

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ
ΝΟΣΩΝ

Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής
Γεώργιος Ν. Κουκούλης

**Ο ρόλος των νευροπεπτιδίων της οικογένειας του
εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης και
των ουροκορτινών στην αλληλεπίδραση των
μακροφάγων με το αγγειακό ενδοθήλιο**

Σοφία Γ. Γκούγκουρα
Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δέσποινα Κυριάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παναγιώτης Λιάκος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Ν.Κουκούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

(Επιβλέπων)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Δέσποινα Κυριάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παναγιώτης Λιάκος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Ν.Κουκούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στεφανίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νικόλαος Σακελλαρίδης, Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Φίλιππος Τρυποσκιάδης, Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Κ. Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου

Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ πάνω από όλους τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής αυτής κ. Γεώργιο Κουκούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη βοήθεια (επιστημονική και ηθική) και τις συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια. Εξίσου θερμά ευχαριστώ και τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Λιάκο για την πολύτιμη βοήθειά του στο σχεδιασμό των πειραμάτων, αλλά και στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη καθώς ήταν παρών σε κάθε δυσκολία και πρόβλημα που προέκυπτε. Η πραγματοποίηση της διατριβής δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την συμβολή των δύο αυτών ανθρώπων, οι οποίοι υπήρξαν πέραν όλων δάσκαλοι επιστημονικής γνώσης, σκέψης και εμπειρίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην καθηγήτρια κα. Δέσποινα Κυριάκου για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ένα ευχαριστώ οφείλω και στους καθηγητές κ. Ανδρέα Μαργιωρή, κ. Χρήστο Τσατσάνη και κ. Αχιλλέα Γραβάνη για την φιλοξενία τους στην Ιατρική Σχολή Ηρακλείου καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας.

Ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπων υπήρξαν συνεργάτες αλλά και φίλοι αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Αιμοδοσίας και Μεταγγίσεων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας για τη συνεργασία τους. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Βίκη Μηνά για την ευχάριστη συνεργασία της.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη δική της βοήθεια και στήριξη και σε αυτήν μου την προσπάθεια.

Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought.

Albert Szent-Györgi (1893-1986) U.S. biochemist.
Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1937

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	σελ 15
Summary	σελ 17
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	σελ 19
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ 22
1.1 Ο μηχανισμός του στρες	σελ 22
1.1.1 Διατήρηση της ομοιοστασίας	σελ 22
1.1.2 Ο ΥΥΕ άξονας	σελ 24
1.1.3 Τα γλυκοκορτικοειδή	σελ 24
1.2 Νεύρο-ενδοκρινικό σύστημα – Νευροπεπτίδια της οικογένειας του CRH	σελ 25
1.2.1 Νευροπεπτίδια	σελ 25
1.2.2 Ο υποθάλαμο- υποφύσιο- επινεφριδιακός (ΥΥΕ) άξονας.....	σελ 26
1.3 Η οικογένεια των πεπτιδίων του στρες	σελ 27
1.3.1 Ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH)	σελ 28
1.3.2 Urocortins (UCNs)	σελ 28
1.3.3 Χαρακτηριστικά και ρύθμιση των γονιδίων CRH και UCN	σελ 29
1.4 Υποδοχείς CRH	σελ 30
1.4.1 Οι υποδοχείς CRHR ₁ και CRHR ₂	σελ 30
1.4.2 sCRHR _{2a} (soluble CRF _{2a})	σελ 32
1.4.3 CRH – binding protein (CRH-BP)	σελ 33
1.4.4 Ανταγωνιστές των υποδοχέων CRH	σελ 33
1.4.5 Σηματοδότηση υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες	σελ 34
1.4.6 Ρύθμιση των υποδοχέων CRH.....	σελ 36

1.5 Ο ρόλος των πεπτιδίων του στρες στο κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την απόκριση στο στρες	σελ 36
1.6 Στοιχεία φυσιολογίας ποντικών με ομόζυγη απαλοιφή των γονιδίων CRH, UCN1, CRHR₁ και CRHR₂	σελ 38
1.6.1 <i>crh</i> ^{-/-}	σελ 38
1.6.2 <i>ucn</i> ^{-/-}	σελ 39
1.6.3 <i>crhr</i> ₁ ^{-/-}	σελ 40
1.6.4 <i>crhr</i> ₂ ^{-/-}	σελ 40
1.6.5 <i>crhr</i> ₁ ^{-/-} / <i>crhr</i> ₂ ^{-/-}	σελ 41
1.7 Πεπτίδια του στρες και περιφερική δράση	σελ 41
1.7.1 Επιδράσεις της οικογένειας των ουροκορτινών στην περιφέρεια	σελ 42
1.7.2 Πεπτίδια του στρες και απόπτωση	σελ 44
1.8 Νευροενδοκρινικό- ανοσοποιητικό σύστημα	σελ 45
1.8.1 Αλληλεπίδραση νευροενδοκρινικού- ανοσοποιητικού Συστήματος	σελ 45
1.8.2 Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην ανοσοαπάντηση	σελ 47
1.8.3 Παρουσία πεπτιδίων του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα	σελ 48
1.8.4 Υποδοχείς της CRH στο ανοσοποιητικό σύστημα	σελ 50
1.8.5 Δράσεις των πεπτιδίων του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα	σελ 51
1.8.5.1 In vivo	σελ 51
Προφλεγμονώδεις δράσεις	σελ 51
Αντιφλεγμονώδεις δράσεις	σελ 52
1.8.5.2 In vitro	σελ 53

1.9 Μοντέλα φλεγμονής σε διαγονιδιακά CRH (CRH- Tg), <i>crhr₁^{-/-}</i> και <i>crh^{-/-}</i> ζώα	σελ 54
1.9.1 CRH- Tg ζώα και φλεγμονή	σελ 54
1.9.2 Φλεγμονή σε διαγονιδιακά ποντίκια <i>crhr₁^{-/-}</i>	σελ 55
1.9.3 Φλεγμονή σε διαγονιδιακά ποντίκια <i>crh^{-/-}</i>	σελ 56
1.9.3.1 Επαγόμενη με carrageenin άσηπτη φλεγμονή	σελ 56
1.9.3.2 Η ενεργοποίηση του NFκΒ σε οξεία φλεγμονή επαγόμενη από LPS	σελ 57
1.9.3.3 Φλεγμονή επαγόμενη από turpentine	σελ 57
1.10 Φλεγμονή	σελ 58
1.10.1 Γενικά στοιχεία φλεγμονής	σελ 58
1.10.2 Διαμεσολαβητές φλεγμονής	σελ 61
1.10.3 Φλεγμονώδης δράση CRH	σελ 64
1.11 Φλεγμονή του ενδοθηλίου	σελ 66
1.11.1 Η φλεγμονή διατρέχει όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης	σελ 66
1.11.2 Πρώτα στάδια αθηροσκλήρωσης – ενδογενής (φυσική) και επίκτητη ανοσία	σελ 67
Ενδογενής ανοσία	σελ 67
Επίκτητη ανοσία	σελ 68
1.11.3 Th ₁ και Th ₂ ισορροπία	σελ 68
1.11.4 Κυτταρικοί πληθυσμοί των πρώτων σταδίων φλεγμονής – αθηροσκλήρωσης	σελ 71
1.11.5 CRH και φλεγμονή του ενδοθηλίου	σελ 73
1.12 Ο ενεργός ρόλος του ενδοθηλίου στη διατήρηση της ομοιοστασίας του – Μονοξείδιο του αζώτου (NO)	σελ 74

1.12.1 Μονοξείδιο του αζώτου (NO)	σελ 75
1.12.2 Διπλός ρόλος NO στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης	σελ 76
1.12.3 Άλλες δράσεις του NO	σελ 78
1.12.4 Ισορροπία δράσης NO και ενδοθηλίνης-1 (ET-1)	σελ 78
1.12.5 Προεπαγωγή NO	σελ 79
1.12.6 CRH και έκλυση NO	σελ 81
1.12.7 UCNs και έκλυση NO	σελ 82
1.13 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου	
(Reactive oxygen species, ROS)	σελ 84
1.13.1 Γενικά	σελ 84
1.13.2 Πηγές ελευθέρων ριζών	σελ 86
1) NADPH οξειδάση	σελ 86
2) Οξειδάση της Ξανθίνης	σελ 87
3) Συνθετάση NO	σελ 88
4) Άλλες πηγές	σελ 88
1.13.3 Χημεία των βιολογικά σημαντικών ριζών	σελ 89
1.13.4 Βιολογικά σημαντικά μη-ρίζες:	
H ₂ O ₂ , OHCl, μονήρες οξυγόνο, ONOO ⁻	σελ 90
1.13.5 Προοξειδωτικό – Αντιοξειδωτικό προφίλ	σελ 91
1.13.5 α) Θετικές επιδράσεις των ROS	σελ 91
1.13.5 β) Αρνητικές επιδράσεις των ROS	σελ 92
1.13.6 NO και O ₂ ⁻ ισορροπία	σελ 93
1.13.7 Οξειδωτικό στρες και αγγειακές δυσλειτουργίες	σελ 94
A) Αντιοξειδωτική απόκριση του ενδοθηλίου	σελ 95
B) Απόπτωση	σελ 95

Γ) Έκφραση μορίων προσκόλλησης	σελ 95
1.13.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	σελ 96
1. Δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD)	σελ 96
2. Καταλάση	σελ 96
3. Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	σελ 97
1.14 Πεπτίδια του στρες και οξειδωτικό στρες	σελ 99
1.14.1 UCNs και οξειδωτικό στρες	σελ 99
 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ 103
Ερευνητικό ερώτημα	σελ 103
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ 105
Πεπτίδια – διαλυτά μόρια	σελ 105
Υλικά και συσκευές καλλιέργειών	σελ 105
2.1 Κυτταρικές σειρές	σελ 105
2.1.1 Καλλιέργεια Κυτταρικής σειράς EAhy926	σελ 106
2.1.2 Κυτταρική σειρά THP-1	σελ 107
2.2 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Bradford).....	σελ 108
2.3 Προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης ορού	σελ 109
2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSH	σελ 110
2.5 Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης GSSG και GSH.....	σελ 111
2.6 Προσδιορισμός των επιπέδων του NO	σελ 111
2.7 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS)	σελ 112

2.8	Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS στα κύτταρα.....σελ	113
2.9	Στατιστική ανάλυση	σελ 114
2.10	Απομόνωση RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα	σελ 115
2.11	Μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	σελ 116
2.12	Αντίδραση PCR	σελ 118
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 120
3.1.	Έλεγχος έκφρασης των CRH υποδοχέων στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926.....σελ	120
3.2	A. Μελέτη της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα και του ρόλου των CRH υποδοχέων	σελ 121
i)	Επίδραση της CRH στην έκλυση NO	σελ 121
ii)	Ο ρόλος των υποδοχέων CRHR1 και CRHR2 στη ρύθμιση της έκλυσης NO	σελ 123
iii)	Η επίδραση της CRH και ο ρόλος των CRH υποδοχέων στη ρύθμιση της δραστηριότητας της eNOS.σελ	125
iv)	Η επίδραση της CRH και ο ρόλος των CRH υποδοχέων στα επίπεδα των ROS	σελ 127
v)	Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστηριότητα της καταλάσης	σελ 129
vi)	Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της στα επίπεδα GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG	σελ 131

B. Μελέτη της δράσης της CRH κατόπιν προ-έκθεσης των κυττάρων σε TNF-α.	σελ 133
i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NO	σελ 133
ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS	σελ 135
iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS	σελ 137
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης	σελ 139
v) Επίδραση στα επίπεδα GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG	σελ 141
Γ. Μελέτη της δράσης της CRH παρουσία μακροφάγων	σελ 143
i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NO	σελ 143
ii) Επίδραση στην ενζυμική δραστικότητα της eNOS	σελ 145
iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS	σελ 147
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης	σελ 149
v) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG	σελ 151
Δ. Μελέτη της επίδρασης της CRH και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων	σελ 154
i) Επίδραση στα επίπεδα του NO	σελ 154
ii) Επίδραση στην ενζυμική δραστικότητα της eNOS	σελ 156
iii) Επίδραση στα επίπεδα των ROS	σελ 158
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης	σελ 160
v) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG	σελ 161
Ε. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα και του ρόλου των CRH υποδοχέων	σελ 163
i) Επίδραση στην έκλυση του NO	σελ 163
ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS	σελ 164

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.σελ 165	σελ 165
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσηςσελ 166	σελ 166
v) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG.....σελ 167	σελ 167
ΣΤ. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατόπιν προ-έκθεσης τους σε	
TNF-α.σελ 168	σελ 168
i) Επίδραση στην έκλυση του NOσελ 168	σελ 168
ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOSσελ 169	σελ 169
iii) Επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROSσελ 171	σελ 171
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσηςσελ 173	σελ 173
v) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSH.....σελ 175	σελ 175
Z. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία μακροφάγωνσελ 177	
i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NOσελ 177	σελ 177
ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS.σελ 179	σελ 179
iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.σελ 181	σελ 181
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης.σελ 183	σελ 183
v) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG.σελ 185	σελ 185
Η. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία διεγερμένων με LPS μακροφάγωνσελ 187	
i) Επίδραση στην έκλυση του NOσελ 187	σελ 187
ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS.σελ 189	σελ 189
iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.σελ 190	σελ 190
iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης.σελ 191	σελ 191

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG.....σελ	193
4. Σύνοψη αποτελεσμάτων.....σελ	195
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ 205
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ	221
7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	σελ 223
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ 224

Περίληψη

Το φαινόμενο της φλεγμονής φαίνεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του ενδοθηλίου, το οποίο δέχεται την επίδραση ενδογενών και εξωγενών στρεσογόνων παραγόντων. Η απόκρισή του στους εν λόγω παράγοντες καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά των αρτηριών και ειδικότερα της αθηρωματώδους διαδικασίας. Το φαινόμενο της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών όπου συμμετέχουν τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) ή φλεγμονώδη κύτταρα. Παρακρινικοί και αυτοκρινικοί μηχανισμοί διέπουν την κυτταρική αλληλεπίδραση, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες επιτυγχάνει τη διατήρηση της αγγειακής ομοιοστασίας. Όμως σε συνθήκες εντόνων ή μακροχρόνιων επιδράσεων στρεσογόνων παραγόντων (stressors), όπως ο TNF-α, η IL-1β και η IL-6, η διαταραχή της ομοιοστασίας συνοδεύεται από αντιδράσεις του συστήματος του στρες που χαρακτηρίζονται ως φλεγμονώδης απόκριση στην προσπάθεια εξουδετέρωσης των βλαπτικών παραγόντων. Στο σύστημα του στρες εντάσσεται ο άξονας ΥΥΕ και η παρουσία της οικογενείας των πεπτιδίων του στρες, CRH, UCN1, UCN2 και UCN3 στους περιφερικούς ιστούς. Η CRH όσο και η UCN1 θεωρούνται λειτουργικοί προσδέτες των CRHR₁ και CRHR₂ υποδοχέων ενώ οι UCN2 και UCN3 ασκούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα CRHR₂, ο οποίος εκφράζεται ευρύτερα στην περιφέρεια. Η αντιφλεγμονώδης δράση των πεπτιδίων του στρες στο ΚΝΣ έχει μελετηθεί διεξοδικά ενώ ο ρόλος τους στη περιφέρεια είναι ακόμη ασαφής.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε, για πρώτη φορά, ο ρόλος των πεπτιδίων του στρες στη βραχυπρόθεσμη ρύθμιση της προ- και αντιοξειδωτικής απόκρισης του ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε συνάρτηση με τη δραστηριότητα της eNOS και της καταλάσης καθώς και οι συγκεντρώσεις του παραγόμενου NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSH, που αποτελούν δείκτη της δραστηριότητας της GP_x. Η εκτίμηση έγινε σε συνθήκες ηρεμίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, μετά από προηγούμενη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου με TNF-α και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα και ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, σε συνθήκες ηρεμίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, η CRH κυρίως μέσω του CRHR₁, προάγει την ανάπτυξη

ενός ήπιου προοξειδωτικού φορτίου ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση του ενζύμου καταλάσης. Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου επιτεύχθηκε μέσω της αναστολής της ενεργότητας της eNOS που συνοδεύτηκε από ελάττωση του NO. Σε αντίθεση με τα προς τα ανωτέρω, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα είχαν αυξημένο ενδοκυτταρικό φορτίο που προκλήθηκε από τον TNF-α ή από την συγκαλλιέργειά τους με τα ενεργοποιημένα και μη μακροφάγα, διαπιστώθηκε ότι η CRH ελάττωσε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο αυξάνοντας τη δραστικότητα όλων των αντιοξειδωτικών συστημάτων που μελετήσαμε (καταλάσης, eNOS, GSH). Οι ανωτέρω περιγραφείς δράσεις της CRH ασκήθηκαν μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων.

Αντίστοιχα, οι UCN1,2 και 3, αύξησαν τη δραστικότητα της eNOS και της καταλάσης, χωρίς να επηρεάσουν σημαντικά το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο σε συνθήκες ηρεμίας των κυττάρων. Στην περίπτωση προεπώασης των ενδοθηλιακών κυττάρων με TNF-α που συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των ROS και της καταλάσης και ελάττωση της eNOS, των επιπέδων NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG, οι UCN1, 2 και 3 επανέφεραν τις αναφερθείσες παραμέτρους στα προ της επώασης επίπεδα. Κατά τη συγκαλλιέργεια με μακροφάγα όλες οι ουροκορτίνες ελάττωσαν το υψηλό οξειδωτικό φορτίο των ενδοθηλιακών κυττάρων και αύξησαν περαιτέρω την ήδη αυξημένη ενεργότητα της καταλάσης χωρίς να επηρεάσουν το σύστημα της γλουταθειόνης, ενώ τη δραστικότητα της eNOS αύξησαν μόνο οι UCN2 και 3. Οι ουροκορτίνες δεν επηρέασαν σημαντικά τη δραστικότητα της eNOS στη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με ενεργοποιημένα μακροφάγα, ενώ αντίθετα ελάττωσαν τα αυξημένα επίπεδα του οξειδωτικού φορτίου και της GSH καθώς και τη δραστικότητα της καταλάσης. Η δράση των ουροκορτινών ασκείται κυρίως διαμέσω του CRHR₂.

Συμπερασματικά, τα νευροπεπτίδια του στρες της οικογένειας της κορτικοτροπίνης επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και σε συνθήκες επίδρασης προφλεγμονωδών επαγωγέων.

Summary

Inflammation is a key regulator of endothelial function. Endothelium is exposed to stressful stimuli and its response determines, at a great extent, the behavior of the arteries and the initiation of atherogenic process. Atherosclerosis is characterized by morphological and functional changes of endothelial, smooth muscle and immune cells. Under normal conditions, the local cellular interactions are regulated in an autocrine/paracrine way in order to retain vascular homeostasis. However, under the action of severe or long-term stressors, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, the inflammatory response disturbs the vascular homeostasis. The stress system is composed from the HPA axis and the peripheral stress peptides such as CRH, UCN1, UCN2 and UCN3. CRH and UCN1 are non-selective ligands of both receptors, CRHR₁ and CRHR₂, while UCN2 and UCN3 bind selectively only to CRHR₂, located mainly in the periphery. The above stress peptides have been studied thoroughly in the CNS. However, a few data exist, regarding their function in the periphery. The aim of this study was to investigate the role of the above mentioned stress peptides in the short term regulation of pro- and anti-oxidant endothelial response to stressors.

Macroendothelial cells were incubated, *in vitro*, in the presence of CRH and its selective receptor antagonists at basal conditions and under the influence of TNF- α or unstimulated and LPS-stimulated macrophages. The intracellular endothelial oxidative burden was estimated simultaneously with eNOS and catalase activity, as well as the concentration of released NO in the medium and in the lysates, the GSH content and the ratio of GSH/GSH+GSSG, which is a reliable marker of GP_x activity. Our result showed that CRH, acting mainly via CRHR₁, induced a significant increase of ROS and of catalase activity and, in the same time, inhibited the eNOS activity and NO production. On the contrary, when endothelial cells were pre-incubated with the mentioned stressors, the intracellular ROS content was reduced by CRH and, simultaneously, antioxidant enzymes were upregulated.

Under basal conditions, UCN1, 2 and 3 increased eNOS and catalase activity, without affecting the intracellular ROS content. However, the exposure of endothelial cells to stressors was followed by a significant increase in ROS levels and catalase activity, and a significant decrease of NO levels, eNOS activity, GSH content and GSH/GSH+GSSG ratio. At this condition UCN1, 2 and 3

restored successfully the stressor-induced changes, when the stressor was TNF- α . When endothelial cells were co-cultured with unstimulated macrophages, UCNs restored the increased ROS levels, the reduced eNOS activity and increased further catalase activity, whereas GSH concentration and GSH/GSH+GSSG ratio were not affected. Under the influence of LPS-primed macrophages, UCNs did not alter the eNOS activity and the other antioxidant enzymes but catalase activity that was increased when endothelial cells were co-culture with LPS-stimulated macrophages.

In conclusion, the stress peptides of the corticotropin releasing hormone family, are involved in the inflammatory process of endothelial cells. They act as pro- or anti-inflammatory regulators, depending on cells' activation state.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ACTH** (Adenocorticotropin Hormone, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)
- ACE** (Angiotensin converting enzyme, Ένζυμο μετατροπής της αγγειοτασίνης)
- α- MSH** (α- Melanocyte Releasing Hormone, μελανοτροπίνη)
- AP-1** (Activator Protein 1)
- APC** (Antigen Presenting Cell, αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο)
- AVP** (Arginin- Vasopressin Peptide, πεπτίδιο αργινίνης- βασοπρεσσίνης)
- BH₄** (tetrahydrobiopterin)
- BSA** (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός)
- cAMP** (cyclic Adenosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)
- ConA** (Concavalin A)
- Cox** (Cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση)
- CREB** (CRE Binding protein)
- CRH** (Corticotropin Releasing Hormone, ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης)
- CRHR₁** (Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1, υποδοχέας 1 της CRH)
- CRHR₂** (Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2, υποδοχέας 2 της CRH)
- CRH-BP** (CRH Binding Protein, συνδετική πρωτεΐνη της CRH)
- DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, θρεπτικό υλικό)
- DMSO** (Dimethyl sulfoxide, διμεθυλσουλφοξείδιο)
- DNA** (Desoribonucleic acid, δεσοξυριβονουκλικό οξύ)
- DTT** (Dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη)
- EDTA** (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, αιθυλενο διαμινο τετραοξικό οξύ)
- EGF** (Epidermal Growth Factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)
- ELISA** (Enzyme- Linked Immunoabsorbent Assay, ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση)
- ERK** (Extracellular signal Regulated Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάριο σήμα)
- EW** (Edinger- Westphal)
- FAM** (Flavin Adenine Mononucleotide)
- FAD** (Flavin Adenine Dinucleotide)
- FCS** (Foetal Calf Serum, ορός εμβρύου βοός)
- GPCR** (G- protein Coupled Receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G- πρωτεΐνες)
- HIF-1a** (Hypoxia inducible factor, Παράγων που ενεργοποιείται από την υποξία)
- IFN-γ** (Interferon- γ, ιντερφερόνη)
- Ig** (Immunoglobulin, ανοσοσφαιρίνη)
- IKK** (Inhibitor of nuclear factor κB kinase, αναστολέας της κινάσης του NFκB)

IL- (Interleukin- , ιντερλευκίνη-)

iNOs (inducible Nitric Oxide synthase, εκκρινόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου)

IP3 (tri- phosphate inositol, τριφωσφορική ινοσιτόλη)

iRNA (interference RNA)

JNK (c- Jun N-terminal kinase, πρωτεϊνική κινάση που συνδέεται στο αμινοτελικό άκρο του c-Jun)

ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα)

LPS (Lipopolysacharide, λιποπολυσακχαρίτης)

MAPK (Mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο σήμα)

MMP -9 (Metalloproteinase -9, μεταλοπρωτεϊνάση-9)

NE (Norepinephrine, νορεπινεφρίνη)

NF-kB (Nuclear Factor kB)

NK cells (Natural Killer cells, κύτταρα φυσικοί φονείς)

NK-1 (Neurokinin -1, νευροκινίνη)

NO (Nitric Oxide, ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου)

NOD2 (Nucleotide- binding Oligomerization Domain protein 2)

NPY (Neuropeptide Y, νευροπεπτίδιο Y)

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide)

PAF (Platelet Activating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων)

PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns, μοριακά μοτίβα μικροοργανισμών)

PBMNC (Peripheral Blood Mononuclear Cells, μονοκύτταρα από περιφερικό αίμα)

PBS (Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)

PGE₂ (Prostaglandin E₂, προσταγλανδίνη E₂)

PI3K (Phospho Inositol 3 Kinase, κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης)

PKA (Protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A)

PKC (Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C)

PLC (Phospholipase C, φωσφολιπάση C)

PMA (Phorbol 12- myristate 10- Acetate)

PMSF (Phenylmethylsulfonyl, φαινυλο μεθυλ σουλφονυλο φθορίδιο)

POMC (Proiomelanocortin, προ-οπιομελανοκορτίνη)

PPAR γ (Peroxisome Proliferators Activated Receptor- γ)

RNA (Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ)

RNS (Reactive nitrogen species, Δραστικές ενώσεις αζώτου)

ROS (Reactive Oxygen Species, Δραστικές ενώσεις οξυγόνου)

TCR (T- cell Receptor, υποδοχέας των T- κυττάρων)

TGF-α (Tumor Growth Factor α)

TIR (Toll/IL-1R)

TLR (Toll- like Receptor)

TNF-α (Tumor Necrosis Factor –α, ογκονεκρωτικός παράγοντας α)

TXB₂ (Thromboxane, θρομβοξάνη)

UCN (Urocortin, ουροκορτίνη)

VIP (Vasoactive Intestinal Peptide, αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο)

VP (Vasopressin, βασοπρεσσίνη)

ΥΥΕ (Υποθάλαμο- υποφυσιο- επινεφριδιακός άξονας)

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ο μηχανισμός του στρες

1.1.1 Διατήρηση της ομοιοστασίας

Η διατήρηση της ομοιοστασίας στον οργανισμό είναι απαραίτητη για τη ζωή. Αυτή η πολύπλοκη και δυναμική ισορροπία συνεχώς απειλείται από εσωτερικά ή εξωγενή αίτια, τα κοινώς αποκαλούμενα στρεσογόνα ερεθίσματα. Κατά συνέπεια το στρες ορίζεται ως μια κατάσταση όπου απειλείται η ομοιοστασία του οργανισμού και αντισταθμίζεται από ένα σύνθετο ρεπερτόριο φυσιολογικών αντιδράσεων που επαναφέρουν την ομοιοστασία (αντίδραση προσαρμοσμένη στο στρες). Η αντίδραση στο στρες χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση εξειδικευμένων νευροενδοκρινών, κυτταρικών και μοριακών υποσυστημάτων (σύστημα στρες) που εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην περιφέρεια. Η προσαρμοσμένη αντίδραση σε κάθε μορφής στρες καθορίζεται από την πολυπλοκότητα των γενετικών, περιβαλλοντικών και αναπτυξιακών παραγόντων. Τυχόν αλλαγές στην ικανότητα απόκρισης στο στρες, όπως για παράδειγμα οι ανεπαρκείς, εκτεταμένες και παρατεταμένες αντιδράσεις, οδηγούν δυνητικά στην εμφάνιση ασθενειών. Επιπλέον παρατεταμένες χρονικά εκθέσεις σε στρες έχουν αντίθετο αποτέλεσμα σε ένα σύνολο φυσιολογικών λειτουργιών όπως η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός, η ανοσοεπάρκεια και κατ' επέκταση η ανάπτυξη της προσωπικότητας και της συμπεριφοράς. Η εμβρυική ζωή, η παιδική ηλικία και ορισμένες περιόδους της ενήλικης ζωής, χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα ευπαθείς στο στρες.

Το σύστημα του στρες λαμβάνει και ενσωματώνει μια μεγάλη ετερογένεια νευροαισθητικών, αιματογενών και κινητικών (μεταιχμιακών) σημάτων, που καταφθάνουν μέσω συγκεκριμένων και διακριτών μονοπατιών. Η οξεία ενεργοποίηση του συστήματος του στρες οδηγεί σε μια συσσώρευση αλλαγών που κατατείνει στη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού. Αυτές οι αλλαγές αποτελούν αντιδράσεις προσαρμογής που ευνοούν την επιβίωση του οργανισμού. Καθώς η ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος αυξάνεται, η εξειδίκευση της αντίδρασης μειώνεται και τελικά οδηγεί σε ένα φαινόμενο μη ειδικών αποκρίσεων.

Η φυσική προσαρμογή στο στρες προάγει την ανακατανομή της ενέργειας, ούτως ώστε ο οργανισμός να ανταπεξέλθει στο στρες. Κατά συνέπεια το οξυγόνο και τα διάφορα θρεπτικά στοιχεία εκτρέπονται προς το κεντρικό νευρικό σύστημα και τις περιοχές του σώματος που δέχονται στρεσογόνα ερεθίσματα, εφόσον εκεί κρίνεται απαραίτητη η ύπαρξή τους. Η αύξηση του καρδιαγγειακού τόνου, του ρυθμού της αναπνοής και του ενδιάμεσου μεταβολισμού (γλυκονεογένεση, λιπόλυση) λειτουργούν προς όφελος της μεταφοράς ζωτικών υποστρωμάτων για την παραγωγή ενέργειας, ενώ λειτουργίες όπως η χώνευση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και η ανοσία προσωρινά αναστέλλονται.

Στο πλαίσιο διατήρησης των προσαρμοστικών μηχανισμών του στρες εντός ενός πλαισίου, ενεργοποιούνται παράλληλα περιοριστικοί μηχανισμοί με σκοπό να αποτραπεί η υπερβολική αντίδραση. Η αδυναμία των περιοριστικών μηχανισμών να διατηρήσουν την απόκριση στο στρες, εντός των «φυσιολογικών» ορίων, οδηγεί σε νόσηση [1]. Σύμφωνα με την υπόθεση του Walter Cannon, η απόκριση στο στρες είναι ένας προσαρμοστικός ψυχοφυσιολογικός μηχανισμός που εξελίχθηκε ούτως ώστε ο οργανισμός να αντιδρά σε μια οξεία εξωγενή ή ενδογενή βιολογική απόκλιση άμεσα και έντονα, και σε μια χρόνια κατάσταση στρες εξοικονομώντας ενέργεια. Κατά την εξέλιξη της ζωής, οι στρεσογόνοι παράγοντες άλλαξαν και κατά συνέπεια δεν αφορούσαν μόνο την επιβίωση του ατόμου. Οι παθοφυσιολογικές αλλαγές που έχουν ως αρχή το στρες, οδηγούν σε νοσήματα όπως οι φλεγμονώδεις παθήσεις, οι αυτοάνοσες διαταραχές και οι αλλεργίες [2] .

Αν και συνολικά το κεντρικό νευρικό σύστημα εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στη διατήρηση της εσωτερικής ομοιόστασης και συμμετέχει στην οργάνωση της απόκρισης στο στρες, συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου κατέχουν κρίσιμο ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς. Η αντίδραση προσαρμογής στο στρες χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση δύο αξόνων, του υποθαλαμο-υποφυσιακού-επινεφριδιακού (ΥΥΕ) άξονα και του άξονα του συμπαθητικού συστήματος ο οποίος περιλαμβάνει πυρήνες του ΚΝΣ, προγαγγλιακές συμπαθητικές ίνες και το μυελό των επινεφριδίων. Τα κεντρικά στοιχεία του συστήματος στρες, βρίσκονται στον υποθάλαμο και το εγκεφαλικό στέλεχος και περιλαμβάνουν τους νευρώνες της κορτικοτρόπου εκλυτικής ορμόνης (CRH) και τους νευρώνες της αργινίνης-βασοπρεσίνης (AVP) του παρακοιλιακού (paraventricular, PVN) πυρήνα του υποθαλάμου, και τους CRH νευρώνες στην

περιοχή του προμήκους και του υπομέλανα τόπου (Locus Ceruleus, LC) και άλλων κατεχολαμινεργικών ομάδων κυττάρων του προμήκη και του στελέχους (κεντρικό συμπαθητικό σύστημα). Οι περιφερειακές ομάδες του άξονα ΥΥΕ και του απαγωγού συμπαθητικού νευρικού συστήματος, αντιπροσωπεύουν τα περιφερειακά τμήματα αυτού του σύνθετου συστήματος [1] .

1.1.2 Ο ΥΥΕ άξονας

Η ακεραιότητα του ΥΥΕ άξονα (Υποθάλαμο- Υποφύσιο- Επινεφριδιακός άξονας) και η ακριβής ρύθμιση της λειτουργίας του, είναι κρίσιμες για την επιτυχή απόκριση σε οποιασδήποτε μορφής στρες, καθώς ο άξονας είναι ζωτικό σκέλος του συστήματος του στρες. Στο επίπεδο του υποθαλάμου, η CRH εκλύεται στο υποφυσιακό πυλαίο φλεβικό σύστημα και δρα ως αρχικός ρυθμιστής της πρωταρχικής έκκρισης ACTH από την υπόφυση. Η πρόσδεση της CRH στον CRHR₁ των κορτικοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης διεγείρει την έκκριση της ACTH, ενώ η AVP λειτουργεί ως ισχυρός συνεργατικός παράγοντας της CRH, αλλά με χαμηλότερη διεγερτική ικανότητα έκκρισης ACTH. Σε μη στρεσογόνες συνθήκες, αμφότερα οι υποθαλαμικοί παράγοντες (CRH και η AVP) εκκρίνονται στο πυλαίο σύστημα με τη μορφή ταυτόχρονων περιοδικών κυμάτων διατηρώντας τον κιρκάδιο ρυθμό. Απόρροια της ανωτέρω συμπεριφοράς είναι τα αυξημένα επίπεδα της ACTH και κορτιζόλης πλάσματος τις πρωινές ώρες. Ο ρυθμός απελευθέρωσης CRH και AVP αυξάνεται σε συνθήκες στρες.

1.1.3 Τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι το τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα. Πρόκειται για ορμόνες με πλειοτρόπους δράσεις οι οποίες ασκούνται μέσω των σχεδόν παντού κατανεμημένων υποδοχέων τους, ενδοκυτταρικά. Ο μη ενεργός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στη μορφή ετεροολιγομερούς με πρωτεΐνες θερμικού σοκ και ανοσοφιλίνες. Κατόπιν επίδρασης του προσδέματος, οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών αποδεσμεύονται από το υπόλοιπο ετεροολιγομερές και μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές (GRE, glucocorticoid

responsive elements) που ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Ειδικότερα, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς αναστέλλουν, με αντιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη, σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το ετεροδιμερές c-jun/c-fos, που μαζί με άλλους παράγοντες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση γονιδίων του ανοσολογικού συστήματος, και τον NF-kB που είναι μείζονος σημασίας στην ανοσολογική και φλεγμονώδη αντίδραση.

Τα γλυκοκορτικοειδή κατέχουν βασικό ρόλο στον έλεγχο του ΥΥΕ άξονα και της δραστηριότητάς τους και στον τερματισμό της αντίδρασης του στρες καθώς δρουν σε εξωυποθαλαμικά ρυθμιστικά κέντρα, τον υποθάλαμο και την υπόφυση. Η αρνητική ανατροφοδότηση που ασκούν στην έκκριση ACTH έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκθεσης του οργανισμού στη δράση των γλυκοκορτικοειδών και έτσι μειώνεται η καταβολική, λιπογενής, αντιαναπαραγωγική και ανοσοκατασταλτική επίδραση αυτών των ορμονών. Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στο ΚΝΣ: I και II. Ο τύπος I αποκρίνεται σε χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, ενώ ο τύπος II αποκρίνεται σε υψηλότερα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και σε συνθήκες υψηλού στρες, όπου ενεργοποιεί ή αναστέλλει κάποια συστήματα. Η αρνητική ανατροφοδότηση έκκρισης CRH και AVP γίνεται μέσω των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών τύπου II [1] .

1.2 Νεύρο-ενδοκρινικό σύστημα – Νευροπεπτίδια της οικογένειας του CRH

1.2.1 Νευροπεπτίδια

Τα νευροπεπτίδια βρίσκονται αποθηκευμένα στις απολήξεις των νευρικών κυττάρων σε κοινά εκκριτικά κοκκία με τους νευροδιαβιβαστές. Εκκρίνονται σε απάντηση νευρικών διεγέρσεων και επιδρούν στις λειτουργίες άλλων κυττάρων, δηλαδή δρουν ως χυμικά μηνύματα τόσο στο ΚΝΣ (κεντρικό νευρικό σύστημα) όσο και στην περιφέρεια.

Πεπτίδια προερχόμενα από το πρόδρομο μόριο της προ-οπιο-μελανοκορτικοτροπίνης (POMC), όπως η β-ενδορφίνη, οι εγκεφαλίνες και οι δυνορφίνες, ανήκουν στα νευροπεπτίδια της υπόφυσης και πιο ειδικά χαρακτηρίζονται ως οπιοειδή πεπτίδια. Νευροπεπτίδια όπως η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης CRH (Corticotropin Releasing Hormone) και τα συγγενή

πεπτίδια ουροκορτίνες (UCN1, UCN2, UCN3), αλλά και πολλά άλλα, μεταξύ των οποίων, η ουσία P (Substance P), το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), το εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο (VIP) (Vasoactive intestinal peptide), το PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide) και η νευροτενσίνη, ανήκουν στα νευροπεπτίδια του στρες, όπως έχουν χαρακτηριστεί, εξαιτίας του σημαντικού ρόλου που έχουν στην ρύθμιση και λειτουργία του μηχανισμού απάντησης στο στρες.

1.2.2 Ο υποθάλαμο- υποφύσιο- επινεφριδιακός (ΥΥΕ) άξονας

Καταστάσεις στρες ενεργοποιούν τον ΥΥΕ άξονα. Η CRH που συντίθεται στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου ελευθερώνεται από τις νευρικές απολήξεις των υποθαλαμικών νευρώνων και φθάνει στην υπόφυση μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας. Στην υπόφυση η CRH διεγείρει την παραγωγή και έκκριση της κορτικοτροπίνης (ACTH), η οποία μέσω της κυκλοφορίας φθάνει στα επινεφρίδια όπου προκαλεί την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τη φλοιώδη μοίρα τους. Η έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια αποτελεί το τελικό στάδιο ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα.

Η υποθαλαμική ορμόνη CRH διεγείρει παράλληλα τον υπομέλανα τόπο, στον προμήκη μυελό, που οδηγεί στην απελευθέρωση νορεπινεφρίνης (NE), από ένα εξαιρετικά πυκνό δίκτυο νευρώνων σε ολόκληρο των εγκεφαλο και την ενεργοποίηση του περιφερικού συμπαθητικού συστήματος που συνοδεύεται από την έκκριση κατεχολαμινών από τον μυελό των επινεφριδίων.

Η διέγερση του συμπαθητικού ενεργοποιεί το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης. Η αγγειοτασίνη-II (Ang-II) που παράγεται είναι ισχυρός αγγειοσυσπαστικός παράγοντας και συμβάλλει ενεργά στη διατήρηση του αγγειακού χώρου σε καταστάσεις στρες. Επιπλέον, στο ΚΝΣ ενεργοποιεί την υποθαλαμική έκκριση της CRH και κατ' ακολουθίαν της κορτιζόλης.

Η δραστηριότητα του ΥΥΕ ακολουθεί κερκαδικό ρυθμό κατά τη διάρκεια του 24ωρου. Στους ανθρώπους, η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών του πλάσματος έχει την υψηλότερη τιμή λίγο πριν από την έγερση και τη χαμηλότερη τις βραδινές ώρες. Στα ποντίκια, που είναι πιο δραστήρια τη νύχτα, συμβαίνει το αντίθετο.

Η διέγερση του ΥΥΕ άξονα αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή μέσω αναστολής της έκκρισης ACTH και συγκεκριμένα μέσω αναστολής της σύνθεσης της CRH στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν αρνητικά την ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα και μέσω υποδοχέων τους σε ειδικές περιοχές του ΚΝΣ, όπως ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή και οι νοραδρενεργικοί πυρήνες του προμήκους [3].

1.3 Η οικογένεια των πεπτιδίων του στρες

Η οικογένεια των πεπτιδίων CRH (εικόνα 1) περιλαμβάνει τα πεπτίδια ουροτενσίνη 1 (urotensin1, στους ιχθείς), sauvagine (στα αμφίβια), CRH και ουροκορτίνες (UCN1, UCN2, UCN3) στα θηλαστικά. Πρόκειται για ομόλογα πεπτίδια που διατηρούν σε σημαντικό βαθμό την αμινοξική ακολουθία.

Πεπτίδιο	Ακολουθία	Μήκος	% Ομολογία
hCRF	SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMELII	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPISIDLTTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPISIDLSLELLRKMIETIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI	40	48
hSRP	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
hSCP	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI	38	32
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNLLFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI	38	26

TRENDS in Pharmacological Sciences

Εικόνα 1. Ομοπαράθεση των μελών της οικογένειας των πεπτιδίων του στρες. Επισημαίνονται τα αμινοξέα που είναι ομόλογα μεταξύ των μελών της οικογενείας των πεπτιδίων. Το ανθρώπινο πεπτίδιο που σχετίζεται με την στρεσκοπίνη (hSRP) και η ουροκορτίνη 2 (UCN II) είναι πανομοιότυπα. Η ανθρώπινη στρεσκοπίνη (hSCP) και η ανθρώπινη ουροκορτίνη 1 (UCN1) έχουν ομόλογες ακολουθίες. Συντομογραφίες: h, human; m, mouse; o, ovine; SVG, sauvagine [4].

1.3.1 Ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH)

Η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH), ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων, απομονώθηκε από τον Vale και τους συνεργάτες του το 1981 [5] . Αναγνωρίστηκε αρχικά ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο και κύριος ρυθμιστής του ΥΥΕ άξονα. Εκτός από τον υποθάλαμο, έχει ανιχνευτεί σε πολλά σημεία του ΚΝΣ και του εγκεφάλου (ρινεγκέφαλος, υπόφυση, φλοιός εγκεφάλου, βασικά γάγγλια, ιππόκαμπος, γέφυρα, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός), όπου η δράση του αφορά αυτόνομες λειτουργίες και συμπεριφορές που επάγονται από το στρες [6, 7, 8]. Στην περιφέρεια, mRNA της CRH έχει βρεθεί στον πλακούντα, τους πνεύμονες, το ήπαρ, το στομάχι και έντερο, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, το θύμο αδένα, το δέρμα, τις αμυγδαλές τον σπλήνα και το ενδοθήλιο [9, 10, 11]. Επιπλέον, CRH έχει ανιχνευτεί σε νεοπλασματικούς ιστούς, όπως νεοπλασμάτα των πνευμόνων και του μαστού, το καρκινοειδές του θύμου και σε κακοήθεις όγκους του μυελού των επινεφριδίων [12, 13] . Τα τελευταία χρόνια τα δεδομένα που αφορούν στις δράσεις της CRH στην περιφέρεια συνηγορούν υπέρ ενός ευρύτερου ρυθμιστικού ρόλου της στο στρες οποιασδήποτε μορφής (φλεγμονή, εγκυμοσύνη κ.α.) [14, 15, 16].

1.3.2 Urocortins (UCNs)

Η UCN1 [17] που αποτελείται από μία αλληλουχία 40 αμινοξέων, παρουσιάζει ομολογία με την ανθρώπινη CRH, γύρω στο 45%, ενώ έχει ακόμα μεγαλύτερη ομοιότητα με την urotensin1 των ιχθύων (63%).

Η έκφραση της UCN1 στον εγκέφαλο συμπίπτει ελάχιστα με αυτήν της CRH. Μεταξύ των ειδών έχουν αναφερθεί διαφορές στην κατανομή του mRNA και του πεπτιδίου της UCN1 στον εγκέφαλο [18]. Πάντως, αν και ορισμένα σημεία του ΚΝΣ εκφράζουν σε σημαντικά επίπεδα το πεπτίδιο της UCN1 (ιππόκαμπος, μικρός πληθυσμός νευρώνων του μετωπιαίου φλοιού, περιοχή Edinger-Westphal) [19], περισσότερο ευρεία είναι η έκφραση της στην περιφέρεια. Το πεπτίδιο UCN1 έχει ανιχνευτεί στην υπόφυση, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στις αμυγδαλές, στα μυοκύτταρα της καρδιάς, στο θύμο αδένα, στο σπλήνα, στους πνεύμονες στον πλακούντα και στα νεφρά [20]. Πρόσφατα ανιχνεύτηκε στο δέρμα [21] και στο λιπώδη ιστό [22].

Η UCN2 ή stresscopin- related peptide [23], ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων, εκφράζεται σε πολύ συγκεκριμένες περιοχές στον εγκέφαλο. Στον ποντικό εντοπίζεται στο μακροκυτταρικό τμήμα του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου, τον υπεροπτικό και τοξοειδή πυρήνα και τους κινητικούς πυρήνες του στελέχους και του νωτιαίου μυελού.

Στην περιφέρεια, mRNA της UCN2 ανιχνεύεται στην καρδιά, τα επινεφρίδια, σε κύτταρα του αίματος, σε ανθρώπινα κύτταρα ενδομήτριου, στο δέρμα [24] και στο σκελετικό μυ [25]. Είναι χαρακτηριστικό ότι UCN2 mRNA δεν εκφράζεται στην υπόφυση.

Η UCN3 ή stresscopin [26] επίσης αποτελείται από 38 αμινοξέα. Εκφράζεται σε περιοχές του ΚΝΣ όπως ο υποθάλαμος, ο μέσος πυρήνας της αμυγδαλής και το στέλεχος [27]. Στην περιφέρεια mRNA της UCN3 ανιχνεύτηκε στους μύες, στο δέρμα, στα επινεφρίδια [28], στον γαστρεντερικό σωλήνα [29], στην καρδιά [30], στα β- κύτταρα στο πάγκρεας [31] και στο λιπώδη ιστό [22].

1.3.3 Χαρακτηριστικά και ρύθμιση των γονιδίων CRH και UCN

Και τα δύο γονίδια αποτελούνται από δύο εξόνια και ένα ιντρόνιο. Το ιντρόνιο του γονιδίου της UCN1 έχει μέγεθος 260bp και διαφέρει ελάχιστα μεταξύ των διαφόρων θηλαστικών. Από την άλλη το ιντρόνιο της CRH είναι αρκετά μεγαλύτερο (700- 800 bp) και το ακριβές μέγεθος ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Τα προ- πεπτίδια και των δύο κωδικοποιούνται από το αντίστοιχο δεύτερο εξόνιο, ενώ το πρώτο εξόνιο περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της 5'- μη μεταφραζόμενης περιοχής [32]. Τα γονίδια της CRH και της UCN περιέχουν παρόμοιες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές τους. Για παράδειγμα και τα δύο έχουν θέση CRE και μια τύπου- NRSE/RE1 ακολουθία. Ωστόσο, ενώ η CRH έχει αυτή την αρνητική ρυθμιστική ακολουθία τύπου- NRSE/RE1 στο ιντρόνιο, στην UCN βρίσκεται πριν την TATA αλληλουχία.

Έχει δειχθεί ότι στον υποθάλαμο προηγείται φωσφορυλίωση του CREB (CRE binding protein) πριν την ενεργοποίηση της έκφρασης της CRH [33]. Μελέτες σε κύτταρα PC12, για τη ρύθμιση της έκφρασης της UCN1 από τον CREB, υποστηρίζουν ανάλογο λειτουργικό ρόλο του CRE στον υποκινητή της UCN [32]. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το REST/NRSF ρυθμίζει την έκφραση της

CRH [34], ενώ η αλληλουχία τύπου- NRSE/RE1 στον υποκινητή της UCN φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή της [32] .

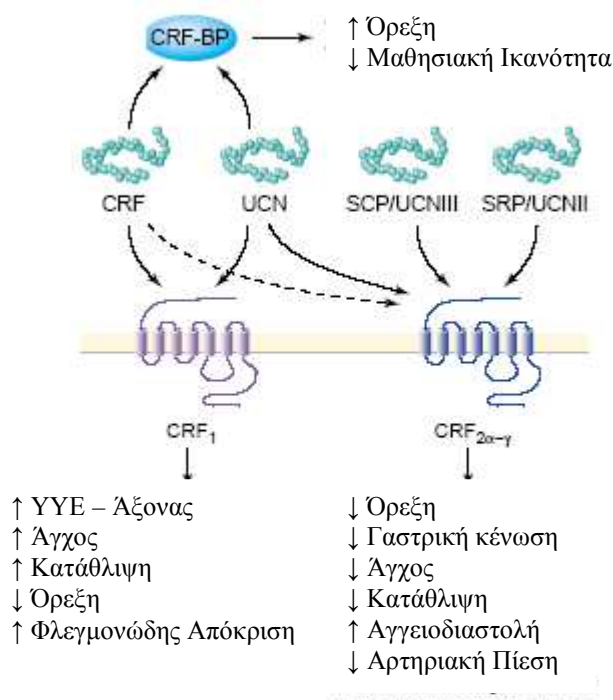
Και τα δύο γονίδια περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Brg-2. Μάλιστα έχειδειχθεί ότι ο Brg-2 ρυθμίζει την έκφραση της CRH [35]. Όσον αφορά την UCN δεν υπάρχει ανάλογη πληροφορία.

Επιπλέον, τα γονίδια των πεπτιδίων της οικογένειας της CRH περιέχουν στοιχεία απόκρισης των γλυκοκορτικοειδών. Έχει αναφερθεί ρύθμιση του mRNA της UCN1 στο θύμο αδένα από χορήγηση κορτικοστερόνης, άλλα και αύξηση της μεταγραφής της UCN2 σε περιφερικούς ιστούς από γλυκοκορτικοειδή [36].

1.4 Υποδοχείς CRH

1.4.1 Οι υποδοχείς CRHR₁ και CRHR₂

Τα πεπτιδία του στρες προσδένονται σε δύο υποδοχείς, τον CRHR₁ [37] και τον CRHR₂ [38], οι οποίοι παρουσιάζουν περίπου 70% αμινοξική ομολογία. Στους τελοϊχθύες έχει απομονωθεί και ένας τρίτος CRH υποδοχέας (CRHR₃) ο οποίος είναι περίπου 85% ομόλογος με τον CRHR₁ [39]. Πρόκειται για υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) και έχουν το τυπικό πρότυπο των 7 διαμεμβρανικών περιοχών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας παρουσιάζεται στο διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα τους (80-85%), ενώ το εξωκυττάριο τμήμα και ειδικά το N- τελικό άκρο παρουσιάζει μόλις 40% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία. Οι δύο αυτοί υποδοχείς κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια και μπορούν να υπάρξουν σε περισσότερες μορφές που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς και διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες όσον αφορά τους προσδέτες τους (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων του στρες και των υποδοχέων τους. Οι CRHRs ρυθμίζουν ένα σημαντικό αριθμό φυσιολογικών αντιδράσεων [4].

Τόσο η CRH όσο και η UCN1 θεωρούνται λειτουργικοί προσδέτες των CRH υποδοχέων. Οι UCNs προσδένονται με 100 φορές μεγαλύτερη συγγένεια στον CRHR₂ απ' ότι η CRH [40]. Είναι ενδιαφέρον ότι η UCN1 εμφανίζει 6 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον CRHR₁ και 40 φορές μεγαλύτερη για τον CRHR₂ σε σχέση με τη CRH. Τα πεπτίδια UCN2 και την UCN3 προσδένονται αποκλειστικά και με μεγάλη συγγένεια στον CRHR₂ [23, 26]. Το γεγονός πάντως ότι η συγγένεια της UCN3 για τον CRHR₂ είναι 10 φορές περίπου μικρότερη από τις αντίστοιχες της UCN1 ή της UCN2 δημιουργεί υπόνοιες για την ύπαρξη τρίτου CRH υποδοχέα στα θηλαστικά [41].

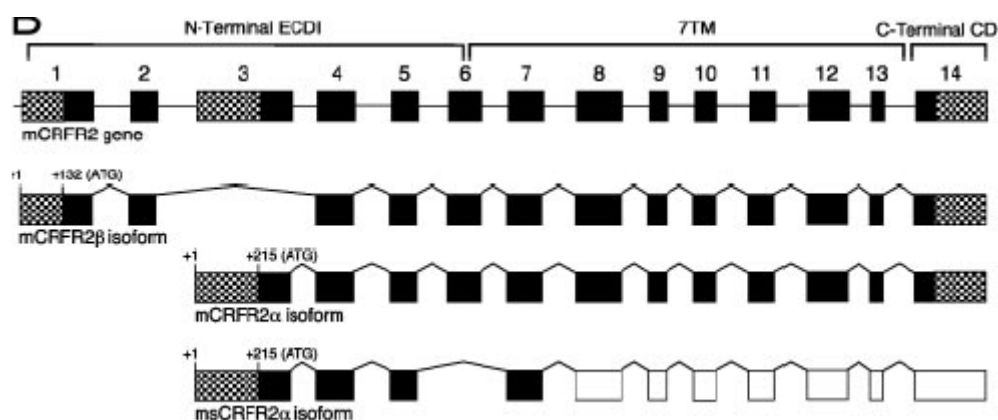
Έχουν ανιχνευθεί αρκετές διαφορετικές μορφές του CRHR₁, πλην όμως μόνο μία βρέθηκε να είναι λειτουργική [42]. Ο CRHR₁ εκφράζεται σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (κυρίως φλοιό, στέλεχος, ιππόκαμπος, αμυγδαλή, υπόφυση). Η έκφρασή του στον υποθάλαμο επάγεται από το στρες [43].

Στην περιφέρεια, αν και τα επίπεδα έκφρασης είναι χαμηλότερα, εντοπίζεται στις αμυγδαλές, τις ωοθήκες, τον σπλήνα, τα επινεφρίδια, το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα [44] και το λιπώδη ιστό [22].

Τρεις λειτουργικές μορφές του CRHR₂, οι οποίες διαφέρουν μόνο στο εξωκυττάριο N- τελικό άκρο τους, είναι γνωστές. Ο CRHR_{2a}, εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο (υποθάλαμος, πλάγιο διάφραγμα, ραφιοειδής πυρήνας στον μεσεγκέφαλο, οσφρητικός βολβός) και στην υπόφυση [45]. Ο CRHR_{2b} ανιχνεύεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες), αλλά κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας) [46]. mRNA του CRHR₂ βρέθηκε επίσης στους πνεύμονες, στον σπλήνα, στο θύμο αδένα, στο δέρμα και στο λιπώδη ιστό. Ο CRHR_{2c} έχει ανιχνευθεί μόνο στην μεταιχμιακή περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου [47]. Υποδοχείς CRH εκφράζονται επίσης, σε υψηλό ποσοστό, σε διάφορα νεοπλάσματα στον άνθρωπο [48, 49].

1.4.2 sCRHR_{2a} (soluble CRF_{2a})

Πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξη μίας διαλυτής μορφής του υποδοχέα CRHR₂ στον εγκέφαλο ποντικού, ο sCRH_{2a} [50]. Πρόκειται για προϊόν εναλλακτικού ματίσματος (splice variant) του mRNA του CRHR₂ στο οποίο λείπει το εξόνιο 6 (εικόνα 3). Η χημική συγγένεια του για τα πεπτίδια CRH και UCN1 είναι μεγάλη και η ύπαρξή του μεταβάλλει την ικανότητα των CRH και UCN1 να επάγουν το cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς CRH.



Εικόνα 3. Το γονίδιο του CRFR₂ στον ποντικό. Σχηματική περιγραφή των δύο γνωστών λειτουργικών υπότυπων, CRFR_{2β} και CRFR_{2α} (δεύτερη και τρίτη σειρά), και της διαλυτής μορφής sCRFR_{2α} (τέταρτη σειρά) του γονιδίου του υποδοχέα [50].

1.4.3 CRH – binding protein (CRH-BP)

Εκτός από τους υποδοχείς CRHR₁ και CRHR₂, τα πεπτίδια του στρες προσδένονται στην CRH-BP, μια γλυκοπρωτεΐνη 37-kDa. Το σύμπλοκο της CRH-BP με τα πεπτίδια δεν έχει βιολογική δραστικότητα [51]. Έτσι, η δράση της CRH-BP αναστέλλει την βιολογική δραστικότητα των πεπτιδίων του στρες και θεωρείται ότι ο ρόλος της αφορά τη ρύθμιση της δράσης τους [52]. Στον άνθρωπο η CRH-BP εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, αμυγδαλή, υποθάλαμος), αλλά συντίθεται και στην περιφέρεια, όπως στον πλακούντα, στο ήπαρ και στα επινεφρίδια, και εκλύεται στην κυκλοφορία [53].

1.4.4 Ανταγωνιστές των υποδοχέων CRH

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών εργασιών στοχεύουν στην μελέτη των μοριακών δομών των υποδοχέων CRH και της αλληλεπίδρασης με τους προσδέτες τους με σκοπό τη δημιουργία ανταγωνιστών. Δεδομένων των φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών δράσεων των πεπτιδίων του στρες κάτι τέτοιο αποτελεί αντικείμενο εξαιρετικού ενδιαφέροντος και σημασίας.

Ο πρώτος ανταγωνιστής που περιγράφηκε ήταν ο α-helical CRH₍₉₋₄₁₎ [54]. Ακολούθησαν διάφορες μοριακά τροποποιημένες μορφές του α-helical CRH₍₉₋₄₁₎, [55] μέχρι τη δημιουργία της astressin [56], η οποία ήταν 30 φορές πιο ικανή από τους προηγούμενους ανταγωνιστές στην αναστολή της έκκρισης της ACTH. Μια μικρή μοριακή τροποποίηση της τελευταίας έδωσε την Astressin B έναν ισχυρό ανταγωνιστή μακράς διάρκειας και των δύο υποδοχέων CRH, και στη συνέχεια την Astressin-2B, η οποία προσδένεται αποκλειστικά στον CRHR₂ [57]. Παράλληλα, περιγράφηκε, από ένα άλλο εργαστήριο, η δημιουργία ενός ειδικού για τον υποδοχέα CRHR₂ ανταγωνιστή, της anti-sauvagine-30 [58].

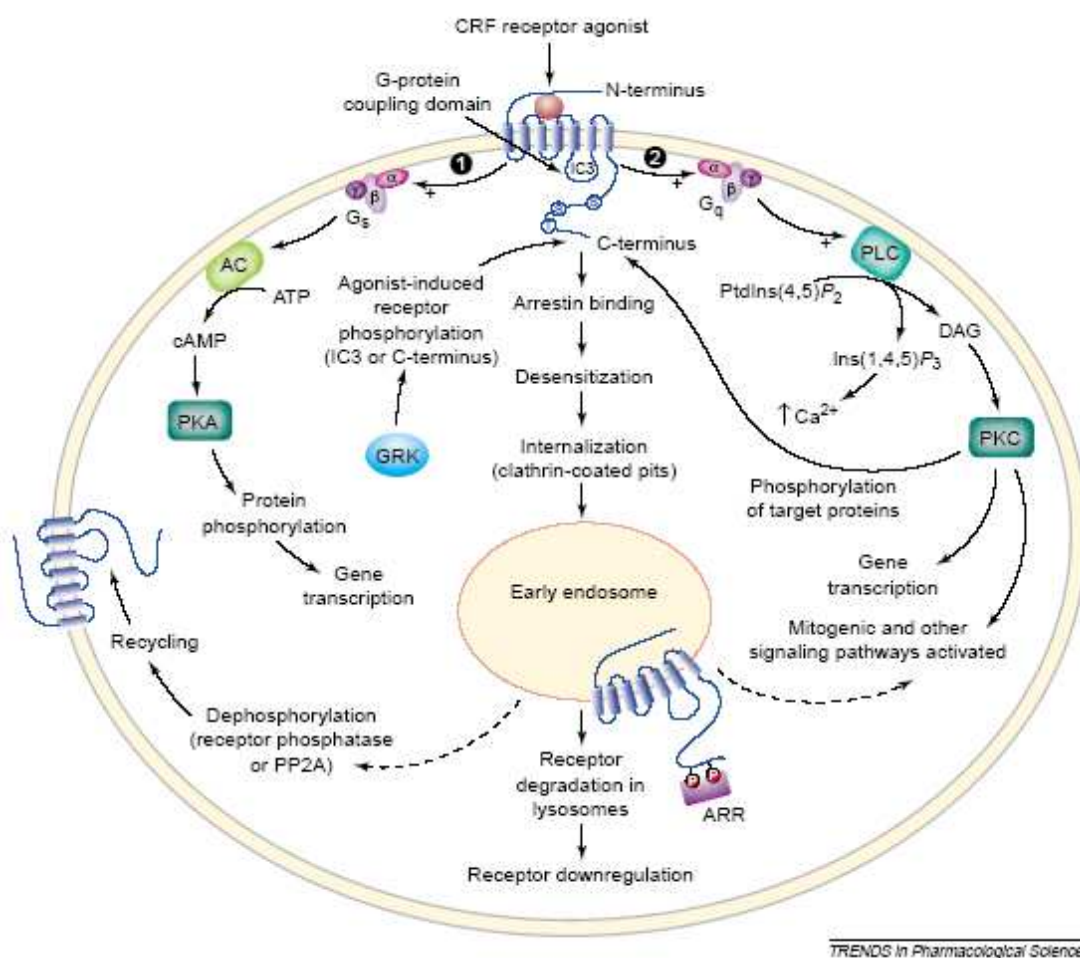
Εκτός των πεπτιδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων CRH, οι οποίοι εξελίσσονται συνεχώς, υπάρχουν και αρκετοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές όπως η antalarmin και το ανάλογο CP-154,526 (CRHR₁ ανταγωνιστές). Η μη πεπτιδική φύση των τελευταίων παρέχει κάποια πλεονεκτήματα στη χρήση τους, καθώς δεν έχουν τη δυνατότητα να επάγουν βιολογικές δράσεις από μόνοι τους.

1.4.5 Σηματοδότηση υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες

Όπως προαναφέρθηκε, οι υποδοχείς CRH ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs). Έχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων. Όταν δημιουργηθεί το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη, η αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα ενεργοποιεί την τριμερή G πρωτεΐνη με την οποία βρίσκεται σε επικοινωνία. Η ενεργοποίηση αυτή έγκειται ομοίως σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου της G πρωτεΐνης, ώστε να αποδεσμεύσει το μόριο GDP και να δεσμεύει ένα μόριο GTP. Ακολούθως, η υπομονάδα α που φέρει το GTP μετατοπίζεται σε ένα μεμβρανικό ένζυμο-τελεστή (effector enzyme), όπως η αδενυλική κυκλάση και η φωσφολιπάση C (PLC), και διεγείρει την έναρξη της καταλυτικής του δραστηριότητας. Η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού παράγει τα λεγόμενα «δεύτερα μηνύματα» τα οποία μπορεί να είναι c-AMP, c-GMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), διακυλογλυκερόλη (DAG), ή Ca⁺² (εικόνα 4).

Η αυξημένη συγκέντρωση ενός ή περισσότερων από τα δεύτερα μηνύματα των ορμονών, διεγείρει την αλλαγή στη δραστικότητα ενός ή περισσότερων ενζύμων ή μη ενζυματικών πρωτεϊνών. Κύριος στόχος των δεύτερων μηνυμάτων είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (κινάσες τυροσίνης ή κινάσες σερίνης/θρεονίνης).

Την ενεργοποίηση της πρώτης πρωτεϊνικής κινάσης συνήθως ακολουθεί ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων (από φωσφατάσες) σε διάφορα υποστρώματα (ένζυμα, κανάλια ιόντων, μικροσωληνίσκους, ιστόνες, μεταγραφικούς παράγοντες κ.α.). Τελικός στόχος μπορεί να είναι η μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η αλλαγή της πολικότητας μεμβρανών, η δραστηριοποίηση ενζύμων, η μεταγραφή γονιδίων και η σύνθεση πρωτεϊνών, η έκκριση ουσιών από το κύτταρο κτλ.



Εικόνα 4. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της CRH και η ρύθμιση των υποδοχέων της. Οι CRHR₁ και CRHR₂ ενεργούν κυρίως μέσω της G_s υπομονάδας και αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP. Επιπλέον και οι δύο υποδοχείς συζεύγνυνται με την G_q υπομονάδα και μετάγουν το σήμα μέσω PLC (φωσφολιπάση C). Η GRK3 (κινάση 3 των GPCR) ρυθμίζει την απευαισθητοποίηση των υποδοχέων. (Συντομογραφίες: AC,adenylyl cyclase; ARR, arrestin; DAG, 1,2-diacylglycerol; IC3, intracellular loop 3; Ins(1,4,5) P3, inositol (1,4,5)-trisphosphate; PKA, protein kinase A) [4].

1.4.6 Ρύθμιση των υποδοχέων CRH

Οι υποδοχείς της CRH κάτω από συνθήκες συνεχούς έκθεσης στους προσδέτες τους ή υψηλές συγκεντρώσεις των τελευταίων απευαισθητοποιούνται, ενδοκυτταρώνονται και σε ορισμένες περιπτώσεις ελαττώνονται τα επίπεδα έκφρασής τους [59]. Τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να είναι για παράδειγμα κάποιες παθοφυσιολογικές (κατάθλιψη ή αυξημένη αγχώδης συμπεριφορά) ή παθολογικές καταστάσεις [20, 60-62].

Η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της CRH, όπως συμβαίνει με όλους τους GPCRs, επιτυγχάνεται μέσω φωσφορυλίωσης του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα από τις GPCR κινάσες (GRKs). Οι τελευταίες αναγνωρίζουν το σύμπλοκο υποδοχέα-αγωνιστή και ελκύουν β-αρρεστίνες (β-arrestins) οι οποίες αλλάζουν την στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα οπότε και αναστέλλεται η πρόσδεση τους με τις G πρωτεΐνες. Ακολουθεί ενδοκυττάρωση του υποδοχέα και μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Οι πιο συνήθεις τρόποι είναι η επικάλυψη του συμπλόκου υποδοχέα συνδέτη από μόρια κλαθρίνης (εικόνα 4) [63].

1.5 Ο ρόλος των πεπτιδίων του στρες στο κεντρικό νευρικό σύστημα κατά την απόκριση στο στρες

Όπως προαναφέρθηκε, η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής της απόκρισης στο στρες μέσω της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα, αλλά και της δράσης του στο περιφερικό νευρικό. Κύρια δράση της CRH στην απόκριση στο στρες, είναι η ρύθμιση της έκκρισης της ACTH από τα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης.

Το οξύ ή χρόνιο στρες επάγει την έκφραση της CRH και του CRHmRNA σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Ουσίες όπως η σεροτονίνη, η νορεπινεφρίνη ή η ακετυλοχολίνη αυξάνουν τα επίπεδα του CRHmRNA στον υποθάλαμο. Αντίθετα, τα γλυκοκορτικοειδή αλλά και η ίδια η CRH ελαττώνουν το CRHmRNA στην υπόφυση [27].

Η έκφραση της UCN1 στον υποθάλαμο και τον υπεροπτικό πυρήνα του εγκεφάλου, αυξάνεται κάτω από συνθήκες αύξησης της οσμωτικότητας στο πλάσμα, όπως π.χ σε περίπτωση αφυδάτωσης. Μετά από στρες, η έκφραση της UCN1 αυξάνεται στον πυρήνα Edinger- Westphal (EW).

Θεωρείται ότι στην απόκριση του ΚΝΣ στο στρες, κυρίαρχο ρόλο έχει ο CRHR₁ υποδοχέας και μικρότερο ο CRHR₂ [59]. Μέσω της δράσης της στο ΚΝΣ, η CRH επάγει συμπεριφορές που σχετίζονται με το στρες όπως ελάττωση της όρεξης, αύξηση της μαθησιακής ικανότητας, της διεγερσιμότητας και της αρτηριακής πίεσης, ελάττωση της σεξουαλικής επιθυμίας και αύξηση της κινητικότητας [66]. Στη δράση της CRH, μέσω του CRHR₁, αποδίδονται κλινικές εκδηλώσεις όπως η κατάθλιψη, η ανορεξία και βουλιμία, η επιληψία και άλλα.

Η CRH, μέσω του CRHR₂, ρυθμίζει επίσης αρνητικά την όρεξη και καταστέλει το άγχος. Η αναστολή της δράσης της CRH με τη χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της τροποποιεί συμπεριφορές που επάγονται από το στρες [64]. Για παράδειγμα, οι ανταγωνιστές του CRHR₁ έχουν ισχυρές αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες [65].

Η UCN1 συμμετέχει στην απόκριση τόσο σε κυτταρικό, *in vitro*, όσο και σε συστηματικό, *in vivo*, στρες. Αναφορικά με τη δράση της, στο συστηματικό στρες η UCN1 εμφανίζει πολλές από τις δράσεις της CRH [18] και πιθανώς, οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται στις φαρμακολογικές δράσεις της CRH και της UCN1 οφείλονται εν μέρει σε παράγοντες φαρμακοκινητικής ή στην μεγαλύτερη συγγένεια της UCN1 για τον CRHR₂ υποδοχέα.

Η UCN1 μπορεί να διεγείρει την έκκριση της ACTH, *in vivo* και *in vitro* και θεωρείται ότι μπορεί να υποκαταστήσει την CRH κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες απουσίας της τελευταίας. Ωστόσο, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η ενδογενής UCN1 δεν συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της ACTH από την υπόφυση. Η δράση της UCN1 στον υποθάλαμο περιλαμβάνει την αύξηση της λεπτίνης στο πλάσμα και την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης αποσύνδεσης-1 (uncoupling protein 1) στον φαιό λιπώδη ιστό [67], γεγονός το οποίο δείχνει ότι η UCN1 συμμετέχει στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου, όπως άλλωστε και η CRH [68], η οποία αυξάνει τον φαιό λιπώδη ιστό και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης στον ορό. Η ρυθμιστική επίδραση των πεπτιδίων του στρες στο μεταβολισμό φαίνεται ότι ασκείται δια του CRHR₁ [69].

Οι UCN2 και UCN3 έχουν αγχολυτικές ιδιότητες (μειώνουν την αγχώδη συμπεριφορά των πειραματόζωνων) ενεργώντας μέσω του CRHR₂. Η UCN2 ελαττώνει την όρεξη παρεμβαίνοντας στον κεντρικό αυτόνομο και ενδοκρινικό έλεγχο της όρεξης [23] (εικόνα 2).

1.6 Στοιχεία φυσιολογίας ποντικών με ομόζυγη απαλοιφή των γονιδίων CRH, UCN1, CRHR₁ και CRHR₂

1.6.1 *crh*^{-/-}

Τα *crh*^{-/-} ποντίκια αναπαράγονται κανονικά και δεν παρουσιάζουν διαφορές στα χαρακτηριστικά (μέγεθος και γενική συμπεριφορά) με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ζώα [70]. Η διάρκεια της ζωής τους κυμαίνεται στα φυσιολογικά όρια. Τα *crh*^{-/-} ζώα είναι γόνιμα, αλλά στην περίπτωση που και οι δύο γονείς είναι ομόζυγοι, η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στην περίοδο της εγκυμοσύνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση του νεογέννητου.

Καθώς η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής του ΥΥΕ, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Ο κirkάδιος ρυθμός παραγωγής της κορτικοστερόνης (γλυκοκορτικοειδές των τρωκτικών) δεν υφίσταται σε ζώα *crh*^{-/-} και των δύο φύλων ενώ, τα βασικά επίπεδα της κορτικοστερόνης είναι ελαφρώς μειωμένα σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα. Μετά από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα στα αρσενικά ποντίκια *crh*^{-/-}, η απάντηση της κορτικοστερόνης είναι μικρή και δε ξεπερνά τα βασικά επίπεδα της κορτικοστερόνης των φυσιολογικών ζώων. Τα θηλυκά πάντως παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση στην κορτικοστερόνη που πλησιάζει το 30% της απάντησης των *crh*^{-/-}. Αλλά και στις καταστάσεις χρόνιου στρες τα *crh*^{-/-} ζώα φαίνεται να μπορούν να ανταποκριθούν μερικώς. Τα χαμηλά επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών ρύθμισης των γλυκοκορτικοειδών στα ζώα *crh*^{-/-} δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της ACTH στην υπόφυση, καθώς δεν είναι αυξημένα. Τα ελαττωμένα βασικά επίπεδα της κορτικοστερόνης στα *crh*^{-/-} ζώα δε φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα της ACTH. Στις περιπτώσεις αυτές εκτιμάται ότι παίζουν ρόλο άλλοι παράγοντες, όπως η AVP.

Η απουσία της CRH έχει επίπτωση και στα επινεφρίδια. Η ενεργότητα του PNMT (Phenyl N methyl transferase), του ενζύμου μετατροπής της νορεπινεφρίνης σε επινεφρίνη, είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα να υπάρχει καθυστέρηση στην παραγωγή της τελευταίας. Ωστόσο, θεωρείται ότι γι' αυτό ευθύνεται η χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, παρά η απουσία της CRH.

Οι Weninger και συν. ωστόσο, από την ίδια ερευνητική ομάδα με τους παραπάνω, εξετάζοντας την συμπεριφορά των *crh*^{-/-} ζώων σε φυσιολογικές συνθήκες και κάτω από στρες, έδειξαν ότι παρά την αναποτελεσματική

ενεργοποίηση του ΥΥΕ, τα ζώα αυτά παρουσιάζουν φυσιολογική συμπεριφορά απόκρισης στο στρες [71]. Έδειξαν ότι για την απάντηση στο στρες, δεν είναι απαραίτητοι η CRH όσο και ο υποδοχέας CRHR₁, στον οποίο, απουσία της CRH, πιθανώς να δρα κάποιο άλλο πεπτίδιο, όπως η UCN1. Είναι χαρακτηριστικό, εξάλλου, ότι η έκφραση της UCN1 στην περιοχή του πυρήνα Edinger- Westphal του εγκεφάλου αυξάνεται στα *crh*^{-/-} ζώα. Μέχρι πρόσφατα, η παρουσία της UCN₁ αποκλειστικά στην συγκεκριμένη περιοχή, η οποία δεν είναι γνωστό να ρυθμίζει την συμπεριφορά που επάγεται από στρες, δεν συνηγορούσε στην παραπάνω υπόθεση. Σε μια πιο πρόσφατη αναφορά πάντως, σημειώνεται η έκφραση της UCN1 στο μεσολόβιο διάστημα του προσθίου τμήματος του εγκεφαλικού φλοιού, μια περιοχή που παίζει καθοριστικό ρόλο στην αγχώδη συμπεριφορά [72].

1.6.2 *ucn*^{-/-}

Τα *ucn*^{-/-} ποντίκια αναπαράγονται κανονικά και έχουν φυσιολογική διάρκεια ζωής και χαρακτηριστικά που δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Τα ζώα αυτά δημιουργήθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα σε δυο διαφορετικά εργαστήρια και, για λόγους που δεν έχουν προς το παρόν διευκρινιστεί, παρουσιάζουν κάποιες διαφορές.

Στην πρώτη περίπτωση [73], η συμπεριφορά τους σε καταστάσεις στρες δεν φαίνεται να διαφέρει από τα φυσιολογικά ζώα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και κατεχολαμινών κάτω από φυσιολογικές ή κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης του ΥΥΕ. Η απουσία UCN1 βρέθηκε ωστόσο να προκαλεί πρόβλημα σε ένα είδος αντανakλαστικής συμπεριφοράς σε έντονο οπτικοακουστικό ερέθισμα, που μάλλον δεν οφείλεται σε πρόβλημα ακοής δεδομένης της μεγαλύτερης ευαισθησίας των ζώων σε θορύβους χαμηλής έντασης.

Στην δεύτερη περίπτωση πάντως [74], τα *ucn*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζονται αγχώδη κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, υποδεικνύοντας κάποιο αγχολυτικό ρόλο για την UCN1. Η έκφραση του CRFR₂ υποδοχέα στο ενδιάμεσο πλάγιο διάφραγμα βρέθηκε ωστόσο σημαντικά ελαττωμένη, κάτι μη συνηθισμένο για υποδοχείς που συνδέονται με G- πρωτεΐνες και των οποίων η έκφραση

αυξάνεται απουσία του προσδέτη τους. Πιθανώς, στην περίπτωση αυτή να αυξάνεται η έκφραση κάποιου άλλου προσδέτη του CRFR₂ υποδοχέα (UCN2 ή UCN3). Ας σημειωθεί ότι τα *ucn^{-/-}* ποντίκια στην περίπτωση αυτή, παρουσίασαν και πρόβλημα στην ακοή, γεγονός που θα μπορούσε να ευθύνεται για την αγχώδη συμπεριφορά τους.

1.6.3 *crhr₁^{-/-}*

Η έλλειψη του υποδοχέα CRHR₁ προκαλεί μειωμένη απόκριση στο στρες [75]. Η λειτουργία του ΥΥΕ είναι ελαττωματική και οφείλεται στην υποπλασία της στηλιδωτής ζώνης των επινεφριδίων από την ανεπάρκεια της ACTH κατά την περίοδο ανάπτυξης. Τα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης είναι ιδιαίτερα χαμηλά στα *crhr1^{-/-}* ζώα και παρατηρείται μικρή αύξησή τους μετά από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα. Τα *crhr1^{-/-}* ζώα δεν απαντούν στη CRH λόγω απουσίας του υποδοχέα CRHR₁, τα επίπεδα της ACTH κάτω από φυσιολογικές συνθήκες φαίνεται να είναι κανονικά, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου άλλου παράγοντα που μάλλον φαίνεται να είναι η AVP. Τα επίπεδα της CRH είναι αυξημένα στον υποθάλαμο και αποδίδονται στην απουσία αρνητικής ρύθμισης από τα γλυκοκορτικοειδή.

1.6.4 *crhr₂^{-/-}*

Σε αντίθεση με τα *crhr1^{-/-}* ζώα, η απουσία του CRHR₂ οδηγεί σε αυξημένη αγχώδη συμπεριφορά. Επιπλέον, η απάντηση στο στρες είναι πιο έντονη και πιο γρήγορη. Τα επίπεδα του CRHR₂mRNA είναι αυξημένα στην περιοχή της αμυγδαλής, αλλά και το UCN1mRNA είναι αυξημένο στον εγκέφαλο (περιοχή EW) [76]. Αυξημένη βρέθηκε επίσης και η έκφραση της βασοπρεσίνης (VP) στον υποθάλαμο των *crhr2^{-/-}* ζώων.

Μετά τη γέννηση τα *crhr2^{-/-}* ζώα εμφάνισαν αυξημένη αγγειοδιαστολή για την ερμηνεία της οποίας διατυπώθηκε η άποψη ότι ο CRHR₂ είναι ένας τονικός αναστολέας της αγγειοδιαστολής [77]. Οι υποδοχείς CRHR₂ εκφράζονται φυσιολογικά στο καρδιαγγειακό σύστημα όπου φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο [30]. Ο καρδιακός ρυθμός δεν είχε διαφορά στους δύο τύπους πειραματόζων. Ωστόσο, η ενδοφλέβια χορήγηση UCN1 είχε ως αποτέλεσμα να

αυξηθεί η καρδιακή λειτουργία στα φυσιολογικά ζώα (*crhr2^{+/+}*), αλλά όχι στα *crhr2^{-/-}* ζώα. Η εξήγηση πιθανών βρίσκεται στο γεγονός ότι οι υποδοχείς CRHR₂ εκφράζονται φυσιολογικά στα καρδιομυοκύτταρα και προκαλούν συστολή της καρδιάς [78].

1.6.5 *crhr1^{-/-} / crhr2^{-/-}*

Οι Bale et al έδειξαν ότι ομόλογη απαλοιφή και των δύο υποδοχέων CRH έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη απόκριση στο στρες και μάλιστα περισσότερο απ' ότι στην περίπτωση απουσίας μόνο του CRHR₁, όπως προέκυψε από την μέτρηση των επιπέδων της ACTH και της κορτικοστερόνης μετά από έκθεση σε κάποιο στρες, υποδηλώνοντας ότι και οι δύο υποδοχείς συμμετέχουν στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες [79]. Στα πειράματα συμπεριφοράς παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ζώων. Τα θηλυκά *crhr1^{-/-} / crhr2^{-/-}* ζώα παρουσιάζουν κάποιου είδους αγχολυτικό φαινότυπο σε αντίθεση με τα αρσενικά. Επίσης είναι χαρακτηριστικό ότι η απουσία και των δύο υποδοχέων επάγει τόσο τα επίπεδα έκφρασης της CRH (όπως στα *crhr1^{-/-}* ζώα) όσο και της UCN3 (όπως και στα *crhr2^{-/-}* ζώα) στον εγκέφαλο. Ωστόσο, δεν αλλάζουν τα επίπεδα της UCN1 στην περιοχή του πυρήνα EW του εγκεφάλου σε αντίθεση με τα *crhr2^{-/-}* ζώα.

1.7 Πεπτίδια του στρες και περιφερική δράση

Όπως προαναφέρθηκε, η CRH παράγεται κεντρικά, στον υποθάλαμο και ρυθμίζει την ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα, τα τελικά προϊόντα του οποίου (τα γλυκοκορτικοειδή) έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Συνεπώς, η δράση της «κεντρικής» CRH μπορεί, έμμεσα, να θεωρηθεί αντιφλεγμονώδης. Ωστόσο, η CRH, τα συγγενή πεπτίδια UCN1, UCN2 και UCN3, και οι υποδοχείς τους, εκφράζονται και στους περιφερικούς ιστούς. Η οικογένεια των πεπτιδίων του στρες στην περιφέρεια φαίνεται να συμμετέχει στην ανοσοαπάντηση ανεξάρτητα από τον ΥΥΕ άξονα, άποψη που ενισχύεται από πλήθος ερευνητικών δεδομένων τα τελευταία χρόνια.

1.7.1 Επιδράσεις της οικογένειας των ουροκορτινών στην περιφέρεια

Οι ουροκορτίνες λόγω του ότι ασκούν τη δράση τους κυρίως μέσω του CRHR₂, έχουν ιδιαίτερη σημασία στα περιφερικά όργανα και την καρδιά. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί το κατά πόσο η δράση τους είναι επιβλαβής ή ωφέλιμη, έχει βρεθεί πως η χορήγησή τους σε ισχαιμικό τραύμα είναι κυτταροπροστατευτική [80]. Οι Ikeda και συν. [82,83], έχουν δείξει ότι οι ουροκορτίνες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρδιακών μη-μυοκυττάρων, μετά από ισχαιμικό επεισόδιο.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που ερεύνησαν τη δράση των ουροκορτινών στην καρδιά. Υποστηρίζεται πως, η παραγόμενη από το μυοκάρδιο ουροκορτίνη λειτουργεί τοπικά καρδιοπροστατευτικά. Σύμφωνα με τους Huang και συν., [81], οι ουροκορτίνες προκαλούν ενδοθηλιοεξαρτώμενη και μη, χάλαση της στεφανιαίας αρτηρίας σε αρουραίους. Σε πρόβατα μείωσαν την περιφερική αρτηριακή πίεση και τα επίπεδα πλάσματος της AVP και αύξησαν τα νατριουρητικά πεπτιδία προκαλώντας δόσοεξαρτώμενη αύξηση του όγκου των ούρων, του νατρίου και της κάθαρση κρεατινίνης. Οι UCNs επάγουν, επίσης, την έκκριση του αANP (atrial natriuretic peptide) και του BNP (brain natriuretic peptide) σε καλλιέργεια καρδιομυοκυττάρων νεογνών αρουραίων, πεπτιδία που ασκούν ευοδωτική δράση στην καρδιακή λειτουργία. Η αύξηση της έκκρισης των πεπτιδίων ANP και BNP, η οποία συμβαίνει σε περιπτώσεις καρδιακής υπερτροφίας, παρατηρήθηκε σε *in vitro* μελέτες καρδιομυοκυττάρων νεογνών και ανήλικων αρουραίων υπό την επίδραση των ουροκορτινών [89-91]. Από τους Wiley και συν. [85], διατυπώθηκε η άποψη ότι οι ουροκορτίνες 2 και 3, μέσω του CRHR₂ υποδοχέα, ασκούν αγγειοδιασταλτική δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα που αντισταθμίζει την κεντρική στρεσογόνο δράση της CRH και της UCN1. Ωστόσο υπάρχουν δεδομένα που δεν υποστηρίζουν την ευεργετική επίδραση των ουροκορτινών στο καρδιαγγειακό.

Οι Yang και συν. [86], παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (angiotensin converting enzyme, ACE), μετά ενδοφλέβια χορήγηση UCN1 σε ποντίκια. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα Ang-II παρατηρήθηκαν σε πειραματόζωα, κατόπιν χορήγησης υψηλών δόσεων UCN2. Σε μελέτες που έγιναν σε αρουραίους, η υποχρόνια ή η χρόνια επίδραση των ουροκορτινών είχε διαφορετικά αποτελέσματα στη δραστηριότητα του ACE, του

συστήματος ρενίνης/αλδοστερόνης και της ενδοθηλίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι οι δράσεις των ουροκορτινών εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, όσο αφορά τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αλλά και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους και σε συνάρτηση με το χρόνο δράσης τους.

Οι ουροκορτίνες επηρεάζουν επίσης στην αγγειογένεση, με την έννοια ότι αναστέλλουν το σχηματισμό τριχοειδών, υποδεικνύοντας ένα ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων [85]. Σε νεοπλάσματα παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση UCN2 αναστέλλει την ανάπτυξη νέων αγγείων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη του όγκου. Η ανωτέρω παρατήρηση εγείρει το ερώτημα εάν και κατά πόσο η χορήγηση UCN2 σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (heart failure) ή μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου θα επηρεάσει δυσμενώς το σχηματισμό νέων αγγείων που είναι αναγκαίος [88].

Σύμφωνα με τους [60] Coste και συν., προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο LPS και / ή οι κυτταροκίνες, αυξάνουν την έκκριση ουροκορτινών από την καρδιά, και οδηγούν σε ελάττωση του CRHR₂. Δεδομένου ότι η CRH και οι UCNs αυξάνουν τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και την αιματική ροή, είναι πολύ πιθανό η ελάττωση της επιφανειακής έκφρασης του CRHR₂ υποδοχέα στη φλεγμονή να ρυθμίζει το επίπεδο της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου. Επιπλέον, οι UCNs αλλά όχι η CRH παίζουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στο γαστρικό επιθήλιο, σύμφωνα με τους Chatzaki και συν. [84] που έδειξαν πως τα επίπεδα των UCNs και η εξέλιξη της χρόνιας φλεγμονής στο γαστρικό βλεννογόνο είναι αντιστρόφως ανάλογα.

Η συμμετοχή των ουροκορτινών στην φλεγμονώδη αντίδραση επεκτείνεται σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων της CRH, οι ουροκορτίνες επάγουν ισχυρά την αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων και την αγγειακή διαπερατότητα. Επιδρώντας στο ενδοθηλιακό στρώμα των αγγείων, στα μονοκύτταρα, στα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα, επάγουν σε συνθήκες στρες, διαταραχές όπως η ατοπική δερματίτιδα ή η ψωρίαση Singh και συν [87].

Οι ουροκορτίνες βρέθηκε ότι ενεργοποιούν την έκκριση των IL-6 και IL-1β, *in vitro*, μέσω των οποίων το ενδοθήλιο προάγει την αλλαγή του ενδοθηλιακού προφίλ από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό. Παράλληλα, τα πεπτίδια της

οικογένειας της CRH βρέθηκε να μειώνουν την προκαλούμενη από IL-1α σύνθεση της PGI₂, που είναι ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγον.

Γενικά, η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο ομαλός πολλαπλασιασμός τους και η λειτουργία τους είναι ένα σύνθετο φαινόμενο το επηρεάζουν οι ουροκορτίνες. Υπάρχουν ωστόσο επιφυλάξεις για το εάν οι ουροκορτίνες ασκούν αμιγώς προστατευτική δράση στο ενδοθήλιο [86].

1.7.2 Πεπτίδια του στρες και απόπτωση

Στην κυτταρική σειρά PC12, η CRH επάγει την απόπτωση από απουσία τροφικών παραγόντων [93], ενώ στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ρετινοβλαστώματος Y79, η CRH προστατεύει ενάντια στις δράσεις της καμπτοθεκίνης, δηλαδή σε απόπτωση εξαιτίας βλάβης στο DNA, καταστέλλοντας την προ-κασπάση-3, μέσω PKA, σε κάποιο στάδιο πριν την ενεργοποίηση της [94]. Η UCN1 έχει δείχθει ότι προστατεύει νευρώνες του ιππόκαμπου από κυτταρικό θάνατο που επάγεται από οξειδωτικούς και κυταροτοξικούς παράγοντες [95]. Η CRH από μόνη της δεν είναι νευροτοξική, πιθανώς όμως να συμμετέχει έμμεσα στην καταστροφή νευρικών κυττάρων από άλλα επιβλαβή ερεθίσματα [96].

Οι UCNs παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα επίπεδα έκφρασης της UCN1 αυξάνονται στην καρδιά μετά από ισχαιμικό επεισόδιο [97] είναι υψηλότερα σε καρδιομυοπάθειες [98] και βρίσκονται αυξημένα στο πλάσμα αλλά και στο μυοκάρδιο, στην καρδιακή ανακοπή [99]. Οι UCNs, μεταξύ άλλων, προστατεύουν τα μυοκύτταρα της καρδιάς από αποπτωτικό ή νεκρωτικό θάνατο που επάγεται από ισχαιμία μέσω ενεργοποίησης MAP κινασών (MEK/ERK), Akt και επαγωγής της έκφρασης καναλιών K(ATP) [97, 100].

Στο αναπαραγωγικό σύστημα, η CRH εκφράζεται στο ενδομήτριο από τα κύτταρα του φθαρού χιτώνα και της τροφοβλάστης και δρα αυτό- και παρακρινικά διεγείροντας την έκφραση FasL επάγοντας έτσι την απόπτωση στα ενεργοποιημένα από το έμβρυο T- κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο παίρνει μέρος στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης στο ενδομήτριο, στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης και υποβοηθάει στην διατήρησή της [14].

1.8 Νευροενδοκρινικό-ανοσοποιητικό σύστημα

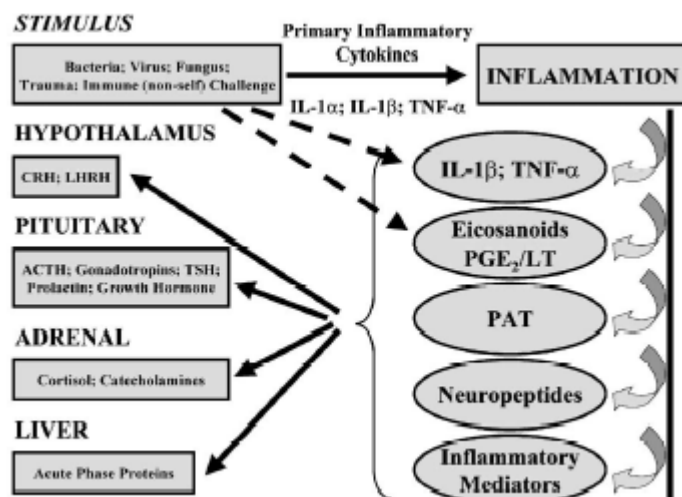
1.8.1 Αλληλεπίδραση νευροενδοκρινικού- ανοσοποιητικού συστήματος

Πλήθος ερευνητικών δεδομένων υποστηρίζει πλέον την επικοινωνία νευροενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος (εικόνα 5). Το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα μπορεί να διεγείρουν ή να αναστείλουν μηχανισμούς ειδικής ή μη ειδικής ανοσοαπάντησης μέσω πεπτιδικών ορμονών (α-MSH, νευροτενσίνη, βραδυκίνη, κορτικοστατίνη), νευροπεπτιδίων (NK1, NPY) και νευροδιαβιβαστών [101]. Η νευροκινίνη (NK-1), για παράδειγμα, επάγει, μεταξύ άλλων, την αγγειακή διαπερατότητα στο δέρμα, τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων και μακροφάγων, την αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων και την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε ανοσοκύτταρα. Το νευροπεπτίδιο Υ αναστέλλει την έκκριση κυτοκινών, όπως της IL-6 από τα μακροφάγα, καταστέλλει την ενεργότητα των NK κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις αναστέλλει την παραγωγή αντισωμάτων από λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αντιγόνα. Τα νευροπεπτίδια VIP (Vasoactive Intestinal Peptide, αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο) και PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide) αναστέλλουν την φαγοκυττάρωση, την χημειοταξία, την παραγωγή IL-6 και την έκφραση του TNF-α από ενεργοποιημένα μακροφάγα [102]. Ένα ευρύ φάσμα αντιφλεγμονωδών δράσεων της α-MSH έχει αναφερθεί σε ανοσοκύτταρα και έχει αποδοθεί στην κατασταλτική δράση που φαίνεται να ασκεί αυτή στην ενεργοποίηση του NFκΒ [103]. Η προλακτίνη παρουσιάζει ευοδωτική δράση στη λειτουργία των λεμφοκυττάρων και στον πολλαπλασιασμό τους μέσω της IL-2 και σε περιπτώσεις αυτοάνοσης εγκεφαλίτιδας η τεστοστερόνη έχει προστατευτική δράση αυξάνοντας την παραγωγή IL-10 από τα T-λεμφοκύτταρα. Είναι ενδιαφέρον πως καταστάσεις στρες ή στρεσογόνοι παράγοντες που δεν σχετίζονται με λοιμογόνους παράγοντες ή φλεγμονώδεις επεξεργασίες μπορεί να επάγουν ανοσολογική απόκριση από μόνοι τους [104].

Αντίστροφα, το ανοσολογικό σύστημα μέσω των κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF-α) αλλά και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως είναι η IFN-α ή ο PAF (Platelet Activating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων), συμμετέχει στη ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ. Ειδικότερα, η IFN-α διεγείρει την σύνθεση κορτικοστερόνης από επινεφριδιακά κύτταρα ενώ τα προστανοειδή και ο PAF δρουν με άμεσο τρόπο στη διέγερση της έκκρισης της CRH και της AVP

στον υποθάλαμο. Ορισμένες κυτταροκίνες, ή συνδυασμός αυτών, μπορεί να οδηγήσουν σε αντίσταση στη δράση των γλυκοκορτικοειδών. Ενδεικτική είναι η περίπτωση των ιντερλευκινών, IL-2 και IL-4, οι οποίες μειώνουν τη συγγένεια των γλυκοκορτικοειδών προς τον υποδοχέα τους στα T- κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε αντίσταση στη δράση τους. Ειδικά η IL-2 φαίνεται να επηρεάζει τον ΥΥΕ άξονα σε πολλά επίπεδα [105]. Ευοδωτική φαίνεται να είναι και η δράση της IL-3 και IL-6 στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ. Υποστηρίζεται ότι η έκκριση κορτιζόλης, που προκαλείται από τη δράση των κυτταροκινών αυτών, διαμεσολαβείται, αντίστοιχα, από το μονοπάτι της λιποοξυγενάσης και της κυκλοοξυγενάσης. Την παραγωγή της CRH επάγει και η IL-10 η οποία εκτός από τα ανοσοκύτταρα, παράγεται από κύτταρα της υπόφυσης, του εγκεφάλου και του νευρικού ιστού και φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της παραγωγής των γλυκοκορτικοειδών.

Συμπερασματικά, καταστάσεις στρες που σχετίζονται με λοιμογόνους παράγοντες ή φλεγμονώδεις επεξεργασίες ενεργοποιούν τον ΥΥΕ άξονα μέσω κυτταροκινών που διεγείρουν την παραγωγή CRH στον υποθάλαμο, ενώ παράλληλα ασκούν διεγερτική δράση και στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Στην αρχή οι κυτταροκίνες έχουν ευοδωτική δράση στην ανοσολογική απάντηση αλλά η επακόλουθη ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα οδηγεί σε ανοσοκαταστολή.



Εικόνα 5. Η αλληλεπίδραση του νευροενδοκρινικού με το ανοσοποιητικό σύστημα

Η δράση αυτή ασκεί προστατευτικό ρόλο έναντι υπερβολικής και παρατεταμένης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού. Η βιολογική σημασία της αρνητικής ρύθμισης την οποία επάγει η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα στην δραστηριότητα του ανοσοποιητικού φαίνεται στην περίπτωση των επινεφριδιοεκτομιθέντων αρουραίων οι οποίοι, μετά από χορήγηση LPS, εμφανίζουν πολύ υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών και σε μεγάλο ποσοστό πεθαίνουν.

1.8.2 Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην ανοσοαπάντηση

Τα γλυκοκορτικοειδή γενικά θεωρούνται ισχυροί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, αλλά φαίνεται να συμμετέχουν στην ανοσοαπάντηση με τρόπο όχι πάντα αρνητικό. Προσδένονται σε μια πρωτεΐνη μεταφοράς, την CBG (corticosteroid binding globulin), η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση με τους υποδοχείς τους και συνεπώς την έκφραση της βιολογικής δράσης τους. Τα επίπεδα της CBG ελαττώνονται κατά την οξεία φάση απόκρισης σε κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα με αποτέλεσμα να κυκλοφορούν περισσότερα ελεύθερα γλυκοκορτικοειδή.

Έχει προταθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ασκούν αντίθετες δράσεις κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες, πιθανώς λόγω διαφορετικής συγκέντρωσης τους. Επιπρόσθετα, μπορεί να έχουν άλλη δράση σε οξείες και άλλη σε χρόνιες καταστάσεις. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο αντιφλεγμονώδης ρόλος των γλυκοκορτικοειδών σε περιπτώσεις χρόνιου στρες αντιστρέφεται [106].

Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση σε πολλαπλά επίπεδα. Αρχικά αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων που έχει προκληθεί από την επίδραση αντιγονικού ερεθισμού, καθώς και τη διαδικασία παρουσίασης αντιγόνων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, μέσω αναστολής της έκφρασης των μορίων της τάξης II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ). Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή ελαττώνουν την κυτταρική δραστηριότητα μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των βοηθητικών T- λεμφοκυττάρων καθώς και των φονικών κυττάρων. Οι Franchimont και συν. έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη (συνθετικό ανάλογο των γλυκοκορτικοειδών) αναστέλλει την παραγωγή IFN-γ που επάγεται

από την δράση της IL-12 σε T- και NK- λεμφοκύτταρα, μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της Stat-4 [107].

Η παραγωγή γλυκοκορτικοειδών είναι εξαιρετικά σημαντική για την ανοσολογική απόκριση όπως προκύπτει από διάφορες παρατηρήσεις κλινικών καταστάσεων υπερανοσίας και αυτοάνοσων νόσων. Για παράδειγμα, η ανεπάρκεια παραγωγής της CRH (ανερεθιστότητα του CRH νευρώνα) που παρατηρείται σε ποντίκια Lewis, επιτρέπει την ανάπτυξη ρευματοειδούς αρθρίτιδας καθώς και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων. Σημαντική διαταραχή της ανοσιακής απάντησης παρουσιάζεται σε περιπτώσεις αντίστασης των γλυκοκορτικοειδών σε όργανα στόχους. Στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας η συγκέντρωση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στα λευκοκύτταρα είναι μειωμένη κατά 50%. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα τα γλυκοκορτικοειδή έχουν άμεση ευοδωτική δράση στην παραγωγή IL-10 από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMNCs) και επαγωγή της ανοσοαπάντησης Th-2 τύπου [108]. Αντίσταση των λευκοκυττάρων στη δράση των γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται σε περιπτώσεις άσθματος που ανθίστανται στα στεροειδή, ενώ σε μερικούς ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) παρατηρήθηκε μείωση της χημικής συγγένειας της κορτιζόλης για τους υποδοχείς της στα λευκοκύτταρα.

Σε καταστάσεις χρόνιου στρες, κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα φαίνεται να παίζει η AVP παρά η CRH. Πειραματικά μοντέλα επαγόμενων φλεγμονών, όπως είναι η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE), μπορούν να θεωρηθούν καταστάσεις χρόνιου στρες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των ζώων, στα μοντέλα αυτά, είναι η μειωμένη έκφραση της υποθαλαμικής CRH, ενώ το mRNA της AVP βρίσκεται αυξημένο. Υποστηρίζεται ότι ένας λόγος που μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι η λιγότερο ευαίσθητη ρύθμιση της AVP στην ανασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών (τα οποία είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε χρόνιο στρες) σε σχέση με την CRH [109].

1.8.3 Παρουσία πεπτιδίων του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα

Το 1990 ανιχνεύτηκε η CRH (πεπτίδιο και mRNA) σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (ανθρώπινα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα) [110]. Το 1991 οι Karalis και συν. ανέφεραν για πρώτη φορά την

παρουσία ανοσοενεργού CRH σε φλεγμονώδες έκκριμα. Φλεγμαίνοντες ιστοί αρουραίων Sprague- Dawley, στους οποίους είχε επαχθεί άσηπτη φλεγμονή με χημικό τρόπο, βρέθηκαν να εκφράζουν την CRH [111]. Στη συνέχεια, η CRH ανιχνεύθηκε σε ποικίλες τοπικές φλεγμονές, όπως στον αρθρικό θύλακα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα [112], στον σπλήνα και τις αρθρώσεις αρουραίων Lewis με φλεγμονώδη αρθρίτιδα [113], σε φλεγμονώδεις θυροειδίτιδες [114] και στο στομάχι ασθενών με εντεροκολίτιδα [115].

CRHmRNA εντοπίστηκε στο ήπαρ, τον θύμο αδένα και στο σπλήνα αρουραίων [116]. Οι Muglia και συν. έδειξαν την έκφραση του CRHmRNA σε σπληνοκύτταρα ποντικών και αφού τα διαχώρισαν σε B-, T- λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, βρήκαν ότι μόνο τα T- λεμφοκύτταρα περιείχαν CRH mRNA [117]. Στο θύμο, η CRH εντοπίστηκε στο μυελό και συγκεκριμένα στα επιθηλιακά κύτταρα και στα μακροφάγα, αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα [118]. Στον σπλήνα η CRH βρέθηκε στον ερυθρό πολφό, στις περιφερικές ζώνες σε θέσεις που εντοπίζονται B-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.

Στους λεμφοειδείς ιστούς, πολλά από τα κύτταρα που περιείχαν CRH ήταν κοντά σε νοραδρενεργικούς νευρώνες. Ίσως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, στον σπλήνα και το θύμο, να μην είναι οι μόνες πηγές CRH, καθώς με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές αποκαλύφθηκε η παρουσία CRH σε νευρικά κύτταρα που νευρώνουν τα αιμοφόρα αγγεία, τον σπλήνα, το θύμο και τον αρθρικό θύλακα [119].

Η UCN1 απομονώθηκε το 1995. Οι Bamberger και συν. ανέφεραν για πρώτη φορά, μόλις το 1998, την έκφραση της UCN1 σε ενεργοποιημένα και μη ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και στην κυτταρική σειρά Jurkat, ενώ ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι στα ίδια κύτταρα δεν βρήκαν CRHmRNA [117]. UCN1 mRNA ανιχνεύτηκε επίσης στο θύμο και το σπλήνα αρουραίου [120].

CRH και UCN1 mRNA ανιχνεύθηκαν επίσης στα ιστιοκύτταρα [121]. Μάλιστα, η ποσότητα των πεπτιδίων του στρες στα κύτταρα αυτά είναι συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητά τους στον πλακούντα ή τον υποθάλαμο.

Πεπτίδιο και UCN1mRNA βρέθηκαν σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων, στον αρθρικό θύλακα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ινοβλάστες, ενδοθηλιακά των αιμοφόρων αγγείων και διηθούντα μονοκύτταρα) [122]. Στους πνεύμονες

από επίμυες με βρογχικό άσθμα τα επίπεδα έκφρασης της UCN1 βρέθηκαν, πρόσφατα, ιδιαίτερα αυξημένα [123].

Η UCN1 εκφράζεται μετά τη γέννηση στα μακροφάγα της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου του παχέος εντέρου [124]., γεγονός το οποίο δείχνει ότι ο ρόλος της UCN1 πιθανώς αφορά την έκθεση του οργανισμού σε μια νέα δίαιτα ή/και τα βακτήρια που είναι παρόντα στο γαστρεντερικό επιθήλιο. Η πρωτεΐνη της UCN1 ανιχνεύτηκε και στα επιθηλιακά κύτταρα στο στομάχι. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου βρέθηκε αρκετά υψηλότερη σε ασθενείς με γαστρίτιδα από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού απ' ότι σε φυσιολογικούς [125].

Πειράματα που έγιναν με τη χρήση παραγόντων ενεργοποίησης, όπως οι κυτταροκίνες, που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ο LPS ή άλλα μιτογόνα, είχαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Σε σπληνικά και θυμικά κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με IL-1 δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση της έκκρισης της CRH [116.], ενώ ο LPS και η ConA (Concavalin A) βρέθηκε να αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα της εκκρινόμενης CRH από B- και T- λεμφοκύτταρα αντίστοιχα [126]. Ουσίες όπως η phytohemagglutinin και η 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate είχαν παρόμοια αυξητικά αποτελέσματα στα επίπεδα του CRHmRNA των T- λεμφοκυττάρων [127].

1.8.4 Υποδοχείς της CRH στο ανοσοποιητικό σύστημα

Υποδοχείς της CRH έχουν βρεθεί μεταξύ άλλων σε σπληνοκύτταρα [128-130], μονοκύτταρα, T- λεμφοκύτταρα [131, 132] και ιστιοκύτταρα [133].

Οι Webster και συν. μάλιστα αναγνώρισαν τα σπληνοκύτταρα που έφεραν υποδοχείς για τη CRH ως μακροφάγα [128.]. Θεαματική αύξηση (17-φορές) του CRHR₁ υποδοχέα παρατηρήθηκε σε σπληνοκύτταρα ποντικού μετά από επαγωγή οξείας και χρόνιας φλεγμονής με χορήγηση LPS και Complete Freund's Adjuvant αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των κυττάρων που εξέφραζε τον υποδοχέα κατά την οξεία αντίδραση ήταν τα πολυμορφοπύρηνα (ουδετερόφιλα), τα οποία διέρχονται τον σπλήνα και ενεργοποιούνται για φαγοκυττάρωση και παραγωγή υπεροξειδίου. Στην περίπτωση ενεργοποίησης μιας χρόνιας ανοσοαπάντησης βρέθηκε ότι τα πρόδρομα κύτταρα των κοκκιοκυττάρων διεγείρονται να

εκφράσουν τον CRHR₁ κατά τη διάρκεια της σπληνικής αιμοποίησης [130] (218). Σημειώνεται ότι και οι δύο τύποι υποδοχέων CRH (CRHR₁ και CRHR₂) έχουν ανιχνευτεί στον σπλήνα και το θύμο πάντως [120].

1.8.5 Δράσεις των πεπτιδίων του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα

1.8.5.1 In vivo

Προφλεγμονώδεις δράσεις

Η μελέτη της δράσης των πεπτιδίων CRH στο μηχανισμό της φλεγμονής παρουσιάζει εξαιρετική πολυπλοκότητα καθώς σε in vivo πειράματα ενέχονται αφενός η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και αφετέρου αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλήθους μορίων, όπως τα γλυκορτικοειδή, οι κυτταροκίνες και τα διάφορα νευροπεπτίδια, κεντρικά και περιφερικά.

Σε πειραματικά επαγόμενη φλεγμονή σε αρουραίους, η χορήγηση, περιφερικά, αντισώματος έναντι της CRH ή antalarmin, που είναι ειδικός ανταγωνιστής του CRHR₁, πριν την υποδόρια ένεση carageenin, ακολουθήθηκε από σημαντική καταστολή της κυτταρικής διήθησης και μείωση του φλεγμονώδους εκκρίματος [111], υποδεικνύοντας ένα προ-φλεγμονώδη ρόλο για τη περιφερική CRH.

Ανοσοενεργός CRH βρέθηκε στους οφθαλμούς τρωκτικών που είχαν αναπτύξει πειραματικά επαγόμενη αυτοάνοση κερατίτιδα [134] και σε πειραματικά επαγόμενη αρθρίτιδα [135]. Τοπική χρήση ανταγωνιστών κατά των υποδοχέων της CRH μείωσε την φλεγμονή και στις δύο περιπτώσεις.

Κατά την οξεία φλεγμονή που προκαλείται στο γαστρεντερικό από την εντεροτοξίνη του *C. Difficile* (TxA) αυξάνεται η έκφραση της CRH και των υποδοχέων της, CRHR₁ και CRHR₂, ενώ η χρήση ανταγωνιστών κατά των υποδοχέων της CRH μειώνει την φλεγμονή [136, 137]. Ωστόσο, στις αναφορές αυτές δεν ήταν ξεκάθαρος ο ρόλος της περιφερικής έναντι της κεντρικής CRH στη ρύθμιση της φλεγμονής.

Πολύ πρόσφατα, μια άλλη ομάδα ερευνητών μελέτησε το ρόλο της CRH και της UCN2 στο πειραματικό αυτό μοντέλο φλεγμονής. Ας σημειωθεί ότι για το ρόλο της UCN2 στην φλεγμονώδη ανοσοαπάντηση, ελάχιστα πράγματα είναι

γνωστά. Οι Ia Fleur και συν. εξέτασαν το ρόλο των τοπικά παραγόμενων CRH και UCN2 στη φλεγμονώδη αντίδραση από TxA, στο γαστρεντερικό, αναστέλλοντας τοπικά την έκφρασή τους με τη χρήση iRNA [138]. Η αποσιώπηση των γονιδίων της CRH και της UCN2 δεν συνοδεύτηκε από κάποια μη-ειδική ανοσοαπάντηση ή αλλαγή στο προφίλ των κυτταροκινών, στο πλάσμα των αρουραίων. Ωστόσο, η τοπική εξάλειψη της έκφρασης του CRH, αλλά όχι της UCN2, είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της επαγόμενης φλεγμονής από TxA. Τα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα δεν μεταβλήθηκαν μετά την αποσιώπηση των γονιδίων της CRH και της UCN2 στον ειλεό και χορήγηση TxA αύξησε τα επίπεδά της μόνο στα ζώα αναφοράς και σε εκείνα που τους χορηγήθηκε iRNA-UCN2, που εξουδετέρωνε το ενδογενές RNA. Η απουσία αυξημένων επιπέδων κορτικοστερόνης στα ζώα αναφοράς, στα οποία χορηγήθηκε iRNA-CRH, αποδόθηκε στο ότι δεν εμφάνισαν σχεδόν καθόλου συμπτώματα φλεγμονής και έτσι αποδόθηκε στην CRH ένας προφλεγμονώδης ρόλος ανεξάρτητος από την δράση γλυκοκορτικοειδών.

Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Έχουν επίσης παρατηρηθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις της CRH και της UCN1. Στην αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, όπου παθογόνα T-κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες, που καταστρέφουν τη μυελίνη, όπως ο TNF-α, η ενδοπεριτονιακή χορήγηση CRH ή UCN1 κατέστειλε τα συμπτώματα. Στο αποτέλεσμα αυτό βρέθηκε να μεσολαβεί μερικώς η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα [139].

Ενδοδερμική χορήγηση CRH είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του οιδήματος στο πέλμα αρουραίων μετά από έκθεση σε ζέστη (48-58 °C), κρύο (-20 °C) ή κάποια χημική ουσία [140], με τρόπο ανεξάρτητο από γλυκοκορτικοειδή ή φαινόμενα υπότασης [141]. Μια άλλη ομάδα, μερικά χρόνια αργότερα, ανέφερε ότι και το πεπτίδιο της UCN1 έχει ανάλογες κατασταλτικές ιδιότητες στο επαγόμενο από θερμικό τραύμα οίδημα σε αρουραίους [142]. Ωστόσο, οι Correa και συν., χρησιμοποιώντας το ίδιο μοντέλο, βρήκαν ότι το αποτέλεσμα της δράσης της CRH στο επαγόμενο οίδημα στο πέλμα ήταν ανάλογο της δόσης του

CRH. Έδειξαν ότι μικρές δόσεις πεπτιδίου είχαν αντιφλεγμονώδη δράση ενώ στις μεγάλες δόσεις η δράση του CRH ήταν μάλλον προφλεγμονώδης [143].

Ενδοφλέβια χορήγηση CRH ή UCN1 πριν από τη χορήγηση LPS βρέθηκε να ελαττώνει σημαντικά τα επίπεδα του παραγόμενου TNF-α στον ορό ποντικών [144]. Στο αποτέλεσμα αυτό δεν φάνηκε να συμβάλουν τα γλυκοκορτικοειδή αφού δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα της κορτικοστερόνης στον ορό των ποντικών στους οποίους χορηγήθηκε LPS μόνο ή LPS μαζί με UCN ή CRH.

Σε ένα άλλο *in vivo* μοντέλο φλεγμονής, επαγόμενης με *Listeria monocytogenes*, η ενδοπεριτονιακή χορήγηση UCN2, αλλά όχι CRH ή UCN1, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική επίταση της φλεγμονής (μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων στον σπλήνα και το ήπαρ) και την αύξηση της θνησιμότητας των ποντικών. Η δράση αυτή της UCN2 σχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα IL-10 στα σπληνοκύτταρα, ενώ τα επίπεδα της IFN-γ και του TNF-α βρέθηκαν μειωμένα. Ανταγωνιστής του CRF₂ ανέστειλε τη δράση της UCN2 [145].

1.8.5.2 In vitro

Αρκετές *in vitro* μελέτες δείχνουν προ-φλεγμονώδεις κυρίως δράσεις της CRH. Οι Mc Gillis και συν. έδειξαν ότι η CRH επάγει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό απομονωμένων σπληνοκυττάρων αρουραίου [146]. Άλλοι έδειξαν ότι η CRH μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση των υποδοχέων της IL-2 σε T- λεμφοκύτταρα [147], την έκφραση πρωτεϊνών οξείας φάσης από ηπατοκύτταρα [148], την παραγωγή IL-1, IL-2 και IL-6 από λευκοκύτταρα [149, 150], καθώς και την έκκριση των POMC πεπτιδίων [151]. Επίσης μπορεί να επάγει την χημειοταξία [152] και να αυξήσει οριακά την παραγωγή αραχιδονικού οξέος από περιτοναϊκά κύτταρα [140], ενώ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αναστείλει την παραγωγή IFN-γ [153]. Η CRH φαίνεται να ενισχύει έμμεσα την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων [154].

Η δράση της CRH και της UCN1 στα ιστιοκύτταρα θεωρείται σήμερα από τις σημαντικότερες προφλεγμονώδεις δράσεις των πεπτιδίων αυτών. Η CRH και η UCN1 βρέθηκαν να επάγουν την αποκοκκίωση και την έκκριση ισταμίνης από τα κύτταρα αυτά [133, 155]. Μια πρώτη ένδειξη του μηχανισμού δράσης της CRH σε ανοσοκύτταρα δόθηκε από τους Zhao και Karalis οι οποίοι έδειξαν

αύξηση της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB σε θυμοκύτταρα ποντικού που επωάστηκαν με CRH [156].

Η CRH, η UCN1 και οι υποδοχείς τους έχουν ανιχνευτεί στον αρθρικό θύλακα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Μάλιστα, μετά από χορήγηση antalarmin, η πρόοδος των συμπτωμάτων της νόσου φαίνεται να ελαττώνεται [132]. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση, η CRH βρέθηκε να επάγει την έκκριση της PGE2 από ιστικά σπαράγματα (tissue explants) ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ex vivo), μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων CREB και ATF [157].

Έχει αποδειχθεί ότι στο μοντέλο του σηπτικού σοκ σε ποντικούς, η χορήγηση antalarmin καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6, TNF-α) πλάσματος και αυξάνει την επιβίωση των ζώων. Επιπλέον, η CRH βρέθηκε να επάγει in vitro την έκκριση της IL-1β, IL-6 και TNF-α από μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS [158].

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι ουροκορτίνες ενεργούν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες σε φλεγμένους περιοχές στις οποίες αντισταθμίζουν τη φλεγμονώδη δράση της CRH. Σύμφωνα με τους Tsatsani και συν., οι ουροκορτίνες δρουν παρακρινικά ως αντιφλεγμονώδη μόρια μέσω της επαγωγής της απόπτωσης των μακροφάγων μέσω του CRHR2 υποδοχέα [159].

1.9 Μοντέλα φλεγμονής σε διαγονιδιακά CRH (CRH- Tg), *crhr1*^{-/-} και *crh*^{-/-} ζώα

1.9.1 CRH- Tg ζώα και φλεγμονή

Η υπερέκφραση της κεντρικής CRH, σε ποντικούς, επάγει ανοσολογικά χαρακτηριστικά δηλωτικά ανοσοκατεσταλμένου φαινότυπου, ο οποίος φαίνεται να οφείλεται στα υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, που παρουσιάζουν τα ζώα αυτά, παρά στην υπερέκφραση της CRH, η οποία εξάλλου περιορίζεται στις περιοχές του εγκεφάλου όπου φυσιολογικά εκφράζεται [160].

Στα ζώα αυτά, τα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης είναι σε χρόνια βάση ιδιαίτερα αυξημένα με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Cushing. Εξετάζοντας τον ανοσολογικό φαινότυπο βρέθηκε ότι τα ζώα αυτά παρουσιάζουν σημαντική μείωση του αριθμού των T- και B-

λεμφοκυττάρων στους λεμφοειδείς ιστούς. Στον σπλήνα, η μείωση (περίπου 90%) αφορούσε κυρίως στα B- κύτταρα ενώ αντίθετα στα μακροφάγα, τα NK- λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή (<5% μείωση). Σε συμφωνία με τον αριθμό των B-λεμφοκυττάρων στον σπλήνα, τα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα (pre- B cells) (B220⁺/IgM⁻), αλλά και τα ώριμα B-λεμφοκύτταρα (B220⁺/IgM⁺) στο μυελό των οστών βρέθηκαν επίσης ελαττωμένα. Στο θύμο αδέν, ο αριθμός των διπλά θετικών T-λεμφοκυττάρων (CD4⁺/CD8⁺) ήταν ιδιαίτερα αυξημένος, ενώ ελαφρά αυξημένος ήταν ο αριθμός των διπλά αρνητικών (CD4⁻/CD8⁻) και των CD25⁺/CD3⁻. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ελαττωματική ωρίμανση των B- και T-λεμφοκυττάρων στα ζώα αυτά.

Η επινεφριδιοεκτομή ανέστειλε σχεδόν πλήρως τα μειωμένα επίπεδα των λεμφοκυττάρων στον σπλήνα και το θύμο (όχι όμως στο μυελό των οστών) και επανέφερε το μέγεθος των συγκεκριμένων ιστών στο φυσιολογικό, αποκαλύπτοντας τον ρόλο των αυξημένων γλυκοκορτικοειδών στη δημιουργία του παραπάνω ανοσολογικού φαινότυπου στα CRH- Tg ποντίκια.

Σε μοριακό επίπεδο η δράση των γλυκοκορτικοειδών ασκείται μέσω του επηρεασμού, με διάφορους τρόπους, μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB (Nuclear Factor κB), ο NFAT και ο AP-1 (Activator Protein 1) [161-163]. Στα θυμοκύτταρα κατά την ωρίμανση τους από CD4⁻/CD8⁻ σε CD4⁺/CD8⁺, αυξάνεται η έκφραση του υποδοχέα της IL-2 μέσω του οποίου επάγεται η Bcl-2 και αναστέλλεται ο κυτταρικός θάνατος που επάγουν τα γλυκοκορτικοειδή. Στα CRH- Tg ποντίκια, τα υψηλά επίπεδα κορτικοστερόνης φαίνεται να επηρεάζουν τον μηχανισμό αυτό και κατά συνέπεια την ωρίμανση των θυμοκυττάρων.

1.9.2 Φλεγμονή σε διαγονιδιακά ποντίκια *crhr₁^{-/-}*

Η μελέτη πειραματικά επαγόμενης φλεγμονής με turpentine στο οπίσθιο άκρο *crhr₁^{-/-}* ποντικών έδειξε ότι η απουσία του υποδοχέα CRHR₁ έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής ελάχιστα μικρότερης έκτασης (15-25%), ενώ τα επίπεδα της IL-6 πλάσματος πλάσμα των *crhr₁^{-/-}* ζώων βρέθηκαν περίπου 10 φορές υψηλότερα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα [164]. Τα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης στα *crhr₁^{-/-}* ζώα ήταν χαμηλότερα από αυτά των

φυσιολογικών ζώων αν και η χορήγηση turpentine είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθούν σημαντικά και στις δύο ομάδες ζώων. Συνεπώς, παρά την απουσία του CRHR₁ υποδοχέα, η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα από το ανοσολογικό ερέθισμα επάγεται (σε αντίθεση με άλλου τύπου στρεσογόνα ερεθίσματα), όπως και στην περίπτωση των διαγονιδιακών *crh*^{-/-} ζώων. Οι Turnbull και συν. αναφέρουν ότι και ο LPS μπορεί να επάγει την παραγωγή κορτικοστερόνης στα *crhr*₁^{-/-} ζώα, όπως η turpentine. Πάντως, η ACTH βρέθηκε ελαφρά υψηλότερη στα *crhr*₁^{-/-} ζώα μετά από την χορήγηση turpentine, ενώ τα βασικά επίπεδα δεν είχαν διαφορά μεταξύ των *crhr*₁^{-/-} και *crhr*₁^{+/+} ζώων. Είναι προφανές ότι οι μηχανισμοί ενεργοποίησης του άξονα ΥΥΕ τόσο στην περίπτωση των *crhr*₁^{-/-} (όσο και των *crh*^{-/-}) ποντικών πρέπει να διαφέρουν από τους φυσιολογικούς και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο κυτοκινών, όπως η IL-1 και η IL-6, σε τέτοιες περιπτώσεις [165]. Τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα της IL-6, στο συγκεκριμένο μοντέλο, συνηγορούν για την άποψη αυτή. Εξάλλου, μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει το ρόλο της IL-6 στην έκκριση της ACTH απουσία της CRH [166].

1.9.3 Φλεγμονή σε διαγονιδιακά ποντίκια *crh*^{-/-}

Η φλεγμονή διεγείρει την ενεργοποίηση του ΥΥΕ και αντίστοιχα η παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών μειώνει την φλεγμονώδη ανοσοαπάντηση. Τα βασικά επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στα *crh*^{-/-} ζώα είναι σημαντικά μειωμένα και δεν αυξάνονται μετά από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα, όπως έχει προαναφερθεί, με αποτέλεσμα τα ζώα αυτά να παρουσιάζουν πιο έντονη φλεγμονώδη αντίδραση. Ωστόσο, όταν το ερέθισμα είναι ανοσολογικού χαρακτήρα τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνονται, σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ζώων.

1.9.3.1 Επαγόμενη με carrageenin άσηπτη φλεγμονή

Η επαγόμενη με carrageenin φλεγμονή είναι μια οξεία άσηπτη φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από έντονη συγκέντρωση πολυμορφοπύρηνων και μακροφάγων κυττάρων. Η ανοσολογική απόκριση μετά από υποδόρια χορήγηση

carrageenin σε *crh*^{-/-} ποντίκια βρέθηκε σημαντικά αυξημένη (50%), όσον αφορά την συγκέντρωση των λευκοκυττάρων. Τα επίπεδα της κορτικοστερόνης πλάσματος αυξήθηκαν 10 φορές περίπου. Μετά από επινεφριδιοεκτομή και αποκατάσταση των επιπέδων της κορτικοστερόνης με εξωγενή χορήγηση, τα *crh*^{-/-} και *crh*^{+/+} ζώα παρουσίασαν παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της κορτικοστερόνης όταν χορηγήθηκε carrageenin. Όμως στην περίπτωση αυτή, τα *crh*^{-/-} ποντίκια παρουσίασαν μειωμένα συμπτώματα φλεγμονής. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι όταν τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών είναι παρόμοια, η CRH δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας και μάλιστα η προφλεγμονώδης δράση της φαίνεται να αφορά τα επινεφρίδια. Όπως αναφέρουν οι Karalis και συν., η επινεφρίνη φαίνεται να είναι ο προφλεγμονώδης επινεφριδιακός παράγοντας που αποκαλύπτεται από την απουσία CRH στα *crh*^{-/-} ζώα [167].

1.9.3.2 Η ενεργοποίηση του NFκΒ σε οξεία φλεγμονή επαγόμενη από LPS

Στην περίπτωση χορήγησης LPS (σηπτικό σοκ) σε *crh*^{-/-} ποντίκια η κορτικοστερόνη φτάνει στο 60% των αντίστοιχων επιπέδων των *crhr1*^{+/+} ζώων. Παρά τα μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ σε θυμοκύτταρα *crh*^{-/-} ποντικίων που τους είχε δοθεί LPS, βρέθηκε μειωμένη (παρά τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και συγκεκριμένα του TNF-α στο πλάσμα). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συμφωνία με τα in vitro δεδομένα στην ίδια μελέτη (δράση της CRH στην ενεργοποίηση του NFκΒ σε θυμοκύτταρα σε καλλιέργεια), συνηγορεί για τον χαρακτηρισμό της δράσης της CRH ως προφλεγμονώδους που αφορά στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ [156].

1.9.3.3 Φλεγμονή επαγόμενη από turpentine

Όταν χορηγήθηκε turpentine σε *crh*^{-/-} ποντίκια η απάντηση στην κορτικοστερόνη δεν είχε διαφορά από εκείνη στα *crh*^{+/+} ζώα, παρά το γεγονός ότι στις χρονικές στιγμές που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκε ανάλογη αύξηση των επιπέδων της ACTH στους δύο γονότυπους. Στο σημείο της φλεγμονής ωστόσο

τα διηθούντα λευκοκύτταρα βρέθηκαν μειωμένα στα *crh*^{-/-} ζώα. Τα *crh*^{-/-} ποντίκια παρουσίασαν και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-6 στο πλάσμα σε σχέση με τα *crh*^{+/+}.

Στη μελέτη αυτή παρουσιάζονται δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η CRH είναι απαραίτητη για την έκκριση ACTH αλλά όχι και για την παραγωγή κορτικοστερόνης στην φλεγμονώδη ανοσοαπάντηση. Η έλλειψη CRH συσχετίζεται με τα παράδοξα αυξημένα επίπεδα IL-6 και προτείνεται ότι η IL-6 μπορεί να δρα (με τρόπο εξαρτώμενο από την CRH) ρυθμίζοντας την έκκριση της ACTH. Επιπλέον παρουσιάζονται δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η CRH πιθανών να ρυθμίζει την παραγωγή IL-6 από τα επινεφρίδια, συμβάλλοντας έτσι στην παθοφυσιολογία ανοσολογικών καταστάσεων (όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα) που χαρακτηρίζονται από την ταυτόχρονη παρουσία των δύο αυτών παραγόντων, CRH και IL-6 [166].

1.10 Φλεγμονή

1.10.1 Γενικά στοιχεία φλεγμονής

Η φλεγμονή είναι μια σύνθετη αντίδραση/απόκριση στο τοπικό ή οποιασδήποτε άλλης μορφής τραύμα και σε πολυάριθμους άλλους παράγοντες [168]. Μπορεί επίσης να ορισθεί ως μια δυναμική αγγειακή και κυτταρική απόκριση σε προσβολή ή τραύμα, που είναι ωφέλιμη και προστατευτική, αν είναι ελεγχόμενη, και επιβλαβής όταν εκτραπεί σε ανεξέλεγκτη. Μπορεί να προκληθεί από μικροοργανισμούς, τοξίνες, παράσιτα, χημική και βιολογική καταστροφή και φυσική φθορά όπως θερμότητα, ψύχος, ακτινοβολία και τραυματισμό, ή μπορεί να έχει ανοσολογική προέλευση όπως σε υπερευαισθησία τύπου 1, 3, 4. Ο ρόλος της φλεγμονής έγκειται στο να ελαχιστοποιεί την απειλή στον οργανισμό μέσω αραίωσης ή περιορισμού δράσης των επιβλαβών παραγόντων, την καταστροφή αυτών, την απομάκρυνση τους και τελικά την επιδιόρθωση της βλάβης και την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας. Σε αυτά τα πλαίσια η φλεγμονή είναι μια απαραίτητα αντίδραση του οργανισμού που έχει εξελιχθεί προς όφελος της επιβίωσης. Παράλληλα, η φλεγμονώδης αντίδραση συνοδεύεται από σύνθετες αγγειακές, ανοσολογικές και κυτταρικές αντιδράσεις, των οποίων η εκτροπή σε μη ισορροπημένη απόκριση έχει το αντίθετο αποτέλεσμα.

Η φλεγμονή είναι μια ανοσιακή απόκριση που φέρει λευκοκύτταρα και μόρια του πλάσματος σε θέσεις μόλυνσης ή βλάβης των ιστών. Οι κυριότερες επιπτώσεις είναι η αύξηση παροχής αίματος, η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας για μεγάλα μόρια του ορού και η ενισχυμένη μετανάστευση λευκοκυττάρων, δια μέσου του τοπικού αγγειακού ενδοθηλίου, προς την κατεύθυνση της θέσης της φλεγμονής.

Η μετανάστευση των κυττάρων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία εξαρτάται από τον τύπο του πληθυσμού των εμπλεκόμενων κυττάρων, από την κατάσταση ενεργοποίησης τους και από το πώς αυτά αλληλεπιδρούν με το ενδοθήλιο στα διάφορα αγγειακά πεδία σε όλο το σώμα.

Η κατάσταση ενεργοποίησης των κυττάρων προσδιορίζει εν μέρει το μεταναστευτικό τους πρότυπο. Τα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα τείνουν να μεταναστεύσουν προς τους λεμφικούς ιστούς μέσα από το υψηλό κυβικό ενδοθήλιο που υπαλείφει κάποια φλεβίδια, ενώ τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα τείνουν να μεταναστεύσουν σε θέσεις φλεγμονής.

Τα μόρια πρόσδεσης (adhesion molecules) που ελέγχουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων κατατάσσονται σε τρεις δομικά συγγενείς οικογένειες: (α) Στα μόρια κυτταρικής πρόσδεσης (CAMs) της υπεργονιδιακής οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, (β) στις σελεκτίνες και τα υδατανθρακικά τους προσδέματα και (γ) στις ιντεργκρίνες. Τα μόρια πρόσδεσης των ενδοθηλίων επάγονται από κυτταροκίνες. Η έκφραση των λευκοκυτταρικών μορίων πρόσδεσης προσδιορίζεται από τον εμπλεκόμενο κυτταρικό πληθυσμό και από την κατάσταση διαφοροποίησης του κυττάρου.

Τα μόρια χημειοτακτισμού είναι σημαντικά τόσο στην καθοδήγηση της κυτταρικής μετανάστευσης όσο και στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου προς έναρξη της μετανάστευσής τους.

Οι διαμεσολαβητές της φλεγμονής που απελευθερώνονται από μαστοκύτταρα, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα κατά τις ανοσοποιητικές αντιδράσεις, ή ως επακόλουθο καταστροφής ιστού συνεργάζονται αρμονικά με μόρια που απελευθερώνονται από ενζυμικά συστήματα του πλάσματος για να ελέγξουν την αγγειακή διαπερατότητα και την παροχή αίματος.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν σε όλους τους ιστούς του σώματος – τα κύτταρα που βρίσκονται στο αίμα είναι αυτά που πρόκειται να εισέλθουν στους διάφορους ιστούς. Κάθε κυτταρικός

πληθυσμός έχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο μετανάστευσης. Το πρότυπο αυτό εξαρτάται επιπλέον από το βαθμό διαφοροποίησης του κυττάρου και από την ενεργοποίηση:

Τα φαγοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων, εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και μεταναστεύουν στους περιφερικούς ιστούς, ιδιαιτέρως σε θέσεις μόλυνσης ή φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα κάνουν ένα ταξίδι απλής διαδρομής, αλλά τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται προς μακροφάγα και μπορεί να επανακυκλοφορούν ξανά πίσω στα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα και να δρουν ως κύτταρα έκθεσης αντιγόνων (APCs).

Τα μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το θύμο και των μυελό των οστών προς τους δευτερεύοντες λεμφικούς ιστούς. Μετά την ενεργοποίηση από το αντιγόνο, τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα τείνουν να μετακινηθούν σε θέσεις φλεγμονής, ενώ τα B λεμφοκύτταρα και τα αναμνηστικά T-λεμφοκύτταρα αποικίζουν άλλους λεμφικούς ιστούς.

Τα δενδριτικά κύτταρα, όπως είναι τα κύτταρα Langerhans του δέρματος, προέρχονται από αρχέγονα γενετικά κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία αποικίζουν διάφορα όργανα. Μετά την πρόσληψη του αντιγόνου, μεταναστεύουν σε γειτονικά λεμφογάγγλια και εκθέτουν το αντιγόνο στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.

Ένας στόχος αυτής της μετανάστευσης είναι να δίνεται η ευκαιρία στο μικρό αριθμό των λεμφοκυττάρων που είναι εξειδικευμένα για κάποιο συγκεκριμένο αντιγόνο να συναντήσουν αυτό το αντιγόνο. Οδοί λεμφικής αποχέτευσης και η μετανάστευση των κυττάρων εξασφαλίζουν ότι τα λεμφοκύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τα αντιγόνα από τους μολυσμένους ή τους φλεγμένοντες ιστούς συρρέουν στα λεμφογάγγλια ενώ ο σπλην διαχειρίζεται τα αντιγόνα που βρίσκονται μέσα στο αίμα. Πριν από την απελευθέρωση των κυττάρων μέσα στα απαγωγικά λεμφικά αγγεία, και επομένως στη κυκλοφορία, επιτελείται αρχικός κλωνικός πολλαπλασιασμός των αντιγονο-ειδικών λεμφοκυττάρων μέσα στους δευτερεύοντες λεμφικούς ιστούς. Στη συνέχεια η μετανάστευση αυτών των κυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος εξαρτάται από την έκφραση των μορίων πρόσδεσης στο ενδοθήλιο: Σε θέσεις φλεγμονής το ενδοθήλιο εκφράζει μόρια πρόσδεσης τα οποία αναγνωρίζονται από υποδοχείς των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων ή φαγοκυττάρων και τα οποία κατευθύνουν την κυτταρική κυκλοφορία σε αυτές τις περιοχές. Οι

αντιδράσεις οι οποίες προκλήθηκαν στους ιστούς ως απόκριση σε βλάβη ή μόλυνση ονομάζονται φλεγμονώδεις και σε αυτές εμφανίζουν τρία κύρια χαρακτηριστικά:

- 1) Η παροχή αίματος στην προσβληθείσα περιοχή αυξάνει, μεταφέροντας λευκοκύτταρα και τα μόρια του πλάσματος.
- 2) Η διαπερατότητα των τριχοειδών αυξάνει, επιτρέποντας την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος (αντισώματα, συμπλήρωμα, κινηνογόνα κ.α) τα οποία απαιτούνται για τον έλεγχο της μόλυνσης.
- 3) Η μετανάστευση των λευκοκυττάρων προς τους ιστούς αυξάνει.

Τα πρώτα κύτταρα που φθάνουν σε συνθήκες οξείας φλεγμονής, που προκαλείται από μόλυνση είναι τα ουδετερόφιλα. Αυτά συνιστούν τον κύριο κυτταρικό τύπο για αρκετές ημέρες. Έπειτα αρχίζουν να φθάνουν μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Τα CD+8 T-λεμφοκύτταρα και μικρός αριθμός B-λεμφοκυττάρων συνήθως φθάνουν αργότερα. Η έκβαση μιας οξείας αντίδρασης εξαρτάται από το εάν το αντιγόνο ή ο μολυσματικός παράγοντας έχουν εξουδετερωθεί. Εάν όχι, αναπτύσσεται μία χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση. Σε αυτή την περίπτωση τα ουδετερόφιλα που προσέρχονται είναι λίγα, αλλά συσσωρεύονται πολλά CD+4 T-λεμφοκύτταρα και μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Η αντίδραση σε παρασιτική μόλυνση οδηγεί συχνά σε συνάθροιση ηωσινόφιλων, τα οποία μαζί με τα βασεόφιλα και τα μακροφάγα επικρατούν στα τοιχώματα των βρόγχων ως επακόλουθο ασθματικής προσβολής.

1.10.2 Διαμεσολαβητές φλεγμονής

Μια πληθώρα διαμεσολαβητών της φλεγμονής απελευθερώνονται από τα κύτταρα της ενδογενούς ή επίκτητης ανοσίας κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση [164]. Αυτές οι ενώσεις είτε επιταχύνουν είτε αναστέλλουν τη φλεγμονή. Απελευθερώνονται από τα ιστιοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, και μια ποικιλία λευκοκυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα εοσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα λεμφοκύτταρα.

- 1) Χυμοκίνες

Οι χυμοκίνες είναι μια ομάδα μικρών πολυπεπτιδίων, που περιέχουν 70-80 αμινοξέα, που χημειοτακτικά προσελκύουν διαφορετικούς τύπους

λευκοκυττάρων και ρυθμίζουν την έκφραση και το σχηματισμό των ιντεργκρινών στις μεμβράνες των λευκοκυττάρων. Οι χυμοκίνες επάγουν την προσκόλληση διαφόρων λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο, τα οποία μεταναστεύουν ακολουθώντας την αύξηση της συγκέντρωσης των χυμοκινών. Μια από τις πιο χαρακτηρισμένες χυμοκίνες είναι η IL-8. Παράγεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα ουδετερόφιλα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Διατηρείται στο φλεγμένο ενδοθήλιο και εξασφαλίζει τη σταθερή πρόσδεση των ουδετερόφιλων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου.

2) Ενζυμικοί διαμεσολαβητές του πλάσματος

Το πλάσμα περιλαμβάνει τέσσερα συστήματα παραγωγής παραγόντων φλεγμονής: το σύστημα της κίνησης, το σύστημα του σχηματισμού θρόμβων, το ινοδολυτικό σύστημα και το σύστημα του συμπληρώματος. Εκτός του συμπληρώματος, όλα τα άλλα συστήματα έχουν κοινό σημείο συνάντησης.

Το σύστημα της κίνησης

Είναι ένας ενζυματικός καταρράκτης αντιδράσεων που οδηγεί στην παραγωγή βραδυκινίνης, η οποία είναι ένας πολύ ισχυρός αγγειοδραστικός παράγοντας. Αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα, προκαλεί αγγειοδιαστολή και επάγει τον πόνο και τη συστολή των λείων μυών.

Το σύστημα του σχηματισμού θρόμβων

Είναι ένα άλλο ενζυμικό σύνολο αντιδράσεων που οδηγεί στην παραγωγή θρομβίνης. Ο σχηματισμός θρόμβων λειτουργεί ως φυσικό φράγμα στη διάδοση της μόλυνσης, επουλώνονται τα τραύματα και κατ'επέκταση περιορίζεται η είσοδος παθογόνων στην κυκλοφορία του αίματος. Ομοίως, κύριο γνώρισμα του συγκεκριμένου συστήματος είναι η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και η χημειοτακτική προσέλκυση των ουδετερόφιλων.

Το ινοδολυτικό σύστημα

Το τελικό προϊόν αυτού του μονοπατιού είναι η έκκριση πλασμίνης. Η πλασμίνη είναι ένα ισχυρό πρωτεολυτικό ένζυμο, διασπά τα συσσωματώματα ινικής σε μικρότερα τμήματα που δρουν χημειοτακτικά στην προσέλκυση ουδετερόφιλων. Επιπλέον ενεργοποιεί το συμπλήρωμα.

Το σύστημα του συμπληρώματος

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από την κλασσική ή εναλλακτική οδό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πλειάδας προϊόντων που κάθε ένα

επάγει διαφορετικές μεταβολές στο ενδοθήλιο. Για παράδειγμα η αναφυλατοξίνη επάγει την αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων και την απελευθέρωση ισταμίνης. Άλλοι παράγοντες προκαλούν σύσπαση των λείων μυικών ινών και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, προσκόλληση μονοκύτταρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και ενεργοποίηση του ενδοθηλίου.

3) Λιπιδιακοί μεσολαβητές φλεγμονής

Τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών διασπώνται σε αραχιδονικό οξύ και παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF, platelet activating factor). Ο τελευταίος παράγοντας προκαλεί πολλές φλεγμονώδεις αντιδράσεις συμπεριλαμβανομένων της χημειόταξης εοσινόφιλων και την ενεργοποίηση/αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων και εοσινόφιλων.

Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού δίνει επιπλέον γένεση στις προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες που ευθύνονται για ποικίλες δράσεις ως προς την επαγωγή της φλεγμονής και την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

4) Κυτταροκίνες

Οι κυριότεροι αντιπρόσωποι της οικογένειας των κυτοκινών που κατέχουν βασικούς ρόλους στην εμφάνιση και εξέλιξη της φλεγμονής είναι οι η IL-1, η IL-6 και ο TNF-α. Επιπλέον η IFN-γ συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στη φλεγμονώδη απόκριση στα τελικά στάδια της οξείας απόκρισης και στη χρόνια φλεγμονή. Τόσο η IFN-γ όσο και ο TNF-α επάγουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και αυξάνουν την φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων. Η IL-1 και ο TNF-α ενεργοποιούν τα μακροφάγα ως προς την απελευθέρωση IL-8 που θεωρείται ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας.

Τα λεμφοκύτταρα, T- βοηθητικά κύτταρα 1 (T-helper cells 1, Th₁), φυσικοί φονείς (natural killers, NK) και T- κυτταροτοξικά (Tα-cytotoxic, Tc), εκκρίνουν IFN-γ, ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν TNF-α. Αν και ο ρόλος των ιντερφερονών (α, β και γ) είναι η προστασία των γειτονικών κυττάρων από τα μολυσμένα από ιό κύτταρα, τα οποία και τις εκκρίνουν, η IFN-γ έχει και ένα ιδιόζοντα ρόλο στη φλεγμονή. Κατ' αρχάς, ενεργοποιεί τα μακροφάγα, τα οποία εκφράζουν αντιγόνα MHCII (μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας-II) στην επιφάνειά τους και αυξάνουν την έκκριση κυτταροκινών με απώτερο στόχο τον περιορισμό της μόλυνσης – φλεγμονής. Τα αποτελέσματα της δράσης της είναι

μη επιθυμητά κατά την χρόνια φλεγμονή, όπου η συσσώρευση μακροφάγων επιταχύνει την καταστροφή των ιστών.

Όπως προαναφέρθηκε, ο TNF-α είναι μια κυτταροκίνη που εκκρίνεται από τα μακροφάγα και λειτουργεί συνεργατικά με την IFN-γ στη χρόνια φλεγμονή. Ο TNF-α είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από τον NF-κΒ, τα AGEs (advanced glycation end-products) και τις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες [304]. Ο TNF-α επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αναστέλλει τη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών από τον ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο χώρο [305, 306].

1.10.3 Φλεγμονώδης δράση CRH

Η κεντρική (υποθαλαμική) CRH φαίνεται να εμπλέκεται περισσότερο στην άμεση απόκριση στο στρες, παρά στην μακροχρόνια. Η AVP η οποία επηρεάζει τον ΥΥΕ άξονα φαίνεται ότι εμπλέκεται στην απόκριση κατά την χρόνια φλεγμονή δεδομένης της μικρότερης ευαισθησίας της στην αρνητική ανατροφοδότηση των γλυκοκορτικοειδών, σε σύγκριση με την CRH [109, 169, 170]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η κεντρική CRH φαίνεται να λειτουργεί ως αντιφλεγμονώδης παράγων ενώ η περιφερική CRH ως προφλεγμονώδης. Σε ένα πειραματικό μοντέλο οξείας φαρμακευτικής κολίτιδας, η απουσία CRH συνδέθηκε με την ελάττωση της τοπικής φλεγμονής [171]. Οι Theocharides και συν. [153], εντόπισαν την προφλεγμονώδη δράση της CRH στην αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων του δέρματος όπου το φαινόμενο ήταν CRHR₁ εξαρτώμενο και οδήγησε σε αγγειοδιαστολή και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Οι Kempraj και συν. [121], παρατήρησαν ότι τα ιστιοκύτταρα που προερχόταν από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο συνέθεταν CRH και UCNs και επισήμαναν τον πιθανό αυτοκρινή και παρακρινή ρόλο τους σε αλλεργικές διαταραχές. Η έκλυση CRH/UCNs από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να είναι διφασική με τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων, που εκκρίνονται τοπικά, σε φλεγμένους περιοχές, να έχουν μεγάλο εύρος γεγονός που σημαίνει ότι μια αντιφλεγμονώδης απόκριση μπορεί να αντιστραφεί σε φλεγμονώδη αφού αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των πεπτιδίων [16]. Σύμφωνα με τους Agelaki

και συν. [172], η CRH έχει κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στην έναρξη της φλεγμονής, μέσω της επαγωγής της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα, δράση που ασκείται μέσω του CRHR₁. Το γεγονός πως η IL-1β, η IL-6 και ο TNF-α επάγουν την έκκριση της ACTH και των γλυκοκορτικοειδών, ενεργοποιώντας το σύστημα του στρες [173], κάνει πιθανή την ύπαρξη αμφίδρομης επικοινωνίας.

Η CRH ενέχεται και στο φαινόμενο της απόπτωσης. Στην μελέτη των Dermintzaki και συν. [174], η CRH προκάλεσε απόπτωση των κυττάρων της κυτταρικής σειράς PC12, μέσω του υποδοχέα CRHR₁ ο οποίος οδήγησε σε φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της υπομονάδας p38 MAPK, και τελικά πυροδότησε την απόπτωση.

Η CRH συνδέθηκε επίσης με την πρόοδο του καρκίνου από τους Androulidaki και συν. [175] οι οποίοι απέδειξαν ότι η CRH αυξάνει την μεταστατικότητα της κυτταρικής σειράς MCF7 (κύτταρα καρκίνου του μαστού) και επάγει την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης και την απελευθέρωση προσταγλανδινών μέσω της Cox-1. Είναι γνωστή ή φλεγμονώδης δράση των προσταγλανδινών και η ικανότητά τους να επάγουν την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών στην φλεγμένους περιοχή. Με δεδομένο το ότι οι αγωνιστές του CRHR₂ αναστέλλουν την αγγειογένεση, η απουσία του στα καρκινικά κύτταρα ίσως συμβάλλει στην επέκταση του νεοπλασματος [176]. Η ισορροπία δράσης μέσω των CRHR₁ και CRHR₂ υποδοχέων στους ιστούς, στην περιφέρεια, ίσως αποτελεί προϋπόθεση ομαλής στρεσογόνου απόκρισης.

Ο NF-κB αποτελεί κομβικό στοιχείο στην παθοφυσιολογία της φλεγμονώδους αντίδρασης και του οξειδωτικού στρες. Έχει βρεθεί ότι ο παράγων αυτός επηρεάζεται διπλά, θετικά ή αρνητικά, από την CRH [177]. Συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα «αθανατοποιημένα» επιδερμικά μελανοκύτταρα, ασκείται ανασταλτική δράση της CRH στον NF-κB δια του CRHR₁, ενώ αντίθετα στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα η δράση της CRH είναι προφλεγμονώδης και ασκείται μέσω του CRHR₁ επάγοντας τον NF-κB. Κατά συνέπεια η δράση της CRH εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων που μελετώνται [179]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση των Karalis και συν. [180], οι οποίοι απέδειξαν πως υπάρχει και η αντίστροφη σχέση μεταξύ του NF-κB και του POMC γονιδίου, μιας και η αναστολή της πρόσδεσης του NF-κB στο DNA υποφυσιακών κυττάρων οδήγησε σε μεταγραφική ενεργοποίηση της POMC.

1.11 Φλεγμονή του ενδοθηλίου

Η φλεγμονώδης διαδικασία φαίνεται να διαδραματίζει κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιοστασία και τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Ουσιαστικά, η φλεγμονή και η λειτουργία του ενδοθηλίου έχουν μια σχέση αμοιβαίας συνεισφοράς, που προϋποθέτει την επικοινωνία του νευροενδοκρινικού-ανοσοποιητικού συστήματος.

Έχει πλέον ευρέως τεκμηριωθεί πως το ενδοθήλιο δεν είναι απλά μια στοιβάδα κυττάρων που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, αλλά στην πραγματικότητα είναι καθοριστικός ρυθμιστής της δομής και του τόνου των αγγείων [181]. Δεν περικλείει μόνο τα στοιχεία των κυκλοφορούντων υγρών, αλλά ταυτόχρονα συμβάλλει στην κατανομή του αίματος και των κυτταρικών πληθυσμών, ελέγχοντας τι διαπερνά τα αγγειακά τοιχώματα. Κατά συνέπεια το ενδοθήλιο καταλαμβάνει κύρια ρυθμιστική θέση όχι μόνο κατά τις φυσιολογικές διαδικασίες στον οργανισμό, αλλά και σε περιπτώσεις οξείας απόκρισης, όπως στη φλεγμονή [182].

1.11.1 Η φλεγμονή διατρέχει όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης

Η φλεγμονή είναι ένας παθολογικός μηχανισμός, εφόσον εκτραπεί από τα φυσιολογικά όρια, που συνδέεται με ένα μεγάλο αριθμό παθήσεων. Ο ρόλος των αγγειακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης είναι κρίσιμος και ιδιαίτερης σημαντικότητας στις φλεγμονώδεις ασθένειες συμπεριλαμβανομένων της αθηροσκλήρωσης, της ισχαιμίας/επανοξυγόνωσης και του σηπτικού σοκ. Η αλληλουχία των σταδίων της αθηροσκλήρωσης καθορίζεται από σύνθετες αντιδράσεις μεταξύ των κυττάρων της φλεγμονής (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) και αγγειακών κυττάρων (ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά) [183]. Το ενδοθήλιο επηρεάζεται και συνεισφέρει με αυτοκρινικό/παρακρινικό τρόπο στην φλεγμονώδη διαδικασία που οδηγεί στην αθηροσκλήρωση.

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή πολλών σταδίων, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία χρόνιας φλεγμονής σε όλα τα στάδια, εξέλιξης της. Στην αθηροσκλήρωση οι φυσιολογικές λειτουργίες του ενδοθηλίου που διατηρούν την ομοιόσταση αλλάζουν και επικρατούν οι

φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Για παράδειγμα, τα μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στο φλεγμένον ενδοθήλιο προσελκύουν λευκοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, που στη συνέχεια διεισδύουν στο εσωτερικό της έσω αρτηριακής στιβάδας και προδιαθέτουν το αγγειακό τοίχωμα στην εναπόθεση λίπους και στην αγγειίτιδα. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες αυξάνουν την πρόσληψη τροποποιημένων λιποπρωτεϊνικών μορίων και ευνοούν τον σχηματισμό των αφρωδών μακροφάγων. Τα T-κύτταρα εισέρχονται επίσης στο εσωτερικό τοίχωμα και εκκρίνουν κυτταροκίνες οι οποίες μεγενθύνουν την φλεγμονώδη αντίδραση και προωθούν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Αργότερα οι ίδιοι παράγοντες μπορούν να λεπτύνουν το προστατευτικό ινώδες κάλυμμα του αγγείου, την έξοδο του άμορφου υλικού της αθηρωματικής πλάκας και την πρόκληση θρόμβωσης και οξέων αρτηριακών συνδρόμων [184, 185].

1.11.2 Πρώτα στάδια αθηροσκλήρωσης – ενδογενής (φυσική) και επίκτητη ανοσία

Εκ πρώτης όψεως η φλεγμονή φαίνεται να είναι η αντίδραση της επίκτητης ανοσίας, η οποία στην πορεία ενισχύεται από τους μηχανισμούς της ενδογενούς (φυσικής) ανοσίας. Η ενδογενής ανοσία αποτελεί μια πρώτη γραμμή άμυνας η οποία κινητοποιείται σε χρόνο λίγων λεπτών έως και ωρών, ενώ η επίκτητη ανοσία αναγνωρίζει συγκεκριμένες μοριακές δομές και εξαρτάται από την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού υποδοχέων αντιγόνων και ανοσοσφαιρινών [186].

Ενδογενής ανοσία

Η πρώτη γραμμή απόκρισης της ανοσολογικής άμυνας, η ενδογενής ανοσία, είναι ουσιαστικά μια τοξική και φλεγμονώδης απόκριση. Περιλαμβάνει πολλούς κυτταρικούς τύπους με πιο σημαντικούς αυτούς της σειράς των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Οι υποδοχείς των μακροφάγων (TLR και SRC), αναγνωρίζουν το ξένο προς τον οργανισμό μόριο (LPS, φωσφατιδιλοσερίνες επιφάνειας και πρωτεΐνες παραγώγων αλδεϋδών), των οποίων η πρόσδεση οδηγεί στην ενδοκύττωσή τους και τη λυσοσωμική αποδόμησή τους. Με αυτό τον

τρόπο ξεκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια TLR που ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ και τις MAPK κινάσες. Η πρόσδεση των ξένων μορίων στους TLR υποδοχείς πυροδοτεί την έκφραση γονιδίων πρωτεϊνών που ενέχονται στην προσέλκυση και προσκόλληση λεμφοκυττάρων, την παραγωγή ελευθέρων ριζών, τη δράση των φαγοκυττάρων, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και αποπτωτικών μηχανισμών που ενισχύουν το προφίλ της φλεγμονής.

Επίκτητη ανοσία

Στον αντίποδα, η επίκτητη ανοσία λειτουργεί πιο εξειδικευμένα αλλά πιο αργά. Μόλις τα T-κύτταρα αναγνωρίσουν τα ξένα αντιγόνα στα οποία έχουν εκτεθεί, ξεκινούν μια εξειδικευμένη προς αυτά απόκριση. Αυτή η απόκριση περιλαμβάνει απευθείας επίθεση στα κύτταρα-φορείς των αντιγόνων μέσω των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, την ενεργοποίηση κυττάρων που παράγουν αντισώματα κατά των αντιγόνων και την επαγωγή της φλεγμονής η οποία ενισχύεται από την ενδογενή απόκριση στη φλεγμαίνουσα περιοχή ή στην περιοχή έκθεσης στο αντιγόνο.

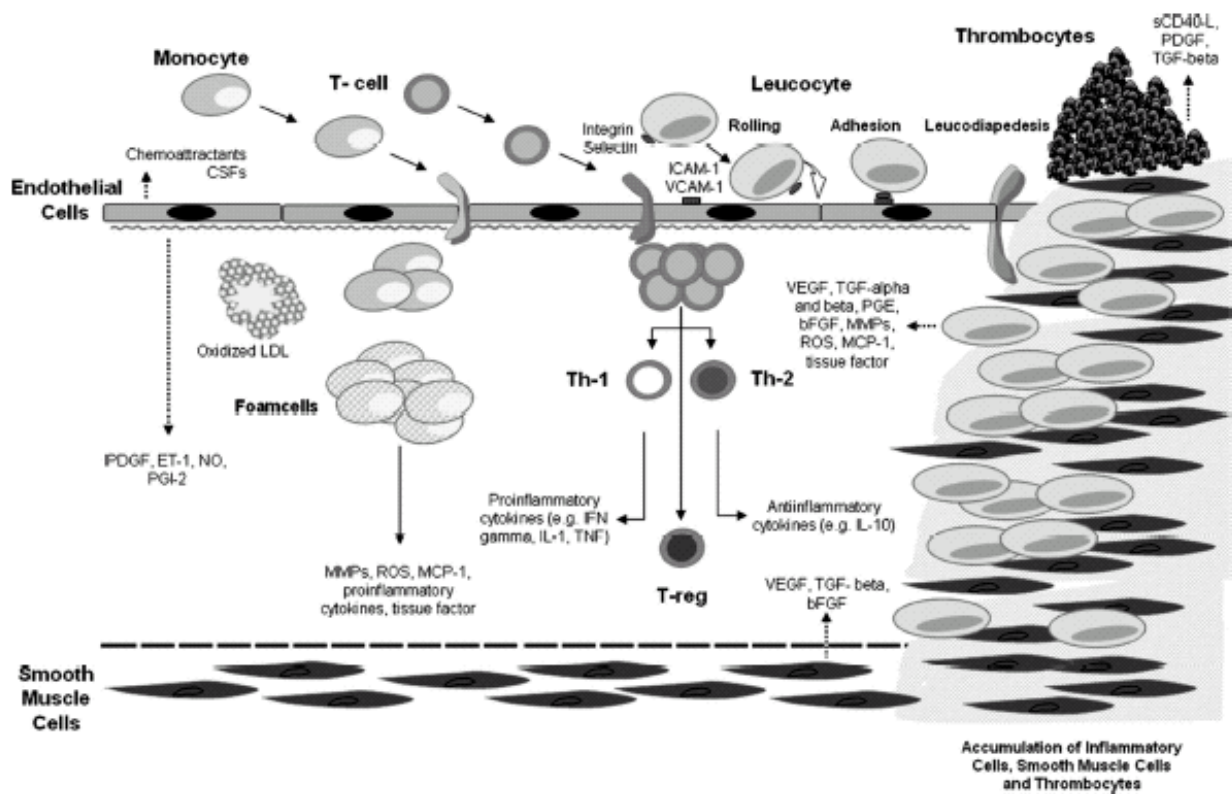
Αρχικά τα δένδριτικά κύτταρα ενεργοποιούν τα T-κύτταρα τα οποία στη συνέχεια υφίστανται ωρίμανση συγγένειας και μετατρέπονται σε T-κύτταρα μνήμης ειδικά για το συγκεκριμένο ερέθισμα. Επίσης ειδικά B-κύτταρα, τα B1, παράγουν ανοσοσφαιρίνες πρόδρομης σειράς που είναι συνήθως χαμηλής συγγένειας αντιγονοπαρουσιαστικά [186].

1.11.3 Th₁ και Th₂ ισορροπία

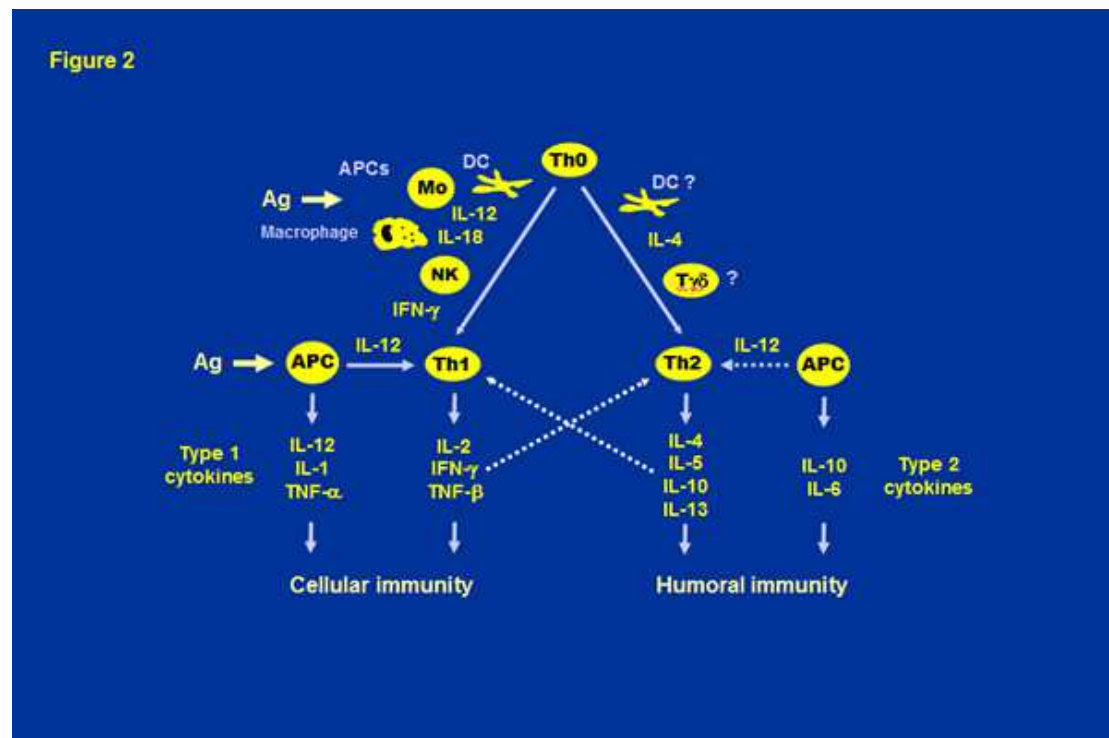
Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ανθρώπινων αθηρωματικών περιοχών έχουν αποκαλύψει ότι υπάρχει μια εγγενής αλληλεπίδραση μεταξύ T-κυττάρων και μακροφάγων και τα T-κύτταρα που συμμετέχουν σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις βρίσκονται συνήθως στην ενεργοποιημένη κατάσταση και εκφράζουν αντιγόνα MHCII. Η συγκεκριμένη ομάδα T-λεμφοκυττάρων περνά σε μετέπειτα στάδια φλεγμονής (εικόνα 6). Δεν είναι απλά παρούσα σε περιοχές φλεγμονής, αλλά συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη αθηρώματος, πιθανότατα

μέσω της έκλυσης διάφορων κυτταροκινών [187]. Από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα προκύπτουν τα Th₁ και Th₂ κύτταρα. Μέσα στον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων, η επαγωγή προ- και αντι-αθηρογόνων κυτταροκινών, πιθανόν να εξαρτάται από την επικράτηση αυτού του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού στον Th₁ ή Th₂ φαινότυπο [188]. Όταν η ισορροπία Th₁/Th₂ ευνοεί τον Th₁ φαινότυπο, τα συγκεκριμένα κύτταρα ευνοούν την παραγωγή κυτοκινών που ενεργοποιούν τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα (CD⁺8) και τα κύτταρα-φυσικούς φονείς (NK), που αθροιστικά μεγεθύνουν την κυτταροτοξική δραστηριότητα [189]. Με αυτό τον τρόπο ο Th₁ φαινότυπος ευνοεί την έκκριση κυτταροκινών όπως IFN-γ και TNF-α, που ακολούθως ενεργοποιούν τα μακροφάγα. Είναι ήδη γνωστό πως η έκκριση IL-1β και TNF-α οδηγεί προοδευτικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Είναι πολύ πιθανό ότι οι ιντερλευκίνες IL-12, IL-15 και IL-18 παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του Th₁ φαινότυπου ο οποίος είναι χαρακτηριστικός στις αθηρωματικές περιοχές. Η IL-18 επάγει την έκφραση της IFN-γ από τα T-λεμφοκύτταρα και ελαχιστοποιεί την παραγωγή IL-10 που είναι μια κύρια αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη που παράγεται από τα Th₂ κύτταρα. Σε αντίθεση με τον Th₁ φαινότυπο, ο Th₂ ευνοεί την έκκριση αντι-αθηρογόνων κυτταροκινών όπως IL-4 και IL-10. Κάθε κλάση κυτταροκινών αναστέλλει τον αντίθετο φαινότυπο και την έκκριση των χαρακτηριστικών του κυτταροκινών [188] (εικόνα 7).

Τα T-κύτταρα του Th₁ φαινότυπου προωθούν και μεγεθύνουν τον ίδιο τύπου φλεγμονώδους αντίδρασης που επάγεται και από την ενδογενή ανοσία, όταν τα ανοσοκύτταρα αναγνωρίζουν PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) μέσω υποδοχέων. Το γεγονός αυτό πιστοποιείται από την έκκριση κυτοκινών όπως της IFN-γ, από τα T-κύτταρα, που ενεργοποιεί τα μακροφάγα και ελαττώνει τον ουδό ενεργοποίησης μέσω των TLR. Επιπρόσθετα, τα T-κύτταρα παράγουν TNF-α που ενεργοποιεί τον NF-kB. Επίσης τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα εκφράζουν προσδέτη CD40 (DC154) που ενώνεται με το αντιγόνο R-CD40 στα μακροφάγα, τα B κύτταρα και πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα δένδριτικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα [186] .



Εικόνα 6. Το φλεγμένον ενδοθήλιο επιτρέπει την προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων με αποτέλεσμα την διαιώνιση της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος [313].



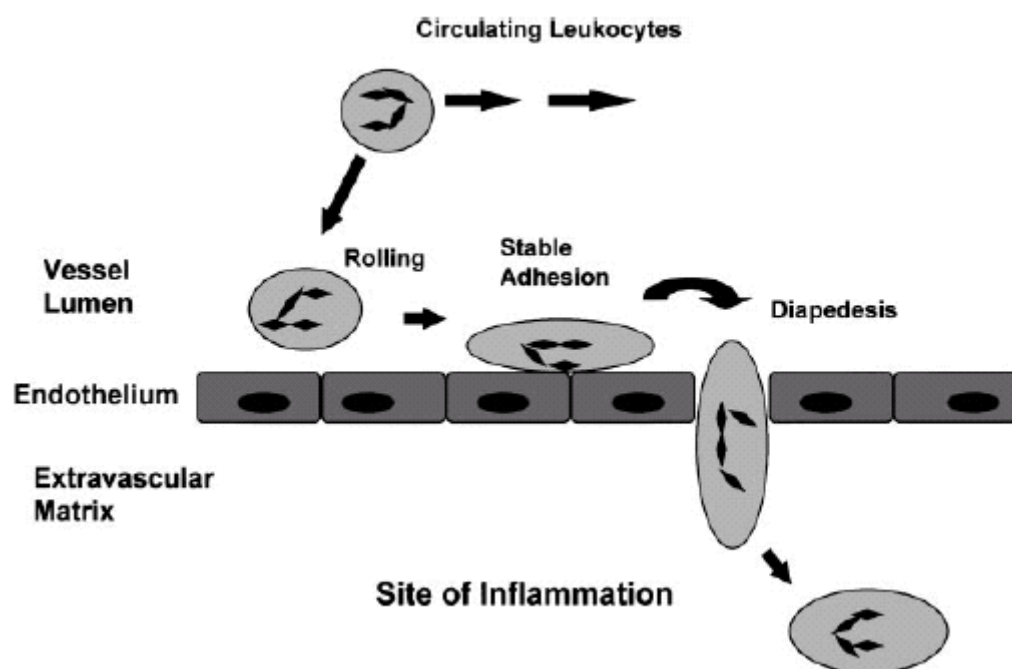
Εικόνα 7. Ρόλος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των Th₁ και TH2 κυττάρων, και των τύπου 1/προφλεγμονωδών και τύπου 2/αντιφλεγμονωδών κυτοκινών στη ρύθμιση της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας. Η κυτταρική ανοσία παρέχει προστασία έναντι των ενδοκυτταρικών βακτηριδίων, πρωτοζώων, μυκήτων και αρκετών ιών, ενώ η χυμική ανοσία παρέχει προστασία έναντι πολυκυτταρικών παρασίτων, εξωκυτταρικών παρασίτων, μερικούς ιούς, διαλυτές τοξίνες και αλλεργιογόνα. Η κυτταρική προέλευση της IL-4 η οποία ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των TH0 κυττάρων σε T-κύτταρα με TH2 φαινότυπο δεν έχει αποσαφηνισθεί. Οι συνεχείς γραμμές σημαίνουν διέγερση, οι διακεκομμένες γραμμές σημαίνουν αναστολή.

Συντομογραφίες: Ag, αντιγόνο; APC, αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο; DC, δενδριτικό κύτταρο; IFN, ιντερφερόνη; IL, ιντερλευκίνη; Mo, μονοκύτταρο; NK, Φυσικός φονέας T-λεμφοκύτταρο; T, T-λεμφοκύτταρο; Th, T βοηθητικό λεμφοκύτταρο; TNF, παράγοντας νέκρωσης των όγκων.

1.11.4 Κυτταρικοί πληθυσμοί των πρώτων σταδίων φλεγμονής - αθηροσκλήρωσης

Η δυσλειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ξεκινάει πολύ νωρίτερα από τις μορφολογικές αλλαγές της δημιουργίας του αθηρώματος και

συνεχίζεται καθ'όλη τη διάρκεια της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Τα μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στο αθήρωμα και οι χυμοκίνες επάγουν την αρχική διήθηση των μονοκυττάρων, ως πρώιμο μορφολογικό φαινόμενο της φλεγμονής, στις αρτηρίες (εικόνα 8). Τα μονοπύρρηνα κύτταρα που βρίσκονται στις αθηρωματικές περιοχές αποτελούνται κατά 80% από μακροφάγα, που προκύπτουν από την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων τα οποία στη συνέχεια, μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (foam cells), και κατά 10-20% από λεμφοκύτταρα κυρίως του Th₁ φαινότυπου των T-κυττάρων μνήμης. Επιπρόσθετα, η παρουσία δενδριτικών κυττάρων που αλληλεπιδρούν με τα T-κύτταρα φαίνεται πως αποτελεί τμήμα της επίκτητης ανοσίας. Ακόμα, η προσέλκυση αρχέγονων κυττάρων, τελικά οδηγεί σε εγκατάσταση λείων μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων στην έσω αρτηριακή στοιβάδα [190].



Εικόνα 8. Το μοντέλο διήθησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Σε φλεγμένους περιοχές, οι τοπικοί διαμεσολαβητές της φλεγμονής επάγουν την κύλιση των λευκοκυττάρων, την σταθερή πρόσδεσή τους και τη διαπηδησή τους στο ενδοθηλιακό τοίχωμα [314].

1.11.5 CRH και φλεγμονή του ενδοθηλίου

Η CRH, ως γνωστόν, ασκεί έμμεσα αντιφλεγμονώδη δράση δια της παραγόμενης κορτιζόλης και άμεσα προ-φλεγμονώδη ρόλο μέσω της κινητοποίησης των ανοσοκυττάρων και της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η αναστολή της σύνθεσης των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να εξουδετερώνει την κατασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην αλληλεπίδραση λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου σε συνθήκες τοξιναιμίας [191]. Σε αντίθεση με την κεντρική της δράση, ο ρόλος της CRH στην περιφέρεια φαίνεται να είναι διαφορετικός. Η κεντρική χορήγηση CRH, σε αρουραίους, συνοδεύεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού ενώ, αντίθετα, η περιφερειακή χορήγηση CRH μειώνει την αρτηριακή πίεση και αυξάνει την αγγειοχάλαση μέσω του CRFR₂ [192, 193, 194]

Η πλειοτροπική δράση του CRH είναι πλέον αποδεκτή. Εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το βαθμό στρες στο οποίο υποβάλλεται ένα σύστημα. Οι Cantarella και συν. [195], περιέγραψαν αποκλίνουσες δράσεις των κυτταροκινών και της έκφραση της eNOS, όταν προηγήθηκε η δράση της CRH, σε διάφορους τύπους ενδοθηλιακών κυττάρων. Με βάση τις υπάρχουσες παρατηρήσεις έχει προταθεί ένα μοντέλο διπλής δράσης της CRH στους περιφερικούς ιστούς, σύμφωνα με το οποίο σε χαμηλές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως αντιφλεγμονώδης παράγων, ενώ στις υψηλές ως προφλεγμονώδης παράγοντας [196]. Εκτός από την έμμεση αντιφλεγμονώδη δράση μέσω του ΥΥΕ άξονα [197], είναι πιθανό και η τοπικά παραγόμενη CRH, στα πλαίσια της αντιφλεγμονώδους απάντησης [198], να επάγει αντιφλεγμονώδη απόκριση. Υπέρ αυτού του ενδεχόμενου συνηγορεί το ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και παράγουν μεγάλα ποσά CRH η οποία μέσω των υποδοχέων της, ρυθμίζει την ομοιοστασία του ενδοθηλίου αυτοκρινικά ή παρακρινικά [199]. Η απόκριση του ενδοθηλίου στη φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το βαθμό ενεργοποίησης του και το στάδιο διαφοροποίησης [195].

Η συμμετοχή της περιφερικής CRH κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση τεκμαίρεται και από το γεγονός ότι στα μονοκύτταρα αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και την έκκριση της ET-1 ενώ παράλληλα μειώνει την έκλυση NO [199]. Επίσης στην προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε πως σε χρόνια φλεγμονή, η CRH προκαλεί έκκριση ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα του NO, γεγονός που υποδηλώνει

διαφορετική δράση της ορμόνης και συμπεριφορά του ενδοθηλίου στη χρόνια έκθεσή του σε στρεσογόνο περιβάλλον.

1.12 Ο ενεργός ρόλος του ενδοθηλίου στη διατήρηση της ομοιοστασίας του – Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το ενδοθήλιο είναι μια συνεχώς μεταβαλλόμενη επιφάνεια που αποκρίνεται σε μια πληθώρα ερεθισμάτων που προέρχονται από το κυκλοφορούν αίμα και τα γειτονικά κύτταρα και ιστούς. Το ενδοθήλιο δεν είναι απλά ένα φυσικό όριο και ένας προστατευτικός φραγμός, αλλά ταυτόχρονα και κύριος ρυθμιστής της καρδιαγγειακής ομοιοστασίας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταβιβάζουν ερεθίσματα στο αρτηριακό τοίχωμα και ρυθμίζουν το αγγειακό τόνο, την ομοιοστασία, την πίεση του αίματος, την αναγέννηση των αγγείων και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Αυτές οι λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων θεωρούνται πως λαμβάνουν χώρα μέσω της παραγωγής αυτακοειδών, όπως το NO, η PGI₂ (prostaglandin I₂), EDHF (endothelium – derived hyperpolarization factor), η βραδυκινίνη, η αδρενομεδουλίνη, το c-νατριουρητικό πεπτίδιο, η ενδοθηλίνη-1, η αγγειοτασίνη-2, η θρομβοξάνη A₂, οι προσταγλανδίνες, το H₂O₂ και τα ROS. Κατά συνέπεια, το ενδοθήλιο είναι η πηγή βιολογικά ενεργών παραγόντων με αντίθετες δράσεις όπως αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών ενώσεων, αυξητικών και ανασταλτικών παραγόντων, οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων [86]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ενδοθήλιο διατηρείται σε μια κατάσταση αγγειοδιαστολής, με αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα. Ωστόσο, κλασσικοί αλλά και επιβλαβείς παράγοντες που εντοπίστηκαν πρόσφατα, σχετίζονται με την απώλεια της βιολογικής δραστηριότητας του ενδοθηλιακού NO και την έκφραση προ-θρομβωτικών παραγόντων, προφλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης, κυτοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων. Αυτές οι προφανείς αλλαγές στο φαινότυπο του ενδοθηλίου πιστεύεται ότι συμμετέχουν σε όλες τις φάσεις της αθηροσκλήρωσης [200].

Το αγγειακό ενδοθήλιο, επηρεάζεται και επηρεάζει τη φλεγμονώδη διαδικασία και κατ' επέκταση την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Οι προφλεγμονώδεις παράγοντες ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προωθούν το αθηρωματικό μοντέλο. Μια σημαντική συνέπεια της ενεργοποίησης

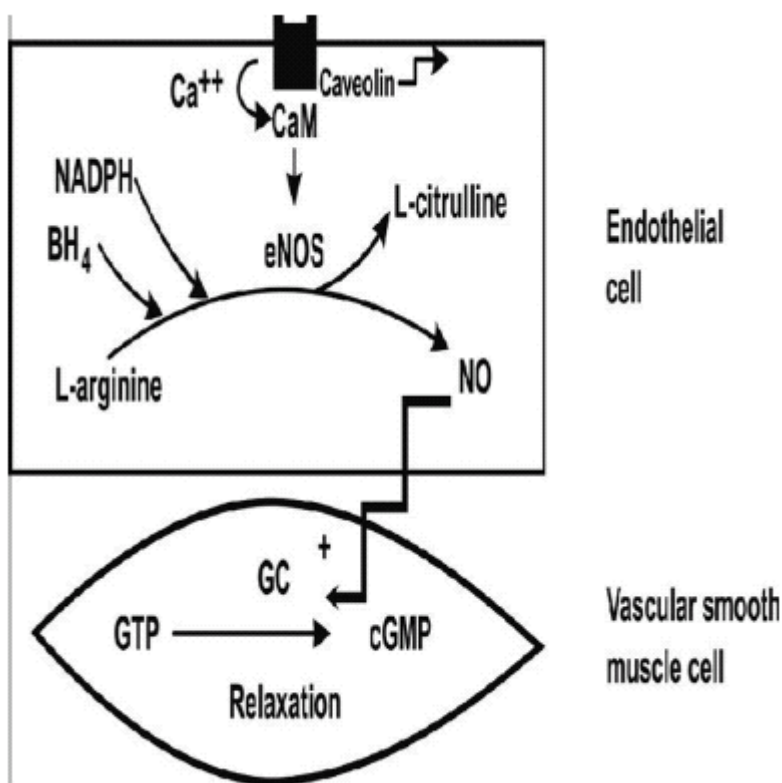
του ενδοθηλίου είναι η απώλεια της δραστικότητας του ενδοθηλιακού NO που αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό καθότι συνδέει τη φλεγμονή με την αθηροσκλήρωση [201, 202].

1.12.1 Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το NO πληρεί πολλά κριτήρια που επιτρέπουν να χαρακτηριστεί ως ένα ενδοκυτταρικό και διακυτταρικό μόριο σηματοδότησης. Το NO συντίθεται ενδοκυτταρικά και φθάνει στα σημεία δράσης του μέσω διάχυσης στο ίδιο κύτταρο ή στα γειτονικά κύτταρα. Κατά συνέπεια έχει ιδιότητες αυτοκρινούς ή παρακρινούς ορμόνης, αλλά και ενδοκυτταρικού αγγελιοφόρου.

Το NO σχηματίζεται ενζυματικά από την αργινίνη, με την καταλυτική δράση της συνθετάσης του μονοξειδίου σε μια αντίδραση που οδηγεί στην παραγωγή L-κιτρουλίνης (εικόνα 9). Η κιτρουλίνη και η αργινίνη είναι ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου της ουρίας και η αργινίνη μπορεί να αναγεννηθεί ξανά από την κιτρουλίνη από ένζυμα του κύκλου της ουρίας.

Υπάρχουν τρεις μορφές συνθετάσης του NO, η νευρική ή τύπος I (nNOS), η επαγόμενη ή τύπος II (iNOS) και η ενδοθηλιακή ή τύπος III (eNOS). Κάθε μορφή έχει διαφορετική ευαισθησία στα επίπεδα ασβεστίου. Οι τύποι II και III απαιτούν την παρουσία ιόντων ασβεστίου για την δραστικότητά τους και είναι συνεχώς ενεργοποιημένα. Αντίθετα, η δραστικότητα της NOS τύπου I δε ρυθμίζεται από τα ιόντα ασβεστίου, αλλά η επαγωγή του ενζύμου γίνεται στο επίπεδο του γονιδίου από φλεγμονώδεις παράγοντες [203].



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [315].

1.12.2 Διπτός ρόλος NO στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης

Ολοένα και περισσότερο υποστηρίζεται πως το NO κατέχει διπτό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό φορτίο. Το NO συμπεριφέρεται τόσο ως οξειδωτικός όσο και ως αντιοξειδωτικός παράγοντας. Μπορεί να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και να επάγει τη σύνθεση της γλουταθειόνης στα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα του ενδοθηλίου. Ωστόσο, όταν παράγεται σε μεγάλες ποσότητες έχει τοξικές επιπτώσεις [204].

Οι Bucci και συν., [205] χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια χωρίς eNOS, έδειξαν ότι η eNOS και το παραγώμενο από αυτήν NO κατέχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μικροαγγειακής διαπερατότητας κατά την οξεία φλεγμονή. Το οίδημα χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις: την πρώτη όπου η απόκριση κορυφώνεται σε 4 ώρες και την δεύτερη που είναι πιο βραδεία και ολοκληρώνεται σε 24 ώρες. Τα *enos*^{-/-} ποντίκια δεν είχαν απόκριση πρώτης φάσης. Ο αποκλεισμός του ενδοθηλιακού NO μείωσε επίσης σημαντικά το

οίδημα στη δεύτερη φάση, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η πρώιμη φάση χαρακτηρίζεται από αύξηση της ροής του αίματος και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και ότι αμφότερα συμμετέχουν στην εξέλιξη της τελευταίας φάσης.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε διάφορα μέρη του κυττάρου και δρουν επίσης ποικιλοτρόπως. Η δράση τους χαρακτηρίζεται τοξική. Το NO[·] είναι μια δραστική και ασταθής ρίζα, σε αέρια μορφή, που έχει την ιδιότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη εύκολα μέσω διάχυσης, χωρίς να εξαρτάται από μηχανισμούς πρόσληψης και απελευθέρωσης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το NO[·] συντίθεται από την eNOS και δρα βραχυπρόθεσμα ως νευροδιαβιβαστής.

Ομοίως το NO[·] που παράγεται από την eNOS παίζει ένα σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην αγγειοδιαστολή και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, υψηλά επίπεδα NO[·], που παράγονται από την iNOS, κυρίως στα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, είναι κυτταροτοξικά για τους ξενιστές στα πρώτα στάδια άμυνας του οργανισμού εναντίον μικροοργανισμών ή καρκινικών κυττάρων [206].

Η κυτταροτοξικότητα του NO έγκειται στο σχηματισμό σιδηρονιτροσιλιωμένων συμπλόκων με ένζυμα που περιέχουν Fe-S. Το NO[·] μπορεί άμεσα να προκαλέσει βλάβες στη χρωματίνη με αποαμίνωση και σύνδεση στο DNA, γεγονός που ευνοεί τη μεταλλαξιγένεση. Ενώ η παραγωγή περοξυνιτρικού, από την αντίδραση του NO[·] με ανιόν υπεροξειδίου, συνεπάγεται τοξικές δράσεις, το NO[·] μπορεί να απενεργοποιεί σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων της καταλάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και την δισμουτάσης του ανιόντος υπεροξειδίου και επιπρόσθετα να επάγει την απόπτωση αυξάνοντας την παραγωγή κεραμιδίων, μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης 3, την αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και την ενεργοποίηση του συστήματος Fas [207].

Επιπλέον τα υψηλά επίπεδα NO και cGMP μειώνουν την εντός του κυττάρου είσοδο ιόντων ασβεστίου (που είναι ένα ερέθισμα παραγωγής NO) και την ίδια στιγμή επάγουν τους μηχανισμούς απομάκρυνσης των ιόντων ασβεστίου με αποτέλεσμα να μειώνεται το ενδοθηλιακό ασβέστιο με αρνητική ανατροφοδότηση [208]. Αυτός ο μηχανισμός που υπάρχει στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, στα αιμοπετάλια και στα κύτταρα του παγκρέατος, μπορεί να

προστατεύει το ενδοθήλιο από τις επιβλαβείς επιπτώσεις των υψηλών συγκεντρώσεων NO και ιόντων ασβεστίου.

1.12.3 Άλλες δράσεις του NO

Εκτός από τη δράση του ως αγγειοδιασταλτικού παράγοντα, το ενδοθηλιακό NO έχει αναγνωρισθεί ως αντιφλεγμονώδες μόριο. Η σύνθεση του ενδογενούς NO αναστέλλει την κύλιση και την προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο καθώς και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Οι δότες NO αναστέλλουν την έκφραση MCP-1 στα λεία μυϊκά κύτταρα που εκτίθενται σε LPS ή oxLDL. Το ενδογενές NO μειώνει το προ-φλεγμονώδες οξειδωτικό στρες μέσω αναστολής της αγγειοτασίνης II στα αιμοφόρα αγγεία. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του NO αποδίδονται μερικώς στην αναστολή του NF-κΒ μέσω της αύξησης της έκφρασης της υπομονάδας IκΒα, και τη μετατόπισή της στον πυρήνα. Ταυτόχρονα με τη φλεγμονώδη διαδικασία, το αγγειακό ανιόν του υπεροξειδίου αυξάνεται κατόπιν χρόνιας αναστολής έκλυσης του NO [185].

Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO, η οποία οφείλεται σε μειωμένη σύνθεσή του ή αυξημένη διάσπασή του λόγω κατανάλωσης από τα ROS, ευθύνεται για τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Η φλεγμονή επιφέρει μειωμένη δραστηριότητα των βασικών μονοπατιών παραγωγής NO από το ενδοθήλιο. Ένας πιθανός μηχανισμός στον οποίο μπορεί να αποδοθεί το φαινόμενο είναι η εξάντληση της L-αργινίνης η οποία αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή NO από την ενδοθηλιακή συνθετάση, ή η αυξημένη παραγωγή ROS. Αμφότεροι οι προαναφερθέντες παράγοντες χαρακτηρίζουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία παρουσία μεταβολικών παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο αθηρωμάτωσης [209].

1.12.4 Ισορροπία δράσης NO και ενδοθηλίνης-1 (ET-1)

Το NO δρα ως παράγοντας που αντισταθμίζει τη αγγειοσυστολή που επάγεται από την ενδοθηλίνη-1. Η ενδοθηλίνη-1 δρα μέσω δύο διαφορετικών υποτύπων υποδοχέων: τον ETa υποδοχέα που εντοπίζεται στα αγγειακά λεία

μυϊκά κύτταρα και επάγει την αγγειοσυστολή και τον ETb υποδοχέα στο αγγειακό ενδοθήλιο που επάγει την αγγειοδιαστολή μέσω του NO και των PGI₂ [210-213]. Η ενδοθηλίνη-1 υποστηρίζεται πως είναι πιο ισχυρός παράγοντας έκλυσης NO από τις κλασσικούς αγγειοδραστικούς παράγοντες του ενδοθηλίου (π.χ ακετυλοχολίνη, βραδυκινίνη). Ωστόσο η αντίδραση μεταξύ του NO και της ενδοθηλίνης-1 είναι σύνθετη και ο ρόλος των προφλεγμονωδών παραγόντων είναι αμφιλεγόμενος, καθώς δεν έχει αποσαφηνισθεί εάν η δράση τους είναι επιβλαβής ή προστατευτική [214, 215]. Η υπερέκφραση ενδοθηλίνης-1 προκαλεί χρόνια φλεγμονή και επαγωγή της iNOS, γεγονός που αντισταθμίζει την αγγειακή δράση της ενδοθηλίνης-1 [216].

1.12.5 Προεπαγωγή NO

Το ενδογενές NO προωθεί την μείωση των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας και συμμετέχει σε ένα μηχανισμό όπου τα κύτταρα διατηρούν χαμηλό ποσοστό οξυγόνου σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Αυτό επιφέρει ακολούθως την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου που ενεργοποιεί τον NF-κB ως πρώιμη στρεσογόνο απόκριση. Αυτό το πρώιμο στάδιο ευαισθητοποίησης του κυττάρου πυροδοτεί ένα πυρηνικό μηχανισμό κυτταρικής άμυνας όταν μεταβάλλεται το οξειδοαναγωγικό προφίλ των μιτοχονδρίων του ενδοθηλίου [217].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις NO που παράγονται από την eNOS έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και προστατεύουν το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο όταν το NO παράγεται σε αφθονία, όπως για παράδειγμα στη χρόνια φλεγμονή, είναι προοξειδωτικός και τοξικός παράγοντας.

Ο PGC-1α είναι κύριος παράγοντας του μιτοχονδριακού συστήματος προστασίας από τα ROS στο ενδοθήλιο. Έχει βρεθεί ότι οι δότες NO επάγουν την πρώιμη μείωση του PGC-1α μέσω PKC, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ραγδαία αύξηση αυτού. Αυτός ο διττός ρόλος του NO είναι ένα φαινόμενο που ονομάζεται προ-επαγωγή ή ευαισθητοποίηση. Έχει βρεθεί πως σε πολλά συστήματα η πρώιμη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις ROS επάγει προστατευτικούς μηχανισμούς που προλαμβάνουν την οξειδωτική βλάβη υπό συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες. Έτσι, η αρχική ελάττωση του PGC-1α

είναι απαραίτητη για την μετέπειτα επαγωγή του. Είναι από επίσης η σηματοδότηση του H_2O_2 στα πλαίσια της προ-επαγωγής να παίζει ένα πολύ σημαντικό μηχανισμό, καθότι το H_2O_2 επάγει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού [204, 218].

Το ενδοθήλιο μπορεί να «ευαισθητοποιηθεί» με τέτοιο τρόπο ώστε να επαχθούν οι προστατευτικοί μηχανισμοί [219]. Οι TNF-α και ο LPS έχουν έκαστος το μέγιστο αποτέλεσμα στη ρύθμιση φαινομένων επαγόμενων από τη θρομβίνη. Συγκεκριμένα οδηγούν στη φωσφορυλίωση της IκB υπομονάδας του NF-κB, την αποδόμηση της κυτταροπλασματικής IκB και την μεταφορά της p65 στον πυρήνα. Με αυτό τον τρόπο το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο αντιδρά λιγότερο έντονα στη σηματοδότηση που ξεκινά από τη θρομβίνη και καταλήγει στον NF-κB.

Υπάρχουν πολλές ακόμα περιπτώσεις υπο- ή υπερ- ευαισθητοποίησης του ενδοθηλίου σε διάφορους αγωνιστές του. Για παράδειγμα η προ-ενεργοποίηση που προκαλεί η ισχαιμία περιγράφεται ως κυτταροπροστατευτική. Η προσαρμογή οργανισμού-μοσχεύματος κατόπιν μεταμόσχευσης λαμβάνει χώρα αφού τα ξένα αντισώματα προκαλέσουν ανοχή του ενδοθηλίου στη χυμική απόρριψη. Επαναλαμβανόμενη έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον LPS απευαισθητοποιούν προσωρινά το ενδοθήλιο σε επόμενη έκθεση. Το φαινόμενο ονομάζεται ανοχή ενδοτοξίνης. Παρόμοιες επιδράσεις που τροποποιούν τη σηματοδότηση του ενδοθηλίου είναι η υποξία, το θερμικό σοκ και ο IGF-1. Αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα πως το ιστορικό των αντιδράσεων του ενδοθηλίου είναι καθοριστικό για τη μελλοντική συμπεριφορά του, σε παθολογικές ή φυσιολογικές καταστάσεις. Σε κάποια χρονική στιγμή, κάθε ενδοθηλιακό κύτταρο έχει εκτεθεί και προ-ενεργοποιηθεί από διαφορετικούς βιοχημικούς και μηχανιστικούς παράγοντες [220-224].

Οι βλάβες που προκαλεί η ισχαιμία/επανοξυγόνωση σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο από την έλλειψη οξυγόνου και την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση ROS και προφλεγμονωδών κυτοκινών, κατά την επανοξυγόνωση [225]. Τα υψηλά επίπεδα HIF-1α και TGF-β συνδέονται με αντιαποπτωτικές, αντιπνωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στην καρδιά και στα νεφρά [226, 227, 228, 229, 230, 231]. Ο TGF-β προωθεί την ενεργοποίηση γονιδίων επιβίωσης όπως το HO-1 [230, 231, 232].

Ο HIF-1α κατέχει πλαστικότητα στη συμπεριφορά του ως προστατευτικός ή επιβλαβής παράγοντας στη φλεγμονή. Τόσο ο HIF-1α όσο και ο TGF-β μπορούν να προετοιμάσουν τα κύτταρα για καλύτερη απόκριση σε επερχόμενη βλάβη. Επίσης το CO δεν αυξάνει την εισροή μακροφάγων στο σημείο της βλάβης, αλλά επαναπρογραμματίζει την ενεργοποίησή τους, αποφεύγοντας έτσι την απελευθέρωση κυτοκινών στο τραύμα που θα μεγέθυναν την καταστροφή του ιστού.

1.12.6 CRH και έκλυση NO

Στοιχεία της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι υπάρχει συνεργεία μεταξύ της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) και της CRH στη διατήρηση του αγγειακού τόνου. Το NO, παραγόμενο από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτελεί σημαντικό μόριο στη ρύθμιση της αγγειοχάλασης. Το ενδεχόμενο η έκκρισή του να επηρεάζεται από την CRH απομακρύνεται σύμφωνα με παρατηρήσεις των Wilbert - Lampen και συν. [199, 233, 234, 235].

Εκτός από την ενδοθηλιοεξαρτώμενη, έχει μελετηθεί και η μη εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοχάλαση, η οποία αναφέρεται στα λεία μυϊκά κύτταρα. Το αγγειακό ενδοθήλιο, όπως επίσης και τα λεία μυϊκά κύτταρα, φέρουν θέσεις πρόσδεσης της CRH [236]. Η αγγειοδιασταλτική δράση της CRH στην αορτή αρουραίου είναι κυρίως ενδοθηλιοεξαρτώμενη [192]. Ομοίως οι [237] Clifton και συν. έδειξαν πως το NO και το cGMP εμπλέκονται στο αγγειοδιασταλτικό αποτέλεσμα του CRH στην ανθρώπινη εμβρυοπλακουντική κυκλοφορία. Ωστόσο, οι Lei και συν. [238], έδειξαν πως στη μεσεντέριο αρτηρία αρουραίου, η δράση της CRH είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του ενδοθηλιακού στρώματος.

Η CRH έχει άμεση βραχεία δράση στα λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα, που ακολουθείται από μια παρατεταμένη ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή μέσω της eNOS. Αν και είναι γενικά αποδεκτό ότι το NO επάγει τη χαλάρωση των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων, πρωταρχικά μέσω ενεργοποίησης της GC και της αύξησης του cGMP, η αντίδραση στην CRH των λείων μυϊκών αγγείων δεν άλλαξε κατόπιν αναστολής της GC [239] σε συγκεντρώσεις που ανέστειλαν εντελώς την επαγόμενη από δότες NO αγγειοδιαστολή. Κατά συνέπεια, ο μηχανισμός δράσης της CRH, στην έκλυση του NO είναι υπό συζήτηση.

Οι Jain και συν. [192] έδειξαν ότι η εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο δράση της CRH συνοδεύεται από αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{+2} . Αυτή η αύξηση οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς όπως η είσοδος εξωκυττάριου Ca^{+2} , η ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$ και η απελευθέρωση Ca^{+2} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες. Είναι ενδιαφέρον ότι η απομάκρυνση του ενδοθηλίου δεν κατάργησε τελείως την χαλάρωση της μητριαίας αρτηρίας από την CRH, γεγονός που δηλώνει ότι η CRH μπορεί να επιφέρει αγγειοχάλαση με απευθείας δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η ενδοκυτταρική αύξηση του cAMP προηγείται της μη ενδοθηλιοεξαρτώμενης χύλασης των λείων μυϊκών ινών [240], ενώ η ενδοθηλιοεξαρτώμενη δράση του CRH επάγεται μέσω του cGMP. Συμπερασματικά, η CRH επενεργεί με διαφορετικό τρόπο στα λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.

1.12.7 UCNs και έκλυση NO

Οι ουροκορτίνες θεωρούνται καρδιοπροστατευτικά πεπτιδία. Με την θετική ινοτρόπο και χρονοτρόπο δράση τους επηρεάζουν θετικά την καρδιακή λειτουργία και απόδοση. Παράλληλα, η αγγειοδιασταλτική δράση των ουροκορτινών, που έχει δειχθεί σε διάφορους τύπους αγγείων, συμβάλλει περαιτέρω στην καρδιοπροστατευτική λειτουργίας τους [241, 242, 243,244, 245,246, 247].

Έχει βρεθεί πως το mRNA της UCN1 εκφράζεται στα καρδιομυοκύτταρα και σε άλλους καρδιακούς μη-μυοκαρδιοκυτταρικούς πληθυσμούς, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή παρακρινική δράση του πεπτιδίου [247, 248]. Η ουροκορτίνη 1 είναι ισχυρότερος παράγοντας διαστολής απ' ότι η CRH.

Είναι ήδη γνωστό ότι οι ουροκορτίνες επηρεάζουν στο ενδοθήλιο:

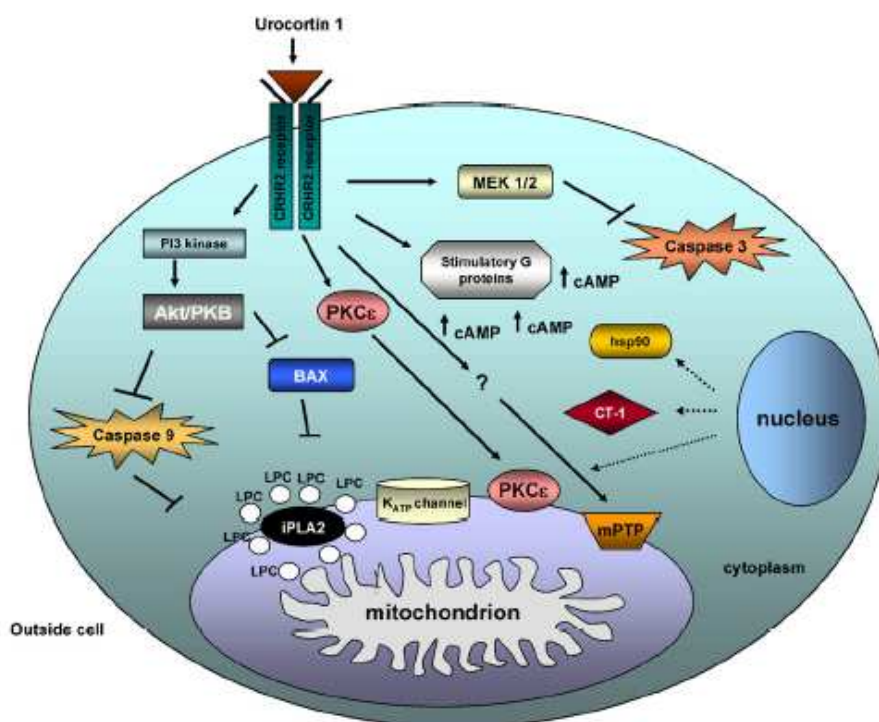
- Το NO
- Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του cAMP
- Τα κανάλια καλίου που ενεργοποιούνται από ιόντα ασβεστίου
- Τους ιοντοανταλλάκτες νατρίου-ασβεστίου, που είναι ευαίσθητοι στα επίπεδα νικελίου

Οι Lubimirov και συν. [249, 250] πιστοποίησαν πως η ουροκορτίνη 1 είναι ένας ισχυρός παράγοντας ενδοθηλιοεξαρτώμενης αγγειοδιαστολής και πρότειναν

πως η συγκεκριμένη δράση ακολουθεί το μονοπάτι της PKA και την ελάττωση της ευαισθησίας της συσταλτικού μηχανισμού των ιόντων ασβεστίου.

Έχει πλέον πιστοποιηθεί ότι η UCN1 δρα ως ενδογενής αγωνιστής της CRHR₂ στα ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα. Οι περισσότεροι μηχανισμοί δράσης των ουροκορτινών, και άλλων πεπτιδίων που σχετίζονται με την οικογένεια του CRH, στο καρδιαγγειακό σύστημα, είναι μέσω του υποδοχέα CRHR₂, της PKA και του cAMP [251]. Γενικά, ο CRFR₂ φαίνεται να έχει τον κυριότερο ρόλο στον έλεγχο του αγγειακού τόνου, καθώς η ενδοφλέβια χορήγηση UCN1 δεν επιφέρει καμία μεταβολή στην διασταλτική αντίδραση σε *crhr2*^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια [252].

Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι του μηνύματος που ακολουθεί τη σύνδεση των ουροκορτινών με τον CRHR₂, [253] βρέθηκε ότι περιλαμβάνει την επαγωγή φωσφορυλίωσης της p38, ERK και Akt μέσω cAMP-PKA και των μονοπατιών που συνδέονται με το ενδοκυτταρικό ασβέστιο (εικόνα 10).



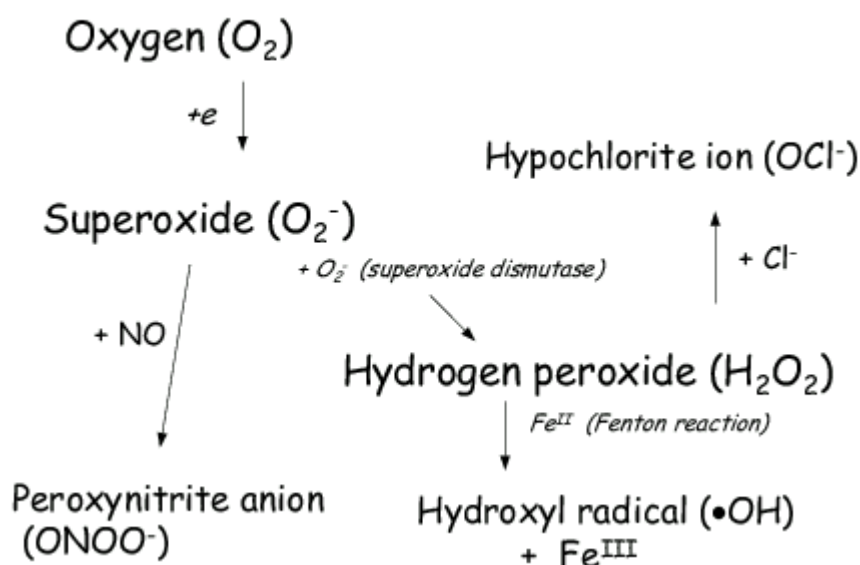
Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τις ουροκορτίνες στα καρδιομυοκύτταρα. Η UCN1 προσδένεται στον CRHR₂ και ενεργοποιεί την G_s υπομονάδα που ακολούθως αυξάνει τα επίπεδα του cAMP (cyclic adenosine monophosphate). Παράλληλα ενεργοποιούνται οι MAPK (mitogen-activated

kinase p42/p44), η PI3K (phosphoinositide-3 kinase) και η PKC (protein kinase C epsilon). Και τα τρία μονοπάτια έχει αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό καρδιοπροστατευτικό ρόλο. Ακολούθως, η UCN1 αυξάνει την έκφραση της HSP90 (heat shock protein 90), της CT-1 (cardiotrophin-1), στοιχεία των K_{ATP} καναλιών και την PKCε [80].

1.13 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

1.13.1 Γενικά

Το οξυγόνο είναι ζωτικής σημασίας δυατομικό μη αντιδρόν μόριο. Ωστόσο αποτελεί και το υπόστρωμα για πολλές αντιδράσεις που δίνουν γένεση σε δραστικές ρίζες, κάποιες από τις οποίες είναι επιβλαβείς (τοξικές) για το κύτταρο. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών ασθενειών αλλά ταυτόχρονα ρυθμίζουν τη σηματοδότηση σημαντικών κυτταρικών μονοπατιών. Τα ROS είναι μόρια σε διαφορετικές καταστάσεις οξειδωσης ή αναγωγής, όπως επίσης και σύμπλοκα οξυγόνου με υδρογόνο ή άζωτο. Αν και το ανιόν υπεροξειδίου προκύπτει απευθείας από την αναγωγή του οξυγόνου, οι βιολογικά δραστικές ρίζες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι ρίζες υδροξυλίου, το υποχλωριώδες ιόν και τα περοξείνιτρίλια (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη παραγωγής ελευθέρων ριζών [254].

Το ανιόν υπεροξειδίου προκύπτει από την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από το οξυγόνο. Είναι μια ασθενής βάση σε φυσιολογικό pH, υψηλή διαλυτότητα στο νερό και για αυτό το λόγο δε διαπερνά εύκολα τις λιπιδιακές μεμβράνες, αν και μπορεί να μεταφερθεί δια μέσω ιοντικών καναλιών. Λόγω του ότι είναι ασθενής βάση, δεν είναι ισχυρό οξειδωτικό σε ουδέτερο pH. Είναι όμως αναγωγικό μέσω για τα μέταλλα, για παράδειγμα δίνει ένα ηλεκτρόνιο στον τρισθενή σίδηρο και τον μετατρέπει σε δισθενή και ανάγει το κυτόχρωμα c. Το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί επίσης να πρωτονιωθεί σε υδροπεροξειδιακή ρίζα σε χαμηλό pH ($pK_a=4.8$), αλλά η κυριότερη κατάληξη του ανιόντος υπεροξειδίου σε φυσιολογικό pH είναι η αντίδρασή του με την αντίστοιχη υπεροξειδάση προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο ρυθμός μετατροπής είναι υψηλός ($k=1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Κατά συνέπεια η συγκέντρωση του ανιόντος διατηρείται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα.

Σε αντίθεση με το ανιόν υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ισχυρότερος οξειδωτικός παράγοντας και πολύ σταθερό μικρομόριο που μπορεί ελεύθερα να διαπερνά, όπως το νερό, τις μεμβράνες. Το γεγονός αυτό καθιστά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ένα σημαντικό μόριο σηματοδότησης. Η καταλάση διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο και είναι το υπεύθυνο ένζυμο για τη διατήρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων H_2O_2 . Το υπεροξείδιο του υδρογόνου συμμετέχει επίσης και σε αντιδράσεις με μέταλλα (αντιδράσεις Fenton) και οδηγεί στην απελευθέρωση ριζών υδροξυλίου. Το υποχλωριώδες ιόν προκύπτει από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με Cl^- . Τόσο η ρίζα υδροξυλίου όσο και το ιόν του υποχλωριώδους θεωρούνται πολύ δραστικά μόρια. Επιπλέον, πολλές δραστικές ρίζες προκύπτουν από την αντίδραση του νιτρικού οξειδίου, ενός γνωστού σηματοδοτικού μορίου, με το οξυγόνο ή το ανιόν υπεροξειδίου. Αυτές είναι το διοξείδιο του αζώτου, που συμμετέχει στην επερχόμενη υπεροξειδωση των λιπιδίων, και το περοξείνιτρικό αντίστοιχα.

1.13.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

Υπάρχουν πολλές πιθανές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών:

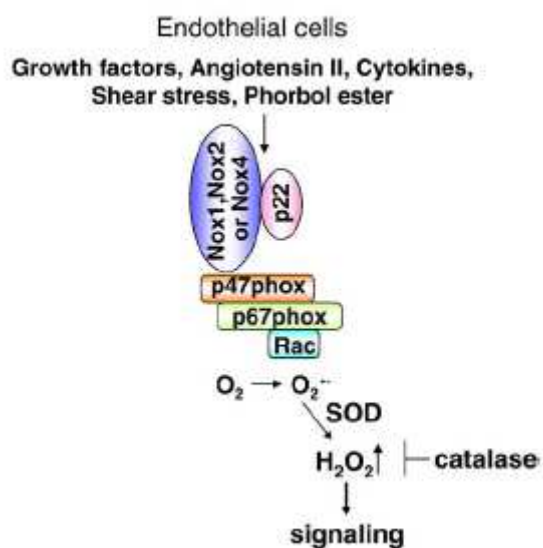
- ✓ Το σύστημα οξειδάσης της ξανθίνης
- ✓ Η NADPH οξειδάση (φαγοκυτταρικής ή μη προέλευσης)
- ✓ Η συνθάση νιτρικού οξέος
- ✓ Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα
- ✓ Τα ένζυμα του μονοπατιού του αραχιδονικού οξέος, της λιποξυγενάσης και της κυκλοξυγενάσης
- ✓ Το κυτόχρωμα P-450
- ✓ Αιμοπρωτεΐνες

Κατά την αερόβια αναπνοή, τα κύτταρα παράγουν ενέργεια ανάγοντας το μοριακό οξυγόνο σε νερό [254]. Ως φυσικό παραπροϊόν του μεταβολισμού, οι ελεύθερες ρίζες φέρουν διάφορες βιολογικές δράσεις. Οι κυριότερες πηγές είναι:

1) NADPH οξειδάση

Οι πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι ενζυματικές και μη ενζυματικές. Μια πληθώρα αυτών βρίσκεται στο αγγειακό σύστημα. Το ενδοθηλίο, τα λεία μυϊκά κύτταρα και οι ινοβλάστες, περιέχουν μορφές μια διαμεμβρανικής οξειδάσης, της NADPH οξειδάσης, που καταλύει την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του μοριακού οξυγόνου, χρησιμοποιώντας το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων και την ανηγμένη μορφή του b588-τύπου κυτοχρώματος, προς παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου (εικόνα 12). Η NADPH οξειδάση ενεργοποιείται από GPCR αγωνιστές όπως η αγγειοτασίνη II, η ενδοθηλίνη-1, η βραδυκίνη, αυξητικοί παράγοντες όπως η θρομβίνη, ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου, αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, αλλά και κυτταροκίνες όπως ο TNF-α. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα της NADPH κατά την υποξία/επανοξυγόνωση, την παρατεταμένη έκθεση σε νιτρογλυκερίνη και σε οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας. Η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης γίνεται κατόπιν τροποποίησης της μεμβρανοσύνδετης μη φαγοκυτταρικής NADPH οξειδάσης (Nox) και της έκφρασης της p22^{phox} υπομονάδας και των κυτταροπλασματικών ρυθμιστικών υπομονάδων p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, και της μικρής GTPάσης Rac1. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιέχουν τις ισομορφές Nox-1, Nox2 (gp91^{phox}),

Nox4 και Nox5, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα εκφράζουν τις Nox1, Nox4 και Nox5 και οι adventitial ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αρτηριών περιέχουν την Nox2. Μια οξεία αύξηση του οξειδωτικού στρες έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου της οξειδάσης (p47^{phox} και Rac1) ή την αύξηση της έκφρασης και ποσοτικής αφθονίας των υπομονάδων του συμπλόκου της οξειδάσης.



Εικόνα 12. Δομή της NADPH οξειδάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ROS που παράγονται από την ενδοθηλιακή NADPH οξειδάση, λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια [316].

2) Οξειδάση της Ξανθίνης

Μια άλλη πηγή παραγωγής O₂⁻ είναι το σύστημα της οξειδορεδοукτάσης της ξανθίνης, που αποτελείται από μεταλλοφλαβοπρωτεΐνες και βρίσκεται σε δύο μορφές: τη δευδρογενάση της ξανθίνης και την μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη μορφή, την οξειδάση της ξανθίνης. Αυτό το ενζυμικό σύστημα εκφράζεται στην ενδοαυλική επιφάνεια του ενδοθηλίου και καταλύει την αντίδραση της υποξανθίνης σε ξανθίνη στο φυσιολογικό μεταβολισμό των πουρινών. Η δευδρογενάση της ξανθίνης προϋποθέτει την παρουσία NAD⁺ ως δέκτη ηλεκτρονίων, ενώ η οξειδάση της ξανθίνης ανάγει το δυατομικό οξυγόνο και κατά συνέπεια παράγει O₂⁻. Η μετατροπή της δευδρογενάσης της ξανθίνης

σε οξειδάση της ξανθίνης συμβαίνει είτε μέσω της οξείδωσης των κυστεϊνικών καταλοίπων, είτε μέσω της πρωτεολυτικής αφαίρεσης ενός τμήματος της δεϋδρογενάσης της ξανθίνης που συμβαίνει κατά την υποξία, την ισχαιμία και τη φλεγμονή. Επιπρόσθετα, η οξειδάση της ξανθίνης μπορεί άμεσα να προσφέρει δύο ηλεκτρόνια στο οξυγόνο προς σχηματισμό H_2O_2 . Η δραστηριότητά της οξειδάσης της ξανθίνης αυξάνεται κατά την υποξία/επανοξυγόνωση, ενώ έχει βρεθεί πως η παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ από το ένζυμο συνδυάζεται με ελάττωση της διαθεσιμότητας NO και κατά συνέπεια της αγγειοδιαστολής.

3) Συνθετάση NO

Μια τρίτη πηγή παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι η συνθετάση του νιτρικού οξειδίου. Η οικογένεια των συγκεκριμένων ενζύμων είναι διμερείς συνθετάσες που εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη ή περιέχουν το κυτόχρωμα P450, όπως οι αιμοπρωτεΐνες που συνδυάζουν καταλυτικές περιοχές ρεδοκτάσης και οξυγενάσης σε ένα μονομερές, φέρουν FAM και FMN, και διεκπεραιώνουν μια οξείδωση πέντε ηλεκτρονίων σε ένα από τα βασικά άτομα γουανιδινο-αζώτου της L-αργινίνης με την αναγωγική βοήθεια της τετραυδροβιοπτερίνης (BH_4), και παράγουν NO και L-κιτρουλίνη. Παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων L-αργινίνης ή του συμπαραγόντα BH_4 , η NOS είναι μη συζευγμένη και παράγει $O_2^{\cdot -}$ με την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου από το μοριακό οξυγόνο. Ομοίως, το περοξενιτρικό μπορεί επίσης να οξειδώσει την BH_4 και να προκαλέσει αποσύζευξη της συνθετάσης.

4) Άλλες πηγές

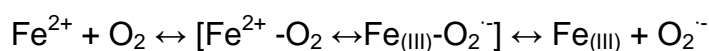
Το κυτόχρωμα P450, οι κυκλοοξυγενάσες, οι λιποξυγενάσες, οι οξειδάσες αλδεϋδών, οι δεϋδρογενάσες φλαβινών και η μιτοχονδρική αναπνοή συγκαταλέγονται στις ενδοκυτταρικές πηγές προέλευσης των ελευθέρων ριζών. Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παράγει $O_2^{\cdot -}$ κατά την ατελή αναγωγή του O_2 , κυρίως στο σύμπλοκο I και III. Οι συγκεκριμένες μιτοχονδριακές θέσεις είναι επίσης σημαντικά σημεία στην ανίχνευση των επιπέδων οξυγόνου και την έναρξη ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Υψηλές συγκεντρώσεις $O_2^{\cdot -}$ στα μιτοχόνδρια εντοπίζονται στα ισχαιμικά επεισόδια, το διαβήτη και τη φλεγμονή.

1.13.3 Χημεία των βιολογικά σημαντικών ριζών

1) Μέταλλα μετάπτωσης

Σχεδόν όλα τα μέταλλα της πρώτης σειράς του τετάρτου τετραγώνου του περιοδικού πίνακα περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και για αυτό το λόγο μπορούν να προσδιοριστούν ως ελεύθερες ρίζες, με την γενικότερη έννοια [255]. Εξαίρεση αποτελεί ο Zn.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο σίδηρος, ο οποίος σχηματίζει τις αντιδράσεις Fenton. Συγκεκριμένα, ο δισθενής σίδηρος υφίσταται οξείδωση ενός ηλεκτρονίου και το οξυγόνο που συμμετέχει στην αντίδραση ανάγεται σε ρίζα υπεροξειδίου.

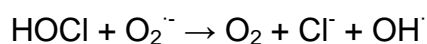


Σε αντίστοιχες αντιδράσεις συμμετέχουν ο χαλκός και το μαγνήσιο.

Ο ποικίλος αριθμός οξείδωσης επιτρέπει στα μέταλλα να είναι αποτελεσματικοί καταλύτες αντιδράσεων οξείδωσης και αναγωγής και για αυτόν τον λόγο βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο πολλών ενζύμων. Η εν δυνάμει καταστροφική τους δράση ενέχεται στο εάν η συγκέντρωσή τους στο κύτταρο είναι ελεγχόμενη και εάν καταλύουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Για παράδειγμα αντιδράσεις αυτοοξείδωσης όπως αυτές των NADH, NADPH, θειολών, ανηγμένων πτεριδινών, της αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης, της L-DOPA και των μεταβολιτών της, είναι αρκετά επιβλαβείς και παράγουν $\text{O}_2^{\cdot-}$. Οι ταχύτητες αυτών των αντιδράσεων είναι αρκετά χαμηλές, ωστόσο επιταχύνονται σημαντικά παρουσία μετάλλων.

2) Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})

Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει από την ομολυτική σύντηξη του δεσμού O-O στο H_2O_2 προς σχηματισμό OH^{\cdot} , υπό την επίδραση της υπεριώδους ή ιονίζουσας ακτινοβολίας. Επιπλέον προκύπτει από την αντίδραση:



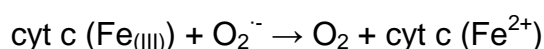
Σχεδόν κάθε βιολογικό μόριο έχει την ικανότητα να αντιδράσει με το OH^{\cdot} . Οι αντιδράσεις τυποποιούνται σε τρεις κυρίως κατηγορίες: την απόσπαση του υδρογόνου, την προσθήκη ή μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Οι ρίζες που προκύπτουν από τις αντιδράσεις του OH^{\cdot} είναι συνήθως λιγότερο δραστικές. Σημαντικές αντιδράσεις του OH^{\cdot} είναι αυτές που οδηγούν σε παραγωγή

υπεροξειδωμένων λιπιδίων, η προσθήκη του σε πουρίνες προς σχηματισμό ρίζας 8-υδροξυγουανίνης, το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου.

3) Η ρίζα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Το $O_2^{\cdot-}$ είναι λιγότερο δραστικό από το OH^{\cdot} σε υδατικό περιβάλλον. Αντιδρά ωστόσο πολύ γρήγορα με NO^{\cdot} , συγκεκριμένα μέταλλα και φαινοξυλικές ρίζες. Βιολογικά παράγεται κυρίως από την ξανθίνη και υποξανθίνη.

Συμμετέχει σε αντιδράσεις δισμουτίωσης σε χαμηλό pH. Σε υδατικά διαλύματα δρα ως αναγωγικό μέσο π.χ δότης ηλεκτρονίων. Χαρακτηριστική είναι η αντίδραση:

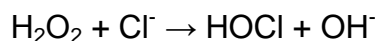


Δρα όμως και ως οξειδωτικός παράγοντας, όπως στην οξείδωση του ασκορβικού οξέος. Επιπλέον το $O_2^{\cdot-}$ ανάγει κινόνες και οξειδώνει διφαινόλες και σε οργανικούς διαλύτες λειτουργεί ως βάση (δέχεται πρωτόνια) και αναγωγικός παράγοντας.

1.13.4 Βιολογικά σημαντικά μη-ρίζες: H_2O_2 , $HOCl$, μονήρες οξυγόνο, $ONOO^-$

Το H_2O_2 είναι τοξικό για τα κύτταρα σε συγκεντρώσεις 10-100μM. Παράγεται από το σύστημα της ξανθίνης, του ουρικού και των οξειδασών των D-αμινοξέων και από τη δισμουτίωση του $O_2^{\cdot-}$. Το H_2O_2 μπορεί άμεσα να οξειδώσει μερικά ένζυμα, όπως η GAPDH, συγκεκριμένα κετοοξέα όπως το πυρουβικό και το 2-οξυγλουταρικό. Επιπλέον σε χαμηλές συγκεντρώσεις φέρει αντηβακτηριδιακές και αντισηπτικές ιδιότητες.

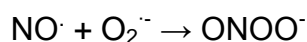
Το $HOCl$ παράγεται από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα σύμφωνα με την αντίδραση



Είναι ένα αρκετά ασθενές οξύ σε pH 7.5, αντιδρά εύκολα και γρήγορα με βιομόρια τα οποία οξειδώνει. Επιπλέον παράγεται και $Cl^{\cdot-}$ που έμμεσα αυξάνει την τοξικότητά του. Παραδείγματα της οξειδωτικής του δράσης είναι η καταστροφή της αναπνευστικής αλυσίδας και της παραγωγής ATP, η οξείδωση των θειολών, του ασκορβικού οξέος, του NADPH και των κυτταρικών μεμβρανών καθώς τις διαπερνά.

Το μονήρες οξυγόνο είναι πιο οξειδωτικό από τη θεμελιώδη μορφή του οξυγόνου και μπορεί να σχηματισθεί σε ορισμένες αντιδράσεις ριζών.

Το περοξεινιτρικό είναι προϊόν οξείδωσης του NO^\cdot από το $\text{O}_2^{\cdot-}$



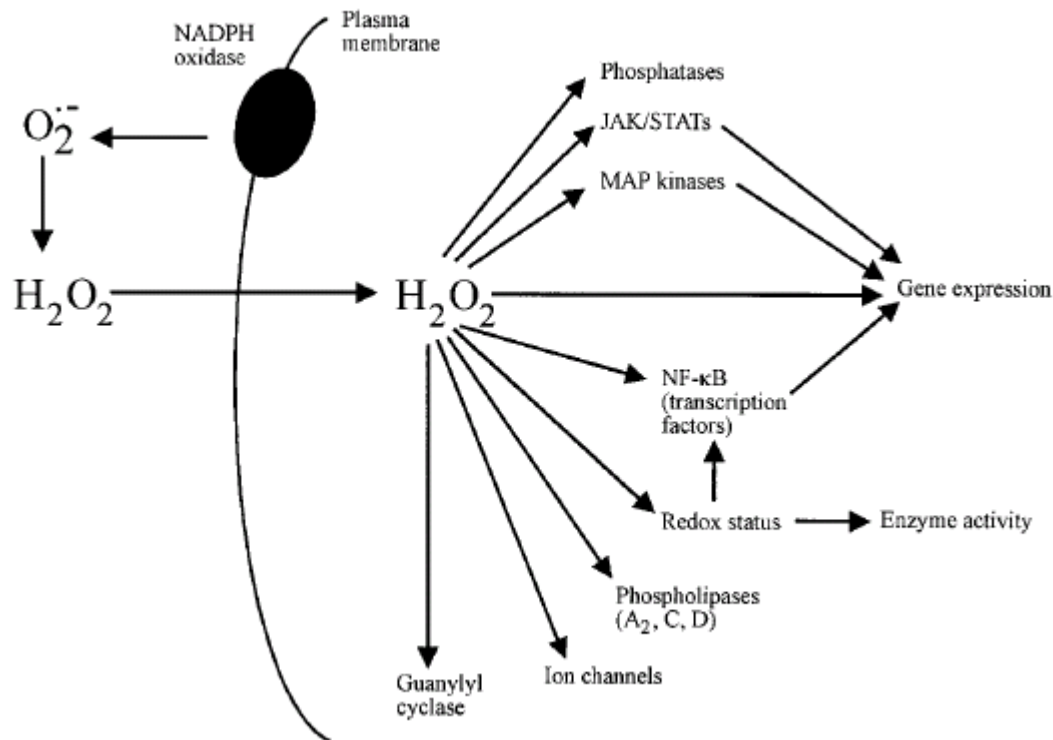
Η κύρια επιβλαβής δράση του είναι η συμμετοχή του στην υπεροξειδωση λιπιδίων, η οποία αποτελείται από αλυσιδωτές αντιδράσεις που έχουν την ικανότητα να μεγεθύνουν το φαινόμενο.

1.13.5 Προοξειδωτικό – Αντιοξειδωτικό προφίλ

Μέσω της μικροκυκλοφορίας το οξυγόνο και τα θρεπτικά στοιχεία της τροφής μεταφέρονται στα κύτταρα των ιστών. Ο τοπικός μεταβολισμός, όπως προαναφέρθηκε, συνοδεύεται από το σχηματισμό ελευθέρων ριζών που αποτελούν το οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου και επηρεάζουν τη λειτουργική του ισορροπία. Κύριος ρυθμιστής της ομοιοστασίας του μικροκυκλοφοριακού συστήματος είναι το ενδοθήλιο, το οποίο συμβάλλει στην τοπική ομοιοστασία [256]. Τα ROS συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεση πολλών διαταραχών, όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η καρδιακή υπερτροφία και ανεπάρκεια.

1.13.5 α) Θετικές επιδράσεις των ROS

Η παρουσία των ελευθέρων ριζών οξυγόνου αντιπροσωπεύει ευνοϊκή ή δυσμενή επίδραση στην κυτταρική λειτουργία που εξαρτάται από την ποσότητά τους. Το επίπεδο των ελευθέρων ριζών ρυθμίζεται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου. Για παράδειγμα, η αντιμετώπιση των παθογόνων επηρεάζεται από τη δράση των ελευθέρων ριζών οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του κυττάρου σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου ρυθμίζει την καταλυτική δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω της αναγωγικής τροποποίησης καταλοίπων (residues) κυστεΐνης και επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων όπως φαίνεται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από το H_2O_2 [317].

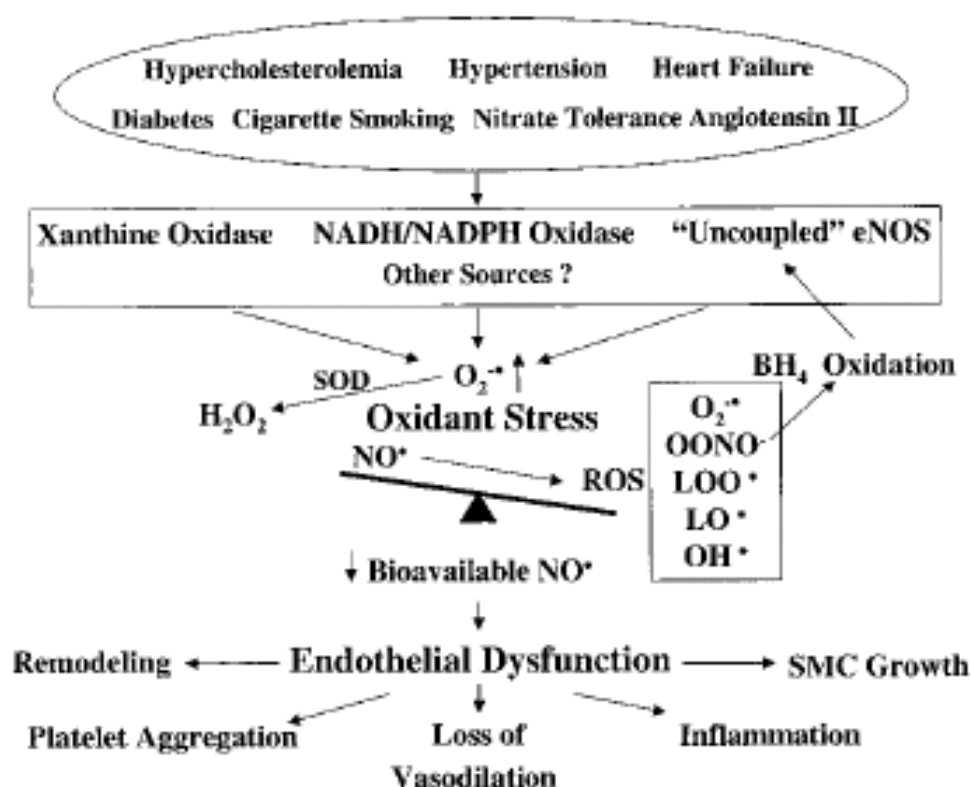
1.13.5 β) Αρνητικές επιδράσεις των ROS

Η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου ασκούν δυσμενή επίδραση στο κύτταρο [257]. Ειδικότερα προκαλούν:

- 1) δομικές αλλαγές στο DNA (μεταλλάξεις, διαγραφές, ενσωματώσεις, αναδιοργανώσεις, επαναλήψεις) που οδηγούν σε αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων οι οποίες πιθανόν εμπλέκονται στην απενεργοποίηση ή απώλεια αλληλόμορφων πρωτοογκογονιδίων ή διαταραχή της έκφρασης διαφόρων γονιδίων.
- 2) διαταραχές στην κυτταροπλασματική και πυρηνική κυτταρική σηματοδότηση. Για παράδειγμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου (που διαχέεται εύκολα στα κυτταρικά διαμερίσματα) ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω μετατόπισης της ανασταλτικής υπομονάδας.
- 3) τροποποίηση γονιδίων που αφορούν στην παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων.

1.13.6 NO και $O_2^{\cdot -}$ ισορροπία

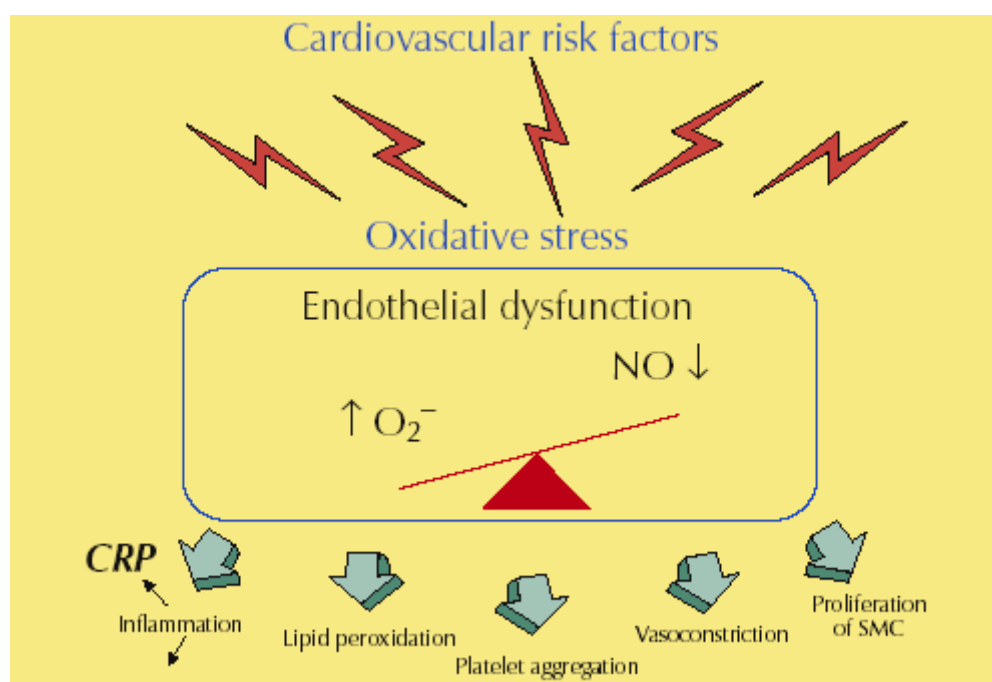
Είναι γενικά παραδεκτό πως η υψηλή τιμή του λόγου $NO^{\cdot} / O_2^{\cdot -}$ αποτελεί ευνοϊκή κατάσταση για το κύτταρο που συνδέεται με μειωμένη υπεροξειδωση των λιπιδίων καθότι το NO δεσμεύει και εξουδετερώνει τις περοξειλικές και αλκοξειλικές ρίζες. Επιπλέον το NO αναστέλλει την προσκόλληση φαγοκυττάρων στο ενδοθήλιο, και μειώνει την έκλυση $O_2^{\cdot -}$, αναστέλλει ορισμένες αντιοξειδωτικές άμυνες (π.χ περοξειδάση της γλουταθειόνης) και ενεργοποιεί άλλες (π.χ αιμοξυγενάσες), αναστέλλει τον NF-kB. Όμως η συγκέντρωση του NO δεν πρέπει να ξεπερνά κάποια όρια, αφού η αυξημένη παρουσία του οδηγεί στη γένεση RNS, προϊόντων ιδιαίτερα βλαπτικών για τις πρωτεΐνες. Η περίσσεια NO είναι επίσης βλαπτική για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στα οποία αναστέλλει την οξειδάση του κυτοχρώματος και ευνοεί τη διαρροή ηλεκτρονίων στη μιτοχονδρική αλυσίδα, τα οποία ασκούν ιδιαίτερα βλαπτική επίδραση (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μηχανισμοί οξειδωτικού στρες που οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [318].

1.13.7 Οξειδωτικό στρες και αγγειακές δυσλειτουργίες

Η διαθεσιμότητα του NO στο αγγειακό ενδοθήλιο αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη φυσιολογική λειτουργία του [256]. Το ενδοθήλιο ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο και αυτορυθμίζει τη λειτουργία του μέσω της έκκρισης αγγειοδραστικών ενώσεων, όπως το NO το οποίο δεν επάγει μόνο την αγγειοδιαστολή, αλλά φέρει και ισχυρές αντιαθηρογόνες ιδιότητες, όπως η αναστολή της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων, η ελάττωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και η αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων (εικόνα 15). Το NO αντιδρά άμεσα με το ανιόν του υπεροξειδίου και σχηματίζει ONOO⁻, οπότε και χάνει τις βιολογικές του δράσεις. Η αναστολή της βιολογικής δράσης του NO από το ανιόν υπεροξειδίου, προάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων και ρυθμίζει την αγγειογένεση.



Εικόνα 15: Ενδοθηλιακές δυσλειτουργίες που επάγονται από την απορρύθμιση της αντιοξειδωτικής και προοξειδωτικής ισορροπίας [258].

A) Αντιοξειδωτική απόκριση του ενδοθηλίου

Σε πειραματικά μοντέλα ζώων, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την αγγειοτασίνη-II, χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυξημένων επιπέδων ROS και την απώλεια της δραστικότητας του NO [258]. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου αντιρροπείται από την SOD η οποία εξουδετερώνει το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο και βελτιώνει την ομοιοστασία του ενδοθηλίου. Η απαλοιφή του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου της GPx συνοδεύεται από αναστολή της αγγειοδιαστολής λόγω μειωμένης εξουδετέρωσης των ROS.

B) Απόπτωση

Η βλάβη του ενδοθηλίου ή η έκθεσή του σε $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 επάγει μηχανισμούς απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που μακροπρόθεσμα προάγουν την αθηρογένεση και τη προθρομβωτική κατάσταση. Είναι γνωστό ότι η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενεργοποιείται από μόρια όπως η oxLDL, η Ang-II, ο TNF-α και η υπεργλυκαιμία, τα οποία προάγουν την αθηρογένεση. Αντιρροπιστικά προς τις ανωτέρω δράσεις λειτουργούν τα αντιοξειδωτικά συστήματα στα οποία περιλαμβάνονται η SOD, η καταλάση, η GPx, η eNOS και οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

Γ) Έκφραση μορίων προσκόλλησης

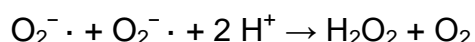
Το ενδοθήλιο υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε κατάσταση λειτουργικής ηρεμίας. Η ενεργοποίησή του από διάφορα προφλεγμονώδη ερεθίσματα συνοδεύεται από την έκφραση στην επιφάνειά του των μορίων προσκόλλησης τα οποία συνδέουν μονοκύτταρα της κυκλοφορίας, βήμα που αποτελεί την αρχή του μηχανισμού της αθηρωμάτωσης.

1.13.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1. Δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου καταστρέφει την πολύ δραστική ελεύθερη ρίζα του υπεροξειδίου, μετατρέποντάς την στο λιγότερο δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια καταστρέφεται από την καταλάση ή το σύστημα της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (εικόνα 16).

Η αντίδραση



πραγματοποιείται με εξαιρετικά υψηλούς ρυθμούς.

Μια άλλη λειτουργία της δισμουτάσης είναι η προστασία των δεϋδρατασών (ακονιτάση, 6-φωσφογλυκονική δεϋδρατάση, φουμαράση A και B, και δεϋδρατάση του δισυδροξεικού) από την απενεργοποίησή τους από το $\text{O}_2^{\cdot -}$.

Έχουν ταυτοποιηθεί 4 κατηγορίες της δισμουτάσης, που περιέχουν χαλκό, ψευδάργυρο ή μονοπύρρηνο σίδηρο, μαγγάνιο ή συμπαράγοντες νικελίου. Οι δισμουτάσες σιδήρου και μαγγανίου εμφανίζουν ομολογία και φέρουν ταυτόσημα κατάλοιπα μετάλλων στο ενεργό κέντρο και έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις μορφές SOD: η κυτταροπλασματική που περιέχει χαλκό ή ψευδάργυρο, η μιτοχονδριακή που περιέχει μαγγάνιο και η εξωκυτταρική.

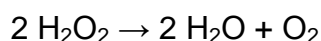
✓ Η κυτταροπλασματική SOD πιστεύεται πως αποτελεί την πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του κυττάρου.

✓ Η μιτοχονδριακή SOD είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου καθώς η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων είναι η βασικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS.

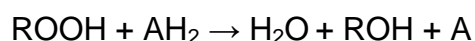
✓ Η εξωκυτταρική SOD είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στους ιστούς και τα εξωκυτταρικά υγρά (π.χ πλάσμα, λέμφος).

2. Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο, που αποτελείται από τέσσερις σιδηροπρωτοπορφυρινικές ομάδες και φέρει τόσο υψηλή δραστικότητα, που δεν κορένεται από το υπόστρωμά της H_2O_2 ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτού. Η αντίδραση που καταλύει είναι:



ή



Αν και η καταλάση σε φυσιολογικές συνθήκες δεν ορίζεται ως ζωτικής σημασίας για κάποιους κυτταρικούς τύπους, κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανεκτικότητα και προσαρμοστικότητα του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες. Σε συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων ROS, είναι πολύ σημαντικό οι ελεύθερες ρίζες να εξουδετερώνονται πριν διαφύγουν από το κύτταρο.

3. Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Οι περοξειδάσες που περιέχουν σελήνιο, είναι τα σημαντικότερα ένζυμα για την αναγωγή ενός μεγάλου αριθμού υδροπεροξειδίων (ROOH , H_2O_2) μέσω της γλουταθειόνης (GSH).

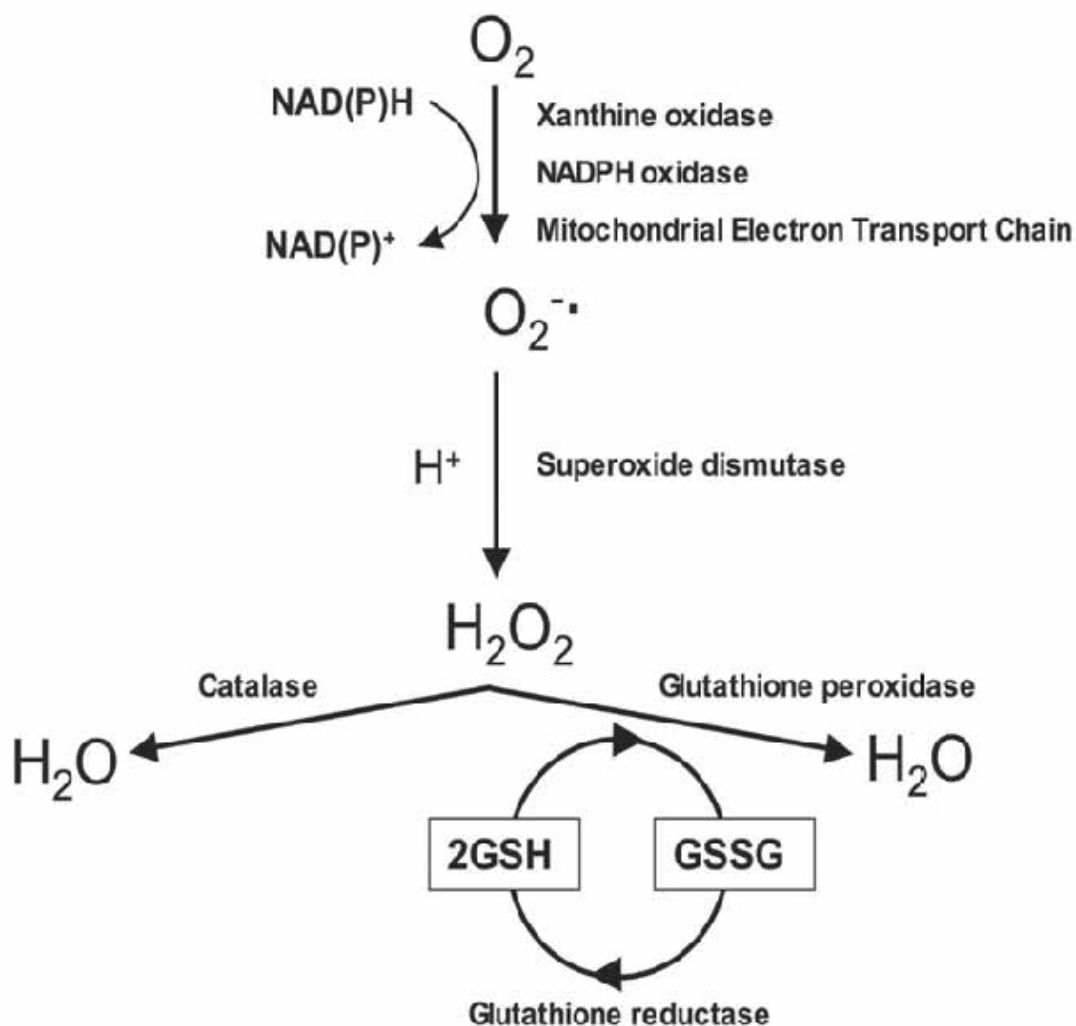


Υπάρχουν 5 τουλάχιστον ισοένζυμα GPx, των οποίων η έκφραση εξαρτάται από τον τύπο του ιστού.

Η κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή GPx ανάγει τα υδροπεροξειδία των λιπαρών οξέων και το H_2O_2 καταναλώνοντας GSH. Ο τύπος GPx 1 και 4 βρίσκονται σε όλους τους ιστούς, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στη μεμβράνη. Ο τύπος 1 εντοπίζεται κυρίως στα ερυθροκύτταρα, στο ήπαρ και στους νεφρούς, ενώ ο τύπος 4 στο νεφρικό επιθήλιο και τους όρχεις. Η κυτταροπλασματική GPx2 και η εξωκυτταρική GPx3 δεν έχουν τόσο ευρεία κατανομή και εντοπίζονται μόνο στο γαστρεντερικό σωλήνα και τα νεφρα αντίστοιχα.

Αν και η GPx μοιράζεται το ίδιο υπόστρωμα με την καταλάση, μπορεί να αντιδρά με λιπίδια και άλλα οργανικά υδροπεροξειδία, το περοξεινιτρικό και άλλες σεληνοπρωτεΐνες.

Ο κύκλος αναγωγής της γλουταθειόνης είναι υψίστης σημασίας για την προστασία κατά το χαμηλής έντασης οξειδωτικό στρες, ενώ η καταλάση είναι σημαντική στην αντιμετώπιση μεγαλύτερης έντασης οξειδωτικού στρες [259].

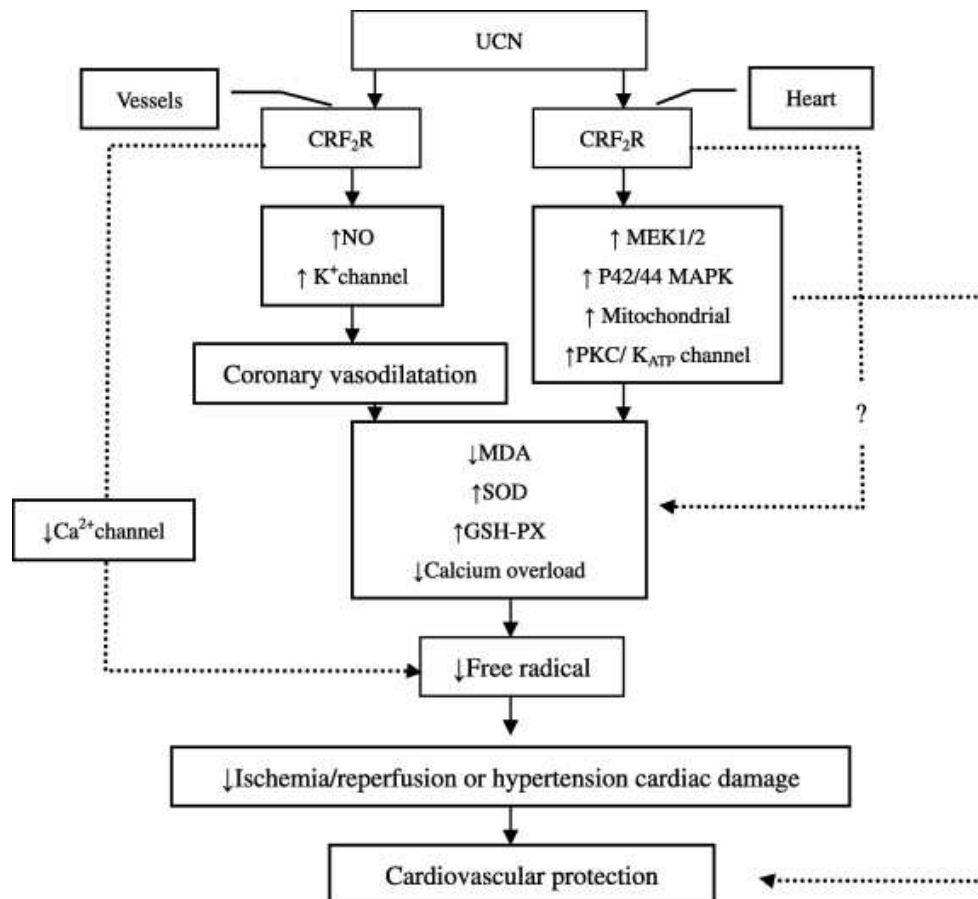


Εικόνα 16: Τα κυριότερα μονοπάτια παραγωγής και μεταβολισμού των ελευθέρων ριζών. Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από την ξανθίνη ή της NADPH οξειδάσες, ή ως παραπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού και ειδικότερα κατά την διαδικασία της αναπνοής στην μιτοχονδριακή αλυσίδα ηλεκτρονίων. Η SOD στη συνέχεια μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 το οποίο απομακρύνεται γρήγορα από την καταλάση ή τις περοξειδάσες, όπως η περοξειδάση της γλουταθειόνης, η οποία καταναλώνει GSH ως δότη ηλεκτρονίων.

1.14 Πεπτίδια του στρες και οξειδωτικό στρες

1.14.1 UCNs και οξειδωτικό στρες

Αυξάνονται οι ενδείξεις για την αντιοξειδωτική δράση των ουροκορτινών στην περιφέρεια [86]. Είναι γνωστό πως οι ουροκορτίνες προστατεύουν την αρτηριακή ενδοθηλιακή λειτουργία κατά την ισχαιμία/επανοξυγόνωση που αποτελεί βασική αιτία τοπικής παραγωγής ROS [260]. Το γεγονός ότι τα μεταγγραφα της ουροκορτίνης 1 βρέθηκαν αυξημένα μετά από ιστική υποξία υποδηλώνει τη συμμετοχή του πεπτιδίου στη διαδικασία της απόκρισης στην υποξία [243, 261, 262]. Οι Yang και συν. [86] διαπίστωσαν πως οι ουροκορτίνες επάγουν την παραγωγή NO κατόπιν ισχαιμίας/επανοξυγόνωσης και μειώνουν την δραστικότητα της SOD στον ορό. Αντίστοιχα, οι [263] Rademaker και συν. βρήκαν πως η ενδογενής και εξωγενής UCN1 μειώνουν στο πλάσμα τα επίπεδα της ANG-II και της ET-1 σε πειραματικό μοντέλο *καρδιακής ανεπάρκειας*, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε με την οξεία χορήγηση ουροκορτινών [264] (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ο πιθανός καρδιοπροστατευτικός μηχανισμός των ουροκορτινών [86].

Σύμφωνα με τους [265] Inada και συν., σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, ο TNF-α μείωσε τα επίπεδα του mRNA της UCN1, αλλά αύξησε τα mRNA της UCN2 και των υποδοχέων CRHR₁ και CRHR₂. Στα ίδια κύτταρα ο CRHR₁ προκάλλεσε μείωση του mRNA των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και E-σελεκτίνης. Επίσης, η ενεργοποίηση του NF-kB δια του υποδοχέα CRHR_{1a}, επάγει την έκφραση των VCAM-1. Κατά συνέπεια, το σηματοδοτικό μονοπάτι του CRHR₁ μπορεί σε αρχικά στάδια να ρυθμίζει την αντιφλεγμονώδη απόκριση του ενδοθηλίου στον TNF-α.

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλει στην έναρξη και εξέλιξη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Οι Izumi και συν. [266] παρατήρησαν ότι οι μηχανισμοί αγγειοδιαστολής μέσω ουροκορτινών, που περιλαμβάνουν την παραγωγή NO στα λεία μυϊκά κύτταρα του ενδοθηλίου, είναι πολύ σημαντικοί στην εξέλιξη της γήρανσης. Επιπλέον η ουροκορτίνη που παράγεται στο ενδοθήλιο αυξάνεται από τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και

καταστέλλει την παραγωγή ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχοντας ρόλο ρυθμιστικό. Στον αντίποδα, έχει βρεθεί πως τα επίπεδα ουροκορτινών είναι αυξημένα σε γαστρικές βιοψίες ασθενών με ενεργό ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού συγκριτικά με άτομα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά συγκλίνουν πως οι ουροκορτίνες κατέχουν πιθανό ρόλο στην παθογένεση των συγκεκριμένων φλεγμονωδών ασθενειών και είναι υπό αμφισβήτηση το κατά πόσο οι ουροκορτίνες έχουν προ- ή αντι- φλεγμονώδη ρόλο [267]. Κατά συνέπεια, δεν πρέπει να παραβλέπονται ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις των UCN στην ενδοθηλιακή λειτουργία.

Η προστατευτική δράση των ουροκορτινών εντοπίζεται κυρίως κατά την έκθεση του κυττάρου σε υποξικό περιβάλλον [261, 262]. Όπως η υποθαλαμική CRH προστατεύει τον οργανισμό από το στρες, έτσι και οι ουροκορτίνες, τοπικά, με αυτοκρινική/παρακρινική δράση, είναι καρδιοπροστατευτικές σε ισχαιμικά επεισόδια.

Η αντιοξειδωτική δράση των ουροκορτινών, σύμφωνα με τον [268] Townsend και συν., κατά την ισχαιμία/επανοξυγόνωση, επικεντρώνεται στη μείωση της διάνοιξης των μιτοχονδριακών πόρων και κατά συνέπεια της ελάττωσης του οξειδωτικού στρες. Είναι γνωστό πως οι μιτοχονδριακοί πόροι ανοίγουν κατόπιν υψηλού οξειδωτικού φορτίου και ελάττωσης του ATP. Ο μηχανισμός αυτός είναι PKC- και ERK-1/2-εξαρτώμενος και μέσω αυτού του μονοπατιού η UCN1 προλαμβάνει την παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS. Επιπλέον, κατόπιν προ-έκθεσης των καρδιομυοκυττάρων σε UCN1, παρατηρήθηκε πως τα μιτοχόνδρια ήταν λιγότερο ευαίσθητα στη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων. Είναι ενδιαφέρον ότι η οξεία χορήγηση UCN1 σε επανοξυγονωμένες καρδιές, δεν οδήγησε σε μετατόπιση της PKC στα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η παρατήρηση αυτή δε συνεπάγεται πως η UCN1 δεν έχει κάποιο ρόλο στο μονοπάτι PKC-MPTP, αλλά ότι η προστατευτική δράση της μεταφράζεται με ένα πιο έμμεσο τρόπο. Η χορήγηση της UCN1 πριν το ισχαιμικό επεισόδιο, δεν συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων ROS ενδομιτοχονδριακά και κατά συνέπεια δεν πυροδοτείται ο μηχανισμός διάνοιξης των πόρων. Συμπερασματικά, η UCN1 συμβάλει στη διαμόρφωση μιας κατάστασης όπου το κύτταρο αντέχει χωρίς συνέπειες υψηλότερα φορτία ROS.

Σύμφωνα με την μελέτη των Davidson και συν. [80], διαφαίνεται ότι οι ουροκορτίνες έχουν προστατευτικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σε db/db ποντίκια ότι η UCN1 μειώνει τη γλυκοζυλίωση και τα επίπεδα MDA (μαλονδεαλδεΰδη) [269]. Επίσης οι οξειδωτικές βλάβες κατά την ισχαιμία/επανοξυγόνωση ελαττώνονται δραματικά με τη UCN1, ενώ παράλληλα ελαττώνονται τα επίπεδα ROS του συστήματος της αγγειοτασίνης-II. Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν το μυοκάρδιο, ενώ υπάρχει απουσία στοιχείων για την αντιοξειδωτική δράση τους στο ενδοθήλιο και κατ'επέκταση στην περιφέρεια [268].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ερευνητικό ερώτημα

Τα πεπτιδία του στρες εκκρινόμενα κύτταρα του νευρικού ιστού και του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική και ιστική ομοιόσταση δρώντας μέσω ειδικών υποδοχέων, των CRH υποδοχέων. Η CRH του ΚΝΣ μέσω του συστήματος του στρες και των γλυκοκορτικοειδών ασκεί έμμεσο αντιφλεγμονώδη ρόλο. Πρόσφατες όμως παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η CRH και τα συγγενή του νευροπεπτιδία UCN1, 2 και 3 επηρεάζουν τη φλεγμονώδη απόκριση τοπικά.

Εφόσον η φλεγμονώδης διαδικασία γίνεται δεκτή ως παθοφυσιολογική βάση έναρξης και εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης, είναι λογικό να υποθέσει κάποιος τη συμμετοχή των νευροπεπτιδίων του στρες στην αγγειακή χρόνια φλεγμονή. Χαρακτηριστικό της φλεγμονώδους διαδικασίας αποτελεί η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου το οποίο ενέχεται ως ευοδωτικός αλλά και βλαπτικός συντελεστής. Από την αναζήτηση στην προσιτή σε εμάς βιβλιογραφία, διαπιστώσαμε ότι η μόνη παρατήρηση αφορά στις ουροκορτίνες οι οποίες στο μυοκάρδιο ενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα της SOD, GSH και NOS, δείχνοντας έμμεσα την κινητοποίηση των μηχανισμών εξουδετέρωσης του οξειδωτικού φορτίου [80, 86, 243, 260-269] ενώ για τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν υπάρχει κάποια αναφορά. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να διερευνηθεί *in vitro* η επίδραση των νευροπεπτιδίων του στρες, που προαναφέρθηκαν, σε μακροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα σε βασικές συνθήκες, μετά προεπαγωγή με TNF-α και σε συγκαλλιέργεια με μη και διεγερθέντα μακροφάγα.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι εξής:

- ✓ Ανίχνευση των υποδοχέων CRH στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926.
- ✓ Προσδιορισμός της βραχυπρόθεσμης επίδρασης των πεπτιδίων του στρες στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα της eNOS, της καταλάσης και της γλουταθειόνης του ενδοθελίου.
- ✓ Προσδιορισμός της βραχυπρόθεσμης επίδρασης των πεπτιδίων του στρες σε συνθήκες προϋπάρχουσας ή ταυτόχρονης προ-οξειδωτικής

ενεργοποίησης του ενδοθηλίου στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα της eNOS, της καταλάσης και της γλουταθειόνης του ενδοθηλίου.

Η διαλεύκανση του ρόλου των νευροπεπτιδίων του στρες στην ομοιοστασία του ενδοθηλίου των αγγείων εκτιμάται ότι θα συμβάλει στην πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών της αθηροσκλήρωσης, προϋπόθεση ουσιώδη για τη μελλοντική προληπτική ή και θεραπευτική παρέμβαση στο συστηματικό αυτό νόσημα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η προμήθεια των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε από τις εταιρείες όπως αντίστοιχα αναγράφεται.

Πεπτίδια – διαλυτά μόρια

CRH (Sigma-Aldrich)

UCN1 (Sigma-Aldrich)

UCN2 (Sigma-Aldrich)

UCN3 (Sigma-Aldrich)

Antalarmin (Sigma-Aldrich)

Astressin-2B (Sigma-Aldrich)

LPS (Sigma-Aldrich)

PMA (Sigma-Aldrich)

TNF-α ((Sigma-Aldrich)

Υλικά και συσκευές καλλιέργειών

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO)

RPMI 1640 (GIBCO)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (Foetal Bovine Serum) (GIBCO)

Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη: Penicillin/Streptomycin (GIBCO)

Αλβουμίνη ορού βοός, Bovine Serum Albumin (BSA), (Sigma-Aldrich)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Zeiss, Axiovert 40C)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)

Επωαστικός κλίβανος (Bioair, Safeflow 1.2)

Cell Freezing medium - DMSO (Sigma)

Χρωστική Trypan Blue (Sigma-Aldrich)

2.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν η κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EAhy926 και η κυτταρική σειρά Τ-λευχαιμικών κυττάρων THP-1, η οποία διαφοροποιήθηκε σε μακροφαγικό κυτταρικό πληθυσμό κατόπιν επίδρασης με PMA.

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, EAhy926, προέκυψε από τη σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου

λώρου και ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα της σειράς A549. Είναι μια από τις περισσότερο μελετηθείσες σειρές μακροενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη μελέτη της αγγειογένεσης στον καρκίνο, τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την απόκριση του ενδοθηλίου σε αθηρωματικό περιβάλλον [309-310].

Η κυτταρική σειρά THP-1 χρησιμοποιείται ευρέως καθώς έχει παρόμοιες ιδιότητες με τα ανθρώπινα μακροφάγα που έχουν προέλθει από διαφοροποίηση μακροφάγων ανθρώπου [311]. Διαφοροποιείται εύκολα σε μακροφαγικό πληθυσμό, κατόπιν ενεργοποίησης με το φορβολεστέρα PMA ή την βιταμίνη D₃, ο οποίος προσκολλάται στην επιφάνεια των φλασκών ή άλλων καλλιεργητικών επιφανειών. Κατά συνέπεια, αυτή η κυτταρική σειρά είναι αρκετά χρήσιμη στη μελέτη της αθηρωματικής διαδικασίας.

2.1.1 Καλλιέργεια Κυτταρικής σειράς EAhy926

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS και 1% Penicillin/Streptomycin σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%. Τα πειράματα έγιναν κατά προτίμηση σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Τα θρεπτικά υλικά των καλλιιεργειών ανανεώνονταν ανά 48 ώρες και τα κύτταρα χρησιμοποιούνταν για πείραμα όταν έφταναν σε πυκνότητα 100%. Η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας γίνονταν με τρυψίνη. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση σε κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο αιμοτοκυτταρομετρίας με Trypan Blue. Όλα ή μέρος των κυττάρων στην κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετούνταν σε νέες φλάσκες για ανακαλλιέργεια ή στα κατάλληλα υποστρώματα για την εκτέλεση συγκεκριμένων πειραμάτων.

Τα κύτταρα καταψύχονταν, σε τακτά χρονικά διαστήματα, στους -80°C έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα να πραγματοποιούνται στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5x10⁶ κυττάρων τοποθετούνταν σε σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης, και προστίθονταν στάγδην υπό συνεχή ανάδευση σε αναλογία 1:1 το

κατάλληλο για κατάψυξη υλικό (Cell Freezing Medium, Sigma). Ενώ η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιούνταν σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους, η απόψυξη τους ήταν γρήγορη κι άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάρια με τα κύτταρα, θερμαίνονταν στους 37°C και άμεσα διαλύονταν σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ίδιας θερμοκρασίας. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 1900 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά και επανακαλλιέργεια όπως παραπάνω.

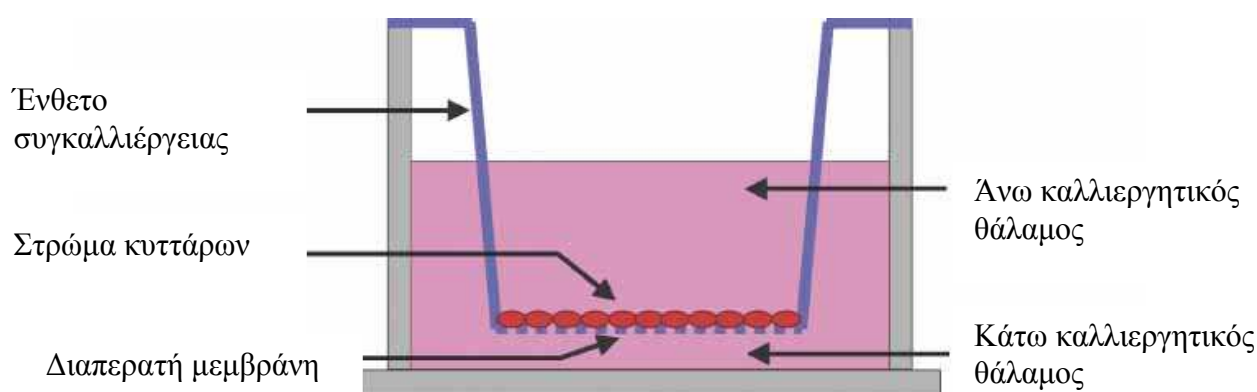
2.1.2 Κυτταρική σειρά THP-1

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Gibco) εμπλουτισμένο με 10% FCS και 1% Penicillin/Streptomycin. Το πρωτόκολλο ανάπτυξης και συντήρησης τους, είναι όμοιο με αυτό της ενδοθηλιακής σειράς EAhy926.

Τα THP-1 διαφοροποιούνταν σε μακροφάγα κατόπιν έκθεσής στους σε 10^{-9} M PMA, 24 ώρες πριν την εκτέλεση του πειράματος. Το μοντέλο συγκαλλιέργειας διαφοροποιημένων THP-1 και EAhy926 κυττάρων, πραγματοποιήθηκε σε ειδικά 6-well πιάτα πολυεστέρα (Transwell™, Permeable Supports, Corning), όπου στο άνω διαμέρισμα βρίσκονταν τα διαφοροποιημένα THP-1 και στο κάτω διαμέρισμα τα EAhy926 κύτταρα. Τα δύο διαμερίσματα επικοινωνούν μεταξύ τους, καθώς η άνω επιφάνεια φέρει πόρους 0,4μm που επιτρέπει τη διέλευση διαλυτών μορίων αλλά όχι κυτταρικών πληθυσμών (εικόνα 18α και 18β).



Εικόνα 18α: 6-well πιάτα πολυεστέρα (Transwell™, Permeable Supports, Corning) με υποδοχές συγκαλλιέργειας.



Εικόνα 18β: Σχηματική περιγραφή συσκευής συγκαλλιέργειας κυττάρων.

2.2 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Bradford)

Υλικά- Συσκευές

Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma USA)

Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 : Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies)

Κυψελίδες 1,5ml (Brand)

Φωτόμετρο ορατού -UV (Perkin-Elmer, UV-VIS Lambda 20 Spectrometer)

Μέθοδος

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των πρωτεϊνών. Η ελεύθερη μορφή της χρωστικής έχει κόκκινο χρώμα ενώ μετά τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη, το χρώμα μετατρέπεται σε κυανό. Η ένταση του χρώματος μετρείται φωτομετρικά στα 595 nm. Το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, παρέχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο μεγάλη ευαισθησία στη μέθοδο. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη γίνεται γρήγορα (2 λεπτά) και μπορεί να μετρηθεί σε χρονικό διάστημα 1 ώρας. Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται από την ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των

διαλυμάτων BSA είναι το ίδιο με το διάλυμα, στο οποίο βρίσκονται διαλυμένα τα υπό εξέταση δείγματα. Σε πλαστική κυψελίδα 1ml μεταφέρονται 10μl άγνωστο δείγμα και προστίθενται 990μl του διαλύματος χρωστικής. Ακολουθεί ανάδευση του μείγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) σε μήκος κύματος 595nm σε φωτόμετρο. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων υπολογίζεται βάσει της πρότυπης καμπύλης και εκφράζονται σε μονάδες μg/ml. Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν με υποτονικό διάλυμα Tris-HCl pH 7,5, παρουσία του αναστολέα πρωτεασών PMSF.

2.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης ορού

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μετρήθηκε η δραστηριότητα της καταλάσης στον ορό και είναι βασισμένη στη μέθοδο των Aebi και συν. (1984) [322].

Η καταλάση ως γνωστό καταλύει την αντίδραση: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Σε 20 μL κυτταρικού λύματος προστέθηκαν 2,975 ml 67mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου, pH 7,4 και το διάλυμα επωάσθηκε για 10 min στους 37°C έτσι ώστε το ένζυμο να αποκτήσει τη μέγιστη δραστηριότητα. Έπειτα προστέθηκαν 5μL 30% H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 15mM) και κατόπιν γρήγορης ανάδευσης έγινε φωτομέτρηση για 3sec στα 240nm σε κυψελίδα χαλαζία οπότε υπολογίστηκε ο ρυθμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό ο ορός αντικαταστάθηκε από ρυθμιστικό διάλυμα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

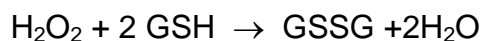
Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\text{Δραστηριότητα} = \frac{\Delta O.D \times 3 \times 10^6}{62,4 \times 20} \text{ μmoles/min/ml}$$

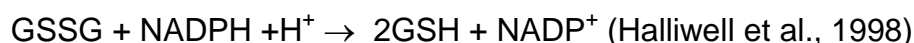
2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSH

Στο συγκεκριμένο προσδιορισμό εφαρμόστηκε η μέθοδος των Reddy Y.N. και συν. (2004) [323].

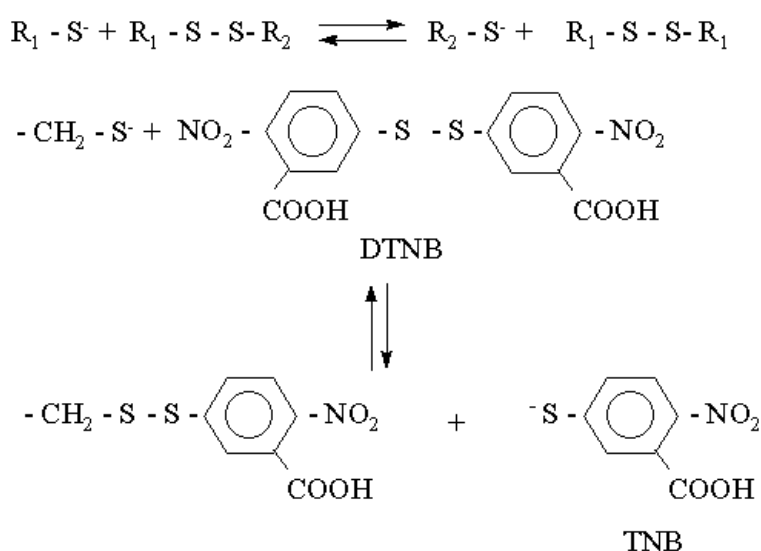
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης απομακρύνει το H_2O_2 προς σχηματισμό H_2O με την οξειδωση της ανηγμένης GSH σύμφωνα με την αντίδραση:



Στη συνέχεια, η οξειδωμένη GSSG επανέρχεται στην ανηγμένη μορφή της χρησιμοποιώντας την αναγωγική ισχύ του NADPH και το ένζυμο ρεδουκτάση της γλουταθειόνης:



Η ελεύθερη ομάδα $-SH$ μπορεί να αντιδράσει με το DTNB όπως φαίνεται στην εικόνα 19.



Εικόνα 19 : Αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.

Σε 10 μL κυτταρικού λύματος προστέθηκαν 660 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου και καλίου, pH 7,95 και 330 μL διαλύματος DTNB (39,6 mg DTNB σε 100ml 1% κιτρικού νατρίου). Κατόπιν ανάδευσης τα διαλύματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 30 min. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 412 nm. Στο τυφλό προστέθηκαν 10 μL dH_2O αντί για κυτταρικό λύμα. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

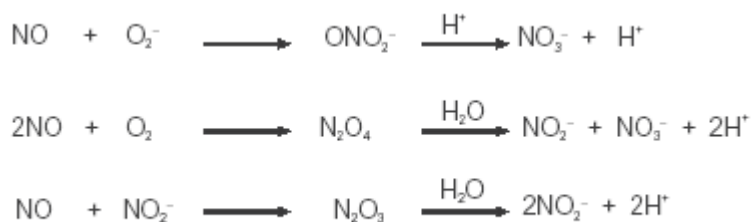
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίζεται στο άρθρο των Khyrian και συν. (2003) [324] σύμφωνα με το οποίο η σύνδεση GSH – DTNB δίνει έγχρωμο προϊόν με συντελεστή απορρόφησης $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (στοιχειομετρική αντίδραση).

2.5 Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης GSSG και GSH.

Σύμφωνα με τους Shaik και συν. (2006) [325], η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης GSSG, μετατρέπεται στην ανηγμένη μορφή GSH κατόπιν επώασης των κυτταρικών λυμάτων με 1 mM NADH and 1Unit ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (Sigma Aldrich) στους 37°C σε 67 mM ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,95. Η μέθοδος συνεχίστηκε όπως με τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH.

2.6 Προσδιορισμός των επιπέδων του NO

Η παραγωγή NO στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά, μετράται έμμεσα μέσω της μέτρησης των νιτρικών (NO_3^-) και νιτρωδών (NO_2^-) ανιόντων στα οποία πολύ εύκολα μετατρέπεται η ρίζα του NO. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ενζυμική μετατροπή του NO_3^- σε NO_2^- από το ένζυμο νιτρική ρεδοκτάση (Sigma-Aldrich). Στη συνέχεια οι ρίζες NO_2^- που έχουν σχηματιστεί μετατρέπονται σε ένα αζίδιο, προϊόν της αντίδρασης Griess, το οποίο απορροφά στα 540 nm .



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ELISA plates πολυστυρενίου των 96-οπών. Προστίθενται $80 \mu\text{l}$ υπερκείμενου καλλιεργητικού υλικού, $0,1 \text{ U/ml}$ νιτρικής ρεδοκτάσης και $0,1 \text{ mM}$ β -NADH. Παρουσία του ενζύμου νιτρική ρεδοκτάση και του β -NADH, ανάγονται οι NO_3^- σε NO_2^- . Έπειτα προστίθενται $100 \mu\text{l/well}$

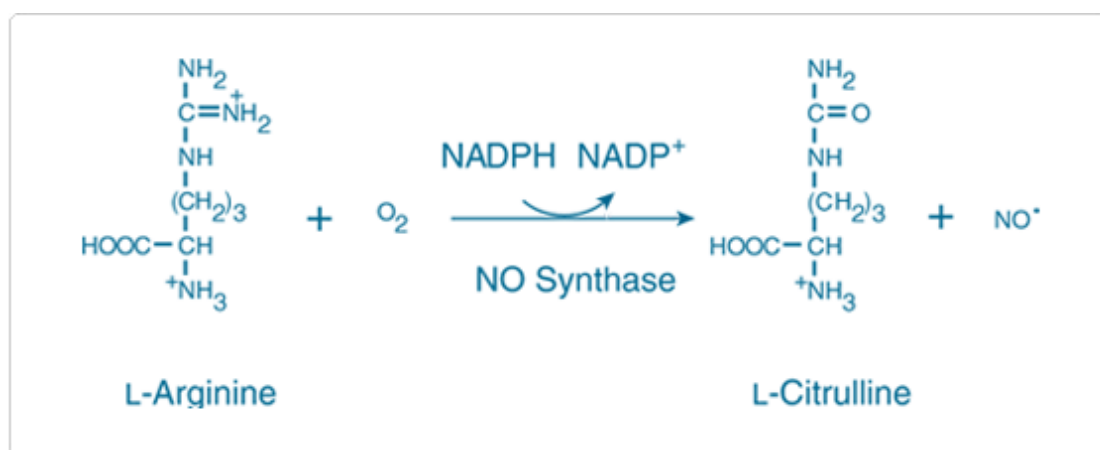
αντιδραστηρίου Griess (Sigma-Aldrich) και πραγματοποιείται η τελευταία αντίδραση που προσδίδει το χρώμα. Μετράται σε φωτόμετρο τύπου ELISA στα 540nm. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 0,2 μ M.

Τα επίπεδα NO προσδιορίζονται σύμφωνα με την εξίσωση που εξάγεται από την πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις NaNO_3 200 μ M - 0,2 μ M. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

2.7 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS)

Το πρωτόκολλο της μεθόδου βασίζεται στη μεθοδολογία των Knowles RG και συν., Stuehr DJ και συν. και Pollock JS και συν. [326-328].

Η κατάλυτική δραστηριότητα της eNOS προσδιορίστηκε μέσω της μετατροπής της L-[^3H]arginine σε L-[^3H] citrulline σύμφωνα με την αντίδραση:



Η συγκεκριμένη αντίδραση περιλαμβάνει μια οξείδωση 5 ηλεκτρονίων της γουανιδινο-νιτρικής ομάδας της L-arginine σε NO, ταυτόχρονα με τη στοιχειομετρική παραγωγή L-citrulline. Η αντίδραση καταναλώνει 1,5 ισοδύναμα ανηγμένου NADPH και επίσης χρειάζεται μοριακό οξυγόνο, ασβέστιο, καλμοδουλίνη και τετραυδροβιοπτερίνη (BH₄).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH 7,4, 6 μ M BH₄, 2 μ M FAD, 2 μ M FAM όπου προστίθενται 25 μ g κυτταρικού

λύματος και 1mM NADH, 0,6 mM CaCl_2 , 1μCi/ml L-[^3H]arginine και 0,1μM καλμοδουλίνη, σε τελική συγκέντρωση.

Ακολουθεί επώαση στους 37°C και απουσία φωτός για μία ώρα.

Αφού ολοκληρωθεί η μετατροπή της L-[^3H]arginine σε L-[^3H] citrulline, η αντίδραση σταματά με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES-EDTA pH 5,5.

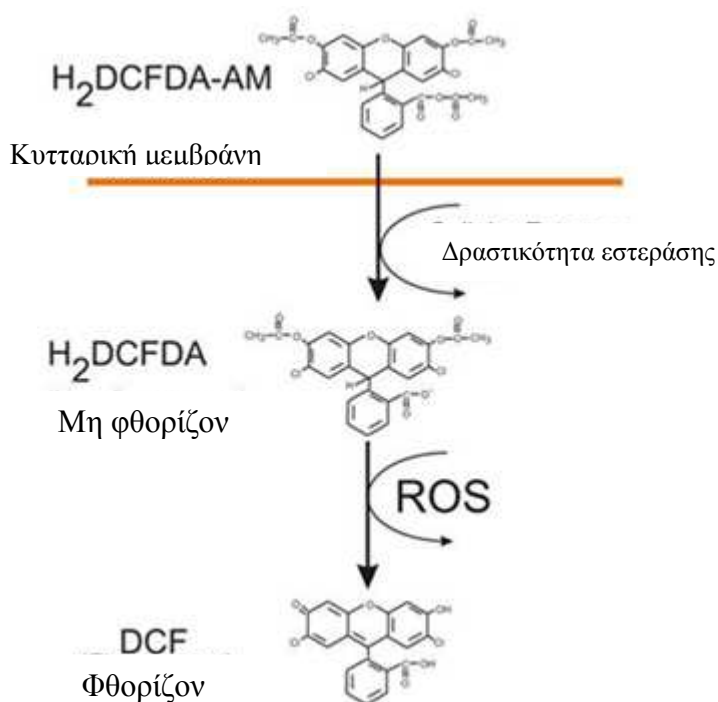
Τα δείγματα μεταφέρονται σε ειδικά φιαλίδια πολυστυρενίου. Ακολουθεί προσθήκη ειδικού υγρού σπινθηρισμού και πραγματοποιείται μέτρηση της κατανάλωσης του υποστρώματος της eNOS L-[^3H]arginine σε μετρητή σπινθηρισμού β-ακτινοβολίας (Wallac 1409).

Ως δείγματα ελέγχουν χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χωρίς NADPH και Ca^{2+} .

Η ευαισθησία και εγκυρότητα της μεθόδου ελέγχθηκε μέσω πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων eNOS 2-20 μM.

2.8 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS στα κύτταρα

Για την παρατήρηση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου στο κύτταρο χρησιμοποιήθηκε ένας φθορίζον ανιχνευτής, η ακετυλιωμένη μορφή του εστέρα του 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$). Η συγκεκριμένη μορφή είναι ένα μεμβρανοσύνδετο μόριο που έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Μόλις μετατοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, οι κυτταρικές εστεράσες μετατρέπουν την ένωση σε ένα μη φθορίζον μόριο, το H_2DCFDA , το οποίο είναι ιονικής φύσης και κατά συνέπεια εγκλωβίζεται στο κύτταρο. Η οξείδωση του H_2DCFDA από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου το μετατρέπει σε 2',7' dichlorodihydrofluorescein (DCF), το οποίο είναι ισχυρά φθορίζον (εικόνα 20). Κατά συνέπεια η ενδοκυττάρια αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, εκφράζεται από ανάλογη αύξηση του σήματος φθορισμού.



Εικόνα 20: Αρχή της μεθόδου μέτρησης των ενδοκυττάρων ROS.

Ειδικότερα, τα EAhy926 κύτταρα επωάσθηκαν με 10 μ M H_2DCF -DA για 30 λεπτά στους 37 $^{\circ}$ C. Στη συνέχεια τα κύτταρα απομακρύνθηκαν με τρυψίνη και επαναιωρήθηκαν σε PBS (10 6 cells/ml). Ο φθορισμός μετρήθηκε στα 520nm με μήκος κύματος εκπομπής στα 488nm, σε φθορισμόμετρο VersaFluorTM Fluorometer (Biorad), σε κυψελίδα χαλαζία.

2.9 Στατιστική ανάλυση

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το Graph Pad Instat Statistical package για Windows. Τα αποτελέσματα είναι προϊόν πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε παράμετρο που μελετήθηκε και εκφράζονται ως μέσος όρος (mean) \pm τυπική απόκλιση (standard deviation). Σε κάθε πείραμα, η παρατήρηση έγινε εις τριπλούν. Για την στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εφαρμόσθηκε η δοκιμασία ANOVA και η διόρθωση έγινε με Bonferroni post-test. Η στατιστική σημαντικότητα επιλέχθηκε για τιμές του $p < 0.05$.

2.10 Απομόνωση RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα

Υλικά και συσκευές

Trizol (Tri reagentTM, Sigma)

Χλωροφόρμιο (Sigma)

Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη (Merck)

Μέθοδος

Στο τέλος των πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν σε 1.500 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά. Ξεπλύθηκαν με PBS και κατόπιν διαλύθηκαν σε 1 ml Trizol (ανά 5-10 εκατομμύρια κύτταρα) που περιείχε μίγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκαν 200 µl χλωροφόρμιο. Μετά από ισχυρή ανάδευση (15sec), το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 15 λεπτά. Ο διαχωρισμός των φάσεων ολοκληρώθηκε με φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά. Η φυγοκέντρωση διαχωρίζει το μίγμα σε 3 φάσεις: Στην οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιέχει τις πρωτεΐνες, στην μεσόφαση που περιέχει το DNA και στην υδατική φάση (άχρωμη) που περιέχει το RNA. Για την κατακρήμνιση του RNA, η υδατική φάση, η οποία μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο, επωάστηκε με 500µl ισοπροπανόλης για 5- 10 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το RNA εκπλύθηκε κατόπιν με 1ml αιθανόλης 75%, αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλύθηκε σε 50µl H₂O. Για καλύτερη διάλυση θερμανθηκε για 5 λεπτά στους 65°C. Για την εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 260 nm και στα 280 nm, όπου απορροφούν αντίστοιχα το RNA και το DNA. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων δίνει την καθαρότητα του RNA, ενώ η ποσότητα υπολογίζεται βάση της απορρόφησης στα 260nm (τιμή απορρόφησης 1nm αντιστοιχεί σε 40µgr/ml RNA). Τα δείγματα του RNA φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

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

Υλικά και συσκευές

Thermoscript RT kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:

Τυχαία εξαμερή: random hexamers

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H₂O)

Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer

Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM

Διθειοθρεϊτόλη: DTT, 0.1 M

Διάλυμα αναστολέων RNασών: RNaseOUT, 40 U/μL

Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT

Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:

Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA: 10X PCR buffer 25mM MgCl₂

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα

Ένζυμο πολυμεράσης: Platinum Taq DNA polymerase, 5 u/μl

Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (Invitrogen)

Συσκευή PCR: θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler): DNA engine (Biorad)

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Αγαρόζη (Sigma)

Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)

TAE διάλυμα: Tris 10 mM, EDTA 10 mM, οξικό Ca 5 mM, NaCl 10 mM

Loading Dye (Invitrogen)

Εκκινητές (primers):

CRHR₁ (313bp)

Sense: 5'-GCCCTGCCCTGCCTTTTTCTA-3'

Antisense :5'- GCTCATTGTTAGCTGGACCA – 3'

CRHR₂ (191bp)

Sense: 5'- TGCTCAAACCTACCTGGGCCAC-3'

Antisense: 5'- GTCATTAGGATCCTGACGATG-3'

Οι εκκινητές ελέγχθηκαν για πιθανές ομολογίες με άλλες θέσεις στο γονιδίωμα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST του NCBI. Βρέθηκε ότι σε καμία περίπτωση δεν υπήρχε ομολογία με άλλες αλληλουχίες και ότι ανάμεσα σε κάθε ζεύγος εκκινητών βρίσκεται εξόνιο και επομένως ενισχύεται επιλεκτικά το cDNA και όχι το γενομικό DNA.

Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (RT-PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος για τον προσδιορισμό του mRNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος χωρίζεται σε δύο μέρη: Στην μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) (**αντίδραση RT**) και στην ενίσχυση-σύνθεση μεγάλης ποσότητας του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το cDNA (**αντίδραση PCR**).

Αντίδραση RT

Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μείγμα αντίδρασης που περιλάμβανε: 1 μg ολικού RNA, 1 μl εκκινητή (τα τυχαία εξαμερή στην συγκεκριμένη περίπτωση) και DEPC-H₂O σε ποσότητα τέτοια ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 10 μl. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή με την επώαση του μείγματος για 5 λεπτά στους 65°C και ψύξη στη συνέχεια με ψύξη στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Κατόπιν προετοιμάστηκε το κύριο μείγμα της αντίδρασης. Για κάθε δείγμα χρειάστηκαν 4 μl cDNA buffer (5x), 1 μl DTT, 1 μl RNase OUT, 1 μl DEPC-H₂O, 2 μl dNTPs και 1 μl ενζύμου Thermoscript. Το παραπάνω μείγμα προστέθηκε στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση του δείγματος για 60 min στους 50°C, οπότε υβριδοποιήθηκε ο εκκινητής και έδρασε η αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση τερματίστηκε με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C οπότε και αποδιατάχθηκαν τα υβρίδια και απενεργοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA είτε χρησιμοποιήθηκε αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάχθηκε στους -20°C.

2.12 Αντίδραση PCR

Ο πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου τμήματος του τμήματος του cDNA πραγματοποιείται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση της επιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA-πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν από δίκλωνα μόρια DNA όταν αυτά θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε και αποχωρίζονται. Η DNA-πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Έτσι το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού μορίου, του εκκινητή, που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για τη σύνθεση DNA. Για κάθε αντίδραση PCR επιλέγονται εκκινητές παρακείμενοι της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί. Κάθε επανάληψη της σύνθεσης νέου κλώνου αποτελεί έναν κύκλο ενίσχυσης, ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να αποχωριστούν παλιοί και νέοι κλώνοι του DNA και επαναλαμβάνεται ο κύκλος υβριδοποίησης των εκκινητών, σύνθεσης DNA και αποχωρισμού των κλώνων. Το cDNA που προέκυψε από την αντίδραση RT, επωάστηκε παρουσία των εκκινητών για το γονίδιο προς ενίσχυση, μίγματος dNTPs, διαλύματος $MgCl_2$, διαλύματος PCR και πολυμεράσης σε αναλογία για κάθε δείγμα:

2 μ l 10X PCR BUFFER
0,6 μ l $MgCl_2$
0,4 μ l dNTP mix
0,4 μ l sense primer
0,4 μ l antisense primer
0,12 μ l Platinum Taq Polymerase
15,08 μ l DEPC-treated water
1 μ l cDNA (από την RT-αντίδραση)

Η επώαση έγινε σε συσκευή PCR και η αντίδραση PCR περιλάμβανε διαδοχικά: α) αποδιάταξη του cDNA στους 96°C για 5min β) πολυμερισμός και σύνθεση της αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από τα primers παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs) και της πολυμεράσης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 35 φορές, ούτως ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του γονιδίου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (real- time ή απλό PCR) για κάθε γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι:

CRHR₁ : 30s 94 °C, 30s 62 °C, 1min 72 °C (35 κύκλοι)

CRHR₂ : 40s 94 °C, 50s 55 °C, 1min 72 °C (35 κύκλοι)

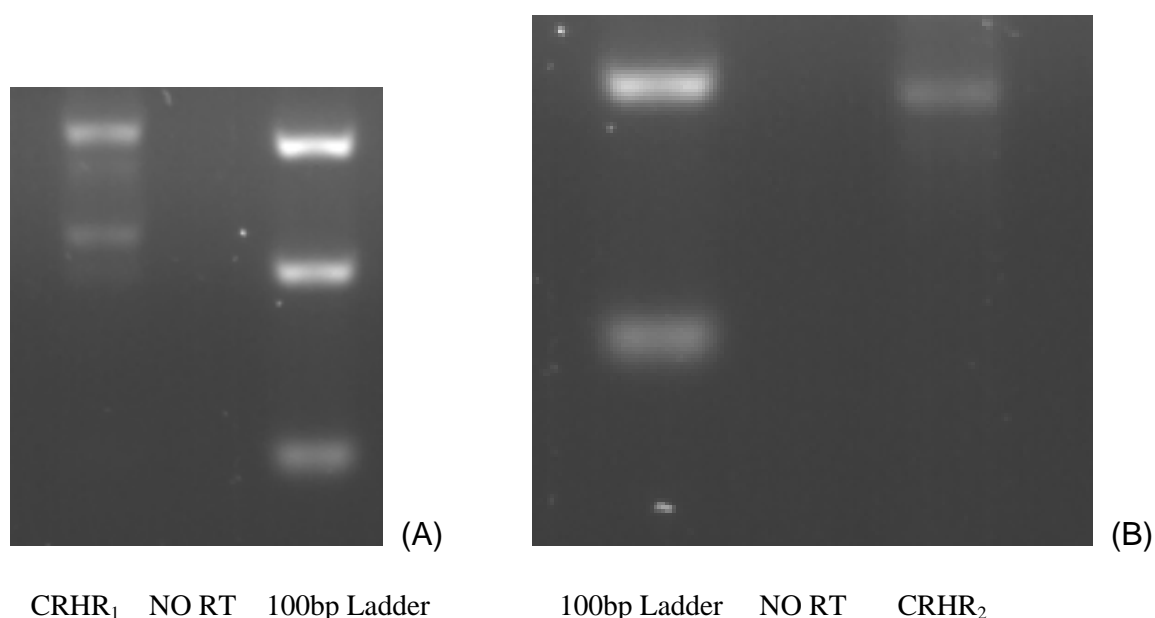
γ) τελική αντίδραση πολυμερισμού, 10min 72°C.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR διαχωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. 12μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης αναμίχθηκε με το διάλυμα φόρτωσης (Loading Dye) και φορτώθηκε σε 2.5% πηκτή αγαρόζης στην οποία είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται και χρωματίζει το DNA, το οποίο ανιχνεύεται με συσκευή υπεριώδους φωτός. Η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση και αφήνεται να διαχωριστεί το DNA. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA έγινε με τη χρήση δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που έτρεξαν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Έλεγχος έκφρασης των CRH υποδοχέων στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926.

Αρχικά αναζητήθηκε η παρουσία των CRH υποδοχέων (CRHR₁ και CRHR₂) στα κύτταρα της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EAhy926. Όπως φαίνεται στην κάτωθι φωτογραφία 1, τα κύτταρα της εν λόγω σειράς εκφράζουν τους υποδοχείς CRHR₁ και CRHR₂,



Φωτογραφία 1: Έκφραση των CRH υποδοχέων στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά.

Με τη μέθοδο της RT-PCR βρέθηκε ότι τα κύτταρα της σειράς EAhy926, εκφράζουν τους υποδοχείς CRHR₁ και CRHR₂. Η ενισχυμένη γονιδιακή περιοχή του CRHR₁ παρατηρείται στις 313 bp (A) και του CRHR₂ στις 191 bp (B). Η ένδειξη NO RT, αναφέρεται στο δείγμα ελέγχου όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή και χρησιμοποιείται για να αποκλειστεί η περίπτωση επιμόλυνσης των αρχικών δειγμάτων RNA με DNA.

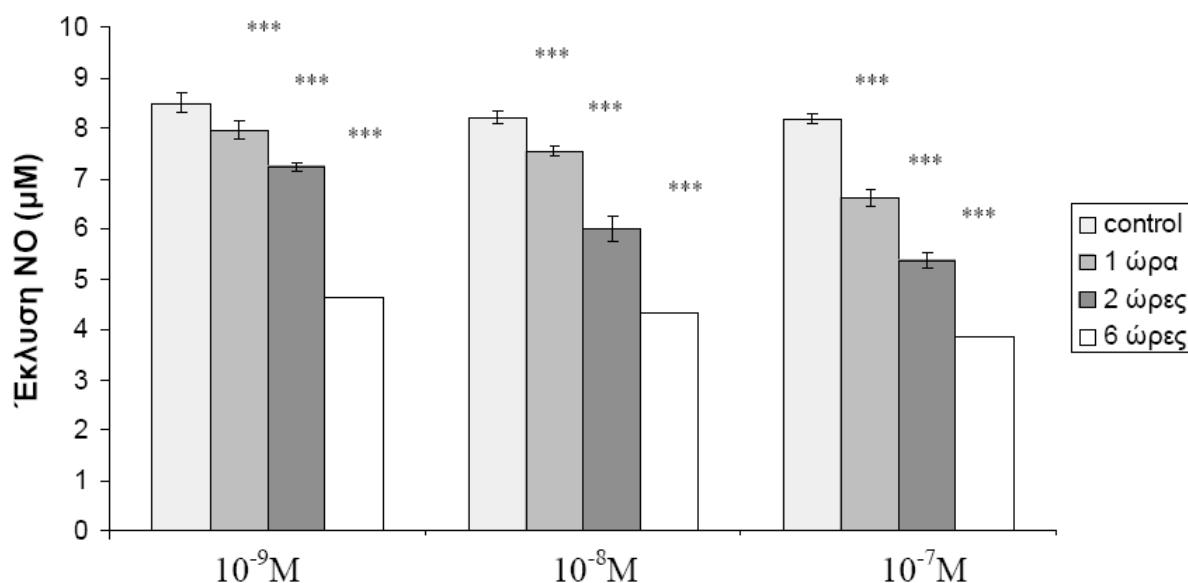
3.2 Α. Μελέτη της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα και του ρόλου των CRH υποδοχέων CRH

i) Επίδραση της CRH στην έκλυση NO

Είναι αποδεκτό πως το ενδοθήλιο ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO επηρεαζόμενο από διάφορους παράγοντες. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν CRH, οπότε εικάζεται ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο ρυθμίζει την ενδοθηλιακή ομοιοστασία με αυτοκρινικό και παρακρινικό τρόπο [11]. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά EAhy926 η χρονο- και δοσο-εξαρτώμενη δράση της CRH στην απελευθέρωση NO στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο ανθρώπινο πλάσμα η συγκέντρωση της CRH κυμαίνεται μεταξύ 10^{-6} M και 10^{-11} M [303], επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 10^{-9} M, 10^{-8} M και 10^{-7} M σε διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης (1 ώρα, 2 ώρες και 6 ώρες).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, η CRH ανέστειλε σημαντικά την έκλυση NO, συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, με χρονο- και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο ($p < 0,001$). Η μέγιστη αναστολή έκλυσης NO παρατηρήθηκε στις 6 ώρες έκθεσης στην CRH.

Έχοντας ως απώτερο στόχο την εκτίμηση της βραχυπρόθεσμης δράσης της CRH, επιλέχθηκαν οι 2 ώρες ως πειραματικός χρόνος δράσης του πεπτιδίου και η συγκέντρωση 10^{-7} M. Στη συγκεκριμένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε η μέγιστη δράση της CRH (αναστολή έκλυσης NO κατά 34% στη συγκέντρωση 10^{-7} M συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις 10^{-9} M, 15,3% και 10^{-8} M, 27%).



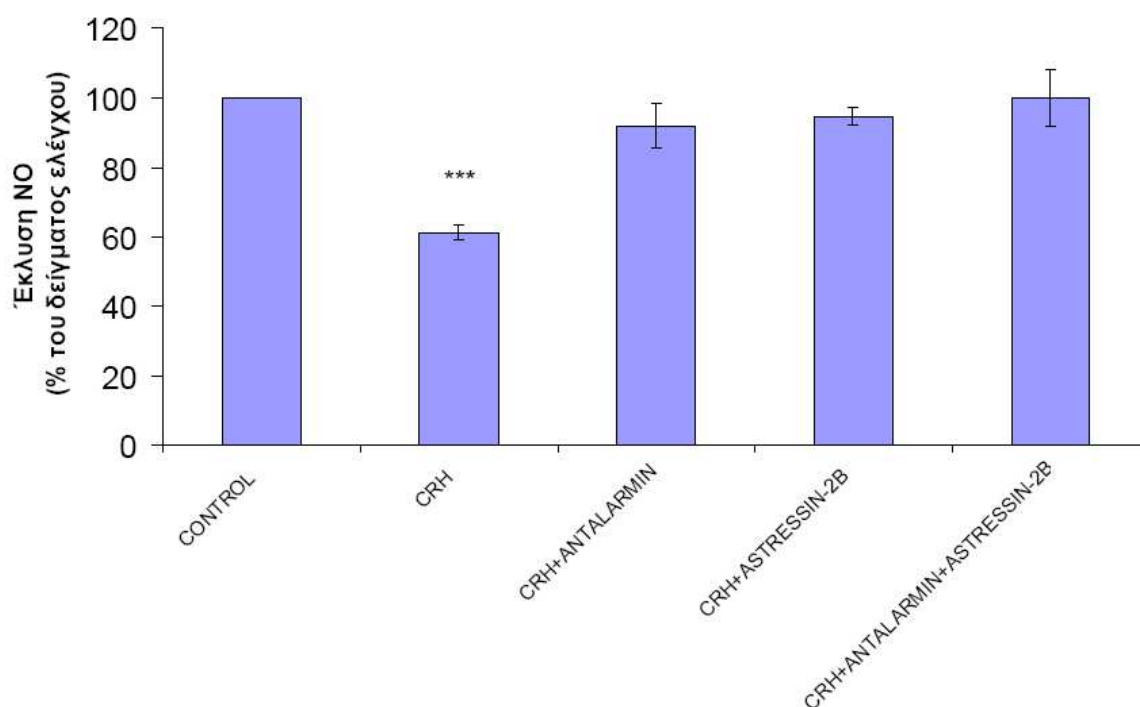
Εικόνα 1

Χρονο- και δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της CRH στην έκλυση του NO

Κατόπιν 24ωρης παραμονής των ενδοθηλιακών κυττάρων της σειράς EAhy926 σε καλλιεργητικό μέσο, άνευ ορού βοός, τα κύτταρα επωάσθηκαν με CRH σε συγκεντρώσεις $10^{-9}M$, $10^{-8}M$ and $10^{-7}M$ για 1, 2 και 6 ώρες. Τα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το control).

ii) Ο ρόλος των υποδοχέων CRHR₁ και CRHR₂ στη ρύθμιση της έκλυσης NO

Για την εκτίμηση του ρόλου των υποδοχέων CRHR₁ και CRHR₂ στην αναστολή του εκλυόμενου NO, χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικοί ανταγωνιστές για κάθε υποδοχέα. Χρησιμοποιήθηκαν η antalarmin και η astressin-2B, σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁶M, για την εκλεκτική αναστολή του CRHR₁ και CRHR₂ αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι η ανασταλτική δράση της CRH στην έκλυση του NO εξουδετερώθηκε πλήρως όταν προστέθηκαν, χωριστά ή μαζί, οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των CRH υποδοχέων (εικόνα 2). Τα δεδομένα υποδηλώνουν πως και οι δύο υποδοχείς της CRH, συμμετέχουν στην άσκηση της ανασταλτικής της δράσης στην παραγωγή NO από το ενδοθήλιο.



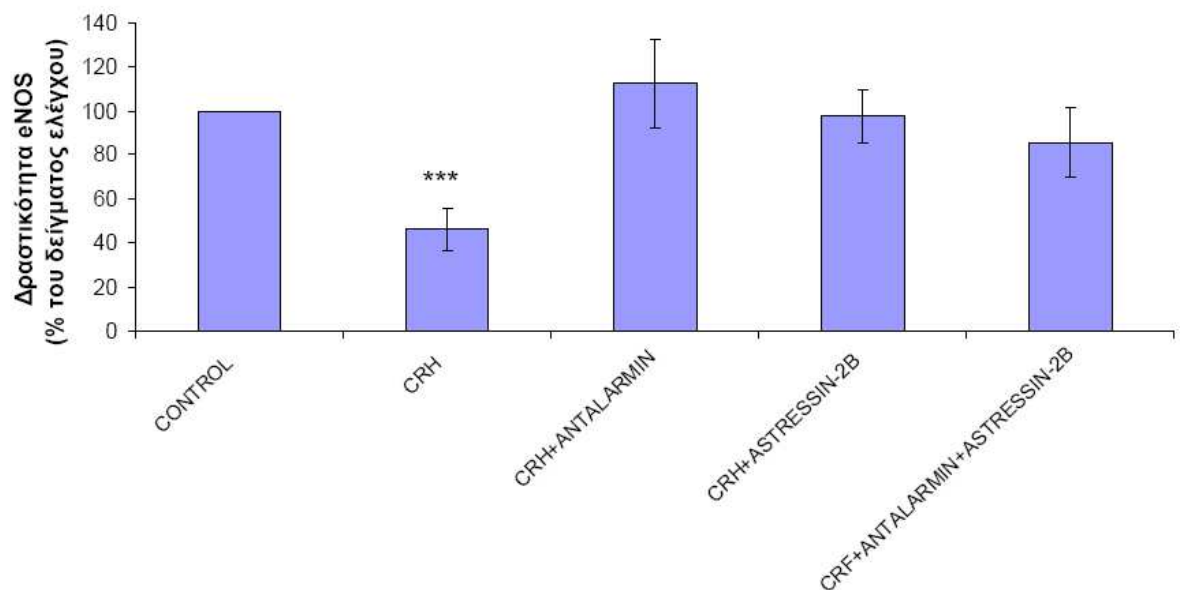
Εικόνα 2

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της στην έκλυση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (δείγμα ελέγχου), ή σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$ ως προς το control).

iii) Η επίδραση της CRH και ο ρόλος των CRH υποδοχέων στη ρύθμιση της δραστηριότητας της eNOS.

Μετά 2 ώρες επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρουσία CRH σε συγκέντρωση 10^{-7}M , παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$) μείωση της δραστηριότητας της eNOS (50% συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου) (εικόνα 3). Η δράση αυτή απαλείφθηκε μετά την προσθήκη των ειδικών CRHR_1 και CRHR_2 αναστολέων σε συγκέντρωση 10^{-6}M , που είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων του NO σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου. Τα συγκεκριμένα δεδομένα δείχνουν ότι στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η CRH ασκεί ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα της eNOS μέσω της οποίας ερμηνεύεται, κατά ένα μέρος τουλάχιστον, η ελάττωση του παραγόμενου NO. Η επίδραση αυτή διαμεσολαβείται από αμφοτέρους τους CRH υποδοχείς.



Εικόνα 3

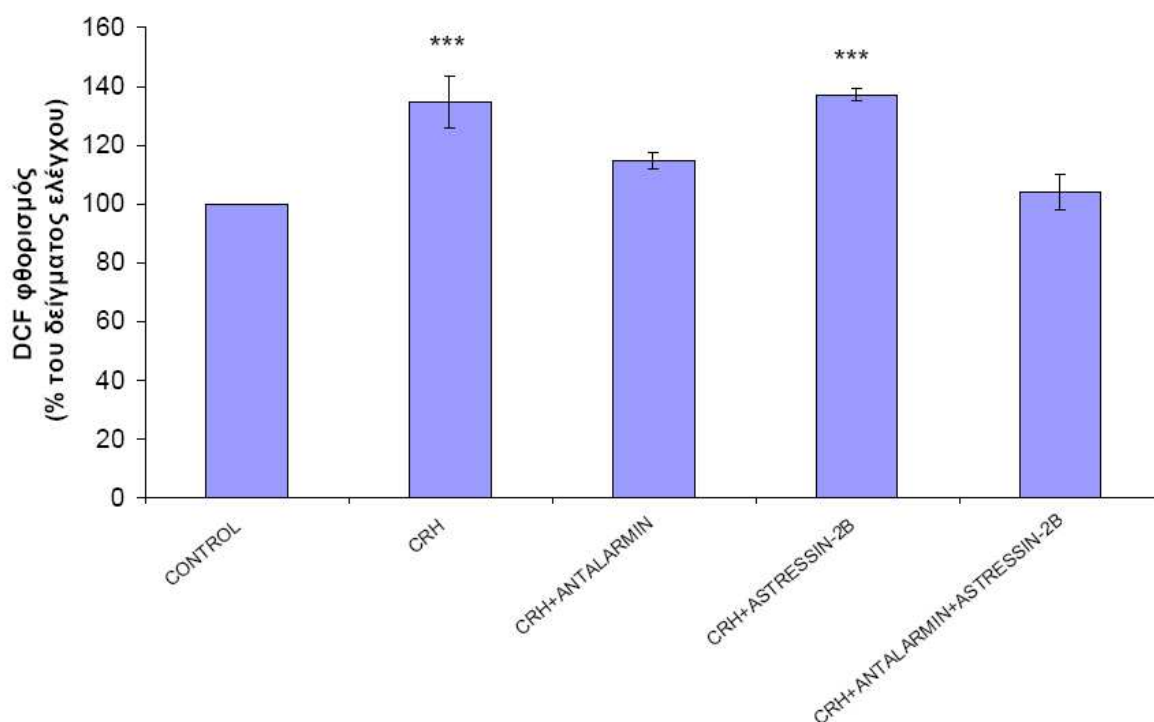
Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (δείγμα ελέγχου), ή σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$) απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι. (***, $p < 0,001$, ως προς το control).

iv) Η επίδραση της CRH και ο ρόλος των CRH υποδοχέων στα επίπεδα των ROS

Το NO που παράγεται από το ενδοθήλιο έχει αναγνωρισθεί ότι ενεργεί ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας μέσω της εξουδετέρωσης των ROS και κατ' επέκταση της προώθησης της φλεγμονώδους αντίδρασης. Με δεδομένη την παρατήρηση μας σχετικά με την ιδιότητα της CRH να εμπλέκεται στην παραγωγή του NO, είναι λογικό να εικάσουμε ότι συμμετέχει και στη διαδικασία ρύθμισης του οξειδωτικού φορτίου στο ενδοθήλιο. Από την σε εμάς γνωστή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα ως προς την συμμετοχή της CRH στην διαμόρφωση του οξειδωτικού φορτίου των κυττάρων. Για την διερεύνηση αυτού του ενδεχόμενου μετρήθηκε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, η CRH προκάλεσε σημαντική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (35% αύξηση, $p < 0,001$). Η συγκεκριμένη δράση αναστάλθηκε παρουσία μόνης της antalarmin ($p < 0,001$) και των δύο εκλεκτικών αναστολέων ($p < 0,001$), αλλά όχι παρουσία μόνης της astressin-2B, υποδηλώνοντας ότι η δράση αυτή της CRH ασκείται μέσω του CRHR₁ υποδοχέα.



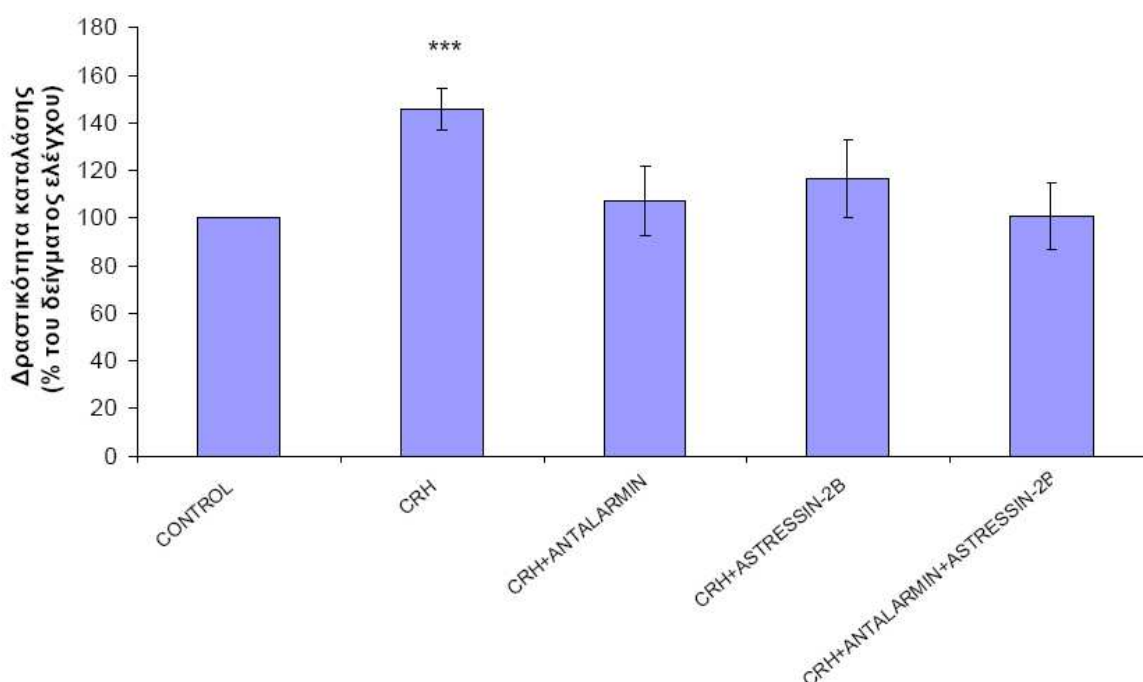
Εικόνα 4

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε DMEM (δείγμα ελέγχου), ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10μM H₂DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το control).

ν) Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης

Η αύξηση των επιπέδων των ROS κατόπιν δράσης της CRH μπορεί να είναι αποτέλεσμα της τροποποίησης των αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων, όπως η καταλάση και η γλουταθειόνη. Το ενδεχόμενο αυτό, μελετήθηκε στη συνέχεια με τον προσδιορισμό της δραστικότητας της καταλάσης, στην κυτταρική ενδοθηλιακή σειρά, κατόπιν δράσης της CRH. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5, η CRH αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης, φθάνοντας ακόμα και σε επίπεδα 50% υψηλότερα απ'ότι τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p < 0,001$). Η παρουσία εκάστου από τους 2 εκλεκτικούς αναστολείς των CRH υποδοχέων ή και των δύο, ανέστειλε πλήρως τη διεγερτική δράση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης. Τα ευρήματα μας δείχνουν ότι η δράση της CRH στο σύστημα της καταλάσης, στα EAhy926 ενδοθηλιακά κύτταρα, ασκείται μέσω και των δύο υποδοχέων.



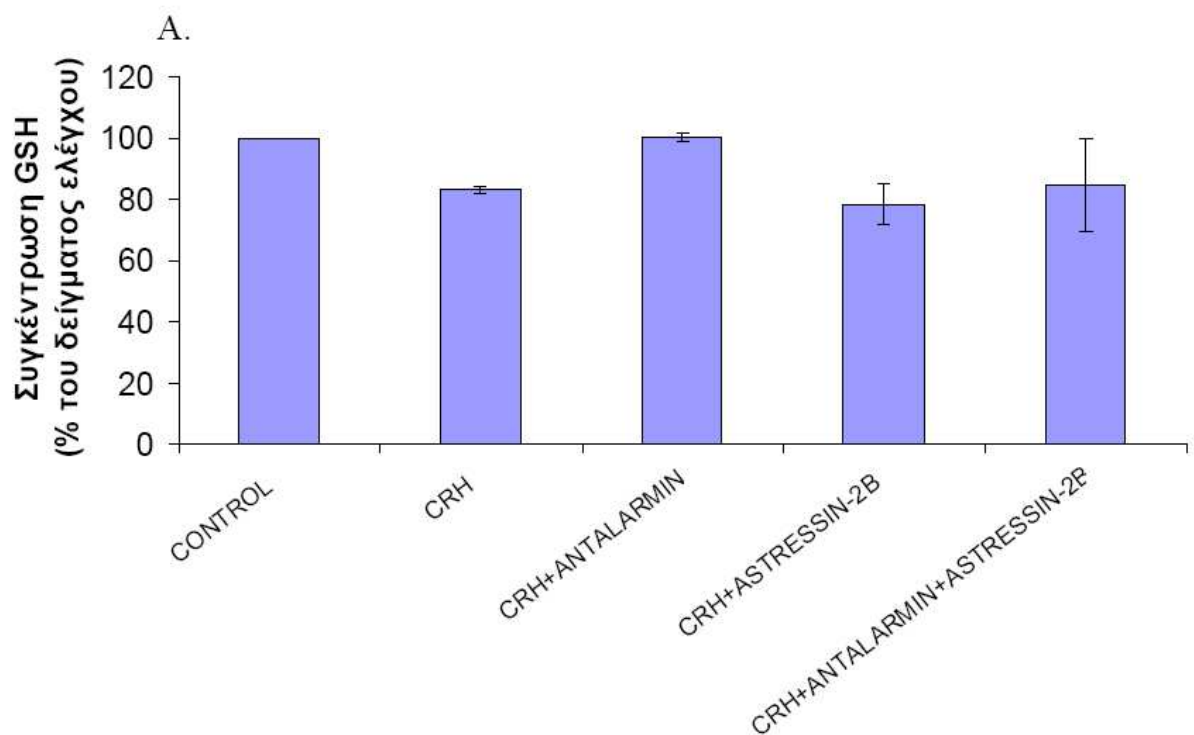
Εικόνα 5

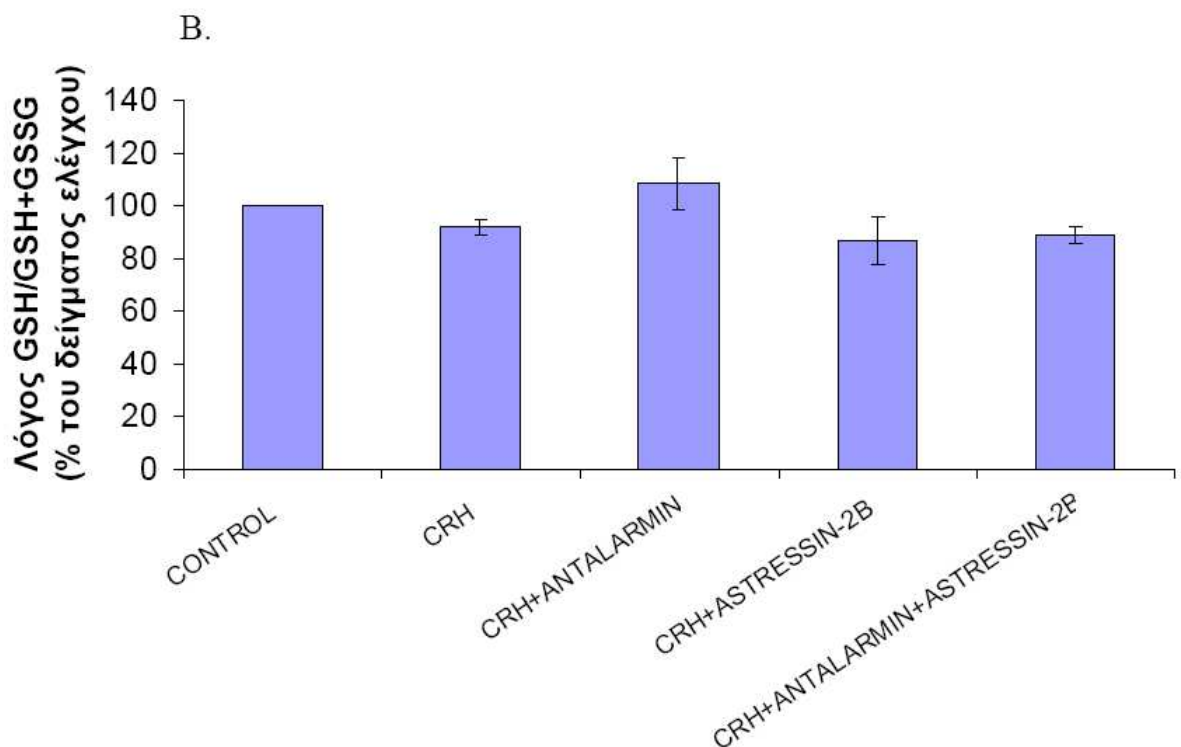
Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (δείγμα ελέγχου), ή σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το control).

vi) Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της στα επίπεδα GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της, στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης εκτιμήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα έμμεσα με τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG. Παρατηρήθηκε ότι, συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, η CRH μείωσε τα επίπεδα GSH αλλά όχι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,062$) (εικόνα 6A). Παρόμοια, ο λόγος GSH/GSH+GSSG δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της CRH (εικόνα 6B).





Εικόνα 6

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (δείγμα ελέγχου, Δ.Ε), ή σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκαν η συγκέντρωση της GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι».

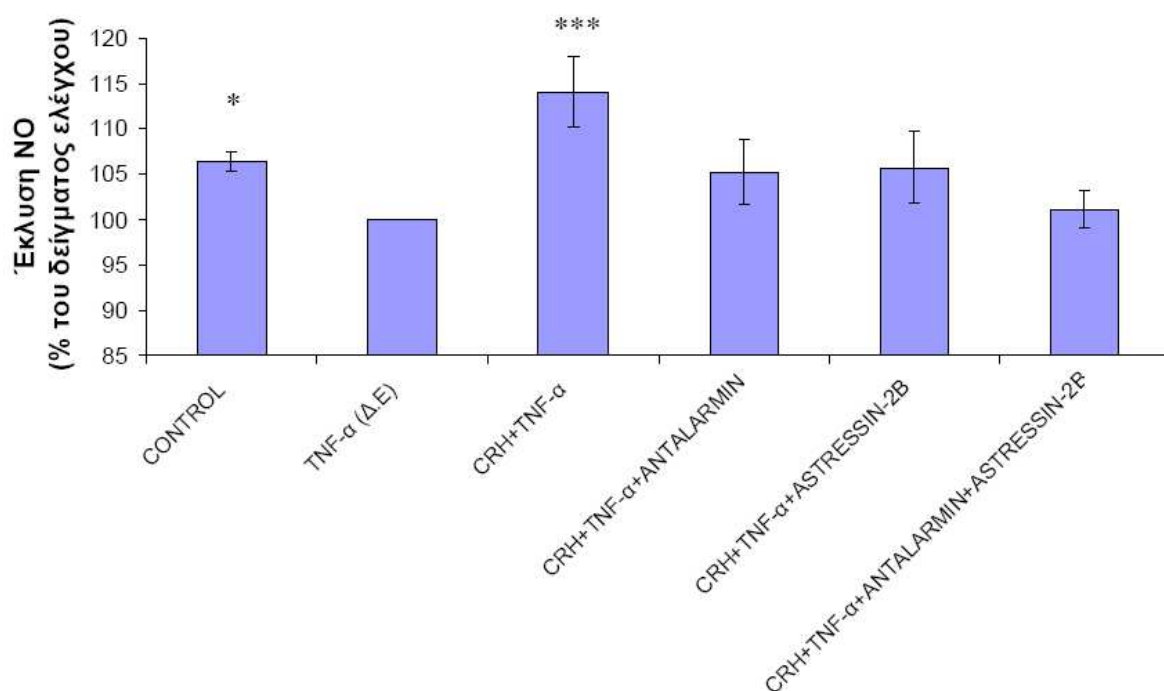
B. Μελέτη της δράσης της CRH κατόπιν προ-έκθεσης των κυττάρων σε TNF-α.

Ο TNF-α είναι γνωστός παράγοντας που προκαλεί αύξηση των ROS στο ενδοθήλιο και συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [304-308]. Σύμφωνα με υπάρχοντα δεδομένα ο TNF-α ελαττώνει το εκλυόμενο NO σε αρτηρίες περιτοναίου, σε συγκέντρωση 1nM [271, 272], ενώ δεν επηρεάζει την έκλυση του σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις [273].

Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 20 ng/ml, ώστε να μελετηθεί η δράση της CRH σε μια κατάσταση του ενδοθηλίου όπου υπάρχει ήδη αυξημένο οξειδωτικό ενδοκυτταρικό φορτίο, όπως τεκμηριώθηκε στη μελέτη μας (περιγράφεται κατωτέρω).

i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NO

Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο TNF-α, σε συγκέντρωση 20 ng/ml, ελάττωσε σημαντικά ($p < 0,05$) τα επίπεδα του NO, σε σύγκριση με το control. Αντίθετα, η CRH, προκάλεσε σημαντική αύξηση του εκλυόμενου NO ($p < 0,001$) από τα ενεργοποιημένα από τον TNF-α ενδοθηλιακά κύτταρα (εικόνα 7). Η δράση αυτή ακυρώθηκε με την παρουσία ενός εκάστου ή και των δύο εκλεκτικών αναστολέων των CRHR₁ και CRHR₂ υποδοχέων, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή και των δύο στην άσκηση της δράσης της CRH σε μια ήδη επαγμένη κατάσταση οξειδωτικού στρες.



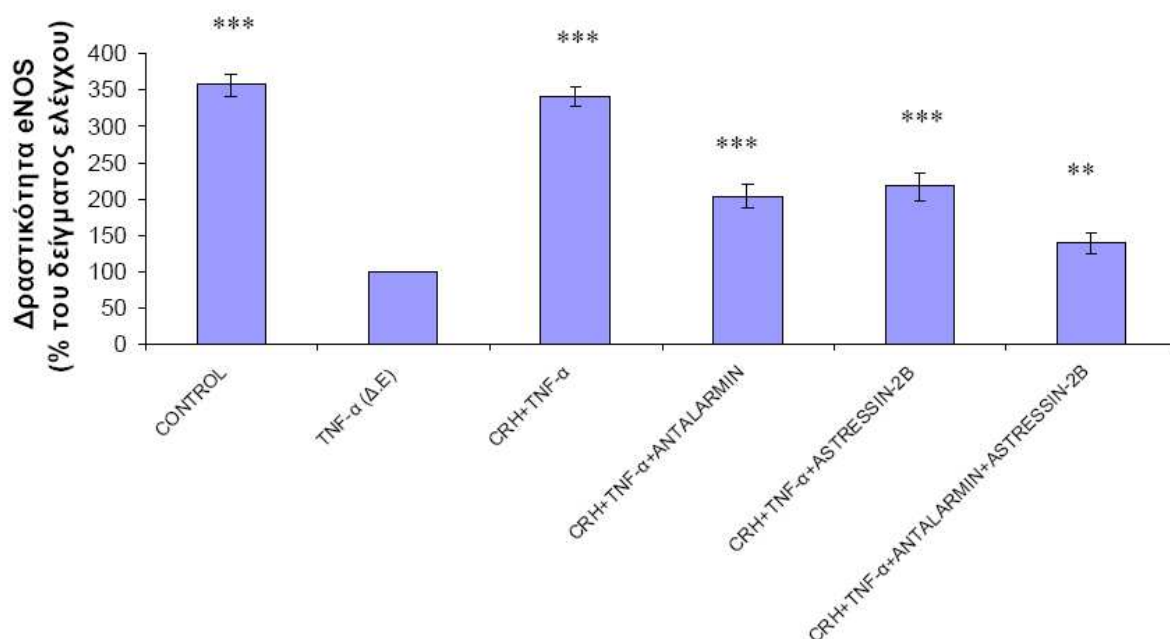
Εικόνα 7

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση NO, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επώασθηκαν για 2 ώρες σε 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγμα ελέγχου ελήφθη η κυτταρική σειρά υπό την επίδραση TNF-α μόνο, χωρίς τη δράση των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS

Η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία του TNF- α προκάλεσε σημαντική μείωση της δραστικότητας του ενζύμου που προσέγγισε το 70% ($p < 0,001$) σε σύγκριση με το control. Η προσθήκη CRH στα προεπωασθέντα με TNF- α κύτταρα, επανέφερε τη δραστικότητα της eNOS σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του control υποδηλώνοντας ανταγωνιστική δράση της CRH. Είναι ενδιαφέρον ότι η παρουσία ενός εκάστου των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστικότητας σε σύγκριση με το control, αλλά δεν έφτασε τα επίπεδα του δείγματος ελέγχου. Η παρουσία στο υλικό επώασης και των δύο αναστολέων επέφερε μεγαλύτερη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS ($p < 0,01$). Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι, η CRH ανταγωνίζεται την ανασταλτική επίδραση του TNF- α στη δραστικότητα της eNOS με δράση που ασκείται μέσω και των δύο CRH υποδοχέων.



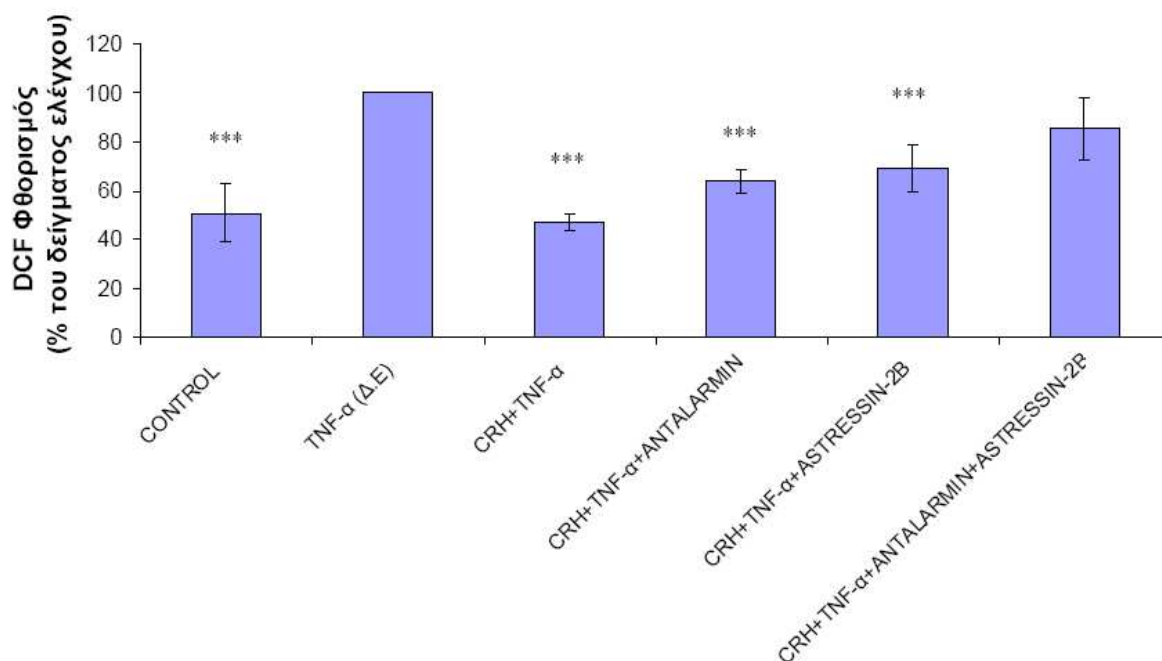
Εικόνα 8

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγμα ελέγχου ελήφθη η κυτταρική σειρά υπό την επίδραση TNF-α μόνο, χωρίς τη δράση των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.

Όπως προαναφέρθηκε, ο TNF-α επάγει στο ενδοθήλιο ένα προ-οξειδωτικό προφίλ, γεγονός που επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη όπου ο TNF-α προκάλεσε σημαντική αύξηση, κατά 100%, στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS ($p < 0,001$) σε σύγκριση με το control (εικόνα 9). Αυτή η δράση του TNF-α εξουδετερώθηκε όταν στο επωαστικό υλικό προστέθηκε CRH η οποία επανέφερε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του control. Η ανασταλτική δράση της CRH στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο εξουδετερώθηκε μερικώς με την παρουσία ενός εκάστου των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων. Η παρουσία αμφοτέρων των εκλεκτικών αναστολών των CRH υποδοχέων ανέστειλε πλήρως την ανασταλτική δράση της CRH, στην προκαλούμενη από τον TNF-α αύξηση του οξειδωτικού φορτίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα προεκτεθέντα ευρήματα δείχνουν ότι στα ενδοθηλιακά κύτταρα η CRH ασκεί ανταγωνιστική (ανασταλτική) δράση στην προκαλούμενη από τον TNF-α, αύξηση των ROS, ενεργώντας μέσω και των δύο υποδοχέων της.



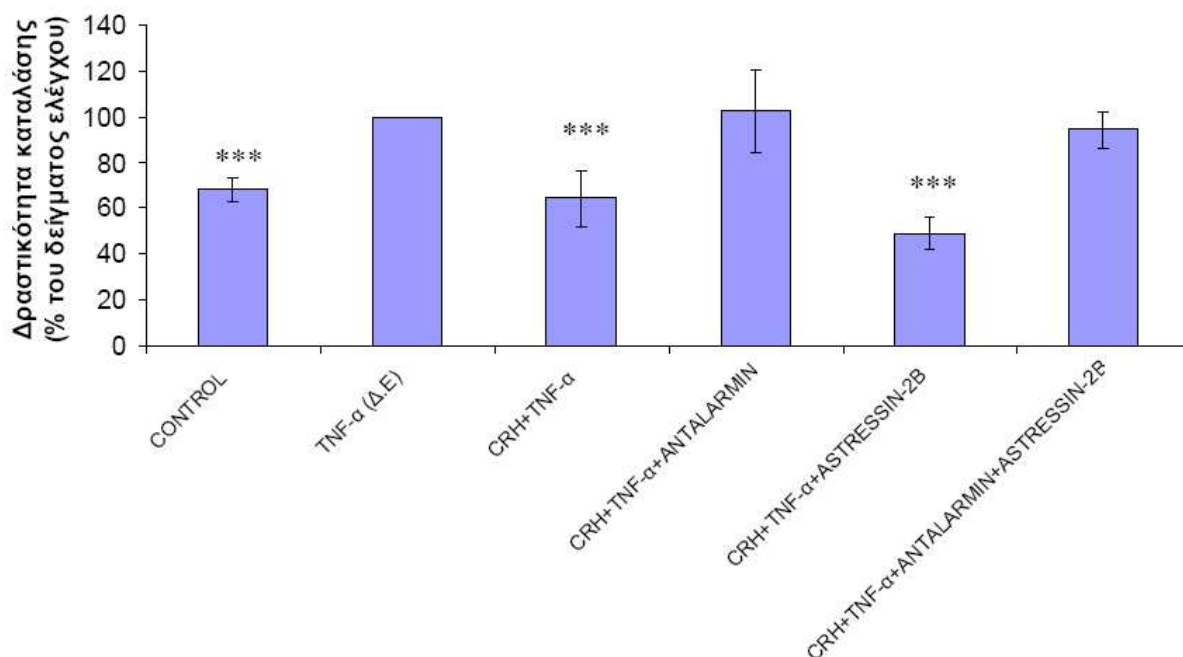
Εικόνα 9

Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα υπό την επίδραση TNF-α μόνο, χωρίς την επίδραση των ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10μM H2DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης

Με δεδομένο ότι ο TNF-α ευνοεί το προοξειδωτικό κυτταρικό προφίλ, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της δραστικότητας της καταλάσης, πρώτου αντιοξειδωτικού μηχανισμού που κινητοποιεί το κύτταρο σε περιπτώσεις υψηλού οξειδωτικού στρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 10, η προκαλούμενη από τον TNF-α αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS συνοδεύτηκε από αντίστοιχη σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης, ($p < 0,001$). Η CRH ανέστειλε την προκαλούμενη από τον TNF-α αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης. Είναι ενδιαφέρον ότι η κατασταλτική δράση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης εξουδετερώθηκε όταν αποκλείστηκε ο CRHR₁ υποδοχέας με antalarmin, όχι όμως όταν αποκλείστηκε ο CRHR₂ υποδοχέας με astressin-2B. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η CRH καταστέλλει τη δραστικότητα της καταλάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα οποία έχει αυξηθεί το οξειδωτικό φορτίο από τον TNF-α, ενεργώντας μέσω του CRHR₁ υποδοχέα.



Εικόνα 10

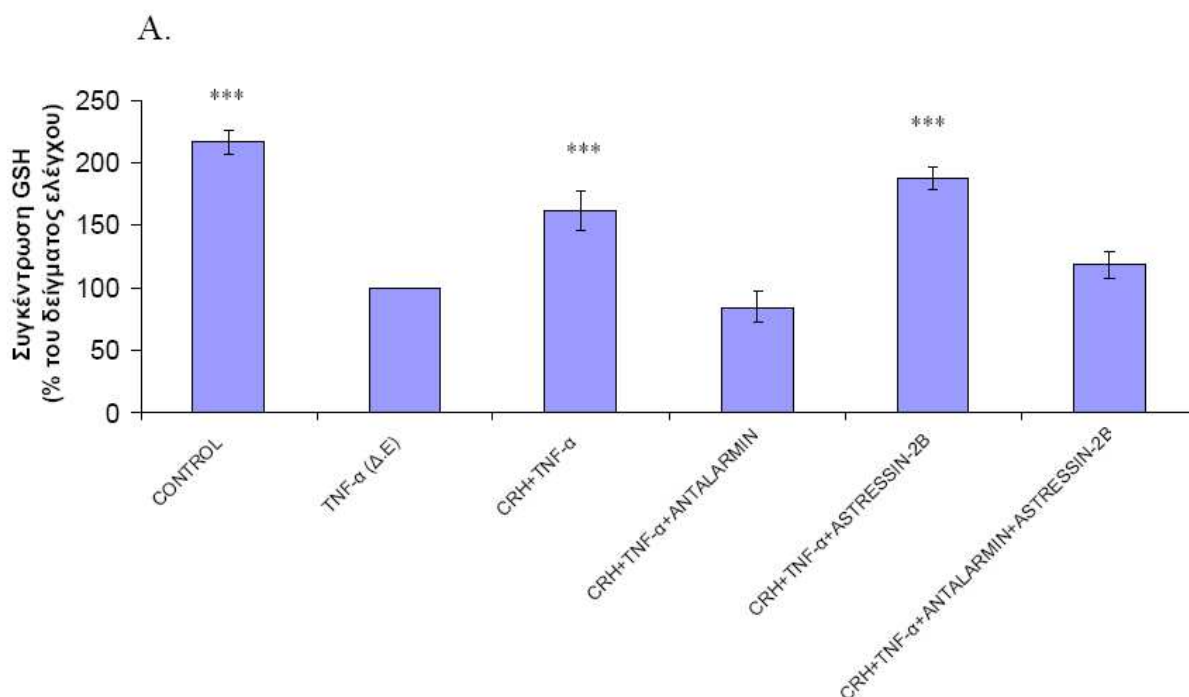
Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

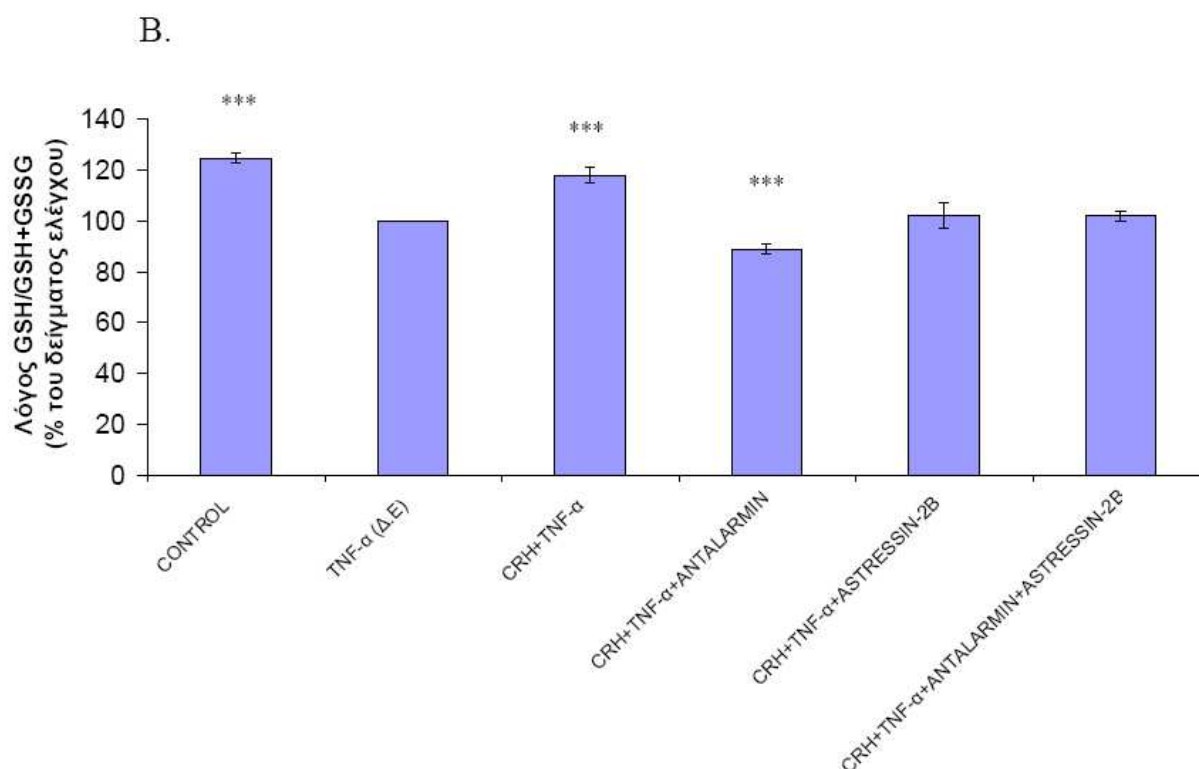
Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά επώασθηκαν για 2 ώρες 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την επίδραση TNF-α ή/και των ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0,001$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ν) Επίδραση στα επίπεδα GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG

Τα δεδομένα για την επίδραση του TNF-α στα επίπεδα της GSH ποικίλουν, εξαρτώμενα σε σημαντικό βαθμό από τη συγκέντρωση του [274]. Στην προκειμένη περίπτωση, στη συγκέντρωση των 20ng/ml, ο TNF-α ελάττωσε σημαντικά (κατά 60%) τη συγκέντρωση της GSH ($p<0,001$) (εικόνα 11A). Η προσθήκη της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα που προεκτέθηκαν στον TNF-α, συνοδεύτηκε από μερική σημαντική ακύρωση της κατασταλτικής δράσης του δεύτερου στα επίπεδα της GSH ($p<0,001$).

Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν επίσης στο λόγο GSH/GSH+GSSG (εικόνα 11B), που έδειξε παρόμοια απόκριση των κυττάρων με αυτή της GSH. Συγκεκριμένα, ο TNF-α ελάττωσε την τιμή του λόγου ($p<0,001$) και η CRH επανέφερε την τιμή του σε επίπεδα του control. Η δράση της CRH αναστάλθηκε από την antalarmin όχι όμως από την astressin-2B. Συμπερασματικά, η CRH αναστέλλει την προκαλούμενη από τον TNF-α ελάττωση του λόγου GSH/GSH+GSSG ενεργώντας μέσω του CRHR1 υποδοχέα.





Εικόνα 11

Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα της GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων

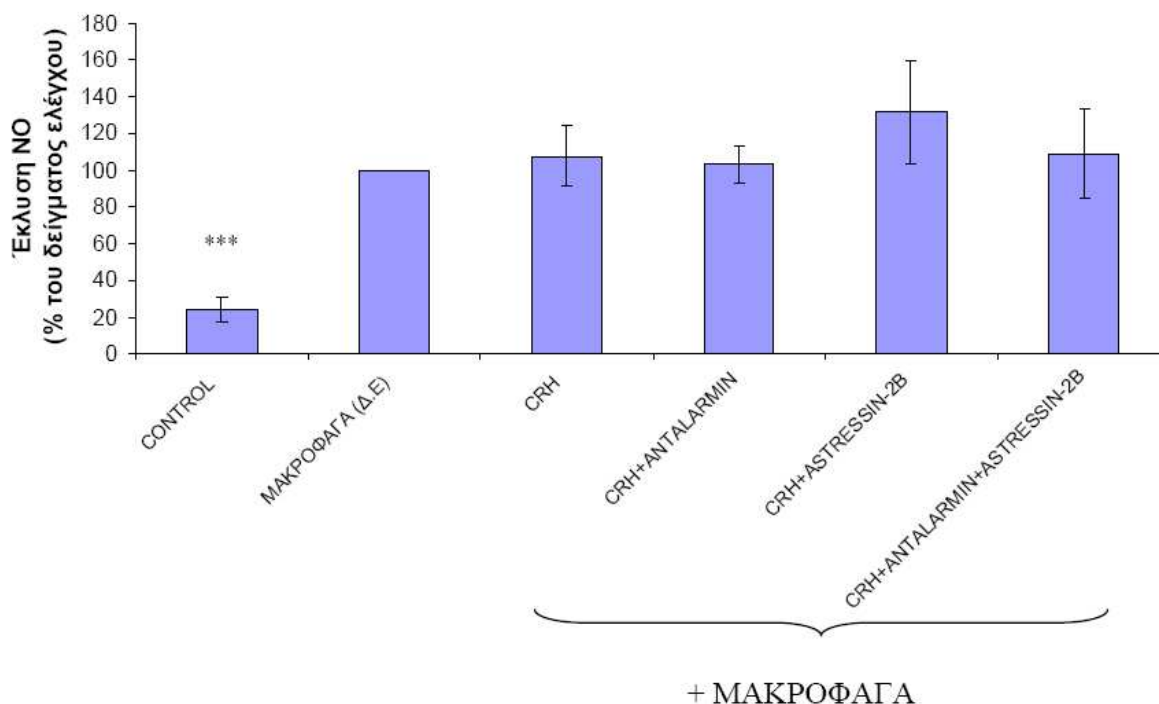
Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγμα ελέγχου χρησίμευσαν ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την επίδραση TNF-α ή/και των ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα προέκθεσης σε TNF-α (Δ.Ε))

Γ. Μελέτη της δράσης της CRH παρουσία μακροφάγων

Είναι γνωστό ότι η παρουσία μακροφάγων πυροδοτεί στρεσογόνους μηχανισμούς στο ενδοθήλιο. Έχει βρεθεί ότι η έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων από τα μακροφάγα, κινητοποιεί τη μεταβίβαση προ-οξειδωτικών σημάτων [277, 278].

i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NO.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [274, 275, 276], κατά τα πρώτα στάδια της φλεγμονής, τα μακροφάγα εκλύουν μεγάλα ποσά NO και επάγουν την αγγειοδιαστολή, με στόχο την ελάττωση της ταχύτητας ροής του αίματος (shear stress), η οποία ευνοεί την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο. Στη δική μας μελέτη, οι συγκεντρώσεις NO στα υπερκείμενα επωαστικά υλικά βρέθηκαν, όπως άλλωστε αναμενόταν, σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες των δειγμάτων χωρίς την παρουσία των μακροφάγων (Εικόνα 12). Τα αυξημένα επίπεδα του NO υπό την επίδραση των μακροφάγων, δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά υπό την επίδραση της CRH απουσία και παρουσία των εκλεκτικών αναστολέων των υποδοχέων της.



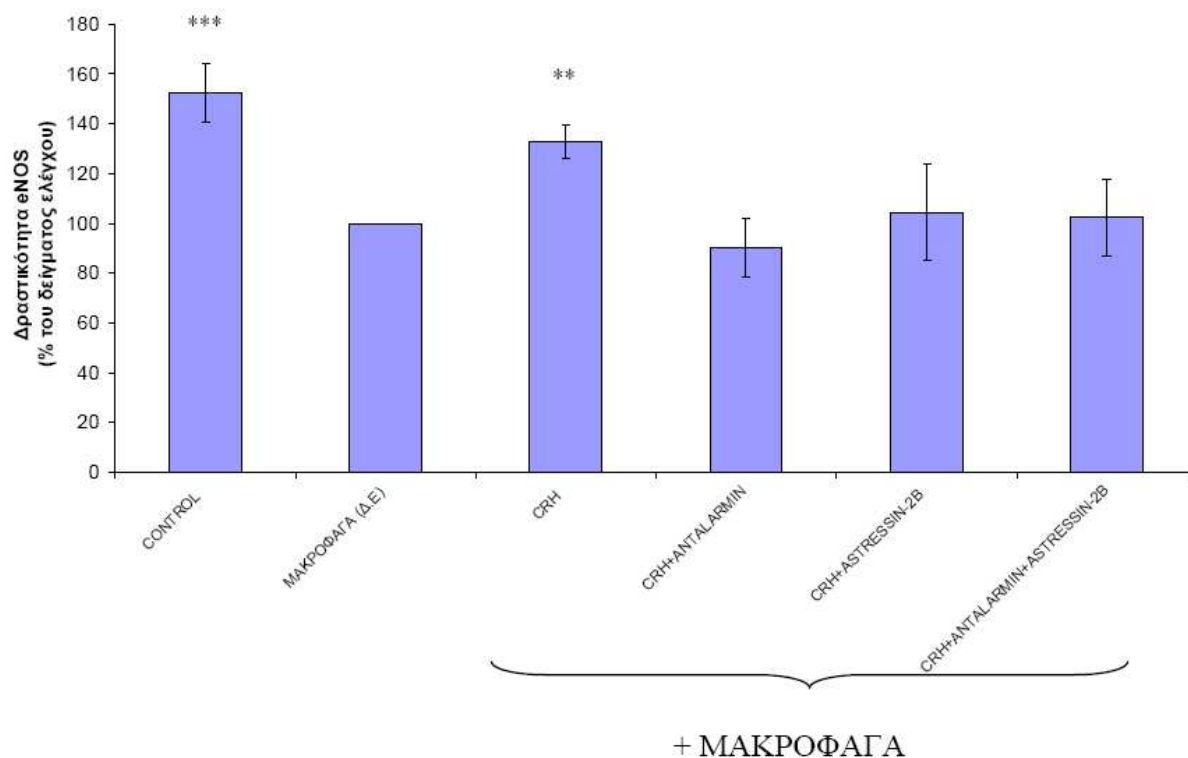
Εικόνα 12

Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση NO, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) ή με μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$ ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ii) Επίδραση στην ενζυμική δραστικότητα της eNOS.

Αν και τα εκλυθέντα επίπεδα NO δεν παρείχαν σαφή εικόνα για το ρόλο της CRH, η μελέτη της καταλυτικής δραστικότητας της eNOS έδειξε σαφέστερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η παρουσία μακροφάγων προκάλεσε ελάττωση της δραστικότητας της eNOS κατά 50% ($p < 0,001$), δράση που εξουδετέρωσε η CRH η οποία αύξησε σημαντικά ($p < 0,01$) τη λειτουργικότητα του ενζύμου των ενδοθηλιακών κυττάρων την οποία επανέφερε σχεδόν στα επίπεδα ηρεμίας. Η δράση αυτή της CRH αναστάλθηκε με την παρουσία των εκλεκτικών αναστολέων, antalarmin και astressin-2B, υποδηλώνοντας ότι ασκείται διαμεσου και των δύο υποδοχέων.



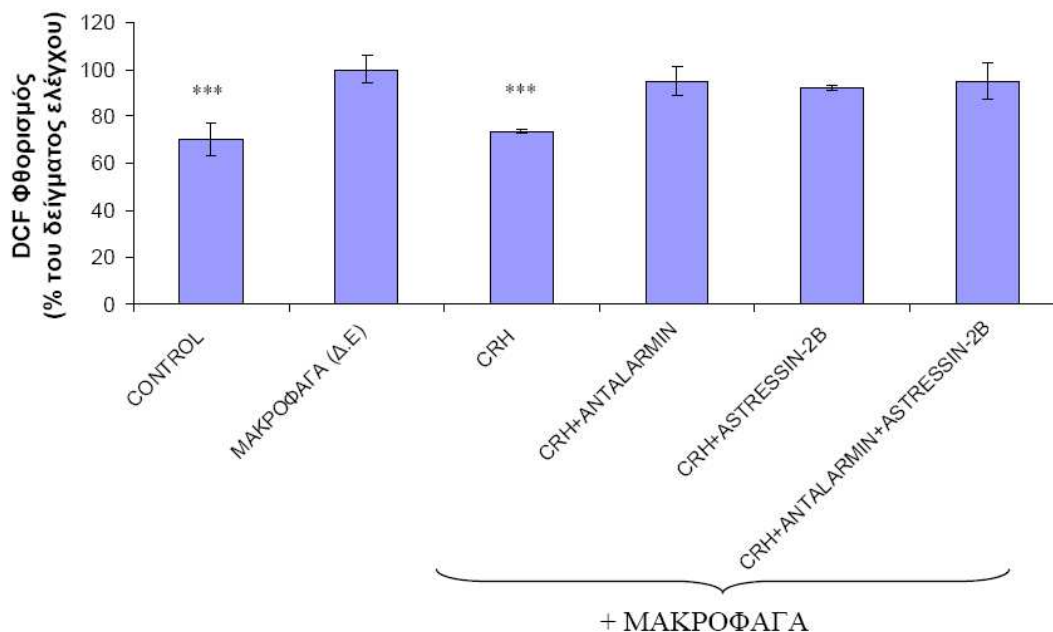
Εικόνα 13

Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) ή με μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 14, η βραχυπρόθεσμη έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε πληθυσμό μακροφάγων αύξησε σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS ($p < 0,001$ συγκριτικά με το control). Η δράση αυτή των μακροφάγων ανεστάλη υπό την επίδραση της CRH η οποία ελάττωσε σημαντικά τα ROS ($p < 0,001$ συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου) και τα επανέφερε σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα του control. Αυτή η δράση της CRH, στην προκαλούμενη από τα μακροφάγα αύξηση του οξειδωτικού φορτίου, φαίνεται ότι ασκείται διαμέσου και των δύο CRH υποδοχέων αφού η παρουσία ενός εκάστου ή και των δύο εκλεκτικών αναστολέων την εξουδετέρωσαν (εικόνα 14).



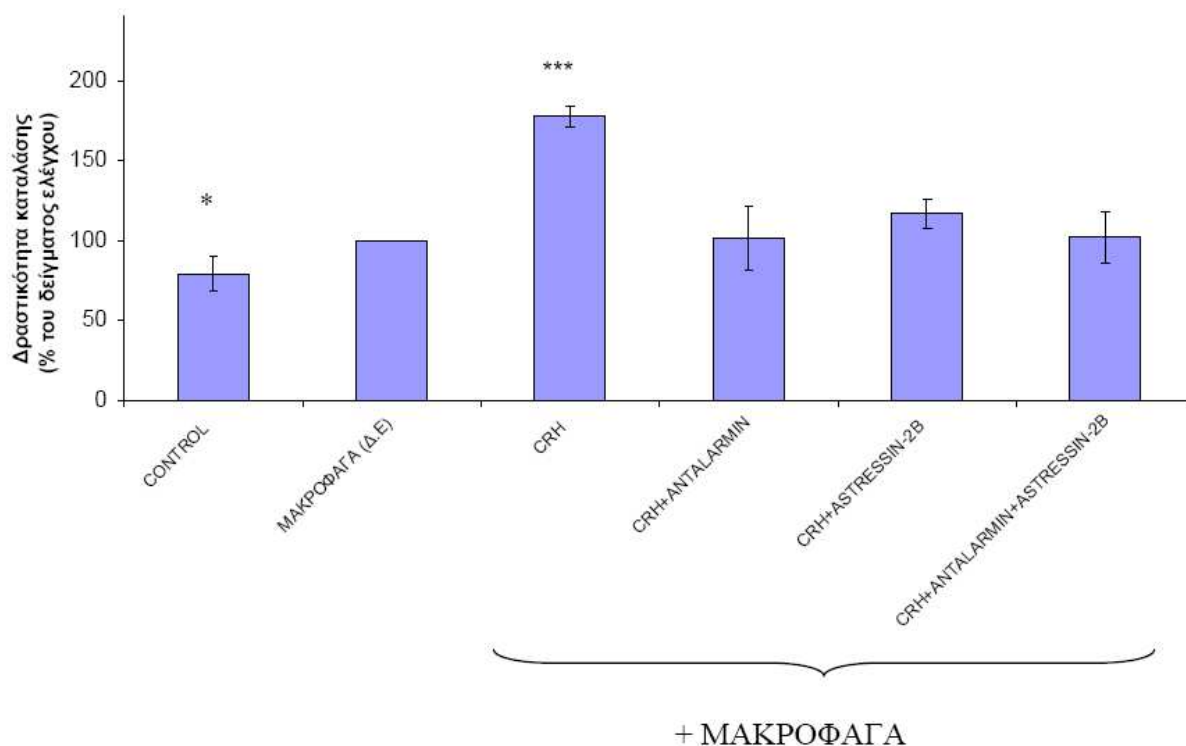
Εικόνα 14

Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) ή με μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10μM H2DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα επίδρασης των μακροφάγων (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης.

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα αύξησε ελαφρά αλλά σημαντικά ($p < 0,05$) τη δραστικότητα της καταλάσης σε σύγκριση με το control (εικόνα 15). Η παρουσία CRH στο επωαστικό υλικό της συγκαλλιέργειας συνοδεύτηκε από περαιτέρω σημαντική αύξηση (σχεδόν διπλασίασε) της δραστικότητας της καταλάσης ($p < 0,001$). Η δράση αυτή αναστάλθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν οι εκλεκτικοί αναστολείς των CRH υποδοχέων γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή και των δύο υποδοχέων στην προκαλούμενη από την CRH αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης.



Εικόνα 15

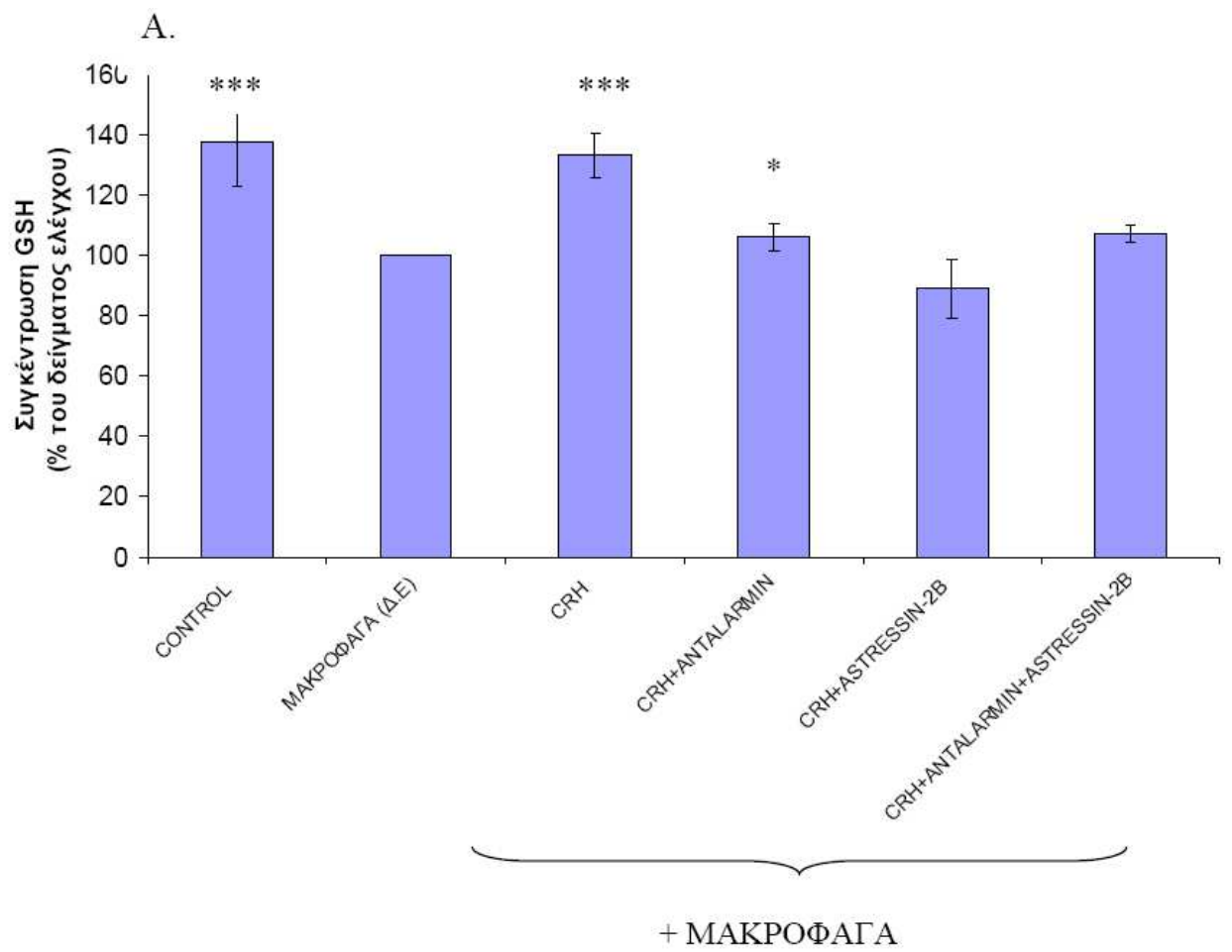
Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστηκότητα της καταλάσης, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

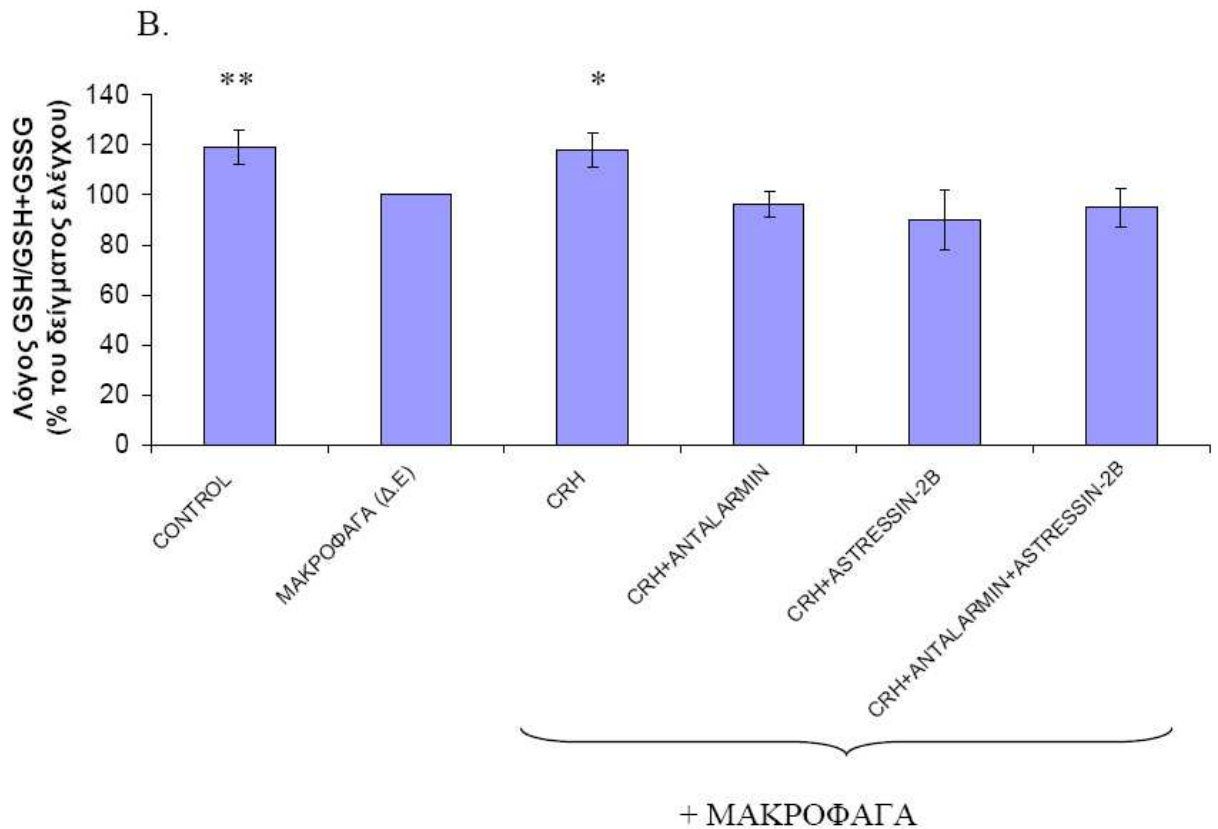
Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) ή με μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστηκότητα της καταλάσης προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα επίδρασης των μακροφάγων (Δ.Ε)).

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG.

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα προκάλεσε σημαντική ελάττωση των επιπέδων της GSH σε σύγκριση με το control ($p < 0,001$) (εικόνα 16). Το αποτέλεσμα αυτό ανταγωνίσθηκε η CRH η οποία επανέφερε την συγκέντρωση της GSH σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του control. Τη δράση αυτή της CRH ανέστειλε πλήρως ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₂ και μερικώς ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₁ υποδοχέα. Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα υποείδη υφίστανται την επίδραση των μακροφάγων η CRH τείνει, ενεργώντας κυρίως μέσω του CRHR₂ υποδοχέα, να διατηρήσει την GSH σε φυσιολογικά επίπεδα.

Αντίστοιχα, ο λόγος GSH/GSH+GSSG ελαττώθηκε υπό την επίδραση των μακροφάγων, δράση που εξουδετερώθηκε από τη CRH, η οποία επανέφερε το λόγο σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα του control. Η αναστολή της δράσης της CRH μετά τον εκλεκτικό αποκλεισμό των CRH υποδοχέων υποδηλώνει συμμετοχή και των δύο.





Εικόνα 16

Η δράση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

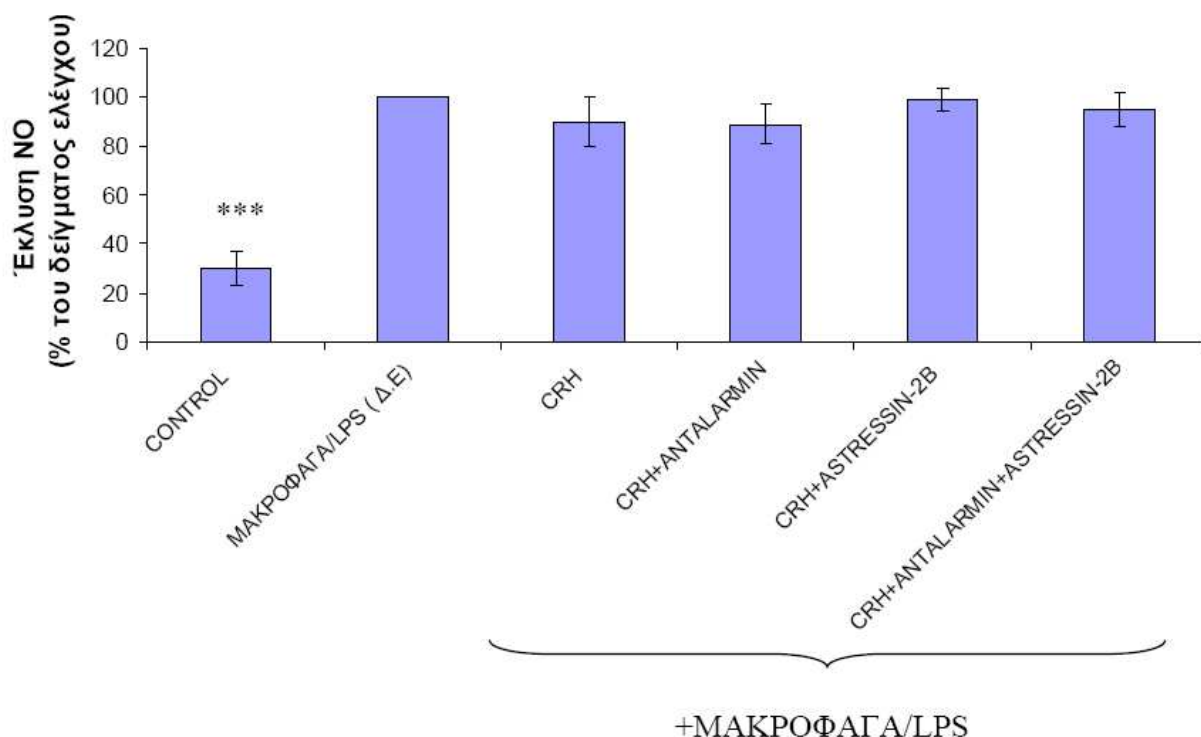
Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) ή με μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, ως προς το δείγμα επίδρασης των μακροφάγων, (Δ.Ε)).

Δ. Μελέτη της επίδρασης της CRH και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων

Η επίδραση των μακροφάγων στη διάρκεια, την ένταση και την εξέλιξη της φλεγμονής, είναι μείζονος σημασίας. Αν και τα μακροφάγα θεωρούνταν, παλαιότερα, απλά αντιγονοπαρουσιαστικά φαγοκύτταρα που εκκρίνουν προφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακούς παράγοντες, σήμερα θεωρείται ότι έχουν ένα πιο σύνθετο ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση προάγοντας τη φλεγμονή και την απόπτωση. Για το λόγο αυτό επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε στα πειράματά μας τα ενεργοποιημένα μακροφάγα τα οποία παρουσιάζουν Th₁ φαινότυπο και για τον πρόσθετο λόγο ότι αλλάζουν λειτουργικό, μορφολογικό και εκκριτικό προφίλ όταν ενεργοποιηθούν εκκρίνοντας προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως IL-1β, IL-6, TNF-α και πολλά πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1, -2, -7, -9 και -12, που αποδομούν το κολλαγόνο, την ελαστίνη, την φιμπρονεκτίνη και άλλα στοιχεία του εξωκυττάριου χώρου.

i) Επίδραση στα επίπεδα του NO

Η συγκαλλιέργεια μακροφάγων, που ενεργοποιήθηκαν με LPS και ενδοθηλιακών κυττάρων συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της παραγωγής του NO σε σύγκριση με το control ($p < 0,001$) η οποία δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της CRH μόνης ή σε συνδυασμό με τους εκλεκτικούς αναστολείς των υποδοχέων της. (εικόνα 17).

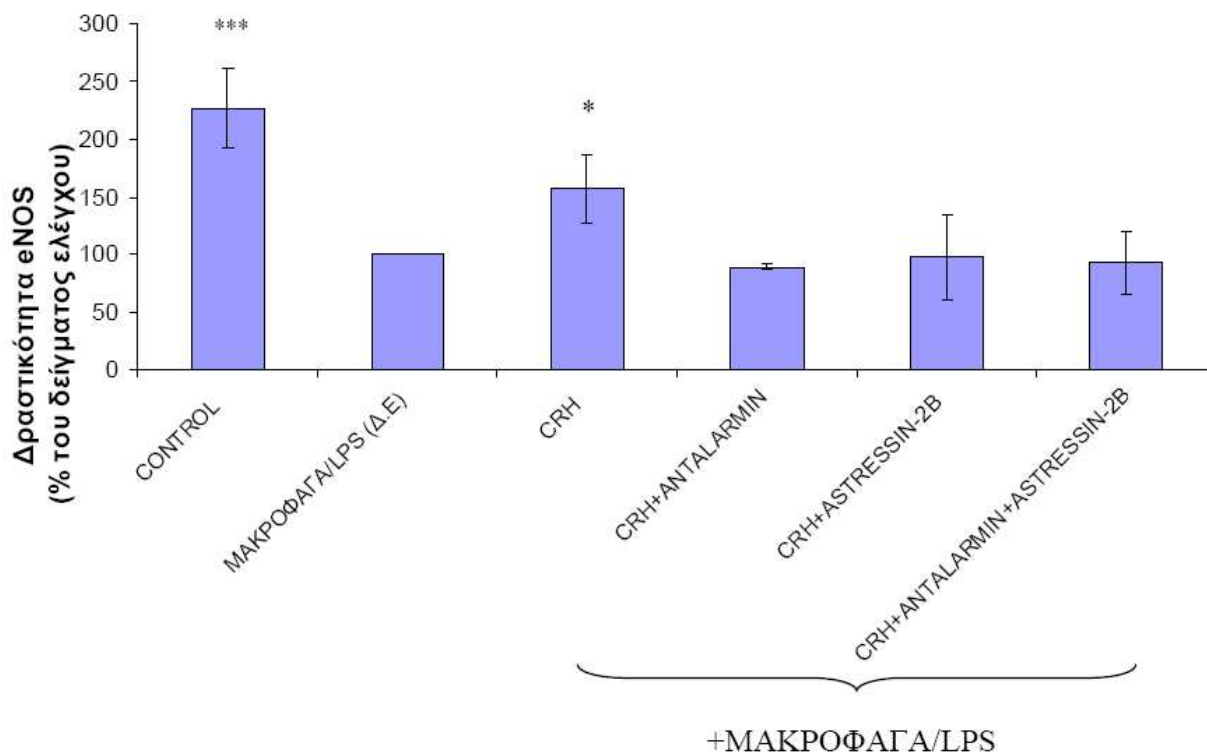


Εικόνα 17 : Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση NO, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS-διεγερμένα μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα συγκαλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων και LPS-διεγερμένων μακροφάγων (Δ.Ε)).

ii) Επίδραση στην ενζυμική δραστικότητα της eNOS.

Κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS-διεγερμένα μακροφάγα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστικότητας της eNOS, συγκριτικά με το δείγμα χωρίς την επίδραση μακροφάγων (control) ($p < 0,001$). Η προσθήκη CRH προκάλεσε σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου, όπως φαίνεται στην εικόνα 18. Η διαδικασία μεσολαβείται από τον $CRHR_1$ όσο και από τον $CRHR_2$, καθώς ο εκλεκτικός αποκλεισμός των CRH υποδοχέων, με την προσθήκη antalarmin ή/και astressin-2B, ανέστειλε την περιγραφείσα δράση της CRH.

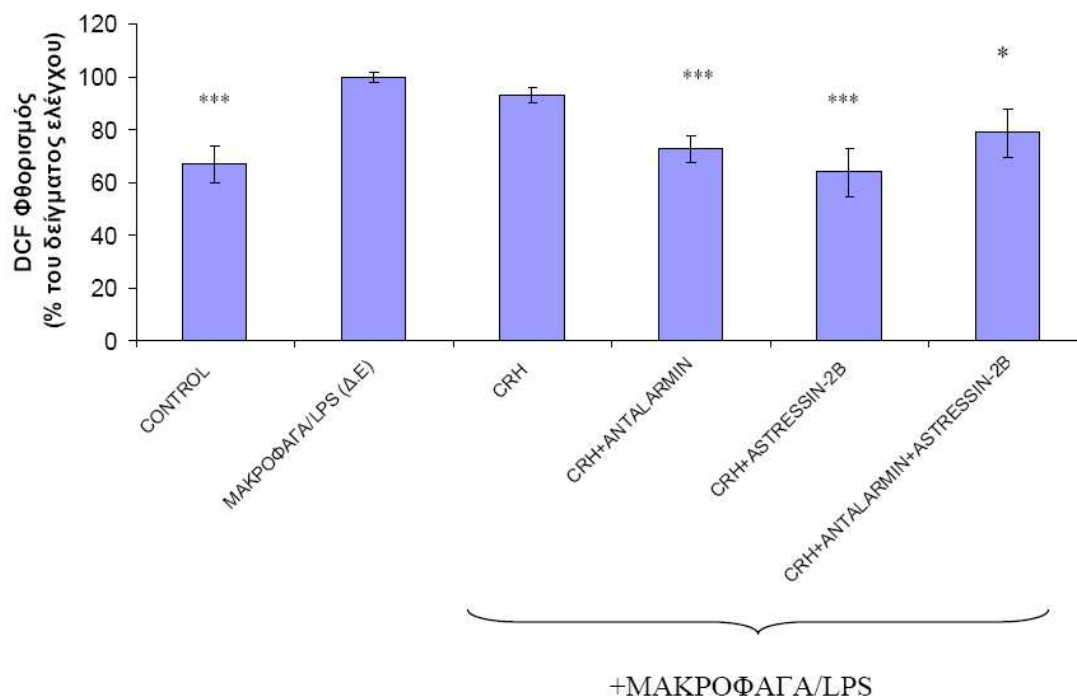


Εικόνα 18 : Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα η επώασθηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επώαστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». Τα (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα συγκαλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων και LPS-διεγερμένων μακροφάγων (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα επίπεδα των ROS.

Η συγκαλλιέργεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου ($p < 0,001$) (Εικόνα 19). Η προσθήκη CRH στην συγκαλλιέργεια δεν είχε σημαντική επίδραση στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ αντίθετα, η εκλεκτική και συνδυαστική αναστολή των CRH υποδοχέων συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των ROS ($p < 0,001$ και 0,05 αντίστοιχα) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε) υποδηλώνοντας αναστολή δράσης ασκούμενης διαμέσου αμφοτέρων των υποδοχέων.

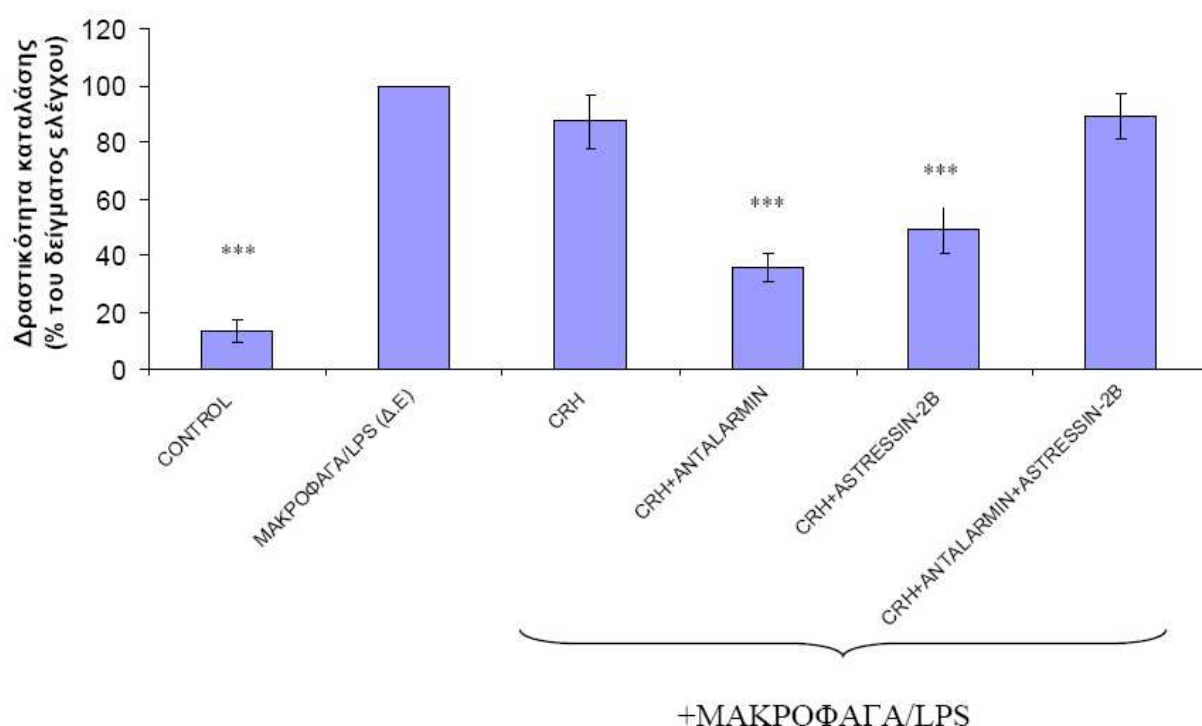


Εικόνα 19 : Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10μM H₂DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα συγκαλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων και LPS-διεγερμένων μακροφάγων (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης

Υπό την επίδραση των ενεργοποιημένων μακροφάγων, αυξήθηκε σημαντικά η δραστικότητα της καταλάσης ($p < 0,001$) στα ενδοθηλιακά κύτταρα (εικόνα 20). Η CRH δεν επηρέασε σημαντικά την αυξημένη καταλυτική δράση του ενζύμου των ενδοθηλιακών κυττάρων στην συγκαλλιέργεια, συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου των ενεργοποιημένων μακροφάγων. Όμως η αναστολή των $CRHR_1$ και $CRHR_2$, με antalarmin και astressin-2B αντίστοιχα, ελάττωσε σημαντικά ($p < 0,001$) την δραστικότητα του ενζύμου.



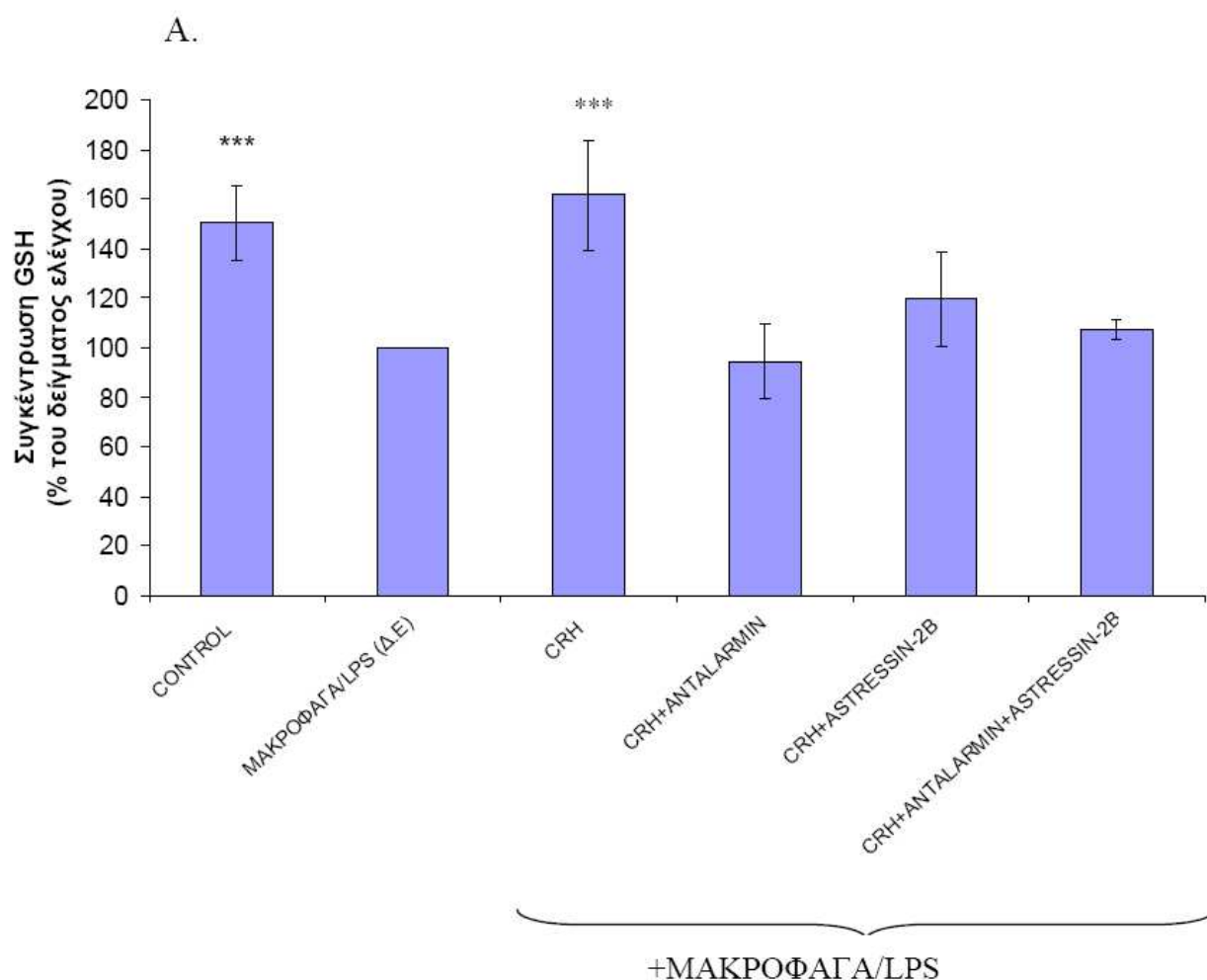
Εικόνα 20 : Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

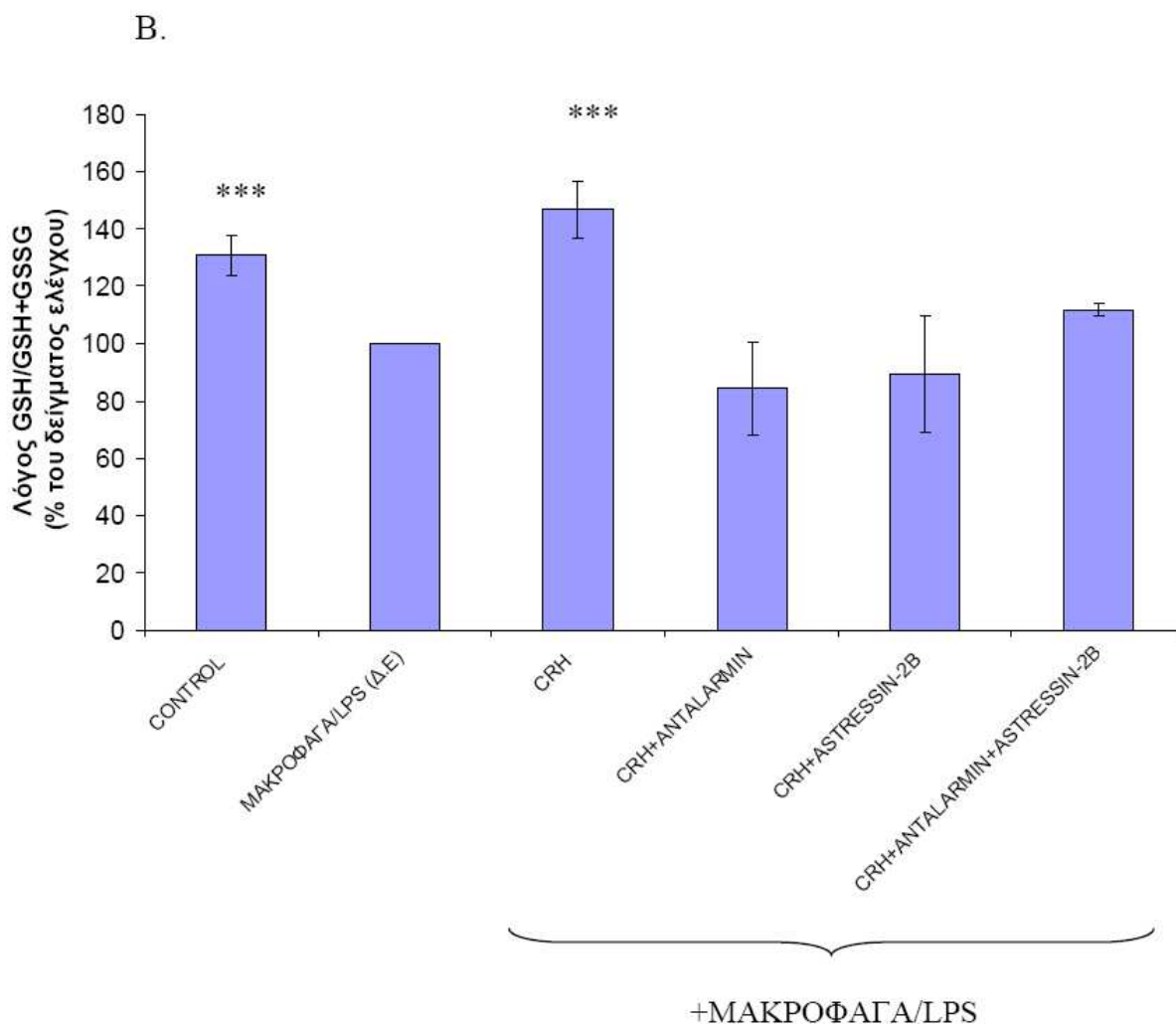
Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα η επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των $CRHR$. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$ ως προς το δείγμα συγκαλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων και LPS-διεγερμένων (Δ.Ε))

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG.

Υπό την επίδραση των ενεργοποιημένων μακροφάγων, ελαττώθηκε σημαντικά η συγκέντρωση της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα ($p < 0,001$) σε σύγκριση με το control (εικόνα 21A). Η προσθήκη της CRH στη συγκαλλιέργεια επανέφερε τη συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής της GSH σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του control. Η δράση αυτή της CRH αναστάλθηκε όταν στην συγκαλλιέργεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα προστέθηκαν, εκλεκτικά ή σε συνδυασμό, οι αναστολείς των CRH υποδοχέων γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της CRH ασκείται μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων της.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα όσον αφορά το λόγο GSH/GSH+GSSG (Εικόνα 21B).





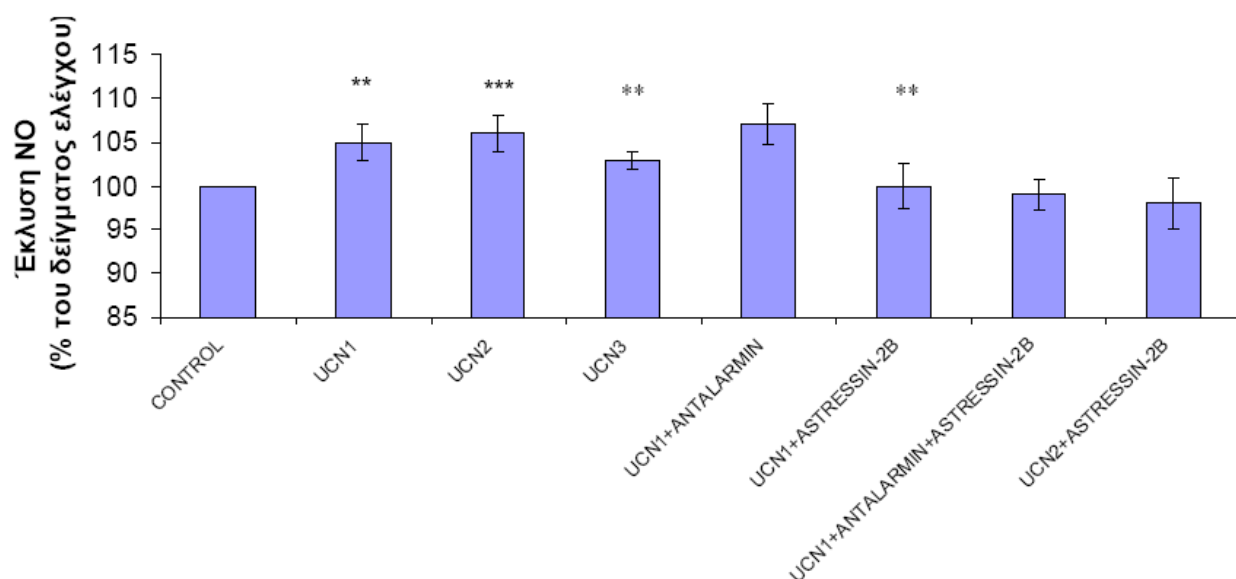
Εικόνα 21 : Η επίδραση της CRH και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα η επώασθηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε CRH (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επώασθηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα, χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$ M, ως προς το δείγμα ελέγχου (ΔΕ)).

Ε. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα και του ρόλου των CRH υποδοχέων

ι) Επίδραση στην έκλυση του NO.

Οι UCNs είναι γενικά αποδεκτές ως καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες [247-261]. Η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία των ουροκορτινών προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκλυσης του NO που ήταν μεγαλύτερη για της UCN2 ($p < 0,001$) απότι για την UCN1 και την UCN3 ($p < 0,01$) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (Εικόνα 22). Ως γνωστόν η UCN1 είναι αγωνιστής αμφοτέρων των CRH υποδοχέων ενώ οι UCN2 και UCN3 του CRHR₂. Η αναστολή της έκλυσης του NO υπό την επίδραση των ουροκορτινών μόνο όταν μπλοκαρίστηκε ο CRHR2 υποδοχέας, με astressin-2B, δείχνει ότι ο υποδοχέας αυτός αποτελεί πύλη μεταγωγής της ευοδωτικής δράσης των ουροκορτινών στην έκλυση του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

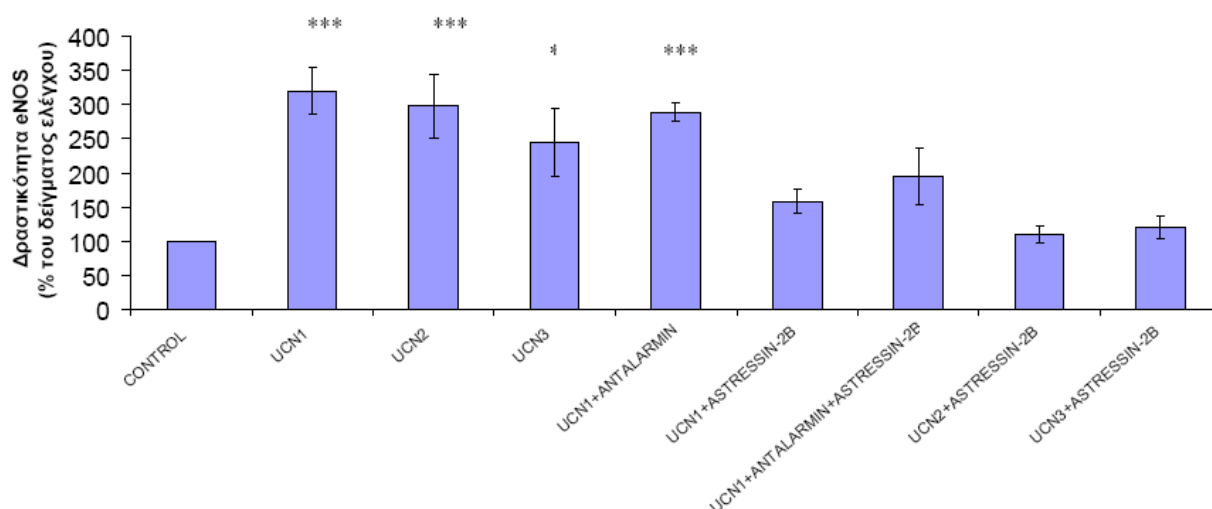


Εικόνα 22 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση του NO

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επώασθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (control), ή σε DMEM που περιείχε UCNs ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$ ως προς το control).

ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS

Η θετική δράση των UCN1, 2, αλλά και 3 στην έκλυση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αντικατοπτρίζεται έντονα στην σημαντική επαγωγή που αυτές προκάλεσαν στην καταλυτική δραστηριότητα της eNOS (εικόνα 23). Η επαγωγή της eNOS από την UCN1 και την UCN2 ήταν ιδιαίτερα έντονη αλλά συγκρίσιμη ($p < 0,001$) ενώ η UCN3 προκάλεσε σημαντική πλην όμως ηπιώτερη επαγωγή του ενζύμου ($p < 0,01$). Η αναστολή της επαγωγής της eNOS μόνο όταν αναστάλθηκε η λειτουργία του CRHR₂ υποδοχέα, υποδηλώνει ότι η επίδραση των ουροκορτινών στην δραστικότητα του ενζύμου στα ενδοθηλιακά κυττάρων ασκείται μέσω αυτού.

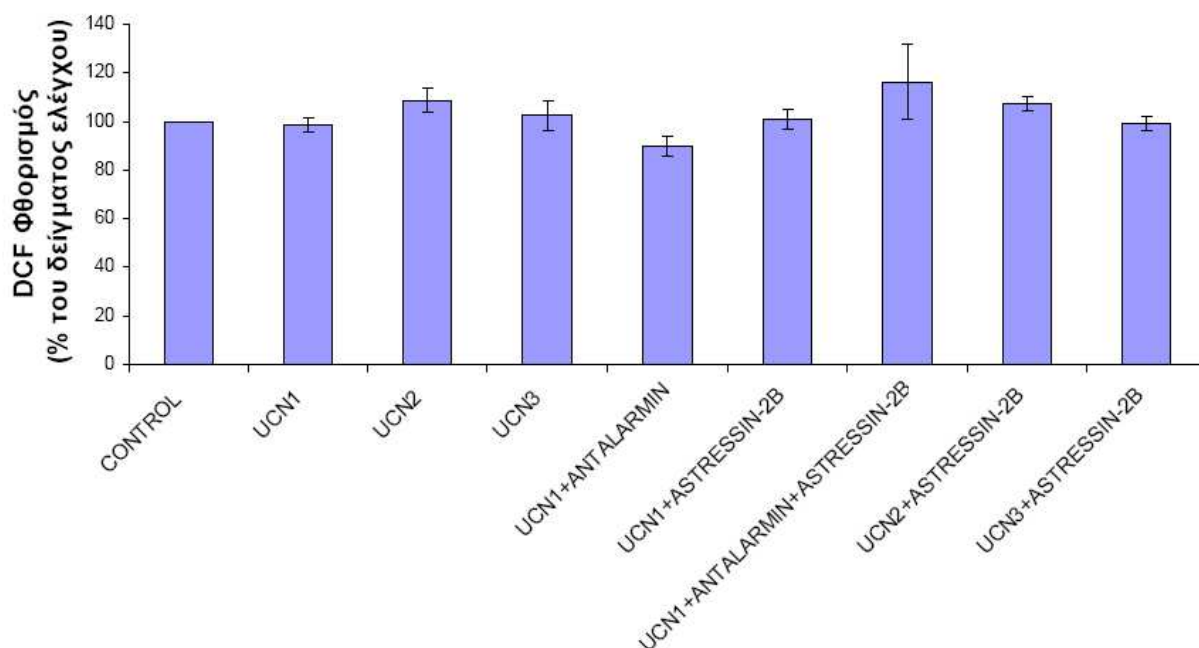


Εικόνα 23 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (control), ή σε DMEM που περιείχε UCNs ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το control).

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.

Όπως φαίνεται στην (εικόνα 24), η έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στις UCNs δεν μετέβαλαν σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS συγκριτικά με το control

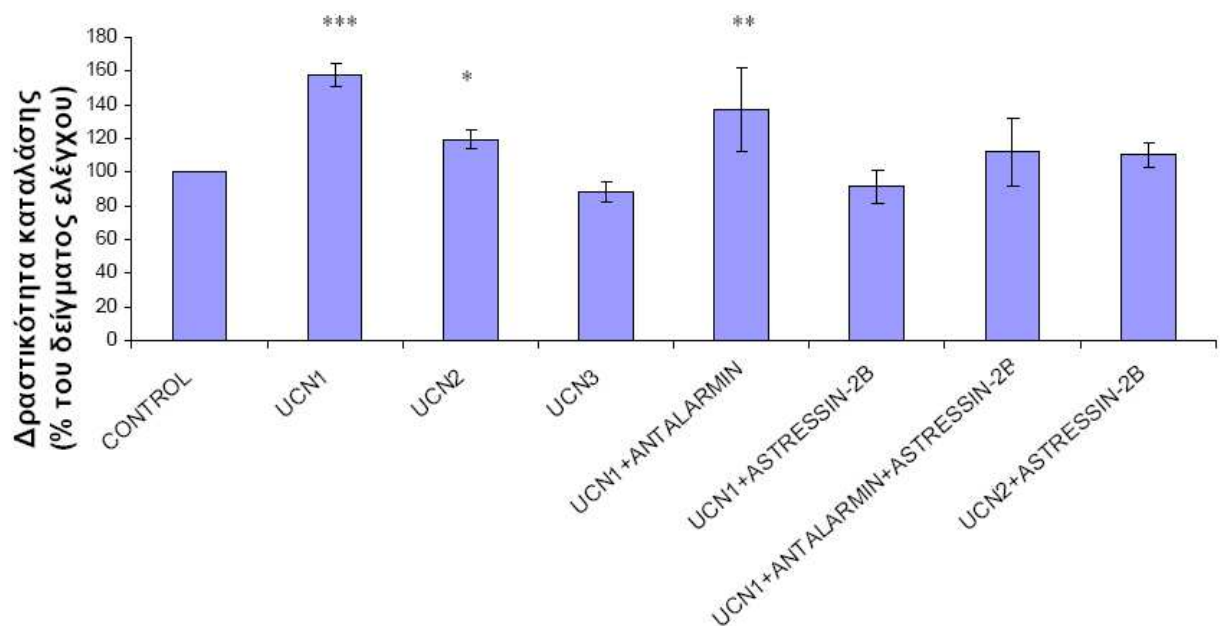


Εικόνα 24 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επώασθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (control), ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Τα κύτταρα επώαστηκαν με 10μ M H₂DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι.

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, οι ουροκορτίνες 1 και 2 προκάλεσαν σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε αντίθεση με τη UCN3. Η ένταση της δράσης της UCN1 ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($p < 0,001$) από ότι της UCN2 ($p < 0,05$). Η δράση αυτή των ουροκορτινών 1 και 2 φαίνεται να διαμεσολαβείται από τον $CRHR_2$ αφού ο αποκλεισμός του $CRHR_1$ δεν την επηρέασε.

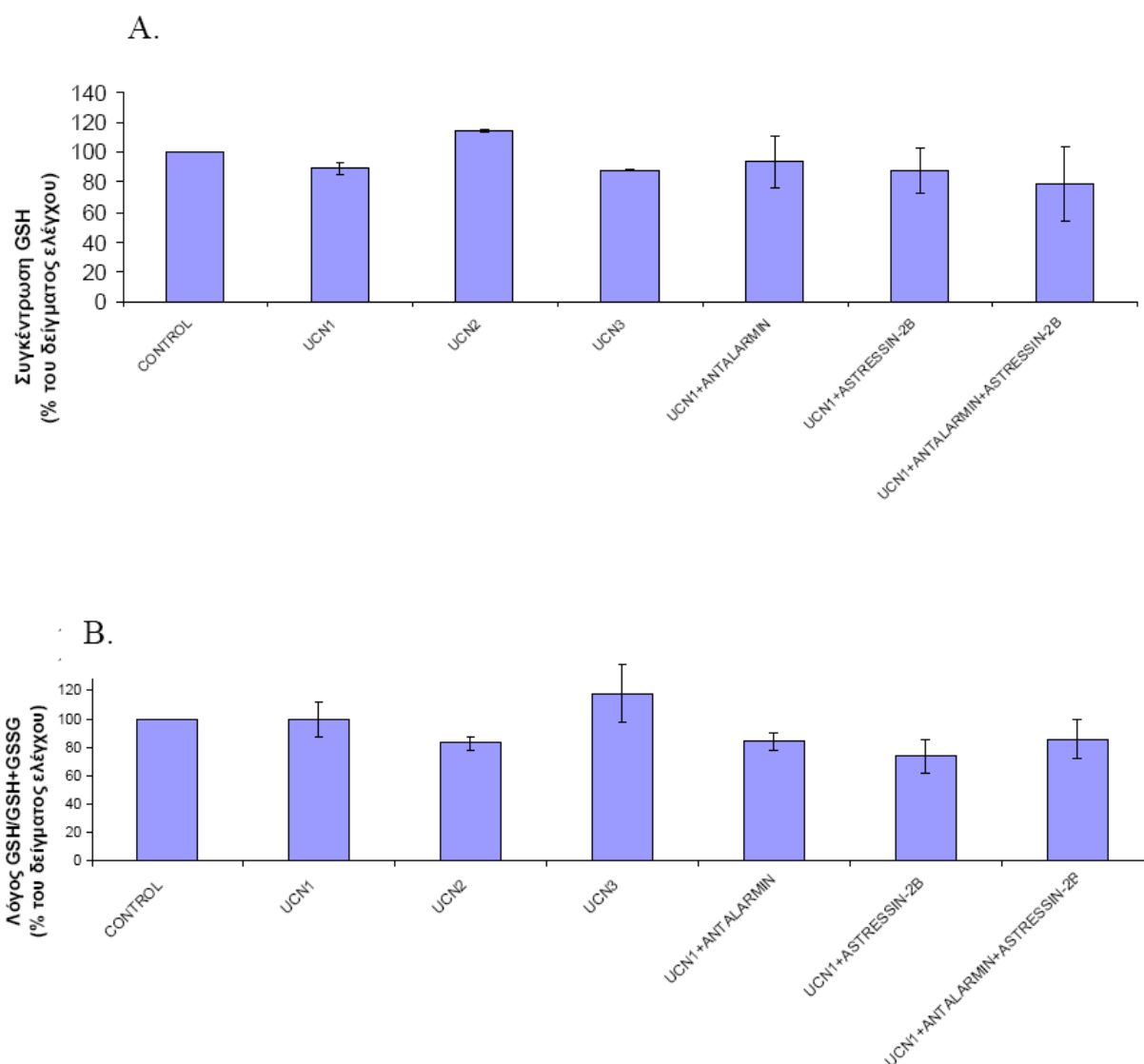


Εικόνα 25 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (control), ή σε DMEM που περιείχε UCNs ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι. (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$, *, $p < 0,05$, ως προς το control)

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG

Όπως φαίνεται στην εικόνα 26Α, οι ουροκορτίνες δεν επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδα της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα ούτε το λόγο GSH/GSH+GSSG (εικόνα 26Β).



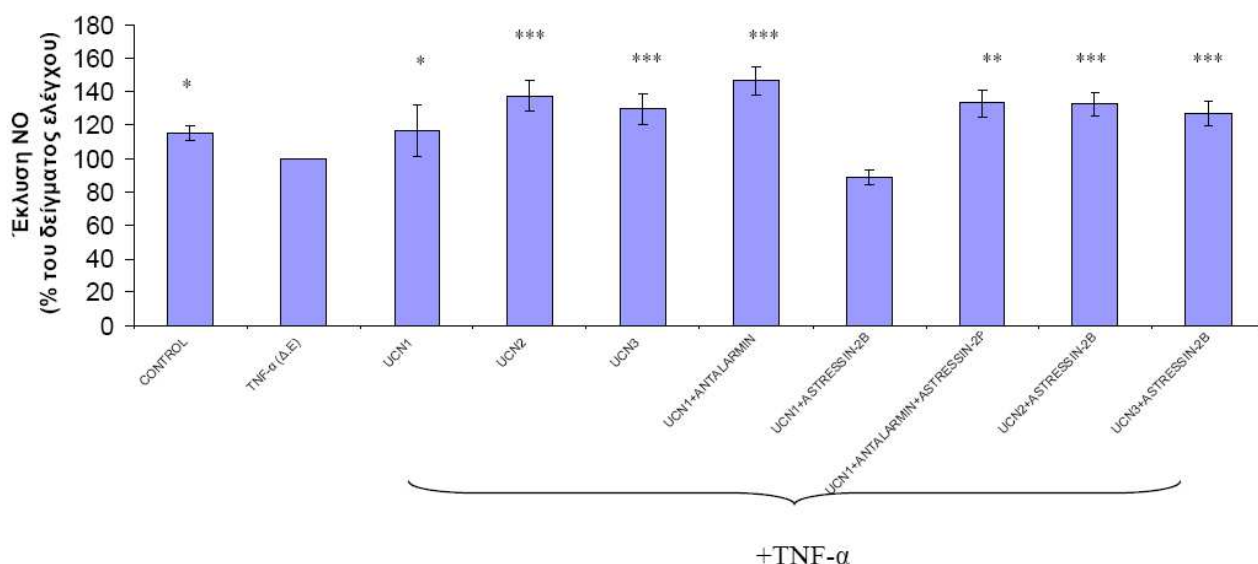
Εικόνα 26 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα της GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επώασθηκαν για 2 ώρες σε DMEM (control), ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι.

ΣΤ. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατόπιν προ-έκθεσης τους σε TNF-α.

i) Επίδραση στην έκλυση του NO

Η προεπάση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τον TNF-α, προκάλεσε σημαντική ελάττωση του εκλυόμενου NO ($p < 0,05$), δράση που εξουδετέρωσαν οι UCN1, 2 και 3, (εικόνα 27). Ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₁ υποδοχέα δεν επηρέασε την ικανότητα της UCN1 να εξουδετερώνει την κατασταλτική δράση του TNF-α στην έκλυση του NO ενώ ο αποκλεισμός του CRHR2 συνοδεύτηκε από εξουδετέρωση της δράσης της UCN1 ($p < 0,05$) όχι όμως της UCN2 και 3.

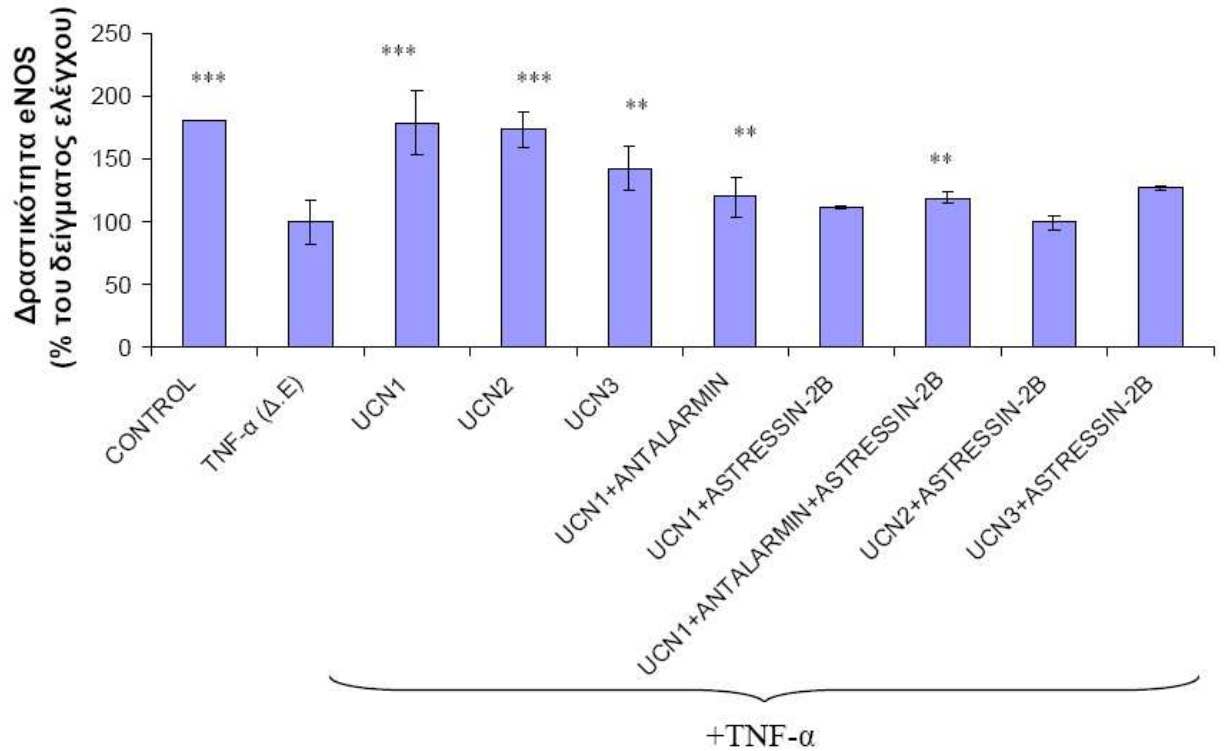


Εικόνα 27 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση NO, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε 20ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάσθηκαν σε επωαστικό υλικό (control) και υπό την επίδραση του TNF-α (Δ.E) απουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.E)).

ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS

Η προκληθείσα σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά την έκθεση τους σε TNF- α ($p < 0,001$) εξουδετερώθηκε όταν προστέθηκε εκάστη των ουροκορτινών (εικόνα 28). Η ανταγωνιστική δράση των ουροκορτινών προς τον TNF- α , όσον αφορά στη δραστικότητα της eNOS, αναστάλθηκε όταν προκλήθηκε εκλεκτικός αποκλεισμός των CRH υποδοχέων, ενδεικτικό ότι η δράση αυτή των ουροκορτινών ασκείται μέσω αμφοτέρων των CRH υποδοχέων.

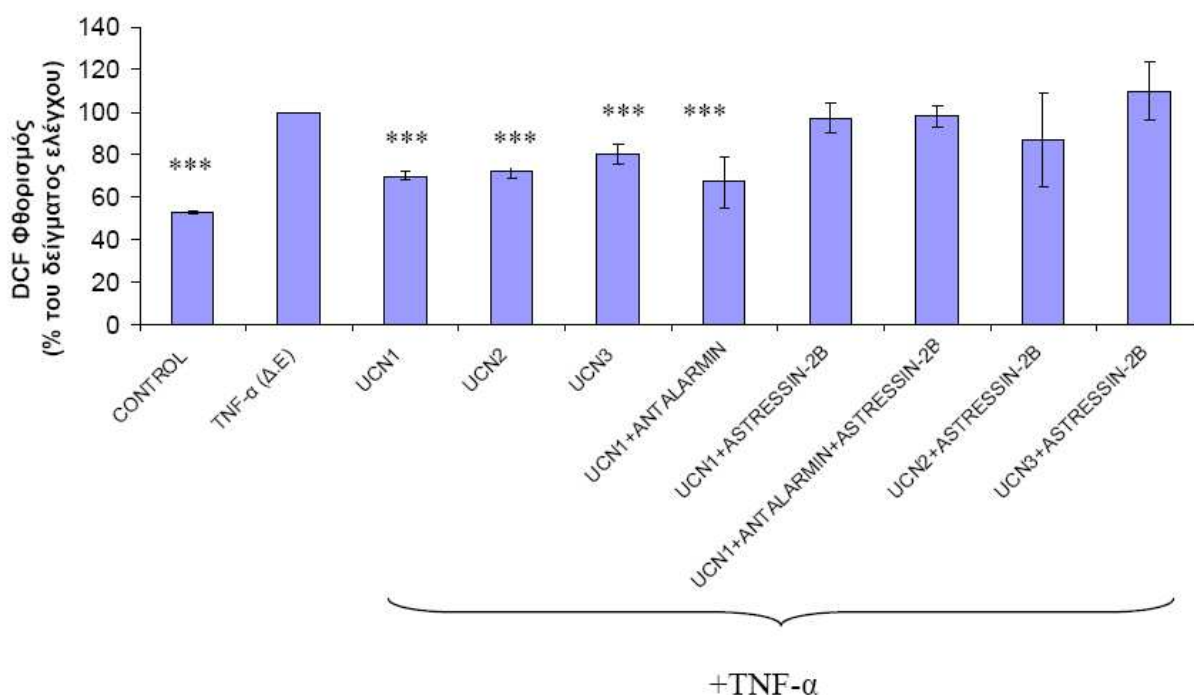


Εικόνα 28 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε 20 ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν σε επωαστικό υλικό (control) και υπό την επίδραση του TNF-α (Δ.Ε) απουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS

Η παρατηρούμενη στην εικόνα 29 προ-οξειδωτική δράση του TNF-α που χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση (κατά 50%) των ROS ($p < 0,001$), εξουδετερώθηκε από τις UCN1, 2 και 3. Η εκλεκτική αναστολή του CRHR2 με astressin-2B, προκάλεσε σημαντική ($p < 0,001$) αναστολή της δράσης όλων των ουροκορτινών ενώ η εκλεκτική αναστολή του CRHR₁ υποδοχέα δεν επηρέασε τη δράση της UCN1 στοιχεία που δείχνουν συμμετοχή του CRHR₂ υποδοχέα στον ανταγωνισμό που ασκούν οι ουροκορτίνες στην προκαλούμενη από τον TNF-α αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

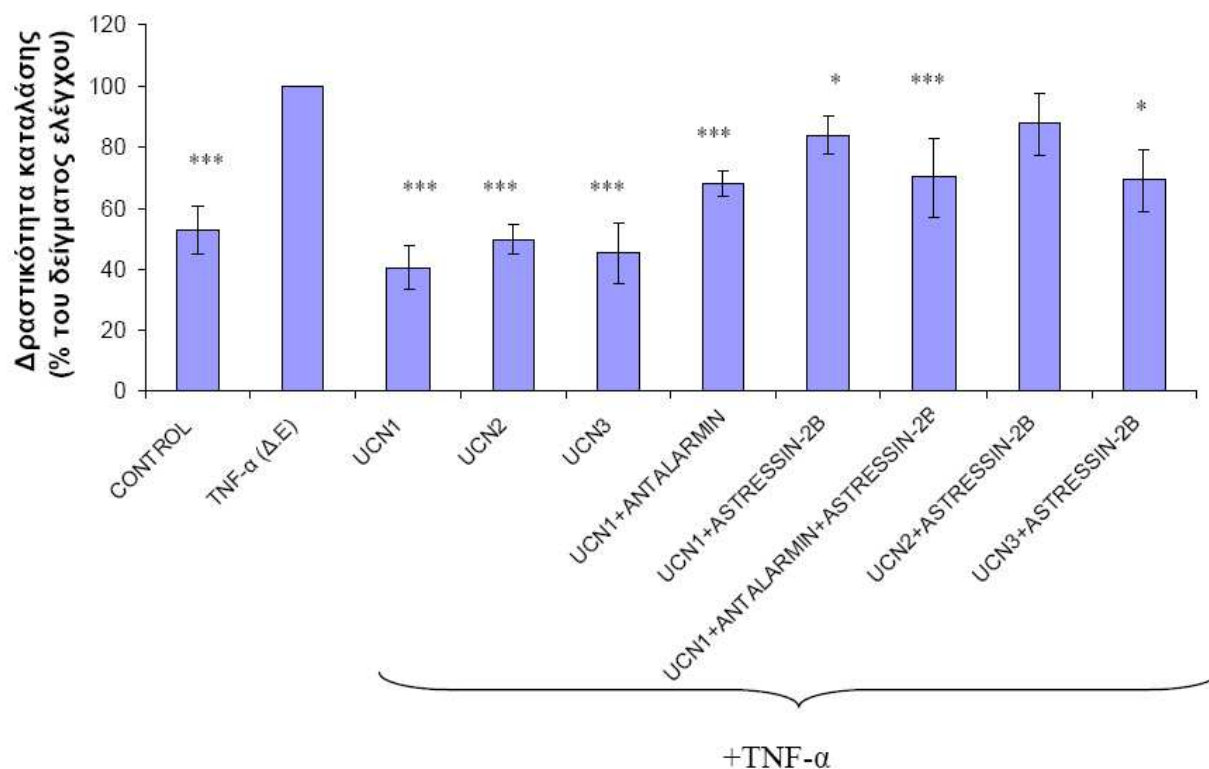


Εικόνα 29 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε 20 ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν σε επωαστικό υλικό (control) και υπό την επίδραση του TNF-α (Δ.Ε) απουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10μM H₂DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι» (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης

Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία του TNF- α , που προαναφέρθηκε (εικόνα 29), συνοδεύτηκε από παράλληλη σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης ($p < 0,001$) (εικόνα 30). Η προκαλούμενη από τον TNF- α αύξηση της ενεργότητας της κατάλασης, εξουδετερώθηκε από ουροκορτίνες 1,2 και 3 με δράση ασκούμενη μέσω του CRHR₂ υποδοχέα αφού ο εκλεκτικός αποκλεισμός μόνο αυτού του υποδοχέα συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου (εικόνα 30). Είναι πιθανό η ενεργοποίηση του ενζυμικού αντιοξειδωτικού συστήματος της καταλάσης να εξαρτάται από το επίπεδο του οξειδωτικού φορτίου.

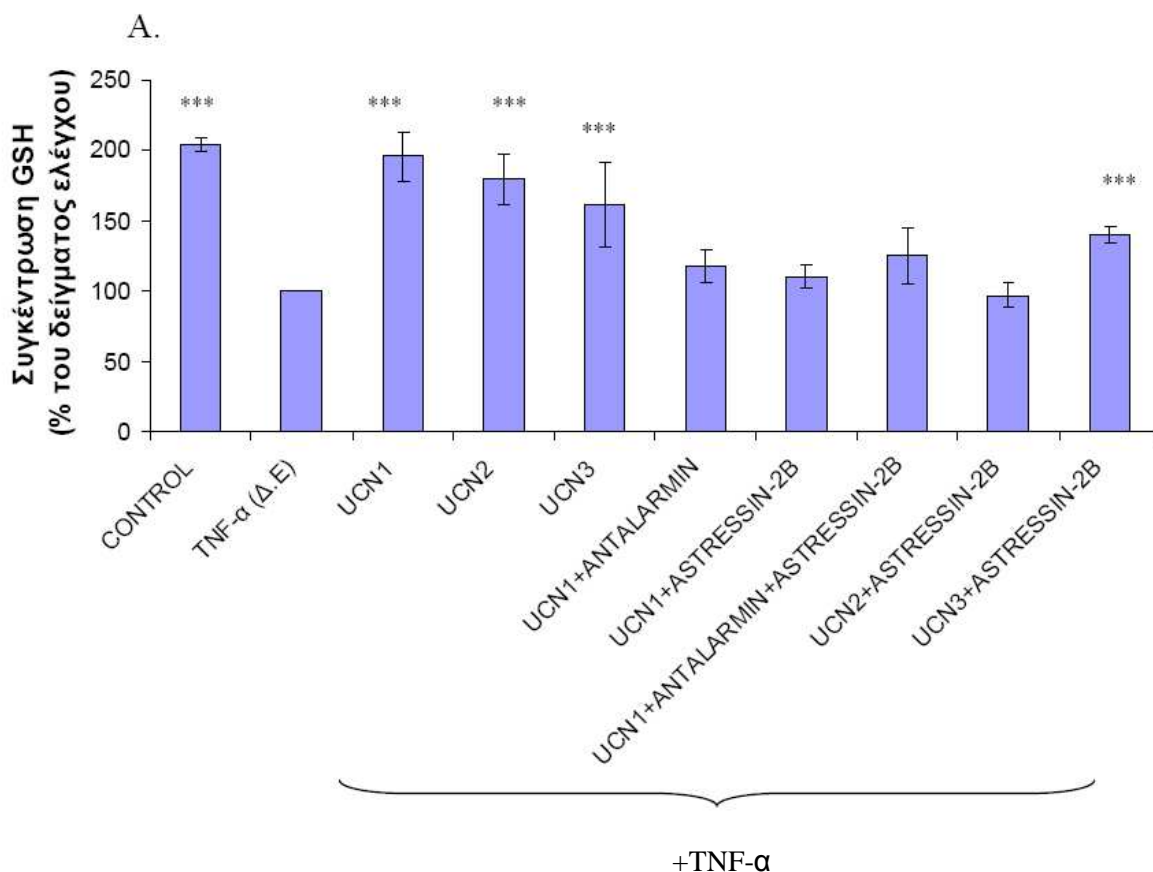


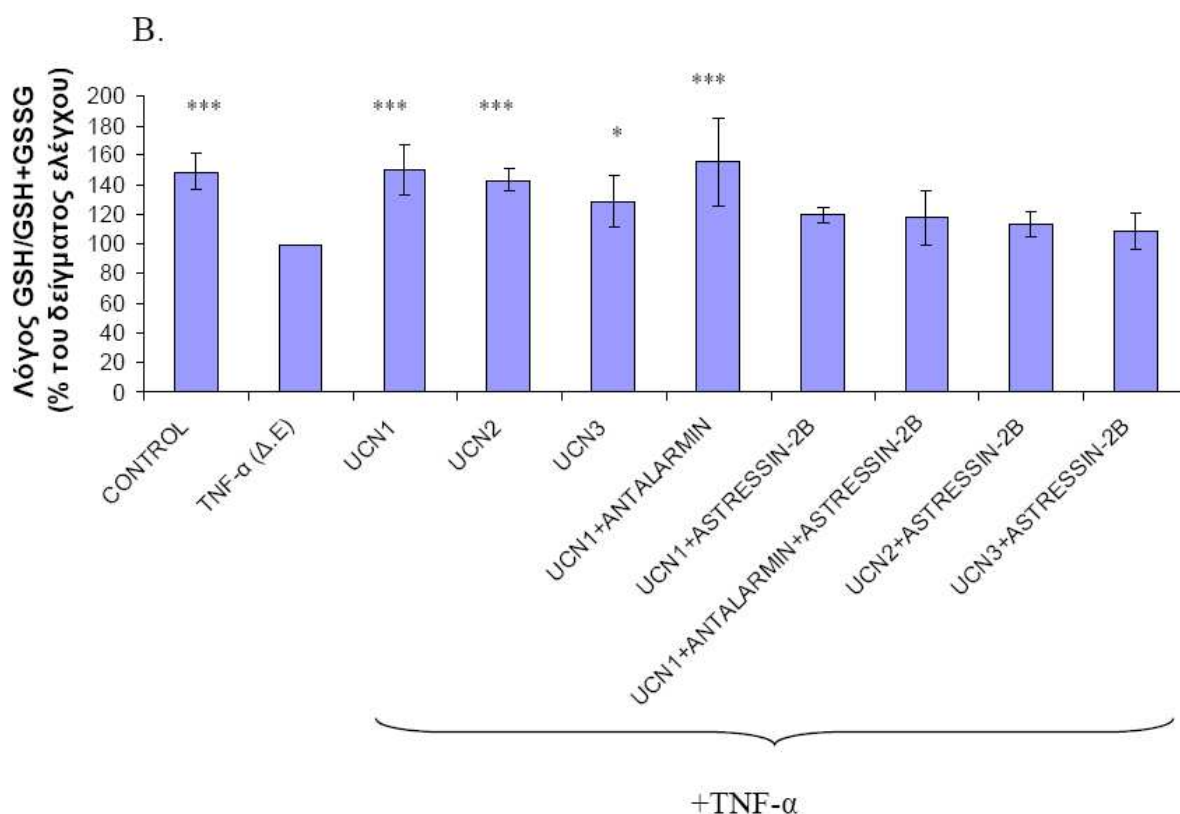
Εικόνα 30 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε 10 ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν σε επωαστικό υλικό (control) και υπό την επίδραση του TNF-α (Δ.Ε) απουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίσθηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι» (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG

Η προεπώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με TNF-α συνοδεύτηκε από σημαντική ελάττωση των επιπέδων της GSH ($p < 0,001$) (εικόνα 31A), δράση που εξουδετερώθηκε από την παρουσία εκάστης των UCN 1, 2 και 3 αφού οι συγκεντρώσεις της GSH επανήλθαν σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του control. Η ανταγωνιστική δράση των ουροκορτινών στην προκαλούμενη σημαντική ελάττωση των επιπέδων της GSH από τον TNF-α φαίνεται ότι ασκείται διαμέσου αμφοτέρων των CRH υποδοχέων αφού ο εκλεκτικός αποκλεισμός τους συνοδεύτηκε από σημαντική ελάττωση των επιπέδων της GSH (εικόνα 31A). Η δράση της UCN1 φαίνεται ότι ασκείται μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων και της UCN2 μέσω του CRHR₂ όπως είναι αυτονόητο. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι δεν ανεστάλλει πλήρως η δράση της UCN3 με την παρουσία του εκλεκτικού αναστολέα του CRHR₂. Αντίστοιχη ήταν οι δράση των ουροκορτινών στο λόγο GSH/GSH+GSSG (εικόνα 31B). Όμως ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₁ υποδοχέα δεν συνοδεύτηκε από αναστολή της δράσης της UCN1 ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στον εκλεκτικό αποκλεισμό του CRHR₂ και για τις τρεις ουροκορτίνες.





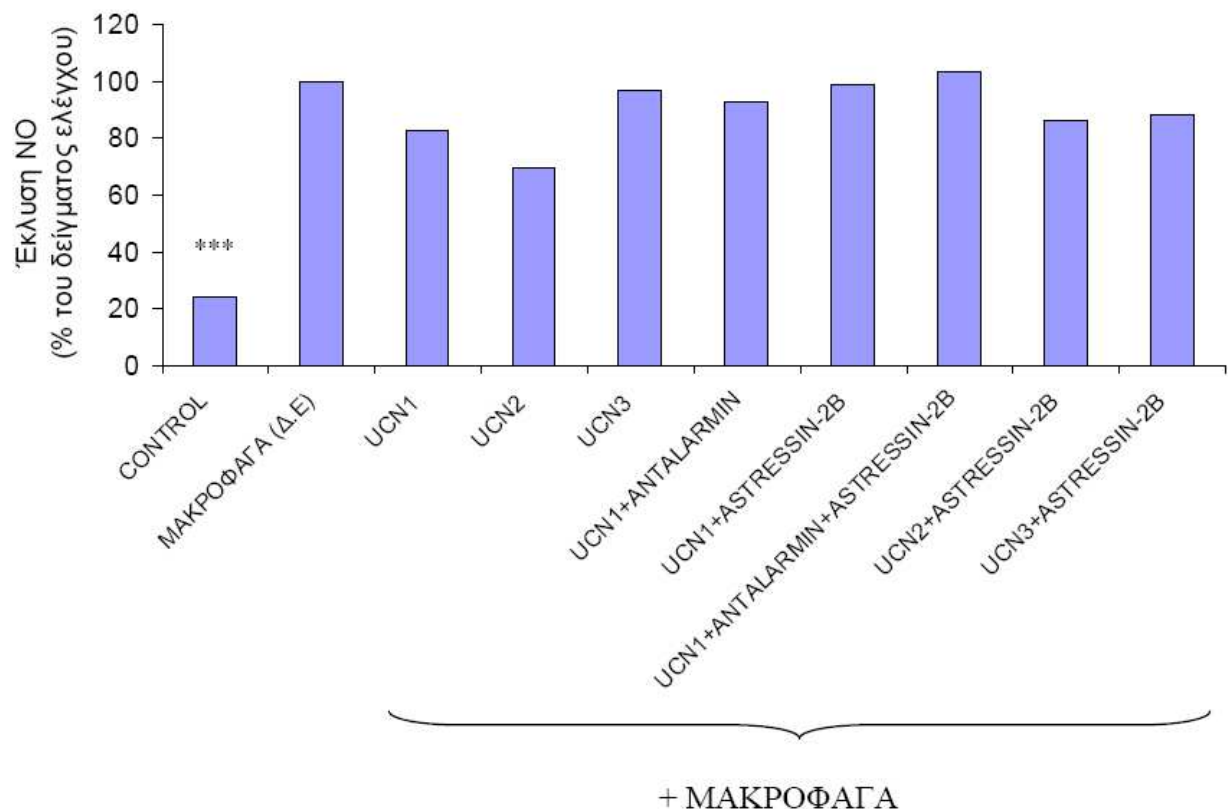
Εικόνα 31 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα της GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατόπιν προέκθεσης των κυττάρων σε TNF-α

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάσθηκαν για 2 ώρες σε 20 ng/ml TNF-α. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο επωαστικό υλικό και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε DMEM, ή σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάσθηκαν σε επωαστικό υλικό (control) και υπό την επίδραση του TNF-α (Δ.Ε) απουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι» (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

Z. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία μακροφάγων

i) Επίδραση στα επίπεδα του εκλυόμενου NO

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της έκλυσης του NO στο υλικό επώασης (εικόνα 32). Οι ουροκορτίνες 1,2 και 3 μόνες τους ή σε συνδυασμό με τους εκλεκτικούς αναστολείς των CRH υποδοχέων δεν μετέβαλαν σημαντικά τις συγκεντρώσεις NO.

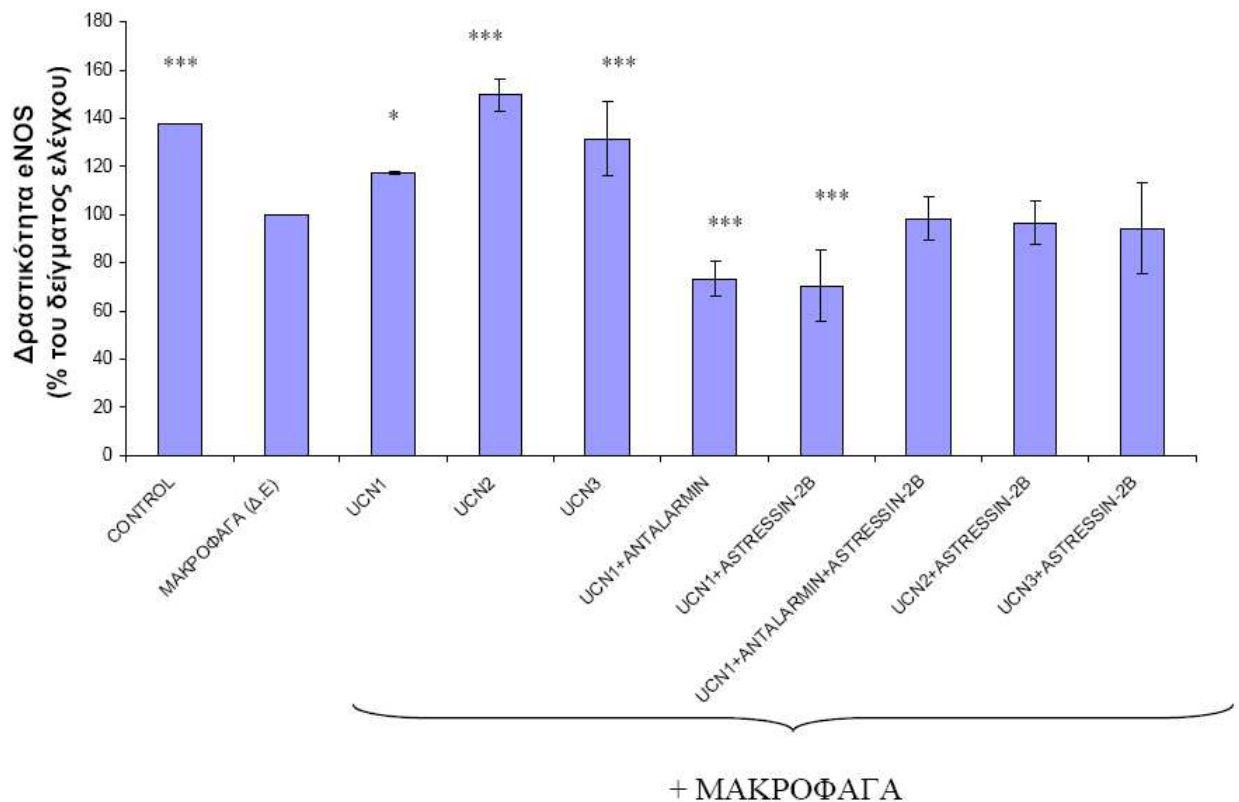


Εικόνα 32 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στην έκλυση NO κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες παρουσία μακροφάγων σε DMEM που περιείχε UCNs ($10^{-7}M$), απουσία και παρουσία antalarmin ($10^{-6}M$), και astressin-2B ($10^{-6}M$). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι (***, $p < 0.001$ ως προς το δείγμα ελέγχου, (Δ.Ε)).

ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS.

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα προκάλεσε σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS, ($p < 0,001$) (εικόνα 33), δράση που εξουδετερώθηκε από τις UCN2 και 3, οι οποίες προκάλεσαν σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου (40%, $p < 0,001$ και 30%, $p < 0,001$, αντίστοιχα), και σε μικρότερο βαθμό από την UCN1 ($p < 0,05$). Ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₂ υποδοχέα ακολουθήθηκε από εξουδετέρωση της δράσης των UCN2 και 3 και σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS που κινήθηκε σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (Δ.Ε).

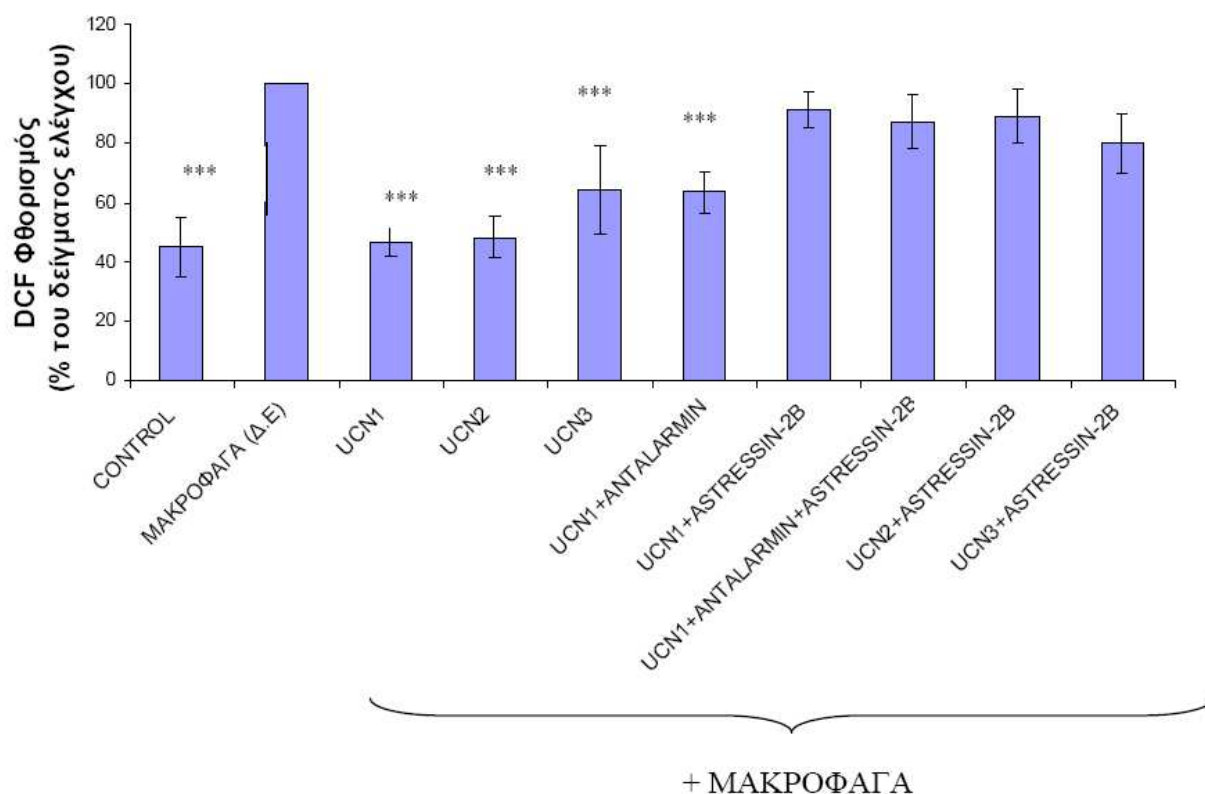


Εικόνα 33 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0.05$, ως προς το δείγμα ελέγχου, (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.

Κατά την συγκαλλιέργεια των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ελεύθερων ριζών στα τελευταία (κατά 60%, $p < 0,001$) σε σύγκριση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν απουσία μακροφάγων (εικόνα 34). Η δράση αυτή των μακροφάγων εξουδετερώθηκε από τις UCN1,2 και 3 οι οποίες επανέφεραν το οξειδωτικό φορτίο σε επίπεδα συγκρίσιμα με το αντίστοιχο των ενδοθηλιακών κυττάρων που επωάστηκαν χωρίς την παρουσία μακροφάγων. Η εξουδετέρωση της δράσης των ουροκορτινών μετά τον εκλεκτικό αποκλεισμό του CRHR₂ υποδοχέα αλλά όχι του CRHR₁ δείχνει ότι η ανταγωνιστική δράση των ουροκορτινών στην προκαλούμενη από τα μακροφάγα αύξηση του οξειδωτικού φορτίου ασκείται διαμέσου του CRHR₂ υποδοχέα.

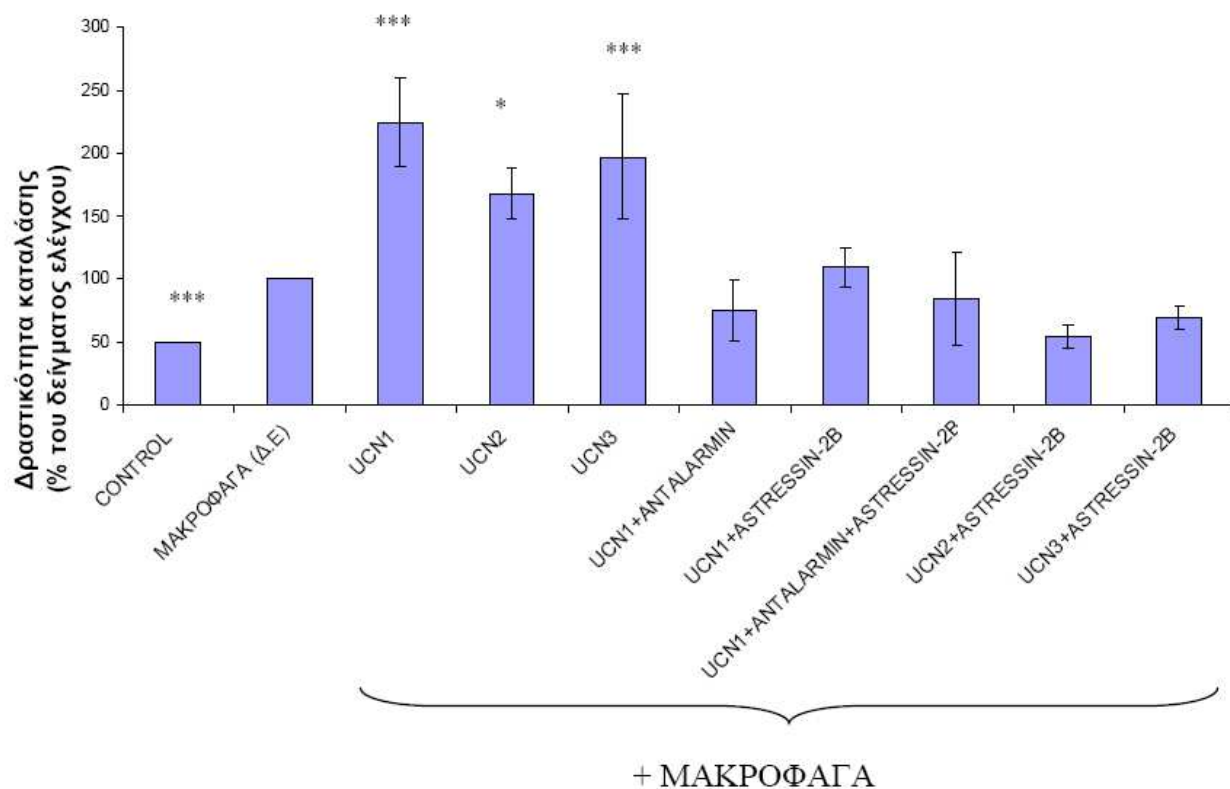


Εικόνα 34 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επώασθηκαν για 2 ώρες, παρουσία μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επώαστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κύτταρα επώαστηκαν με $10\mu\text{M}$ H₂DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα ελέγχου, (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης.

Η παρουσία των μακροφάγων, κατά την συγκαλιέργεια τους με ενδοθηλιακά κύτταρα, προκάλεσε σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα ($p < 0.001$) (εικόνα 35), δράση που επιτάθηκε σημαντικά όταν στο επωαστικό υλικό προστέθηκαν οι ουροκορτίνες 1,2 και 3. Σε σχέση με το δείγμα ελέγχου οι UCN1 , 2 και 3 προκάλεσαν σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης ($p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,001$ αντίστοιχα) που ήταν κατα 70%, τουλάχιστον, μεγαλύτερη (εικόνα 35). Η επάνοδος της δραστικότητας της καταλάσης σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (Δ.Ε) μετά τον εκλεκτικό αποκλεισμό των CRH υποδοχέων, υποδηλώνει ότι η διεγερτική δράση των ουροκορτινών στην δραστικότητα της καταλάσης ασκείται μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων.

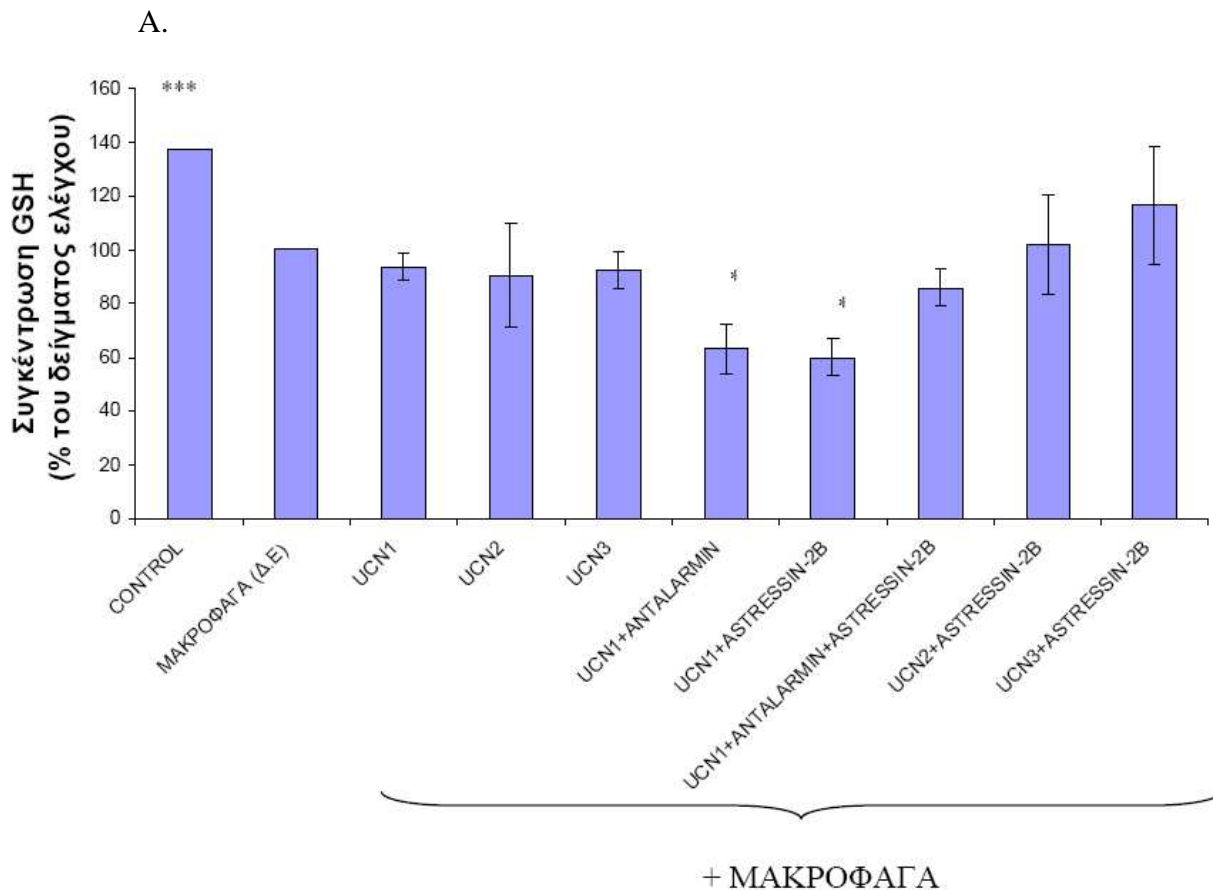


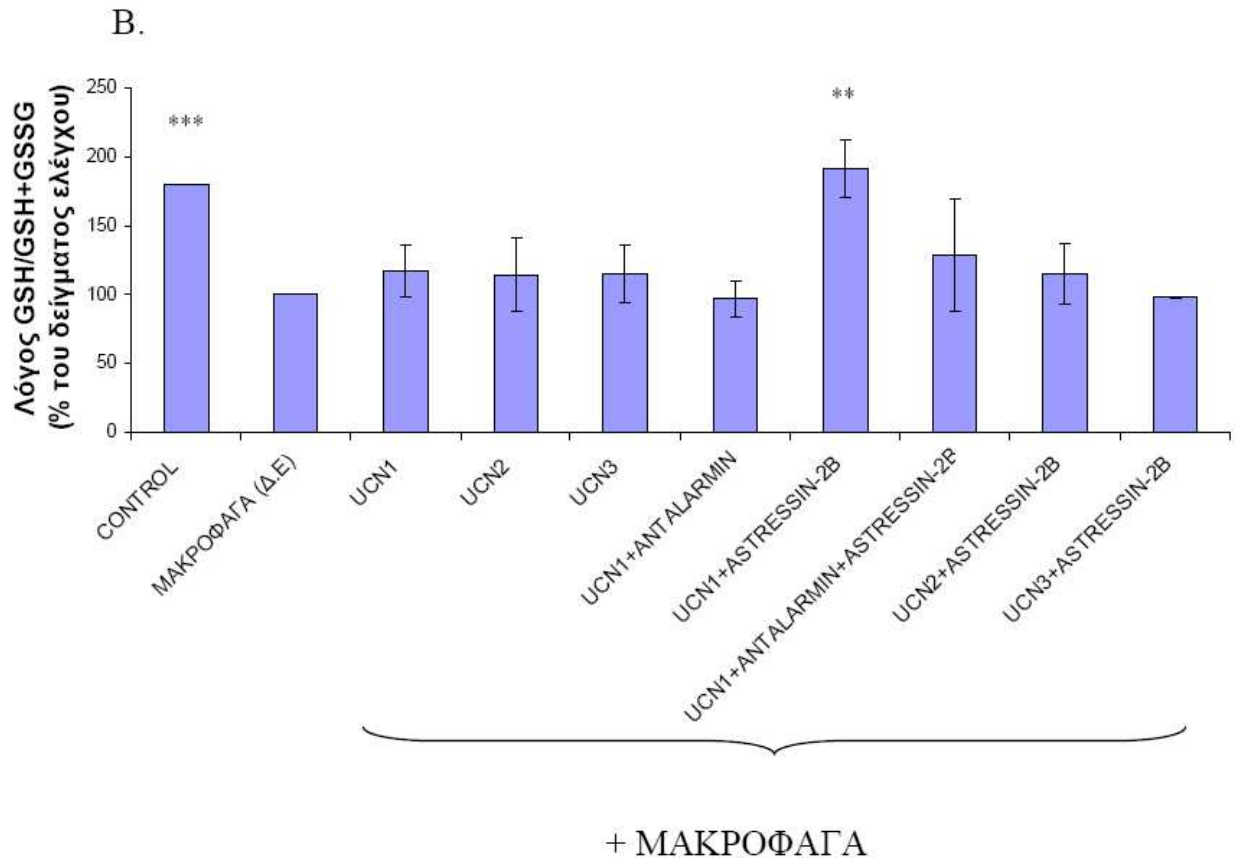
Εικόνα 35 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG.

Τα επίπεδα της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσίασαν σημαντική ελάττωση κατά την συγκαλλιέργεια τους με μακροφάγα, ($p < 0,001$) (εικόνα 36A), συγκρινόμενα με τα επίπεδα του ενζύμου στα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε απλό επωαστικό υλικό. Οι συγκεντρώσεις της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά όταν στη συγκαλλιέργεια προστέθηκαν οι ουροκορτινες 1, 2 και 3 ενώ παρουσίασαν σημαντική μείωση ($p < 0,05$) όταν παρουσία της UCN1 έγινε εκλεκτικός αποκλεισμός των CRHR₁ και CRHR₂ υποδοχέων, με antalarmin ή astresin-2B, αντίστοιχα, αλλά όχι και όταν συνυπήρχαν και οι δύο αναστολείς (εικόνα 36A). Παρόμοιες ήταν οι παρατηρήσεις όσον αφορά την επίδραση των UCN1, 2 και 3 στο λόγο GSH/GSH+GSSG. Σε αντίθεση με τα επίπεδα της GSH ο λόγος GSH/GSH+GSSG αυξήθηκε σημαντικά όταν αποκλείστηκε ο CRHR₂ υποδοχέας παρουσία της UCN1 ($p < 0,01$) (εικόνα 36B).





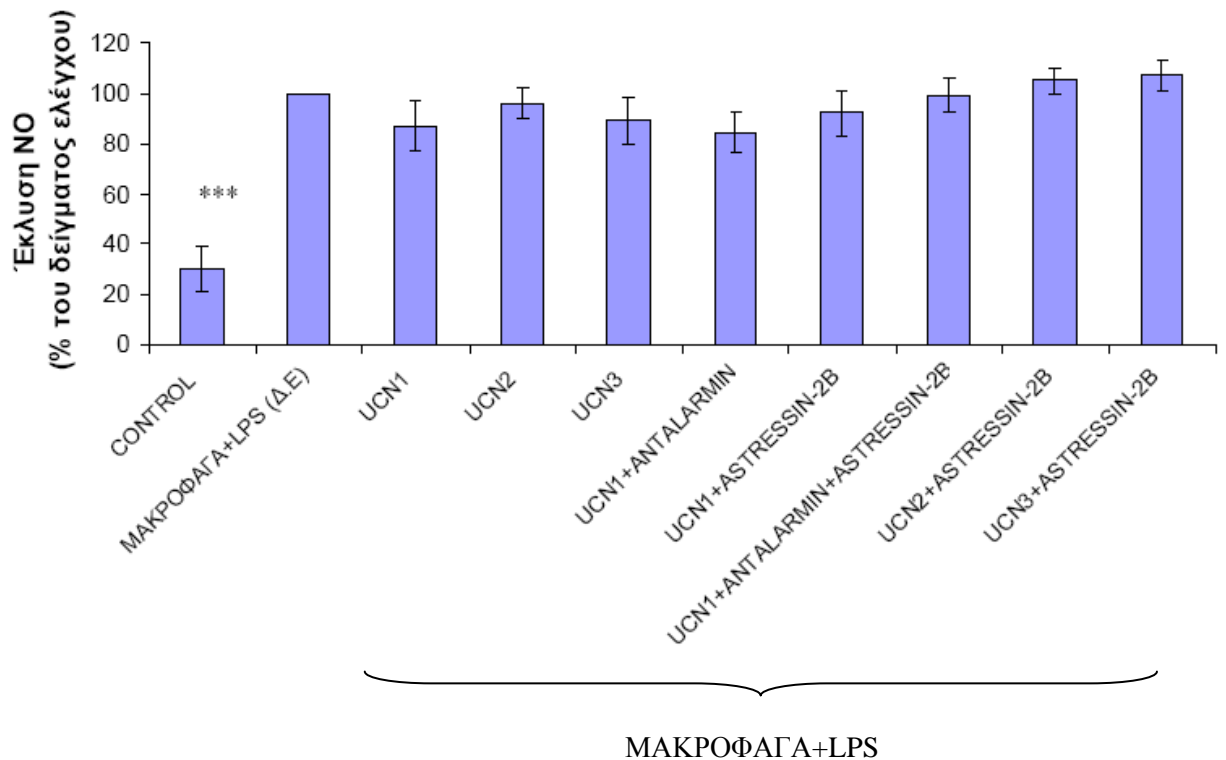
Εικόνα 36 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι. (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

Η. Μελέτη της επίδρασης των ουροκορτινών και του ρόλου των CRH υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία διεγερμένων με LPS μακροφάγων

i) Επίδραση στην έκλυση του NO

Η συγκαλλιέργεια μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με LPS και ενδοθηλιακών κυττάρων συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της παραγωγής του NO σε σύγκριση με το control ($p < 0,001$) η οποία δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της CRH μόνης ή σε συνδυασμό με τους εκλεκτικούς αναστολείς των υποδοχέων της (εικόνα 37).

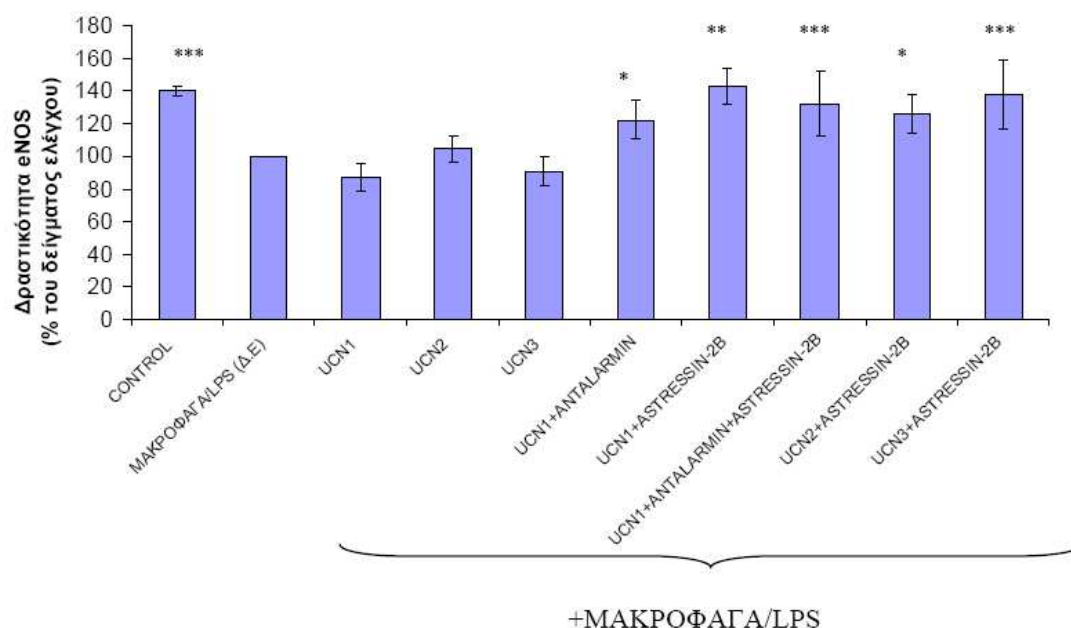


Εικόνα 37 : Η επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRHR στην έκλυση NO, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS-διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα υπερκείμενα επωαστικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα NO, όπως περιγράφεται στο τμήμα υλικά και μέθοδοι. (***, $p < 0.001$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

ii) Επίδραση στη δραστικότητα της eNOS.

Η συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS-διεγερμένα μακροφάγα προκάλεσε σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS, ($p < 0,001$) (εικόνα 38), δράση που δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία των UCN1, 2 και 3. Αντίθετα, ο εκλεκτικός αποκλεισμός των CRH-υποδοχέων ακολουθήθηκε από σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου η οποία επανήλθε σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα των ενδοθηλιακών κυττάρων που επωάστηκαν χωρίς την παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων.

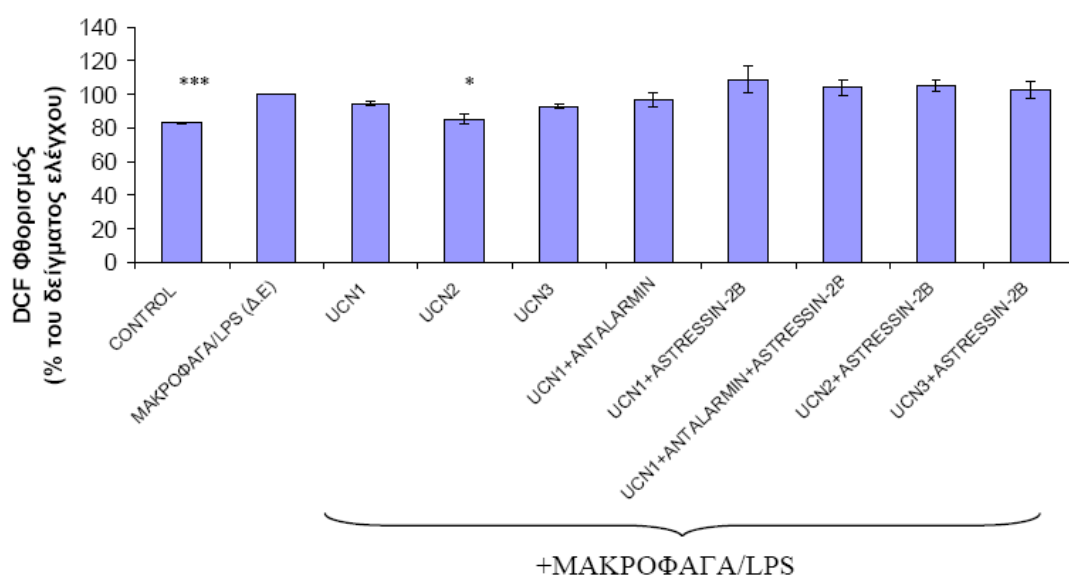


Εικόνα 38 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της eNOS, κατά τη συγκαλλιέργεια των των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της eNOS προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, **, $p < 0,01$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iii) Επίδραση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS.

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα στη συγκαλλιέργεια τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα αύξησαν το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο των τελευταίων (εικόνα 39). Η UCN1 όπως και η UCN3, δεν επηρέεσαν σημαντικά τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS που προκλήθηκαν από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, σε αντίθεση με την UCN2 η οποία τα ελάττωσε σημαντικά ($p < 0,05$). Η δράση της UCN2 εξουδετερώθηκε μετά τον εκλεκτικό αποκλεισμό του φυσικού της υποδοχέα (CRHR₂).

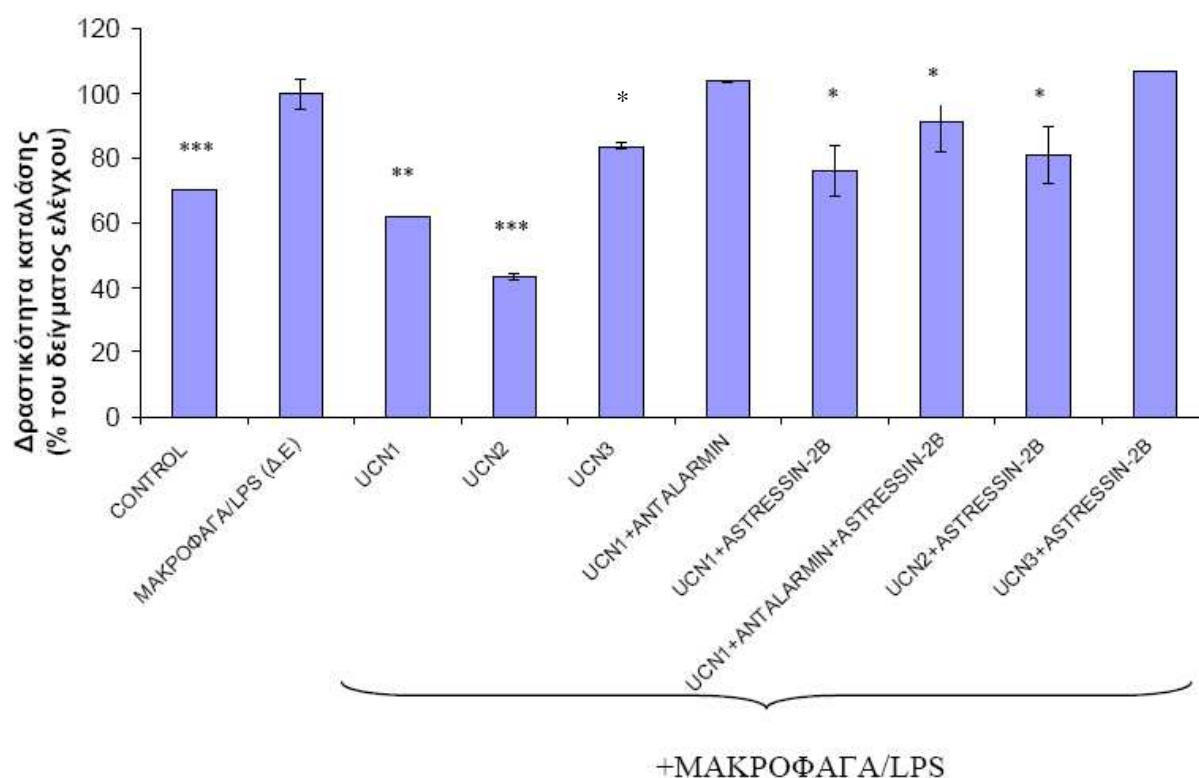


Εικόνα 39 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), ή σε DMEM παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κύτταρα επωάστηκαν με $10\mu\text{M}$ H2DCF-DA και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου (Δ.Ε)).

iv) Επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης.

Η παρουσία των LPS-διεγερμένων μακροφάγων, κατά την συγκαλιέργεια τους με ενδοθηλιακά κύτταρα, συνδυάστηκε με σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης στα τελευταία ($p < 0.001$) (εικόνα 40). Οι ουροκορτίνες 1, 2 και 3 προκάλεσαν σημαντική ελάττωση της δραστικότητας του ενζύμου ($p < 0.001$) με ισχυρότερη τη δράση της UCN2. Ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₁ υποδοχέα συνοδεύτηκε από επάνοδο της δραστικότητας της καταλάσης στα επίπεδα του δείγματος ελέγχου όχι όμως και ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₂ υποδοχέα που ακολουθήθηκε από αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης σημαντικά όμως υπολειπόμενης του δείγματος ελέγχου (Δ.Ε) ($p < 0,05$) (εικόνα 40), υποδηλώνοντας συμμετοχή αμοιτέρων των υποδοχέων, με ισχυρότερη εκείνη του CRHR₁ υποδοχέα, στη ρύθμιση της δραστικότητας της καταλάσης από τις ουροκορτίνες.

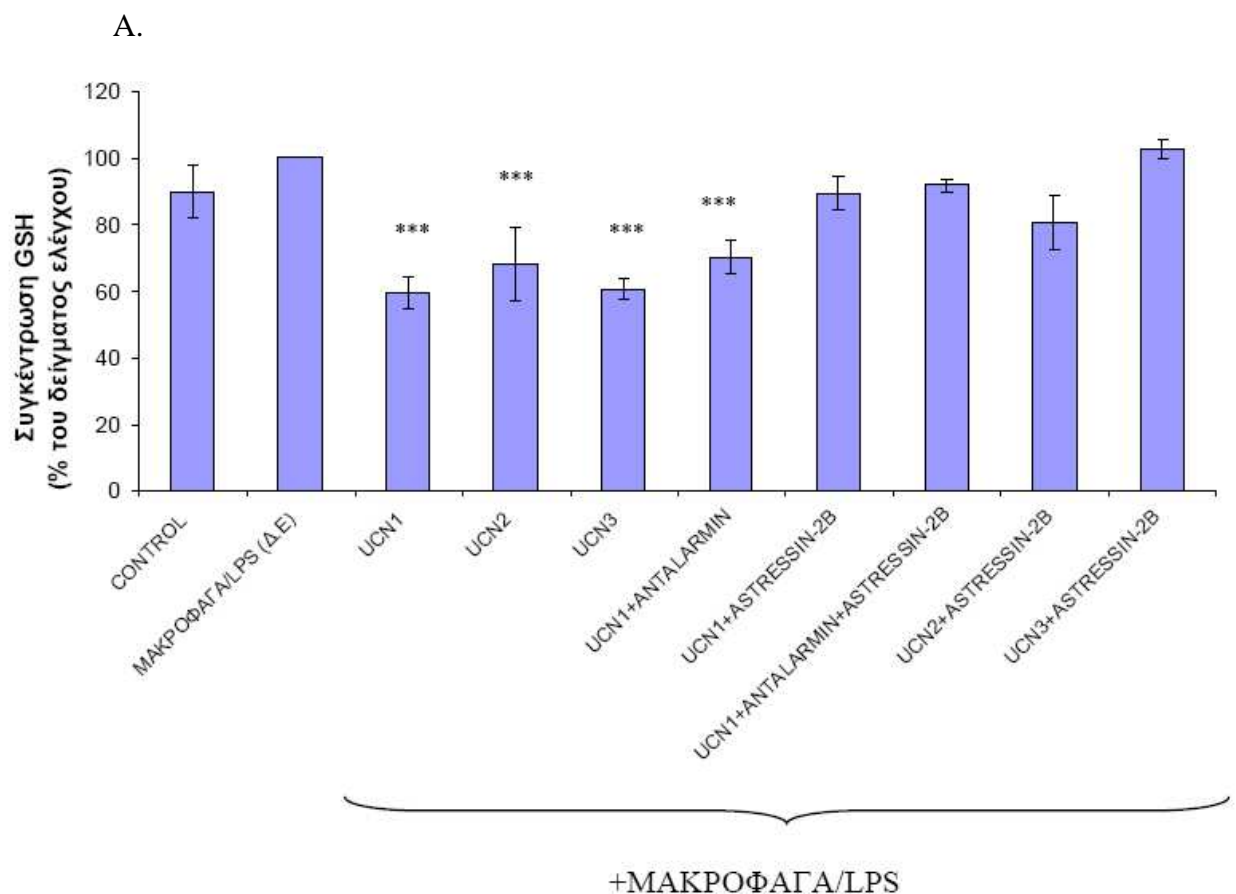


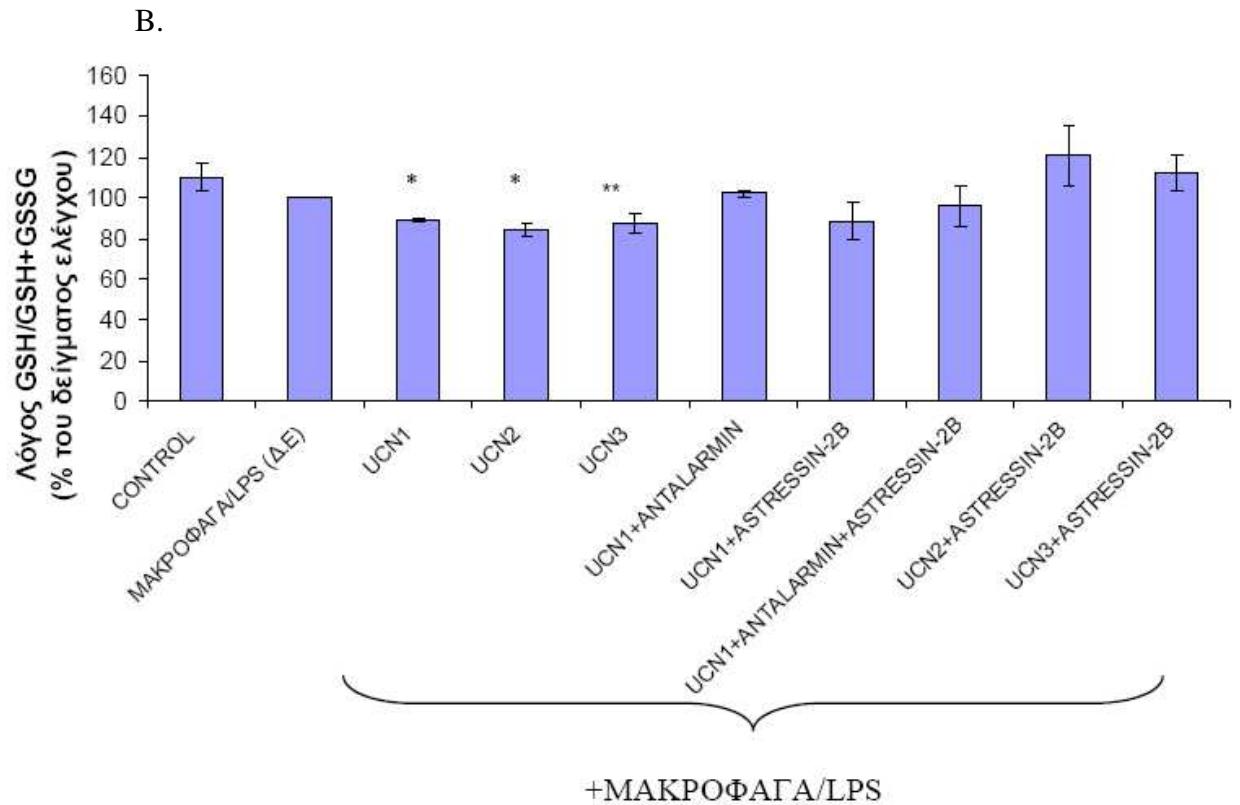
Εικόνα 40 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων στη δραστικότητα της καταλάσης, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRH υποδοχέων. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (***, $p < 0.001$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου, (Δ.Ε)).

ν) Επίδραση στα επίπεδα της GSH και το λόγο GSH/GSH+GSSG.

Τα επίπεδα της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν επηρεάστηκαν σημαντικά όταν αυτά συγκαλλιεργήθηκαν με LPS-διεγερμένα μακροφάγα. Αντίθετα, η παρουσία των ουροκορτινών 1, 2 και 3, στην συγκαλλιέργεια, προκάλεσε σημαντική ελάττωση των συγκεντρώσεων της GSH ($p < 0,001$) (εικόνα 41A). Ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₁ υποδοχέα αύξησε, αλλά όχι σημαντικά, τη συγκέντρωση της GSH ενώ ο εκλεκτικός αποκλεισμός του CRHR₂ υποδοχέα ανέστειλε πλήρως την κατασταλτική δράση των ουροκορτινών στα επίπεδα της GSH υποδηλώνοντας ότι αυτή ασκείται κυρίως διαμέσου του CRHR₂ υποδοχέα. Παρόμοια ήταν η επίδραση των ουροκορτινών στο GSH/GSH+GSSG (εικόνα 41B).





Εικόνα 41 : Επίδραση των UCN1, 2 και 3 και των εκλεκτικών αναστολέων των CRH υποδοχέων α) στα επίπεδα GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με LPS- διεγερμένα μακροφάγα.

Κατόπιν 24ωρης επώασης σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες, παρουσία LPS-διεγερμένων μακροφάγων, σε DMEM που περιείχε UCNs (10^{-7} M), απουσία και παρουσία antalarmin (10^{-6} M), και astressin-2B (10^{-6} M). Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν με απλό επωαστικό υλικό (control) και σε συγκαλλιέργεια με LPS-διεγερμένα μακροφάγα (Δ.Ε) χωρίς την παρουσία των υπόλοιπων ανταγωνιστών και αγωνιστών των CRHR. Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG όπως περιγράφεται στο τμήμα «υλικά και μέθοδοι». (**, $p < 0,01$, *, $p < 0,05$, ως προς το δείγμα ελέγχου, (Δ.Ε)).

4. Σύνοψη αποτελεσμάτων

	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
CRH	E	E	A	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
CRHR₁	+	+	+	+	-	-
CRHR₂	+	+	-	+	-	-

Πίνακας 1. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 1 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Α συνάγεται ότι η CRH επέδρασε ανασταλτικά στη δραστικότητα του υπεύθυνου ενζύμου eNOS και κατά συνέπεια στην έκλυση NO, ενώ ταυτόχρονα αύξησε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του οξειδωτικού φορτίου. Η παράλληλη αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου καταλάσης, υποδηλώνει ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που όμως δεν ήταν εμφανής στο σύστημα της GSH. Οι ανωτέρω δράσεις φαίνεται ότι ασκήθηκαν μέσω αμφοτέρων των CRH υποδοχέων με εξαίρεση την επαγωγή του οξειδωτικού φορτίου όπου η δράση της CRH φαίνεται να ασκήθηκε αποκλειστικά δια του CRHR₁.

TNF-α Προ- επώαση	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
TNF-α	E	E	A	A	E	E
TNF-α CRH	A	A	E	E	A	A
CRHR ₁	+	+	+	+	+	+
CRHR ₂	+	+	+	-	-	-

Πίνακας 2. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατόπιν προεπώασης με TNF-α (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 2 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.B και αφορά στην επίδραση της CRH σε κύτταρα που έχουν προεπώασθεί με TNF-α. Υπό την επίδραση του TNF-α προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS και των συγκεντρώσεων NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG.

Η CRH ελάττωσε σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο που προκλήθηκε από τον TNF-α, όπως επίσης και τη δραστικότητα της καταλάσης, τα οποία επανέφερε σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα προ της διέγερσης των κυττάρων. Αντίστοιχα αύξησε τη δραστικότητα της eNOS και τη συγκέντρωση του NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις της CRH ασκήθηκε μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων με εξαίρεση την καταλάση και την GSH όπου φαίνεται να χρησιμοποιείται μόνο ο CRHR₁ υποδοχέας.

Συγκαλλιέργεια Μακροφάγων- Ενδοθηλιακών κυττάρων	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
Μακροφάγα	A	E	A	A	E	E
Μακροφάγα+CRH	ΧΣΜ	A	E	A	A	A
CRHR ₁	-	+	+	+	-	+
CRHR ₂	-	+	+	+	+	+

Πίνακας 3. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατά τη συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 3 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Γ και αφορά στην επίδραση της CRH σε ενδοθηλιακά κύτταρα που συγκαλλιιεργήθηκαν με μακροφάγα. Υπό την επίδραση των μακροφάγων προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε σύγκριση με ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία μακροφάγων.

Η CRH ελάττωσε σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο που προκλήθηκε από τα μακροφάγα, ενώ ταυτόχρονα επέτεινε την ήδη αυξημένη δραστικότητα της καταλάσης, ενώ επανέφερε στα τη δραστικότητα της eNOS, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία καλλιιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία μακροφάγων. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις της CRH ασκήθηκαν μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων.

Συγκαλλιέργεια Εν. Μακροφάγων- Ενδοθηλιακών κυττάρων	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
Εν. Μακροφάγα	A	E	A	A	E	E
Εν.Μακροφάγα+CRH	ΧΣΜ	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ	A	A
CRHR ₁	-	+	+	+	+	+
CRHR ₂	-	+	+	+	+	+

Πίνακας 4. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατά τη συγκαλλιέργεια με ενεργοποιημένα μακροφάγα (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 4 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Δ και αφορά στην επίδραση της CRH σε ενδοθηλιακά κύτταρα που συγκαλλιεργήθηκαν με ενεργοποιημένα μακροφάγα. Υπό την επίδραση των ενεργοποιημένων με LPS μακροφάγων προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε σύγκριση με ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία διεγερμένων μακροφάγων.

Η CRH δεν επηρέασε σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο και την αυξημένη δραστικότητα της καταλάσης που προκλήθηκε από τα διεγερμένα μακροφάγα, ενώ αύξησε τη δραστικότητα της eNOS, τα επίπεδα της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG και τα επανέφερε σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις της CRH ασκήθηκαν μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων.

	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
UCN1	A	A	ΧΣΜ	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
UCN2	A	A	ΧΣΜ	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
UCN3	A	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ	ΧΣΜ	ΧΣΜ
CRHR ₁	-	-	-	-	-	-
CRHR ₂	+	+	-	+	-	-

Πίνακας 5. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 5 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Ε συνάγεται ότι οι UCN1, 2 και 3 επέδρασαν επαγωγικά στη δραστικότητα του ενζύμου eNOS και κατά συνέπεια στην έκλυση NO, ενώ ταυτόχρονα δε μετέβαλλαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του οξειδωτικού φορτίου συγκριτικά με το control. Είναι ενδιαφέρον ότι η UCN1 και UCN2 αυξάνουν τη δραστικότητα της καταλάσης, σε αντίθεση με την UCN3 που δεν την επηρέασε. Η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δεν είναι εμφανής στο σύστημα της GSH. Οι ανωτέρω δράσεις φαίνεται ότι ασκήθηκαν μέσω αποκλειστικά του CRHR₂.

TNF-α Προεπώαση	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
TNF-α	E	E	A	A	E	E
TNF-α+UCN1	A	A	E	E	A	A
TNF-α+UCN2	A	A	E	E	A	A
TNF-α+UCN3	A	A	E	E	A	A
CRHR ₁	-	+	-	-	+	-
CRHR ₂	+	+	+	+	+	+

Πίνακας 6. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατόπιν προεπώασης με TNF-α (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 6 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.ΣΤ και αφορά στην επίδραση των UCN1, 2 και 3 σε κύτταρα που έχουν προεπωασθεί με TNF-α. Υπό την επίδραση του TNF-α προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS και των συγκεντρώσεων NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG.

Οι UCN1, 2 και 3 ελάττωσαν σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο που προκλήθηκε από τον TNF-α, όπως επίσης και τη δραστικότητα της καταλάσης, τα οποία επανέφεραν σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα προ της διέγερσης των κυττάρων. Αντίστοιχα αύξησε τη δραστικότητα της eNOS και τη συγκέντρωση του NO, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις των UCN1, 2 και 3 ασκήθηκαν μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων για την UCN1 και μέσω του CRHR₂ για τις UCN2 και 3.

Συγκαλλιέργεια Μακροφάγων- Ενδοθηλιακών κυττάρων	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
Μακροφάγα	A	E	A	A	E	E
Μακροφάγα+UCN1	ΧΣΜ	A	E	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
Μακροφάγα+UCN2	ΧΣΜ	A	E	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
Μακροφάγα+UCN3	ΧΣΜ	A	E	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
CRHR ₁	-	+	-	+	-	-
CRHR ₂	-	+	+	+	+	+

Πίνακας 7. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατά τη συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 7 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Ζ και αφορά στην επίδραση των UCN1, 2 και 3 σε ενδοθηλιακά κύτταρα που συγκαλλιιεργήθηκαν με μακροφάγα. Υπό την επίδραση των μακροφάγων προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS, της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε σύγκριση με ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία μακροφάγων.

Οι UCN1, 2 και 3 ελάττωσαν σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο που προκλήθηκε από τα μακροφάγα, ενώ ταυτόχρονα επέτειναν την ήδη αυξημένη δραστικότητα της καταλάσης, ενώ επανέφεραν τη δραστικότητα της eNOS σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία καλλιιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία μακροφάγων. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG παρουσία και των τριών ουροκορτινών. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις των UCN1, 2 και 3 ασκήθηκαν μέσω του CRHR₂ ενώ η UCN1 έδρασε μέσω και

των δύο CRH υποδοχέων στην επαγωγή της δραστικότητας της eNOS και της καταλάσης.

Συγκαλλιέργεια Εν.Μακροφάγων- Ενδοθηλιακών κυττάρων	Έκλυση NO	Δραστικότητα eNOS	DCF Φθορισμός	Δραστικότητα καταλάσης	Συγκέντρωση GSH	Λόγος GSH/GSH+GSSG
--	--------------	----------------------	------------------	---------------------------	--------------------	-----------------------

Εν. Μακροφάγα	A	E	A	A	ΧΣΜ	ΧΣΜ
Εν. Μακροφάγα+UCN1	ΧΣΜ	ΧΣΜ	E	E	E	E
Εν. Μακροφάγα+UCN2	ΧΣΜ	ΧΣΜ	E	E	E	E
Εν. Μακροφάγα+UCN3	ΧΣΜ	ΧΣΜ	E	E	E	E
CRHR ₁	-	-	+	+	-	+
CRHR ₂	-	+	+	+	+	+

Πίνακας 8. Σύνοψη αποτελεσμάτων της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 κατά τη συγκαλλιέργεια με ενεργοποιημένα μακροφάγα (E: σημαντική ελάττωση, A: σημαντική αύξηση, ΧΣΜ: χωρίς σημαντική μεταβολή, +: συμμετοχή, -: μη συμμετοχή).

Από τον πίνακα 8 που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της ενότητας 3.Η και αφορά στην επίδραση των UCN1, 2 και 3 σε ενδοθηλιακά κύτταρα που συγκαλλιιεργήθηκαν με ενεργοποιημένα μακροφάγα. Υπό την επίδραση των ενεργοποιημένων με LPS μακροφάγων προκλήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα σημαντική αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της ενεργότητας της καταλάσης με ταυτόχρονη ελάττωση της δραστικότητας της eNOS. Παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων, η GSH και ο λόγος GSH/GSH+GSSG δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία διεγερμένων μακροφάγων.

Οι UCN1, 2 και 3 δεν επηρέασαν σημαντικά τη δραστικότητα της eNOS, ενώ ελάττωσαν σημαντικά το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο, τη δραστικότητα της καταλάσης, τα επίπεδα της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία καλλιιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων. Στις περιγραφείσες συνθήκες οι δράσεις των UCN1, 2 και 3 ασκήθηκαν μέσω του CRHR₂, ενώ τα επίπεδα των ROS, η δραστικότητα καταλάσης και ο λόγος GSH/GSH+GSSG περιέλαβαν τη συμμετοχή αμφοτέρων των CRH υποδοχέων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η CRH και οι ουροκορτίνες ανήκουν στην οικογένεια των νευροπεπτιδίων του στρες και εμπλέκονται στην ρύθμιση της ανοσοαπάντησης στο πλαίσιο της αλληλεπίδρασης του νευροενδοκρινικού με το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας του στρες κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην προσαρμογή του οργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες. Η απάντηση στο στρες χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα και την παραγωγή

CRH στον υποθάλαμο. Τα γλυκοκορτικοειδή, τελικά προϊόντα της ενεργοποίησης του ΥΥΕ, οδηγούν, μεταξύ των άλλων δράσεών τους, σε ανοσοκαταστολή, σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Λόγω αυτής της έμμεσης δράσης, η CRH μπορεί να χαρακτηριστεί αντι-φλεγμονώδη παράγοντας. Έτσι, οι *in vivo* μελέτες της άμεσης δράσης της CRH στην ανοσοαπάντηση δεν δίνουν ξεκάθαρα αποτελέσματα αφού παρεμβάλλεται η δράση των γλυκοκορτικοειδών. Η παρουσία των πεπτιδίων του στρες και των υποδοχέων τους, στα κύτταρα των περιφερικών ιστών, υποδηλώνει ένα ρόλο ανεξάρτητο και ίσως διαφορετικό από αυτόν της υποθαλαμικής CRH.

Η CRH έχει βρεθεί σε θέσεις φλεγμονής διαφόρων περιφερικών ιστών και η δράση της έχει χαρακτηριστεί άλλοτε ως προ-φλεγμονώδης και άλλοτε ως αντι-φλεγμονώδης. Η παρουσία της έχει επίσης καταγραφεί στο φυσιολογικό ενδοθήλιο αλλά δεν είναι γνωστός ο λόγος της εκεί έκφρασης της. Ο ρόλος των πεπτιδίων UCN1, 2 και 3 είναι λιγότερο μελετημένος, καθώς τα μέλη αυτά της οικογένειας της CRH απομονώθηκαν σχετικά πρόσφατα. Η φλεγμονώδης διαδικασία φαίνεται ότι διαδραματίζει κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιοστασία και τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Ουσιαστικά, η φλεγμονώδης αντίδραση και η λειτουργία του ενδοθηλίου βρίσκονται σε μια δυναμική σχέση που προϋποθέτει την επικοινωνία του νευροενδοκρινικού-ανοσοποιητικού συστήματος.

Το ενδοθήλιο έχει ρυθμιστικό ρόλο τόσο κατά τις φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού όσο και σε περιπτώσεις οξείας απόκρισης σε συνθήκες φλεγμονής [182]. Η χρόνια φλεγμονή, ενεχόμενη ως παθοφυσιολογικός μηχανισμός στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης τροποποιεί τη συμπεριφορά του ενδοθηλίου το οποίο αντιδρά με αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο στην φλεγμονώδη διαδικασία. Αυτονόητο ότι σε συνθήκες φλεγμονής αυξάνεται το οξειδωτικό στρες το οποίο είναι επίσης αυξημένο στην αθηροσκλήρωση. Η συμμετοχή των πεπτιδίων του στρες στην φλεγμονώδη διαδικασία γενικά, καθιστά έντονα πιθανή τη συμμετοχή τους και στη χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση του ενδοθηλίου που προάγει την αθηροσκλήρωση. Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε για πρώτη φορά, ο ρόλος των πεπτιδίων του στρες στην *in vitro* προ- και αντιοξειδωτική απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Σήμερα, είναι πλέον αποδεκτή η πλειοτροπική δράση του CRH, η οποία εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο [179] και το βαθμό του στρες στο οποίο

υποβάλλεται ένα σύστημα. Η CRH φαίνεται ότι εμπλέκεται περισσότερο στην άμεση (οξεία) παρά στην μακροχρόνια απόκριση στο στρες όπου μοιάζει να επικρατεί η δράση της βαζοπρεσίνης. Επιπλέον, όπως έδειξαν οι Correa και συν., μικρές δόσεις της CRH ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση ενώ στις μεγάλες δόσεις η δράση είναι μάλλον προφλεγμονώδης [143, 196].

Δεν είναι γνωστό εάν η τοπική CRH ενεργεί σε συνέργεια ή ανεξάρτητα από την, έμμεσα ασκούμενη, αντιφλεγμονώδη δράση του ΥΥΕ άξονα [197]. Είναι πιθανό η τοπικά παραγόμενη CRH, να λειτουργεί, στα πλαίσιο της τοπικής αντιφλεγμονώδους απάντησης [198], με αυτοκρινικό/παρακρινικό τρόπο. Υπέρ αυτού του ενδεχόμενου συνηγορούν το ότι α) τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν σημαντικά ποσά CRH, ενώ ταυτόχρονα φέρουν CRH υποδοχείς και β) το ότι, η περιφερική CRH επάγει θετικά την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα μονοκύτταρα, και την έκκριση ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα μειώνει την έκλυση NO [199]. Υπέρ αυτής της άποψης συνηγορεί το γεγονός ότι, *in vitro*, η CRH επάγει την έκκριση της IL-1β, της IL-6 και του TNF-α από μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS [158]. Είναι προφανές ότι η CRH επεμβαίνει σε μεγάλο βαθμό στην ομοιοστασία των μονοκυττάρων. Τα υπάρχοντα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η απόκριση του ενδοθηλίου στη φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το βαθμό ενεργοποίησής τους [195].

CRH

Η επίδραση της CRH στην έκλυση NO είναι αμφιλεγόμενο θέμα, καθώς οι παρατηρήσεις εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συμφωνούν με την άποψη ότι περιφερική CRH επιφέρει ελάττωση του εκλυόμενου NO στον αγγειακό χώρο [199]. Η συγκεκριμένη παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι ελαττώνεται σημαντικά και η δραστηριότητα του υπεύθυνου ενζύμου παραγωγής του NO, της eNOS. Συνεπώς, η

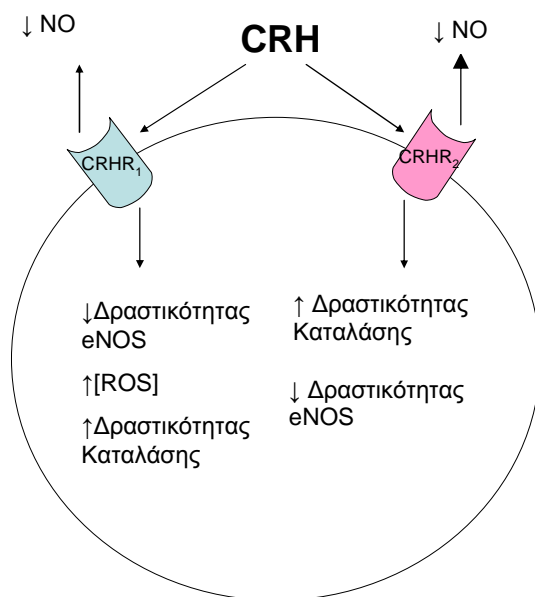
βραχυπρόθεσμη έκθεση του ενδοθηλίου στη CRH ευνοεί την αγγειοσυστολή και την τοπική αύξηση της ροής του αίματος.

Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε υπερτασικά άτομα παρατηρήθηκε πως αυξάνεται ταυτόχρονα και το οξειδωτικό στρες στους παρακείμενους κυτταρικούς πληθυσμούς [312]. Στην παρούσα μελέτη, η τιμή DCF, που αντικατοπτρίζει το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο, αυξήθηκε από την CRH ταυτόχρονα με την αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης, η οποία ενεργοποιείται παρουσία υψηλών επιπέδων ROS. Αρκετά ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως ο $CRHR_1$, είναι ο υποδοχέας μέσω του οποίου επέρχεται η σημαντική αύξηση των επιπέδων των ROS, ενώ στην μεταβολή των μελετηθέντων αντιοξειδωτικών συστημάτων, συμμετέχουν και οι δύο CRH υποδοχείς. Η ταυτόχρονη αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου και των αντιοξειδωτικών συστημάτων δείχνουν ότι πιθανώς η CRH λειτουργεί ως στρεσογόνος παράγοντας που ενεργοποιεί και την αντιοξειδωτική απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Όμως, σε αντίθεση με τα ανωτέρω, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του λόγου $GSH/GSH+GSSG$ και των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH που αποτελούν δείκτες της δραστηριότητας της GPx και αυξάνονται σε συνθήκες στρες. Είναι πιθανό ότι αυτό ερμηνεύεται από την βραχυπρόθεσμη επίδραση της CRH που επηρεάζει την άμεση απόκριση των κυττάρων στην αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και όχι την απώτερη που ενδεχομένως θα ενεργοποιούσε και την γλουταθειόνη.

Η eNOS αποτελεί μέρος του συστήματος του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και θα ανέμενε κάποιος μια αύξηση, αντί της ελάττωσης, της δραστηριότητας της. Η αντίφαση αυτή ερμηνεύεται από τη γνώση ότι η eNOS μπορεί να λειτουργεί και ως προοξειδωτικός παράγοντας ενισχύοντας την αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης περοξυνιτρικών τα οποία οξειδώνουν την BH4, συνένζυμο της eNOS, και ελαττώνουν τη σύζευξη της με την τελευταία [319] γεγονός που ακολουθείται από ελάττωση της σύνθεσης NO και συνεπώς μειωμένη εξουδετέρωση ROS.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι η CRH, μέσω και των δύο CRH υποδοχέων, επάγει στο ενδοθήλιο μια ήπια αύξηση του οξειδωτικού φορτίου, σε βαθμό που οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φτάνουν τον ουδό ενεργοποίησής τους. Η θεωρία της «ευαισθητοποίησης» των κυττάρων από προ-οξειδωτικούς παράγοντες, όπως η υποξία και η LPS δέχεται πως στρεσογόνοι

παράγοντες «αφυπνίζουν» τις κυτταρικές αντιοξειδωτικές λειτουργίες που καθιστούν άμεση την αντίδραση του κυττάρου σε πρόσθετα βλαπτικά ερεθίσματα ούτως ώστε να μη οδηγήσει η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου σε μη αναστρέψιμη βλάβη [218, 219].



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της CRH στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου

CRH – TNF-α

Μετά την διαπίστωση της βραχυπρόθεσμης προ-οξειδωτικής δράσης της CRH, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην CRH, αφού όμως προηγηθεί επαγωγή του οξειδωτικού τους φορτίου με ένα γνωστό οξειδωτικό παράγοντα, τον TNF-α [304-308]. Η προεπώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τον TNF-α, συνοδεύτηκε, όπως αναμενόταν, από σημαντική αύξηση του οξειδωτικού τους φορτίου και παράλληλα από σημαντική

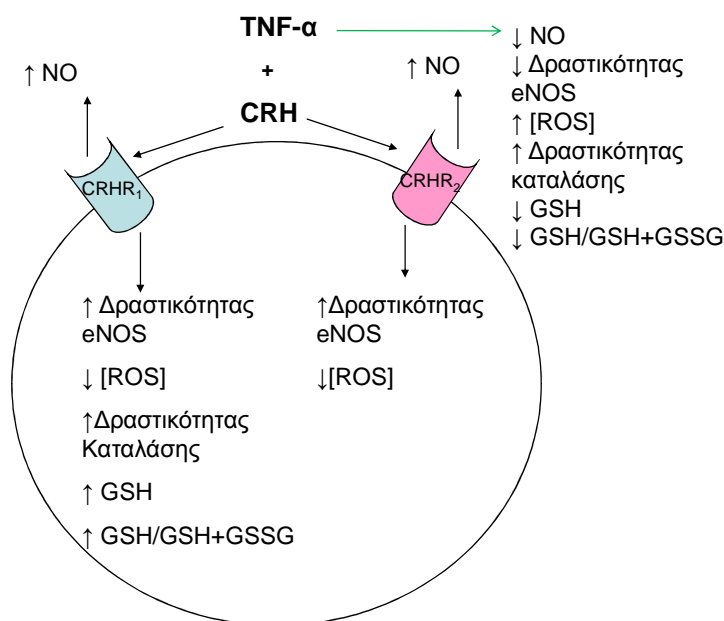
ελάττωση της δραστηριότητας της eNOS και των επιπέδων του NO [271, 272]. Στη συνθήκη αυτή, η CRH λειτούργησε αντισταθμιστικά, μέσω αμφοτέρων των υποδοχέων της, εξουδετερώνοντας το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο, μέσω της κινητοποίησης της eNOS και της αύξησης του NO. Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει τη δράση της CRH ως τοπικού ρυθμιστικού παράγοντα στην εξέλιξη της ενδοθηλιακής φλεγμονής. Είναι άλλωστε γνωστό πως το εκλυόμενο NO, σε φυσιολογικά επίπεδα, εξουδετερώνει ποσότητες ROS και η eNOS είναι ένα από τα σημαντικά ένζυμα που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του ενδοθηλίου έχοντας όμως το χαρακτηριστικό να είναι ιδιαίτερο ευαίσθητο στα υψηλά επίπεδα ROS. Κατά συνέπεια, η CRH μοιάζει να δρα ρυθμιστικά-προστατευτικά όταν στο ενδοθήλιο ασκείται δράση παράγοντα που αυξάνει το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο, εξασφαλίζοντας την ομαλή του λειτουργία.

Η CRH εξουδετέρωσε, επίσης, τη σημαντική αύξηση της ενεργότητας της καταλάσης, που προκλήθηκε από τον TNF-α και ήταν παράλληλη με την αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου. Η ελάττωση της ενεργότητας της καταλάσης φαίνεται να ασκείται, κατά ένα μέρος τουλάχιστον, με άμεση δράση της CRH, μέσω του CRHR₁ υποδοχέα, χωρίς να μπορεί να αποκλεισθεί η έμμεση προσαρμογή του ενζύμου στην προκαλούμενη από την eNOS ελάττωση του οξειδωτικού φορτίου με άλλους μηχανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με την καταλάση, η δράση της CRH στη δραστηριότητα της eNOS και την ελάττωση του αυξημένου κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου ασκείται διαμέσου αμφοτέρων των CRH υποδοχέων. Η εικόνα αυτή είναι αντίστροφη σε σύγκριση με την δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την επίδραση του TNF-α, όπου η αύξηση των ROS έλαβε χώρα μέσω του CRHR₁ υποδοχέα και η επαγωγική δράση της CRH στη δραστηριότητα της καταλάσης ασκήθηκε διαμέσου και των δύο υποδοχέων.

Η κυτταρική απόκριση στον TNF-α όσον αφορά τη συγκέντρωση της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG, χαρακτηρίστηκε, όπως αναμένονταν, από εξάντληση των αποθεμάτων GSH και κατά συνέπεια, μείωση της τιμής του λόγου GSH/GSH+GSSG. Η εικόνα αυτή περιγράφει το γρήγορο ρυθμό κατανάλωσης της GSH στην αντιοξειδωτική απόκριση στον TNF-α. Η αποκατάσταση των επιπέδων της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG που επέφερε η CRH, ενεργώντας μέσω του CRHR₁ υποδοχέα, υποσημαίνει την ουσιώδη προστατευτική της δράση σε συνθήκες στρες. Η θέση αυτή ενισχύεται

από την παρατήρηση ότι η ελάττωση των επιπέδων GSH αποτελεί σημαντικό πρώιμο δείκτη δυσλειτουργίας και απόπτωσης των κυττάρων [320].

Συμπερασματικά, ενώ σε συνθήκες ηρεμίας η CRH δρα ως στρεσογόνος παράγοντας, σε συνθήκες στρες που επάγουν υψηλό ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο, δρα ευωδωτικά, μέσω της ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της CRH στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατόπιν προεπίσχεσης των κυττάρων με TNF-α.

Μακροφάγα +CRH

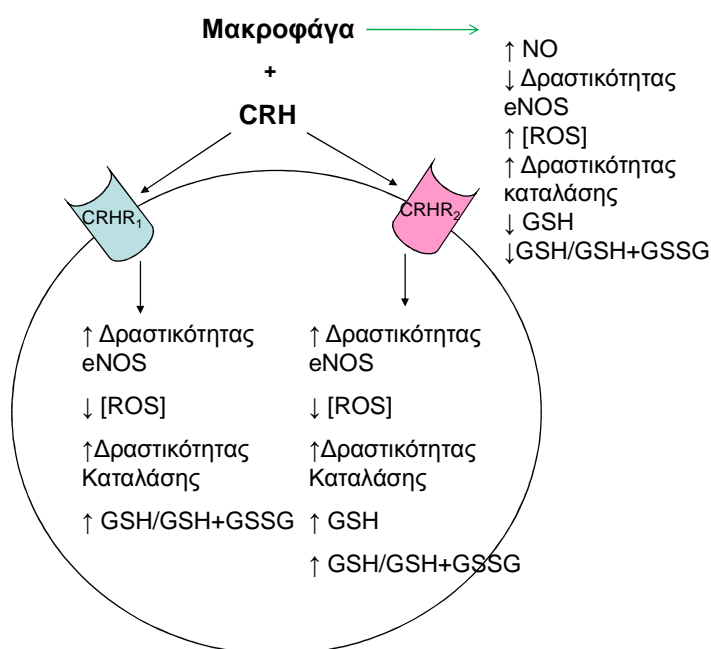
Η παρουσία μακροφαγικού πληθυσμού στο ενδοθήλιο συνοδεύεται από δυσλειτουργία του. Τα μακροφάγα έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS μέσω της NADPH οξειδάσης, και να προάγουν το προ-οξειδωτικό προφίλ. Εκτός από την άμεση παραγωγή ελευθέρων ριζών, τα μακροφάγα εκλύουν προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η IL-1β, η IL-6 και ο TNF-α, που μεγεθύνουν τη φλεγμονώδη αντίδραση του ενδοθηλίου [277, 278].

Κατά τη συγκαλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων με μακροφάγα, παρατηρήθηκε κατακόρυφη αύξηση του εκλυόμενου NO, φαινόμενο που περιγράφεται στην βιβλιογραφία [321], σε συνδυασμό με αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων. Σήμερα γίνεται ευρέως δεκτό πως η μετανάστευση των μακροφάγων στη φλεγμαίνουσα αγγειακή περιοχή συνοδεύεται από αγγειοχάλαση και αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων η οποία επιτρέπει την προσκόλληση και διαπήδηση των μακροφάγων στον ενδοαγγειακό χώρο. Σε τέτοιες συνθήκες παρατηρείται αύξηση του NO στο εξωκυττάριο περιβάλλον που συνοδεύεται από ελάττωση της δραστηριότητας της eNOS, [321] γεγονός που υποδηλώνει ότι πηγή του NO είναι τα μακροφάγα και όχι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι πιθανό ότι η υπερβολική παραγωγή NO οδηγεί σε σχηματισμό RNS (reactive nitrogen species), τα οποία οξειδώνουν την BH₄ [319] και αναστέλλουν τη δραστηριότητα της eNOS. Η δράση της CRH στο ενζυμικό σύστημα παραγωγής NO, χαρακτηρίζεται στην προκειμένη περίπτωση επαγωγική, καθώς επαναφέρει τη λειτουργικότητα της eNOS σε υψηλά επίπεδα μέσω και των δύο υποδοχέων της.

Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση των ενδοκυττάρων ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η ενεργοποίηση της καταλάσης, είναι συνήθεις επιπτώσεις της παρουσίας των μακροφάγων [320]. Οι παρατηρήσεις της μελέτης αυτής συμφωνούν με το γνωστό προ-οξειδωτικό προφίλ που προωθούν τα μακροφάγα. Στον αντίποδα, η CRH διατήρησε αυξημένη τη δραστηριότητα της καταλάσης στο πλαίσιο εξουδετέρωσης του οξειδωτικού φορτίου, ενεργώντας διαμέσου και των δύο CRH υποδοχέων.

Σε συμφωνία με την άποψη που αναφέρθηκε στην προ-επαγωγή των ROS από τον TNF-α, και τα μακροφάγα ελαττώνουν σημαντικά την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης, γεγονός που υποδηλώνει πως η αντίδραση $H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + H_2O$ μετατοπίζεται με γρήγορο ρυθμό προς τα δεξιά. Η επίδραση της CRH, στις δύο πρώτες ώρες, αποκαθιστά σε μεγάλο βαθμό την οξειδωτική ισορροπία των ενδοθηλιακών κυττάρων ενεργώντας μέσω και των δύο υποδοχέων. Πιθανόν η έντονη και παρατεταμένη ενεργοποίηση της καταλάσης, η οποία εκφράζει την άμεση κυτταρική αντιοξειδωτική απόκριση, να ευθύνεται για τη γρήγορη αποκατάσταση των αποθεμάτων GSH και της δραστηριότητας της eNOS.

Συμπερασματικά, η δράση της CRH κατά την έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μακροφάγα, προσομοιάζει με αυτήν κατά την οποία τα κύτταρα προ-εκτέθηκαν στον TNF-α, και περιγράφεται ως άμεση και έντονη.



Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της CRH στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατά τη συγκαλλιέργεια με μακροφάγα.

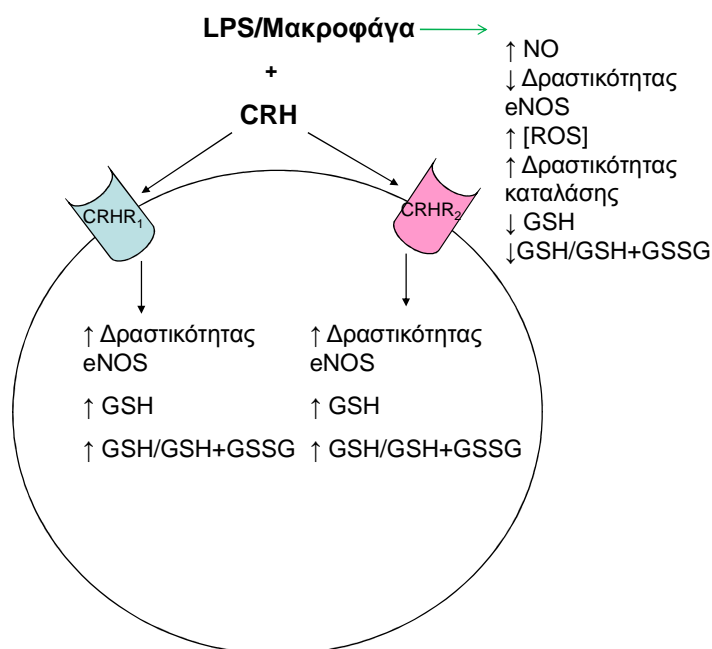
LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση των μακροφάγων με κάποιο προφλεγμονώδη παράγοντα, που στην προκειμένη περίπτωση είναι ο LPS, αλλάζει το εκκριτικό προφίλ τους. Ωστόσο, η επίδραση της CRH, στη μελέτη μας, ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε κατά την έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μη ενεργοποιημένα μακροφάγα.

Η κατακόρυφη έκλυση NO από τα μακροφάγα και ο σχηματισμός RNS στον εξωκυττάριο ενδοθηλιακό χώρο οδήγησαν σε αναστολή της eNOS, ενώ η CRH αποκατέστησε τα επίπεδα της δραστικότητάς της μέσω και των δύο υποδοχέων της.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία της CRH και LPS-ενεργοποιημένων μακροφάγων στα επίπεδα ROS και τη δραστικότητα της καταλάσης. Η CRH, δρώντας διαμέσου και των δύο υποδοχέων, δεν ελάττωσε αποτελεσματικά τα ROS σε αντίθεση με την δράση της κατά τη συγκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μη ενεργοποιημένα μακροφάγα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σύντομο χρονικό διάστημα δράσης του πεπτιδίου, υπόθεση που ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η δραστικότητα της καταλάσης παραμένει αυξημένη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντιοξειδωτική απόκριση συνεχίζεται σε υψηλό ρυθμό, μέσω και των δύο υποδοχέων.

Εντύπωση προκαλεί το ότι ο ρυθμός ανακύκλωσης της γλουταθειόνης και τα επίπεδα της GSH, επανέρχονται στα προ της συγκαλλιέργειας με διεγερμένα μακροφάγα επίπεδα παρόλο που το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο παραμένει υψηλό. Είναι αξιοσημείωτο πως το σύστημα της GP_x, αποκαταστάθηκε γρήγορα υπό την επίδραση της CRH και στις τρεις περιπτώσεις επαγωγής του οξειδωτικού φορτίου των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ δεν τροποποιήθηκε σημαντικά όταν τα κύτταρα ήταν σε ηρεμία. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την άποψη πως η CRH, στα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε μεταβολική ηρεμία, ευνοεί μια ήπια προ-οξειδωτική κατάσταση, ικανή να ενεργοποιήσει την αντιοξειδωτική απόκριση τους σε ισχυρούς στρεσογόνους παράγοντες. Αντίθετα, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν υποστεί την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων που προκαλούν αύξηση του οξειδωτικού τους φορτίου, η δράση της CRH είναι έντονα προστατευτική και ευωδωτική για το ενδοθήλιο προάγοντας τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της CRH στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατά τη συγκαλλιέργεια με LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα.

Ουροκορτίνες

Η UCN1 συμμετέχει στην απόκριση του οργανισμού τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό στρες. Οι Weninger και συν [71] έδειξαν ότι για την απάντηση στο στρες, δεν είναι απαραίτητη η CRH, όσο ο υποδοχέας CRFR₁, στον οποίο, απουσία της CRH, πιθανώς δρα κάποιο άλλο πεπτίδιο, όπως η UCN1. Αναφορικά με τη δράση της στο συστηματικό στρες, η UCN1 έχει πολλές από τις δράσεις της CRH [18] και πιθανώς, οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται στις φαρμακολογικές δράσεις των CRH και UCN1 οφείλονται εν μέρει σε παράγοντες φαρμακοκινητικής ή στην μεγαλύτερη συγγένεια της UCN1 για τον CRHR₂ υποδοχέα.

Τα *ucn*^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια παρουσιάζονται αγχώδη κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, παρατήρηση που υποδεικνύει κάποιο αγχολυτικό ρόλο για την UCN1 [74]. Ομοίως, αγχολυτικές ιδιότητες φαίνεται να έχουν και οι UCN2 και UCN3, ενεργώντας μέσω του CRHR₂ [23].

Οι ουροκορτίνες λόγω του ότι ασκούν τη δράση τους κυρίως μέσω του CRHR₂ υποδοχέα, έχουν ιδιαίτερη σημασία σε περιφερικά όργανα και στην

καρδιά όπου επικρατεί η έκφραση τους. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί το κατά πόσο η δράση τους είναι επιβλαβής ή ωφέλιμη, έχει βρεθεί πως η χορήγησή τους είναι κυτταροπροστατευτική σε ισχαιμικό τραύμα [80]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης της UCN1, στην καρδιά, αυξάνονται μετά από ισχαιμικό επεισόδιο [97], είναι υψηλότερα σε καρδιομυοπάθειες [98] και βρίσκονται αυξημένα στο πλάσμα και στο μυοκάρδιο, σε περιπτώσεις καρδιακής ανακοπής [99]. Οι UCNs, μεταξύ άλλων, προστατεύουν τα μυοκύτταρα της καρδιάς από απόπτωση ή νέκρωση που προκαλούνται από ισχαιμία, μέσω της ενεργοποίησης MAP κινασών (MEK/ERK), Akt και επαγωγής της έκφρασης των καναλιών K (ATP) [97, 100]. Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι ουροκορτίνες, σε φλεγμαίνουσες περιοχές, ενεργούν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες που αντισταθμίζουν τη προ-φλεγμονώδη δράση της CRH. Σύμφωνα με τους Tsatsani και συν, οι ουροκορτίνες δρουν παρακρινικά ως αντιφλεγμονώδη μόρια μέσω της επαγωγής της απόπτωσης των μακροφάγων ενεργώντας διαμέσου του CRHR₂ υποδοχέα. [159].

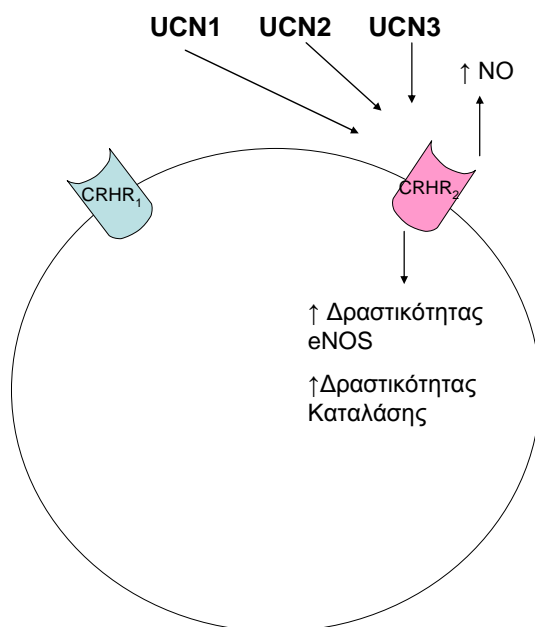
UCNs

Η βιβλιογραφία που υποστηρίζει τον προστατευτικό ρόλο των ουροκορτινών στην περιφέρεια και ειδικότερα στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι σημαντική [260-264]. Είναι πλέον αποδεκτό πως η δράση των ουροκορτινών ευνοεί την ομοιοστασία του ενδοθηλίου μέσω της έκλυσης NO [241-247]. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, που εκτίθενται συνοπτικά στον πίνακα 5, είναι σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη. Οι UCN1, 2 και 3 αυξάνουν τα επίπεδα του εκλυόμενου NO και τη δραστικότητα της eNOS, με μηχανισμό εξαρτώμενο από τον CRHR₂. Άλλωστε, ο CRHR₂ είναι ο ευρύτερα διαδεδομένος CRH υποδοχέας στην περιφέρεια, συγκριτικά με τον CRHR₁, και οι UCNs έχουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σ' αυτόν. Κατά συνέπεια, είναι εύλογο η κύρια ευωδωτική δράση τους να πραγματοποιείται μέσω αυτού.

Η αντιοξειδωτική δράση των ουροκορτινών εντοπίζεται, σύμφωνα με τη τρέχουσα βιβλιογραφία [86, 260], στην αναστολή της δράσης της Ang-II και της ET-1, οι οποίες είναι γνωστοί αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες που ταυτόχρονα αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS. Η οικογένεια των ουροκορτινών,

στην μελέτη μας, διατήρησε τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών στα επίπεδα ηρεμίας. Είναι ενδιαφέρον πως ενώ, παρουσία των UCN1, 2 και 3, δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά τα ενδοκυτταρικά ROS, οι UCN1 και 2 αύξησαν σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης, μέσω του CRHR₂. Η ευνοϊκή δράση των ουροκορτινών στο ενδοθήλιο επεκτείνεται και στη διατήρηση υψηλών επιπέδων GSH, που είναι σημαντικός δείκτης εύρυθμης κυτταρικής λειτουργίας.

Συμπερασματικά, οι ουροκορτίνες, σε αντίθεση με τη CRH, προάγουν στο ενδοθήλιο ένα αντι-οξειδωτικό και αγγειοδιασταλτικό προφίλ ενεργώντας διαμέσου του CRHR₂-υποδοχέα.



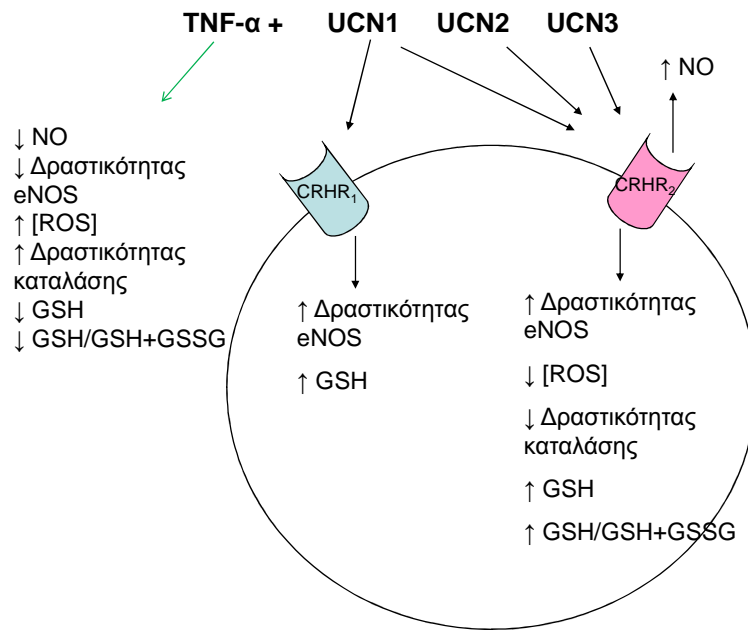
Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου.

UCNs και TNF-α

Με δεδομένο το ότι οι ουροκορτίνες ασκούν ευνοϊκή δράση στο ενδοθήλιο, σε συνθήκες ηρεμίας, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της επίδρασής τους σε συνθήκες αυξημένου ενδοκυτταρικού φορτίου υπό την επίδραση του TNF- α , ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, αναστέλλει τη δραστικότητα της eNOS και το ποσό του εκλυόμενου NO, αυξάνει το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο και κινητοποιεί την απόκριση της καταλάσης και της GP_x.

Η οικογένεια των ουροκορτινών αποκαθιστά άμεσα το οξειδωτικό ισοζύγιο των ενδοθηλιακών κυττάρων και επαναφέρει τα μελετηθέντα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα σε φυσιολογικούς ρυθμούς λειτουργίας. Είναι ενδιαφέρον πως ενώ η δράση της UCN1, στη δραστικότητα της eNOS και τα επίπεδα GSH, σε συνθήκες ηρεμίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, πραγματοποιείται μέσω του CRHR₂, στην περίπτωση οξειδωτικής φόρτισης τους συμμετέχει και ο CRHR₁. Ομοίως, η επαγωγική δράση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, πραγματοποιήθηκε μέσω και των δύο υποδοχέων, γεγονός που προσομοιάζει τη δράση των δύο πεπτιδίων στην τοπική φλεγμονή, όσον αφορά τα εκλυόμενα επίπεδα NO. Η αποτελεσματική επαναφορά του συστήματος της eNOS από τους εκλεκτικούς αγωνιστές των CRH υποδοχέων σε συνθήκες στρες, επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα της eNOS στην ομοιοστασία του ενδοθηλίου.

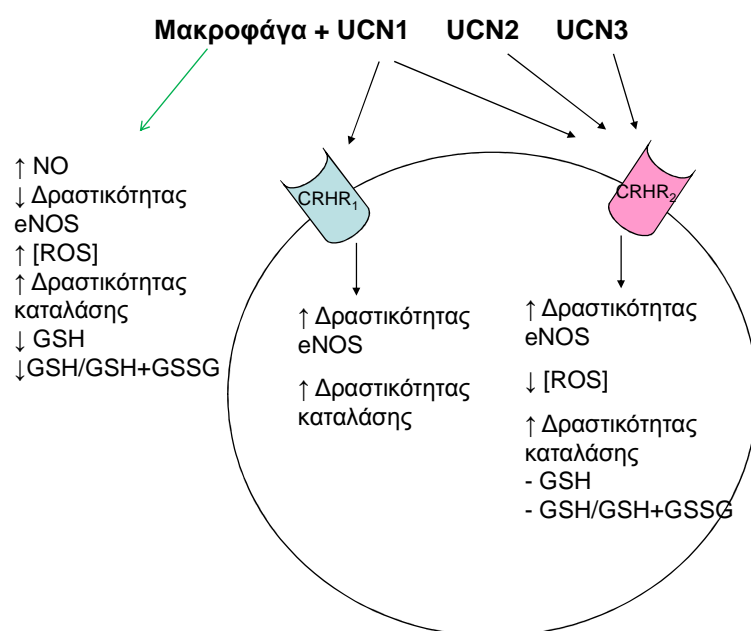
Η δράση των UCN2 και 3 ασκείται ως αναμένονταν, μέσω του CRHR₂ με σημαίνοντα ρόλο στη ρύθμιση των ενδοκυττάρων ROS, τη δράση της καταλάσης και τη λειτουργικότητα της GP_x.



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατόπιν προεπεώσεως με TNF-α.

UCNs και Μακροφάγα

Η βραχυπρόθεσμη έκθεση του ενδοθηλίου σε μακροφάγα, όπως ήδη παρατηρήθηκε και σχολιάστηκε, αυξάνει το οξειδωτικό φορτίο. Η δράση των ουροκορτινών, στη μελέτη μας, ήταν ως επί το πλείστον ταυτόσημη με αυτή της CRH και οδήγησε σε άμεση αποκατάσταση της ελαττωμένης δραστηριότητας της eNOS και την ελάττωση των ενδοκυττάρων ROS. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ουροκορτίνες αύξησαν ακόμα περισσότερο την ήδη αυξημένη δραστηριότητα της καταλάσης που είχε προκληθεί από τα μακροφάγα. Σε αντιστοιχία με την CRH η δράση της UCN1 στα μελετηθέντα ενζυμικά συστήματα ασκήθηκε μέσω και των δύο υποδοχέων, γεγονός που υποδηλώνει παρόμοια δράση των πεπτιδίων στη βραχυπρόθεσμη τοπική φλεγμονή του ενδοθηλίου. Όσον αφορά τα επίπεδα GSH και στο ρυθμό ανακύκλωσης του τριπεπτιδίου, υπήρχε διαφορά στη δράση της CRH και των ουροκορτινών. Ενώ η CRH προκάλεσε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης και κατ' επέκταση το λόγο GSH/GSH+GSSG, οι UCN1, 2 και 3 δεν επηρέασαν τα επίπεδα τους. Είναι πιθανό η επίδραση των μακροφαγών να είναι αρκετά έντονη σε αντιδιαστολή με μια ήπια αντιοξειδωτική δράση των ουροκορτινών, ώστε στο σύντομο χρόνο του δώρου να μην έχει επέλθει πλήρης αποκατάσταση όλων των ενζυμικών αντιοξειδωτικών συστημάτων.

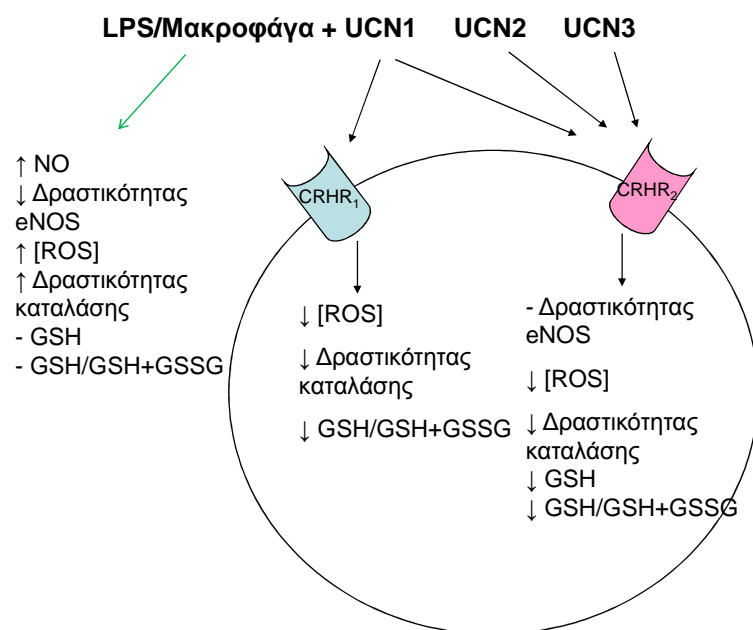


Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατά τη συγκαλλιέργεια με μακροφάγα.

UCNs και LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS, αλλάζει το εκκριτικό προφίλ τους με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται και οι αλληλεπιδράσεις τους με το ενδοθήλιο. Ειδικότερα, ενώ οι ουροκορτίνες επανέφεραν την ελαττωμένη δραστικότητα της eNOS που είχε προκληθεί από τον TNF-α και τα μη διεγερθέντα μακροφάγα, δεν το επέτυχαν όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκαλλιεργήθηκαν με LPS-διεγερθέντα μακροφάγα. Είναι πιθανό, η μεγάλη έκλυση NO από τα μακροφάγα και ο σχηματισμός RNS να οξειδωσαν την BH₄ σε τέτοιο βαθμό, ώστε η βραχυπρόθεσμη δράση των ουροκορτινών να μην ήταν αποτελεσματική.

Σε αντίθεση με την eNOS, οι ουροκορτίνες προκάλεσαν σημαντική ελάττωση της ενεργότητας της καταλάσης, στα επίπεδα GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG.



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των UCN1, 2 και 3 στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα του ενδοθηλίου κατά τη συγκαλλιέργεια με LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πεπτιδία του στρες είναι ο κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στο στρες μέσω της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα, αλλά και της πλειοτρόπου δράσης τους στην περιφέρεια. Μάλιστα, είναι αποδεκτό πως και οι δύο υποδοχείς συμμετέχουν στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες [79]. Θεωρείται ότι στην συστηματική απόκριση (του ΚΝΣ) στο στρες, επικρατούν δράσεις μέσω του CRHR₁ υποδοχέα, με μικρότερη συμμετοχή του CRHR₂ υποδοχέα [59]. Στην περιφέρεια, τα στοιχεία που αφορούν στη δράση των πεπτιδίων και των υποδοχέων τους είναι περιορισμένα.

Η CRH φαίνεται να παίζει κρίσιμο και ρυθμιστικό ρόλο στην αρχή της φλεγμονώδους αντίδρασης, μέσω επαγωγής της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα με δράση που μεσολαβείται από τον CRHR₁. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη δεδομένων για ανάλογη ρύθμιση της CRH και των μελών της οικογένειας των ουροκορτινών στην ενδοθηλιακή φλεγμονή. Είναι πλέον αποδεκτό πως η φλεγμονή αποτελεί σταθερό χαρακτηριστικό της αθηροσκλήρωσης και συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του ενδοθηλίου να αντισταθμίζει τα υψηλά επίπεδα ROS, που είναι χαρακτηριστικά παρόντα σε αθηρωματικές και φλεγμαίνουσες περιοχές. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά, η, *in vitro*, επίδραση των πεπτιδίων του στρες, CRH, UCN1, 2 και 3, στα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα μακροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι:

✓ Η CRH εκθέτει τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ένα ήπιο στρες, ούτως ώστε να ξεπεραστεί ο ουδός ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Με αυτό τον τρόπο το «ευαισθητοποιημένο» ενδοθήλιο ανταπεξέρχεται αποτελεσματικότερα σε πιθανή μελλοντική έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες. Στις περιπτώσεις που το ενδοθήλιο προσβάλλεται από κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, η CRH λειτουργεί άμεσα και δραστικά ως αντιοξειδωτικός παράγων αποκαθιστώντας την ισορροπία του ενδοθηλίου, με τον CRHR₁ να αποτελεί το σημαντικότερο κανάλι μεταγωγής της δράσης της CRH.

✓ Οι UCN1, 2 και 3 διατηρούν το προφίλ των ενδοθηλιακών κυττάρων σε συνθήκες ηρεμίας με δράση που είναι κυρίως CRHR₂- εξαρτώμενη. Παρουσία του στρεσογόνου διεγέρτη TNF-α, οι UCNs αποκαθιστούν τη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων, ενώ αυτό το επιτυγχάνουν μερικώς παρουσία μακροφάγων. Είναι πιθανό η δράση των ουροκορτινών σε

αυτήν την περίπτωση να εμπλέκει διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια ή ακόμα και να είναι αποτελεσματική μακροπρόθεσμα.

7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματεύτηκε τον ρόλο της CRH και των UCN1, 2 και 3 στην βραχεία απόκριση του ενδοθηλίου στα πεπτιδία αλλά και σε συνδυαστική δράση αυτών με στρεσογόνους παράγοντες, όπως ο TNF-α, τα μακροφάγα και τα LPS-ενεργοποιημένα μακροφάγα.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η βραχυπρόθεσμη δράση των πεπτιδίων στο ενδοθήλιο. Παρατηρήθηκε πως μόνο η CRH προωθεί ένα ήπιο προ-οξειδωτικό προφίλ στο ενδοθήλιο, ενώ οι ουροκορτίνες διατηρούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της δράσης των πεπτιδίων στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα μακροπρόθεσμα, καθώς σύμφωνα με το μοντέλο της «προ-ευαισθητοποίησης» των κυττάρων, η συμπεριφορά του ενδοθηλίου πιθανόν να διαφοροποιείται όταν έχουν ήδη επαχθεί σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες. Επιπλέον, οι αποκλίσεις που παρουσιάζουν οι CRH υποδοχείς στα διαφορετικής φύσεως ερεθίσματα, μπορούν να ερευνηθούν διεξοδικότερα με τον έλεγχο ενεργοποίησης μορίων-κλειδιών στα σηματοδοτικά μονοπάτια των GPCR υποδοχέων.

Επιπλέον, εφόσον η δράση των πεπτιδίων του στρες είναι χρονο- και δοσο-εξαρτώμενη, η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων τους σε επιλεγμένα στρεσογόνα ερεθίσματα και χρονικά διαστήματα, θα διαλεύκανε τη δράση τους. Άλλωστε, το οξειδωτικό στρες και η απόκριση του ενδοθηλίου είναι μια συνεχώς μεταβαλλόμενη δυναμική ισορροπία, η οποία καθορίζει την εξέλιξη της φλεγμονής και κατά συνέπεια της αθηροσκλήρωσης.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tsigos C, Kyrou I, Chrousos G Stress, endocrine physiology and pathophysiology. Chapter 8, May 119, 2004
2. Arck PC, Slominski A, Theoharides CT, Peters EMJ, Paus Ralf Neuroimmunology of stress: Skin takes center stage. *Journal of Investigative Dermatology* (2006) 126, 1697-1704
3. Cameron VA, Fleming AM 1998 Novel sites of adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues. *Endocrinology* 139:2253-64
4. Frank M.Dautzenberg and Richard L. Hauger The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in pharmacological sciences*; 2002: Vol 3, No 2
5. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-7
6. Lowry CA, Moore FL 2006 Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. *Gen Comp Endocrinol* 146:19-27
7. Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, et al. 1986 Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci* 6:2908-14
8. Morin SM, Ling N, Liu XJ, Kahl SD, Gehlert DR 1999 Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience* 92:281-91
9. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K 1984 Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 59:861-6

10. Brouxhon SM, Prasad AV, Joseph SA, Felten DL, Bellinger DL 1998 Localization of corticotropin-releasing factor in primary and secondary lymphoid organs of the rat. *Brain Behav Immun* 12:107-22
11. T. Simoncini, R. Apa, F. M. Reis, F. Miceli, M. Stomati, L. Driul, A. Lanzone, A. R. Genazzani and F. Petraglia Human Umbilical Vein Endothelial Cells: A New Source and Potential Target for Corticotropin-Releasing Factor
12. Sato H, Igarashi H, Kishimoto Y, et al. 2002 Combined tumor consisting of non-functioning adrenocortical adenoma and pheochromocytoma in the same gland. *Int J Urol* 9:398-401
13. Jessop DS, Cunnah D, Millar JG, et al. 1987 A phaeochromocytoma presenting with Cushing's syndrome associated with increased concentrations of circulating corticotrophin-releasing factor. *J Endocrinol* 113:133-8
14. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, et al. 2003 Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. *Biochem Pharmacol* 65:917-21
15. Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, et al. 2003 Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression. *Faseb J* 17:2313-5
16. Baigent SM 2001 Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809-20
17. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, et al. 1995 Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378:287-92
18. Skelton KH, Owens MJ, Nemeroff CB 2000 The neurobiology of urocortin. *Regul Pept* 93:85-92

19. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE 1999 Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 415:285-312
20. Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, Blount AL, Vale WW 1999 Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology* 140:5651-8
21. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, et al. 2001 Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb J* 15:1678-93
22. Seres J, Bornstein SR, Seres P, et al. 2004 Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89:965-70
23. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, et al. 2001 Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2843-8
24. Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J 2004 Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145:941-50
25. Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W 2004 Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 145:2445-57
26. Lewis K, Li C, Perrin MH, et al. 2001 Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7570-5

27. Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T 2004 Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 25:1689-701
28. Hsu SY, Hsueh AJ 2001 Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7:605-11
29. Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H 2005 Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* 26:1196-206
30. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S 2004 Urocortins as cardiovascular peptides. *Peptides* 25:1723-31
31. Li C, Chen P, Vaughan J, et al. 2003 Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 144:3216-24
32. Zhao L, Donaldson CJ, Smith GW, Vale WW 1998 The structures of the mouse and human urocortin genes (Ucn and UCN). *Genomics* 50:23-33
33. Chen Y, Hataalski CG, Brunson KL, Baram TZ 2001 Rapid phosphorylation of the CRE binding protein precedes stress-induced activation of the corticotropin releasing hormone gene in medial parvocellular hypothalamic neurons of the immature rat. *Brain Res Mol Brain Res* 96:39-49
34. Seth KA, Majzoub JA 2001 Repressor element silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) can act as an enhancer as well as a repressor of corticotropin-releasing hormone gene transcription. *J Biol Chem* 276:13917-23

35. Ramkumar T, Adler S 1999 A requirement for the POU transcription factor, Brn-2, in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol Endocrinol* 13:1237-48
36. Chen A, Vaughan J, Vale WW 2003 Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 17:1622-39
37. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW 1993 Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8967-71
38. Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB 1996 Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 137:72-7
39. Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB 2001 Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 142:446-54
40. Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM 2003 International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55:21-6
41. Hoare SR, Sullivan SK, Fan J, Khongsaly K, Grigoriadis DE 2005 Peptide ligand binding properties of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor: pharmacology of endogenously expressed receptors, G-protein-coupling sensitivity and determinants of CRF2 receptor selectivity. *Peptides* 26:457-70
42. Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM 2003 Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and

desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* 306:794-803

43. Sanchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR 1999 Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol* 408:365-77

44. Chatzaki E, Murphy BJ, Wang L, et al. 2004 Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. *J Neurochem* 88:1-11

45. Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB 1995 CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136:4139-42

46. Perrin MH, Vale WW 1999 Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885:312-28

47. Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL 1998 Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 12:1077-85

48. Reubi JC, Waser B, Vale W, Rivier J 2003 Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3312-20

49. Suda T, Tozawa F, Dobashi I, et al. 1993 Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro. *J Clin Invest* 92:2790-5

50. Chen AM, Perrin MH, Digruccio MR, et al. 2005 A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2620-5

51. Suda T, Iwashita M, Tozawa F, et al. 1988 Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1278-83
52. Westphal NJ, Seasholtz AF 2006 CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front Biosci* 11:1878-91
53. Chatzaki E, Margioris AN, Gravanis A 2002 Expression and regulation of corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals. *J Neurochem* 80:81-90
54. Rivier J, Rivier C, Vale W 1984 Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science* 224:889-91
55. Pitcher D, Hilbocus J 1998 Variability in the distribution and composition of insertion sequence-like elements in strains of *Mycoplasma fermentans*. *FEMS Microbiol Lett* 160:101-9
56. Miranda A, Koerber SC, Gulyas J, et al. 1994 Conformationally restricted competitive antagonists of human/rat corticotropin-releasing factor. *J Med Chem* 37:1450-9
57. Rivier J, Gulyas J, Kirby D, et al. 2002 Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists. *J Med Chem* 45:4737-47
58. Ruhmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J 1998 Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15264-9

59. Dautzenberg FM, Hauger RL 2002 The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-7
60. Coste SC, Heldwein KA, Stevens SL, Tobar-Dupres E, Stenzel-Poore MP 2001 IL-1 α and TNF α down-regulate CRH receptor-2 mRNA expression in the mouse heart. *Endocrinology* 142:3537-45
61. Holsboer F 1999 Neuroendocrine studies and antidepressant drug development. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 101:711-6
62. Grigoriadis S, Kaplan A, Carter J, Woodside B 2001 What treatments patients seek after inpatient care: a follow-up of 24 patients with anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* 6:115-20
63. Halmos G, Schally AV, Pinski J, Vadillo-Buenfil M, Groot K 1996 Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2398-402
64. Dunn AJ, Berridge CW 1990 Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev* 15:71-100
65. Chaki S, Nakazato A, Kennis L, et al. 2004 Anxiolytic- and antidepressant-like profile of a new CRF1 receptor antagonist, R278995/CRA0450. *Eur J Pharmacol* 485:145-58
66. Smagin GN, Heinrichs SC, Dunn AJ 2001 The role of CRH in behavioral responses to stress. *Peptides* 22:713-24
67. Kotz CM, Wang C, Levine AS, Billington CJ 2002 Urocortin in the hypothalamic PVN increases leptin and affects uncoupling proteins-1 and -3 in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R546-51

68. Cullen MJ, Ling N, Foster AC, Pelleymounter MA 2001 Urocortin, corticotropin releasing factor-2 receptors and energy balance. *Endocrinology* 142:992-9
69. Oki Y, Sasano H 2004 Localization and physiological roles of urocortin. *Peptides* 25:1745-9
70. Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Karalis KP, Jeong K, Majzoub JA 2001 The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. *Peptides* 22:725-31
71. Weninger SC, Peters LL, Majzoub JA 2000 Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology* 141:256-63
72. Gysling K, Forray MI, Haeger P, Daza C, Rojas R 2004 Corticotropin-releasing hormone and urocortin: redundant or distinctive functions? *Brain Res Brain Res Rev* 47:116-25
73. Wang X, Su H, Copenhagen LD, et al. 2002 Urocortin-deficient mice display normal stress-induced anxiety behavior and autonomic control but an impaired acoustic startle response. *Mol Cell Biol* 22:6605-10
74. Vetter DE, Li C, Zhao L, et al. 2002 Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet* 31:363-9
75. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, et al. 1998 Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20:1093-102
76. Bale TL, Contarino A, Smith GW, et al. 2000 Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24:410-4

77. Bale TL, Giordano FJ, Hickey RP, et al. 2002 Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7734-9
78. Coste SC, Quintos RF, Stenzel-Poore MP 2002 Corticotropin-releasing hormone-related peptides and receptors: emergent regulators of cardiovascular adaptations to stress. *Trends Cardiovasc Med* 12:176-82
79. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF 2002 Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci* 22:193-9
80. Davidson SM, Rybka AE, Townsend PA The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotrophin releasing hormone (CRH) family 2009 *Biochemical pharmacology* 141-150
81. Huang Y, Chan FL, Lau CW, Tsang SY, Chen ZY, He GW, Yao X Roles of the cyclic AMP and Ca^{2+} - activated K^{+} channels in endothelium-independent relaxation by urocortin in the rat coronary artery. 2003 *Cardiovascular research* 57 824-833
82. Ikeda K, Tojo K, Tokudome G, et al. 2003 Cardiac expression of urocortin (Ucn) in diseased heart; preliminary results on possible involvement of Ucn in pathophysiology of cardiac diseases. *Mol Cell Biochem* 252:25-32
83. Oki Yutaka, Sasano Hironobu Localization and physiological roles of urocortin 2004 *Peptides* 25; 1745-1749
84. Chatzaki K, Charalampopoulos L, Leontidis I, Mouzas A, Tsatsanis C, Margioris AM, Gravanis A Urocortin in human gastric mucosa: relationship to inflammatory activity 2003 *J Clin Endocrinol Metab* 88: 478-483

85. Wiley EK, Davenport AP CRF₂ receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. 2004 British journal of pharmacology 143; 508-514
86. Cui Y, Yinyan X, Shengnan L Urocortin: a beneficial or detrimental agent to endothelium? 2008 Biochemical and Biophysical Research Communication
87. Singh L, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Seretakakis D, Green M, Theocharides T Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotrophin-releasing hormone receptors 1999 The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol 288, No 3
88. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science 213:1394-7
89. Hacker G, Vaux DL 1995 Apoptosis. A sticky business. Curr Biol 5:622-4
90. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ 1996 Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell 87:619-28
91. Tsujimoto Y, Shimizu S 2002 The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. Biochimie 84:187-93
92. Huang Y, Chan FL, Lau CW, Tsang SY, Chen ZY, He GW, Yao X Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: roles of nitric oxide and K⁺ channels. 2002 British journal of pharmacology 135 1467-1476
93. Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN 2002 Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 277:12280-7

94. Radulovic M, Hippel C, Spiess J 2003 Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* 84:1074-85
95. Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP 2002 Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci* 22:404-12
96. Craighead MW, Boutin H, Middlehurst KM, et al. 2000 Influence of corticotrophin releasing factor on neuronal cell death in vitro and in vivo. *Brain Res* 881:139-43
97. Brar BK, Stephanou A, Okosi A, et al. 1999 CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 158:55-63
98. Ikeda K, Tojo K, Tokudome G, et al. 2003 Cardiac expression of urocortin (Ucn) in diseased heart; preliminary results on possible involvement of Ucn in pathophysiology of cardiac diseases. *Mol Cell Biochem* 252:25-32
99. Ng LL, Loke IW, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE 2004 Plasma urocortin in human systolic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 106:383-8
100. Scarabelli TM, Pasini E, Stephanou A, et al. 2002 Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 40:155-61
101. Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M 2005 The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 6:558-64
102. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Kan Y, et al. 1998 Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor

necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J Biol Chem* 273:31427-36

103. Ichiyama T, Sato S, Okada K, Catania A, Lipton JM 2000 The neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH. *Ann N Y Acad Sci* 917:221-6

104. Black PH 2002 Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* 16:622-53

105. Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B 2002 Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol* 133:1-19

106. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, et al. 1997 The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 23:79-133

107. Franchimont D, Galon J, Gadina M, et al. 2000 Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol* 164:1768-74

108. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Lafeber FP, Bijlsma JW 1999 The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis* 58:49-54

109. Jessop DS, Harbuz MS, Lightman SL 2001 CRH in chronic inflammatory stress. *Peptides* 22:803-7

110. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL 1990 Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun* 4:67-73

111. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP 1991 Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421-3
112. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al. 1993 Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Immunol* 151:1587-96
113. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al. 1992 Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 90:2555-64
114. Scopa CD, Mastorakos G, Friedman TC, Melachrinou M, Merino MJ, Chrousos GP 1994 Presence of immunoreactive corticotropin releasing hormone in thyroid lesions. *Am J Pathol* 145:1159-67
115. van Tol EA, Petrusz P, Lund PK, Yamauchi M, Sartor RB 1996 Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 39:385-92
116. Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E 1993 Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7104-8
117. Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergun S, Beil FU, Schulte HM 1998 Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 83:708-11
118. Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C 1998 Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone and cortisol molecules in invertebrate haemocytes and lower and higher vertebrate thymus. *Histochem J* 30:61-7

119. Bileviciute I, Ahmed M, Bergstrom J, Ericsson-Dahlstrand A, Kreicbergs A, Lundeberg T 1997 Expression of corticotropin-releasing factor in the peripheral nervous system of the rat. *Neuroreport* 8:3127-30
120. Baigent SM, Lowry PJ 2000 mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 25:43-52
121. Kempuraj D, Papadopoulou NG, Lytinas M, et al. 2004 Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 145:43-8
122. Kohno M, Kawahito Y, Tsubouchi Y, et al. 2001 Urocortin expression in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: relation to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4344-52
123. Wu Y, Zhou H, Xu Y, Li S 2006 Enhanced expression of urocortin in lung tissues of rats with allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 341:532-40
124. Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, et al. 2001 Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1362-9
125. Chatzaki E, Charalampopoulos I, Leontidis C, et al. 2003 Urocortin in human gastric mucosa: relationship to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:478-83
126. Kravchenko IV, Furalev VA 1994 Secretion of immunoreactive corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B-lymphocytes in response to cellular stress factors. *Biochem Biophys Res Commun* 204:828-34

127. Ekman R, Servenius B, Castro MG, et al. 1993 Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J Neuroimmunol* 44:7-13
128. Webster EL, Tracey DE, Jutila MA, Wolfe SA, Jr., De Souza EB 1990 Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor-bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology* 127:440-52
129. Webster EL, Battaglia G, De Souza EB 1989 Functional corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in mouse spleen: evidence from adenylate cyclase studies. *Peptides* 10:395-401
130. Radulovic M, Dautzenberg FM, Sydow S, Radulovic J, Spiess J 1999 Corticotropin-releasing factor receptor 1 in mouse spleen: expression after immune stimulation and identification of receptor-bearing cells. *J Immunol* 162:3013-21
131. Audhya T, Jain R, Hollander CS 1991 Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol* 134:77-84
132. Singh VK, Leu SJ 1993 Corticotropin-releasing factor-induced production of cyclic AMP by human peripheral blood immunocytes. *Immunol Lett* 35:239-45
133. Singh LK, Boucher W, Pang X, et al. 1999 Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1349-56
134. Mastorakos G, Bouzas EA, Silver PB, et al. 1995 Immune corticotropin-releasing hormone is present in the eyes of and promotes experimental autoimmune uveoretinitis in rodents. *Endocrinology* 136:4650-8
135. Webster EL, Barrientos RM, Contoreggi C, et al. 2002 Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *J Rheumatol* 29:1252-61

136. Wik M, Wang CC, Venihaki M, et al. 2002 Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum. *Gastroenterology* 123:505-15
137. Kawahito Y, Sano H, Mukai S, et al. 1995 Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* 37:544-51
138. la Fleur SE, Wick EC, Idumalla PS, Grady EF, Bhargava A 2005 Role of peripheral corticotropin-releasing factor and urocortin II in intestinal inflammation and motility in terminal ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7647-52
139. Poliak S, Mor F, Conlon P, et al. 1997 Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropin-releasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. *J Immunol* 158:5751-6
140. Wei ET, Gao GC, Thomas HA 1993 Peripheral anti-inflammatory actions of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp* 172:258-68; discussion 268-76
141. Tsagarakis S, Grossman A 1994 Corticotropin-releasing hormone: interactions with the immune system. *Neuroimmunomodulation* 1:329-34
142. Turnbull AV, Vale W, Rivier C 1996 Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, inhibits edema due to thermal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 303:213-6
143. Correa SG, Riera CM, Spiess J, Bianco ID 1997 Modulation of the inflammatory response by corticotropin-releasing factor. *Eur J Pharmacol* 319:85-90
144. Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P 1998 Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. *Am J Physiol* 275:E757-62

145. Sashinami H, Kageyama K, Suda T, Nakane A 2005 Urocortin 2 suppresses host resistance to *Listeria monocytogenes* infection via up-regulation of interleukin-10. *Endocrinology* 146:5003-11
146. McGillis JP, Park A, Rubin-Fletcher P, Turck C, Dallman MF, Payan DG 1989 Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci Res* 23:346-52
147. Singh VK 1989 Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J Neuroimmunol* 23:257-62
148. Hagan PM, Poole S, Bristow AF 1993 Corticotrophin-releasing factor as a mediator of the acute-phase response in rats, mice and rabbits. *J Endocrinol* 136:207-16
149. Singh VK, Leu SJ 1990 Enhancing effect of corticotropin-releasing neurohormone on the production of interleukin-1 and interleukin-2. *Neurosci Lett* 120:151-4
150. Leu SJ, Singh VK 1992 Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol* 143:220-7
151. Kavelaars A, Berkenbosch F, Croiset G, Ballieux RE, Heijnen CJ 1990 Induction of beta-endorphin secretion by lymphocytes after subcutaneous administration of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 126:759-64
152. Genedani S, Bernardi M, Baldini MG, Bertolini A 1992 Influence of CRF and alpha-MSH on the migration of human monocytes in vitro. *Neuropeptides* 23:99-102
153. Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, et al. 1993 Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 53:1735-42

154. Carr DJ, DeCosta BR, Jacobson AE, Rice KC, Blalock JE 1990 Corticotropin-releasing hormone augments natural killer cell activity through a naloxone-sensitive pathway. *J Neuroimmunol* 28:53-61
155. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, et al. 1998 Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 139:403-13
156. Zhao J, Karalis KP 2002 Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes. *Mol Endocrinol* 16:2561-70
157. McEvoy AN, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP 2004 Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 production by corticotropin-releasing hormone contributes to the activated cAMP response element binding protein content in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 50:1132-45
158. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN 2002 Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 70:6068-74
159. Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermintzaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A, Margioris A Urocortin 1 and urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR₂. *FEBS* 2005 4259-4264
160. Boehme SA, Gaur A, Crowe PD, et al. 1997 Immunosuppressive phenotype of corticotropin-releasing factor transgenic mice is reversed by adrenalectomy. *Cell Immunol* 176:103-12

161. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. 1995 Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15:943-53
162. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M 1995 Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270:286-90
163. Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, et al. 1990 Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62:1217-26
164. Turnbull AV, Smith GW, Lee S, Vale WW, Lee KF, Rivier C 1999 CRF type I receptor-deficient mice exhibit a pronounced pituitary-adrenal response to local inflammation. *Endocrinology* 140:1013-7
165. Turnbull AV, Rivier CL 1999 Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71
166. Venihaki M, Dikkes P, Carrigan A, Karalis KP 2001 Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation. *J Clin Invest* 108:1159-66
167. Karalis KP, Kontopoulos E, Muglia LJ, Majzoub JA 1999 Corticotropin-releasing hormone deficiency unmasks the proinflammatory effect of epinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7093-7
168. Kyby J. Immunology Chapter 15
169. Aguilera G Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 1994; 15: 321-50

170. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL Corticotrophin-releasing factor –like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun* 1990; 4: 67-73
171. Gay Jerome, Efi Kokkotou, Michael O'Brien, Charalabos Pathoulakis and Katia Karalis Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Endocrinology*;149:3403-3409, 2008
172. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. 2002 Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun*. Nov;70(11):6068-74
173. Lumpkin, M. D. 1987. The regulation of ACTH secretion by IL-1. *Science* 238:452-454
174. Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12280-7.
175. Androulidaki A, Dermitzaki E, Venihaki M, Karagianni E, Rassouli O, Andreakou E, Stournaras C, Margioris AN, Tsatsanis C. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Mol Cancer*. 2009 Jun 2;8:30
176. Bale TL, Giordano FJ, Hickey RP, et al. 2002 Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7734-9
177. Zhao J, Karalis KP. Regulation of nuclear factor-kappa B by corticotropin releasing hormone in mouse thymocytes. *Mol Endocrinol*. 2002;16:2561–70

178. Karalis KP, Venihaki M, Zhao J, van Vlerken LE, Chandras C. NF-kappa B participates in the corticotropin releasing hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem*. 2004;279:10837–40
179. Zbytek B, Pfeffer LM, Slominski AT. CRH inhibits NF-kappa B signaling in human melanocytes. *Peptides*. 2006 Dec;27(12):3276-83.
180. Karalis KP, Venihaki M, Zhao J, van Vlerken LE, Chandras C. NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19;279(12):10837-40.
181. Landmesser U, Hornig B, Drexler H Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109; 27-33
182. Santiago-Delpin E.A The endothelium and early immune activation: new perspective and interactions 2004; *Transplantation Proceedings*; 36; 1709-1713
183. Tedgui A, Mallat Z Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ. Res*. 2001; 88; 877-887
184. Paoletti R, Gotto A, Hajjar j, Hajjar D Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* 2004; 109; 20-26
185. Black P. Garbutt L Stress, inflammation and cardiovascular disease 2002 *Journal of Psychosomatic research* 52; 1-23
186. Hansson G, Libby P, Schoenbeck U, Yan Z Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis 2002 *Circ. Res*. 2002; 91; 281-291
187. Fan J, Watanabe T Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. 2003 *J Atheroscler Thromb*; 10; 63-71
188. Young J, Libby P, Schoenbeck U Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. 2002 *Thromb Haemost*; 88; 554-67

189. Saito S, Sakai M Th1/Th2 balance in preeclampsia 2003 Journal of reproductive Immunology 59; 161-173
190. Zerneck A, Weber C Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. 2005 Basic Res Cardiol; 100; 93-101
191. Casadevall M, Saperas E, Panes J, Salas A, Anderson D, Malagelada J, Pique J 1999 Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of central corticotrophin-releasing factor. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 276; 1016-1026
192. Jain V, Vedernikov Y, Saade G, Chwalisz K, Garfield R Endothelium-dependent and -independent mechanisms of vasorelaxation by corticotrophin-releasing factor in pregnant rat uterine artery 1999 The journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol 288, No 2
193. Fisher LA, Jessen G, Brown MR. Corticotropin-releasing factor (CRF): mechanism to elevate mean arterial pressure and heart rate. Regul Pept. 1983 Jan;5(2):153-61
194. Gardiner SM, Bennett T. Cardiac baroreflex sensitivities in conscious, unrestrained, Long Evans and Brattleboro rats. J Auton Nerv Syst. 1988 Sep;23(3):213-9.
195. Cantarella G, Lempereur L, Lombardo G, Chiarenza A, Pafumi C, Zappalà G, Bernardini R. Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. Br J Pharmacol. 2001 Oct;134(4):837-44
196. Correa S.G, Riera C.M, Spiess J, Bianco J.D (1997). Modulation of the inflammatory response by corticotropin releasing factor. Eur. J. Pharmacol.319,
197. Munck A., Guyre P.M, Holbrook N.J. (1984). Physiological function of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological action. Endocrine Rev., 5, 25–60 85–91.

198. Karalis K., Sano H. Redwine J., Listwak S., Wilder R.L, Chrousos G.P. (1991). Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*, 254, 421–423.
199. Wilbert-Lampen U, Trapp A, Modrzik M, Fiedler B, Straube F, Plasse A. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: a potential link between stress and endothelial dysfunction? *J Psychosom Res.* 2006 Oct;61(4):453-60
200. Huang AL, Vita JA. Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Jan;16(1):15-20. Review.
201. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Oct 1;42(7):1149-60. Review
202. Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF Jr, Morrow JD, Vita JA. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension.* 2003 Sep;42(3):310-5.
203. Cockcroft JR. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Hypertens.* 2005 Dec;18(12 Pt 2):177S-183S. Review
204. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J.* 2006 Sep;20(11):1889-91.
205. Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC, Ignarro LJ, Cirino G. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):904-8.
206. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10040-6.

207. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):323-33. Review
208. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997 Dec 15;100(12):3131-9
209. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res*. 2004 Oct 1;64(1):172-8
210. Malmström RE, Weitzberg E. Endothelin and nitric oxide in inflammation: could there be a need for endothelin blocking anti-inflammatory drugs? *J Hypertens*. 2004 Jan;22(1):27-9
211. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990 Dec 20-27;348(6303):730-2
212. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990 Dec 20-27;348(6303):732-5.
213. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9797-800
214. Malmström RE, Törnberg DC, Settergren G, Liska J, Angdin M, Lundberg JO, Weitzberg E. Endogenous nitric oxide release by vasoactive drugs monitored in exhaled air. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jul 1;168(1):114-20.
215. Ye Q, Chen S, Gardner DG. Endothelin inhibits NPR-A and stimulates eNOS gene expression in rat IMCD cells. *Hypertension*. 2003 Mar;41(3 Pt 2):675-81. Epub 2002 Dec 9

216. Hocher B, Schwarz A, Slowinski T, Bachmann S, Pfeilschifter J, Neumayer HH, Bauer C. In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J Hypertens*. 2004 Jan;22(1):111-9
217. Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7630-5.
218. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jul;38(7):995-1014.
219. Wada Y, Otu H, Wu S, Abid MR, Okada H, Libermann T, Kodama T, Shih SC, Minami T, Aird WC. Preconditioning of primary human endothelial cells with inflammatory mediators alters the "set point" of the cell. *FASEB J*. 2005 Nov;19(13):1914-6.
220. Ahmad S, Ahmad A, Gerasimovskaya E, Stenmark KR, Allen CB, White CW. Hypoxia protects human lung microvascular endothelial and epithelial-like cells against oxygen toxicity: role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Feb;28(2):179-87
221. Delikouras A, Fairbanks LD, Simmonds AH, Lechler RI, Dorling A. Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors. *Eur J Immunol*. 2003 Nov;33(11):3127-35
222. Ishida I, Kubo H, Suzuki S, Suzuki T, Akashi S, Inoue K, Maeda S, Kikuchi H, Sasaki H, Kondo T. Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells. *J Immunol*. 2002 Aug 15;169(4):2069-75
223. Kohn G, Wong HR, Bshesh K, Zhao B, Vasi N, Denenberg A, Morris C, Stark J, Shanley TP. Heat shock inhibits tnf-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells via I kappa kinase inhibition. *Shock*. 2002 Feb;17(2):91-7

224. Che W, Lerner-Marmarosh N, Huang Q, Osawa M, Ohta S, Yoshizumi M, Glassman M, Lee JD, Yan C, Berk BC, Abe J. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ Res*. 2002 Jun 14;90(11):1222-30
225. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T, Zhang XC, Gallo D, Cszimadia E, Bach FH, Lee PJ, Otterbein LE. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5109-14. Epub 2007 Mar 12
226. Chin BY, Petrache I, Choi AM, Choi ME. Transforming growth factor beta1 rescues serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *J Biol Chem*. 1999 Apr 16;274(16):11362-8
227. Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol*. 2000 Sep;48(3):285-96
228. Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R, Maeda N, Mitsuda N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience*. 2004;126(2):433-40.
229. Yang BC, Zander DS, Mehta JL. Hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cultured adult rat myocytes and the protective effect of platelets and transforming growth factor-beta(1). *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Nov;291(2):733-8
230. Biswas S, Criswell TL, Wang SE, Arteaga CL. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling in human cancer: targeting a tumor suppressor network as a therapeutic strategy. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4142-6.

231. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 1;88(7):2918-21
232. Horowitz JC, Lee DY, Waghray M, Keshamouni VG, Thomas PE, Zhang H, Cui Z, Thannickal VJ. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9;279(2):1359-67.
233. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994 Apr 28;368(6474):850-3
234. Garland CJ, Dora KA. Evidence against C-type natriuretic peptide as an arterial 'EDHF'. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(1):4-5.
235. Lewis K, Cadieux A, Rae GA, Gratton JP, D'Orléans-Juste P. Nitric oxide limits the eicosanoid-dependent bronchoconstriction and hypotension induced by endothelin-1 in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*. 1999 Jan;126(1):93-102
236. Dashwood MR, Andrews HE, Wei ET. Binding of [125I]Tyr-corticotropin-releasing factor to rabbit aorta is reduced by removal of the endothelium. *Eur J Pharmacol*. 1987 Mar 3;135(1):111-2
237. Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Giles WB, Boura AL, Robinson PJ, Smith R. Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal-placental circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Oct;80(10):2888-93
238. Lei S, Richter R, Bienert M, Mulvany MJ. Relaxing actions of corticotropin-releasing factor on rat resistance arteries. *Br J Pharmacol*. 1993 Apr;108(4):941-7.

239. Barker DM, Corder R. Studies of the role of endothelium-dependent nitric oxide release in the sustained vasodilator effects of corticotrophin releasing factor and sauvagine. *Br J Pharmacol*. 1999 Jan;126(1):317-25
240. Little PJ, Campbell JH, Skews H, Bobik A. Mechanism of isoprenaline induced desensitization of rabbit aortic smooth muscle beta-adrenoceptor responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1984 Sep-Oct;11(5):503-11
241. Chen ZW, Huang Y, Yang Q, Li X, Wei W, He GW. Urocortin-induced relaxation in the human internal mammary artery. *Cardiovasc Res*. 2005 Mar 1;65(4):913-20
242. Schilling L., Kanzler C., Schmiedek P., Ehrenreich H. Characterization of the relaxant action of urocortin, a new peptide related to corticotropin-releasing factor in the rat isolated basilar artery. *Br. J. Pharmacol*. (1998) 125:1164–1171.
243. Huang Y., Chan F.L., Lau C.W., Tsang S.Y., He G.W., Chen Z.Y., et al. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: role of nitric oxide and K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol*. (2002) 135:1467–1476.
244. Huang Y., Chan F.L., Lau C.W., Tsang S.Y., Chen Z.Y., He G.W., et al. Roles of cyclic AMP and Ca²⁺-activated K⁺ channels in endothelium-independent relaxation by urocortin in the rat coronary artery. *Cardiovasc. Res*. (2003) 57:824–833.
245. Lau C.W., Chan Y.C., Yao X., Chan F.L., Chen Z.Y., Huang Y. Nickel inhibits urocortin-induced relaxation in the rat pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol*. (2004) 488:169–172.
246. Huang Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aortic rings. *Eur. J. Pharmacol*. (1998) 349:53–60.
247. Tao J, Li S. Urocortin: a cardiac protective peptide? *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 15;332(4):923-6. Review

248. Tan HL, Mazón P, Verberne HJ, Sleeswijk ME, Coronel R, Opthof T, Janse MJ. Ischaemic preconditioning delays ischaemia induced cellular electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res.* 1993 Apr;27(4):644-51. Erratum in: *Cardiovasc Res* 1993 Jul;27(7):1385
249. Chan YC, Yao XQ, Lau CW, Chan FL, He GW, Bourreau JP, Huang Y. The relaxant effect of urocortin in rat pulmonary arteries. *Regul Pept.* 2004 Sep 15;121(1-3):11-8
250. Lubomirov L, Gagov H, Petkova-Kirova P, Duridanova D, Kalentchuk VU, Schubert R. Urocortin relaxes rat tail arteries by a PKA-mediated reduction of the sensitivity of the contractile apparatus for calcium. *Br J Pharmacol.* 2001 Dec;134(7):1564-70
251. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature.* 1995 Nov 16;378(6554):287-92
252. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):410-4
253. Grossini E, Molinari C, Mary DA, Uberti F, Ribichini F, Caimmi PP, Vacca G. Urocortin II induces nitric oxide production through cAMP and Ca²⁺ related pathways in endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2009;23(1-3):87-96.
254. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5323-44. Review
255. Halliwell B, Gutteridge MJ Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publication Chapter 2

256. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2007 Dec;41(12):1364-75. Review
257. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996 Jan 1;313 (Pt 1):17-29. Review
258. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003 Dec;42(6):1075-81. Review
259. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999 Mar 15;4:D339-45. Review
260. García-Villalón AL, Sanz E, Monge L, Fernández N, Climent B, Diéguez G. Urocortin protects coronary endothelial function during ischemia-reperfusion: a brief communication. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jan;229(1):118-20
261. Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8508-14
262. Brar BK, Stephanou A, Okosi A, Lawrence KM, Knight RA, Marber MS, Latchman DS. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Dec 20;158(1-2):55-63
263. Rademaker MT, Charles CJ, Richards AM. Urocortin 1 administration from onset of rapid left ventricular pacing represses progression to overt heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Sep;293(3):H1536-44.

264. Yang C, Xu Y, Mendez T, Wang F, Yang Q, Li S. Effects of intravenous urocortin on angiotensin-converting enzyme in rats. *Vascul Pharmacol*. 2006 Apr;44(4):238-46.
265. Inada Y, Ikeda K, Tojo K, Sakamoto M, Takada Y, Tajima N. Possible involvement of corticotropin-releasing factor receptor signaling on vascular inflammation. *Peptides*. 2009 Feb;30(2):365-72.
266. Miki I, Seya K, Motomura S, Furukawa K. Role of corticotropin-releasing factor receptor type 2 beta in urocortin-induced vasodilation of rat aortas. *J Pharmacol Sci*. 2004 Oct;96(2):170-6.
267. Honjo T, Inoue N, Shiraki R, Kobayashi S, Otsui K, Takahashi M, Hirata K, Kawashima S, Yokozaki H, Yokoyama M. Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin. *J Vasc Res*. 2006;43(2):131-8.
268. Townsend PA, Davidson SM, Clarke SJ, Khaliulin I, Carroll CJ, Scarabelli TM, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS, Halestrap AP. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Aug;293(2):H928-38.
269. Li X, Zhang R, Sun X Urocortin ameliorates diabetic nephropathy in obese *db/db* mice. 2008 *British Journal of Pharmacology* 154, 1025-1034
270. Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci*. 2002 Jan 15;22(2):404-12.
271. Gillham JC, Myers JE, Baker PN, Taggart MJ. TNF-alpha alters nitric oxide- and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilatation in human omental arteries. *Hypertens Pregnancy*. 2008;27(1):29-38

272. Gillham JC, Myers JE, Baker PN, Taggart MJ. Regulation of endothelial-dependent relaxation in human systemic arteries by SKCa and IKCa channels. *Reprod Sci*. 2007 Jan;14(1):43-50
273. Scalera F. Intracellular glutathione and lipid peroxide availability and the secretion of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells after incubation with TNF-alpha. *Eur J Clin Invest*. 2003 Feb;33(2):176-82
274. Balog T, Sarić A, Sobočanec S, Kušić B, Marotti T. Endomorphin-suppressed nitric oxide release from mice peritoneal macrophages. *Neuropeptides*
275. Verma N, Tripathi SK, Chaudhury I, Das HR, Das RH. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) targeted 10-23 DNAzyme reduces lipopolysaccharide (LPS) induced systemic inflammation and mortality in mice. *Shock*. 2009 Oct 9.
276. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009 Sep 15;78(6):539-52. Review
277. Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev*. 2008 Jul;28(4):483-544. Review
278. Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Indian J Biochem Biophys*. 2007 Oct;44(5):310-9. Review
279. Gordon, S. (1999) "Macrophages and the immune system." in *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Paul, W.E., ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 533-545.
280. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):287-92
281. Duffield, J.S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Jan;104(1):27-38. Review

281. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23-35. Review
282. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Kontinen YT. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Nov;60(11):2334-46. Review
283. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209-12. Review
284. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1739-42.
285. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1742-5.
286. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. Review
287. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
288. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002 Jul;3(7):667-72.
289. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):136-45.
290. Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jun;3(6):472-82. Review

291. Harding CV, Ramachandra L, Wick MJ. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2003 Feb;15(1):112-9. Review
292. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):129-35. Review
293. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Sep 1;23(9):1553-8
294. Duffield JS, Ware CF, Ryffel B, Savill J. Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages. *Am J Pathol.* 2001 Oct;159(4):1397-404
295. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol.* 2000 Aug 25;204(1):19-28
296. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6533-44
297. Thomassen MJ, Kavuru MS. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol.* 2001 Aug;1(8):1479-90. Review

298. Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):2110-9.
299. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5347-54
300. Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, Burger D, Dayer JM Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5952-60.
301. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jun;20(6):1136-44
302. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jun;20(6):1145-54
303. Rückert Y, Rohde W, Furkert J. Radioimmunoassay of corticotropin-releasing hormone. *Exp Clin Endocrinol.* 1990 Nov;96(2):129-37
304. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 2009 Feb;116(3):219-30. Review

305. Yoshida LS, Tsunawaki S Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . *Int Immunopharmacol*. 2008 Oct;8(10):1377-85.
306. Zhang C, Hein TW, Wang W, Ren Y, Shipley RD, Kuo L. Activation of JNK and xanthine oxidase by TNF- α impairs nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Feb;40(2):247-57.
307. Gertzberg N, Neumann P, Rizzo V, Johnson A. NAD(P)H oxidase mediates the endothelial barrier dysfunction induced by TNF- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jan;286(1):L37-48.
308. Scalera F. Intracellular glutathione and lipid peroxide availability and the secretion of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells after incubation with TNF- α . *Eur J Clin Invest*. 2003 Feb;33(2):176-82
309. Lu ZJ, Ren YQ, Wang GP, Song Q, Li M, Jiang SS, Ning T, Guan YS, Yang JL, Luo F Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Feb 13;28:16.
310. Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*. 2001;4(2):91-102.
311. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980 Aug;26(2):171-6.

312. Tamara M. Paravicini and Rhian M. Touyz Redox signaling in hypertension Cardiovascular Research 2006 71(2):247-258
313. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S The endothelium and inflammation. Endothelium. 2006 Nov-Dec;13(6):423-9.
314. Kenneth A. Roebuck. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C719–C741, 2001.
315. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109 (suppl III): III27- III32.
316. Masuko Ushio-Fukai Cardiovascular Research 71 (2006) 226 – 235 Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase
317. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):345-50. Review.
318. Hua Cai, David G. Harrison Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases The Role of Oxidant Stress *Circ Res*. 2000;87:840-844
319. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG, Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin *Circulation* 2001;103:1282–1288.
320. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):323-33.
321. P. Kirkham Oxidative stress and macrophage function: a failure to resolve the inflammatory response *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 2

322. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6
323. Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett.* 2004 Sep 16;368(1):15-20
324. Kyrian T.R, Devi S.A. (2004) Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137: 187-196
325. Shaik IH, Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem.* 2006 May;385(1):105-13.
326. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:5159- 5162.
327. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 1991;266:6259-6263
328. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10480-10484.

