

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**
Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Λ. ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του γλυκοζυλιωμένου με O-N-
Ακετυλογλυκοζαμίνη Επίτοπου Η στις χοριακές λάχνες του πλακούντα
στις παλίνδρομες κυήσεις»*

του Ιατρού
ΜΙΧΑΗΛ ΑΠ. ΝΙΚΟΛΑΟΥ



ΛΑΡΙΣΑ 2011

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF MORPHOLOGY
LABORATORY OF ANATOMY
HEAD: Professor D. L. ARVANITIS

PhD Thesis

“Immunohistochemical study of the expression of the O-linked- N-acetylglucosamine containing epitope H in the chorionic villi of the placenta in missed miscarriage abortions”

MICHAEL AP. NIKOLAOU, Doctor



LARISSA 2011

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη ανοσοϊστοχημικώς της κατανομής του επίτοπου Η στις χοριακές λάχνες του πλακούντα σε 60 περιπτώσεις παλίνδρομων κυήσεων, κάθε μία από τις οποίες περιείχε χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Ακόμα, με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος (western blot) μελετήθηκε σε μερικά δείγματα η παρουσία του επίτοπου Η στα πολυπεπίδια των κυττάρων των χοριακών λαχνών.

Το υλικό της παρούσης διατριβής ελήφθη από την Παθολογοανατομική Μονάδα του Εργαστηρίου Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο Επίτοπος Η περιλαμβάνει το σάκχαρο Ο-N-Ακετυλογλυκοζαμίνη τοποθετημένο κατά ένα ειδικό τρόπο στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και/ή γειτονικό τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, και αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού της τάξης IgM.

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής αποδεικνύουν ότι η μυξοειδής υδρωπική εκφύλιση των χοριακών λαχνών προκαλεί μεγάλη αύξηση της έκφρασης του επίτοπου Η στα κύτταρα της συγκιτωτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης, και μεγάλη ελάττωση της έκφρασης του Επίτοπου Η στους ινοβλάστες σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

The objective of the present PhD thesis was the immunohistochemical study of the Epitope H distribution on the chorionic villi of the placenta in 60 different cases of palindromic gestations, each of which constituted of chorionic villi with normal characteristics and chorionic villi with myxoid hydropic degeneration. Moreover, under the western blot method the presence of Epitope H in the polypeptides of the chorionic villi cells was studied.

The material for this PhD study was gathered from the Pathology –Anatomy Unit of the Laboratory of Anatomy, Faculty of Medicine / University of Thessaly.

The epitope H contains the sugar O-linked N-acetylglucosamine in a specific conformation and or/environment implying that the monoclonal IgM mouse antibody H which reacts with the epitope H recognizes a subpopulation of the polypeptides which are glycosylated with the sugar N- acetylglucosamine.

The myxoid hydropic degeneration of the chorionic villi in the cases of missed miscarriage abortions causes great up -regulation of the O -linked N -acetylglucosamine containing epitope H in the cells of the syncytiotrophoblast and cytotrophoblast and great down -regulation of the epitope H in the fibroblasts compared with the expression of the epitope H in the corresponding type of cells in the chorionic villi with the normal characteristics.

Από τη θέση αυτή, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Δημήτριο Αρβανίτη**, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιώντας με τον τρόπο αυτό ένα στόχο που είχα θέσει από τα πρώιμα φοιτητικά μου χρόνια. Περαιτέρω, ελπίζω ότι πέτυχα ένα μικρό σημαντικό άλμα στην επιστημονική μου πορεία, ενώ ταυτόχρονα η διδακτορική αυτή διατριβή αποτελεί την απτή υλοποίηση ενός προσωπικού οράματος. Ο κ. Αρβανίτης, ως επιβλέπων της διατριβής μου, μου ενέπνευσε τη στρατηγική και ενίσχυσε τα κίνητρά μου, κατευθύνοντάς με σταθερά και συμβουλευόντάς με καίρια πάνω σε όλα τα θέματα που αντιμετωπίσαμε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Περαιτέρω, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Αθανάσιο Καλλιτσάρη**, και τον Επίκουρο Καθηγητή Ανατομίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Μάρκο Σγάντζο** για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Η καθοδήγηση και συμπαράστασή τους ήταν καθοριστική για την επιτυχία του εν λόγω πονήματος.

Στον πατέρα μου

Περίληψη	1
Summary	3
Ευχαριστίες	5
Περιεχόμενα	9
Πρόλογος	11
Κεφάλαιο 1 ^ο : Γενικό Μέρος	13
1.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	15
1.2 ΦΑΣΗ 1Η: ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΑΚΤΙΝΩΤΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΥ	16
1.3 ΦΑΣΗ 2Η: ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΑΝΟΥΣ ΖΩΝΗΣ	16
1.4 ΦΑΣΗ 3Η: ΣΥΝΕΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ	17
1.5 ΤΕΧΝΗΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	20
1.6 ΑΥΛΑΚΩΣΗ	21
1.8 ΑΝΩΜΑΛΟΙ ΖΥΓΩΤΕΣ	23
1.9 Ο ΔΙΣΤΙΒΟΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΔΙΣΚΟΣ (2Η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ)	24
1.9.1 Η 8 ^η ημέρα της ανάπτυξης	24
1.9.2 Η 9 ^η ημέρα της ανάπτυξης	26
1.9.3 Η περαιτέρω ανάπτυξη της τροφοβλάστης	27
1.10 ΟΙ ΕΜΒΡΥΪΚΟΙ ΥΜΕΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ	30
1.10.1 Ο πλακούντας στο τέλος της κύησης	30
1.10.2 Η κυκλοφορία του πλακούντα	30
1.10.3 Η λειτουργία του πλακούντα	31
1.11 ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ	33
1.11.1 Υδατιδώδης μύλη κύηση (μερική και ολική)	34
1.11.2 Διηθητική μύλη κύηση	38
1.11.3 Τροφοβλαστικός όγκος θέσης εμφύτευσης	41
Κεφάλαιο 2 ^ο : Η σημασία της γλυκοζυλίωσης των πολυπεπτιδίων με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη στο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης O-GlcNAc	43
2.1 ΥΠΟΒΑΘΡΟ	46
2.2 Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ OGLCNAC	47
2.3 OGT	47
2.4 O-GLCNAC-ΑΣΗ	50
2.5 O-GLCNAC, ΕΝΑΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ	51
2.6 Η O-GLCNAC ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	53
2.7 ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	53
2.8 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ	55
2.9 ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	56
Κεφάλαιο 3ο: Βιοχημικά μονοπάτια που ελέγχονται από την O-GlcNAc	61
3.1 O-GLCNAC: ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ & ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟΥ II ΣΔ	63
3.2 O-GLCNAC, ΕΝΑΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	65
3.3 Η O-GLCNAC ΚΑΙ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	66
3.4 ΤΕΛΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ	68
Κεφάλαιο 4 ^ο : Κυτταρολογική και πολυπεπτιδική κατανομή του Επιτόπου H	71

Κεφάλαιο 5 ^ο : Ειδικό Μέρος	77
5.1 ΥΛΙΚΟ	79
5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	79
5.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ (WESTERN - BLOT)	80
5.3 ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΙΣ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ	80
5.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ ΜΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	82
5.5.1 Συγκυτιοτροφοβλάστη	82
5.5.2 Κυτταροτροφοβλάστη	83
5.5.3 Ινοβλάστες	84
5.5.4 Ιστιοκύτταρα	85
5.5.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα	86
5.5.6 Ερυθρά αιμοσφαίρια	87
5.5.7 Μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες	88
5.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ ΜΕ ΜΥΞΟΕΙΔΗ ΥΔΡΩΠΙΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ	89
5.6.1 Συγκυτιοτροφοβλάστη	91
5.6.2 Κυτταροτροφοβλάστη	92
5.6.3 Ινοβλάστες	94
5.6.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα	95
5.6.6 Ερυθρά αιμοσφαίρια	96
5.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ	97
5.8 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	97
Κεφάλαιο 6 ^ο : Συζήτηση	129
Κεφάλαιο 7 ^ο : Τελικά Συμπεράσματα	137
Βιβλιογραφία	143

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Γλυκοζυλίωση των πολυπεπτιδίων με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη αναγνωρίστηκε το 1984 και από τότε ανακαλύπτονται συνεχώς πολυπεπτίδια που φέρουν αυτό το σάκχαρο. Η γλυκοζυλίωση των πολυπεπτιδίων γίνεται στο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης, δηλαδή στη θέση που γίνεται και η φωσφοριλίωση. Σύμφωνα με πρωτοπόρους ερευνητές, η γλυκοζυλίωση και η απογλυκοζυλίωση των πολυπεπτιδίων με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να αποδειχθεί πολύ σημαντική για διάφορες βιολογικές εξεργασίες και όχι κατώτερης σημασίας από τη φωσφοριλύωση και αποφωσφοριλύωση.

Μέχρι στιγμής έχει βρεθεί ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών που φέρουν στο μόριό τους το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη και οι οποίες κατατάσσονται στις ακόλουθες μεγάλες κατηγορίες:

- 1) μεταγραφικοί παράγοντες
- 2) πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων
- 3) πρωτεΐνες συνδεδεμένες με RNA
- 4) πολυμεράσες
- 5) ένζυμα
- 6) κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες
- 7) πρωτεΐνες του θερμικού σοκ.

Έξι σημαντικές βιολογικές εξεργασίες επηρεάζονται από τη γλυκοζυλίωση και απογλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται λειτουργίες, όπως:

- η αντιγραφή του DNA,
- η αποδόμηση των πρωτεϊνών,
- η απόπτωση,
- η καρκινογένεση,
- η αντιμετώπιση καταστάσεων stress
- η συνεχής καταγραφή των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου και
- η διατήρηση του σακχάρου του αίματος.

Ο Επίτοπος Η αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα Η. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Η είναι της τάξεως IgM και δημιουργήθηκε σε ποντικό μετά από ένεση ολόκληρων σωμάτων ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων προβάτου. Ο Επίτοπος Η περιλαμβάνει το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά και άλλα στοιχεία, τα οποία μπορεί να είναι: το παρακείμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλύσου, ο τρόπος που τοποθετείται το σάκχαρο στο μόριο της πολυπεπτιδικής αλύσου ή ο συνδυασμός και των δύο παραπάνω καταστάσεων. Έτσι, το μονοκλωνικό αντίσωμα Η δεν αναγνωρίζει όλα τα πολυπεπτίδια που φέρουν το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό αυτών των πολυπεπτιδίων που φέρουν το σάκχαρο με τις προϋποθέσεις που απαιτούνται για να δημιουργηθεί ο Επίτοπος Η.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω κατάστασης είναι - σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία - ότι το αντίσωμα Η αναγνωρίζει την κερατίνη 8, της οποίας μοναδικό σάκχαρο είναι η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά δεν αναγνωρίζει την κερατίνη 18, η οποία επίσης έχει ως μοναδικό σάκχαρό της την N-ακετυλογλυκοζαμίνη.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικώς η κατανομή του επίτοπου Η στις χοριακές λάχνες του πλακούντα σε 60 περιπτώσεις παλίνδρομων κυήσεων, κάθε μία από τις οποίες περιείχε χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Ακόμα, με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος (western blot) μελετήθηκε σε μερικά δείγματα η παρουσία του επίτοπου Η στα πολυπεπτίδια των κυττάρων των χοριακών λαχνών.

Το υλικό της παρούσης διατριβής ελήφθη από την Παθολογοανατομική Μονάδα του Εργαστηρίου Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η συμβολή του οποίου κρίνεται ως εκ τούτου ανεκτίμητη.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κ
Ε
Φ
Λ
Λ
Α
Ι
Ο
1^ο

1.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η γονιμοποίηση, που ορίζεται ως η διεργασία με την οποία συνενώνονται ο άρρεν και θήλυς γαμέτης, συμβαίνει στη **λήκυθο του ωαγωγού**. Η λήκυθος είναι η ευρύτερη μοίρα του ωαγωγού και βρίσκεται κοντά στην ωοθήκη. Ενώ τα σπερματοζωάρια μπορούν να παραμένουν ζωντανά στη γυναικεία γεννητική οδό για 24 περίπου ώρες, το δευτερογενές ωοκύτταρο πιστεύεται ότι αν δε γονιμοποιηθεί πεθαίνει σε 12 έως 24 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία (17).

Τα σπερματοζωάρια περνούν γρήγορα από τον κόλπο στην κοιλότητα της μήτρας και από εκεί στους ωαγωγούς. Αυτή η ανάβαση πιθανόν να προκαλείται από συστολές του μυϊκού χιτώνα της μήτρας και των ωαγωγών. Δε θα πρέπει να λησμονείται ότι τα σπερματοζωάρια μόλις φθάσουν στο γεννητικό σύστημα του θήλεως δεν είναι ικανά να γονιμοποιήσουν το ωοκύτταρο. Πρέπει πρώτα να υποστούν (α) **ενεργοποίηση** και (β) **ακροσωματική αντίδραση**.

Ενεργοποίηση είναι η περίοδος προσαρμογής των σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σύστημα του θήλεως και στον άνθρωπο διαρκεί περίπου 7 ώρες.

Κατά τη διάρκειά της το γλυκοπρωτεϊνικό κάλυμμα και σπερματικές πρωτεΐνες απομακρύνονται από την κυτταρική μεμβράνη που επικαλύπτει την ακροσωματική περιοχή των σπερματοζωαρίων. Η ολοκλήρωση της ενεργοποίησης επιτρέπει την επιτέλεση της ακροσωματικής αντίδρασης (18, 19).

Η **ακροσωματική αντίδραση** επιτελείται σε άμεση γειτονία προς το ωοκύτταρο, υπό την επίδραση ουσιών που προέρχονται από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου και το ωοκύτταρο (20). Από μορφολογική άποψη η κυτταρική μεμβράνη και η εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη συνενώνονται μεταξύ τους σε πολλά σημεία, γεγονός που επιτρέπει την απελευθέρωση του ακροσωματικού περιεχομένου (Εικ. 1), το οποίο χρειάζεται για τη διέλευση του ακτινωτού στεφάνου και της διαφανούς ζώνης. Κατά την ακροσωματική αντίδραση απελευθερώνονται οι εξής ουσίες:

(α) υαλουρονιδάση, η οποία χρησιμεύει στο να υποβοηθήσει το σπερματοζωάριο να διαπεράσει το φραγμό του ακτινωτού στεφάνου (21)

(β) ουσίες τύπου θρυψίνης, οι οποίες χρειάζονται για την πέψη της διαφανούς ζώνης (22), και

(γ) ακροσίνη, προσκολλημένη στην εσωτερική επιφάνεια της ακροσωματικής μεμβράνης, η οποία επίσης χρησιμεύει στο να υποβοηθήσει το σπερματοζωάριο να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη (23, 24).

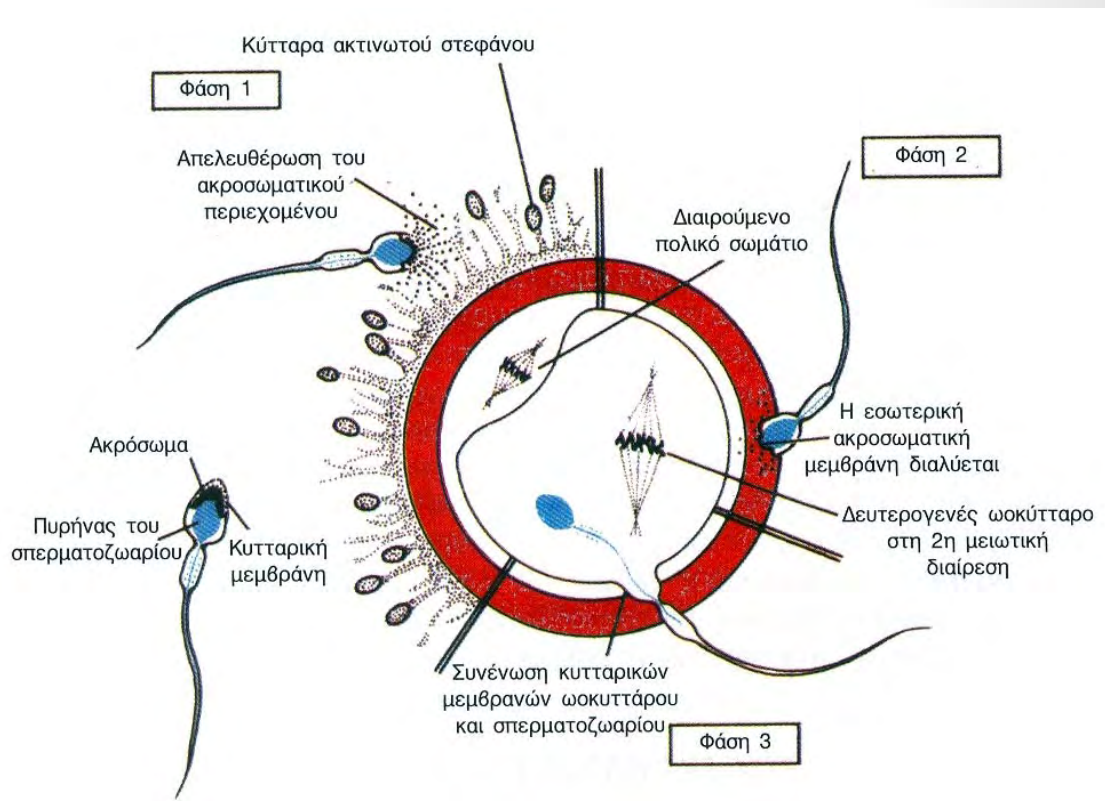
1.2 ΦΑΣΗ 1Η: ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΑΚΤΙΝΩΤΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Από τα 200 έως 300 εκατομμύρια σπερματοζωάρια που εναποτίθενται στη γυναικεία οδό μόνον 300 έως 500 φθάνουν στην περιοχή όπου γίνεται η γονιμοποίηση. Μόνο ένα από αυτά χρειάζεται για τη γονιμοποίηση, ενώ για τα υπόλοιπα πιστεύεται ότι υποβοηθούν το γονιμοποιό σπερματοζωάριο να διαπεράσει τον πρώτο φραγμό που προστατεύει το θήλυ γαμέτη, τον ακτινωτό στέφανο (Εικ. 1). Αρχικά, εθεωρείτο ότι το ένζυμο υαλουρονιδάση ήταν το υπεύθυνο ένζυμο για τη διάσπαση των κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου. Σήμερα πιστεύεται ότι τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου διασκορπίζονται χάρη στη συνδυασμένη δράση ενζύμων, τόσο του σπερματοζωαρίου όσο και του βλεννογόνου του ωαγωγού (17).

1.3 ΦΑΣΗ 2Η: ΔΙΕΛΕΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΑΝΟΥΣ ΖΩΝΗΣ

Το σπερματοζωάριο διαπερνά το δεύτερο κατά σειρά φραγμό που προστατεύει το θήλυ γαμέτη, με τη βοήθεια ενζύμων που απελευθερώνονται από την εσωτερική ακροσωματική μεμβράνη (Εικ. 1) (15). Μόλις το σπερματοζωάριο αγγίξει τη διαφανή ζώνη, προσκολλάται στέρεα σε αυτήν και την διαπερνά γρήγορα. Η διαβατότητα της διαφανούς ζώνης αλλάζει όταν η κεφαλή του σπερματοζωαρίου έλθει σε επαφή με την επιφάνεια του ωοκυττάρου. Η εν λόγω επαφή έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων, τα οποία προκαλούν μεταβολή στις ιδιότητες της διαφανούς ζώνης (την αποκαλούμενη **αντίδραση της ζώνης**) και αδρανοποιούν ειδικές για το είδος θέσεις υποδοχής των σπερματοζωαρίων (25). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά σπερματοζωάρια διαπερνούν τη διαφανή ζώνη, αλλά μόνο ένα φαίνεται ότι είναι σε θέση να διεισδύσει στο ωοκύτταρο (Εικ. 2B) (26). Σε σπάνιες περιπτώσεις διεισδύουν ταυτόχρονα δύο

σπερματοζωάρια στο θήλυ γαμέτη και έχουν περιγραφεί έμβρυα με 69 χρωματοσώματα (27).



Εικ. 1 Σχηματική αναπαράσταση των τριών φάσεων της εισόδου στο ωοκύτταρο. Στην 1η φάση τα σπερματοζωάρια διαπερνούν το φραγμό του ακτινωτού στεφάνου. Στη 2η φάση ένα ή περισσότερα σπερματοζωάρια διεισδύουν στη διαφανή ζώνη, ενώ στην 3η φάση ένα σπερματοζωάριο διαπερνά τη μεμβράνη του ωοκυττάρου, ενώ παράλληλα χάνει τη δική του. Το ένθετο σχήμα απεικονίζει φυσιολογικό σπερματοζωάριο με την ακροσωματική καλύπτρα.

1.4 ΦΑΣΗ 3Η: ΣΥΝΕΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Αμέσως μόλις το σπερματοζωάριο έλθει σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη του ωοκυττάρου, οι δύο μεμβράνες συνενώνονται (Εικ. 1). Δεδομένου ότι η μεμβράνη που σκέπαζε την ακροσωματική καλύπτρα έχει εξαφανισθεί κατά τη διάρκεια της ακροσωματικής αντίδρασης, στην πραγματικότητα συνένωση επιτελείται μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης του ωοκυττάρου και της μεμβράνης που καλύπτει το οπίσθιο μέρος της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (Εικ. 1). Στον άνθρωπο εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου τόσο η κεφαλή όσο και η ουρά του σπερματοζωαρίου, αλλά η κυτταρική μεμβράνη εγκαταλείπεται στην επιφάνεια του ωοκυττάρου (26).

Μόλις το σπερματοζωάριο εισέλθει στο ωκύτταρο, το ωάριο αντιδρά με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

(1) **Την αντίδραση του φλοιού και της ζώνης.** Λόγω της απελευθέρωσης των κοκκίων του φλοιού του ωκυττάρου, τα οποία περιέχουν λυσοσωματικά ένζυμα (α) η μεμβράνη του ωκυττάρου καθίσταται αδιαπέραστη για άλλα σπερματοζωάρια και (β) η διαφανής ζώνη αλλάζει τη δομή και τη σύστασή της, πιθανώς μέσω απομάκρυνσης ειδικών θέσεων υποδοχής σπερματοζωαρίων. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η πολυσπερμία.

(2) **Την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης.** Το ωκύτταρο ολοκληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεσή του, αμέσως μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου. Το ένα από τα θυγατρικά κύτταρα λαμβάνει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και είναι γνωστό ως **δεύτερο πολικό σωματίο**, ενώ το άλλο θυγατρικό κύτταρο είναι το **ώριμο ωάριο**. Τα χρωματοσώματά του ($22 + X$) εγκλείονται σε ένα φυσαλιδώδη πυρήνα, γνωστό ως **θήλυ προπυρήνα** (Εικ. 2B).

(3) **Τη μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου.** Ο ενεργοποιητικός παράγοντας πιθανόν μεταφέρεται από το σπερματοζωάριο. Η μετασυνενωτική ενεργοποίηση μπορεί να θεωρηθεί ότι περικλείει τα αρχικά κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που σχετίζονται με την πρώιμη εμβρυογένεση.

Εν τω μεταξύ, το σπερματοζωάριο κινείται προς τα εμπρός, μέχρις ότου φθάσει πολύ κοντά στο θήλυ προπυρήνα. Ο πυρήνας του διογκώνεται και σχηματίζει τον **άρρενα προπυρήνα** (Εικ. 2Γ), ενώ η ουρά αποκόπτεται και εκφυλίζεται. Από μορφολογική άποψη ο άρρεν και ο θήλυς προπυρήνας δε μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους και τελικά έρχονται σε στενή επαφή και χάνουν τα πυρηνικά περιβλήματά τους (Εικ. 3Α) (28, 29). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του άρρενος και του θήλεως προπυρήνα (και οι δυο τους είναι απλοειδείς), κάθε προπυρήνας πρέπει να διπλασιάσει την ποσότητα του DNA του (30). Σε ενάντια περίπτωση κάθε κύτταρο του ζυγώτη στο στάδιο των δύο κυττάρων θα περιείχε το ήμισυ της κανονικής ποσότητας DNA. Αμέσως μετά τη σύνθεση του DNA τα χρωματοσώματα αρχίζουν να λαμβάνουν θέση στην άτρακτο προπαρασκευαζόμενα για μια κανονική μιτωτική διαίρεση. Τα 23 μητρικά και τα 23 πατρικά (διπλά) χρωματοσώματα σχίζονται κατά τον επιμήκη άξονά τους στο κεντρομερίδιο και οι αδελφές χρωματίδες κινούνται προς τους αντίθετους πόλους, εφοδιάζοντας με αυτόν τον τρόπο κάθε κύτταρο

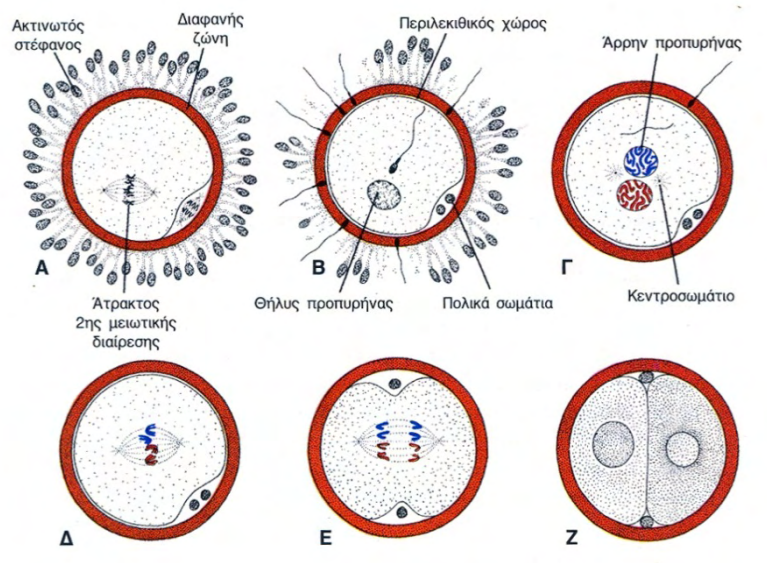
του ζυγώτη με τον κανονικό διπλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων και την κανονική ποσότητα DNA (Εικ. 2 Δ,Ε). Ενώ οι αδελφές χρωματίδες κινούνται προς τους αντίθετους πόλους, στην επιφάνεια του κυττάρου εμφανίζεται μία βαθιά αύλακα, η οποία χωρίζει σταδιακά το κυτταρόπλασμα σε δύο μέρη (Εικ. 2Ζ και 3Β).

Τα κύρια αποτελέσματα της γονιμοποίησης είναι:

(α) **αποκατάσταση του διπλοειδούς αριθμού των χρωματοσωμάτων**, μισά από τα οποία έχουν πατρική προέλευση και μισά μητρική προέλευση. Ως εκ τούτου, ο ζυγώτης περιέχει ένα νέο συνδυασμό χρωματοσωμάτων, διαφορετικό από των γονέων

(β) **καθορισμός του φύλου** του νέου ατόμου. Ένα σπερματοζωάριο που φέρει Χ-φυλετικό χρωματόσωμα θα δώσει θήλυ (XX) έμβρυο, ενώ ένα σπερματοζωάριο που φέρει Υ φυλετικό χρωματόσωμα θα δώσει άρρεν (XY) έμβρυο. Ως εκ τούτου, το χρωματοσωματικό φύλο του εμβρύου καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση

(γ) **έναρξη της αυλάκωσης**. Χωρίς γονιμοποίηση το ωοκύτταρο συνήθως εκφυλίζεται 24 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία.



Εικ. 2. Α. Ωοκύτταρο αμέσως μετά την ωοθυλακιορρηξία, το οποίο εμφανίζει την άτρακτο της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Β. Ένα σπερματοζωάριο έχει διεισδύσει στο ωοκύτταρο που έχει ολοκληρώσει τη δεύτερη μειωτική διαίρεσή του. Τα χρωματοσώματα του ωοκυττάρου έχουν εγκλεισθεί σε φυσαλιδώδη πυρήνα, το θήλυ προπυρήνα. Οι κεφαλές μερικών σπερματοζωαρίων έχουν καθλωθεί στη διαφανή ζώνη. Γ. Το στάδιο του άρρενος και του θήλεος προπυρήνα. Δ και Ε. Τα χρωματοσώματα διατάσσονται στην άτρακτο, σχίζονται κατά τον επιμήκη άξονά τους και κινούνται προς τους αντίθετους πόλους. Ζ. Το στάδιο των δύο κυττάρων.

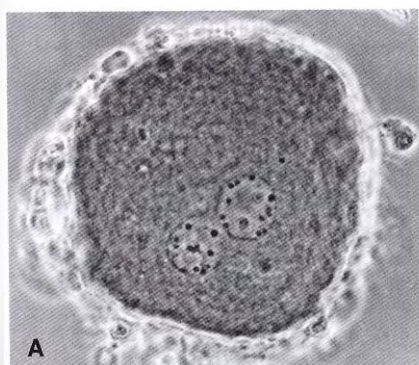
1.5 ΤΕΧΝΗΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η τεχνητή (in vitro) γονιμοποίηση των ανθρώπινων ωαρίων είναι μέθοδος που εφαρμόζεται τελευταία συχνά στα εργαστήρια σε διάφορα μέρη του κόσμου.

Η ωρίμανση ωοθυλακίων διεγείρεται στην ωοθήκη με χορήγηση γοναδοτροπινών. Τα ωκύτταρα αφαιρούνται από τα ωοθυλάκια με αναρροφητήρα αμέσως πριν από την ωοθυλακιορρηξία, οπότε το ωκύτταρο βρίσκεται στα τελικά στάδια της πρώτης μειωτικής διαίρεσής του. Κατόπιν, το ωάριο τοποθετείται σε απλό θρεπτικό υλικό και αμέσως προστίθεται σπέρμα. Τα γονιμοποιημένα ωάρια παρακολουθούνται συστηματικά μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων και κατόπιν εμφυτεύονται στη μήτρα για να αναπτυχθούν έως τη γέννηση. Μέχρι σήμερα πολλές τέτοιες κυήσεις έχουν φθάσει έως τον τοκετό με τη χρήση αυτής της τεχνικής (32-34).

Η μέθοδος της τεχνητής γονιμοποίησης παρέχει τη δυνατότητα να αντιμετωπισθεί η στειρότητα που οφείλεται σε ποικίλα αίτια, όπως μη διαπερατοί ωαγωγοί, απρόσφορη τραχηλική βλέννα, ανοσία στα σπερματοζωάρια κ.λπ. Πρόσθετο πλεονέκτημά της, το οποίο αναμένει περαιτέρω διερεύνηση, αφορά τη δυνατότητα εξέτασης του καρυστύπου του γονιμοποιημένου ωαρίου με σκοπό την αποφυγή χρωματοσωματικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων φυλοσύνδετων διαταραχών (34). Ευτυχώς, ο κίνδυνος παραγωγής ανώμαλων εμβρύων με τις in vitro τεχνικές είναι πολύ χαμηλός, επειδή το έμβρυο πριν από την επανεμφύτευσή του είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε τερατογόνες επιδράσεις.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής είναι το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της, αφού μόνο 20% των γονιμοποιημένων ωαρίων εμφυτεύονται και αναπτύσσονται πλήρως. Για το λόγο αυτό, και για να αυξηθεί η πιθανότητα επιτυχούς κύησης, συλλέγονται 4 έως 5 ωάρια, τα οποία γονιμοποιούνται και τοποθετούνται στη μήτρα. Η εν λόγω αντιμετώπιση οδηγεί, όπως είναι επόμενο, σε αυξημένη πιθανότητα πολύδυμων κυήσεων, γεγονός που έχει παρατηρηθεί.



Εικ. 3. Το προπυρηνικό στάδιο του γονιμοποιημένου ανθρώπινου ωοκυττάρου όπως φαίνεται με αντίθεση των φάσεων. Προσέξτε τον άρρενα και το θήλυ προπυρήνα (31). (Με την άδεια των Dr. L. Dickman και Dr. R. Noyes του Vanderbilt University).
8. Το στάδιο των δύο κυττάρων του ανθρώπινου ζυγώτη. (Από τους A.T. Hertig και J. Rock, με την ευγενή άδεια του Carnegie Institution of Washington).

1.6 ΑΥΛΑΚΩΣΗ

Μόλις ο ζυγώτης φθάσει στο στάδιο των δύο κυττάρων, υφίσταται μια σειρά μιτωτικών διαιρέσεων, οι οποίες οδηγούν σε ταχεία αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα, τα οποία καθίστανται διαρκώς μικρότερα με κάθε νέα διαίρεση αυλάκωσης, είναι γνωστά ως **βλαστομερίδια** (Εικ. 4).

Μετά από τρεις έως τέσσερις διαιρέσεις, ο ζυγώτης - όμοιος σε εμφάνιση με μούρο - χαρακτηρίζεται ως **μορίδιο**. Ο ζυγώτης φθάνει στο στάδιο του μοριδίου περίπου τρεις ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, οπότε το έμβρυο είναι έτοιμο να εισέλθει στην κοιλότητα της μήτρας.

Αυτή τη χρονική στιγμή (στάδιο των 12 έως 16 κυττάρων), το μορίδιο αποτελείται από μία ομάδα κεντρικώς τοποθετημένων κυττάρων, την **έσω κυτταρική μάζα**, και μια περιφερική στιβάδα, την **έξω κυτταρική μάζα**. Η έσω κυτταρική μάζα θα σχηματίσει τους ιστούς του **ιδίως εμβρύου**, ενώ η έξω κυτταρική μάζα σχηματίζει την τροφοβλάστη, η οποία αργότερα θα συμβάλει στο σχηματισμό του **πλακούντα**.

1.7 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ

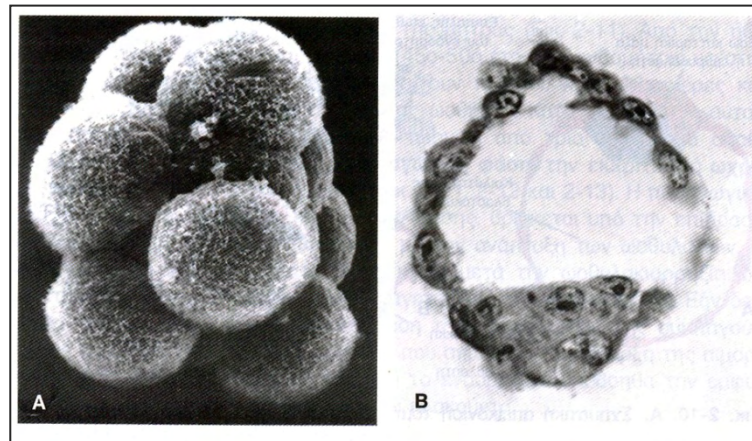
Την εποχή περίπου που το μορίδιο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας, υγρό αρχίζει να διεισδύει μέσω της διαφανούς ζώνης στους μεσοκυττάριους χώρους της έσω κυτταρικής μάζας. Σταδιακά, οι μεσοκυττάριοι χώροι αρχίζουν να συνενώνονται και τελικά σχηματίζεται μια κοιλότητα, η **βλαστοκήλη** (Εικ. 5B και 6A). Αυτή τη χρονική περίοδο το έμβρυο χαρακτηρίζεται ως **βλαστοκύστη**. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας, χαρακτηριζόμενα πλέον ως εμβρυοβλάστη, εντοπίζονται στον ένα πόλο, ενώ εκείνα της έξω κυτταρικής μάζας, χαρακτηριζόμενα πλέον ως τροφοβλάστη, αποπλατώνονται και σχηματίζουν το επιθηλιακό τοίχωμα της βλαστοκύστης (Εικ. 6A). Η διαφανής ζώνη έχει πλέον εξαφανισθεί, επιτρέποντας την έναρξη της εμφύτευσης.

Στον άνθρωπο τα τροφοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται πάνω από τον εμβρυοβλαστικό πόλο αρχίζουν να διεισδύουν μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου την έκτη περίπου ημέρα (Εικ. 6B). Είναι πιθανόν, η διείσδυση και η

επακόλουθη διάβρωση των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου να οφείλονται σε πρωτεολυτικά ένζυμα παραγόμενα από την τροφοβλάστη (37). Και το ενδομήτριο, όμως, ενισχύει την πρωτεολυτική δράση της βλαστοκύστης, με αποτέλεσμα η εμφύτευση να είναι το αποτέλεσμα συνεργικής δράσης της τροφοβλάστης και του ενδομητρίου. Ως εκ τούτου, στο τέλος της πρώτης εβδομάδας της ανάπτυξης, ο ανθρώπινος ζυγώτης έχει διέλθει από τα στάδια του μοριδίου και της βλαστοκύστης και έχει αρχίσει να εμφυτεύεται στο ενδομήτριο (Εικ. 6).



Εικ. 4. Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης του ζυγώτη από το στάδιο των δύο κυττάρων έως τα τέλη του σταδίου του μοριδίου. Ο ζυγώτης φθάνει στο στάδιο των δύο κυττάρων περίπου 30 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων περίπου την 40ή ώρα, στο στάδιο των 12 και 16 κυττάρων την τρίτη ημέρα περίπου, και στο στάδιο του όψιμου μοριδίου περίπου την τέταρτη ημέρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου τα βλαστομερίδια περιβάλλονται από τη διαφανή ζώνη, η οποία εξαφανίζεται στα τέλη της τέταρτης ημέρας.

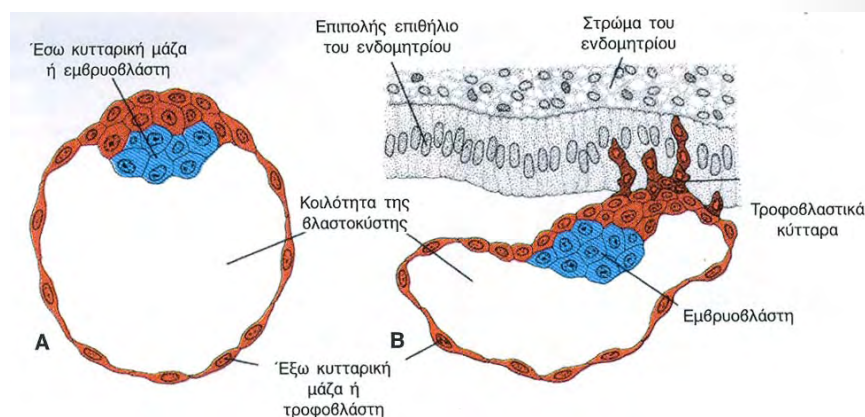


Εικ. 5 Α. Σαρωτική ηλεκτρονική μικροφωτογραφία μοριδίου ποντικού μετά την εξαφάνιση της διαφανούς ζώνης. Τα περιγράμματα κάθε βλαστομεριδίου είναι αρκετά ευκρινή. Προσέξτε τις πολυάριθμες μικρολάχνες που καλύπτουν την επιφάνεια των βλαστομεριδίων. (Από το βιβλίο των Van Bierkom J, Motta P: *The Cellular Basis of Mammalian Reproduction*. Baltimore, Urban and Schwatzenberg, 1979). Β. Τομή ανθρώπινης βλαστοκύστης αποτελούμενης από 107 κύτταρα. Προσέξτε την έσω κυτταρική μάζα και τα τροφοβλαστικά κύτταρα. (Από το άρθρο των Hertig AT, Rock J, Adams EC:

1.8 ΑΝΩΜΑΛΟΙ ΖΥΓΩΤΕΣ

Ανώμαλοι ανθρώπινοι ζυγώτες, καθώς και ανώμαλοι ζυγώτες άλλων θηλαστικών, περιγράφονται συχνά. Από ένα σύνολο οκτώ ζυγωτών που περισυνελέγησαν σε στάδιο πριν την εμφύτευση από την κοιλότητα της μήτρας, από τον Hertig και τους συνεργάτες του, τέσσερις φαίνονταν φυσιολογικοί ενώ οι υπόλοιποι τέσσερις ανώμαλοι (28). Οι ανώμαλοι ζυγώτες, των οποίων οι ηλικίες κυμαίνονται μεταξύ 3 και 5 ημερών, παρουσίαζαν πολυπύρρηνα βλαστομερίδια και ποικίλου βαθμού κυτταρική εκφύλιση. Αν και είναι αμφίβολο ότι κάποιος από αυτούς του ζυγώτες θα μπορούσε να είναι σε θέση να εμφυτευθεί, και οι τέσσερις τους περισυνελέγησαν από ασθενείς με φυσιολογική γονιμότητα.

Ο ακριβής αριθμός των ανώμαλων ζυγωτών που σχηματίζονται είναι άγνωστος, διότι συνήθως χάνονται κατά το πρώιμο στάδιο της κύησης (σε 2-3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση), πριν η γυναίκα καταλάβει ότι είναι έγκυος, και ως εκ τούτου δε γίνονται αντιληπτοί. Υπολογίζεται ότι μέχρι 50% όλων των κυήσεων καταλήγει σε αυτόματη αποβολή και ότι οι μισές από αυτές τις αποβολές οφείλονται σε ανωμαλίες των χρωματοσωμάτων (39). Οι αποβολές λοιπόν αυτές λειτουργούν ως φυσικός τρόπος ελέγχου των ανωμαλιών του εμβρύου, ελαττώνοντας έτσι τη συχνότητα των συγγενών διαμαρτιών. Χωρίς αυτό το φαινόμενο, το ποσοστό των παιδιών που θα έπασχαν από συγγενείς ανωμαλίες θα ήταν περίπου 12% αντί 2-3% (39).



Εικ. 6. Α. Σχηματική απεικόνιση τομής ανθρώπινης βλαστοκύστης, η οποία περισυλλέχθηκε από την κοιλότητα της μήτρας την 4^η ημέρα περίπου. Τα μπλε κύτταρα αντιπροσωπεύουν την έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη, ενώ τα καστανόχρωμα κύτταρα την τροφωβλάστη. (Τροποποιημένο σχέδιο των Α.Τ. Hertig και J. Rock) **Β.** Σχηματική απεικόνιση τομής βλαστοκύστης Μακάκου πιθήκου, την ένατη ημέρα της ανάπτυξης. Τα τροφωβλαστικά κύτταρα, που εντοπίζονται στον εμβρυϊκό πόλο της βλαστοκύστης, αρχίζουν να διεισδύουν στο ενδομήτριο (36). Η ανθρώπινη βλαστοκύστη αρχίζει να διεισδύει στο ενδομήτριο πιθανόν την πέμπτη ή έκτη ημέρα της ανάπτυξης.

1.9 Ο ΔΙΣΤΙΒΟΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΔΙΣΚΟΣ (2Η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ)

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται ημέρα προς ημέρα τα σημαντικότερα γεγονότα που συμβαίνουν τη δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης. Πρέπει, όμως, να γίνει κατανοητό ότι έμβρυα που έχουν την ίδια ηλικία από τη γονιμοποίηση δεν αναπτύσσονται υποχρεωτικά με τον ίδιο ρυθμό. Πράγματι, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στο ρυθμό αύξησης σε αυτά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης (1, 2).

1.9.1 Η 8^η ημέρα της ανάπτυξης

Την όγδοη ημέρα της ανάπτυξης η βλαστοκύστη έχει εν μέρει εμφυτευθεί στο στρώμα του ενδομητρίου (3). Στην περιοχή πάνω από την εμβρυοβλάστηση, η τροφοβλάστη έχει διαφοροποιηθεί σε δύο στιβάδες:

(α) μια εσωτερική στιβάδα από κύτταρα με έναν πυρήνα το καθένα τους, την **κυτταροτροφοβλάστη**, και

(β) μια εξωτερική πολυπύρηνη ζώνη χωρίς διακριτικά κυτταρικά όρια, τη **συγκυτιοτροφοβλάστη ή συγκύτιο** (Εικ. 7 και 8).

Μιτώσεις παρατηρούνται συχνά στην κυτταροτροφοβλάστη, αλλά ποτέ στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Παρ' όλα αυτά, όμως, η τελευταία αυξάνει σημαντικά σε πάχος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαιρούνται στην κυτταροτροφοβλάστη και εν συνεχεία μεταναστεύουν στη συγκυτιοτροφοβλάστη, όπου συνενώνονται και χάνουν τις ατομικές κυτταρικές μεμβράνες τους.

Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας ή εμβρυοβλάστης, επίσης, διαφοροποιούνται σε δύο στιβάδες:

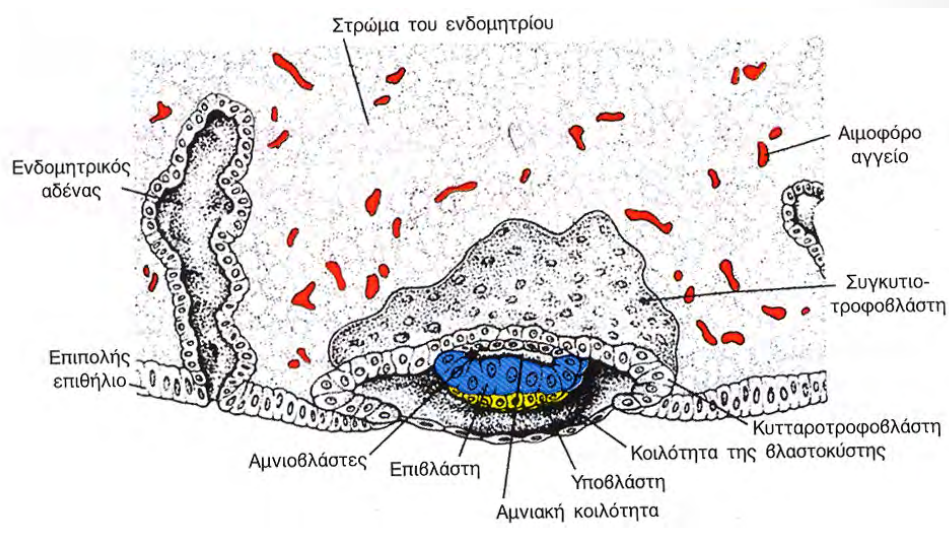
(α) στη στιβάδα της **υποβλάστης**, αποτελούμενη από μικρά κυβοειδή κύτταρα που γειτνιάζουν με την κοιλότητα της βλαστοκύστης, και

(β) στη στιβάδα της **επιβλάστης**, αποτελούμενη από υψηλά κυλινδρικά κύτταρα που γειτνιάζουν με την αμνιακή κοιλότητα (Εικ. 7 και 8). Τα κύτταρα κάθε μιας βλαστικής στοιβάδας σχηματίζουν έναν επίπεδο δίσκο, ενώ οι δύο μαζί χαρακτηρίζονται ως **δίστιβος βλαστικός δίσκος**.

Την ίδια εποχή εμφανίζεται μια μικρή κοιλότητα μέσα στην επιβλάστη. Αυτή η

κοιλότητα διευρύνεται για να αποτελέσει την **αμνιακή κοιλότητα**. Τα επιβλαστικά κύτταρα που γειτνιάζουν με την κυτταροτροφολάστη λέγονται **αμνιοβλάστες** και μαζί με τα υπόλοιπα κύτταρα της επιβλάστης επενδύουν την αμνιακή κοιλότητα (Εικ. 7 και 8) (4).

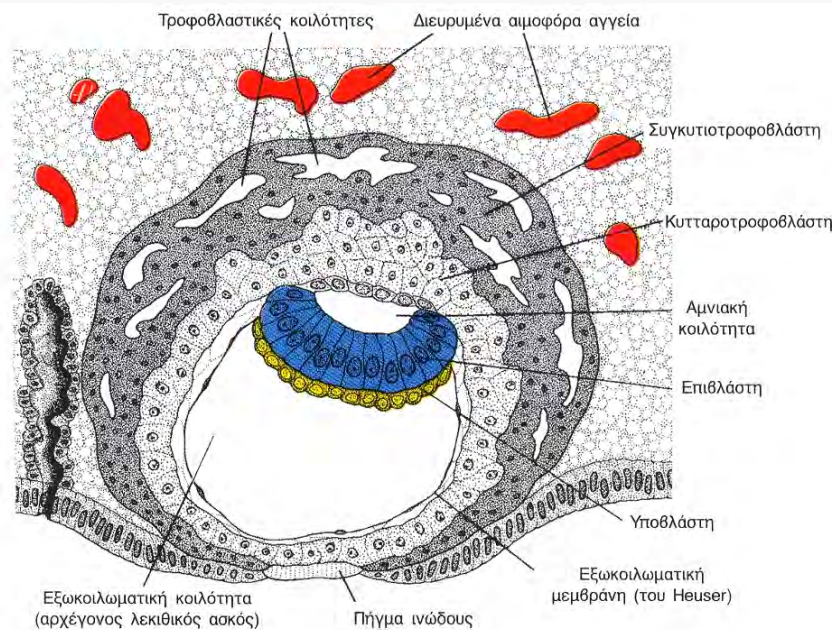
Το στρώμα του ενδομητρίου γύρω από το σημείο της εμφύτευσης είναι οίδηματώδες και εξαιρετικά αγγειοβριθές, ενώ οι μεγάλοι πολυέλικτοι ενδομήτριοι αδένες εκκρίνουν άφθονο γλυκογόνο και βλέννη.



Εικ. 7. Σχηματική αναπαράσταση ανθρώπινης βλαστοκύστης ηλικίας 7½ ημερών, μερικώς εμφυτευμένης στο στρώμα του ενδομητρίου. Η τροφολάστη αποτελείται από μία έσω στιβάδα κυττάρων, με έναν πυρήνα το καθένα τους, την κυτταροτροφολάστη, και μία έξω στιβάδα χωρίς διακριτά κυτταρικά όρια, τη συγκυτιοτροφολάστη. Η εμβρυοβλάστη σχηματίζεται από την επιβλαστική και την υποβλαστική στιβάδα. Η αμνιακή κοιλότητα εμφανίζεται σαν μικρή σχισμή.



Εικ. 8. Τομή ανθρώπινης βλαστοκύστης 7½ ημερών (x 100). Προσέξτε την πολυπύρνηνη δομή της συγκυτιοτροφολάστης, τα μεγάλα κύτταρα της κυτταροτροφολάστης και τη σχισμοειδή αμνιακή κοιλότητα. (Από το άρθρο των Hertig AT, Rock J)



Εικ. 9. Σχηματική απεικόνιση ανθρώπινης βλαστοκύστης 9 ημερών. Η συγκυτιοτροφοβλάστη παρουσιάζει μεγάλο αριθμό κοιλοτήτων. Προσέξτε τα πλακώδη κύτταρα που σχηματίζουν την εξωκοιλωματική μεμβράνη. Ο δίστιβος βλαστικός δίσκος αποτελείται από μία στιβάδα κυλινδρικών επιβλαστικών κυττάρων και μία στιβάδα κυβικών υποβλαστικών κυττάρων. Το αρχικό επιφανειακό έλλειμμα έχει αποφραχθεί με πήγμα ινώδους.

1.9.2 Η 9^η ημέρα της ανάπτυξης

Η βλαστοκύστη βρίσκεται βαθύτερα εμφυτευμένη στο ενδομήτριο, ενώ το έλλειμμα του επιπολής επιθηλίου στο σημείο της εμφύτευσης έχει κλείσει με πήγμα ινώδους (Εικ. 9). Η τροφοβλάστη παρουσιάζει σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξή της, ιδιαίτερα στον εμβρυϊκό πόλο, όπου εμφανίζονται κενοτόπια στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Όταν αυτά τα κενοτόπια συνενωθούν σχηματίζουν μεγάλες κοιλότητες και γι' αυτό η συγκεκριμένη φάση της τροφοβλαστικής ανάπτυξης είναι γνωστή ως **στάδιο των κοιλοτήτων**.

Στον αντίθετο πόλο, εν τω μεταξύ, αποπλατυσμένα κύτταρα, πιθανόν προερχόμενα από την υποβλάστη, σχηματίζουν μια λεπτή μεμβράνη, την εξωκοιλωματική μεμβράνη (ή υμένα του Heuser), η οποία επενδύει την εσωτερική επιφάνεια της κυτταροτροφοβλάστης (Εικ. 9). Αυτή η μεμβράνη μαζί με την υποβλάστη σχηματίζει την επένδυση της **εξωκοιλωματικής κοιλότητας (αρχέγονος λεκιθικός ασκός)**.

1.9.3 Η περαιτέρω ανάπτυξη της τροφοβλάστης

Στην αρχή της τρίτης εβδομάδας η τροφοβλάστη χαρακτηρίζεται από τις πρωτογενείς λάχνες, οι οποίες αποτελούνται από ένα κυτταροτροφοβλαστικό κεντρικό σώμα, καλυπτόμενο από μία συγκυτιακή στιβάδα (Εικόνα 10Α). κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης μεσοδερμικά κύτταρα εισδύουν στο κεντρικό τμήμα της πρωτογενούς λάχνης και αναπτύσσονται προς την κατεύθυνση του φθαρτού. Η νεοσχηματισμένη δομή χαρακτηρίζεται ως δευτερογενής λάχνη (Εικόνα 10Β).

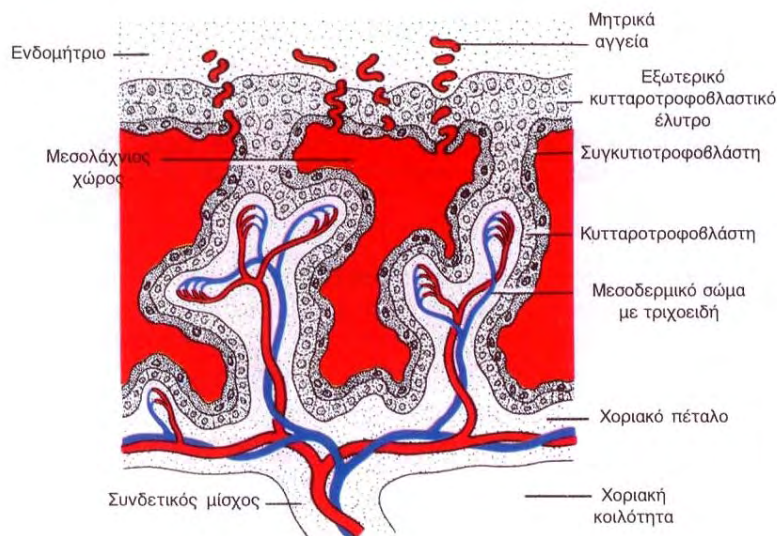
Στο τέλος της τρίτης εβδομάδας τα μεσοδερμικά κύτταρα στο κέντρο της λάχνης αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα του αίματος και μικρά αιμοφόρα αγγεία, σχηματίζοντας έτσι το τριχοειδικό σύστημα της λάχνης (Εικόνα 10Γ). Η λάχνη χαρακτηρίζεται πλέον ως τριτογενής ή τελική πλακουντική λάχνη. Τα τριχοειδή της τριτογενούς λάχνης έρχονται σε επικοινωνία με τριχοειδή που αναπτύσσονται στο μεσόδερμα του χοριακού πετάλου και του συνδετικού μίσχου (Εικόνα 11 και 12). Αυτά τα αγγεία με τη σειρά τους έρχονται σε επικοινωνία με το ενδοεμβρυϊκό κυκλοφορικό σύστημα, συνδέοντας έτσι τον πλακούντα με το έμβρυο. Ως εκ τούτου, όταν η καρδιά αρχίζει να κτυπάει την τέταρτη εβδομάδα της ανάπτυξης, το σύστημα των λαχνών είναι έτοιμο να προμηθεύσει στο ιδίως έμβρυο τις απαραίτητες ουσίες και το οξυγόνο.

Εν τω μεταξύ, τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα της λάχνης διεισδύουν προοδευτικά στο υπερκείμενο συγκύτιο μέχρι να φθάσουν στο ενδομήτριο της μητέρας. Εκεί έρχονται σε επαφή με όμοιες προσεκβολές των γειτονικών λαχνών, σχηματίζοντας έτσι ένα λεπτό εξωτερικό κυτταροτροφοβλαστικό έλυτρο (Εικόνα 11 και 12). Σταδιακά αυτό το έλυτρο περιβάλλει πλήρως την τροφοβλάστη και το χοριακό σάκο στον ενδομητρικό ιστό της μητέρας (Εικόνα 12)(8,9). Οι λάχνες που εκφύονται από τα πλάγια των στελεχιαίων λαχνών αντιπροσωπεύουν ελεύθερες (τελικές) λάχνες, διαμέσου των οποίων θα γίνεται η ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών κλπ. (Εικ. 13)(10).

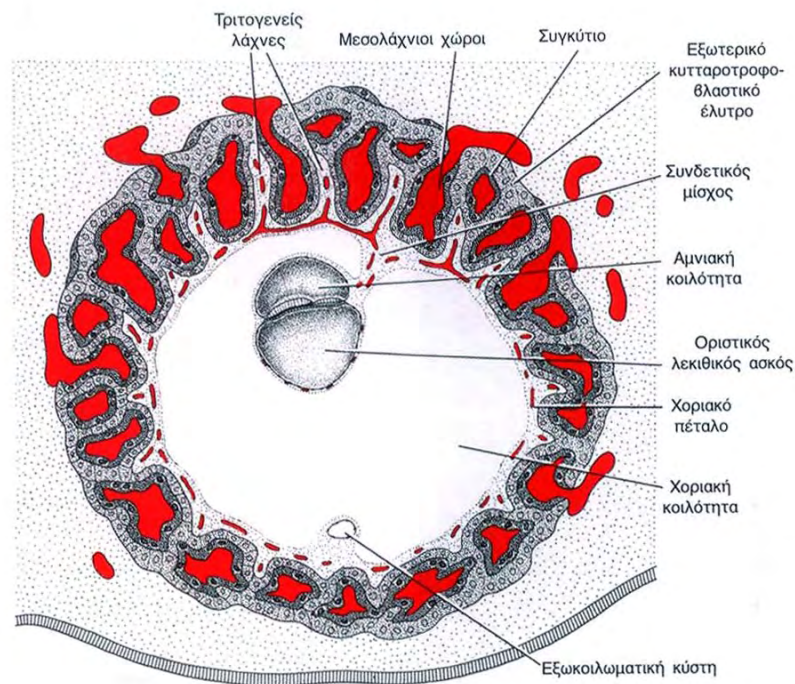
Η χοριακή κοιλότητα εν τω μεταξύ γίνεται ευρύτερη και τη 19^η ή 20^η ημέρα το έμβρυο προσφύεται στο τροφοβλαστικό έλυτρό του μόνο με ένα στενό συνδετικό μίσχο (Εικ. 12). Ο συνδετικός μίσχος αργότερα εξελίσσεται σε ομφάλιο λώρο, ο οποίος σχηματίζει τη σύνδεση μεταξύ του πλακούντα και του εμβρύου.



Εικ. 10 Σχηματικές παραστάσεις που δείχνουν την ανάπτυξη της χοριακής λάχνης. Α. Εγκάρσια τομή πρωτογενούς λάχνης, η οποία παρουσιάζει ένα κεντρικό σώμα από κυτταροτροφολαστικά στοιχεία να καλύπτεται από μία συγκυτιακή στιβάδα. Β. Εγκάρσια τομή δευτερογενούς λάχνης με μεσοδερμικό σώμα το οποίο καλύπτεται από μία στιβάδα κυτταροτροφολαστικών κυττάρων που με τη σειρά της καλύπτεται από συγκύτιο. Γ. Το μεσόδερμα της λάχνης παρουσιάζει μερικά τριχοειδή και φλεβίδια.



Εικ. 11 Σχηματική απεικόνιση επιμήκου τομής λάχνης στο τέλος της τρίτης εβδομάδας της ανάπτυξης. Παρατηρήστε πως τα μητρικά αγγεία διαπερνούν το κυτταροτροφολαστικό έλυτρο για να εισέλθουν στους μεσολάχνιους χώρους που περιβάλλουν τις λάχνες. Τα τριχοειδή των λαχνών επικοινωνούν με τα αγγεία του χοριακού πετάλου και του συνδετικού μίσχου, τα οποία με τη σειρά τους επικοινωνούν με τα ενδοεμβρυϊκά αγγεία.



Εικ. 12. Σχηματική απεικόνιση προσωμιτικού εμβρύου και της τροφοβλάστης στο τέλος της τρίτης εβδομάδας. Οι τριτογενείς και οι δευτερογενείς λάχνες προσδίδουν στην τροφοβλάστη χαρακτηριστική ακτινωτή όψη. Οι μεσολάχνιοι χώροι απαντώνται σε όλη την έκταση της τροφοβλάστης και επενδύονται από συγκύτιο. Τα κυτταροτροφολαστικά κύτταρα περιβάλλουν πλήρως την τροφοβλάστη και βρίσκονται σε άμεση επαφή με το ενδομήτριο. Το έμβρυο κρέμεται στη χοριακή κοιλότητα με το συνδετικό μίσχο του.



Εικ. 13. Στελεχιαίες λάχνες (SV), οι οποίες εκτείνονται από το χοριακό πέταλο (CP) μέχρι το βασικό πέταλο (BP). Οι λεπτές αποφυάδες (βέλη) που εκφύονται από τις στελεχιαίες λάχνες αντιπροσωπεύουν τελικές λάχνες. (Από το άρθρο των King BF, Mais JJ: Developmental changes in Rhesus monkey placental villi and cell columns. Anat Embryol 165:361-376, 1982)

1.10 ΟΙ ΕΜΒΡΥΪΚΟΙ ΥΜΕΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ

1.10.1 Ο πλακούντας στο τέλος της κύησης

Στο τέλος της κύησης ο πλακούντας έχει δισκοειδές σχήμα, διάμετρο 15 έως 25 εκ., πάχος περίπου 3 εκ. και βάρος 500 έως 600 γρ. Κατά τον τοκετό αποκολλάται από το τοίχωμα της μήτρας και 30 λεπτά περίπου μετά τη γέννηση αποβάλλεται από την κοιλότητα της μήτρας. Όταν μετά τη γέννηση ο πλακούντας επισκοπείται από τη **μητρική όψη** του, είναι ευκρινώς ορατές 15 έως 20 ελαφρώς προέχουσες περιοχές, οι **κοτυληδόνες**, σκεπασμένες με λεπτή στιβάδα του βασικού φθαρτού. Οι αύλακες μεταξύ των κοτυληδόνων σχηματίζονται από τα φθαρτικά διαφράγματα. Το μεγαλύτερο μέρος του φθαρτού παραμένει προσωρινά στη μήτρα και αποβάλλεται με μεταγενέστερες αιμορραγίες της μήτρας.

Η **εμβρυϊκή επιφάνεια** του πλακούντα καλύπτεται εξ ολοκλήρου από το χοριακό πέταλο. Μερικές ευμεγέθεις αρτηρίες και φλέβες, τα **χοριακά αγγεία**, συγκλίνουν προς τον ομφάλιο λώρο. Το χόριο με τη σειρά του καλύπτεται από το αμνίο. Η πρόσφυση του ομφάλιου λώρου είναι συνήθως έκκεντρη και σε σπάνιες περιπτώσεις παραχείλια. Ακόμη σπανιότερα όμως προσφύεται στους χοριακούς υμένες εκτός πλακούντα (**υμενώδης πρόσφυση**).

1.10.2 Η κυκλοφορία του πλακούντα

Οι κοτυληδόνες δέχονται το αίμα τους διαμέσου 80 έως 100 ελικοειδών αρτηριών, οι οποίες διαπερνούν το φθαρτικό πέταλο και εισέρχονται στους μεσολάχνιους χώρους σε κατά το μάλλον ή ήττον τακτά διαστήματα (3, 4). Ο αυλός των ελικοειδών αρτηριών είναι στενός, με αποτέλεσμα αυξημένη αρτηριακή πίεση όταν εισέρχονται στο μεσολάχνιο χώρο. Αυτή η πίεση ωθεί το αίμα βαθιά μέσα στους μεσολάχνιους χώρους και κατακινεί τις πολυάριθμες μικρές λάχνες του λαχνικού δένδρου με οξυγονωμένο αίμα (3). Καθώς η πίεση πέφτει, το αίμα οπισθοδρομεί από το χοριακό πέταλο προς το φθαρτό, όπου και εισέρχεται στις ενδομητριάες φλέβες. Έτσι, το αίμα επιστρέφει από τις μεσολάχνιες λίμνες στη μητρική κυκλοφορία διαμέσου των ενδομητριάων φλεβών.

Οι μεσολάχνιοι χώροι του πλήρως ανεπτυγμένου πλακούντα περιέχουν συνολικά

περίπου 150 κ.εκ. αίματος, το οποίο ανανεώνεται περίπου 3 ή 4 φορές ανά λεπτό (5-7). Αυτό το αίμα ρέει κατά μήκος των χοριακών λαχνών, των οποίων η επιφάνεια κυμαίνεται μεταξύ 4 και 14 τετραγωνικών μέτρων. Υπενθυμίζεται, όμως, ότι η ανταλλαγή στον πλακούντα δεν συμβαίνει σε όλες τις λάχνες, παρά μόνο σε εκείνες στις οποίες τα εμβρυϊκά αγγεία βρίσκονται σε στενή συνάφεια με την καλυπτική συγκυτιακή μεμβράνη. Σε αυτές τις λάχνες το συγκύτιο παρουσιάζει συχνά ψηκτροειδή παρυφή, η οποία αποτελείται από πολυάριθμες μικρολάχνες, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα ανταλλαγής μεταξύ της μητρικής και της εμβρυϊκής κυκλοφορίας (2). Η διαχωριστική δομή μεταξύ των δύο κυκλοφοριών, ο **πλακουντικός φραγμός**, αρχικά αποτελείται από τέσσερις στιβάδες:

- (α) την ενδοθηλιακή επένδυση των εμβρυϊκών αγγείων,
- (β) το συνδετικό ιστό στο κέντρο της λάχνης,
- (γ) την κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα και
- (δ) το συγκύτιο.

Από τον τέταρτο μήνα, όμως, και μετά ο πλακουντικός φραγμός γίνεται πολύ λεπτότερος, μια και η ενδοθηλιακή επένδυση των αγγείων έρχεται σε στενή επαφή με τη συγκυτιακή μεμβράνη, αυξάνοντας έτσι σημαντικά το ρυθμό ανταλλαγής. Δεδομένου ότι το μητρικό αίμα στους μεσολάχνιους χώρους διαχωρίζεται από το εμβρυϊκό αίμα με ένα χοριακό παράγωγο, ο ανθρώπινος πλακούντας θεωρείται ότι ανήκει στον **αιμοχοριακό** τύπο.

1.10.3 Η λειτουργία του πλακούντα

Οι κύριες λειτουργίες του πλακούντα είναι:

- (α) **η ανταλλαγή των μεταβολικών προϊόντων και των αερίων** μεταξύ της μητρικής και της εμβρυϊκής κυκλοφορίας, και
- (β) **η παραγωγή ορμονών.**

1.10.3.1 Η ΑΝΤΑΛΛΑΓΗ ΤΩΝ ΑΕΡΙΩΝ

Η ανταλλαγή των αερίων, όπως το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το μονοξείδιο του άνθρακα, γίνεται με απλή διάχυση. Περί τα τέλη της κύησης, το έμβρυο αποσπά 20 έως 30 κ.εκ. οξυγόνου ανά λεπτό από τη μητρική κυκλοφορία και είναι

ευνόητο ότι ακόμη και σύντομη διακοπή της παροχής οξυγόνου θα αποβεί μοιραία για το έμβρυο (8, 9).

1.10.3.2 Η ΑΝΤΑΛΛΑΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΩΝ

Η ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και ηλεκτρολυτών, όπως αμινοξέα, ελεύθερα λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες και βιταμίνες, είναι ταχεία και αυξάνεται καθώς η κύηση προχωρεί (9).

1.10.3.3 Η ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΗΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Μητρικά αντισώματα προσλαμβάνονται με πινοκυττάρωση από τη συγγενή τριχοειδή και εν συνεχεία μεταφέρονται στα εμβρυϊκά τριχοειδή (10, 11). Με αυτό τον τρόπο το έμβρυο αποκτά μητρικά αντισώματα του τύπου IgG (7S) των γάμμα σφαιρινών εναντίον διαφόρων λοιμωδών νοσημάτων και επιτυγχάνει παθητική ανοσία έναντι της διφθερίτιδας, της ευλογιάς, της ιλαράς και άλλων νοσημάτων, όχι όμως έναντι της ανεμοβλογιάς και του κοκκύτη.

Μεγάλης σημασίας είναι η **ασυμβατότητα του παράγοντα Rhesus**, η οποία σχετίζεται με ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Εάν το έμβρυο είναι Rh-θετικό και η μητέρα Rh-αρνητική, εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα που εισβάλουν στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να προκαλέσουν παραγωγή αντισωμάτων από τη μητέρα. Τα μητρικά αντισώματα εναντίον των εμβρυϊκών αντιγόνων επιστρέφουν εν συνεχεία στο έμβρυο και προκαλούν καταστροφή των ερυθροκυττάρων του εμβρύου. Μικροαιμορραγίες στην επιφάνεια των λαχνών είναι πιθανόν υπεύθυνες για την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος μεταξύ εμβρύου και μητέρας (12). Η καταστροφή εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων, γνωστή ως **εμβρυϊκή ερυθροβλάσωση ή αιμολυτική νόσος** του εμβρύου, μπορεί να οδηγήσει σε ενδομήτριο θάνατο. Η εξέταση του αμνιακού υγρού μπορεί να προσφέρει μια ένδειξη για το βαθμό σοβαρότητας της νόσου, ενώ ενδομήτριες μεταγγίσεις αίματος στο έμβρυο ή αφαιμαξομεταγγίσεις μετά τη γέννηση μπορεί να αποσοβήσουν το θάνατο.

1.10.3.4 Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΡΜΟΝΩΝ

Από το τέλος του τέταρτου μήνα ο πλακούντας παράγει **προγεστερόνη** σε αρκετές ποσότητες ώστε να συνεχίσει την κύηση σε περίπτωση που το ωχρο σωματίδιο αφαιρεθεί ή

δεν κατορθώσει να λειτουργήσει κανονικά (13). Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις, όλες οι ορμόνες συντίθενται στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Εκτός από την προγεστερόνη, ο πλακούντας παράγει αυξανόμενες ποσότητες **οιστρογόνων ορμονών (κυρίως οιστρίδιλη)** μέχρι σχεδόν το τέλος της κύησης, οπότε και φθάνουν στο μέγιστο επίπεδό τους. Αυτά τα υψηλά επίπεδα των ορμονών συμβάλλουν στην αύξηση της μήτρας και την ανάπτυξη των μαζικών αδένων.

Η συγκυτιοτροφοβλάστη παράγει, επίσης, **γωναδοτροπίνες (ανθρώπινη χοριακή γωναδοτροπίνη - hCG)**, οι οποίες έχουν δράση όμοια με εκείνη των ωχρινοτρόπων ορμονών του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Αυτές οι ορμόνες εκκρίνονται από τη μητέρα στα ούρα και στα πρώιμα στάδια της κύησης η παρουσία τους χρησιμοποιείται ως δείκτης κύησης. Μια άλλη πρωτεϊνικής φύσης ορμόνη που παράγεται από τον πλακούντα είναι η **σωματομαμοτροπίνη** (παλαιότερα γνωστή ως **πλακουντική γαλακτογόνος ορμόνη**). Είναι μια ουσία του τύπου της αυξητικής ορμόνης, η οποία δίνει στο έμβρυο προτεραιότητα στη χρήση της γλυκόζης του μητρικού αίματος και κάνει τη μητέρα ελαφρώς διαβητική.

Οι περισσότερες μητρικές ορμόνες δε διέρχονται από τον πλακούντα. Οι ορμόνες που πράγματι διέρχονται από αυτόν, όπως για παράδειγμα η θυροξίνη, το κάνουν με βραδύ ρυθμό (9). Πολύ επικίνδυνες είναι μερικές συνθετικές προγεστίνες, οι οποίες διέρχονται μέσω του πλακούντα με γρήγορο ρυθμό και μπορεί να προκαλέσουν αρρενοποίηση σε θήλεα έμβρυα (16). Ακόμη πιο επικίνδυνη είναι η χρήση του συνθετικού οιστρογόνου **διαθυλστυλβεστρόλη**, που διέρχεται εύκολα από τον πλακούντα. Αυτή η ουσία προκαλεί καρκίνωμα του κόλπου και ανωμαλίες των όρχεων σε άτομα που εκτέθηκαν σε αυτήν κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής τους (15).

1.11 ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Η τροφοβλαστική νόσος της κύησης αποτελείται από ένα φάσμα όγκων και καταστάσεων που μοιάζουν με όγκους που χαρακτηρίζονται από τον αυξημένο πολλαπλασιασμό τροφοβλαστικού ιστού, που συνδέεται με την κύηση και ο οποίος έχει

αυξανόμενο κακόηθες δυναμικό. Στις βλάβες περιλαμβάνονται η υδατιδώδης μύλη κύηση (ολική και μερική), η διηθητική μύλη κύηση και το ξεκάθαρο κακόηθες χοριοκαρκίνωμα.

Η τροφοβλαστική νόσος της κυήσεως είναι σημαντική για τους εξής λόγους:

Α) η υδατιδώδης μύλη κύηση είναι μια συνήθης επιπλοκή της κύησης με συχνότητα περίπου 1 ανά 1000 έως 2000 κυήσεις στις ΗΠΑ, αλλά πολύ πιο συχνή στην Άπω Ανατολή.

Β) έχει γίνει δυνατό παρακολουθώντας τα κυκλοφορούντα επίπεδα της ανθρώπινης χοριακής γονιδοτροπίνης να καθοριστεί η πρόωγη ανάπτυξη εμμένουσας τροφοβλαστικής νόσου.

Γ) το χοριοκαρκίνωμα, που κάποτε θεωρείτο μια φοβερή και απόλυτα θανατηφόρος επιπλοκή, σήμερα έχει πολύ υψηλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.

1.11.1 Υδατιδώδης μύλη κύηση (μερική και ολική)

Η υδατιδώδης μύλη κύηση χαρακτηρίζεται από κυστική διόγκωση των χοριακών λαχνών και συνοδεύεται από ποικίλο πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης. Ο πιο σημαντικός λόγος για τη σωστή αναγνώριση της αληθούς μύλης κύησης είναι το ότι μπορεί να προηγηθεί του χοριοκαρκινώματος. Οι περισσότερες ασθενείς εμφανίζονται τον 4^ο ή τον 5^ο μήνα της κυήσεως με κοιλιακή αιμορραγία και με μήτρα, που συνήθως αλλά όχι πάντα, είναι μεγαλύτερη του αναμενόμενου για τη διάρκεια της κυήσεως. Αυτές οι μύλες κυήσεις μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε ηλικία κατά τη διάρκεια της ενεργού αναπαραγωγικής ζωής, αλλά ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες κάτω των 20 ετών ή μεταξύ 40 και 50 ετών. Για ανεξήγητους λόγους η συχνότητα ποικίλλει σημαντικά σε διάφορες περιοχές του κόσμου, όπως 1 ανά 1000 εγκυμοσύνες στις ΗΠΑ, αλλά 10 στις 1000 στην Ινδονησία.

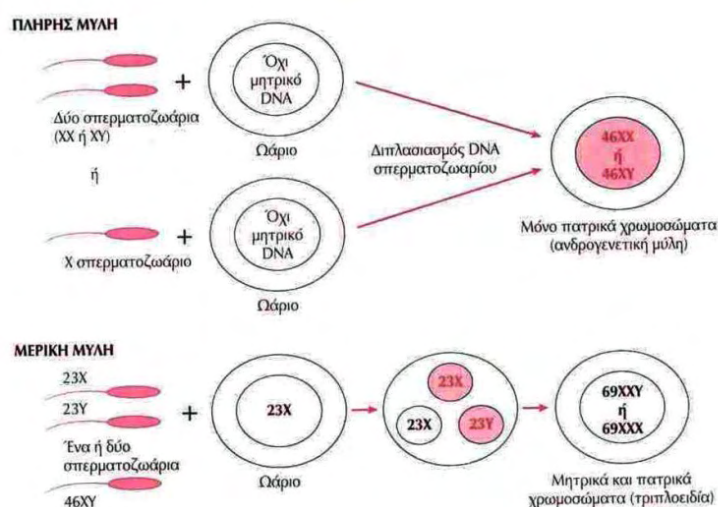
ΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Με ιστολογικές, κυτταρολογικές και μελέτες κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατό να αναγνωριστούν δύο τύποι καλοήθους μη διηθητικής μύλης κύησης, ολόκληρης ή μερικής. Στην ολική (ή κλασική) μύλη κύηση όλες ή οι περισσότερες των λαχνών είναι οιδηματώδεις και υπάρχει διάχυτη υπερπλασία της τροφοβλάστης. Οι κυτταρογενετικές μελέτες αυτών των περιπτώσεων δείχνουν ότι σε περισσότερες του 90% είναι

διπλοειδικές 46, XX και ότι όλες προέρχονται από το σπερματοζωάριο (ένα φαινόμενο που αποκαλείται ανδρογένεση). Θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης από ένα σπερματοζωάριο ενός ωαρίου που έχει χάσει τα χρωμοσώματά του (Εικ. 14). Στο υπόλοιπο 10% σχηματίζονται από τη γονιμοποίηση ενός τέτοιου ωαρίου από δύο σπερματοζωάρια (46,XX και 46, XY). Σε αμφότερες τις περιπτώσεις δεν υπάρχει ανάπτυξη εμβρύου και έτσι η ολική μύλη κύηση δεν έχει εμβρυϊκά στοιχεία.

Στη μερική μύλη κύηση κάποιες από τις λάχνες είναι οιδηματώδεις, ενώ άλλες έχουν μικρές μεταβολές και η ανάπτυξη της τροφοβλάστης είναι εστιακή. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο καρυότυπος είναι τριπλοειδικός (δηλαδή 69, XXY) ή περιστασιακά τετραπλοειδικός (92, XXXY). Οι μύλες κύσεις είναι αποτέλεσμα γονιμοποίησης ενός ωαρίου από ένα ή δύο σπερματοζωάρια (Εικ. 14). Το έμβρυο είναι βιώσιμο για εβδομάδες και έτσι μπορεί να υπάρχουν εμβρυϊκά στοιχεία όταν υπάρξει αποβολή. Σε αντίθεση με τις ολικές μύλες κύσεις, οι μερικές σπανίως ακολουθούνται από χοριοκαρκίνωμα.

Ένα μέρος μόνο των τριπλοειδικών κυήσεων έχει σαν αποτέλεσμα μερική μύλη κύηση. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πιθανότητα μερικής μύλης κύησης ήταν σημαντικότερα πιο πιθανή όταν η κύηση ήταν διανδρική, δηλαδή, όταν οι δύο από τις τρεις σειρές απλοειδικών χρωμοσωμάτων προέρχονται από τον άνδρα (μέσω της εισόδου δύο σπερματοζωαρίων σε ένα ωάριο). Αυτός έρχεται σε αντίθεση με τις προερχόμενες από τη μητέρα τριπλοειδικές κυήσεις, στις οποίες οι δύο απλοειδικές σειρές προέρχονται από σφάλματα στην μειωτική διαίρεση.

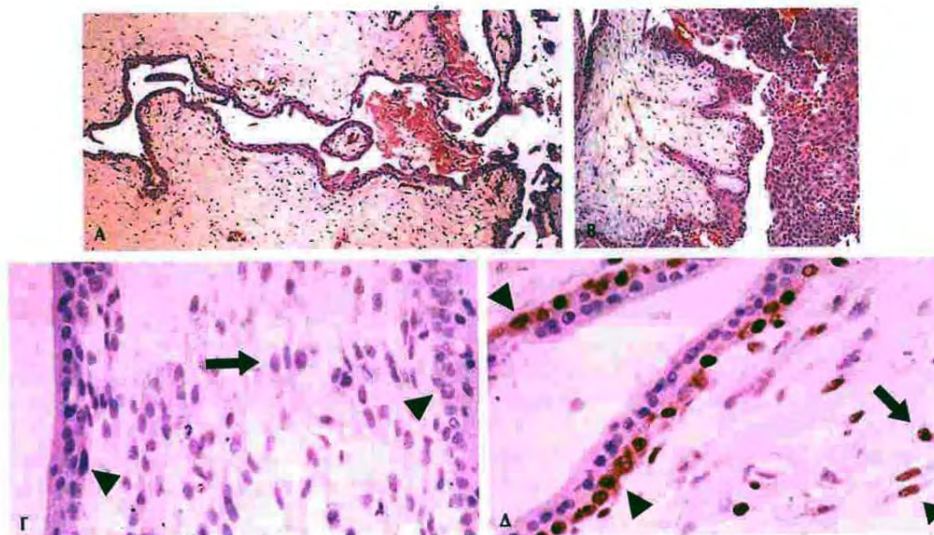


Εικόνα 14 Τρόποι γονιμοποίησης ευθυνόμενοι για την προέλευση των χρωμοσωμάτων σε πλήρη (46, XX) και τριπλοειδική μερική μύλη κύηση (XXY). Στην πλήρη μύλη κύηση ένα ή δύο σπερματοζωάρια γονιμοποιούν ένα ωάριο που έχει χάσει τα χρωμοσώματά του. Η μερική μύλη κύηση οφείλεται στην γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα διπλοειδικό ή δύο απλοειδικά σπερματοζωάρια τα οποία στο παράδειγμα αυτό παρουσιάζονται σαν ένα 23, X και ένα 23, Y .

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Στις περισσότερες των περιπτώσεων η μύλη κύηση αναπτύσσεται εντός της μήτρας, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί οπουδήποτε, συμπεριλαμβανομένων και των έκτοπων κύσεων. Η στιγμή της ανακάλυψης σχετίζεται με τον τύπο της μύλης κύησης (μερική έναντι ολικής και επίπεδο παρακολούθησης της κύησης). Οι μερικές μύλες κύσεις μπορεί να διαγνωστούν είτε σε πρώιμες αυτόματες αποβολές είτε αργότερα, μετά την ανάπτυξη του εμβρύου. Η προσεκτική ανατομή μπορεί να καταστήσει εμφανή την ύπαρξη ενός μικρού, συνήθως ατελεκτασικού αμνιακού σάκου. Τα εμβρυακά τμήματα ανευρίσκονται συνήθως σε μερικές μύλες κύσεις, αλλά δεν ανευρίσκονται ποτέ σε πλήρεις μύλες κύσεις (εκτός αν υπάρχει δίδυμη κύηση).

Στην εποχή μας, οι πλήρεις μύλες κύσεις διαγιγνώσκονται και αφαιρούνται νωρίτερα (8½ έναντι 17 εβδομάδων), λόγω της καθιέρωσης της χρήσης των υπερήχων και τη στενή παρακολούθηση των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης, σε συνδυασμό με την πιο αποτελεσματική ιστολογική αναγνώριση της πρώιμης ολικής υδατιδώδους μύλης κύησης. Η κλασική εμφάνιση είναι εκείνη όπου η κοιλότητα της μήτρας είναι γεμάτη με μια απαλή, εύθραυστη μάζα κάποιων διάφανων, κυστικών, με λεπτά τοιχώματα, δίκην σταφυλίου δομών που αποτελούνται από οιδηματώδεις (υδρωπικές) λάχνες. (Εικόνα 14)



Εικόνα 15 Α Μικροφωτογραφία της μερικής υδατιδώδους μύλης κύησης με διογκωμένες λάχνες και ελαφρά υπερπλασία της επιφανειακής τροφοβλάστης. Β Πλήρης υδατιδόμορφη μύλη κύηση με εκτεταμένη κυτταροτροφοβλαστική υπερπλασία (κατώτερο τμήμα) (Ευγενής χορηγία του Dr David R Genest, Brigham and Women's Hospital, Boston MA). Γ Στην πλήρη μύλη κύηση χάνεται η έκφραση του p57 στην κυτταροτροφοβλάστη (αιχμές) και το λαχνωτό στρώμα (βέλη) Δ Φυσιολογικός πλακούντας Η ανοσοχρωμάτωση με p57 είναι φανερή τόσο στους στρωματικούς (βέλη) όσο και στους κυτταροτροφοβλαστικούς (αιχμές) πυρήνες (Ευγενής χορηγία του Dr Diego C Castrillon, Brigham and Women's Hospital, Boston MA)

Ιστολογικά οι μερικές μύλες κυήσεις (Εικ. 15Α) καταδεικνύουν την ύπαρξη υδρωπικών λαχνών και διαταραχές της αρχιτεκτονικής σε ένα μέρος μόνο των λαχνών. Ο πολλαπλασιασμός της τροφοβλάστης είναι ελάχιστος και περιορίζεται στην συγκυτιοτροφοβλάστη. Αντίθετα, στις πλήρεις μύλες κυήσεις καταδεικνύεται υδρωπικό οίδημα των περισσότερων χοριακών λαχνών και κατ' ουσίαν απουσία ή ανεπαρκής ανάπτυξη της αγγείωσης των λαχνών. Στις πρώιμες πλήρεις μύλες κυήσεις υπάρχουν διακριτές αλλαγές της διάπλασης των λαχνών που συνοδεύονται από πυρηνορρηξία των στρωματικών κυττάρων και μέτρια συγκυτιακή και κυτταροτροφοβλαστική υπερπλασία. Στις πιο προχωρημένες μύλες κυήσεις διαπιστώνεται το κλασικό φάσμα του διάχυτου οιδήματος των λαχνών, της δημιουργίας κεντρικών κοιλοτήτων και του εκτεταμένου συγκεντρικού πολλαπλασιασμού των λαχνών και της εξωλαχνικής τροφοβλάστης (Εικ. 15Β). Στη θέση εμφύτευσης συχνά παρατηρείται αυξημένη ατυπία, ο ιστολογικός βαθμός της οποίας δεν προδικάζει το αποτέλεσμα. Επομένως, όλες οι μύλες κυήσεις θα πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά μέσω της μέτρησης των επιπέδων της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Οι περισσότερες ασθενείς με μερική και πρώιμη ολική μύλη κύηση εμφανίζονται με αυτόματη αποβολή ή υφίστανται απόξεση λόγω ανωμαλιών στο υπερηχοτομογράφημα. Το περιεχόμενο της μήτρας είναι υδατώδες και μπορεί να υπάρχουν τεμαχίδια ιστού που μοιάζουν με μικρά σταφύλια. Η υπερηχοτομογραφική εξέταση θα επιβεβαιώσει τη διάχυτη μεγέθυνση των λαχνών. Στις πλήρεις μύλες κυήσεις η ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης θα δείξει ότι τα επίπεδα της ορμόνης υπερβαίνουν κατά πολύ εκείνα που παράγονται σε μια φυσιολογική κύηση αντίστοιχης ηλικίας. Οι διαδοχικές μετρήσεις της ορμόνης καταδεικνύουν ταχέως αυξανόμενα επίπεδα, η αύξηση των οποίων είναι μεγαλύτερη εκείνης μιας συνήθους φυσιολογικής μονής ή ακόμη και πολλαπλής κύησης.

Η μεγάλη πλειοψηφία των κύσεων αυτών αφαιρείται με προσεκτική απόξεση. Κατ' ουσία, καμία από τις μερικές και μόνο το 2,5% των πλήρων μύλων κύσεων εξελίσσεται σε κακόηθες τροφοβλαστικό νεόπλασμα (χοριοκαρκίνωμα). Μετεξέλιξη σε διηθητικές μορφές παρατηρείται στο 10% από τις πλήρεις μύλες κύσεις που δεν έχουν παρακολουθηθεί και μπορεί να επιμείνουν και να υποτροπιάσουν, είναι σημαντική η διάκρισή τους από τις μη μύλες υδρωπικές και μερικές μύλες κύσεις. Το p57, ένα γονίδιο-αναστολέας του κυτταρικού κύκλου πατρικής προέλευσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποκάλυψη της πλήρους μύλης κύησης με την έλλειψη της έκφρασής του στην συγκυτιακή τροφοβλάστη και τα στρωματικά κύτταρα των λαχνών της μύλης κύησης (Εικ. 15 Γ και Δ). Λόγω του ότι το p57 προέρχεται από τον πατέρα, όπως και αμφότερα τα χρωμοσώματα X, στις πλήρεις μύλες κύσεις δεν υπάρχει έκφραση της πρωτεΐνης p57.



Εικόνα 16. Διηθητική μύλη κύηση με τη μορφή αιμορραγικής μάζας συμφυόμενης προς το τοίχωμα της μήτρας. Β. Σε διατομή, ο όγκος εισβάλλει στο μυομήτριο. (Ευγενής χορηγία του Dr David R Genest, Brigham and Women's Hospital, Boston MA).

1.11.2 Διηθητική μύλη κύηση

Αυτή ορίζεται σαν μια μύλη κύηση που εισέρχεται ή ακόμη διαπερνά το τοίχωμα της μήτρας. Υπάρχει διήθηση του ενδομητρίου από υδρωπικές χοριακές λάχνες που συνοδεύεται από πολλαπλασιασμό τόσο της κυτταροτροφοβλάστης, όσο και της συγκυτιοτροφοβλάστης (Εικ. 16). Ο όγκος προκαλεί τοπική αποδόμηση και μπορεί να διεισδύσει στον παραμήτριο ιστό και αγγεία. Οι υδρωπικές λάχνες μπορεί να δημιουργήσουν έμβολα σε απομακρυσμένες εστίες, όπως οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος, αλλά δεν αναπτύσσονται στα όργανα αυτά ως αληθείς μεταστάσεις και ακόμη, πριν την εποχή της χημειοθεραπείας, κάποια στιγμή υποχωρούσαν εκτός εάν επήρχετο θανατηφόρος αιμορραγία. Ο όγκος είναι εμφανής κλινικά, λόγω της αιμορραγίας από τον

κόλπο και της ανώμαλης μεγέθυνσης της μήτρας. Πάντα συνδυάζεται με μία εμμένουσα αύξηση των επιπέδων της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης και ποικίλου βαθμού ωχρινοποίησης των ωοθηκών. Ο όγκος έχει καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε ρήξη της μήτρας από την οποία θα απαιτηθεί υστερεκτομή.

ΧΟΡΙΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το χοριοκαρκίνωμα της κύησης είναι ένα επιθηλιακό κακόηθες νεόπλασμα τροφοβλαστικών κυττάρων που προέρχονται από οποιαδήποτε μορφή προηγηθείσας φυσιολογικής ή ανώμαλης κύησης. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες περιπτώσεις αναπτύσσονται στη μήτρα, οι έκτοπες κυήσεις αποτελούν θέσεις εντόπισης εκτός της μήτρας. Το χοριοκαρκίνωμα αναπτύσσεται γρήγορα και μεθίσταται ευρέως, αλλά απαντάει κανονικά στη χημειοθεραπεία μετά τη διάγνωσή του.

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Είναι μια ασυνήθης κατάσταση που παρατηρείται σε 1 ανά 20.000 έως 30.000 εγκυμονούσες στις Ηνωμένες Πολιτείες. Είναι πολύ συχνότερη σε κάποιες αφρικανικές χώρες και για παράδειγμα, παρατηρείται σε 1 ανά 2.500 εγκυμονούσες στο Ιμπαντάν της Νιγηρίας. Του χοριοκαρκινώματος προηγούνται κάποιες καταστάσεις: Το 50% αναπτύσσεται σε υδατιδώδεις μύλες κυήσεις, το 25% σε προηγηθείσες εκτρώσεις και 22% περίπου σε φυσιολογικές εγκυμονούσες (ενδοπλακουντιακό χοριοκαρκίνωμα). Οι υπόλοιπες περιπτώσεις παρατηρούνται σε έκτοπες κυήσεις και τερατώματα εντός και εκτός του γεννητικού συστήματος. Περίπου 1 στις 40 υδατιδόμορφες μύλες κυήσεις αναμένεται ότι θα οδηγήσει σε χοριοκαρκίνωμα, σε αντίθεση με 1 στις 150.000 φυσιολογικές κυήσεις.

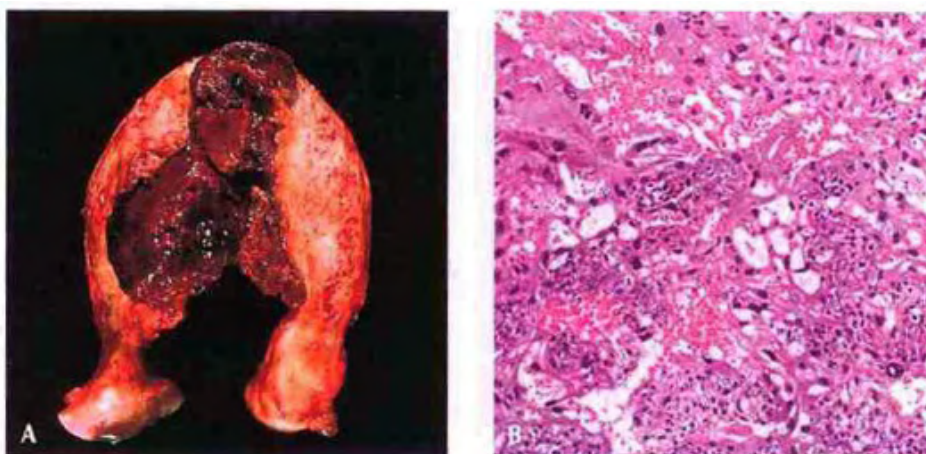
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το χοριοκαρκίνωμα κλασσικά είναι ένας μαλακός, σαρκώδης, ωχροκίτρινος όγκος που έχει μια ιδιαίτερη τάση να σχηματίζει μεγάλες ωχρές περιοχές ισχαιμικής νέκρωσης, εστίες μαλθακών κύστεων και εκτεταμένη αιμορραγία (Εικ. 17Α). Ιστολογικά, είναι ένας καθαρά επιθηλιακός όγκος που δεν παράγει χοριακές λάχνες και που αναπτύσσεται με

ανώμαλο πολλαπλασιασμό, τόσο της κυτταροτροφοβλάστης όσο και της συγκυτιοτροφοβλάστης (Εικόνα 17B).

Μερικές φορές είναι δυνατόν να αναγνωριστούν αναπλαστικές περιοχές με ανώμαλες μιτώσεις εντός περιοχών με ανώμαλο πολλαπλασιασμό. Ο όγκος εισβάλλει στο υποκείμενο μυομήτριο, συχνά διηθεί αγγεία και λεμφαγγεία και σε μερικές περιπτώσεις επεκτείνεται στον ορογόνο της μήτρας και τις γειτονικές δομές. Έχει γρήγορη ανάπτυξη και μπορεί να παρουσιάσει αιμορραγία, ισχαιμική νέκρωση και δευτεροπαθή φλεγμονή.

Σε θανατηφόρες περιπτώσεις, μεταστάσεις ανευρίσκονται στους πνεύμονες, τον εγκέφαλο, τον μυελό των οστών, το ήπαρ και άλλα όργανα. Περιστασιακά, ανακαλύπτεται μεταστατικό χοριοκαρκίνωμα χωρίς να ανευρίσκεται πρωτοπαθής εστία στη μήτρα (ή την ωοθήκη), προφανώς λόγω του ότι η πρωτοπαθής εστία έχει υποστεί ολική νέκρωση.



Εικόνα 17 Α. Χοριοκαρκίνωμα με τη μορφή ευμεγέθους αιμορραγικής μάζας που εισχωρεί στο τοίχωμα της μήτρας. Β. Μικροφωτογραφία χοριοκαρκινώματος στην οποία φαίνεται νεοπλασματική κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. (Ευγενής χορηγία του Dr David R Genest, Brigham and Women's Hospital, Boston MA).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Το χοριοκαρκίνωμα της μήτρας κλασικά δεν οδηγεί στην ανάπτυξη μιας μεγάλης ογκώδους μάζας. Καθίσταται εμφανές μόνο από περιστασιακές κηλίδες ενός αιμορραγικού, καφεοειδούς και ενίοτε δύσοσμου υγρού. Αυτό το έκκριμα μπορεί να εμφανιστεί κατά την πορεία μιας κατά τα άλλα φυσιολογικής εγκυμοσύνης μετά από μια αποβολή ή μετά από μια απόξεση. Σε μερικές περιπτώσεις ο όγκος δεν εμφανίζεται παρά μήνες μετά από αυτά τα γεγονότα. Συνήθως, τη στιγμή της ανακάλυψης του όγκου τοπικά, στις ακτινογραφίες των πνευμόνων και των οστών θα είναι ήδη εμφανής η ύπαρξη

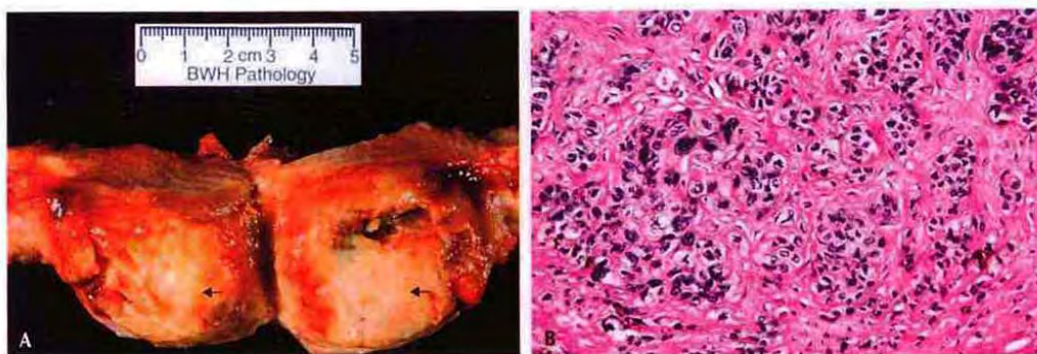
μεταστατικών βλαβών. Τα επίπεδα της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης είναι αυξημένα πέραν εκείνων που παρατηρούνται σε υδατιδόμορφες μύλες κυήσεις. Περιστασιακά όμως, ανευρίσκονται όγκοι που παράγουν μικρές ποσότητες ορμόνης ενώ κάποιοι όγκοι είναι τόσο νεκρωτικοί που έχουν γίνει λειτουργικά ανενεργείς.

Οι διάχυτες μεταστάσεις είναι το χαρακτηριστικό αυτών των όγκων. Οι συνηθέστερες θέσεις είναι οι πνεύμονες (50%) και ο κόλπος (30-40%), ακολουθούμενες σε κατιούσα τάξη από τον εγκέφαλο, το ήπαρ και τους νεφρούς.

Η θεραπεία των τροφοβλαστικών νεοπλασμάτων εξαρτάται από τον τύπο και το στάδιο του όγκου και περιλαμβάνει εκκενωτική επέμβαση στην μήτρα, άλλες επεμβάσεις και χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία συνίσταται στην χορήγηση ενός ή περισσότερων από μια ομάδα φαρμάκων στην οποία περιλαμβάνονται η μεθοτρεξάτη, η ακτινομυκίνη D και η ετοποσίδη. Τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας στο χοριοκαρκίνωμα της κυήσεως είναι εντυπωσιακά με αποτέλεσμα μέχρι και 100% ίαση ή υποχώρηση των βλαβών σε όλες τις εστίες, με την εξαίρεση κάποιων που είχαν υψηλού κινδύνου μεταστατική νόσο της τροφοβλάστης. Πολλές από τις θεραπευθείσες ασθενείς είχαν φυσιολογικές συνακόλουθες κυήσεις και τοκετούς. Αντίθετα, τα μη συνδεόμενα με την κύηση χοριοκαρκινώματα είναι πολύ πιο ανθεκτικά στη θεραπεία.

1.11.3 Τροφοβλαστικός όγκος θέσης εμφύτευσης

Σε αντίθεση με την συγκυτιακή κυτταροτροφοβλάστη που παρατηρείται στις χοριακές λάχνες, η ενδιάμεση τροφοβλάστη ανευρίσκεται στη θέση εμφύτευσης και της πλακουντιακής μεμβράνης. Η ενδιάμεση τροφοβλάστη αποτελείται από μονοπύρρηνα κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα, το οποίο τα διακρίνει από τη συγκυτιακή κυτταροτροφοβλάστη. Σε αντίθεση με τη συγκυτιοτροφοβλάστη (που παράγει ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη), τα κύτταρα της ενδιάμεσης τροφοβλάστης έχουν ασθενή έκφραση του ανθρώπινου πλακουντιακού λακτογόνου. Η ενδιάμεση τροφοβλάστη συντίθεται από την τροφοβλάστη του πλακούντα και τα υπολείμματα στη θέση εμφύτευσης του πλακούντα μετά την εγκυμοσύνη και μπορεί να δημιουργήσει *τροφοβλαστικούς όγκους της θέσης εμφύτευσης του πλακούντα (PSTT)*(Εικ. 18)



Εικόνα 18 Α. τροφοβλαστικός όγκος στη θέση του πλακούντα με τη μορφή διακριτής μάζας στο μυομήτριο. Β. Ιστολογική εικόνα του PSTT. (Ευγενής χορηγία του Dr Bradley G Quade, Brigham and Women's Hospital, Boston MA).

Οι PSTT αντιστοιχούν σε λιγότερο από το 2% των τροφοβλαστικών νεοπλασμάτων της εγκυμοσύνης και εμφανίζονται σαν νεοπλασματικά πολυγωνικά κύτταρα που διηθούν το ενδομήτριο. Των PSTT μπορεί να προηγηθεί φυσιολογική εγκυμοσύνη (στο ήμισυ των περιπτώσεων), αυτόματη αποβολή (1/3 των περιπτώσεων) ή υδατιδώδης μύλη κύηση (1/3 των περιπτώσεων). Τα επίπεδα της β –ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης μπορεί να είναι υψηλά. Οι ασθενείς με εντοπισμένη (σταδίου I ή II) νόσο, ή εκείνες στις οποίες το διάστημα από την προηγηθείσα εγκυμοσύνη μέχρι την διάγνωση είναι μικρότερο των δύο ετών έχουν εξαιρετική πρόγνωση. Οι όγκοι που διαγιγνώσκονται 4 ή και περισσότερα έτη μετά την εγκυμοσύνη με συμμετοχή των πνευμόνων ή προχωρημένου σταδίου έχουν κακή πρόγνωση. Συνολικά το 10 % θα παρουσιάσει διάχυτες μεταστάσεις και θα πεθάνει. Η διάκριση των PSTT από τη φυσιολογική τροφοβλάστη στη θέση εμφύτευσης του πλακούντα μπορεί να είναι δύσκολη και να απαιτήσει τη χρήση βιολογικών δεικτών (Mel – Cam και Ki- 67) με τους οποίους θα αναγνωριστεί αυξημένος πολλαπλασιασμός των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Η ΣΗΜΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ
ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ
ΜΕ ΤΟ ΣΑΚΧΑΡΟ Ο-N-
ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ
ΣΤΟ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟ
ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ
ΣΕΡΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ Ο-GLcNAc

Κ
Ε
Φ
Α
Λ
Α
Ι
Ο
2^ο

Πολλά σήματα, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού stress, της ινσουλίνης, του οξειδίου του αζώτου, των εστέρων φορβόλης, της αδενοσίνης, του IGF-I, TGF- β , IL-1 β , TNF- α , της θρομβοποιητίνης, του παράγοντα διέγερσης των μακροφάγων, του παράγοντα βλαστοκυττάρων, της ενεργοποίησης του AMPK και της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού stress 70, αυξάνουν την πρόσληψη της γλυκόζης στα κύτταρα. Για μία υποομάδα αυτών των σημάτων, η γλυκόζη τροποποιεί την κυτταρική απάντηση κατά τρόπο ανεξάρτητο της διατήρησης των ενεργειακών επιπέδων. Παραδείγματα είναι η μεταβολή της σύνθεσης γλυκοζαμινογλυκανών στην εξωκυττάρια ουσία, η σηματοδότηση της ινσουλίνης, η ενεργοποίηση της κινάσης JNK/MAP, και η ρύθμιση των επιπέδων των HsP79, HsP40 και της πρωτεΐνης MMP-2. Η μεταβολή των εξωκυττάρων επιπέδων γλυκόζης και γλυκοζαμίνης μπορεί να μεταβάλει την κυτταρική λειτουργία κατά τρόπο ανεξάρτητο της γλυκόλυσης, διά της μετατροπής της γλυκοζαμίνης σε UDP-GlcNAc δια της οδού βιοσύνθεσης των εξοζαμινών HPB. Ίσως το πιο πειστικό παράδειγμα του ρόλου των HPB στην κυτταρική ρύθμιση με τη μεσολάβηση της γλυκόζης/γλυκοζαμίνης να είναι οι μηχανισμοί που διέπουν την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης γλυκόζης και γλυκοζαμίνης, ή η διευκόλυνση της μεταφοράς της γλυκόζης δια της υπερέκφρασης μεταφορέων γλυκόζης (Gluts) οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, το παθογνωμονικό σημείο του διαβήτη τύπου II. Σε μία σημαντική μελέτη, οι Marshal et al απέδειξαν ότι ο αποκλεισμός της GFAT, του ενζύμου περιορισμού στην HBP είτε μέσω της αζασερίνης είτε μέσω της 6-διαζο-5-οξονολευκίνης, μπορούσε επίσης να αποκλείσει την αντίσταση στην ινσουλίνη που μεσολαβείται από γλυκόζη. Σε ενίσχυση αυτών των μελετών, κι άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι η υπερέκφραση της GFAT μιμείτο τα αποτελέσματα της θρέψης των κυττάρων/ζώων με γλυκόζη/γλυκοζαμίνη. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα δεικνύουν τη συμμετοχή της HBP ως μεσολαβητή στην αντίσταση στην ινσουλίνη, και εγείρουν την υποψία ότι η HBP μπορεί να ρυθμίζει και άλλες οδούς που επηρεάζονται από τη γλυκόζη/γλυκοζαμίνη.

Το τελικό προϊόν της HBP είναι η UDP-GlcNAc, που είναι δότης της κοινής μορφής ενδοκυττάριας γλυκοζυλίωσης του πυρήνα και των πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος. Η αύξηση των επιπέδων O-GlcNAc στα ποντίκια και στις κυτταρικές καλλιέργειες, είτε γενετικά είτε φαρμακευτικά, οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη και μιμείται τα αποτελέσματα αυξημένης παραγωγής γλυκόζης, σε πολλαπλές οδούς. Αυτά τα δεδομένα

δεικνύουν ότι η O-GLcNAc είναι ένας κύριος ρυθμιστικός παράγων της γλυκόζης. Σε αυτή την ανασκόπηση, εξετάζονται οι πολλοί ρόλοι της O-GLcNAc στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας, με έμφαση σε αυτούς που επηρεάζονται περισσότερο από την παραγωγή γλυκόζης, ή από μεταβολές στις εξωκυττάρειες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

2.1 ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Το 1984 οι Torres & Hart περιέγραψαν μία νέα μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία υπάρχει σε αφθονία στις κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, έναν υδατάνθρακα που πλέον είναι γνωστός ως O-GLcNAc. Η O-GLcNAc θεωρήθηκε καινούρια για δύο λόγους: (1) Η O-GLcNAc δεν είχε επισημανθεί σε μία πιο πολύπλοκη δομή, με την εξαίρεση των πρωτεϊνών των πυρηνικών ποριδίων των φυτών, και (2) είχε μία κατανομή στο κυτταρόπλασμα και το πυρήνα, ενώ οι κλασσικές γλυκοπρωτεΐνες είχαν εντοπιστεί στην επιφάνεια των κυττάρων καθώς και στον αυλό των μεμβρανωδών ενδοκυττάρων διαμερισμάτων, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και το όργανο του Golgi. Από το 1984, έχει αναγνωριστεί ένας μικρός αριθμός κι άλλων ενδοκυττάρων υδατανθράκων, αλλά η O-GLcNAc παραμένει η πιο συχνή και η πιο διαδεδομένη. Η O-GLcNAc έχει απομονωθεί σε όλα τα μετάζωα που έχουν μελετηθεί, καθώς και στα πρωτόζωα και τον προκαρυωτικό οργανισμό *Listeria*. Περιέργως, οι τροποποιημένες πρωτεΐνες O-GLcNAc έχουν αναγνωριστεί και στον ασπέργιλλο, αλλά υπάρχουν λίγες βιοχημικές ή γενετικές αποδείξεις ότι υπάρχουν πρωτεΐνες O-GLcNAc στους μύκητες, στους *Saccharoyses* ή στα *Pombe*.

Η O-GLcNAc έχει κυρίως πυρηνική κατανομή. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση Oilcan παρατηρείται στο πυρηνικό σύμπλεγμα, και σχετίζεται με τη χρωματίνη. Επίσης η Oilcan έχει ανευρεθεί σε πολλές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, των μιτοχονδρίων και της μεμβράνης. Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν περισσότερες από 400 σημαντικές κυτταρικές πρωτεΐνες, και ανήκουν σε πολλές λειτουργικές ομάδες .

2.2 Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ O-GLcNAc

Η O-GLcNAc είναι μία επαγώγιμη και δυναμικά μεταβαλλόμενη μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην προσθήκη και την αφαίρεση της O-GLcNAc έχουν αναγνωριστεί και κλωνοποιηθεί. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες φωσφορυλίωσης, όπου περίπου 650 διακριτά γενετικά ένζυμα ρυθμίζουν την προσθήκη και την αφαίρεση των φωσφορικών, μόνο δύο πολυπεπίδια δρουν ως καταλύτες στην παραγωγή της O-GLcNAc: ένα ουριδινινοπεπτίδιο διφωσφο-N-ακετυλγλυκοζαμίνης ή β-N-ακετυλογλυκοζαμινυλική τρανσφεράση και η ουδέτερη β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάση. Ωστόσο, αυτές οι δύο υπομονάδες είναι μη ομοιοπολικά στοιχεία πολλών διαφορετικών συστατικών των συμπλεγμάτων ολοενζύμων, που φαίνεται να ρυθμίζουν τόσο τη στόχευση όσο και το ρυθμό ανακύκλωσης της O-GLcNAc.

2.3 OGT

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την OGT έχει κλωνοποιηθεί από πολλούς οργανισμούς και θεωρείται καλά διατηρημένο. Υπάρχει ταύτιση κατά 99% μεταξύ της OGT ανθρώπων και επίμυων, και ταύτιση κατά 61% μεταξύ της OGT επίμυων και *Caenorhabditis Elegans*. Στα κύτταρα των θηλαστικών η OGT κωδικοποιείται από ένα αντίγραφο ενός γονιδίου ευρισκόμενου στο X χρωμόσωμα, ενώ στα φυτά, υπάρχουν δύο ομόλογα χρωμοσώματα. Αναφέρθηκε πρόσφατα ότι το γονίδιο 4 του συνδρόμου Bardet-Biedl, που ευρίσκεται στο 15q22.2-23 έχει ορισμένες ομοιότητες με την OGT. Ωστόσο δεν έχει αναφερθεί κάποια δραστηριότητα αυτού του μεταγραφικού παραγώγου της OGT, μήκους 527 αμινοξέων. Η OGT εκφραζόταν σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, αν και φαίνεται να βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό στο πάγκρεας, στον εγκέφαλο και στο θύμο.

Η OGT είναι μία μοναδική γλυκοζυλοτρανσφεράση καθώς είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη, παρά μία τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη, και έχει μικρή ή καθόλου συγγένεια με της υπόλοιπες γλυκοζυλοτρανσφεράσες. Η OGT περιέχει δύο υπομονάδες, μία αμινοτελική τετρατρικοπεπτιδική υπομονάδα και μια καρβοξυτελική υπομονάδα που δρα ως καταλύτης. Αυτές οι υπομονάδες χωρίζονται από μία διμερή ακολουθία εντόπισης στον

πυρήνα. Η OGT ευρίσκεται κυρίως στον πυρήνα, όπως διαπιστώθηκε από τον ανοσοφθορισμό και την υποκυτταρική διαίρεση. Στα κύτταρα των θηλαστικών, το μάτισμα του mRNA του OGT οδηγεί σε διαφορετικές μεταγραφές, από τις οποίες έχουν αναγνωριστεί δύο, η μιτοχονδριακή OGT και η πυρηνικο-κυτταροπλασματική. Η μιτοχονδριακή OGT έχει 9 επαναλήψεις και ένα διαφορετικό αμινοτελικό άκρο, που περιέχει μία ακολουθία στόχευσης των μιτοχονδρίων. Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή, ανιχνεύεται OGT και UDP-GlcNAc εντός των μιτοχονδρίων.

Η πυρηνική OGT έχει μελετηθεί πιο επισταμένα ως προς τα διαφορετικά προϊόντα της μετά το μάτισμα. Αυτή η πρωτεΐνη 1037 αμινοξέων (110kDa) αρχικά επιστεύετο ότι βρισκόταν κυρίως ως ομοιοτριμερές, πανομοιότυπων υπομονάδων, ή ως ετεροτριμερές ή όμοιων υπομονάδων συνδεδεμένων με μία τρίτη υπομονάδα. Πρόσφατα, μελέτες της δομής της έδειξαν ότι τεταρτοταγώς, η OGT είναι ένα διμερές, κάτι που δεικνύει ότι τα προηγούμενα συμπεράσματα ήταν εσφαλμένα λόγω της επιμηκυμένης τεταρτοταγούς δομής του μορίου, που οδηγεί σε μεγάλη ακτίνα Stokes.

Η πυρηνική OGT απομονώθηκε αρχικά από την κυτοσόλη ήπατος επίμυων, έχει βέλτιστο pH κοντά στο 6 (ενεργό εύρος pH 6-7,5) και σε αντίθεση με πολλές γλυκοζυλτρανσφεράσες δεν εξαρτάται από ετεροπολικά κατιόντα. Η πρωτεΐνη αυτή αναστέλλεται από το NaCl, το UDP, το UMP καθώς και από ένα ανάλογο της ουρακίλης, την αλλοξάνη και την N-αιθυλμαλεϊμίδη. Πρόσφατα, μία νέα μελέτη τόνισε τη χρησιμότητα των 3 αναστολέων που ανταγωνίζονται με την UDP-GlcNAc, αν και η χρησιμότητα αυτών των συμπλόκων, δεν έχει αξιολογηθεί ακόμα *in vivo*.

Η απομονωθείσα από το ήπαρ ncOGT έχει μία Km 545nM για την UDP-GlcNAc χρησιμοποιώντας το συνθετικό πεπτίδιο YDSPSTST. Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη ncOGT και ένα πεπτίδιο με γνωστή τροποποίηση της περιοχής OO-GlcNAc, δείχνοντας ότι η ncOGT συνέχισε να λειτουργεί αν και με ένα τυχαίο μηχανισμό *bi-bi* και είχε διάφορες τιμές Km για την UDP-GlcNAc, που κυμαίνονταν από 6 έως 217 μM. Η δραστηριότητα της OGT πιστεύεται ότι βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο, η ακολουθία του οποίου ανήκει στην υπεροικογένεια των φωσφορυλασών του γλυκογόνου, με δύο πτυχές Rossman και μία θέση δέσμευσης του UDP-GlcNAc. Πρόσφατες μελέτες των μεταλλάξεων της, τόνισαν σημαντικές ρίζες που υπάρχουν, ιδιαίτερα η ρίζα Cys, τύπου

Ψ839. Η αντικατάσταση της Cys από ρίζα Ser προκαλεί μείωση της δραστηριότητας κατά 93%.

Η ncOGT των επίμυων έχει 11,5 επαναλήψεις της TPR που είναι σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, για την αναγνώριση τους, καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Η δομή του μορίου TPR της OGT αναγνωρίστηκε πρόσφατα. Αυτή η δομή έχει το σχήμα επιμηκυμένης υπερέλικας όμοιας με αυτήν της ιμπορτίνης-α. Η κυρτή επιφάνεια της υπερέλικας φαίνεται πως μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, και ειδικότερα οι περιοχές 6, και 7. Σε ανεξάρτητες μελέτες, οι Kreppel et al απέδειξαν ότι η διαγραφή του TPR 6-11,5 προκαλούσε μονομερή της OGT.

Η κοίλη επιφάνεια της υπερέλικας έχει μία κλίμακα ασπαραγίνης, όμοια με τις επαναλήψεις ARM της ιμπορτίνης α και β, που είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση των πεπτιδίων στόχων στις πρωτεΐνες αυτές. Η διαγραφή των τριών περιοχών TPR δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της ncOGT ως προς τα πεπτίδια, αλλά καταστρέφει την δραστηριότητα της ως προς την CK-2 και την πρωτεΐνη των ποριδίων του πυρήνα p62 (nr62). Η συγγένεια της OGT για την πλήρη πρωτεΐνη nr62 είναι μεγαλύτερη από αυτή που έχει ως προς τα πεπτίδια. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ποιος είναι ο ρόλος της περιοχής του TPR για τη μεσολάβηση στην αναγνώριση και τη δέσμευση των υπομονάδων. Ο ρόλος της περιοχής TPR στην μεσολάβηση της αναγνώρισης των υπομονάδων, συνιστά ένα λόγο γιατί δεν έχει αναγνωριστεί ομόφωνα, ένα πρότυπο για την προσθήκη O-GlcNAc.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους μία OGT τροποποιεί ειδικά χιλιάδες πρωτεΐνες, είναι άγνωστοι, αν και φαίνεται πως παίζουν κάποιο ρόλο και η συγκέντρωση UDP-GlcNAc, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, η γλυκοζυλίωση καθώς και η φωσφορυλίωση. Έχουν αναγνωρισθεί πολλές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την OGT και των οποίων οι αλληλεπιδράσεις δε μεταβάλλουν τη δραστηριότητα της, αν και δρουν ως άγκυρες, και επάγουν τη σήμανση των μεταγραφικών προϊόντων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της OGT ελέγχοντας την εντόπιση της, ρυθμίζοντας τη δέσμευση πρωτεϊνών, ή στοχεύοντας σε σύμπλοκα όπου ενεργοποιείται από μεταγραφικά γεγονότα. Κυρίως, η OGT είναι τροποποιημένη ως προς το O-GlcNAc, ενώ φέρει και φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Τέλος, η Km της OGT ως προς τα διάφορα πεπτίδια, φαίνεται να μεταβάλεται καθώς αλλάζουν οι συγκεντρώσεις UDP-GlcNAc, κάτι που

υποδεικνύει ότι καθώς τα επίπεδα της UDP-GLcNAc μεταβάλλονται εντός του κυττάρου η OGT στοχεύει σε διαφορετικά πεπτίδια. Η ρύθμιση της σύνδεσης των υπομονάδων, και η συσχέτιση τους με τα σύμπλοκα στόχους, και η μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί να ελέγχουν την OGT κατά τέτοιο τρόπο που αυτή τροποποιεί διαφορετικές πρωτεΐνες ως απάντηση σε διαφορετικά σήματα, ρυθμίζοντας έτσι με τον κατάλληλο τρόπο την κυτταρική λειτουργία.

2.4 O-GLcNAc-άση

Η O-GLcNAc-άση είναι μία διαλυτή β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάση του κυτταροπλάσματος, που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, και ιδίως στον εγκέφαλο. Η O-GLcNAc-άση έχει διατηρηθεί στα θηλαστικά με μία ταύτιση της τάξης τους 97,8% μεταξύ των ανθρώπινων γονιδίων και αυτών των επίμυων, καθώς και με μία ταύτιση της τάξης του 29% μεταξύ των γονιδίων του ανθρώπου και αυτών του *C.Elegans*.

Σε αντίθεση με τις λυσοσωματικές εξοζαμινιδάσες, η O-GLcNAc-άση είναι ειδική για την β-N-ακετυλγλυκοζαμίνη, και δεν αναστέλλεται από την N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, ενώ λειτουργεί σε ένα Ph 5,5-7. (οι λυσοσωματικές εξοζαμινιδάσες λειτουργούν σε ένα Ph 3,5-5,5). Η O-GLcNAc-άση επιδρά με ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, κάτι που υποδεικνύει ότι όπως και η OGT, ρυθμίζεται από τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η O-GLcNAc-άση φωσφορυλιώνεται, κάτι που συνιστά έναν επιπρόσθετο μηχανισμό ρύθμισης. Η O-GLcNAc-άση αναστέλλεται από την O-(2-ακεταμιδο-2δεοξυ-D-γλυκοκυρανοσυλιδέννη) άμινο-N-καρβαμάτη, και πρόσφατες μελέτες έχουν απομονώσει δύο νέους αναστολείς της, οι οποίοι μπορεί να είναι πιο ειδικοί.

Η O-GLcNAc-άση είναι μία πρωτεΐνη 917 αμινοξέων, με δύο δραστικές περιοχές τουλάχιστον, και ένα εξοζαμινιδασικό αμινοτελικό άκρο, καθώς και ένα καρβοξυτελικό άκρο ιστονικής ακετυλτρανσφεράσης. Το αμινοτελικό άκρο μοιάζει με αυτό των υαλουρονιδασών και η ακολουθία της O-GLcNAc-άση ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένα αυτοαντιγόνο υαλουρονιδάσης στο μηνιγγίωμα. Ενώ μπορεί να έχει κάποια δραστηριότητα έναντι του υαλουρονικού οξέως, η προτιμώμενη δράση της φαίνεται να είναι η O-GLcNAc με ένα Km 1,1mM για την pNP-GLcNAc και ένα Kcat 1s-1. Η O-GLcNAc-άση φαίνεται να χρησιμοποιεί μία μορφή κατάλυσης υποβοηθούμενης από τις υπομονάδες της, που

περιλαμβάνει δύο ομάδες ακεταμιδίων, όμοιες με τις άλλες γλυκοζυλυδρολάσες της οικογένειας 84. Δύο παραλλαγές της O-GlcNAc-άσης, στις οποίες έχουν διαγραφεί τα αμινοξέα 250-345 και 250-398, δεν έχουν καμία δραστικότητα, κάτι που υποδηλώνει ότι η δραστική περιοχή της O-GlcNAc-άσης βρίσκεται στο αμινοτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης. Η φυσιολογική συσχέτιση αυτών των παραλλαγών δεν έχει καθορισθεί, αν και η D250-345 O-GlcNAc-άση βρίσκεται σε μία θέση που σχετίζεται με υψηλή συχνότητα σακχαρώδους διαβήτη τύπου II στους επίμυες Goto-Kakizaki Wistar.

Το καρβοξυτελικό άκρο της O-GlcNAc-άσης είναι ομόλογο των ριζών HAT στις θέσεις AA 772-899 και έχει φανεί ότι είναι ελεύθερες ιστόνων και ιστονικών πρωτεϊνών του πυρηνίου. Η μετάλλαξη των ριζών ασπαρτικού οξέως και φαινυλαλανίνης καταστρέφει τη δραστηριότητα της. Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, η δραστηριότητα της HAT χαρτογραφήθηκε στις ρίζες αμινοξέων στις θέσεις 583 -917 της πρωτεΐνης. Η OGT σχετίζεται με τα σύμπλοκα δεακετυλάσης της ιστόνης, και προωθεί τη μεταγραφή. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η δυναμική τροποποίηση των μεταφραστικών συμπλόκων από την O-GlcNAc και από την ακετυλίωση των ιστονών παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μετάφρασης. Έχει αποδειχθεί ότι η O-GlcNAc-άση διασπάται εκλεκτικά από την κασπάση 3. Ωστόσο, αυτό δε φαίνεται να τροποποιεί ούτε τη δραστηριότητα της O-GlcNAc-άσης ούτε των περιοχών HAT. Ο ρόλος αυτής της σχισμής είναι άγνωστος, αν και μπορεί να απορυθμίζει την O-GlcNAc-άση κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

2.5 O-GlcNAc, ΕΝΑΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

Οι αρχικές μελέτες πάνω στην κρυσταλλίνη α, και τις κερατίνες 8 και 18, έδειξαν ότι η τροποποίηση των πρωτεϊνών από την O-GlcNAc γινόταν γρηγορότερα απ' ό,τι από τη βασική πρωτεΐνη. Αυτά τα δεδομένα έδειχναν ότι η προσθήκη O-GlcNAc μπορούσε να είναι ένας δυναμικός ρυθμιστής των τροποποιήσεων. Ενισχυτικές αυτής της άποψης ήταν ορισμένες μελέτες που έδειχναν ότι πολλαπλά σήματα οδηγούν σε δυναμικές αλλαγές στα επίπεδα O-GlcNAc εντός του κυττάρου, όπως:

- (1) η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από εστέρες φορβόλης, Con A, ιονομυκίνη,

(2) η μετάδοση σημάτων στα ουδετερόφιλα επαγόμενα από αγωνιστές,
 (3) η ανάπτυξη των ωκυττάρων του Xenopus,
 (4) η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου των θηλαστικών,
 (5) η αναστολή ορισμένων κινασών / φωσφατασών,
 (6) η μεταβολή των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων γλυκόζης / γλυκοζαμίνης
 (7) η μεταβολή των επιπέδων O-GlcNAc στην Stat5a και mTOR α4 φωσφοπρωτεΐνη
 ως απάντηση στη θεραπεία με προλακτίνη και

(8) η επαγωγή κυτταρικού stress με διάφορους παράγοντες.

Οι πλέον πειστικές ενδείξεις ότι η προσθήκη O-GlcNAc είναι ένας δυναμικός μετα-μεταφραστικός της τροποποίησης των πρωτεϊνών προέρχεται από μελέτες όπου γινόταν αναστολή της ανακύκλωσης του O-GlcNAc. Στις αρχικές μελέτες χρησιμοποιείτο διάλυμα γαλακτοζυλικής τρανσφεράσης, ενός ενζύμου που δεσμεύει την O-GlcNAc με ρίζες γαλακτόζης που αναστέλλουν την αναγνώριση από της εξοζαμινιδάσες. Τόσο η υπερέκφραση αυτού του ενζύμου, όσο και η μικροέγχυσή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προκαλούσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Πρόσφατα, η τεχνολογία Cre-lox χρησιμοποιήθηκε για τον αποκλεισμό της OGT σε επίμυες. Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι η O-GlcNAc είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, τόσο στα κύτταρα ES όσο και στην εμβρυογένεση των επίμυων.

Ο ανασυνδυασμός της lox flanked OGT από την ZP-3 ρεκομπινάση προκαλεί αυτόματη έκτρωση κατά την 4-5 ημέρα λόγω πλακουντικής ανεπάρκειας. Θεωρητικά, η ανεπάρκεια αυτή οφείλεται στην πλακουντική OGTδ, που κωδικοποιείται από τα μητρικά χρωμοσώματα. Η διαγραφή της OGT σε επίμυες, χρησιμοποιώντας ειδική για τους ιστούς Cre-ρεκομπινάση, οδήγησε σε παραπλήσια αποτελέσματα. Όταν ο ανασυνδυασμός γίνεται σε νευρικό ιστό, μέσω της Synapsin 1 Cre-ρεκομπινάσης, τα ζώα με απλότυπο OGTδ/ Y είναι παρόντα στο 50% της αναμενόμενης συχνότητας. Τα ζώα με απλότυπο OGTδ/ Y που επιβιώνουν ως τη γέννηση, έχουν μικρότερο μέγεθος από τα υπόλοιπα, δεν κατορθώνουν να αναπτύξουν φυσιολογική δραστηριότητα της κινητικής τους συσκευής, δε θηλάζουν και δεν επιβιώνουν για περισσότερες από 10 ημέρες. Η μελέτη ιστοτεμαχίων από το νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο αυτών των επίμυων, φανερώνει αύξηση της έκφρασης Tau καθώς και της φωσφορυλίωσής του, ενώ η έκφραση πρωτεϊνών όπως η συναψίνη 1 και η MAP2 δεν επηρεάζεται. Χρησιμοποιώντας Ick-driven Cre ρεκομπινάση διαγράφηκε εκλεκτικά η

OGT από τα CD4+ CD8+ θυμοκύτταρα, καθώς αυτά ωρίμαζαν προς ώριμα T κύτταρα. Υπό αυτές τις συνθήκες, παρατηρείται μείωση κατά 50% στα ώριμα CD4+ CD8+ στο μυελό. Αυτή η μείωση οφείλεται σε απόπτωση των T κυττάρων. Η OGT είναι φυλοσύνδετη, και συνδέεται με το X χρωμόσωμα στις γυναίκες, και στα θήλεα, ένα X χρωμόσωμα απενεργοποιείται τυχαία, πρώιμα κατά την ανάπτυξη. Στους επίμυες που είναι ετεροζυγώτες ως προς την OGTwt/OGTδ, οι ιστοί είναι μωσαϊκό αυτών των αλληλίων. Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία διαφορά στη δραστηριότητα ή στο ποσό της πρωτεΐνης, κάτι που δεικνύει ότι τα κύτταρα απενεργοποιούν εκλεκτικά το X χρωμόσωμα που κωδικοποιεί το OGTδ, ή υφίστανται απόπτωση, πρώιμα κατά την ανάπτυξη. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα δεικνύουν ότι η ανάγκη για OGT δεν είναι αμιγώς αναπτυξιακή, αλλά είναι, επίσης, αναγκαία για την κυτταρική λειτουργία.

2.6 Η O-GLcNAc ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η προσθήκη O-GLcNAc σε πρωτεΐνες σχετίζεται με τη ρύθμιση της δράσης των πρωτεϊνών με διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν:

- (1) τη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, και κατά συνέπεια την πρωτεϊνική λειτουργία,
- (2) τη μεταβολή του ρυθμού αποδόμησης των πρωτεϊνών,
- (3) την προσαρμογή της θέσης των πρωτεϊνών,
- (4) τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών,
- (5) τη διαμεσολάβηση στη μεταγραφή.

2.7 ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι αρχικές μελέτες χαρτογράφησης τόνιζαν τις ομοιότητες μεταξύ των θέσεων τροποποίησης της O-GLcNAc και των θέσεων των επαγόμενων από την προλίνη κινασών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι θέσεις προσκόλλησης της O-GLcNAc και του O-φωσφορικού χαρτογραφήθηκαν στην ίδια θέση. Τέτοια δεδομένα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η O-GLcNAc και το O-φωσφορικό είναι ανταγωνιστές, και ανταγωνίζονται για την ίδια θέση

Ser/Thr. Έτσι, αλλάζοντας το πρότυπο διαθέσιμων θέσεων Ser/Thr για την φωσφορυλίωση, η O-GLcNAc θα τροποποιούσε τα πρότυπα φωσφορυλίωσης και την πρωτεϊνική λειτουργία. Ενισχυτικά αυτού του προτύπου, είναι τα αποτελέσματα των μελετών των Wells et al, οι οποίοι απέδειξαν ότι η OGT και η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 β και γ υπάρχουν ταυτόχρονα σε ένα σύμπλοκο. Επιπρόσθετα στοιχεία, ενισχυτικά αυτού του μοντέλου, προέρχονται από μελέτες καθορισμού των επιδράσεων των αναστολέων των κινασών και φωσφατασών στα επίπεδα O-GLcNAc ορισμένων πρωτεϊνών. Στις μελέτες αυτές, η ενεργοποίηση της κινάσης PKC και PKA μείωνε τη γλυκοζυλίωση σε ένα αδιάλυτο κλάσμα πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό. Επίσης, η αναστολή των PKC και PKA αυξάνει την τροποποίηση των πρωτεϊνών από την O-GLcNAc στο κλάσμα αυτό. Χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο, οι Griffith et al παρατήρησαν την αναστολή των κινασών που εξαρτώνται από την κυκλίνη από την ολομουκίνη, της κινάσης S6 από την ραπαμυκίνη, καθώς και τα αυξημένα επίπεδα O-GLcNAc σε ορισμένες πρωτεΐνες. Στα κύτταρα νευροβλαστώματος, Cos-7, Hela, και τα κύτταρα Kelly, ο αναστολέας της φωσφατάσης του οκαδαϊκού οξέος μειώνει την γλυκοζυλίωση, αν και αυτό το φαινόμενο παρατηρείται κυρίως σε πυρηνικές πρωτεΐνες. Τέλος, σε ορισμένες πρωτεΐνες, όταν τα επίπεδα O-GLcNAc μειωθούν, αυξάνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης. Αυτό ισχύει και για την OGT των Tau, καθώς και για την Tau που απομονώνεται από ασθενείς που πάσχουν από νόσο Alzheimer. Συνολικά, αυτές οι μελέτες παρέχουν αποχρώσεις ενδείξεις για την αντίστροφη σχέση μεταξύ της O-GLcNAc και του O-φωσφορικού. Εναλλακτικά, αυτά τα δεδομένα μπορούν να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών πρωτεϊνικών δεξαμενών.

Τα δεδομένα από τις in vitro μελέτες πάνω στην RNA πολυμεράση II ενισχύουν άμεσα την αντίστροφη σχέση μεταξύ της O-GLcNAc και της φωσφορυλίωσης ορισμένων πρωτεϊνών. Οι Comer et al εξέτασαν της ιδιότητες μίας μονήρους θέσης γλυκοζυλίωσης στο καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II. Το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II αποτελείται από παράλληλα πολυπεπτίδια. Στη μελέτη αυτή, συντέθηκαν 1 αντίγραφα αυτών των επαναλήψεων και υποβλήθηκαν είτε σε in vitro φωσφορυλίωση, είτε σε in vitro γλυκοζυλίωση. Η ανάλυση του φωσφοπεπτιδίου ή του γλυκοπεπτιδίου που σχηματίστηκε δεν έδειξε κάποια μεταβολή στην δομή του μορίου. Ωστόσο, σε μία in vitro ενζυμική μελέτη, η προσθήκη O-GLcNAc ανέστειλε την φωσφορυλίωση. Αντίθετα, η

προσθήκη φωσφατάσης ανέστειλε την τροποποίηση της ω. Η αντίστροφη γλυκοζυλίωση και φωσφορυλίωση της RNA πολυμεράσης II μπορεί να ρυθμίζει την μεταγραφή. Η RNA πολυμεράση II υποφωσφορυλιώνεται όταν συντίθεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για το σχηματισμό του σύμπλοκου έναρξης. Κατά συνέπεια, η RNA πολυμεράση II υπερφωσφορυλιώνεται και ξεκινά μεταγραφή.

Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι η O-GlcNAc προλαμβάνει την πρόωρη έναρξη της μεταγραφής.

2.8 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ

Η αποδόμηση των πρωτεϊνών παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας, διά της προγραμματισμένης καταστροφής των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, των μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η O-GlcNAc έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει την πρωτεϊνική αποδόμηση με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Πρώτον, μεταβάλλει τη στόχευση ορισμένων πρωτεϊνών στο πρωτεόσωμα, και δεύτερον μεταβάλλει τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος.

Η τροποποίηση του ευκαρυωτικού παράγοντα ενεργοποίησης α-p67, Sp1 και του υποδοχέα των οιστρογόνων -β από την O-GlcNAc επιμηκύνει την ημίσεια ζωή αυτών των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση του ευκαρυωτικού παράγοντα ενεργοποίησης α-p67, η τροποποίηση της O-GlcNAc προλαμβάνει την αποδόμηση των πρωτεϊνών με άγνωστο τρόπο. Όταν αποδομείται ο ευκαρυωτικός παράγοντας ενεργοποίησης α-p67, φωσφορυλιώνεται ο ευκαρυωτικός παράγοντας ενεργοποίησης 2α προκαλώντας αναστολή της μετάφρασης.

Αρκετές θέσεις της O-GlcNAc είναι σε ακολουθίες που έχουν υψηλή βαθμονόμηση κατά PEST. Αυτές οι ακολουθίες αμινοξέων είναι πλούσιες σε Pro, Glu, Ser και Thr και έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβούν στην πρωτεϊνική αποδόμηση. Ενώ ορισμένες ακολουθίες Pest είναι συστατικές, ορισμένες απαιτούν ενεργοποίηση μέσω μηχανισμών όπως η φωσφορυλίωση. Μία θεωρία είναι ότι η ER-β O-GlcNAc μπορεί να αναστέλλει θέσεις φωσφορυλίωσης που προάγουν την πρωτεϊνική αποδόμηση. Επιπλέον, η μετάλλαξη των

κύριων θέσεων γλυκοζυλίωσης της Er-β, προκαλεί αύξηση της ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης σε σχέση με τη φυσιολογική, ενώ η μεταλλαγμένη που μιμείται την διαδικασία φωσφορυλίωσης, έχει μικρότερη ημίσεια ζωή.

Ο αποκλεισμός της HBP προκαλεί μεταβολές στη στοιχειομετρία της O-GlcNAc του παράγοντα μεταγραφής Sp1. Η υπογλυκοζυλιωμένη Sp1 αποδομείται ταχέως από μεσολαβούμενα από πρωτεασώματα βιοχημικά μονοπάτια, κάτι που επιταχύνεται από την προσθήκη εξωκυττάριας γλυκοζαμίνης. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η O-GlcNAc μεταβάλλει τη στόχευση της Sp1 από το πρωτεάσωμα. Ωστόσο, σε ανεξάρτητες μελέτες, η δραστηριότητα των πρωτεασωμάτων έχει εμπλακεί στη ρύθμιση των επιπέδων της Sp1. Σε αυτές τις *in vitro* μελέτες, η αποδόμηση του παράγοντα μεταγραφής Sp1 από πυρηνικό εκχύλισμα, μπορεί να ανασταλλεί με τη προσθήκη OGT, αλλά όχι από την καταλυτικά ανενεργή μορφή της OGT. Η αποδόμηση της OGT σε αυτό το μοντέλο, ωστόσο, είναι ανεξάρτητη της κατάστασης τροποποίησης της O-GlcNAc σε αυτό τον μεταγραφικό παράγοντα, κάτι που υποδεικνύει ότι υπάρχει μεταβολή, είτε στη στόχευση του Sp1, είτε στην δραστηριότητα των πρωτεασωμάτων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τουλάχιστον πέντε από τις δεκαεννέα πρωτεΐνες του πρωτεασωμικού υποσυμπλόκου 19S και εννέα από τις δεκατέσσερις πρωτεΐνες του πρωτεασωμικού υποσυμπλόκου 20S της *Drosophila* και των θηλαστικών τροποποιούνται από την O-GlcNAc. Η τροποποίηση των πρωτεασωμάτων από την O-GlcNAc *in vitro*, μειώνει την αποδόμηση μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της ATPάσης, ιδίως της ATPάσης Ρπτ2. Η O-GlcNAc δεν έχει φανεί να αναστέλλει τη δραστηριότητα της πεπτιδάσης του πρωτεασώματος 20S των κονίκλων. Στα θηλαστικά, η κατάσταση γλυκοζυλίωσης των πρωτεασωμάτων ανταποκρίνεται στη θρεπτική κατάσταση του κυττάρου. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι σε περιόδους ασιτίας, τα πρωτεασώματα απογλυκοζυλιώνονται και ενεργοποιούνται για να παρέχουν ενέργεια στο κύτταρο.

2.9 ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι οι πόροι του πυρήνα είχαν τροποποιηθεί εκτενώς από την O-GlcNAc, και για πολλά χρόνια η ειδική για την O-GlcNAc λεκτίνη Wheat Germ

Aglutinin χρησιμοποιείται για την αναστολή της μεταφοράς δια του πυρήνα, κάτι που υποδηλώνει ότι η O-GlcNAc μπορεί να ρυθμίζει την δραστηριότητα των πόρων του πυρήνα. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας μελέτες αποκατάστασης των πόρων του πυρήνα, οι Miller & Hanover έδειξαν ότι το έλλειμμα στην μεταφορά στον πυρήνα οφείλετο σε steri hindrance, παρά ότι ήταν αποτέλεσμα της τροποποίησης της δράσης των πρωτεϊνών του πυρήνα από την ω. Στις μελέτες αυτές, η O-GlcNAc των πυρηνικών πρωτεϊνών είχε ενωθεί με γαλακτόζη χρησιμοποιώντας την b-D-1-4-γαλακτοζυλτρανσφεράση, πριν επανεισαχθεί στους πυρηνικούς πόρους και αποδειχθεί ότι ήταν πλήρως ενεργή. Πιο πρόσφατα, οι Hanover et al απέδειξαν ότι σε ορότυπους *C. Elegans* με OGTδ η μεταφορά προς τον πυρήνα πολλών μεταγραφικών παραγόντων είναι φυσιολογική.

Πειράματα σε νευρώνες *Aplysia* έδειξαν ότι αρκετές τροποποιημένες πρωτεΐνες μεταφέρονται γρήγορα από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Σε συνδυασμό με τα δεδομένα που δείχνουν ότι η O-GlcNAc είναι κυρίως πυρηνική, φαίνεται ότι η O-GlcNAc είναι μία εναλλακτική πρωτεΐνη της NLS. Οι μελέτες που εξέτασαν την μεταφορά γλυκοσυμπλόκων αλβουμίνης που είχαν συντεθεί από ορό βοοειδών, η οποία εισήχθη σε κύτταρα με μικροέγχυση, ενισχύουν αυτή τη θέση. Εδώ, η γλυκόζη, η μανόζη, η φουκόζη, και η N-ακετυλχιτοβιόζη φάνηκε ότι προάγουν την πρόσληψη BSA από τον πυρήνα. Ενώ η μεταφορά των γλυκοσυμπλόκων BSA ήταν ενεργητική, δεν απαιτούσε τους συνήθεις κυτταροπλασματικούς παράγοντες που απαιτούνται για την μεταφορά στον πυρήνα. Πρόσφατα, οι Guinez et al πρότειναν ότι οι εξαρτώμενες από την GlcNAc μεταβολές, στη θέση των πρωτεϊνών εντός του κυττάρου, μπορεί να μεσολαβούνται από λεκτίνες, που είναι πρωτεΐνες δέσμησης υδατανθράκων όπως η CBP-35, η γαλεκτίνη 3, η CBP-67 και η HSP70, που ως γνωστόν μετακινούνται ελεύθερα από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

Για πρωτεΐνες όπως η c-Myc, Tau, Stat5a, Pax-6, ELF-1, Sp1 και mTOR α4 φωσφοπρωτεΐνη, οι πυρηνικές μορφές τους τροποποιούνται περισσότερο από την O-GlcNAc απ' ότι οι κυτταροπλασματικές τους μορφές. Επιπρόσθετα στοιχεία παρέχονται από τη θεραπεία νευρωνικών κυττάρων με οκαδαϊκό οξύ, όπου παρατηρείται αύξηση της φωσφορυλίωσης της Tau και μείωση της εντόπισής της στον πυρήνα. Επιπλέον, το siRNA του γονιδίου *ogt* των κυττάρων λεμφώματος προκαλεί επανατοποθέτηση της Sp1 και της mTOR α4 φωσφοπρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, ανεξάρτητες μελέτες της Stat5a δείχνουν ότι η εγκατάσταση στον πυρήνα είναι ανεξάρτητη της κατάστασης τροποποίησης

της O-GLcNAc. Όπως αναφέρεται παραπάνω, στο μοντέλο της OGTA *C. elegans*, η μεταφορά στον πυρήνα αρκετών παραγόντων μεταγραφής φάνηκε να είναι φυσιολογική. Αν η O-GLcNAc παίζει ρόλο στη μεταφορά στον πυρήνα, μπορεί να μην είναι ως σήμα NLS, αλλά ως σήμα απομάκρυνσης από τον πυρήνα.

Η πρωτεϊνική κινάση C είναι μία οικογένεια σχετιζόμενων δομικά κινάσων Ser/ Thr, που διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες, με συμβατικά ισοένζυμα (α , β I, β II, γ), άτυπα ισοένζυμα (ζ , ι , λ) και νέα ισοένζυμα (δ , ϵ , η , θ). Η PKC μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη όταν ενεργοποιείται, και τελικά αποφωσφορυλιώνεται και αποδομείται. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει επίδραση υψηλού επιπέδου γλυκόζης και γλυκοζαμίνης στην ενεργοποίηση της μεταφοράς των διαφόρων ισοενζύμων, και η αναστολή της HBP, μπορεί να απαλείψει ορισμένα από αυτά τα αποτελέσματα. Πρόσφατα, οι αλλαγές στη δραστηριότητα της PKC έχουν αποδοθεί σε αλλαγές στα επίπεδα της O-GLcNAc σε αστρογλοιακά κύτταρα. Σε κύτταρα που θεραπεύονται με PUGNAc ή στρεπτοζοτοκίνη, παρατηρείται μία μείωση στη μεμβρανική PKC- α και PKC- ϵ και αύξηση στην PKC- β II. Η γλυκοζαμίνη οδηγεί σε ταχεία μετακίνηση της PKC- β II στη μεμβράνη. Ωστόσο, το ίδιο δε συμβαίνει και με τις PUGNAc και STZ, κάτι που υποδηλώνει ότι οι μεταβολές στην PKC- β II δε μεσολαβούνται από την O-GLcNAc. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η O-GLcNAc μεταβάλλει τη σχέση των μεμβρανικών PKC δεν είναι ξεκάθαρη, αλλά φαίνεται ότι η ρύθμιση της θέσης και της δραστηριότητας τροποποιεί τη μεταγραφή αρκετών γονιδίων.

2.10 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Εκτός από τη μεταβολή της θέσης των πρωτεϊνών και της ημίσειας ζωής του παράγοντα μεταγραφής SP1, η O-GLcNAc ρυθμίζει, επίσης, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, ελαττώνοντας τη μεταγραφή του SP1 σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα. Ορισμένες θέσεις τροποποίησης της Sp1 αναγνωρίστηκαν από τους Roos et al στην O-GLcNAc, στην πλούσια σε Glu περιοχή της Sp1. Αυτή η περιοχή, που ονομάζεται SpE είναι σημαντική για τη σύνδεση με το σχετιζόμενο με την πρωτεΐνη TATA παράγοντα 110. Χρησιμοποιώντας την SpE που εκφράζεται σε *E. Coli* ή σε *Y. vaccinia*, οι Roos et al έδειξαν

ότι η γλυκοζυλίωση της SpE ανέστειλε τη σύνδεση με το TAF110. Επιπλέον, η θέση SPE υπέστη μετάλλαξη για να αφαιρεθούν οι θέσεις γλυκοζυλίωσης, καθώς και τα SpE που εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών. Ελέγχθηκε και η σύνδεση με τη φυσική Sp1, όπου η γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη SpE συνδεόταν λιγότερο ισχυρά σε σχέση με το μη μεταλλαγμένο πεπτίδιο. Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να ρυθμίζονται δύο ακόμα μεταγραφικοί παράγοντες, οι YY1 και ELF-2. Τόσο ο YY1 όσο και ο ELF-2, η δεσμευμένη με την RB, μορφή αυτών των πρωτεϊνών, είναι γλυκοζυλιωμένη σε μικρότερο βαθμό από ό,τι σε άλλες κυτταρικές μορφές. Επιπλέον, στην περίπτωση του YY1, η μεταβολή των εξωκυττάρων επιπέδων γλυκόζης οδηγεί σε αύξηση της τροποποίησης της O-GlcNAc και μείωση της σύνδεσης της με την RB. Ωστόσο, η επίδραση της O-GlcNAc στη σύνδεση της RB με την YY1 και την ELF02 δεν έχει μετρηθεί.

Η O-GlcNAc μπορεί να ρυθμίζει θετικά τις επιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Σε απάντηση στην ινσουλίνη, η Stat5a φωσφορυλιώνεται και τροποποιείται από την O-GlcNAc. Οι μελέτες χαρτογράφησης ταυτοποίησαν την Thr-92 ως μία πιθανή θέση τροποποίησης της O-GlcNAc, και η μετάλλαξη της Ala το επιβεβαίωσε. Η Stat5a μπορεί, επίσης, να τροποποιήσει την ενεργοποίηση των γονιδίων, επιστρατεύοντας ενεργοποιητές. Κατά τη δέσμευση με τον co-repressor της μεταγραφής η N-CoR δεν επηρεάστηκε από την O-GlcNAc, με τη γλυκοζυλιωμένη μορφή της Stat5a να είναι εκλεκτικά δεσμευμένη από το μεταγραφικό συνενεργοποιητή CREB.

Πρόσφατα, απομονώθηκε HsP70 ως μία λεκτίνη O-GlcNAc, κάτι που υποδηλώνει ότι πολλές από τις αλληλεπιδράσεις αυτής της πρωτεΐνης ρυθμίζονται από την O-GlcNAc. Ωστόσο, δεν έχουν ανευρεθεί μεσολαβούμενες από την O-GlcNAc αλληλεπιδράσεις της HsP70 in vivo, και είναι άγνωστη συνεπώς η σημασία αυτών των δεδομένων, αν και φαίνεται ότι μεσολαβείται από την κατάσταση θρέψης των κυττάρων.

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ
ΕΛΕΓΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΤΗΝ O-GLcNAc**

Κ
Ε
Φ
Α
Λ
Α
Ι
Ο
30

3.1 O-GLcNAc: ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ & ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟΥ II ΣΔ

Η ινσουλίνη δρα για να μειώσει τη συγκέντρωση της κυκλοφορούσας γλυκόζης, διεγείροντας την είσοδο γλυκόζης στους μύες και το λιπώδη ιστό, ενώ καταστέλλει την παραγωγή γλυκόζης και μεταβάλλει αρκετά ακόμα βιοχημικά μονοπάτια. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, η ινσουλίνη οδηγεί στη μεταφορά της Glut4 στην κυτταρική μεμβράνη και στην πρόσληψη γλυκόζης, που είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών υποδοχέων, της PI-3 κινάσης της AKT και της PKC. Σε μοντέλα ΣΔ τύπου II, η δράση της ινσουλίνης ως προς την πρόσληψη γλυκόζης ελαττώνεται. Η αύξηση των εξοζαμινών μεταβάλλει την πρόσληψη γλυκόζης σε αρκετά μοντέλα, και αυτό έχει αποδοθεί στην αυξημένη τροποποίηση της O-GLcNAc. Η αύξηση των επιπέδων O-GLcNAc στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και στους γραμμωτούς μύες μέσω της PUGNA οδηγεί σε αντοχή στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η υπερέκφραση OGT στο λίπος και τους μύες επίμυων οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη και υπερλεπτιναιμία. Πολλές πρωτεΐνες στον καταρράκτη σήμανσης της ινσουλίνης, κυρίως οι IRS-1, PI-3, και AKT τροποποιούνται από την O-GLcNAc. Η διεγερση των υποδοχέων ινσουλίνης οδηγεί συνήθως στην ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών και σε μεσολαβούμενη από την O-GLcNAc αντίσταση στην ινσουλίνη, ενώ η φωσφορυλίωση της AKT αναστέλλεται, είτε έμμεσα, είτε άμεσα, από την αναστολή των κινασών. Ο ρόλος της O-GLcNAc στη μεσολάβηση στη μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης έχει υποστηριχθεί από την μέτρηση της OGT στην *C. Elegans*. Η διαγραφή της *ogt-1(ok430)* οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων τρεχαλόζης και γλυκογόνου, σε μείωση της αποθήκευσης λίπους και σε καταστολή του σχηματισμού dauer επί εδάφους *daf-2*.

Επιπρόσθετα, η O-GLcNAc έχει βρεθεί ότι διαμεσολαβεί σε πολλές από τις επιπλοκές που σχετίζονται με τον τύπου II ΣΔ. Η υπεργλυκαιμία αναστέλλει τη δραστηριότητα του eNOS (κατά 67%). Το eNOS τροποποιείται από το O-GLcNAc και η κατάσταση γλυκοζυλίωσης του εξαρτάται από τις εξωκυττάριες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η τροποποίησή του μέσω της O-GLcNAc έχει τοποθετηθεί στη θέση Ser-1177 και αυτή, προφανώς, αποκλείει την επαγόμενη από την ινσουλίνη φωσφορυλίωση αυτού του αμινοξέος, προλαμβάνοντας την ενεργοποίηση αυτού του ενζύμου. Ο χρόνιος

αποκλεισμός του eNOS σχετίζεται τόσο με στητικές δυσλειτουργίες, όσο και με αθηροσκληρυνση σε διαβητικά μοντέλα. Εξετάζοντας το ρόλο της O-GlcNAc στην αθηροσκληρυνση, οι Federici et al έλεγξαν τα επίπεδα O-GlcNAc σε αθηροσκληρυντικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Ενώ η O-GlcNAc ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε μη αθηροσκληρυντικά κύτταρα, υπήρχε μία εξαπλάσια αύξηση της σε αθηροσκληρυντικές πλάκες στις καρωτίδες. Η O-GlcNAc μπορεί, επίσης, να μεταβάλλει τη λειτουργία των αγγειακών ιστών, μεταβάλλοντας τα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών, όπως η PAI-1 και ο TGF α ,b.

Ένα παθογνωμονικό γνώρισμα του τύπου II ΣΔ είναι η αυξημένη σύνθεση και αποθήκευση λιπιδίων. Η αύξηση της οδού σύνθεσης εξοζαμινών οδηγεί σε ενεργοποίηση της σύνθεσης γλυκογόνου, καθώς και σε αύξηση των ενζύμων σύνθεσης λιπαρών οξέων, της ακετυλ-CoA-καρβοξυλάσης και της γλυκερολ-3-P δευδρογονάσης. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές οι επιδράσεις είναι το άμεσο αποτέλεσμα της μεταβολής των βιοχημικών οδών από την O-GlcNAc ή αν πρόκειται για επιπτώσεις της μειωμένης σήμανσης από τις κινάσες AKT/PI3. Αρκετοί ερευνητές έδειξαν ότι η επαγωγή αντίστασης στην ινσουλίνη μέσω της σίτισης με ελεύθερα λιπαρά οξέα μεταβάλλει τα τελικά προϊόντα των HBP, UDP-GlcNAc. Εν μέρει, οι επιδράσεις αυτές φαίνεται πως μεσολαβούνται από την αναστολή της οξειδωσης της γλυκόζης, αλλά και από την αύξηση στην έκφραση της GFAT. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αυξάνουν τις επιπτώσεις της υψηλής γλυκόζης στα επίπεδα UDP-GlcNAc στο κύτταρο, οδηγώντας σε αύξηση της O-GlcNAc. Αντίθετα, οι Choi et al έδειξαν ότι στους επίμυες τα λιπαρά οξέα λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, δεν επηρεάζουν τη συγκέντρωση UDP-GlcNAc.

Άλλος ένας μηχανισμός πρόκλησης υπεργλυκαιμίας είναι η αναστολή της GS. Η ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού PI3K/AKT οδηγεί σε αναστολή της GSK-3 που προκαλεί διέγερση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1, και αποφωσφορυλίωση της GS. Η φωσφορυλίωση της GS αναστέλλει τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκογόνο. Οι Parker et al έδειξαν ότι η GS τροποποιείται από την O-GlcNAc και ότι αυτή ήταν αυξημένη επί υπεργλυκαιμικών μοντέλων. Επιπλέον, η τροποποίηση της O-GlcNAc οδηγούσε σε μείωση της GS, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της γλυκοζο-6-φωσφάτης.

Η καρδιομυοπάθεια είναι μία μείζων επιπλοκή που σχετίζεται με το διαβήτη, με την κακή καρδιακή διάταση, και με ανωμαλίες των επιπέδων ασβεστίου. Η σύσπαση

ελέγχεται, κυρίως, από την πρόσληψη και την απελευθέρωση ασβεστίου από και προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η κακή καρδιακή λειτουργία σχετίζεται με μεταβολές στις εξωκυττάρειες συγκεντρώσεις γλυκόζης και γλυκοζαμίνης. Δύο αναφορές έχουν δείξει ότι η μείωση της καρδιακής διαταραχής που οφείλεται σε υπεργλυκαιμία μπορεί να διορθωθεί με τη ρύθμιση των επιπέδων O-L. Οι Clark et al έδειξαν ότι η υπεργλυκαιμία σχετιζόταν με παρατεταμένα δυναμικά ασβεστίου και μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών και mRNA. Η υπερέκφραση της OGT μιμείτο τα αποτελέσματα της υπεργλυκαιμίας ενώ η υπερέκφραση της O-GlcNAc-άσης διόρθωνε τα αποτελέσματα της υπεργλυκαιμίας. Κατά συνέπεια, φάνηκε ότι σε μοντέλα καρδιάς διαβητικών τα επίπεδα O-GlcNAc ήταν αυξημένα, και πως στα μοντέλα ιστικών καλλιιεργειών η υπερέκφραση της O-GlcNAc-άσης μπορούσε να βελτιώσει τη συστολική λειτουργία.

3.2 O-GlcNAc, ΕΝΑΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Πολλές πρωτεΐνες τροποποιούνται από την Takenouchi-ryu κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο, συμπεριλαμβανόμενων των c-myc, των κερατινών, YY1 και Sec23 και μεταβάλλουν τα εξωκυττάρια επίπεδα γλυκοζαμίνης, ενώ φαίνεται ότι μεταβάλλουν το ρυθμό αύξησης ορισμένων κυττάρων.

Διερευνώντας το ρόλο της O-GlcNAc στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και κατά συνέπεια της κυτταρικής αύξησης, οι Slawson et al εξέτασαν τα συνολικά επίπεδα O-GlcNAc στα κύτταρα κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Βρέθηκε ότι η O-GlcNAc ρυθμιζόταν συνολικά κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο, με μέγιστο στις φάσεις G1/S και G2/M. Τα επίπεδα O-GlcNAc ήταν χαμηλότερα κατά τη φάση M, και οι πιο μεγάλες μεταβολές παρατηρήθηκαν σε κύτταρα με αναστολή του κύκλου μέσω νοκοδαζόλης. Η μείωση και αύξηση των επιπέδων O-GlcNAc σε κύτταρα HeLa και 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα προκάλεσε καθυστέρηση στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η υπερέκφραση OGT οδήγησε σε ελλείμματα στην κυτταρική κίνηση και πολυπύρρηνα κύτταρα. Η OGT φάνηκε να βρίσκεται στην μιτωτική άτρακτο κατά την κυτταρική διαίρεση. Η αύξηση και η μείωση της O-GlcNAc οδήγησε σε μεταβολές στην μιτωτική φωσφορυλίωση, καθώς και στην έκφραση κυκλινών, κάτι που υποδηλώνει πως

υπάρχουν αρκετά σημεία στα οποία η O-GLcNAc ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι απαιτείται ανακύκλωση της O-GLcNAc για τις διάφορες πλευρές τις πρωτεϊνικής ρύθμισης κατά τον κυτταρικό κύκλο.

3.3 Η O-GLcNAc ΚΑΙ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ως απάντηση σε πολλές μορφές κυτταρικού στρες, τα κύτταρα αυξάνουν την πρόσληψη γλυκόζης. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την αύξηση στη μεταφορά της γλυκόζης με αυξημένη αντοχή στο στρες. Η προστασία του κυττάρου έχει αποδοθεί στη διατήρηση των επιπέδων ATP, του δυναμικού των μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς και στην σταθεροποίηση της αναγωγικής κατάστασης. Η υπογλυκαιμία μπορεί να επάγει τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα, σταθεροποιώντας το p53, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από το p53 απόπτωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο αποκλεισμός της γλυκόλυσης δεν είχε καμία επίδραση στη μεσολαβούμενη από τη γλυκόζη προστασία του κυττάρου, ενώ ο αποκλεισμός της HBP καταστρέφει τη μεσολαβούμενη από τη γλυκόζη κυτταρική προστασία.

Σε προ-διαβητικά μοντέλα υπεργλυκαιμίας, ο χειρισμός ασβεστίου από τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα μεταβάλλεται κατά τρόπο εξαρτώμενο από το HBP, κάτι που προστατεύει από τις βλάβες επαναιμάτωσης. Ως απάντηση στους αγωνιστές IP₃, συμπεριλαμβανομένης της φαινυλεφρίνης, της θαψιγαργίνης και της αγγειοτασίνης, παρατηρείται μειωμένη είσοδος ασβεστίου όταν είναι αυξημένα τα εξωκυττάρια επίπεδα γλυκόζης και γλυκοζαμίνης. Αυτό μπορεί να ανασταλεί με αναστολείς της HBP. Σε πιο άμεσες μελέτες έχει φανεί ότι η PUGNAc μπορεί επίσης να μειώσει την είσοδο ασβεστίου στα κύτταρα, κάτι που υποδηλώνει πως η O-GLcNAc δεν είναι ρυθμιστής της γλυκόζης σε αυτό το σύστημα.

Πρόσφατα έχει δειχτεί ότι σε πολλές μορφές κυτταρικού στρες αυξάνουν ταχύως και δυναμικά τα επίπεδα O-GLcNAc σε πολλές κυτταρικές σειρές των θηλαστικών. Ιδιαίτερα, η αύξηση των επιπέδων O-GLcNAc είτε μέσω της αναστολής της O-GLcNAc-άσης, είτε μέσω υπερέκφρασης της OGT στα κύτταρα τα έκανε πιο ανθεκτικά στη θερμότητα. Αντίθετα, η μείωση της O-GLcNAc μεταβάλλοντας τα επίπεδα OGT ή αποκλείοντας την HBP

προκαλούσε ευαισθητοποίηση των κυττάρων στο στρες. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι σε μοντέλα ολόκληρης καρδιάς, η θεραπεία με γλυκοζαμίνη προκαλούσε αύξηση των επιπέδων O-GlcNAc και πως η αύξηση αυτή εντατικοποιούσε τις επαγόμενες από το ασβέστιο βλάβες επαναιμάτωσης. Η θεραπεία με έναν μη ειδικό αναστολέα της OGT, την αλλοζάνη, εξαφάνιζε την επίδραση της γλυκοζαμίνης στην είσοδο του ασβεστίου.

Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι τα αυξημένα επίπεδα O-GlcNAc στους ιστούς είναι προστατευτικά, σε συμφωνία με άλλες παρατηρήσεις. Σε ολόκληρες καρδιές επίμυων που υποβλήθηκαν σε βλάβες από επαναιμάτωση τα επίπεδα O-GlcNAc ήταν αυξημένα, και πάλι σε συμφωνία με δεδομένα από άλλες κυτταρικές σειρές. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι η O-GlcNAc είναι ένας σημαντικός μετα-μεταφραστικός ρυθμιστής, που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα και από ολόκληρο τον οργανισμό ως μία ταχεία απάντηση στο στρες.

Οι μεταβολές στο O-GlcNAc μπορούν να είναι αποτέλεσμα της μεταβολής στην πρόσληψη γλυκόζης, ωστόσο πολλές παρατηρήσεις δεικνύουν ότι αυτή η σχέση ρυθμίζεται πιο δυναμικά. Αυτές περιλαμβάνουν:

(1) τα επίπεδα της OGT είναι αυξημένα σε απάντηση σε ορισμένες μορφές στρες, όπως η ακτινοβολία UV, η αιθανόλη, το χλωριούχο νάτριο και το νατριούχο αρσενικό

(2) ως απάντηση στο θερμικό στρες, υπάρχει μία ταχεία αύξηση της OGT στο τριπλάσιο

(3) το αυξημένο φορτίο ελευθέρων ριζών αυξάνει την δραστηριότητα της GFAT και

(4) η αυξημένη παραγωγή γλυκοζο-1-φωσφάτης και φρουκτοζο-6-φωσφάτης, διά της ενεργοποίησης της ανεξάρτητης από το AMP φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Στον ασπέργιλλο και στον *Saccharomyces cerevisiae*, το στρες του κυτταρικού τοιχώματος προκαλεί σύνθεση και εναπόθεση χιτίνης. Στον ασπέργιλλο αυτό είναι αποτέλεσμα της αύξησης της GFAT, το οποίο υποδηλώνει ότι οι επαγόμενες από το στρες κυτταρικές αλλαγές στα επίπεδα UDP-GlcNAc είναι μία βασική απόκριση των οργανισμών που έχει εξελιχθεί από την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος στη ρύθμιση των επιπέδων O-GlcNAc των πρωτεϊνών.

Τα κύτταρα επάγουν την τροποποίηση της O-GlcNAc ως απάντηση σε πολλές μορφές κυτταρικού στρες, και αυτό φαίνεται πως έχει προστατευτική δράση στα κύτταρα.

Υπάρχουν αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί μεσολαβούμενης από την O-GLcNAc ανοχής στο στρες:

(1) Οι Sohn et al προτείνουν ότι η τροποποίηση της O-GLcNAc προλαμβάνει το να γίνουν αδιάλυτες οι πρωτεΐνες ως απάντηση στο θερμικό στρες

(2) η αύξηση και η μείωση των επιπέδων O-GLcNAc φάνηκε πως μεταβάλλει τα επίπεδα HsP40 & HsP70

(3) η υπερέκφραση πρωτεϊνών θερμικού στρες καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στο στρες (πρόσφατα η HsP70 αναγνωρίστηκε ως μία λεκτίνη του O-GLcNAc). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην ενδιαφέρουσα ιδέα ότι η O-GLcNAc μπορεί να μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών με το HsP70 και

(4) η O-GLcNAc έχει φανεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του ασβεστίου, εδώ η O-GLcNAc μειώνει την είσοδο του ασβεστίου, και κατά συνέπεια ελαττώνει τη πιθανότητα δηλητηρίασης από ασβέστιο εντός του κυττάρου.

3.4 ΤΕΛΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Έχουν περάσει τουλάχιστον 22 χρόνια από την ταυτοποίηση της O-GLcNAc και γνωρίζουμε τώρα ότι πρόκειται για μία ρυθμιστική τροποποίηση, πιο ανάλογη στην φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών από την πρωτότυπη γλυκοζυλίωση. Αυτή η απλή μετα-μεταφραστική τροποποίηση νευρώνει πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και είναι βασική για τη ζωή. Η ευαισθησία των επιπέδων O-GLcNAc στις εξωκυττάρια συγκεντρώσεις γλυκόζης συντηρεί ένα μοντέλο, στο οποίο η O-GLcNAc παίζει ένα ρόλο θρεπτικού ανιχνευτή, που ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση σε σχέση με τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία, μεταβάλλοντας τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, τα πρωτεώματα και τη λειτουργία και τη θέση των πρωτεϊνών. Ενισχυτικές αυτής της θέσης είναι οι μελέτες που δείχνουν πως η μεταβολή των επιπέδων UDP-GLcNAc και η αύξηση των επιπέδων O-GLcNAc διαταράσσουν τον κυτταρικό κύκλο.

Πρόσφατα, δεδομένα από πολλές ομάδες έχουν δείξει ότι η O-GLcNAc εμπλέκεται στην κυτταρική απάντηση στο στρες. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ένα πιο πολύπλοκο

μοντέλο λειτουργίας του O-GlcNAc στα κύτταρα, όπου η O-GlcNAc είναι ένας αισθητήρας της κατάστασης του κυττάρου. Εδώ, τα επίπεδα O-GlcNAc αναπαριστούν έναν αναγνώστη, όχι μόνο της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, αλλά και του επιπέδου στρες. Έτσι, μεταβάλλοντας συνολικά τα επίπεδα O-GlcNAc, τα κύτταρα μπορούν να συντονίσουν την απάντηση τους ως προς τα διάφορα εξωκυττάρια σήματα, και να τροποποιήσουν την κυτταρική συμπεριφορά κατά καθολικό τρόπο.

**ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ
ΚΑΙ
ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΗ
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ
ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η**

Κ
Ε
Φ
Α
Λ
Α
Ι
Ο
4⁰

Ο επίτοπος Η αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα Η. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Η είναι της τάξεως IgM και δημιουργήθηκε σε ποντικό μετά από ένεση ολόκληρων σωμάτων ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων προβάτου. Ο Επίτοπος Η περιλαμβάνει το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά και άλλα στοιχεία, τα οποία μπορεί να είναι ή το παρακείμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλύσου ή ο τρόπος που τοποθετείται το σάκχαρο στο μόριο της πολυπεπτιδικής αλύσου ή ο συνδυασμός και των δύο παραπάνω καταστάσεων. Έτσι, το μονοκλωνικό αντίσωμα Η δεν αναγνωρίζει όλα τα πολυπεπτίδια που φέρουν το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό αυτών των πολυπεπτιδίων, που φέρουν το σάκχαρο με τις προϋποθέσεις που απαιτούνται για να δημιουργηθεί ο επίτοπος Η. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω κατάστασης, είναι σύμφωνα με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, ότι το αντίσωμα Η αναγνωρίζει την κερατίνη 8, που το μοναδικό σάκχαρό της είναι η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, αλλά δεν αναγνωρίζει την κερατίνη 18, που και αυτή έχει ως μοναδικό σάκχαρό της την N-ακετυλογλυκοζαμίνη.

Ο επίτοπος Η απαντάται σε περισσότερα του ενός είδη κυττάρων και σε περισσότερα από ένα πολυπεπτίδια. Η έρευνα έχει δείξει μέχρι τώρα ότι ο επίτοπος Η απαντάται σε μικρό αριθμό ινωδών αστροκυττάρων της λευκής ουσίας του εγκεφάλου του ανθρώπου και του επίμου, καθώς και σε αστροκύτταρα της επιφάνειας των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (έξω αφοριστικός νευρογλοιακός υμένας).

Ο επίτοπος Η αυξάνεται σημαντικά στα αντιδραστικά αστροκύτταρα, ανεξαρτήτως της αιτίας που προκαλεί την αντίδρασή τους. Σε ομοιογενοποιημένα καλλιέργειών αστροκυττάρων που ελήφθησαν από το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων του επίμου και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο western-blot, immunoblot, βρέθηκε ότι ο επίτοπος Η εντοπίζεται σε δύο πολυπεπτίδια με μοριακές μάζες 209 KDa και 62 KDa (Arvanitis DL. et al 2001).

Έρευνα που έγινε με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο), έδειξε ότι ο επίτοπος Η εντοπίζεται στα ακόλουθα κυτταρικά οργανίδια των κυττάρων των ινοαδενωμάτων και των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού: σε κυτταροπλασματικά ινίδια, στα μιτοχόνδρια, στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο, στα δεσμοσώματα, στην ετεροχρωματίνη, στις μεσο ετεροχρωματινικές περιοχές, στους πόρους και στο πυρήνιο

του πυρήνα, σε κυτταροπλασματικά κυστίδια, στον αυλό των ενδοκυτταρικών πόρων, και σε μόρια της εξοκυττάριας ουσίας (Havaki S et al 2003).

Άλλη έρευνα έχει δείξει ότι ο επίτοπος Η εκφράζεται περισσότερο στο κυτταρόπλασμα των καλά διαφοροποιημένων ινωδών αστροκυττωμάτων, σε σύγκριση με τα αναπλαστικά αστροκυτώματα και τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα (Arvanitis DL et al 2005b).

Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι τα φυσιολογικά κύτταρα που έχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, όπως τα οξύφιλα κύτταρα των παραθυροειδών αδένων, τα κύτταρα των γραμμωτών πόρων της παρωτίδος, τα κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων του νεφρού, τα τοιχωματικά κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου, όπως και τα μεταπλαστικά και νεοπλασματικά ογκοκύτταρα που το κυτταρόπλασμα τους είναι πλημμυρισμένο με μιτοχόνδρια, όπως τα οξύφιλα κύτταρα του θυροειδούς στην περίπτωση της θυροειδίτιδας Hashimoto και τα νεοπλασματικά ογκοκύτταρα των όγκων του Warthin της παρωτίδος, των καλοηθών και κακοηθών όγκων Hurthle του θυροειδούς και των ογκοκυττωμάτων του νεφρού, παρουσιάζουν πολύ έντονη έκφραση του επιτόπου Η στο κυτταρόπλασμά τους (Arvanitis DL et al 2005a).

Ακόμη, μέσα από μελέτες διαφαίνεται ότι ο επίτοπος Η παράγεται έντονα στο κυτταρόπλασμα των στρωματικών κυττάρων του φθαρτού και αυξημένα στο κυτταρόπλασμα των προφθαρτικών κυττάρων του στρώματος του ενδομητρίου κατά την τελευταία φάση του εκκριτικού κύκλου, ενώ στο παραγωγικό ενδομήτριο, στο εκκριτικό ενδομήτριο της αρχικής και μέσης φάσης και στο στρώμα της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου, τα στρωματικά κύτταρα είτε δεν παράγουν καθόλου επίτοπο Η, είτε η παραγωγή του παρουσιάζει χαμηλή έκφραση (histol., histopathol, 2006,21:1193-1198).

Άλλη έρευνα έχει δείξει ότι ο επίτοπος Η εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου και των λειομυωμάτων και λειομυοσαρκωμάτων της μήτρας σε διαφορετικές, όμως, αναλογίες. Επιπροσθέτως, ο επίτοπος Η εντοπίζεται σε τέσσερα πολυπεπτίδια, που είναι ταυτόσημα στα ομοιογενοποιημένα του μυομητρίου και των λειομυωμάτων της μήτρας και έχουν μοριακές μάζες 100KDa, 61 KDa, 59 KDa και 54 KDa (Sgantzos MN et al 2007).

Μια άλλη μελέτη, με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού και της παλίνδρομης αφαίρεσης του οξεικού ουρανίου στο επίπεδο του ηλεκτρονικού

μικροσκοπίου, έδειξε ότι ο επίτοπος Η εντοπίζεται περισσότερο στις περιοχές της πυκνής ετεροχρωματίνης και λιγότερο στις αθροίσεις των μεσοχρωματινικών κοκκίων και των περιχρωματινικών ινών, των πυρήνων των κυττάρων των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων και των ινοαδενωμάτων του μαστού (Havaki S et al 2006).

Άλλη έρευνα έχει δείξει ότι ο επίτοπος Η στην σειρά MCF-7 του αδενοκαρκινώματος του μαστού απαντάται σε πέντε πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη 232 KD, 67KD, 51KD, 50KD και 37KD και την κερατίνη 8. Από τα πέντε πολυπεπτίδια, τα πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη 232KD, 67KD και 37KD ανήκουν σε κλάσμα που διαλύεται στον Triton X-100, ενώ αυτά με μοριακά βάρη 51KD και 50 KD δε διαλύονται στον Triton X-100. (Arvanitis DL et al 1995).

Τέλος, έχει αποδειχτεί ότι ο Επίτοπος Η αυξάνεται στα επενδυματικά κύτταρα των εγκεφάλων του ανθρώπου, σε περιπτώσεις υποξεικής εγκεφαλοπάθειας (Arvanitis L.D et al 2010.)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ 1-4

(Warren AP et al. 1986) (Vossellerk et al. 2002) (Zachara NE et al. 2004) (Patti ME et al.1999) (Buse MG et al.2002) (Bosch RR et al. 2003) (Arias E.B et al 2004) (Park SY et al.2005) (Zachara NE et al.2004) (Holt GD et al 1986) (Hanover JA et al.1987) (Holt GD et al 1987) (Love CD et al 2003) (Zachara NE et al.2004) (Wells L et al.2002) (Haltiwagner Rs et al.1992) (Haltiwagner RS et al. 1991) (Wells L et al. 2002) (GAOY et al. 2001) (Haltiwagner Rs et al. 1998) (chou CF et al.1992) (chou CF et al.1993) (Kamemurak et al.2002) (Slawson C et al. 2005) (Wells L et al. 2004) (DU XL et al.2001) (Comer FI et al. 2001) (Ray MK et al 1992) (Cheng Xet al.2000) (Cheng X et al.2001) (Han I et al.1997) (Zhang F et al. 2003) (Snow CM et al. 1987) (Park MK et al 1987) (Guinezc et al. 2005) (Matthews JA et al.2005) (Yang X et al. 2001). (Guinez C et al.2004) (Lefebvre T et al. 2001) (Jackson Sp et al 1988) (Mcclain DA et al. 2002) (Pasternak CA et al.1991) (Sviderskaya EV et al. 1996) (DU XL et al. 2000) (Noyman I et al.2002) (Hsieh TJ et al. 2003) (Kelly W.G et al.1993) (Chou TY et al.1995).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κ
Ε
Φ
Λ
Λ
Α
Ι
Ο
5⁰

5.1 ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της παρούσης διατριβής αποτελείται από 60 περιπτώσεις ξεσμάτων ενδομητρίου από παλίνδρομες κυήσεις. Το εξετασθέν υλικό επιλέχθηκε κατά τέτοιον τρόπο, ούτως ώστε στο υλικό κάθε περίπτωσης να περιέχονται χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Το υλικό λήφθηκε από την Παθολογοανατομική Μονάδα του Εργαστηρίου Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία παρέχει διαγνωστικές υπηρεσίες στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, στο Νοσοκομείο Φλώρινας, στο Νοσοκομείο της Καστοριάς, στο Νοσοκομείο Λαμίας, καθώς και σε ασφαλισμένους ασθενείς διαφόρων ταμείων.

5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Τα δείγματα των ιστών μονιμοποιήθηκαν σε 10% ουδέτερη φορμόλη και σκληνώθηκαν σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους παραφίνης κόπηκαν τομές πάχους 4 μ, αποπαραφινώθηκαν και ενυδατώθηκαν. Για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του επιτόπου Η, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϋπεροξειδάσης. Μετά την ενυδάτωση, οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 3 % H_2O_2 σε TBS pH 7,6 για την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια, οι τομές πλύθηκαν με TBS 3X10 λεπτά. Ακολούθως, οι τομές επώασθηκαν σε διάλυμα δέκα τοις εκατό φυσιολογικού ορού κουνελιού σε TBS για 30 λεπτά για να εξουδετερωθεί η μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, οι τομές επώασθηκαν σε αδιάλυτο υγρό κυτταροκαλλιέργειας, που περιείχε το μονοκλωνικό αντίσωμα Η, για δύο ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια και αφού πλύθηκαν για 3X10 λεπτά σε TBS, οι τομές απώασθηκαν σε διάλυμα αντισώματος κουνελιού εναντίον ποντικού σε αναλογία 1.: 50 σε TBS για μια ώρα, ενώ μετά από αυτό οι τομές πλύθηκαν για 3X10 λεπτά σε TBS και επώασθηκαν σε διάλυμα DAB H_2O_2 σε TBS για 8 λεπτά. Τέλος, οι τομές πλύθηκαν, βάφτηκαν με αιματοξυλίνη, αφυδατώθηκαν

και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Στους αρνητικούς μάρτυρες δεν τοποθετήθηκαν πρωτογενή αντισώματα.

5.3 ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΙΣ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ

Αρνητική έκφραση (–): Όταν όλα τα κυτταρικά στοιχεία παραμένουν αρνητικά ή άβαφα για τον επίτοπο Η.

Πολύ χαμηλή έκφραση (+/–): Όταν λιγότερα από το 5% των κυττάρων βάφονται για τον επίτοπο Η, άσχετα από την ατομική ένταση χρώσης κάθε κυττάρου που μπορεί να είναι ελαφρά, μέτρια και έντονη.

Χαμηλή έκφραση (+): Όταν βάφεται το 5 – 30% των κυττάρων και παρατηρούνται κύτταρα με ελαφρά, μέτρια και έντονη ατομική ένταση χρώσης ή όταν βάφονται από 30% και πάνω έως και το 100% των κυττάρων, αλλά όλα τα κύτταρα που βάφονται παρουσιάζουν ελαφρά ένταση ατομικής χρώσης.

Μέτρια έκφραση (+ +): Όταν βάφεται το 31 – 75% των κυττάρων και παρατηρούνται κύτταρα με μέτρια και έντονη ατομική ένταση χρώσης.

Υψηλή έκφραση (+ + +): Όταν βάφεται πάνω από το 75% των κυττάρων και παρατηρούνται κύτταρα με μέτρια και έντονη ατομική ένταση χρώσης.

5.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ (Western - blot)

Οι αμονιμοποίητοι ιστοί μεταφέρθηκαν στο τροποποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris –HCl pH 8,0, 1% SDS, 1% δεοξυχολικό Νάτριο, 1% NP -40, 1% Triton) που περιείχε 10 μM PMSF και 1: 100 κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (SERVA), τοποθετήθηκαν σε πάγο και ομοιογενοποιήθηκαν με υπερήχους. Μετά την επίδραση των υπερήχων, οι λυθέντες ιστοί φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 για 20 λεπτά στους 4° C, και τα υπερναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια. Οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο Μίκρο BCA πρωτεΐνης (Pierce). Ίσες ποσότητες

πρωτεΐνης (75μg) τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια και διαχωρίστηκαν σε 15% SDS-PAGE, μετά την προσθήκη 4X ρυθμιστικού διαλύματος Laemli (200 mM Tris HCL PH 6.8, 8% SDS, 40% γλυκερόλης, 20% 2-μερκαπτοαιθανόλης, 0,8 % γαλάζιας βρωμοφαινόλης). Σε κάθε γέλη (ζελατίνα) 10 με προβαμμένου δείκτη μοριακών βαρών (seeblue, invitrogen) προστέθηκε. Οι πρωτεΐνες των ζελατινών μεταφέρθηκαν με ηλεκτρικό ρεύμα σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (μεγέθους πόρων 0,45 μm, Amersham), χρησιμοποιώντας μια ημίξηρη συσκευή ηλεκτροανοσοαποτυπώματος (blotting) της εταιρείας (Bio-Rad) στα 15 Volt για 45 λεπτά. Για το βάψιμο των πρωτεϊνών και για να εκτιμηθεί ότι ίσα ποσά πρωτεϊνών φορτώθηκαν σε κάθε στήλη (lane) και ότι μεταφέρθηκαν αποτελεσματικά, η μεμβράνη βαπτίσθηκε σε 0,5 % Ponceaus (Sigma chemical co. St.Louis, M.D) σε 1% οξείκό οξύ. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκαν σε 5% αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος σε TBS που περιείχε 0,05% Tween-20 (TBST) και 0,01% azide, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφρά ανάδευση, για να αποκλειστεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Μετά οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης πλύθηκαν 2 φορές με φρέσκο TBST για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος του αποβουτυρωμένου γάλακτος και μετά επώασθηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα H σε αραιώση 1: 1000 σε Tris-ρυθμιστικό διάλυμα με ελαφρά ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

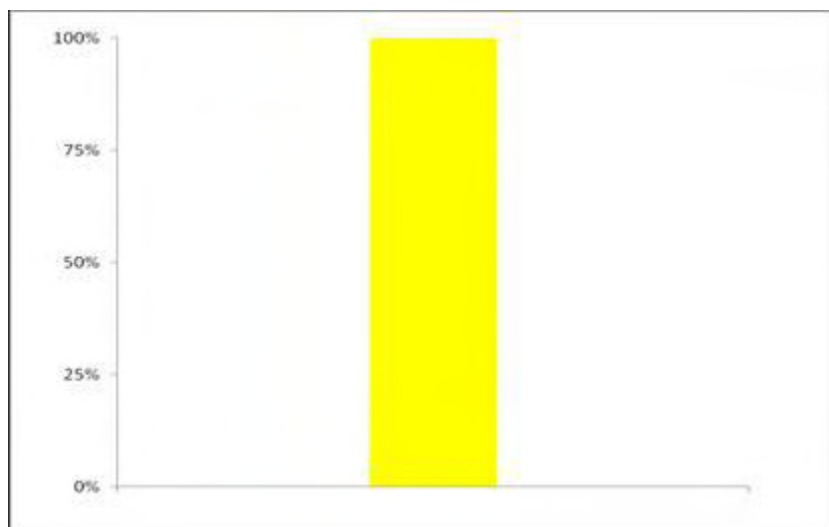
Μετά από αυτή την επώαση οι μεμβράνες πλύθηκαν 4X10' με TBST και μετά επώασθηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα κουνελιού, που ήταν συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και στρεφόταν εναντίον των ανοσοσφαιρινών του ορού ποντικίου (1:3000) (POIGI DAKO), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά πλύθηκαν με TBST (4X10') και η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης εμφανίστηκε με ECL και αντιδραστήριο (Amersham) και έκθεση των μεμβρανών σε X-ray film για την ανίχνευση της χημειοφωταύγειας των θετικών ζωνών των πρωτεϊνών.

Μετά την εμφάνιση της αντίδρασης, τα αντιδραστήρια αφαιρέθηκαν από τις μεμβράνες και οι μεμβράνες επώασθηκαν με αντίσωμα ποντικού εναντίον της κερατίνης 8 (1:100) (c53011Sigma), με ελαφρά ανάδευση στους 4° C όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα ακολουθήθηκε η παραπάνω περιγραφόμενη διαδικασία, μετά την επώαση του πρώτου αντισώματος για την ανοσολογική ανίχνευση της κερατίνης 8.

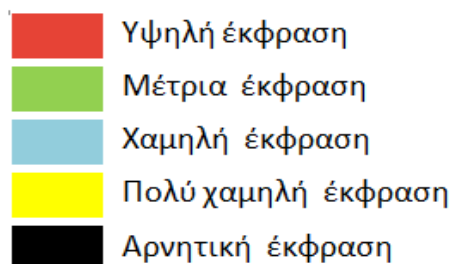
5.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ ΜΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

5.5.1 Συγκυτιοτροφοβλάστη

Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και στις 60 περιπτώσεις (100%) έδειξαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η. Ποιοτικώς, τα θετικά για τον Επίτοπο Η κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης έδειξαν σαν πρωιμότερο σημάδι θετικότητας την παρουσία χρώσης στην ελεύθερη ψηκτροειδή επιφάνεια (Φωτ. 1, Φωτ.2, Φωτ.3). Στα κύτταρα που έδειξαν βαθμιαία αυξημένη θετικότητα, παρατηρήθηκε διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση χαμηλής ατομικής έντασης (Φωτ.4, Φωτ.5) με σπάνια κύτταρα να δείχνουν μέτρια και ακόμα πιο σπάνια κύτταρα με έντονη κυτταροπλασματική χρώση. Οι πυρήνες των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο Η. Εξυπακούεται ότι, εφόσον η έκφραση του Επίτοπου Η είναι πολύ χαμηλή για την συγκυτιοτροφοβλάστη, η συντριπτική πλειοψηφία (>95%) των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης παρέμεινε αρνητική για τον επίτοπο Η (Φωτ. 8).

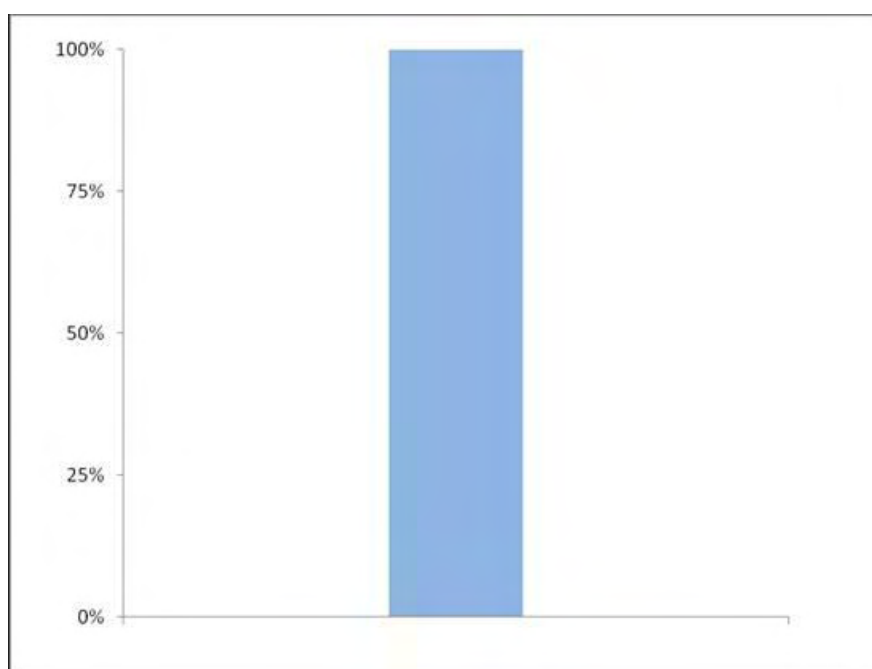


Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στην συγκυτιοτροφοβλάστη των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

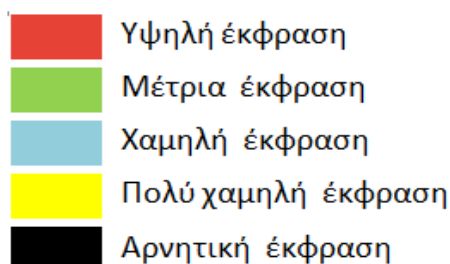


5.5.2 Κυτταροτροφοβλάστη

Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης και στις 60 περιπτώσεις (100%) έδειξαν χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η. Ποιοτικώς, τα θετικά για τον Επίτοπο Η κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης έδειξαν σαν πρωιμότερο σημάδι θετικότητας την παρουσία έντονης κυτταροπλασματικής χρώσης, της κυτταρικής μεμβράνης που έρχεται σε επαφή με τα υπερκείμενα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης. Στα κύτταρα με βαθμιαία αύξηση της έντασης της χρώσης παρατηρήθηκε διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση των ατομικών κυττάρων, κυρίως χαμηλής έντασης, με πολύ λιγότερα κύτταρα έντονης κυτταροπλασματικής χρώσης. Οι πυρήνες των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο Η. Εφόσον η έκφραση του Επίτοπου Η είναι χαμηλή, εξυπακούεται ότι ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης παρέμεινε αρνητικός για τον Επίτοπο Η. (Φωτ.: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20).

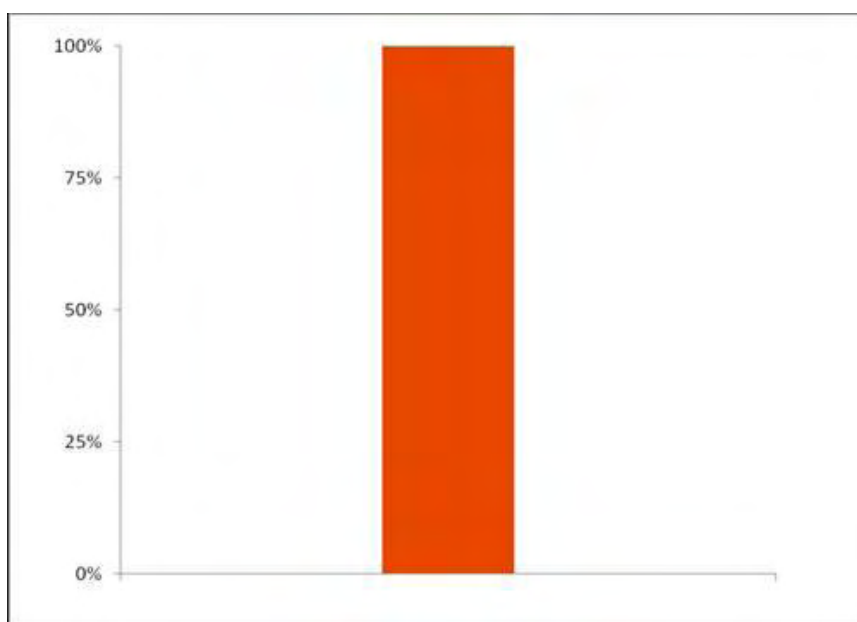


Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στην κυτταροτροφοβλάστη των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

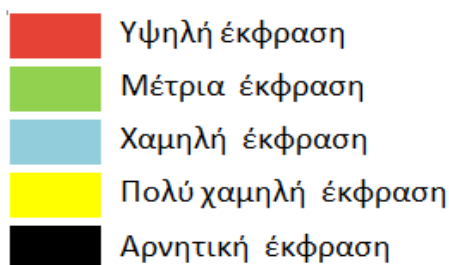


5.5.3 Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών και στις 60 περιπτώσεις (100%) που εξετάσθηκαν παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η. Ποιοτικώς, όλοι οι ινοβλάστες παρουσίασαν διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση για τον Επίτοπο Η, που ήταν κυρίως έντονη κυτταροπλασματική χρώση στα ατομικά κύτταρα και σε μικρότερο ποσοστό ήταν μέτρια κυτταροπλασματική χρώση. Οι πυρήνες όλων των ινοβλαστών παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο Η (Φωτ.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 18).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στους ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

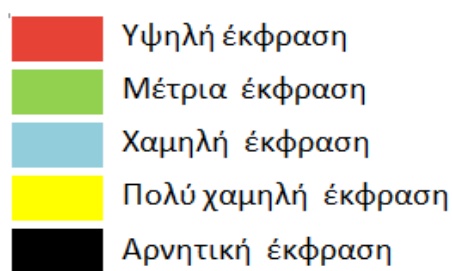


5.5.4 Ιστοκύτταρα

Τα ιστοκύτταρα των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο H και στις 60 περιπτώσεις (100%) που εξετάσθηκαν. Ποιοτικώς, τα ιστοκύτταρα που παρουσίασαν θετικότητα για τον επίτοπο H, έδειξαν κυτταροπλασματική χρώσης χαμηλής έντασης στα ατομικά κύτταρα που ήταν κατανεμημένη, κυρίως κατά εστίες μέσα στο κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες των ιστοκυττάρων παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο H. Εφόσον η έκφραση του Επίτοπου H ήταν πολύ χαμηλή στα ιστοκύτταρα, εξυπακούεται ότι ένας μεγάλος αριθμός (>95%) ιστοκυττάρων παρέμεινε αρνητικός για τον Επίτοπο H (Φωτ.15).



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου H στα ιστοκύτταρα των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

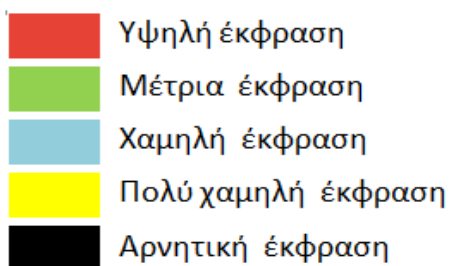


5.5.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η και στις 60 περιπτώσεις (100%) των περιπτώσεων που εξετάσθηκαν. Πρακτικά, όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσίασαν διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, που ήταν κυρίως έντονη στη μεγάλη πλειοψηφία των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ σε μικρότερο ποσοστό κυττάρων ήταν μέτριας έντασης. Οι πυρήνες των ενδοθηλιακών κυττάρων παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο Η. (Φωτ.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 17).

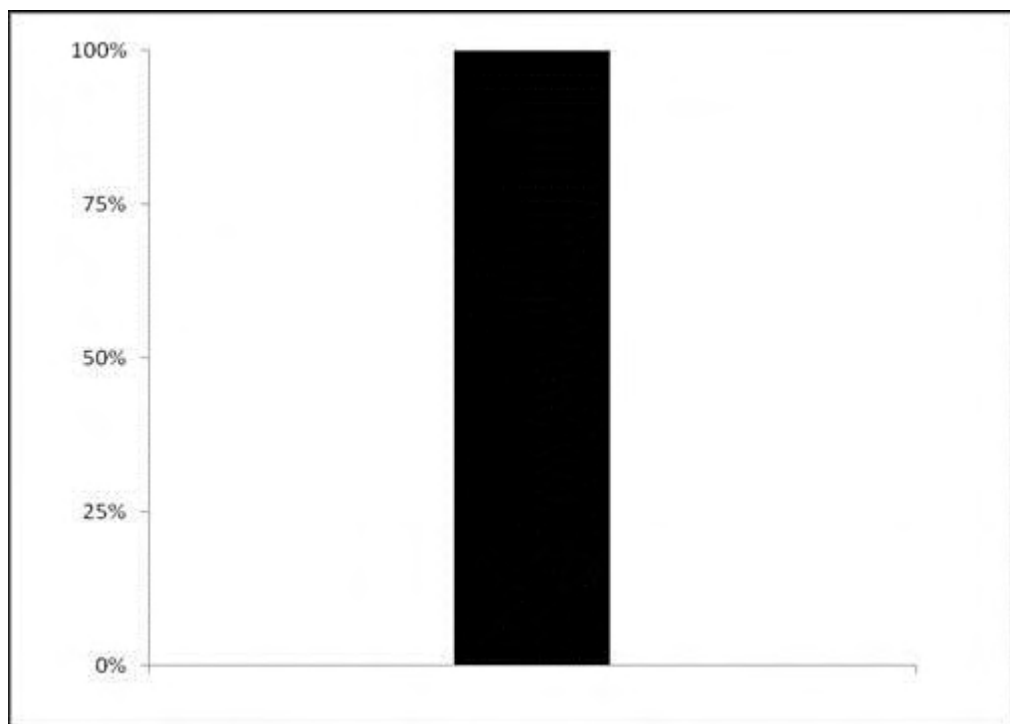


Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

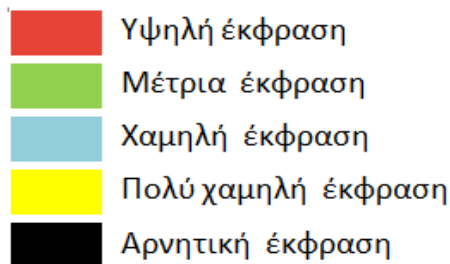


5.5.6 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του εμβρύου μέσα στα τριχοειδή των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν αρνητική έκφραση για τον Επίτοπο Η. Όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια, είτε ήταν εμπύρνηνα, είτε απύρνηνα, παρέμειναν αρνητικά για τον Επίτοπο Η, καθώς τόσο το κυτταρόπλασμα, όσο και ο πυρήνας των ερυθρών κυττάρων, παρέμειναν άβαφα για τον Επίτοπο Η. Η αρνητική έκφραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για τον Επίτοπο Η παρατηρήθηκε και στις 60 περιπτώσεις (100%) που εξετάσθηκαν (Φωτ.: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 17).

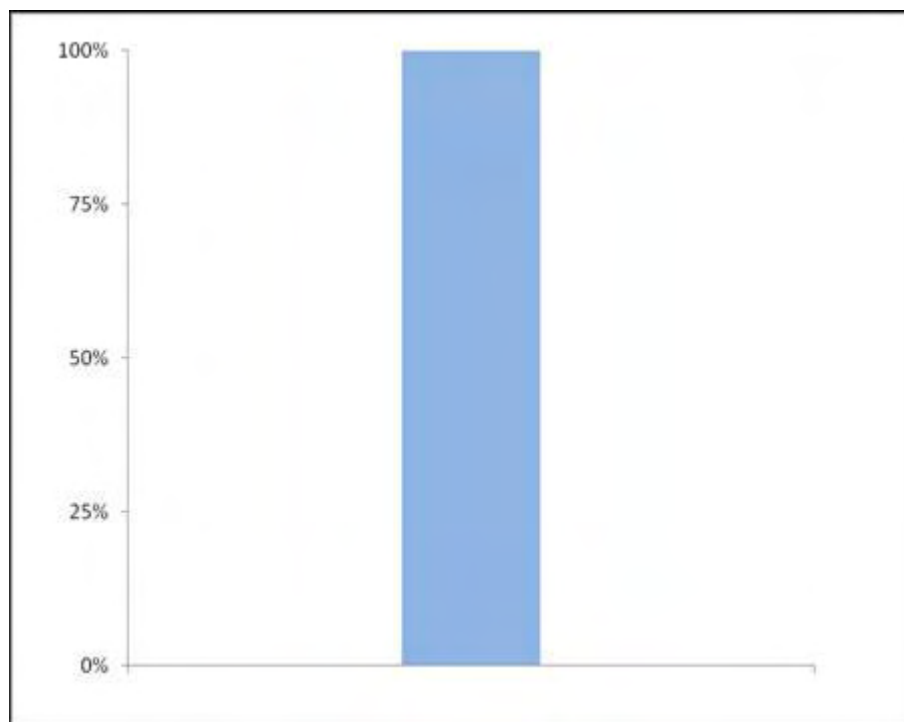


Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στα ερυθρά αιμοσφαίρια των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

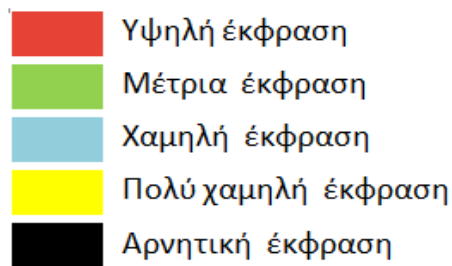


5.5.7 Μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες

Μεταξύ των χοριακών λαχνών, σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάσθηκαν, υπήρχαν μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες, που είχαν αποχωρισθεί από τις χοριακές λάχνες και ευρίσκοντο στα μεσοδιαστήματα των λαχνών. Αυτές οι μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες παρουσίασαν χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο H και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων που εξετάσθηκαν). Ποιοτικώς, το πρωιμότερο σημάδι θετικότητας των μεμονωμένων συγκυτιοτροφοβλαστών ήταν η θετική χρώση της ελεύθερης ψηκτροειδούς επιφάνειας των κυττάρων. Με τη βαθμιαία αύξηση της θετικότητας παρατηρήθηκε διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, κυρίως χαμηλής έντασης στη μεγάλη πλειοψηφία των θετικών κυττάρων, ενώ σε μικρό ποσοστό παρατηρήθηκε χρώση μέτριας και σε ακόμα μικρότερο ποσοστό έντονη ατομική κυτταροπλασματική χρώση. Χαρακτηριστικά, σε αρκετές θέσεις των δειγμάτων υπήρχαν μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες, οι οποίες παρουσίασαν ελαφρά, και σπανιότερα μέτρια, και ακόμα πιο σπάνια έντονη, κυτταροπλασματική χρώση, ενώ οι περιβάλλουσες γειτονικές χοριακές λάχνες παρουσίαζαν συγκυτιοτροφοβλάστες με αρνητική έκφραση για τον Επίτοπο H (Φωτ.: 8,19).



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου H στις μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες.

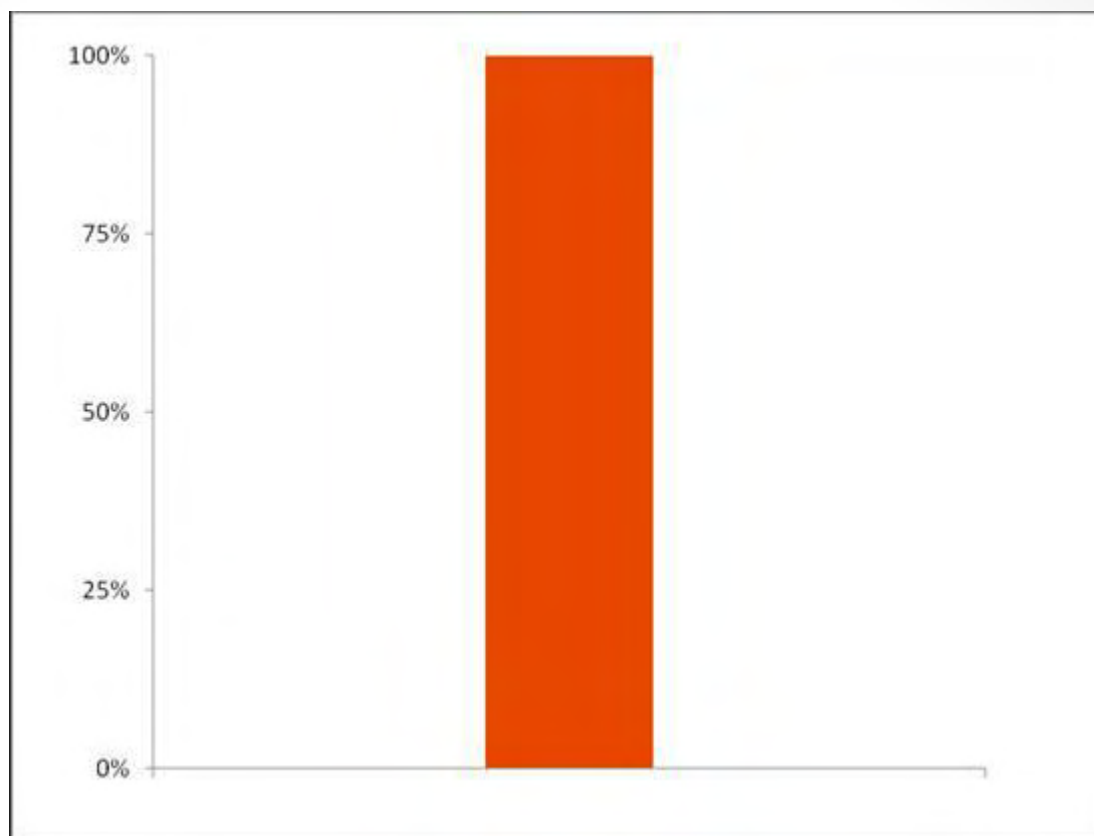


5.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ Η ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ ΜΕ ΜΥΞΟΕΙΔΗ ΥΔΡΩΠΙΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ

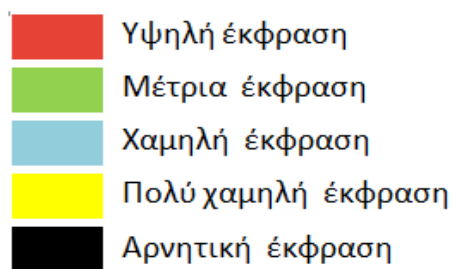
5.6.1 Συγκυτιοτροφοβλάστη

Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και στις 60 περιπτώσεις (100%) των περιπτώσεων που εξετάσθηκαν, έδειξαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η. Τα ατομικά κύτταρα έδειξαν έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση και σε μικρότερο ποσοστό μέτρια διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, ενώ παρατηρήθηκαν και πολύ λίγα κύτταρα με ελαφρά κυτταροπλασματική χρώση. Οι πυρήνες των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης παρέμειναν αρνητικοί.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση έδειξαν μεγάλη αύξηση της έκφρασης του Επίτοπου Η, σε σχέση με τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι στην πρώτη από τις παραπάνω, περιγραφόμενες κατηγορίες παρουσίασαν υψηλή έκφραση (λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) και στη δεύτερη κατηγορία (λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά) παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση για τον επίτοπο Η. (Φωτ.:20, 21, 22, 23, 24, 25).



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στην συγκυτιοτροφολάστη των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

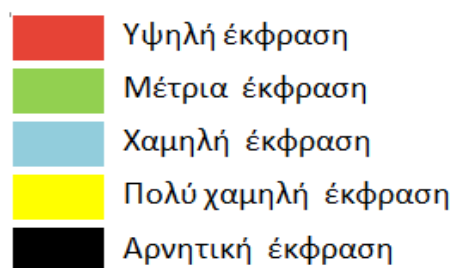


5.6.2 Κυτταροτροφοβλάστη

Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων), έδειξαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο H. Τα ατομικά κύτταρα έδειξαν, κυρίως, έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, ενώ μικρότερο ποσοστό κυττάρων έδειξε μέτρια διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση. Οι πυρήνες παρέμειναν αρνητικοί. Συμπερασματικά, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, έδειξαν μεγάλη αύξηση της έκφρασης του Επίτοπου H, σε σύγκριση με τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στις χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι στην πρώτη από τις δύο παραπάνω κατηγορίες, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης (χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) έδειξαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο H, ενώ τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στη δεύτερη κατηγορία (χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά) έδειξαν χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο H (Φωτ.: 20, 21, 22, 23, 24, 25).



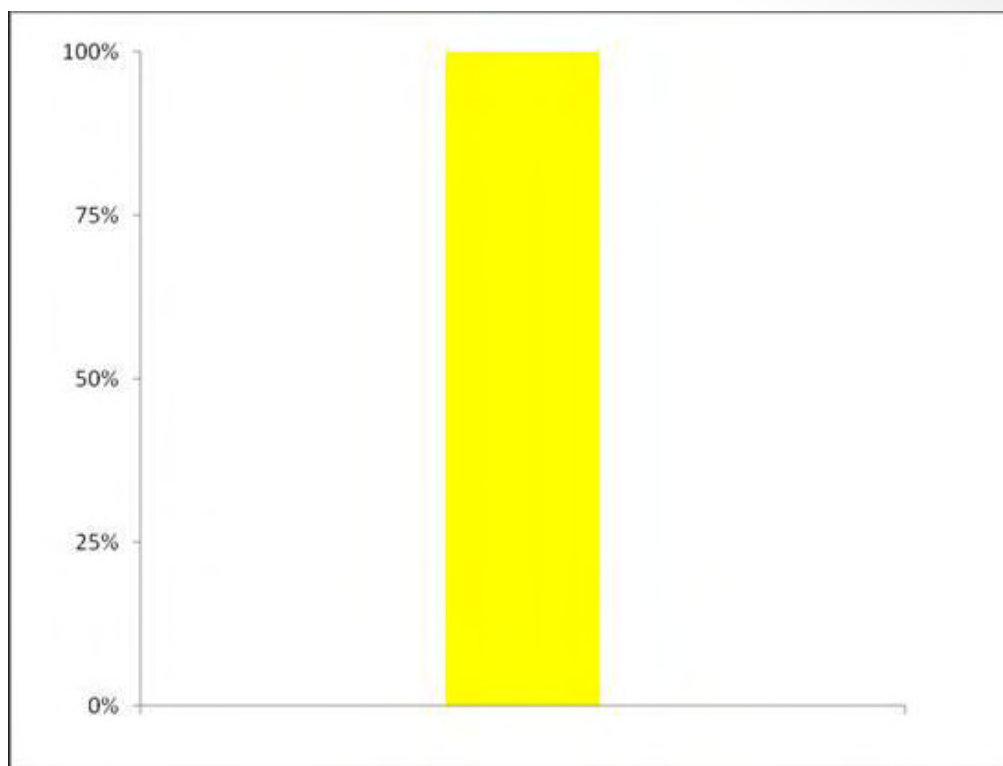
Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου H στην κυτταροτροφοβλάστη των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.



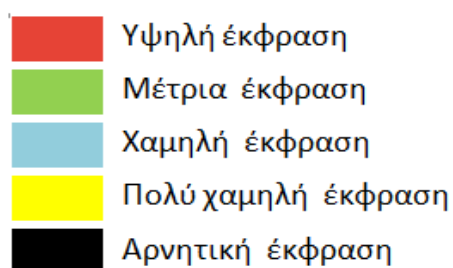
5.6.3 Ινοβλάστες

Οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων) έδειξαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου H. Η συντριπτική πλειοψηφία των ινοβλαστών παρέμεινε αρνητική για τον Επίτοπο H (Φωτ.: 20, 21, 23, 24, 25, 26), ενώ παρατηρήθηκε και πολύ μικρό ποσοστό ινοβλαστών (<5%) που παρουσίασε θετική κυτταροπλασματική χρώση. Οι πυρήνες παρέμειναν αρνητικοί.

Συμπερασματικά, οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρουσίασαν μεγάλη ελάττωση της έκφρασης του Επίτοπου H, σε σχέση με τους ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά (Φωτ.27) δεδομένου ότι οι ινοβλάστες της πρώτης κατηγορίας (λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου H, σε σύγκριση με τους ινοβλάστες της δεύτερης κατηγορίας (λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά) που παρουσίασαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο H. Η μεγάλη ελάττωση της έκφρασης του Επίτοπου H, στους ινοβλάστες των λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, απεικονίστηκε πολύ παραστατικά. Σε μερικές λάχνες οι οποίες παρουσίασαν εν μέρει μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και εν μέρει φυσιολογική εμφάνιση, οι ινοβλάστες που ευρίσκοντο μέσα στο μυξοειδές στρώμα του τμήματος με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρέμειναν αρνητικοί για τον Επίτοπο H, ενώ οι ινοβλάστες που ευρίσκοντο μέσα στο στρώμα του τμήματος της ίδιας χοριακής λάχνης χωρίς μυξοειδή εκφύλιση παρουσίασαν έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση για τον Επίτοπο H (Φωτ.:28, 29, 30, 31).

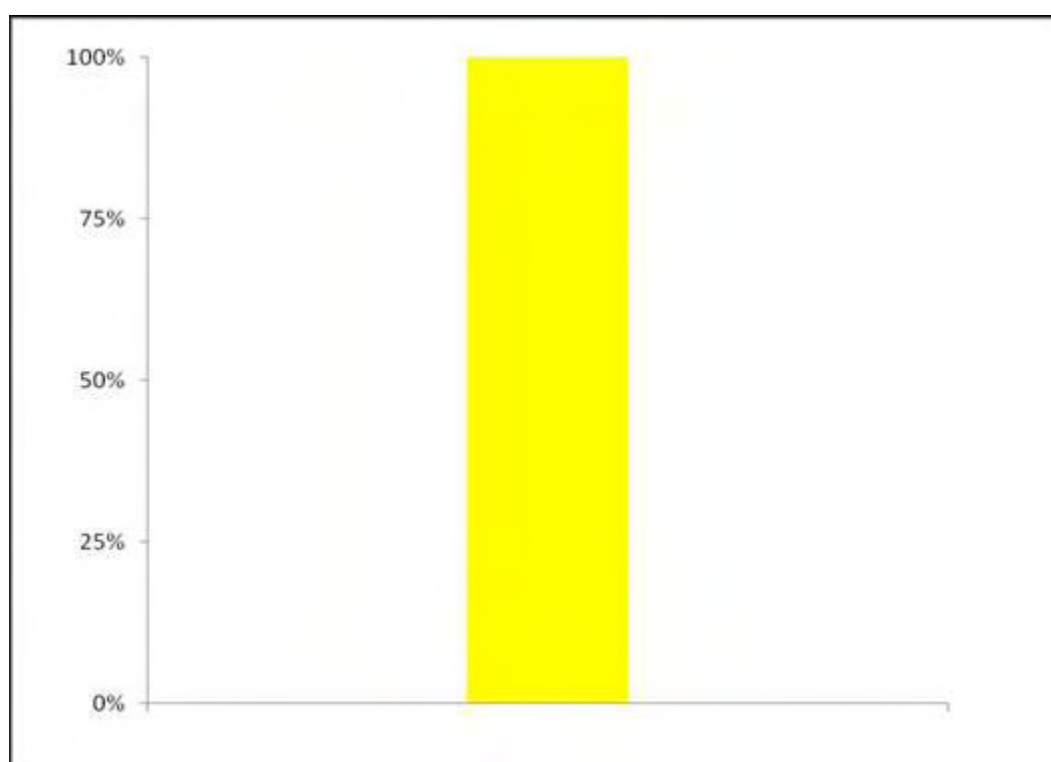


Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στους ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

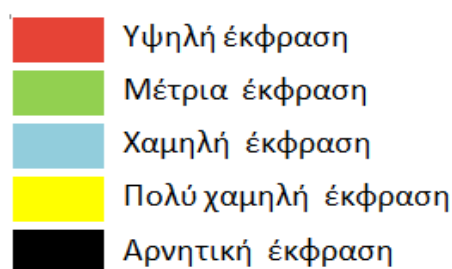


5.6.4 Ιστιοκύτταρα

Τα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων) που εξετάστηκαν, παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η. Συμπερασματικά, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στην έκφραση του επιτόπου Η. Στα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, σε σύγκριση με τα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι και στις δύο κατηγορίες των λαχνών (με και χωρίς μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) τα ιστιοκύτταρα παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η.

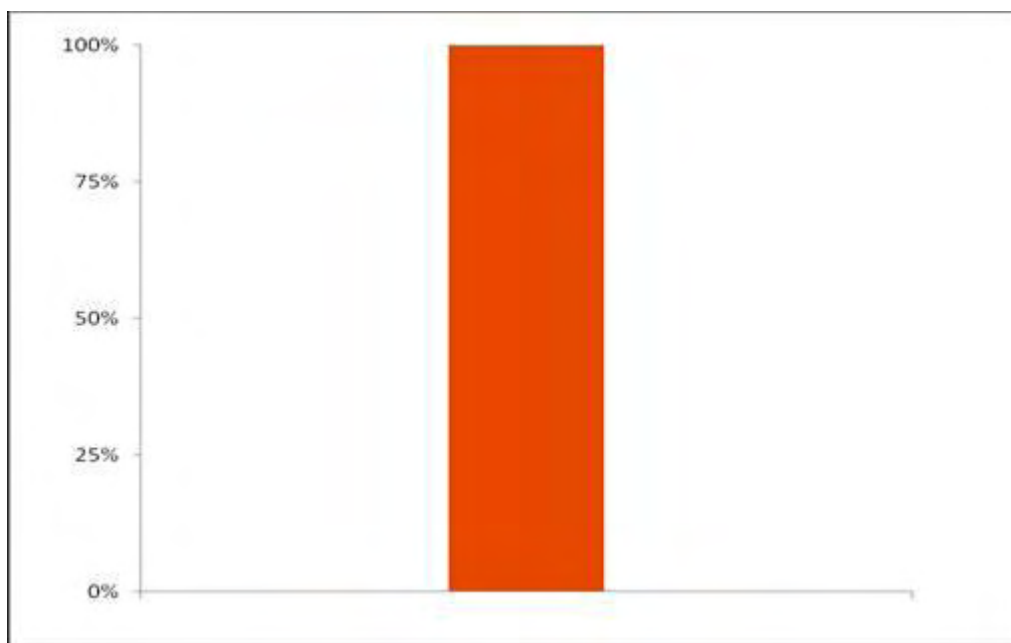


Σχήμα 11. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

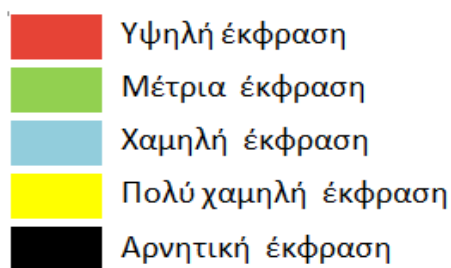


5.6.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων) που εξετάστηκαν, παρουσίασαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο H. Συμπερασματικά, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στην έκφραση του Επίτοπου H, μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση και των ενδοθηλιακών κυττάρων των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά δεδομένου ότι και στις δύο κατηγορίες των λαχνών (με και χωρίς μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσίασαν υψηλή έκφραση για το Επίτοπο H (Φωτ.: 20, 21, 23, 25, 31).

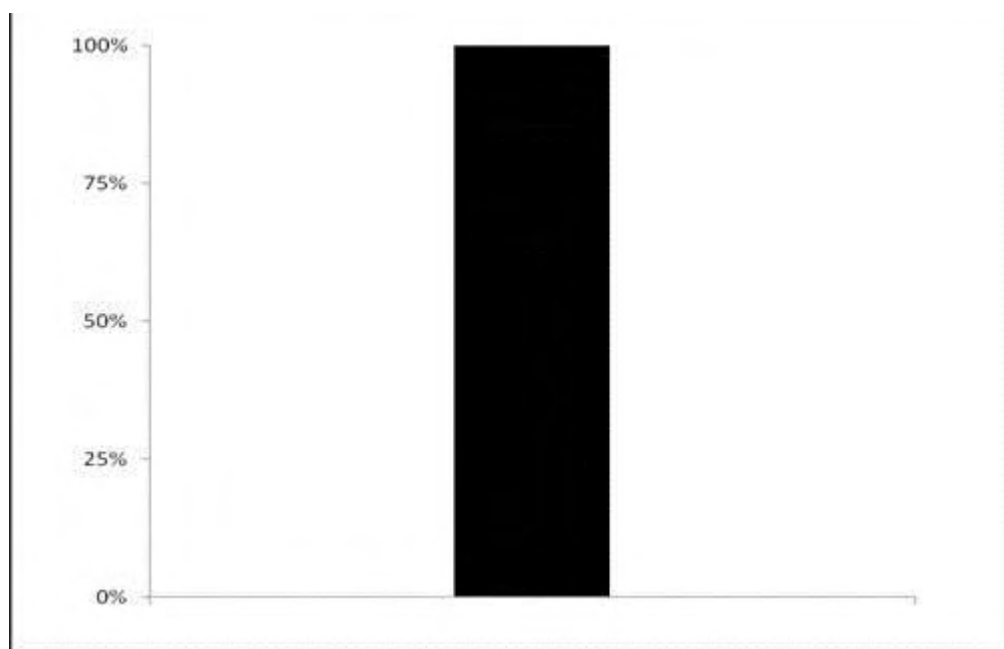


Σχήμα 12. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου H στα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

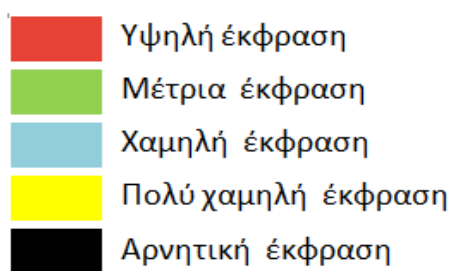


5.6.6 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα στα τριχοειδή αγγεία των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρουσίασαν και στις 60 περιπτώσεις (100% των περιπτώσεων) που εξετάστηκαν αρνητική έκφραση για τον Επίτοπο Η, δεδομένου ότι τόσο τα εμπύρνηνα όσο και τα απύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια παρέμειναν αρνητικά για τον Επίτοπο Η. Συμπερασματικά, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στην έκφραση του Επίτοπου Η μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων των χοριακών λαχνών με και χωρίς μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, δεδομένου ότι και στις δύο κατηγορίες των χοριακών λαχνών, τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρουσίασαν αρνητική έκφραση για τον Επίτοπο Η (Φωτ.24).



Σχήμα 13. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του Επίτοπου Η στα ερυθρά αιμοσφαίρια των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

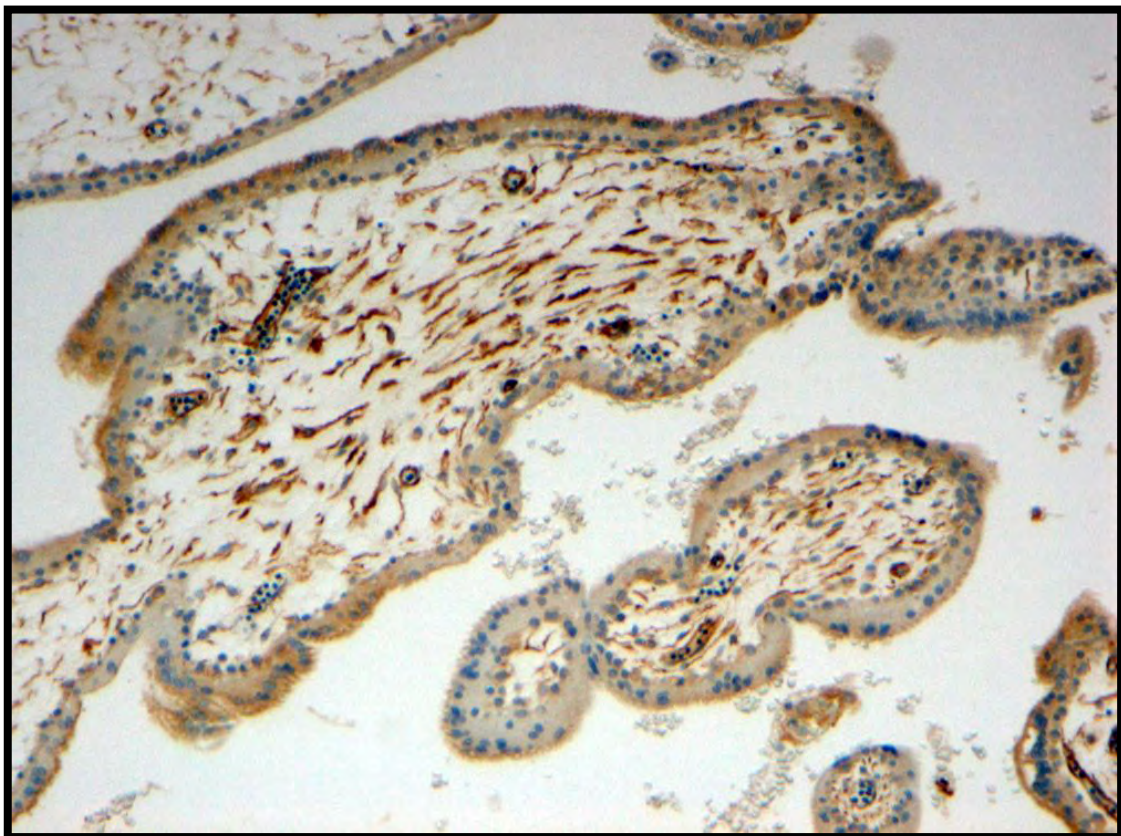


5.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ

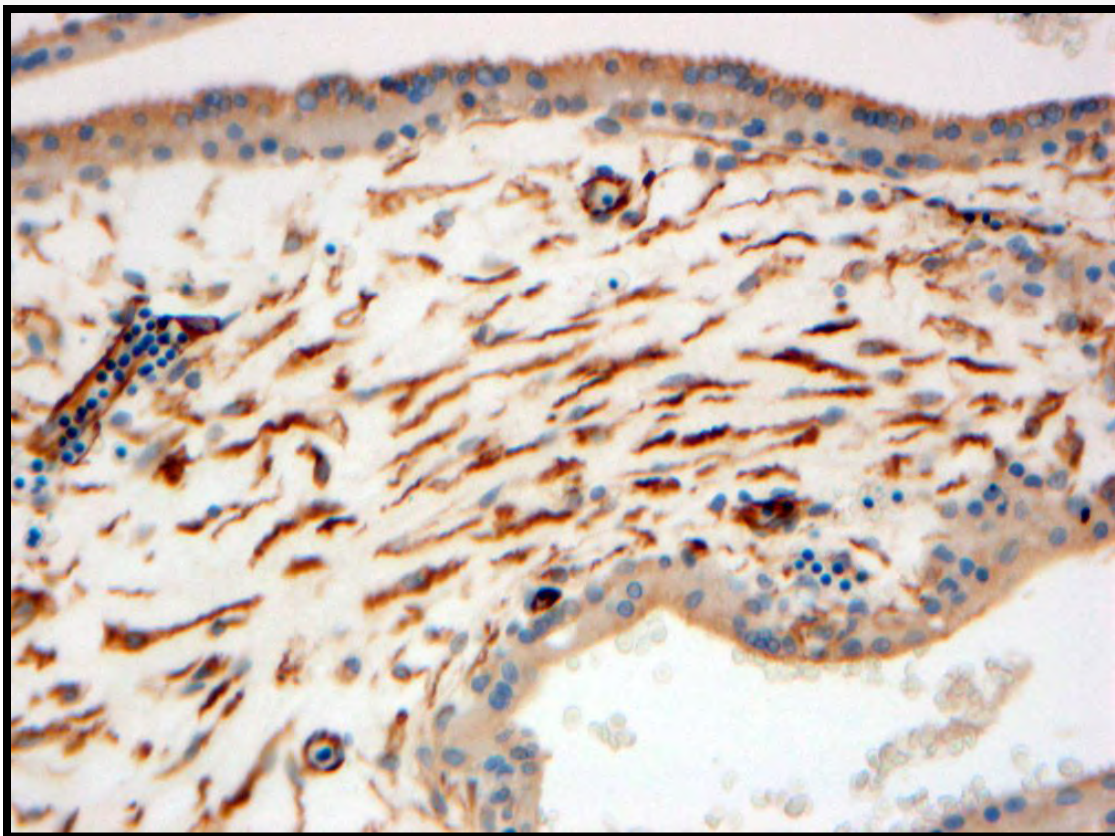
Με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος βρέθηκε ότι τα κύτταρα των χοριακών λαχνών περιέχουν 5 πολυπεπτίδια που φέρουν τον Επίτοπο Η. Αυτά τα πολυπεπτίδια έχουν μοριακά βάρη 118,5 KD , 106,3 KD, 85 KD, 53 KD, 36,7 KD.

Το πολυπεπτίδιο με το μοριακό βάρος 53 KD, ανήκει στην κερατίνη 8, επειδή αυτό αντέδρασε με το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8.

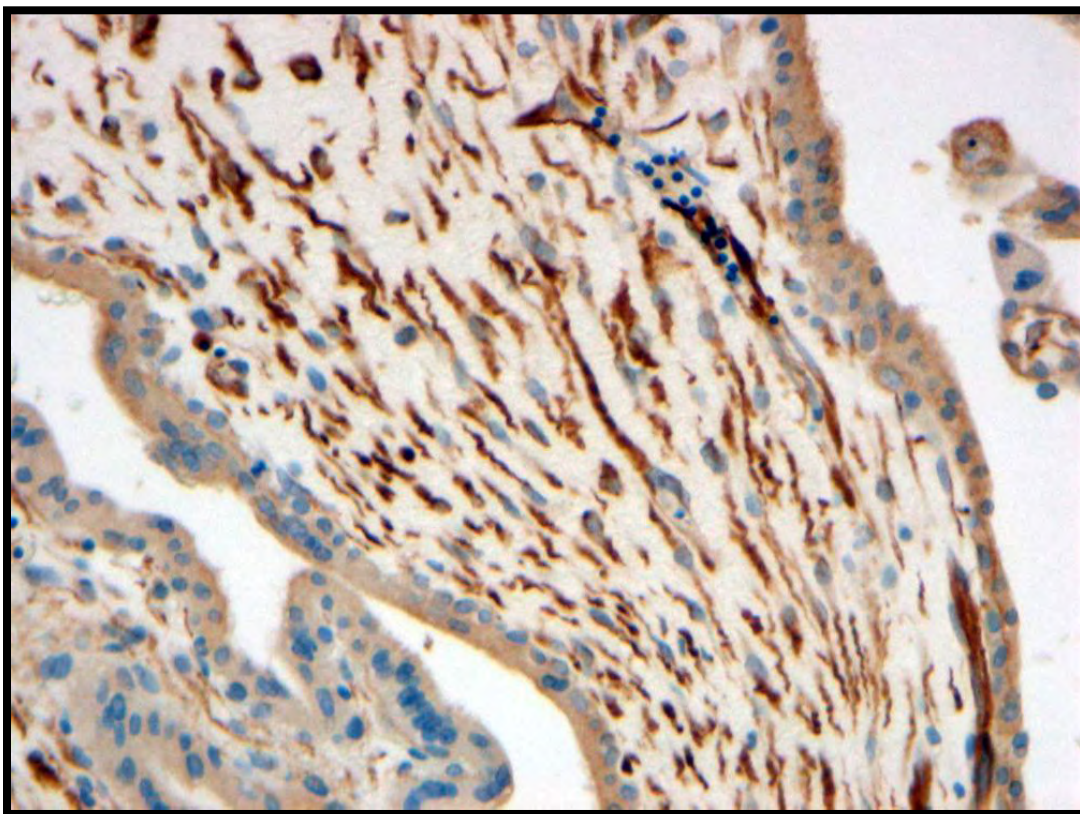
5.8 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ



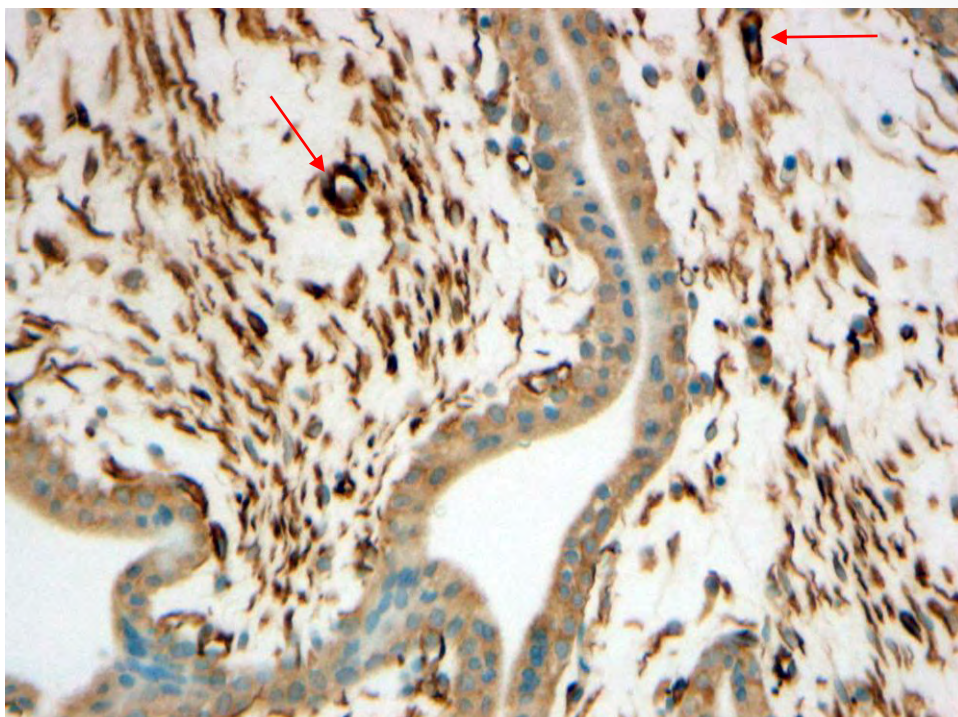
Φωτ.1: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Λίγα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης με επιφανειακή κυτταροπλασματική χρώση. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά. Mag. 100X.



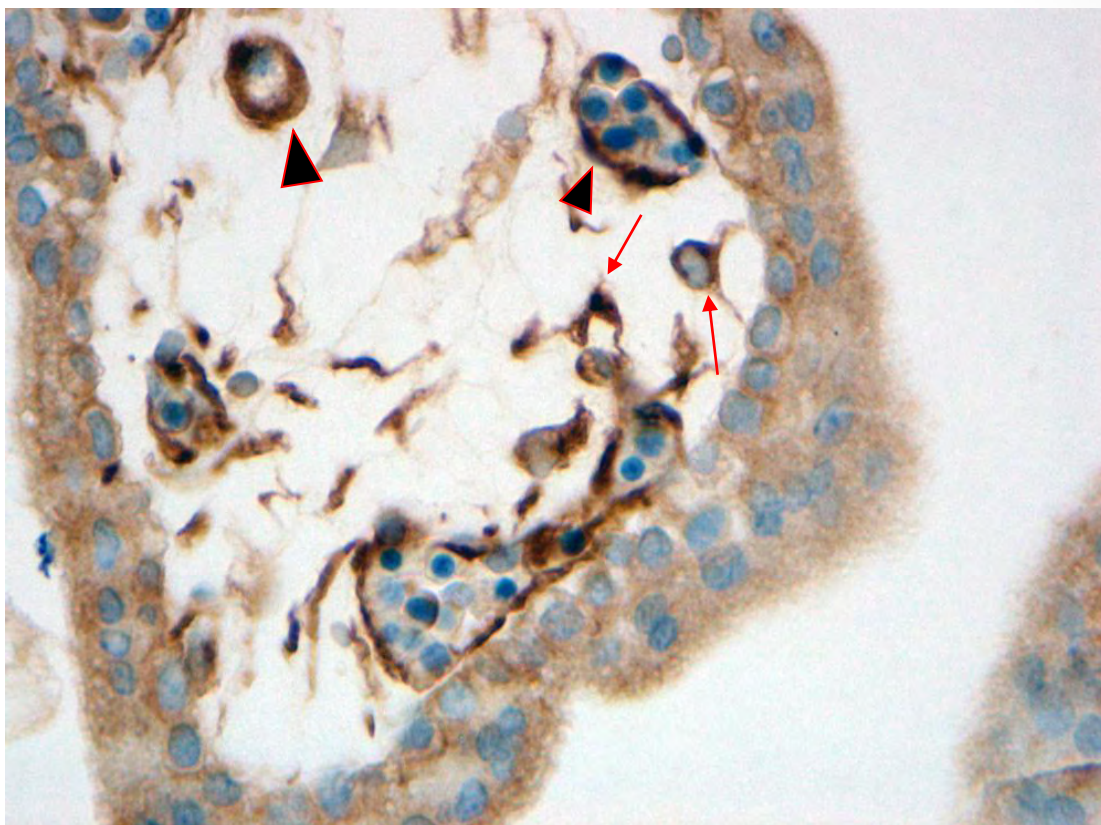
Φωτ. 2: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 1. Τμηματική επιφανειακή χρώση της συγκυτιοτροφοβλάστης, και έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον Επίτοπο Η. Ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά. Mag. 200X.



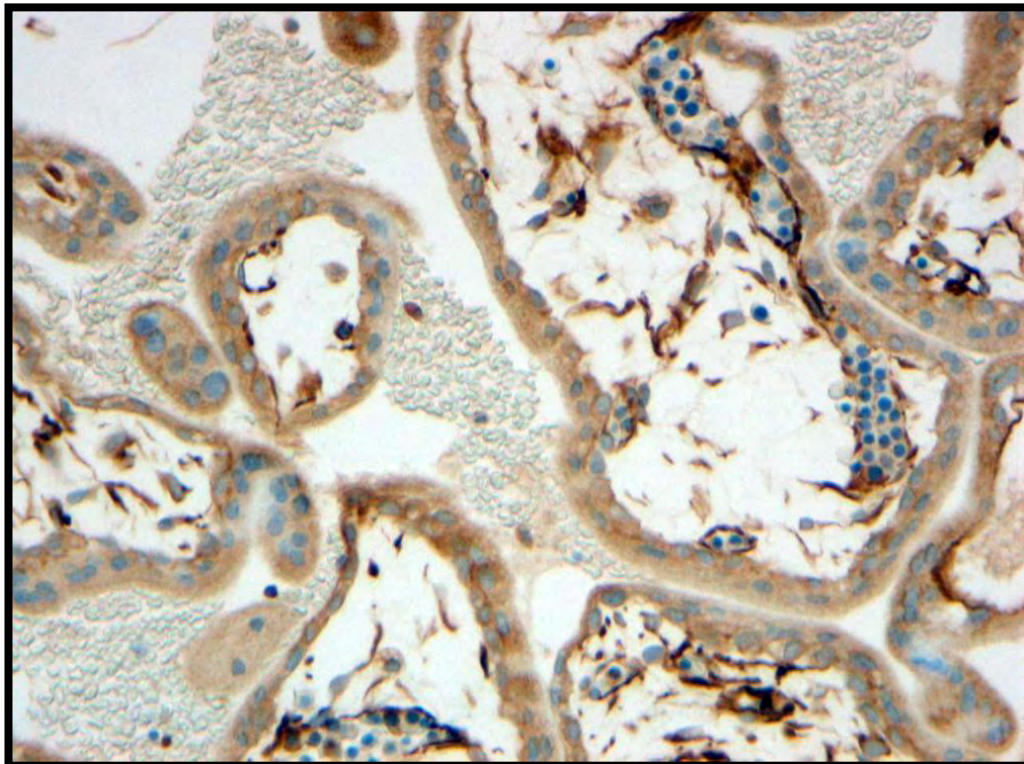
Φωτ.3: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Λίγα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης με επιφανειακή κυτταροπλασματική χρώση. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά. Mag. 200X.



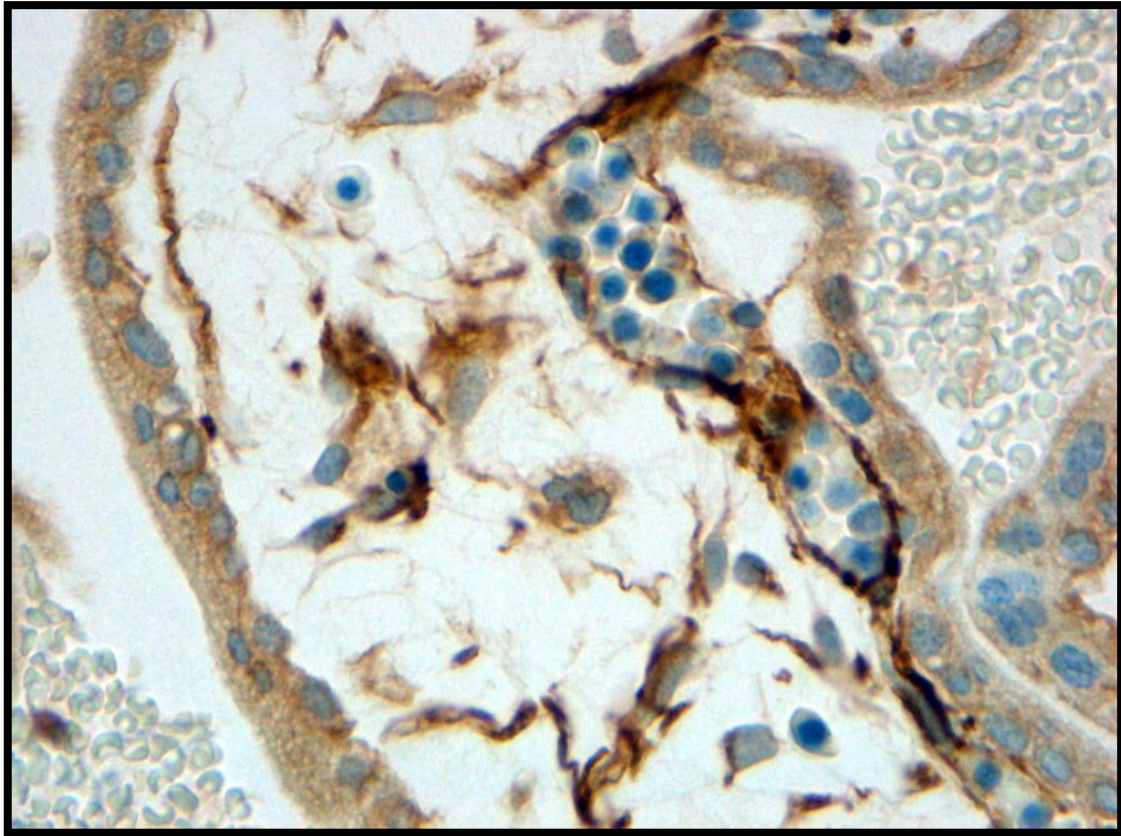
Φωτ. 4: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Χρώση για τον Επίτοπο Η. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών (βέλη) κυττάρων. Χαμηλής έντασης κυτταροπλασματική χρώση της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης. Mag. 200X.



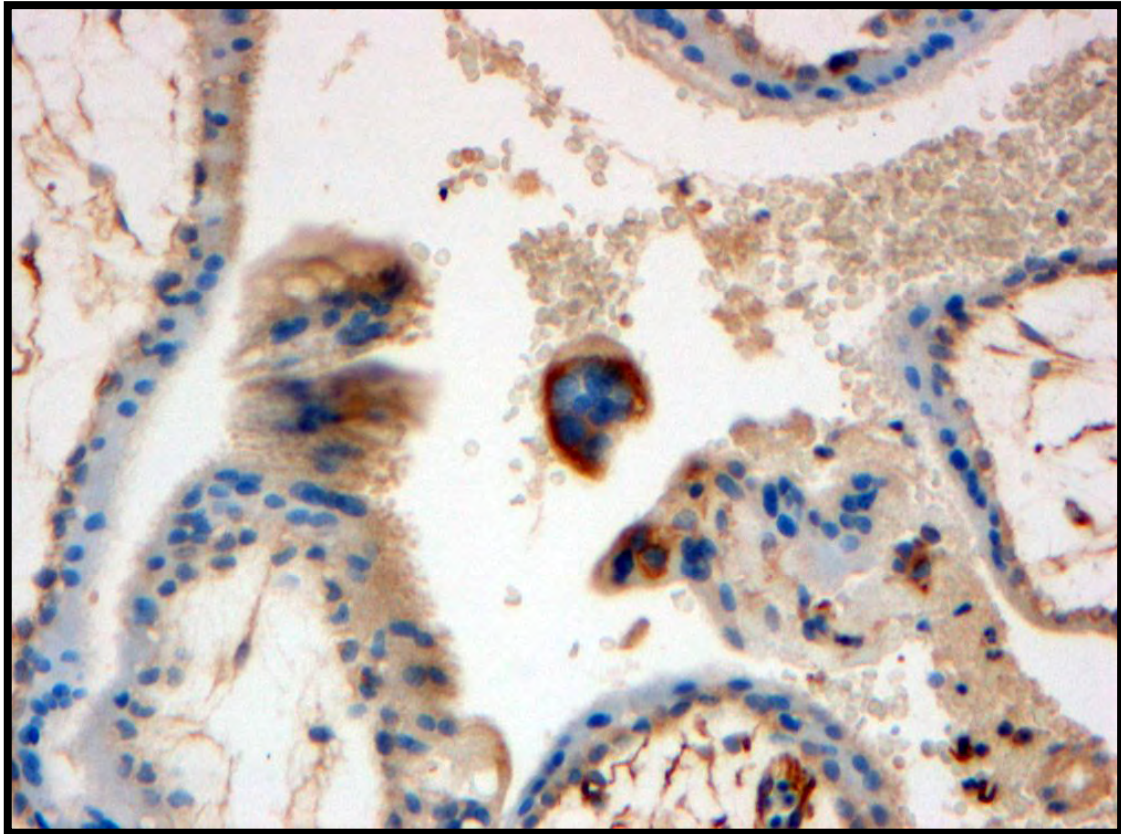
Φωτ. 5: Χοριακή λάχνη με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Πολύ χαμηλή ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών (βέλη) και των ενδοθηλιακών κυττάρων (κεφαλές βελών). Αρνητική χρώση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για τον Επίτοπο Η. Mag. 400X.



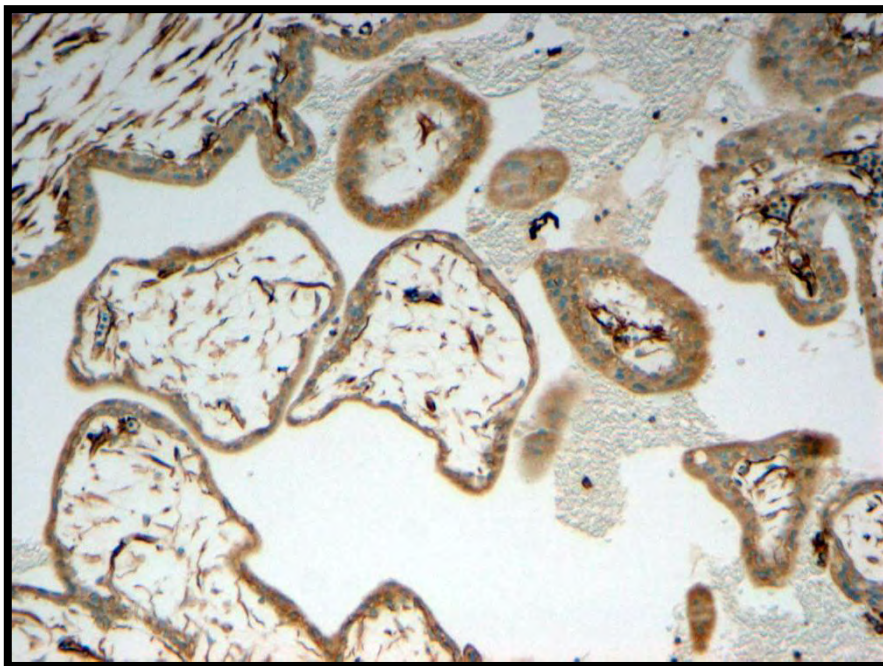
Φωτ. 6: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Πολύ χαμηλή ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αρνητική χρώση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για τον Επίτοπο H. Mag. 200X.



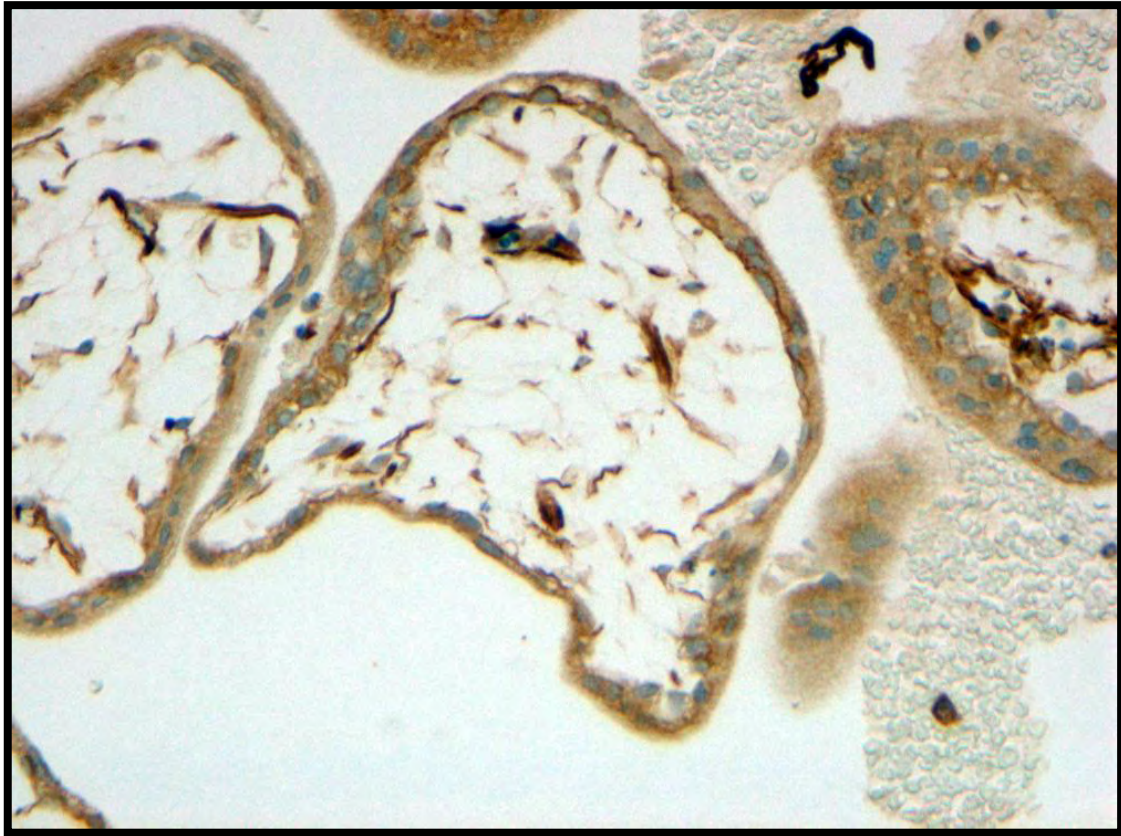
Φωτ. 7: Χοριακή λάχνη με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Πολύ χαμηλή ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αρνητική χρώση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για τον Επίτοπο H. Mag. 400X.



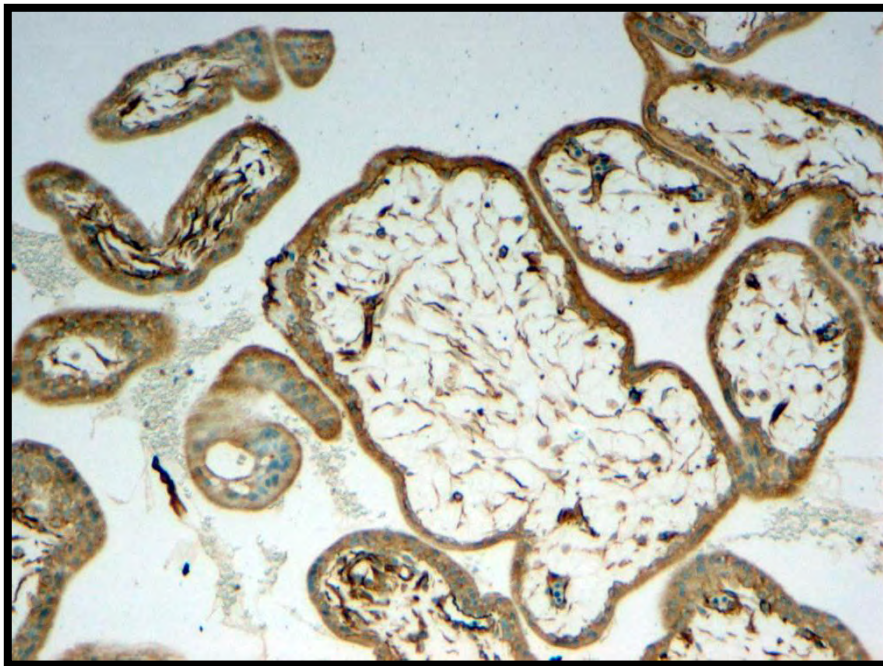
Φωτ. 8: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Συγκυτιοτροφολάστη αρνητική εκτός από λίγες εστίες. Όλα τα κύτταρα της κυτταροτροφολάστης και οι ινοβλάστες είναι θετικά. Η μεμονωμένη συγκυτιοτροφολάστη παρουσιάζει έντονη χρώση της επιφάνειάς της για τον Επίτοπο Η. Mag. 200X.



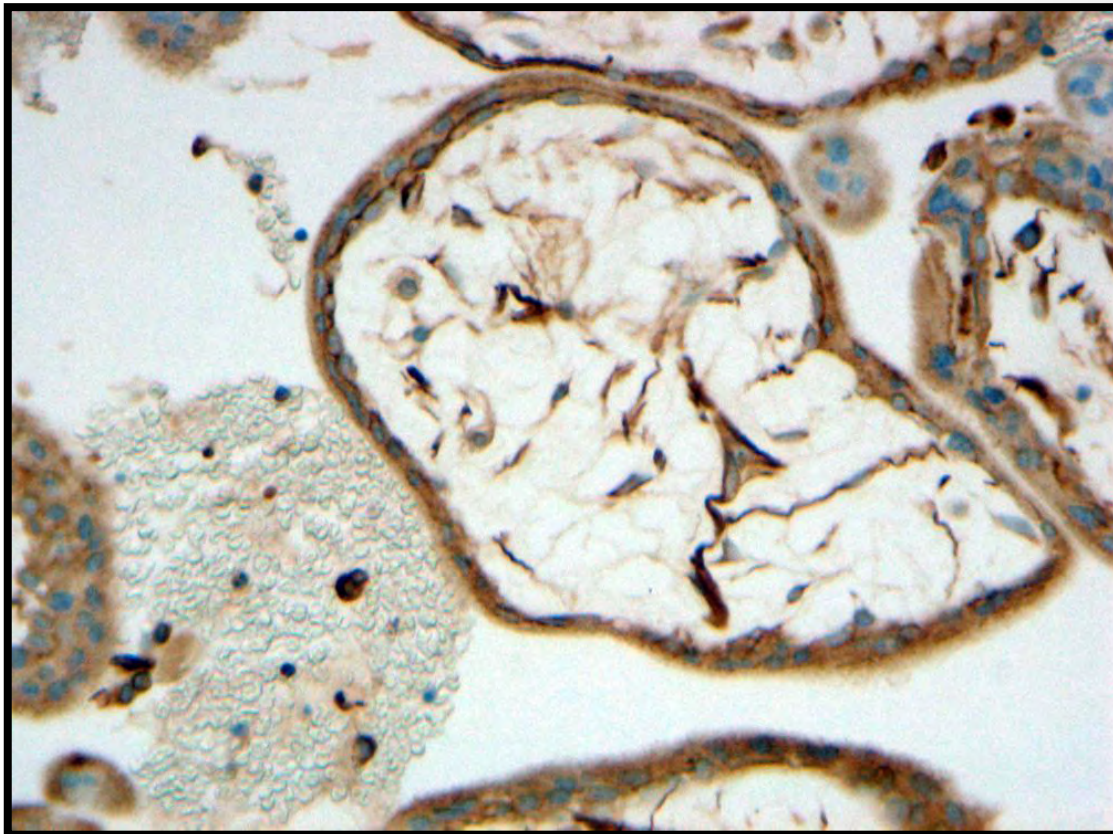
Φωτ. 9: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Χρώση για τον Επίτοπο Η. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Αρνητική ή πολύ χαμηλής έντασης χρώση της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης. Έντονη χρώση κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη θέση επαφής της κυτταροτροφολάστης με την συγκυτιοτροφολάστη. Ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά. Mag. 100X.



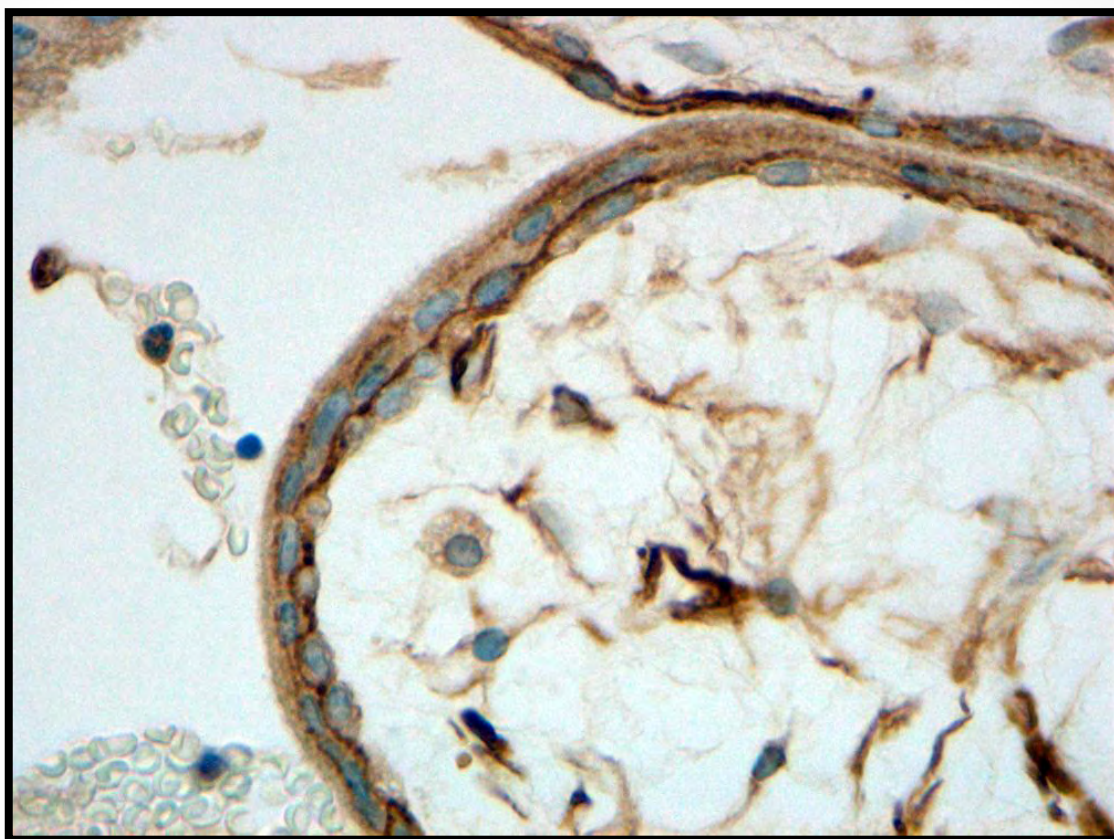
Φωτ. 10: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της Φωτ. 9. Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Διακρίνεται η έντονη χρώση της κυτταρικής επιφάνειας στη θέση επαφής κυτταροτροφοβλάστης και συγκυτιοτροφοβλάστης. Έντονη χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων για τον Επίτοπο Η. Mag. 200X.



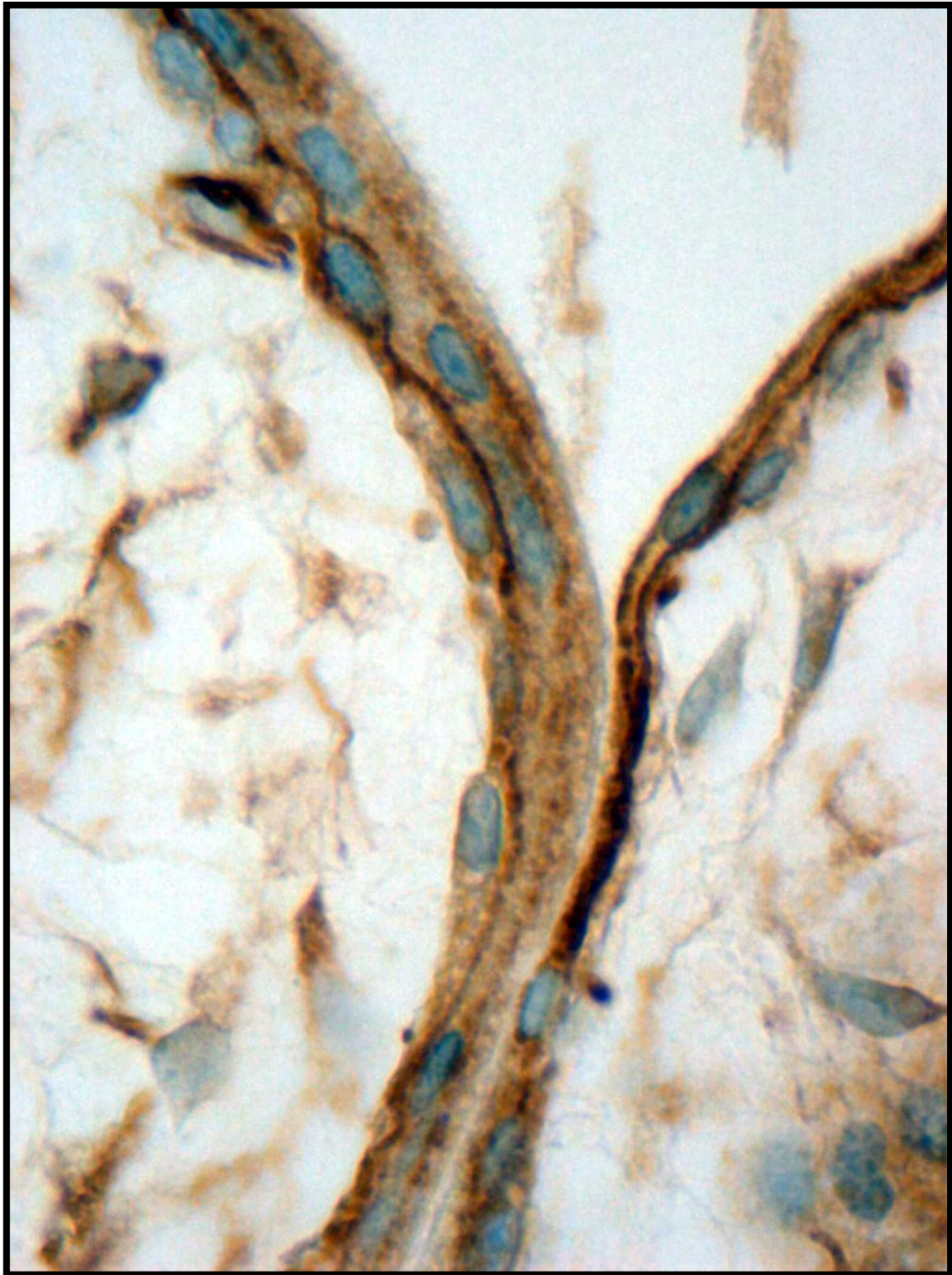
Φωτ. 11: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Χρώση για τον Επίτοπο Η. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Αρνητική ή πολύ χαμηλής έντασης χρώση της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης. Έντονη χρώση κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη θέση επαφής της κυτταροτροφοβλάστης με την συγκυτιοτροφοβλάστη. Ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά. Mag. 100X.



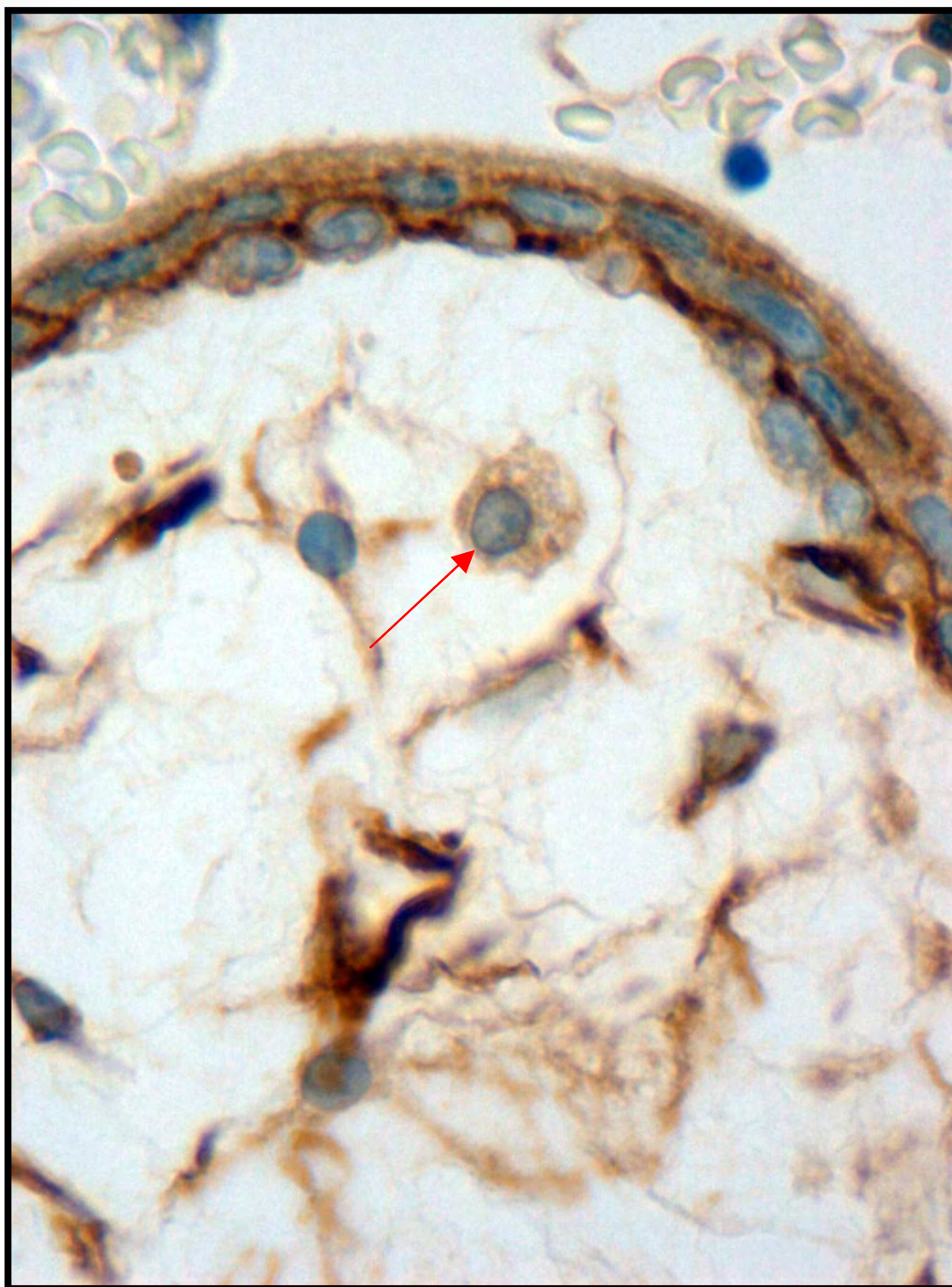
Φωτ. 12: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Διακρίνεται η έντονη χρώση της κυτταρικής επιφάνειας στη θέση επαφής κυτταροτροφोβλάστης και συγκυτιοτροφοβλάστης. Έντονη χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων για τον Επίτοπο Η. Mag. 200X.



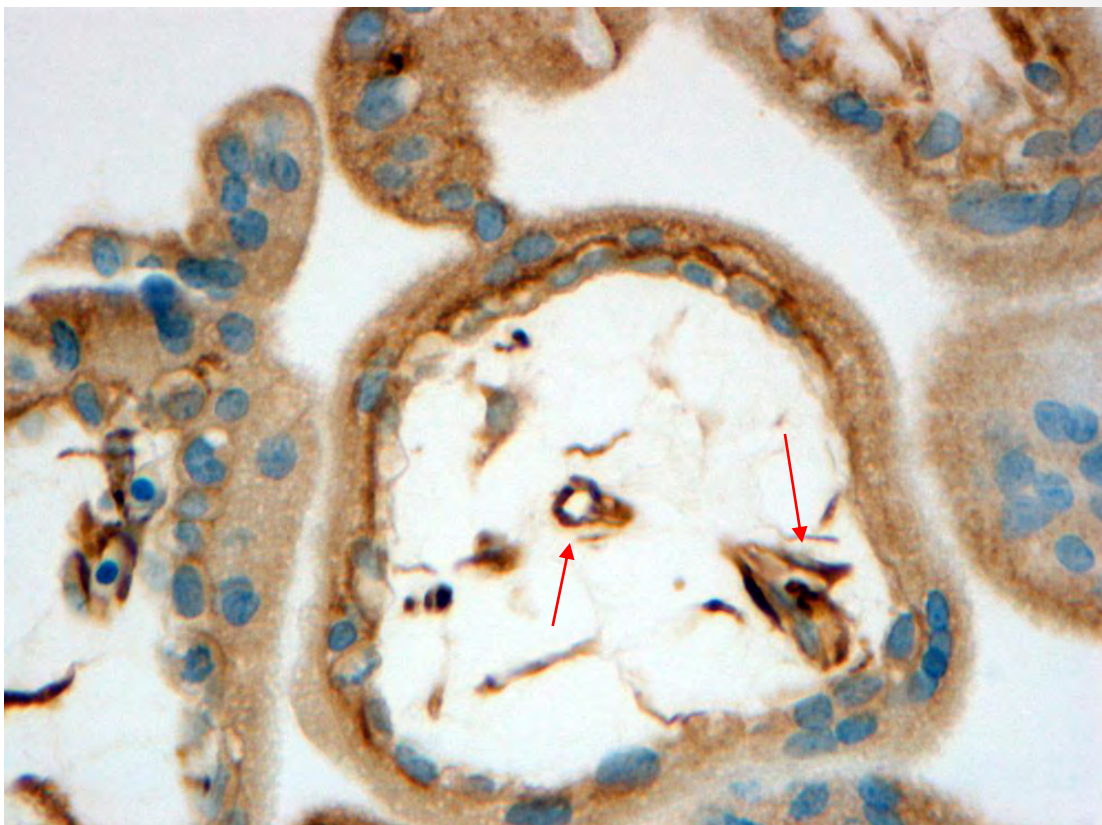
Φωτ. 13: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 12. Mag. 400X.



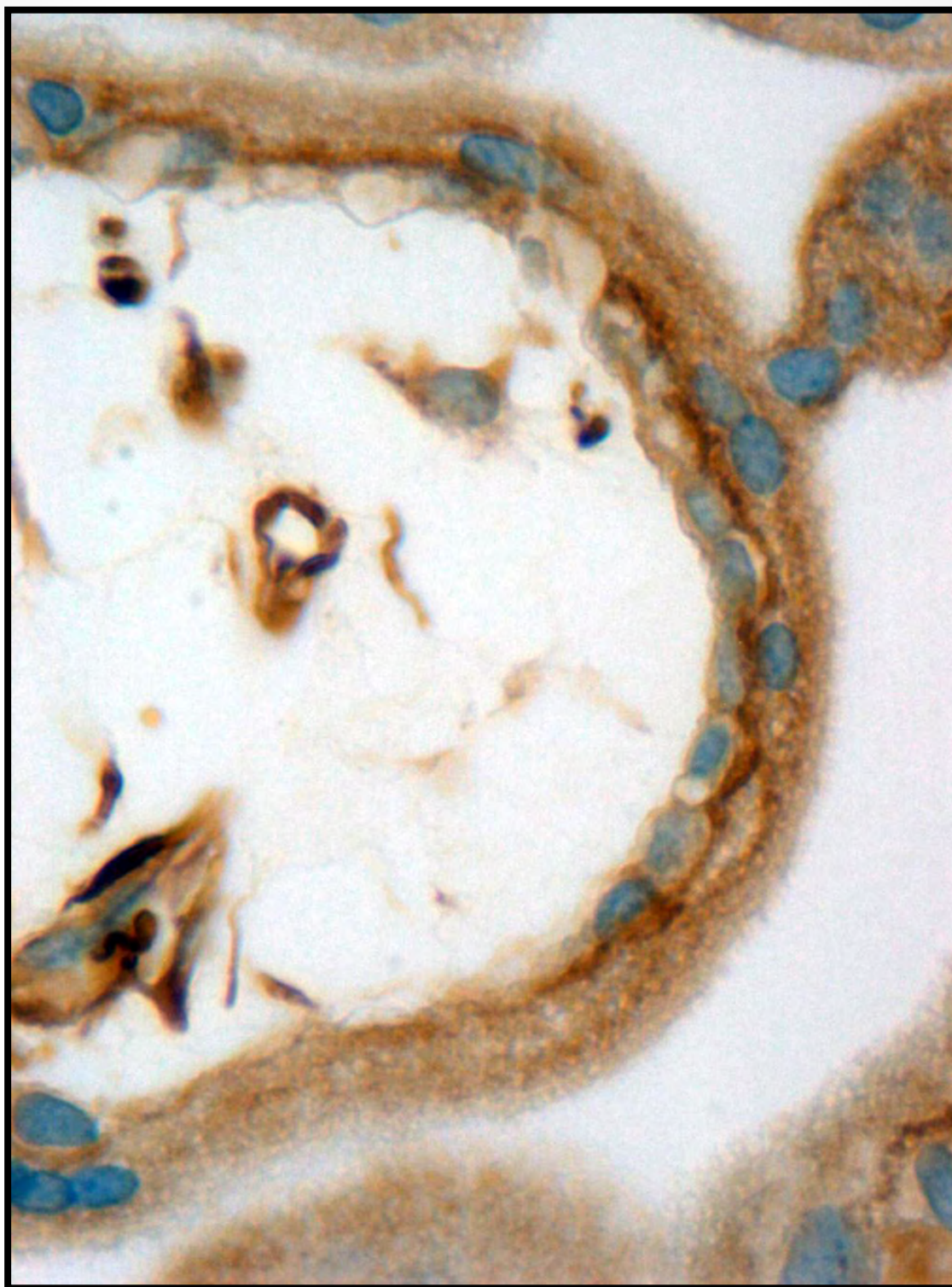
Φωτ. 14: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 13. Ευκρινής η έντονη χρώση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για τον Επίτοπο Η στη θέση επαφής της κυτταροτροφοβλάστης με την συγκυτιοτροφοβλάστης. Mag. 630X.



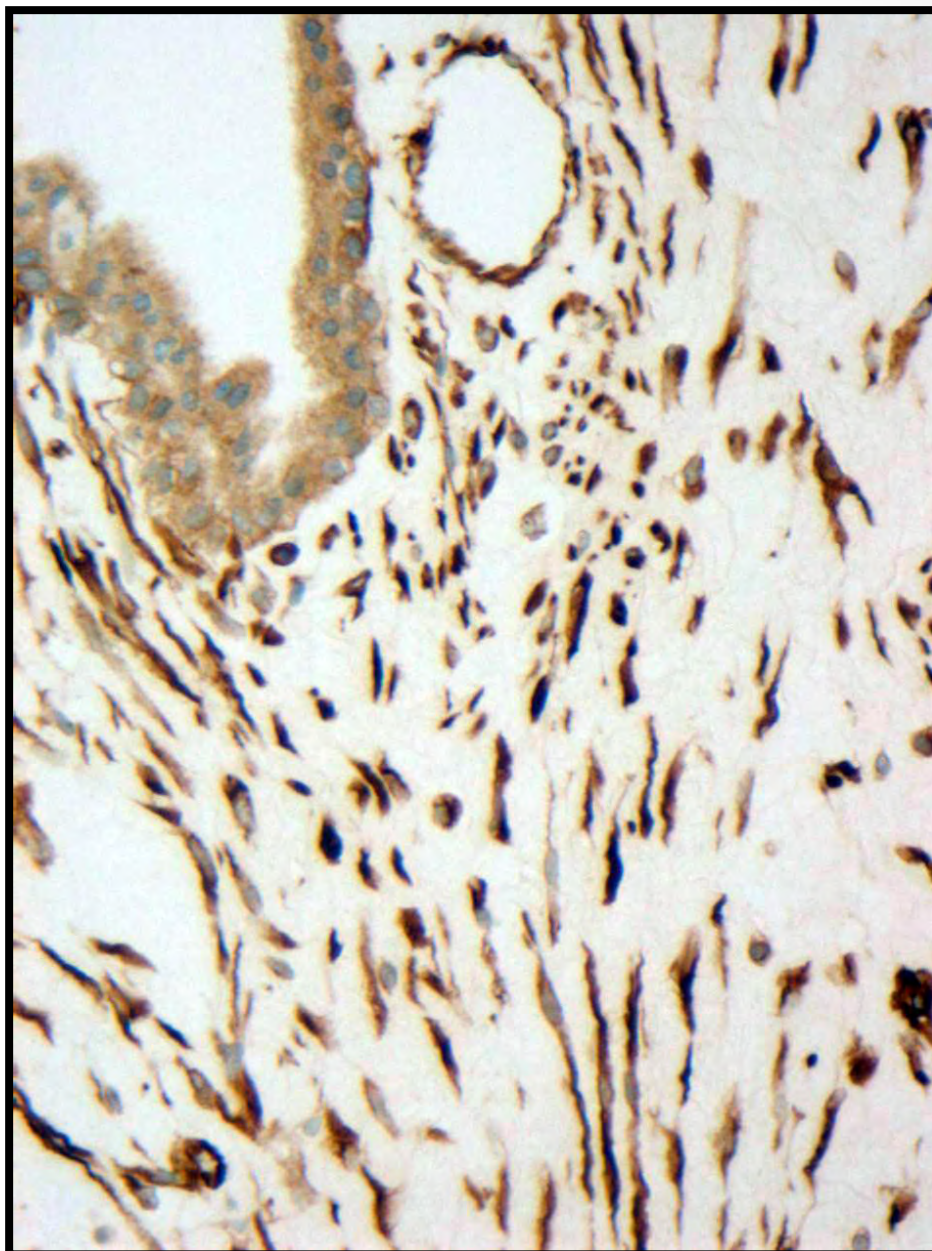
Φωτ. 15: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 12. Ακόμη παρατηρείται πολύ χαμηλή κυτταροπλασματική χρώση ενός ιστιοκυττάρου (βέλος). Mag 630X.



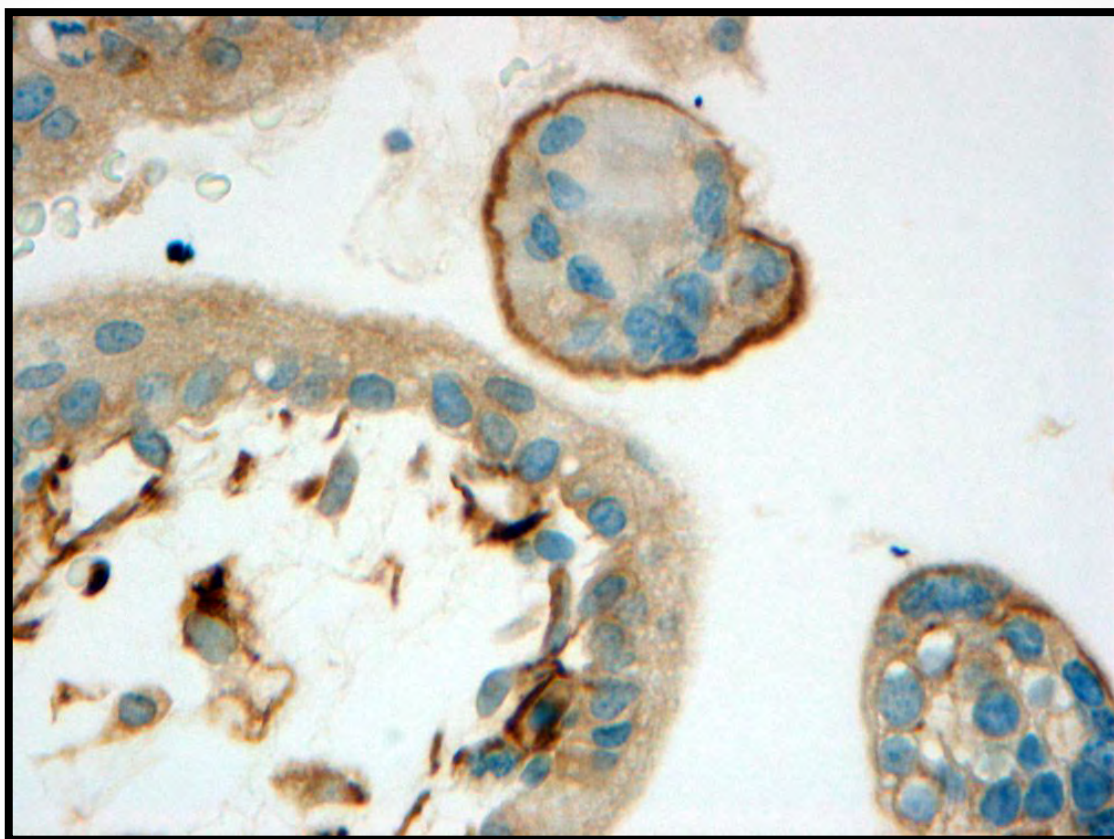
Φωτ. 16: Λάχνη με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών (βέλη) κυττάρων. Ελαφρά κυτταροπλασματική χρώση της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης. Διακρίνεται η έντονη χρώση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη θέση επαφής της κυτταροτροφολάστης με την συγκυτιοτροφολάστη, για τον Επίτοπο Η. Mag 400X.



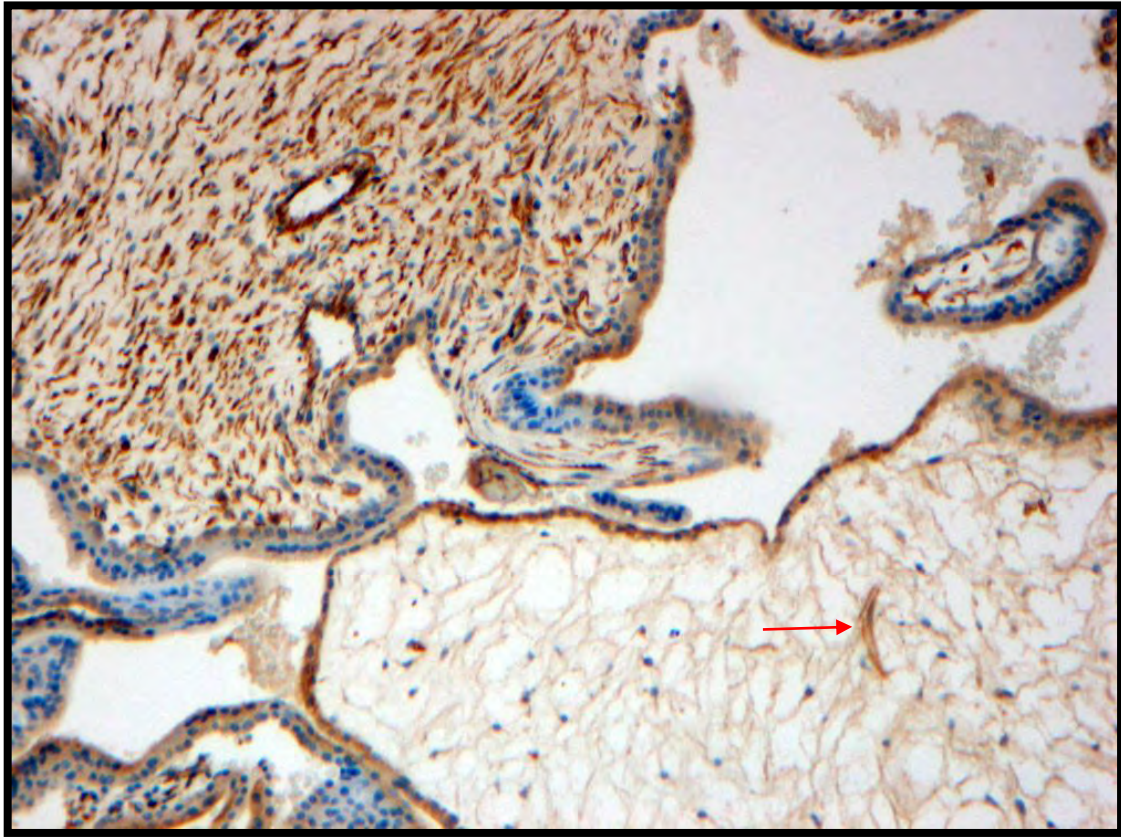
Φωτ. 17: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 16. Mag. 630X.



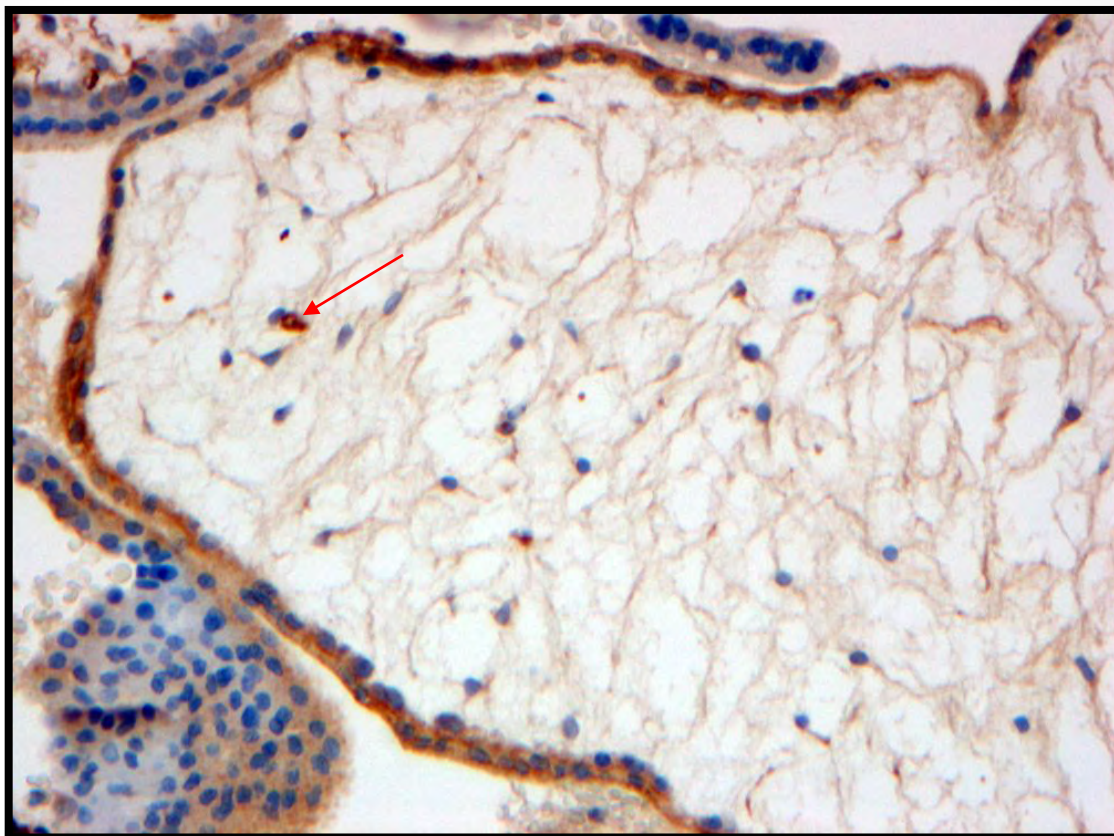
Φωτ. 18: Κεντρική μοίρα μιας χοριακής λάχνης με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών για τον Επίτοπο Η. Mag. 200X.



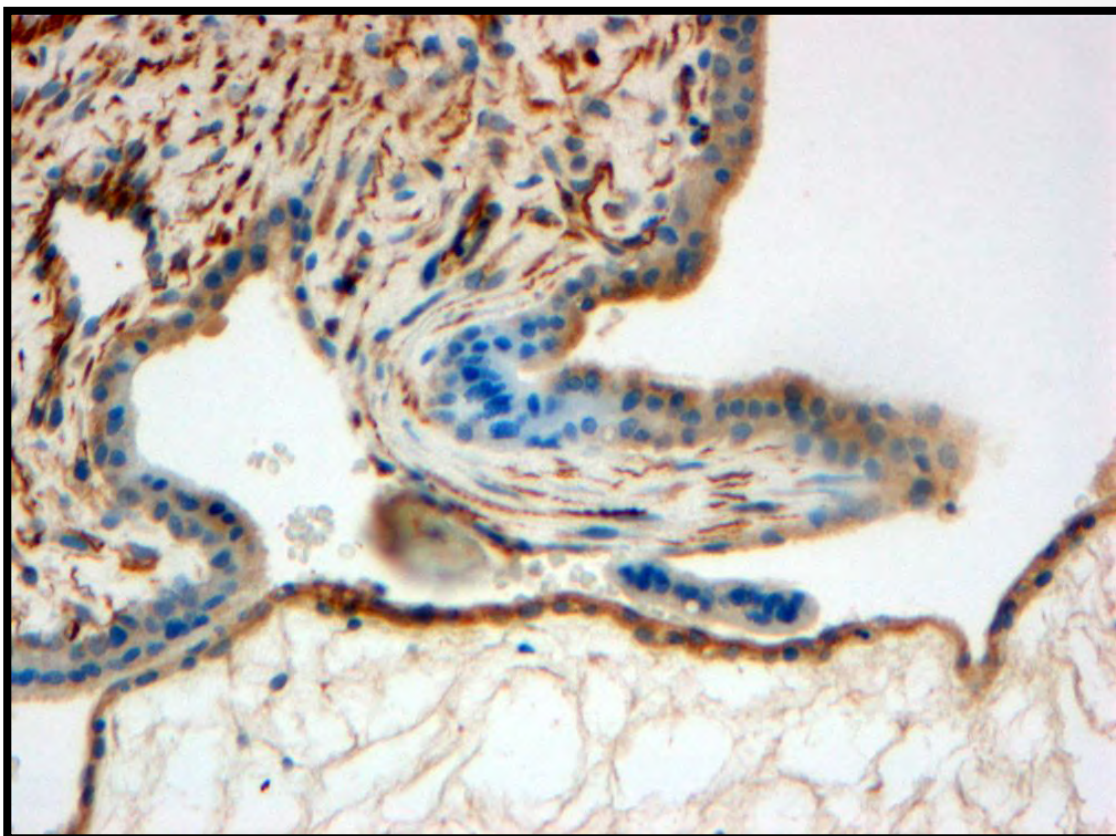
Φωτ. 19: Λάχνη με φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Συγκυτιοτροφοβλάστη και κυτταροτροφοβλάστη με αρνητική έως πολύ χαμηλή ένταση χρώσης. Μεμονωμένη συγκυτιοτροφοβλάστη με έντονη επιφανειακή χρώση για τον Επίτοπο Η. Mag. 400X.



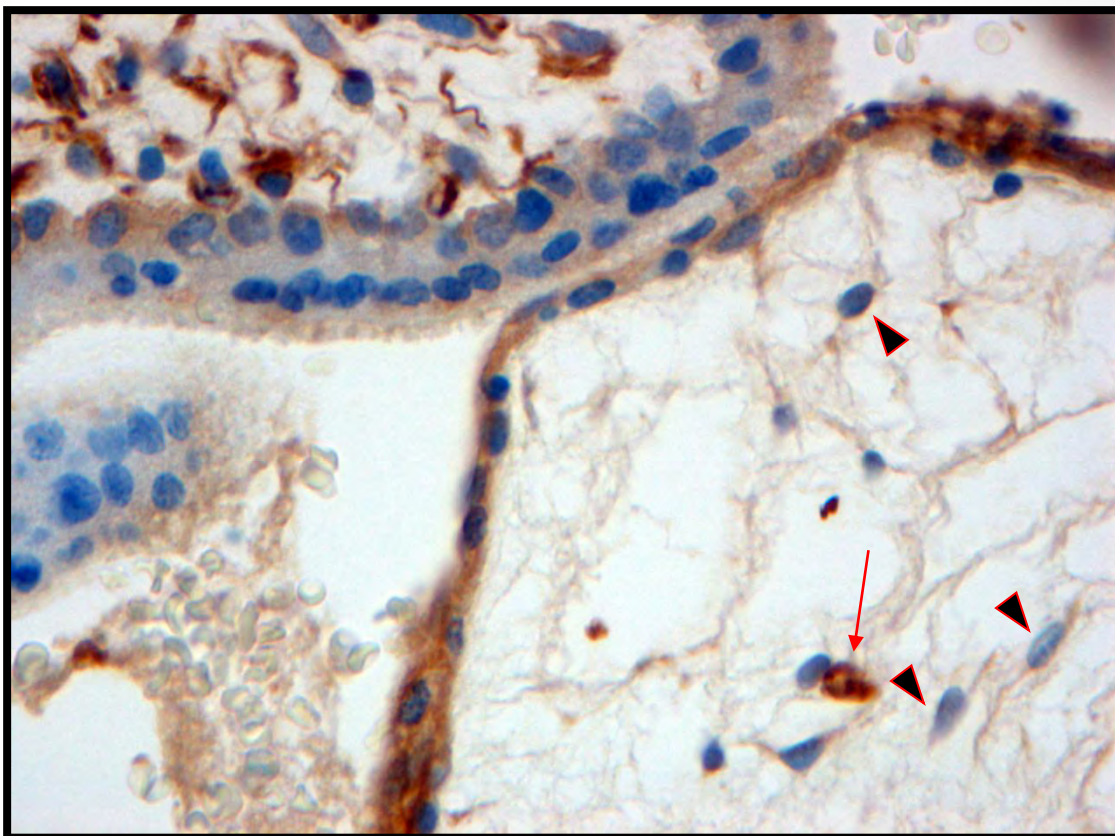
Φωτ. 20: Χοριακή λάχνη με φυσιολογικά χαρακτηριστικά (αριστερά άνω) και χοριακή λάχνη με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση (δεξιά κάτω). Στη λάχνη με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης παρουσιάζουν σποραδική κυτταροπλασματική χρώση για τον Επίτοπο Η, ενώ οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν έντονη κυτταροπλασματική χρώση. Όλα τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης παρουσιάζουν θετική κυτταροπλασματική χρώση, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των ινοβλαστών αρνητική χρώση και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (βέλος) θετική χρώση στη λάχνη με μυξοειδή εκφύλιση. Mag 100X.



Φωτ. 21: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της Φωτ. 20. Στη χοριακή λάχνη με μυξοειδή εκφύλιση τα κύτταρα της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης είναι θετικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι θετικά (βέλος), και οι ινοβλάστες αρνητικοί για τον Επίτοπο H. Mag.200X



Φωτ. 22: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 20. Mag. 200X



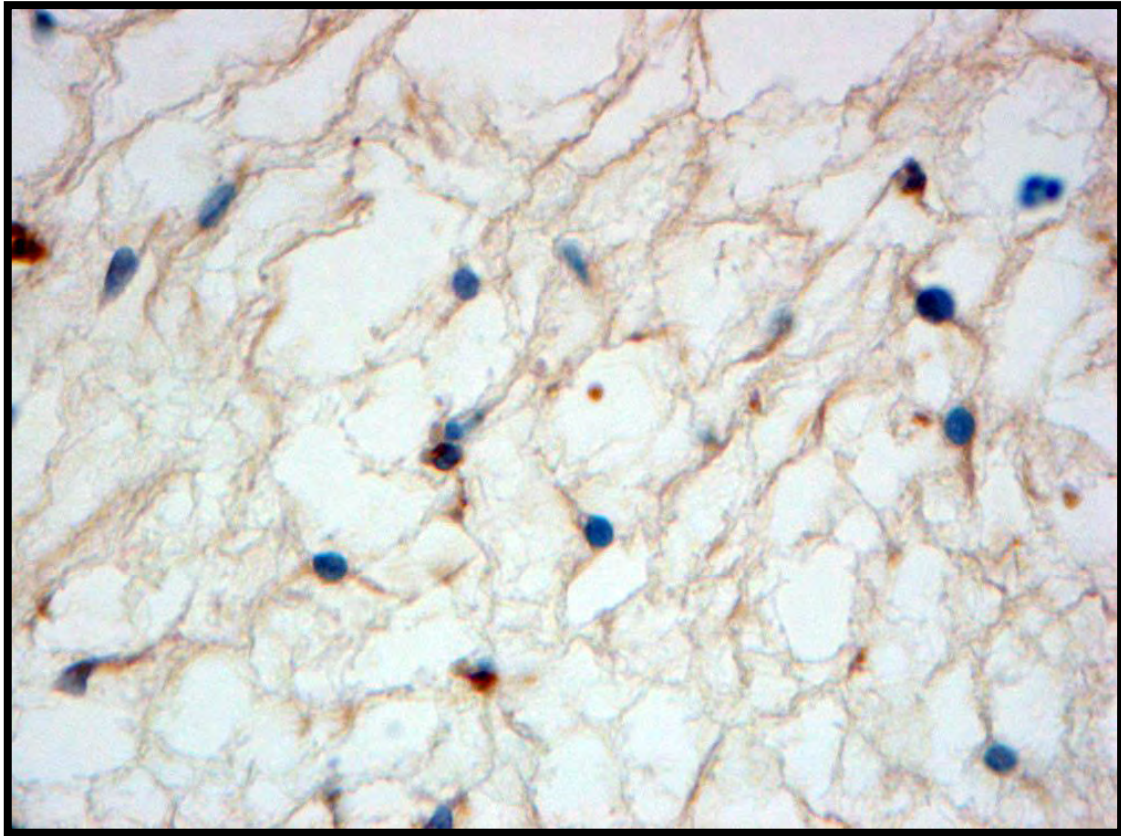
Φωτ. 23: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 20. Στη χοριακή λάχνη με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, το ενδοθηλιακό κύτταρο είναι θετικό (βέλος), και οι ινοβλάστες αρνητικοί (κεφαλές βελών) για τον Επίτοπο H. Mag. 400X.



Φωτ. 24: Χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση όλων των κυττάρων της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης. Ενδοθηλιακά κύτταρα θετικά και ερυθρά αιμοσφαίρια αρνητικά (βέλη) για τον Επίτοπο H. Mag. 100X.



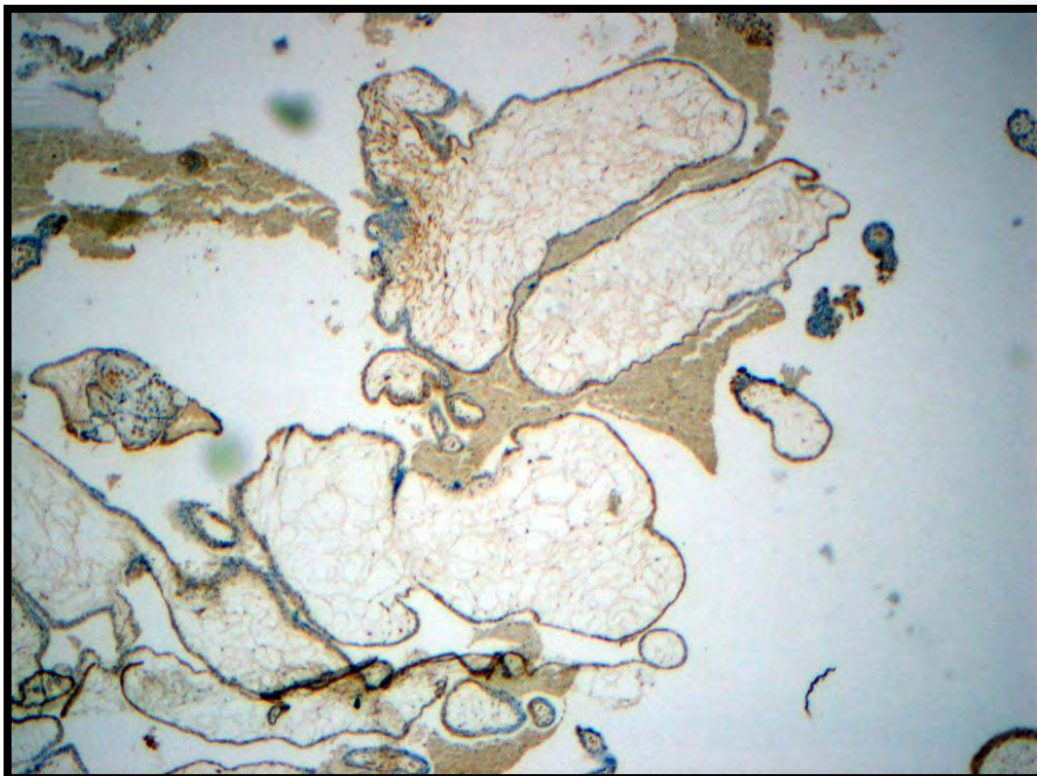
Φωτ. 25: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 24. Έντονη κυτταροπλασματική χρώση της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης , και των ενδοθηλιακών κυττάρων (βέλη) και αρνητική χρώση των ινοβλαστών (κεφαλές βελών) για τον Επίτοπο H. Mag. 200X.



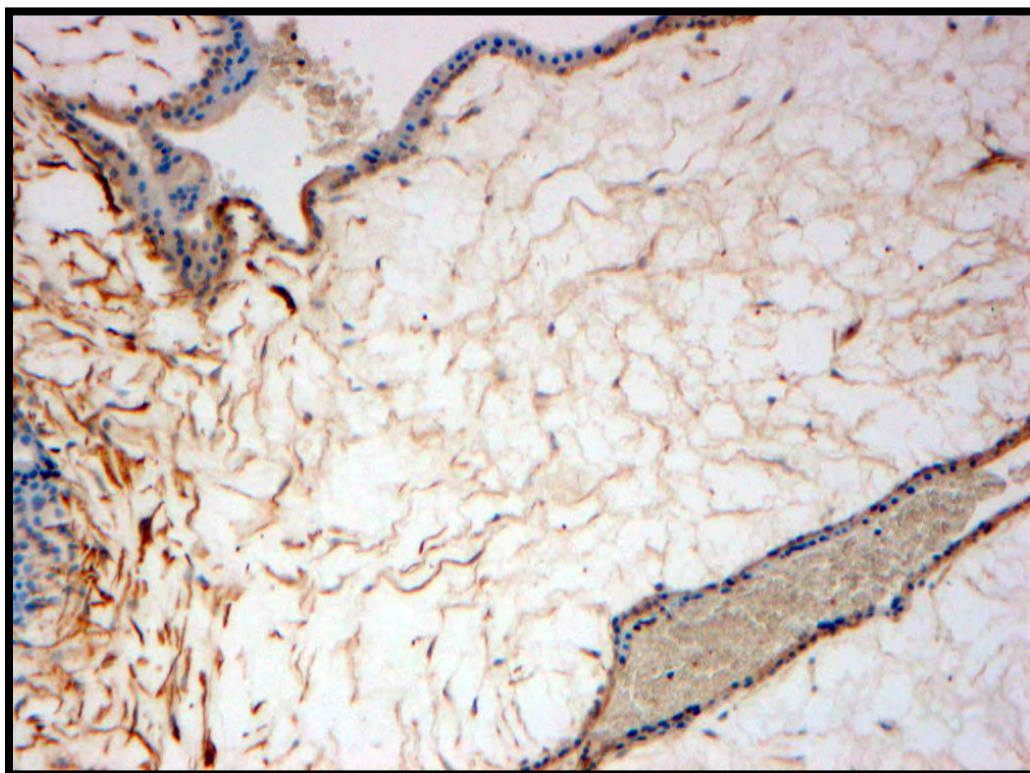
Φωτ. 26: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 20. Κεντρική περιοχή χοριακής λάχνης με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Οι περισσότεροι ινοβλάστες είναι αρνητικοί για τον Επίτοπο H. Mag. 400X.



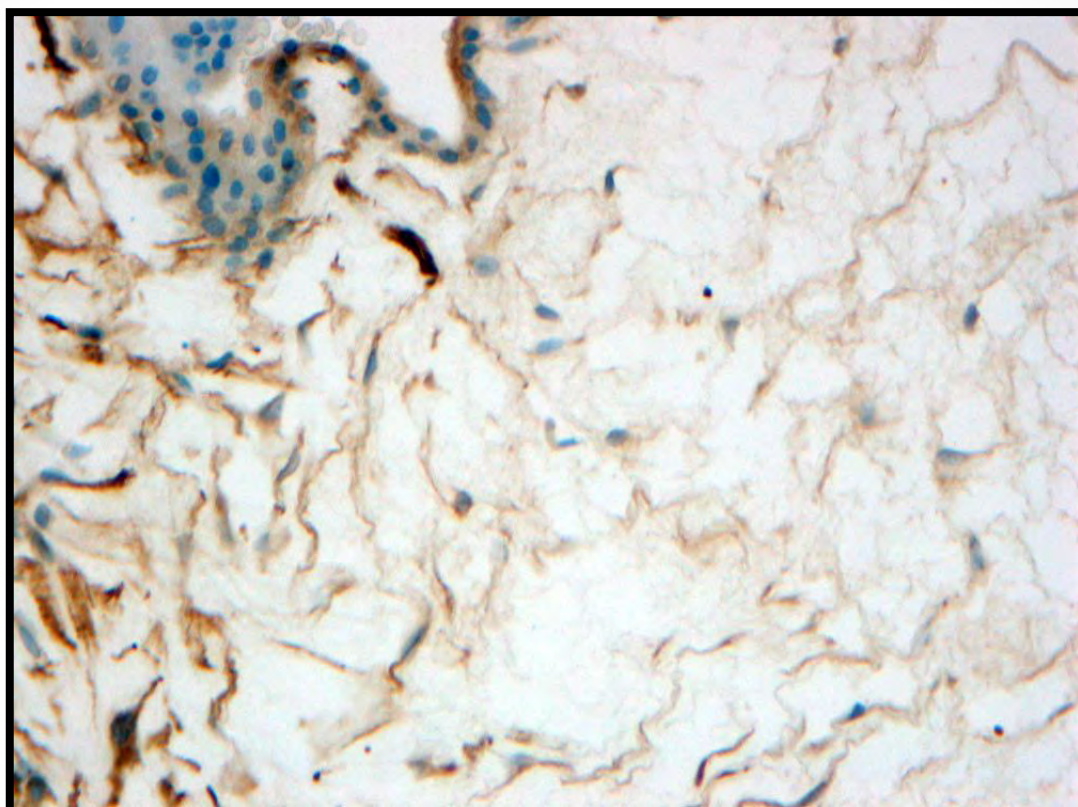
Φωτ. 27: Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και λάχνη με υδρωπική μυξοειδή εκφύλιση (βέλος). Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών στις λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά για τον Επίτοπο Η. Mag 25X.



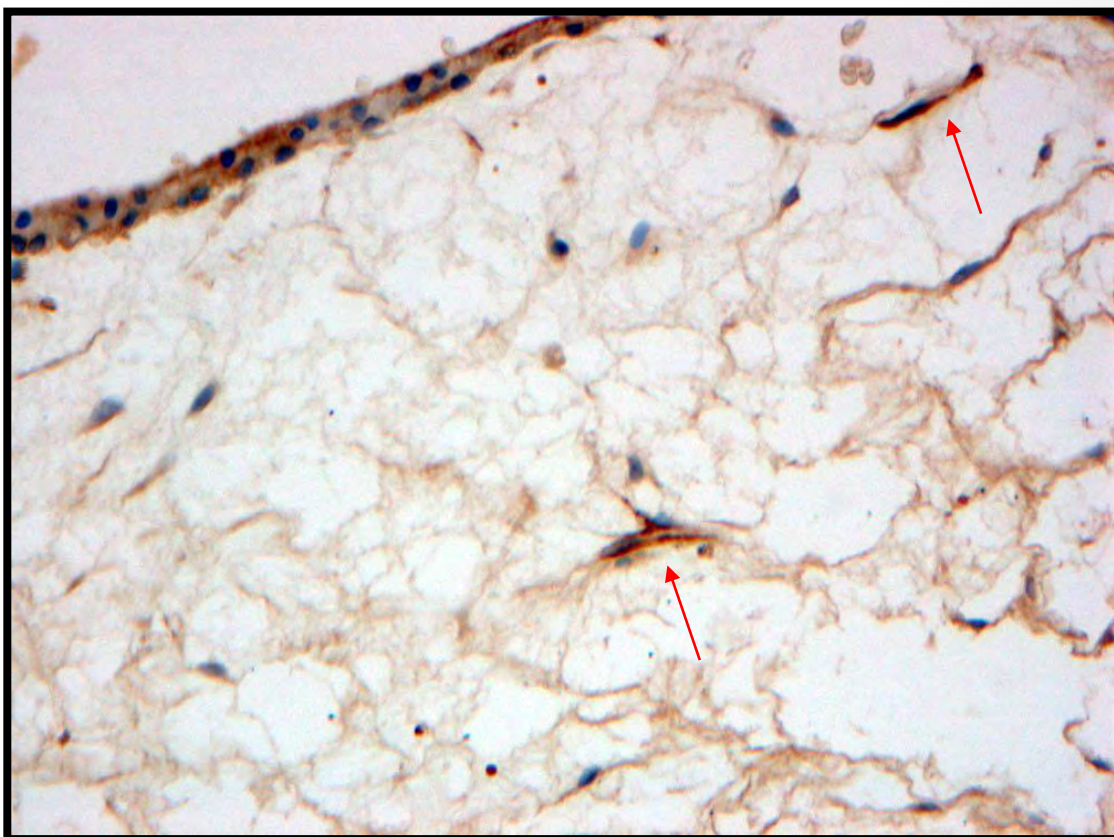
Φωτ. 28 : Λάχνη με τμηματική μυξοειδή εκφύλιση. Στο αριστερό τμήμα της, χωρίς μυξοειδή εκφύλιση παρατηρείται έντονη κυτταροπλασματική χρώση των ινοβλαστών για τον Επίτοπο Η. Mag 25x



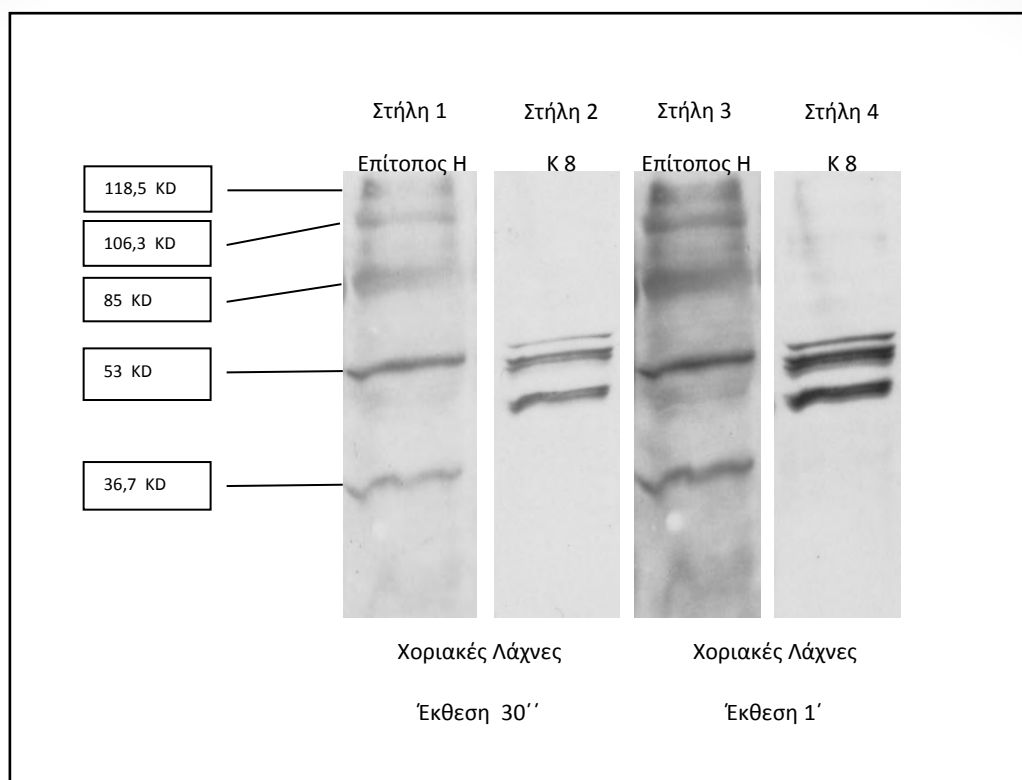
Φωτ. 29: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 28. Αριστερά οι ινοβλάστες με την έντονη κυτταροπλασματική χρώση και δεξιά μέσα στο μυξοειδές στρώμα οι ινοβλάστες που είναι είτε αρνητικοί ή παρουσίασαν πολύ χαμηλή κυτταροπλασματική χρώση για τον Επίτοπο Η. Mag. 100x.



Φωτ. 30: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της φωτ. 29. Mag. 200X.



Φωτ. 31: Μεγαλύτερη μεγέθυνση άλλου τμήματος της φωτ. 28. Κύτταρα τροφοβλάστης θετικά, ινοβλάστες αρνητικοί, ενδοθηλιακή κύτταρα θετικά (βέλη) για τον Επίτοπο H.Mag. 200X



Φωτ. 32

15 % SDS –PAGE: Ανοσοαποτυπώματα κυττάρων χοριακής λάχνης βαμμένα με το αντίσωμα Η εναντίον του Επίτοπου Η και με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 το οποίο αναγνωρίζει έναν Επίτοπο επάνω στην πολυπεπτιδική της αλυσίδα. Το αποτέλεσμα δείχνει ότι ο Επίτοπος Η απαντάται σε πέντε πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη 118,5 KD - 106,3 KD - 85 KD - 53 KD - 36,7 KD στήλη 1 – έκθεση 30'' και στήλη 3 – έκθεση 1'. Η αντίδραση με το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 βάφει τρεις λωρίδες στήλη 2 - έκθεση 30'' και στήλη 4 έκθεση 1'. Παρατηρήστε ότι η δεύτερη από πάνω λωρίδα της κερατίνης 8 συμπίπτει με τη λωρίδα (πολυπεπτίδιο) με Μ.Β. 53 του πολυπεπτιδίου που φέρει τον Επίτοπο Η. Αυτό σημαίνει ότι το πολυπεπτίδιο με Μ.Β. 53 Kd που φέρει τον Επίτοπο Η αντιστοιχεί στην κερατίνη 8, δεδομένου ότι οι λωρίδες που βάφτηκαν με το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 είναι οι ίδιες λωρίδες που βάφτηκαν με το αντίσωμα εναντίον του Επίτοπου Η, αφού αυτές ξεβάφτηκαν από τον Επίτοπο Η και βάφτηκαν εκ νέου με το αντίσωμα της κερατίνης 8.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Αποτελέσματα της έκφρασης του Επίτοπου Η στα κύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση.

Τύπος κυττάρου	Χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά		Χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση	
	Βαθμός έκφρασης Επίτοπου Η	Ποσοστιαία αναλογία έκφρασης Επίτοπου Η	Βαθμός έκφρασης Επίτοπου Η	Ποσοστιαία αναλογία έκφρασης Επίτοπου Η
Συγκυτιοτροφοβλάστη	+/-	100%	+++	100%
Κυτταροτροφοβλάστη	+	100%	+++	100%
Ινοβλάστες	+++	100%	+/-	100%
Ιστιοκύτταρα	+/-	100%	+/-	100%
Ενδοθηλιακά κύτταρα	+++	100%	+++	100%
Ερυθρά αιμοσφαίρια	-	100%	-	100%
Μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες	+	100%		

Βαθμός έκφρασης Επίτοπου Η:	
Αρνητική	-
Πολύ χαμηλή	+/-
Χαμηλή	+
Μέτρια	++
Υψηλή	+++

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κ
Ε
Φ
Α
Λ
Α
Ι
Ο
6^ο

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της έκφρασης του Επίτοπου Η στα κυτταρικά στοιχεία των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, αξίζει να σημειωθούν τα ακόλουθα:

Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η, που σημαίνει ότι η συντριπτική πλειοψηφία >95% των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης παράμεινε αρνητική για τον Επίτοπο Η. Αυτό σημαίνει ότι τα αρνητικά για τον Επίτοπο Η κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης δε φέρουν πολυπεπτίδια, τα οποία φέρουν τον Επίτοπο Η. Αυτό μπορεί να σημαίνει ή ότι δεν παράγονται πολυπεπτίδια, τα οποία φέρουν τον Επίτοπο Η από τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, ή ότι παράγονται πολυπεπτίδια, τα οποία δυνητικά μπορούν να φέρουν τον Επίτοπο Η, αλλά δεν είναι γλυκοζυλιωμένα με το σάκχαρο N -ακετυλογλυκοζαμίνη στις θέσεις των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης <5% που παρουσιάζουν θετικότητα για τον Επίτοπο Η παρουσιάζουν ποιοτικές διαφορές, όσον αφορά στη θετικότητα που παρατηρείται μεταξύ των θετικά βαμμένων για τον Επίτοπο Η κυττάρων. Υπάρχουν κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης με βαμμένη μόνο την ελεύθερη ψηκτροειδή επιφάνειά τους, και κύτταρα με διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση μέτριας και σπανιότερα έντονης έντασης χρώσης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το γεγονός ότι είτε το πολυπεπτίδιο ή τα πολυπεπτίδια τα οποία φέρουν τον Επίτοπο Η και τα οποία παρατηρούνται στην ψηκτροειδή επιφάνεια είναι διαφορετικά από αυτά που φέρουν τον Επίτοπο Η και τα οποία παρατηρούνται διάχυτα στο κυτταρόπλασμα ή ότι τα κύτταρα με διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση, παράγουν και γλυκοζυλιώνουν μεγάλες ποσότητες του πολυπεπτιδίου ή των πολυπεπτιδίων που παρατηρούνται στην ψηκτροειδή επιφάνεια και λόγω των πολύ μεγάλων ποσοτήτων αυτά τα πολυπεπτίδια παρατηρούνται τώρα διάχυτα και στο κυτταρόπλασμα.

Τέλος, υπάρχει η περίπτωση να συμβαίνουν και τα δύο παραπάνω εναλλακτικά σενάρια, δηλαδή, τα κύτταρα με μέτρια και έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση να παράγουν και μεγάλες ποσότητες πολυπεπτιδίου ή πολυπεπτιδίων ελεύθερης ψηκτροειδούς επιφάνειας, τα οποία έτσι παρατηρούνται και στο κυτταρόπλασμα, και επιπλέον να παράγουν και επιπρόσθετα πολυπεπτίδια με κυτταροπλασματική μόνο κατανομή. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με μυξοειδή

υδρωπική εκφύλιση παρουσίασαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερμηνεύεται ότι πρακτικά όλα τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης παρουσίασαν θετικότητα για τον Επίτοπο Η και μάλιστα τα περισσότερα κύτταρα παρουσίασαν έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση και σε μικρότερο ποσοστό μέτρια διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση με πολύ λίγα κύτταρα να δείχνουν ελαφρά διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση φέρουν αυξημένη ποσότητα πολυπεπτιδίων με τον Επίτοπο Η. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται ή σε αύξηση του ποσού των πολυπεπτιδίων, τα οποία ήταν παρόντα έστω και στα λίγα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης στις φυσιολογικές χοριακές λάχνες, ή σε παραγωγή νέων πολυπεπτιδίων, ή στο συνδυασμό και των δύο παραπάνω σεναρίων, δηλαδή και στην αύξηση της ποσότητας των πολυπεπτιδίων των παρόντων στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις φυσιολογικές χοριακές λάχνες και στην παραγωγή νέων επιπρόσθετων πολυπεπτιδίων. Τέτοιες αυξήσεις της έκφρασης του Επίτοπου Η έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία και για άλλους τύπους κυττάρων. Στα αστροκύτταρα των φυσιολογικών εγκεφάλων παρατηρείται χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η, ενώ σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις στον εγκέφαλο, όπου δημιουργούνται αντιδραστικά αστροκύτταρα παρατηρείται υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η στα αντιδραστικά αστροκύτταρα (Arvanitis D.L. et al 2001). Τα επενδυματικά κύτταρα των φυσιολογικών εγκεφάλων παρουσιάζουν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η, ενώ τα επενδυματικά κύτταρα εγκεφάλων με αλλοιώσεις υπόξεικής εγκεφαλοπάθειας παρουσιάζουν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η (Arvanitis L.D. et al 2010). Στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, τόσο τα αντιδραστικά αστροκύτταρα, όσο και τα επενδυματικά κύτταρα των εγκεφάλων με αλλοιώσεις υποξεικής εγκεφαλοπάθειας, βρίσκονται κάτω από καταστάσεις στρες (stress). Μία εξήγηση, επομένως, για την αύξηση του Επίτοπου Η στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αύξηση του Επίτοπου Η στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά βρίσκονται κάτω από συνθήκες stress στις λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, σε σύγκριση με τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης όσον αφορά στην έκφραση του Επίτοπου Η στις χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση ακολουθούν ένα παρόμοιο αλλά όχι ταυτόσημο πρότυπο με τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση του Επίτοπου Η, σε σύγκριση με τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι στην πρώτη παραπάνω κατηγορία (χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση) τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η, ενώ τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των φυσιολογικών χοριακών λαχνών παρουσίασαν χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η. Αναλυτικότερα, ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων κυτταροτροφοβλάστης στις φυσιολογικές χοριακές λάχνες παρέμεινε αρνητικός για τον Επίτοπο Η που σημαίνει ότι είτε δεν παράγουν πολυπεπτίδια που φέρουν τον Επίτοπο Η, είτε παράγονται πολυπεπτίδια τα οποία δυνητικώς μπορούν να γλυκοζυλιωθούν με το σάκχαρο N- ακετυλογλυκοζαμίνη στις θέσεις σερίνης και θρεονίνης, αλλά παραμένουν χωρίς γλυκοζυλίωση.

Τα θετικώς βαμμένα κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης παρουσίασαν ποιοτικές διαφορές όσον αφορά στην χρώση τους. Το πρωϊμότερο σημάδι θετικότητας ήταν μία έντονη χρώση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στην περιοχή επαφής της κυτταροτροφοβλάστης με την συγκυτιοτροφοβλάστη. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν πολυπεπτίδιο ή πολυπεπτίδια με τον Επίτοπο Η σ' αυτήν την περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτό είναι ένα ενδιαφέρον εύρημα δεδομένου ότι δείχνει ότι η κυτταροπλασματική μεμβράνη της κυτταροτροφοβλάστης είναι πολωμένη, δηλαδή έχει διαφορετική σύσταση πολυπεπτιδίων στην επιφάνεια που ενώνεται με την συγκυτιοτροφοβλάστη σε σχέση με την υπόλοιπη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα κύτταρα που παρουσιάζουν διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση συνθέτουν αυξημένο αριθμό πολυπεπτιδίου ή πολυπεπτιδίων με τον Επίτοπο Η, που μπορεί εν μέρει να ανήκουν στα πολυπεπτίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τα οποία λόγω περίσσειας υπάρχουν τώρα και στο κυτταρόπλασμα ή σε σύνθεση νέου πολυπεπτιδίου ή πολυπεπτιδίων με κυτταροπλασματική μόνο εντόπιση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της

έρευνας, πρακτικά, όλα τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των λαχνών με μυξοειδή εκφύλιση παρουσιάζουν διάχυτη έντονη ή μέτρια κυτταροπλασματική χρώση. Η χρώση μπορεί να οφείλεται είτε σε αύξηση των πολυπεπτιδίων με τον Επίτοπο Η, τα οποία παρατηρούνται στα θετικώς βαμμένα κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης στις φυσιολογικές χοριακές λάχνες, είτε επιπλέον στην παρουσία νέου πολυπεπτιδίου ή πολυπεπτιδίων επιπρόσθετα των υπαρχόντων στα κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης των φυσιολογικών χοριακών λαχνών.

Η εξήγηση για την αύξηση της έκφρασης του Επίτοπου Η στην κυτταροτροφοβλάστη των χοριακών λαχνών με μυξοειδή εκφύλιση μπορεί να είναι η ίδια με την εξήγηση για την αύξηση του Επίτοπου Η στην συγκυτιοτροφοβλάστη, δηλαδή η μυξοειδής εκφύλιση προκαλεί μία κατάσταση stress στην κυτταροτροφοβλάστη με αποτέλεσμα την αύξηση του Επίτοπου Η που περιέχει το σάκχαρο N –ακετυλογλυκοζαμίνη.

Οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά έδειξαν υψηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η, ενώ οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση έδειξαν πολύ χαμηλή έκφραση για τον Επίτοπο Η. Αυτό μπορεί να οφείλεται ή σε πολύ ελαττωμένη σύνθεση του πολυπεπτιδίου ή των πολυπεπτιδίων που φέρουν τον Επίτοπο Η στους ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή εκφύλιση ή σε πολύ ελαττωμένη γλυκοζυλίωσή τους ή στον συνδυασμό και των δύο παραπάνω γεγονότων. Γιατί όμως οι ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρουσιάζουν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η, δηλαδή πολύ μεγάλη ελάττωση του σε σχέση με τους ινοβλάστες των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα κύτταρα της τροφοβλάστης; Ο παράγοντας ή οι παράγοντες που προκαλούν την αύξηση του Επίτοπου Η στα κύτταρα της τροφοβλάστης είναι ο ίδιος ή οι ίδιοι παράγοντες που προκαλούν την ελάττωση της έκφρασης του Επίτοπου Η στους ινοβλάστες, δεδομένου ότι πρόκειται για τις ίδιες χοριακές λάχνες που βρίσκονται κάτω από την ίδια επίδραση του παράγοντος ή των παραγόντων που προκαλούν την μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση. Με μία επιφανειακή θεώρηση το γεγονός αυτό φαίνεται παράξενο, γι' αυτό θα προσπαθήσουμε να δώσουμε μία εξήγηση βάσει των δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Η γλυκοζυλίωση των πολυπεπτιδίων με το σάκχαρο N -ακετυλογλυκοζαμίνη γίνεται στο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης, γι' αυτό ονομάζεται και O -

γλυκοζυλίωση με την N – ακετυλογλυκοζαμίνη, από το O του οξυγόνου της ρίζας του υδροξυλίου (-OH). Είναι γνωστό ότι και η φωσφορυλίωση των πολυπεπτιδίων με την ρίζα (PO₄) γίνεται στο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης. Επομένως, υπάρχει ένας ανταγωνισμός μεταξύ της γλυκοζυλίωσης και της φωσφορυλίωσης για τις ρίζες υδροξυλίου των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης. Σε ορισμένα πολυπεπτίδια, μάλιστα, η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση γίνονται στο ίδιο αμινοξύ, στην ίδια θέση του πολυπεπτιδίου, όπως στην πρωτεΐνη C -myc όπου η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση γίνονται στο υδροξύλιο του αμινοξέος θρεονίνης στη θέση 58 της πολυπεπτιδικής αλυσού. Ο ανταγωνισμός μπορεί να υφίσταται, ακόμα και αν η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση δε γίνονται στο ίδιο αμινοξύ στην ίδια θέση της πολυπεπτιδικής αλυσού, αλλά σε γειτονικές θέσεις, γιατί στον τρισδιάστατο χώρο η μία θέση είναι τόσο κοντά στην άλλη, ούτως ώστε ο όγκος του σακχάρου N -ακετυλογλυκοζαμίνη να εμποδίζει τη ρίζα PO₄ να πάει στην θέση της αν το σάκχαρο έχει καταλάβει πρώτο τη θέση του ή να συμβαίνει και το αντίθετο, αν η ρίζα PO₄ έχει καταλάβει τη θέση της στην πολυπεπτιδική αλυσού πριν το σάκχαρο N -ακετυλογλυκοζαμίνη. Αυτό είναι το φαινόμενο της *στερεοχημικής παρεμπόδισης*. Έτσι, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αν αυξάνεται το γενικό επίπεδο φωσφορυλίωσης των πολυπεπτιδίων ενός κυττάρου, τότε ελαττώνεται το γενικό επίπεδο γλυκοζυλίωσης με την O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Έτσι, σε κυτταροκαλλιέργειες στις οποίες χορηγείται οκαδαϊκό οξύ, το οποίο αναστέλλει τις φωσφατάσες που αφαιρούν τις φωσφορικές ρίζες από τα πολυπεπτίδια και επομένως αυξάνεται το επίπεδο της φωσφορυλίωσης, παρατηρείται ελάττωση της O-γλυκοζυλίωσης με την N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Όταν, όμως, χορηγείται PUGNAC που αναστέλλει την εξοζαμινιδάση, που αφαιρεί την O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και επομένως αυξάνεται το γενικό επίπεδο της γλυκοζυλίωσης, τότε παρατηρείται ελάττωση του γενικού επιπέδου της φωσφορυλίωσης. Το παραπάνω σχήμα αύξησης φωσφορυλίωσης με αντίστοιχη ελάττωση της γλυκοζυλίωσης και το αντίθετο, αποτελεί έναν γενικό κανόνα, στον οποίο παρατηρούνται εξαιρέσεις.

Έτσι, σε μια εργασία (Wang Z. et al. 2007), κατά την οποία χορηγήθηκε λίθιο σε κυτταροκαλλιέργειες COS7 κυττάρων από νεφρούς - το οποίο αναστέλλει την κινάση 3 της συνθετάσης του γλυκογόνου - παρατηρήθηκε αύξηση της O-γλυκοζυλίωσης με το σάκχαρο N - ακετυλογλυκοζαμίνη σε 10 πρωτεΐνες, και, προς μεγάλη έκπληξη, ελάττωση της

γλυκοζυλίωσης σε 19 πρωτεΐνες. Πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι η κινάση 3 της συνθετάσης του γλυκογόνου φωσφορυλιώνει αρκετές πρωτεΐνες και εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών οδών. Έτσι, το παραπάνω πείραμα μας δείχνει την πολυπλοκότητα των εμπλεκόμενων οδών μεταξύ γλυκοζυλίωσης και φωσφορυλίωσης και ότι το ίδιο ερέθισμα (εδώ η αναστολή της συνθετάσης 3 του γλυκογόνου) μπορεί να προκαλέσει σε άλλα πολυπεπίδια αύξηση της γλυκοζυλίωσης και σε άλλα πολυπεπίδια ελάττωση της γλυκοζυλίωσης.

Με βάση το παραπάνω πείραμα, μπορεί να υποτεθεί ότι η ομάδα των πολυπεπτιδίων που φέρει τον Επίτοπο Η στους ινοβλάστες είναι διαφορετική από την ομάδα των πολυπεπτιδίων που φέρει τον Επίτοπο Η στα κύτταρα της τροφοβλάστης. Με τη μέθοδο του western - blot βρέθηκε ότι υπάρχουν 5 πολυπεπίδια που φέρουν τον Επίτοπο Η στις χοριακές λάχνες των παλινδρομών κυήσεων. Δεν είναι δυνατόν όμως να γνωρίζουμε ποια από αυτά τα πολυπεπίδια ανήκουν στους τροφοβλάστες και ποια στους ινοβλάστες. Το μόνο σίγουρο είναι ότι η κερατίνη 8 που ανιχνεύθηκε με το western -blot ανήκει στην τροφοβλάστη.

Η έκφραση του Επίτοπου Η στα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση είναι πολύ χαμηλή και στις δύο κατηγορίες, που σημαίνει ότι ο παράγοντας ή οι παράγοντες που προκαλούν τη μυξοειδή εκφύλιση των χοριακών λαχνών δεν επηρεάζει τα επίπεδα των πολυπεπτιδίων που φέρουν τον Επίτοπο Η στα ιστιοκύτταρα. Η έκφραση του Επίτοπου Η στα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση υπήρξε πολύ υψηλή και στις δύο κατηγορίες λαχνών, που σημαίνει ότι ο παράγοντας ή οι παράγοντες που προκαλούν μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση των χοριακών λαχνών δεν επηρεάζουν το γενικό επίπεδο των πολυπεπτιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων που φέρουν τον Επίτοπο Η.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (εμπύρνηνα ή απύρνηνα) των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρέμειναν αρνητικά για τον Επίτοπο Η, που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν πολυπεπίδια στα ερυθρά αιμοσφαίρια που φέρουν τον Επίτοπο Η, είτε κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις ή κάτω από καταστάσεις που προκαλούν μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση των χοριακών λαχνών στις παλινδρομες κυήσεις.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κ
Ε
Φ
Α
Λ
Α
Ι
Ο
7⁰

Στην παρούσα διατριβή εξετάσθηκαν οι χοριακές λάχνες από 60 περιπτώσεις παλίνδρομων κυήσεων, όπου η κάθε περίπτωση περιλάμβανε λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά και λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, με τη μέθοδο της έμμεσης ανοσοϋπεροξειδάσης και του western-blot (ανοσοαποτυπώματος πρωτεϊνών) για τη μελέτη της έκφρασης του Επίτοπου Η.

Ο Επίτοπος Η περιλαμβάνει το σάκχαρο O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, τοποθετημένο κατά ένα ειδικό τρόπο στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και/ή γειτονικό τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, και αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού της τάξης IgM.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έχουν ως εξής:

1. Ο Επίτοπος Η παρατηρήθηκε σε 5 πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη 118,5 KD, 106,3 KD, 85 KD, 53 KD, ΚΑΙ 36,7 KD.
2. Ένα από τα πολυπεπτίδια που φέρουν τον Επίτοπο Η είναι η κερατίνη 8, η οποία αντιστοιχεί στο πολυπεπτίδιο με το μοριακό βάρος 53 KD.
3. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά έδειξαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
4. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση έδειξαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
5. Οι μεμονωμένες συγκυτιοτροφοβλάστες μεταξύ των χοριακών λαχνών παρουσίασαν χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
6. Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
7. Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
8. Τα κύτταρα των ινοβλαστών των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
9. Τα κύτταρα των ινοβλαστών των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
10. Τα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).
11. Τα ιστιοκύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση του Επίτοπου Η σε όλες τις περιπτώσεις (100%).

12. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου H σε όλες τις περιπτώσεις (100%).

13. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των χοριακών λαχνών με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, παρουσίασαν υψηλή έκφραση του Επίτοπου H σε όλες τις περιπτώσεις (100%).

14. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα στις χοριακές λάχνες με φυσιολογικά χαρακτηριστικά παρουσίασαν αρνητική έκφραση του Επίτοπου H σε όλες τις περιπτώσεις (100%).

15. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα στις χοριακές λάχνες με μυξοειδή υδρωπική εκφύλιση, παρουσίασαν αρνητική έκφραση του Επίτοπου H σε όλες τις περιπτώσεις (100%).

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η μυξοειδής υδρωπική εκφύλιση των χοριακών λαχνών προκαλεί μεγάλη αύξηση της έκφρασης του Επίτοπου H στα κύτταρα της συγκυτιοτροφολάστης και της κυτταροτροφολάστης, και μεγάλη ελάττωση της έκφρασης του Επίτοπου H στους ινοβλάστες, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα των χοριακών λαχνών με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ Robbins & Cotran

ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ Langman's

1. E.B. Arias, J. Kim, G.D. Cartee. Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* 53 (2004) 921-930.
2. Arvanitis DL, Kouklis P, Mori de Moro G, Goutas N, Kittas C and Szuchet S (1995). Immunostaining of ductal breast carcinomas with the monoclonal antibody H. *Oncol Rep* 2, 991-995.
3. Arvanitis DL, Stavridou AL, Mori de Moro G and Szuchet S (2001). Reactive astrocytes upregulate one or more gene products that are recognized by monoclonal antibody H. *Cell Tissue Res* 304, 11-19.
4. Arvanitis DL, Arvanitis LD, Panourias IG, Kitsoulis P and Kanavaros P (2005a). Mitochondria-rich normal, metaplastic and neoplastic cells show overexpression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H. *Pathol Res Pract* 21, 319 -324.
5. Arvanitis DL, Arvanitis LD, Panourias IG, Kitsoulis P and Kanavaros P (2005b). The expression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H is higher in astrocytomas compared to anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Histol Histopathol* 20, 1057-1063.
6. Arvanitis L.D, VassiouK., Kotrotsios A., Sgantzios M., (2010). Hypoxia up-regulates the expression of the o-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in human ependymal cells.
7. A M.G, Buse, K.A. Robinson, B.A. Marshall, R.C. Hresko, MM. Mueckler, Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles, *Am. J. Physiol: Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E241-E250.
8. X. Cheng, R.N. Cole, J. Zaia, G.W. Hart, Alternative O-glycosylation/ Ophosphorylation of the murine estrogen receptor beta, *Biochemistry* 39 (2000) 11609-11620.
9. X. Cheng, G.W. Hart, Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10570-10575
10. T.-Y. Chou, G.W. Hart, C.V. Dang, c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas, *J. Biol. Chem.* 270 (32) (1995) 18961-18965.
11. C.-F. Chou, A.J. Smith. M.B. Omary, Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3901-3906.
12. C.-F. Chou, M.B. Omary, Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4465-4472.
13. X.L. Du, D. Edelstein, L. Rossetti, I.G. Fantus, H. Goldberg, F. Ziyadeh, J. Wu, M. Brownlee. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Spl glycosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 12222-12226

14. X.L. Du, D. Edenstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, M. Brownlee, Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1341-1348.
15. Y. Gao, L. Wells, F.I. Comer, G.J. Parker, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9838-9845.
16. C. Guinez, J. Lemoine, J.C. Michalski, T. Lefebvre, 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 21-26.
17. G. Guinez, W. Morelle, J.C. Michalski, T. Lefebvre, O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 765-774.
18. R.S. Haltiwanger, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Glycosylation in the cytoplasm and the nucleus: purification and characterization of the O-GlcNAc transferase, *Glycoconjugate J.* 8 (1991) 212 (0).
19. R.S. Haltiwanger, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine: polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 9005-9013.
20. R.S. Haltiwanger, K. Grove, G.A. Philipsberg, Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O - (2 - acetamido - 2 - deoxy - D - gluco-pyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3611-3617.
21. A.I. Han, J.E. Kudlow, Reduced O glycosylation of Sp 1 is associated with increased proteasome susceptibility, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 2550-2558.
22. J.A. Hanover, C.K. Cohen, M.C. Willingham, K. Partridge, N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9887-9894.
23. Havaki S, Kittas C, Marines E, Dafni U, Sotiropoulou C, Voloudakis-Baltatzis I, Goutas N, Vassilaros SD, Athanassiou E, and Arvanitis DL (2003). Ultrastructural immunostaining of infiltrating ductal breast carcinomas with the monoclonal antibody H: a comparative study with cytokeratin 8. *Ultrastructural Pathol* 27, 393-407.
24. G.D. Holt, G.W. Hart, The subcellular distribution of terminal N- acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 8049-8057.
25. G.D. Holt, C.M. Snow, A. Senior, R.S. Haltiwanger, L. Gerace, G.W. Hart. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine, *J. Cell Biol.* 104 (1987) 1157-1164.
26. T.-T. Hsieh, P. Fustier, S.L. Zhang, J.G. Filep, S.S. Tang, J.R. Ingelfinger, L.G. Fantus, P. Horne, J.S. Chan, High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells, *Endocrinology* 144 (2003) 4338-4349.
27. S.P. Jackson, R. Tjian, O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation, *Cell* 55 (1988) 125-133.
28. K. Kamemura, B.K. Hayes, F.I. Comer, G.W. Hart, Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of

THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19229-19235.

29. W.G. Kelly, M.E. Dahmus, G.W. Hart, RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10416-10424.

30. T. Lefebvre, C. Cieniewski, J. Lemoine, Y. Guerardel, Y. Leroy, J.P. Zanetta, J.C. Michalski, Identification of N-acetyl-D-glucosamine -specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins, *Biochem. J.* 360 (2001) 179-188.

31. D.C. Love, J. Kochan, R.L. Cathey, S.H. Shin, J.A. Hanover, Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 647-654.

32. J.A. Matthews, M. Acevedo-Duncan, R.L. Potter, Selective decrease of membrane-associated PKC-alpha and PKC-epsilon in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells, *Biochim Biophys Acta* 1743 (2005) 305-315

33. D.A. McClain, Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes, *J. Diabetes its Complicat.* 16 (2002) 72-80

34. I. Noyman. M. Mankovsky, S. Sasson, A.H. Stark, K. Bemath, R. Seger, Z. Madar. Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase activity in endothelial cells, *Nitric Oxide* 7 (2002) 187-193.

35. M.K. Park, M. D'Onofrio, M.C. Willingham, J.A. Hanover, A monoclonal antibody against a family of nuclear pore proteins (nucleoporins): O-linked N-acetylglucosamine is part of the immunodeterminant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 6462-6466.

36. S. Y. Park, J. Ryu, W. Lee, O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes, *Exp. Mol. Med.* 37 (2005) 220-229.

37. C.A. Pasternak, J.E. Aiyathurai, V. Makinde, A. Davies, S.A. Baldwin, E.M. Konieczko, C.C. Widnell, Regulation of glucose uptake by stressed cells, *J. Cell Physiol.* 149 (1991) 324-331.

38. M.E. Patti, A. Virkamaki, E.J. Landaker, C.R. Kahn, H. Yki-Jarvinen, Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle, *Diabetes* 48 (1999) 1562-1571.

39. Polyzos P, Arvanitis LD, Charchanti A, Galani V, Havaki S, Kallioras VA, Nakou M, Faros EG, Marines E, Sgantzios MN and Kittas C (2006). Decidualized and pre-decidualized normal endometrial stromal cells produce more O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H than non-decidualized normal endometrial stromal cells. *Histol Histopathol* 21, 1193-1198

40. M.K. Ray, B. Datta, A. Chakraborty, A. Chattopadhyay, S. Meza-Keuthen, N.K. Gupta, The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 539-543.

41. Sgantzios MN, Polyzos P, Arvanitis LD, Charchanti A, Galani V, Havaki S, Kallioras VA, Nakou M, Faros EG, Marinos E, Sgantzios MN and Kittas C (2006). Expression of the O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in normal myometrium and uterine smooth muscle cell tumors. *Pathol Res Pract* 203, 31-37

42. C. Slawson, N.E. Zachara, K. Vosseller, W.D. Cheung, M.D. Lane, G.W. Hart, Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32944-32956

43. C.M. Snow, A. Senior, L. Gerace, Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore

- complex glycoproteins, *J. Cell Biol.* 104 (1987) 1143-1156
44. K.C. Sohn, K.Y. Lee, J.E. Park, S.I. Do, OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 1045-1051.
 45. E.V. Sviderskaya, E. Jazrawi, S.A. Baldwin, C.C. Widnell, C.A. Pasternak, Cellular stress causes accumulation of the glucose transporter at the surface of cells independently of their insulin sensitivity, *J. Membr. Biol.* 149 (1996) 133-140.
 46. A.P. Warren, M.H. James, D.E. Menzies, C.C. Widnell, P.A. Whitaker-Dowling, C.A. Pasternak, Stress induces an increased hexose uptake in cultured cells. *J. Cell. Physiol.* 128 (1986) 383-388.
 47. L. Wells, Y. Gao, J.A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1755-1761.
 48. L. Wells, Y. Gao, J.A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1755-1761.
 49. L. Wells, L.K. Kreppel, F.I. Comer, B.E. Wadzinski, G.W. Hart, O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38466-38470.
 50. K. Vosseller, L. Wells, M.D. Lane, G.W. Hart, Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5313-5318.
 51. X. Yang, K. Su, M.D. Roos, Q. Chang, A.J. Paterson, J.E. Kudlow, O-linkage of N-acetylglucosamine to Spl activation domain inhibits its transcriptional capability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 6611-6616.
 52. N. E. Zachara, N. O'Donnell, W.D. Cheung, J.J. Mercer, J.D. Marth, G.W. Hart, Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30133-30142.
 53. N. E. Zachara, W.D. Cheung, G.W. Hart, O-GlcNAc, an essential posttranslational modification of nucleocytoplasmic proteins, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 369-383.
 54. N.E. Zachara. G.W Hart, O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress, *Biochim. Biophys. Acta* 1673 (2004) 13-28.
 55. F. Zhang, K. Su, X. Yang, D.B. Bowe, A.J. Paterson, J.E. Kudlow, O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115 (2003) 715-725.