ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια: **ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ Ε1 ΚΑΙ Ε2 ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ

ΤΣΕΛΕΚΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ…

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας της καθηγήτριας κας Ειρήνη Αθανασάκη στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2009-2010.

Θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην καθηγήτριά μου Ειρήνη Αθανασάκη που με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω μέλος του εργαστηρίου της. Επίσης να την ευχαριστήσω θερμά γιατί ήταν πάντα δίπλα μου αφιερώνοντας μου τον πολύτιμο χρόνο της σε ότι τη χρειαζόμουν και ήταν πάντα χαμογελαστή και φιλική από την πρώτη στιγμή.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με συμβούλευαν, μου πρόσφεραν τη βοήθεια τους απλόχερα όποτε τη χρειαζόμουν και μου έλυναν τις απορίες μου.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τις φίλες και συμφοιτήτριες μου Πηνελόπη, Χρυσούλα και Μαργαρίτα που φρόντισαν έτσι ώστε τα φοιτητικά μου χρόνια να μου μείνουν αξέχαστα.

Τέλος τις θερμότερες ευχαριστίες τις οφείλω στους γονείς μου και τον Νίκο που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν σε οποιαδήποτε απόφαση μου καθώς είναι και πολύτιμοι συμπαραστάτες αλλά και οδηγητές για μια ζωή γνώσεων, εμπειριών και συναισθημάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ενδομητρίωση……6
1.2 Ενδομητρίωση και υπογονιμότητα……8
1.3 Ανοσολογία της ενδομητρίωσης……..10
1.4 Η λεβοκαρνιτίνη (L-καρνιτίνη)…….....15
1.5 Προσταγλανδίνες (PGs)……....18
1.6 Προσταγλανδίνες και Ενδομητρίωση……..20
1.7 Σκοπός της εργασίας……..21

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα……...24
2.2 Απομόνωση ορού αίματος, ιστών και περιτοναϊκού υγρού……25
2.3 Συλλογή περιτοναϊκού υγρού από ποντίκι……26
2.4 Εξωτερικός Ανοσοφθορισμός…….....27
2.5 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA)……29
2.6 Πάγωμα μήτρας και σπλήνας……...32
2.7 Ζελατίνωση αντικειμενοφόρων πλακών……32
2.8 Κρυοτομές……33
2.9 Ανοσοϊστοχημική και ιστολογική ανάλυση……34

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 In vivo επίδραση της καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 και καρνιτίνης με αναστολείς προσταγλανδινών Ε1 και Ε2……36
3.1.1 Συνολικά επίπεδα ανίχνευσης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στον ορό του αίματος ποντικιών μετά τη χορήγηση καρνιτίνης, αναστολέων προσταγλανδίνης Ε1και Ε2 και της

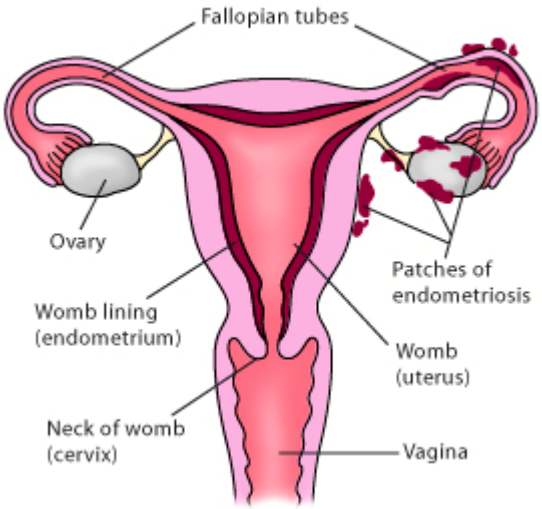
συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης και αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2……36
3.1.2 Συνολικά επίπεδα ανίχνευσης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό ποντικιών μετά τη χορήγηση καρνιτίνης, αναστολέων προσταγλανδίνης Ε1και Ε2 και της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης και αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2……45
3.2 Ενδοκυτταρική έκφραση Cd11b, Ly5, Thy, CD4, CD8 σε κύτταρα περιτοναϊκού υγρού για κάθε ομάδα ποντικιών……51
3.3 Ποσοστά φθορισμού……69
3.4 Ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές μήτρας……..70

4. <u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>……72

5. <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>……78

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ



Η ενδομητρίωση ορίζεται ως η παρουσία λειτουργικού ενδομητρίου (ιστός που επενδύει το εσωτερικό της κοιλότητας της μήτρας), έξω από αυτή την κοιλότητα της μήτρας. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του ενδομητριακού ιστού σε άλλες περιοχές του σώματος, σε έκτοπες θέσεις. Είναι δηλαδή η ύπαρξη ενός φυσιολογικού ιστού σε μη φυσιολογικές θέσεις. Οι θέσεις στις οποίες αναπτύσσεται πιο συχνά ο ενδομητριακός ιστός είναι η πυελική περιοχή όπως για παράδειγμα οι ωοθήκες, οι σάλπιγγες και το τοίχωμα της μήτρας. Βέβαια πιο σπάνια εμφανίζεται και σε άλλες περιοχές όπως στην ουροδόχο κύστη, στο έντερο αλλά και στους πνεύμονες.

Ο ενδομητριακός ιστός στις έκτοπες θέσεις ανταποκρίνεται στις ωοθηκικές ορμόνες οπότε κατά τη διάρκεια της περιόδου μιας γυναίκας με ενδομητρίωση ο ιστός αυτός αποπίπτει όπως και το φυσιολογικό ενδομήτριο χωρίς όμως να βρίσκει διέξοδο, με αποτέλεσμα την εσωτερική αιμορραγία και τη φλεγμονή των γύρω περιοχών.

Σχετικά με την αιτιολογία και το μοριακό μηχανισμό για την ανάπτυξη αυτής της ασθένειας δεν υπάρχουν ξεκάθαρες απαντήσεις παρόλο που η ενδομητρίωση έχει περιγραφεί από παλιά(1882). Πάντως, ένας μεγάλος αριθμός εργαστηριακών και κλινικών μελετών, προτείνει ότι κληρονομικοί παράγοντες, σε συσχέτιση με το περιβάλλον, ευθύνονται για αυτή τη γυναικολογική ανωμαλία. Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορες θεωρίες για την ιστογένεση αυτής της αινιγματικής διαταραχής.

- **Θεωρία της εμφύτευσης:** Κύτταρα του ενδομητριωτικού ιστού που βρίσκονται στο αίμα της έμμηνης ρύσης, διέρχονται από τις σάλπιγγες και εμφυτεύονται στις ωοθήκες, στις περιοχές της περιτοναϊκής κοιλότητας. Στην ανάπτυξη της ενδομητρίωσης συμβάλλει κάθε εμπόδιο στην ελεύθερη ροή του αίματος της περιόδου όπως για παράδειγμα η στένωση τραχήλου.

- **Θεωρία της μετάπλασης ή σχηματισμός ενδομητρίωσης in situ:** Υποστηρίζεται ότι το περιτοναϊκό μεσοθήλιο έχει πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία μπορούν να διεγερθούν και να μεταπλαστούν σε λειτουργικό ενδοθήλιο. Η διέγερση μπορεί να γίνει από το αίμα της έμμηνου ρύσεως, που παλινδρομεί, ή από τη ρήξη ενός ώριμου ωοθυλάκιου και τη διασπορά του περιεχομένου του στο περιτόναιο.

- **Θεωρία του Sampson:** Το αίμα της έμμηνης ρύσης ρέει ανάποδα κάποιες φορές προς την πύελο μέσω των σαλπίγγων και έτσι ζώντα στοιχεία του ενδομητρίου (στρώμα και ενδομητριακοί αδένες) βρίσκονται μέσα στην κοιλιακή χώρα και ειδικότερα στην πύελο της γυναίκας. Τα στοιχεία αυτά προσκολλώνται στα τοιχώματα των διαφόρων οργάνων (σάλπιγγες, ωοθήκες, ουροδόχος κύστη) εμφυτεύονται, τροφοδοτούνται με αίμα και μετατρέπονται σε ενεργές εστίες ενδομητρίωσης, οι οποίες και αιμορραγούν κάθε φορά που η γυναίκα έχει έμμηνο ρύση, ακριβώς γιατί συμπεριφέρεται όπως και το κανονικό ενδομήτριο.

Βέβαια υπάρχουν και πιο σύγχρονες απόψεις σχετικά με την αιτιολογία και την παθογένεια της ενδομητρίωσης. Μερικές από αυτές είναι οι εξής:

- **Θεωρία της ανοσολογίας:** Ενδομητριωτικά κύτταρα που απομακρύνονται από τη φυσιολογική τους θέση, θα μπορούσαν να εμφυτευθούν σε έκτοπη θέση, με αποτέλεσμα την ενδομητρίωση, μόνο σε γυναίκες με μια συγκεκριμένη ελαττωμένη ανοσία. Δίνεται η εντύπωση λοιπόν ότι σε κάποιες γυναίκες υπάρχει ένα 'αδύναμο' ανοσοποιητικό σύστημα. Η ύπαρξη αυξημένου αριθμού ενεργοποιημένων μακροφάγων στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση και η ανεύρεση σημαντικά υψηλότερων τιμών ορισμένων στοιχείων του συμπληρώματος στο περιτοναϊκό υγρό και στον ορό γυναικών με ενδομητρίωση ενισχύουν την άποψη της εμπλοκής του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεια της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα πολλών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, που εκκρίνονται από κύτταρα του ενδομητρίου και του ανοσοποιητικού συστήματος, επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση, οδηγώντας στην ανάπτυξη έκτοπου ενδομητριώματος **[1].** Επίσης σημαντική είναι και η ανικανότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να μεσολαβήσουν στην απομάκρυνση των ενδομητριακών κυττάρων.

- **Θεωρία της κληρονομικότητας:** Ορισμένες οικογένειες μπορεί να φέρουν παράγοντες προδιάθεσης οι οποίοι οδηγούν στην ενδομητρίωση **[2]**.

1.2 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενδομητρίωση είναι μια σοβαρή παθολογική κατάσταση που προσβάλλει τις γυναίκες στην αναπαραγωγική τους ηλικία. Προκαλεί έντονο πόνο και είναι αποδεκτό πλέον ότι σχετίζεται με την υπογονιμότητα. Εκτιμάται ότι το 30-71% υπογόνιμων γυναικών έχουν ενδομητρίωση και μεταξύ των γυναικών με ενδομητρίωση το 30-50% είναι υπογόνιμες **[3]**. Δεν είναι ακόμη γνωστό κατά πόσο τα προβλήματα γονιμότητας σε γυναίκες με ενδομητρίωση οφείλονται άμεσα στην παρουσία της ασθένειας, ή κατά πόσο εμπλέκονται άλλοι παράγοντες στη σχέση γονιμότητας και ενδομητρίωσης. Γεγονός είναι ότι η ενδομητρίωση φαίνεται να επιδρά με διαφορετικούς μηχανισμούς στη φυσιολογία της σύλληψης **[4]**.

Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η ενδομητρίωση επηρεάζει τη γονιμότητα.

- Διαταραχές ωοθηλακιορρηξίας
    1. Ανωοθυλακιορρηξία
    2. Διαταραχή ανάπτυξης ωοθυλακίου **[5]**
    3. Μεταβολή της φύσης του ωαρίου
- Μεταβολές στη μεταφορά ωαρίου πριν ή μετά από τη γονιμοποίησή του **[6-8]**
    1. Παρεμπόδιση φυσιολογικής μεταφοράς ωαρίου από την ωοθήκη στη μήτρα.
    2. Ανικανότητα κροσσών σάλπιγγας να προσλάβουν τα ώριμα ωάρια.
- Διαταραχές στη γονιμοποίηση
    1. Φαγοκυττάρωση σπερματοζωαρίων
    2. Παρεμπόδιση διείσδυσης σπερματοζωαρίων στο ωάριο
- Διαταραχές στη φάση της εμφύτευσης **[9]**, εμπλεκόμενη στις απαραίτητες προϋποθέσεις για μια επιτυχή εμφύτευση, που είναι:
    1. Ο απόλυτος συγχρονισμός της εξέλιξης του προεμφυτευτικού εμβρύου σε βλαστοκύστη και της διαφοροποίησης μιας περιοχής του ενδομητρίου κατάλληλης για εμφύτευση.
    2. Η ορμονική προετοιμασία της μήτρας και εκκριτική δραστηριότητα του ενδομητρίου και του εμβρύου.
    3. Η αυξημένη αγγειογένεση και αιμάτωση της περιοχής.
    4. Η αυστηρά ρυθμιζόμενη διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης στο ενδοθήλιο του ενδομητρίου.
    5. Η τοπική μείωση των ανοσολογικών μηχανισμών.

Όπως αναφέρθηκε, η ενδομητρίωση επεμβαίνει σε διάφορα βήματα της όλης διαδικασίας της γονιμότητας. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί δύο μηχανισμοί, που ο καθένας ξεχωριστά ερμηνεύει πολλές από τις διαταραχές της γονιμότητας, οι οποίες παρατηρούνται σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά τις προσταγλανδίνες, ενώ ο δεύτερος σχετίζεται με τα μακροφάγα και τα παράγωγά τους.

Σχετικά με τον πρώτο μηχανισμό, έχει παρατηρηθεί ότι οι προσταγλανδίνες έχουν αυξημένα επίπεδα σε γυναίκες με ενδομητρίωση και ασκούν πολλές και διαφορετικές δράσεις στο γυναικείο γεννητικό σύστημα **[10]**.

Πιο συγκεκριμένα, οι προσταγλανδίνες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ωοθυλακιορρηξία όσο και στην ωχρινόλυση, αλλά και στην κινητικότητα των σαλπίγγων και στη συσταλτικότητα της μήτρας. Επίσης συμμετέχουν και στη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού κατά την ανάπτυξη του έκτοπου ενδομητρίου. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι λειτουργίες αυτές από κάθε πιθανή αλλαγή στην παραγωγή και στη σχέση των προσταγλανδινών. Τέλος, οι προσταγλανδίνες έχουν ενοχοποιηθεί για την παθολογική ωορρηξία, τις διαταραχές της εκκριτικής φάσης και άλλες ενδοκρινικές μεταβολές που παρατηρούνται σε γυναίκες με ενδομητρίωση.

Σχετικά με το δεύτερο μηχανισμό, αυξημένος αριθμός ενεργοποιημένων, δηλαδή ώριμων, μακροφάγων καθώς και τα παράγωγα τους έχουν βρεθεί στο περιτοναϊκό υγρό και στο υγρό των σαλπίγγων υπογόνιμων γυναικών με ενδομητρίωση. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν στο περιβάλλον τους ουσίες (κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες), οι οποίες μπορούν πιθανόν να ασκήσουν βλαπτική επίδραση σε διάφορες τοπικές φυσιολογικές λειτουργίες, που σχετίζονται με την αναπαραγωγή **[11]**.

Το φαινόμενο της υπογονιμότητας, μπορεί να λυθεί με την εφαρμογή υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, μέσω της οποίας βελτιώνεται σημαντικά η πιθανότητα σύλληψης και τεκνοποίησης στις γυναίκες αυτές. Οι δύο βασικές θεραπείες που εφαρμόζονται είναι η σπερματέγχυση σε συνδυασμό με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

1.3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΧΕΤΙΚΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.

Οι κυτταροκίνες και οι αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες είναι διαλυτές ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτείνες μικρού μοριακού βάρους οι οποίες είναι είτε μεμβρανικές είτε εκκρίνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον από λεμφοκύτταρα (Β και Τ), μακροφάγα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Για παράδειγμα, οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα T_H βοηθητικά κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των Β, των T_C και των φυσικών φονιάδων (NK) κυττάρων, καθώς και των μακροφάγων, των κοκκιοκυττάρων και των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, δραστηριοποιώντας έτσι ένα ολόκληρο δίκτυο αλληλεπιδρώντων κυττάρων.

Οι κυτταροκίνες χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες του πλειοτροπισμού, του πλεονασμού, της συνέργειας, του ανταγωνισμού και της επαγωγής φαινομένων ενίσχυσης, οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα ρύθμισης της κυτταρικής δραστηριότητας με ένα συντεταγμένο και διαδραστικό τρόπο. Μπορούν να αλλάξουν τη συμπεριφορά του ίδιου του κυττάρου που τις εκκρίνει αλλά και άλλων κυττάρων. Επίσης ουσιαστική λειτουργία τους είναι και ο συντονισμός της λειτουργίας πολλών διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, συμβάλλουν στην ωρίμανση των κυττάρων, στη διαφοροποίηση τους, στον πολλαπλασιασμό τους, στην μεταστροφή της τάξης των ανοσοσφαιρινών (εάν το κύτταρο στόχος είναι ένα Β λεμφοκύτταρο), στη διέγερση της διαδικασίας της απόπτωσης, στην συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής, καθώς και στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των δραστικών τους μηχανισμών. Μερικές από αυτές αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων, συμμετέχουν στην εξουδετέρωση του κυττάρου στόχου και έχουν αντιιϊκή και αντιβακτηριδιακή δράση. Τέλος οι κυτταροκίνες

συμμετέχουν στην εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδοθήλιο της μήτρας, καθώς και στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Παρ' όλα αυτά αν και γνωρίζουμε ότι οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες προστατεύουν τον οργανισμό από την προσβολή παθογόνων, έχουν και τη δυνατότητα να κατευθύνουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να καταστρέφουν υγιή κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούν αυτοάνοσες ασθένειες όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενδομητρίωση κ.α.

Το περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση περιέχει πολλά μακροφάγα. Τα μακροφάγα αυτά ίσως είναι υπεύθυνα για την παραγωγή υψηλών προ-φλεγμονωδών (TNF-a, IL-2, IL-6, IL-8) και αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor), που παρατηρούνται γενικά σε ασθενείς, μολονότι ακόμη και οι εστίες ενδομητρίωσης παράγουν κυτταροκίνες.

Πολλές κυτταροκίνες αναφέρονται ως ιντερλευκίνες, με βάση την ιδιότητά τους ότι παράγονται από διάφορα λευκοκύτταρα και δρουν σε άλλα λευκοκύτταρα. Συγκεκριμένα, κυτταροκίνες που εμφανίζονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση, είναι οι εξής **[12-15]**:

- **Ιντερλευκίνες** (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13)

Οι ιντερλευκίνες εμπλέκονται σε περιπτώσεις φλεγμονής καθώς και στην ανοσολογική απόκριση. Όλες οι παραπάνω ιντερλευκίνες βρίσκονται αυξημένες σε ασθενείς με ενδομητρίωση, αλλά τα επίπεδα της αύξησης σχετίζονται με το στάδιο της ασθένειας.

Πιο συγκεκριμένα, η IL-2 εκκρίνεται από τα Τ κύτταρα, είναι αυξητικός παράγοντας των Τ κυττάρων και διεγείρει την αύξηση, την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων και την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων. Στον ορό ασθενών με ενδομητρίωση εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένη συγκριτικά με τις υγιείς γυναίκες. Η δράση της IL-2 μπορεί να είναι είτε αυτοκρινής είτε εξωκρινής. Δηλαδή, η IL-2 είτε παράγεται και

χρησιμοποιείται μέσω ειδικού υποδοχέα από το ίδιο το κύτταρο, είτε παράγεται και προσδένεται στον υποδοχέα γειτονικού κυττάρου ή μέσω της κυκλοφορίας μεταφέρεται σε πιο μακρινό κύτταρο ώστε να επηρεάσει και να μεταβάλει την εκάστοτε κυτταρική κατάσταση.

Η IL-4 εκκρίνεται από τα T_H2 και τα ιστιοκύτταρα και είναι αυξητικός παράγοντας των Β κυττάρων και προάγει την αύξηση και την ανάπτυξη των Β και Τ κυττάρων και των κυττάρων της μονοκυτταρικής σειράς, επίσης επηρεάζει κύτταρα εκτός του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών. Η IL-4 φαίνεται να βρίσκεται στα ίδια επίπεδα μεταξύ ασθενών με ενδομητρίωση και υγιών.

- **TNF-a** (παράγοντας νέκρωσης όγκων-α)

Ο TNF-a εκκρίνεται από τα μακροφάγα και είναι ισχυρός ρυθμιστής φλεγμονωδών και ανοσοποιητικών λειτουργιών. Είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την αύξηση και τη διαφοροποίηση ευρείας ποικιλίας κυτταρικών τύπων και ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα. Επίσης, προκαλεί επαγωγή θανάτου σε πολλούς τύπους μετασχηματισμένων κυττάρων. Τέλος, διευκολύνει την προσκόλληση των ενδομητριακών κυττάρων στο περιτοναϊκό μεσοθήλιο.

- **IFN-γ** (ιντερφερόνη-γ)

Η IFN-γ είναι μια ανοσολογική ιντερφερόνη τύπου 2 και παράγοντας ενεργοποίησης μακροφάγων καθώς και ιντερφερόνη Τ κυττάρων. Εκκρίνεται από τα $CD8^+$, τα T_H2 και τα NK κύτταρα. Επηρεάζει την ενεργοποίηση, την αύξηση και τη διαφοροποίηση των Τ κυττάρων, των Β κυττάρων, των μακροφάγων και των NK κυττάρων. Αυξάνει την έκφραση των MHC μορίων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και έχει ασθενή αντιιϊκή και ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό. Επίσης δρα σε συνεργασία με τον TNF-a και φαίνεται να εμπλέκεται στην εξέλιξη αυτοάνοσων ασθενειών.

- **RANTES** (Regulated on Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted)

Η RANTES είναι κυττοκίνη της ‘CC’ οικογένειας χημειοκινών και παράγοντας ρυθμιζόμενος από τη διέγερση, εκφραζόμενος και εκκρινόμενος από τα φυσιολογικά Τ λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα. Σε φυσιολογικό ενδομήτριο εντοπίζεται σαν συστατικό του στρώματος και εκκρίνεται μετά από επαγωγή από TNF-a και IFN-γ. Η παραγωγή RANTES φαίνεται πιο αυξημένη σε κύτταρα που προέρχονται από το ενδομητρίωμα.

Οι αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες που εμφανίζονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση, είναι οι εξής:

- **GM-CSF**

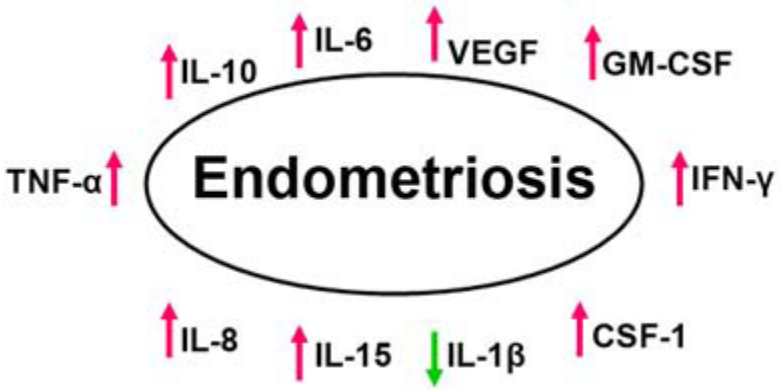
Ο GM-CSF είναι ένας παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων/ μακροφάγων. Εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα Τ λεμφοκύτταρα και είναι ένας αυξητικός παράγοντας προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και παράγοντας διαφοροποίησης των κοκκιοκυτταρικών και μονοκυτταρικών σειρών. Επιπλέον συμβάλει στην ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρίου και στη στειρότητα που επάγεται από την ασθένεια.

- **IGF-1**

Ο IGF-1 είναι ένας αυξητικός παράγοντας με αγγειογενετικές ιδιότητες που είναι υπεύθυνος για καταστάσεις φλεγμονής **[16]** καθώς και για την ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρίου, γι’ αυτό και βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε ασθενείς με ενδομητρίωση **[17-19]**

- **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο VGEF είναι ένας από τους πιο ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες. Εμφανίζεται σε υψηλή συγκέντρωση σε ασθενείς με ενδομητρίωση, λόγω του ότι παρατηρείται σημαντική δημιουργία νέων αγγείων σε νεοσχηματιζόμενα εμφυτεύματα **[20-21]**.



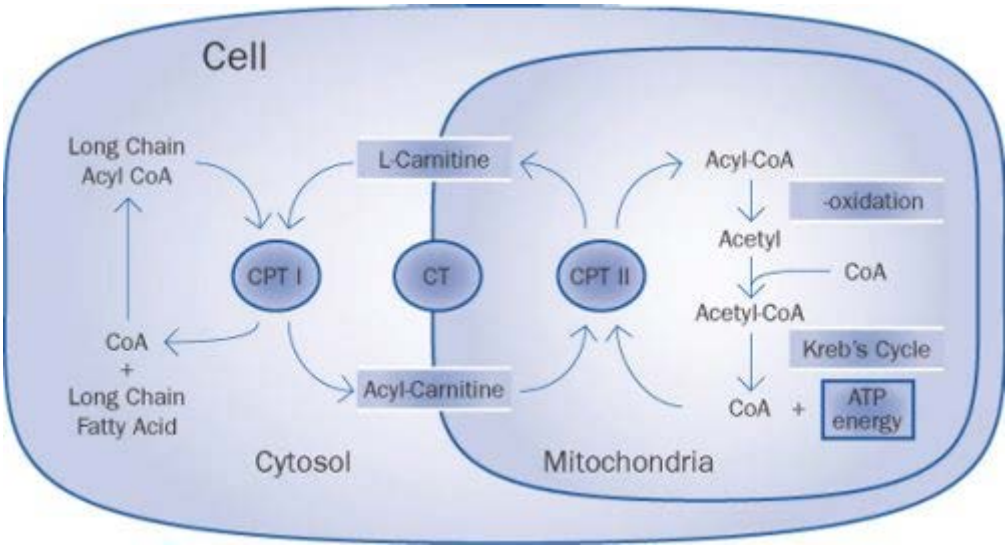
Εικόνα 1.1 Αλλαγές αυξητικών παραγόντων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της ενδομητρίωσης.

1.4 ΛΕΒΟΚΑΡΝΙΤΙΝΗ (L-CARNITINE)

Η καρνιτίνη (3' – hydroxyl – 4- N – trimethylammoniobutanoate) είναι μια υδατοδιαλυτή τεταρτοταγή αμίνη. Προέρχεται από τη διατροφή και ένα μέρος της συντίθεται στο ήπαρ και στα νεφρά από τα αμινοξέα λυσίνη και μεθειονίνη, παρουσία των κατάλληλων υποστρωμάτων, συμπαραγόντων και της βιταμίνης C. Βρίσκεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών και ο ρόλος της στα βιολογικά συστήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τις κυτταρικές λειτουργίες. Βέβαια μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες γιατί στους μύες η ανάγκη για μεταβολισμό των λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερη. Εμφανίζεται και στα βιολογικά υγρά σε υψηλή συγκέντρωση, ως ελεύθερη καρνιτίνη και ως άκυλο-καρνιτίνη η οποία είναι μεταβολικό προϊόν των αντιδράσεων που χρησιμοποιούν άκυλο-συνένζυμο Α (άκυλο-CoA) καταλυόμενες από άκυλο-τρανσφεράσες καρνιτίνης. Μερικές από τις φυσιολογικές λειτουργίες της καρνιτίνης είναι οι εξής:

1. Οξείδωση μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας
2. Ενεργοποίηση αερόβιας γλυκόλυσης : διέγερση του συμπλόκου της πυρουβικής αφυδρογονάσης
3. Ενίσχυση της αναπνευστικής αλυσίδας
4. Ρύθμιση της μιτοχονδριακής αναλογίας ακυλο- CoA / CoA
5. Σύστημα καθαρισμού ακυλο-ομάδων
6. Οξείδωση υπεροξειδοσωματικών λιπαρών οξέων
7. Ενδοκυτταρική επικοινωνία
8. Μεταβολισμός διακλαδισμένων αμινοξέων
9. Μεμβρανική ισορροπία
10. Αντιοξειδωτική δράση
11. Δότης ακετυλο- ομάδων για βιοσύνθεση (π.χ. ακετυλοχολίνη)

Η καλύτερα μελετημένη λειτουργία της καρνιτίνης είναι η συμβολή της στη β-οξείδωση των επιμηκών λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα, όταν καταβολίζονται, ενεργοποιούνται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και στη συνέχεια οξειδώνονται στη μιτοχονδριακή μήτρα **[22-23]**. Τα επιμήκη μόρια ακυλο-CoA όμως, δεν είναι σε θέση να διαπεράσουν την εσωτερική μεμβράνη οπότε διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με τη βοήθεια της καρνιτίνης. Η ακυλομάδα μεταφέρεται από τα άτομα του θείου του CoA στην υδροξυλική ομάδα της καρνιτίνης για τον σχηματισμό της ακυλοκαρνιτίνης, αντίδραση που καταλύεται από την ακυλομεταφοράση I (CAT), η οποία εντοπίζεται στην πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης προς το κυτταροδιάλυμα. Η ακυλο- καρνιτίνη μεταφέρεται από μια μετατοπάση διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ακυλομάδα μεταφέρεται στο CoA, στην εσωτερική μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας, αντίδραση η οποία καταλύεται από την ακυλομεταφοράση II της καρνιτίνης. Πρόκειται για μια ευνοούμενη θερμοδυναμικά αντίδραση εφόσον ο δεσμός Ο-άκυλο της καρνιτίνης έχει υψηλό δυναμικό μεταφοράς ομάδας. Τελικά, η καρνιτίνη επιστρέφει στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της μετατοπάσης, σε ανταλλαγή με την εισερχόμενη ακυλο- καρνιτίνη.



Εικόνα 1.2: Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζεται η μεταφορά των λιπαρών οξέων μέσω της L-Carnitine, από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια για την οξείδωση και την ενεργειακή παραγωγή (π.χ. ATP).

Γενικότερα, διαταραχές στην συγκέντρωση της καρνιτίνης ή κάποια βλάβη στα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις που προαναφέρθηκαν είναι σε θέση να κλονίσουν την κανονική οξείδωση των επιμηκών λιπαρών οξέων και αυτό συμβαίνει σε περιπτώσεις όπως είναι η εγκυμοσύνη, η ασιτία, η έντονη φυσική άσκηση και ο διαβήτης.

Επίσης διαφοροποίηση εντοπίζεται ανάλογα με την ηλικία και το φύλο. Συγκεκριμένα σε βρέφη και θηλυκά άτομα εμφανίζεται πολύ πιο χαμηλή συγκέντρωση. Σημαντικές είναι και οι μελέτες για την κατάσταση της καρνιτίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παρουσιάζεται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ενώ επανέρχεται στα κανονικά επίπεδα μετά τον τοκετό.

1.5 ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ (PGs)

Οι προσταγλανδίνες είναι ενώσεις που ανήκουν στα εικοσανοειδή, θεωρούνται μια ομάδα από λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Είναι υδροξυλιωμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα με αλυσίδες από 20 άτομα C και έναν διπλό δεσμό μεταξύ C_8 και C_{12}. Φέρουν επίσης δακτύλιο κυκλοπεντανίου και δυο πλάγιες αλυσίδες.**[24]** Παράγονται από το αραχιδονικό οξύ (20:4) μέσω της δράσης της κυκλοξυγενάσης (COX-2) και σημαντικός παράγοντας για την βιοσύνθεσή τους είναι η πυκνότητα του κυττάρου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Άλλα ερεθίσματα που μπορεί να προκαλέσουν τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών μπορεί να είναι μηχανικά, νευρικά, ορμονικά και παθολογικά μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης α, η οποία διασπά τα λιπαρά οξέα.

Οι προσταγλανδίνες είναι μεσολαβητές, δηλαδή ενώσεις που δρουν μέσω μεμβρανικών υποδοχέων σαν 'τοπικές ορμόνες' στο άμεσο περιβάλλον τους εξαιτίας της γρήγορης αποικοδόμησης τους και συμμετέχουν σε όλες τις φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, δρουν τοπικά, όπου βιοσυντίθενται, είτε στη θέση παραγωγής τους (αυτοκρινής δράση) είτε σε γειτονικά κύτταρα (παρακρινή δράση).

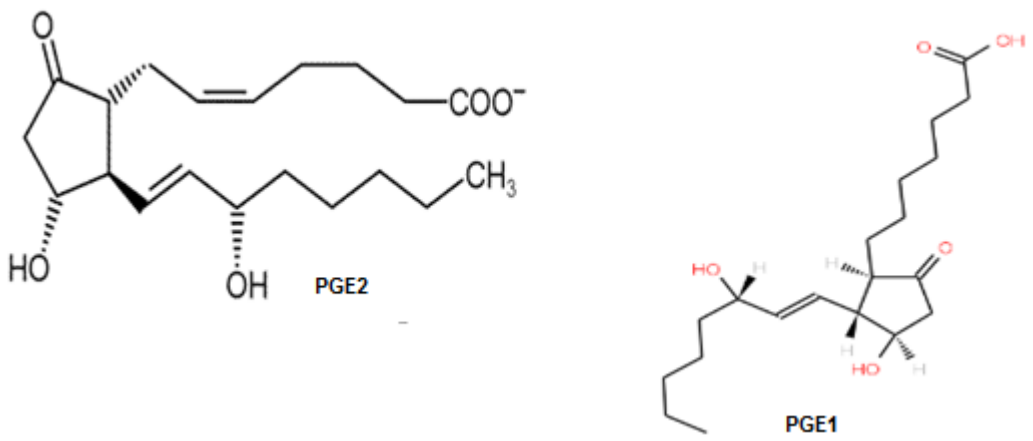
Επιπλέον, μειώνουν την διαφοροποίηση των κυττάρων, εμποδίζουν την απόπτωση, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και προκαλούν την αγγειογένεση μέσω αυξητικών παραγόντων.**[25-26]**

Οι προσταγλανδίνες, επίσης, επηρεάζουν την εμφύτευση του εμβρύου. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η αύξηση της συσπαστικότητας της μήτρας με αποτέλεσμα την αποβολή του εμβρύου. Τα υψηλά επίπεδα προσταγλανδινών στο περιτοναϊκό υγρό συσχετίστηκαν με επιδράσεις στην ωοθυλακιορρηξία, καθώς και με αύξηση της κινητικότητας των ωαγωγών, ώστε το έμβρυο να φθάνει στη μητριαία κοιλότητα σε μη κατάλληλο χρόνο για εμφύτευση.**[27-28]**

Η έκκριση των προσταγλανδινών από τη μήτρα και την ωοθήκη είναι κυκλική και εξαρτάται από την έκκριση των στεροειδών ορμονών. Η σύνθεση τους διεγείρεται από τη συνδυασμένη επίδραση οιστραδιόλης- προγεστερόνης,

αλλά τα υψηλότερα επίπεδα των προσταγλανδινών παρατηρούνται όταν οι τιμές τις προγεστερόνης είναι υψηλές. Πιθανόν, η προγεστερόνη να προκαλεί σύνθεση και αποθήκευση προσταγλανδινών και στο ενδομήτριο και στον έκτοπο ενδομητριακό ιστό.

Οι κυριότερες ομάδες των προσταγλανδινών είναι οι E, F, A, B και D. Στον ανθρώπινο οργανισμό η προσταγλανδίνη E_1 συντίθεται από το διομο- γ-λινολεϊκό οξύ, ενώ η προσταγλανδίνη E_2 συντίθεται από το αραχιδονικό οξύ. Οι προσταγλανδίνες E1 (PGE1) και οι προσταγλανδίνες E2 (PGE2) συμμετέχουν ενεργά στις φλεγμονώδεις, καθώς και στις αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις με άμεσες ή έμμεσες επιπτώσεις στην ανοσολογική απόκριση, στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στην αναγέννηση των νεύρων και στην αγγειακή διαστολή των κυττάρων. Αποτελούν δεύτερο μήνυμα υδρόφιλων ορμονών και εμπλέκονται στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών στην έκκριση συστατικών από τα κύτταρα. Επηρεάζουν το μεταβολισμό των οστών, το αυτόνομο νευρικό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα και την κυτταρική κίνηση. Τέλος προκαλούν συσσώρευση των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων και φέρουν πολύ δραστικά σήματα πόνου για τους αντίστοιχους υποδοχείς.



Εικόνα 1.3. Προσταγλανδίνες E1 και E2.

1.6 Προσταγλανδίνες και Ενδομητρίωση

Τα οιστρογόνα παράγονται σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ιστών συμπεριλαμβανομένων της ωοθήκης, του πλακούντα, του λιπώδους ιστού, του δέρματος και του εγκεφάλου. Η αρωματάση είναι το ένζυμο-κλειδί που ρυθμίζει την παραγωγή των οιστρογόνων σε αυτούς τους ιστούς. Ενεργότητα της αρωματάσης δεν εντοπίζεται σε φυσιολογικό ενδομήτριο σε αντίθεση με την περίπτωση της ενδομητρίωσης που η έκφρασή της είναι αρκετά μεγάλη. Όταν ενδομητριακά κύτταρα μεταναστεύουν στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα μέσω ανάστροφης εμμηνορρυσίας για παράδειγμά, δημιουργούν φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί σε εκθετική αύξηση της ενεργότητας της αρωματάσης και κατά συνέπεια σε παραγωγή οιστρογόνων.**[29-31]**

Η ενεργοποίησης της αρωματάσης γίνεται υπό την επίδραση της προσταγλανδίνης Ε2.**[32]**Αυτό συνεπάγεται την τοπική παραγωγή οιστρογόνων που με τη σειρά τους επάγουν την παραγωγή PGE2, δημιουργώντας έτσι ένα θετικό επανατροφοδοτικό μηχανισμό για τη συνεχή παραγωγή οιστρογόνων και PGE2 στην περιοχή οδηγώντας έτσι στον πολλαπλασιασμό των ενδομητιακών κυττάρων και στην εμφάνιση των φλεγμονωδών χαρακτηριστικών της ενδομητρίωσης.**[33]**

Ταυτόχρονα η επαγωγή της αρωματάσης φαίνεται να προκαλείται από μετατροπές σε διάφορους άλλους μοριακούς μηχανισμούς που μπορεί να βοηθούν την ανάπτυξη ενδομητρίωσης όπως η μη φυσιολογική έκφραση ενζύμων με επουλωτική δράση ιστών ή των αναστολέων τους ή κυτοκινών όπως IL-6, RANTES ή και αυξητικών παραγόντων όπως EGF.**[34]**

1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ενδομητρίωση αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους λόγους ύπαρξης υπογονιμότητας σε γυναίκες. Τα ποσοστά εμφάνισης της ενδομητρίωσης ακολουθούν διεθνώς ανοδική πορεία. Υπολογίζεται ότι με την αύξηση του πληθυσμού και λόγω του ότι η θεραπεία της ενδομητρίωσης είναι πολύ δύσκολη, τα ποσοστά αυτά θα αυξάνονται συνεχώς.

Καθώς οι κλινικές μελέτες στις γυναίκες με ενδομητρίωση δεν επαρκούν αλλά και η ετερογένεια στη συμπτωματολογία και στο ανοσολογικό προφίλ της εκάστοτε ασθενούς δυσχεραίνουν την εξαγωγή ασφαλών και γενικευμένων συμπερασμάτων, ο σχεδιασμός ενός πειραματικού μοντέλου ενδομητρίωσης στα ποντίκια είναι επιτακτικός στόχος. Με τη βοήθεια ενός τέτοιου πειραματικού μοντέλου, η επίδραση της ενδομητρίωσης στη γυναικεία γονιμότητα αλλά κ ο ρόλος διαφόρων παραγόντων όπως η καρνιτίνη και οι αναστολείς των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 θα μπορούσαν να διαλευκανθούν στο εργαστήριο.

Το αναγκαίο αυτό πειραματικό μοντέλο, δημιουργήθηκε σε προηγούμενη έρευνα για πρώτη φορά στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Με αυτό το πειραματικό μοντέλο γινόταν επαγωγή πειραματικής ενδομητρίωσης σε ποντίκι μετά από την επίδραση της L-καρνιτίνης.

Γνωρίζαμε από προηγούμενες έρευνες ότι η L-καρνιτίνη επάγει τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης δρώντας και μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών. Σκοπός, λοιπόν, της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να δούμε κατά πόσο οι αναστολείς των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 σε συνδυασμένη δράση με την L- καρνιτίνη ή και μόνοι τους οι αναστολείς καταστέλλουν τη δράση της καρνιτίνης ή έχουν κάποια επίδραση στα πειραματόζωα και κατ' επέκταση στα συμπτώματα της ενδομητρίωσης.

Με πειράματα in vivo και in vitro προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τις αλλαγές στο κυτταροκινικό και λεμφοκυτταρικό προφίλ, στον ορό του αίματος και στο

περιτοναϊκό υγρό, που επέφερε η χορήγηση L-καρνιτίνης και οι αναστολείς των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 στα πειραματόζωα μας. Επίσης παρατηρήσαμε μακροσκοπικά τις αλλαγές στην μορφολογία της μήτρας των πειραματόζωων καθώς και της μορφολογίας των κυττάρων της μήτρας στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρήση χρωστικών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χειρισμός πειραματόζωων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια BALB/cJ από το ζωοτροφείο του πανεπιστημίου Κρήτης. Τα ποντίκια εκτρέφονται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-25°C), υγρασίας (~50%) και φωτοπερίοδο με 12 ώρες φως (από 6.30π.μ. έως 18.30μ.μ.) και 12 ώρες σκοτάδι.

Σε 5 διαφορετικές ομάδες των 3 BALB/cJ θηλυκών ποντικιών ενέθηκε ενδοπεριτοναϊκά με τη χρήση σύριγγας του 1ml:

-Ομάδα 1: L-carnitine, από stock 25mg/ml χορηγήθηκαν 100μl για 7 μέρες συνεχόμενα.

-Ομάδα 2: L-carnitine, από stock 50mg/ml χορηγήθηκαν 50μl καθώς και 50 μl του παράγοντα 11 deoxymprostaglandin E_1, από stock 6μg/ml για 7 μέρες συνεχόμενα.

-Ομάδα 3: L-carnitine, από stock 50mg/ml χορηγήθηκαν 50μl καθώς και 50 μl του παράγοντα 17-phenyl trimor prostaglandin E_2, από stock 6μg/ml για 7 μέρες συνεχόμενα.

-Ομάδα 4: Παράγοντας 11 deoxymprostaglandin E_1, από stock 3μg/ml χορηγήθηκαν 100μl για 7 μέρες συνεχόμενα.

-Ομάδα 5: Παράγοντας 17-phenyl trimor prostaglandin E_2, από stock 3μg/ml χορηγήθηκαν 100μl για 7 μέρες συνεχόμενα.

Την επόμενη μέρα της τελευταίας ένεσης τα 5 ποντίκια καθώς και ένα untreated ποντίκι θυσιάστηκαν και συλλέχθηκε ο ορός του αίματος. Το πείραμα αυτό διεξάχθηκε 3 φορές.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω παράγοντες:

- Λεβοκαρνιτίνη : Levocarnitine inner salt (Sigma, USA) μοριακού βάρους M.B.=161.2 σε συγκέντρωση 100μl/mouse από stock 25mg/ml.
- 17-phenyl trimor prostaglandin E_2 (selective agonist for EP_1 and EP_2) : Χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 10^{-6}M. (Caynan chemical company)
- 11 deoxy prostaglandin E_1 (selective agonist for EP_2): Χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 10^{-6}M. (Caynan chemical company)

2.2 Απομόνωση ορού αίματος, ιστών και περιτοναϊκών υγρών

α) Ποντικίσιοι οροί αίματος: Για τη συλλογή του ορού, το αίμα αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 30 λεπτά και στη συνέχεια στους 4°C για άλλα 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 3-4 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους -4°C.

β) Ιστοί: Μήτρες και σπλήνες ποντικιών απομονώθηκαν από φυσιολογικά ποντίκια (untreated-control) καθώς και από τα ποντίκια των κάθε ομάδων.

γ) Ποντικίσια περιτοναϊκά υγρά: Από τα ποντίκια των ίδιων ομάδων έγινε και η συλλογή περιτοναϊκών υγρών από τα οποία έγινε διαχωρισμός των κυττάρων που περιέχονταν σε αυτά με φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6 λεπτά.

2.3 Συλλογή περιτοναϊκού υγρού από ποντίκι

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Πιπέτες Pasteur
- Tubes 15ml και 50ml
- Σύριγγες των 10ml

Διαλύματα:

- PBS 1x

Διαδικασία:

Θυσιάζουμε τα ποντίκια και τα καρφιτσώνουμε από τα άκρα σε σταθερό μέρος ώστε να τα ακινητοποιήσουμε. Με αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία, ψαλίδι και λαβίδα, σηκώνουμε το δέρμα έτσι ώστε να αποκαλυφθεί το περιτόναιο.

Σε μια σύριγγα των 10ml βάζουμε 5ml PBS 1x το οποίο στη συνέχεια το αδειάζουμε μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα, κρατώντας κάθετη τη σύριγγα. Χρειάζεται προσοχή ώστε να μην τρυπηθεί το περιτόναιο σε άλλο σημείο. Στη θέση αυτή περνάμε μια λαβίδα στο κάτω μέρος (πλάτη) του ζώου και το χτυπάμε ελαφρά.

Κρατώντας το σημείο που έχουμε τρυπήσει (ανοίγουμε και άλλο την τρύπα αν χρειαστεί) τοποθετούμε εκεί μια πιπέτα Pasteur ώστε να απορροφήσουμε τα 5ml διαλύματος που ενέθηκαν αρχικά. Συλλέγουμε όσο περισσότερο υλικό μπορούμε το οποίο αποτελεί το περιτοναϊκό υγρό του ποντικού.

Κατόπιν, για καλύτερο ξέπλυμα και συλλογή μεγαλύτερου αριθμού περιτοναϊκών κυττάρων επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία άλλες 2 φορές, βάζοντας νέα ποσότητα PBS 1x και συλλέγοντας το σε διαφορετικό tube.

Από τα υλικά που συλλέξαμε, διαχωρίζουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6 λεπτά και τα διατηρούμε στους 4°C ώστε να τα χρησιμοποιήσουμε αργότερα σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό.

Για ELISA χρησιμοποιούμε τα υπερκείμενα μόνο από τα πρώτα 5ml που συλλέξαμε.

2.4 Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Με τον εξωτερικό ανοσοφθορισμό μπορούμε να διακρίνουμε πληθυσμούς κυττάρων στηριζόμενοι στην παρουσία συγκεκριμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στην επιφάνεια τους. Η μέθοδος βασίζεται στη δέσμευση ειδικών αντισωμάτων πάνω στις πρωτεΐνες και στην επακόλουθη αναγνώριση των αντισωμάτων αυτών από αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες είναι προσημασμένες με την φθορίζουσα ουσία φλοουρεσκίνη (FITC).

Κατά την παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού, ακτινοβολία UV διέρχεται από την αντικειμενοφόρο και η μεμβράνες των σημασμένων κυττάρων φθορίζουν, ενώ κατά τη μέτρηση τους με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής μια δέσμη laser χτυπάει κάθε κύτταρο ξεχωριστά δίνοντας στοιχεία τόσο για την ένταση του φθορισμού όσο και για την μορφολογία του.

Τα κύτταρα στα οποία έγινε φθορισμός είχαν προέλθει από τη συλλογή περιτοναϊκών υγρών και κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Tubes 15ml και 50ml
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας Vee bottom 96 πηγαδιών (Sarstedt, Germany)
- FACScan

Διαλύματα:

- PBS 1x
- PBS-BSA 2%
- PBS-BSA 0.1%

Αντισώματα:

- CD11b (rat monoclonal antibody to mouse) σε αραίωση 1/200 σε PBS-BSA 0.1%
- Ly-5 (rat monoclonal antibody to mouse) σε αραίωση 1/200 σε PBS-BSA 0.1%
- CD90 (anti-mouse Thy 1.2) σε αραίωση 1/200 σε PBS-BSA 0.1%
- CD4 (anti-mouse L3T4) σε αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- CD8 (anti-mouse Lyt2) σε αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%
- ABC (mouse anti-human class I) σε αραίωση 1/100 σε PBS-BSA 0.1%

Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε:

- FITC (Sheep anti-Mouse Immunoglobin (gamma and light chains) $F(ab')_2$ fragment, fluorescein conjugated) σε αραίωση 1/200 σε PBS-BSA 0.1%

<u>Διαδικασία</u>

Τα περιτοναϊκά κύτταρα που συλλέξαμε από την περιτοναϊκή κοιλότητα των ποντικιών από τις 5 διαφορετικές ομάδες και ενός untreated (control) ποντικιού φυγοκεντρούνται για 6 λεπτά στις 1200rpm. Απομακρύνουμε τα υπερκείμενα και επαναδιαλύουμε τα ιζήματα (κύτταρα) σε PBS και κατόπιν

μοιράζουμε τα δείγματα μας σε 96άρα πλάκα Vee bottom. Σε κάθε πηγάδι προσθέτουμε 100μl κυτταρικού διαλύματος.

Φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας για 6 λεπτά και μετά απομακρύνουμε το PBS. Προσθέτουμε 200μl/ well PBS-BSA 2% για το blocking των μη ειδικών θέσεων και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρούμε ξανά ώστε να απομακρύνουμε το PBS-BSA 2%. Ξεπλένουμε 2-3 φορές με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και 100μl/ well PBS κάθε φορά.

Κατόπιν προσθέτουμε τα πρώτα αντισώματα αραιωμένα σε PBS-BSA 0.1%. Επωάζουμε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε 2-3 φορές με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και 100μl/ well PBS κάθε φορά.

Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο σε PBS-BSA 0.1%. Επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συνθήκες σκότους. Μετά το τέλος της επώασης αραιώνουμε τα δείγματα σε ίσο όγκο PBS και φυγοκεντρούμε στις 1200rpm για 6 λεπτά. Τέλος κάνουμε 2-3 πλυσίματα ακόμα με PBS και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 500μl PBS και μετράμε τα δείγματα μας στο FACScan.

2.5 ELISA (Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή)

Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο που επιτρέπει τον εντοπισμό αντιγόνων και αντισωμάτων σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών ή σε διάφορα υγρά συστατικά του οργανισμού όπως είναι ο ορός του αίματος και το περιτοναϊκό υγρό με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Πλάκες καλλιέργειας flat bottom 96 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)
- ELISA plate reader στα 450nm (ASYS HITECK-DigScan)

Διαλύματα

- PBS- tween 20 0.05%
- PBS-BSA 2%
- Coating Buffer
- Υπόστρωμα περοξειδάσης: BM blue POD Substrate, soluble (Boehringer Mannheim, Germany)
- Αναστολέας: H_2SO_4 (Merck. Germany)

Αντισώματα

Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν

- IFN-γ, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- TNF-α, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- IL-2, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- IL-4, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- IGF-1, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%
- GM-CSF, αραίωση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%

Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε

- Anti-mouse (Fab specific)- Peroxidase, antibody produced in goat (SIGMA, USA), αραίωση 1/12000 σε PBS-BSA 0.1%

Διαδικασία

Σε 96άρα πλάκα flat bottom προσθέτουμε 100μl διαλύματος από τα δείγματα μας αραιωμένα στο coating buffer: 1/1000 για τους ορούς του αίματος των ποντικιών και 1/100 για τα περιτοναϊκά υγρά. Αφήνουμε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες για 12h με 18h στους 4°C.

Μετά την επώαση πετάμε τα υπερκείμενα από τα πηγαδάκια και ξεπλένουμε 3 φορές προσθέτοντας κάθε φορά 100μl/well PBS-Tween 20.

Προσθέτουμε 200μl/well PBS-BSA 2% και επωάζουμε για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η BSA χρησιμοποιείται για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος.

Πετάμε τα υπερκείμενα από τα πηγαδάκια και ξεπλένουμε 3 φορές προσθέτοντας κάθε φορά 200μl/well PBS-Tween 20.

Στη συνέχεια προσθέτουμε τα πρώτα αντισώματα (100μl/well) αραιωμένα 1/1000 σε PBS –BSA 0,1% και επωάζουμε για 1,5h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε τα υπερκείμενα και πλένουμε 3 φορές προσθέτοντας κάθε φορά 100μl/well PBS-Tween 20.

Προσθέτουμε τα αντίστοιχα για κάθε πρώτο αντίσωμα δεύτερα αντισώματα (100μl/well) αραιωμένα 1/12000 σε PBS-BSA 0,1%. Επωάζουμε σε σκοτεινό μέρος για 1,5h σε θερμοκρασία δωματίου.

Πετάμε ξανά τα υπερκείμενα των πηγαδιών και πλένουμε 3 φορές με 100μl/well PBS-Tween 20.

Τέλος, φτιάχνουμε διάλυμα ίσου όγκου χρωμογόνου και υποστρώματος της υπεροξειδάσης και στη συνέχεια με όσο το δυνατόν λιγότερο φως προσθέτουμε 100μl/well διάλυμα υποστρώματος και επωάζουμε για περίπου 10min σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία δωματίου. Περιμένουμε μέχρι την αλλαγή του υποκίτρινου χρώματος του υποστρώματος σε θαλασσί (κυανό) που σημαίνει και την αντίδραση του υποστρώματος με την υπεροξειδάση του δεύτερου αντισώματος. Σταματάμε την αντίδραση με προσθήκη 50μl/well H_2SO_4. Το χρώμα των δειγμάτων μετατρέπεται σε κίτρινο.

Τοποθετούμε την πλάκα στο ELISA plate reader και μετράμε την απορρόφηση στα 450nm.

2.6 Πάγωμα μήτρας και σπλήνας

Διαλύματα

- PFA 4%
- PBS – sucrose 30%
- Ισοπεντάνιο

Διαδικασία

Οι μήτρες και οι σπλήνες επωάζονται για 4 ώρες σε PFA 4% στο cold room για την μονιμοποίηση του ιστού. Έπειτα αφήνονται πάλι στο cold room σε PBS – sucrose 30% overnight. Την επόμενη μέρα τοποθετούμε τους ιστούς μας σε αντικειμενοφόρο που περιέχει ισοπεντάνιο για 10 λεπτά. Τέλος, αφαιρούμε το ισοπεντάνιο από τις αντικειμενοφόρους και τις φυλάσσουμε στους -80°C.

2.7 Ζελατίνωση αντικειμενοφόρων πλακών

Για την μονιμοποίηση των τομών στις αντικειμενοφόρους πραγματοποιείται ζελατίνωση αυτών. Σε 300ml dH_2O διαλύουμε 1.5g ζελατίνη. Στη συνέχεια θερμαίνουμε το διάλυμα στους 37°C και ταυτόχρονα αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα ζελατίνης και το διάλυμα γίνει διαυγές. Αφού το διάλυμα γίνει διαυγές το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν διαλύουμε 150mg $KCr(SO_4)$ x $12H_2O$ και αναδεύουμε. Στη συνέχεια τοποθετούμε το διάλυμα στο μπανάκι όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί και οι αντικειμενοφόροι πλάκες για 10 λεπτά. Τέλος, αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους στους 37°C overnight.

2.8 Κρυοτομές

Οι ιστοί που έχουμε φυλάξει στους -80°C χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή κρυοτομών. Οι τομές που γίνονται στον ιστό συλλέγονται στις αντικειμενοφόρους πλάκες που έχουμε ήδη ζελατινώσει για την ιστοχημική ή ανοσοϊστοχημική μελέτη του ιστού.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Κρυοτόμος

Διαλύματα

- O.C.T. (Optimum Cutting Temperature)

Διαδικασία

Τα δείγματα κόβονται σε θερμοκρασία -10°C έως -30°C. Αρχικά ο ιστός καλύπτεται από O.C.T. (Optimum Cutting Temperature) και είναι έτοιμος να κοπεί μόνο όταν πήξει η κρυοπροστατευτική αυτή ουσία. Ο ιστός τοποθετείται σε μια πλατφόρμα η οποία στερεώνεται κάθετα προς την κατεύθυνση κοπής μιας ειδικής λεπίδας. Με την βοήθεια μιας τροχαλίας και με σταθερές κινήσεις μετακινούμε την πλατφόρμα προς την ακίνητη λεπίδα και έτσι δημιουργείται μια τομή. Τέλος η τομή συλλέγεται σε μια αντικειμενοφόρο και φυλάγεται στην κατάψυξη.

2.9 Ανοσοϊστοχημική και ιστολογική ανάλυση

Ανοσοϊστοχημεία είναι ο εντοπισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων σε δείγματα κυττάρων ή ιστών με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων συνδεδεμένων με χρωμοφόρες ή φθορίζουσες ουσίες.

Ιστοχημεία είναι η παρατήρηση της μορφολογίας κυττάρων ή ιστών στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρήση χρωστικών.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Μικροσκόπιο φθορισμού

Διαλύματα

- PBS-BSA 5%
- PBS-NGS 10%
- PBS-NGS-SAP, SAP 0.1%
- PBS 1x
- Gill' s hematoxylein

Διαδικασία

Αρχικά ξεπαγώνουμε τις πλάκες και τις τομές. Οι τομές καλύπτονται με PBS-BSA 5% και PBS-NGS 10% για 5 λεπτά με το κάθε διάλυμα. Σε κάθε τομή βάζουμε 20 μl από κάθε διάλυμα.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 IN VIVO ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΝΙΤΙΝΗΣ, ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ Ε1 ΚΑΙ Ε2 ΚΑΙ ΚΑΡΝΙΤΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ Ε1 ΚΑΙ Ε2.

3.1.1 Συνολικά επίπεδα ανίχνευσης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στον ορό του αίματος ποντικιών μετά τη χορήγηση καρνιτίνης, αναστολέων προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 και της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης και αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2.

Είναι γνωστό ότι σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης υπάρχει υψηλή έκκριση ορισμένων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τα συμπτώματα της ασθένειας. Για το λόγο αυτό και γνωρίζοντας από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου ότι η χορήγηση καρνιτίνης δρα και μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών προκαλώντας ή επιδεινώνοντας τα συμπτώματα της ασθένειας, μέσω έκκρισης υψηλών συγκεντρώσεων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, χορηγήσαμε αναστολείς των προσταγλανδινών E_1 και E_2 για να διερευνηθεί ο ρόλος αυτών των προσταγλανδινών στην ενδομητρίωση.

Συγκεκριμένα:

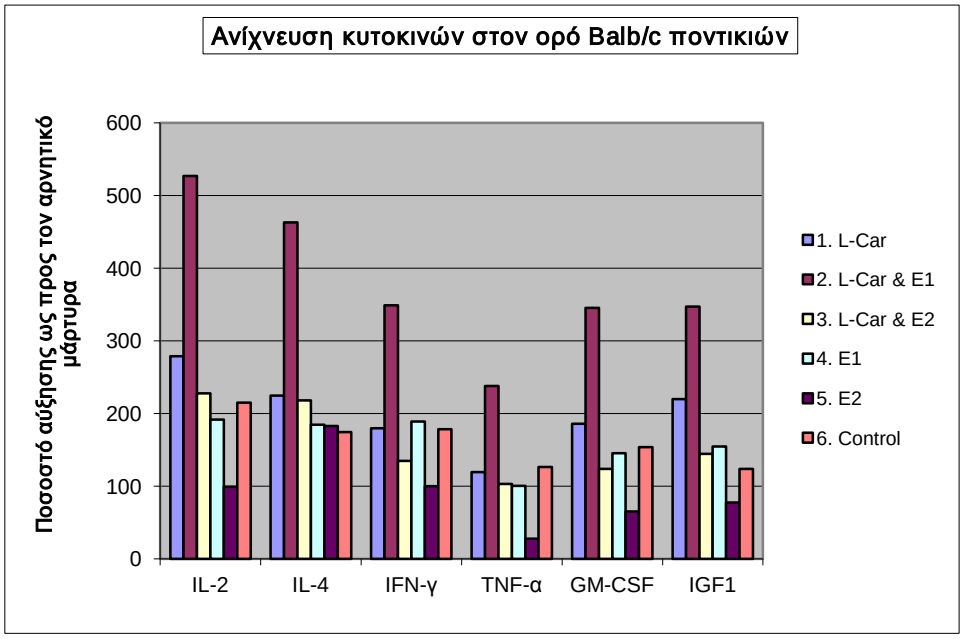
Σε έξι ομάδες ποντικιών Balb/c χορηγήθηκαν για διάστημα επτά ημερών:

- Ομάδα 1: L-Carnitine (25 mg/ml)
- Ομάδα 2: L-Carnitine και ταυτόχρονα χορήγηση του παράγοντα 11 deoxymprostaglandin E_1 (6μl/ml)
- Ομάδα 3: L-Carnitine και ταυτόχρονα χορήγηση του παράγοντα 17-phenyl trimor prostaglandin E_2 (6μl/ml)
- Ομάδα 4: Παράγοντας 11 deoxymprostaglandin E_1 (3μl/ml)
- Ομάδα 5: Παράγοντας 17-phenyl trimor prostaglandin E_2 (3μl/ml)
- Ομάδα 6: Untreated

Στο τέλος του διαστήματος των επτά ημερών και αφού συλλέξαμε τον ορό του αίματος, ελέγξαμε με τη μέθοδο της ELISA κατά πόσο υπήρχε διαφοροποίηση στην παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, συγκριτικά με την ομάδα των φυσιολογικών untreated ποντικιών στα οποία δεν είχε χορηγηθεί κάποιο διάλυμα. Έγιναν τρεις επαναλήψεις του πειράματος.
Ελέγχθηκε η παρουσία των:
IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF (granulocyte macrophage- colony stimulating factor), IGF-1 (insulin growth factor) και για τις έξι ομάδες.
Η επιλογή των συγκεκριμένων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων έγινε με βάση υπάρχουσες μελέτες που αποδεικνύουν την εμπλοκή τους σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα, όπου απεικονίζεται η έκκριση της κάθε κυτταροκίνης και αυξητικού παράγοντα και για τις έξι διαφορετικές ομάδες.

Πρώτη επανάληψη πειράματος

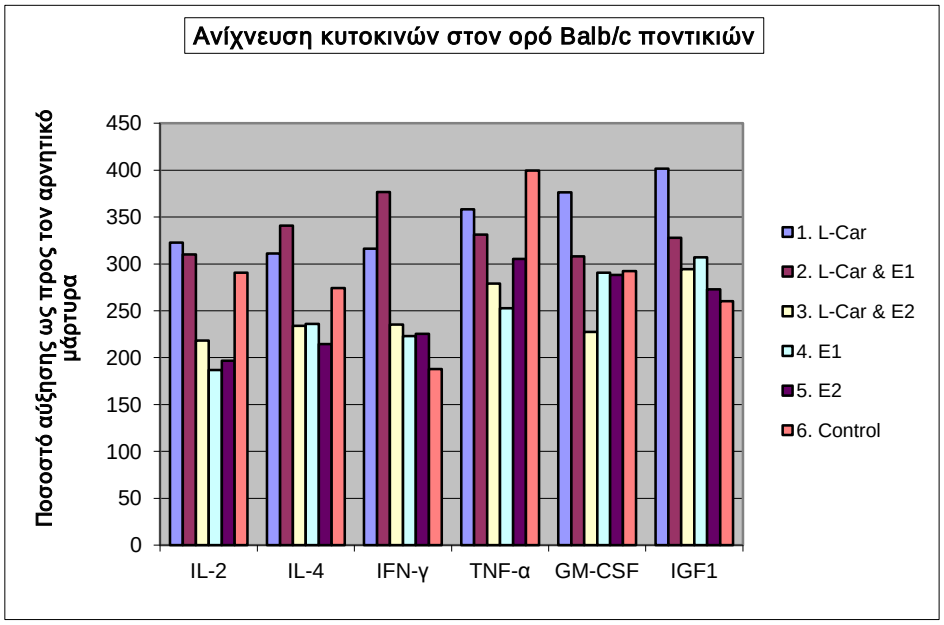


Διάγραμμα 2.1 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E1 και E2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα επίπεδα έκκρισης των IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF, IGF-1. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ποσοστά αύξησης μετά τη χορήγηση καρνιτίνης και του αναστολέα της προσταγλανδίνης E1 (ομάδα 2) είναι πολύ αυξημένα σε όλες τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, σχεδόν διπλάσια από τον αρνητικό μάρτυρα (ομάδα 6). Αντίθετα τα πιο χαμηλά ποσοστά αύξησης παρατηρούνται μετά από χορήγηση μόνο του αναστολέα της προσταγλανδίνης E2 (ομάδα 5). Μετά από χορήγηση μόνο καρνιτίνης (ομάδα 1) παρατηρούμε μικρή αύξηση των ποσοστών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Για τις άλλες δύο ομάδες δηλαδή της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης με αναστολέα προσταγλανδίνης E2 (ομάδα 3) και της ομάδας με χορήγηση μόνο του αναστολέα της προσταγλανδίνης E1 (ομάδα 4) δεν παρατηρούμε κάποια μεγάλη διαφορά στα ποσοστά αύξησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επομένως, όσον αφορά αυτές τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, φαίνεται ότι η χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης E2

μειώνει τα επίπεδα αύξησης της, ελαχιστοποιώντας ενδεχομένως και τις περιπτώσεις φλεγμονής στις οποίες όλες αυτές οι κυτταροκίνες θεωρούνται υπεύθυνες.

Δεύτερη επανάληψη πειράματος

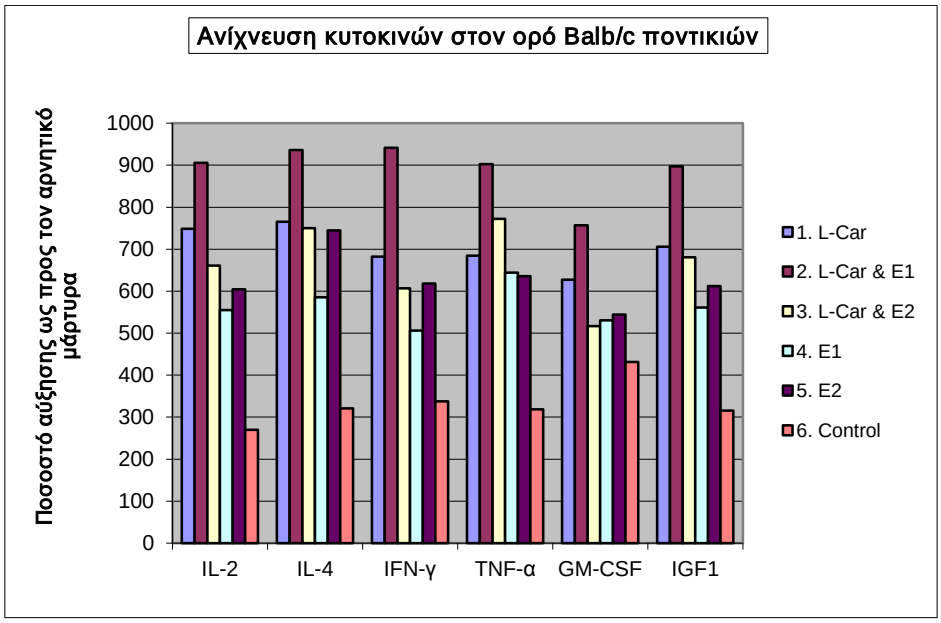


Διάγραμμα 2.2 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Παρόμοιο προφίλ με το πρώτο πείραμα παρουσιάζεται και στη δεύτερη επανάληψη του πειράματος με μικρές αποκλίσεις. Συγκεκριμένα, μετά από χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 5) παρατηρούμε μειωμένα ποσοστά στις περισσότερες κυτταροκίνες σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα εκτός από τις περιπτώσεις της IFN-γ και του IGF-1. Μετά από χορήγηση καρνιτίνης (ομάδα 1) καθώς και καρνιτίνης με ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1 (ομάδα 2) παρατηρούμε πολύ υψηλά ποσοστά έκκρισης όλων των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα εκτός από την περίπτωση του TNF-a. Για τις άλλες δύο ομάδες δηλαδή της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης με αναστολέα προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 3) και της ομάδας με

χορήγηση μόνο του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε1 (ομάδα 4) δεν παρατηρούμε κάποια μεγάλη διαφορά στα ποσοστά αύξησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα όπως και στο πρώτο πείραμα. Επομένως, όσον αφορά αυτές τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες στο δεύτερο πείραμα, φαίνεται ότι η χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 μειώνει τα επίπεδα αύξησης της όπως και στο πρώτο πείραμα και οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στις υπόλοιπες ομάδας ίσως να οφείλονται σε κάποιο λανθασμένο χειρισμό κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τρίτη επανάληψη πειράματος

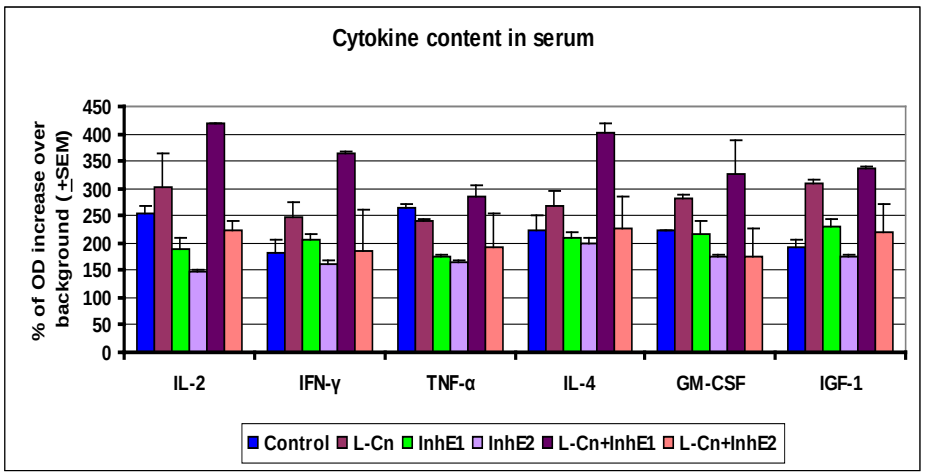


Διάγραμμα 2.3: Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E_1 και E_2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται καθαρά η επανάληψη του πρώτου πειράματος των επιπέδων έκκρισης των IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF και IGF-1. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ποσοστά αύξησης μετά τη χορήγηση καρνιτίνης και του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε1 (ομάδα 2) είναι πολύ αυξημένα σε όλες τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, σχεδόν διπλάσια

από τον αρνητικό μάρτυρα (ομάδα 6) όπως ακριβώς και στο πρώτο πείραμα. Αντίθετα τα πιο χαμηλά ποσοστά αύξησης δεν παρατηρούνται μετά από χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 5) αλλά μετά από τη χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε1 (ομάδα 4). Μετά από χορήγηση μόνο καρνιτίνης (ομάδα 1) παρατηρούμε αρκετά μεγάλη αύξηση των ποσοστών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά τα ποσοστά είναι μειωμένα σε σχέση με τα ποσοστά αύξησης της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1 (ομάδα 2). Για τις άλλες δύο ομάδες δηλαδή της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης με αναστολέα προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 3) και της ομάδας με χορήγηση μόνο του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 5) παρατηρούμε μια μικρή διαφορά στα ποσοστά αύξησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επομένως, όσον αφορά αυτές τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, φαίνεται ότι η χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 μειώνει τα επίπεδα αύξησης της όπως και στο πρώτο πείραμα.

Συνολικά μέσος όρος των τριών επαναλήψεων όλων των αποτελεσμάτων.

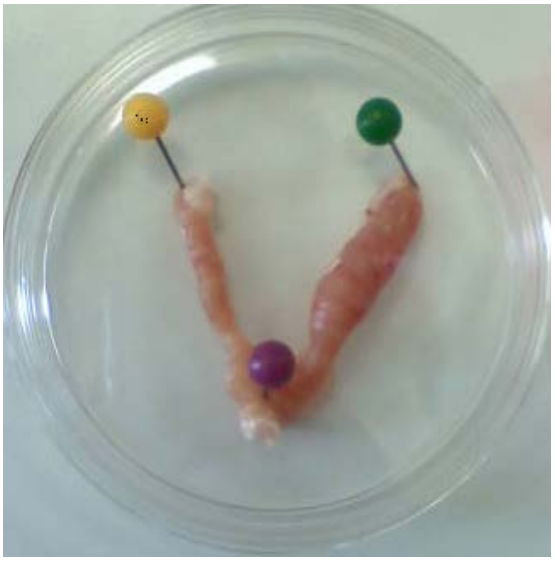


Διάγραμμα 2.4: Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E_1 και E_2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Όπως παρατηρούμε ο αναστολέας της προσταγλανδίνης E_1 σε συνδυασμό με την καρνιτίνη αυξάνει την παραγωγή των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό των ποντικιών ενώ ο αναστολέας της προσταγλανδίνης E_2 σε συνδυασμό με την καρνιτίνη δεν επάγει την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Επίσης μετά από χορήγηση καρνιτίνης αυξάνεται η παραγωγή κυτταροκινών αλλά όχι τόσο πολύ όσο αυξάνεται μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1. Τέλος μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 παρατηρείται μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και ακόμη πιο μειωμένη είναι η παραγωγή τους όταν χορηγείται μόνο ο αναστολέας της προσταγλανδίνης Ε2. Παρατηρείται δηλαδή ότι με τη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1 επάγονται τα συμπτώματα που προκαλούνται μόνο από την καρνιτίνη και αντίθετα ο αναστολέας της προσταγλανδίνης Ε2 δρα

ανασταλτικά στα συμπτώματα της καρνιτίνης μειώνοντας την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.

Μια μακροσκοπική εικόνα της μήτρας μετά τη χορήγηση καρνιτίνης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 2.1 Μήτρα ποντικιού Balb/c, μετά από χορήγηση καρνιτίνης, φαίνονται σημεία έντονης αγγείωσης και φλεγμονής στο δεξί κέρας της μήτρας.

Μια μακροσκοπική εικόνα της μήτρας μετά τη χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε1 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Εικόνα 2.2 Μήτρα ποντικού Balb/c, μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1, φαίνονται χαρακτηριστικά σημεία έντονης αγγείωσης και φλεγμονής και στο δεξί και στο αριστερό κέρας της μήτρας.

Μια μακροσκοπική εικόνα της μήτρας μετά τη χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα της προσταγλανδινής Ε2 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Εικόνα 2.3. Μήτρα ποντικού Balb/c, μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε2, δεν φαίνονται σημεία αγγείωσης και φλεγμονής.

3.1.2 Συνολικά επίπεδα ανίχνευσης κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό ποντικιών μετά τη χορήγηση καρνιτίνης, αναστολέων προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 και της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης και αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2.

Αφού συλλέξαμε τον ορό του αίματος, του οποίου τα αποτελέσματα παρατέθηκαν πιο πάνω, έγινε και συλλογή του περιτοναϊκού υγρού των ίδιων ποντικιών. Ελέγξαμε με τη μέθοδο της ELISA κατά πόσο υπήρχε διαφοροποίηση στην παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, συγκριτικά με την ομάδα των φυσιολογικών untreated ποντικιών στα οποία δεν είχε χορηγηθεί κάποιο διάλυμα. Έγιναν τρεις επαναλήψεις του πειράματος.

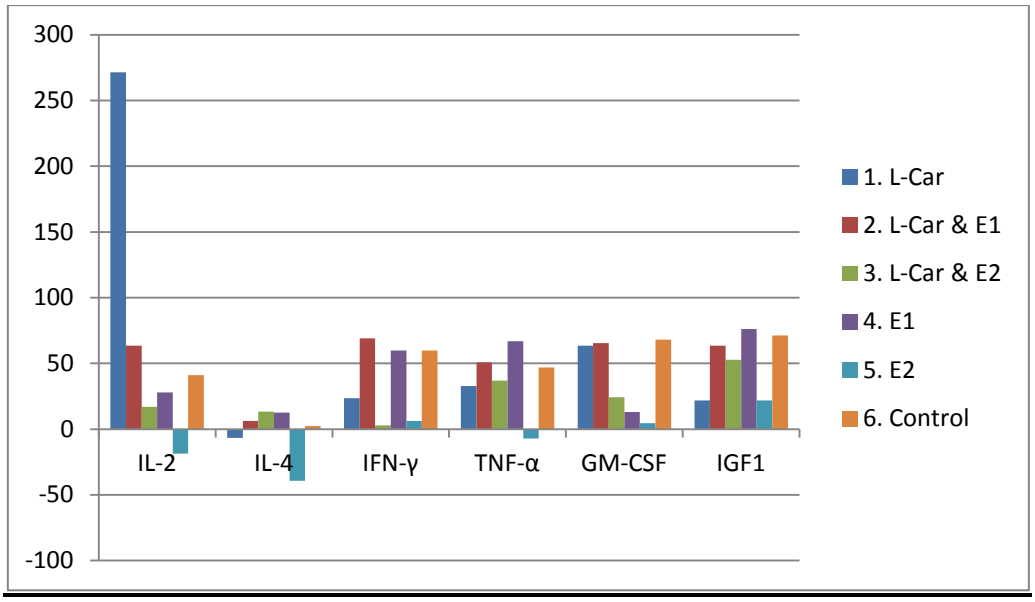
Ελέγχθηκε η παρουσία των:

IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF (granulocyte macrophage- colony stimulating factor), IGF-1 (insulin growth factor) και για τις έξι ομάδες.

Η επιλογή των συγκεκριμένων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων έγινε με βάση υπάρχουσες μελέτες που αποδεικνύουν την εμπλοκή τους σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα, όπου απεικονίζεται η έκκριση της κάθε κυτταροκίνης και αυξητικού παράγοντα και για τις έξι διαφορετικές ομάδες.

Πρώτη επανάληψη πειράματος

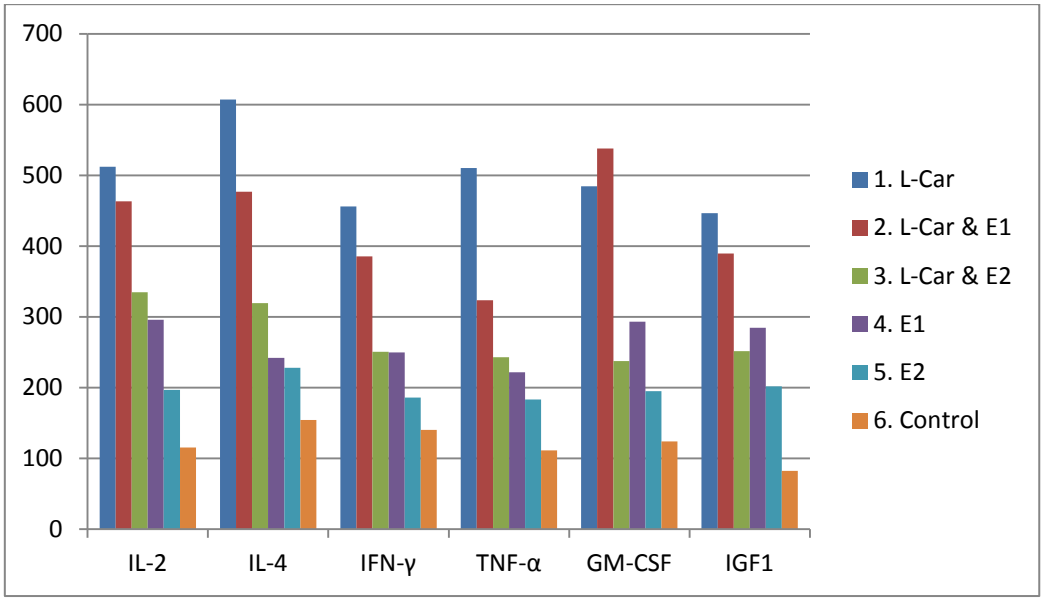


Διάγραμμα2.5 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα επίπεδα έκκρισης των IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF, IGF-1. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ποσοστά αύξησης μετά τη χορήγηση καρνιτίνης (ομάδα 1) είναι πολύ αυξημένα στην IL-2 σε σύγκριση με το untreated ποντίκι (ομάδα 6). Αντιθέτως τα ποσοστά αύξησης στις υπόλοιπες ιντερλευκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες είναι μειωμένα σε σχέση με το untreated ποντίκι (ομάδα 6). Μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα PGE1 (ομάδα 2) παρατηρούμε μεγάλη αύξηση των ποσοστών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα σχεδόν σε όλες τις κυτταροκίνες εκτός από τον TNF-α. Για τις άλλες δύο ομάδες δηλαδή της συνδυασμένης δράσης καρνιτίνης με αναστολέα προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 3) και της ομάδας με χορήγηση μόνο του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 (ομάδα 5) παρατηρούμε μειωμένα ποσοστά αύξησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα σε όλες τις κυτταροκίνες. Τέλος, μετά από χορήγηση του αναστολέα PGE 1 (ομάδα 4) παρατηρούμε μειωμένα ποσοστά αύξησης στην IL-2 και στο GM-CSF σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ενώ αντίθετα παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα στις υπόλοιπες κυτταροκίνες και στους

αυξητικούς παράγοντες. Επομένως, όσον αφορά αυτές τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες, φαίνεται ότι η χορήγηση του αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε1 αυξάνει τα επίπεδα της, μεγεθύνοντας ενδεχομένως και τις περιπτώσεις φλεγμονής στις οποίες όλες αυτές οι κυτταροκίνες θεωρούνται υπεύθυνες.

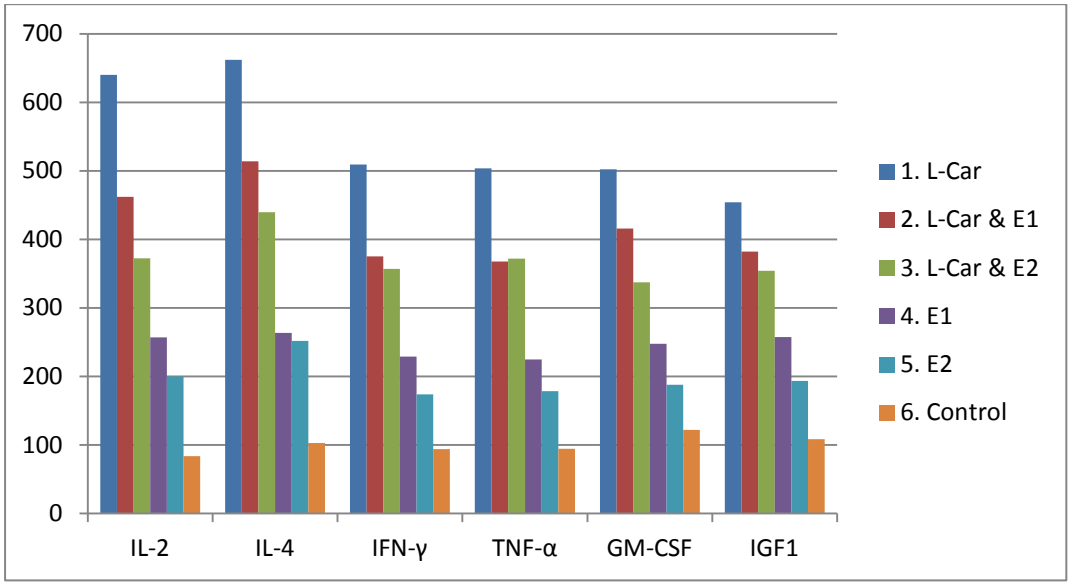
Δεύτερη επανάληψη πειράματος



Διάγραμμα 2.6 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E_1 και E_2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται επίσης συγκριτικά τα επίπεδα έκκρισης των IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF, IGF-1. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ποσοστά αύξησης από όλες τις ομάδες είναι πολύ αυξημένα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αύξησης όμως τα παρατηρούμε μετά από χορήγηση καρνιτίνης (ομάδα 1), στη συνέχεια τα αμέσως μεγαλύτερα στη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE1 (ομάδα 2), τα αμέσως μεγαλύτερα παρατηρούνται στη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE2 (ομάδα 3), τα αμέσως μεγαλύτερα παρατηρούνται μετά από χορήγηση αναστολέα PGE1 (ομάδα 4) και τέλος τα ποσοστά με τη μικρότερη αύξηση παρατηρούνται μετά από χορήγηση του αναστολέα PGE2.

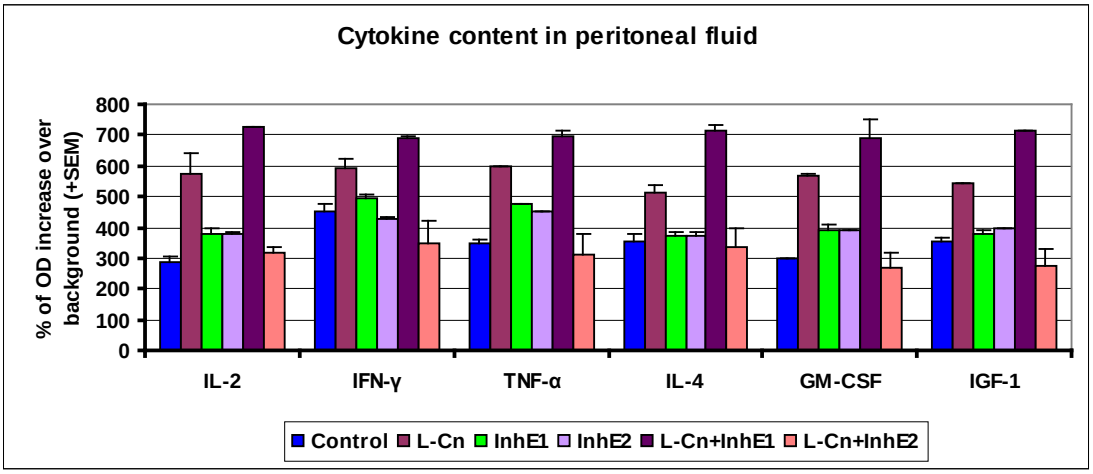
Τρίτη επανάληψη πειράματος



Διάγραμμα 2.7 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E_1 και E_2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται επίσης συγκριτικά τα επίπεδα έκκρισης των IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF, IGF-1. Εδώ φαίνεται καθαρά η επανάληψη του προηγούμενου πειράματος γιατί τα ποσοστά αύξησης ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με το δεύτερο πείραμα. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ποσοστά αύξησης από όλες τις ομάδες είναι πολύ αυξημένα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (ομάδα 6). Τα μεγαλύτερα ποσοστά αύξησης όμως τα παρατηρούμε μετά από χορήγηση καρνιτίνης (ομάδα 1), στη συνέχεια τα αμέσως μεγαλύτερα στη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE1 (ομάδα 2), τα αμέσως μεγαλύτερα παρατηρούνται στη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE2 (ομάδα 3), τα αμέσως μεγαλύτερα παρατηρούνται μετά από χορήγηση αναστολέα PGE1 (ομάδα 4) και τέλος τα ποσοστά με τη μικρότερη αύξηση παρατηρούνται μετά από χορήγηση του αναστολέα PGE2.

Συνολικά μέσος όρος των τριών επαναλήψεων όλων των αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 2.8 Ποσοστά αύξησης των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στον ορό ποντικιών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης, αναστολέων των προσταγλανδινών E_1 και E_2 και της συνδυασμένης δράσης αυτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστά αύξησης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Όπως παρατηρούμε ο αναστολέας της προσταγλανδίνης E_1 σε συνδυασμό με την καρνιτίνη αυξάνει την παραγωγή των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό των ποντικιών ενώ ο αναστολέας της προσταγλανδίνης E_1 επάγει μειωμένα την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Επίσης μετά από χορήγηση καρνιτίνης αυξάνεται η παραγωγή κυτταροκινών αλλά όχι τόσο πολύ όσο αυξάνεται μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1. Τέλος μετά από χορήγηση καρνιτίνης και αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 δεν παρατηρείται παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και ακόμη πιο μειωμένη είναι η παραγωγή τους όταν χορηγείται μόνο ο αναστολέας της προσταγλανδίνης Ε2. Παρατηρείται δηλαδή ότι με τη συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα προσταγλανδίνης Ε1 επάγονται τα συμπτώματα που προκαλούνται μόνο από την καρνιτίνη και αντίθετα ο αναστολέα της προσταγλανδίνης Ε2 δρα ανασταλτικά στα συμπτώματα της καρνιτίνης μειώνοντας την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.

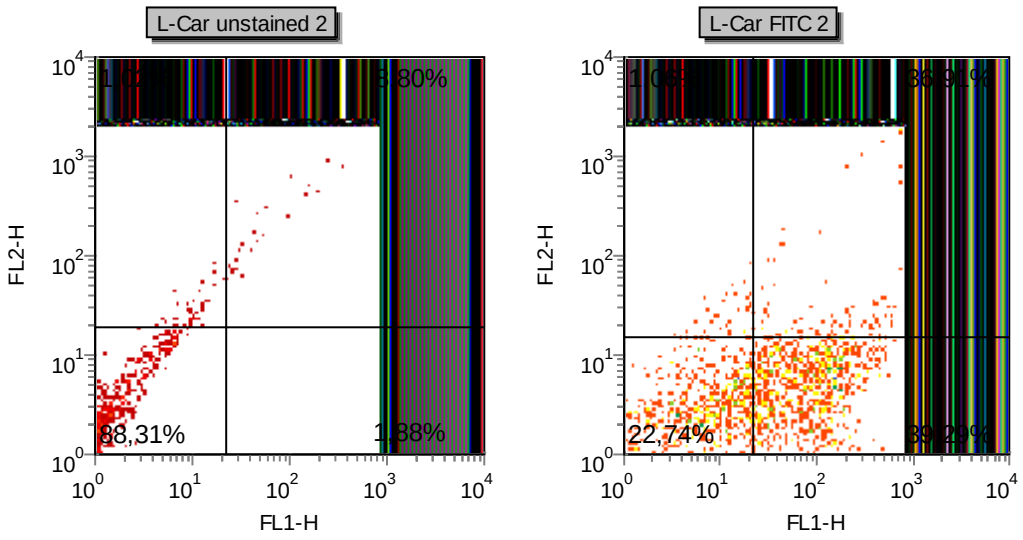
3.2 Ενδοκυτταρική έκφραση Cd11b, Ly5, Thy, CD4, CD8 σε κύτταρα περιτοναϊκού υγρού για κάθε ομάδα ποντικιών.

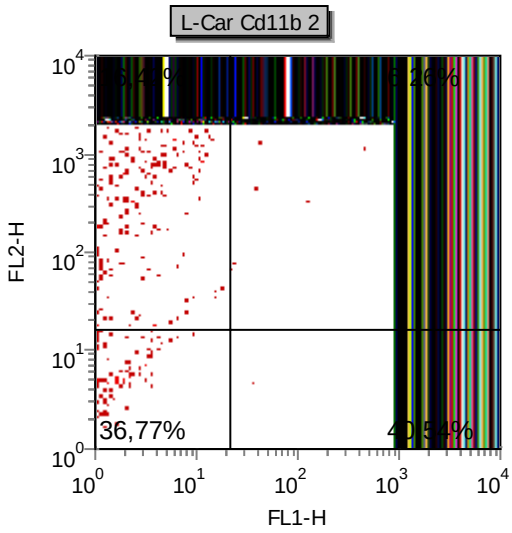
Τα κύτταρα περιτοναϊκού υγρού της κάθε ομάδας των ποντικιών υποβλήθηκαν σε κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα προέρχονται από untreated ποντίκια, από ποντίκια που τους χορηγήθηκε καρνιτίνη (ομάδα 1), συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE1, συνδυασμένη δράση καρνιτίνης και αναστολέα PGE2, αναστολέας PGE1 και αναστολέας PGE2. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση όλων των παραπάνω αντισωμάτων ήταν συνδεδεμένο με το FITC το οποίο εκπέμπει μια ακτινοβολία το μήκος της οποίας αντιστοιχεί στο πράσινο.

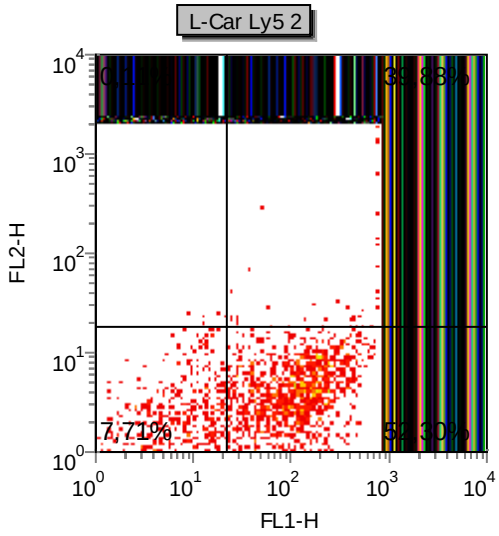
Παραθέτουμε παρακάτω ενδεικτικά κάποια αποτελέσματα:

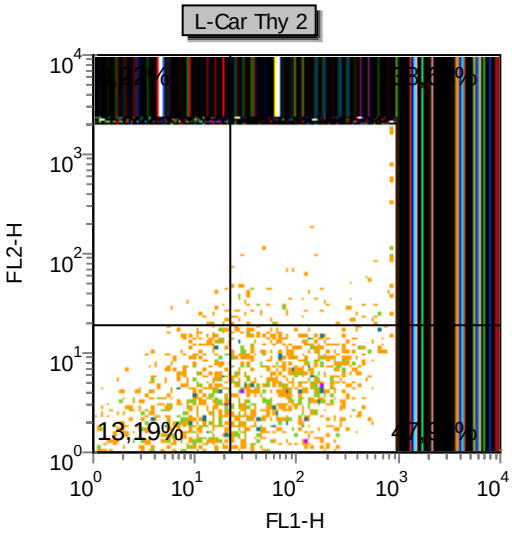
<u>Density plots</u>

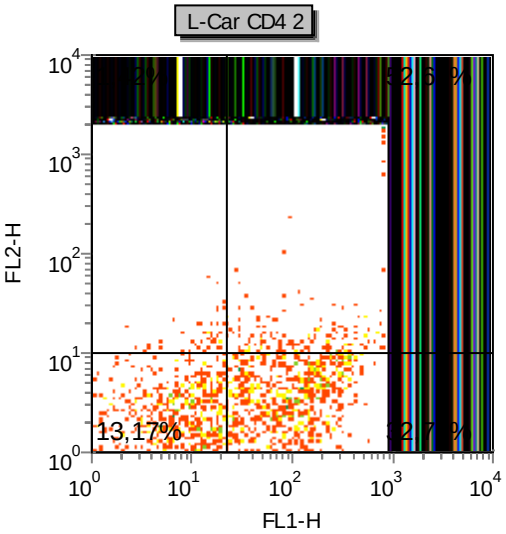
Density plots μετά από χορήγηση L-Carnitine σε ποντίκι.

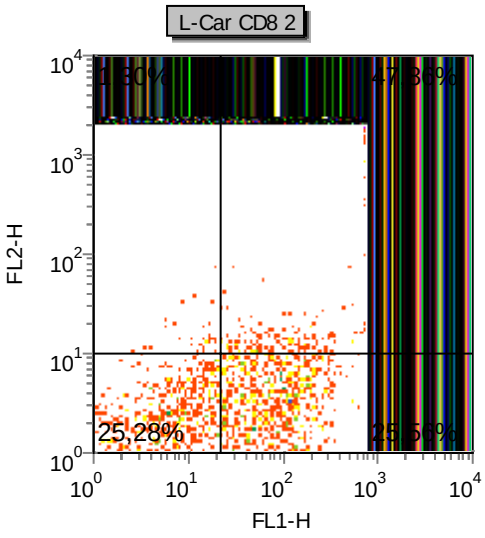



L-Car Cd11b 2
FL2-H
FL1-H
36,77%

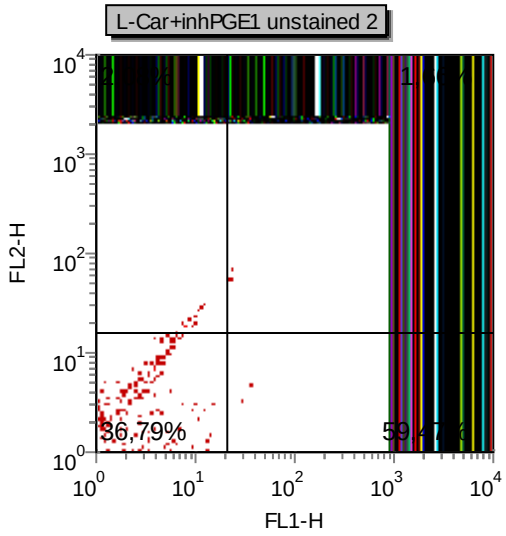

L-Car Ly5 2
FL2-H
FL1-H
7,71%

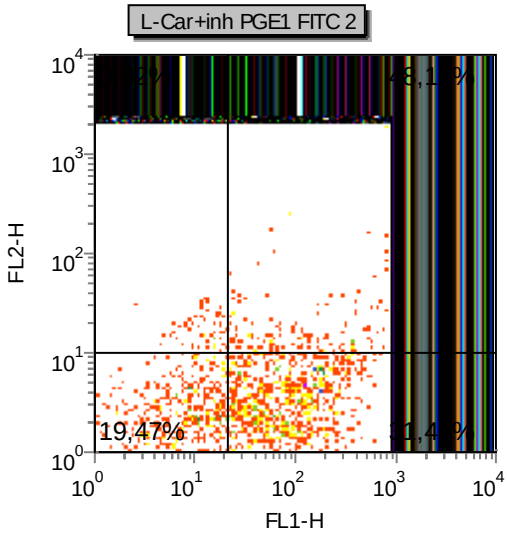

L-Car Thy 2
FL2-H
FL1-H
13,19%

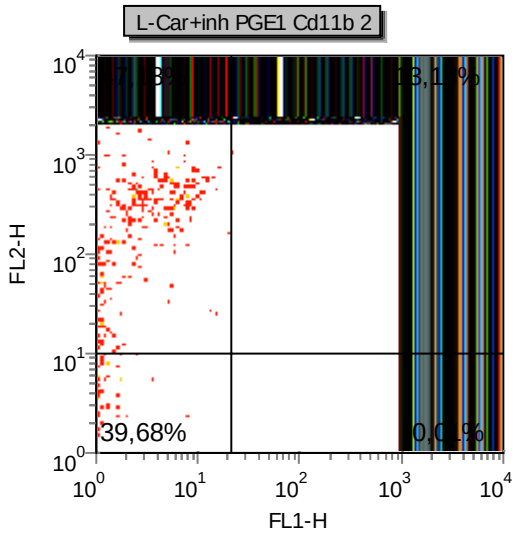

L-Car CD4 2
FL2-H
FL1-H
13,17%

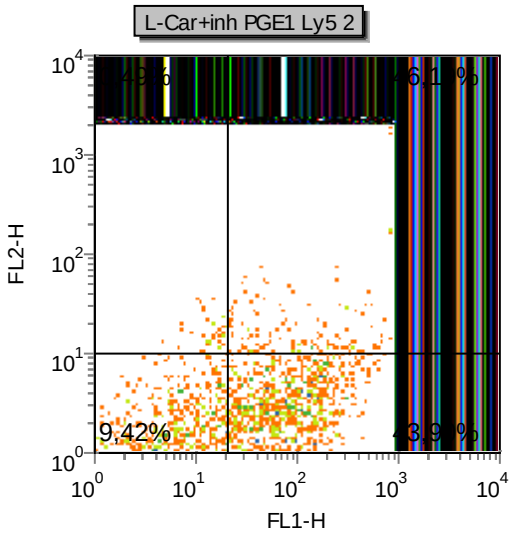


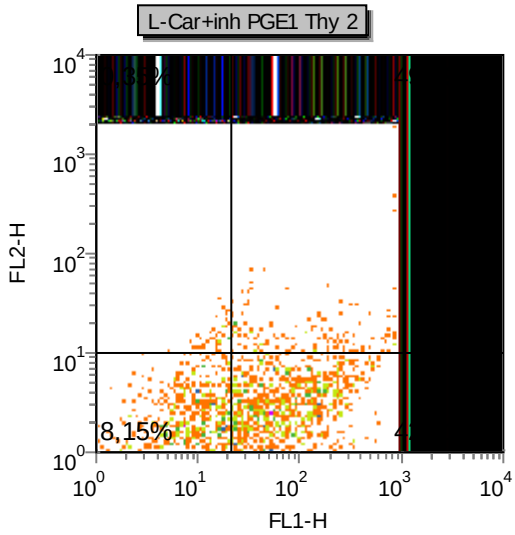
Density plots μετά από χορήγηση L-Carnitine και αναστολέα PGE1 σε ποντίκι.

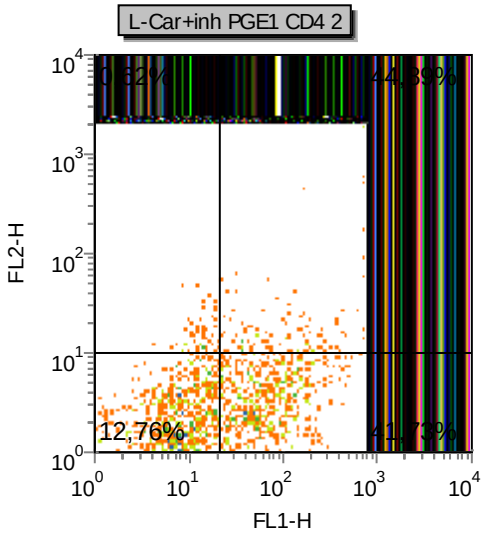


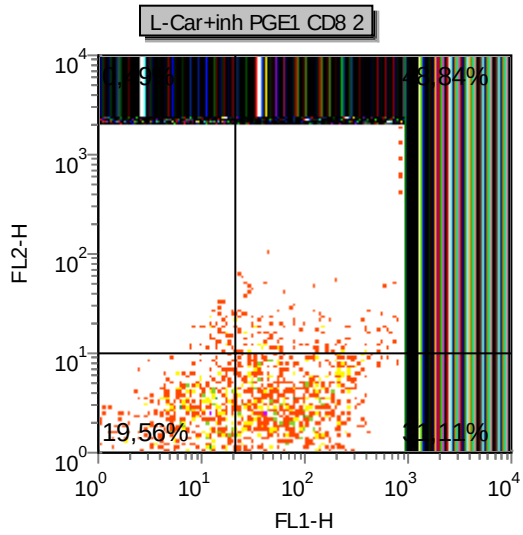



L-Car+inh PGE1 Cd11b 2
39,68%
FL2-H
FL1-H

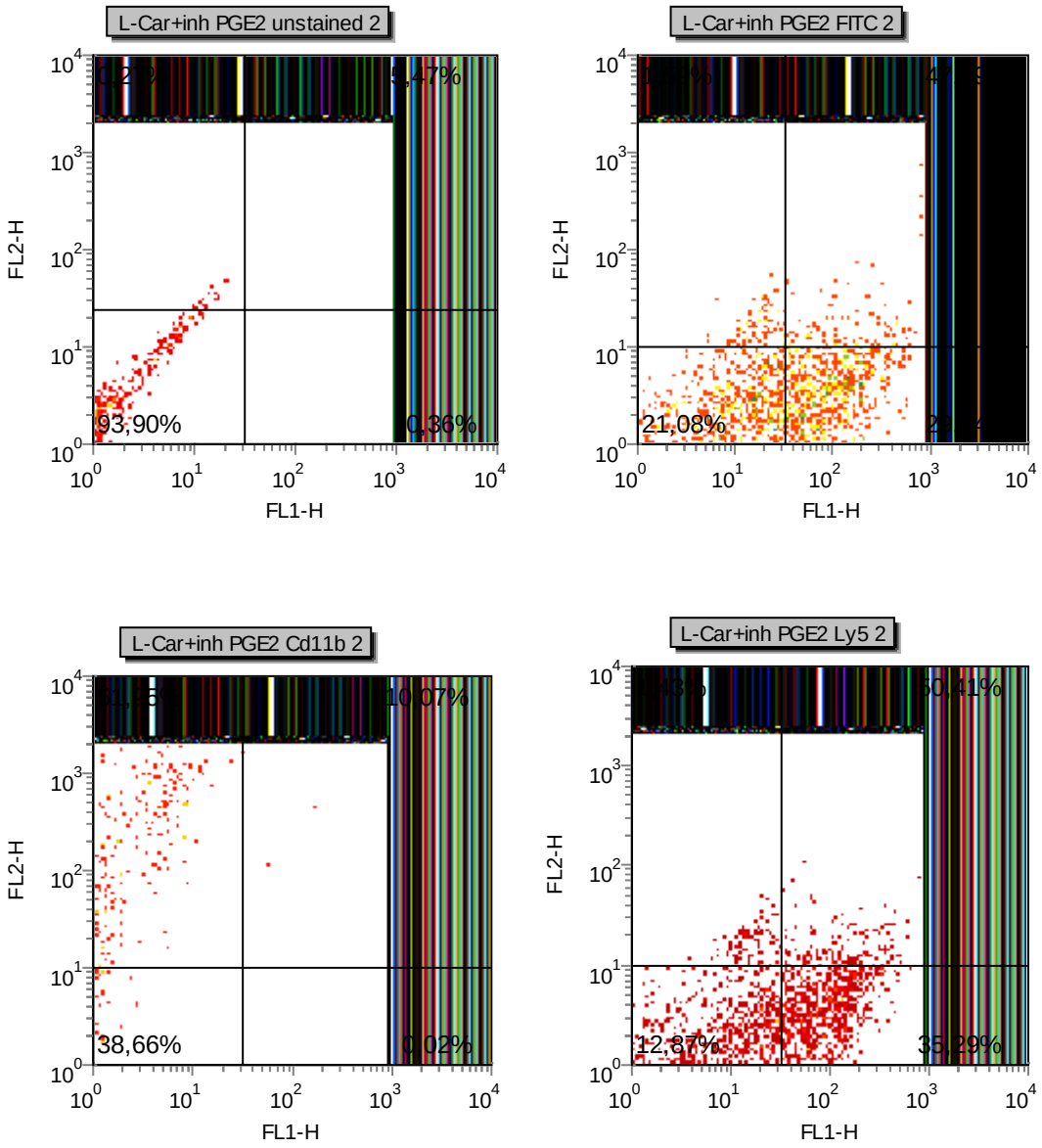

L-Car+inh PGE1 Ly5 2
9,42%
FL2-H
FL1-H

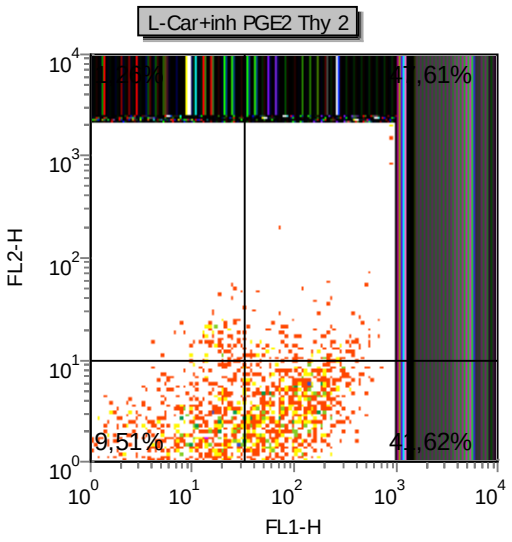

L-Car+inh PGE1 Thy 2
8,15%
FL2-H
FL1-H

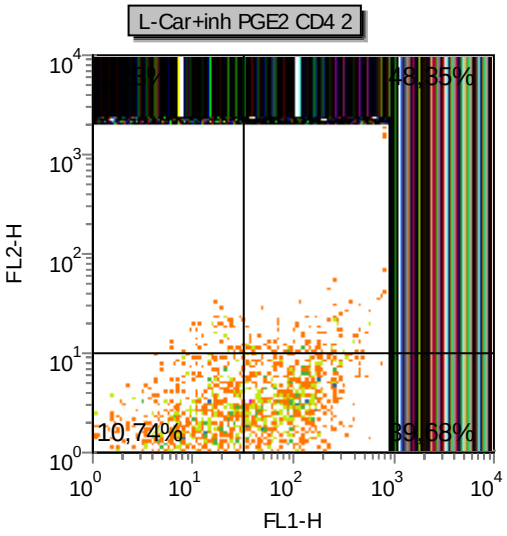

L-Car+inh PGE1 CD4 2
12,76%
FL2-H
FL1-H

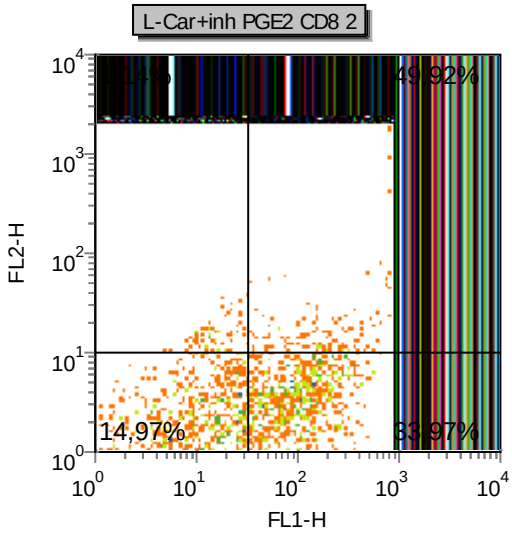

L-Car+inh PGE1 CD8 2
19,56%
FL2-H
FL1-H

Density plots μετά από χορήγηση L-Carnitine και αναστολέα PGE2 σε ποντίκι.

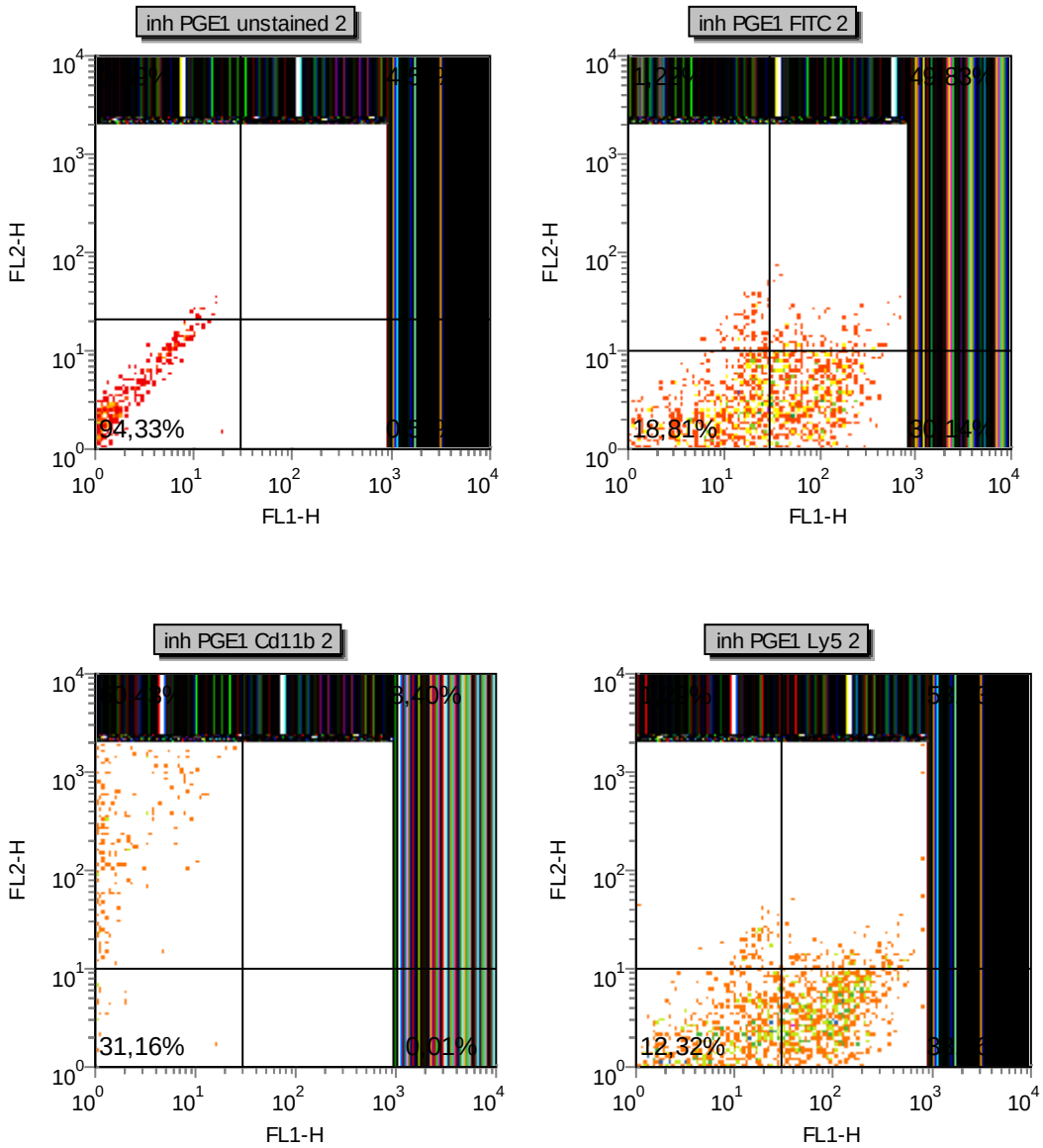


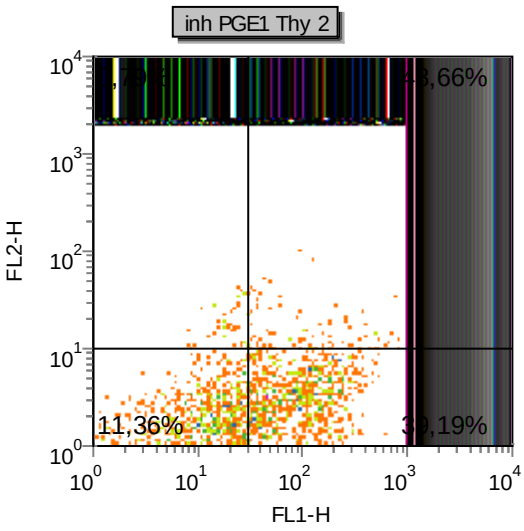

L-Car+inh PGE2 Thy 2
47,61%
9,51%
41,62%
FL2-H
FL1-H

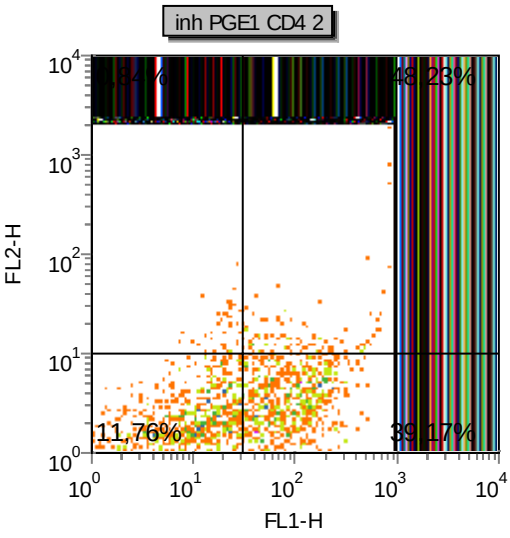

L-Car+inh PGE2 CD4 2
48,35%
10,74%
39,68%
FL2-H
FL1-H

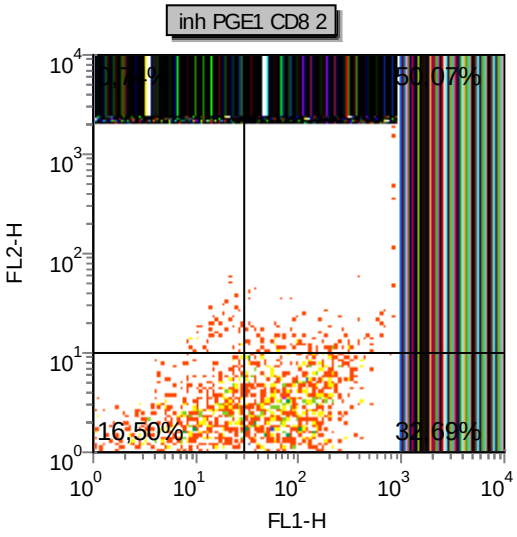

L-Car+inh PGE2 CD8 2
49,92%
14,97%
33,97%
FL2-H
FL1-H

Density plots μετά από χορήγηση αναστολέα PGE1 σε ποντίκι.

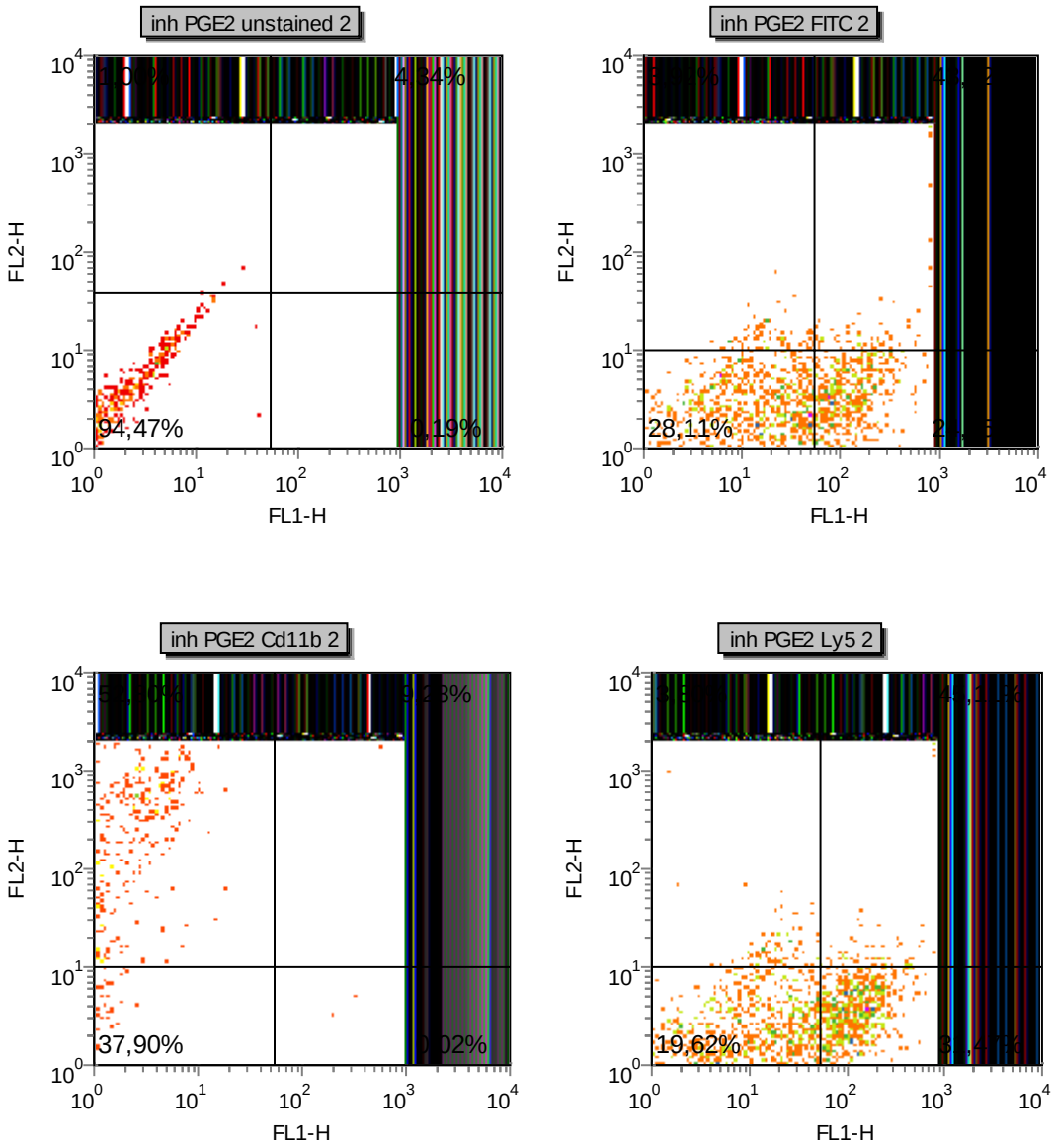


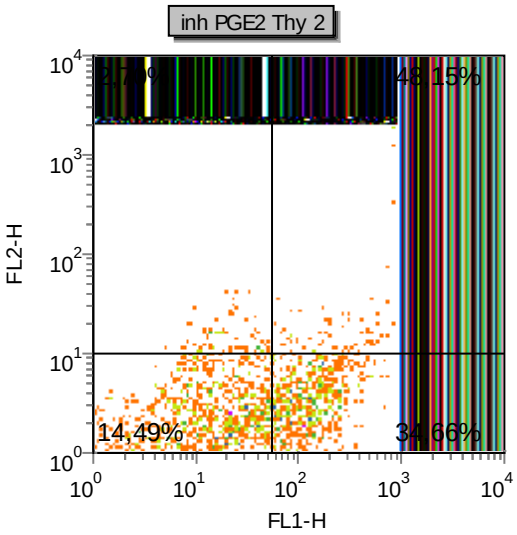

inh PGE1 Thy 2
11,36%
FL2-H
FL1-H

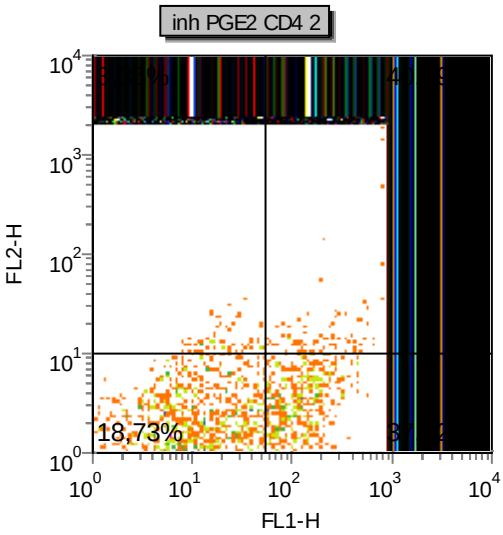

inh PGE1 CD4 2
11,76%
FL2-H
FL1-H

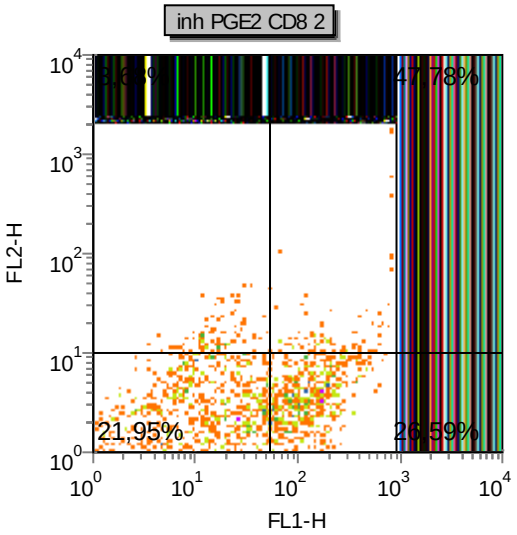

inh PGE1 CD8 2
16,50%
FL2-H
FL1-H

Density plots μετά από χορήγηση αναστολέα PGE2 σε ποντίκι.

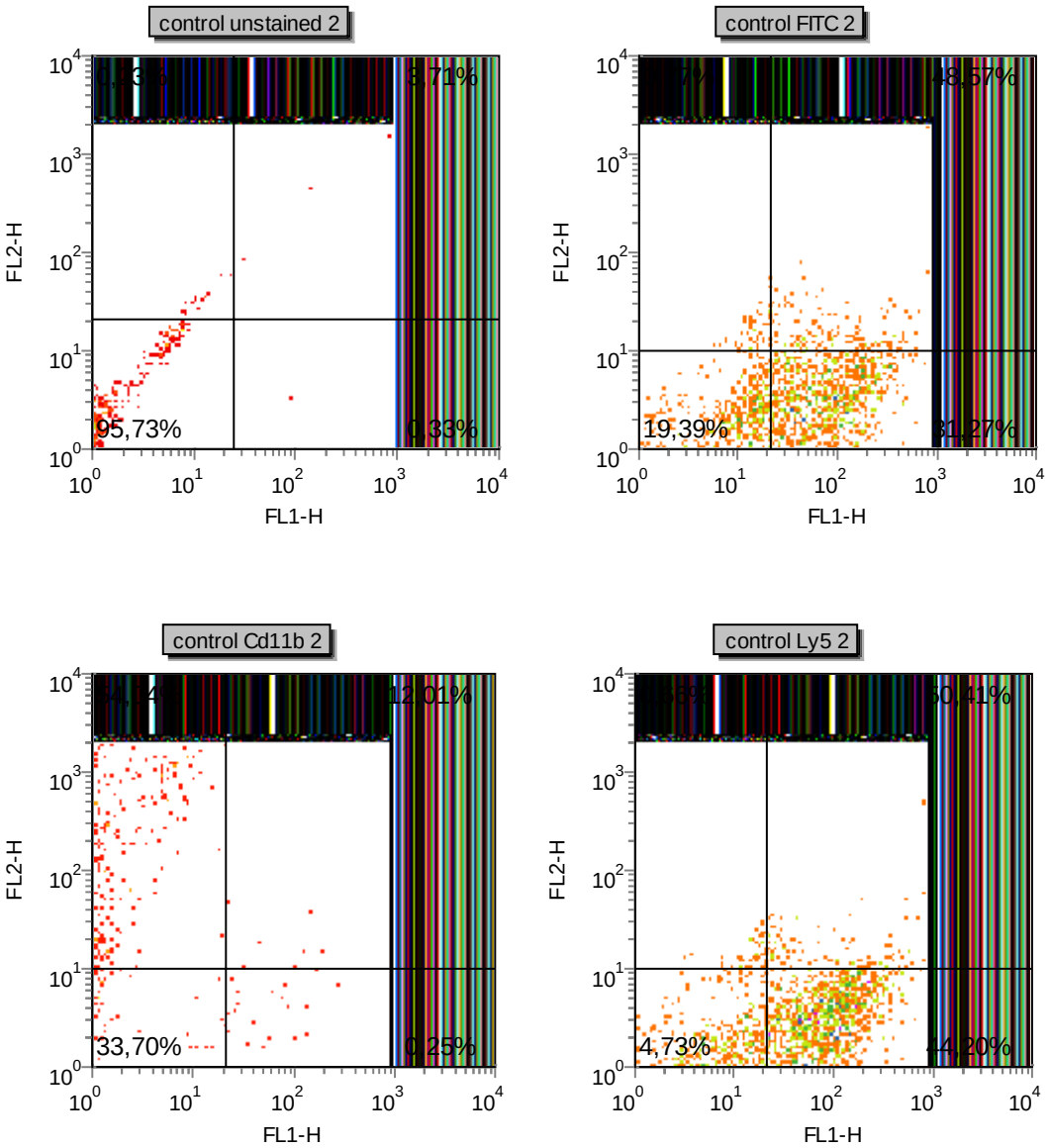


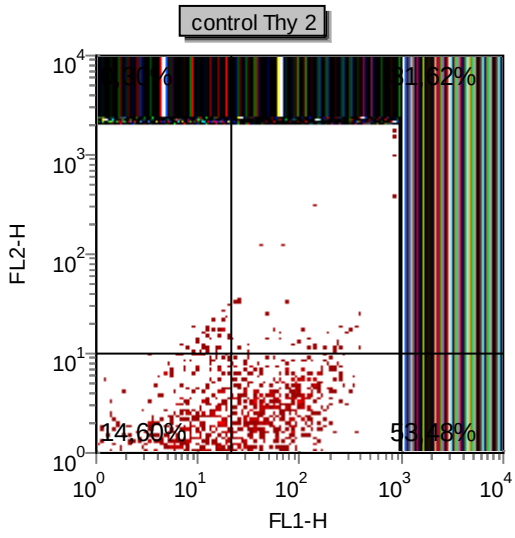

inh PGE2 Thy 2
43,15%
14,49%
34,66%
FL2-H
FL1-H

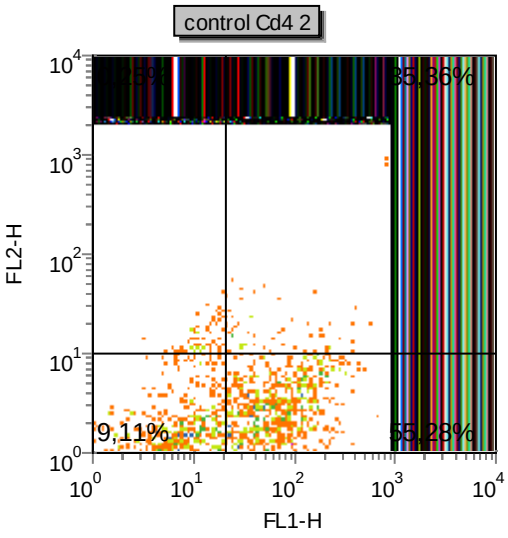

inh PGE2 CD4 2
18,73%
FL2-H
FL1-H

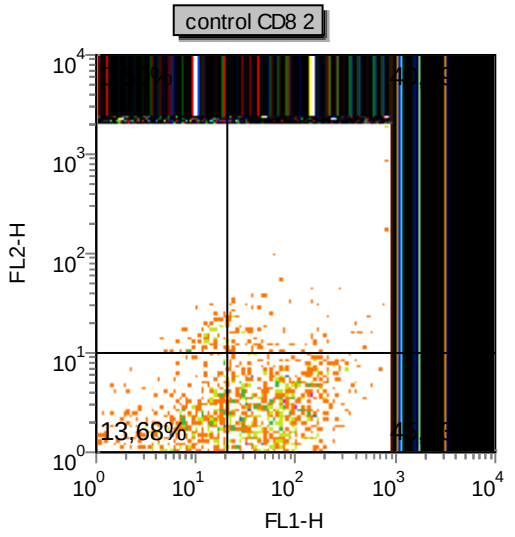

inh PGE2 CD8 2
47,78%
21,95%
26,59%
FL2-H
FL1-H

Density plots σε untreated ποντίκι.





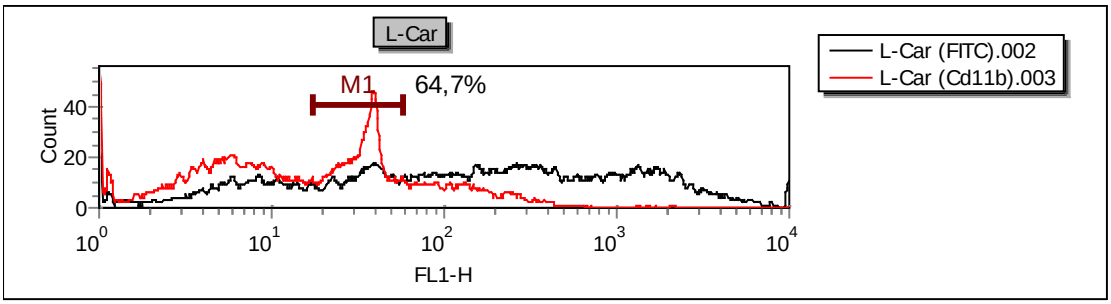


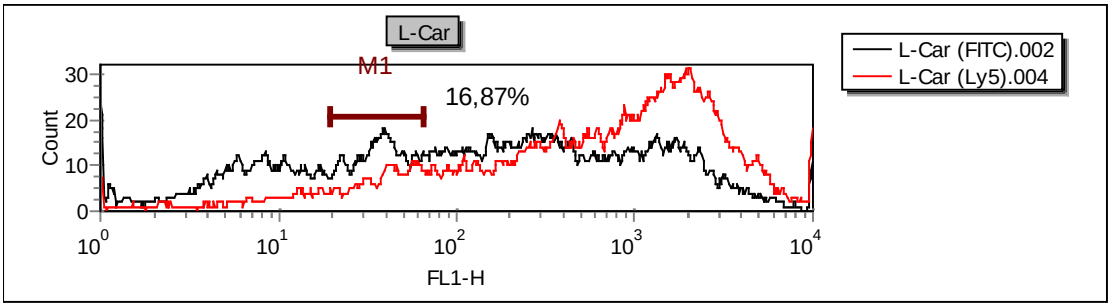


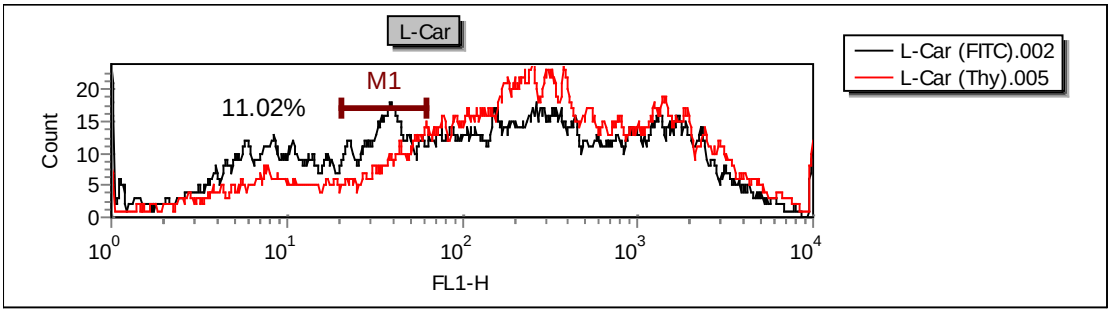
Τα density plots που παραθέσαμε ενδεικτικά είναι από τη δεύτερη επανάληψη του πειράματος. Στη συνέχεια παρατίθενται και τα ιστογράμματα από το συγκεκριμένο πείραμα.

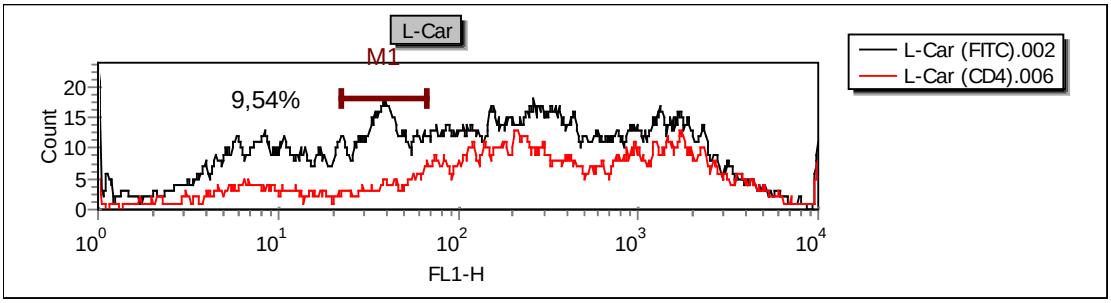
Histograms

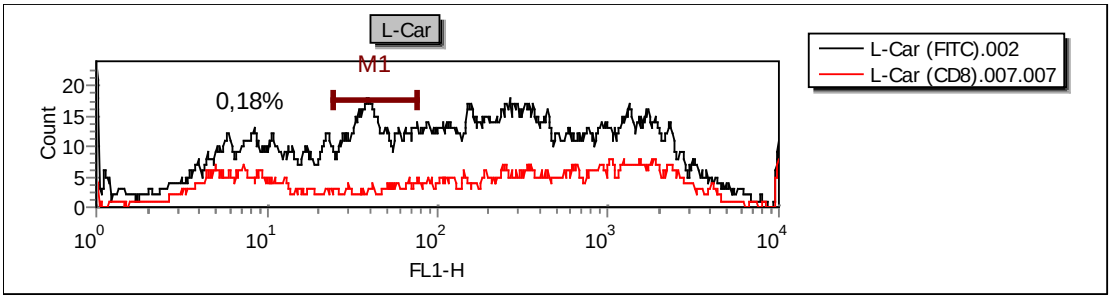
Histograms μετά από χορήγηση L-Carnitine σε ποντίκι.



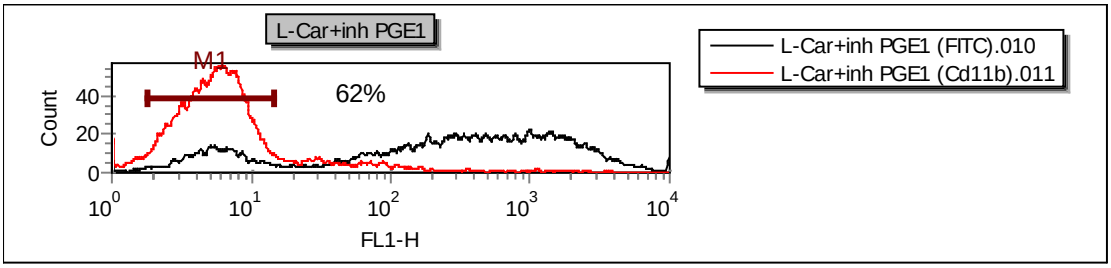


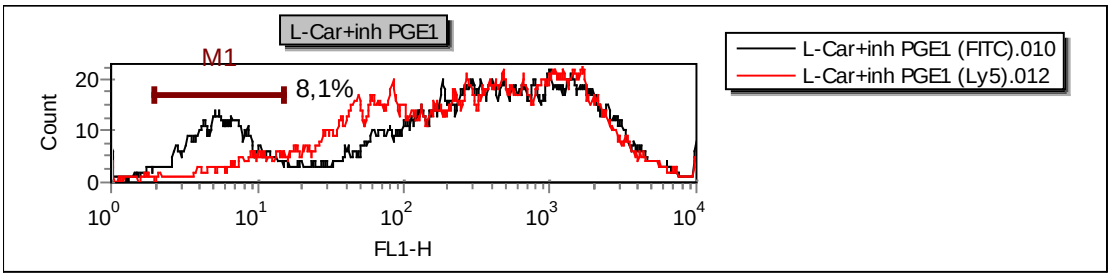


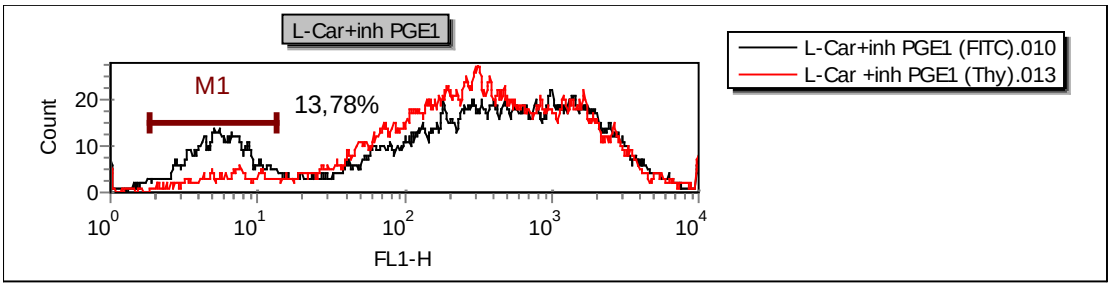


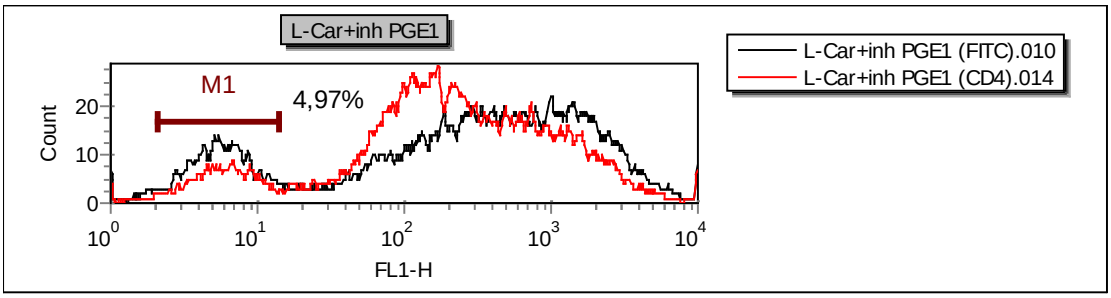


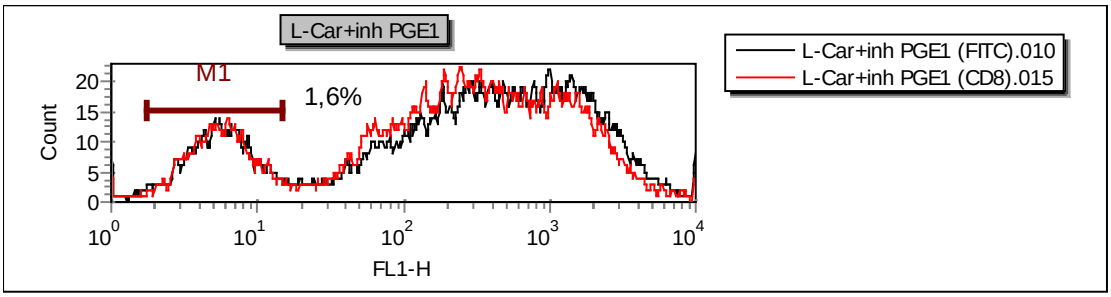
Histograms μετά από χορήγηση L-Carnitine και αναστολέα PGE1 σε ποντίκι.



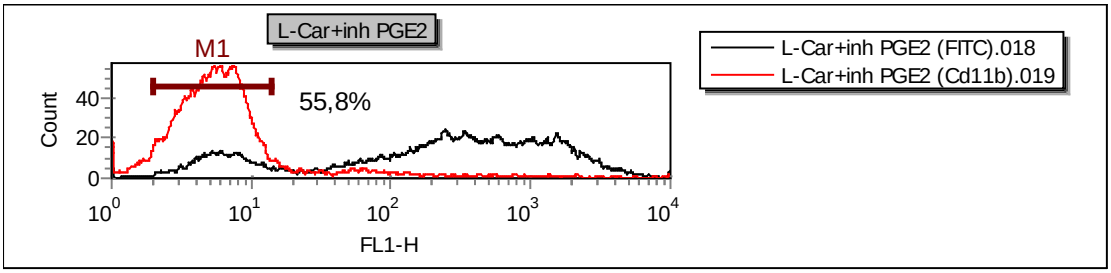


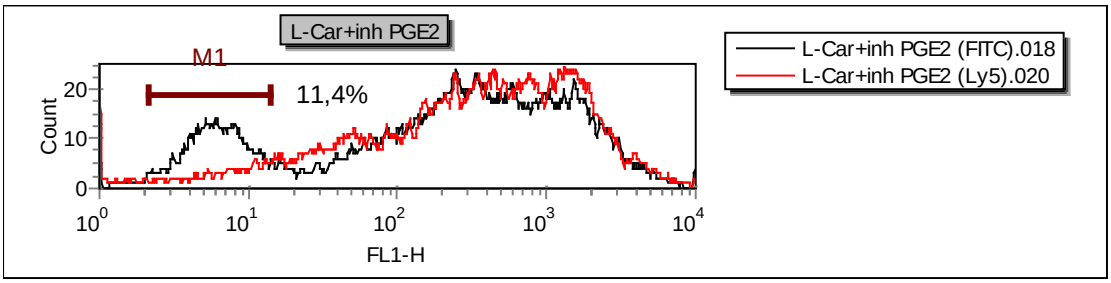


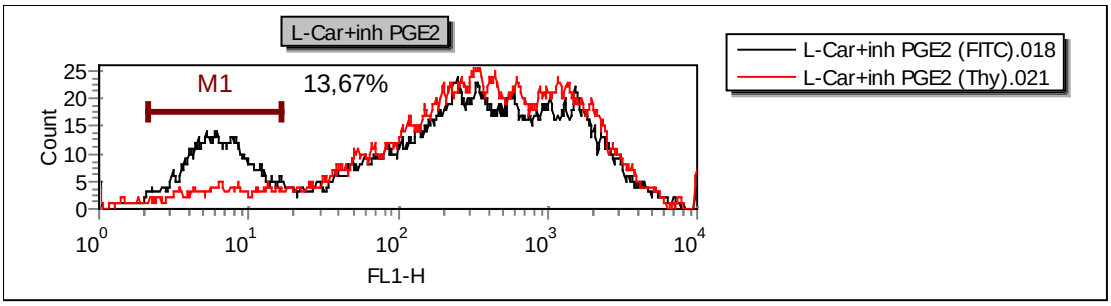


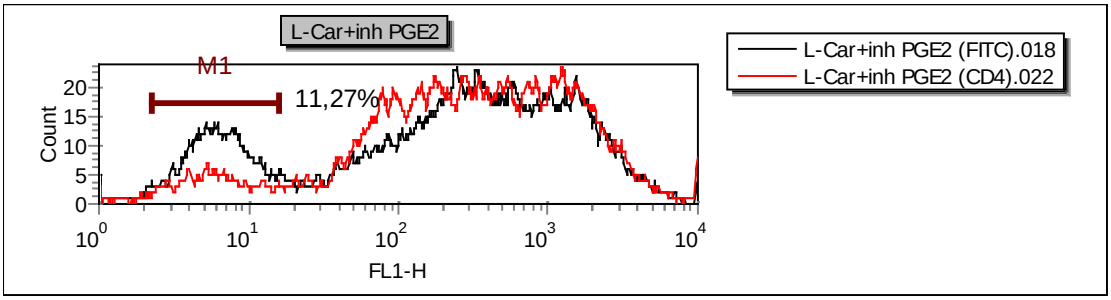


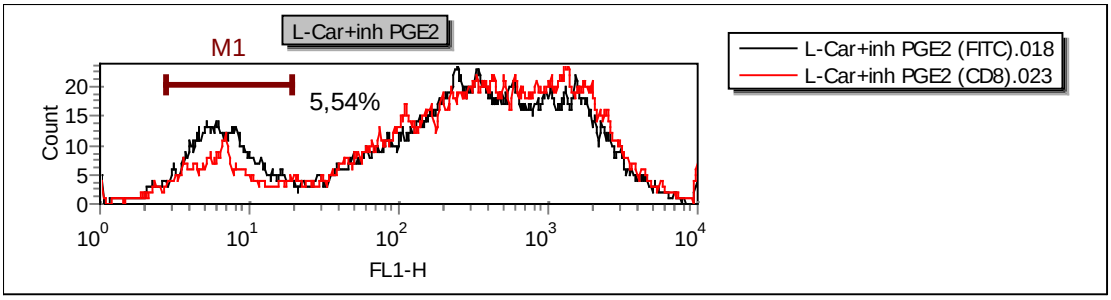
Histograms μετά από χορήγηση L-Carnitine και αναστολέα PGE2 σε ποντίκι.



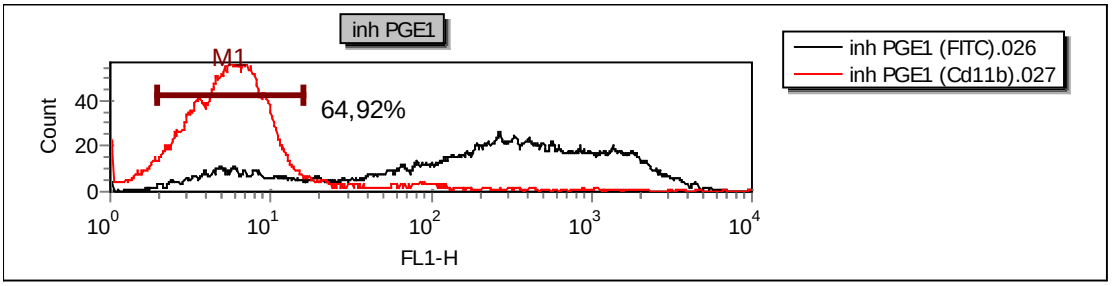


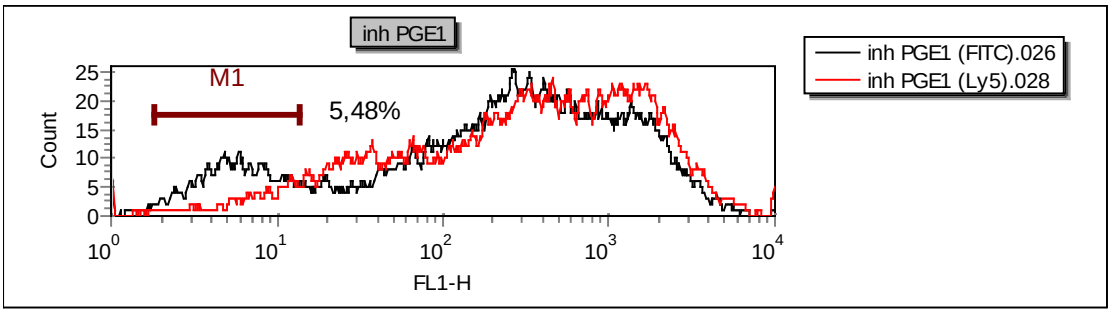


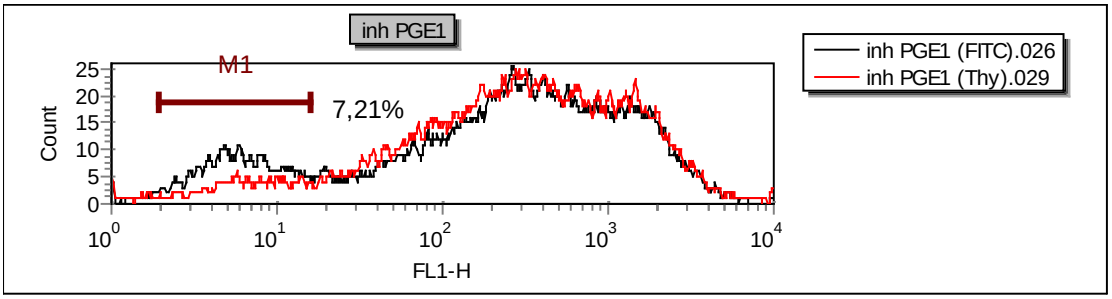


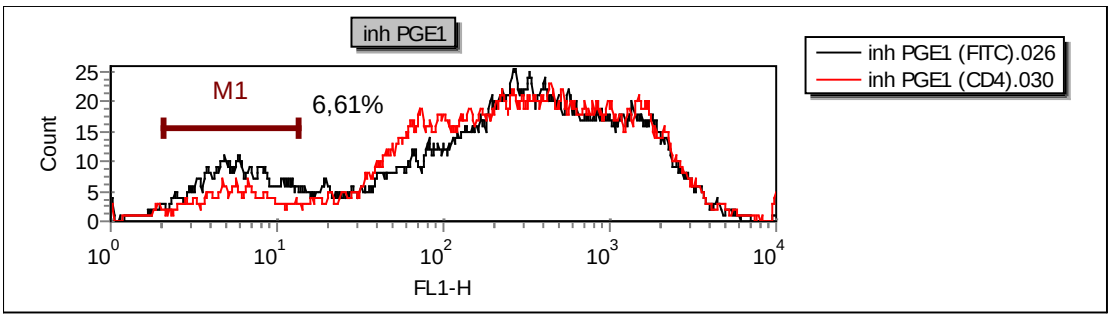


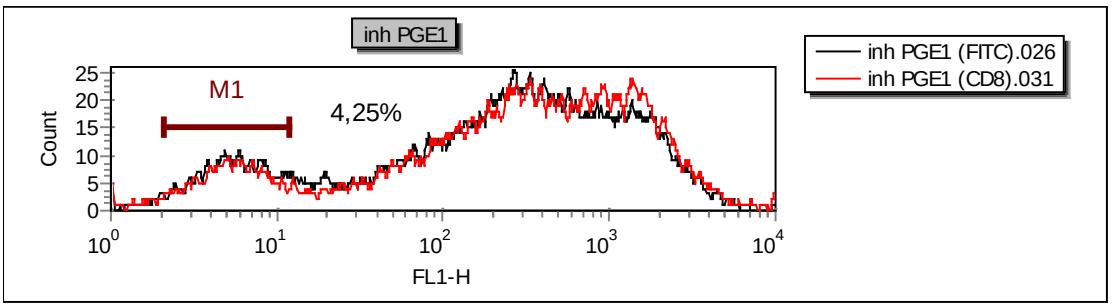
Histograms μετά από χορήγηση αναστολέα PGE1 σε ποντίκι.



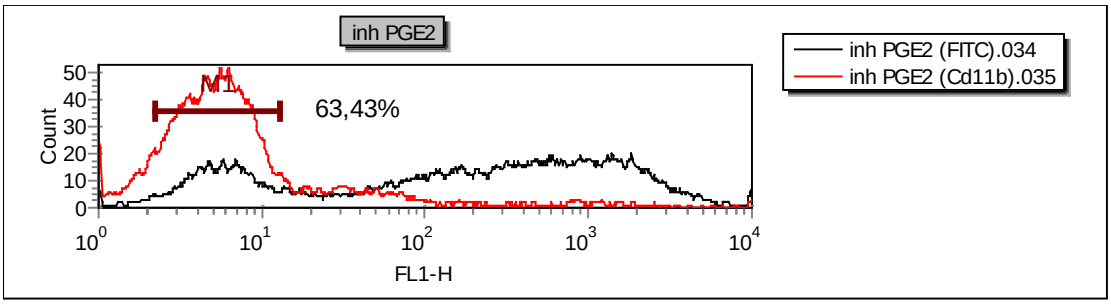


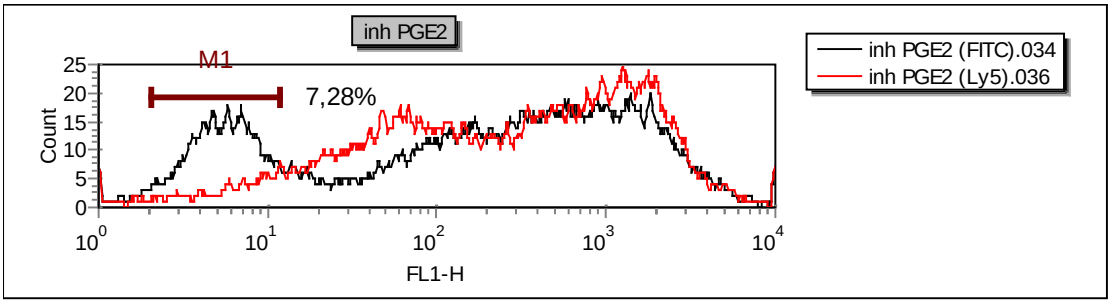


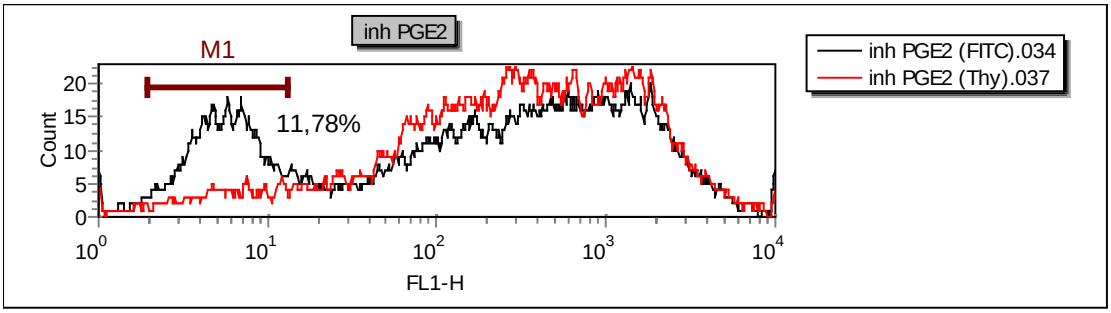


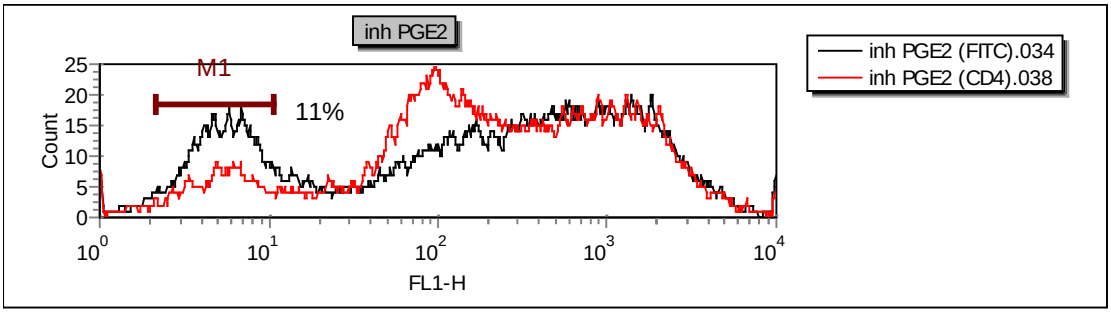


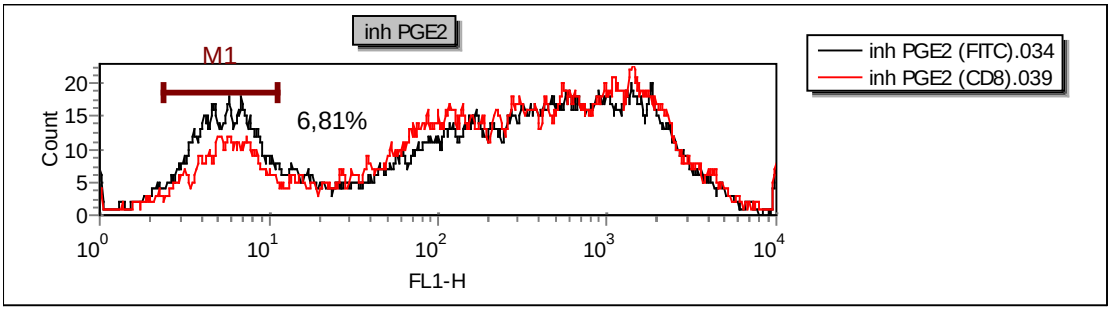
Histograms μετά από χορήγηση αναστολέα PGE2 σε ποντίκι.



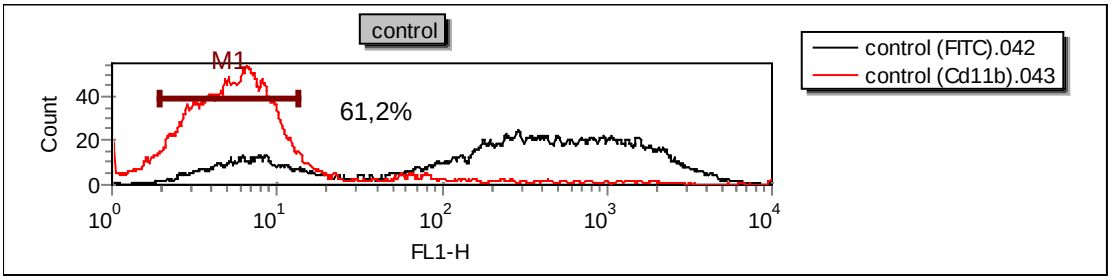


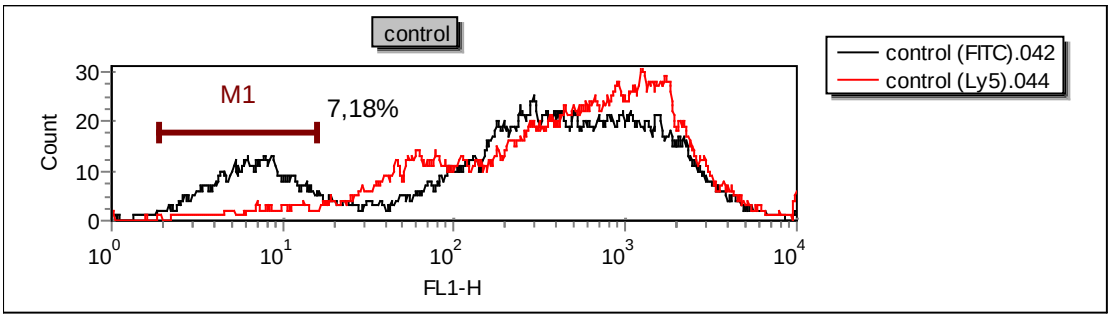


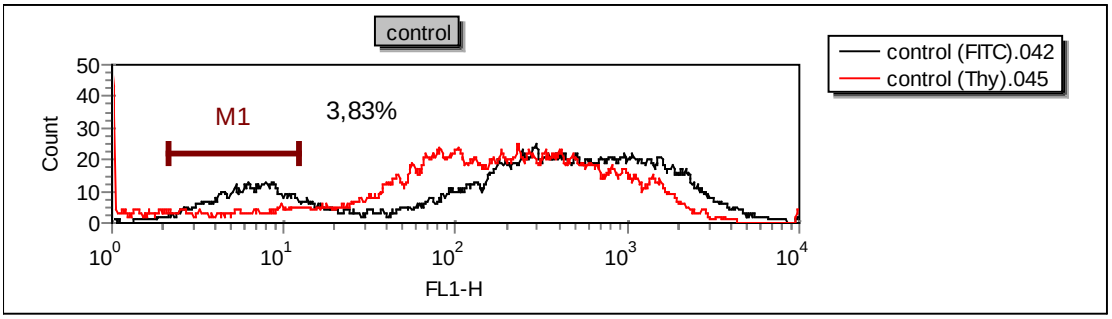


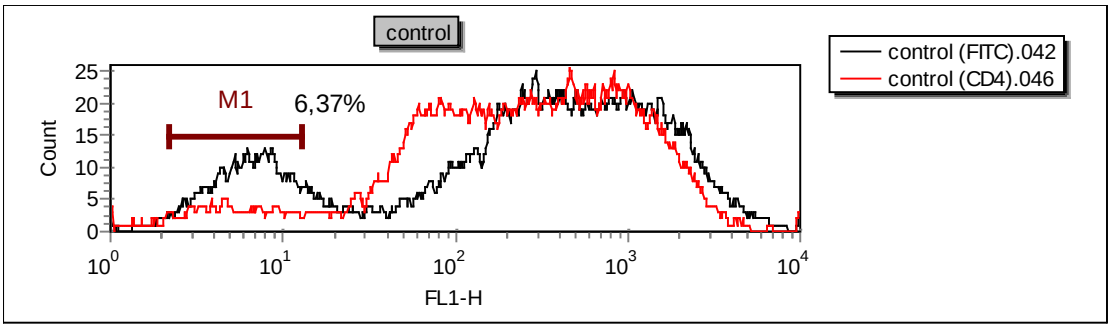


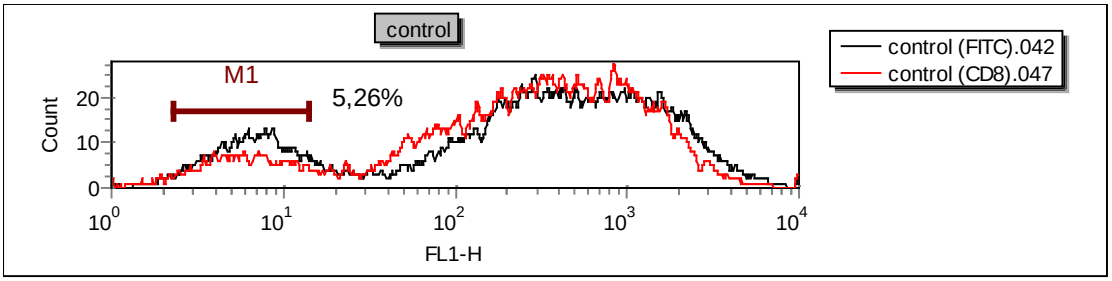
Histograms σε untreated ποντίκι.





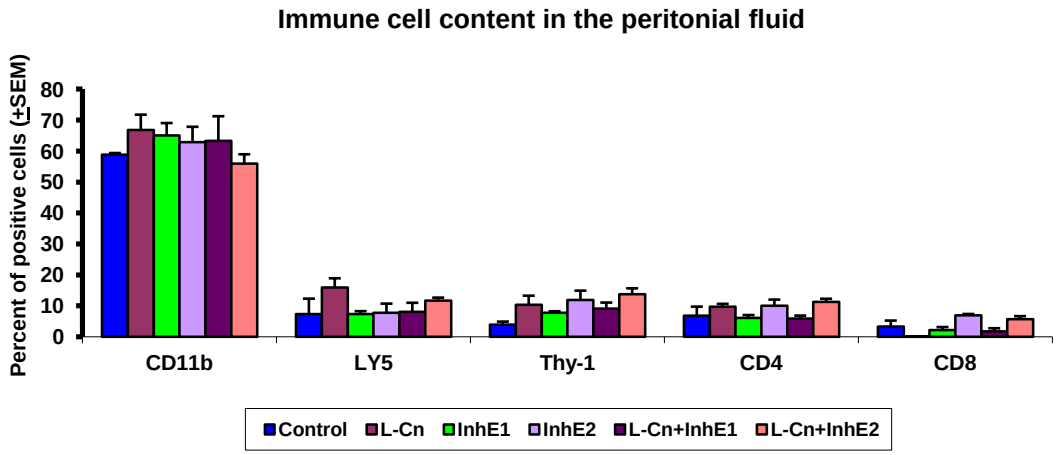






3.3 Ποσοστά φθορισμού

Το παρακάτω διάγραμμα δημιουργήθηκε από το μέσο όρο των ποσοστών που προέκυψαν από τις μετρήσεις και των τριών επαναλήψεων των πειραμάτων σύμφωνα με την κυτταρομετρία ροής. Φαίνονται στο συγκεκριμένο διάγραμμα τα ποσοστά των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο περιτοναϊκό υγρό των ποντικών των πέντε ομάδων με τα διαφορετικά treatments καθώς και του untreated ποντικιού.

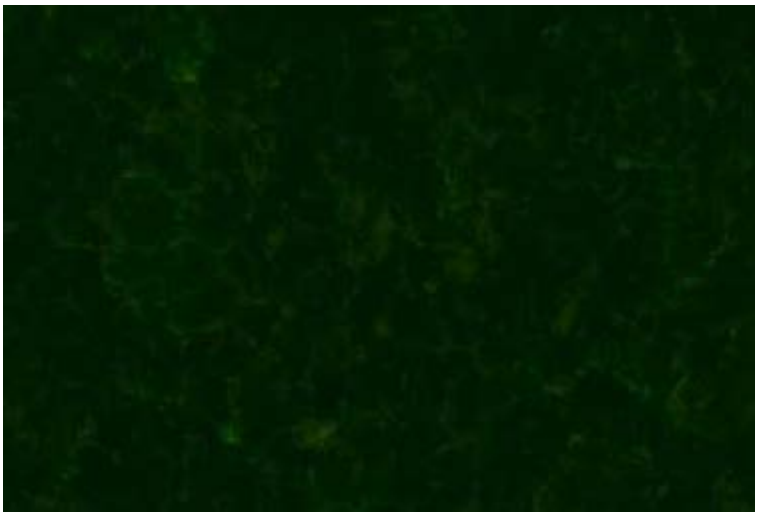


Διάγραμμα 2.9 Διαφοροποίηση του κυτταροκινικού και λεμφοκυτταρικού προφίλ στο περιτοναϊκό υγρό των ποντικιών μετά από χορήγηση L-Car και αναστολέων προσταγλανδινών PGE1 και PGE2.

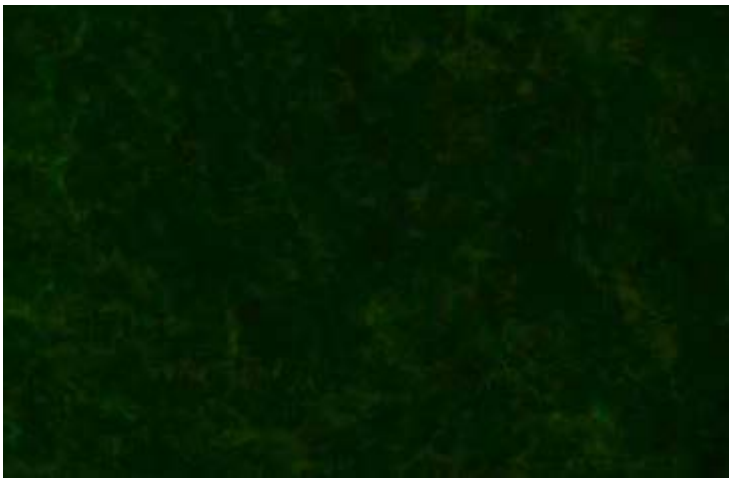
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι ο αναστολέας της προσταγλανδίνης PGE2 μειώνει την αύξηση CD11-θετικών κυττάρων που προκαλείται από την χορήγηση της καρνιτίνης στο περιτοναϊκό υγρό ($p < 0,005$).

3.4 Ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές μήτρας.

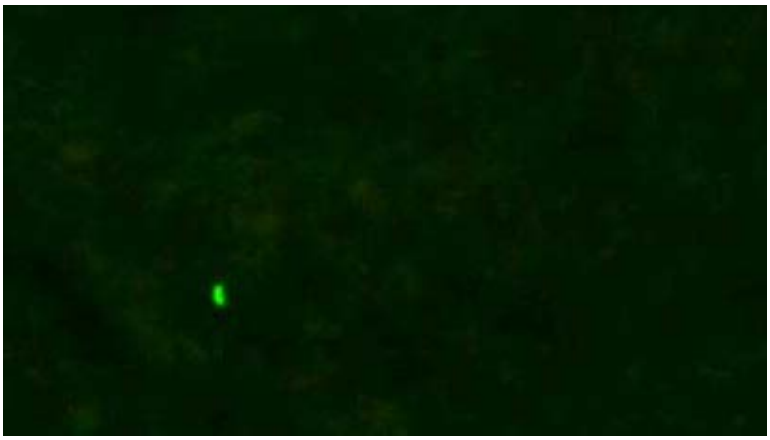
Έχοντας καταγράψει το εκκριτικό και το λεμφοκυτταρικό προφίλ των ορών αίματος και των περιτοναϊκών υγρών των ποντικιών παρουσία L-καρνιτίνης και αναστολέων των προσταγλανδινών PGE1 και PGE2, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τον τύπο των κυττάρων που εντοπίζονται στην περιοχή της μήτρας τους. Πραγματοποιήθηκαν επομένως πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε κρυοτομές από τις μήτρες αυτές. Έτσι για τον εντοπισμό των Τ-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti- Thy-1 ενώ για τον εντοπισμό των μακροφάγων το anti-CD11b. Τα αποτελέσματα που πήραμε δεν ήταν ευδιάκριτα παρ' όλα αυτά παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες εικόνες:



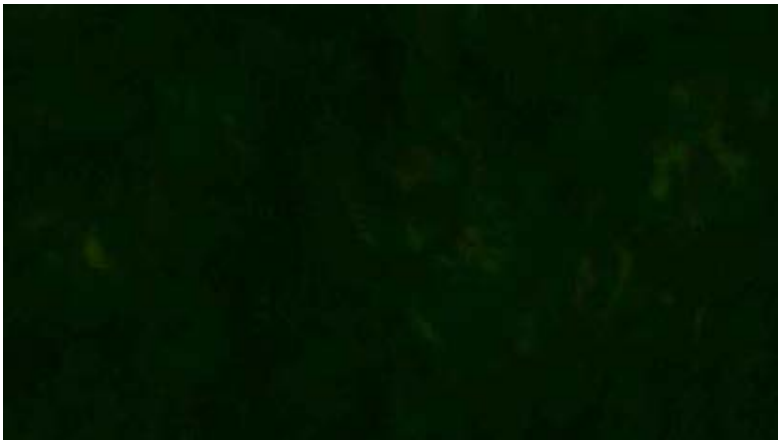
Εικόνα 2.3 Untreated ποντίκι με Thy-1.



Εικόνα 2.4 Untreated ποντίκι με CD11b.



Εικόνα 2.5 Ποντίκι μετά από L-Car με CD11b.



Εικόνα 2.6 Ποντίκι μετά από χορήγηση L-Car με Thy-1.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ενδομητρίωση παραμένει μια ευρέως διαδεδομένη και πολύπλοκη ασθένεια, η οποία εξακολουθεί να προσβάλλει ένα υψηλό ποσοστό γυναικών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πιθανές μεταβολές του ανοσοποιητικού συστήματος, ίσως παίζουν ένα ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της. Πρόκειται για μεταβολές τόσο κυτταρικής όσο και χυμικής ανοσίας, τόσο λεμφοκυτταρικού όσο και κυτταροκινικού προφίλ του οργανισμού.

Στη διάρκεια προηγούμενων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, με βάση ένα παρασκεύασμα που δεν χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό προϊόν, αλλά ως μέσο για την επίτευξη καλύτερης ενεργειακής και μυϊκής τόνωσης, την L-καρνιτίνη, φάνηκε η συμμετοχή αυτής στην επιδείνωση και την έναρξη της ενδομητρίωσης. Επίσης σε προηγούμενη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μελετήθηκε το κυτταροκινικό προφίλ που επέφερε η ινδομεθακίνη, μια αντιφλεγμονώδης ουσία που λειτουργεί ως αντι-προσταγλανδικό, συγκριτικά με αυτό που προκαλούσε η καρνιτίνη.

Επίσης προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η L-καρνιτίνη μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία μιας παθολογικής κατάστασης που μοιάζει με ενδομητρίωση. Την ίδια στιγμή, η L-Cn αποδείχθηκε ότι αυξάνει την παραγωγή της PGE2 και PGE1 από τα μακροφάγα αλλά και τα T και B λεμφοκύτταρα. Η αύξηση στα φλεγμονώδη κύτταρα στη μήτρα και στην περιτοναϊκή κοιλότητα κατά τη διάρκεια της in vivo χορήγησης της L-Cn θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία ενισχυμένη παραγωγή των PGs, η οποία έχει πράγματι φανεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της ενδομητρίωσης. Σε μια τέτοια περίπτωση, η αναστολή των προσταγλανδινών θα ελαφρύνει την in vivo επαγωγή των αποτελεσμάτων από την L- καρνιτίνη. Αυτή η μελέτη σχεδιάστηκε για να εξετάσει αν τα ειδικά ανάλογα των PGE1 και PGE2 θα μπορούσαν να αντιστρέψουν τη φλεγμονώδη δράση από την L-Cn στη μήτρα.

Γνωρίζοντας ότι ένας από τους τρόπους δράσης της L-καρνιτίνης στον οργανισμό είναι μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών και γνωρίζοντας επίσης ότι τα ανάλογα των προσταγλανδινών E1 και E2 αναστέλλουν τη

σύνθεση των συγκεκριμένων προσταγλανδινών, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε το κυτταροκινικό και λεμφοκυτταρικό προφίλ που επέφεραν οι αναστολείς των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 συγκριτικά με αυτό που προκαλούσε η καρνιτίνη, αλλά και το κυτταροκινιτικό και λεμφοκυτταρικό προφίλ έπειτα από το συνδυασμό των δύο ουσιών.

Οι κυτταροκίνες, οι οποίες υπηρετούν ένα σημαντικό σύνδεσμο αμοιβαίας επικοινωνίας μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του ενδοκρινικού και αναπαραγωγικού συστήματος, ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με ενδομητρίωση. Η ανεξέλεγκτη παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στην περίπτωση της ενδομητρίωσης, εμπλέκεται στην αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών, της οιστρόνης καθώς και στην εμφάνιση φλεγμονής. Ευνοώντας έτσι την υψηλή βιωσιμότητα και αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ενδομήτριου καθώς και τη δημιουργία των αιμοφόρων αγγείων.

Ως μοντέλο, για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια του γένους BALB/c γιατί η τεχνητή ανάπτυξη ενδομητρίωσης σε αυτά, παρέχει πολλά πλεονεκτήματα δεδομένου του ότι αποτελείται από ένα καλά μελετημένο ανοσοποιητικό σύστημα και γονιδίωμα. Επιπλέον, η σχετική μορφολογία αλλά και οι παρόμοιες συνέπειες της ασθένειας στο μοντέλο αυτό, σχετικά με τον ανθρώπινο οργανισμό το καθιστούν το καταλληλότερο για την μελέτη της ενδομητρίωσης.

Μελετήσαμε λοιπόν κατά πόσο η in vivo χορήγηση L-καρνιτίνης επηρεάζει το κυτταροκινικό προφίλ στον ορό αίματος ποντικιών BALB/c.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένες συγκεντρώσεις όλων των προς μελέτη κυτταροκινών που είναι οι IL-2, IL-4, TNF-a, IFN-γ και συμμετέχουν σε καταστάσεις φλεγμονής καθώς και δημιουργία έκτοπου ενδομητρίου. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύονται και από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των παραπάνω κυτταροκινών σε ασθενείς με ενδομητρίωση, όπως έδειξαν και προηγούμενες μελέτες συνδυάζοντας τις κυτταροκίνες αυτές με την πρόκληση και εξέλιξη της ασθένειας.**[4-6,25-26,35-36]**

Ωστόσο, πέρα από τις κυτταροκίνες, με την ασθένεια της ενδομητρίωσης εμπλέκεται και η έκκριση αυξητικών παραγόντων, όπως ο VEGF και ο IGF-1, όπου πρόκειται για ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη δημιουργία νέων αγγείων και την τροφοδοσία των ενδομητριωμάτων, καθώς και ο GM-CSF που εμπλέκεται στην ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρίου.

Στην παρούσα εργασία όπου μελετήθηκαν οι GM-CSF και IGF-1 φάνηκε να είναι ιδιαίτερα αυξημένοι έπειτα από χορήγηση L-καρνιτίνης γεγονός το οποίο υποστηρίζεται μέσα από έρευνες και από ασθενείς με ενδομητρίωση.**[7-8,37-38]** Ο παράγοντας IGF-1 παρουσιάζεται αυξημένος σε ποσοστό 140%. Ωστόσο, όσον αφορά το GM-CSF που στη συγκεκριμένη έρευνα αυξάνεται κατά 60%, δεν φαίνεται να παρουσιάζει ένα σταθερό προφίλ σε ασθενείς με ενδομητρίωση, εφόσον προηγούμενες έρευνες έδειξαν είτε την αύξηση είτε τη μείωση του παράγοντα αυτού.**[5,26,39-40]**

Θέλοντας στη συνέχεια να διερευνήσουμε κατά πόσο η έκκριση των παραπάνω κυτταροκινών από την καρνιτίνη, οφείλεται στη δράση της μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών, μελετήσαμε το κυτταροκινικό προφίλ που επέφεραν οι αναστολείς των προσταγλανδινών PGE1 και PGE2, ανάλογα των προσταγλανδινών που εμποδίζουν τη σύνθεση των συγκεκριμένων προσταγλανδινών.

Όλοι οι υπό μελέτη παράγοντες σημείωσαν ποσοστά μείωσης σε σχέση με αυτά έπειτα από τη χορήγηση καρνιτίνης καθώς και από τον αρνητικό μάρτυρα.

Όσον αφορά την καρνιτίνη, αναφέρεται ότι μπορεί να δράσει μέσω διάφορων μονοπατιών, όπως μεταβάλλοντας τη σύνθεση και τον μεταβολισμό της οιστραδιόλης, αλλάζοντας τα επίπεδα παραγωγής προ-φλεγμονωδών αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών ή και μέσω μη σωστής έκφρασης επιδιορθωτικών ενζύμων, επιφέροντας εν τέλει τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης.

Επομένως, σε δυο άλλες ομάδες πειραματόζωων, χορηγήθηκαν ταυτόχρονα και οι δυο ουσίες, δηλαδή καρνιτίνη με αναστολέα PGE1 και καρνιτίνη με αναστολέα PGE2,με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο η υψηλή αύξηση των

συγκεκριμένων κυτταροκινών που πραγματοποιείται μετά τη χορήγηση της καρνιτίνης, οφείλεται στη δράση της μέσω του μονοπατιού των συγκεκριμένων προσταγλανδινών.

Επιλέχθηκε η συγχρονισμένη χορήγηση τους, λόγω του ότι οι προσταγλανδίνες έχουν μικρό χρονικό διάστημα ημιζωής.

Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η καρνιτίνη δρα μέσω του μονοπατιού των προσταγλανδινών, αλλάζοντας τα επίπεδα των COX-2 και PGE2 και κατ' επέκταση μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων, εφόσον μετά τη χορήγηση της καρνιτίνης και των αναστολέων PGE1 και PGE2 η παραγωγή αυτών των κυτταροκινών στη πρώτη περίπτωση αυξάνεται ενώ στη δεύτερη δεν επηρεάζεται.

Στη συνέχεια εξετάσαμε με τον ίδιο τρόπο και τα περιτοναϊκά υγρά των ποντικιών όλων των ομάδων. Προσπαθήσαμε να μελετήσουμε το κυτταροκινικό και λεμφοκυτταρικό προφίλ που επέφεραν οι αναστολείς των προσταγλανδινών Ε1 και Ε2 συγκριτικά με αυτό που προκαλούσε η καρνιτίνη, αλλά και το κυτταροκινιτικό και λεμφοκυτταρικό προφίλ έπειτα από το συνδυασμό των δύο ουσιών.**[41-43]**

Τα αποτελέσματα που πήραμε από την εξέταση των περιτοναϊκών υγρών με ELISA για τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες συνάδουν με τα αποτελέσματα στους ορούς των ποντικιών. Είχαμε δηλαδή αυξημένα ποσοστά σε όλες τις κυτταροκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Ως εκ τούτου, είναι ενδιαφέρον ότι, η PGE1 επιδείνωσε τα επαγώμενα από την L-καρνιτίνη αποτελέσματα, ενώ η PGE2 αντέστρεψε την κακοήθεια. Έτσι, το PGE2 ανάλογο έδειξε ότι μειώνει τη επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό και «αφαίρεσε» τις επιδράσεις από την L-Cn στο ενδομήτριο. Πράγματι, πολλά στοιχεία δείχνουν ότι η PGE2 ρυθμίζει πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντιαπόπτωση, την καταστολή του ανοσοποιητικού, και την αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ενδομητρίωσης, υποδεικνύοντας ότι η

PGE2 θα μπορούσε να είναι ένα μόριο στόχος για τη θεραπεία της ενδομητρίωσης

Όσον αφορά τα αποτελέσματα μετά την κυτταρομετρία ροής αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η προφανής συσσώρευση CD90 και CD11 κυττάρων μετά από επταήμερη θεραπεία θηλυκών ποντικιών με χορήγηση καρνιτίνης. Παρατηρήθηκε λοιπόν υψηλή συγκέντρωση λεμφοκυττάρων και κυρίως μακροφάγων, που θεωρούνται υπεύθυνα για την έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων μετά από χορήγηση καρνιτίνης, αναστολέων προσταγλανδινών PGE1 και PGE2 και τη συνδυασμένη δράση αυτών με καρνιτίνη.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ:

- Ενδομητρίωση – Αδενομύωση
  Ματαλλιωτάκης Ι., Πανίδης Δ., Κουμαντάκης Γ., Γούμενου Α., Κουμαντάκης Ε.
  Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Ανοσολογία
  Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J.
  Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Indroduction to Immunology. 11th Hour
  Janet M. Decker
- Essential Reproduction
  Johnson M., Everitt B.
- Cytokines in Human Reproduction
  Edited by Joseph A. Hill, M.D.
- The Immunology of Human Reproduction
  Manyonda I.
- Endomitriosis in Clinical Practice
  Edited by Olive D.
- Βιοχημεία
  Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L.
  Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης

ΑΡΘΡΑ:

1. Halis G., Arici A. (2004). Endometriosis and inflammation in infertility. Ann N Y Acad Sci., 1034, 300-315.
2. Kennedy S. (1999). The genetics of endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 82(2), 129-133.

3. Halis G., Arici A. (2004). Endometriosis and inflammation in Infertility. Annals of the New York Academy of sciences, 1034 (1), 300-315.
4. Brosens I., Campo R., Gordts S. (2002). Reproductivedisorders affecting fertility in endometriosis. Reprod Biomed Online, 5, 59-63.
5. Doody M.C., Gibbons W.E., Buttram V.C. (1988). Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence of an abnormality of follicular growth in endometriosis patients. Fertility Sterility, 47-49.
6. Simon C., Gutierrez A., Vidal A., M.J De los Santos, J.J Tarin and J Remohi et al. (1994). Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction results from in vitro fertilization and oocyte donation, Hum Reprod, 9, 725-729.
7. Pelicer A., Oliveira N., Ruiz A., Remohi J., Simon C. (1995). Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction, Hum Reprod, 10, 91-97.
8. Brizek C.L., Schlaff S., Pellegrini V.A., Frank J.B. and Worrilow K.C. (1995). Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis-an association with endometriosis. J Assist Reprod Genet, 12, 106-112.
9. Kao L.C., Gemeyer A., Tulac C., Lobo S., Yang J.P., Taylor R.N., Osteen K., Lessey B.A., Giudice L.C. (2003). Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate for disease-based implantation failure and infertility. Endocrinology, vol.144, No 7, 2870-2881.
10. Vassiliadis S., Relakis K., Papageorgiou A., Athanassakis I. (2005). Endometriosis and Infertility : A multi- cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. Clinical & Developmental Immunology, 12(2), 125-129.
11. Druckmann R., Rohi U.D. (2002). IGF-1 in gynecology and obstetrics. 41(1), 65-83.
12. Harada T., Iwabe T., (2001). Role of cytokines in endometriosis. Fertil Steril, 76(1), 1-10.

13. Koyama N., Matsuura K., Okamura H. (1993). Cytokine in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. Intn J Gynecol Obstet, 43(1), 45-50.
14. Wu M-Y, Ho H-N (2003). The role of cytokines in Endometriosis. Am J Reprod Immunol, 49(5), 285-269.
15. Iwabe T., Harada T., Terakawa N. (2002). Role of cytokines in Endometriosis –Associated Infertility. Department of Obstetrics and Gynecology, 53, 19-25.
16. Heemskerk V.H., Daemen M.A., Buurman W.A. (1999). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev., 10(1), 5-14.
17. Pellicer, A. Albert, C. Mercader, A.Bonilla Musoles, F. Remohi, J.Simon, C.Citation (1998). The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. Fertil-Steril, 70(3), 425-431.
18. Kyama C., Overbergh L., Debrock S., Valckx D., Vander Perre S., Meuleman C., Mihalyi A., Mwenda J., Mathieu J., D' Hooghe T. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase inn women with endometriosis. Fertility and Sterility, Volume 85, Issue 6, 1667-1675.
19. Tasuku Harada, Akiko Enatsu, Masahiro Mitsunari, Yorie Negano, Masayuki Ito, Toshiyuki Tsudo, Fuminori Taniguchi, Tomio Iwabe, Masahiro Tanikawa, Naoki Terakawa (1999). Role of Cytokines in Progression of Endometriosis. Gynecologic and Obstetric Investigation, 47, 34-40.

20. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N., Jaffe RB, Taylor RN (1996). Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 3112-3118.

21. Donnez J., Smoes P., Gillerot S., Casanas-Roux F., Nisolle M. (1990). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Human Reproduction, 13, 1680-1690.
22. Bremer J. (1977). Carnitine and its role inn fatty acid metabolism. Trends Biochemistry Science, 2, 207-209.
23. Arenas J., Rubio C., Martin M., Campos Y. (1998). Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism. Early Human Development, 53, 43-50.
24. Sherman L.M. (1984). The role of prostaglandins in obstetrics/gynecology. Endocrinol Spec Top Metabol, 6, 141-161.
25. Qiao L., Kozoni L. and Tsioulias G.J. et al. (1995). Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. Biochemica et Biophysica Acta, 1258, 215-223.
26. Taketo M.M. (1998). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II), J Natl Cancer Inst, 90, 1609-1620.
27. Kauppila A., Puolakka J., Ylikorkala O. (1979). Prostaglandin Biosynthesis inhibitors and endometriosis. Prostaglandins, 18(4), 655-661.
28. Athanassakis I., Dionyssopoulou E., Papanikou S., Evangeliou A., Vassiliadis S. (2003). Early events of the exogenously provided L-carnitine in murine macrophages, T- and B- lymphocytes: modulation of prostaglandin E1 and E2 production in response to arachidonic acid. Journal of Nutritional Biochemistry Science, 2, 207-209.
29. Kitawaki,J., Kado N., Ishihara H., Koshiba H., Kitaoka Y., Honjo H. (2002). Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. J Steroid Biochem Mol Biol, 83(1-5), 149-155.
30. Kitawaki J., Obayashi H., Kado N., Ishihara H., Koshiba H., Maruya E. et al (2002). Association of HLA class I and class II alleles with susceptibility to endometriosis. Hum Immunol, 63(11), 1033-1038.
31. Kitawaki J., Obayashi H., Ohta M., Kado N., Ishihara H., Koshiba H. et al.(2002). Genetic contribution of the interleukin-10 promoter polymorphism in endometriosis susceptibility. Am J Reprod Immunol, 47(1), 12-18.

32. Noble L., Takayama K., Zeitoun K.M., Putman J.M., Johns D.A., Hinshelwood M.M. et al. (1997). Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. J Clin Endocrinol Metab, 82(2), 600-606.
33. Bulun S. E., Yang S., Fang Z., Gurates B., Tamura M., Sebastian S. (2002). Estrogen production and metabolism in endometriosis. Ann N Y Acad Sci, 955, 75-85; discussion 86-78, 396-406.
34. Bulun S. E., Zeitoun K., Sasano H., Simpson E.R. (1999). Aromatase in aging women. Semin Reprod Endocrinol, 17(4), 349-358.
35. Nielse G.L., Sorensen H.T., Larsen H., Padersen L. (2001). Risk of adverse birth outcome and miscarriage in pregnant users fo non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based observational study and case-control study. BMJ, 322, 266-270.
36. Matalliotakis I.M., Goumenou A.G., Koumantakis G.E., Neonaki M.A., Koumantakis E.E., Dionyssopoulou E., Athanassakis I. and Vassiliadis S. (2003). Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. Int Immunopharmacol, 3(1), 81-89.
37. Dionyssopoulou E., Vassiliadis S. Evangeliou A., Koumantakis E.E., Athanassakis I. (2005). Constitutive or induced elevated levels of L-carnitine correlate with the cytokine and cellular profile of endometriosis. Journal of Reproductive Immunology, 65, 159-170.
38. Heryanto B., Rogers PA. (2002). Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. Reproduction, 123(1), 107-113.
39. Fujishita A., Nakane P., Koji T., Masuzaki H., Chavez R.O., Yamabe T., Ishimaru T. (1997). Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Fertility and Sterility, 67, 856-864.
40. Halme J., Hammond MG., Syrop CH., Talbert LM. (1985). Peritoneal macrophages modulate human granulose-luteal cell progesterone production. J. Clin. Endocrinol Metab., 61(5), 912-916.
41. Simon C. and Polan M.L. (1994). Cytokines and reproduction. West J Med., 160(5), 425-429.

42. Ruth S., Rappaport S., Dodgfe G.R. (1981). Prostaglandin E inhibits the reproduction of human interleukin 2. J. Exp. Med., 155, 943-948.
43. Betz M., Fox BS. (1991). Prostaglandin E_2 inhibits production of Thy-1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. The Journal of Immunology, 146(1), 108-113.