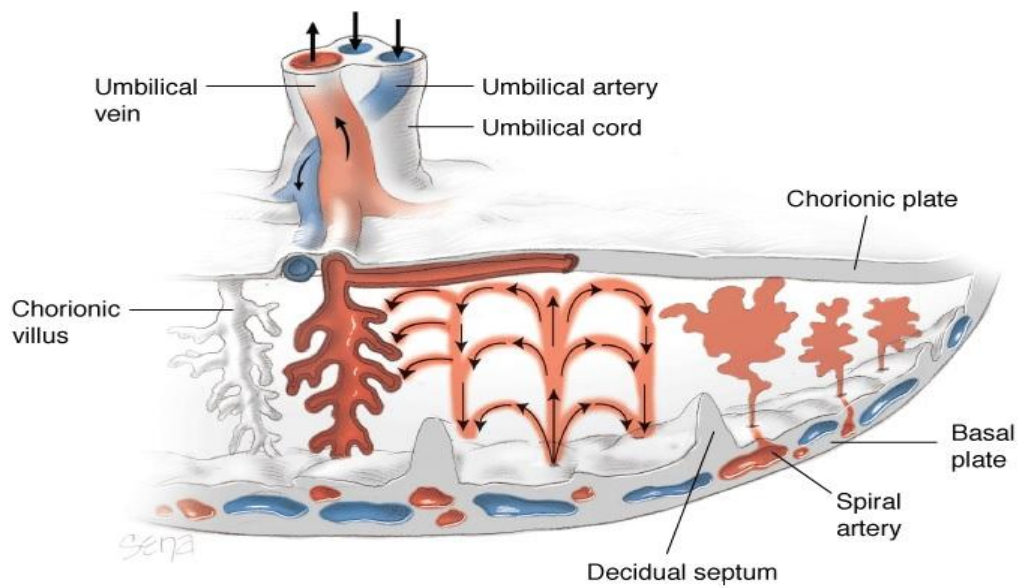
Ένα κρίσιμο στάδιο της εμφύτευσης είναι ο συγχρονισμός μεταξύ εμβρύου και μίας σειράς μοριακών και κυτταρικών διεργασιών που προέρχονται από το ενδομήτριο υπό την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Αφού η βλαστοκύστη αγκιστρωθεί στο ενδομητρικό επιθήλιο, αρχίζει να διεισδύει μέσω της βασικής μεμβράνης στο στρώμα της μήτρας. Για να μπορέσουν τα τροφοβλαστικά κύτταρα να διεισδύσουν θα πρέπει αρχικά να αποδομήσουν το επιθήλιο και το στρώμα. Αν και πολλές ουσίες εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης, ο ακριβής τους ρόλος στα αρχικά στάδια της κύησης, παραμένει αδιευκρίνιστος (Makrigiannakis et al, 2006) (Εικόνα 6)



**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τροφοβλαστικών και ενδομητρικών κυττάρων καθώς και ο πιθανός ρόλος εντεγκρινών, αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών, ορμονών και πρωτεασών στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Αφού η βλαστοκύστη προσκολληθεί στο επιθήλιο του ενδομητρίου, ξεκινά ένας ταχύτατος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε δύο στιβάδες, την εσωτερική κυτταροτροφοβλάστη και την εξωτερική συγκυτιοτροφοβλάστη που αποτελεί μία πολυπυρηνική μάζα χωρίς σαφή κυτταρικά όρια. Κατά την 10<sup>η</sup> 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 10<sup>η</sup> 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 μεσεγγυματικό 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 μεσολάχνιο 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 εμβρυϊκή κυκλοφορία καθώς και τη πρόσληψη των απαραίτητων για το έμβρυο θρεπτικών ουσιών (Εικόνα 7).

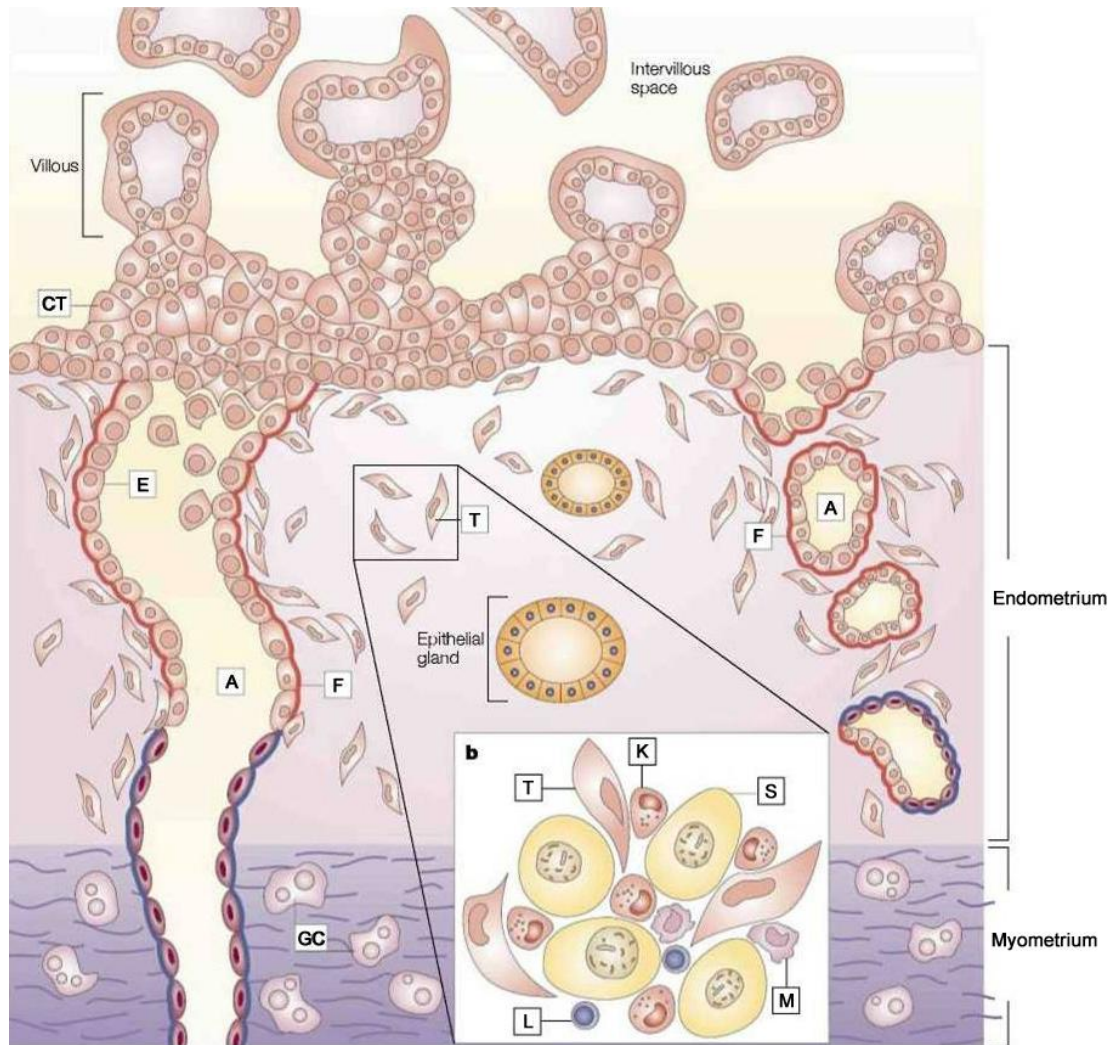




Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της αιμοχοριακής κυκλοφορίας του πλακούντα.

### 1.2.1 Το εμβρυομητρικό όριο

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 έμβryo (τροφοβλάστη). Οι κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στο εμβρυομητρικό όριο είναι η εξωλαχνωτή τροφοβλάστη, τα φθαρτικά κύτταρα, τα κύτταρα του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και τα κύτταρα που δομούν τους ενδομήτριους αδένες και αγγεία και το μυομήτριο (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της ιστολογίας του εμβρυομητρικού ορίου.** Οι πλακουντιακές λάχνες καλύπτονται από την συγκυτιοτροφολάστη (έξω στίχος κυττάρων) και την κυτταροτροφολάστη (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 (Α). Η λαχνωτή κυτταροτροφολάστη αυξάνεται εστιακά στις κορυφές των καθηλωμένων λαχνών σχηματίζοντας τις κυτταροτροφολαστικές κολώνες (CT). Στο εμβρυομητρικό όριο, οι κολώνες αυτές σχηματίζουν ένα κατά τόπους συνεχόμενο κάλυμμα. Από αυτές τις θέσεις η ΕΛΤ εισέρχεται στο φθαρό ως διάμεση ΕΛΤ (Τ) για να περιβάλλει και να καταστρέψει το μυϊκό ιστό των μητριαίων αρτηριών και να τον αντικαταστήσει με ινώδες υλικό (F). Η ενδαγγειακή ΕΛΤ (Ε) μετακινείται προς τα κάτω στις αρτηρίες αντικαθιστώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ΕΛΤ 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 (Τ) μεταξύ των μεγάλων στρωματικών κυττάρων (S). Τα μητρικά λευκοκύτταρα περιλαμβάνουν τα uNK κύτταρα (K), μερικά μακροφάγα (M) και λίγα Τ-κύτταρα (L).

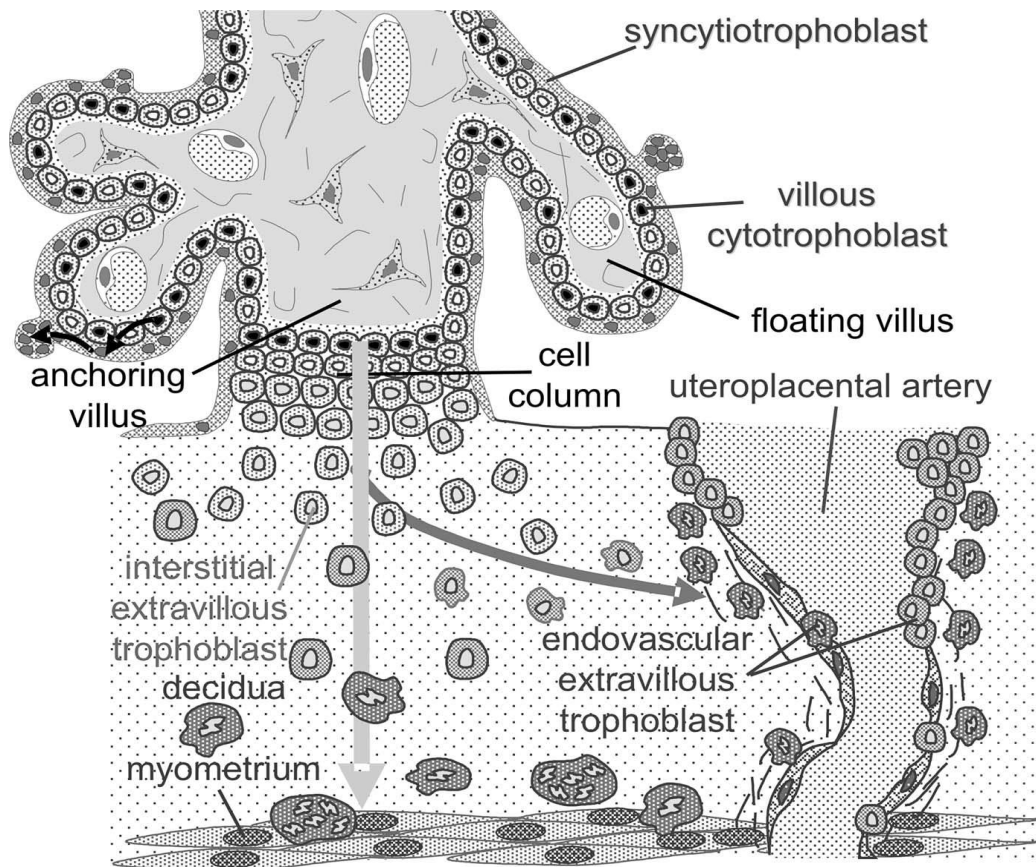
### 1.2.1.1 Τα κύτταρα του εμβρυομητρικού ορίου

Οι στήλες των τροφολαστικών κυττάρων στις κορυφές των καθηλωμένων λαχνών δίνουν γένεση στην εξωλαχνωτή τροφολάστη (extravillous trophoblast) (ΕΛΤ) (Rijnenborg et al, 1981) (Εικόνα 8). 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 φθάνοντας 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 μητριάιες αρτηρίες αντικαθιστώντας σταδιακά το ενδοθηλίό τους. Τα κύτταρα της διάμεσης ΕΛΤ που φτάνουν στο μυομήτριο, συντήκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τα γιγαντιαία κύτταρα του εδάφους του 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 αιματικής παροχής προς το έμβρυο. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με το μετασχηματισμό των μητριάιων σπειροειδών αρτηριών (Pijnenborg et al, 1983). Η διάμεση τροφοβλάστη περιβάλλει τα τοιχώματα των μητριάιων 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 εισέλθει 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 9**). Εκεί, η ενδαγγειακή πλέον τροφοβλάστη αντικαθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παράλληλα, η ενδαγγειακή τροφοβλάστη επιπωματίζει τον αυλό των μητριάιων αρτηριών με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ροή του μητρικού αίματος προς τους μεσολάχνιους 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 (10<sup>η</sup> με 12<sup>η</sup> 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 μητριάιων σπειροειδών αρτηριών είναι καίριος για την

ομαλή ανάπτυξη του κυήματος. 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 σπειροειδείς αρτηρίες μετατρέπονται σε σωλήνες χαμηλής ενδοτικότητας που έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στις ολοένα αυξανόμενες απαιτήσεις αίματος της εμβρυοπλακουντικής μονάδας (Pijnenborg et al, 1980; Brosens et al, 2002; Kam et al, 1999).



**Εικόνα 9.** 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.

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 φθαρτικό στρωματικό κύτταρο (Εικόνα 8). Ένας σημαντικός αριθμός δεδομένων σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τη λειτουργία των κυττάρων αυτών έχει ανακοινωθεί έως σήμερα (Brag, 2002). Είναι πλέον σαφές ότι ο φθαρτός λειτουργεί σαν ένα ενδοκρινές όργανο παράγοντας πληθώρα ορμονών, αυξητικών παραγόντων, ιντερλευκινών και άλλων κυτταροκινών, 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 φθαρτού όσο και με τη διεισδύουσα ΕΛΤ (Dunn et al, 2003).

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 φθαρτού (Bulmer et al, 1991). Ο μεγαλύτερος λευκοκυτταρικός πληθυσμός του ενδομητρίου, αποτελείται από κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer cells, NK cells) που ονομάζονται μητριαία NK κύτταρα (uterine NK cells, uNK cells). Τα κύτταρα αυτά συνιστούν πάνω από το 70% του πληθυσμού των λευκοκυττάρων που βρίσκονται στον φθαρτό κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Το υπόλοιπο 30% αποτελείται από τα μακροφάγα του πλακούντα και λίγα Τ λεμφοκύτταρα (περίπου 20% και 10% του συνολικού λευκοκυτταρικού πληθυσμού αντίστοιχα) (Εικόνα 8).

Ανεξαρτήτως των επιμέρους λειτουργιών του κάθε ενός από τους τύπους κυττάρων που ανευρίσκονται στο εμβρυομητρικό όριο, μια σημαντική πτυχή της διαδικασίας της πλακουντοποίησης είναι η δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος ικανού να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και να καταστείλει τις επιβλαβείς φλεγμονώδεις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος.

### 1.2.1.2 Μικροπεριβάλλον στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου

Το τοπικό περιβάλλον στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου χαρακτηρίζεται όχι μόνο από την παρουσία των διαφόρων κυτταρικών τύπων αλλά και από τους διαλυτούς παράγοντες που παράγονται εκεί. Η παραγωγή και οι δράσεις των κυτταροκινών στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου είναι σημαντικά για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των τροφοβλαστικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση και τη διείσδυσή τους (Simon et al, 2000; Formby 1995). Στις φυσιολογικές κήσεις, επικρατούν οι αντιφλεγμονώδεις Th-2 κυτταροκίνες (Wegmann et al, 1993; Aschkenazi et al, 2000) με αποτέλεσμα η ισορροπία μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών να θεωρείται καθοριστικής σημασίας ως προς την επιτυχή έκβαση μιας κύησης. Πιστεύεται ότι για τη φυσιολογική ανάπτυξη μιας κύησης, η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και η ινερφερόνη-γ (IFN-γ) καταστέλλεται, ενώ η παραγωγή αντιφλεγμονωδών

κυτταροκινών, όπως η IL-4, IL-6 και IL-10 επαυξάνεται (Wegman et al, 1993). Πλακουντιακοί και φθαρτικοί ιστοί από φυσιολογικές κήσεις έχει βρεθεί ότι εκφράζουν τόσο προ- όσο και αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Hanna et al, 2000; Tranchot-Diallo et al, 1997; von Rango et al, 2003; Bennett et al, 1998). Ωστόσο, οι προφλεγμονώδεις Th-1 κυτταροκίνες φαίνεται να είναι δυνητικά επιβλαβείς ως προς την έκβαση μιας κήσης, αν λάβουμε υπόψη ότι ο TNF-α ή η IFN-γ έχουν σχετιστεί με πρόωρο τοκετό (Casey et al, 1989; 1990; Yoon 1996). Παρομοίως, μειωμένα επίπεδα φθαρτικών IL-4 και IL-10 έχουν παρατηρηθεί σε γυναίκες με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβλές (Casey et 1990).

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά τα μακροφάγα, αποτελούν μια κύρια πηγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και συνεισφέρουν στη διατήρηση επαρκούς ισορροπίας μεταξύ Th-1 και Th-2 κυτταροκινών στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

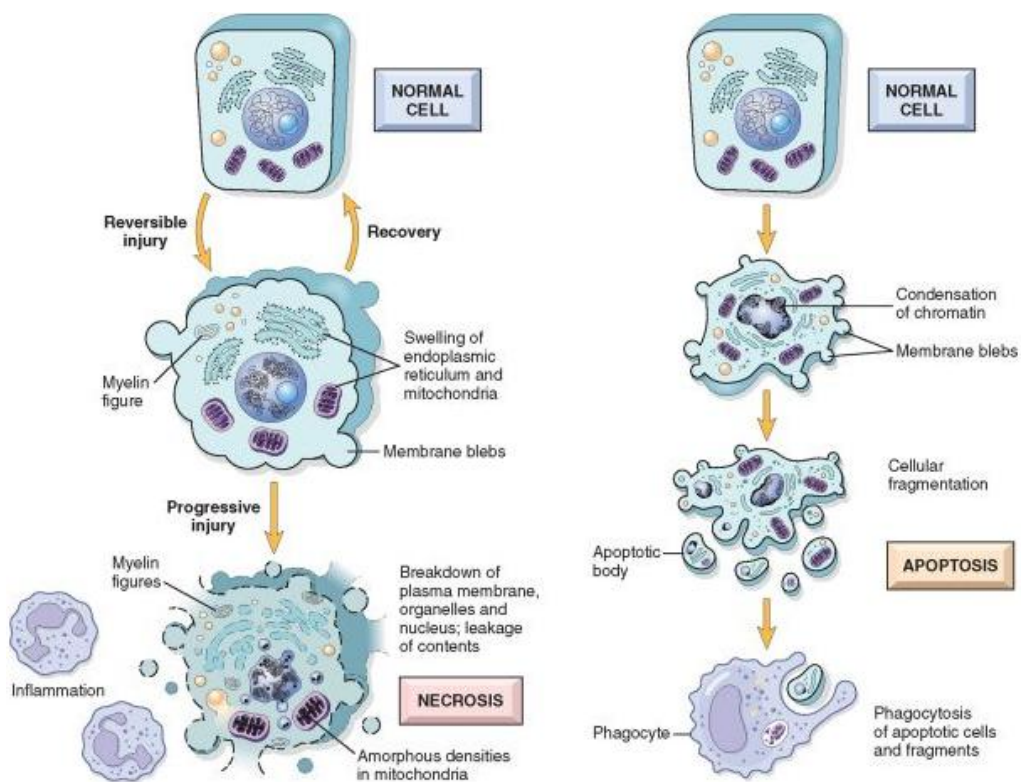
### 1.3 Η απόπτωση

Ο όρος «απόπτωση» είναι συνώνυμος του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που εκφράζει τη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος θανάτου κωδικοποιημένου στο γενετικό υλικό. Η απόπτωση αναγνωρίζεται ως 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). Η απόπτωση έχει μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά διαφορετικά από τη νέκρωση. Τα κύτταρα που πεθαίνουν σε απόκριση σε οξύ τραυματισμό και καταστροφή ιστού, υπόκεινται σε νέκρωση και παρουσιάζουν ποικίλες μορφολογικές διαφοροποιήσεις. Τυπικά το κύτταρο αυξάνει σε όγκο, διαρρηγνύεται η κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό περιεχόμενο απελευθερώνεται στο μεσοκυττάριο χώρο προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση και νέκρωση παρακείμενων κυττάρων (**Εικόνα 10**).

Σε αντίθεση με την νέκρωση, 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). 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 κενοτοπιώδες (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 σωματίδια και περιέχουν τα διάφορα συστατικά του κυττάρου. Τα αποπτωτικά σωματίδια τέλος φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται ταχέως από τα γειτονικά κύτταρα.

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 διασπώνται προκειμένου να προχωρήσει η διαδικασία της απόπτωσης. Σημαντική επίσης θεωρείται η οξινοποίηση 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 10**).



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση των κυρίων γεγονότων της νέκρωσης και της απόπτωσης.

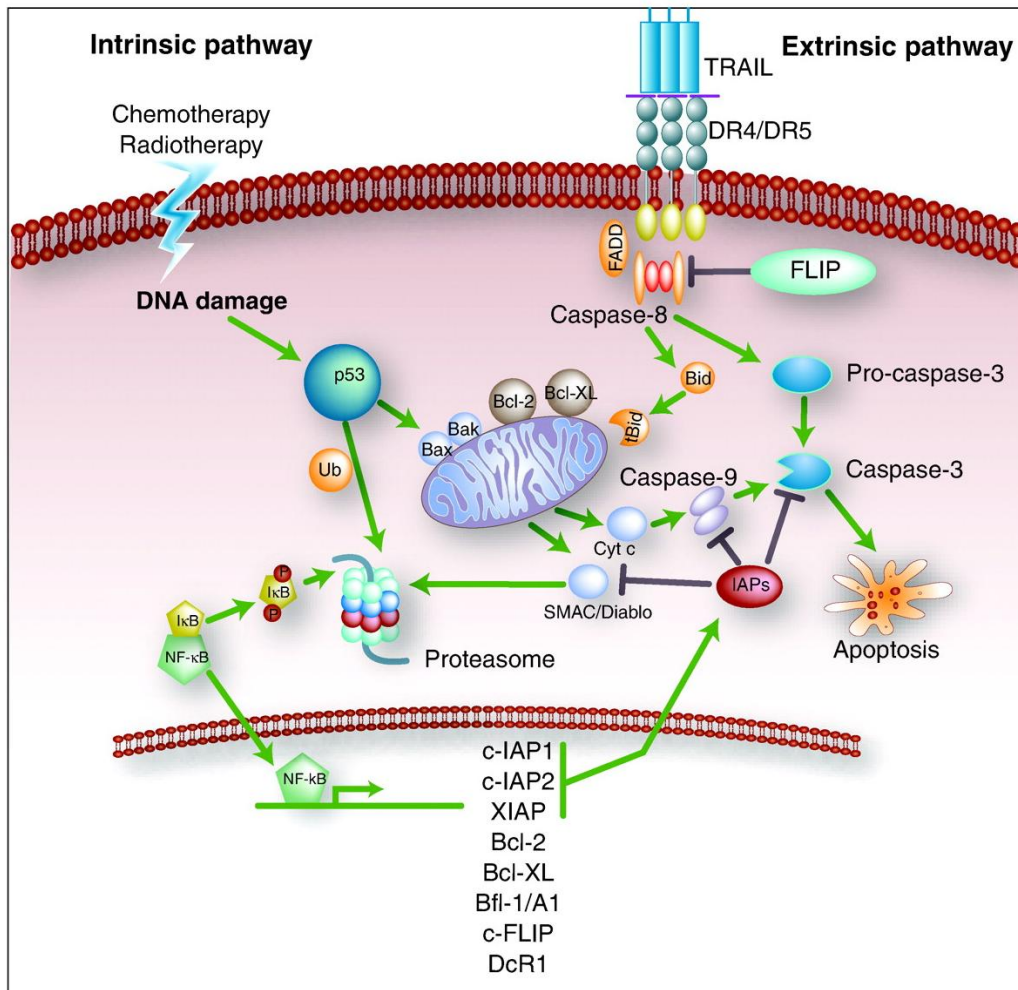


### 1.3.1 Μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται αυστηρά από συγκεκριμένα γονίδια. Έχει περιγραφεί ένα πλήθος μοριακών αποπτωτικών μονοπατιών τα οποία αλληλοδιαπλέκονται κατά τρόπο που καθιστά αδύνατη την περιγραφή τους ξεχωριστά. Διακρίνονται δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές (**Εικόνα 11**).

Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιείται από κάποια διαταραχή στην ομοιόσταση 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).

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

### 1.3.1.1 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, αυτές που περιέχουν τις περιοχές BH1, BH2 και BH3: Bax, Bak, Bok/Mtd και αυτές που περιέχουν μόνο τη BH3 περιοχή: 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 ενδοκυττάριας 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).

### 1.3.1.2 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 εκκινητές και κασπάσες

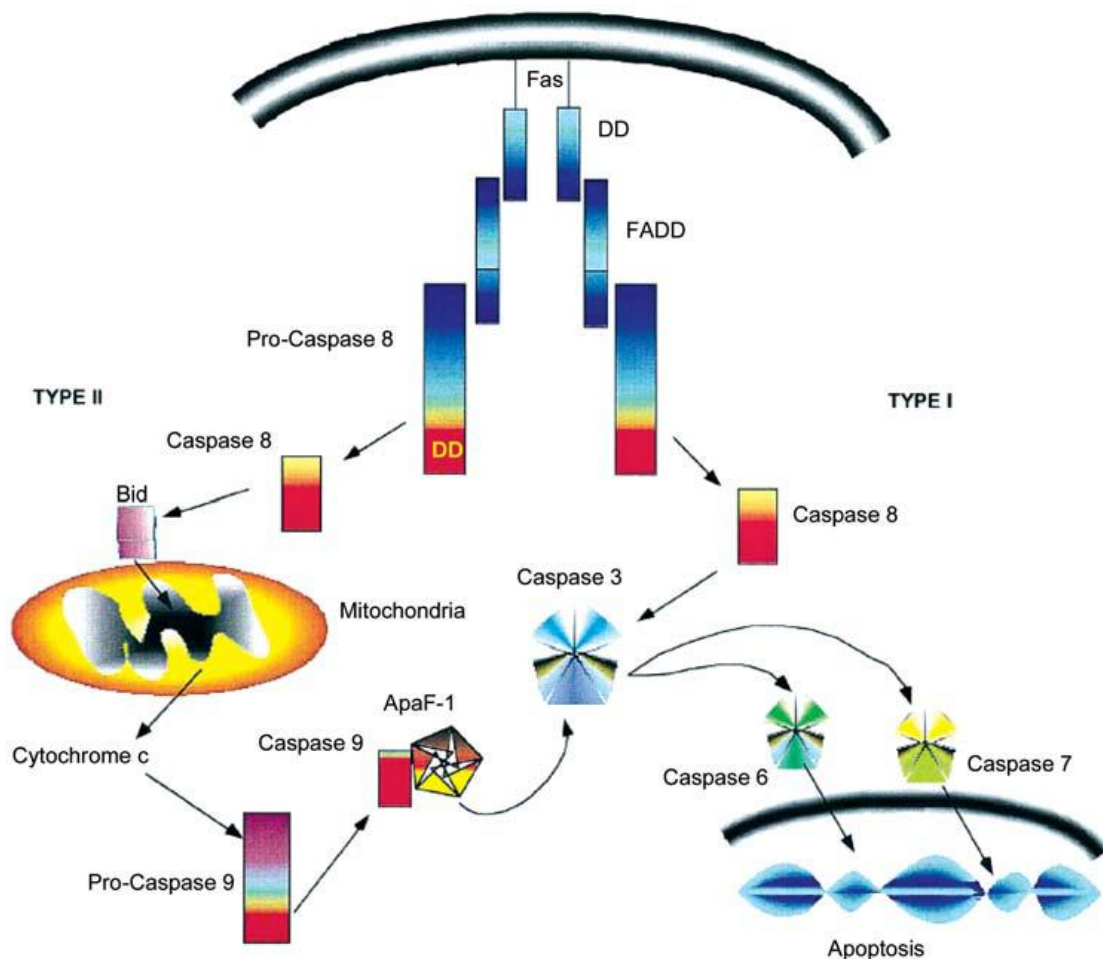
εκτελεστές. Η ενεργοποίηση των τελευταίων αναφέρεται συχνά σαν το σημείο του μονοπατιού όπου το κύτταρο είναι υποχρεωμένο να οδηγηθεί σε απόπτωση. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί 14 κασπάσες στα θηλαστικά, από τις οποίες 11 ομόλογες παρουσιάζονται στον άνθρωπο (Ashe et al, 2003). Όπως και άλλες πρωτεάσες, οι κασπάσες συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα και διαθέτουν τρεις περιοχές: ένα αμινοτελικό άκρο που ποικίλει στο μήκος και την αλληλουχία των αμινοξέων του, μια μεγάλη υποομάδα (MB ~20 kDa) και μια μικρή υποομάδα (MB ~10 kDa). 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-εκκινητές 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-εκκινητών είναι το πρώτο βήμα ενός αυστηρά ελεγχόμενου, μη αντιστρεπτού, αυτο-ενισχυόμενου πρωτεολυτικού μονοπατιού. Οι κασπάσες- εκκινητές 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 στη 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).

### 1.3.1.3 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) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση των ενδοκυττάρων συστατικών του συστήματος Fas/FasL.

Ο επαγόμενος από το Fas/FasL σύστημα κυτταρικός θάνατος έχει διάφορους ρόλους, τόσο προστατευτικούς όσο και επιζήμιους για τον οργανισμό (Green et al, 1997). Συγκεκριμένα, το σύστημα Fas/FasL παίζει σημαντικό ρόλο σε τρεις τύπους φυσιολογικής απόπτωσης: στην περιφερική εξάλειψη ενεργοποιημένων ώριμων T-κυττάρων κατά τη λήξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης (Nagata and Golstein, 1995), στην καταστροφή κυττάρων «στόχων» μέσω των T-κυτταροτοξικών και των NK κυττάρων (Rouvier et al, 1993) και στην εξάλειψη φλεγμονωδών κυττάρων σε ανοσολογικά προνομιακούς ιστούς (Bellgrau et al, 1995).

Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος του συστήματος αφορά στην 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).

### **1.3.2 Η απόπτωση στην τροφοβλάστη**

Τα τελευταία χρόνια, έχει ανακοινωθεί σε ένα αριθμό μελετών η εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων, ή/και στοιχείων της απόπτωσης τόσο στη λαχνωτή όσο και στην εξωλαχνωτή 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 στη 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, την προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Ωστόσο η σημασία του φαινομένου αυτού στην παθοφυσιολογία των δύο νόσων δεν είναι πλήρως γνωστή (Smith et al, 1997; Allaire et al, 2000; Erel et al, 2001; Ishihara et al, 2002).

Ο ρόλος της απόπτωσης στην φυσιολογία της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης, έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Τα πεπτιδία 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 διείσδυσης 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 ανοσολογικά κύτταρα 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). Ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον αποκτά τα τελευταία χρόνια η μελέτη του ρόλου της εξωλαχνωτής

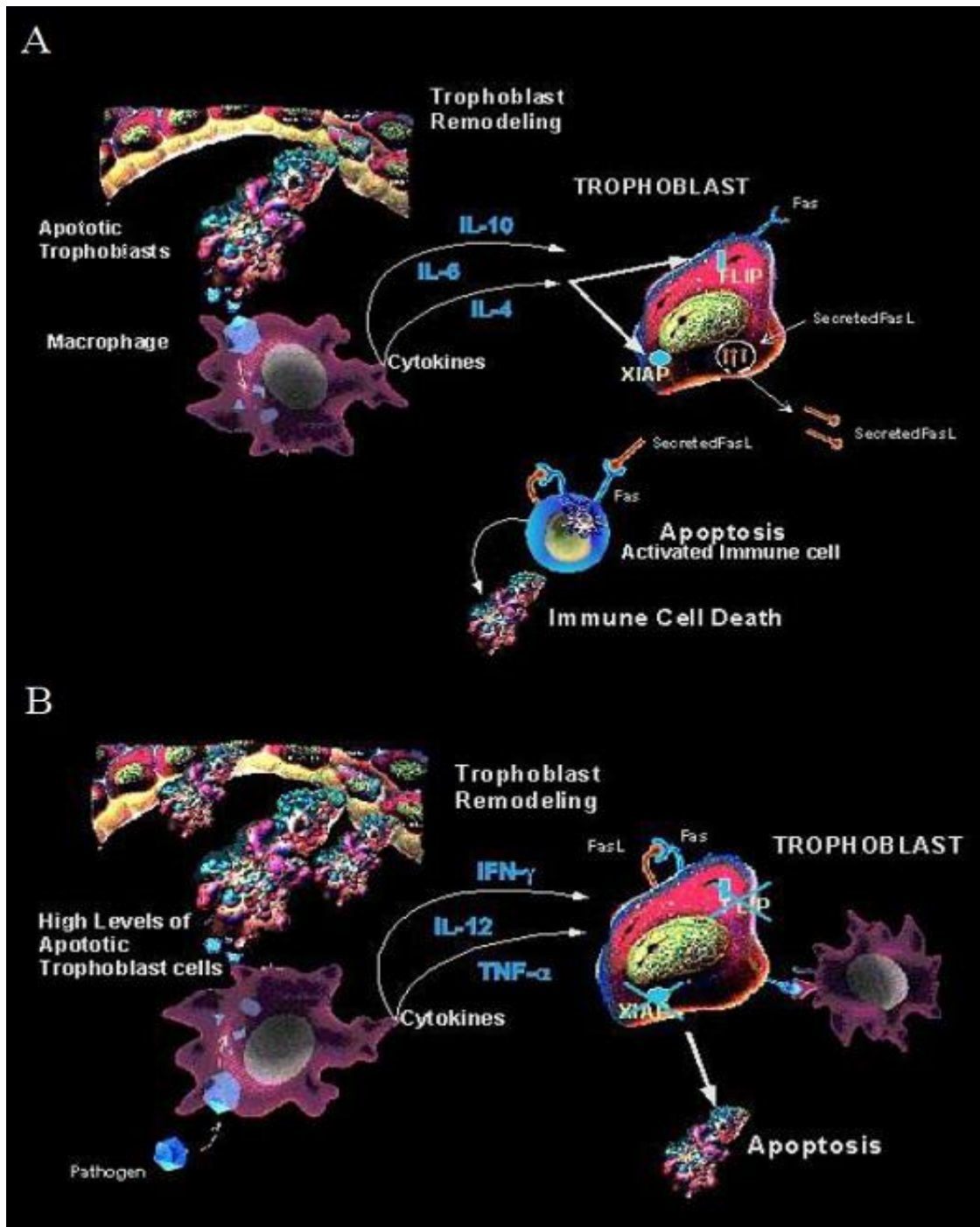
τροφοβλάστης στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας και της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης. Η ακριβής, ωστόσο, συμπεριφορά των τροφοβλαστικών κυττάρων σε αυτές τις νόσους, καθώς και η σημασία της απόπτωσης στην παθοφυσιολογία τους απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

### **1.3.3 Ο ρόλος των μακροφάγων στη ρύθμιση της απόπτωσης στην τροφοβλάστη**

#### **1.3.3.1 Η κάθαρση των αποπτωτικών σωματίων**

Η εμφύτευση και η τροφοβλαστική διείσδυση χαρακτηρίζονται από μια συνεχή και προοδευτική επαγωγή απόπτωσης στους μητρικούς ιστούς που περιβάλλουν το κύημα (Piacentini et al, 1994). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, τα μακροφάγα που είναι παρόντα στη θέση εμφύτευσης, είναι πιθανό μέσω της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών σωματίων να προφυλάσσουν από την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυττοκινών και προ-ανοσογόνων ενδοκυττάρων συστατικών, διαδικασίες που συμβαίνουν κατά τη δευτερογενή νέκρωση (**Εικόνα 13**). Λόγω της αλλογενούς φύσης του πλακούντα, η διαδικασία αυτή είναι αναγκαία για το καλώς έχειν του εμβρύου. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι φορείς πρωτεϊνών αντιγονικά ξένων προς το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας και ενδεχόμενη απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία ως αποτέλεσμα κυτταρικού θανάτου, θα μπορούσε να επάγει ή να επιταχύνει ανοσολογικές αποκρίσεις θανατηφόρες για το κύημα. Έτσι, η απομάκρυνση των θανόντων τροφοβλαστικών κυττάρων πριν την απελευθέρωση των ενδοκυττάρων συστατικών τους, είναι καθοριστική για την πρόληψη της εμβρυϊκής απόρριψης. Τα μακροφάγα αποτελούν κυτταρικό συστατικό-κλειδί στη διαδικασία αυτή.





**Εικόνα 13. Επίδραση της κάθαρσης των αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα.** Α. Η κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων επάγει την έκφραση από τα μακροφάγα αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών με προστατευτικές δράσεις στην επιβίωση της τροφοβλάστης και στην ανοσολογική ανοχή. Β. Αλλαγές στο περιβάλλον των κυτταροκινών, ως αποτέλεσμα αυξημένων επιπέδων αποπτωτικών σωματίων και ανεπαρκούς κάθαρσης, θα οδηγήσει στη δημιουργία ενός προφλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος με συνακόλουθες μεταβολές στην αντίσταση της τροφοβλάστης στη Fas-επαγόμενη απόπτωση.

### 1.3.3.2 Μακροφάγα και κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων

Η απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων τα οποία δημιουργούνται ως αποτέλεσμα απόπτωσης, αποτελεί μια αποστολή αναγκαία για τη διατήρηση της

κυτταρικής ομοιόστασης. Η κάθαρση των αποπτωτικών σωματίων αποτελεί μια δυναμική διαδικασία που στόχο έχει την αποστολή σημάτων επιβίωσης ή θανάτου στα εναπομείναντα κύτταρα (Duvall et al, 1985). Η απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματίων δεν αποτελεί ούτε ουδέτερη ούτε παθητική, αλλά μάλλον μια ενεργητική διαδικασία η οποία επηρεάζει όχι μόνο τις ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά και τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του γειτονικού περιβάλλοντος. Η ικανότητα των μακροφάγων να επηρεάζουν τα κύτταρα αυτά φαίνεται να ρυθμίζεται από την έκταση της πρόσληψης των αποπτωτικών κυττάρων (Piacentini and Autuori, 1994).

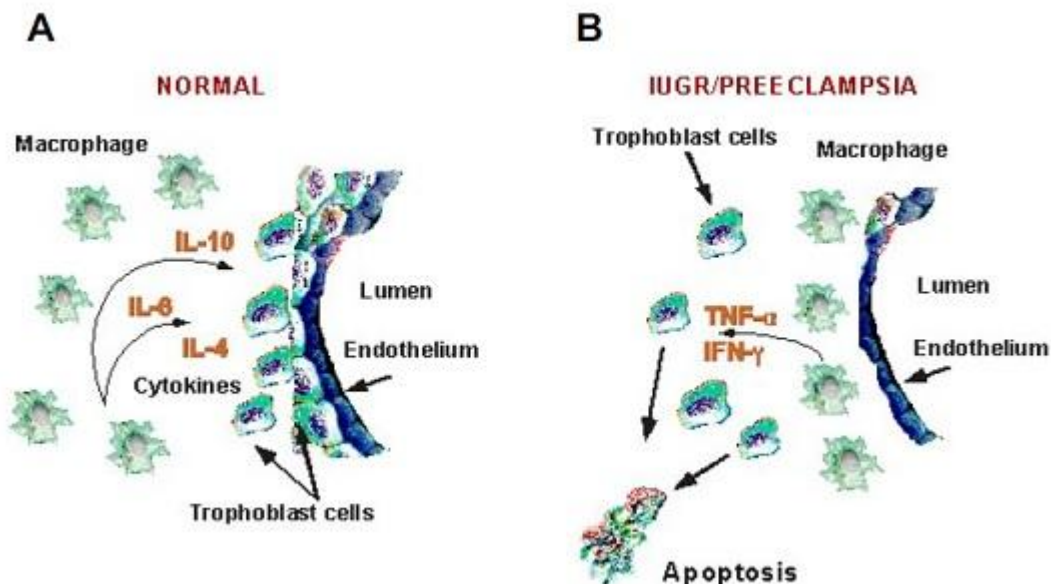
### **1.3.3.3 Τα μακροφάγα της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου**

Ιστολογική ανάλυση φυσιολογικών πλακούντων στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου αποκαλύπτει την παρουσία μεγάλου αριθμού μακροφάγων τα οποία, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, εντοπίζονται πλησίον των αποπτωτικών κυττάρων (De and Wood, 1990). Η πυκνή αυτή διήθηση της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου από μακροφάγα υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή των κυττάρων αυτών σε συγκεκριμένες σχετιζόμενες με την κύηση λειτουργίες (Ben-Hur et al, 2001). Τα μακροφάγα δεν αποτελούν μόνο μέσο απομάκρυνσης των θανόντων κυττάρων, αλλά συντονίζουν ενεργά και την απόπτωση των ανεπιθύμητων κυττάρων κατά την ιστική αναδόμηση (Savill and Fadok, 2000). Τα μακροφάγα, επίσης, συνθέτουν και εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που ελέγχουν τις τοπικές κυτταρικές και ιστικές αλληλεπιδράσεις (Hunt, 1989; Garcia-Velasco et al, 1999; Mor et al, 1998). Υπόκεινται, τέλος, σε ορμονικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία και την επιβίωσή τους (Mor and Naftolin, 1998; Mor et al, 2003).

Πολυάριθμες μελέτες αποδεικνύουν ότι η ικανότητα των μακροφάγων να επηρεάζουν τον κυτταρικό θάνατο ρυθμίζεται από την έκταση της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων (Piacentini and Autuori, 1994). Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης του εμβρύου τα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας που περιβάλλουν τη βλαστοκύστη αποπίπτουν και πιθανόν να σχηματίζουν ένα αντιφλεγμονώδες περιβάλλον μέσω παραγωγής Th-2 τύπου κυτταροκινών. Αυτό πιθανόν να εξηγεί τη συνύπαρξη μακροφάγων και τροφοβλαστικών κυττάρων στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου. Είναι γνωστό ότι ο τύπος των κυτταροκινών που παράγουν τα μακροφάγα εξαρτάται από την κατάσταση ενεργοποίησής τους (Cavaillon 1994). Κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών κήσεων, η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων καταστέλλει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα από το να παράγουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως

ο TNF- $\alpha$  και η IFN- $\gamma$  και προάγει την απελευθέρωση Th-2 τύπου αντι-φλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (**Εικόνα 13A**). Σε κήσεις επιπλεγμένες με προεκλαμψία ή IUGR, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TNF- $\alpha$  και η IFN- $\gamma$  και επάγουν την απόπτωση της ΕΛΤ (**Εικόνα 13B**).

Τα μακροφάγα κατά τη διάρκεια της τροφοβλαστικής διείσδυσης και διαφοροποίησης εντοπίζονται πλησίον των σπειροειδών αρτηριών. Προηγούμενες μελέτες στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου υποστηρίζουν μεταβολές στην κατανομή των μακροφάγων κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, όπως η προεκλαμψία (Reister et al, 2001). Ενώ σε φυσιολογικές κήσεις τα μακροφάγα εντοπίζονται στο στρώμα που περιβάλλει τις μετασχηματισμένες σπειροειδείς αρτηρίες και την ΕΛΤ, στην προεκλαμψία εντοπίζονται μέσα και γύρω από τις σπειροειδείς αρτηρίες διαχωρίζοντάς τες από τα τροφοβλαστικά κύτταρα. Η κατανομή τους αυτή μοιάζει με φράγμα μεταξύ διεισδυτικής τροφοβλάστης και σπειροειδών αρτηριών. Έτσι, ενώ στις φυσιολογικές κήσεις τα μακροφάγα δρουν ως υποστηρικτικά κύτταρα διευκολύνοντας την τροφοβλαστική διείσδυση, σε παθολογικές καταστάσεις δρουν ως φραγμός στη διείσδυση και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης επάγοντας την απόπτωση της (**Εικόνα 14**).



**Εικόνα 14. Κατανομή μακροφάγων σε φυσιολογική και επιπλεγμένη με προεκλαμψία ή IUGR κήση.** Ενώ σε φυσιολογικές κήσεις τα μακροφάγα εντοπίζονται στο στρώμα που περιβάλλει τις μετασχηματισμένες σπειροειδείς αρτηρίες και την ΕΛΤ (A), στην προεκλαμψία εντοπίζονται μέσα και γύρω από τις σπειροειδείς αρτηρίες διαχωρίζοντάς τες από τα τροφοβλαστικά κύτταρα (B).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### 1.4 Η προεκλαμψία

Η προεκλαμψία αποτελεί μια πολυσυστηματική διαταραχή χαρακτηριστική της ανθρώπινης κύησης. Η επίπτωση της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 2-10% ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται και τον ορισμό που χρησιμοποιείται (World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy, 1988). Η διαταραχή αυτή σχετίζεται με την υψηλότερη εμβρυϊκή και μητρική νοσηρότητα και θνησιμότητα μεταξύ όλων των επιπλοκών της κύησης (Villar et al, 2003). Παρά την ευρεία επίπτωση της προεκλαμψίας, η υποκείμενη αιτία της νόσου παραμένει ασαφής. Μια πληθώρα ενδείξεων, ωστόσο, ενοχοποιεί τον πλακούντα ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα (Redman 1991).

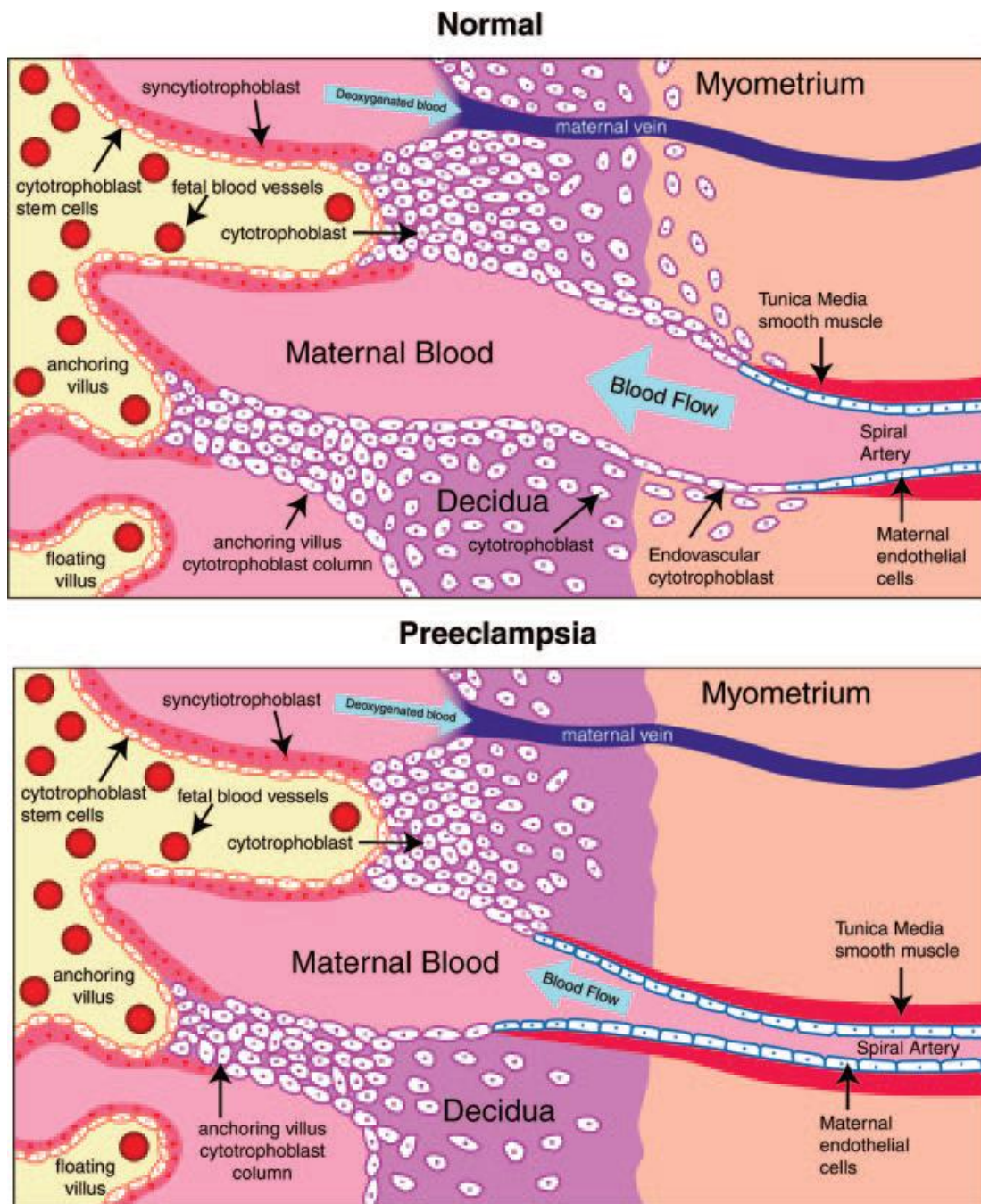
#### 1.4.1 Παθοφυσιολογία

Διάφοροι παθογενετικοί μηχανισμοί οι οποίοι προσπαθούν να συσχετίσουν τις διαταραχές στην εμβρυοπλακουντική μονάδα με τα κλινικά χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας έχουν κατά καιρούς προταθεί. Σήμερα, η προεκλαμψία θεωρείται νόσος δύο σταδίων. Κάθε ένα από τα δύο στάδια της προεκλαμψίας σχετίζεται με γεγονότα που συμβαίνουν σε διαφορετικές περιοχές της εμβρυομητρικής αλληλεπίδρασης (Redman and Sargent, 2005). Η κύρια περιοχή εμβρυομητρικής αλληλεπίδρασης στο στάδιο 1 αφορά στα κύτταρα της ΕΛΤ τα οποία μεταναστεύουν από τις κορυφές των καθηλωμένων λαχνών και διεισδύουν στο φθαρτό. Η δεύτερη περιοχή εμβρυομητρικής αλληλεπίδρασης βρίσκεται στη συγκυτιοτροφοβλαστική στιβάδα, η οποία καλύπτει την επιφάνεια των χοριακών λαχνών και βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μητρική κυκλοφορία. Αυτή η περιοχή παρέχει κατά τη διάρκεια της κύησης στη μητρική κυκλοφορία συγκυτιοτροφοβλαστικά θραύσματα, μικροτεμαχίδια και ελεύθερο DNA και RNA (Sargent et al, 2003). Η περιοχή αυτή δίνει γένεση στο δεύτερο στάδιο της προεκλαμψίας, προκαλώντας την υπεύθυνη για τα μητρικά συμπτώματα της προεκλαμψίας συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (Redman et al, 1999).

Η φυσιολογική πλακουντιακή ανάπτυξη προϋποθέτει τη διείσδυση της ΕΛΤ στις σπειροειδείς αρτηρίες. Η αναδόμηση αυτή των σπειροειδών αρτηριών σε μεγάλης χωρητικότητας-μικρής αντίστασης αγγεία ξεκινά στις αρχές του πρώτου τριμήνου, ολοκληρώνεται μεταξύ της 18<sup>ης</sup>-20<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης και έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του ενδοθηλίου (Robertson et al, 1967; Gerretsen et al, 1981) (**Εικόνα**

**15).** Η τροφοβλαστική διείσδυση/διαφοροποίηση συνεπάγεται αλλαγές στην έκφραση συγκεκριμένων κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μεταλλοπρωτεϊνών και του HLA-G μορίου του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Damsky et al, 1992; 1994). Η διαδικασία αυτή γνωστή ως ‘ψευδοαγγειογένεση’ απαιτεί το μετασχηματισμό των τροφοβλαστικών κυττάρων, με αποτέλεσμα απώλεια έκφρασης στην επιφάνειά τους μορίων προσκόλλησης επιθηλιακού φαινότυπου (π.χ. ιντεγκρινών  $\alpha_6/\beta_4$ ,  $\alpha_v/\beta_5$ , και E-καντχερίνης) και έκφραση μορίων προσκόλλησης αγγειακού φαινότυπου (π.χ. ιντεγκρινών  $\alpha_1/\beta_1$ ,  $\alpha_v/\beta_3$ , και VE-καντχερίνης) (Zhou et al, 1997).

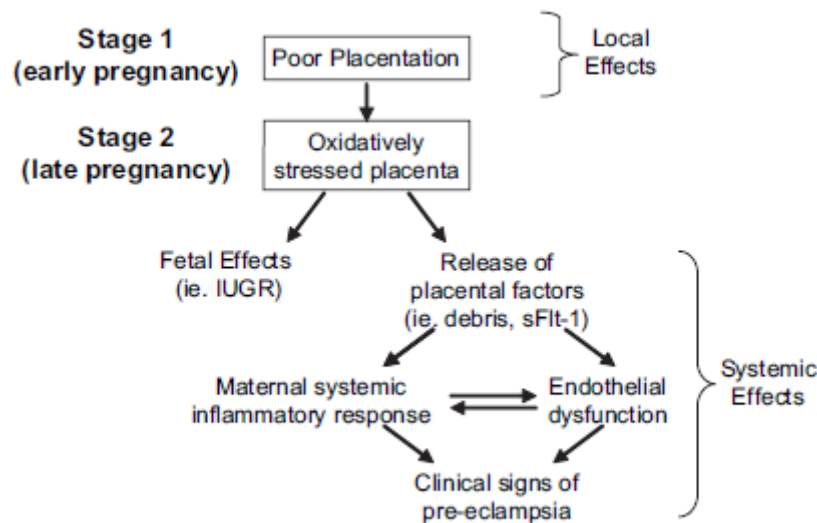
Στις γυναίκες που πρόκειται να αναπτύξουν προεκλαμψία, η κυτταροτροφοβλαστική διείσδυση παραμένει επιφανειακή, οδηγώντας σε διαταραχές στη μητροπλακουντική κυκλοφορία και επακόλουθη πλακουντιακή ισχαιμία (**Εικόνα 15**). *In vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι τροφοβλαστικά κύτταρα προερχόμενα από προεκλαμπτικούς πλακούντες δεν υφίστανται τις απαιτούμενες για την ψευδοαγγειογένεση μεταβολές στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης (Zhou et al, 1997; 1993). Παρ’ όλο που έχουν προταθεί πολυάριθμοι αιτιολογικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων περιβαλλοντικοί, γενετικοί και ανοσολογικοί, η κύρια αιτία αυτής της επιφανειακής τροφοβλαστικής διείσδυσης στην προεκλαμψία παραμένει ασαφής.



**Εικόνα 15. Ανώμαλη πλακουντοποίηση στην προεκλαμψία.** Κατά τη διάρκεια της πλακουντιακής ανάπτυξης τα κύτταρα της ΕΛΤ διεισδύουν στις σπειροειδείς αρτηρίες μετασχηματίζοντάς τες σε μεγάλης χωρητικότητας-μικρής αντίστασης αγγεία ικανά να παρέχουν επαρκή αιματική ροή στον πλακούντα (άνω εικόνα). Στην προεκλαμψία η διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων είναι επιφανειακή με αποτέλεσμα αποτυχία μετατροπής των σπειροειδών αρτηριών σε μεγάλης χωρητικότητας-μικρής αντίστασης αγγεία (κάτω εικόνα).

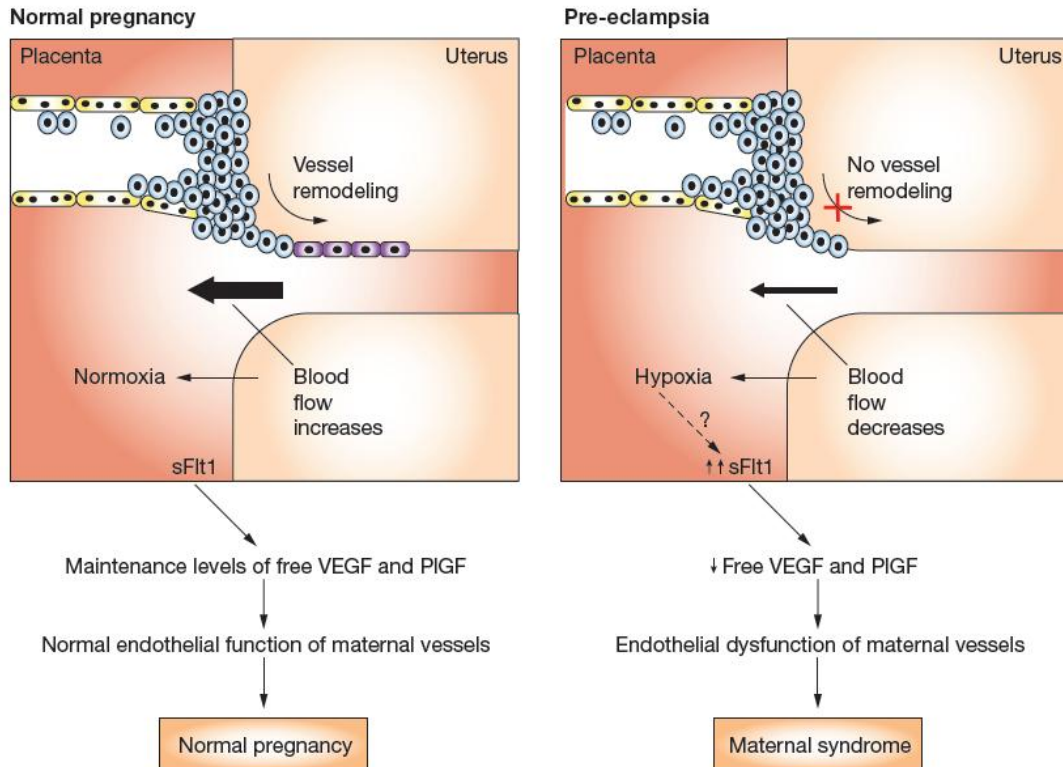
Η ανώμαλη πλακουντοποίηση και η συνοδός υποξία πιστεύεται ότι οδηγεί στην απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων στη μητρική κυκλοφορία. Οι παράγοντες αυτοί δρώντας στο αγγειακό δίκτυο της μητέρας επάγουν μια γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την επακόλουθη κλινική συμπτωματολογία της προεκλαμψίας (Εικόνα 16). Δύο είναι οι κύριες ομάδες των υποψήφιων παραγόντων: οι αυξητικοί

παράγοντες με τους διαλυτούς τους υποδοχείς και τα προϊόντα του πλακουντιακού οξειδωτικού στρες.



**Εικόνα 16. Τα δύο στάδια στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας.** Η προκλινική προεκλαμψία του 1<sup>ου</sup> σταδίου συμβαίνει στην αρχή της κύησης όταν η επιφανειακή τροφοβλαστική διείσδυση οδηγεί σε ανώμαλη πλακουντοποίηση και πλακουντιακή υποξία. Κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> σταδίου της προεκλαμψίας, ο πλακούντας ο οποίος έχει υποστεί οξειδωτικό στρες απελευθερώνει στη μητρική κυκλοφορία παράγοντες οι οποίοι επάγουν τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και τη γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που θα οδηγήσουν στην εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της προεκλαμψίας.

Ισχυρός υποψήφιος της πρώτης ομάδας είναι ο διαλυτός υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF) γνωστός ως sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1). Το μόριο αυτό ουδετεροποιεί την αγγειογενετική δραστηριότητα του VEGF και του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (placental growth factor, PlGF). Τα επίπεδα του sFlt-1 βρέθηκαν υψηλότερα του συνηθούς στο πλάσμα ασθενών με προεκλαμψία και η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε 5 εβδομάδες πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου (Levine et al, 2004). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η πλακουντιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με την πλακουντιακή παραγωγή sFlt-1 παραμένει άγνωστος. Είναι, ωστόσο, γνωστό ότι η υποξία επάγει την παραγωγή sFlt-1 από τα τροφοβλαστικά κύτταρα (Li et al, 2005) κι έτσι αυτό που θα μπορούσε να διαφοροποιεί την προεκλαμψία από μια φυσιολογική κύηση είναι η πρόϊμη πλακουντιακή παραγωγή με αποτέλεσμα τα υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα sFlt-1 πιθανά ως αποτέλεσμα της υποάρδευσης του πλακούντα (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17. Ο ρόλος του sFlt-1 στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας.** Ο sFlt-1 δεσμεύει τόσο τον VEGF όσο και τον PlGF βοηθώντας με τον τρόπο αυτό στη διατήρηση φυσιολογικής ενδοθηλιακής λειτουργίας στο μητρικό αγγειακό δίκτυο (αριστερή εικόνα). Ο προεκλαμπτικός πλακούντας απελευθερώνει υψηλότερα επίπεδα sFlt-1 από το φυσιολογικό (δεξιά εικόνα), στερώντας το αγγειακό δίκτυο του νεφρού, του ήπατος, του εγκεφάλου και άλλων μητρικών οργάνων από τα αναγκαία σήματα επιβίωσης, επάγοντας με τον τρόπο αυτό την παρατηρούμενη στην προεκλαμψία γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Στη δεύτερη ομάδα των διαλυτών παραγόντων, ανήκουν κυτταρικά, υποκυτταρικά και μοριακά θραύσματα τα οποία διαχέονται μέσω της συγκυτιακής επιφάνειας του πλακούντα στη μητρική κυκλοφορία. Έχει προταθεί ότι τα θραύσματα αυτά αναπαριστούν ένα συστηματικό φλεγμονώδες ερέθισμα κατά τη διάρκεια της κύησης. Ανιχνεύονται στο πλάσμα φυσιολογικών εγκύων γυναικών και αυξάνονται σημαντικά στην προεκλαμψία (Knight et al, 1998). Στα θραύσματα αυτά συμπεριλαμβάνονται και συγκυτιοτροφοβλαστικά μικροτεμάχια (syncytiotrophoblast microparticles) τα οποία αποτελούν προϊόν αναδιοργάνωσης και αναδόμησης της συγκυτιακής επιφάνειας των χοριακών λαχνών. Τα συγκυτιοτροφοβλαστικά μικροτεμάχια αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης και έχει δειχθεί ότι ο ρυθμός της απόπτωσης στη συγκυτιοτροφοβλάστη αυξάνεται σημαντικά στην προεκλαμψία (Ishihara et al, 2002). Επιπλέον, η υποξία φαίνεται να επάγει *in vitro* την απόπτωση σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων (Levy et al, 2000). Σήμερα πιστεύεται ότι τα συγκυτιοτροφοβλαστικά μικροτεμάχια συνεισφέρουν στη γενικευμένη



ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται στην προεκλαμψία όχι μόνο άμεσα αλλά και έμμεσα, αλληλεπιδρώντας με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Redman and Sargent, 2008).

#### **1.4.2 Απόπτωση στην τροφοβλάστη και προεκλαμψία**

Αυξημένα ποσοστά απόπτωσης τόσο στη λαχνωτή (Allaire et al, 2000; Smith et al, 1997; Crocker et al, 2003; Ishihara et al, 2002) όσο και στην εξωλαχνωτή (DiFederico et al, 1999; Genbacev et al, 1999) τροφοβλάστη έχουν αναφερθεί σε πλακούντες από κύησεις επιπλεγμένες με προεκλαμψία, υπογραμμίζοντας τη σημασία της ρύθμισης της απόπτωσης στην τροφοβλάστη στη παθοφυσιολογία της νοσολογικής αυτής οντότητας. Έχει δειχθεί ότι αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα αρχικά στάδια της κύησης πιθανόν να περιορίζουν τη διείσδυση της διάμεσης και ενδαγγειακής ΕΛΤ (DiFederico et al, 1999; Genbacev et al, 1999; Reister et al, 2001).

Παρόλο που οι αρχικές μελέτες δεν ανέφεραν διαφορές στην έκφραση των Bcl-2, Bcl-xL, Bax ή Bak στις πλακουντιακές λάχνες φυσιολογικών και επιπλεγμένων με προεκλαμψία κύησεων (Allaire et al, 2000; Levy et al, 2002), μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει μικρότερη έκφραση της Bcl-2 στη συγκυτιοτροφοβλάστη σε πλακούντες από περιπτώσεις βαριάς προεκλαμψίας (Ishihara et al, 2002), ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν απουσία έκφρασης της Bcl-2 στα αποπτωτικά κύτταρα της ΕΛΤ στους προεκλαμπτικούς πλακούντες (DiFederico et al, 1999; Genbacev et al, 1999).

Τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης που παρατηρούνται στις επιπλεγμένες με προεκλαμψία κύησεις, πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες που υφίσταται ο πλακούντας ως αποτέλεσμα υποξίας (Roberts and Hubel, 1999; Hung et al, 2002). Αν και υπάρχουν ορισμένες διαφορές στο κατά πόσο τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στην επαγόμενη από υποξία απόπτωση (Crocker et al, 2001; Levy et al, 2000; Kilani et al, 2003), υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η υποξία επάγει απόπτωση σε άλλους κυτταρικούς τύπους (Muschel et al, 1995; Graeber et al, 1996). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η υποξία επάγει την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων ελαττώνοντας την έκφραση της Bcl-2 και αυξάνοντας την έκφραση των p53 και Bax, ενώ παράλληλα ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) φάνηκε να ελαττώνει σημαντικά τα ποσοστά της επαγόμενης από υποξία απόπτωσης (Levy et al, 2000). Επιπλέον, σε μια μεταγενέστερη μελέτη βρέθηκε ότι αναστολή του μονοπατιού της κινάσης της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης-3 (PIK3)/πρωτεϊνικής κινάσης Β (Akt), μπορεί να ευαισθητοποιήσει υβριδικά

τροφοβλαστικά κύτταρα σε επαγόμενο από οξυγόνο κυτταρικό θάνατο και ότι ο EGF ασκεί την ανταποπρωτική του δράση ανεξάρτητα του PIK3/Akt μονοπατιού (Perkins et al, 2002).

Εκτός από την απόπτωση, πολυάριθμοι μηχανισμοί έχουν βρεθεί να περιορίζουν τη διείσδυση της ΕΛΤ στις μητριαίες σπειροειδείς αρτηρίες. Αυτοί περιλαμβάνουν: ελαττωμένη έκφραση της ιντεγκρίνης  $\alpha_1\beta_1$  και απουσία έκφρασης της VE-καντχερίνης (Zhou et al, 1993), ελαττωμένη έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (MMP-9) (Graham and McCrae, 1996) και ελαττωμένη έκφραση του HLA-G (Hara et al, 1996). Η παρατηρούμενη ελάττωση στην έκφραση αυτών των αναγκαίων για την τροφοβλαστική διείσδυση και διαφοροποίηση παραγόντων, υποστηρίζει την υπόθεση ότι η απόπτωση αυξάνεται στην προεκλαμψία δεδομένου ότι η έκφραση των πρωτεϊνών ελαττώνεται σε επίπεδο μεταγραφής κατά την είσοδο των κυττάρων στον αποπρωτικό καταρράκτη (Reister et al, 1999). Αυτό υποδεικνύει ότι η ρύθμιση της απόπτωσης στον πλακούντα δεν αποτελεί το τέλος της διαδικασίας καθώς η κάθαρση των αποπρωτικών σωματίων αποτελεί καθοριστικό βήμα στην ομοίωση των ιστών. Η απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της απόπτωσης είναι αναγκαία για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοίωσης. Η απομάκρυνση των αποπρωτικών σωματίων δεν αποτελεί ούτε ουδέτερη, ούτε παθητική διαδικασία, αλλά ένα φυσιολογικό ενεργητικό γεγονός που επηρεάζει όχι μόνο τις ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά και τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των περιβαλλόντων κυττάρων (Savill and Fadok, 2000).

### **1.4.3 Το σύστημα Fas/FasL στην προεκλαμψία**

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σημασία της απόπτωσης της τροφοβλάστης στην προεκλαμψία. Η ακριβής, ωστόσο, συμπεριφορά των τροφοβλαστικών κυττάρων καθώς και η σημασία της απόπτωσης τους στην παθοφυσιολογία της νόσου απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Ένα παράδοξο γεγονός στην προεκλαμψία είναι ότι εκτός από τις ενδείξεις αυξημένης απόπτωσης, υπάρχουν και ενδείξεις αυξημένου πολλαπλασιασμού της λαχνωτής τροφοβλάστης (Lyll and Myatt, 2002). Θα μπορούσε, λοιπόν, να αναρωτηθεί κανείς μήπως η αυξημένη απόπτωση που παρατηρείται στην προεκλαμψία είναι δευτερογενές αποτέλεσμα μεταβολών που παρατηρούνται στο εμβρυομητρικό όριο και έχουν ως αποτέλεσμα είτε αύξηση της ευαισθησίας της τροφοβλάστης στη Fas επαγόμενη απόπτωση, είτε αύξηση του υλικού ενός φυσιολογικά λειτουργούντος

κυτταροτροφοβλαστικού/συγκυτιοτροφοβλαστικού συστήματος. Με υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού, και το υλικό που εισάγεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη μέσω διάχυσης θα είναι πολύ υψηλότερο. Έχει υποθεθεί ότι η πολύστιβη συγκυτιοτροφοβλάστη πρέπει να αυξήσει την αποπτωτική απελευθέρωση υλικού ώστε να αντιρροπήσει την μεγαλύτερη εισροή (Huppertz and Kingdom, 2004). Τα παρατηρούμενα, λοιπόν, στην προεκλαμψία υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης, μπορεί να μην αποτελούν απαραίτητα σημείο ιστικής καταστροφής αλλά δευτερογενές, σε μια προσαρμοστική διαδικασία, σημείο αναδιοργάνωσης της τροφοβλάστης.

Συγκεκριμένα, η παθολογία που παρατηρείται στην προεκλαμψία μπορεί να είναι δευτερογενής στην αδυναμία της συγκυτιοτροφοβλάστης να προσαρμοστεί σε μια νέα φυσιολογική ισορροπία μεταξύ εισροής και εκροής. Αν υπάρχει αθρόα εισροή κυτταροτροφοβλάστης να αντισταθμιστεί αποπτωτικά, το αποπτωτικό σύστημα της τροφοβλάστης μπορεί να ανατραπεί και οι συγκυτιακοί κόμβοι να απελευθερωθούν μέσω μιας μη αποπτωτικής διαδικασίας. Στην πραγματικότητα, η απελευθέρωση θραυσμάτων λαχνωτής τροφοβλάστης απευθείας στη μητρική κυκλοφορία (Chua et al, 1991; Johansen et al, 1999; Knight et al, 1998), έχει ενοχοποιηθεί για τη γένεση της εκσεσημασμένης συστηματικής φλεγμονώδους ενδοθηλιακής αντιδράσεως που παρατηρείται σε γυναίκες με προεκλαμψία (Gervasi et al, 2001; Redman and Sargent 2001; Redman et al, 1999; von Dadelszen et al, 1999).

Οι Huppertz και Kingdom αναφέρουν ότι σε ένα *in vitro* μοντέλο εκχυλισμάτων λαχνωτής τροφοβλάστης διαπίστωσαν αυξημένη αποπτωτική απομάκρυνση σε συνδυασμό με αυξημένη μη αποπτωτική απελευθέρωση υλικού (νέκρωση) (Huppertz and Kingdom, 2004). Οι Formigli και συν. πρότειναν ένα χιμαιρικό τύπο κυτταρικού θανάτου, τον οποίο περιέγραψαν ως μια «κουτσουρεμένη» μορφή απόπτωσης με ανεπαρκή εκτέλεση η οποία ακολουθείται από εκφύλιση μέσω νέκρωσης (Formigli et al, 2000). Τον τύπο αυτό κυτταρικού θανάτου τον ονόμασαν «απονέκρωση».

Το φαινόμενο της απονέκρωσης θα μπορούσε να εξηγήσει τη συσχέτιση μεταξύ εκτεταμένης πλακουντιακής απόπτωσης και ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλίου που παρατηρείται στην προεκλαμψία. Αντί των φυσιολογικών αποπτωτικών συγκυτιακών κόμβων που απελευθερώνονται στη συστηματική μητρική κυκλοφορία και ταχέως φαγοκυτταρώνονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παρεμποδίζοντας τη φλεγμονώδη απόκριση, θα μπορούσε να συμβαίνει αυξημένη απελευθέρωση υλικού από τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα πιθανόν να μην είναι ικανά να απομακρύνουν πλήρως το απονεκρωτικό υλικό,

αποδίδοντας στη μητρική κυκλοφορία ένα ποσό εμβρυϊκού υλικού ικανό να υποκινήσει μια εκσεσημασμένη ανοσολογική απόκριση, όπως αυτή που παρατηρείται στην προεκλαμψία (Neale and Mor, 2005).

Το σύστημα Fas/FasL φαίνεται να διαδραματίζει διττό ρόλο κατά τη διάρκεια της κύησης. Διαταραχές στο σύστημα αυτό πιθανόν να οδηγούν σε επιπλοκές της κύησης, όπως η προεκλαμψία. Ένας πολυμορφισμός στη θέση 670 του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον Fas, οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή Fas στα T-κύτταρα. Ο πολυμορφισμός αυτός απαντάται συχνότερα σε προεκλαμπτικές γυναίκες (Kang et al, 1997). Έχει υποθεθεί ότι παρουσία αυτού του ελαττωματικού Fas γονιδίου, η τροφοβλάστη της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου δεν μπορεί να απομακρύνει τα λεμφοκύτταρα από την κυκλοφορία. Εναλλακτικά, τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα υποκινούν μια φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί στην αναγνώριση και εκτεταμένη καταστροφή των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές αυξημένων δεικτών Fas επαγόμενης απόπτωσης στον ορό ασθενών με προεκλαμψία. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα διαλυτού Fas στον ορό ασθενών με προεκλαμψία (Hsu et al, 2001). Δεδομένου ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας φέρουν τον υποδοχέα Fas, ο διαλυτός Fas πιθανόν να προστατεύει τα κύτταρα αυτά από την απόπτωση που επάγει η πρόσδεση του FasL που εκφράζεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Κατά συνέπεια τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παραμένουν στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις αυξημένων επιπέδων του FasL στον ορό ασθενών με προεκλαμψία. Δύο μορφές του FasL έχουν ανιχνευθεί και κάθε μια από αυτές φαίνεται να διαδραματίζει τελείως διαφορετικούς ρόλους στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου (Abrahams et al, 2004; Allison et al, 1997; Ashkenazi and Dixit, 1998; Frangsmyr et al, 2004). Η μεμβρανική μορφή του FasL φαίνεται να προάγει την απόρριψη του μοσχεύματος ως αποτέλεσμα έντονης ανοσολογικής απόκρισης (Abrahams et al, 2004; Allison et al, 1997). Από την άλλη, έχει πρόσφατα δειχθεί ότι τα τροφοβλαστικά κύτταρα 1<sup>ου</sup> τριμήνου στερούνται του μεμβρανικού FasL, εκφράζουν, όμως, την κυτταροπλασματική μορφή του, η οποία εκκρίνεται μέσω απελευθέρωσης μικροκυστιδίων (Frangsmyr et al, 2004). Αυτή η μορφή του FasL φαίνεται να προάγει την απόπτωση των T-κυττάρων, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στην εξασφάλιση του «ανοσολογικού προνομίου» στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου και συνακόλουθα στη φυσιολογική πλακουντοποίηση.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Chemical structure and function of DNA

Chemically, DNA consists of long polymers of simple units called nucleotides, which are made of sugars and phosphate groups joined by ester bonds. These two strands are always antiparallel to each other and are therefore antiparallel to each other. In the sequence of these two bases, the backbone that encodes information. This information is used using the genetic code which specifies the sequence of the amino acids within proteins. The information is copied into RNA via the process called transcription.

Within cells, DNA is organized into long structures called chromosomes. These chromosomes are duplicated before cells divide in a process called DNA replication. Eukaryotic organisms contain their DNA inside the cell nucleus and some of their DNA is organized into mitochondria or chloroplasts. It is common to all animals, bacteria and archaea that their DNA and proteins, bacteria and archaea that their DNA and proteins such as histones, complex and organized DNA. These complex structures provide the DNA with protection and other proteins help to control which parts of the DNA are transcribed.

DNA exists in many possible conformations that include A-DNA, B-DNA, and Z-DNA. Forms will occupy different conformations in different environments. Structural differences in the backbone level DNA sequence affect the width and direction of supercoiling. Chemical structure of the bases, the type and concentration of ions, and the presence of polyanions in solution.

The first published reports of A-DNA X-ray diffraction patterns—and also B-DNA used analysis based on Patterson functions that provided only a limited amount of structural information for oriented fibers of DNA (1937). An ultimate analysis was then proposed by Wilkins et al. in 1953. In the 1960s, B-DNA X-ray diffraction analysis of oriented DNA fibers in terms of repeating structural factors (12). In the subsequent, Watson and Crick presented their model after repeating analysis of the DNA X-ray diffraction patterns to suggest that the structure was a double helix (13).

Although B-DNA form is most common under the conditions found in cells, it is not a well-defined conformation but a family of conformations that occur at the high hydration and pH of living cells. Their corresponding key structural and conformational parameters are characteristic of the B-DNA form with a significant degree of flexibility (14).

Compared to B-DNA, the A-DNA form is a much more compact, narrow, and rigid structure. The A-DNA form is a common conformation in the dry state and in other non-physiological conditions in particular in the presence of high concentrations of DNA and that it may be induced in some DNA complexes (15). The A-DNA form is a common conformation in the dry state and in other non-physiological conditions in particular in the presence of high concentrations of DNA and that it may be induced in some DNA complexes (15). The A-DNA form is a common conformation in the dry state and in other non-physiological conditions in particular in the presence of high concentrations of DNA and that it may be induced in some DNA complexes (15).

## 2 ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ - ΤΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

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 εμβρυοπλακουντικής κυκλοφορίας και η έναρξη του τοκετού. Επίσης προτείνεται ότι τοπική δυσλειτουργία του συστήματος των CRF πεπτιδίων μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές των ανωτέρω διαδικασιών.

Πρόσφατα διαταραχές του συστήματος των CRF πεπτιδίων έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Ένας αριθμός μελετών έχει εντοπίσει αυξημένα επίπεδα CRF στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (Laatikainen et al, 1991; Warren et al, 1995) ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν υψηλά επίπεδα CRF και παράλληλα χαμηλά επίπεδα της δεσμευτικής του CRF πρωτεΐνης (CRF-binding protein, CRF-BP) (Petraglia et al, 1996). Αναφέρεται τέλος, ότι σε πλακούντες προερχόμενους από κυήσεις με προεκλαμψία, η ρύθμιση του τόνου των εμβρυοπλακουντιακών αγγείων από τα CRF πεπτίδια είναι ελαττωματική (Karteris et al, 2005). Η ακριβής σχέση των CRF πεπτιδίων με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως αποσαφηνιστεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος του πεπτιδίου CRF και των προ-αποπτωτικών μορίων Fas/FasL στην διαταραχή της εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης, όπως αυτή εκδηλώνεται κλινικά στην προεκλαμψία. Η μελέτη επεκτάθηκε στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης EVT κυττάρων και μακροφάγων ως πιθανό στοιχείο των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που συνθέτουν την παθοφυσιολογία αυτής της κλινικής οντότητας. Η υπόθεση που προσπαθήσαμε να επαληθεύσουμε είναι κατά πόσο οι διαταραχές στην έκφραση του CRF σε προεκλαμπτικούς πλακούντες ενέχονται στην παθοφυσιολογία της διείσδυσης της EVT κατά την πλακουντοποίηση μέσω τροποποίησης της δράσης των φθαρτικών μακροφάγων.

Προκειμένου να προσπελασθεί πειραματικά το παραπάνω ερώτημα, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν:

1. Η έκφραση των CRF και Fas σε πλακούντες προερχόμενους από ασθενείς με προεκλαμψία σε σύγκριση με την έκφραση των ίδιων μορίων σε φυσιολογικούς

πλακούντες αναφοράς της ίδιας ηλικίας κύησης

2. Η απόπτωση των EVT κυττάρων σε προεκλαμπτικούς πλακούντες σε σύγκριση με την απόπτωση τους σε πλακούντες αναφοράς
3. Η έκφραση του FasL πεπτιδίου σε μακροφάγα του φθαρτού τόσο προεκλαμπτικών όσο και πλακούντων αναφοράς
4. Η ρύθμιση της έκφρασης του FasL από το CRF πεπτίδιο σε μακροφάγα περιφερικού αίματος
5. Η κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων του περιφερικού αίματος σε μια υβριδική κυτταρική σειρά EVT καθώς και ο ρόλος του πεπτιδίου CRF στη δράση αυτή.

### 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Βιολογικά υλικά

##### 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: (Leitz, Germany)
- 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)
- MgCl<sub>2</sub> (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

##### 3.1.1 Πλακουντιακοί ιστοί

Οι πλακούντες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη προέρχονταν από 16 γυναίκες που γέννησαν στην 1<sup>η</sup> Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Μονάχου. Η συλλογή των ιστών έγινε αμέσως μετά τον τοκετό από 8 ασθενείς με προεκλαμψία



(μέση ηλικία κύησης κατά τον τοκετό:  $34 \pm 3.2$  εβδομάδες κύησης) και 8 γυναίκες που δεν εμφάνισαν καμιά επιπλοκή κατά τη διάρκεια της κύησης (μέση ηλικία κύησης κατά τον τοκετό:  $35.2 \pm 3$  εβδομάδες κύησης). Η διάγνωση της προεκλαμψίας έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα από το National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) κριτήρια: συστολική αρτηριακή πίεση  $\geq 140$  mmHg ή διαστολική αρτηριακή πίεση  $\geq 90$  mmHg, συνοδευόμενη από πρόσφατης έναρξης πρωτεϊνουρία, οριζόμενη ως  $\geq 300$  mg το 24ωρο (Gifford et al, 2000). Τα ίδια κριτήρια αποκλεισμού εφαρμόστηκαν και στις δύο ομάδες. Αυτά περιλάμβαναν: τη χοριοαμνιονίτιδα, τη χρόνια υπέρταση, τις χρόνιες νεφρικές νόσους, τις καρδιακές νόσους, τα νοσήματα του συνδετικού ιστού, τον προϋπάρχοντα σκχαρώδη διαβήτη και το σακχαρώδη διαβήτη της κύησης. Όλες οι γυναίκες είχαν ενημερωθεί για τη διενέργεια της μελέτης και είχαν δώσει συγκατάθεση για την επεξεργασία του πλακούντα για ερευνητικούς σκοπούς.

### 3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά της 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 (Funayama et al, 1997). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε προκειμένου να ξεπεραστεί η τεχνική δυσκολία που προκαλεί η αδυναμία πολλαπλασιασμού της πρωτογενούς EVT στη μελέτη του κυτταρικού αυτού τύπου. Τα αρχικά κύτταρα ήταν EVT προερχόμενη από ανθρώπινο πλακούντα. Για την αθανатоποίηση τους υβριδοποιήθηκαν με 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-ριβοσυλης (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 EVT. Τα AC1M88 κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM-F12 εμπλουτισμένο με 10% FCS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> / 95% αέρα και υγρασία 100%. Τα πειράματα γίνονταν 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 τους από τις φλάσκες καλλιέργειας γίνεται

με τη χρήση τρυψίνης. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση σε κάθε πείραμα πραγματοποιείται με τη μέθοδο αιματοκυτταρομετρίας. 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  $-80^{\circ}\text{C}$ , 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  $5 \times 10^6$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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 Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs). Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρηση κλίσης (gradient centrifugation) ηπαρινισμένου δείγματος σε κλινές φικόλης (Christoforidou et al, 2004). Συγκεκριμένα, μετά από αραιώση 1:1 του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ακολουθεί στιβαδοποίησή του σε 1/3 όγκο φικόλης μέσα σε σωληνάριο (falcon) χωρητικότητας 15 ml και φυγοκέντρηση σε 1750 στροφές / λεπτό για 30 λεπτά σε θερμοκρασία  $20^{\circ}\text{C}$ . Εν συνεχεία γίνεται συγκομιδή της κυτταρικής μεσόφασης με τη χρήση πιπέτας Pasteur σε falcon χωρητικότητας 50 ml και 2 πλυσίματα με προσθήκη 5 όγκων HBSS και φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Έπεται επαναιώρηση της πελέτας σε 5 ml διαλύματος RPMI/FBS 10% και μέτρηση των κυττάρων με την ανάμιξη κυτταρικού εναιωρήματος με ίσο όγκο trypan blue και καταμέτρηση σε μικροσκόπιο ορατού φωτός και τη βοήθεια πλάκας αιματοκυτταρόμετρου Neubauer. Τα απομονωμένα μονοπύρηννα επαναιωρούνται σε DMEM (10% FCS, 100 U/ml πενικιλίνης και 0.1 mg/ml

στρεπτομυκίνης), καταμετρώνται και επιστρώνονται σε πλάκες 24 οπών. Οι καλλιέργειες κρατιούνται για 2 ώρες στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο απομακρύνεται. Το κλάσμα των κυττάρων τα οποία προσκολλώνται στο πλαστικό έδαφος στις φλάσκες καλλιέργειών αποτελείται από μονοπύρηνα/μακροφάγα. Η καθαρότητα των μακροφάγων (άνω του 90%) επιβεβαιώθηκε με αντισώματα κατά του CD68 (B&D Biosciences) μονοπυρηνικού/μακροφαγικού δείκτη. Το ποσοστό ζωντανών μακροφάγων στις καλλιέργειες καθορίστηκε μικροσκοπικά με τη χρήση trypan blue. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν μόνο καλλιέργειες που περιείχαν πάνω από 90% ζωντανά μακροφάγα. Τα κύτταρα ακολούθως διεγέρθηκαν με CRF (Sigma) συγκέντρωσης 10<sup>-8</sup> M και 10 mg/ml Escherichia coli-προερχόμενου λιποπολυσακχαρίτη (serotype 0111:B4, Sigma).

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Έμμεση ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης

#### Υλικά-συσκευές

- Kit ανοσοϊστοχημειών βιοτίνης-στρεπταβιδίνης με υπεροξειδάση (BioGenex)
- Ξυλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτός (Leitz)
- Αντισώματα αντι-CRF (Phoenix Pharmaceuticals), αντι-κυτταροκερατίνη-7 (Novocastra), αντι-Fas (Serotec), αντι-M30 (Axxora)
- 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. Το kit περιλαμβάνει διάλυμα καζεΐνης (PowerBlock) για την κάλυψη των μη 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, κουνέλι 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  $H_2O_2$  απαραίτητο για την αντίδραση.

Για την συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία είχαν μονιμοποιηθεί σε 4% φορμόλη και εμβαπτισθεί σε παραφίνη. Τομές πάχους 7 $\mu$ m κοπήκαν σε σειρά από τα μπλοκ της παραφίνης και επικολήθηκαν 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 PBS. Τα πλακίδια θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 x 5 min μέσα σε διάλυμα κιτρικού οξέως 10 mM σε νερό με pH 6 (η διόρθωση του pH έγινε με τη χρήση NaOH). Αφού αφέθηκαν να κρυσώσουν για 20 λεπτά, οι ιστοί ξεπλήθηκαν σε 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-κυτταροκερατίνη-7: αραιώση 1/30, χρόνος επώασης 1 ώρα
- αντι-Fas: αραιώση 1/250, χρόνος επώασης 1 ώρα
- αντι-M30: αραιώση 1/200, 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 PBS για 10 min και επώασθηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα multilink για 20 min. Ακολούθησε έκπλυση για 10 min με TBS και επώαση με το ένζυμο της υπεροξειδάσης για 20 min, έκπλυση με PBS, επώαση με το διάλυμα χρωμογόνου (σε 5 ml διαλύτη προστίθενται 4 σταγόνες DAB και 2 σταγόνες  $H_2O_2$ ) 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 κεχρωσμένο κύτταρο, 1 = κεχρωσμένα κύτταρα <10% επί του συνόλου των εξεταζομένων κυττάρων, 2 = 11-50% των κυττάρων, 3 = 51-80% των κυττάρων και 4 = >81% των κυττάρων) (Remmele and Stegner 1987).

### 3.2.2 *In situ* nick translation (ISNT) assay σε κρυοτομές ιστών

#### Υλικά-συσκευές

- Kit ιστοχημείας ISNT (Roche)
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris, MgCl, β-μερκαπτοαιθανόλη, BSA 20 mg/ml, απεσταγμένο νερό (Merck)
- Ρυθμιστικό διάλυμα: 0.3 mol/l NaCl and 0.03 mol/l κιτρικό νάτριο (Merck)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτός (Leitz)
- Hemalaun (Sigma)

#### Μέθοδος

Η τεχνική βασίζεται στην ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA *in situ*. Στηρίζεται στην ειδική σύνδεση του ενζύμου DNA πολυμεράση I με τα 3-OH τελικά άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην ενσωμάτωση τριφωσφορικού δεσοξυνουκλεοτιδίου (dNTP) συνδεδεμένου με βιοτίνη στις εντομές του DNA. Το σήμα στο σχηματιζόμενο πολυμερές πολυδεσοξυνουκλεοτιδικό μόριο ενισχύεται συνδεδεμένο με αβιδίνη-υπεροξειδάση και ακολουθεί η ιστοχημική ανίχνευσή του.

Για την συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν κρυοτομές οι οποίες επώαστηκαν με πρωτεΐνάση K (20 μg/ml για 15 min σε ΘΔ) με στόχο τη διάσπαση των διασταυρούμενων δεσμών που δημιουργούνται στις πυρηνικές πρωτεΐνες κατά τη μονιμοποίηση. Ακολούθησε έκπλυση με απεσταγμένο νερό, προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος για 10 min σε ΘΔ και επώαση των ιστών με βιοτινιλωμένη τριφωσφορική αδενοσίνη (7-dATP) για 65 min σε ΘΔ. Μετά το χρόνο αυτό, οι ιστοί εκπλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα για 15 min σε ΘΔ και επώαστηκαν με συζευγμένη με στρεπταβιδίνη περοξειδάση για 30 min σε ΘΔ. Ακολούθει επώαση με hemalaun για 1 min, έκπλυση με νερό βρύσης, κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδες και φωτογράφιση των ιστών κάτω από μικροσκόπιο ορατού φωτός (Wiest et al, 2005). Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των υπό εξέταση πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας ημι-ποσοτικής μεθόδου όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

### 3.2.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε 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)
- Ξυλόλη/Αιθανόλη/PBS/TBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH/κιτρικό οξύ (Merck)
- Αντισώματα: αντι-FasL (Santa Cruz), αντι-rabbit Cy2 (Dianova), συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη αντι-CD14 (Pharmingen)
- Mowiol (Calbiochem- Novabiochem)

#### 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 τα πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τομές παγωμένου ιστού όπως περιγράφεται (Hammer et al, 2001). Οι τομές αφέθηκαν να στεγνώσουν σε ΘΔ 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 στις συνθήκες που αναφέρονται:

- αντι-FasL: αραιώση 1/75, χρόνος επώασης 30 min, ΘΔ
- αντι-rabbit Cy2: αραιώση 1/400, χρόνος επώασης 30 min, ΘΔ

Μετά από έκπλυση σε PBS οι τομές επώαστηκαν για 30 min με συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη αντι-CD14 σε αραιώση 1/25. Μετά από έκπλυση σε PBS οι τομές επώαστηκαν με Mowiol και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες.

### 3.2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (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 θειϊκού δωδεκυλίου: SDS (Serva)
- Tris (Bio-Rad Labs)
- NaCl, HCl, Bacitracin, Leupeptin, μη ιονικό απορρυπαντικό P-40: NP40, φαινυλο-μεθυλ-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 βρωμοφάνολης 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 φυγοκέντρηση 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)
- Υπερθεικό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (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 επιστίβαξης: 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 επιστίβαξης (10ml): Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.7ml + διάλυμα επιστοιίβαξης 1.25 ml + απιονισμένο νερό 6.8ml + APS 10% 100μl + TEMED 10μl + SDS 10% 100μl

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται στην συνέχεια το πήκτωμα επιστίβαξης 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 επιστίβαξης 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)
- Μembrάνη 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 πηκτή πολυακρυλαμίδιου απομακρύνεται από την συσκευή. Διαχωρίζεται η πηκτή επιστίβαξης και λαμβάνεται μόνο η πηκτή διαχωρισμού που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες. Τοποθετείται στο διχτυωτό πλέγμα της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών σε μορφή 'σάντουιτς' που αποτελείται από τα εξής: χαρτί wattman, πηκτή πολυακρυλαμίδιου, 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 πηκτή πολυακρυλαμίδιου όπως αναφέρθηκε είναι αρνητικά φορτισμένες. Προς τον θετικό πόλο τοποθετείται η νιτροκυτταρίνη. Οι πρωτεΐνες λόγω του αρνητικού τους φορτίου μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Όταν τελειώσει η διαδικασία της μεταφοράς η μεμβράνη μπορεί να φυλαχτεί στους 4oC 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 πειραματόζωου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα
- Σύστημα 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-Actin (Chemicon, MAB1501) σε αραιώση 1:1000
- Anti-mouse (IM0817) και anti-goat (sc-2020, Santa Cruz) δεύτερα αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση του χρένου (HRP).

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώάζεται 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 επώάζεται 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 επώάζεται 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 ανίχνευση 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 Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης.

#### 3.2.5.1 Μέθοδος APOPercentage

##### Υλικά – Συσκευές

- APOPercentage kit (Biocolor, UK)
- Συσκευές συν-καλλιέργειών (0.2 Anopore membrane, Nunc)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Φωτόμετρο ELISA (Chantilly, VA)
- CRF (Tocris)
- Antalarmin (ευγενική χορηγία του Prof. 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 φωσφοτιδυλσερίνη της μεμβρανικής διπλοστιβάδας 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 24 οπών με επίπεδη βάση (24-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 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 AC1M88. Οι πλάκες των 24 οπών επιστρώθηκαν με  $2 \times 10^4$  τροφοβλάστες/οπή. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις διάφορες ουσίες (CRF, a-Fas, antalarmin).

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση των μακροφάγων στη κυτταρική σειρά 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. Τα PBMCs τοποθετήθηκαν στις συσκευές συν-καλλιέργειών (co-culture inserts) ( $2 \times 10^5$  μακροφάγα/μεμβράνη) με θρεπτικό υλικό DMEM/F12. Μετά από 2 ώρες επώασης τα υπερκείμενα κύτταρα απομακρύνθηκαν. Τα κύτταρα τα οποία παρέμειναν στη μεμβράνη της συσκευής συν-καλλιέργειας είναι μακροφάγα καθαρότητας και βιωσιμότητας άνω του 90% όπως επιβεβαιώθηκε με χρώση τους με αντισώματα κατά του CD68 (B&D Biosciences) μονοπυρηνικού/μακροφαγικού δείκτη και trypan blue, αντίστοιχα. Τα μακροφάγα είτε δεν υποβλήθηκαν σε καμία διαδικασία, είτε προ-επώαστηκαν με 100 nM CRF ± antalarmin για 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 μακροφάγων των άλλων συνθηκών. Οι συν-καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με τοποθέτηση των μεμβρανών οι οποίες περιείχαν τα μακροφάγα στις πλάκες των 24 οπών οι οποίες περιείχαν τους τροφοβλάστες. Οι τροφοβλάστες και τα μακροφάγα συν-επώαστηκαν 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, τα μακροφάγα απομακρύνθηκαν, προστέθηκε η χρωστική του kit και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή όπως αναφέρθηκε ανωτέρω (Johnson et al, 2003).

### 3.2.5.2 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)
- Συσκευές συν-καλλιέργειών (0.2 Anopore membrane, Nunc)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- CRF (Tocris)
- Antalarmin (ευγενική χορηγία του Prof. 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 προσδένεται στα λιπίδια φωσφατιδυλσερίνης. Αυτά βρίσκονται φυσιολογικά στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβρανικής διπλοστιβάδας, 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 ζωντανά 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 τη μέθοδο APOPercentage, έως το σημείο της απομάκρυνσης των μακροφάγων. Ακολούθως, εκπλένονται βίαια οι οπές για να συλληθούν 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). Ακολουθεί η επώαση για 20 min με 5 μl annexin-V και 5 μl PI, αραιώση 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.

Η κυτταρομετρία ροής είναι η τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου ή άλλου 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.

### 3.2.6 Στατιστική ανάλυση

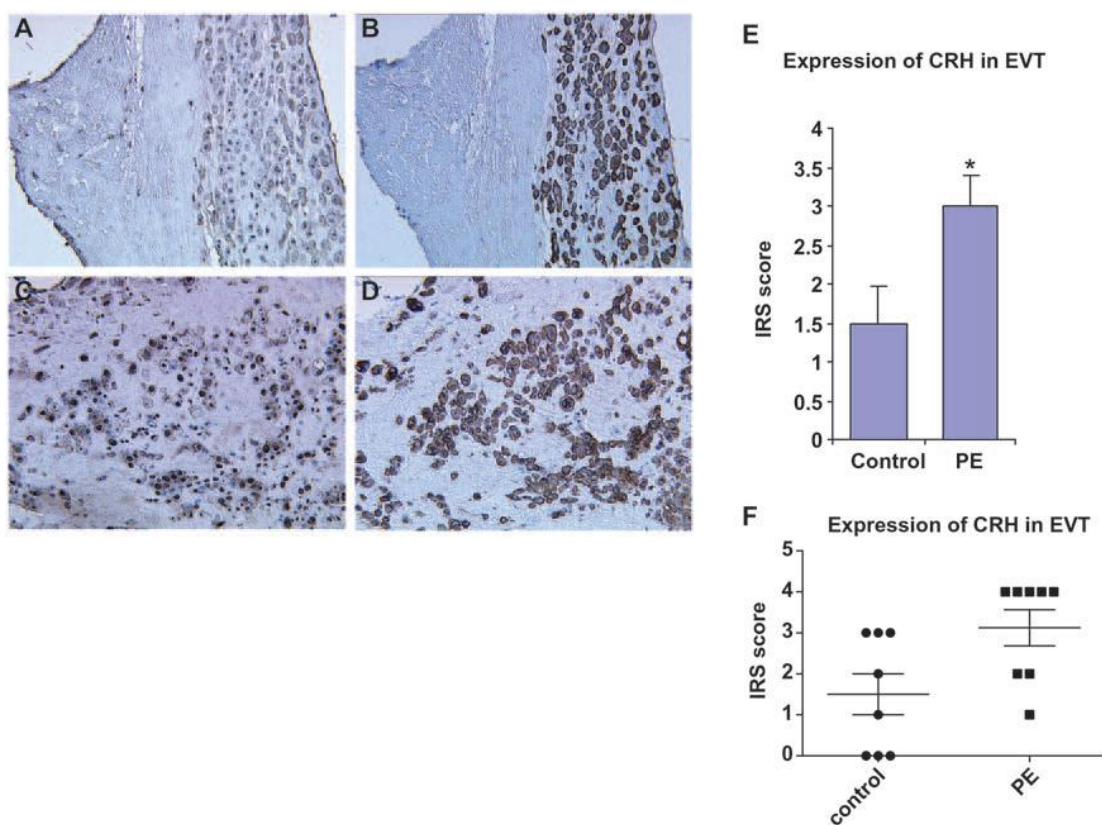
Η συλλογή, η επεξεργασία και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα SPSS, έκδοση 11.01. Η στατιστική σημασία των διαφορών μεταξύ των ομάδων που ελέγχθηκαν καθορίστηκε με τη δοκιμασία Mann-Whitney. Το  $P < 0.05$  θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει την στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές των ομάδων που αναλύθηκαν.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Μελέτη της έκφρασης των CRF, Fas και FasL σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες

#### 4.1.1 Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του CRF στον πλακούντα.

Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του CRF σε πλακούντες προερχόμενους από ασθενείς με προεκλαμψία σε σύγκριση με την έκφραση του ίδιου μορίου σε φυσιολογικούς πλακούντες αναφοράς της ίδιας ηλικίας κύησης. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημεία σε προεκλαμπτικούς (n=8) και φυσιολογικούς (n=8) πλακούντες. Αν και η πλειονότητα των EVT κυττάρων στους προεκλαμπτικούς πλακούντες εκφράζει το CRF πεπτίδιο (**Εικόνα 1C**), στους πλακούντες αναφοράς τα EVT κύτταρα που εκφράζουν το πεπτίδιο είναι λιγότερα (**Εικόνα 1A**). Τα EVT κύτταρα αναγνωρίστηκαν με τη χρώση σειριακών τομών με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7, (**Εικόνα 1B και D**). Η ένταση της χρώσης εκτιμήθηκε με την ημι-ποσοτική μέθοδο IRS. Διαπιστώθηκε αύξηση του δείκτη IRS κατά 1.8 φορές για τον CRF στους προεκλαμπτικούς συγκριτικά με τους φυσιολογικούς πλακούντες (**Εικόνα 1E και F**).

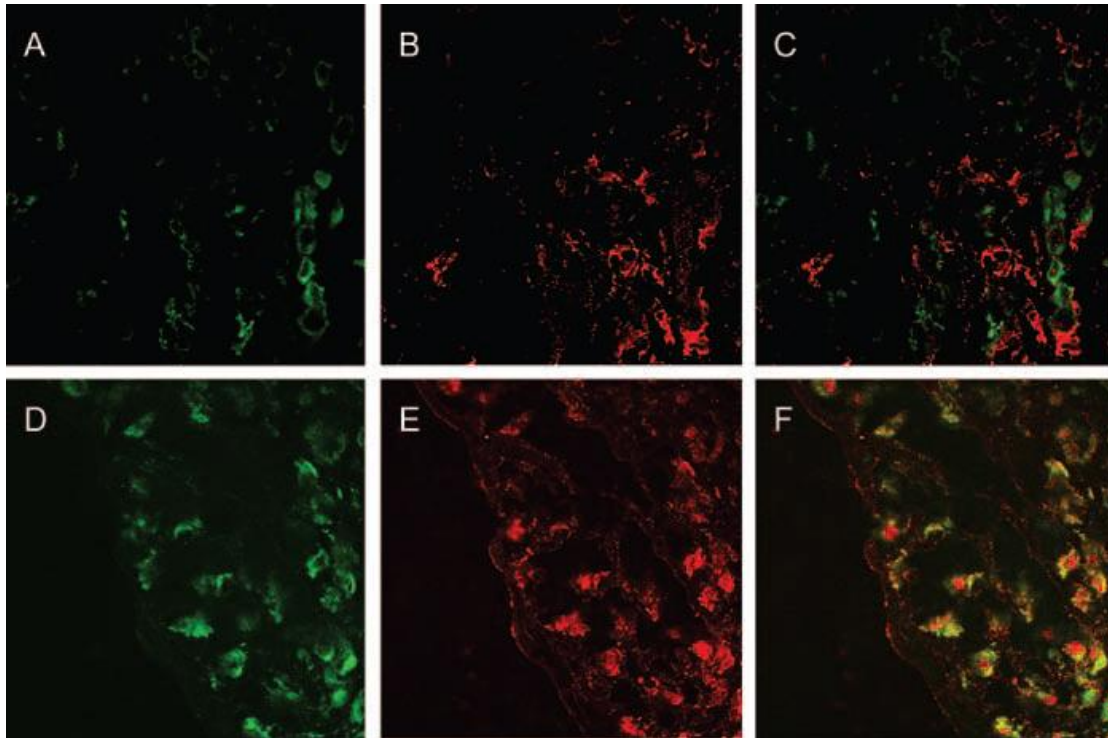


**Εικόνα 1.** Έκφραση του πεπτιδίου CRF σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την έκφραση του πλακουντιακού CRF (A και C) και της κυτταροκερατίνης-7 στις αντίστοιχες σειριακές τομές (B και D) φυσιολογικών (A και B) και προεκλαμπτικών (C και D) πλακούντων (x100). E: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± SE (\*, P<0.05). F: Διάγραμμα σκέδασης της έντασης της χρώσης για τον CRF στα EVT κύτταρα φυσιολογικών και προεκλαμπτικών πλακούντων.

#### 4.1.2 Η προεκλαμψία σχετίζεται με την εμφάνιση του FasL πεπτιδίου στα φθαρτικά μακροφάγα.

Για τη μελέτη της έκφρασης του FasL πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός. 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 EVT. Στο φθαρτικό ιστό από τους φυσιολογικούς πλακούντες (n=8) το FasL πεπτίδιο εντοπίστηκε μόνο στα κύτταρα EVT (**Εικόνα 2A-C**). Αντίθετα, στους προεκλαμπτικούς πλακούντες (n=8) εμφανίστηκε ένας δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός μέσα στο φθαρτό θετικός για το πεπτίδιο. Αυτά τα κύτταρα αναγνωρίστηκαν ως φθαρτικά μακροφάγα εκφράζοντα FasL, με τη χρήση ενός δεύτερου αντισώματος κατά του ειδικού μακροφαγικού δείκτη CD14 (**εικόνα 2D-F**).

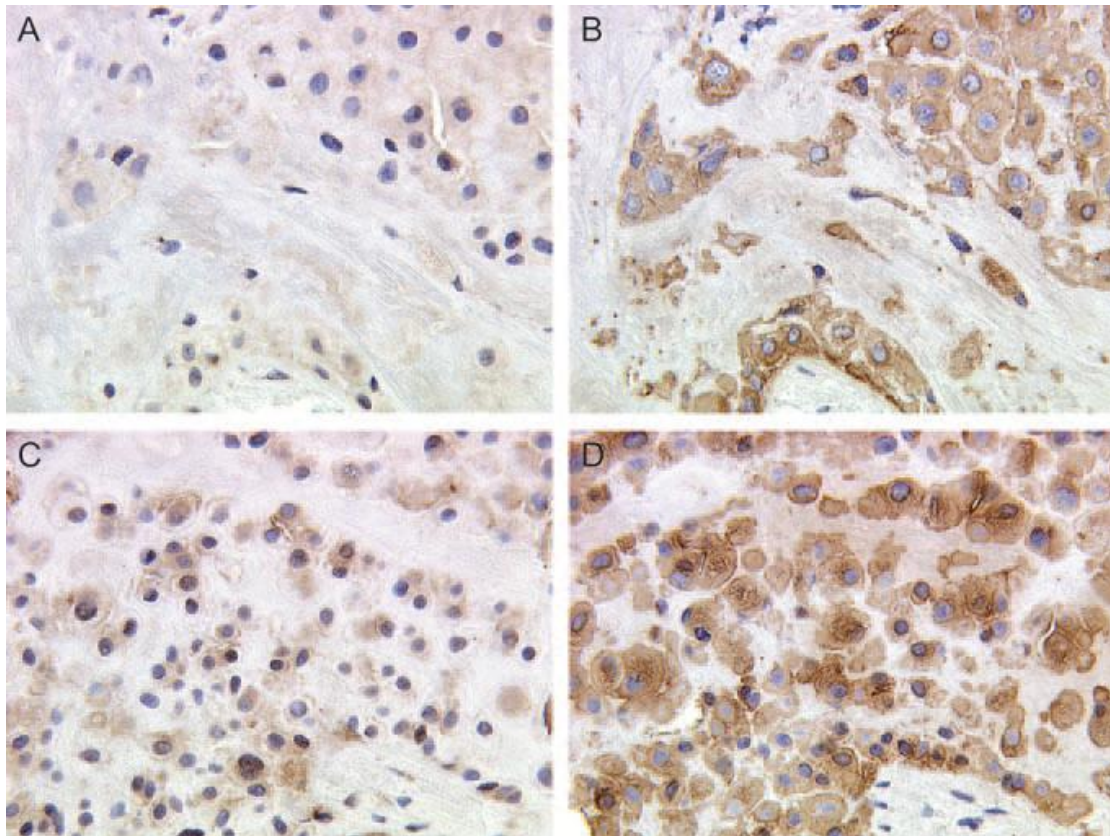




**Εικόνα 2.** Έκφραση του πεπτιδίου FasL στα φθαρτικά μακροφάγα φυσιολογικών και προεκλαμπτικών πλακούντων. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες με μικροσκόπιο συνεστίασης από φυσιολογικούς (A-C) και προεκλαμπτικούς (D-F) πλακούντες. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατά του FasL (πράσινος φθορισμός) (A και D) και του μακροφαγικού δείκτη CD14 (κόκκινος φθορισμός) (B και E). Τα φθαρτικά μακροφάγα που εκφράζουν FasL χρωματίζονται κίτρινα και είναι παρόντα μόνο στους προεκλαμπτικούς πλακούντες (F) (x400).

#### 4.1.3 Η προεκλαμψία δεν σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του Fas πεπτιδίου στα EVT κύτταρα.

Δεδομένης της έκφρασης FasL στα μακροφάγα του φθαρτού στην προεκλαμψία, εξετάστηκε εάν τα κύτταρα EVT εκφράζουν το Fas πεπτίδιο για να διαπιστωθεί εάν είναι δυνατό να υποστούν απόπτωση επαγόμενη από το FasL των πρώτων. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη σε φυσιολογικούς (n=8) και προεκλαμπτικούς (n=8) πλακούντες. Τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους προεκλαμπτικούς πλακούντες τα EVT κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν το πεπτίδιο του υποδοχέα Fas (Εικόνα 3A και C, αντίστοιχα). Τα κύτταρα EVT μέσα στο φθαρτό χαρακτηρίστηκαν με τη χρώση σειριακών τομών με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (Εικόνα 3B και D). Τα επίπεδα έκφρασης εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Ο δείκτης δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και προεκλαμπτικών πλακούντων.

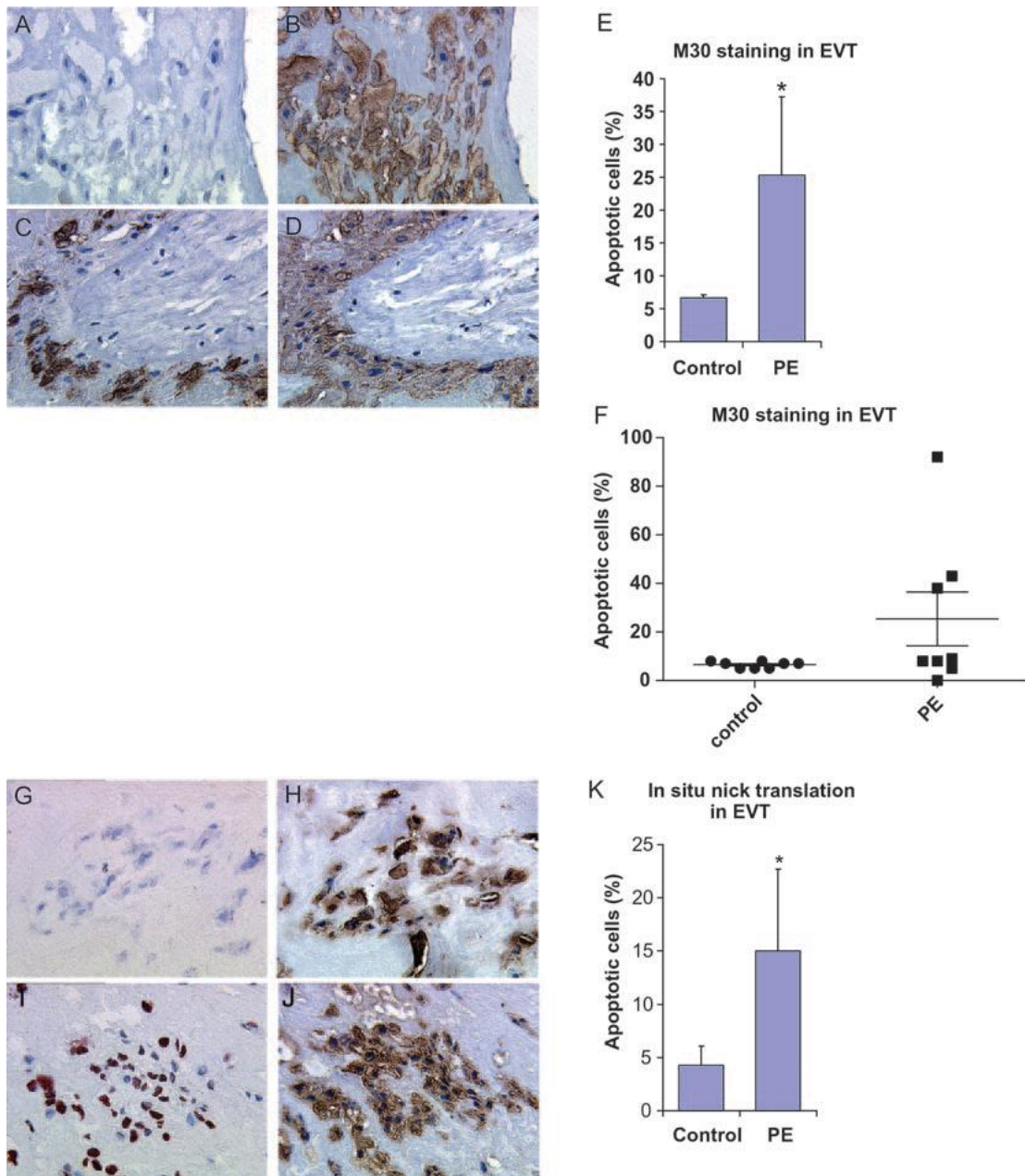


**Εικόνα 3.** Έκφραση του πεπτιδίου Fas στα EVT κύτταρα φυσιολογικών και προεκλαμπτικών πλακούντων. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του Fas (A και C) και της κυτταροκερατίνης-7 (B και D) σε σειριακές τομές από φυσιολογικούς (A και B) και προεκλαμπτικούς (B και D) πλακούντες έδειξαν έκφραση του Fas πεπτιδίου και στις δύο περιπτώσεις (x250). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο δείκτη IRS μεταξύ φυσιολογικών και προεκλαμπτικών πλακούντων.

## 4.2 Μελέτη της απόπτωσης σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες

### Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση των EVT κυττάρων.

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η παρουσία μακροφάγων θετικών για τον FasL στην προεκλαμψία συνοδεύεται με αυξημένα επίπεδα απόπτωσης της EVT. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε τομές παραφίνης και κρυοτομές από φυσιολογικούς (n=8) και προεκλαμπτικούς (n=8) πλακούντες. Εφαρμόστηκαν δύο από τις πλέον κοινές μεθόδους για την εκτίμηση της απόπτωσης, οι μέθοδοι M30 (Εικόνες 4 A-F) για την εκτίμηση της πρώιμης και *in situ* nick translation (Εικόνες 4 G-K) για την εκτίμηση της όψιμης απόπτωσης, ενώ για να αναγνωριστούν τα κύτταρα EVT έγινε χρώση σειριακών τομών με αντίσωμα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (Εικόνες 4 B, D, H και J). Το ποσοστό της πρώιμης απόπτωσης στα EVT κύτταρα, όπως αυτό εκτιμήθηκε με την τεχνική M30, ήταν κάτω του 10% ( $6.6 \pm 0.5\%$ ) του συνολικού αριθμού των EVT κυττάρων, σε όλους τους φυσιολογικούς πλακούντες που μελετήθηκαν (Εικόνα 2A). Στην προεκλαμψία το αντίστοιχο ποσοστό αυξήθηκε έως 25% ( $25.4 \pm 11.8\%$ ) του συνολικού αριθμού των EVT κυττάρων (Εικόνα 4C). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στις εικόνες 4E και F. Το ποσοστό της όψιμης απόπτωσης των EVT κυττάρων στους φυσιολογικούς πλακούντες, όπως αυτό εκτιμήθηκε με την τεχνική ISNT, κυμαινόταν μεταξύ 1% έως 5% του συνολικού αριθμού των EVT κυττάρων που μετρήθηκαν (Εικόνα 4G). Στην προεκλαμψία το ποσοστό αυτό αυξήθηκε έως 15% του συνολικού αριθμού των EVT κυττάρων που μετρήθηκαν (Εικόνα 4I). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στην εικόνα 4K.

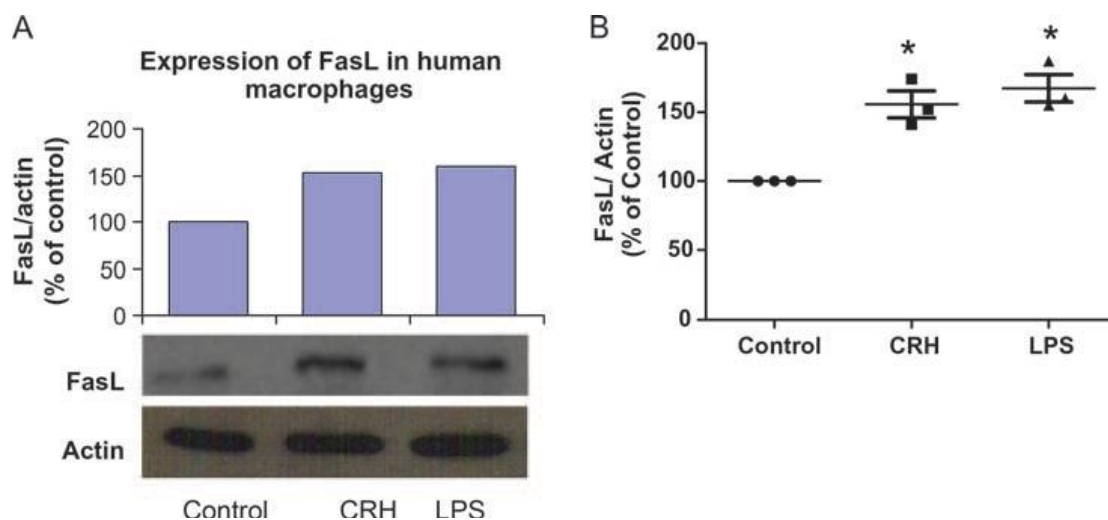


**Εικόνα 4.** Ανίχνευση πρώιμης και όψιμης απόπτωσης των EVT κυττάρων σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από σειριακές τομές της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου φυσιολογικών (A, B, G και H) και προεκλαμπτικών (C, D, I και J) πλακούντων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατά της κυτταροκερατίνης-7 (B, D, H και J) για την ανίχνευση των EVT κυττάρων και οι μέθοδοι M30 (A και C) και ISNT (G και I) για την ανίχνευση της πρώιμης και όψιμης απόπτωσης, αντίστοιχα (x250). E και K: ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών EVT κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με τις μεθόδους M30 και ISNT, αντίστοιχα. Στους προεκλαμπτικούς πλακούντες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών EVT κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους  $\pm$  SE (\*,  $P < 0.05$ ). F: Διάγραμμα σκέδασης των αποπτωτικών EVT κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο M30 σε φυσιολογικούς και προεκλαμπτικούς πλακούντες.

### 4.3 Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του FasL από το CRF πεπτιδίιο σε μακροφάγα περιφερικού αίματος

**Το πεπτιδίιο CRF επάγει την έκφραση του FasL σε μακροφάγα περιφερικού αίματος.**

Στη συνέχεια μελετήθηκε η υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα του CRF στην προεκλαμψία ενεργοποιούν τα φθαρτικά μακροφάγα να εκφράσουν FasL και να προκαλέσουν την παρατηρούμενη απόπτωση των EVT κυττάρων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 5). Μετά από επώαση 6 ωρών με 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS-προερχόμενου από E.coli τα επίπεδα του πεπτιδίου FasL στα μακροφάγα αυξήθηκαν σημαντικά. Μακροφάγα τα οποία απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα και κρατήθηκαν 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. Η ένταση της ζώνης, η οποία αντιστοιχεί στη μεμβρανική μορφή του πεπτιδίου FasL, κανονικοποιήθηκε έναντι της ακτίνης. Το νευροπεπτιδίιο CRF σε συγκεντρώσεις  $10^{-8}\text{M}$  έπειτα από 6 ώρες επώασης, προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του FasL σε μακροφάγα περιφερικού αίματος (n=3) κατά 1.5 φορές σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς. Η επίδραση του πεπτιδίου CRF ήταν παρόμοια με αυτήν του προερχόμενου από E.coli LPS.



**Εικόνα 5.** Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western της επίδρασης του CRF στην έκφραση του πεπτιδίου FasL σε ανθρώπινα μακροφάγα. A: Επώαση των μακροφάγων για 6 h με CRF αύξησε σημαντικά την έκφραση του FasL. Η επίδραση του CRF ήταν συγκρίσιμη με αυτήν του προερχόμενου από E.coli LPS. Οι εντάσεις των ζωνών κανονικοποιήθηκαν έναντι της ακτίνης. B: Διάγραμμα σκέδασης της έκφρασης του FasL τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (\*,  $P < 0.05$ )

#### 4.4 Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των μακροφάγων του περιφερικού αίματος στην κυτταρική σειρά AC1M88 καθώς και ο ρόλος του πεπτιδίου CRF στη δράση αυτή

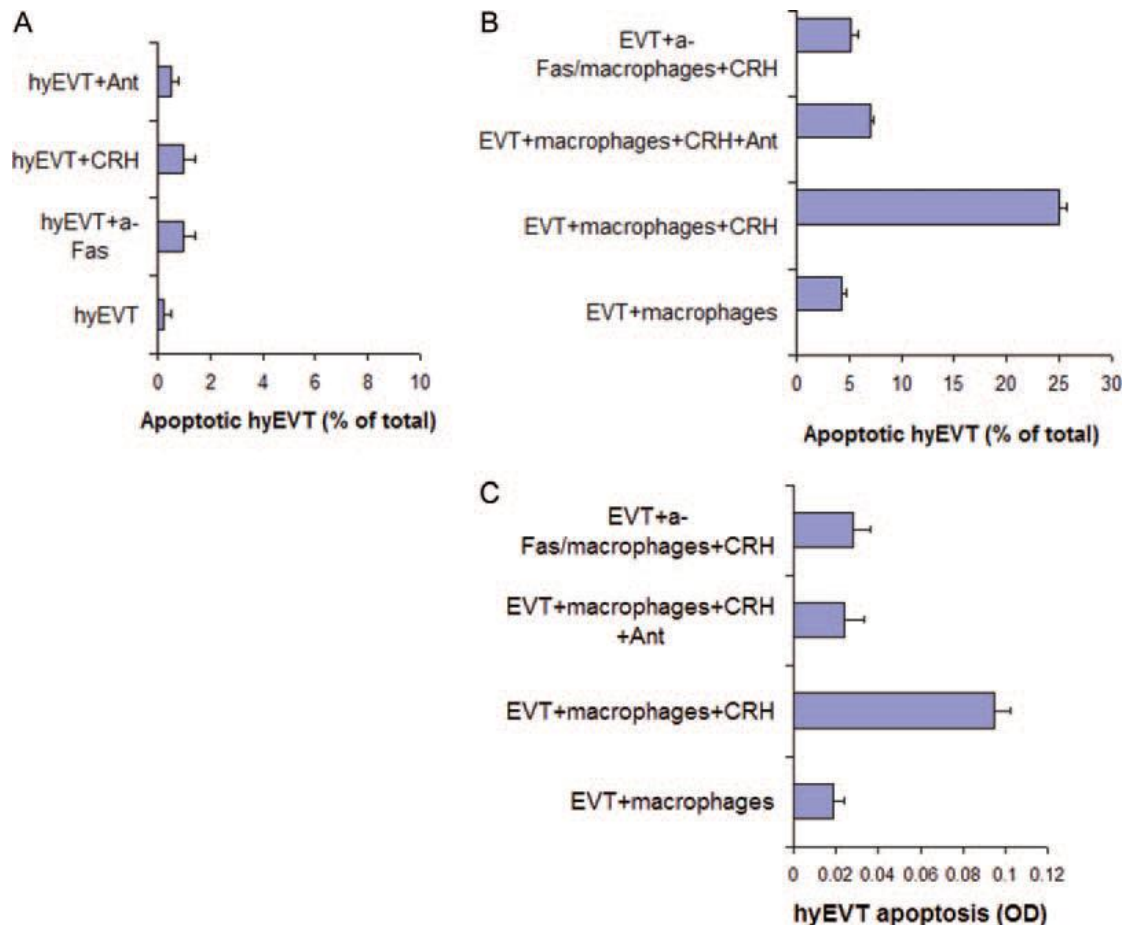
**Το πεπτίδιο CRF ενισχύει την ικανότητα των μακροφάγων του περιφερικού αίματος να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση των AC1M88 κυττάρων.**

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των μακροφάγων του περιφερικού αίματος να προκαλούν απόπτωση των EVT κυττάρων. Επίσης μελετήθηκε η δράση του CRF στο φαινόμενο αυτό, δεδομένης της ικανότητας του νευροπεπτιδίου να ενεργοποιεί την έκφραση του FasL στα μακροφάγα όπως δείχθηκε ανωτέρω. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η υβριδική κυτταρική σειρά EVT AC1M88 (αναφέρονται στις εικόνες ως hyEVT: hybridoma EVT), η οποία είναι γνωστό ότι εκφράζει τον υποδοχέα Fas. Αρχικά εξετάστηκε η πιθανότητα τοξικής δράσης των διαφόρων χρησιμοποιούμενων ουσιών πάνω στα AC1M88 κύτταρα. Εξετάστηκε με τη μέθοδο FACS η απόπτωση των AC1M88 κυττάρων μετά από 24 ώρες επώαση με τα πρόσθετα μόρια (CRF, αντι-Fas αντίσωμα, ανταλαρμίνη). Διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε καμία τοξική δράση για τα μόρια αυτά πάνω στα AC1M88 κύτταρα (**Εικόνα 6A**).

Ακολούθησε η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των μακροφάγων απέναντι στα AC1M88 κύτταρα καθώς και του πιθανού ρόλου των CRF. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι APOPercentage (**Εικόνα 6B**) και κυτταρομετρίας ροής με χρώση annexin-V/PI (**Εικόνα 6C**). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους ήταν παρόμοια για όλες τις συνθήκες. Μετά από 24 ώρες συν-καλλιέργειας με μακροφάγα περιφερικού αίματος και χωρίς πρόσθετες ουσίες, τα AC1M88 κύτταρα παρουσίασαν απόπτωση στο  $4.3 \pm 1.8\%$  του πληθυσμού τους. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα τα οποία είχαν επιπρόσθετα επωασθεί με 100nM CRF για 24 ώρες πριν την έναρξη της συν-καλλιέργειας. Η τελευταία έγινε παρουσία 100nM CRF και διήρκησε 24 ώρες. Το ποσοστό απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων αυξήθηκε στο  $25 \pm 0.9\%$ . Διαμεσολαβητής της δράσης αυτής του νευροπεπτιδίου 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

μακροφάγα τα οποία είχαν προηγουμένα ενεργοποιηθεί με CRF όπως περιγράφεται ανωτέρω. Τα κύτταρα κρατήθηκαν σε συν-καλλιέργεια για 24 ώρες παρουσία αντι-Fas και CRF. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της απόπτωσης των AC1M88κυττάρων στα επίπεδα που παρατηρούνταν μετά από συν-καλλιέργεια με μη ενεργοποιημένα μακροφάγα ( $5.2 \pm 1.8\%$  αποπτωτικών κυττάρων AC1M88).



**Εικόνα 6. Μελέτη της απόπτωσης των hyEVT κυττάρων μετά από συν-καλλιέργειες με μακροφάγα.** A: Κανένα από τα χρησιμοποιούμενα μόρια δεν προκάλεσε απόπτωση στη κυτταρική σειρά μετά από επώαση 24 ωρών. Η απόπτωση των hyEVT κυττάρων ποσοτικοποιήθηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. B: hyEVT  $\pm$  8 ώρες προ-επώασης με αντι-Fas (a-Fas) καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με μακροφάγα  $\pm$  πρόσθετα πεπτίδια/ανταγωνιστές. Τα μακροφάγα επώαστηκαν με τα αντίστοιχα πρόσθετα πεπτίδια/ανταγωνιστές για 24 ώρες πριν από τις συν-καλλιέργειες. Η απόπτωση των hyEVT κυττάρων ποσοτικοποιήθηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. C: Ποσοτικοποίηση της απόπτωσης των hyEVT κυττάρων κατά τις συνθήκες που περιγράφηκαν ανωτέρω, με τη μέθοδο APOPercentage. Η απόπτωση εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD, optical density). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους  $\pm$  SE τεσσάρων διαφορετικών πειραμάτων (\*,  $P < 0.05$ ).

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) και τα ομόλογά του πεπτίδια ουροκορτίνες (UCNs) αποτελούν τον κύριο ρυθμιστή και συντονιστή των συμπεριφορικών, ενδοκρινικών και ανοσολογικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι στο στρες (Bale and Vale, 2004). Ο βιολογικός ρόλος του «αναπαραγωγικού» συστήματος των CRF πεπτιδίων μελετάται και προσδιορίζεται τα τελευταία χρόνια. Μέχρι στιγμής έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή τους ως παρακρινείς και αυτοκρινείς ρυθμιστές σε σημαντικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος όπως η ωορρηξία, η ωχρινοποίηση, η φθαρτοποίηση του στρώματος του ενδομητρίου, η εμφύτευση της βλαστοκύστης, η λειτουργία της εμβρυοπλακουντικής κυκλοφορίας και η έναρξη του τοκετού (Hillhouse and Grammatopoulos, 2002; Kalantaridou et al, 2003). Επίσης προτείνεται ότι τοπική δυσλειτουργία των CRF πεπτιδίων μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές των ανωτέρω διαδικασιών.

Πρόσφατα, διαταραχές του συστήματος των CRF πεπτιδίων έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Ένας αριθμός μελετών έχει εντοπίσει αυξημένα επίπεδα CRF στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (Laatikainen et al, 1991; Warren et al, 1995), άλλες μελέτες αναφέρουν υψηλά επίπεδα CRF και παράλληλα χαμηλά επίπεδα της δεσμευτικής του CRF πρωτεΐνης (CRF-binding protein, CRF-BP) (Petraglia et al, 1996), ενώ μια πρόσφατη μελέτη εντόπισε αυξημένα επίπεδα UCN στο μητρικό και στο εμβρυϊκό πλάσμα σε κήσεις επιπλεγμένες με υπέρταση (Florio et al. 2006). Αναφέρεται τέλος, ότι σε πλακούντες προερχόμενους από κήσεις με προεκλαμψία, η ρύθμιση του τόνου των εμβryo-πλακουντικών αγγείων από τα CRF πεπτίδια είναι ελαττωματική (Karteris et al, 2005). Η ακριβής, ωστόσο σχέση των CRF πεπτιδίων με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως αποσαφηνιστεί.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο της τροφοβλάστης στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Πρόσφατα έχει αναγνωρισθεί ελαττωματική τροφοβλαστική διείσδυση καθώς και αυξημένη απόπτωση των εξωλαχνωτών τροφοβλαστικών (EVT) κυττάρων (DiFederico et al, 1999). Σημαντικό ρόλο στη επαγωγή της απόπτωσης των EVT κυττάρων φαίνεται να παίζει το σύστημα Fas/FasL (Neale and Mor, 2005).

Εκτός από την αυξημένη απόπτωση των EVT κυττάρων, η προεκλαμψία σχετίζεται επίσης με αυξημένη διήθηση από ενεργοποιημένα μακροφάγα γύρω από τις μη



τροποποιημένες σπειροειδείς αρτηρίες του πλακούντα. Η συσχέτιση της ελαττωμένης διείσδυσης των τροφοβλαστικών κυττάρων στις σπειροειδείς αρτηρίες με την περίσσεια μακροφάγων μέσα και γύρω από τις αρτηρίες αυτές απασχολεί τη βιβλιογραφία ήδη από το 1999 (Reister et al, 1999). Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ότι η παρουσία περίσσειας ενεργοποιημένων μακροφάγων περιορίζει τη διείσδυση των EVT κυττάρων επάγοντας την απόπτωσή τους μέσω ενός TNF- $\alpha$  εξαρτώμενου μηχανισμού (Reister et al, 2001). Οι ακριβείς, ωστόσο, μηχανισμοί που επάγουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των μακροφάγων στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου παραμένουν άγνωστοι.

Η παρούσα διατριβή διερευνώντας το ρόλο των CRF πεπτιδίων στην παθολογία της διείσδυσης της εξωλαχνωτής τροφοβλάστης κατά την πλακουντοποίηση, παρουσιάζει νεότερα δεδομένα στην παθογένεση νόσων με ελλατωματική πλακουντοποίηση, όπως η προεκλαμψία. Συνεκτιμώντας την αυξημένη έκφραση του CRF στους προεκλαμπτικούς πλακούντες *in situ*, την παρουσία FasL θετικών μακροφάγων στο φθαρτό ασθενών με προεκλαμψία και την ικανότητα του CRF να επάγει την έκφραση του FasL σε ανθρώπινα μακροφάγα και να ενισχύει την ικανότητα των τελευταίων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση στην κυτταρική σειρά EVT, προτείνουμε το ρόλο της τριάδας 'CRF-μακροφάγα-Fas/FasL' ως πιθανό παθογενετικό μοντέλο στην εμφάνιση της προεκλαμψίας.

### **5.1 Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση CRF στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου και παρουσία θετικών για τον προσδέτη Fas φθαρτικών μακροφάγων**

Έχει προηγουμένα δειχθεί ότι η προεκλαμψία σχετίζεται με διαταραχές στην έκφραση του CRF. Συγκεκριμένα, πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει αυξημένες συγκεντρώσεις CRF στο μητρικό πλάσμα σε κήσεις επιπλεγμένες με προεκλαμψία (Laatikainen et al, 1991; Warren et al, 1995; Perkins et al, 1995; Petraglia et al, 1996; Liapi et al, 1996; Leung et al, 2000). Παράλληλα σε ασθενείς με προεκλαμψία έχουν αναφερθεί αυξημένες συγκεντρώσεις CRF στο αίμα ομφαλίου λώρου καθώς και στα κυκλοφορούντα επίπεδα mRNA του CRF (Goland et al, 1993; Ng et al, 2003). Οι αγγειοδιασταλτικές δράσεις του CRF στην ανθρώπινη εμβρυοπλακουντική κυκλοφορία (Clifton et al, 1994), οδήγησαν τους Florio και συν. στην υπόθεση ότι στην προεκλαμψία ο πλακούντας συμμετέχει σε ένα σύνδρομο στρες, απελευθερώνοντας CRF για να εξασφαλίσει με τον τρόπο αυτό τη διατήρηση επαρκούς

αιματικής ροής προς τη μήτρα, προφυλάσσοντας το έμβρυο από ένα αφιλόξενο περιβάλλον (Florio et al, 2002). Η αντιρροπιστική αύξηση στην έκκριση του CRF από τους πλακουντιακούς ιστούς σε καταστάσεις μητρικού στρες, ενισχύεται από τους McLean και Smith. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι ο πλακουντιακός CRF ενεργοποιεί ορισμένους δυνητικά χρήσιμους προσαρμοστικούς μηχανισμούς στο στρεσαρισμένο έμβρυο. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την επιτάχυνση της ωρίμανσης των εμβρυϊκών οργάνων, τη μεγιστοποίηση της πλακουντιακής αιματικής ροής και την πρόωμη έναρξη του τοκετού όταν η επιβίωση του εμβρύου απειλείται (McLean and Smith, 1999).

Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά, η ερευνητική μας ομάδα προτείνει έναν πιθανό επιβλαβή ρόλο για τον CRF στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Τα *in vitro* δεδομένα μας αποδεικνύουν ότι ο CRF μπορεί να επάγει την έκφραση του FasL στα μακροφάγα ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητά τους να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση της ΕΛΤ. Αυτό μας κάνει να υποθέσουμε ότι στους προεκλαμπτικούς πλακούντες, η αυξημένη ευαισθησία των τροφοβλαστικών κυττάρων στην απόπτωση πιθανά να οφείλεται εν μέρει, σε επαγόμενες από τον CRF αλλαγές στο σύστημα Fas/FasL. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα κύτταρα της ΕΛΤ πιθανά να είναι υπεύθυνα για την αυξημένη έκφραση του πλακουντιακού CRF που παρατηρείται στην προεκλαμψία. Τα ευρήματα αυτά εγείρουν το ερώτημα κατά πόσο η διαταραγμένη έκφραση του CRF αποτελεί μέρος του πρωτογενούς παθογενετικού μηχανισμού της προεκλαμψίας ή συμβαίνει δευτερογενώς ως αποτέλεσμα των αυξημένων αγγειακών αντιστάσεων που παρατηρούνται αργότερα. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό δεν είναι καθόλου εύκολη αν λάβουμε υπόψη ότι οι πλακουντιακοί ιστοί που χρησιμοποιήσαμε προέρχονται από κύσεις που βρίσκονται περίπου στην 34<sup>η</sup> εβδομάδα. Η διενέργεια παρόμοιων πειραμάτων είναι προφανές ότι είναι να αδύνατο να πραγματοποιηθεί σε πλακούντες 18 εβδομάδων-περίοδο κατά την οποία ολοκληρώνεται η αναδόμηση των σπειροειδών αρτηριών-καθώς η παρακολούθηση της έκβασής των κύσεων αυτών όσον αφορά στην ανάπτυξη ή όχι προεκλαμψίας δεν είναι δυνατή. Λαμβάνοντας, ωστόσο, υπόψη τα δεδομένα των Leung και συν. που αναφέρουν αυξημένες συγκεντρώσεις CRF κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου στο πλάσμα ασθενών οι οποίες αργότερα ανέπτυξαν προεκλαμψία (Leung et al, 2000), πιστεύουμε ότι πιθανά να υπάρχει σχέση αιτίου και αιτιατού μεταξύ διαταραχών του συστήματος του CRF πεπτιδίου και της προεκλαμψίας ως αποτέλεσμα διαταραχών της πλακουντοποίησης.

Επιβλαβής ρόλος για τον CRF στην παθογένεση της προεκλαμψίας έχει πρόσφατα προταθεί και από τους Karteris και συν. οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η μείωση της επαγόμενης από τον CRF αγγειοδιαστολής στις προεκλαμπτικές κύσεις πιθανά να είναι αποτέλεσμα της ελαττωμένης έκφρασης των CRF υποδοχέων ως αποτέλεσμα χρόνιας έκθεσης στα αυξημένα επίπεδα του CRF (Karteris et al, 2003). Επίσης, σύμφωνα με τους Karteris και συν. η μείωση του επιπέδου των CRF υποδοχέων στην προεκλαμψία θα μπορούσε να οδηγεί σε διαταραχές στη ρύθμιση του μονοπατιού του μονοξειδίου του αζώτου-κυκλικής μονοφωσφορικής γουανωσίνης (NO-cGMP), που φαίνεται να αποτελεί ένα από τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων διαμεσολαβούνται οι δράσεις του CRF κατά τη διάρκεια της κύησης. Διαταραχές στη λειτουργία του NO-cGMP σηματοδοτικού μονοπατιού πιθανά να συνεισφέρουν σε διαταραχές της ισορροπίας η οποία ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο στην εμβρυοπλακουντική κυκλοφορία, προς την κατεύθυνση της αγγειοσύσπασης και την επακόλουθη κλινική αλληλουχία της προεκλαμψίας (Karteris et al, 2005).

## **5.2 Η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση της ΕΛΤ**

Με γνώμονα τις ανωτέρω παρατηρήσεις, μελετήθηκε η υπόθεση ότι στην προεκλαμψία η ΕΛΤ πιθανόν να είναι ευάλωτη σε επαγόμενη από το μακροφαγικό FasL κυτταροτοξική επίθεση. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών EVT κυττάρων είναι σημαντικά υψηλότερο σε προεκλαμπτικούς συγκριτικά με φυσιολογικούς πλακούντες της ίδιας ηλικίας κύησης.

Όσον αφορά στην παθογένεση της προεκλαμψίας, μια παλιά υπόθεση υποστηρίζει ότι η επιπλοκή αυτή της κύησης σχετίζεται με μια γενικευμένη διαταραχή στην τροφοβλαστική διείσδυση. Σύμφωνα με τους DiFederico και συν. η εκτεταμένη απόπτωση της ΕΛΤ θα μπορούσε να εξηγεί την παρατηρούμενη στις προεκλαμπτικές κύσεις επιφανειακή διείσδυση της διάμεσης και ενδαγγειακής τροφοβλάστης (DiFederico et al, 1999). Σε αντίθεση με τη μελέτη αυτή, μια μελέτη των Kadyrov και συν. υποστηρίζει ότι η ελαττωμένη τροφοβλαστική διείσδυση στην προεκλαμψία δεν μπορεί να εξηγηθεί με βάση τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης, καθώς ο αποπτωτικός δείκτης στην προεκλαμψία φαίνεται να είναι μικρότερος και από αυτόν των φυσιολογικών κύσεων στις οποίες η τροφοβλαστική διείσδυση είναι φυσιολογική (Kadyrov et al, 2003). Ωστόσο, η ίδια ερευνητική ομάδα σε μια πιο πρόσφατη μελέτη της, αναφέρει αυξημένα ποσοστά απόπτωσης της διάμεσης και ενδαγγειακής τροφοβλάστης σε προεκλαμπτικούς πλακούντες. Στη μελέτη αυτή υποστηρίζεται ότι τα

αυξημένα ποσοστά απόπτωσης πιθανόν να είναι υπεύθυνα για την ελαττωματική τροφοβλαστική διείσδυση στις σπειροειδείς αρτηρίες σε κήσεις επιπλεγμένες με πρόωμης έναρξης προεκλαμψία και ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (Kadyrov et al, 2006). Καθώς προς το παρόν δεν υπάρχει ομοφωνία στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν ότι η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά πρόωμης και όψιμης απόπτωσης. Επιβεβαιώνοντας τα αυξημένα ποσοστά αποπτωτικού θανάτου στους προεκλαμπτικούς πλακούντες με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο M30, εκμηδενίζουμε την πιθανότητα υπερεκτίμησης των αποπτωτικών γεγονότων καθώς η νέκρωση που οδηγεί στον κατακερματισμό του DNA και σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο ISNT, δε συμβαίνει κατά τη διάσπαση της κυτταροκερατίνης-18 (CK18) η οποία ανιχνεύεται με τη μέθοδο M30 (Sakagami et al, 1999).

### **5.3 Ο ρόλος των μακροφάγων της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου στην προεκλαμψία**

Στην προεκλαμψία η σκέψη της εκσεσημασμένης απόπτωσης ως μηχανισμού που περιορίζει την τροφοβλαστική διείσδυση στο τοίχωμα των σπειροειδών αρτηριών, εγείρει την πιθανότητα ύπαρξης προερχόμενων από μητρικά κύτταρα σημάτων τα οποία επάγουν την απόπτωση. Οι Reister και συν. περιγράφουν την παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων πλησίον των σπειροειδών αρτηριών στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου, ικανών να επάγουν απόπτωση της τροφοβλάστης. Η επαγωγή της απόπτωσης στη συγκεκριμένη μελέτη επιτυγχάνεται με συνδυασμό έκκρισης TNF-α ο οποίος προσδένεται στον τύπου-1 υποδοχέα του και ινδολεαμίνης 2,3-διοξυγενάσης (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase, IDO) η οποία καταβολίζει τα τοπικά επίπεδα τρυπτοφάνης (Reister et al, 2001). Ωστόσο, οι Renaud και συν. σε μεταγενέστερη μελέτη υποστηρίζουν ότι στην προεκλαμψία η αυξημένη διήθηση μακροφάγων γύρω από τις σπειροειδείς αρτηρίες παρεμποδίζει την τροφοβλαστική διείσδυση και αναδόμηση των σπειροειδών αρτηριών μέσω ενός μη αποπτωτικού μηχανισμού. Σύμφωνα με την ερευνητική αυτή ομάδα, η παρουσία πληθώρας ενεργοποιημένων μακροφάγων γύρω από τα μητριαία αγγεία πιθανά να συνεισφέρει στην ανεπαρκή τροφοβλαστική διείσδυση και αναδόμηση των σπειροειδών αρτηριών επάγοντας την έκκριση του τύπου 1 αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) και αναστέλλοντας τη σχετιζόμενη με τον τύπου προ-ουροκινάσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (pro-uPA) καζεϊνολυτική δραστηριότητα, μέσω παραγωγής TNF-α

(Renaud et al, 2005). Παρ' όλα αυτά, οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και η χρονική αλληλουχία των γεγονότων κατά τη διάρκεια της αναδόμησης των σπειροειδών αρτηριών παραμένουν ακόμα ασαφή. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αναδόμηση των σπειροειδών αρτηριών συμβαίνει σε διακριτά, εξαρτώμενα και μη από την τροφοβλάστη στάδια και παρέχουν τις πρώτες ενδείξεις συμμετοχής των μακροφάγων στα μη εξαρτώμενα από την τροφοβλάστη στάδια (Smith et al, 2009).

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι στους προεκλαμπτικούς πλακούντες, τα φθαρτικά μακροφάγα εκφράζουν FasL, πεπτίδιο το οποίο απουσιάζει από τον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό στους φυσιολογικούς πλακούντες. Η υπόθεση της συμμετοχής του Fas/FasL συστήματος στην σχετιζόμενη με τις επιλοκές της κύησης απόπτωση των πλακουντιακών κυττάρων έχει υποστηριχθεί από προηγούμενες μελέτες (Neale et al, 2003; Minas et al, 2007). Οι Neale και συν. παρατήρησαν ότι ορός από ασθενείς με προεκλαμψία περιορίζει τη βιωσιμότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων, επίδραση που φαίνεται να σχετίζεται με μεταβολές στην ευαισθησία των κυττάρων αυτών στη Fas-επαγόμενη απόπτωση (Neale et al, 2003). Μεταγενέστερες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, συνέδεσαν τις αυτόματες αποβολές στον άνθρωπο με αυξημένη απόπτωση της διάμεσης ΕΛΤ και την ικανότητα των φθαρτικών λεμφοκυττάρων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων αυτών (Minas et al, 2007). Η ταυτόχρονη, ωστόσο, παρουσία του Fas και του προσδέτη του, στον πλακούντα και τους εμβρυϊκούς υμένες, καθιστά περίπλοκο το ρόλο του Fas/FasL συστήματος στους αναπαραγωγικούς ιστούς. Έτσι, εκτός από το ρόλο του στην επαγωγή της απόπτωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων, ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο του Fas/FasL συστήματος στην περιοχή του εμβρυομητρικού ορίου. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι στις φυσιολογικές κύσεις, τα μακροφάγα μαζί με τα τροφοβλαστικά κύτταρα, μπορούν να προκαλέσουν Fas-επαγόμενη απόπτωση των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος των σπειροειδών αρτηριών, προάγοντας την αναδόμησή τους (Keogh et al, 2004; Ashton et al, 2005). Ο ενδεχόμενος αποπτωτικός ή προστατευτικός ρόλος του Fas/FasL συστήματος φαίνεται να εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο μικροπεριβάλλον του εμβρυομητρικού ορίου (Elovitz and Mrinalini, 2004).

Ανάλογο των συνθηκών που επικρατούν στο μικροπεριβάλλον του εμβρυομητρικού ορίου φαίνεται να είναι και το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των φθαρτικών μακροφάγων με τα τροφοβλαστικά κύτταρα της περιοχής. Οι Mor και Abrahams υποστηρίζουν ότι στην προεκλαμψία τα ενεργοποιημένα μακροφάγα

εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μεταξύ των οποίων TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$ , επάγοντας την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών κυήσεων, η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων φαίνεται να καταστέλλει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, προάγοντας την απελευθέρωση Th-2 τύπου αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (Mor and Abrahams, 2003). Μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας υποστηρίζουν ότι αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών προάγουν την έκφραση του Fas στους τροφοβλάστες και καθιστούν τα κύτταρα ιδιαίτερα ευάλωτα στην Fas-επαγόμενη απόπτωση. Αντίθετα, οι IL-6 και IL-10, οι οποίες ανήκουν στις Th-2 κυτταροκίνες, ενισχύουν την αντίσταση των τροφοβλαστών σε αυτή τη μορφή απόπτωσης (Aschkenazi et al, 2002). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν το διττό ρόλο των μακροφάγων στην τροφοβλαστική διείσδυση και το μετασχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών, ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησής τους. Έτσι, ενώ στις φυσιολογικές κυήσεις τα μακροφάγα δρουν ως υποστηρικτικά κύτταρα διευκολύνοντας το μετασχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών, στην προεκλαμψία δρουν ως φραγμός στη διείσδυση της τροφοβλάστης επάγοντας την απόπτωσή της και δυσχεραίνοντας το μετασχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών.

#### **5.4 Το πεπτίδιο CRF ενισχύει την ικανότητα των φθαρτικών μακροφάγων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση σε μια υβριδική κυτταρική σειρά EVT**

Ακολούθως διερευνήθηκε ένας πιθανός ρόλος για τον CRF στην επαγωγή των ανωτέρω φαινομένων. Έχει παλαιότερα δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του CRFR1 επάγει την έκφραση του FasL στην EVT και στα PC12 κύτταρα (Makrigiannakis et al, 2001; Dermitzaki et al, 2002). Επιπρόσθετα, πρόσφατα ανακοινώθηκε η ικανότητα του CRF να επάγει την έκφραση του FasL σε φθαρτικά λεμφοκύτταρα απομονωμένα από πλακούντες από διακοπές κυήσεως μέσω του CRFR1 (Minas et al, 2007). Με βάση τα δεδομένα αυτά, εξετάστηκε η υπόθεση ότι ο CRF επάγει την έκφραση του FasL σε μακροφάγα περιφερικού αίματος ενισχύοντας έτσι την ικανότητα των τελευταίων να προκαλούν απόπτωση της EVT. Η μελέτη εστιάστηκε στα μακροφάγα περιφερικού αίματος καθώς τα κύτταρα αυτά είναι τεχνικά εύκολο να απομονωθούν σε πρωτογενείς καλλιέργειες υψηλής καθαρότητας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προτείνουν έναν λειτουργικό ρόλο για τον CRF στην κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων έναντι των EVT κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι ο CRF επάγει την έκφραση του συνδεδεμένου στη κυτταρική

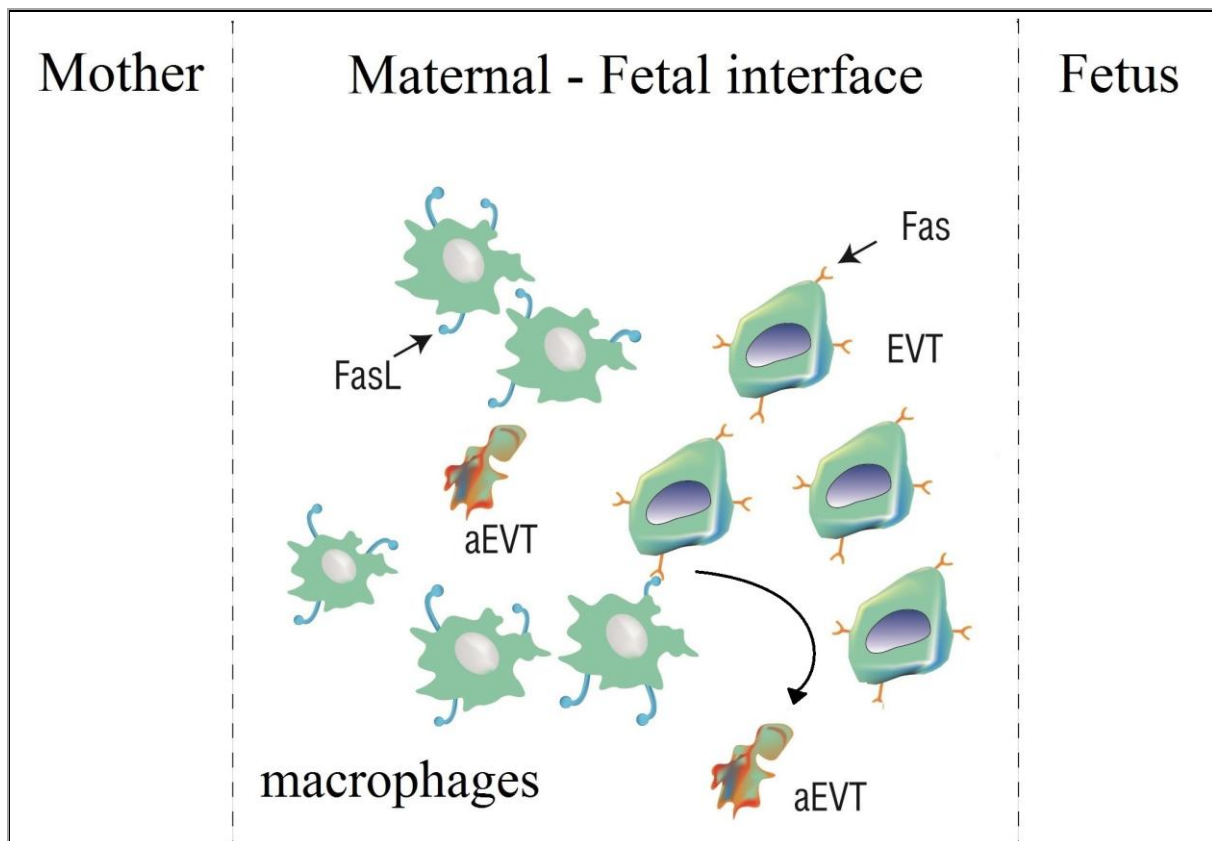
μεμβράνη FasL σε μακροφάγα περιφερικού αίματος. Η άντληση, ωστόσο, πληροφοριών από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας χρειάζεται προσεκτική ερμηνεία αν σκεφτεί κανείς ότι τα μακροφάγα του περιφερικού αίματος μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από τον αντίστοιχο υποπληθυσμό τους στο φθαρτό. Ωστόσο, πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ότι οι περισσότερες λειτουργίες των μακροφάγων, συμπεριλαμβανόμενης της έκφρασης των μορίων επιφανείας, δε μεταβάλλονται όταν φθαρτικά μακροφάγα και μακροφάγα περιφερικού αίματος συν-καλλιεργούνται με τροφοβλαστικά κύτταρα (Rozner et al, 2011).

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των μακροφάγων πάνω στους τροφοβλάστες χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο κυτταρικών συν-καλλιέργειών αποτελούμενο από πρωτογενείς καλλιέργειες μακροφάγων περιφερικού αίματος και μια υβριδική κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος και εξωλαχνωτής τροφοβλάστης (AC1M88). Παρατηρήθηκε ότι ο CRF προκάλεσε σημαντική αύξηση στην κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων έναντι των AC1M88 κυττάρων. Το γεγονός αυτό έγινε αντιληπτό με τη μέτρηση αυξημένων ποσοστών απόπτωσης των AC1M88 κυττάρων μετά τη συν-καλλιέργειά τους με τα συγκεκριμένα μακροφάγα σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς. Οι τελευταίες ορίζονται ως συν-καλλιέργεια AC1M88 κυττάρων με μακροφάγα χωρίς την προσθήκη εξωγενούς CRF. Το περιγραφόμενο φαινόμενο αναστράφηκε τόσο με τη χρήση της ανταλαρμίνης πάνω στα μακροφάγα, 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 μακροφαγικού FasL από τον CRF.

Μια σημαντική διάσταση της δράσης του CRF που διαπιστώνεται στη παρούσα μελέτη, αφορά στον ανοσορυθμιστικό ρόλο του πεπτιδίου στην προεκλαμψία. Γίνεται φανερό ότι το νευροπεπτίδιο ασκεί δράση πάνω στα μακροφάγα της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου, ρυθμίζοντας την έκφραση του FasL στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Η δυνατότητα του CRF να τροποποιεί τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει προηγουμένα αναφερθεί (Angioni et al, 1993; Tsatsanis et al, 2006). Σε συστηματικό επίπεδο ο CRF έχει έμμεση ανοσοκατασταλτική δράση, με την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ και τη συνακόλουθη απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών. Αντίθετα, σε τοπικό επίπεδο διαπιστώνεται ότι ο CRF που παράγεται σε φλεγμαίνοντες ιστούς δρα παρακρινώς ή/και αυτοκρινώς ως μια ισχυρή προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη (Karalis et al, 1991). Πρόσφατα, οι Agelaki και συν.

πρότειναν ότι τα επαγόμενα από τον CRF σήματα, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα (Agelaki et al, 2002). Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις αυτές, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι στην προεκλαμψία ο CRF ενισχύει την κυτταροτοξική δράση των φθαρτικών μακροφάγων, είτε άμεσα μέσω επαγωγής της έκφρασης του FasL, είτε έμμεσα μέσω παραγωγής μακροφαγικών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Συνοπτικά, η παρούσα διατριβή, συνεκτιμώντας την αυξημένη έκφραση του CRF στους προεκλαμπτικούς πλακούντες *in situ*, την παρουσία FasL θετικών μακροφάγων στο φθαρτό ασθενών με προεκλαμψία και την ικανότητα του CRF να ενισχύει την ικανότητα των μακροφάγων να προκαλούν Fas-επαγόμενη απόπτωση της EVT (Εικόνα 7), υπογραμμίζει τον ανοσοτροποποιητικό ρόλο του περιφερικού CRF στην τροφοβλαστική διείσδυση και αναδόμηση των μητριάων σπειροειδών αρτηριών κατά την πλακουντοποίηση. Ωστόσο, αναγνωρίζεται η ανάγκη περαιτέρω μελετών προκειμένου να διευκρινιστεί με σαφήνεια ο ακριβής ρόλος του νευροπεπτιδίου στην παθογένεση των νόσων που σχετίζονται με διαταραχές στην πλακουντοποίηση.



**Εικόνα 7. Προτεινόμενο παθογενετικό μοντέλο προεκλαμψίας.** Στην προεκλαμψία τα φθαρτικά μακροφάγα είναι δυνατό να επιτίθενται στα EVT κύτταρα της περιοχής του εμβρυομητρικού ορίου επάγοντας την απόπτωσή τους (aEVT) μέσω του συστήματος Fas/FasL.



## 5.5 Μελλοντικές 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 πλακουντοποίησης. Η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών της πλακουντοποίησης αναμένεται να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών στην αντιμετώπιση καταστάσεων που σχετίζονται με διαταραχές στην πλακουντοποίηση.

Στη παρούσα μελέτη περιγράφεται ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου το νευροπεπτίδιο CRF συμμετέχει στην αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν σε διαταραχές στη διείδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων και συνακόλουθες διαταραχές στην πλακουντοποίηση. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας περιγράφουν το μηχανισμό με τον οποίο το CRF πεπτίδιο συμμετέχει στη ρύθμιση της φυσιολογικής διείδυσης των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω ρύθμισης του μορίου CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) (Bamberger et al, 2006). Μία σειρά πειραμάτων που θα διεξαχθούν στο εργαστήριο Ανθρώπινης Αναπαραγωγής αποσκοπούν στην άμεση τεκμηρίωση και σε μεγαλύτερο βάθος μελέτη του ρόλου των CRF πεπτιδίων στην παθογένεση νόσων με ελλατωματική πλακουντοποίηση.

Έτσι, καταρχήν θα μελετηθεί η έκφραση μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της τροφοβλαστικής διείδυσης, όπως το μόριο CEACAM1, η οστεοποντίνη, οι ιντεγκρίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες σε παθολογικούς πλακούντες καθώς και ο ρόλος των νευροπεπτιδίων του CRF συστήματος στη ρύθμιση της έκφρασης των μορίων αυτών. Ακόμα θα αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος των ουροκορτινών στους ανωτέρω μηχανισμούς και θα μελετηθεί η έκφραση και ρύθμιση των «υποδοχέων θανάτου» στην εξωλαχνωτή τροφοβλάστη τόσο σε φυσιολογικούς όσο και παθολογικούς πλακούντες. Επιπλέον, θα διερευνηθούν πιθανοί μηχανισμοί αναστολής της κυτταροτοξικότητας των φθαρτικών μακροφάγων καθώς και ο ενδεχόμενος ρόλος του συστήματος των CRF πεπτιδίων στη ρύθμιση χημειοτακτικών παραγόντων των μακροφάγων.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10:55-63.
- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10:55-63.
- Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 2002;70:6068-6074.
- Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;96:271-276.
- Allison J, Georgiou HM, Strasser A, Vaux DL. Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3943-3947.
- Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, Cossarizza A, Franceschi C, Muscettola M, Genazzani AD, Surico N, Genazzani AR. Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 1993;53:1735-1742.
- Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 2001;142:446-454.
- Aschkenazi S, Naftolin F, Mor G. Menopause, Sex Hormones and the Immune System. *Menopause Management* 2000;9:6-13.
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002;66:1853-1861.
- Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:199-214.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
- Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous

- trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:102-108.
- Baigent SM. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 2001;22:809-820.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:525-557.
- 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. Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 2006;168:141-150.
- Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Gotze J, Brummer J, Schulte HM, Wagener C, Loning T. Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol* 1998;152:1401-1406.
- Bamberger CM, Bamberger AM. The peripheral CRH/urocortin system. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:290-296.
- Bamberger CM, Minas V, Bamberger AM, Charalampopoulos I, Fragouli Y, Schulte HM, Makrigiannakis A. Expression of Urocortin in the Extravillous Human Trophoblast at the Implantation Site. *Placenta* 2006.
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;377:630-632.
- Ben-Hur H, Gurevich P, Berman V, Tchansyshev R, Gurevich E, Zusman I. The secretory immune system as part of the placental barrier in the second trimester of pregnancy in humans. *In Vivo* 2001;15:429-435.
- Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Stopple JA, Barber WH, Hale E, Brackin MN, Cowan BD. Cytokine expression by first-trimester human chorionic villi. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:309-318.
- Berkowitz GS, Lapinski RH, Lockwood CJ, Florio P, Blackmore-Prince C, Petraglia F. Corticotropin-releasing factor and its binding protein: maternal serum levels in term and preterm deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1477-1483.
- Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-

- containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 1999;415:285-312.
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004;11:90-98.
- Blankenship TN, Enders AC, King BF. 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* 1993;272:227-236.
- Brar A. Decidua as an endocrine organ. In: Glasser S, Aplin J, Giudice L, Tabibzadeh S (eds) *The Endometrium*. Taylor and Francis, London, 2002, pp. 308-323.
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1416-1423.
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791-798.
- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:718-724.
- Campbell EA, Linton EA, Wolfe CD, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ. Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1054-1059.
- Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, Macdonald PC. Cachectin/tumor necrosis factor- $\alpha$  formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989;83:430-436.
- Casey ML, Cox SM, Word RA, Macdonald PC. Cytokines and infection-induced preterm labour. *Reprod Fertil Dev* 1990;2:499-509.
- Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 1994;48:445-453.
- Challis JR. CRH, a placental clock and preterm labour. *Nat Med* 1995;1:416.
- Chan EC, Falconer J, Madsen G, Rice KC, Webster EL, Chrousos GP, Smith R. A corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist delays parturition in sheep. *Endocrinology* 1998;139:3357-3360.
- Chatzaki E, Margioris AN, Gravanis A. Expression and regulation of corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals. *J Neurochem* 2002;80:81-90.

- Chatzaki E, Murphy BJ, Wang L, Million M, Ohning GV, Crowe PD, Petroski R, Tache Y, Grigoriadis DE. Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. *J Neurochem* 2004;88:1-11.
- Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W. 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* 2004;145:2445-2457.
- Chen A, Vaughan J, Vale WW. Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 2003;17:1622-1639.
- Chen AM, Perrin MH, Digruccio MR, Vaughan JM, Brar BK, Arias CM, Lewis KA, Rivier JE, Sawchenko PE, Vale WW. 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* 2005;102:2620-2625.
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8967-8971.
- Chen Y, Hatalski CG, Brunson KL, Baram TZ. 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* 2001;96:39-49.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997;278:1966-1968.
- Christoforidou AV, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C. Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. *Mol Cancer* 2004;3:34.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332:1351-1362.
- Chua S, Wilkins T, Sargent I, Redman C. Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:973-979.
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:554-559.

- Clifton VL, Gu Q, Murphy VE, Schwartz J, Madsen G, Smith R. Localization and characterization of urocortin during human pregnancy. *Placenta* 2000;21:782-788.
- Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Boura AL, Robinson PJ, Smith R. Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:666-669.
- Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Giles WB, Boura AL, Robinson PJ, Smith R. 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* 1995;80:2888-2893.
- Clifton VL, Telfer JF, Thompson AJ, Cameron IT, Teoh TG, Lye SJ, Challis JR. Corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin-derived peptides are present in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3716-3721.
- Crocker IP, Barratt S, Kaur M, Baker PN. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2001;22:822-830.
- Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003;162:637-643.
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. 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* 1992;89:210-222.
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. 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* 1992;89:210-222.
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120:3657-3666.
- Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:71-77.
- De M, Wood GW. Influence of oestrogen and progesterone on macrophage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 1990;126:417-424.

- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002;277:12280-12287.
- Difederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 1999;155:293-301.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
- Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003;7:151-161.
- Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 1985;56:351-358.
- Elovitz MA, Mrinalini C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:479-487.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
- Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;73:229-235.
- Ettinger R, Panka DJ, Wang JK, Stanger BZ, Ju ST, Marshak-Rothstein A. Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. *J Immunol* 1995;154:4302-4308.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
- Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* 1993;4:183-188.
- Florio P, Arcuri F, Ciarmela P, Runci Y, Romagnoli R, Cintonino M, Di Blasio AM, Petraglia F. Identification of urocortin mRNA and peptide in the human endometrium. *J Endocrinol* 2002;173:R9-14.
- Florio P, Cobellis L, Woodman J, Severi FM, Linton EA, Petraglia F. Levels of maternal plasma corticotropin-releasing factor and urocortin during labor. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:233-237.
- Florio P, Franchini A, Reis FM, Pezzani I, Ottaviani E, Petraglia F. Human placenta, chorion, amnion and decidua express different variants of corticotropin-releasing factor receptor messenger RNA. *Placenta* 2000;21:32-37.

- Florio P, Severi FM, Ciarmela P, Fiore G, Calonaci G, Merola A, De Felice C, Palumbo M, Petraglia F. Placental stress factors and maternal-fetal adaptive response: the corticotropin-releasing factor family. *Endocrine* 2002;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. High maternal and fetal plasma urocortin levels in pregnancies complicated by hypertension. *J Hypertens* 2006;24:1831-1840.
- Florio P, Vale W, Petraglia F. Urocortins in human reproduction. *Peptides* 2004;25:1751-1757.
- Formby B. Immunologic response in pregnancy. Its role in endocrine disorders of pregnancy and influence on the course of maternal autoimmune diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24:187-205.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000;182:41-49.
- Frangmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjøllberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005;11:35-41.
- Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Fuzesi L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG. 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* 1997;10:191-201.
- Garcia-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1999;5:642-650.
- Genbacev O, Difederico E, McMaster M, Fisher SJ. Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia. *Hum Reprod* 1999;14 Suppl 2:59-66.
- Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88:876-881.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:792-797.



- Gill TJ, 3rd. Immunological and genetic factors influencing pregnancy and development. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986;10:116-120.
- Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D, Roberts JM, Sibai BM, Taler SJ. Report of the National High Blood Pressure Education Programme Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1-S22.
- Goland RS, Jozak S, Warren WB, Conwell IM, Stark RI, Tropper PJ. Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1174-1179.
- Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, Brown LS, Jr., Frantz AG. High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1199-1203.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91.
- Graham CH, McCrae KR. Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:555-562.
- Grammatopoulos D, Dai Y, Chen J, Karteris E, Papadopoulou N, Easton AJ, Hillhouse EW. Human corticotropin-releasing hormone receptor: differences in subtype expression between pregnant and nonpregnant myometria. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2539-2544.
- Grammatopoulos D, Milton NG, Hillhouse EW. The human myometrial CRH receptor: G proteins and second messengers. *Mol Cell Endocrinol* 1994;99:245-250.
- Grammatopoulos D, Stirrat GM, Williams SA, Hillhouse EW. 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* 1996;81:745-751.
- Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 1999;354:1546-1549.
- Grammatopoulos DK, Randeva HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW. 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* 2000;14:2076-2091.
- Gravanis A, Margioris AN. The corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in inflammation: potential therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2005;12:1503-1512.
- Green DR, Ware CF. Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5986-5990.
- Green DR, Ware CF. Fas-ligand: privilege and peril. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5986-5990.
- Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996;5:7-16.
- Hacker G, Vaux DL. Apoptosis. A sticky business. *Curr Biol* 1995;5:622-624.
- Hammer A, Desoye G, Dohr G, Sattler W, Malle E. Myeloperoxidase-dependent generation of hypochlorite-modified proteins in human placental tissues during normal pregnancy. *Lab Invest* 2001;81:543-554.
- Hammer A, Dohr G. Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 2000;46:83-90.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000;164:5721-5728.
- Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 1996;36:349-358.
- Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003;55:21-26.
- Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM. 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* 2003;306:794-803.

- Hees H, Moll W, Wrobel KH, Hees I. Pregnancy-induced structural changes and trophoblastic invasion in the segmental mesometrial arteries of the guinea pig (*Cavia porcellus* L.). *Placenta* 1987;8:609-626.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
- Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Role of stress peptides during human pregnancy and labour. *Reproduction* 2002;124:323-329.
- Hoare SR, Sullivan SK, Fan J, Khongsaly K, Grigoriadis DE. 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* 2005;26:457-470.
- Hobel CJ, Dunkel-Schetter C, Roesch SC, Castro LC, Arora CP. Maternal plasma corticotropin-releasing hormone associated with stress at 20 weeks' gestation in pregnancies ending in preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S257-263.
- Houston A, O'connell J. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:321-326.
- Hsu CD, Harirah H, Basherra H, Mor G. Serum soluble Fas levels in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:530-532.
- Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 2001;7:605-611.
- Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 2002;90:1274-1281.
- Hunt JS. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J Reprod Immunol* 1989;16:1-17.
- Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998;110:495-508.
- Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999;79:1687-1702.
- Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:353-362.
- Huppertz B, Tews DS, Kaufmann P. Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol* 2001;205:215-253.

- Hustin J, Schaaps JP. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:162-168.
- Imperatore A, Florio P, Torres PB, Torricelli M, Galleri L, Toti P, Occhini R, Picciolini E, Vale W, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:288-295.
- Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:158-166.
- Jaffe R, Woods JR, Jr. Color Doppler imaging and in vivo assessment of the anatomy and physiology of the early uteroplacental circulation. *Fertil Steril* 1993;60:293-297.
- Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S. In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991;1:435-445.
- Jeske W, Soszynski P, Lukaszewicz E, Debski R, Latoszevska W, Rogozinski W, Snochowska H, Zgliczynski S. Enhancement of plasma corticotropin-releasing hormone in pregnancy-induced hypertension. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990;122:711-714.
- Johansen M, Redman CW, Wilkins T, Sargent IL. Trophoblast deportation in human pregnancy--its relevance for pre-eclampsia. *Placenta* 1999;20:531-539.
- Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, Mislser S, Edlund H, Polonsky KS. Increased islet apoptosis in Pdx1<sup>+/-</sup> mice. *J Clin Invest* 2003;111:1147-1160.
- Jones SA, Challis JR. Local stimulation of prostaglandin production by corticotropin-releasing hormone in human fetal membranes and placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:192-199.
- Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:557-563.
- Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kaufmann P, Huppertz B. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 2003;24:540-548.

- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Mastorakos G, Chrousos GP. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:129-135.
- Kam EP, Gardner L, Loke YW, King A. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod* 1999;14:2131-2138.
- Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med* 1997;3:738-743.
- Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991;254:421-423.
- Karteris E, Goumenou A, Koumantakis E, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Reduced expression of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 alpha in human preeclamptic and growth-restricted placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:363-370.
- Karteris E, Grammatopoulos D, Randeve H, Hillhouse EW. Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the feto-placental unit. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1989-1996.
- Karteris E, Grammatopoulos DK, Randeve HS, Hillhouse EW. The role of corticotropin-releasing hormone receptors in placenta and fetal membranes during human pregnancy. *Mol Genet Metab* 2001;72:287-296.
- Karteris E, Hillhouse EW, Grammatopoulos D. 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* 2004;145:890-900.
- Karteris E, Papadopoulou N, Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Expression and signalling characteristics of the corticotrophin-releasing hormone receptors during the implantation phase in the human endometrium. *J Mol Endocrinol* 2004;32:21-32.
- Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. 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* 2005;90:3680-3687.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001;11:526-534.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- Keogh RJ, Whitley GS, Harris LK, Baker PN, Aplin JD, Cartwright J. Trophoblast induction of smooth muscle cell apoptosis. *Placenta* 2004;25:A62.
- Kilani RT, Mackova M, Davidge ST, Guilbert LJ. Effect of oxygen levels in villous trophoblast apoptosis. *Placenta* 2003;24:826-834.
- King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;6:28-36.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995;14:5579-5588.
- Klimaviciute A, Calciolari J, Bertucci E, Abelin-Tornblom S, Stjernholm-Vladic Y, Bystrom B, Petraglia F, Ekman-Ordeberg G. 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* 2006;4:29.
- Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:632-640.
- Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR. Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1585-1591.
- Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 1998;12:1077-1085.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-298.
- Laatikainen T, Virtanen T, Kaaja R, Salminen-Lappalainen K. Corticotropin-releasing hormone in maternal and cord plasma in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;39:19-24.
- Leitch IM, Boura AL, Botti C, Read MA, Walters WA, Smith R. Vasodilator actions of urocortin and related peptides in the human perfused placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4510-4513.

- Leung TN, Chung TK, Madsen G, Lam CW, Lam PK, Walters WA, Smith R. Analysis of mid-trimester corticotrophin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations for predicting pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000;15:1813-1818.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-683.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1998;1:553-563.
- Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C982-988.
- Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1056-1061.
- 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. 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* 2001;98:7570-7575.
- Li C, Chen P, Vaughan J, Blount A, Chen A, Jamieson PM, Rivier J, Smith MS, Vale W. Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 2003;144:3216-3224.
- Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 2005;26:210-217.
- Liapi CA, Tsakalia DE, Panitsa-Fafli CC, Antsaklis AI, Aravantinos DI, Batrinos ML. Corticotropin-releasing-hormone levels in pregnancy-induced hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;68:109-114.
- Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, De Souza EB. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1996;137:72-77.

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:516-524.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 1995;136:4139-4142.
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:836-840.
- Lyall F, Myatt L. The role of the placenta in pre-eclampsia--a workshop report. *Placenta* 2002;23 Suppl A:S142-145.
- Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiannis V, Athanassiou A, Theoharides TC. High levels of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase, and interleukin-8 in spontaneous abortions. *Endocrinology* 2003;144:2285-2290.
- Majzoub JA, Mcgregor JA, Lockwood CJ, Smith R, Taggart MS, Schulkin J. A central theory of preterm and term labor: putative role for corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S232-241.
- Makrigiannakis A, Margioris AN, Chatzaki E, Zoumakis E, Chrousos GP, Gravanis A. The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999;5:789-796.
- Makrigiannakis A, Margioris AN, Zoumakis E, Stournaras C, Gravanis A. The transcription of corticotropin-releasing hormone in human endometrial cells is regulated by cytokines. *Neuroendocrinology* 1999;70:451-459.
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2006.
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2001;2:1018-1024.
- Mano-Otagiri A, Shibasaki T. Distribution of urocortin 2 and urocortin 3 in rat brain. *J Nippon Med Sch* 2004;71:358-359.



- Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001;16:1213-1224.
- Mclean M, Smith R. Corticotropin-releasing Hormone in Human Pregnancy and Parturition. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:174-178.
- Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA. Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 1996;271:16260-16262.
- Mellor AL, Munn DH. Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol* 2001;13:213-218.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, 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. *Mol Hum Reprod* 2007;13:663-673.
- Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:119.
- Mor G, Naftolin F. Oestrogen, menopause and the immune system. *The Journal of the British Menopause Society* 1998;4:4-8.
- Mor G, Sapi E, Abrahams VM, Rutherford T, Song J, Hao XY, Muzaffar S, Kohen F. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol* 2003;170:114-122.
- Mor G, Yue W, Santen RJ, Gutierrez L, Eliza M, Berstein LM, Harada N, Wang J, Lysiak J, Diano S, Naftolin F. Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;67:403-411.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996;381:335-341.
- Murakoshi H, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocr J* 2003;50:199-207.
- Muschel RJ, Bernhard EJ, Garza L, Mckenna WG, Koch CJ. Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signaling. *Cancer Res* 1995;55:995-998.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.

- Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;13:39-44.
- Neale DM, Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia. *J Perinat Med* 2005;33:471-477.
- Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem* 2003;49:727-731.
- Ober C. HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet* 1998;62:1-5.
- Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 2004;200:951-955.
- Parkes DG, Weisinger RS, May CN. Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides* 2001;22:821-827.
- Perkins AV, Linton EA, Eben F, Simpson J, Wolfe CD, Redman CW. Corticotrophin-releasing hormone and corticotrophin-releasing hormone binding protein in normal and pre-eclamptic human pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102:118-122.
- Perkins J, St John J, Ahmed A. Modulation of trophoblast cell death by oxygen and EGF. *Mol Med* 2002;8:847-856.
- Perrin MH, Sutton S, Bain DL, Berggren WT, Vale WW. The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin. *Endocrinology* 1998;139:566-570.
- Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:312-328.
- Petraglia F, Florio P, Benedetto C, Gallo C, Woods RJ, Genazzani AR, Lowry PJ. 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* 1996;81:852-856.
- Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* 1987;328:717-719.
- Petraglia F, Tabanelli S, Galassi MC, Garuti GC, Mancini AC, Genazzani AR, Gurbide E. 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* 1992;74:1427-1431.
- Piacentini M, Autuori F. Immunohistochemical localization of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo implantation and post-partum involution. *Differentiation* 1994;57:51-61.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983;4:397-413.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 1981;2:303-316.
- Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1980;1:3-19.
- Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981;2:71-91.
- Ramkumar T, Adler S. A requirement for the POU transcription factor, Brn-2, in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol Endocrinol* 1999;13:1237-1248.
- Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991;12:301-308.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:499-506.
- Redman CW, Sargent IL. The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil* 2001;29:518-522.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-1594.
- Redman CW, Sargent IL. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 2008;29 Suppl A:S73-77.
- Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776.
- Reister F, Frank HG, Heyl W, Kosanke G, Huppertz B, Schroder W, Kaufmann P, Rath W. The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta* 1999;20:229-233.
- Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001;81:1143-1152.

- Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987;8:138-140.
- Renaud SJ, Postovit LM, Macdonald-Goodfellow SK, McDonald GT, Caldwell JD, Graham CH. Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 2005;73:237-243.
- Reubi JC, Waser B, Vale W, Rivier J. Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3312-3320.
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. 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* 2001;98:2843-2848.
- Riley SC, Walton JC, Herlick JM, Challis JR. The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1001-1007.
- Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999;354:788-789.
- Robertson WB, Brosens I, Dixon HG. The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 1967;93:581-592.
- Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993;177:195-200.
- Rozner AE, Dambaeva SV, Drenzek JG, Durning M, Golos TG. Modulation of cytokine and chemokine secretions in rhesus monkey trophoblast co-culture with decidual but not peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Am J Reprod Immunol* 2011;66:115-127.
- Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997;276:1571-1574.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999;401:168-173.
- Sakagami H, Kusama K, Toguchi M, Kochi M. Induction of non-apoptotic cell death by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate in a human salivary gland tumor cell line. *Anticancer Res* 1999;19:4045-4048.

- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99.
- Sanchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol* 1999;408:365-377.
- Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2003;59:153-160.
- Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H. Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* 2005;26:1196-1206.
- Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-788.
- Schlegel RA, Stevens M, Lumley-Sapanski K, Williamson P. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunol Lett* 1993;36:283-288.
- Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JF. 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* 1975;116:129-138.
- Sehringer B, Zahradnik HP, Deppert WR, Simon M, Noethling C, Schaefer WR. 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* 2005;383:768-775.
- Sehringer B, Zahradnik HP, Simon M, Ziegler R, Noethling C, Schaefer WR. 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* 2004;32:339-348.
- Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M. Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:965-970.
- Seth KA, Majzoub JA. 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* 2001;276:13917-13923.

- Simon C, Martin JC, Meseguer M, Caballero-Campo P, Valbuena D, Pellicer A. Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:43-53.
- Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994;1:365-371.
- Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J. Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 2004;145:941-950.
- Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb J* 2001;15:1678-1693.
- Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2916-2920.
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1395-1401.
- Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009;174:1959-1971.
- Spieß J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:6517-6521.
- Suda T, Iwashita M, Tozawa F, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K. Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:1278-1283.
- Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 2004;25:1689-1701.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.
- 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. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446.

- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996;184:1331-1341.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. Urocortins as cardiovascular peptides. *Peptides* 2004;25:1723-1731.
- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 2000;12:731-737.
- Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, Benveniste O, Marce D, Roques P, Milliez J, Chaouat G, Dormont D. Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:215-226.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. 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* 2006;176:1869-1877.
- Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 1997;3:655-662.
- Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog Horm Res* 1983;39:245-270.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213:1394-1397.
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Et Al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995;378:287-292.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
- Villar K, Say L, Gulmezoglu AM, Merialdi M, Lindheimer MD, Betran AP, Piaggio G. Eclampsia and preeclampsia: a health problem for 2000 years. In: Critchley H, MacLean AB, Poston L, Walker JJ (eds). *Preeclampsia*. London: RCOG Press, 2003, pp. 189–207.

- Von Dadelszen P, Hurst G, Redman CW. Supernatants from co-cultured endothelial cells and syncytiotrophoblast microvillous membranes activate peripheral blood leukocytes in vitro. *Hum Reprod* 1999;14:919-924.
- Von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta* 2003;24:929-940.
- Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-1636.
- Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-1636.
- Warren WB, Gurewitsch ED, Goland RS. Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenal hormones in pregnancies complicated by chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:661-666.
- Warren WB, Patrick SL, Goland RS. Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1198-1204; discussion 1204-1197.
- Warren WB, Silverman AJ. Cellular localization of corticotrophin releasing hormone in the human placenta, fetal membranes and decidua. *Placenta* 1995;16:147-156.
- Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Susceptibility of human placental syncytiotrophoblastic mitochondria to oxygen-mediated damage in relation to gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1697-1705.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-356.
- Westphal NJ, Seasholtz AF. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front Biosci* 2006;11:1878-1891.
- Wetzka B, Sehringer B, Schafer WR, Biller S, Hor C, Benedek E, Deppert WR, Zahradnik HP. Expression patterns of CRH, CRH receptors, and CRH binding protein in human gestational tissue at term. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:154-161.
- World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:80-83.
- Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998;273:7141-7147.



- Wiest I, Seliger C, Walzel H, Friese K, Jeschke U. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1. *Anticancer Res* 2005;25:1575-1580.
- Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987;153:313-316.
- Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, Syn HC. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1433-1440.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-809.
- Zhao L, Donaldson CJ, Smith GW, Vale WW. The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics* 1998;50:23-33.
- Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6785-6790.
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:950-960.
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997;99:2152-2164.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997;99:2139-2151.
- Zoumakis E, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Margioris AN, Angelakis E, Koumantakis E, Gravanis A. Cycle and age-related changes in corticotropin-releasing hormone levels in human endometrium and ovaries. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:98-102.
- Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Gravanis A. Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 2000;6:344-351.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΑΝΑΤΥΠΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

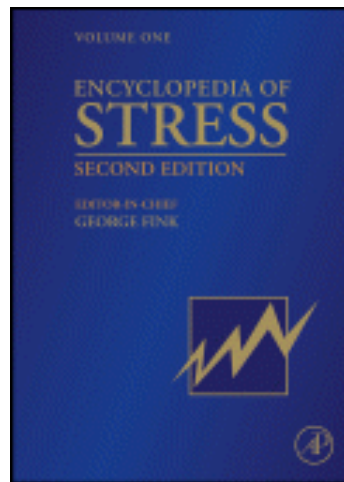
Chemists have used X-ray diffraction to determine the structure of DNA. The structure of DNA is a double helix, with the two strands of DNA twisted around each other. The strands are made of a sugar-phosphate backbone, with nitrogenous bases attached to the sugar. The bases of one strand are paired with the bases of the other strand, forming the rungs of the helix. This structure allows DNA to store and transmit genetic information.

Chemically, DNA consists of three components: a simple sugar called deoxyribose, a phosphate group, and a nitrogenous base. The sugar and phosphate groups form the backbone of the DNA molecule, while the nitrogenous bases are attached to the sugar. The bases of one strand are paired with the bases of the other strand, forming the rungs of the helix. This structure allows DNA to store and transmit genetic information.

Within cells, DNA is organized into long structures called chromosomes. These chromosomes are replicated before cells divide, in a process called DNA replication. Cells store copies of their DNA inside the nucleus, and portions of their DNA code for the instructions for building proteins. DNA is involved in all biological processes, including growth, development, and reproduction. The structure of DNA is a double helix, with the two strands of DNA twisted around each other. The strands are made of a sugar-phosphate backbone, with nitrogenous bases attached to the sugar. The bases of one strand are paired with the bases of the other strand, forming the rungs of the helix. This structure allows DNA to store and transmit genetic information.

Provided for non-commercial research and educational use only.  
Not for reproduction or distribution or commercial use

This article was originally published in the *Encyclopedia of Stress Second Edition*, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution,



sending it to specific colleagues who you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Makrigiannakis A, Petsas G and Chrousos G P (2007), Eclampsia and Pre-Eclampsia. In: George Fink, (Editor-in-Chief) *Encyclopedia of Stress, Second Edition*, volume 1, pp. 880-884. Oxford: Academic Press.

# Eclampsia and Pre-Eclampsia

**A Makrigiannakis and G Petsas**

University of Crete, Heraklion, Greece

**G P Chrousos**

Athens University Medical School, Athens, Greece

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Maternal and Perinatal Outcome

History

Epidemiology

Pathophysiology

Prediction of Pre-Eclampsia

Prevention of Pre-Eclampsia

Management of Pre-Eclampsia

## Glossary

<i>Eclampsia</i>	Occurrence of seizures in a woman with pre-eclampsia that cannot be attributed to other causes.
<i>Invasive trophoblast</i>	The inner trophoblast lineage which differentiates into tumorlike cells that invade the lining of the pregnant uterus and the maternal uterine spiral arteries.
<i>Oxidative stress</i>	A disequilibrium between antioxidant defenses and production of reactive oxygen species in favor of the latter.
<i>Pre-eclampsia</i>	A pregnancy-specific syndrome that occurs after mid-gestation, defined by the <i>de novo</i> appearance of hypertension (systolic blood pressure of $\geq 140$ mmHg or diastolic blood pressure of $\geq 90$ mmHg), accompanied by new-onset proteinuria (defined as $\geq 300$ mg per 24 h).
<i>Pregnancy-induced hypertension</i>	<i>De novo</i> hypertension arising after mid-gestation distinguished from pre-eclampsia by the absence of proteinuria.

Pre-eclampsia is a multisystem disorder of unknown etiology, which is unique to pregnancy. Women with pre-eclampsia usually develop hypertension and proteinuria, but the condition is also associated with abnormalities of the blood coagulation system, disturbed liver function, renal failure, and cerebral ischemia. The incidence of pre-eclampsia is 2–10%, depending on the population studied and definitions of pre-eclampsia. Eclampsia, the occurrence of one or more convulsions superimposed on the syndrome of pre-eclampsia, occurs less frequently. In the Western world, the reported incidence of eclampsia ranges from one pregnancy in 2000 to one in 3448.

## Maternal and Perinatal Outcome

Pre-eclampsia is a major obstetric problem leading to substantial maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide, especially in developing countries. In general, maternal and perinatal outcomes are usually favorable in women with mild pre-eclampsia developing beyond 36 weeks of gestation. By contrast, maternal and perinatal morbidities and mortalities are increased in women who develop the disorder before 33 weeks of gestation, in those with pre-existing medical disorders, and in those from developing countries. Eclampsia compared to pre-eclampsia carries a much higher risk of death and serious morbidity for the woman and her baby. In the UK, for example, one in 50 of the women who have eclampsia die.

## History

Eclampsia was defined by Celsus in 100 AD as seizures during pregnancy that abated with delivery. For the ensuing 1700 years, eclampsia was considered a pregnancy-specific seizure disorder. It was not until the mid-1800s that the similarity of the edematous eclamptic women and the dropsic patients with Bright's disease (acute glomerulonephritis) stimulated clinicians to determine whether women with eclampsia, like individuals with Bright's disease, had protein in their urine. Protein was indeed present and 50 years later an association of increased blood pressure and eclampsia was recognized. It was soon evident that hypertension and proteinuria during pregnancy, even without seizures, identified a woman with the potential for a rapidly progressive life-threatening disorder and a fetus at increased risk of stillbirth.

## Epidemiology

Several risk factors have been identified with increased risk of pre-eclampsia. These factors include a previous history of pre-eclampsia, nulliparity, maternal age over 40 years, family history of pre-eclampsia, limited sperm exposure, multiple pregnancies, obesity, and chronic medical conditions such as chronic hypertension, renal disease, insulin-dependent diabetes (IDDM), autoimmune disease, and antiphospholipid syndrome. Paradoxically, smoking during pregnancy has been associated with a reduced risk of pre-eclampsia.

Studies conducted to determine the relation between job strain and hypertensive complications during pregnancy showed that work-related psychosocial stress increased the risk of pre-eclampsia. Indeed stressful job characteristics did show associations with pregnancy-induced hypertension. In particular, gestational hypertension was associated with low decision latitude and low job complexity among women in lower-status jobs and with job pressures/low control among women in higher-status jobs.

## Pathophysiology

### Reduced Placental Perfusion, Oxidative Stress, and Pre-Eclampsia

Although the causes of pre-eclampsia remain still unknown, it is generally agreed that pre-eclampsia arises from the placenta and/or the maternal response to placentation. The clinical syndrome is characterized by secondary systemic circulatory disturbances that can be ascribed to generalized maternal endothelial dysfunction. Pre-eclampsia is appropriately divided into two stages: alterations in placental perfusion and the maternal syndrome. In placental pre-eclampsia, the problem arises from a placenta that is under hypoxic conditions and oxidative stress. Once defective placentation is established, reduced perfusion appears to interact with maternal factors to result in the maternal syndrome. These factors are posited to be genetic, behavioral, or environmental.

The placenta seems to be the key component of pregnancy that leads to pre-eclampsia. During the first half of normal human pregnancy, uteroplacental arteries undergo a series of pregnancy-specific changes that include the replacement of endothelial and media smooth muscle cells by invasive trophoblast cells, loss of elasticity, dilatation to incontractile tubes, and loss of vasomotor control, which allows a substantial increase in blood supply to the growing fetus. In pre-eclampsia, spiral arteries undergo superficial or no remodeling and this results in reduced placental perfusion.

A principal question is how reduced perfusion of the placenta can result in the maternal syndrome. Oxidative stress has been proposed as the link between the two phases of pre-eclampsia. The oxidative stress hypothesis proposes that hypoxia at the fetal-maternal interface results in the generation of free radicals that may lead to oxidative stress by the following potential mechanism: hypoxia stimulates xanthine oxidase, an important source of superoxide generation. As a result, the placenta releases what can be described as trophoblastic debris into the maternal circulation. This comprises syncytiotrophoblast

membrane microparticles, cytokeratin fragments, soluble ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA) of fetal origin and even cytotrophoblast cells. Syncytiotrophoblast microvesicles, normally present in the circulation in pregnancy, are increased in pre-eclampsia and have been directly linked to activation of maternal neutrophils, which in turn may contribute to endothelial cell activation.

In pre-eclampsia, the hypoxia/reperfusion injury leads also to increased expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase and hence increased superoxide generation in placental tissue. Potential additional stimuli to activation of NAD(P)H oxidase in pre-eclampsia include raised feto-placental vascular shear stress, elevation of maternal plasma cytokine concentrations, and enhanced angiotensin II sensitivity.

Abundant evidence of oxidative stress in placenta, tissues, and blood of women with pre-eclampsia support the oxidative stress hypothesis. These oxidative damage biomarkers include higher placental levels of markers for lipid peroxidation such as the  $F_2$ -isoprostanes and malondialdehyde and for non-lipid markers, including increased nitrotyrosine residues in fetal blood vessels. Supportive of a role for oxidative stress in the maternal circulation is the maternal plasma elevations of lipid peroxidation products, including malondialdehyde (MDA), conjugated dienes,  $F_2$ -isoprostanes (usually 8-epi-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ), and antibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein (LDL). Besides the elevation of lipid peroxidation markers, another indication of the presence of oxidative stress is the decreased antioxidant capacity in the maternal circulation. Indeed, women with pre-eclampsia have lower plasma concentrations of glutathione, a major intracellular water-soluble antioxidant.

### Stress and Pre-Eclampsia

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, along with the arousal and sympathetic nervous systems (SNS), constitute the stress system. Activation of the stress system leads to behavioral and peripheral changes that improve the ability of the organism to adjust homeostasis and increase its chances for survival. The principal regulators of the HPA axis are corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine-vasopressin (AVP), both produced by parvocellular neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and secreted into the hypophysial portal system. CRH and AVP synergistically stimulate pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion and subsequently cortisol secretion by the adrenal cortex.

CRH and its receptors have been identified in several female reproductive organs, including the ovaries, endometrial glands, decidualized endometrial stroma, and placenta. Placental CRH is produced by the syncytiotrophoblast, placental decidua, and fetal membranes. In pregnant women, the placenta is the main source of circulating CRH, as supported by undetectable levels of circulating CRH levels in non-pregnant woman. The biologic activity of placental CRH is attenuated by the presence of a circulating CRH-binding protein (CRH-BP), a 37-kD protein of 322 amino acids that binds circulating CRH and modulates CRH actions on pregnant target tissues during pregnancy. To optimize placental perfusion during pregnancy, the umbilical-placental vessels are normally maintained in a state of physiological dilatation by the action of locally produced vasodilators. CRH is a potent dilator of placental resistance vessels, acting via production of nitric oxide (NO). Maternal plasma CRH concentrations are significantly elevated in complicated pregnancies.

The mean umbilical cord plasma CRH in pre-eclamptic pregnancies is significantly higher than that from normotensive pregnancies. This is also reflected by maternal plasma CRH levels that are significantly higher in hypertensive women than those with uncomplicated pregnancies. Moreover, in women with pregnancy-induced hypertension, CRH-BP levels are significantly lower in patients who progressed to pre-eclampsia. CRH-BP may be involved in the paracrine regulation of vasodilator CRH effects in human placenta. In this regard, the reduced secretion of CRH-BP may enhance and amplify the effects of CRH by increasing its biologically active free fraction. Taken together these findings suggest that in pre-eclampsia or eclampsia the placenta takes part in a stress syndrome by releasing CRH, which may help improve uterine perfusion thereby protecting the fetus from anoxia and starvation. Indicative of a stress-responsive compensatory mechanism in the human placenta is the fact that the concentration of CRH in the fetal circulation is significantly increased in pregnancies complicated by abnormal umbilical artery flow-velocity waveforms.

In pregnancies complicated by pre-eclampsia, the plasma levels of CRH are elevated, together with a concomitant reduction in CRH receptor type 1 $\alpha$  (CRHR1 $\alpha$ ) and type 2 (CRHR2) expression. The dampening of CRH-induced vasodilatation in pre-eclamptic placentas could be attributable to loss of CRHRs. Although in normal placenta there is a balance between the vasodilatory action of CRH and the opposing actions of vasopressor agents, such as angiotensin II, in pre-eclampsia upregulation of

angiotensin II receptors (AT<sub>1</sub>R) and formation of heterodimers with bradykinin B<sub>2</sub> receptors (B<sub>2</sub>R) alter this balance and further potentiate the vasoconstriction caused by angiotensin II. Enhanced angiotensin II activity induces secretion of placental CRH, which, in turn, can downregulate its own receptors leading to abnormal vascular resistance and the clinical sequelae of pre-eclampsia.

One of the signaling pathways mediating CRH actions during pregnancy appears to be the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway. This signaling pathway appears to play an important role in vascular adaptation and placental physiology by mediating the vasodilatory effects of agonists in resistance vessels, which helps in the maintenance of low vascular resistance in the fetoplacental circulation. In pre-eclampsia the placental CRH-R down-regulation and the associated inability of CRH and CRH-related peptides to stimulate the NO/cGMP pathway might result in the disturbance of the balance controlling vascular tone towards vasoconstriction. In addition to CRH, other hormones with vasodilatory actions involved in the stress response, such as ACTH and cortisol, are increased in the fetuses of pre-eclamptic pregnancies, underscoring the role of the placental stress syndrome in the disease.

The role of CRH in the regulation of pituitary adrenocorticotropin secretion and the stress response is well established. In recent years, association of abnormally high placental expression of CRH with pregnancy complications, such as pre-eclampsia and intrauterine growth restriction (IUGR), suggest that CRH output from the placenta is specifically increased in response to fetal stress. Placental CRH activates a number of potentially useful adaptive responses for the stressed fetus. These include maximization of placental blood flow, acceleration of fetal organ development, and the early initiation of labor when fetal survival is threatened.

Besides the activation of the HPA axis, stress is associated with the activation of the SNS and hence with elevated serum levels of catecholamines. Enhanced release of catecholamines is postulated to aggravate the already existing vasoconstriction in pre-eclampsia, whereas, in normal pregnancy, loss of vasomotor control keeps vessels relatively insensitive to vasoactive substances.

### Prediction of Pre-Eclampsia

A variety of biochemical markers, based primarily on the above rationale implicated in the pathophysiology of pre-eclampsia have been proposed to predict the development of pre-eclampsia later in pregnancy.

Only markers related to placental stress syndrome are discussed in this section.

Although there is an inverse relation between reduced plasma CRH-BP levels and increased CRH levels in the maternal circulation of patients with pregnancy-induced hypertension, the measurement of these polypeptides in maternal plasma does not predict the development of pre-eclampsia because these hormonal changes do not occur before the onset of disease. Measurements, however, of CRH and CRH-BP in pregnant women who are at-risk for pre-eclampsia may add significant prognostic information for predicting pre-eclampsia, as the probability of the disease was shown to be remarkably higher among women with positive than in women with negative double-hormone tests.

In women with pre-eclampsia, the combination of elevated lipid peroxidation markers and decreased antioxidant capacity has raised the possibility that markers of oxidative stress might prove useful in the prediction of the disease. However, data for the reliability of these markers in suggesting pre-eclampsia have been inconsistent because of the difficulties and variability in the methods of measurement. As pre-eclampsia is of multifactorial origin, the determination of a single biochemical marker is unlikely to provide adequate predictive power.

At present, the best predictive test involves assessment of the velocity of uterine artery blood flow in the second trimester, however this test is still not recommended for routine screening of pregnant women for pre-eclampsia.

### Prevention of Pre-Eclampsia

During the past decade, several trials reported the use of various methods to reduce the rate or severity of pre-eclampsia. Although prevention trials have been disappointing to date, the evidence for oxidative stress in pre-eclamptic women indicates that there may be a role for antioxidant vitamins C and E for prophylaxis. Large multicenter trials are now underway and will determine whether antioxidant prophylaxis may be used routinely in the prevention of pre-eclampsia.

### Management of Pre-Eclampsia

The most important factor in the management of pre-eclampsia is adequate and proper prenatal care. After diagnosis, subsequent treatment will depend on the results of initial maternal and fetal assessment. Mother always takes the first priority in the management of pre-eclampsia and thus delivery remains the

ultimate treatment. When possible, vaginal delivery is preferable to avoid the added physiologic stressors of a cesarean section. Since delivery is not always the best choice for a very premature fetus, the decision between delivery and expectant management depends on the severity of maternal condition, the fetal status, and fetal gestational age at the time of assessment.

### Further Reading

- Cunningham, F. G., Gant, N. F., Leveno, K. J., et al. (2003). Hypertensive disorders in pregnancy. In: Seils, A., Noujaim, S. R. & Davis, K. (eds.) *Williams obstetrics*, (21st edn, pp. 567–618). New York: McGraw-Hill Companies.
- Duckitt, K. and Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *British Medical Journal* **330**, 565–571.
- Duley, L. (2003). Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *British Medical Bulletin* **67**, 161–176.
- Florio, P., Imperatore, A., Sanseverino, F., et al. (2004). The measurement of maternal plasma corticotropin releasing factor (CRF) and CRF-binding protein improves the early prediction of preeclampsia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 4673–4677.
- Kalantaridou, S. N., Makrigrannakis, A., Zoumakis, E., et al. (2004). Stress and the female reproductive system. *Journal of Reproductive Immunology* **62**, 61–68.
- Karteris, E., Goumenou, A., Koumantakis, E., et al. (2003). Reduced expression of corticotropin-releasing hormone receptor type-1  $\alpha$  in human preeclamptic and growth-restricted placentas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 363–370.
- Karteris, E., Vatish, M., Hillhouse, E. W., et al. (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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**, 3680–3687.
- Landsbergis, P. A. and Hatch, M. C. (1996). Psychosocial work stress and pregnancy-induced hypertension. *Epidemiology* **7**, 346–51.
- Paarlberg, K. M., Vingerhoets, A. J., Passchier, J., et al. (1995). Psychosocial factors and pregnancy outcome: a review with emphasis on methodological issues. *Journal of Psychosomatic Research* **39**, 563–595.
- Petraglia, F., Florio, P., Benedetto, C., et al. (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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 852–856.
- Raijmakers, M. T. M., Dechend, R. and Poston, L. (2004). Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* **44**, 374–380.

Redman, C. W. and Sargent, I. L. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592–1594.

Roberts, J. M., Pearson, G., Cutler, J., et al. (2003). Summary of the NHLBI Working Group on research on hypertension during pregnancy. *Hypertension* 41, 437–445.

Sibai, B. M. (2005). Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstetrics and Gynecology* 105, 402–410.

Sibai, B., Dekker, G. and Kupfermanc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785–799.

## Economic Factors and Stress

**R A Catalano**

University of California, Berkeley, CA, USA

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

This article is a revision of the previous edition article by R A Catalano, volume 2, pp 9–14, © 2000, Elsevier Inc.

Introduction: The Economy as a Population Stressor  
 The Economy's Effect on Hazard Avoidance  
 The Economy's Effect on Coping Assets  
 The Economy's Effect on Tolerance for Coping  
 Socioeconomic Status and Stress  
 Policy Implications and Conclusions

### Glossary

<i>Discount rate of pain</i>	A measurement of the difference between fear of pain experienced now and of that experienced in the future.
<i>Expected value of pain</i>	The product of multiplying the likelihood of experiencing a painful event by the amount pain it would inflict.
<i>Reservation wage</i>	The wage at which a worker with chronic illness will apply for disability benefits rather than compete for a job.
<i>Social support</i>	Tangible and intangible help from family, friends, and social networks to cope with stressors.

### Introduction: The Economy as a Population Stressor

We intuitively separate the stressors associated with physiological and behavioral disorders into several groups. These groups include undesirable as well as intuitively desirable job and financial events. As might be expected, the incidence of undesirable job and financial stressors increases during periods of economic contraction. The experience of undesirable job and financial events by a principal wage earner also increases the risk of disorder for his or her spouse and family. Undesirable job and financial experiences,

moreover, increase the likelihood of subsequent stressful nonjob, nonfinancial experiences for the wage earner and his or her family. The contraction of a regional economy can, in other words, increase the experience of undesirable job and financial events that, in turn, increase the risk of experiencing yet other undesirable experiences not intuitively related to the economy. These undesirable events raise the risk of disorder not only for those who experience them, but also for spouses and other members of the family.

Researchers have focused on job loss more than any other economic stressor. While disagreement remains over the virulence of job loss as a pathogen, there is agreement that forced job loss increases the risk of depressed mood, alcohol abuse, and antisocial behavior. More controversy arises from claims of a connection with somatic illness, but job loss reportedly increases the risk of stress-related illnesses, including those associated with compromised endocrine and immune responses.

Persons exposed to undesirable job and financial events early in life may exhibit elevated risk of succumbing to future stressors, whether those are economic in nature or not. Research on those who experienced the Great Depression of the 1930s, for example, suggests that economic stressors can affect behavior well into the future.

Classic and recent theoretical literature concerned with the economy as a source of stressors posits that economies expanding more quickly than the rate to which a population has habituated should be pathogenic. This work argues that movements away from the expected value of macroeconomic performance, regardless of direction, should increase the incidence of stress-related illness. Individual-level research has not found desirable job and financial events to be as virulent or as contagious as undesirable events, but reports of ecological associations between rapid economic growth and the incidence of trauma and alcohol-related pathology appear in the literature. Fear of job loss, moreover, appears to reduce risk-taking behavior such as alcohol use and antisocial



# Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis

G. Petsas<sup>1,†</sup>, U. Jeschke<sup>2,†</sup>, D.U. Richter<sup>3</sup>, V. Minas<sup>1</sup>, A. Hammer<sup>4</sup>, S. Kalantaridou<sup>1</sup>, B. Toth<sup>5</sup>, C. Tsatsanis<sup>6</sup>, K. Friese<sup>2</sup>, and A. Makrigiannakis<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>IVF Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71110, Greece <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Maistrasse 11, 80337 Munich, Germany <sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Rostock, Rostock, Germany <sup>4</sup>Institute of Cell Biology, Histology and Embryology, Center of Molecular Medicine, Medical University of Graz, Harrachgasse 21, 8010 Graz, Austria <sup>5</sup>Department of Gynecological Endocrinology and Fertility Disorders, University of Heidelberg, Vossstrasse 9, 69115 Heidelberg, Germany <sup>6</sup>Department of Clinical Chemistry-Biochemistry, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

\*Correspondence address. Tel: +30-2810-392333; Fax: +30-2810-392131; E-mail: makrigia@med.uoc.gr

Submitted on July 24, 2011; resubmitted on June 3, 2012; accepted on June 7, 2012

**ABSTRACT:** Corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptors are expressed in human placenta. Recently, the impaired function of this system has been associated with a number of complications of pregnancy, including pre-eclampsia. The aim of the study was to test the hypothesis that CRH participates in the pathophysiology of pre-eclampsia through the induction of macrophage-mediated apoptosis of extravillous trophoblasts (EVTs). We found that the expression of CRH was increased in the EVT of the placental bed biopsy specimens from pre-eclamptic pregnancies (1.8-fold increase;  $P < 0.05$ ). In addition, significantly larger numbers of apoptotic EVT were detected in pre-eclamptic placentas compared with normal ones ( $P < 0.05$ ), and only in pre-eclamptic placentas, decidual macrophages were found to be Fas ligand (FasL)-positive. *In vitro* studies on the effect of CRH on human macrophages suggested that CRH induced the expression of the FasL protein in human macrophages and potentiated their ability to induce the apoptosis of a Fas-expressing EVT-based hybridoma cell line in co-cultures. These findings demonstrate a possible mechanism by which the aberrant expression of CRH in pre-eclampsia may activate the FasL-positive decidual macrophages, impair the physiological turnover of EVT and eventually disturb placentation.

**Key words:** CRH / FasL / macrophages / EVT / pre-eclampsia

## Introduction

Pre-eclampsia is a multisystem disorder that is unique to human pregnancy. The incidence of pre-eclampsia is 2–10% depending on the population studied and definitions of pre-eclampsia (World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy, 1988). This common disorder is associated with the highest maternal and fetal morbidity and mortality of

all pregnancy complications, with >90% of the most serious outcomes occurring in developing countries (Villar *et al.*, 2003). Despite the widespread occurrence of pre-eclampsia, the underlying cause or causes of the disease remain elusive. Accumulated evidence, however, strongly suggests that the causative agent is the placenta (Redman, 1991).

Several studies have emphasized the importance of trophoblast in the pathophysiology of pre-eclampsia. Increased apoptosis of the

<sup>†</sup>These two authors contributed equally to this work.

extravillous trophoblast (EVT) in the placental bed has been reported in pre-eclampsia (DiFederico et al., 1999). Serum from pre-eclamptic women has been shown to reduce trophoblast viability, and this effect seems to be related to changes in trophoblast sensitivity to Fas-mediated apoptosis (Neale et al., 2003). The Fas/Fas ligand (FasL) system is one of the main apoptotic pathways in cells and tissues (Nagata, 1994). Both villous (Bamberger et al., 1997; Hammer et al., 1999) and EVT cells (Hammer et al., 1999; Kauma et al., 1999) express Fas and/or FasL. The binding of the Fas receptor by FasL results in downstream activation of a cascade of intracellular proteolytic enzymes ending in the apoptosis of the Fas-bearing cell (Aschkenazi et al., 2002). Although a greater incidence of EVT apoptosis has been detected in placentas from pregnancies complicated by pre-eclampsia, the role of Fas/FasL system in the regulation of trophoblast apoptosis and its potential role in the pathophysiology of pre-eclampsia have not been yet fully elucidated.

Besides increased EVT apoptosis, pre-eclampsia is also associated with increased infiltration of activated maternal macrophages around the non-remodeled spiral arteries (Reister et al., 1999) and changes in their distribution pattern. Normally, macrophages are located in the stroma surrounding the EVT and spiral arteries. In pre-eclamptic placentas, however, macrophages have been observed within and around the spiral arteries separating them from the trophoblast cells (Reister et al., 2001; Abrahams et al., 2004). Moreover, in pregnancies complicated by pre-eclampsia, activated macrophages around the spiral arteries have been shown to secrete tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) at levels that lead to the apoptotic death of the invading EVT and therefore prevent them from invading and remodeling the vessels (Reister et al., 2001). However, the cellular interactions and timeline of events during spiral artery remodeling remain still poorly defined. Recently published data suggest that spiral artery remodeling occurs in distinct trophoblast-independent and -dependent stages and provide the first evidence of decidual macrophage involvement in trophoblast-independent stages (Smith et al., 2009).

It is suggested that abnormalities of the placental corticotropin-releasing hormone (CRH) system are implicated in the pathogenesis of pre-eclampsia (Karteris et al., 2003, 2005). The hypothalamic neuropeptide CRH is the principal mediator of the stress response in mammals. Its major role is to orchestrate the integrated stress response by coordinating a series of adaptation homeostatic mechanisms, involving the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Bale and Vale, 2004). Beyond its classical role, increasing evidence suggests a role for CRH in reproductive function. CRH and its type 1 and type 2 receptors (CRH-R1 and CRH-R2) are expressed at the fetomaternal interface (Hillhouse and Grammatopoulos, 2002). A number of autocrine/paracrine roles have been shown so far for placental CRH including the regulation of trophoblast invasion, the placental vasculature, myometrial contractility and onset of labor (Hillhouse and Grammatopoulos, 2002; Kalantaridou et al., 2003; Bamberger et al., 2006). Interestingly, CRH might regulate apoptosis at the fetomaternal site through the regulation of the FasL in trophoblasts and decidual lymphocytes (Makriganakis et al., 2001; Minas et al., 2007). In pre-eclampsia, maternal plasma and cord venous plasma CRH concentrations were found to be significantly elevated compared with normal pregnancies (Goland et al., 1993; Warren et al., 1995; Laatikainen et al., 1991).

In the present study, we tested the hypothesis that aberrantly expressed CRH in pre-eclamptic placentas plays a role in the pathophysiology of excessive trophoblast apoptosis observed in pre-eclampsia via modulating the function of decidual macrophages.

## Materials and Methods

### Placental tissues

Placental tissues were obtained from 16 women who underwent delivery at the First Department of Obstetrics and Gynaecology of the LMU Munich. Specimens were collected immediately after delivery from eight patients with pre-eclampsia (mean date of delivery:  $34 \pm 3.2$  weeks of gestation) and eight gestational age-matched patients (mean date of delivery:  $35.2 \pm 3$  weeks of gestation) following a normal course of pregnancy. Pre-eclampsia was diagnosed according to the following criteria, recommended by the National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP): systolic blood pressure of  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure of  $\geq 90$  mmHg, accompanied by new-onset proteinuria, defined as  $\geq 300$  mg per 24 h (Gifford et al., 2000). Exclusion criteria for both groups included chorioamnionitis, chronic hypertension, chronic renal disease, cardiac disease, connective-tissue disease, pre-existing diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus. The study had the approval of the local ethical committee of the LMU Munich, Germany (No. 158/00), and informed consent from the patient was obtained.

### Cell lines

The cells used for *in vitro* apoptosis experiments are EVT-choriocarcinoma hybrid cells (clone AC1M88) (hereafter hyEVT), which have been described previously (Funayama et al., 1997). The cells were kept in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 supplemented with 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine 200 mM, 1% Penicillin–Streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry on paraffin sections (7  $\mu$ m) of the different specimens was done by incubating the slides in methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) to inhibit endogenous peroxidase activity, followed by washing in phosphate-buffered saline (PBS; 5 min) and treating with goat serum (20 min, 22°C) to reduce non-specific background staining. Incubation with one of the primary antibodies [CRH antibody was obtained from Phoenix Pharmaceuticals, USA, cytokeratin-7 (CK7) antibody was obtained from Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany, M30 antibody was obtained from Axxora, Gruenberg, Germany, and Fas antibody was obtained from Pharmingen, Heidelberg, Germany] was done overnight at 4°C. Sections were then thoroughly incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody (1 h, 22°C) and streptavidin-conjugated peroxidase [45 min, room temperature (RT)]. Between each step, sections were washed with PBS (pH 7.4). Peroxidase staining reaction was done with diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mg/ml; 2 min) and stopped in tap water (10 min). Sections were counterstained in hemalaun (1 min) and then cover-slipped. Control experiments encompassed immunohistochemistry with immunoneutralization of primary antibodies by pre-incubation with the respective peptides. From each section, five digital images were obtained with a 3CCD color camera (JVC, Victor Company of Japan, Japan) and a Leitz (Wetzlar, Germany) microscope.

### In situ nick translation

Staining of DNA fragmentation and apoptotic bodies was performed on frozen tissue slides using the *in situ* nick translation (ISNT) histochemical

assay (Wiest *et al.*, 2005). Slides were incubated with Proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 15 min at RT. After being rinsed with distilled water, endogenous peroxidase was quenched in 0.3% hydrogen peroxide for 10 min. The slides were rinsed in distilled water and then equilibrated in nick buffer (Tris, MgCl,  $\beta$ -mercaptoethanol, bovine serum albumin 20 mg/ml, distilled water) for 10 min at RT. The ISNT was carried out by incubating the slides with deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) and biotinylated 7-dATP diluted in nick buffer for 65 min at 37°C. Chamber slides were rinsed in terminating buffer (0.3 mol/l sodium chloride and 0.03 mol/l sodium citrate) for 15 min at RT. After being washed in PBS, slides were incubated with streptavidin-conjugated peroxidase for 30 min at RT. The development was performed using the 3-amino-9-ethylcarbazole substrate. Slides were subsequently counterstained with hemalaun, washed and mounted. Specificity of ISNT reactivity was confirmed by human epidermis and lymph node. Negative controls were performed by incubation in nick buffer without dNTPs and biotinylated 7-dATP.

### Immunohistochemical evaluation

The intensity and distribution of the specific immunohistochemical staining reaction was evaluated using a semi-quantitative method [immunoreactive score (IRS)] as described previously (Remmele and Stegner, 1987). The IRS was calculated by the multiplication of optical staining intensity (graded as: 0, no; 1, weak; 2, moderate; 3, strong staining) and the percentage of positive stained cells (0, no staining; 1, <10% of the cells; 2, 11–50% of the cells; 3, 51–80% of the cells; 4, >81% of the cells). To evaluate early (M30 cyto-death staining) and late (ISNT) apoptosis, 5–8 sections from each tissue block were examined. Apoptotic and total cytokeratin-positive EVT were counted in randomly selected microscope fields at a magnification of  $\times 400$ . The number of apoptotic EVT was expressed as a percentage of the total number of cytokeratin-positive EVT counted in each slide (at least 300). Each slide was independently evaluated by two investigators.

### Immunofluorescence

Double immunofluorescence was performed as described (Hammer *et al.*, 2001). Briefly, sections were thawed, fixed once more in acetone at RT for 5 min and rehydrated in PBS. After blocking for 10 min with ultraviolet block (Dako, Vienna, Austria), the sections were incubated with the polyclonal rabbit antibody Q20 (anti-human Fas-ligand; Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) for 30 min at RT, followed by an incubation step with a cyanine-2 (Cy2) goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Germany) in a dilution of 1:400. Afterwards, the sections were incubated for 30 min with a phycoerythrin (PE) labeled anti-CD14 mAb (Pharmingen) in a dilution of 1:25. PBS was used for washing sections between different incubation steps. Sections were mounted with Moviol (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA) and analyzed on a confocal laser scanning microscope (Leica SP2, Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany), using the 488-nm laser line for the excitation of Cy2 and the 543-nm laser line for PE. Cy2 staining is colored in green, whereas PE staining is colored in red. In the merged images, co-localization appears yellow. Control experiments encompassed immunofluorescence (i) without primary detection antibodies, (ii) with monoclonal or polyclonal non-immune antibodies as primary antibodies and (iii) without secondary antibodies.

### Isolation of human peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from fresh EDTA-K<sub>3</sub> anti-coagulated peripheral blood samples from healthy non-obese donors by Lymphoprep density centrifugation (Nycomed Pharma AS, Norway) as described previously (Christoforidou *et al.*, 2004). Cells

were washed twice in PBS, resuspended in DMEM (containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin), counted and plated in 24-well plates. After 2 h, non-adherent cells were discarded. The adherent fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) consists of peripheral monocytes/macrophages. Purity of macrophages (above 90%) was confirmed by staining with an anti-CD68 marker (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Macrophage viability was microscopically determined by Trypan blue exclusion. Only samples with  $\geq 90\%$  viable macrophages were used. Cells were subsequently stimulated with CRH (Sigma) at a concentration of  $10^{-8}$  M and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharides (LPS) (serotype 0111:B4, Sigma). For the isolation of PBMCs, we used peripheral venous blood from healthy third-trimester pregnant women not taking any drugs.

### Western blot analysis

Western blot analysis for the detection of FasL and actin was performed as described previously (Dermizaki *et al.*, 2002), using the antibodies anti-FasL (Santa Cruz Biotechnologies) and anti-Actin (MAB1501, Chemicon, USA). Briefly, protein content in the lysates was measured by Bradford Assay. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis sample loading buffer was added in 10  $\mu\text{g}$  of protein from each lysate electrophoresed through a 12% SDS polyacrylamide gel. Protein was transferred to nitrocellulose membranes, using an LKB electroblot transfer system (LKB, Bromma, Sweden). Membranes were processed according to the standard western blotting procedures. To detect protein levels, membranes were incubated with the appropriate antibodies and then exposed to Kodak X-omat AR films. A PC-based Image Analysis was used to quantify the intensity of each band (Image Analysis Inc., Ontario, Canada). To normalize for protein content, the blots were stripped in stripping buffer (62.5 mM Tris–HCl, pH 6.7, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and stained with anti-actin antibody (Chemicon). The concentration of FasL protein in each lysate was normalized versus actin. The analysis was performed three times for macrophages isolated from PBMCs as described previously, before and after stimulation with CRH or *E. coli*-derived LPS.

### Apoptosis assays for *in vitro* experiments

The APOPercentage Apoptosis Assay (Biocolor, Newtownabbey, Northern Ireland) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of AC1M88 cells stained with annexin and propidium iodide (BD Biosciences) were employed. Briefly, hyEVT cells were placed in 24-well plates ( $2 \times 10^4$  cells/well) and cultured for 2–3 days until confluence in DMEM/F12 medium  $\pm 2 \mu\text{g}$  of anti-Fas blocking antibody (SM1/23, ALEXIS Biotechnologies, San Diego, CA, USA). PBMCs were seeded in co-culture inserts ( $2 \times 10^5$ ) (0.2 Anopore membrane, Nunc) with DMEM/F12. After 2 h of culture at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, supernatant and non-adherent cells were discarded and adherent cells (mostly macrophages) were carefully washed. This isolation protocol resulted in greater than 90% purity and viability of macrophages, as revealed by Giemsa staining and anti-CD68 immunocytochemistry. The macrophages were either not pretreated with any additives or pretreated for 24 h with CRH  $\pm$  antalarmin (Tocris, Bristol, UK, and Laboratory of Medicinal Chemistry, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, USA, respectively). Co-cultures were performed by placing the co-culture inserts, containing macrophages within the 24-well plates containing hyEVT cells. The cells were co-cultured for 24 h in the presence of the additives (freshly prepared), which were used for their pretreatment, or in medium alone. Then, the macrophages were discarded and APOPercentage assay was performed according to the manufacturer's instructions (Johnson *et al.*, 2003) or the wells were forcefully rinsed to recover the trophoblasts for annexin-Pi stain and FACS analysis. The latter was performed as previously described (Makrigiannakis *et al.*,

2001) with FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), and the results were analyzed with the FACScan CELLQUEST software. Annexin-positive cells were considered apoptotic. The experiments were performed four times.

### Statistical analysis

The SPSS/PC software package, version 11.01 (SPSS, Munich, Germany), was used for collection, processing and statistical data analysis. Statistical analysis was performed using the non-parametrical Mann–Whitney *U* signed-rank test for comparison of the means. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

## Results

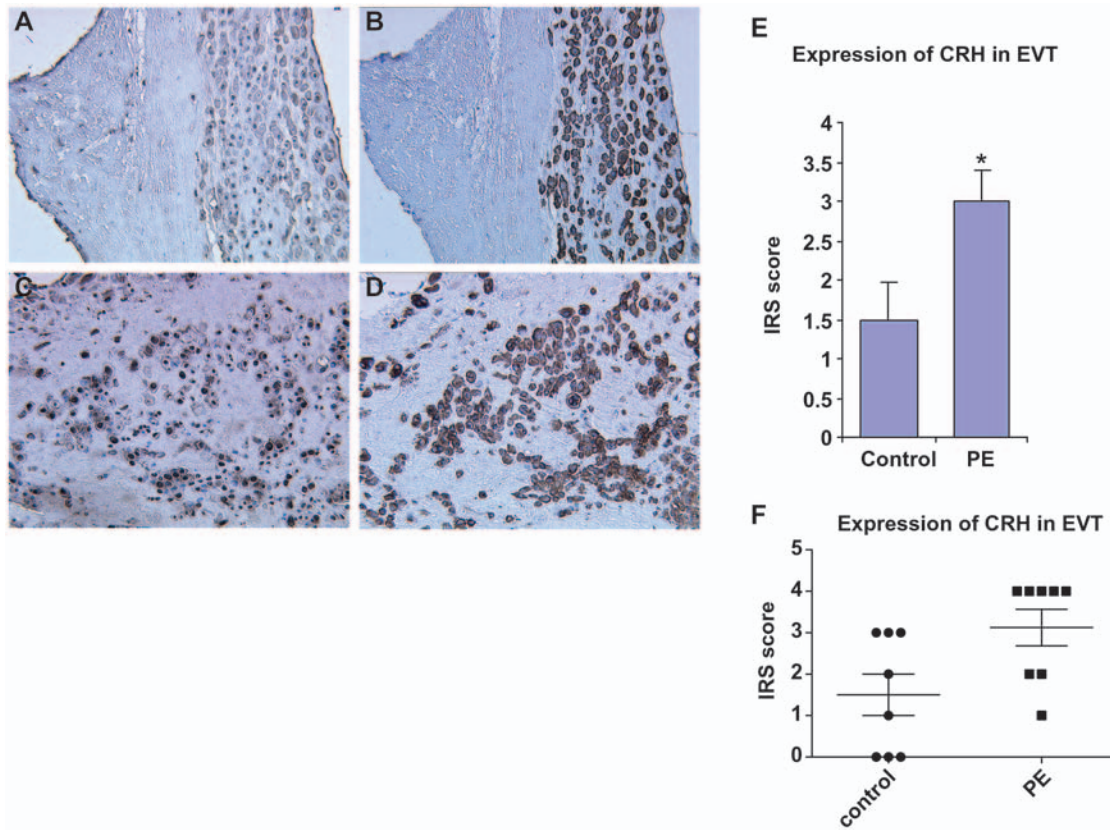
### Expression of CRH protein is up-regulated in pre-eclamptic placentas

Immunohistochemical evaluation of CRH protein expression in the placental bed biopsies from pre-eclamptic (*n* = 8) and normal (*n* = 8) placentas showed that the majority of EVT in pre-eclamptic placentas expressed CRH (Fig. 1C), whereas fewer EVT stained for

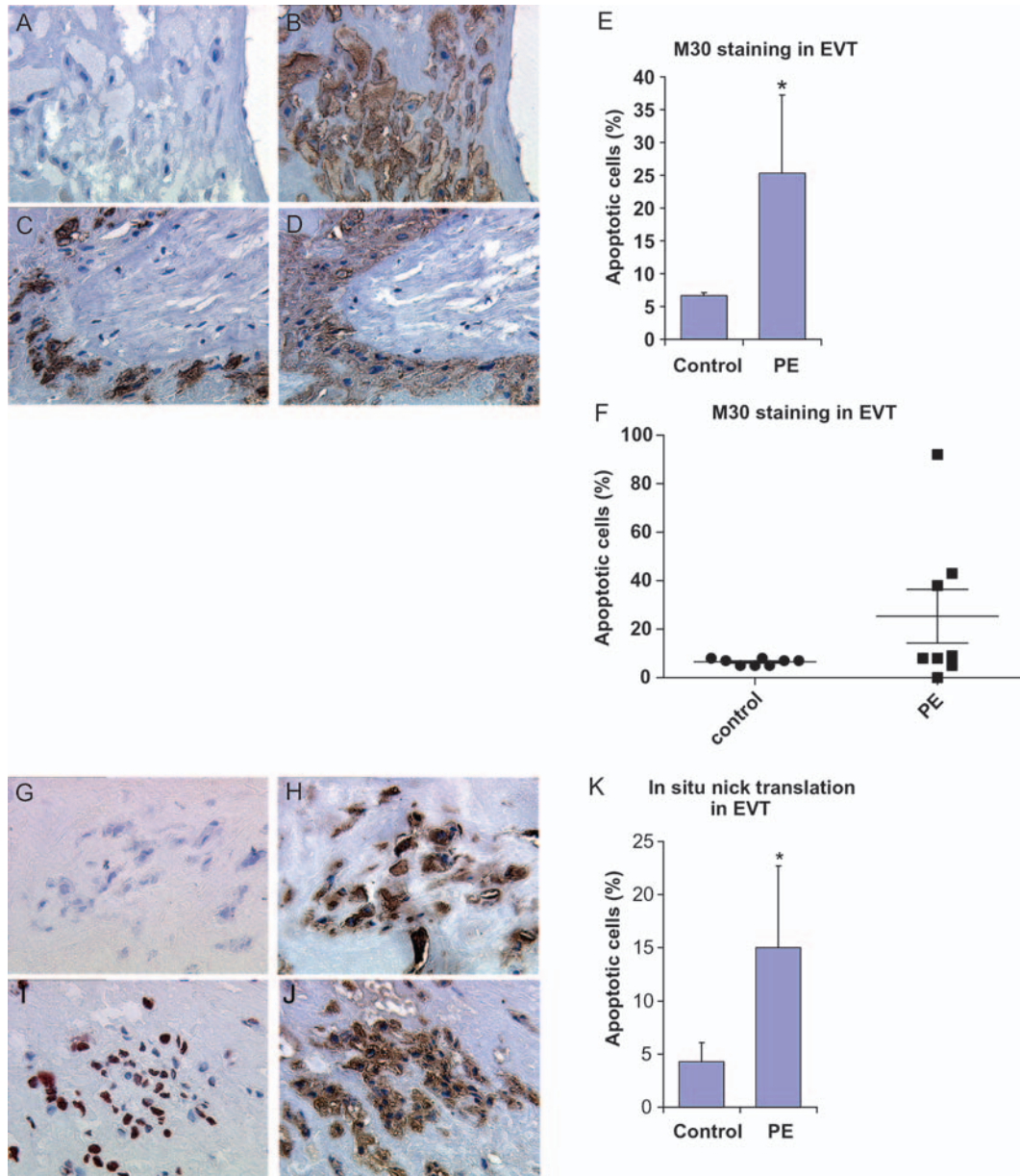
CRH protein in control placentas (Fig. 1A). EVTs were identified as such by labeling of serial sections with anti-CK7 antibody (Fig. 1B and D). IRS scoring revealed a 1.8-fold increase in CRH staining intensity in cases of pre-eclamptic ( $3 \pm 0.4$ ) compared with control ( $1.7 \pm 0.5$ ) placentas (Fig. 1E and F; *P* < 0.05).

### Pre-eclampsia is associated with elevated rates of EVT apoptosis

The rate of early apoptosis evaluated by M30 staining in normal EVT cells was below 10% ( $6.6 \pm 0.5\%$ ) in all control cases (*n* = 8) investigated (Fig. 2A). In pre-eclampsia (*n* = 8), EVT early apoptosis was elevated up to 25% ( $25.4 \pm 11.8\%$ ; Fig. 2C). These results are summarized in Fig. 2E and F (*P* < 0.05). The rate of late apoptosis indicated by ISNT in normal (*n* = 8) EVT cells ranged between 1 and 5% (Fig. 2G). In pre-eclampsia (*n* = 8), EVT late apoptosis was elevated up to 15% (Fig. 2I). These results are summarized in Fig. 2K (*P* < 0.05). To identify EVT cells, CK7 staining was performed on parallel sections (Fig. 2B, D, H and J).



**Figure 1** Immunohistochemical expression of CRH in normal and pre-eclamptic placentas. Representative photos of CRH (A and C) and CK7 (B and D) expression in serial sections in normal (A and B) and pre-eclamptic placenta (C and D). Please note that only a few EVTs were stained for CRH in normal placenta, whereas most of EVTs were strongly positive for CRH in pre-eclamptic placenta ( $\times 100$ ). (E) Staining intensity was determined by the semi-quantitative immunohistochemical IRS. There was a statistically significant increase in CRH expression between normal and pre-eclamptic placentas. Data represent the mean  $\pm$  standard error ( $*P < 0.05$ ). (F) Scattergram of CRH staining intensities in EVT of normal and pre-eclamptic placentas.



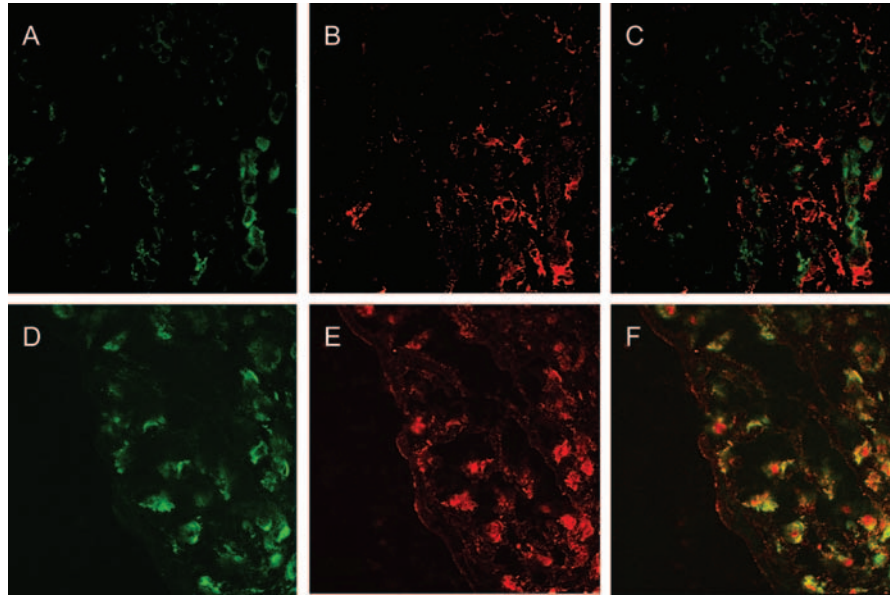
**Figure 2** Detection of EVT early and late apoptosis in normal and pre-eclamptic placentas. Serial sections of the placental bed biopsy specimens from normal (**A, B, G** and **H**) and pre-eclamptic (**C, D, I** and **J**) placentas were stained with antibodies against CK7 (**B, D, H** and **J**) to identify EVT and M30 cyto-death assay (**A** and **C**) to detect early apoptosis or the ISNT assay (**G** and **I**) to detect late apoptosis ( $\times 250$ ). (**E** and **K**) Quantification of apoptotic EVT detected by M30 and ISNT, respectively. A statistically significant increase in apoptotic EVT was observed in pre-eclamptic placentas. Data represent the mean  $\pm$  standard error ( $*P < 0.05$ ). (**F**) Scattergram of apoptotic EVT detected by M30 in normal and pre-eclamptic placentas.

### Pre-eclampsia is associated with expression of FasL in decidual macrophages

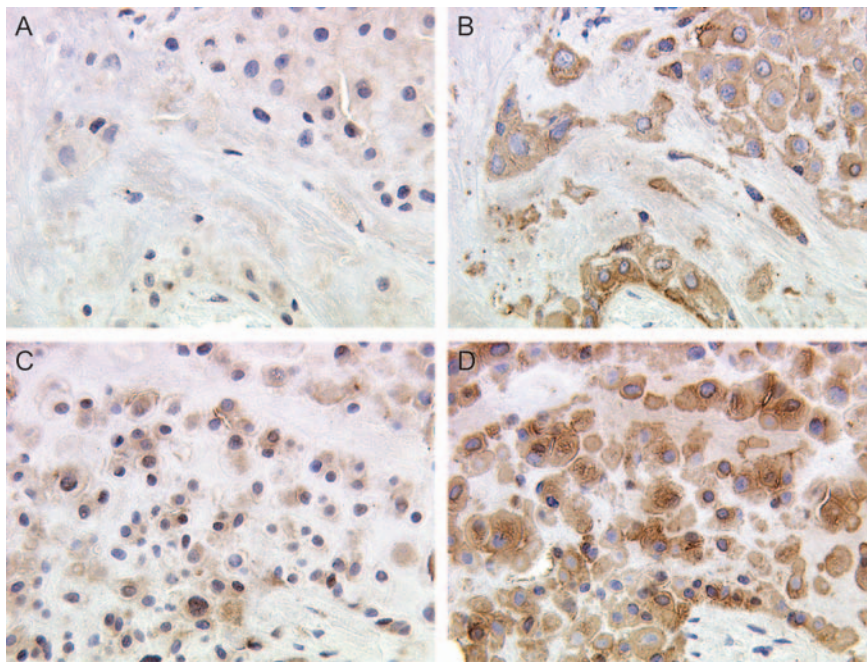
In normal placentas ( $n = 8$ ), decidual macrophages, identified by CD14 staining, did not express FasL protein (Fig. 3A–C). Contrarily, in pre-eclampsia ( $n = 8$ ), deciduas were rich in FasL-positive macrophages (Fig. 3D–F). Furthermore, in pre-eclampsia, T cells and natural killer cells did not express FasL as shown by double staining for FasL and CD3 or CD56 (data not shown).

### Detection of Fas in EVT of normal and pre-eclamptic placentas

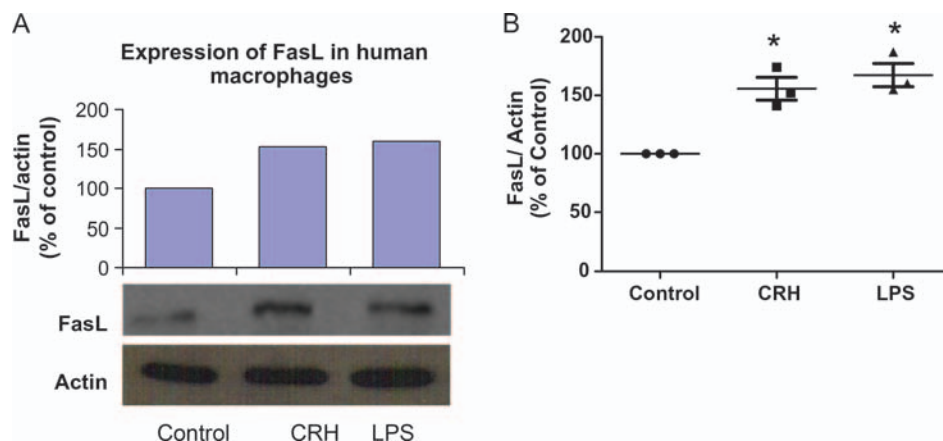
To investigate the expression of Fas in EVT, immunohistochemistry was performed. In both normal ( $n = 8$ ) and pre-eclamptic ( $n = 8$ ) placentas, EVT expressed the Fas peptide (Fig. 4A and C, respectively), with no significant difference in staining intensities. EVTs were identified as such by labeling of serial sections with anti-CK7 antibody (Fig. 4B and D).



**Figure 3** Expression of FasL in normal and pre-eclamptic placentas. (A–F) Representative photos of double immunofluorescence for FasL (green) (A and D) and CD14 (red) (B and E) in normal (A–C) and pre-eclamptic (D–F) placenta. Yellow colored cells representing decidual macrophages expressing FasL were detected only in pre-eclamptic placentas (F) ( $\times 400$ ).



**Figure 4** Expression of Fas in normal and pre-eclamptic placentas. Immunohistochemistry using antibodies against Fas (A and C) and CK7 (B and D) in serial sections of normal (A and B) and pre-eclamptic (C and D) placentas showed Fas expression in EVT in both cases. No statistically significant difference in IRS was observed between normal and pre-eclampsia (data not shown) ( $\times 250$ ).



**Figure 5** Regulation of FasL peptide expression in human macrophages by CRH. **(A)** Incubation of human macrophages for 6 h with CRH significantly increased FasL expression. The effect of CRH was comparable with that of *E. coli*-derived LPS. The bands' staining intensities were normalized versus actin. **(B)** Scattergram of the FasL expression of three independent experiments (\* $P < 0.05$ ).

### CRH up-regulates the expression of FasL protein in human macrophages

To investigate the effect of CRH on FasL expression in human macrophages, western blot was performed. Incubation of human macrophages with  $10^{-8}$  M CRH for 6 h, increased FasL by 1.5-fold compared with control ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ). The effect of CRH was comparable with that of *E. coli*-derived LPS at  $10 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 5A). The results of the FasL expression of three independent experiments are presented in a scattergram (Fig. 5B).

### CRH potentiates the ability of macrophages to induce Fas-mediated apoptosis of hyEVT

All additives were initially tested for their toxic effect on hyEVT cultured alone for 24 h. FACS analysis of annexin-Pi stained cells revealed no toxic effect for any of the additives that were subsequently used in co-cultures of hyEVT with macrophages ( $n = 4$ ; Fig. 6A).

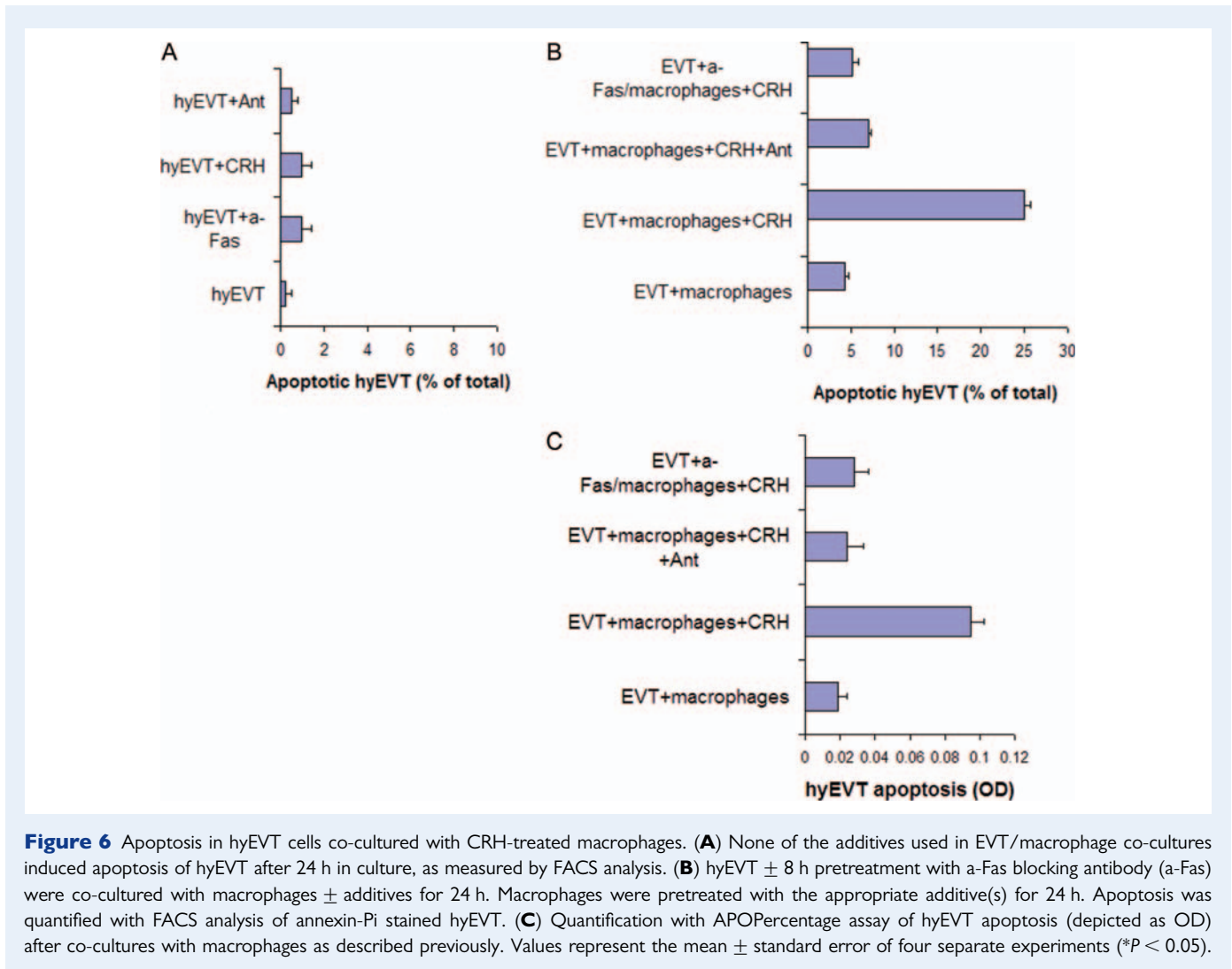
Macrophages pretreated for 24 h with 100 nM CRH and then co-cultured with hyEVT for 24 h in the presence of 100 nM CRH, showed increased apoptotic activity against hyEVT compared with untreated macrophages ( $25 \pm 0.9$  and  $4.3 \pm 1.8\%$  apoptotic hyEVT, respectively). This effect was specifically mediated through CRH-R1 since the addition of antalarmin completely reversed it. Eight-hour pretreatment of hyEVT with  $2 \mu\text{g/ml}$  of anti-Fas blocking antibody and subsequent co-culture with CRH-treated macrophages in the presence of anti-Fas and 100 nM CRH reduced hyEVT apoptosis to the levels observed in co-cultures with untreated macrophages ( $5.2 \pm 1.8\%$  apoptotic hyEVT). Similar results were obtained from both apoptosis methods applied, i.e. FACS analysis of annexin-Pi stained cells ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 6B) and APOPercentage method ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 6C).

## Discussion

In this study, we have found that pre-eclampsia is associated with the up-regulation of CRH in EVT from affected pregnancies, a significant

increase in FasL-positive maternal macrophages, the expression of Fas peptide in EVT and the increased apoptosis of EVT *in situ*. Furthermore, we examined the possible pathway by which CRH accomplishes its role in the pathogenesis of pre-eclampsia. Our data show that CRH stimulated the expression of FasL in human macrophages, thereby potentiating their ability to induce the apoptosis of the Fas-expressing EVT-based hybridoma cell line. This effect of CRH appeared to be specifically mediated through its type I receptor (CRH-R1), since the addition of the appropriate antagonist, antalarmin, completely reversed it. Blocking of Fas receptor in hyEVT also significantly reduced the levels of hyEVT apoptosis in co-cultures with macrophages. Our findings underlie the potential role of the 'CRH-macrophage-Fas/FasL triad' in the pathogenesis of pre-eclampsia.

In recent years, CRH has been found to serve a number of functions outside the classic neuroendocrine domain. Its roles in female reproductive physiology and pathophysiology are gradually being clarified (Makrigiannakis *et al.*, 2006; Kalantaridou *et al.*, 2007). Abnormally increased maternal plasma CRH has been reported by various groups in pregnancies complicated by pre-eclampsia (Petraglia *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 2000). Additionally, in patients with pre-eclampsia, the mean umbilical cord plasma CRH and the concentration of circulating CRH mRNA were shown to be significantly higher (Goland *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 2003). The vasodilatory response of CRH in the human fetal-placental circulation (Clifton *et al.*, 1994) led Florio *et al.* (2002) to suggest that in pre-eclampsia, the placenta takes part in a stress syndrome by releasing CRH, which may help to influence uterine perfusion, thereby protecting the fetus from a hostile environment. The compensatory increase in CRH secretion from human placental tissues in maternal pathologic stress conditions is reinforced by McLean *et al.* These authors suggest that placental CRH activates a number of potentially useful adaptive responses for the stressed fetus. These include the acceleration of fetal organ maturation, maximization of placental blood flow and the early initiation of labor when fetal survival is threatened (McLean and Smith, 1999).



Contrarily to the above findings, we propose here a possible detrimental role for CRH in the pathogenesis of pre-eclampsia. Our *in vitro* data show that CRH can induce the expression of FasL in human macrophages which in turn induce the apoptosis of EVT. That suggests that in pre-eclamptic placentas, the heightened sensitivity of trophoblast cells to apoptosis may be due in part to the CRH-induced alterations in the Fas–FasL system. Our results also show that EVT might be responsible themselves for the increased expression of placental CRH in pre-eclampsia. These findings raise the question whether this deranged secretion of CRH is part of the primary pathophysiology of pre-eclampsia, i.e. whether it has a detrimental effect in placentation which occurs in first and mid-trimester or occurs as a secondary response to the increased vascular resistance later on. Our placental tissues were obtained at around 34 weeks of gestation. It would be impossible to perform similar experiments in 18-week placentas, the time when spiral artery remodeling completes, as we would not be able to follow-up their fate, in terms of whether the patients developed pre-eclampsia or not. However, considering the data of Leung et al. (2000), who showed elevated plasma CRH in mid-trimester in patients who went on to develop pre-eclampsia later, we suggest

that there might be a potential causative link between a deranged CRH system and pre-eclampsia as a result of defected placentation.

Further detrimental role of CRH in pre-eclampsia has been suggested by Karteris et al. (2003), who proposed that the dampening of CRH-induced vasodilation in pre-eclamptic pregnancies could be attributable to the reduced expression of CRH receptors (CRH-Rs) probably seen due to chronic exposure to elevated levels of placental CRH. Furthermore, according to Karteris et al. in the pre-eclampsia, down-regulation of CRH-Rs can lead to diminished regulation of the nitric oxide–cyclic guanosine 3,5-monophosphate (NO/cGMP) pathway, which appears to be one of the signaling pathways mediating CRH actions during pregnancy. The impaired NO/cGMP pathway may contribute in the disturbance of the balance controlling vascular tone in fetoplacental circulation toward vasoconstriction and the clinical sequelae of pre-eclampsia (Karteris et al., 2005).

Regarding the pathogenesis of pre-eclampsia an old hypothesis claims that this pregnancy-specific disorder is associated with a generalized impairment of trophoblast invasion. According to DiFederico et al. (1999), widespread apoptosis of EVT might explain the insufficient/shallow interstitial and endovascular trophoblast invasion



observed in pre-eclamptic pregnancies. Contrarily, a study by [Kadyrov et al. \(2003\)](#) suggests that the reduced trophoblast invasiveness in pre-eclampsia cannot be explained by higher rates of apoptosis as the apoptosis index found in pre-eclampsia is even lower than in normal pregnancy with normal invasiveness. However, the same group in a more recent study reported an increased frequency of apoptosis of intramural and endovascular trophoblast in pre-eclamptic placentas. They proposed that this may account for the reduced invasion of spiral arteries from pregnancies complicated by early-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction ([Kadyrov et al., 2006](#)). As no consensus exists at present in the literature, our current study establishes that pre-eclampsia is associated with elevated levels of early and late apoptosis evaluated by M30 immunohistochemistry and ISNT, respectively. By confirming elevated rates of apoptotic death in pre-eclamptic placental tissues with M30 immunohistochemistry, we postulate that the overestimation of apoptotic events has been avoided as necrosis leading to DNA breakdown and false-positive ISNT staining does not result in CK18 cleavage and M30 positivity ([Sakagami et al., 1999](#)).

In pre-eclampsia, the concept of excessive apoptosis as a mechanism to limit trophoblast invasion into the walls of spiral arteries raises the possibility of apoptosis-promoting signals derived from maternal cells. [Reister et al.](#) described activated maternal macrophages in close vicinity to spiral arteries of the placental bed that are capable of inducing trophoblast apoptosis. Induction of apoptosis was achieved by the concerted action of the secretion of TNF- $\alpha$  that binds to the trophoblastic TNF type-I receptor and the secretion of indolamine 2,3-dioxygenase that catabolizes and depletes the local levels of tryptophan ([Reister et al., 2001](#)). However, [Renaud et al. \(2005\)](#) recently suggested that during pre-eclampsia, the abnormal increase in macrophage infiltration around spiral arteries hampers trophoblast invasion and vascular remodeling through a non-apoptotic mechanism. According to this group, the aberrant presence of activated macrophages around uterine vessels may contribute to inadequate trophoblast invasion and remodeling of the uterine spiral arteries by inducing the secretion of plasminogen activator inhibitor I and inhibiting the pro-urokinase plasminogen activator-associated caseinolytic activity through TNF- $\alpha$  secretion ([Renaud et al., 2005](#)). Interestingly, our results show for the first time that in pre-eclampsia, decidual macrophages become strongly positive for FasL, a ligand which is known to induce apoptosis in Fas-expressing EVT ([Minas et al., 2007](#)).

Previous studies of our group have shown a possible direct role for CRH in the pathophysiology of clinical conditions associated with defective placentation ([Bamberger et al., 2006](#); [Minas et al., 2007](#)). Our present data enlighten its possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. *In vitro*, CRH stimulated the expression of FasL in macrophages, thereby potentiating their ability to induce the apoptosis of Fas-bearing EVT cells. Relevance of these data needs very cautious interpretation as peripheral blood-derived macrophages may be significantly different from their uterine counterparts. However, most macrophage functions, including cell-surface marker expression, were shown to be unchanged when decidual and peripheral blood-derived macrophages were co-cultured with trophoblasts ([Rozner et al., 2011](#)). Recently published data suggest that the Fas/FasL pathway can be employed by macrophages to induce vascular smooth muscle cell apoptosis ([Imanishi et al., 2002](#)). Furthermore,

during normal pregnancy, macrophages together with trophoblast cells may induce Fas-mediated apoptosis in endothelial and vascular smooth muscle cells to promote spiral artery transformation ([Keogh et al., 2004](#); [Ashton et al., 2005](#)). In pregnancies complicated with pre-eclampsia, however, [Mor and Abrahams \(2003\)](#) proposed that activated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  which induce the apoptosis of EVT. Studies of this group indicate that enhanced levels of pro-inflammatory macrophage products increase Fas expression and enhance trophoblast sensitivity to Fas-mediated apoptosis ([Aschkenazi et al., 2002](#)). This suggests a differential role for macrophages in trophoblast invasion and spiral artery transformation according to their activation status. Whereas, in normal pregnancies, macrophages function as support cells by facilitating transformation of the spiral arteries, in pre-eclampsia, macrophages act as barrier to trophoblast invasion by inducing trophoblast apoptosis, thereby preventing spiral artery transformation ([Mor and Abrahams, 2003](#)). Finally, we tried to confirm our *in situ* findings with a functional mechanism *in vitro*. We, therefore, used a co-culture system to test the hypothesis that CRH-induced expression of FasL in macrophages potentiates the ability of these cells to induce the apoptosis of EVT. Co-cultures of macrophages with a Fas-expressing EVT-based hybridoma cell line, revealed higher rates of apoptosis in hyEVT when co-cultures were performed in the continuous presence of CRH. Our data suggest that in pre-eclampsia, CRH exerts immunomodulatory effects acting on macrophages at the fetomaternal interface. The ability of CRH to modulate the function of immune cells has been reported previously ([Angioni et al., 1993](#); [Tsatsanis et al., 2006](#)). It is suggested that in contrast to its systemic indirect immunosuppressive effects through the HPA axis, CRH produced locally at inflammation sites acts as a potent autocrine and/or paracrine pro-inflammatory cytokine ([Karalis et al., 1991](#)). Recently, [Agelaki et al. \(2002\)](#) suggested that CRH signals play a crucial role in augmenting pro-inflammatory cytokine production by macrophages. In accord with these observations, we propose here that in pre-eclampsia, CRH potentiates the cytotoxic effect of macrophages both directly through the up-regulation of FasL and indirectly through the production of macrophage-derived pro-inflammatory cytokines, suggesting that CRH controls a complex crosstalk between macrophages and EVT facilitating both cell-to-cell interaction and paracrine actions.

Taken together our findings of CRH up-regulation in pre-eclamptic placentas *in situ*, the presence of FasL-positive decidual macrophages in pre-eclampsia and the ability of CRH to induce the expression of FasL in human macrophages suggest that the immunomodulatory role of peripheral CRH may disrupt trophoblast invasion and remodeling of spiral arteries predisposing to placental dysfunction associated with later appearance of pre-eclampsia. Determining the mechanisms that control early placentation may have implications for therapeutic intervention in pregnancy complications associated with defective placentation such as pre-eclampsia.

## Acknowledgements

We thank Dr AM Bamberger, University Hospital Eppendorf, Hamburg, for kindly providing us the hybridoma EVT cell line.

## Authors' roles

G.P. and U.J. participated in the study design, did the data analysis and interpretation and wrote the manuscript. D.U.R. and A.H. processed the placental bed biopsy specimens and performed the immunohistochemical evaluation. V.M., S.K. and B.T. contributed to the review of the manuscript. C.T. performed the isolation of PBMCs and western blot analysis. K.F. and A.M. designed the study and reviewed the intellectual content of the manuscript.

## Funding

This work was supported by a grant from General Secretariat for Research and Technology, Greece (PENED 2003, 03ED626).

## Conflict of interest

None declared.

## References

- Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004;**51**:275–282.
- Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris A. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages *in vitro* and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 2002;**70**:6068–6074.
- Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, Cossarizza A, Franceschi C, Muscettola M, Genazzani AD, Surico N, Genazzani AR. Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 1993; **53**:1735–1742.
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002;**66**:1853–1861.
- Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:102–108.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;**44**:525–557.
- Bamberger AM, Schulte HM, Thuncke I, Erdmann I, Bamberger CM, Asa SL. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:3173–3175.
- Bamberger AM, Minas V, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Loning T, Charalampopoulos I, Brummer J, Wagener C, Bamberger CM et al. Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 2006;**168**:141–150.
- Christoforidou AV, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C. Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. *Mol Cancer* 2004;**3**:34.
- Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Boura AL, Robinson PJ, Smith R. Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;**79**:666–669.
- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002;**277**:12280–12287.
- DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 1999;**155**:293–301.
- Florio P, Severi FM, Ciarmela P, Fiore G, Calonaci G, Merola A, De Felice C, Palumbo M, Petraglia F. Placental stress factors and maternal-fetal adaptive response: the corticotropin-releasing factor family. *Endocrine* 2002;**19**:91–102.
- Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Fuzesi L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG. 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* 1997; **10**:191–201.
- Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D, Roberts JM, Sibai BM, Taler SJ. Report of the National High Blood Pressure Education Programme Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;**183**:S1–S22.
- Goland RS, Jozak S, Warren WB, Conwell IM, Stark RI, Tropper PJ. Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**:1174–1179.
- Hammer A, Blaschitz A, Daxböck C, Walcher W, Dohr G. Fas and Fas ligand are expressed in the uteroplacental unit of first-trimester pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1999;**41**:41–51.
- Hammer A, Desoye G, Dohr G, Sattler W, Malle E. Myeloperoxidase-dependent generation of hypochlorite-modified proteins in human placental tissues during normal pregnancy. *Lab Invest* 2001;**81**:543–554.
- Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Role of stress peptides during human pregnancy and labour. *Reproduction* 2002;**124**:323–329.
- Imanishi T, Han DKM, Hofstra L, Hano T, Nishio I, Liles WC, Gorden AM, Schwartz SM. Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from monocytes/macrophage. *Atherosclerosis* 2002; **161**:143–151.
- Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, Misler S, Edlund H, Polonsky KS. Increased islet apoptosis in Pdx1 +/- mice. *J Clin Invest* 2003;**111**:1147–1160.
- Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kaufmann P, Huppertz B. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 2003;**24**:540–548.
- Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;**194**:557–563.
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Mastorakos G, Chrousos GP. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **997**:129–135.
- Kalantaridou S, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Peripheral corticotropin-releasing hormone is produced in the immune and reproductive systems: actions, potential roles and clinical implications. *Front Biosci* 2007;**12**:572–580.
- Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone *in vivo*. *Science* 1991;**254**:421–423.
- Karteris E, Goumenou A, Koumantakis E, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Reduced expression of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 alpha in human preeclamptic and growth-restricted placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:363–370.
- Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. 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* 2005;**90**:3680–3687.
- Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:2188–2194.
- Keogh RJ, Whitley GS, Harris LK, Baker PN, Aplin JD, Cartwright J. Trophoblast induction of smooth muscle cell apoptosis. *Placenta* 2004;**25**:A62.
- Laatikainen T, Virtanen T, Kaaja R, Salminen-Lappalainen K. Corticotropin-releasing hormone in maternal and cord plasma in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;**39**:19–24.
- Leung TN, Chung TK, Madsen G, Lam CW, Lam PK, Walters WA, Smith R. Analysis of mid-trimester corticotrophin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations for predicting pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000;**15**:1813–1818.
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2001;**2**:1018–1024.
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2006;**17**:178–185.
- McLean M, Smith R. Corticotropin-releasing hormone in human pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol Metab* 1999;**10**:174–178.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, 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. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:663–673.
- Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;**1**:119.
- Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1994;**57**:129–144.
- Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;**13**:39–44.
- Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem* 2003;**49**:727–731.
- Petraglia F, Florio P, Benedetto C, Gallo C, Woods RJ, Genazzani AR, Lowry PJ. 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* 1996;**81**:852–856.
- Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991;**12**:301–308.
- Reister F, Frank HG, Heyl W, Kosanke G, Huppertz B, Schroder W, Kaufmann P, Rath W. The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta* 1999;**20**:229–233.
- Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001;**81**:1143–1152.
- Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987;**8**:138–140.
- Renaud SJ, Postovit LM, Macdonald-Goodfellow SK, McDonald GT, Caldwell JD, Graham CH. Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness *in vitro*. *Biol Reprod* 2005;**73**:237–243.
- Rozner AE, Dambaeva SV, Drenzek JG, Durning M, Golos TG. Modulation of cytokine and chemokine secretions in rhesus monkey trophoblast co-culture with decidual but not peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Am J Reprod Immunol* 2011;**66**:115–127.
- Sakagami H, Kusama K, Toguchi M, Kochi M. Induction of non-apoptotic cell death by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate in a human salivary gland tumor cell line. *Anticancer Res* 1999;**19**:4045–4048.
- Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009;**174**:1959–1971.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. 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* 2006;**176**:1869–1877.
- Villar K, Say L, Gulmezoglu AM, Merialdi M, Lindheimer MD, Betran AP, Piaggio G. Eclampsia and preeclampsia: a health problem for 2000 years. In: Critchley H, MacLean AB, Poston L, Walker JJ (eds). *Preeclampsia*. London: RCOG Press, 2003, 189–207.
- Warren WB, Gurewitsch ED, Goland RS. Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenal hormones in pregnancies complicated by chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1995;**172**:661–666.
- Wiest I, Seliger C, Walzel H, Friese K, Jeschke U. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-I. *Anticancer Res* 2005;**25**:1575–1580.
- World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988;**158**:80–83.