ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ

Διευθύντρια: κα Μπαργιώτα Αλεξάνδρα

Διδακτορική Διατριβή

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΠΟΥ ΕΚΛΥΕΙ ΤΗΝ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗ (CRH) ΣΤΗΝ ΠΡΟ-/ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ»

υπό

ΦΙΛΙΠΟΝΗ ΜΑΡΙΑΣ

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

© 2020 ΦΙΛΙΠΟΝΗ ΜΑΡΙΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6η/22-01-2020 ΓΣΕΣ):

1ος Εξεταστής: (Επιβλέπουσα)	**Μπαργιώτα Αλεξάνδρα** Επίκουρος Καθηγήτρια, Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2ος Εξεταστής:	**Λιάκος Παναγιώτης** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3ος Εξεταστής:	**Σκουλαρίγκης Ιωάννης** Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4ος Εξεταστής:	**Νταφόπουλος Κωνσταντίνος** Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5ος Εξεταστής:	**Δαπόντε Αλέξανδρος** Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6ος Εξεταστής:	**Στεφανίδης Ιωάννης** Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7ος Εξεταστής:	**Ελευθεριάδης Θεόδωρος** Αναπληρωτής Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Φτάνοντας πλέον στο τέλος της διατριβής μου νιώθω ιδιαίτερη χαρά να ευχαριστήσω τους σημαντικότερους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτού του σημαντικού έργου. Αρχικά, ευχαριστώ πολύ θερμά την επιβλέπουσα Επίκουρο καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας κα Μπαργιώτα Αλεξάνδρα για την πολύτιμη βοήθειά της στην υπεράσπιση αυτής της μελέτης, την κατανόηση, καθοδήγηση και υπομονή της κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας.

Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εμπνευστή αυτής της μελέτης τον τέως Αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας κ. Κουκούλη Γεώργιο, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία εκπόνησης αυτής της διατριβής. Υπήρξε αρωγός στην όλη προσπάθειά μου όλα αυτά τα χρόνια, στήριγμα, σύμβουλος και καθοδηγητής. Τον ευχαριστώ πολύ για την αμέριστη συμπαράστασή του και βοήθεια σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα. Νιώθω ιδιαίτερη τιμή που τον είχα καθηγητή μου. Αποκόμισα πολλά και σημαντικά εφόδια για τη ζωή μου και έμαθα να χρησιμοποιώ κριτικά τη σκέψη μου, όπως με συμβούλευε συχνά.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, κ.Λιάκο Παναγιώτη, που ήταν δίπλα μου πάντα όταν χρειαζόμουν βοήθεια, πρόθυμος να με βοηθήσει σε οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα είχα. Τον ευχαριστώ θερμά για τον χρόνο που μου διέθετε στην αξιολόγηση και ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων μου και χάρη στις υποδείξεις του ολοκληρώθηκε με επιτυχία αυτή η μελέτη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον Καθηγητή Καρδιολογίας, κ.Σκουλαρίγκη Ιωάννη, που δέχτηκε να διαβάσει και να κρίνει την παρούσα διατριβή.

Στην πορεία αυτών των χρόνων εκτός του ότι έλαβα πολύτιμα μαθήματα για την επιστημονική μου πορεία, έκανα επίσης και αξιόλογους φίλους. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρα Γκούγκουρα Σοφία για τη συνεργασία της, την απλόχερη βοήθειά της σε ότι χρειαζόμουν, τη συμπαράσταση και τη φιλία της.

Ευχαριστώ πολύ την Δρα Μπεφάνη Χριστίνα για την ευχάριστη συνεργασία τόσο σε επιστημονικό όσο και προσωπικό επίπεδο. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον φίλο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

και συνάδερφο Dr. Enzo Scifo για τις πολύτιμες συμβουλές του και την ηθική συμπαράστασή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν πρακτικά στη διεξαγωγή των πειραμάτων της διατριβής μου ξεκινώντας από το προσωπικό της ενδοκρινολογικής κλινικής και το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, συνεχίζοντας με τον Διευθυντή του τμήματος τεχνητού νεφρού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας κ.Στεφανίδη Ιωάννη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις υπέροχες κυρίες, Τζούλια και Νάντια, η βοήθεια των οποίων υπήρξε καταλυτική.

Τέλος, ευχαριστώ, από τα βάθη της καρδιάς μου, την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη της στην αποπεράτωση αυτού του πολύτιμου για μένα έργου.

Φιλιπόνη Μαρία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ονοματεπώνυμο: Μαρία Φιλιπόνη

Εθνικότητα: Ελληνική

Ημερομηνία Γέννησης: 04/01/1985

Διεύθυνση Κατοικίας: Άνω Βόλος, Πρ.Ηλίας

Τηλέφωνο εργασίας: 2421026936/37

2002: Απολυτήριο Ενιαίου Γενικού Λυκείου

2008: Πτυχίο Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα με βαθμό «Λίαν Καλώς» (7,21/10,0)

> ***Θέμα Πτυχιακής εργασίας:*** *«Επίδραση του πράσινου τσαγιού και της άσκησης στη συγκέντρωση της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης στο αίμα». Επιβλέπων καθηγητής: κ. Κουρέτας Δημήτριος*

2010: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών: «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες», Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Σχολή επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα με βαθμό «Άριστα» (8,60/10,0)

> ***Θέμα Πτυχιακής εργασίας:*** *«Ανίχνευση ανασυνδυασμών και μεταλλάξεων σε ολόκληρο το γένωμα ενός πολϊοιού». Επιβλέπων καθηγητής: κ. Μαρκουλάτος Παναγιώτης*

2010-2019: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

> ***Θέμα Διδακτορικής Διατριβής:*** *«Μελέτη της δράσης της ορμόνης που εκλύει την κορτικοτροπίνη (CRH) στην προ/αντι-οξειδωτική ισορροπία του ενδοθηλίου παρουσία στεροειδών των γονάδων». Επιβλέπουσα καθηγήτρια: κ. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα*

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Άριστη γνώση, TIE (Επίπεδο C2)

Ιταλικά: Καλή Γνώση, P.L.I.D.A B2 (Progetto Lingua Italiana Dante Alighieri)

Ισπανικά: Μέτρια γνώση (Επίπεδο B1)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

1. **Filiponi E.M.**, Gougoura G.S., Koukoulis N. Estrogens effect on oxidative stress markers and the antioxidant response on endothelial cells. 62ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα 9-11 Δεκεμβρίου 2011.

2. Gougoura G.S., **Filiponi E.M.**, Koukoulis N.G. Urocortin Family Peptides Reverse the Macrophage-Induced Increase In Oxidative Stress and Adhesion Molecules Expression in Endothelial Cells. 62ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB), Αθήνα 9-11 Δεκεμβρίου 2011

3. Γκούγκουρα Σ.Γ., **Φιλιπόνη Μ.Ε.**, Λιάκος Π.Α., Κουκούλης Γ.Ν. In vitro μελέτη της επίδρασης της τεστοστερόνης στο οξειδωτικό φορτίο και τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων ενδοθηλιακών κυττάρων. 38ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Θεσσαλονίκη, 6-9 Απριλίου 2011.

4.Σ.Γ Γκούγκουρα., **Μ.Ε Φιλιπόνη**, Π.Ι Δρίτσα, Π.Α Λιάκος, Γ.Ν Κουκούλης. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) ασκεί αντιρροπιστική δράση στην προκαλούμενη από την υπεργλυκαιμία αύξηση του οξειδωτικού φορτίου σε ενδοθηλιακά κύτταρα. 38ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Θεσσαλονίκη, 6-9 Απριλίου, 2011.

5. **Μ.Ε. Φιλιπόνη**, Σ.Γ. Γκούγκουρα, Γ.Ν. Κουκούλης. Η κινητοποίηση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ενδοθηλίου ως δείκτης της αντιαθηρογόνου δράσης των οιστρογόνων. 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 4-7 Απριλίου, 2012.

6. Σ.Γ. Γκούγκουρα, **Μ.Ε. Φιλιπόνη**, Γ.Ν. Κουκούλης. In Vitro Μελέτη της Δράσης του Λινολεϊκού Οξέος στην αντιοξειδωτική απόκριση του ενδοθηλίου σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας. 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 7-7 Απριλίου, 2012.

7. S. Gougoura, **M. Filiponi**, A. Bargiota, P. Dritsa, G. Koukoulis. Increased nuclear translocation of GAPDH in peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) of diabetic patients.15th International and 14th European congress of Endocrinology (ICE/ECE 2012), Florence, Italy, 5-9 May 2012.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

8. Gougoura S.G, **Filiponi M.E**, Koukoulis G.N. Free Fatty Acids (FFAs) Counterbalance The Glucose Induced Apoptosis of Endothelial Cells In Vitro. 63° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Ηράκλειο, Κρήτη, 9-11 Νοεμβρίου 2012.

9. Σοφία Γκούγκουρα, **Μαρία Φιλιπόνη**, Αλεξάνδρα Μπαργιώτα, Γεώργιος Κουκούλης. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) ενεργεί ως αντιαποπτωτικός παράγων στην προκαλούμενη, ιn vitro, από υπεργλυκαιμία ενεργοποίηση της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ). 13° Πανελλήνιο Κλινικό Συνέδριο Διαβήτη, 27-31 Μαρτίου, 2013.

10. **Μ.Ε Φιλιπόνη**, Σ.Γ Γκούγκουρα, Γ.Ν. Κουκούλης. Μελέτη της έκφρασης της ορμόνης που εκλύει την κορτικοτροπίνη (CRH) στην διατήρηση της ομοιοστασίας του ενδοθηλίου, σε περιβάλλον έντονου οξειδωτικού φορτίου. 40° Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 17-20 Απριλίου, 2013.

11. Σ.Γ. Γκούγκουρα, **Μ.Ε. Φιλιπόνη**, Γ.Ν. Κουκούλης. Ο ρυθμιστικός ρόλος της ενδοκυττάριας CRH στην προκαλούμενη από υπεργλυκαιμία προ-φλεγμονώδη αντίδραση ενδοθηλιακών κυττάρων. 40° Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 17-20 Απριλίου, 2013.

12. **Filiponi Maria**, Gougoura Sophia, Koukoulis Georgios. Estrogens counterbalance the Ang-II-induced oxidative stress in endothelial cells in vitro. 64° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Αθήνα, 6-8 Δεκεμβρίου, 2013.

13. Gougoura G. S., **Filiponi E.M**., Koukoulis N. G. SOD-catalase dipole activity as a marker of a well-balanced antioxidant response in endothelial cells. 64° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Αθήνα, 6-8 Δεκεμβρίου, 2013.

14. **Μ.Ε. Φιλιπόνη,** Σ.Γ. Γκούγκουρα, Α. Μπαργιώτα, Γ.Ν. Κουκούλης. Μελέτη της δράσης της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) στην προ/αντι-οξειδωτική ισορροπία του ενδοθηλίου σε περιβάλλον εκτεθειμένο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης. 41° Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 14-17 Μαΐου, 2014.

15. Σ.Γ. Γκούγκουρα, **Μ.Ε. Φιλιπόνη**, Γ.Ν. Κουκούλης. Ο ρόλος της CRH στο τοπικό σύστημα αυτορύθμισης της φλεγμονής του ενδοθηλίου σε συνθήκες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

υπεργλυκαιμίας. 41ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Αθήνα, 14-17 Μαΐου, 2014.

SFRR-E/IUBMB ΔΙΕΘΝΕΣ SUMMER SCHOOL, ΣΠΕΤΣΕΣ, 24-30 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2012 (GREECE).

Free fatty acids and glucose levels are involved in the regulation of endothelial antioxidant response. **Maria E.Filiponi**, Sofia G.Gougoura, George N.Koukoulis

Βραβείο Σ.Πιτούλη

Σοφία Γκούγκουρα, **Μαρία Φιλιπόνη**, Αλεξάνδρα Μπαργιώτα, Παγώνα Δρίτσα, Γεώργιος Κουκούλης. Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη συνοδεύεται από μεγαλύτερη μετακίνηση της GAPDH στον πυρήνα των περιφερικών μονοκυττάρων (PMCs). Κλινική Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων, Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. 39ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολικών Νόσων. Αθήνα, 4-7 Απριλίου, 2012

Δημοσιεύσεις

1. Pliaka V, **Filliponi ME**, Kyriakopoulou Z, Ruether IG, Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Retrospective molecular and phenotypic analysis of poliovirus vaccine strains isolated in Greece. Clin Microbiol Infect. 2011 Oct;17(10):1554-62. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03470.x. Epub 2011 Mar 7.

2. Zachariou A, **Filiponi M**, Baltogiannis D, Giannakis J, Dimitriadis F, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. Effective treatment of neurogenic detrusor overactivity in multiple sclerosis patients using desmopressin and mirabegron. Can J Urol. 2017 Dec;24(6):9107-9113.

3. A Zachariou, **M Filiponi** and PS Kirana. Translation and validation of the greek version of the female sexual function of the female function index questionnaire. Int J Impot Res. 2017 Apr 20, 1-4.

4. **Filiponi M**, Gougoura SG, Befani C, Bargiota A, Liakos P, Koukoulis GN. 17-β estradiol attenuates the pro-oxidant activity of corticotrophin-releasing hormone in macroendothelial cells. Cell Biol Int. 2019. doi: 10.1002/cbin.11188.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΠΟΥ ΕΚΛΥΕΙ ΤΗΝ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗ (CRH) ΣΤΗΝ ΠΡΟ-/ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ»

ΦΙΛΙΠΟΝΗ ΜΑΡΙΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Μπαργιώτα Αλεξάνδρα:** Επίκουρος Καθηγήτρια, Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)
2. **Λιάκος Παναγιώτης:** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Σκουλαρίγκης Ιωάννης:** Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Περίληψη

Η αθηροσκλήρωση συνιστά μία εξελισσόμενη αρτηριακή διαταραχή που προκαλείται από διάφορους παράγοντες και χαρακτηρίζεται από χρόνια υποκλινική φλεγμονή του ενδοθηλίου. Η ενδοθηλιακή ακεραιότητα είναι ιδιαιτέρως σημαντική για τη μεταβίβαση των απαραίτητων ερεθισμάτων στο αρτηριακό τοίχωμα, τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, την πίεση του αίματος, κλπ, και η διαταραχή αυτής της ακεραιότητας έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

Τα στεροειδή των γονάδων επηρεάζουν τους μηχανισμούς ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης. Επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα ασκούν προστατευτική δράση στο ενδοθήλιο αφού, σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η συχνότητα της αθηροσκλήρωσης αυξάνει μετά την εμμηνόπαυση. Ο ρόλος των ανδρογόνων στη λειτουργία του ενδοθηλίου δεν είναι πλήρως κατανοητός. Υπάρχει διάχυτη αλλά μη τεκμηριωμένη αντίληψη ότι τα ανδρογόνα προάγουν την αθηροσκλήρωση. Ωστόσο, οι γνώσεις μας για τη συμμετοχή ανδρογόνων και οιστρογόνων στην παθοφυσιολογία της χρόνιας φλεγμονής του ενδοθηλίου είναι περιορισμένες.

Σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας του φαινομένου της φλεγμονής είναι η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), γνωστό νευροπεπτίδιο του στρες. Συμμετέχει γενικά στη διαδικασία της φλεγμονής επάγοντας την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και την παραγωγή της κορτιζόλης. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η CRH εκφράζεται τοπικά σε περιφερικούς ιστούς και ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων μέσω παρακρινικής και αυτοκρινικής δράσης. Πρόσφατες παρατηρήσεις μας έδειξαν ότι η CRH εκφράζεται στο ενδοθήλιο και ασκεί προ-οξειδωτική δράση, επάγοντας την προσαρμογή του στο τοπικό στρες μέσω της τροποποίησης των προ- και αντι-οξειδωτικών μηχανισμών, οι οποίοι αποτελούν σημαντικό στοιχείο της φλεγμονώδους διαδικασίας.

Περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η οιστραδιόλη ελαττώνει το οξειδωτικό φορτίο του ενδοθηλίου μέσω ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων ενώ η τεστοστερόνη το επιτείνει. Ωστόσο, άλλες μελέτες δείχνουν θετική επίδραση των φυσιολογικών επιπέδων τεστοστερόνης στο οξειδωτικό φορτίο του ενδοθηλίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Επειδή δεδομένα για την επίδραση οιστρογόνων και ανδρογόνων στην ομοιόσταση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου στο ενδοθήλιο είναι περιορισμένα, και η επίδρασή τους στη δράση της τοπικά παραγόμενης CRH άγνωστη, σχεδιάσαμε την παρούσα μελέτη με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των στεροειδών των γονάδων: α) στους προ- και αντι-οξειδωτικούς μηχανισμούς μακροενδοθηλιακών κυττάρων, της σειράς EAhy926, σε βασικές συνθήκες και β) στη μεταβολή του προ-οξειδωτικού ρόλου της CRH στο ενδοθήλιο.

Στα μακροενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επωάσθηκαν για 2 ώρες παρουσία 17β-οιστραδιόλης (E2), Τεστοστερόνης και Διυδροτεστοστερόνης (DHT), μόνων ή σε συνδυασμό με CRH, μετρήθηκαν: α) η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), β) η ενεργότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS), της καταλάσης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), γ) η συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της γλουταθειόνης (GSH) και υπολογίστηκε ο λόγος GSH/GSH+GSSG. Για την εκτίμηση του μηχανισμού δράσης των ορμονών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικοί ανταγωνιστές των οιστρογονικών και ανδρογονικών υποδοχέων αντίστοιχα.

Η μελέτη μας έδειξε, ότι σε βασικές συνθήκες η E2, μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων, αύξησε τη δραστικότητα της eNOS και την παραγωγή του NO, τη δραστικότητα της SOD και της καταλάσης και τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης, δράσεις που συνοδεύτηκαν από ελάττωση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντίστοιχα, τα ανδρογόνα, μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα, είχαν παρόμοια επίδραση στη δραστικότητα της eNOS, την παραγωγή NO και τη δραστικότητα της SOD, ενώ μείωσαν σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης και δεν είχαν σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης, δράσεις που συνοδεύτηκαν από αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου.

Όσον αφορά στις επιδράσεις της 17β-οιστραδιόλης στην προ-οξειδωτική δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η παρουσία E2 οδήγησε σε αναστροφή της ανασταλτικής δράσης της πρώτης στη δραστικότητα της eNOS και την παραγωγή του NO, προκαλώντας περαιτέρω σημαντική αύξησή τους. Επίσης, η παρουσία της E2 δεν επηρέασε την προκαλούμενη από τη CRH αυξημένη δραστικότητα της SOD, ενίσχυσε την προκαλούμενη από τη CRH αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης, ενώ προκάλεσε μικρή ελάττωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης η οποία όμως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

παρέμεινε σημαντικά αυξημένη. Αυτές οι επιδράσεις συνοδεύτηκαν από εξουδετέρωση της προκαλούμενης από τη CRH αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και επαναφορά του σε επίπεδα μικρότερα του δείγματος αναφοράς (control). Αντίστοιχα, η τεστοστερόνη και η DHT εξουδετέρωσαν την προκαλούμενη από τη CRH ελάττωση της eNOS και την παραγωγή του NO, την αύξηση της καταλάσης ενώ ενίσχυσαν την προκαλούμενη από την CRH αύξηση της SOD και του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα ασκούν συστηματική αντιοξειδωτική δράση στο αγγειακό ενδοθήλιο, μέσω επίδρασης στο σύνολο των προ- και αντι-οξειδωτικών μηχανισμών, ενώ εξουδετερώνουν την ανασταλτική επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS και την παραγωγή του NO οδηγώντας σε ελάττωση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου. Σε αντίθεση με τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα φαίνεται ότι ασκούν προ-οξειδωτική δράση μέσω της αύξησης της δραστικότητας της eNOS, της παραγωγής NO, της δραστικότητας της SOD, και μείωση της δραστικότητας της καταλάσης, αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο. Παράλληλα, εξουδετερώνουν, όπως και τα οιστρογόνα, την ανασταλτική επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS και την παραγωγή του NO και επιπρόσθετα τη διεγερτική της επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης ενισχύοντας το ήδη αυξημένο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο. Οι ως άνω επιδράσεις τεκμηριώνουν τη σημαντική επίδραση των στεροειδών του φύλου στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του οξειδωτικού φορτίου των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της τροποποίησης των προ- και αντι-οξειδωτικών μηχανισμών.

Λέξεις κλειδιά: Αθηροσκλήρωση, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), 17β-οιστραδιόλη, τεστοστερόνη, διυδροτεστοστερόνη, οξειδωτικό στρες, αντιοξειδωτικά ένζυμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Summary

Atherosclerosis, a progressive arterial disorder, is caused by several factors and characterized by chronic subclinical inflammation of the endothelium. Endothelial tissue integrity is particularly important for transmission of impulses in the arterial wall, regulation of vascular tone, blood pressure, etc, and its disruption has been implicated in the progression of atherosclerosis.

Steroid hormones are implicated in the regulation of developmental mechanisms of atherosclerosis. Epidemiological studies indicate that estrogens have a protective effect on the endothelium, as evidenced by lower incidences of atherosclerosis in premenopausal women in comparison to their postmenopausal counterparts. However, the role of androgens in the regulation of the endothelium is not fully elucidated. It is thought that androgens may induce atherosclerosis. However, the current knowledge on how estrogens and androgens participate in the pathophysiology of chronic endothelial inflammation is limited.

An important regulator of inflammation is Corticotropin releasing hormone (CRH), a well known stress neuropeptide. In general, CRH participates in inflammation by inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines and production of cortizole. According to the literature, CRH is expressed locally in peripheral tissues and regulates cell function through its paracrine and autocrine effects. Our recent studies show that CRH is expressed on the endothelium and exerts a pro-oxidative effect, inducing its adaptation to local stress by modifying pro- and anti- oxidative mechanisms, that constitute important factors of inflammation.

There is limited data indicating that estradiol decreases endothelial oxidative stress by activating anti-oxidative enzymes, whereas testosterone induces oxidative stress. However, there are also studies that show a positive effect of physiological levels of testosterone on the oxidative burden of the endothelium.

Given the limited data about the effect of estrogens and androgens on the homeostasis of cellular oxidative burden of the endothelium and that their effect on locally produced CRH effect is unknown, we designed this study in order to investigate the effect of steroid gonadals on: a) pro- and anti-oxidative mechanisms of

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

macroendothelial cell line EAhy926, in normal conditions and b) the modification of the pro-oxidative role of CRH on the endothelium.

The endothelial cell line EAhy926 was incubated for 2h with 17β-estradiol (E2), testosterone and dihydrotestosterone (DHT), alone or in combination with CRH. Our experimental protocol involved the assessment of intracellular reactive oxygen species (ROS) content, activities of endothelial synthase of NO (eNOS), catalase and superoxide dismutase (SOD), as well as the production of nitric oxide (NO), glutathione (GSH) and the Ratio GSH/GSH+GSSG of the macroendothelial cells. In order to evaluate the hormone's mechanisms of action we used selective inhibitors of the estrogens and androgens receptors.

Our findings indicate that E2 under normal conditions, through estrogen receptors (ERs) increased: the activity of eNOS and NO production, the activities of SOD and catalase, as well as GSH concentration, effects that were accompanied by decreased oxidative stress in endothelial cells. Accordingly, androgens through the androgen receptor (AR), exerted a similar effect on eNOS activity, NO production and SOD activity, while they decreased significantly catalase activity and had no significant effect on GSH concentration, effects that were accompanied by increased intracellular oxidative stress.

Concerning 17β-estradiol effects on the pro-oxidative effect of CRH on the endothelial cells, the presence of E2 resulted in a reversal of the inhibitory effect of CRH on eNOS activity and NO production, thereby inducing a further increase of both. Moreover, E2 did not affect the CRH dependent increase of SOD activity, it enhanced the CRH dependent increase of catalase activity and it reduced GSH concentration that remained significantly increased. These effects were accompanied by neutralization of the CRH dependent increase of oxidative burden and restoration of its levels to control. Accordingly, testosterone and DHT abolished the CRH dependent decrease of eNOS, NO, the increase of catalase activity whereas they enhanced the CRH dependent increase of SOD and oxidative burden.

In conclusion, our findings indicate that estrogens exert a systemic anti-oxidative effect on the vascular endothelium, through regulation of pro- and anti-oxidative mechanisms, while they counterbalance the inhibitory effect of CRH on

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

eNOS activity and NO production, resulting in decreased intracellular oxidative stress. On the contrary, androgens seem to have a pro-oxidative effect, whereby they increase eNOS and SOD activities, as well as NO production, thereby inducing oxidative stress. Moreover, they abolish, similarly to estrogen, the inhibitory effect of CRH on eNOS activity, NO production, and its stimulatory effect on catalase activity enhancing the already increased oxidative stress. The above effects highlight the important role of steroid gonadals in the regulation of oxidative stress homeostasis of endothelial cells through modifications on pro- and anti-oxidative mechanisms.

Key words: Atherosclerosis, endothelial dysfunction, corticotropin releasing hormone (CRH), 17β- estradiol, testosterone, dihydrotestosterone, oxidative stress, antioxidative enzymes.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Συντομογραφίες

ACTH:	Adrenocorticotropin hormone, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη
AC:	Adenylylcyclase, αδενυλική κυκλάση
ADMA:	asymmetric dimthylarginine, ασύμμετρη διμεθυλική αργινίνη
AGEs:	advanced glycation end-products, τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοσιλίωσης
ANF:	atrila natriuretic factor, Νατριουρητικός παράγοντας του κόλπου
Ang-II:	Angiotensin-II, αγγειοτασίνη-II
AP-1:	activator protein -1, ενεργοποιός πρωτεΐνη 1
APCs:	antigen presenting cells, αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα
AR:	Androgen Receptor, υποδοχέας ανδρογόνων
ARE:	Androgen Response Elements, στοιχεία ανταπόκρισης στα ανδρογόνα
ATP:	adenosine triphosphate, τριφοσωρική αδενοσίνη
AVP:	arginine -vasopressin peptide, πεπτίδιο αργινίνης-βασοπρεσσίνης
bAEC:	bovine aortic endothelial cells, βόεια αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα
BCL-2:	B-cell lymphoma 2
BH_4:	Tetrahydrobiopterin, τετραϋδροβιοπτερίνη
BSA:	bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός
CAD:	coronary artery disease, στεφανιαία νόσος
cAMP:	cyclic Adenosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

CAMs:	Cell adhesion molecules, μόρια κυτταρικής πρόσδεσης
CAT:	catalase, καταλάση
CFs:	καρδιακοί ινοβλάστες
cGMP:	cyclic Guanosine MonoPhosphate, κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
COMT:	Catechol-O-Methyltransferase, κατεχολο-Ο-μεθυλοτρασφεράση
ConA:	Concavalin A, κονκαβαλίνη Α
COX-2:	Cyclooxygenase-2, κυκλοοξυγενάση 2
CREB:	cAMP response element binding protein, πρωτεΐνη απόκρισης στο cAMP
CRH:	corticotrophin releasing hormone, κορτικοτρόπος εκλυτική ορμόνη
CRHR 1:	corticotrophin releasing hormone receptor 1, υποδοχέας της CRH 1
CRHR2:	corticotrophin releasing hormone receptor 2, υποδοχέας της CRH 2
c-Src:	Proto-oncogene tyrosine kinase Src, Πρωτο-ογκογονίδιο της τυροσινικής κινάσης Src
C-Terminal:	καρβοξυ -τελική περιοχή
CYP1A2, CYP1B1:	ένζυμα του κυτοχρώματος P450 A2, B1
DAG:	1,2-diacylglycerol, 1,2 διακυλογλυκερόλη
DBD:	DNA binding domain, περιοχή πρόσδεσης DNA
DCF:	2'-7' dichlorodihydrofluorescein
DHT:	Dihydrotestosterone, διυδροτεστοστερόνη
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

DMSO:	dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
EDHF:	Endothelium-derived hyperpolarizing factor, ενδοθηλιακός παράγοντας υπερ-πόλωσης
eNOS:	endothelial NO synthase, ενδοθηλιακή συνθετάση του NO
EPAC:	exchange protein directly activated by cAMP
EREs:	Estrogen Response Elements, στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα
ERK:	Extracellular signal Regulated Kinase, κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτταρικό σήμα
ERs:	Estrogen receptor, υποδοχείς οιστρογόνων
ERα:	Estrogen Receptor α , Υποδοχέας οιστρογόνων α
ERβ:	Estrogen Receptor β , Υποδοχέας οιστρογόνων β
ET-1:	Endothelin-1, ενδοθηλίνη 1
FBS:	Foetal Bovine Serum, Ορός εμβρύου βοός
Fl:	Flutamide, φλουταμίδη
FSH:	Follicle stimulating hormone, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
Fulv:	Fulvestrant, φουλβεστράνη
GABA:	γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GAPDH:	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης
GnRH:	εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης
GPCRs:	G-protein coupled receptors, Υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

GPER:	G-protein-coupled ER
GPx:	glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR:	glutathione reductase, αναγωγάση της γλουταθειόνης
GR:	Glycocorticoid receptor, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
GRE:	glucocorticoid responsive elements, απαντητικές αλληλουχίες γλυκοκορτικοειδών
GRK:	GPCR κινάση
GSH:	glutathione, ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG:	oxidized glutathione, οξειδωμένη γλουταθειόνη
GST:	glutathione S-transferase, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
H2DCFDA-AM:	2'-7' dichlorodihydrofluorescein diacetate
H_2O_2:	Hydrogen peroxide, υπεροξείδιο του υδρογόνου
HAECs:	ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής
HCAEC:	Ενδοθηλιακά κύτταρα στεφανιαίας αρτηρίας
HDL:	high density lipoprotein, λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
HMEC-1:	μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα
HRE:	Hormone Response Elements, στοιχεία ανταπόκρισης σε ορμόνες
HUVECs:	ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου
IC_3:	intracellular loop 3, ενδοκυτταρική θηλειά 3
ICAM-1:	intracellular adhesion molecule 1, διακυτταρικό μόριο πρόσδεσης 1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

IFN-γ:	interferon –γ, ιντερφερόνη-γ
IL-8:	interleukin-8, ιντερλευκίνη-8
iNOS:	induced NOS synthase, επαγώμενη συνθάση του μονοξειδίου
Ins (1,4,5)P_3:	inositol (1,4,5)-trisphosphate, 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη
LBD:	ligand binding domain, περιοχή πρόσδεσης του μορίου προσδέτη
LDL:	low density lipoprotein, λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
LH:	ωχρινοτρόπος ορμόνη
LPS:	Lipopolysaccharide, λιποπολισακχαρίτης
MAPKs:	mitogen activated protein kinases, πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα σήματα
mER-α:	membrane Estrogen Receptor α, μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων α
MHCII:	μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας-ΙΙ
MR:	Mineralocorticoid Receptor, Υποδοχέας αλατοκορτικοειδών
NaNO3:	Νιτρικό νάτριο
nNOS:	neuronal NOS, νευρωνική NOS
NO:	Nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου
NPY:	νευροπεπτίδιο Υ
NR:	nitrite reductase, νιτρική ρεδουκτάση
N-Terminal:	αμινο-τελική περιοχή
$ONOO^-$:	υπεροξυ νιτρώδες ανιόν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

PACAP:	Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide, πολυπεπτίδιο ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης της υπόφυσης
PAF:	platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PECAM-1:	platelet endothelial adhesion molecule 1, αιμοπεταλιακό ενδοθηλιακό μόριο πρόσδεσης 1
PGI2:	Prostaglandin I2, προσταγλανδίνη I2
PI3K:	Phosphatidylinositide-3-kinase, κινάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης
PKA:	protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση Α
PKC:	Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C
PLC:	Phospholipase C, φωσφολιπάση C
PLN:	Phospholamban, φωσφολαμβάνη
POMC:	Proopiomelanocortin, προ-οπιο-μελανοκορτικοτροπίνη
PR:	Progesterone Receptor, Υποδοχέας προγεστερόνης
PVN:	paraventricular, παρακοιλιακός πυρήνας
qRT-PCR:	Real time (or quantitative) reverse transcription polymerase chain reaction, μέθοδος αλυσιδωτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής
RNS:	reactive nitrogen species, δραστικές μορφές αζώτου
ROS:	Reactive oxygen species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
RT-PCR:	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
RyR:	ryanodine receptor, υποδοχέας ρυανοδίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

SERMs:	selective estrogen receptor modulators, εκλεκτικοί τροποποιητές δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων
SHBG:	Sex-hormone binding globulin, φυλοδεσμευτική σφαιρίνη
SHBGR:	υποδοχέας της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης
siRNA:	short interfering RNA, RNA σύντομης παρέμβασης
SOD:	superoxide dismutase, δισμουτάση του υπεροξειδίου
SRc:	ενδοκυτταρική κινάση τυροσίνης C
TLR-4:	toll-like receptor-4
TNF-α:	Tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκου
TnI:	troponin I, τροπονίνη I
UCN:	urocortin, ουροκορτίνη
VCAM-1:	vascular adhesion molecule 1, αγγειακό μόριο πρόσδεσης 1
VEGF:	vascular endothelial growth factor, ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας
VIP:	Vasoactive intestinal peptide, εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο
VSMC:	Vascular smooth muscle cells, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα
XO:	Xanthine oxidase, οξειδάση της ξανθίνης
από-Ε:	απολιποπρωτεΐνη Ε
β-ARR:	Arrestin, αρρεστίνη
E2:	17-beta estradiol, 17-β οιστραδιόλη
ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

NBT:	Nitro Blue Tetrazolium
NE:	Norepinephrine, νορεπινεφρίνη
$O_2^{\cdot-}$:	superoxide, ανιόν του υπεροξειδίου
OH^{-}:	ιόν υδροξυλίου
ΟΘΥ:	ορμονική θεραπεία υποκατάστασης
ΣΠΩ:	Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών
ΥΥΕ:	Υποθάλαμος, υπόφυση, επινεφριδιακός άξονας
ΥΥΩ:	Υποθάλαμος, υπόφυση, ωοθήκες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο}:ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

Α.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ 1

Α.1.1 Ο μηχανισμός απόκρισης στο στρες – Η Διατήρηση της ομοιοστασίας μέσω αντιδράσεων προσαρμογής στο στρες 1

Α.1.2 Ο ΥΥΕ άξονας και η απόκριση στο στρες 3

Α.1.3 Τα γλυκοκορτικοειδή 5

Α.1.4. Νευροπεπτίδια του στρες 6

Α.1.4.1 Η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH) 8

Α.1.4.2 Χαρακτηριστικά και ρύθμιση του γονιδίου της CRH 8

Α.1.5 Υποδοχείς των πεπτιδίων της οικογένειας της CRH 9

Α.1.5.1 Γενικά 9

Α.1.5.2 Σηματοδοτική μεταγωγή μηνύματος των υποδοχέων CRHR1 και CRHR2 11

Α.1.5.3 Διαλυτός CRH2a υποδοχέας (sCRHR2a) 13

Α.1.5.4 Πρωτεΐνη που προσδένει τον CRH – (CRH binding protein, CRH-BP.. 14

Α.1.5.5 Αναστολείς των CRH Υποδοχέων 14

Α.1.6 Ο ρόλος της CRH στο ΚΝΣ κατά την απάντηση στο στρες 15

Α.1.7 Η παρουσία της CRH στην περιφέρεια 16

Α.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ 17

Α.2.1 Γενικά στοιχεία φλεγμονής 17

Α.2.2 Διαμεσολαβητές φλεγμονής 20

Α.2.3 Η συμμετοχή της κεντρικής και περιφερειακής CRH στη φλεγμονή 22

Α.2.4 Δράσεις της περιφερικής CRH στη φλεγμονώδη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος..... 23

Α.2.4.1 In vivo- Προ-φλεγμονώδεις δράσεις 24

Α.2.4.2 -In vivo- Αντιφλεγμονώδεις δράσεις 25

Α.2.4.3 -In vitro Προ-φλεγμονώδεις δράσεις 25

Α.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ, ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ 26

Α.3.1 Φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου - Ο σημαντικός ρόλος του Μονοξειδίου του αζώτου (NO) 26

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.3.2 Φλεγμονή του Ενδοθηλίου 28
Α.3.3 Προ-φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της CRH στη φλεγμονή του ενδοθηλίου 31
Α.3.4 Σύνδεση των δεικτών φλεγμονής του ενδοθηλίου με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 32
Α.4 ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 33
Α.4.1 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αθηροσκλήρωση 33
Α.4.2 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης 34
Α.4.3 Κλινικές εκδηλώσεις αθηροσκλήρωσης 37
Α.4.4 Συμμετοχή της CRH στους μηχανισμούς παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης 38
Α.4.5 Επιδημιολογία και οι διαφορές των δύο φύλων στην αθηροσκλήρωση.....39
Α.5 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ 41
Α.5.1 Ο άξονας υποθάλαμος - υπόφυση – ωοθήκες – όρχεις 41
Α.5.2 Χημική δομή και βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών 44
Α.5.3 Οιστρογόνα 47
Α.5.3.1 Μεταβολισμός οιστρογόνων 47
Α.5.3.2 Επίδραση της GnRH στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας 49
Α.5.3.3 Υποδοχείς Οιστρογόνων (ERs) 50
Α.5.3.4 Έκφραση και δράση ERs στο ενδοθήλιο 51
Α.5.3.5 Μηχανισμοί γενωμικής δράσης οιστρογόνων 52
Α.5.3.6 Μηχανισμοί μη γενωμικής δράσης οιστρογόνων 54
Α.5.4 Ανδρογόνα 57
Α.5.4.1 Παραγωγή, μεταφορά και μεταβολισμός της τεστοστερόνης 57
Α.5.4.2 Δράσεις των ανδρογόνων στον άρρενα 58
Α.5.4.3 Υποδοχείς ανδρογόνων 59
Α.5.4.4 Μηχανισμοί Γενωμικής δράσης ανδρογόνων 60
Α.5.4.5 Μηχανισμοί μη Γενωμικής δράσης ανδρογόνων 62
Α.5.4.6 Παρουσία του AR στο ενδοθήλιο 64
Α.5.5 Στεροειδή των γονάδων και αθηροσκλήρωση 64
Α.5.5.1 Οιστρογόνα και αθηροσκλήρωση 64
Α.5.5.2 Θεραπεία Υποκατάστασης Οιστρογόνων- Επιπτώσεις της ιστο- ειδικότητας,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

το στάδιο της αθηροσκλήρωσης και ο «κρίσιμος» χρόνος 67
Α.5.5.3 Ανδρογόνα και αθηροσκλήρωση 68
Α.5.5.4 Ο ρόλος της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης τεστοστερόνης στην αθηροσκλήρωση 70
Α.6 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ 71
Α.6.1 Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) 72
Α.6.1.1 Γενικά 72
Α.6.1.2 Πηγές ελευθέρων ριζών 74
Α.6.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS) και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 78
Α.6.3 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS) και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 79
Α.6.4 Ο διπλός ρόλος του NO στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 81
Α.6.5 Αντιοξειδωτικοί ενδοκυττάριοι μηχανισμοί 82
Α.6.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί 83
Α.6.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας 87
Α.6.6 Προ-φλεγμονώδης και αντιφλεγμονώδης δράση των στεροειδών των γονάδων 90
Α.6.6.1 Προ-φλεγμονώδης δράση των οιστρογόνων 90
Α.6.6.2 Αντιφλεγμονώδης δράση των οιστρογόνων 92
Α.6.6.3 Αντιφλεγμονώδης δράση της τεστοστερόνης 93
Α.6.7 Η δράση της CRH και των στεροειδών των γονάδων στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου 93
Α.6.7.1 Ο αντιοξειδωτικός ρόλος των οιστρογόνων στο ενδοθήλιο 93
Α.6.7.2 Ο ρόλος των ανδρογόνων στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου 94
Α.6.7.3 CRH και οξειδωτικό στρες 96
Α.7 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ-ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ...97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 99
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ 99
Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 100
Β.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ 101
Β.1.2 Κατάψυξη κυτταρικής σειράς EAhy926 101

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.1.3 Καλλιέργεια Κυτταρικής σειράς EAhy926 102
Β.1.4 Απόψυξη κυτταρικής σειράς EAhy926 103
Β.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD 104
Β.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ (SOD) 106
Β.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ 107
Β.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ GSH 108
Β.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ GSSG ΚΑΙ GSH 109
Β.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (eNOS) 110
Β.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ NO 112
Β.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS 112
Β.10 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ 114
Β.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 115
Β.11.1 Υλικά και συσκευές μεθόδου RT-PCR 115
Β.11.2 Μέθοδος - Αντίδραση RT 116
Β.11.3 Αλυσωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 117
Β.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real Time, RT-PCR) 120
Β.13 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 123
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 124
Γ.1 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ EAhy926 124
Γ.1.1 Γονιδιακή έκφραση των οιστρογονικών (ERα - ERβ) υποδοχέων στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926 124
Γ.1.2 Γονιδιακή έκφραση του ανδρογονικού (AR) υποδοχέα στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926 125

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 126
Γ.2.1 Επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και DHT που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα 126
Γ.2.2 Προ-οξειδωτική δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα 128
Γ.2.2.1 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της eNOS παρουσία οιστραδιόλης 129
Γ.2.2.2 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της έκλυσης του NO παρουσία οιστραδιόλης 130
Γ.2.2.3 Επίδραση της CRH στα επίπεδα των ROS παρουσία οιστραδιόλης ...131
Γ.2.2.4 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της SOD και της έκφρασης του γονιδίου της παρουσία οιστραδιόλης 133
Γ.2.2.5 Επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης και της έκφρασης του γονιδίου της παρουσία οιστραδιόλης 135
Γ.2.2.6 Επίδραση της CRH στα επίπεδα της GSH, το λόγο GSH/GSH+GSSG και την έκφραση του γονιδίου της, παρουσία οιστραδιόλης 137
Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 140
Γ.3.1 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της eNOS παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 141
Γ.3.2 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της έκλυσης του NO παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 144
Γ.3.3 Επίδραση της CRH στα επίπεδα των ROS παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 146
Γ.3.4 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της SOD παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 148
Γ.3.5 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της καταλάσης παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 151
Γ.3.6 Επίδραση της CRH στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG παρουσία τεστοστερόνης ή DHT 154
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{ο}: ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 157
Δ.1 ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΣΕ Η ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΗΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 157
Δ.2 ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΣΕ Η ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΚΑΙ Η DHT ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....158
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}: ΣΥΖΗΤΗΣΗ 159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 169
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....208
ΠΕΡΙΛΗΨΗ i
SUMMARY iv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....xxi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΣΧΗΜΑΤΩΝ – ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ.....xxii

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προμήθεια υλικών. 100
Πίνακας 2: Υλικά-Συσκευές Καλλιεργειών. 100
Πίνακας 3: Υλικά-Συσκευές μεθόδου Bradford. 106
Πίνακας 4 : Υλικά-Συσκευές μεθόδου εκχύλισης RNA. 115
Πίνακας 5: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων. 119
Πίνακας 6: Οι συνθήκες ενίσχυσης των γονιδίων με τη μέθοδο της PCR. 119
Πίνακας 7: Οι εκκινητές και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της Real time RT-PCR για τα γονίδια της SOD 1, SOD 2, της καταλάσης και της GPX1 123

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΣΧΗΜΑΤΩΝ - ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του άξονα Υποθαλάμου Υπόφυσης Επινεφριδίων (YYE) σε συνθήκες στρες (Τροποπ. από [6]).....4
Εικόνα 2: Η κυτταρική σηματοδότηση του CRHR2 στα κύτταρα του μυοκαρδίου. 7
Εικόνα 3: Επισκόπηση της εκλεκτικής σύνδεσης των πεπτιδίων του στρες με τους CRH υποδοχείς. 11
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των CRH υποδοχέων μετά τη σύνδεσή τους με την ορμόνη. 12
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου του $CRHR_2$ και των μεταγράφων που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του. 14
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής NO με τη βοήθεια της συνθετάσης του NO (NOS). 28
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου πρόσδεσης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου (Τροποπ. από [127].....30
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της έναρξης και εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης.....36
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες. 42
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Όρχεις.....43
Σχήμα 1: Απεικόνιση της χημικής δομής της 17β- Οιστραδιόλης, της Οιστρόνης και της Τεστοστερόνης. 44
Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών. 46
Εικόνα 11: Απεικόνιση των μονοπατιών δράσης της τεστοστερόνης. 47
Εικόνα 12. Σχεδιάγραμμα του μεταβολισμού των οιστρογόνων. 48
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της γενωμικής οιστρογονικής δράσης μέσω των υποδοχέων ERs. 54
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της οιστρογονικής δράσης σε αγγειακά κύτταρα μέσω μεμβρανικών υποδοχέων (μη γενωμική δράση). 55
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου και της πρωτεΐνης του ανδρογονικού υποδοχέα [243]. 59
Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση γενωμικής και μη-γενωμικής δράσης των ανδρογόνων. 61
Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της γενωμικής και μη γενωμικής επίδραση της τεστοστερόνης στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). 63

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της απομάκρυνσης ενός ηλεκτρονίου από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS).....73
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών δομών που απαρτίζουν την NADPH οξειδάση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. 76
Εικόνα 20: Πηγές ελευθέρων ριζών που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουγία στο καρδιαγγειακό σύστημα (τροποπ. από [156]). 80
Εικόνα 21: Τα βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και οι αντιδράσεις που καταλύουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και του υπεροξειδίου.....83
Εικόνα 22: Ο κύκλος παραγωγής και ανακύκλωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). 86
Εικόνα 23: Παραγωγή και μεταβολισμός των ελευθέρων ριζών [321].....87
Εικόνα 24: Η χημική δομή της γλουταθειόνης.....88
Εικόνα 25: Πρότυπη καμπύλη BSA με τη μέθοδο Bradford.....105
Εικόνα 26: Κύκλος ενζυμικής δραστικότητας της SOD. 107
Εικόνα 27: Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού της GSSG/GSH μέσω της αντίδρασης παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.....109
Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της καταλυτικής δραστικότητας της eNOS [366].....110
Εικόνα 29: Αρχή της μεθόδου μέτρησης των ενδοκυττάριων ROS. 113
Εικόνα 30. Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).....118
Φωτογραφία 1: Έκφραση των mRNA των υποδοχέων ERs στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά. 125
Φωτογραφία 2: Έκφραση του mRNA του AR υποδοχέα στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά.....126
Εικόνα 31: Η δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της E2 στη δραστικότητα της eNOS. 127
Εικόνα 32: Η δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της τεστοστερόνης στη δραστικότητα της eNOS.....128
Εικόνα 33: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. 129
Εικόνα 34: Η επίδραση της CRH στην έκλυση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της.....131

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Εικόνα 35: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. 132
Εικόνα 36: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. 134
Εικόνα 37: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της SOD1 και SOD2. 135
Εικόνα 38: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. 136
Εικόνα 39: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της καταλάσης. 137
Εικόνα 40: Προσδιορισμός της επίδρασης της CRH α) στα επίπεδα της GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της..... 139
Εικόνα 41: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της GPx.....140
Εικόνα 42: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 142
Εικόνα 43: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 143
Εικόνα 44: Η επίδραση της CRH στην έκλυση του NO παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 144
Εικόνα 45: Η επίδραση της CRH στην έκλυση του NO παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 145
Εικόνα 46: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 147
Εικόνα 47: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 148
Εικόνα 48: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 149
Εικόνα 49: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 150
Εικόνα 50: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 152
Εικόνα 51: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 153

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Εικόνα 52: Η επίδραση της CRH στα επίπεδα της α) GSH και του λόγου β) GSH/GSH+GSSG, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. 154
Εικόνα 53: Η επίδραση της CRH στα επίπεδα της α) GSH και του λόγου β) GSH/GSH+GSSG, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. 156

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο}: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

Α.1.1 Ο μηχανισμός απόκρισης στο στρες – Η Διατήρηση της ομοιοστασίας μέσω αντιδράσεων προσαρμογής στο στρες

Η ομοιοστασία αποτελεί μια δυναμική κατάσταση ισορροπίας του οργανισμού, η οποία χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα, ενώ δέχεται διαρκείς απειλές από παράγοντες του εσωτερικού ή του εξωτερικού περιβάλλοντος. Οι παράγοντες αυτοί είναι γνωστοί ως στρεσογόνα ερεθίσματα. Η κατάσταση κατά την οποία ασκούνται απειλές στην ομοιοστασία ονομάζεται στρες. Όταν συμβεί μια τέτοια απειλή, ο οργανισμός λειτουργεί αντισταθμιστικά, υιοθετώντας και επιδεικνύοντας ένα σύνολο από φυσιολογικές αντιδράσεις προσαρμοσμένες στο στρες, με τις οποίες επανέρχεται η ομοιοστασία [1]. Οι συγκεκριμένες αντιδράσεις είναι αποτέλεσμα της πολυπλοκότητας κάποιων παραγόντων γενετικής, περιβαλλοντικής και αναπτυξιακής φύσης. Έτσι, ενεργοποιούνται κάποια εξειδικευμένα νευροενδοκρινικά κύτταρα και μοριακά υποσυστήματα του οργανισμού, τα οποία ευρίσκονται στο χώρο του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), καθώς και στην περιφέρεια [1].

Επειδή βέβαια η ικανότητα απάντησης στο στρες αλλάζει, υπάρχει η πιθανότητα να εμφανιστούν ασθένειες όταν η έκθεση σε αυτό είναι μεγάλης διάρκειας. Ως αποτέλεσμα, η χρονική επέκταση της περιόδου κατά την οποία ο οργανισμός εκτίθεται στο στρες συνεπάγεται αρνητικά αποτελέσματα σε λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή και η ανοσοεπάρκεια [1]. Κατ’ επέκταση επηρεάζεται, επίσης, αρνητικά η προσωπικότητα και η συμπεριφορά του ατόμου που υποβάλλεται σε στρεσογόνες καταστάσεις.

Για να λειτουργήσει το σύστημα του στρες χρειάζεται να ληφθούν ετερογενή σήματα, νευροαισθητικού, αιματογενούς και κινητικού περιεχομένου. Τα σήματα αυτά ακολουθούν συγκεκριμένες και διαφορετικές οδούς μέσω των οποίων τελικά προσλαμβάνονται από τον οργανισμό. Όταν ενεργοποιείται το σύστημα του στρες, παρατηρείται πληθώρα αλλαγών, οι οποίες στοχεύουν στη διατήρηση της ομοιοστασίας και στην επιβίωση, προκαλώντας αντιδράσεις προσαρμογής [2].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Για να μπορέσει να αντιμετωπίσει ο οργανισμός το στρες με φυσικό τρόπο, ανακατανέμει την ενέργεια, εκτρέποντας το οξυγόνο και τα θρεπτικά στοιχεία στο ΚΝΣ και όπου αλλού επενεργούν οι στρεσογόνοι παράγοντες. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται ο καρδιαγγειακός τόνος, αλλάζει ο αναπνευστικός ρυθμός και διαφοροποιείται η λειτουργία του ενδιάμεσου μεταβολισμού, δηλαδή η γλυκονεογένεση και η λιπόλυση, ούτως ώστε να μεταφερθούν ζωτικά υποστρώματα με τα οποία μπορεί να παραχθεί ενέργεια. Αντίθετα, άλλες λειτουργίες του οργανισμού που δεν συμμετέχουν άμεσα στη διαδικασία του στρες, όπως είναι η χώνευση, η ανάπτυξη, η ανοσοεπάρκεια και η αναπαραγωγή, σταματούν επί προσωρινής βάσης για να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική αντιμετώπιση των στρεσογόνων παραγόντων [1].

Για να καταστεί δυνατός ο περιορισμός των μηχανισμών προσαρμογής στο στρες, ο οργανισμός ενεργοποιεί άλλους μηχανισμούς που σταματούν την εκδήλωση μη φυσιολογικών αντιδράσεων. Αν αυτό δεν μπορεί να επιτευχθεί τότε ο οργανισμός νοσεί [1]. Αυτό συμβαίνει γιατί η ψυχοφυσιολογική απάντηση προσαρμογής του οργανισμού στο στρες αποτελεί ένα τρόπο εξοικονόμησης ενέργειας εξαιτίας του οποίου ο οργανισμός μπορεί να αντιδράσει αμέσως και με ένταση όταν επισυμβαίνουν οξείες ή χρόνιες εξωγενείς ή ενδογενείς βιολογικές αποκλίσεις. Επειδή όμως η αρχική αυτή λειτουργία τροποποιήθηκε λόγω της εξέλιξης, με αποτέλεσμα οι στρεσογόνοι παράγοντες να μην αφορούν μόνο θέματα επιβίωσης, οι αλλαγές που προκύπτουν είναι τέτοιου μεγέθους που έχουν ως συνέπεια την εμφάνιση διαταραχών όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι φλεγμονές και οι αλλεργίες [2].

Όπως προαναφέρθηκε, η διάρκεια των στρεσογόνων ερεθισμάτων στα οποία εκτίθενται ο οργανισμός και ειδικότερα το αποκαλούμενο χρόνιο στρες, ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απόκριση στον εγκέφαλο και την περιφέρεια [3]. Η φλεγμονή έχει άμεσα συσχετισθεί με την παθοφυσιολογία αρκετών διαταραχών που σχετίζονται με το στρες, όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης, νευρογενείς διαταραχές όπως πχ η νόσος Alzheimer, και ο καρκίνος [4].

Παρότι το σύνολο του ΚΝΣ συμμετέχει άμεσα ή έμμεσα στη διατήρηση της ομοιοστασίας του σώματος, υπάρχουν συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

οποίες κατέχουν κρίσιμο ρόλο στην οργάνωση της απόκρισης στο στρες. Όταν ο οργανισμός αντιδράσει με στόχο να προσαρμοστεί στο στρες ενεργοποιεί τον άξονα υποθαλάμου, υπόφυσης, επινεφριδίων (YYE), καθώς και τον άξονα του συμπαθητικού συστήματος με πυρήνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, προγαγγλιακές συμπαθητικές ίνες και το μυελό των επινεφριδίων. Τα κύρια σημεία του συστήματος αντίδρασης στο στρες περιλαμβάνουν νευρώνες της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH: corticotropin releasing hormone) και νευρώνες της αργινίνης-βασοπρεσσίνης (AVP: arginine -vasopressin peptide), στον παρακοιλιακό (PVN: paraventricular) πυρήνα του υποθαλάμου καθώς και νευρώνες της CRH στην περιοχή του προμήκους και του υπομέλανα τόπου (LC: Locus Ceruleus,) και άλλες κατεχολαμινεργικές ομάδες νορεπινεφρίνης που συνθέτουν κυτταρικές ομάδες του προμήκη και του στελέχους (κεντρικό συμπαθητικό σύστημα). Τα σημεία αυτά εδρεύουν στον υποθάλαμο και το εγκεφαλικό στέλεχος, ενώ τα περιφερειακά μέρη του συστήματος αντιπροσωπεύονται από τις περιφερειακές ομάδες στον άξονα YYE και το απαγωγό συμπαθητικό νευρικό σύστημα [1].

Η CRH αποτελεί νευροπεπτίδιο του νευρο-ενδοκρινικού συστήματος και ειδικότερα, είναι μέλος της οικογένειας των νευροπεπτιδίων του στρες, όπως θα αναλυθεί στην ενότητα Α.1.4.

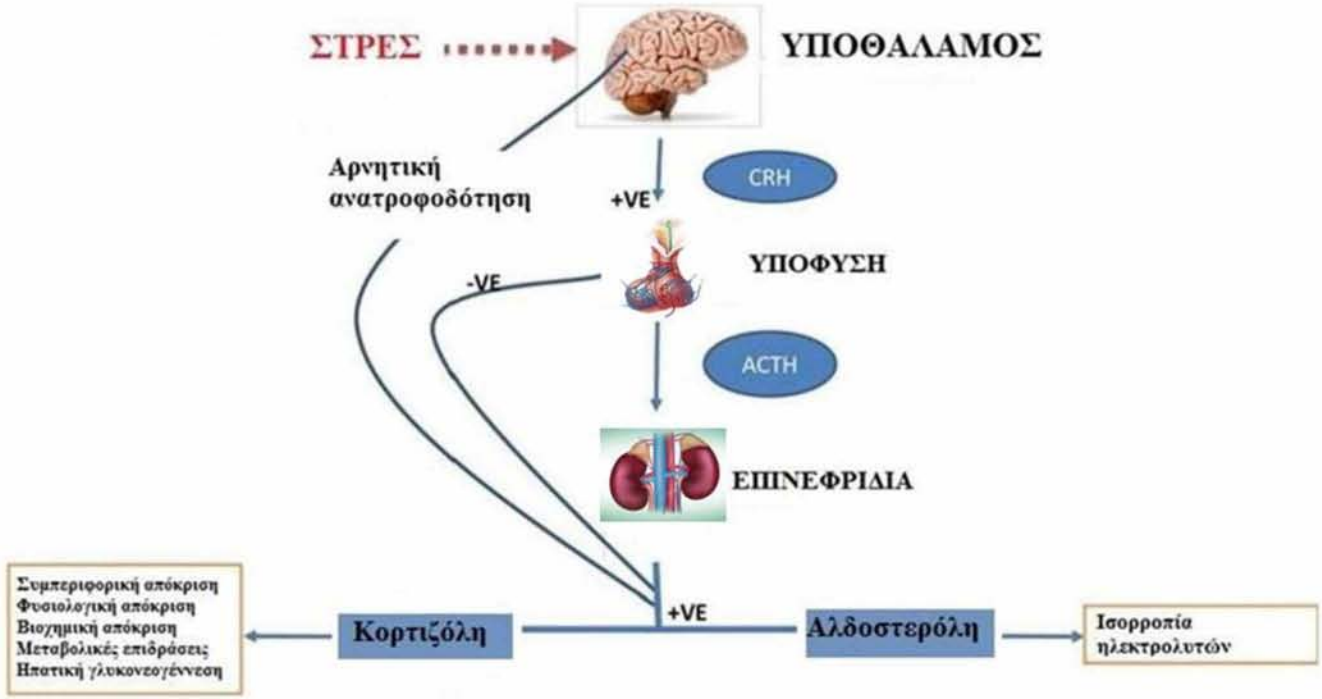
Α.1.2 Ο YYE άξονας και η απόκριση στο στρες

Ο άξονας YYE είναι απαραίτητος για την επιτυχημένη απάντηση σε κάθε μορφής στρες του οργανισμού. Η CRH μεταφέρεται από τον υποθάλαμο στην υπόφυση με το υποφυσιακό πυλαίο φλεβικό σύστημα του υποθαλάμου και ρυθμίζει την έκκριση της κορτικοτροπίνης ή κορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH: Adrenocorticotropin hormone). Αφού προσδεθεί η CRH στον υποδοχέα 1 της CRH (CRHR1) των κορτικοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης διεγείρεται η έκκριση της ACTH, με τη βοήθεια της συνεργιστικής δράσης της AVP. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η CRH και η AVP εκκρίνονται ταυτόχρονα από τον υποθάλαμο στο πυλαίο σύστημα υπό τη μορφή περιοδικών κυμάτων με αποτέλεσμα να διατηρείται ο κιρκάδιος ρυθμός. Σε συνθήκες στρες, ενεργοποιείται η έκλυση της CRH, η οποία φυσιολογικά καταστέλλει την ανοσοαπάντηση μέσω της διέγερσης της έκκρισης της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ACTH. Η τελευταία με τη σειρά της, μέσω της κυκλοφορίας, διεγείρει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια [5].

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση του μεγέθους και της διάρκειας της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα. Μετά από έκθεση σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα, τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία καταστέλλουν τη δράση του ΥΥΕ άξονα στο επίπεδο του υποθαλάμου και της υπόφυσης (αρνητική ανατροφοδότηση) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του άξονα Υποθαλάμου Υπόφυσης Επινεφριδίων (ΥΥΕ) σε συνθήκες στρες (Τροποπ. από [6]).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η ενεργοποίηση του κεντρικού συστήματος απόκρισης στο στρες στηρίζεται στην αμοιβαία αλληλεπίδραση των νευρώνων της CRH του παρακοιλιακού PVN και των κατεχολαμινεργικών νευρώνων του LC/NE, με τη CRH και τη NE να διεγείρουν την αμοιβαία έκκρισή τους μέσω του υποδοχέα CRHR1 και των α1-αδρενεργικών υποδοχέων [1]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το περιφερικό συμπαθητικό σύστημα, με επακόλουθο την έκκριση κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια.

Όταν διεγείρεται το συμπαθητικό νευρικό σύστημα ενεργοποιείται ταυτόχρονα και το σύστημα ρενίνης- αγγειοτασίνης από το οποίο παράγεται η αγγειοτασίνη-ΙΙ (Ang-II: Angiotensin-II). Η Ang-II συνιστά ισχυρό αγγειοσυσταλτικό παράγοντα που συμμετέχει δραστικά στη διατήρηση του αγγειακού χώρου σε στρεσογόνες καταστάσεις. Επιπρόσθετα, διεγείρει την απελευθέρωση της CRH του υποθαλάμου και εν συνεχεία της κορτιζόλης.

Η αναστολή της έκκρισης της ACTH από τα γλυκοκορτικοειδή, η οποία γίνεται μέσω παρεμπόδισης της έκλυσης της CRH από τον υποθάλαμο, αναστέλλει την ενεργότητα του άξονα ΥΥΕ. Επιπροσθέτως, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα δρώντας σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ, που περιλαμβάνουν την αμυγδαλή, τους νοραδρενεργικούς νευρώνες του προμήκους μυελού και τον ιππόκαμπο [7].

Α.1.3 Τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή που εκκρίνονται από το μυελό των επινεφριδίων αποτελούν τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα. Μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς τους, οι τελευταίοι μετακινούνται και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές (GRE: glucocorticoid responsive elements) στον πυρήνα, οι οποίες περιοχές είναι ρυθμιστικές για την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Ειδικότερα, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς αναστέλλουν σημαντικούς παράγοντες μεταγραφής, όπως το ετεροδιμερές c-jun/c-fos, που συμμετέχει στην ενεργοποίηση γονιδίων του ανοσολογικού συστήματος, και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Δρώντας μέσω του υποθαλάμου και της υπόφυσης, τα γλυκοκορτικοειδή κατέχουν βασικό ρόλο στον τερματισμό της αντίδρασης του στρες, ελέγχοντας τη ρύθμιση του ΥΥΕ άξονα. Οι τύποι των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GR) στο ΚΝΣ είναι δύο: Ο τύπος Ι και ΙΙ. Ο τύπος Ι ενεργοποιείται όταν η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών είναι χαμηλή, ενώ ο τύπος ΙΙ ενεργοποιείται όταν η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών είναι υψηλότερη καθώς και σε στρεσογόνες συνθήκες. Ο τύπος ΙΙ των GR ρυθμίζει την αρνητική ανατροφοδότηση της απελευθέρωσης της CRH και της AVP [1].

Α.1.4. Νευροπεπτίδια του στρες

Γενικά, τα νευροπεπτίδια απαντώνται στις απολήξεις των νευρικών κυττάρων σε ειδικά εκκριτικά κοκκία μαζί με τους νευροδιαβιβαστές. Η έκκρισή τους διεγείρεται από νευρικά ερεθίσματα και δρουν ως χυμικοί διαβιβαστές τόσο στο ΚΝΣ όσο και στην περιφέρεια.

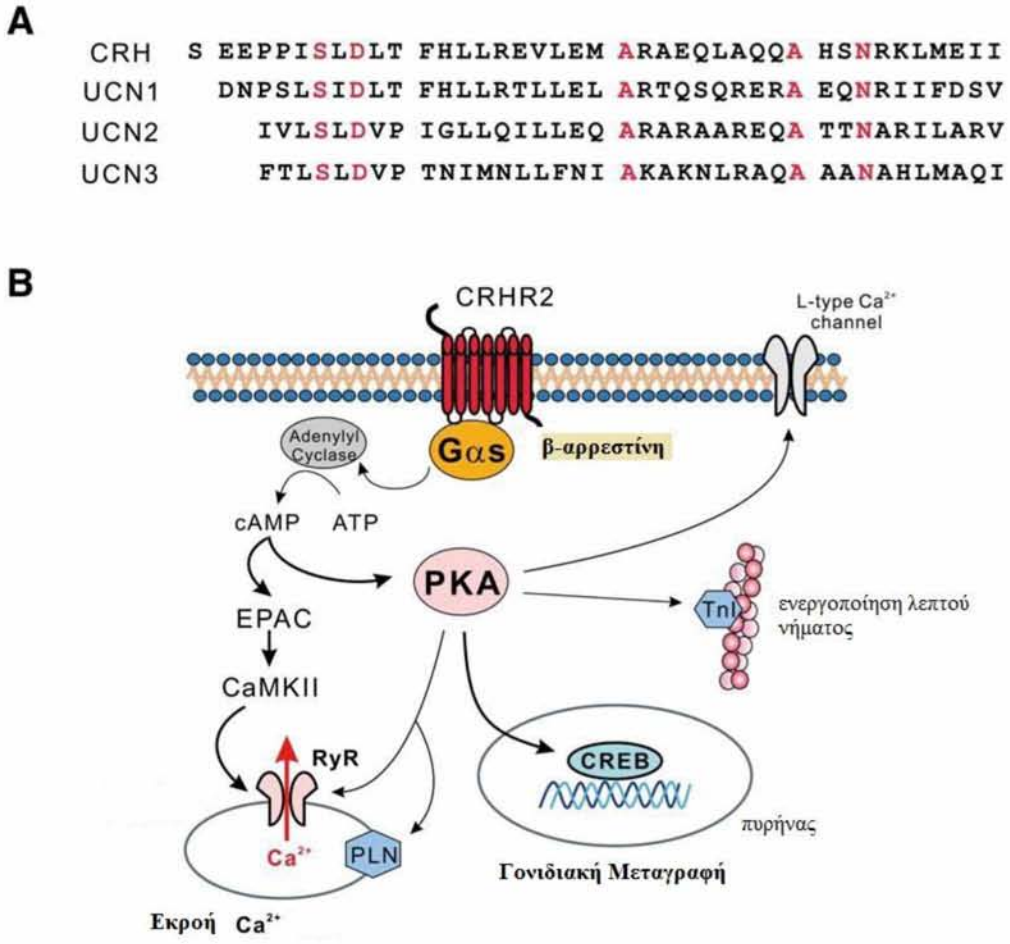
Η CRH και τα συγγενή πεπτίδια, ουροκορτίνες (UCN I, UCN II, UCN III), η ουσία P (Substance P), το νευροπεπτίδιο Y (NPY), το εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο (VIP: Vasoactive intestinal peptide), το πολυπεπτίδιο ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης της υπόφυσης (PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide) και η νευροτενσίνη, ανήκουν στα νευροπεπτίδια του στρες επειδή κατέχουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση και λειτουργία του μηχανισμού απόκρισης στο στρες.

Έχει αναφερθεί η έκφραση της UCN I σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ, όπως στον ιππόκαμπο και στο μετωπιαίο φλοιό [8], αλλά εκτενέστερα έχει μελετηθεί η έκφρασή της στην περιφέρεια όπως στους νεφρούς, στον πλακούντα [9], στο σπλήνα, στους πνεύμονες, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο δέρμα [10] και στο λιπώδη ιστό [11]. Η UCN II έχει ανιχνευτεί στην περιφέρεια στα επινεφρίδια, στην καρδιά, στο δέρμα, σε ανθρώπινα κύτταρα του ενδομητρίου [10] και στο σκελετικό μυ [12]. Για το πεπτίδιο UCN III, έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται στο μεν ΚΝΣ στις περιοχές του υποθαλάμου, του στελέχους και του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής, στη δε περιφέρεια εκφράζεται στα επινέφρια, στους μύες και το δέρμα [13] καθώς και στο γαστρεντερικό σωλήνα [14], την καρδιά [15], το πάγκρεας και το λιπώδη ιστό [11].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η CRH και οι ουροκορτίνες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αμινοξική τους ακολουθία [16] (Εικόνα 2Α). Οι UCN II και UCN III έχει δειχθεί ότι είναι ενδογενείς προσδέτες του υποδοχέα 2 της CRH (CRHR2). Ο υποδοχέας 2 εκφράζεται κατεξοχήν στην καρδιά. Η κυτταρική σηματοδότηση του υποδοχέα CRHR2 θα αναφερθεί εκτενέστερα σε επόμενη παράγραφο.

Η πρόσδεση των UCN στον υποδοχέα CRHR2 (Εικόνα 2Β) αυξάνει τη δράση τους ως καρδιοπροστατευτικών παραγόντων. Οι UCN εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα του μυοκαρδίου [16].



Εικόνα 2: Η κυτταρική σηματοδότηση του CRHR2 στα κύτταρα του μυοκαρδίου. Α) Αμινοξική αλληλουχία των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH. Οι πανομοιότυπες αλληλουχίες απεικονίζονται με κόκκινο. Β) Η κυτταρική σηματοδότηση του CRHR2 μεσολαβείται μέσω των G-πρωτεϊνών. ATP, adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη; cAMP, 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αδενοσίνη; CREB, cAMP response element binding protein, πρωτεΐνη απόκρισης στο cAMP; CRH, corticotropin-releasing hormone, κορτικοτρόπος εκλυτική ορμόνη; CRHR, corticotropin-releasing hormone receptor, υποδοχέας της CRH; EPAC, exchange protein directly activated by cAMP; PKA, protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση Α; PLN, phospholamban, φωσφολαμβάνη; RyR, ryanodine receptor, υποδοχέας ρυανοδίνης; TnI, troponin I, τροπονίνη Ι; UCN, urocortin, ουροκορτίνη (τροποπ. από [16]).

Α.1.4.1 Η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH)

Η CRH, είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων, το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως νευροπεπτίδιο του υποθαλάμου και ως βασικός ρυθμιστής του ΥΥΕ άξονα [17]. Έχει ανιχνευτεί σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ, όπως ο ρινεγκέφαλος, ο φλοιός του εγκεφάλου, η υπόφυση, τα βασικά γάγγλια, η γέφυρα, ο ιππόκαμπος, η παρεγκεφαλίτιδα και ο νωτιαίος μυελός. Η δραστηριότητα της CRH αυξάνεται σε αυτόνομες λειτουργίες και καταστάσεις που επάγονται από στρεσογόνα ερεθίσματα [18-20].

Στο περιφερειακό σύστημα, το γονίδιο της CRH ανιχνεύθηκε στο έντερο, τον πλακούντα, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το πάγκρεας, το στομάχι, τα επινεφρίδια, το σπλήνα, θύμο, το δέρμα και το ενδοθήλιο [21, 22]. Η CRH έχει επίσης βρεθεί σε ιστούς νεοπλασμάτων, του μαστού, των πνευμόνων και του θύμου καθώς και σε κακοήθεις όγκους των επινεφριδίων [23,24]. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η περιφερική CRH ασκεί ρυθμιστική δράση κατά τη διαδικασία του στρες [25-27]. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 η CRH ασκεί ρυθμιστική δράση σε προ-φλεγμονώδεις μηχανισμούς, προάγοντας την προσαρμογή του ενδοθηλίου στο τοπικό στρες [28].

Α.1.4.2 Χαρακτηριστικά και ρύθμιση του γονιδίου της CRH

Το ιντρόνιο του γονιδίου της CRH έχει μέγεθος 700- 800 bp ωστόσο αυτό διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών. Το ιντρόνιο της UCN I έχει μέγεθος 260bp και δεν διαφέρει πολύ ανάμεσα στα διάφορα θηλαστικά. Τα προ- πεπτίδια και των δύο νευροπεπτιδίων κωδικοποιούνται από το εξόνιο 2, αντίστοιχα, με το εξόνιο 1 να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της 5΄- μη μεταφραζόμενης περιοχής [29]. Οι υποκινητές των mRNA της CRH και της UCN I αποτελούνται από περιοχές δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίες παρουσιάζουν ομολογία. Αυτές οι περιοχές είναι η CRE και μια τύπου- NRSE/RE1 ακολουθία. Στο γονίδιο της CRH η αρνητική ρυθμιστική αλληλουχία τύπου- NRSE/RE1 βρίσκεται στο ιντρόνιο, ενώ στην UCN I βρίσκεται πριν την ακολουθία TATA.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πριν την ενεργοποίηση της έκφρασης της CRH προηγείται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης απόκρισης στο cAMP (CREB: cAMP response element binding protein) στον υποθάλαμο [30]. Πρόσφατα, επίσης αναφέρθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας αποσιώπησης γονιδίων REST/NRSF και ο μεταγραφικός παράγοντας Brn-2 ρυθμίζουν την έκφραση της CRH [31], ενώ η αλληλουχία NRSE ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της UCN. Τα γονίδια της CRH και της UCN I περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τον Brn-2 [32], ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για το αν ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας έχει επίδραση στην έκφραση της UCN I.

Α.1.5 Υποδοχείς των πεπτιδίων της οικογένειας της CRH

Α.1.5.1 Γενικά

Τα πεπτίδια της οικογένειας της CRH προσδένονται σε δύο υποδοχείς, τον CRHR1 [33] και τον CRHR2 [34] (Εικόνα 3). Οι δύο υποδοχείς έχουν περίπου 70% αμινοξική ομολογία. Ένας τρίτος υποδοχέας CRH έχει χαρακτηριστεί στους τελεοϊχθύες, ο CRHR3, ο οποίος παρουσιάζει ομολογία 85% περίπου, με τον CRHR1 [35].

Οι CRHRs ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs: G-protein coupled receptors) και παρουσιάζουν το τυπικό πρότυπο των 7 διαμεμβρανικών περιοχών (Εικόνα 3). Στο διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα τους παρουσιάζουν ομολογία 80-85%, ενώ στο εξωκυτταρικό τους τμήμα και ειδικά στο αμινο- τελικό άκρο υπάρχει μόνο 40% ομολογία στην αμινοξική ακολουθία. Οι υποδοχείς κωδικοποιούνται από δύο διακριτά γονίδια τα οποία απαντώνται σε διαφορετικές μορφές οι οποίες δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της μεταγραφής με εναλλακτικό μάτισμα.

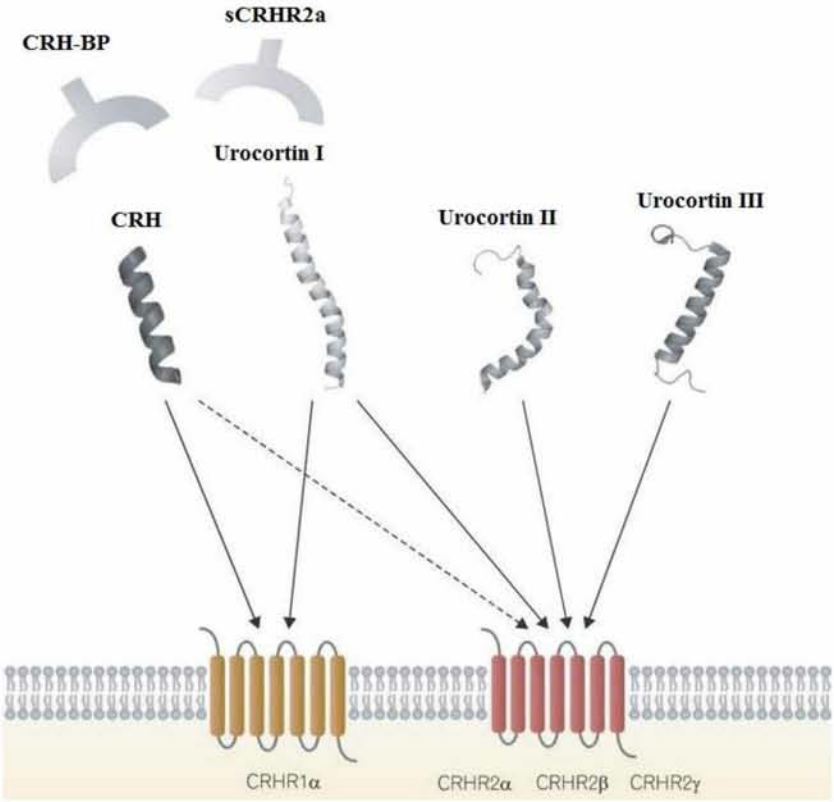
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Τόσο η CRH όσο και η UCN I αποτελούν λειτουργικούς προσδέτες των CRHRs. Οι UCNs έχουν 100 φορές μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα 2 (CRHR2) απ' ότι η CRH [36]. Συγκεκριμένα, η συγγένεια πρόσδεσης της UCN I στον CRHR1 είναι 6 φορές πιο ισχυρή και στον CRHR2 40 φορές ισχυρότερη σε σχέση με της CRH. Οι UCN II και UCN III παρουσιάζουν εκλεκτική πρόσδεση στον CRHR2 [37] (Εικόνα 3).

Από την πληθώρα των διαφορετικών ισομορφών που έχουν αναγνωριστεί για τον CRHR1, μία μόνο είναι λειτουργική [38]. Η έκφραση του γονιδίου του CRHR1 στο ΚΝΣ επιτελείται σε διάφορα σημεία, ενώ στον υποθάλαμο διεγείρεται από το στρες [39]. Στην περιφέρεια ανιχνεύεται η έκφρασή του σε μικρότερο βαθμό, κυρίως στα επινεφρίδια, τις αμυγδαλές, τις ωοθήκες, το σπλήνα, αλλά και στο δέρμα, το λιπώδη ιστό [11] και το γαστρεντερικό σύστημα [40].

Ο CRHR2, απαντάται σε 3 διαφορετικές λειτουργικές μορφές οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές μόνο στο εξωκυτταρικό Ν- τελικό άκρο τους. Ο CRHR2α, ανιχνεύεται στον υποθάλαμο και την υπόφυση [41], ενώ ο CRHR2β στο ΚΝΣ (χοριοειδές πλέγμα, εγκεφαλικές αρτηρίες), αλλά κυρίως στην περιφέρεια [42]. Ο CRHR2γ έχει βρεθεί μόνο στο μεταίχμιο του ανθρώπινου ΚΝΣ [43]. Το mRNA του CRHR2 έχει εντοπιστεί επίσης στους πνεύμονες, το θύμο αδένα, το δέρμα και το λιπώδη ιστό. Οι υποδοχείς της CRH έχουν βρεθεί και σε ανθρώπινους όγκους [39, 44]. Τέλος, και οι δύο υποδοχείς της CRH (CRHR1 και CRHR2) έχουν ανιχνευτεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EAhy926, σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου της Πανεπιστημιακής Ενδοκρινολογικής Κλινικής [28].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



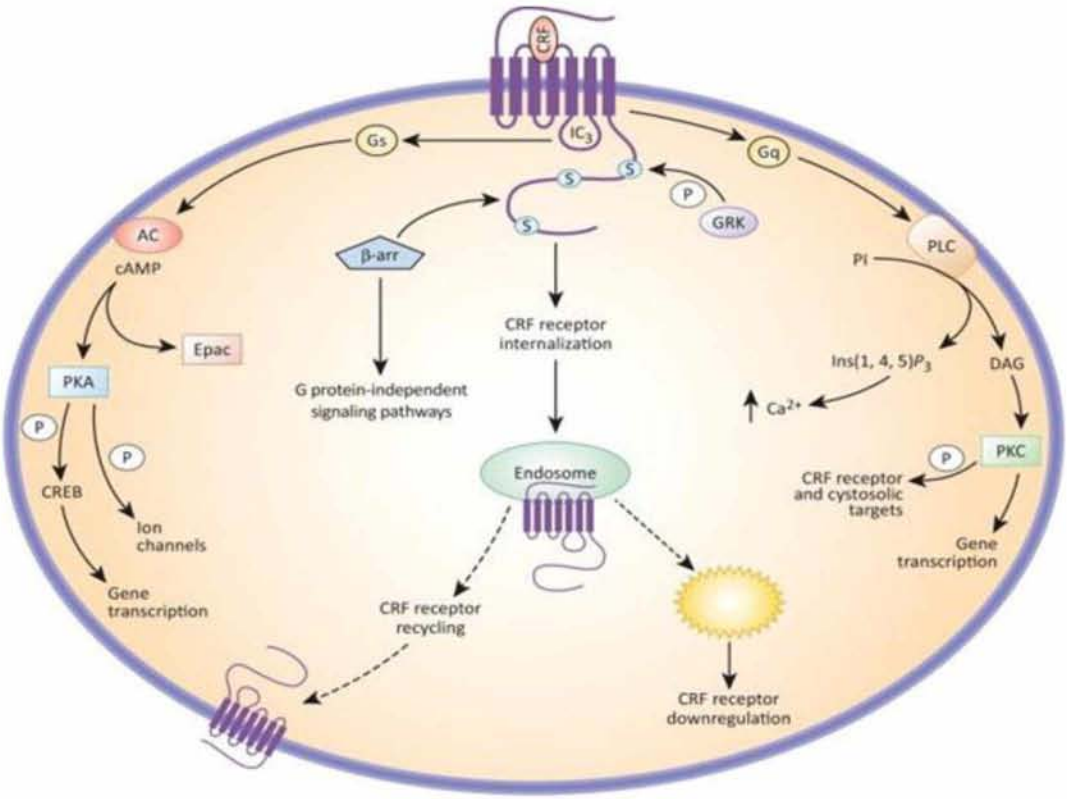
Εικόνα 3: Επισκόπηση της εκλεκτικής σύνδεσης των πεπτιδίων του στρες με τους CRH υποδοχείς. Το σύστημα της CRH αποτελείται από φυσικούς προσδέτες, CRH, UCN I, UCN II και UCN III, από τους υποδοχείς, CRHR1 και CRHR2 και από τις πρωτεΐνες δέσμευσης, CRH-BP και sCRHR2a. Οι CRH-BP και sCRHR2a προσδέονται στη CRH και στην UCN I, αντίστοιχα, ρυθμίζοντας τις βιολογικές δράσεις των προσδετών [45].

Α.1.5.2 Σηματοδοτική μεταγωγή μηνύματος των υποδοχέων CRHR1 και CRHR2

Ως έχει ήδη λεχθεί, οι υποδοχείς CRH συγκαταλέγονται μεταξύ των GPCRs υποδοχέων και διαθέτουν το χαρακτηριστικό μοτίβο των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων. Η πρόσδεση της CRH ή άλλου προσδέτη στους υποδοχείς CRHR1 και CRHR2 οδηγεί αρχικά σε μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης των υποδοχέων, όπου στη συνέχεια ενεργοποιείται η τριμερής G πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση ενός μορίου GDP και τη δέσμευση ενός μορίου GTP. Ακολουθεί η μετατόπιση της υπομονάδας α που φέρει το GTP σε ένα ένζυμο-τελεστή (effector enzyme), όπως η αδενυλική κυκλάση και η φωσφολιπάση C

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

(PLC: Phospholipase C). Ακολουθεί η εκκίνηση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου, εκ της οποίας και παράγονται οι δεύτεροι διαβιβαστές, που αποτελούν ενδοκυτταρικά μόρια μηνύματα όπως είναι το cAMP, το c-GMP, η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3: inositol (1,4,5)-trisphosphate), η διακυλογλυκερόλη (DAG: 1,2-diacylglycerol), ή το Ca^{+2} [17] (εικόνα 4). Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Α (PKA), η οποία συνοδεύεται από ένα καταρράκτη φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων διαφόρων υποστρωμάτων όπως ιοντικά κανάλια, ένζυμα, ιστόνες, μεταγραφικούς παράγοντες κ.ά., που αποσκοπούν τελικώς στην αλλαγή της μεμβρανικής διαπερατότητας και πολικότητας των κυττάρων, στην ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων, στη γονιδιακή μεταγραφή και πρωτεϊνοσύνθεση καθώς, στην αποβολή διαφόρων ουσιών από το κύτταρο, κ.λ.π. [46].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των CRH υποδοχέων μετά τη σύνδεσή τους με την ορμόνη. Η πρόσδεση της CRH στους CRHR1 και CRHR2 οδηγεί στην παραγωγή του cAMP μέσω της G_s υπομονάδας. Μέσω της G_q υπομονάδας διαμεταβιβάζουν το σήμα ενεργοποιώντας τη φωσφολιπάση C (PLC). Η GRK (GPCR κινάση) ρυθμίζει την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

απευαισθητοποίηση των υποδοχέων. AC: adenylylcyclase, αδενυλική κυκλάση; β-ARR: arrestin, αρρεστίνη; DAG: 1,2-diacylglycerol, 1,2 διακυλογλυκερόλη; IC_3: intracellular loop 3, ενδοκυτταρική θηλειά 3; Ins(1,4,5) P_3: inositol (1,4,5)-trisphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη; PKA: protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση Α [46].

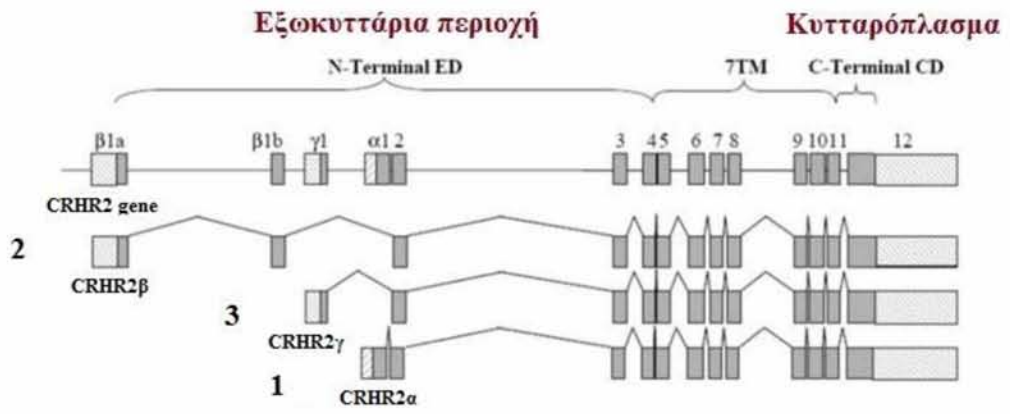
Η απευαισθητοποίηση, η ενδοκυττάρωση και ενίοτε η ελάττωση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της CRH παρατηρείται όταν σε αυτούς συνδέονται οι προσδέτες τους σε μεγάλο βαθμό ή όταν σημειώνονται υψηλές συγκεντρώσεις των τελευταίων [47] και τούτο μπορεί να συμβαίνει σε ορισμένες ψυχολογικές παθήσεις και διαταραχές όπως κατάθλιψη ή αυξημένη αγχώδης συμπεριφορά ή διάφορες παθολογικές καταστάσεις [48-50].

Προκειμένου να απευαισθητοποιηθούν οι υποδοχείς της CRH απαιτείται, όπως άλλωστε και για το σύνολο των GPCRs, φωσφορυλίωση του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα από τις GPCR κινάσες (GRKs), οι οποίες αναγνωρίζοντας το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη προσελκύουν β-αρρεστίνες (β-arrestins). Οι προρρηθείσες ακολούθως μεταβάλλουν τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα και κατ΄ αυτόν τρόπο επέρχεται η αναστολή της πρόσδεσής τους με τις G πρωτεΐνες, ενώ στη συνέχεια ενδοκυτταρώνεται ο υποδοχέας, με ποικίλους τρόπους, ο συνηθέστερος των οποίων τυγχάνει η επικάλυψη του συμπλόκου υποδοχέα-συνδέτη από μόρια κλαθρίνης [51].

Α.1.5.3 Διαλυτός CRH2a υποδοχέας (sCRHR2a)

Ο sCRH2α, είναι η τελευταίως παρατηρηθείσα στον εγκέφαλο ποντικού διαλυτή μορφή του υποδοχέα CRHR2 [52] και τυγχάνει παράγωγο εναλλακτικού ματίσματος (splice variant) του mRNA του CRHR2, εκ του οποίου απουσιάζει το εξόνιο 6 (Εικόνα 5). Συγγενεύει χημικά, σε σημαντικό βαθμό, με τα πεπτίδια CRH και UCN I, με την παρουσία του να προκαλεί μεταβολή της ικανότητας των CRH και UCN I για επαγωγή του cAMP σε κύτταρα εκφράζοντα υποδοχείς CRH.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου του CRHR2 και των μεταγράφων που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του. Σχηματική αναπαράσταση των τριών λειτουργικών μεταγράφων που εντοπίζονται: 1, 2 στον εγκέφαλο και την περιφέρεια (CRHR2α, CRHR2β), 3 στον εγκέφαλο (CRHR2γ). Απεικόνιση των εξονίων που κωδικοποιούν στην αμινο-τελική περιοχή (N-Terminal ED), των 7 διαμεμβανικών περιοχών (7TM) και της καρβοξυ -τελικής περιοχής (C-Terminal CD) (Πρωτ. [53]).

Α.1.5.4 Πρωτεΐνη που προσδένει τον CRH – (CRH binding protein, CRH-BP)

Τα πεπτίδια του στρες προσδένονται τόσο στους υποδοχείς CRHR1 και CRHR2, όσο και στη γλυκοπρωτεΐνη CRH-BP, 37-kDa χωρίς όμως αυτό το σύμπλοκο να παρουσιάζει βιολογική ενεργότητα [54]. Συνεπώς, η πρόσδεση με τη CRH-BP συνοδεύεται από αναστολή της βιολογικής ενεργότητας των πεπτιδίων του στρες και θεωρείται ότι αυτό αποτελεί τοπικό ρυθμιστικό μηχανισμό [55]. Τέλος, η CRH-BP, αφού εκφρασθεί κυρίως σε διάφορες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, όπως ο φλοιός, η αμυγδαλή και ο υποθάλαμος, αλλά και στην περιφέρεια, όπως στο ήπαρ, τα επινεδρίδια και τον πλακούντα, απελευθερώνεται ακολούθως στην αιματική κυκλοφορία [56].

Α.1.5.5 Αναστολείς των CRH Υποδοχέων

Οι μοριακές δομές των CRH υποδοχέων και η αλληλεπίδραση με τους προσδέτες τους έχουν αποτελέσει κεντρικό αντικείμενο πλήθους ερευνών, στοχεύοντας τελικώς στη δημιουργία ανταγωνιστών, επίτευγμα το οποίο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

συνεκτιμώμενων των φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών δράσεων των πεπτιδίων του στρες, κρίνεται υψίστης σημασίας και ενδιαφέροντος.

Στην κατεύθυνση αυτή, το πρώτο σημαντικό βήμα ήταν η περιγραφή του ανταγωνιστή α-helical CRH [57] και στη συνέχεια επακολούθησαν διάφορες μοριακά τροποποιημένες μορφές του, μέχρι τη δημιουργία της astressin [58] της οποίας η ικανότητα αναστολής έκκρισης της ACTH ήταν 30 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους προγενέστερούς της ανταγωνιστές. Η αστρεσίνη Β (Astressin B) που ακολούθησε, ήταν αποτέλεσμα ασήμαντης μοριακής τροποποίησης της astressin και επρόκειτο για ισχυρό ανταγωνιστή και των δύο CRH υποδοχέων, ενώ την διαδέχθηκε η Astressin-2B, που προσδένεται μόνο στον CRHR2 [59]. Ταυτόχρονα, έτερο εργαστήριο περιέγραψε τη δημιουργία της anti-sauvagine-30, που επρόκειτο για έναν ειδικό ανταγωνιστή του υποδοχέα CRHR2 [60].

Πέρα όμως από τους πεπτιδικούς ανταγωνιστές των υποδοχέων CRH, ευρίσκεται και πληθώρα μη πεπτιδικών ανταγωνιστών, πχ η ανταλαρμίνη (antalarmin) και το πεπτιδικό ανάλογο CP-154,526 (CRHR1 αναστολείς), οι οποίοι, συνεπεία της μη πεπτιδικής φύσης τους δεν επάγουν βιολογικές δράσεις και ως εκ τούτου η χρήση τους είναι πλεονεκτική σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Α.1.6 Ο ρόλος της CRH στο ΚΝΣ κατά την απάντηση στο στρες

Η ρυθμιστική επίδραση της CRH στην έκκριση της ACTH από τα κορτικοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης τυγχάνει ο βασικότερος παράγοντας ρύθμισης της απόκρισης στο στρες, ενεργοποιώντας τον YYE άξονα, που επιδρά επίσης και στο περιφερικό νευρικό σύστημα.

Το οξύ ή χρόνιο στρες διεγείρει την έκφραση του mRNA της CRH και της CRH σε διάφορα σημεία του εγκεφάλου. Η σεροτονίνη, η ΝΕ, η ακετυλοχολίνη και άλλοι νευροδιαβιβαστές προκαλούν αύξηση των επιπέδων του γονιδίου της CRH στον υποθάλαμο, ενώ στον αντίποδα, τη μείωσή τους στην υπόφυση προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή, καθώς και η ίδια η CRH [21].

Οι επικρατούσες θεωρίες αποδίδουν στον υποδοχέα της CRH, CRHR1, μεγαλύτερο βαθμό επίδρασης στην απόκριση του ΚΝΣ απ΄ ότι στον CRHR2 [47].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Συμπεριφορικές εκδηλώσεις του στρες, όπως η μειωμένη όρεξη, η αυξημένη μαθησιακή δεινότητα, η διεγερσιμότητα και η αρτηριακή πίεση, η μειωμένη σεξουαλική επιθυμία και η έντονη κινητικότητα, θεωρούνται απόρροια της επίδρασης της CRH στο ΚΝΣ [61], ενώ η επιληψία, η κατάθλιψη, η ανορεξία και η βουλιμία, καθώς και άλλες κλινικές εκδηλώσεις θεωρούνται συνέπειες της δράσης της CRH, διαμέσου του CRHR1.

Περαιτέρω, διαμέσου του CRHR2, η CRH επιδρά αρνητικά στην όρεξη και προκαλεί καταστολή του άγχους, οπότε η χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της και η επακόλουθη αναστολή της δράσης της μεταβάλλει τις συμπεριφορικές εκδηλώσεις του στρες [62].

Προσέτι, η δράση της «κεντρικής» CRH χαρακτηρίζεται παράλληλα και ως αντιφλεγμονώδης, λόγω της «κεντρικής» παραγωγής της στον υποθάλαμο και του ρόλου της στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα, ο οποίος παράγει προϊόντα με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (τα γλυκοκορτικοειδή), ενώ τα αποτελέσματα μεγάλου αριθμού ερευνών που διεξήχθησαν πρόσφατα καταδεικνύουν τη συμμετοχή στην ανοσοαπάντηση της οικογένειας των πεπτιδίων του στρες στην περιφέρεια, ανεξάρτητα από τον ΥΥΕ άξονα [63, 24-27], όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω.

Α.1.7 Η παρουσία της CRH στην περιφέρεια

Η περιφερική CRH έχει την ίδια ηλεκτροφορητική κατατομή με τη CRH που εκκρίνεται από την υπόφυση [63]. Επίσης, παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης με τους παράγοντες αντίδρασης οξείας φάσης, όπως ο παράγοντας Ρ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α), κατά τη διάρκεια της οξείας φλεγμονής, περιλαμβάνοντας και τη μειορύθμισή του από τα γλυκοκορτικοειδή.

Η CRH (πεπτίδιο και mRNA) ανιχνεύτηκε το 1990 σε ανοσοποιητικά κύτταρα, όπως τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα της κυκλοφορίας και τα ουδετερόφιλα [64]. Το 1991, οι Karalis et al. [63], αναφέρθηκαν αρχικά στην παρουσία ανοσοενεργής CRH σε έκκριμα φλεγμονής. Ιστοί αρουραίων του γένους Sprague-Dawley, οι οποίοι με χημικό τρόπο είχαν υποστεί άσηπτη φλεγμονή, εντοπίστηκαν να εκφράζουν τη CRH [63]. Εν συνεχεία, η CRH εντοπίστηκε και σε άλλες τοπικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

φλεγμονές, πχ σε αρθρικό θύλακα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα [65], σε σπλήνα και αρθρώσεις αρουραίων στελέχους Lewis με αρθρίτιδα [66], σε θυρεοειδίτιδες [67] και σε στομάχι ασθενών με εντεροκολίτιδα [68].

Το γονίδιο της CRH εντοπίστηκε, επίσης, στο θύμο αδένα, το ήπαρ και το σπλήνα αρουραίων [69]. Στο θύμο αδένα, η CRH ανιχνεύτηκε στο μυελό και συγκεκριμένα στα επιθηλιακά και στα μακροφάγα κύτταρα [70], ενώ στο σπλήνα εντοπίστηκε στις περιφερικές ζώνες του ερυθρού πολφού, όπου εντοπίζονται Β-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Η περιφερική CRH, επίσης έχει εντοπιστεί στο μυελό των επινεφριδίων, στους όρχεις, τις ωοθήκες, το καρδιαγγειακό σύστημα, το πάγκρεας, τους πνεύμονες, το ενδομήτριο και τον πλακούντα [71-74, 27].

Πειράματα που έγιναν με εκκρινόμενες από ενεργοποιημένα ανοσοποιητικά κύτταρα, κυτταροκίνες, καθώς και με άλλους παράγοντες ενεργοποίησης, όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), παρουσίασαν ενδιαφέροντα ευρήματα. Σε κύτταρα του θύμου και του σπλήνα, που είχαν ενεργοποιηθεί in vitro με IL-1 δεν παρατηρήθηκε αύξηση της έκκρισης της CRH [69], ενώ η παρουσία του LPS και της κονκαβαλίνης Α (ConA: Concavalin A) αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της έκκρισης της CRH από κύτταρα του ανοσοποιητικού (Β- και Τ- λεμφοκύτταρα) [75].

Α.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Α.2.1 Γενικά στοιχεία φλεγμονής

Προσεγγίζοντας εννοιολογικά τη φλεγμονή, μπορεί αυτή να ορισθεί α) ως μια πολύπλοκη αντίδραση/απόκριση σε τοπικό ή παντός είδους τραύμα, καθώς και σε ποικίλους άλλους παράγοντες, ή β) ως αγγειακή και κυτταρική απάντηση σε οποιασδήποτε μορφής τραύμα, η οποία εφόσον μπορεί να ελεγχθεί λειτουργεί ωφέλιμα και προστατευτικά, ενώ όταν καταστεί ανεξέλεγκτη λειτουργεί επιζήμια για τον οργανισμό. Προκαλείται είτε από μικρόβια, τοξίνες, παράσιτα, χημική και βιολογική καταστροφή, είτε από φυσική φθορά, όπως ακραίες τιμές θερμοκρασίας, ακτινοβολία, τραυματισμός, είτε είναι ανοσολογικής φύσεως, όπως σε υπερευαισθησία τύπου 1, 3, 4. Ο βασικός λόγος ύπαρξης των φλεγμονών είναι η εξάλειψη των όποιων κινδύνων για τον οργανισμό, αραιώνοντας ή αμβλύνοντας τη δράση των επιβλαβών παραγόντων, καταστρέφοντας και απομακρύνοντας αυτούς, με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

τελικό αποτέλεσμα τη θεραπεία και την επαναφορά του οργανισμού στη φυσιολογική του λειτουργία. Υπό αυτό το πρίσμα, η φλεγμονή τυγχάνει οργανική αντίδραση, με ευεργετικές επιδράσεις στην επιβίωση, αλλά σε περίπτωση απόκλισης εκτός ελέγχου των πολύπλοκων αγγειακών, ανοσολογικών και κυτταρικών αντιδράσεων που τη συνοδεύουν, οι επιπτώσεις της είναι οι ακριβώς αντίθετες.

Δεδομένου ότι η φλεγμονή αποτελεί ανοσιακή απόκριση κατά την οποία φέρονται στα σημεία μόλυνσης ή βλάβης των ιστών λευκοκύτταρα και μόρια του πλάσματος, σημειώνεται άνοδος στα επίπεδα παροχής αίματος καθώς και αυξημένη μετακίνηση λευκοκυττάρων στο υπό φλεγμονή σημείο, διαμέσου του τοπικού αγγειακού ενδοθηλίου [76].

Αναφορικά με την ως άνω κυτταρική μετανάστευση, πρόκειται για μια σύνθετη διεργασία που συσχετίζεται με τον τύπο των μεσολαβούμενων κυττάρων καθώς και με τον τρόπο δραστηριοποίησης και αλληλεπίδρασης αυτών με το ενδοθήλιο στα ποικίλα αγγειακά πεδία του σώματος.

Τα χημειοτακτικά μόρια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο αφενός στην καθοδήγηση της μετανάστευσης των κυττάρων και αφετέρου στη δραστηριοποίηση των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, προκειμένου να εκκινηθεί η μετανάστευσή τους. Όταν τα μαστοκύτταρα, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα, στα πλαίσια ανοσοποιητικών αντιδράσεων ή έπειτα από καταστροφή ιστού, αποδεσμεύουν διαμεσολαβητές της φλεγμονής, παρατηρείται αρμονική συνεργασία αυτών με τα αποδεσμευόμενα από ενζυμικά συστήματα του πλάσματος μόρια, προκειμένου να ελεγχθεί η αγγειακή διαπερατότητα και η κυκλοφορία του αίματος.

Τα φαγοκύτταρα, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, αποχωρούν από το μυελό των οστών και μετακινούνται προς τους περιφερικούς ιστούς και ιδίως σε μολυσμένες ή φλεγμαίνουσες περιοχές, όπου τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, και ενεργούν ως κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων (APCs: antigen presenting cells) [77], με ενδεχόμενη την επιστροφή τους στα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα.

Όσα λεμφοκύτταρα δεν είναι ενεργοποιημένα εγκαταλείπουν το θύμο και το μυελό των οστών και κατευθύνονται στους δευτερεύοντες λεμφικούς ιστούς, αλλά όταν το αντιγόνο τα ενεργοποιήσει, τα Τ-λεμφοκύτταρα εξ΄ αυτών μεταναστεύουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

προς σημεία φλεγμονής, εν εντιθέσει με τα Β και Τ αναμνηστικά -λεμφοκύτταρα τα οποία μετακινούνται προς έτερους λεμφικούς ιστούς.

Η καταγωγή των δενδριτικών κυττάρων, όπως τα δερματικά Langerhans, προέρχεται από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα του μυελού των οστών, που μετεγκαθίστανται σε άλλα όργανα και αφού προσλάβουν το αντιγόνο κατευθύνονται σε παραπλεύρως ευρισκόμενα λεμφογάγγλια και παρουσιάζουν το αντιγόνο στα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα.

Με την ανωτέρω αναφερόμενη μετανάστευση επιδιώκεται η συνάντηση των ολίγων εξειδικευμένων λεμφοκυττάρων με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η συρροή των λεμφοκυττάρων, των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και των αντιγόνων εκ των μολυσμένων ή φλεγμαίνοντων ιστών στα λεμφογάγγλια διασφαλίζεται από την κυτταρική μετανάστευση και τις οδούς λεμφικής αποχέτευσης, ενώ ο σπλην αναλαμβάνει το χειρισμό των αντιγόνων του αίματος [78]. Αναλυτικότερα, η έκφραση αυτών των μορίων στα σημεία φλεγμονής είναι αναγνωρίσιμη από υποδοχείς των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων ή φαγοκυττάρων, οπότε αυτά καθοδηγούν την κυτταρική κυκλοφορία στα επίμαχα σημεία [79].

Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, στους ιστούς διέπονται από τα εξής χαρακτηριστικά: α) άνοδο των επιπέδων παροχής αίματος στη φλεγμαίνουσα περιοχή, β) ενίσχυση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων, καθιστώντας δυνατή την εξαγγείωση των απαιτούμενων για την αντιμετώπιση της μόλυνσης πρωτεϊνών του πλάσματος (αντισώματα, συμπλήρωμα, κ.ά) και γ) άνοδο του ρυθμού μετανάστευσης των λευκοκυττάρων προς τους ιστούς [80].

Όταν σημειώνεται οξεία φλεγμονή, εξαιτίας μολύνσεως, αρχικά προσέρχονται τα ουδετερόφιλα, που αποτελούν το βασικό κυτταρικό τύπο για πολλές ημέρες και στη συνέχεια καταφθάνουν τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, ενώ τελευταία καταφθάνουν τα CD+8 Τ-λεμφοκύτταρα και λίγα Β-λεμφοκύτταρα [81]. Η εξέλιξη της οξείας αντίδρασης είναι συνάρτηση της εξουδετέρωσης ή μη του αντιγόνου ή του μολυσματικού παράγοντα και σε αρνητική εκδοχή η αντίδραση εξελίσσεται σε χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση, οπότε τότε παρατηρείται μικρή προσέλευση ουδετερόφιλων και ταυτόχρονα μεγάλη συγκέντρωση CD+4 Τ-λεμφοκυττάρων και μονοπύρηνων μακροφάγων [82, 83].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.2.2 Διαμεσολαβητές φλεγμονής

Στα πλαίσια της φλεγμονώδους αντίδρασης, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, λεμφοκύτταρα και ιστιοκύτταρα, αποδεσμεύουν μεγάλο αριθμό διαμεσολαβητών, οι οποίοι δρουν είτε επιταχυντικά είτε ανασταλτικά επί της φλεγμονής. Οι βασικότεροι διαμεσολαβητές της φλεγμονής είναι οι παρακάτω:

Κυτοκίνες

Η οικογένεια των κυτοκινών διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της φλεγμονής και ως βασικότεροι εκπρόσωποι τους θεωρούνται η IL-1, η IL-6 και ο TNF-α, καθώς και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ: interferon γ), η οποία συντελεί τα μέγιστα στη φλεγμονώδη απάντηση και ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια της οξείας απάντησης και στη χρόνια φλεγμονή. Η δράση της IFN-γ και του TNF-α έχει ως αποτέλεσμα να εκφράζονται τα μόρια προσκόλλησης και να αυξάνονται τα επίπεδα της φαγοκυτταρικής δραστικότητας των μακροφάγων. Ο TNF-α εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, ενώ η IFN-γ από τα λεμφοκύτταρα, τα Τ-βοηθητικά κύτταρα 1 (T-helper cells 1), τους φυσικούς φονείς (NK: natural killers) και τα Τ- κυτταροτοξικά (Tc: T-cytotoxic) [84]. Παρότι ο κύριος σκοπός των ιντερφερονών (α, β και γ) έγκειται στην προφύλαξη υγιών κυττάρων που βρίσκονται παραπλεύρως των μολυσμένων από ιό, εκ των οποίων και εκκρίνονται, διαπιστώνεται ότι η IFN-γ διαδραματίζει και έναν άλλο ιδιαίτερο ρόλο που συνίσταται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας ΙΙ (MHCII) και προκαλούν τη μεγαλύτερη απελευθέρωση κυτταροκινών, προκειμένου να μειώσουν την έκταση της μόλυνσης – φλεγμονής, αλλά το γεγονός αυτό είναι επιβλαβές στην περίπτωση των χρόνιων φλεγμονών, αφού καταστρέφονται ταχύτερα οι ιστοί, συνεπεία της συγκέντρωσης μακροφάγων.

Ως προεκτέθηκε, η έκκριση του TNF-α προέρχεται από τα μακροφάγα και πρόκειται για μια προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη, η οποία συνεργάζεται με την IFN-γ στη χρόνια φλεγμονή. Η δε έκφρασή του καθορίζεται από τον NF-κB, τα τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοσυλίωσης (AGEs: advanced glycation end-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

products) και τις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες [85], ενώ η δράση του συνεπάγεται την παραγωγή ελευθέρων ριζών και ταυτοχρόνως την αναστολή της λειτουργικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες του ενδο- και εξωκυττάριου χώρου [86, 87].

Χυμοκίνες

Πρόκειται για ομάδα μικρών πολυπεπτιδίων, εμπεριέχοντα από 70 έως 80 αμινοξέα, που έχουν την ιδιότητα χημειοτακτικής προσέλκυσης ποικίλων τύπων λευκοκυττάρων και καθορισμού της έκφρασης και του σχηματισμού των επί των λευκοκυτταρικών μεμβρανών ιντεργκρινών. Στις χυμοκίνες αποδίδεται και η προσκόλληση επί του αγγειακού ενδοθηλίου ποικίλων λευκοκυττάρων και η μετανάστευση αυτών σύμφωνα με την αύξηση της συγκέντρωσής τους. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί η IL-8, η οποία προέρχεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και παραμένουσα επί του φλεγμαίνοντος ενδοθηλίου, διασφαλίζει την επ΄ αυτού στέρεα πρόσδεση των ουδετερόφιλων.

Λιπιδιακοί μεσολαβητές φλεγμονής

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF: platelet activating factor), που προέρχεται από τη διάσπαση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών έχει ως συνέπεια την εκδήλωση φλεγμονωδών αντιδράσεων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και η χημειόταξη ηωσινόφιλων και η ενεργοποίηση/αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων. Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος, που επίσης προέρχεται από τη διάσπαση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών, ενισχύει τη γένεση προσταγλανδινών και θρομβοξανών, στις οποίες οφείλονται διάφορες δράσεις σχετιζόμενες με την πρόκληση φλεγμονής και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.2.3 Η συμμετοχή της κεντρικής και περιφερειακής CRH στη φλεγμονή

Η συμμετοχή της κεντρικής (υποθαλαμική) CRH δείχνει να είναι μεγαλύτερη στην άμεση φλεγμονώδη απόκριση στο στρες, απ΄ ότι στη μακροχρόνια. Η μεγαλύτερη ευαισθησία της CRH στην αρνητική ανατροφοδότηση των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με την AVP, καταδεικνύει ότι η δεύτερη, επιδρώντας στον YYE άξονα, συμμετέχει κυρίως στη χρόνια φλεγμονή [88, 89, 64]. Σε πειραματικά επαγόμενη οξεία φαρμακευτική κολίτιδα, βρέθηκε άμεση συσχέτιση της απουσίας CRH με τον περιορισμό της τοπικής φλεγμονής [90], ενώ σε έτερη ερευνητική προσπάθεια παρατηρήθηκε σύνθεση CRH και UCNs από ιστιοκύτταρα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου, υποδηλώνοντας το ενδεχόμενο και παρακρινής εμπλοκής τους σε αλλεργικές διαταραχές [91].

Σε κατάσταση τοξιναιμίας, η καταστολή της αλληλεπίδρασης λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου συνεπεία των γλυκοκορτικοειδών, φέρεται να εμποδίζεται από την αναστολή της σύνθεσης των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών [92]. Η επίδραση της CRH στην περιφέρεια, δείχνει να μεταβάλλεται σε σχέση με αυτή στην κεντρική χορήγηση. Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι όταν αυτή χορηγείται περιφερειακά στους αρουραίους επιφέρει πτώση της αρτηριακής πίεσης και άνοδο της αγγειοχάλασης διαμέσου του CRHR2, ενώ σε περίπτωση κεντρικής χορήγησης σημειώνεται άνοδος της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού [93- 95].

Η CRH, διαμέσου του CRHR1 και της επακόλουθης έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα, καθορίζει καταλυτικά την απαρχή της φλεγμονής [27]. Επίσης, ενδέχεται να υφίσταται αμφίδρομη επικοινωνία με βάση το ότι η έκκριση της ACTH και των γλυκοκορτικοειδών διεγείρεται από την IL-1β, την IL-6 και τον TNF-α, με επακόλουθο την ενεργοποίηση της λειτουργίας του συστήματος του στρες [96].

Επιπρόσθετα, η CRH εμπλέκεται και στο φαινόμενο της απόπτωσης. Πρόσφατες παρατηρήσεις έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα CRHR1 προκάλεσε φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της υπομονάδας p38 MAPK με αποτέλεσμα εν τέλει την απόπτωση των κυττάρων της σειράς PC12 [97].

Επίσης, έχει διαπιστωθεί η θετική ή αρνητική επίδραση της CRH στον NF-kB, ο οποίος διαδραματίζει καίριο ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση και το οξειδωτικό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

στρες [98]. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η CRH επιδρά ανάλογα με τον τύπο των μελετώμενων κυττάρων, αφού λειτουργεί ανασταλτικά στον NF-kB, μέσω του CRHR1, σε επιδερμικά μελανοκύτταρα ανθρώπου, ενώ σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα η CRH έχει προ-φλεγμονώδη δράση και διαμέσου του CRHR1 προάγει τον NF-kB [99]. Ιδιαίτερη μνεία όμως θα πρέπει να γίνει και στο γεγονός ότι αναστέλλοντας την πρόσδεση του NF-kB στο DNA κυττάρων της υπόφυσης επήλθε ενεργοποίηση της μεταγραφής της προ-οπιο μελανοκορτίνης (POMC: proopiomelanocortin) [100].

Τέλος, διαπιστώθηκε συσχέτιση της CRH με την εξέλιξη του καρκίνου, υπό την έννοια ότι μεγεθύνει τη μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων του μαστού και ειδικότερα της σειράς MCF7, ενώ αναδιοργανώνει τα ινίδια ακτίνης και αποδεσμεύει, διαμέσου της Cox-1, προσταγλανδίνες [101], οι οποίες έχουν φλεγμονώδεις ιδιότητες και δύνανται να αποδεσμεύσουν ελεύθερες ρίζες στα φλεγμαίνοντα σημεία. Λαμβανόμενου υπόψη του γεγονότος ότι η αγγειογένεση διακόπτεται από τους αγωνιστές του CRHR2, αναδύεται το ενδεχόμενο η μη παρουσία του στα καρκινικά κύτταρα να συντελεί στην ανάπτυξη του νεοπλάσματος [102]. Η ομαλή στρεσογόνος απόκριση ενδεχομένως να διασφαλίζεται από την εξισορροπημένη περιφερειακή δράση, διαμέσου των CRHR1 και CRHR2 υποδοχέων στους ιστούς.

Α.2.4 Δράσεις της περιφερικής CRH στη φλεγμονώδη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος

Όπως προαναφέρθηκε, το mRNA της CRH καθώς και το ίδιο το πεπτίδιο έχει ανιχνευτεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [103, 104, 63, 66]. Επιπρόσθετα, η παρουσία των CRH υποδοχέων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν POMC-πεπτίδια (όπως η ACTH και η β-ενδορφίνη), ενισχύει την άμεση εμπλοκή της CRH στη φλεγμονώδη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος [105]. Στις παρακάτω ενότητες θα αναφερθούν εκτενέστερα οι προ-φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της CRH στο ανοσοποιητικό σύστημα, in vivo και in vitro.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

A.2.4.1 In vivo- Προ-φλεγμονώδεις δράσεις

Από πειραματική σκοπιά έχουν ανακύψει βάσιμες ενδείξεις για την προ-φλεγμονώδη ιδιότητα της περιφερικής CRH, αφού παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη καταστολή της κυτταρικής διήθησης και ελάττωση της φλεγμονής, όταν χορηγήθηκε περιφερικά, πριν την υποδόρια ένεση carageenin, αντίσωμα έναντι της CRH ή της ανταλαρμίνης (ειδικού ανταγωνιστή του CRHR1) σε αρουραίους με φλεγμονή [63].

Επιπρόσθετα, η επαγωγή οξείας φλεγμονής σε κύτταρα σπλήνας ποντικού, έπειτα από προέκθεση σε LPS, οδήγησε σε υπέρμετρη αύξηση της έκφρασης του mRNA του υποδοχέα CRHR1 από τα πολυμορφοπύρηνα του σπλήνα, τα οποία διεγείρονται για φαγοκυττάρωση και παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έχει αποδειχθεί ότι όταν προκαλείται οξεία ανοσολογική απόκριση, τα πρόδρομα κύτταρα των κοκκιοκυττάρων ενεργοποιούνται και εκφράζουν τον CRHR1 κατά τη διάρκεια της αιμοποίησης των σπληνοκυττάρων [106, 107]. Σημειωτέον ότι οι υποδοχείς CRHRs έχουν ανιχνευτεί σε κύτταρα του σπλήνα [103, 106], σε Τ- λεμφοκύτταρα, σε μονοκύτταρα [108, 109] και σε ιστιοκύτταρα [110] καθώς και στο θύμο αδένα [111].

Ελάττωση της φλεγμονής παρατηρήθηκε όταν χορηγήθηκαν ανταγωνιστές των υποδοχέων της CRH σε τρωκτικά με πειραματικά προκληθείσα αρθρίτιδα [112] ή με αυτοάνοση κερατίτιδα. Διαπιστώθηκε, ότι η χορήγηση ανταλαρμίνης επιδρά θετικά στην επιβίωση ποντικών σε σηπτικό σοκ, αφού επιτυγχάνεται καταστολή της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1β, IL-6, TNF-α) του πλάσματος, ενώ επίσης η απελευθέρωση αυτών από ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα ενισχύεται από τη CRH [113].

Τέλος, στην περίπτωση της οξείας φλεγμονής, από εντεροτοξίνη του στελέχους *C.Difficile* (TxA) παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της CRH και των υποδοχέων της, CRHR1 και CRHR2, καθώς και αντίστοιχη μείωση της φλεγμονής με τη χορήγηση ανταγωνιστών κατά των υποδοχέων της CRH [114, 115]. Παρ'όλα αυτά, στις υπόψη παρατηρήσεις δεν κατέστη δυνατή η αποσαφήνιση της σημασίας της περιφερικής έναντι της κεντρικής CRH.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.2.4.2 -In vivo- Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Εκτός από τις προφλεγμονώδεις, έχουν επισημανθεί και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της CRH. Ειδικότερα, σε περιπτώσεις αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, κατά την οποία καταστρέφεται η μυελίνη, από κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α, που παράγονται από Τ-κύτταρα, παρατηρήθηκε καταστολή των συμπτωμάτων όταν χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά CRH και προς τούτο φέρεται να συμβάλει μερικώς και η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα [116].

Επίσης, έχει παρατηρηθεί μείωση της φλεγμονής στο πέλμα αρουραίων που προκλήθηκε από έκθεση σε θερμό (48-58 ^{o}C), κρύο (-20 ^{o}C) ή κάποιο χημικό παράγοντα, όταν χορηγήθηκε ενδοδερμικά CRH, ασχέτως από γλυκοκορτικοειδή ή φαινόμενα υπότασης [117]. Με βάση αυτό το μοντέλο όμως, αποδείχθηκε τελικώς ότι το είδος της CRH δράσης στην προκληθείσα φλεγμονή, συσχετίζεται άμεσα με το μέγεθος της χορηγηθείσας δόσης, υπό την έννοια ότι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες όταν χορηγούνται μικρές δόσεις πεπτιδίου, και προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες στην αντίθετη περίπτωση.

Τέλος, ο ρυθμός παραγωγής του TNF-α στον ορό ποντικών μειώνεται δραματικά, όταν χορηγείται ενδοφλέβια CRH πριν από LPS, χωρίς να διαφαίνεται συμβολή των γλυκοκορτικοειδών [118] αφού τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στον ορό δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά.

Α.2.4.3 -In vitro Προ-φλεγμονώδεις δράσεις

Οι in vitro έρευνες κατέδειξαν πρωτίστως προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες της CRH, όπως ο αξιοσημείωτος πολλαπλασιασμός απομονωμένων σπληνοκυττάρων αρουραίου [104], ο πολλαπλασιασμός και η έκφραση των υποδοχέων της IL-2 σε Τ-λεμφοκύτταρα [119], η έκφραση πρωτεϊνών οξείας φάσης σε ηπατοκύτταρα, η παραγωγή κυτταροκινών από λευκοκύτταρα [120, 121], και η έκκριση των πεπτιδίων POMC [105]. Επιπρόσθετα, η CRH προάγει τη χημειοταξία [122] και την οριακή αύξηση της παραγωγής αραχιδονικού οξέος από περιτοναϊκά κύτταρα, ενώ υπάρχουν και αναφορές αναστολής της παραγωγής IFN-γ [123] και έμμεσης ενίσχυσης της κυτταροτοξικής δράσης των ΝΚ κυττάρων [124].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Ως βασικότερη όμως προ-φλεγμονώδης δράση της CRH λογίζεται αυτή στα ιστιοκύτταρα, όπου διαπιστώθηκε ότι προκαλεί αποκοκκίωση και έκκριση ισταμίνης [109, 125]. Η επίδραση της CRH σε ανοσοκύτταρα αρχικά καταγράφηκε με τη σημειούμενη διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB σε θυμοκύτταρα ποντικού έπειτα από επώασή τους με CRH [98].

Επιπρόσθετα, η περιφερική CRH, πέραν των προ-φλεγμονωδών δράσεών της στο ανοσοποιητικό σύστημα, έχει δειχθεί ότι κατέχει προ-φλεγμονώδη ρόλο και σε κύτταρα του ενδοθηλίου, μέσω της διαφορετικής έκφρασης των υποδοχέων της CRHR1 και CRHR2 [126]. Στις παρακάτω ενότητες αφού αναπτυχθεί η έννοια του ενδοθηλίου, θα συζητηθεί ο ρόλος της CRH (προ-φλεγμονώδης/ αντιφλεγμονώδης δράση) στη φλεγμονή του ενδοθηλίου.

Α.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ, ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Α.3.1 Φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου - Ο σημαντικός ρόλος του Μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Το ενδοθήλιο αποτελεί τον πιο μεγάλο ενδοκρινή αδένα του σώματος και ρυθμίζει την ομοιοστασία του κυκλοφορικού συστήματος [127]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, με τη συμμετοχή του ενδοθηλίου, το αγγείο διατηρείται σε κατάσταση αγγειοδιαστολής και ταυτόχρονα ασκείται αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδης δραστηριότητα. Είναι γενικώς πλέον αποδεδειγμένος ο καίριος ρόλος του ενδοθηλίου στη δομή και τον τόνο των αγγείων, καταρρίπτοντας την προσέγγισή του ως απλή κυτταρική στοιβάδα επικάλυψης του εσωτερικού των αιμοφόρων αγγείων [128]. Ο ρόλος του δεν περιορίζεται μόνο στη συμπερίληψη των στοιχείων των υγρών που κυκλοφορούν, αλλά έγκειται και στη συμμετοχή του στον καταμερισμό του αίματος και των κυτταρικών πληθυσμών, μέσω της διέλευσης των στοιχείων που διεισδύουν από τα αγγειακά τοιχώματα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού καθώς και της οξείας απάντησης στη φλεγμονή [129].

Η ομοιοστασία και η λειτουργία του ενδοθηλίου, καθορίζονται σε σημαντικό βαθμό από τη φλεγμονώδη διαδικασία, δημιουργώντας μεταξύ τους μια σχέση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

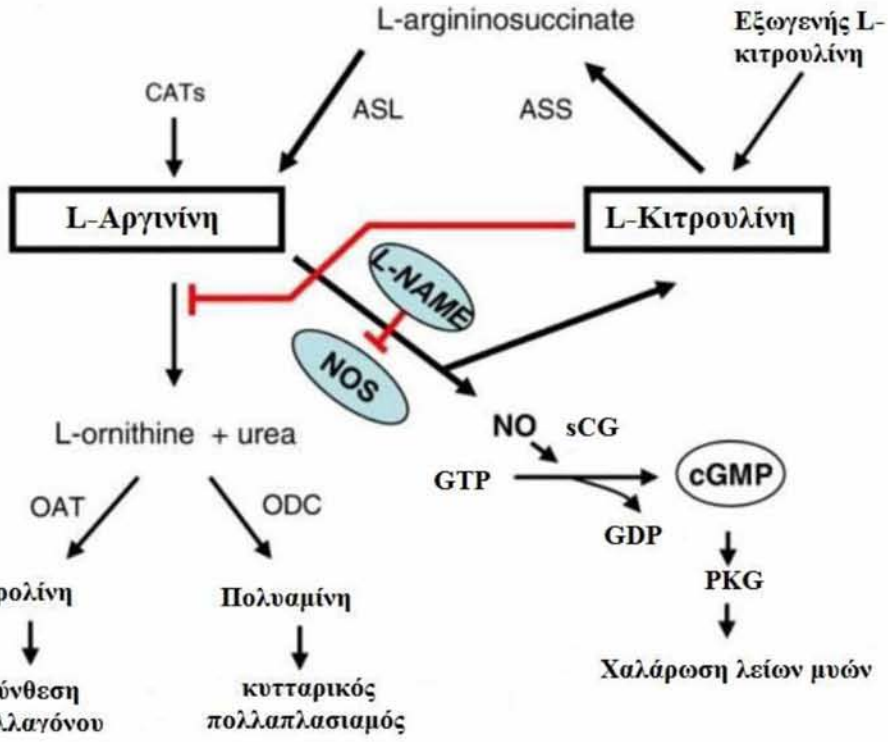
αλληλοσυνεισφοράς, στην αναγκαία βάση επικοινωνίας νευροενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Συνέπεια της χρόνιας φλεγμονής είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία, όπως θα αναπτυχθεί σε επόμενη ενότητα, αποτελεί τη βάση για την έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Τα κύτταρα του ενδοθηλίου μεταφέρουν στο αρτηριακό τοίχωμα ερεθίσματα ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο, την πίεση του αίματος, την αγγειογένεση και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Οι παραπάνω διεργασίες επιτελούνται με τη βοήθεια του μονοξειδίου του αζώτου (NO: Nitric oxide), της προσταγλανδίνης I2 (PGI2: Prostaglandin I2), του ενδοθηλιακού παράγοντα υπερ-πόλωσης (EDHF), της βραδυκινίνης, της αδρενομεδουλίνης, του c-νατριουρητικού πεπτιδίου, της ενδοθηλίνης-1, της αγγειοτασίνης-2, των προσταγλανδινών, του H_2O_2 και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [130].

Το NO, διαδραματίζει έναν ενεργό ρόλο στις περισσότερες από τις προστατευτικές δράσεις του ανέπαφου ενδοθηλίου, όπου σε συνδυασμό με την PGI2 ασκεί αντιαθηροσκληρωτικές ιδιότητες, εμποδίζοντας την προσκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων [131]. Επιπρόσθετα, αποτελεί αγγειοχαλαρωτικό παράγοντα που εκκρίνεται από το ενδοθήλιο, και κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη διατήρηση του τόνου των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος [132].

Ο σχηματισμός του NO διενεργείται μέσω της καταλυτικής δράσης της συνθετάσης του NO, η οποία μετατρέπει το υπόστρωμα L-αργινίνη σε L-κιτρουλίνη (Εικόνα 6). Η αργινίνη και η κιτρουλίνη τυγχάνουν ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου της ουρίας, με τη δυνατότητα αναγέννησης της αργινίνης με τη μεσολάβηση διαφόρων ενζύμων. Διακρίνονται τρεις ισομορφές της συνθετάσης του NO: α) η νευρωνική ή τύπος I (nNOS), β) η επαγόμενη ή τύπος II (iNOS) και γ) η ενδοθηλιακή συνθετάση ή τύπος III (eNOS). Η ευαισθησία στα επίπεδα ασβεστίου διαφέρει σε καθεμία από αυτές και πιο συγκεκριμένα η δραστικότητα της πρώτης μορφής δεν καθορίζεται από την ύπαρξη ιόντων ασβεστίου και το γονίδιο του ενζύμου παράγεται από φλεγμονώδεις παράγοντες. Η δραστικότητα των άλλων δύο μορφών προϋποθέτει απαραιτήτως την παρουσία ιόντων ασβεστίου [133].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής NO με τη βοήθεια της συνθετάσης του NO (NOS). Η παραγωγή του NO οδηγεί μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της cGMP σε χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων [134].

Α.3.2 Φλεγμονή του Ενδοθηλίου

Η αρχική αντίδραση του αγγειακού ενδοθηλίου σε βλαπτικά ερεθίσματα είναι η αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης τα οποία ρυθμίζουν την προσκόλληση των κυκλοφορούντων κυττάρων του αίματος (λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων) και μετακινούμενα υπό τη στιβάδα των κυττάρων του ενδοθηλίου σχηματίζουν τον αρχικό πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας.

Η μετανάστευση των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων εξαρτάται από κυτταροσκελετικές αλλαγές που επισυμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει διαπιστωθεί ότι η αναστολή των μικροϊνιδίων των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα ή της πνευμονικής αρτηρίας μειώνει τη διαενδοθηλιακή μετανάστευση των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων, αντίστοιχα, επισημαίνοντας το ρόλο των δομικών αλλαγών που επιτελούνται στο ενδοθήλιο, στη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων [135].

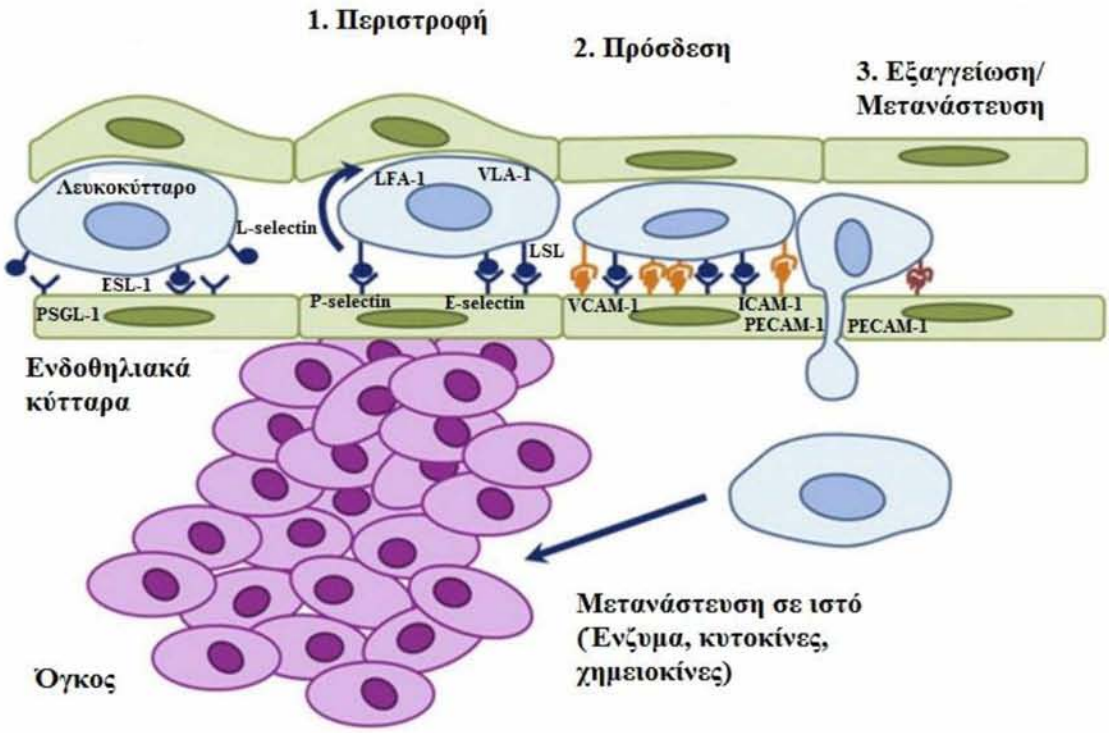
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η έκφραση των μορίων πρόσδεσης (adhesion molecules), που ρυθμίζουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων, επάγεται από κυτταροκίνες και καθορίζεται από τον κυτταρικό πληθυσμό που εμπλέκεται, καθώς και από την κατάσταση διαφοροποίησης του ενδοθηλιακού κυττάρου. Συνήθως, αυτά τα μόρια ξεκινούν τη διαδικασία της πρόσδεσης σε απάντηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μπορούν να διακριθούν, με βάση τη δομή τους, σε τρεις οικογένειες: (α) στα μόρια κυτταρικής πρόσδεσης (CAMs) της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που περιλαμβάνει το διακυτταρικό μόριο πρόσδεσης 1 (ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1), το αγγειακό μόριο πρόσδεσης 1 (VCAM-1: vascular adhesion molecule 1) και το αιμοπεταλιακό ενδοθηλιακό μόριο πρόσδεσης 1 (PECAM-1: platelet endothelial adhesion molecule 1) (β) στις σελεκτίνες, που περιλαμβάνουν την P-, L- και E- σελεκτίνη, και (γ) στις ιντεγκρίνες (CD11/CD18) [136].

Κατά τη διάρκεια της ενδοθηλιακής φλεγμονώδους απόκρισης τα μόρια κυτταρικής πρόσδεσης είναι υπεύθυνα για τη διαδικασία της περιστροφής, της πρόσδεσης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου στον υποενδοθηλιακό χώρο, στο σημείο της φλεγμονής (Εικόνα 7). Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων μορίων κυτταρικής πρόσδεσης αποτελούν δείκτες της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου και ταυτόχρονα προγνωστικούς δείκτες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και διάφορων καρδιαγγειακών συμβαμάτων [127].

Οι ισχύουσες σήμερα θεωρίες για την επίπτωση της φλεγμονής του ενδοθηλίου στην παθογένεση της αθηρογένεσης περιλαμβάνουν διαταραχή της αγγειακής σηματοδότησης, αυξημένο οξειδωτικό φορτίο, συμμετοχή φλεγμονωδών κυττάρων και θρόμβωση [137].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου πρόσδεσης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου (Τροποπ. από [127]. Η αρχική αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η περιστροφή τους επί της ενδοθηλιακής επιφάνειας διενεργείται με τη μεσολάβηση, πρωταρχικά, των μορίων πρόσδεσης της οικογένειας των σελεκτινών. Εν συνεχεία, τα λευκοκύτταρα προσδένονται ισχυρά στο ενδοθήλιο έπειτα από χημειοτακτική προσέλκυση αυτών από σηματοδοτικά μηνύματα του ενδοθηλίου. Η πρόσδεση διενεργείται με τη βοήθεια των ιντεγκρινών που βρίσκονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, όπως το αντιγόνο-1 σχετιζόμενο με τη λευκοκυτταρική λειτουργία (LFA-1: leykocyte-funtion associated-antigen-1) και το όψιμο αντιγόνο-4 (VLA-4: very late antigen-4) καθώς και διαμέσου του διακυτταρικού μορίου πρόσδεσης 1 (ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1) και του αγγειακού μορίου πρόσδεσης 1 (VCAM-1: vascular adhesion molecule 1). Τέλος, για τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο απαιτείται η αντίδραση του αιμοπεταλιακού ενδοθηλιακού μορίου πρόσδεσης 1 (PECAM-1: platelet endothelial adhesion molecule 1) που εκφράζεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου με το αντίστοιχο που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα, απαιτώντας επιπλέον τη συμμετοχή των ιντεγκρινών.

ESL-1: E-selectin ligand -1, LSL: L-selectin ligand-2, PSGL-2: P-selectin glycoprotein ligand-1.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.3.3 Προ-φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της CRH στη φλεγμονή του ενδοθηλίου

Κοινή παραδοχή αποτελεί το γεγονός ότι η CRH επιδρά ποικιλοτρόπως, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το επίπεδο στρες που υπόκειται ένα σύστημα [138]. Έχει ήδη καταγραφεί ότι η προγενέστερη επίδραση της CRH σε ποικίλους τύπους ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί αποκλίνουσες δράσεις των κυτταροκινών και της έκφραση της eNOS [126], ενώ το γενικότερο πλαίσιο παρατηρήσεων σχετικά με τη CRH υποδεικνύουν μια διττή επίδρασή της στους περιφερικούς ιστούς, που σημαίνει ότι επιδρά ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ως προ-φλεγμονώδης σε υψηλές [138]. Το δε στάδιο διαφοροποίησης και ο βαθμός ενεργοποίησης του ενδοθηλίου καθορίζει και τον τρόπο απόκρισής του στη φλεγμονώδη αντίδραση [126].

Ειδικότερα, μελέτες έχουν αποσαφηνίσει τον προ-φλεγμονώδη ρόλο της CRH δρώντας μέσω του CRHR1 [104, 119], ενισχυόμενες από δεδομένα που καταδεικνύουν την τοπική παραγωγή της CRH από ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια φλεγμονής, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα [63]. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς CRHR2 έχουν άμεση εμπλοκή στην ενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου (HUVECs) [139]. Ωστόσο, έχει περιγραφεί η CRH-επαγόμενη αναστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοός, υποδηλώνοντας την πιθανότητα η CRH να κατέχει και αντιφλεγμονώδη ρόλο [140].

Παρόλο που οι κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένοι, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση των CRH υποδοχέων εμπλέκεται στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του cAMP και του ασβεστίου [141]. Η αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται έπειτα από την πρόσδεση της CRH στον CRHR1, ακολουθούμενη από αύξηση της ενεργότητας της PKA. Η τελευταία στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί διάφορα γονίδια στόχους που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια [142]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η διέγερση του CRHR1 ενεργοποιεί το μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνο σήμα (MAPKs: mitogen activated protein kinases) [97]. Οι διάφοροι τύποι κινασών της οικογένειας MAPKs, όπως η ERK1/2, η p38 MAPK, και η JNK1/2 (c

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

jun N-terminal kinase 1/2), ρυθμίζουν την έκφραση κυτοκινών και διαμεσολαβούν την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών [143].

Η εμπλοκή της περιφερικής CRH στη φλεγμονώδη αντίδραση αποδεικνύεται και από την επαγόμενη αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και των ποσοτήτων της ET-1 που εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, με ταυτόχρονο περιορισμό της έκλυσης NO [144]. Παράλληλα, στα πλαίσια της ίδιας έρευνας προέκυψε ότι σε συνθήκες χρόνιας έκθεσης σε στρεσογόνο περιβάλλον μεταβάλλονται οι αντιδράσεις της ορμόνης και του ενδοθηλίου, αφού σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής συνεπεία της CRH εκκρίνεται ET-1 από το ενδοθήλιο χωρίς όμως να υπάρχουν αλλαγές στη συγκέντρωση του NO.

Α.3.4 Σύνδεση των δεικτών φλεγμονής του ενδοθηλίου με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Η χρόνια αγγειακή φλεγμονώδης διαταραχή είναι άμεσα συνυφασμένη με την ικανότητα του ενδοθηλίου να επάγει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης. Συγκεκριμένοι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο TNF-α εκκρίνονται από το ενδοθήλιο διεγείροντας την ενεργοποίηση των μορίων προσκόλλησης με συνέπεια την αύξηση του αγγειακού κινδύνου [145].

Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου θεωρείται η έκφραση της πλέον πρώιμης διαταραχής του ενδοθηλίου που προηγείται της μόνιμης αγγειακής βλάβης. Τη βασική έκφραση της μη ορθής λειτουργίας του ενδοθηλίου, αποτελεί η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Σε καταστάσεις φλεγμονής, η αύξηση της IL-6 και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) προκαλεί τη μείωση της παραγωγής του NO είτε εξαιτίας της ελάττωσης του υποστρώματος L-αργινίνης, είτε εξαιτίας της μεγάλης παραγωγής ROS [146]. Οι προρρηθέντες συντελεστές αποτελούν παράγοντες που εμπλέκονται, ανάλογα με τη συγκέντρωση και την υπάρχουσα κατάσταση του κυττάρου, στη διαδικασία της οξειδωτικής ή μη ισορροπίας του ενδοθηλίου, με τη συνύπαρξη μεταβολικών παραγόντων, που καθιστούν πιο πιθανή την εμφάνιση της αθηρωμάτωσης και οι οποίοι θα αναπτυχθούν εκτενέστερα σε επόμενες ενότητες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.4 ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Α.4.1 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αθηροσκλήρωση

Επειδή οι δράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι πολλές, όπως προαναφέρθηκε, οι αλλαγές στη λειτουργία τους μπορεί να επηρεάζουν ένα ή πολλά συστήματα ταυτόχρονα ή σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ενίοτε, προσδιορίζεται αυξημένη διαπερατότητα των μακρομορίων, άλλοτε αυξημένη ή μειωμένη παραγωγή αγγειοσυσπαστικών ή αγγειοσυσταλτικών ουσιών ή αυξημένη θρομβωτική δραστηριότητα. Η πιο γνωστή μορφή της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας αφορά διαταραχές της ρύθμισης του αυλού των αγγείων.

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου συνοδεύεται από αλλαγή της αντίδρασης των αγγείων που οδηγεί σε αγγειόσπασμο, μεταβολή της διαπερατότητας της έσω στιβάδας των αρτηριών στις λιποπρωτεΐνες, αυξημένη άθροιση μονοκυττάρων υπενδοθηλιακά, μεταβολή του ρυθμού ανάπτυξης και επιβίωσης των κυττάρων των αρτηριών (όπως ελαττωμένη αναγέννηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων κ.λπ.) και διαταραχή στους μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης που ευνοούν το σχηματισμό θρόμβων [147].

Το ενδοθήλιο των αγγείων δημιουργείται από μία στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων πάχους 1-2μm. Το ενδοθηλιακό κύτταρο είναι επίπεδο με κεντρικό πυρήνα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ροής του αίματος και την αποκατάσταση της ακεραιότητας του αγγείου, όταν υποστεί βλάβη. Έχει βασικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ πήξης και ινωδόλυσης. Η θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική, που πολυμερίζεται κι έτσι σχηματίζεται ο θρόμβος. Μετά το σχηματισμό του θρόμβου ενεργοποιείται η πλασμίνη από τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) και λύεται ο θρόμβος.

Το ενδοθήλιο, υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν επιτρέπει την παθητική διείσδυση των μακρομορίων. Επιπλέον, τα κύτταρα του ενδοθηλίου αποτρέπουν την είσοδο των έμμορφων συστατικών του αίματος και τη δημιουργία θρόμβου. Παράλληλα, ρυθμίζουν και τον τόνο του τοιχώματος της αρτηρίας [148]. Η ενδοκρινική και παρακρινική δράση του ενδοθηλίου συνίσταται στην απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών, θρομβογόνων και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

θρομβολυτικών ουσιών, μορίων προσκόλλησης, αυξητικών παραγόντων και αναστολέων της αύξησης της αθηρωματικής πλάκας [149].

Το ενδοθήλιο επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMC: Vascular smooth muscle cells), μέσω παραγόντων που την προάγουν ή την αναστέλλουν, κι έτσι συμμετέχει στην αγγειακή αναδιαμόρφωση (remodeling).

Όπως προαναφέρθηκε, σε φυσιολογικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα εκφράζουν ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων και αγγειοδραστικών ουσιών, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η ενδοθηλίνη-1 και οι αγγειοτασίνες I και II [150]. Η παρουσία, από την άλλη, ενός αριθμού επιβλαβών παραγόντων στο ενδοθήλιο οδηγούν στην απώλεια της βιολογικής δραστικότητας του ενδοθηλιακού NO με ταυτόχρονη επαγωγή της έκφρασης προ-φλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης, κυτταροκινών και προ-οξειδωτικών παραγόντων. Όλες αυτές οι διαφοροποιήσεις που επέρχονται στο ενδοθήλιο συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης [151]. Οι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες δραστηριοποιούν το ενδοθήλιο και προωθούν το αθηρωματικό μοντέλο. Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου έχει ως συνέπεια τη μείωση της ενεργότητας του NO του ενδοθηλίου, καταλήγοντας στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης [152, 153].

Η ακολουθία των σταδίων της αθηροσκλήρωσης προσδιορίζεται από πολύπλοκες αντιδράσεις μεταξύ των κυττάρων της φλεγμονής (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) και των αγγειακών κυττάρων (ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά) [154].

Α.4.2 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης

Η αθηρωμάτωση ή αθηροσκλήρωση είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή η οποία εξελίσσεται προοδευτικά σε πολλά στάδια. Πρόκειται για μια διαταραχή η οποία σε όλες τις φάσεις εξέλιξής της περιλαμβάνει τη χρόνια υποκλινική φλεγμονή [155].

Το τοίχωμα μιας φυσιολογικής αρτηρίας απαρτίζεται από τρεις χιτώνες: τον έσω, τον μέσο και τον έξω. Ο έσω χιτώνας καλύπτεται από μια στοιβάδα κυττάρων,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

το ενδοθήλιο. Μία συνοπτική θεώρηση των αποτελεσμάτων πειραματικών μελετών σε ζώα και σε ανθρώπους έδειξε ότι ο σχηματισμός «λιπωδών ραβδώσεων» αντιπροσωπεύει την πρωταρχική βλάβη της αθηρωμάτωσης. Ο σχηματισμός αυτών των πρώιμων αθηρωματικών βλαβών, προκαλείται, τις περισσότερες φορές, από την αύξηση της ποσότητας των λιποπρωτεϊνών που περιέχεται σε σημεία του έσω χιτώνα των αρτηριών. Αυτή η συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων μπορεί να επέρχεται λόγω της αυξημένης διαπερατότητας του υπερκείμενου ενδοθηλίου [156].

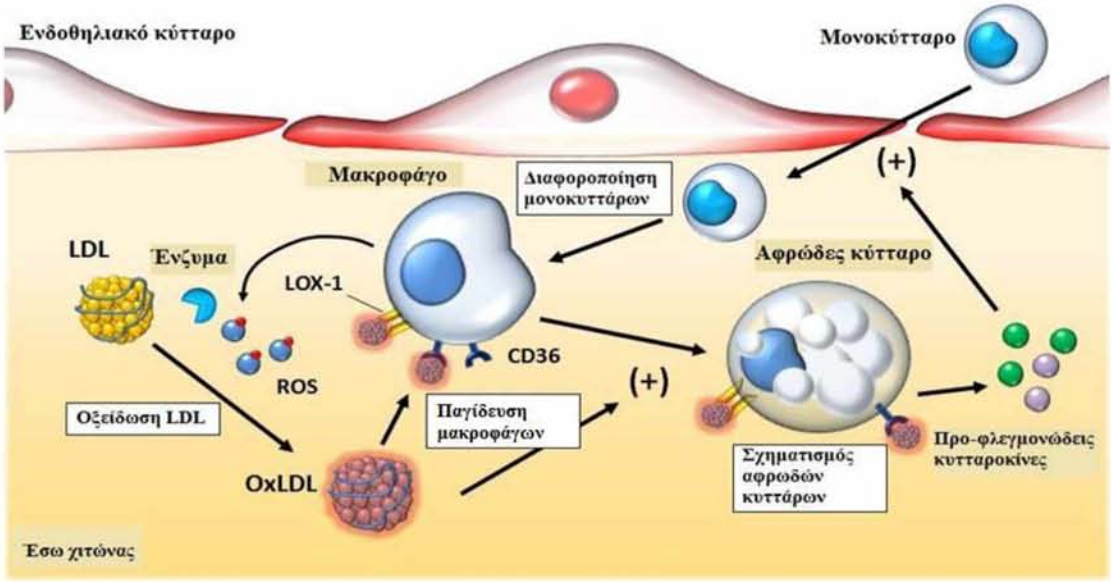
Το ενδοθήλιο απαλείφει το εσωτερικό των αγγείων και σύμφωνα με επίκαιρες θεωρήσεις δεν αποτελεί εσωτερικό προστατευτικό κάλυμμα των αγγείων αλλά λειτουργικό ιστό που συμμετέχει στη διατήρηση της λειτουργίας του αγγειακού τοιχώματος, απαντώντας σε φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα [157]. Σε δυσμενή ερεθίσματα, οι ομοιοστατικές λειτουργίες του ενδοθηλίου αλλάζουν προάγοντας τη φλεγμονώδη απόκριση και τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Η αθηρωματική πλάκα αποτελείται από συσσωματώματα λιπιδίων, κυρίως χοληστερόλης, που βρίσκονται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες και εστέρες χοληστερόλης [158].

Κατά τη διάρκεια της αθηροσκλήρωσης σημειώνεται μεταβολή των συνήθων λειτουργιών που διατηρούν την ομοιόσταση του ενδοθηλίου και πλέον κυριαρχούν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενδεικτικά αναφέροντας την προσέλκυση λευκοκυττάρων, μεταξύ των οποίων και τα μονοκύτταρα, από τα εκφραζόμενα στο φλεγμαίνων ενδοθήλιο μόρια προσκόλλησης, τα οποία εισερχόμενα στο εσωτερικό της έσω αρτηριακής στιβάδας, επηρεάζουν το τοίχωμα των αγγείων προς την αποθήκευση λιπιδίων και την αγγειίτιδα. Η πρόσληψη τροποποιημένων λιποπρωτεϊνικών μορίων και ο σχηματισμός των αφρωδών μακροφάγων ενισχύεται από τους φλεγμονώδεις συντελεστές, ενώ σημειώνεται διείσδυση των Τ-λεμφοκυττάρων στο εσωτερικό τοίχωμα, τα οποία με την έκκριση κυτταροκινών, επαυξάνουν την απόκριση στη φλεγμονή και ενισχύουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [159].

Κατά τη φάση εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης, οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) συναθροίζονται στον έσω χιτώνα, και συνδέονται με μόρια πρωτεογλυκανών από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το διάστημα παραμονής των πλούσιων σε λίπη σωματιδίων, μέσα στο αρτηριακό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

τοίχωμα (Εικόνα 8) [160]. Οι λιποπρωτεΐνες δύνανται να τροποιηθούν χημικά. Οι σημαντικότερες τροποποιήσεις στις οποίες υπόκεινται αποτελούν η οξείδωση και η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση [161]. Οι τροποποιημένες LDL, μέσω οξείδωσης, αποτελούν στην πραγματικότητα ένα μείγμα ατελώς καθορισμένο, με σύσταση που ποικίλλει. Τόσο το λιπιδικό όσο και το πρωτεϊνικό ήμισυ των μορίων της LDL μπορεί να συμμετέχει στις διαδικασίες οξειδωτικής τροποποίησης [162]. Κατά την τροποποίηση των λιπιδίων σχηματίζεται: α) υπεροξείδιο του υδρογόνου, β) φωσφολιπίδια και γ) αλδεϋδικά κατάλοιπα της διάσπασης των λιπαρών οξέων. Οι τροποποιήσεις των αποπρωτεϊνικών κλασμάτων περιλαμβάνουν διάσπαση σε διάφορα σημεία του πεπτιδικού σκελετού και παραγωγή διαφόρων προϊόντων από τα κατάλοιπα συγκεκριμένων αμινοξέων [163].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της έναρξης και εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) προσκολλάται στους υποδοχείς CD36 της επιφάνειας των μακροφάγων τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε αφρώδη κύτταρα.

Ο υποδοχέας CD36, διαμεσολαβεί την πρόσληψη της οξειδωμένης μορφής της LDL, την oxyLDL (Εικόνα 8), και των μεταφορέων της οικογένειας των ATP-δεσμευμένων πρωτεϊνών (ABC), όπως οι ABCA1 και ABCG1, οι οποίες συμμετέχουν στην εκροή της χοληστερόλης στην απολιποπρωτεΐνη A1 (apo A1) και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) [164]. Η διατήρηση της λιπιδικής ομοιοστασίας στα μακροφάγα έχει άμεση σχέση με τη δραστηριότητα των παραπάνω υποδοχέων και μεταφορέων, και η παραμικρή αλλαγή στην έκφραση αυτών των μορίων μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων και τη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης.

Στο πλαίσιο της περιγραφείσας φλεγμονώδους διαδικασίας μπορεί να γίνει ρήξη του λεπτού προστατευτικού ινώδους καλύμματος της αθηρωματικής πλάκας προς τον αυλό του αγγείου, επιτρέποντας την εκροή του άμορφου υλικού της, τη δημιουργία θρόμβωσης και την επαγωγή οξέως αρτηριακού συνδρόμου [159].

Α.4.3 Κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση, που συνιστά νόσο των αρτηριών, δύναται να προσβάλει σχεδόν κάθε σημείο του οργανισμού. Οι βλάβες που προκαλούνται είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε στένωση του αυλού μίας ή περισσοτέρων στεφανιαίων αρτηριών, καταλήγοντας σε στηθάγχη [165]. Η προχωρημένη απόφραξη και θρόμβωση των στεφανιαίων αρτηριών οδηγεί σε νέκρωση τμήματος του μυοκαρδίου, με τελικό αποτέλεσμα το έμφραγμα [166].

Στην κυκλοφορία του εγκεφάλου, η στένωση των αρτηριών προκαλεί ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια [165], ενώ η τοπική στένωση της μίας ή και των δύο αρτηριών των νεφρών προκαλεί υπέρταση [167]. Επίσης, στην κυκλοφορία των κάτω άκρων η απόφραξη προκαλεί διαλείπουσα χωλότητα, δηλαδή μυϊκό πόνο στη διάρκεια της βάδισης, που υποχωρεί με την ανάπαυση. Το πιο συχνό σημείο που προσβάλλεται είναι οι κνήμες, ωστόσο και άλλες περιοχές, εξίσου, μπορούν να προσβληθούν, όπως είναι οι γλουτιαίοι, τα σφυρά ή ο άκρος πόδας [149]. Στο δέρμα, κυρίως των άκρων, στην περίπτωση μείωσης της ροής του αίματος τοπικά, δημιουργούνται αλλοιώσεις, με αποτέλεσμα την εμφάνιση εξελκώσεων, περιφερικής κυάνωσης, και σε σπάνιες περιπτώσεις, πρόκληση γάγγραινας [168].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.4.4 Συμμετοχή της CRH στους μηχανισμούς παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης

Η CRH προάγει το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων στα μακροφάγα, διαδικασία που συνιστά το αρχικό κρίσιμο στάδιο της έναρξης της αθηροσκλήρωσης [169]. Η LPS-επαγόμενη αύξηση της παραγωγής των κυτοκινών στα μακροφάγα οφείλεται στη CRH, η οποία προάγει επίσης την έκφραση του toll-like υποδοχέα-4 (TLR-4) μέσω της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων PU.1 και AP.1 [113, 170]. Επιπρόσθετα, η CRH μπορεί να προκαλέσει την εκλεκτική κινητοποίηση των Τ- λεμφοκυττάρων, η οποία ακολουθείται από ενεργοποίηση των μακροφάγων και αγγειακών κυττάρων από τις κυτοκίνες, καταλήγοντας σε φλεγμονώδη απόκριση στο αρτηριακό τοίχωμα, σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και έναρξη της αθηροσκλήρωσης [171].

Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η ενδομυϊκή χορήγηση της CRH σε υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια ορφανά του LDL υποδοχέα, προκάλεσε σημαντικά μεγαλύτερη αθηροσκληρωτική αλλοίωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [172]. Ωστόσο, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί ο άμεσος μηχανισμός με τον οποίο η CRH προάγει τη φλεγμονή που οδηγεί μεταγενέστερα στην αθηροσκλήρωση.

Οι Cho et al. [169], έδειξαν ότι η CRH μέσω της μείωσης που προκαλεί στην έκφραση της ABCA1, του μεταφορέα "κλειδί" για την εκροή της χοληστερόλης, διευκολύνει το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων των μακροφάγων, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Η CRH μέσω του CRHR1 επάγει τη φωσφορυλίωση της Akt και μειώνει τη γονιδιακή έκφραση του ABCA1 μεταφορέα ο οποίος ρυθμίζει την ενδοκυτταρική λιπιδική ομοιοστασία των μακροφάγων, προάγοντας τη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης. Συμπερασματικά, η CRH ως νευροπεπτίδιο του στρες, εκτός των άλλων δράσεών της στην κυκλοφορία και στο τοπικό σύστημα του στρες ενεργοποιεί το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων καθώς επίσης και την απελευθέρωση της ET-1, συμβάλλοντας στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.4.5 Επιδημιολογία και οι διαφορές των δύο φύλων στην αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση συνιστά πλέον μια κοινή διαταραχή, της οποίας απόρροια αποτελεί η ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων που αποτελούν την πρώτη αιτία νοσηρότητας και θανάτου σε άνδρες και γυναίκες σε όλο τον κόσμο. Οι πρόσφατες προβλέψεις καταδεικνύουν ότι μέχρι το έτος 2020, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ειδικότερα η αθηροσκλήρωση, θα αποτελέσουν το κύριο αίτιο νοσηρότητας παγκοσμίως [173]. Σύμφωνα με εκτίμηση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (Π.Ο.Υ), το 2004 τα καρδιοαγγειακά νοσήματα ευθυνόταν για το 32% των θανάτων στις γυναίκες έναντι του 27% των θανάτων στους άνδρες [174]. Στην Ευρώπη, το 54% του συνόλου των θανάτων στις γυναίκες οφειλόταν στα καρδιαγγειακά νοσήματα ενώ στους άνδρες το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 43% [175].

Η επίπτωση της αθηροσκλήρωσης και της στεφανιαίας νόσου είναι πολύ χαμηλότερη σε προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες συνήθως έχουν χαμηλή αρτηριακή πίεση, σε σύγκριση με άνδρες ίδιας ηλικίας. Αυτό το πλεονέκτημα των γυναικών, ωστόσο, εξαλείφεται σταδιακά μετά την εμμηνόπαυση, όπου παύει η λειτουργία των ωοθηκών και τα επίπεδα των οιστρογόνων ελαττώνονται, με αποτέλεσμα ο κίνδυνος ανάπτυξης καρδιαγγειακών διαταραχών να αυξάνεται στις γυναίκες σε σύγκριση με άνδρες ίδιας ηλικίας [176]. Διαφορές των φύλων στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα με «φυσιολογικές» στεφανιαίες αρτηρίες έχουν επίσης περιγραφεί [177, 178]. Είναι πιο συχνές στις γυναίκες (10-25%), και ειδικότερα σε μη-λευκές γυναίκες, σε σύγκριση με άνδρες (6-10%).

Στις γυναίκες η αθηροσκλήρωση μπορεί να συμβεί ενόσω φαινομενικά υπάρχουν φυσιολογικές στεφανιαίες αρτηρίες. Οι λειτουργικοί μηχανισμοί έχουν αποδοθεί σε διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στη στεφανιαία αναδιαμόρφωση, που εμφανίζονται στο αγγειακό τοίχωμα σε απάντηση προς τη συσσώρευση της πλάκας. Οι διαφορές στην αναδιαμόρφωση έχουν χαρακτηριστεί ως: θετική αναδιαμόρφωση (κυρίαρχη στις γυναίκες) και αρνητική αναδιαμόρφωση (κυρίαρχη στους άνδρες), και έχουν εξεταστεί στο παρελθόν [179]. Στη θετική αναδιαμόρφωση, η πλάκα και η στένωση μπορεί να συμβούν χωρίς εστιακή απόφραξη, επειδή η νόσος είναι πιο διάχυτη με λιγότερες τμηματικές στενώσεις. Σε απάντηση, στη διάχυτη συσσώρευση της πλάκας, το εσωτερικό ελαστικό στρώμα λεπταίνει, ενώ το αγγείο διαστέλλεται, ώστε να φιλοξενήσει την πλάκα (ασυμπτωματική), έτσι ώστε όταν οι γυναίκες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

παρουσιάσουν συμπτώματα, το βάρος της πλάκας να είναι μεγαλύτερο καθώς το αγγείο έχει ήδη αντισταθμιστεί. Στην αρνητική αναδιαμόρφωση, η εστιακή αποφρακτική στεφανιαία βλάβη και η τμηματική στένωση του αγγειακού τοιχώματος είναι μεγαλύτερες [179].

Οι φυλοεξαρτώμενες διαφορές στην επίπτωση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης, της υπέρτασης και της στεφανιαίας νόσου (CAD: coronary artery disease), όπως προλέχθηκε, αποδίδονται στην άμεση παρέμβαση των οιστρογόνων σε παράγοντες κινδύνου όπως τα επίπεδα της χοληστερόλης, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και τα επίπεδα της ινσουλίνης [180].

Είναι προφανές ότι η διαδικασία της αθηρωμάτωσης συνιστά ένα φαινόμενο προϊούσης φθοράς των αρτηριών του οποίου πολλοί μηχανισμοί παραμένουν ακόμα άγνωστοι. Οι στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα, ανδρογόνα) αποτελούν βασικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, μετά την εμμηνόπαυση. Αυτό οφείλεται κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά, σε διαφορές στα επίπεδα των οιστρογόνων που παρέχονται στους καρδιαγγειακούς ιστούς. Επιπλέον, γίνεται όλο και πιο φανερό ότι τα χαμηλά επίπεδα της τεστοστερόνης ορού που εμφανίζουν οι ηλικιωμένοι άνδρες σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο και άλλες αγγειακές διαταραχές [180].

Η υπόθεση ότι η ορμονική θεραπεία είναι αποτελεσματικό προληπτικό μέτρο για τη στεφανιαία νόσο, υποστηρίζεται από προηγούμενες επιδημιολογικές μελέτες [181, 182]. Αυτό αποδόθηκε στις αντιοξειδωτικές δράσεις των οιστρογόνων όπως έχει καταδειχθεί σαφώς σε ζωικά μοντέλα με πρώιμη αθηρωμάτωση [181, 182], βελτιώσεις στο προφίλ των λιπιδίων (μείωση της LDL χοληστερόλης και αύξηση της HDL χοληστερόλης) [183, 184], και στην άμεση αθηροπροστατευτική δράση τους. Παραδείγματα καρδιαγγειακής προστατευτικής δράσης των οιστρογόνων αποτελούν η ταχεία αγγειοδιαστολή [185], η αναστολή της αγγειακής απάντησης μετά από τραυματισμό [186, 187], η μείωση της βλάβης του μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα [188, 189], καθώς και η μείωση της υπερτροφίας του μυοκαρδίου.

Υπάρχει μια ευρέως διαδεδομένη αντίληψη ότι οι διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών στον επιπολασμό της CAD οφείλονται στη μειωμένη παραγωγή τεστοστερόνης στους άνδρες [190]. Το γεγονός ότι κλινικές παρατηρήσεις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αποκαλύπτουν ότι οι άνδρες με ιστορικό καρδιαγγειακών διαταραχών πάσχουν από υπογοναδισμό, έχει οδηγήσει στη θεώρηση ότι τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηροσκληρωτικής καρδιακής διαταραχής [191].

Παράλληλα, η επίτευξη μιας φυσιολογικής συγκέντρωσης τεστοστερόνης μέσω της χορήγησης της θεραπείας υποκατάστασης έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ευεργετικές επιδράσεις στους παθοφυσιολογικούς δείκτες και τα κλινικά συμπτώματα της στεφανιαίας νόσου [192]. Πολλοί από τους παράγοντες που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική διαδικασία σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση όπως η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο (ΜΣ), ο διαβήτης τύπου 2. Η θετική συσχέτιση της αθηρωμάτωσης με τη στυτική δυσλειτουργία υποδηλώνει τη σημασία των φυσιολογικών επιπέδων των ανδρογόνων στη διατήρηση της ακεραιότητας των αρτηριών και τη χρησιμότητα της θεραπείας υποκατάστασης με τεστοστερόνη [192].

Στις επόμενες ενότητες θα γίνει λόγος για την παραγωγή και το μεταβολισμό των στεροειδών των γονάδων και θα μελετηθούν εκτενέστερα οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτά συμμετέχουν στη λειτουργία ή δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την αθηροσκλήρωση.

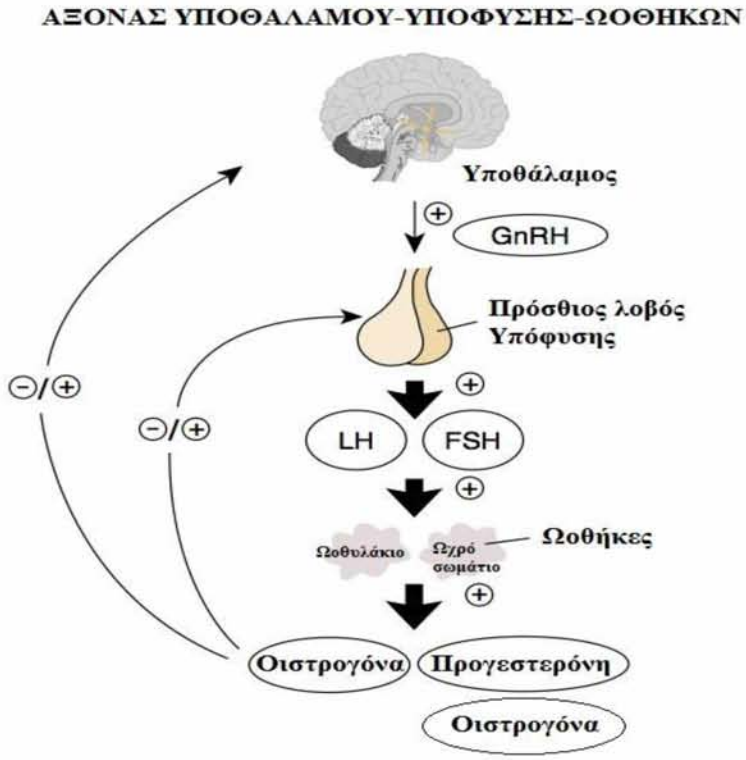
Α.5 ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ

Α.5.1 Ο άξονας υποθάλαμος - υπόφυση – ωοθήκες – όρχεις

Η λειτουργία των ωοθηκών, περιλαμβάνοντας την περιοδική ωρίμανση των ωοθυλακίων, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη λειτουργία του άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – ωοθήκες (ΥΥΩ), συνοδευόμενη από φαινόμενα που αφορούν στις ωοθήκες, τη μήτρα, τον κόλπο και γενικά ολόκληρο τον θήλυ οργανισμό. Η ενδοκρινική λειτουργία των ωοθηκών αφορά στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών, οιστρογόνων και προγεστερόνης (Εικόνα 9). Ο όρος οιστρογόνα αναφέρεται σε μια ομάδα τριών ορμονών: την 17β-οιστραδιόλη (Ε2), την οιστρόνη (Ε1) και την οιστριόλη (Ε3). Εξ'αυτών, η 17β-οιστραδιόλη έχει τη μεγαλύτερη οιστρογονική δράση. Ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμομών που περιλαμβάνει την προγεστερόνη, τα ανδρογόνα και τις ορμόνες του φλοιού των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

επινεφριδίων. Στην κατηγορία των οιστρογόνων ανήκει και η ρελαξίνη, η οποία παράγεται κυρίως στη διάρκεια της κύησης.



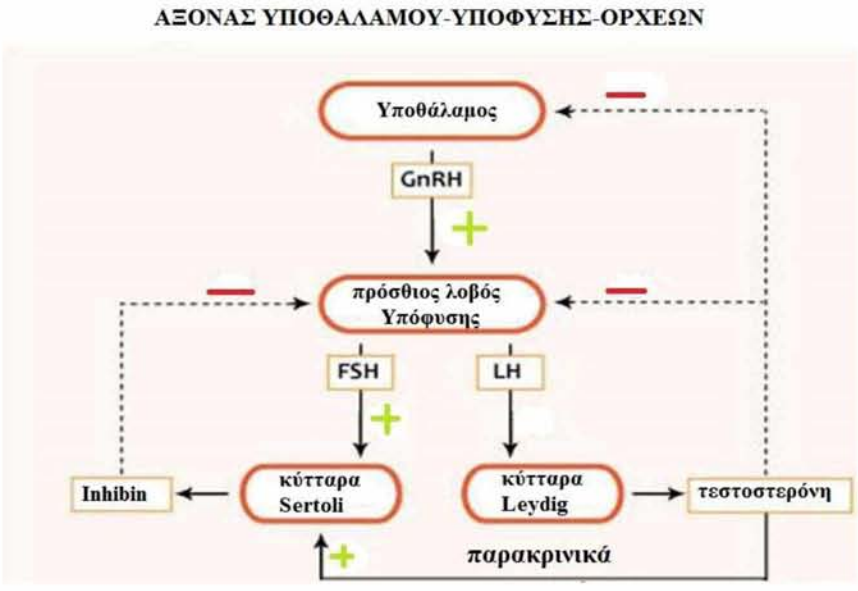
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες. Οι εκλυτικές ορμόνες που εκκρίνονται από τον υποθάλαμο (GnRH) επηρεάζουν την έκκριση των υποφυσεϊκών ορμονών (FSH, LH) οι οποίες οδηγούν στην έκκριση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από το ωοθυλάκιο και το ωχρό σωμάτιο αντίστοιχα.

Η λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις αρχίζει από την εμβρυϊκή περίοδο, αλλά η έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (GnRH), των γοναδοτρόπων ορμονών και των ανδρογόνων κατά την περίοδο αυτή δεν είναι αξιοσημείωτη. Γενικά, παρατηρείται μία προοδευτική αύξηση της ικανότητας σύνθεσης στεροειδών στους όρχεις από τη γέννηση μέχρι την ηλικία των 60 ημερών, υπό την επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της ωοθυλακιοτρόπου (FSH) και άλλων ορμονών (Εικόνα 10) [193, 194]. Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά τις πρώτες 60 ημέρες μετά τη γέννηση η τεστοστερόνη στους όρχεις αυξάνεται τουλάχιστον στο πενταπλάσιο, ενώ κατά την ίδια περίοδο η συχνότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

έκκρισης της LH αυξάνεται στο δεκαπλάσιο. Η μέση συγκέντρωση της LH, αφού φτάσει το μέγιστό της, στη συνέχεια είτε παραμένει σταθερή είτε αρχίζει να μειώνεται. Η μέση συγκέντρωση της τεστοστερόνης στο πλάσμα του αίματος συνεχίζει να αυξάνεται προοδευτικά και μετά την 60η ημέρα από τη γέννηση. Η διαπίστωση αυτή έγινε σε αμνούς των φυλών Ile-de-France [195], Merino X Corriedale [196] και σε Hampshire X clun [197]. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην προοδευτική αύξηση του αριθμού των κυττάρων του Leydig ή και στην αύξηση της ικανότητας των κυττάρων αυτών για σύνθεση ανδρογόνων [198].

Με την πάροδο της ηλικίας διαπιστώνεται αύξηση της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης και μείωση της συγκέντρωσης της LH στο αίμα. Η μείωση της συχνότητας της έκκρισης της LH κατά την προηβική περίοδο, που ποικίλλει από φυλή σε φυλή, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι: α) η έκκριση της LH από την υπόφυση μειώνεται λόγω της αρνητικής παλίνδρομης επίδρασης των στεροειδών που εκκρίνονται σε αυξημένο βαθμό από τους όρχεις, β) η μείωση της συχνότητας της έκκρισης της LH μπορεί να οφείλεται σε μειωμένο ρυθμό έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο, που και πάλι οφείλεται σε αρνητική παλίνδρομη επίδραση των στεροειδών των όρχεων [199].



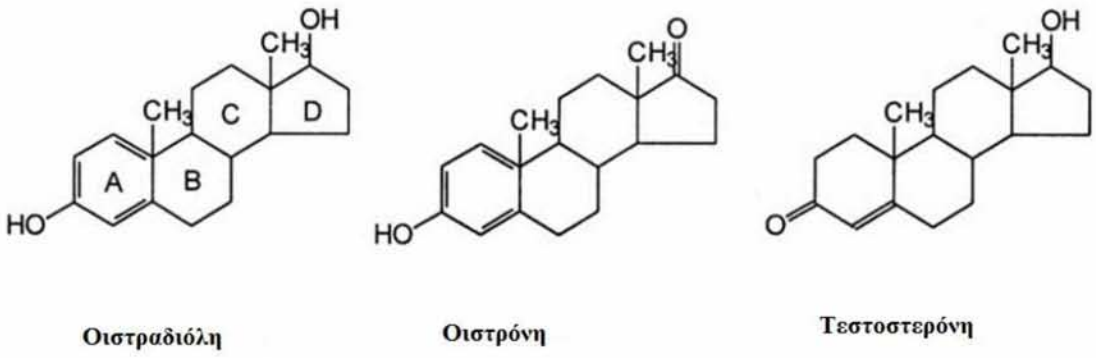
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Όρχεις. Οι εκλυτικές ορμόνες που εκκρίνονται από τον υποθάλαμο (GnRH) επηρεάζουν την έκκριση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

των υποφυσεϊκών ορμονών (FSH, LH) οι οποίες οδηγούν στην έκκριση της τεστοστερόνης από τα κύτταρα του Leydig.

Α.5.2 Χημική δομή και βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες αποτελούνται από ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων (A, B, C, D), στο οποίο είναι προσδεδεμένες ομάδες ή αλυσίδες ποικίλου μήκους και χαρακτηρίζονται από τον αριθμό των ατόμων άνθρακα. Τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από τον δακτύλιο Α και διαχωρίζονται σε α) ορμόνες του οιστρανίου, που αποτελούνται από 18 άτομα άνθρακα, σε β) ορμόνες του ανδροστανίου, που αποτελούνται από 19 άτομα άνθρακα και σε γ) ορμόνες του πρεγνανίου, που αποτελούνται από 21 άτομα άνθρακα. Στο σχήμα 1 απεικονίζεται η χημική δομή της Ε2, της Ε1 και της τεστοστερόνης.



Οιστραδιόλη **Οιστρόνη** **Τεστοστερόνη**

Σχήμα 1: Απεικόνιση της χημικής δομής της 17β- Οιστραδιόλης, της Οιστρόνης και της Τεστοστερόνης.

Στα θηλυκά το μεγαλύτερο ποσοστό των οιστρογόνων παράγεται στις ωοθήκες ενώ στα αρσενικά το μεγαλύτερο ποσοστό των ανδρογόνων παράγεται στους όρχεις, στα κύτταρα του Leydig, ακολουθώντας την κοινή οδό βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών, η οποία ξεκινά με το σχηματισμό της χοληστερόλης. Η χοληστερόλη μερικώς προέρχεται από τις λιποπρωτεΐνες της κυκλοφορίας και το μεγαλύτερο ποσοστό από την τοπική σύνθεσή της [200]. Η εστεροποιημένη μορφή της χοληστερόλης αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή για τη σύνθεση της τεστοστερόνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Ακολούθως, η ελεύθερη χοληστερόλη που προκύπτει από την υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης, μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια. Εκεί διενεργείται ο σχηματισμός της πρεγνενολόνης, μετά την αποδέσμευση της πλάγιας αλύσου της χοληστερόλης, που αποτελεί και το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης [201]. Ωστόσο σήμερα επικρατεί η άποψη, ότι υπάρχει μία ρυθμιστική μιτοχονδριακή πρωτεΐνη (STAR: steroidogenic acute regulatory protein), η οποία κατέχει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της στερεοειδογένεσης, μεσολαβώντας στη μεταφορά της χοληστερόλης εντός των μιτοχονδρίων [202]. Αφού συντεθεί η πρεγνενολόνη, ακολουθούν δύο μονοπάτια για την παραγωγή των στεροειδών ορμονών: 1) στο πρώτο μονοπάτι, μετά τη σύνθεση της Δ5 πρεγνενολόνης παράγεται η προγεστερόνη, η οποία ακολούθως μετατρέπεται σε 17OH-προγεστερόνη. Η τελευταία μετατρέπεται σε Δ4 ανδροστενεδιόνη, η οποία καταλήγει στην παραγωγή της τεστοστερόνης, 2) στο δεύτερο μονοπάτι η πρεγνενολόνη μετατρέπεται σε 17OH Δ5 πρεγνενολόνη και αυτή με τη σειρά της μετατρέπεται σε δεϋδροεπιανδροστερόνη, η οποία μετατρέπεται σε ανδροστενεδιόλη και καταλήγει στη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης [202] (Σχήμα 2).

Η διαφοροποίηση προς οιστρογόνα στις ωοθήκες γίνεται με τη δράση της P450 11 beta/18/19-υδροξυλάσης, η οποία μετατρέπει την ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη.

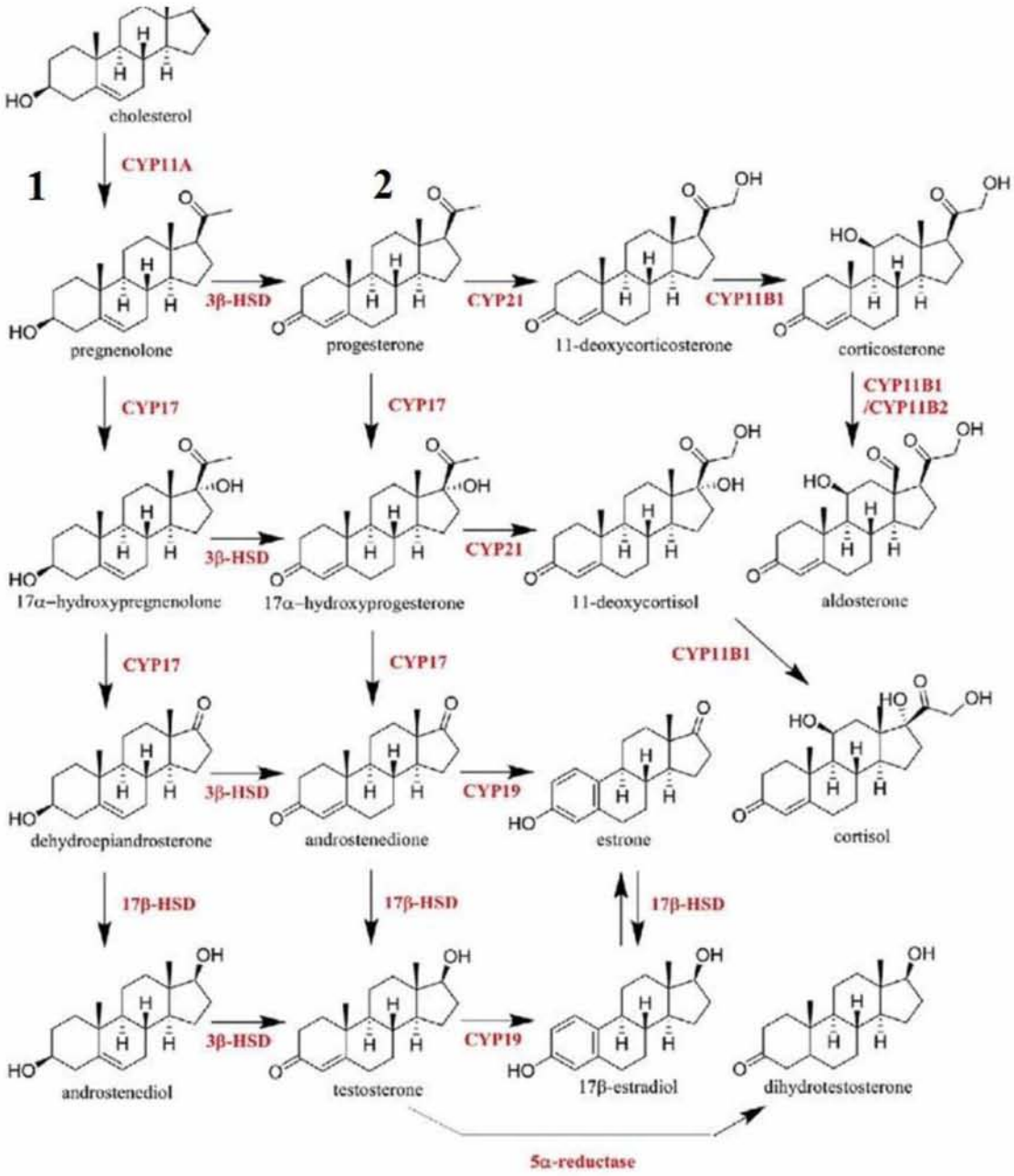
Με την καταλυτική δράση της κυτοχρωμικής αρωματάσης (CYP19A1), η οποία βρίσκεται στα κύτταρα του Leydig, η τεστοστερόνη αρωματοποιείται σε 17β-οιστραδιόλη (Σχήμα 2, Εικόνα 11), διαμέσου του μονοπατιού ενίσχυσης. Επίσης, ένα ποσοστό 5-10% μετατρέπεται στο μη αρωματοποιήσιμο ανδρογόνο διυδροτεστοστερόνη (DHT), μέσω της 5α αναγωγάσης. Τα μονοπάτια της δράσης της τεστοστερόνης απεικονίζονται στην Εικόνα 11.

Μετέπειτα, ακολουθεί η παραγωγή της οιστριόλης, από την οιστρόνη. Η οιστριόλη, επίσης, παράγεται κατά τη διάρκεια της κύησης στον πλακούντα από τη δεϋδροεπιανδροστερόνη που βρίσκεται στο φλοιό των επινεφριδίων του εμβρύου [203].

Τα οιστρογόνα, στους άνδρες, παράγονται σε μικρές ποσότητες (περίπου 10-15μg) από τους όρχεις, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό (~80%) πηγάζει από το

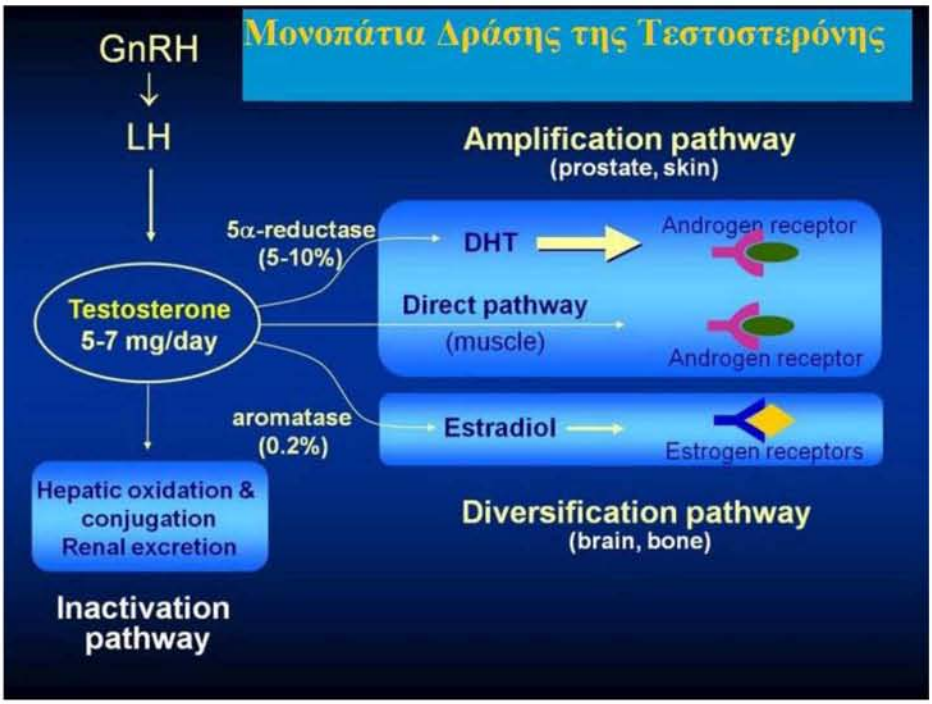
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

μεταβολισμό της τεστοστερόνης σε 17β-οιστραδιόλη στην κυκλοφορία μέσω της P450 αρωματάσης. Επίσης, μικρές ποσότητες οιστρογόνων παράγονται στα επινεφρίδια και στο λιπώδη ιστό και των δύο φύλων [204, 205].



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών. Απεικονίζονται τα μονοπάτια 1, 2 βιοσύνθεσης της τεστοστερόνης. Με κόκκινο χρώμα αναπαριστώνται τα ένζυμα που καταλύουν την κάθε αντίδραση [206].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 11: Απεικόνιση των μονοπατιών δράσης της τεστοστερόνης. Η ημερήσια παραγωγή τεστοστερόνης (5-7mg) κατανέμεται μεταξύ των 4 οδών, όπως απεικονίζονται. Η τεστοστερόνη στους σκελετικούς μύες, συνήθως ακολουθεί το άμεσο μονοπάτι (direct pathway) προσδενόμενη στον υποδοχέα των ανδρογόνων AR. Ένα ποσοστό 5-10% της τεστοστερόνης ακολουθεί το μονοπάτι ενίσχυσης (amplification pathway) και μετατρέπεται σε DHT, μέσω της 5α αναγωγάσης, χαρακτηριστικό των κυττάρων του προστάτη και των θυλάκων της τρίχας. Στο μονοπάτι της διαφοροποίησης ένα μικρό ποσοστό 0,2% της τεστοστερόνης μετατρέπεται σε 17β-οιστραδιόλη, μέσω της αρωματάσης.

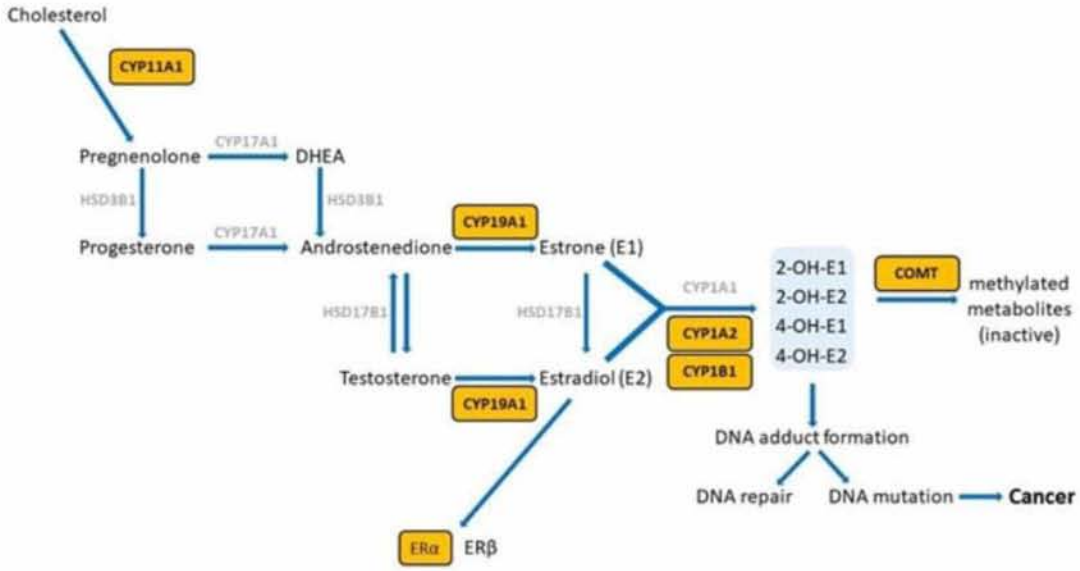
Α.5.3 Οιστρογόνα

Α.5.3.1 Μεταβολισμός οιστρογόνων

Τα ενδογενή οιστρογόνα και τα συνθετικά, όπως η οιστρόνη (E1), η 17β-οιστραδιόλη (E2), η οιστριόλη (E3), η 17α-εθινυλ-οιστραδιόλη (EE2) και η εκουιλίνη (Eq), μέσω αρωματικής υδροξυλίωσης από ειδικά ένζυμα περοξειδάσες του κυτοχρώματος P450, μετατρέπονται σε κατεχολο-οιστρογόνα, τα οποία είναι: τα 2 υδροξυ-οιστρογόνα (2OH-E1/E2/E3/EE2) και τα 4υδροξυ-οιστρογόνα (4OH-E1/E2/E3/EE2/ Eq) (Εικόνα 12) [207]. Τα κατεχολο-οιστρογόνα απενεργοποιούνται μέσω μεθυλίωσης καταλυόμενης από κατεχολο-μεθυλοτρασφεράσες καθώς επίσης και μέσω γλυκουρονιδίωσης και θειοζυλίωσης καταλυόμενες από γλυκουρονοσυλ-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

τρασφεράσες και θειολοτρασφεράσες, αντίστοιχα. Η καταλυτική οξείδωση των κατεχολο-οιστρογόνων παράγει τις οιστρογονο-κινόνες (E-2,3 -Q, E-3,4 -Q). Οι οιστρογονο-κινόνες συζεύγνυνται με τη γλουταθειόνη μέσω των γλουταθειονικών τρανσφερασών in vivo και in vitro [208].



Εικόνα 12. Σχεδιάγραμμα του μεταβολισμού των οιστρογόνων. CYP1A2, CYP1B1: ένζυμα του κυτοχρώματος P450; COMT: Catechol-O-Methyltransferase (κατεχολο-Ο-μεθυλοτρασφεράση) [209].

Τα οξειδωτικά προϊόντα των κατεχολο-οιστρογόνων, προσδένονται ομοιοπολικά στις βάσεις του DNA και στις πυρηνόφιλες θέσεις των πρωτεϊνών και δημιουργούν μεταλλάξεις ή απενεργοποιούνται σχηματίζοντας μεθυλιωμένα παράγωγα μέσω της κατεχολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι σταθερές και να παραμείνουν στο DNA, ή αφαιρούνται ως συνέπεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης [209]. Επιπρόσθετα είναι δυνατόν να σχηματίσουν απουρινικά προϊόντα προσθήκης που απελευθερώνονται από το DNA με αποσταθεροποίηση του γλυκοσυλικού δεσμού, οδηγώντας σε δυσμενείς επιδράσεις όπως ο καρκίνος. Η οιστρόνη και η οιστραδιόλη δεν μπορούν να σχηματίσουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ομοιοπολικούς δεσμούς με νουκλεοτιδικές βάσεις και αμινοξέα, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δημιουργήσουν μεταλλάξεις στο DNA.

Α.5.3.2 Επίδραση της GnRH στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας

Η στεροειδογένεση στην ωοθήκη ρυθμίζεται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των υποθαλαμικών, των υποφυσεϊκών και των στεροειδών ωοθηκικών ορμονών. Η GnRH, που εκκρίνεται από τους νευρώνες του τοξοειδούς πυρήνα και της προοπτικής περιοχής του υποθαλάμου, είναι ο κύριος ρυθμιστής της παραγωγής και της έκκρισης της ωχρινοποιητικής και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης από την υπόφυση. Οι γοναδοτροπίνες με τη σειρά τους προάγουν τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών από την ωοθήκη, οι οποίες μέσω μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης δρουν ευοδωτικά ή ανασταλτικά στην απελευθέρωση των γοναδοτροπινών [196].

Η έκκριση της GnRH γίνεται κατά ώσεις ως αποτέλεσμα της εγγενούς γεννήτριας ώσεων των νευρώνων του υποθαλάμου. Η κατά ώσεις έκκριση της GnRH επηρεάζεται επιπρόσθετα από πολλούς άλλους παράγοντες. Η νοραδρεναλίνη, η ισταμίνη, η ακετυλοχολίνη και το νευροπεπτίδιο Υ διεγείρουν την έκκριση της GnRH, σε αντίθεση με την ανασταλτική δράση των ενδογενών οπιοειδών, όπως η β-ενδορφίνη, στην υποθαλαμική έκκριση της GnRH. Κατασταλτική δράση στην απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο ασκούν η ντοπαμίνη και οι αγωνιστές της, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η CRH και η κορτιζόλη [196].

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν τη συχνότητα και το εύρος των ώσεων της GnRH, προκαλώντας έμμεσα την αύξηση της συχνότητας των ώσεων, μέσω της μεταβολής των επιπέδων της νοραδρεναλίνης, της νευροτενσίνης και του νευροπεπτιδίου Υ καθώς και μέσω της ελάττωσης των επιπέδων της β-ενδορφίνης. Η προγεστερόνη, παρουσία της οιστραδιόλης, εμφανίζει ανασταλτική επίδραση στην υπόφυση, στην έκκριση των γοναδοτροπινών και αυξάνει τα επίπεδα των οπιοειδών στον υποθάλαμο οδηγώντας στην ελάττωση της συχνότητας των ώσεων της GnRH [210].

Η λειτουργία του άξονα ΥΥΩ είναι αλληλένδετη με τη λειτουργία του ΥΥΕ άξονα και ως εκ τούτου το σύστημα του στρες και το αναπαραγωγικό σύστημα εμφανίζουν αλληλεπίδραση. Γενικά, φαίνεται ότι με στόχο την εξοικονόμηση ενέργειας κατά τις καταστάσεις στρες ο ΥΥΕ άξονας αναστέλλει τον ΥΥΩ άξονα σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

όλα τα επίπεδα. Η CRH αναστέλλει την έκκριση της GnRH είτε δρώντας άμεσα στους νευρώνες του υποθαλάμου είτε έμμεσα με τη διέγερση των β-ενδορφινών, και η κορτιζόλη ασκεί ανασταλτική δράση στον υποθάλαμο, την υπόφυση, όπου επηρεάζει κυρίως την παραγωγή της LH, και την ωοθήκη αναστέλλοντας την παραγωγή των στεροειδών ορμονών και τη δράση αυτών στην περιφέρεια [1]. Με τη σειρά τους τα οιστρογόνα δρουν θετικά στην έκφραση του γονιδίου της CRH και την έκκριση της συνδετικής σφαιρίνης της κορτιζόλης.

Α.5.3.3 Υποδοχείς Οιστρογόνων (ERs)

Τα οιστρογόνα ασκούν τη δράση τους μέσω πρόσδεσης και ενεργοποίησης των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs: Estrogen receptors) που είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες εξαρτώμενοι από το μόριο (ligand) που προσδένεται πάνω τους. Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί σε όλα τα θηλαστικά δύο κυτταροπλασματικοί ERs, ο ERα και ο ERβ. Και οι δύο υποδοχείς έχουν βρεθεί επίσης και στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι δυο υποδοχείς είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων (ESR1 και ESR2), αλλά μοιράζονται έναν υψηλό βαθμό ομολογίας. Για παράδειγμα, ο ERα αυξάνει ενώ ο ERβ μειώνει την έκφραση της από-Ε (απολιποπρωτεΐνη) στον ιππόκαμπο. Ωστόσο, στην αορτή ποντικού, οι δύο υποδοχείς φαίνεται να έχουν ξεχωριστά γονίδια στόχους [211].

Οι ERs αποτελούνται από 3 περιοχές: 1) την καρβοξυ-τελική περιοχή, που περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (LBD: ligand binding domain), στην οποία βρίσκεται ένα καλά συντηρημένο AF-2 μοτίβο, απαραίτητο για την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τους συνενεργοποιητές, 2) την υπερμεταβλητή αμινο- τελική περιοχή, που συμβάλλει στη διαδικασία μεταγραφής των γονιδίων στόχων και, 3) την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA (DBD: DNA binding domain). Οι ERα και ERβ εμφανίζουν μια γενική ταυτότητα αμινοξικής ακολουθίας της τάξης του 47%. Η ομοιότητα, εντούτοις, είναι πολύ υψηλότερη μεταξύ των περιοχών DBD και LBD (97% και 58% αντίστοιχα) [212].

Η οιστρογονο-επαγόμενη αναστολή της απάντησης σε αγγειακή βλάβη και η προστασία έναντι της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αθηροσκλήρωσης απαιτούν μια περίοδο ωρών ή ημερών μετά από θεραπεία με οιστρογόνα και οφείλονται σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αλλαγές της έκφρασης γονιδίων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων καλούνται «γενωμικές» (genomic) ή «πυρηνικές» δράσεις. Επιπλέον, έχουν αναγνωριστεί μη-μεταγραφικοί μηχανισμοί μεταγωγής σήματος μέσω ERs, που καλούνται «μη-γενωμικοί» (non genomic) επειδή δεν εξαρτώνται από τη μεταγραφή γονιδίων και τη σύνθεση πρωτεϊνών, αλλά από τη συμμετοχή ρυθμιστικών πρωτεϊνών, κυτταροπλασματικών ή προσδεδεμένων στην κυτταρική μεμβράνη [213].

Τα μη-μεταγραφικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζονται από οιστρογόνα αφορούν στη συμμετοχή ειδικών πρωτεϊνών όπως MAPKs, την κινάση της 3-OH φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης καθώς και τυροσινικές κινάσες. Δίαυλοι ιόντων καθώς και υποδοχείς συνδεόμενοι με G-πρωτεΐνες αποτελούν επίσης στόχους ρύθμισης μέσω ERs [214]. Η συμμετοχή των «γενωμικών και μη» μονοπατιών μεταγωγής σήματος στους ιστούς στόχους ελέγχει μια πληθώρα φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών εξεργασιών που συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της ενδοθηλιακής λειτουργίας [215].

Α.5.3.4 Έκφραση και δράση ERs στο ενδοθήλιο

Οι ERs εκφράζονται ευρέως σε ανθρώπινους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού τοιχώματος, όπου συνεισφέρουν στην οιστρογονοεξαρτώμενη προστασία ενάντια στο τραύμα και την αθηροσκλήρωση. Ο υποδοχέας ERα έχει αναγνωριστεί στο ενδοθήλιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και το μυοκάρδιο ανδρών και γυναικών [216]. Θεωρείται ο κυρίαρχος υποδοχέας στο ενδοθήλιο, καθώς έχει αναγνωριστεί στην αορτή χοίρου, και στα HUVECs, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο in vitro μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Ωστόσο, μόνο ο ERβ έχει ταυτοποιηθεί στα HUVECs [217]. Προσεκτική ανάλυση του καρδιακού και εγκεφαλικού ενδοθηλίου αρουραίων, αποκάλυψε ότι ο ERβ εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, ενώ ο ERα βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα [218]. Επιπλέον, η οιστραδιόλη αυξορυθμίζει τον ERα, αλλά μειορυθμίζει τον ERβ, στο πνευμονικό ενδοθήλιο.

Οι δράσεις των οιστρογόνων, μέσω των ERs, κυρίως περιλαμβάνουν την επιτάχυνση της ανάκαμψης του ενδοθηλίου μετά από φλεγμονή, την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων, αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ευνοϊκές μεταβολές στα επίπεδα της χοληστερόλης, ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και αντιοξείδωση [219].

Η raloxifene, ένας εκλεκτικός αγωνιστής των υποδοχέων των οιστρογόνων, ενεργοποιεί την eNOS και ενισχύει την απελευθέρωση του NO μέσω του μονοπατιού PI3K-Akt-ERK προστατεύοντας το ενδοθήλιο από το οξειδωτικό στρες, in vitro και in vivo, καθώς μειώνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες [220].

Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των ERα και ERβ είναι υψηλότερα στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες, αλλά η έκφραση του ERα στα θηλυκά μειώνεται με την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης ενώ του ERβ είναι αμετάβλητη. Σε μοντέλο ποντικού με έλλειψη του υποδοχέα της LDL (LDLR), η επιλεκτική εξάλειψη του ERα στο ενδοθήλιο κατήργησε τις αντι-αθηροσκληρωτικές δράσεις των οιστρογόνων, γεγονός που υποδηλώνει τη μεγάλη σημασία της δράσης των οιστρογόνων στο ενδοθήλιο διαμέσου του υποδοχέα α [221].

Τα οιστρογόνα προωθούν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και αυξάνουν την αγγειακή ενσωμάτωση του μυελού των οστών που προέρχεται από τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στην ενίσχυση του ενδοθηλίου μετά από φλεγμονή των αρτηριών [222]. Μελέτες στο ενδοθήλιο έχουν αποκαλύψει μια σειρά από αντι-φλεγμονώδεις δράσεις των οιστρογόνων που επηρεάζουν την αθηροσκλήρωση και θα αναφερθούν εκτενέστερα παρακάτω.

Α.5.3.5 Μηχανισμοί γενωμικής δράσης οιστρογόνων

Η μοριακή σηματοδότηση μέσω των ERs μπορεί να επιτευχθεί μέσω «γενωμικών» -αργών, ή «μη-γενωμικών»-γρήγορων μηχανισμών. Η γενωμική δράση των οιστρογόνων απαιτεί ώρες έως και ημέρες για την επίτευξη αύξησης ή μείωσης της έκφρασης των γονιδίων στόχων.

Η είσοδος των οιστρογόνων στο κύτταρο διενεργείται με παθητική διάχυση, όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες στεροειδείς ορμόνες, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία ή συμμετοχή εξειδικευμένων μεμβρανικών υποδοχέων [223]. Η πρόσδεση της οιστραδιόλης στους ERα και ERβ οδηγεί σε απελευθέρωση από τη

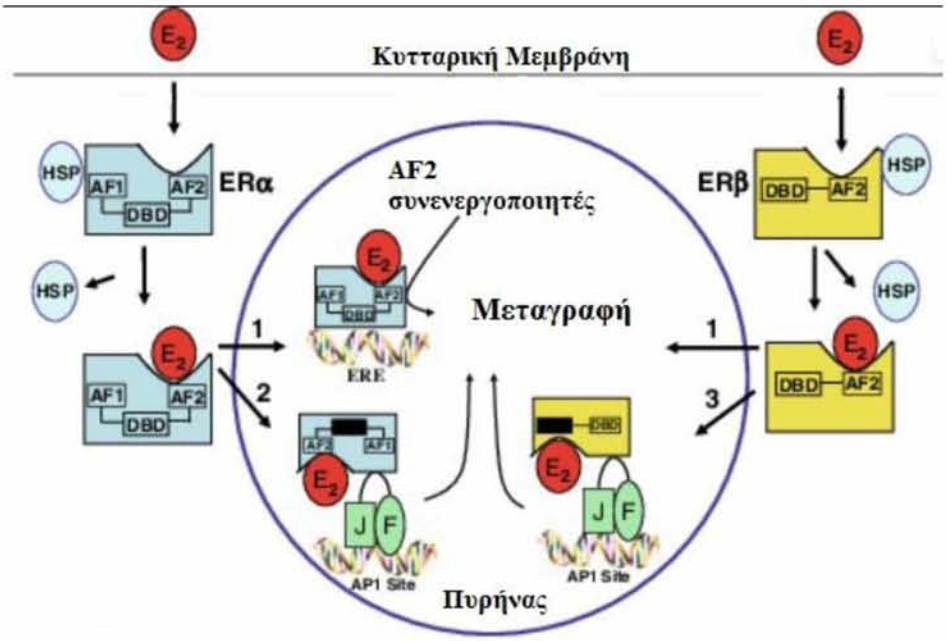
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

σύνδεσή τους με κατασταλτικές πρωτεΐνες, όπως είναι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90, και επιτρέπει τον ομοδιμερισμό και τη δυνατότητα μετακίνησης των υποδοχέων στον πυρήνα [224]. Η αλληλεπίδραση της ορμόνης με τον υποδοχέα ενεργοποιεί το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ERs-ορμόνης αλληλεπιδρά με τις cis-ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων, που πρόκειται να μεταγραφούν, είτε άμεσα μέσω της πρόσδεσης σε ειδικές ακολουθίες DNA, που καλούνται στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs: Estrogen Response Elements) [225], είτε έμμεσα μέσω της αλληλεπίδρασης με ένα DNA-προσδενόμενο μεταγραφικό παράγοντα, όπως η ενεργοποιός πρωτεΐνη 1 (AP-1: activator protein -1) [212] (Εικόνα 13).

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκφραση των L-τύπου διαύλων ασβεστίου όπως καταδείχθηκε από πειράματα σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν εκφράζουν ERs (knockout, ERKO), στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του mRNA των L-τύπου διαύλων ασβεστίου όσο και της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Μια άλλη γενωμική οιστρογονική δράση, στην οποία καταδεικνύονται οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των οιστρογόνων είναι η αύξηση του νατριουρητικού παράγοντα του κόλπου (ANF: atrila natriuretic factor) [226], ο οποίος μπορεί να βελτιώσει την καρδιακή υπερτροφία που απαντάται στη μετεμμηνοπαυσιακή υπερτροφική καρδιοπάθεια.

Τέλος, τα οιστρογόνα αλληλεπιδρώντας με πυρηνικούς ή κυτταροπλασματικούς υποδοχείς προκαλούν μια σειρά «γενωμικών» επιδράσεων που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού των MAPK κινασών. Η οιστραδιόλη βρέθηκε επίσης ότι επάγει τη φωσφορυλίωση των p38 και p42/44 MAPKs και τη μετακίνηση καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής χοίρων [227].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



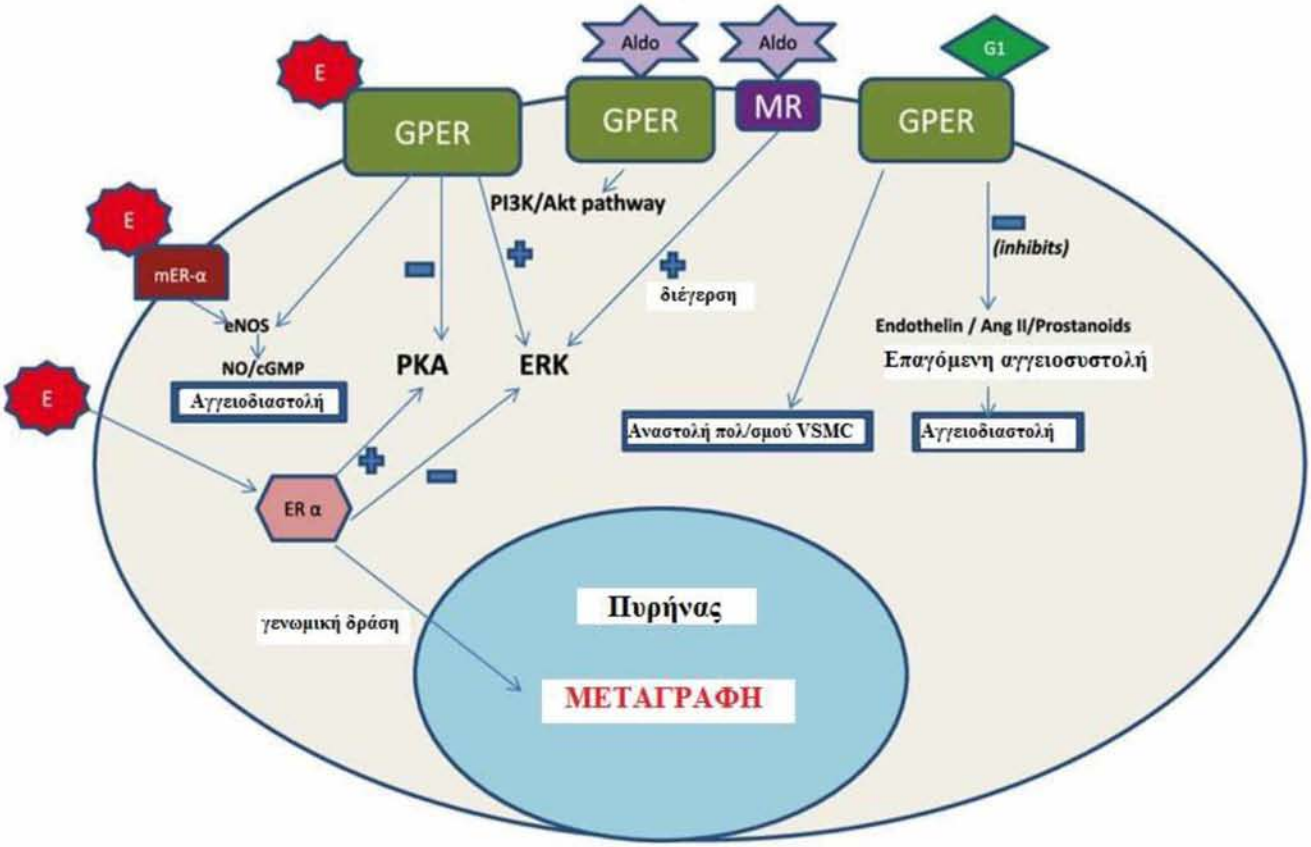
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της γενωμικής οιστρογονικής δράσης μέσω των υποδοχέων ERs. Τα οιστρογόνα εισέρχονται στο κύτταρο με διάχυση και προσδένονται στους ειδικούς υποδοχείς, ERs. Μετά τη δέσμευση των οιστρογόνων, το σύμπλοκο με τους ERs είτε προσδένεται στο DNA συγκεκριμένων γονιδίων στόχων είτε ενεργοποιεί άλλα γονίδια μέσω της αλληλεπίδρασης με την AP-1. Και στις δύο περιπτώσεις, οι ERs επάγουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής, της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών καθώς και την ενεργοποίηση άλλων βιολογικών λειτουργιών. ERE: estrogen response element, στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα, AP-1: activator protein-1, ενεργοποιός πρωτεΐνη-1 (τροποπ. από [212]).

Α.5.3.6 Μηχανισμοί μη γενωμικής δράσης οιστρογόνων

Αρχικά, η οιστρογονική μη γενωμική σηματοδότηση αναγνωρίστηκε από τους Szego και Davis το 1967 [228], στη μήτρα ποντικών που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή και τους είχε χορηγηθεί 17β-οιστραδιόλη. Η δράση της ορμόνης ήταν τάχιστη, προκαλώντας την ενεργοποίηση του cAMP στη μήτρα των ποντικών εντός διαστήματος 15 λεπτών [228]. Στην κυτταρική μεμβράνη έχουν αναγνωριστεί οι GPCRs για τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη, αλλά παραμένει ακόμα αμφιλεγόμενο θέμα. Έχει αναγνωριστεί ένας GPR30 (GPCR receptor 30) υποδοχέας για τα οιστρογόνα, γνωστός ως GPER (G-protein-coupled ER), ο οποίος εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο και την πλασματική μεμβράνη. Σε αντίθεση με τους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

κλασικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs), ο GPER δρα μέσω ενός γρήγορου μη γενωμικού μηχανισμού, που περιλαμβάνει ενεργοποίηση του cAMP/PKA/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού και του μονοπατιού της PI3K/Akt. Επίσης έχουν αναγνωριστεί και άλλοι μεμβρανικοί υποδοχείς οι οποίοι αυξάνουν την παραγωγή της eNOS που με τη σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι NO/cGMP, οδηγώντας σε αύξηση της αγγειοδιαστολής (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της οιστρογονικής δράσης σε αγγειακά κύτταρα μέσω μεμβρανικών υποδοχέων (μη γενωμική δράση). ER-α: Estrogen Receptor α (υποδοχέας οιστρογόνων α); mER-α: membrane Estrogen Receptor α (μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων α); NOS: Nitric Oxide Synthase (συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου); PKA: Protein Kinase A (πρωτεϊνική κινάση Α), ERK: Extracellular signal Regulated Kinase (πρωτεϊνική κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάριο σήμα); PI3K: Phosphatidylinositide-3-kinases (κινάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης); Aldo: Aldosterone (αλδοστερόνη) (τροποπ. από [229]).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Έχει αναφερθεί ότι ο GPER εκφράζεται στο ενδοθήλιο των μικρών περιφερικών αρτηριών αλλά όχι σε μεγάλες αρτηρίες που είναι σημαντικές για την αθηροσκληρωτική αγγειακή νόσο (αορτή, καρωτίδα και νεφρά) [230]. Πειράματα με ένα GPER ειδικό αγωνιστή, G-1, αποκάλυψαν το ρόλο του GPER στην αγγειοδιαστολή και τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, ο Filardo et al. [231], αποκάλυψε ότι η οιστρογονο-επαγώμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών και των εξυκυττάριων ρυθμιστικών κινασών ERK1/2, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, προήλθε από την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPER.

Ο αγωνιστής G1, είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος αγωνιστής γιατί έχει παρόμοια συγγένεια σύνδεσης για τον υποδοχέα GPER με τη 17β-οιστραδιόλη και δεν δεσμεύεται στους κλασικούς υποδοχείς ERs [232]. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι υπάρχουν σε ανθρώπους και τρωκτικά παραλλαγές ματίσματος του ER, συμπεριλαμβανομένων και παραλλαγών του ERβ [233]. Έτσι, υπάρχει μεγάλη ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών για τη δράση των οιστρογόνων.

Οι ταχύτατες οιστρογονικές δράσεις που δεν χρειάζονται τη μεταγραφή γονιδίων και μπορούν να είναι ER-εξαρτώμενες ή μη, καλούνται όπως προαναφέραμε «μη-γενωμικές» δράσεις. Τα πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ενεργήσουν σε διάφορους τύπους κυττάρων του αγγειακού συστήματος όπως καρδιακά μυοκύτταρα, μέσω ενός μεμβρανικού υποδοχέα και με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Gai, οδηγώντας σε αύξηση της απελευθέρωσης NO. Η πρωτεΐνη Gai βοηθά στη σύζευξη του μεμβρανικού υποδοχέα με την eNOS [234]. Επίσης, στα VSMCs των στεφανιαίων αρτηριών, τα οιστρογόνα βρέθηκαν να εμποδίζουν τους L-τύπου διαύλους ασβεστίου με συνέπεια την ενεργοποίηση των διαύλων K+ και συνοδό απομάκρυνση ιόντων K+, με συνέπεια την αγγειοδιαστολή [235]. Τα οιστρογόνα μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν ταχέως τους μεμβρανικούς διαύλους ιόντων K+ μέσω των πρωτεϊνών Gas και Gaq, οδηγώντας σε υπερπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών. Στις στεφανιαίες αρτηρίες, τα οιστρογόνα είναι σε θέση να ενισχύσουν το άνοιγμα της μεγάλης αγωγιμότητας ασβεστιο-εξαρτώμενων διαύλων καλίου, 30-60 λεπτά μετά από την επίδραση οιστρογόνων, μέσω του μηχανισμού NO/GMP/PKG [236]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι υποδοχείς των στεροειδών μπορούν να ενεργοποιηθούν από την αυξητική ορμόνη ελλείψει του μορίου πρόσδεσης [237].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Πράγματι, ο IGF-1 υποκινεί το μηχανισμό ενεργοποίησης κινασών (MAPKK/ERK1/2) και οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του ERα, ανεξάρτητα από την ύπαρξη μορίου πρόσδεσης [238]. Τα προηγούμενα στοιχεία προτείνουν ότι οι μη-γενωμικές οιστρογονικές δράσεις εμπλέκονται στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιόντων, του μεταβολισμού του NO και της ενδοκυττάριας μεταγωγής σημάτων.

Α.5.4 Ανδρογόνα

Α.5.4.1 Παραγωγή, μεταφορά και μεταβολισμός της τεστοστερόνης

Η τεστοστερόνη ανήκει στην ομάδα των στεροειδών ορμονών. Εκκρίνεται κυρίως από τα κύτταρα του Leydig των όρχεων. Μικρότερες, επίσης, ποσότητες παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων και από τις ωοθήκες. Ο ρυθμός έκκρισής της στους όρχεις ελέγχεται από τη συγκέντρωση της LH η οποία απελευθερώνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης.

Η έκκριση της LH ρυθμίζεται από τον υποθάλαμο, ο οποίος δέχεται ειδικά ερεθίσματα για την έκκριση ή αναστολή έκκρισης της ορμόνης αυτής. Ένα βασικό ερέθισμα του είδους αυτού είναι η συγκέντρωση της τεστοστερόνης του ορού, η οποία ενεργοποιεί τον υποθάλαμο μέσω αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού (negative feedback). Όταν η συγκέντρωση της ορμόνης αυτής στον ορό είναι μειωμένη, ο υποθάλαμος ελευθερώνει την ειδική εκλυτική ορμόνη (LHRH), η οποία διεγείρει την παραγωγή LH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση της τεστοστερόνης είναι αυξημένη, ο υποθάλαμος δεν εκκρίνει την ειδική αυτή εκλυτική ορμόνη. Η λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιο-ορχικού άξονα έχει μεγάλη σημασία για τη συγκέντρωση της κυκλοφορούσης τεστοστερόνης. Εκτός όμως από το μηχανισμό αυτό, η έκκριση της εκλυτικής ορμόνης LHRH από τον υποθάλαμο επηρεάζεται και από άλλα ερεθίσματα τα οποία προέρχονται από διάφορες περιοχές του ΚΝΣ όπως π.χ από διάφορα εγκεφαλικά κέντρα [239].

Η συγκέντρωση της τεστοστερόνης δεν είναι σταθερή. Εμφανίζει φυσιολογικές αυξομειώσεις που έχουν στιγμιαίο, ημερήσιο, ετήσιο και ηλικιακό χαρακτήρα. Τα φυσιολογικά επίπεδά της στον άνδρα κυμαίνονται από 10-30 nM και στη γυναίκα μεταξύ 0.6-2.5nM [240].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Για τη μεταφορά της τεστοστερόνης, που ελευθερώνεται στην αιματική κυκλοφορία, είναι απαραίτητη η σύνδεσή της με εδικούς πρωτεϊνικούς φορείς επειδή η στεροειδής αυτή ουσία δεν είναι υδατοδιαλυτή. Έτσι, ποσοστό 97% της παραγόμενης τεστοστερόνης συνδέεται κυρίως με τη φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (SHBG) και κατά δεύτερο λόγο με άλλες πρωτεΐνες του ορού, ενώ μόλις ένα ποσοστό 3% περίπου της ορμόνης αυτής κυκλοφορεί στο αίμα με την ελεύθερη μορφή της. Η ελεύθερη ή αδέσμευτη τεστοστερόνη αποτελεί τη βιολογικά δραστική μορφή της ορμόνης.

Ποσοστό 7% περίπου της τεστοστερόνης μετατρέπεται μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάσης σε DHT. Η DHT αποτελεί πιο ισχυρό ανδρογόνο, έχοντας 2 φορές πιο μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR: Androgen Receptor) και 5 φορές χαμηλότερο ρυθμό αποδέσμευσης, σε σύγκριση με την τεστοστερόνη [241].

Η ελεύθερη τεστοστερόνη έχει σύντομη διάρκεια ημιζωής. Κυκλοφορεί αυτούσια στο αίμα επί 15'-30' λεπτά. Στο διάστημα αυτό μεταβολίζεται και αδρανοποιείται με διάφορους τρόπους: α) αποδομείται στα κύτταρα – στόχους της μετατρεπόμενη σε λειτουργικά λιγότερο δραστικούς μεταβολίτες, β) μετασχηματίζεται στο συκώτι σε στεροειδείς ουσίες με σαφώς ηπιότερη αναβολική και ανδρογονική δραστηριότητα (πχ ανδροστερόνη) και γ) συζεύγνυται με γλυκουρονικό ή θειϊκό οξύ μετατρεπόμενη σε γλυκουρονική ή θειϊκή τεστοστερόνη, οι οποίες είναι ανενεργείς μορφές που αποβάλλονται με τα ούρα.

Α.5.4.2 Δράσεις των ανδρογόνων στον άρρενα

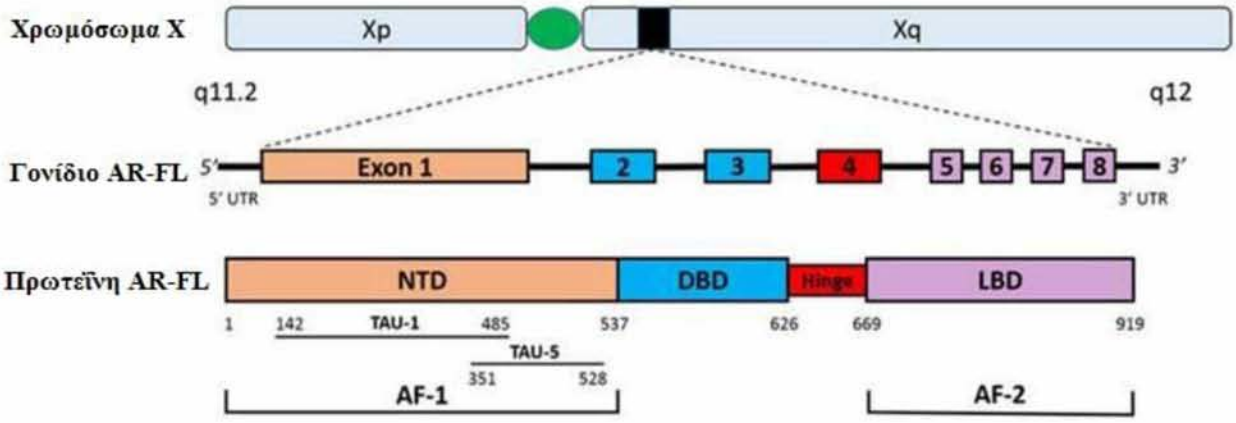
Τα ανδρογόνα, με κυριότερο την τεστοστερόνη, παρουσιάζουν αναβολική δράση στο ανθρώπινο κυτταρικό σύστημα και συντελούν στη διαμόρφωση του άρρενος γεννητικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η τεστοστερόνη εκκρίνεται μεταξύ 7ης και 8ης εβδομάδας από τα κύτταρα του Leydig, οδηγώντας στο σχηματισμό των έσω γεννητικών οργάνων του άρρενος από τη διαφοροποίηση των πόρων του Wolf. Στην περίοδο της ήβης, η τεστοστερόνη και η DHT διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του άρρενος φύλου, όπως είναι η διαμόρφωση του πέους, ο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

σχηματισμός του οσχέου, του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων. Η DHT είναι επιπλέον υπεύθυνη για την ανάπτυξη της τριχοφυΐας στην περιοχή του εφηβαίου, της μασχάλης, του προσώπου και των άκρων. Τέλος, ενεργοποιεί τη λειτουργία των σμηγματογόνων και ολοκρινών αδένων του εφηβαίου και της μασχάλης [202].

Α.5.4.3 Υποδοχείς ανδρογόνων

Μέχρι σήμερα, ένας μοναδικός AR (υποδοχέας ανδρογόνων) έχει ταυτοποιηθεί, ο οποίος μεταγράφεται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος X, στην περιοχή Xq11-12 (Εικόνα 15). Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων έχει μέγεθος ~90kb γενωμικού DNA, είναι προσανατολισμένο με το 5' άκρο προς το κεντρομερίδιο και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~110kDa. Αποτελείται από 8 εξόνια, στα οποία παρεμβάλλονται εσόνια μεγέθους έως 25kb. Τα εξόνια εμφανίζουν ίδια δομική κατανομή με τα εξόνια των γονιδίων που κωδικοποιούν άλλους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο (5'UTR), τα εξόνια 2, 3 κωδικοποιούν την κεντρική περιοχή δέσμευσης στο DNA (DBD), και τα εξόνια 4, 5, 6, 7, 8 κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης και το καρβοξυτελικό άκρο που αποτελεί το σημείο πρόσδεσης του συνδέτη (LBD) (Εικόνα 14) [242].



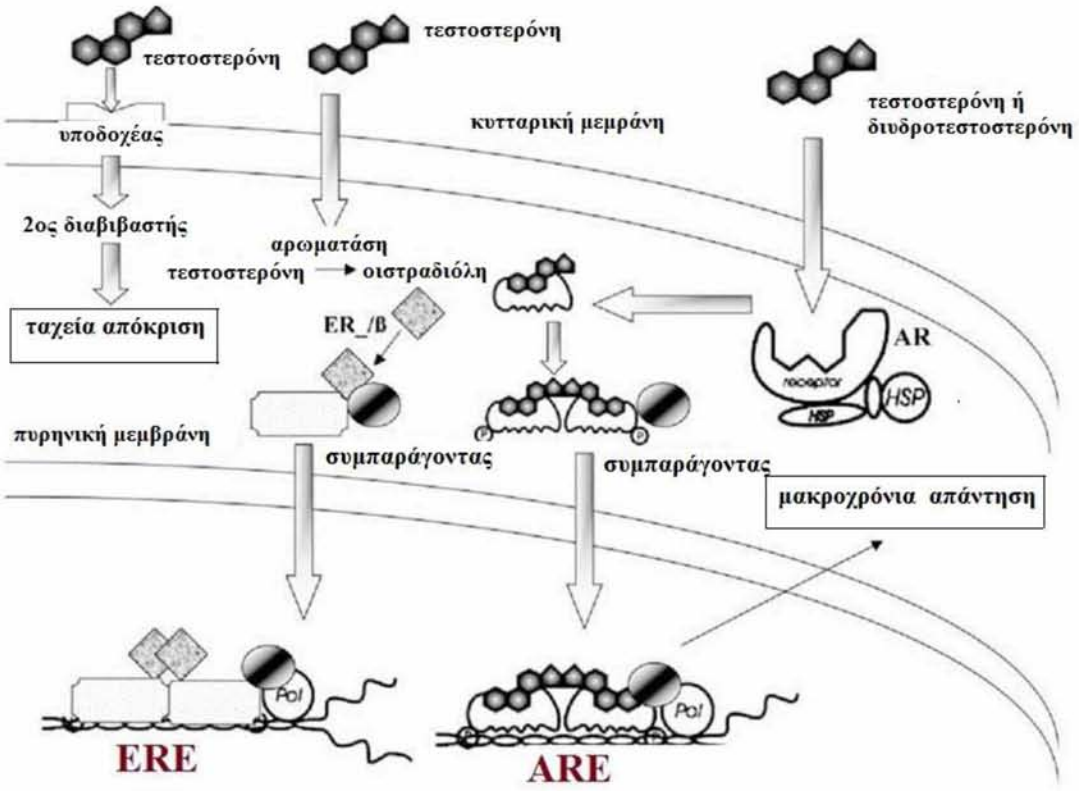
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου και της πρωτεΐνης του ανδρογονικού υποδοχέα [243].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.5.4.4 Μηχανισμοί Γενωμικής δράσης ανδρογόνων

Ο ανδρογονικός υποδοχέας AR, ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του αγγειακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων, των καρδιακών μυϊκών ινών, των μακροφάγων και των αιμοπεταλίων. Οι βιολογικές δράσεις των ανδρογόνων διαμεσολαβούνται κυρίως από τον ανδρογονικό υποδοχέα AR, μέσω του "κλασικού" γενωμικού μονοπατιού (Εικόνα 15). Η δέσμευση της τεστοστερόνης και διυδροτεστοστερόνης στον AR, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του υποδοχέα, καταλήγοντας σε διμερισμό του και μετακίνησή του στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί προσδένεται στις ειδικές αλληλουχίες DNA απόκρισης στα ανδρογόνα (ARE: Androgen Response Elements) ή στις ειδικές αλληλουχίες ERE [244] (Εικόνα 16). Το επόμενο βήμα είναι η στρατολόγηση συνενεργοποιητικών πρωτεϊνών (πχ. HSP90) και μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να γίνει η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων [245]. Αυτή η διαδικασία συνήθως διαρκεί ώρες πριν την εμφάνιση των βιολογικών αλλαγών στα γονίδια στόχους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση γενωμικής και μη-γενωμικής δράσης των ανδρογόνων. Αριστερά: Παρουσιάζεται η μη γενωμική οδός δράσης, η οποία ενεργοποιείται από την πρόσδεση της τεστοστερόνης ή άλλου ανδρογόνου, σε ένα μη χαρακτηρισμένο (μη κλασικό) μεμβρανικό υποδοχέα. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται δεύτερα μηνύματα/διαμεσολαβητές όπως ασβέστιο και πρωτεϊνικές κινάσες, που παράγουν άμεση απόκριση. Η γενωμική οδός παρουσιάζεται στο κέντρο και στα δεξιά της εικόνας. **Κέντρο:** Η τεστοστερόνη ή (κάποιο άλλο συνθετικό ανδρογόνο), διαπερνάει την κυτταρική μεμβράνη και μετατρέπεται σε οιστραδιόλη μέσω της αρωματάσης όπου στη συνέχεια προσδένεται και ενεργοποιεί τους υποδοχείς ERα και ERβ. **Δεξιά:** Η DHT εισέρχεται στο κύτταρο και ενεργοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων AR. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς απελευθερώνουν τις δεσμευμένες πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP), υφίστανται αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωσή τους, διμερίζονται και μεταναστεύουν στον πυρήνα του κυττάρου για να προσδεθούν στις ειδικές αλληλουχίες ERE ή ARE αντίστοιχα που εντοπίζονται στο DNA ή σε γονίδια στόχους του πυρήνα ώστε να παράγουν τις μακροχρόνιες γενωμικές δράσεις της τεστοστερόνης (τροποπ. από [246]).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.5.4.5 Μηχανισμοί μη Γενωμικής δράσης ανδρογόνων

Έχει προταθεί και ένα άλλο μονοπάτι για τη δράση των ανδρογόνων, που περιλαμβάνει μη γενωμικά γεγονότα, και διαμεσολαβείται από διάφορους υποδοχείς [247, 248]. Η δέσμευση της τεστοστερόνης και της DHT στον υποδοχέα της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBGR) [247] μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του cAMP και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), ενώ η δέσμευση στον υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεΐνες σε αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των ιόντων Ca^{2+} [249]. Η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν την PKA, την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και τις MAP κινάσες, οδηγώντας σε τροποποίηση της AR λειτουργίας καθώς και άλλων μεταγραφικών παραγόντων [250, 251]. Ο υποδοχέας AR μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει και να ενεργοποιήσει την ενδοκυτταρική κινάση τυροσίνης C (SRc). Έχουν ταυτοποιηθεί δύο υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται στη μη γενωμική δράση των ανδρογόνων, οι οποίοι τις περισσότερες φορές δεν μπορούν να παρεμποδιστούν από ανταγωνιστές του AR υποδοχέα και μετά την ενεργοποίησή τους σηματοδοτούν διάφορα μεταγωγικά μονοπάτια. Αυτοί οι υποδοχείς είναι ο GPRC6A που συνδέεται με G-πρωτεΐνες και ο ZIP9, που ανήκει στην οικογένεια των ρυθμιστικών μεταφορέων των ιόντων Zn2+ [252]. Ο GPRC6A εκφράζεται σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών, των μονοκυττάρων, των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, των σκελετικών μυϊκών κυττάρων, των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των β-κυττάρων του παγκρέατος και των κυττάρων του Leydig [253]. Συνδέτης αυτού του υποδοχέα είναι η υποκαρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη.

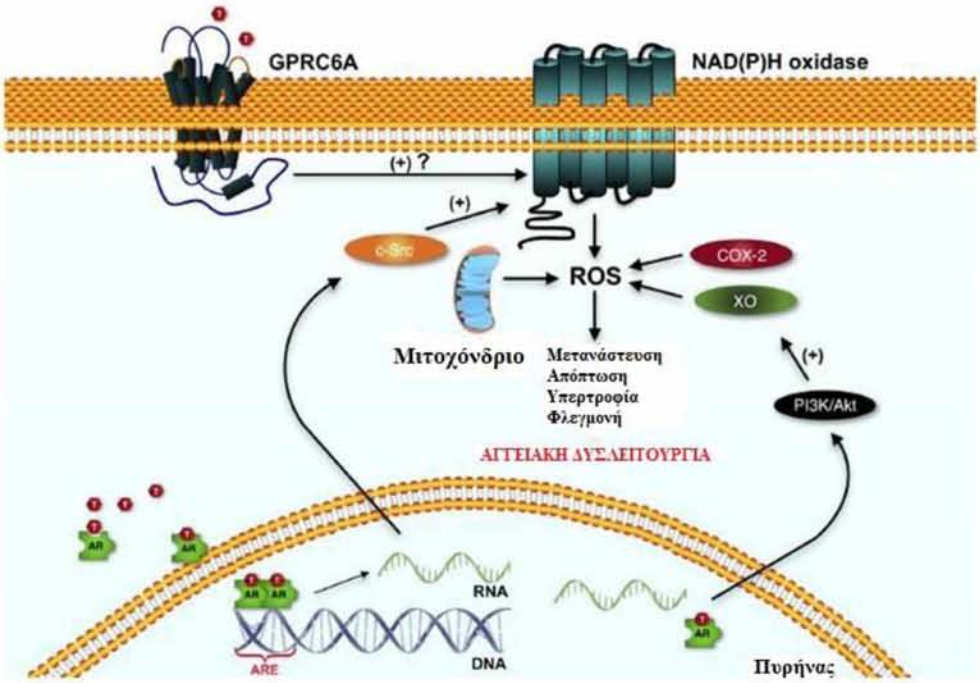
Η γρήγορη ενεργοποίηση των δεύτερων διαβιβαστών από τα ανδρογόνα μέσω του μη γενωμικού μονοπατιού, καταλήγει σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των AR και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, μέσω των οποίων ασκούνται οι μετέπειτα βιολογικές δράσεις στο κύτταρο και στα γονίδια στόχους. Επειδή αυτές οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις δεν περιλαμβάνουν μεταγραφή γονιδίων ή τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, μπορούν να επιτελεστούν σε μόλις λίγα λεπτά ή και δευτερόλεπτα ακόμα. Οι υποδοχείς που διαμεσολαβούν τις μη γενωμικές δράσεις των ανδρογόνων, είναι πιθανό να μην αναστέλλονται από τους ανταγωνιστές των κλασικών γενωμικών υποδοχέων των στεροειδών, με εξαίρεση τους αναστολείς που η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

δράση τους περιλαμβάνει κοινές δομικές δομές σύνδεσης των στεροειδών τόσο σε γενωμικούς όσο και σε μη γενωμικούς υποδοχείς στεροειδών. Επιπρόσθετα, οι υποδοχείς των μη γενωμικών μονοπατιών δεν παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα δέσμευσης του προσδέτη, διότι δύνανται να προσδεθούν σε αυτούς και στεροειδή με παραπλήσια στερεοδιαμόρφωση ασκώντας ποικίλες δράσεις.

Έχει θεωρηθεί ότι η τεστοστερόνη μέσω της πρόσδεσής της στους υποδοχείς GPRC6A και ZIP9, αυξάνει την παραγωγή των ROS (Εικόνα 17). Η δέσμευση της τεστοστερόνης στον GPRC6A αυξάνει την κινητοποίηση των ιόντων Ca^{2+}, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση του ισοενζύμου Duox 1, που ανήκει στην οικογένεια των NOx. Αυτή η ενεργοποίηση εν τέλει καταλήγει στην παραγωγή των ROS και στην κυτταρική απόπτωση, δρώντας μέσω του μη γενωμικού μονοπατιού (Εικόνα 17) [254].

Επομένως, η βιολογική δραστικότητα των ανδρογόνων μπορεί να διενεργηθεί μέσω γενωμικών ή μη γενωμικών μονοπατιών, και αυτό εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων καθώς και το είδος του προσδέτη των AR υποδοχέων.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της γενωμικής και μη γενωμικής επίδραση της τεστοστερόνης στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Η τεστοστερόνη αυξάνει τα ROS στα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

λεία μυϊκά κύτταρα μέσω διαφορετικών κυτταρικών πηγών, όπως είναι η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης, τα μιτοχόνδρια, η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2), και η οξειδάση της ξανθίνης. Στη γενωμική δράση της τεστοστερόνης εμπλέκεται η ενεργοποίηση των c-Src και PI3/Akt μονοπατιών, όπου οδηγούν στην ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης αντίστοιχα. Η τεστοστερόνη μπορεί επίσης να αυξήσει τα ROS, μέσω μη γενωμικών δράσεων, διαμέσου του GPRC6A υποδοχέα. Η αυξημένη παραγωγή των ROS μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική μετανάστευση, απόπτωση, υπερτροφία και φλεγμονή, προκαλώντας αγγειακή δυσλειτουργία. T: τεστοστερόνη, ARE: androgen responsive element (αλληλουχίες DNA απόκρισης στα ανδρογόνα), COX-2: κυκλοοξυγενάση 2, XO: οξειδάση της ξανθίνης, c-Src: Proto-oncogene tyrosine kinase Src (Πρωτο-ογκογονίδιο τυροσινικής κινάσης Src), PI3K/Akt: Phosphatidylinositide-3-kinase (κινάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης, GPRC6A: G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A (υποδοχέας συνδεδεμένος με πρωτεΐνες G, οικογένεια C, ομάδα 6, μέλος A) (τροποπ. από [255]).

A.5.4.6 Παρουσία του AR στο ενδοθήλιο

Ο AR έχει ταυτοποιηθεί με RT-PCR σε HAECs (ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής) [256] καθώς και με λειτουργικές μελέτες, όπως Western blot και ανοσοϊστοχημεία. Ο AR μπορεί να εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε ενδοθηλιακά κύτταρα αρσενικών από ό,τι σε κύτταρα θηλυκών. Επιπλέον, η αρωματάση έχει ταυτοποιηθεί με RT-PCR σε HUVECs [257], αλλά όχι σε HAECs, υποδηλώνοντας ότι ορισμένες επιδράσεις των ανδρογόνων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της μετατροπής τους σε οιστρογόνα. Παράλληλα, το mRNA χαμηλής συγγένειας τύπου 1 της 5α-αναγωγάσης, είναι παρόν σε HAECs, υποδεικνύοντας ότι η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί στο εξαιρετικά ισχυρό ανδρογόνο DHT εντός των ενδοθηλιακών κυττάρων.

A.5.5 Στεροειδή των γονάδων και αθηροσκλήρωση

A.5.5.1 Οιστρογόνα και αθηροσκλήρωση

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι πολλές εμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα που οφείλεται τόσο στην αθηροσκλήρωση όσο και στη στεφανιαία νόσο. Η μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων, κατά την εμμηνόπαυση, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αύξηση των LDL και μείωση των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

HDL, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [258, 259]. Παράλληλα, μειώνονται οι παράγοντες πήξης του αίματος και αυξάνεται η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιαγγειακή νόσο και αθηροσκλήρωση. Η δράση των ενδογενών οιστρογόνων στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορεί να μεσολαβηθεί άμεσα στα αγγεία ή έμμεσα, μέσω της διαφοροποίησης των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου, καθώς και στο προφίλ των λιπιδίων (μείωση της ολικής χοληστερόλης και της LDL και αύξηση της HDL) [147].

Όσον αφορά στην προστασία των αγγείων από την αθηροσκλήρωση, τα οιστρογόνα συμμετέχουν στη λειτουργική ανάκτηση του ενδοθηλίου έπειτα από βλάβη του, δρώντας μέσω των υποδοχέων τους (ERs) [260]. Τελευταία, το ενδιαφέρον στράφηκε στη μελέτη της αγγειοδιασταλτικής δράσης των οιστρογόνων στα στεφανιαία και περιφερικά αγγεία [261]. Ο μηχανισμός της αγγειοδιασταλτικής τους δράσης ασκείται μέσω του αποκλεισμού των διαύλων ασβεστίου. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζουν την παραγωγή και έκλυση του NO, που προκαλεί αγγειοχάλαση [262].

Οι άμεσες επιδράσεις των οιστρογόνων στο αγγειακό σύστημα, οι οποίες διαμορφώνουν τον αγγειακό τόνο περιλαμβάνουν: 1) οξεία αγγειοδιαστολή, αύξηση της σύνθεσης και της βιοδραστικότητας του μονοξειδίου του αζώτου, 2) μακροπρόθεσμη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, ρύθμιση της παραγωγής των προσταγλανδινών και έκφραση της eNOS και του γονιδίου gene46 της ενδοθηλίνης, 3) αναστολή της επαγόμενης από την ενδοθηλίνη αγγειοσυστολής, και 4) αναστολή της συμπαθητικής δραστηριότητας. Εκτός από αυτές τις δράσεις στον αγγειακό τόνο, τα οιστρογόνα μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. Επίσης, φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή αναδιαμόρφωση, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό του εσωτερικού στρώματος μετά από τραυματισμό και αυξάνοντας την έκφραση των συσταλτικών πρωτεϊνών στο μυοκάρδιο.

Σε πειραματικά μοντέλα αθηρωμάτωσης, σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια και ποντίκια, η αθηροπροστατευτική επίδραση της E2, προκύπτει μέσα από μια άμεση δράση επί του αρτηριακού τοιχώματος και όχι μέσω της δράσης στο λιπιδαιμικό προφίλ [263]. Πράγματι, οι ενδοθηλιακοί αγγελιοφόροι, όπως το NO και η προστακυκλίνη αυξήθηκαν υπό την επίδραση της E2. Μελέτες έχουν δείξει, ότι τα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

οιστρογόνα αυξάνουν την αγγειοδιαστολή και αναστέλλουν τη φλεγμονώδη απόκριση του ενδοθηλίου και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, μέσω της συνθάσης της προστακυκλίνης και της συνθάσης του NO [264]. Αν και η αθηροπροστατευτική δράση της E2 δεν φαίνεται να εξαρτάται από την παραγωγή του NO, η επαγωγή της παραγωγής της κυκλοοξυγενάσης-2 και της προστακυκλίνης θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της εναπόθεσης λιπιδίων στο επίπεδο της θωρακοκοιλιακής αορτής.

Στα μυοκαρδιακά κύτταρα η αύξηση της έκφρασης τόσο της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου (iNOS), όσο και της ενδοθηλιακής της μορφής (eNOS) από οιστρογονικό ερέθισμα οδηγεί σε αγγειοδιαστολή, αναστολή του πολλαπλασιασμού των VSMCs και σε αύξηση των καρδιακών ινοβλαστών (CFs) [265]. Η προαναφερόμενη δράση των οιστρογόνων επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης των γενωμικών μηχανισμών των υποδοχέων ERs.

Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή που επάγεται από την E2 έχει αποδειχθεί ότι απαιτεί διέγερση του μονοπατιού ERK/MAPK, PI3K. Η E2 επάγει τη γρήγορη φωσφορυλίωση της eNOS στη Ser1177 οδηγώντας σε αύξηση του ενδοθηλιακού NO [266]. Επιπλέον, η E2 επάγει την κυκλοοξυγενάση 2 και διεγείρει, βραχυπρόθεσμα, την έκκριση των προσταγλανδινών PGI2 και PGE2 στο ανθρώπινο ενδοθήλιο [267].

Επιπρόσθετα, πρόσφατες παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μέσω των ERα υποδοχέων αυξάνουν την θειο-ζυλίωση των πρωτεϊνών ασκώντας προστατευτική δράση στο αγγειακό τοίχωμα [268].

Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι τα οιστρογόνα δεν σχηματίζονται μόνο στο αναπαραγωγικό σύστημα ανδρών και γυναικών, αλλά επίσης και τοπικά στο αγγειακό σύστημα μετά τη μετατροπή της τεστοστερόνης που καταλύεται από το ένζυμο αρωματάση [269]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η έλλειψη αρωματάσης στους ανθρώπους συνδέεται με την προοδευτική φθορά, τα ευνουχοειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, την οστεοπενία και τα μη φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων [270]. Η αναστολή της αρωματάσης αυξάνει το σχηματισμό των αθηροσκληρωτικών βλαβών σε αρσενικά ποντίκια [271]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η φαρμακολογική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αναστολή της αρωματάσης προκάλεσε μείωση στην ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή σε υγιείς άνδρες [272].

Α.5.5.2 Θεραπεία Υποκατάστασης Οιστρογόνων- Επιπτώσεις της ιστο-ειδικότητας, το στάδιο της αθηροσκλήρωσης και ο «κρίσιμος» χρόνος

Είναι ενδιαφέρον ότι ενώ η χορήγηση οιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εντός συντόμου χρονικού διαστήματος από την τελευταία έμμηνο ρύση έχει ευεργετική επίδραση στο καρδιαγγειακό, η χορήγησή τους αρκετό διάστημα μετά την εμμηνόπαυση συνοδεύεται από αύξηση της συχνότητας καρδιαγγειακών συμβαμάτων [273]. Το πεδίο της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (ΟΘΥ) την τελευταία δεκαετία χαρακτηρίζεται από αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Εφαλτήριο των έντονων κριτικών και των αμφισβητήσεων της ΟΘΥ αποτέλεσε η δημοσίευση των πορισμάτων της προοπτικής και τυχαιοποιημένης μελέτης Women's Health Initiative (WHI) (2002), εκ των οποίων αναδεικνύονταν σοβαροί κίνδυνοι συνεπεία της χρόνιας χρήσης, χωρίς όμως παράλληλη συνεκτίμηση του παράγοντα της προχωρημένης ηλικίας των συμμετεχουσών ασθενών [274].

Το μέγεθος και ο βαθμός πολυπλοκότητας της αθηροσκλήρωσης όταν ξεκινά η θεραπεία με οιστρογόνα, καθορίζουν την επίδραση που αυτά έχουν στο τοίχωμα των αρτηριών. Αρκετά χρόνια μετά την εμμηνόπαυση, όταν η αθηρωματική εικόνα είναι δυσμενέστερη, παρατηρείται υποχώρηση των πρώιμων αγγειακών προστατευτικών δράσεων των οιστρογόνων και εμφάνιση δυσμενών επιπτώσεων από τη χρήση τους. Στα πλαίσια αυτά μπορούν να παρατηρηθούν φαινόμενα όπως η μείωση της ER λειτουργίας/έκφρασης και της αγγειοδιαστολής, αλλά και η αύξηση της φλεγμονώδους ενεργοποίησης και αστάθειας των πλακών [275].

Σύμφωνα με μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικιών που παρουσίαζαν πρώιμη συστηματική αθηροσκλήρωση, ο καθοριστικός μεσολαβητής όσον αφορά τις προστατευτικές επιδράσεις των οιστρογόνων είναι ο ERα [181, 276]. Η προστασία από την αθηροσκλήρωση που παρατηρήθηκε σε αυτά τα μοντέλα είναι αποτέλεσμα μείωσης της βλάβης του ενδοθηλίου και του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας [181]. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου έχουν ήδη εγκατασταθεί αθηροσκληρωτικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

κακώσεις τα οιστρογόνα δεν μπορούν πλέον να λειτουργήσουν ανασταλτικά και να παρεμποδίσουν την αθηρογένεση [277]. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η οιστραδιόλη λειτουργεί ανασταλτικά δια μέσου ERα-ανεξάρτητων μηχανισμών, επιβραδύνοντας την εξέλιξη αθηρωματικών αλλοιώσεων πρώιμου σταδίου και των λιπαρών ραβδώσεων, σε μοντέλα με πρώιμη αθηροσκλήρωση [278].

Συμμετοχή του ERβ, όσον αφορά την εξέλιξη της πρώιμης φάσης της αθηροσκληρωτικής νόσου, δεν παρατηρείται [279], αν και σε γυναίκες που βρίσκονταν πριν και μετά την εμμηνόπαυση, βρέθηκε συσχέτιση του ERβ με στεφανιαία ασβεστοποίηση [280]. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι αυτός ο υπότυπος ERβ διαδραματίζει πιο σημαντικό ρόλο σε προχωρημένη αγγειακή νόσο, αφού στην περίπτωση αυτή αυτός ο υποδοχέας συνδέεται με πιο σοβαρή αθηροσκλήρωση.

Φαίνεται ότι για να αναπτυχθεί η στεφανιαία νόσος χρειάζεται να έρθει η κατάλληλη κρίσιμη στιγμή, γνωστή και ως κρίσιμη χρονική υπόθεση, όταν χορηγούνται αρχικά τα οιστρογόνα [281]. Αυτή λειτουργεί αθηροπροστατευτικά, ενώ ακολουθείται από μια περίοδο αυξημένου κινδύνου, λόγω εκκολαπτόμενης υποκείμενης κλινικής ή υποκλινικής CAD. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αφού επιτρέπει την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα οιστρογόνα συνδέονται μοριακά και φαινοτυπικά με τους υποδοχείς τους στο αγγειακό τοίχωμα, σύμφωνα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η αθηροσκλήρωση. Ως αποτέλεσμα, καθίσταται σαφής ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να βελτιστοποιηθούν οι ορμονικές θεραπείες ώστε να στοχεύουν πιο αποτελεσματικά στην προστασία των γυναικών από την ανάπτυξη καρδιαγγειακών διαταραχών.

Α.5.5.3 Ανδρογόνα και αθηροσκλήρωση

Τα ανδρογόνα φαίνεται να διαδραματίζουν ένα ρόλο που παρουσιάζει αντιφάσεις όσον αφορά στη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος, αφού σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες μπορούν να παρατηρηθούν ταυτόχρονα και θετικές και αρνητικές επιδράσεις, ενώ υποστηρίζεται ότι οι γυναίκες που βρίσκονται σε ηλικία αναπαραγωγής και έχουν την ίδια ηλικία με τους άνδρες που μελετήθηκαν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

έχουν πιο μικρό κίνδυνο από αυτούς να εμφανίσουν διαταραχές στη λειτουργία του συστήματος αυτού [191, 246, 282].

Όπως έχει βρεθεί σε μελέτες, όταν χορηγείται τεστοστερόνη σε υγιείς γυναίκες παρουσιάζεται ινσουλινοαντίσταση η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση αθηρωμάτωσης [283, 284]. Παράλληλα, σε γυναίκες με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ) που παρουσιάζουν υπερανδρογοναιμία, οι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση του οξειδωτικού συστήματος και της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης και μείωση του αντιοξειδωτικού τους συστήματος, όπως πχ των επιπέδων της GSH, αποσαφηνίζοντας μερικώς το λόγο που οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών διαταραχών [285].

Ένας αριθμός κλινικών δοκιμών [282, 286- 288] και μια μετα-ανάλυση που διεξήχθη πρόσφατα [289], υποστηρίζουν ότι ο αυξημένος κίνδυνος που έχουν οι άνδρες να αναπτύξουν καρδιαγγειακές διαταραχές, καθώς και η μεγαλύτερη θνησιμότητα για το φύλο αυτό, σχετίζονται με ανεπαρκή επίπεδα τεστοστερόνης. Αντίθετα, τα ανδρογόνα φαίνεται να λειτουργούν ευεργετικά για την αντιμετώπιση της στηθάγχης, όχι μόνο όσον αφορά στους ανθρώπους αλλά και στα ζώα [290] [291]. Παράλληλα, βρέθηκε ότι τα ανδρογόνα έχουν αντι-αθηροσκληρωτικές ιδιότητες [291] συμβάλλοντας στην προαγωγή της ενδοθηλιοεξαρτώμενης και μη αγγειοδιαστολής [292]. Πέραν τούτου, αξιοσημείωτο είναι ότι άλλοι ερευνητές αναφέρουν αύξηση της συστολικής αιματικής ροής λόγω των ανδρογόνων [293].

Ο τρόπος με τον οποίο επισυμβαίνουν οι επιδράσεις των ανδρογόνων πιθανώς να ανάγεται σε μηχανισμούς ρύθμισης της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Όπως έχει βρεθεί σε παλαιότερες έρευνες, η DHT, η οποία αποτελεί ένα ενδογενές ανδρογόνο με πολυδύναμο χαρακτήρα, λειτουργεί αυξητικά όσον αφορά στην ενσωμάτωση της [^{3}H]θυμιδίνης σε HUVECs. Με αυτό το μηχανισμό και μέσω των κλασικών γενωμικών μονοπατιών αυξάνεται η δραστικότητα της κρεατινικής κινάσης και της MAPK [294].

Όπως βρέθηκε από τους Cai et al. [256], τα ανδρογόνα (DHT και τεστοστερόνη), μπορούσαν να προάγουν τον χρόνο- και δοσο-εξαρτώμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής (HAECs). Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται στον μεγαλύτερο αριθμό των βιώσιμων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

κυττάρων και της βιοσύνθεσης του DNA. Όταν προστεθεί η ουσία casodex, η οποία αναστέλλει τους ανδρογονικούς υποδοχείς (AR), ή γίνει αποσιώπηση του υποδοχέα AR με short interfering RNA (siRNA: RNA σύντομης παρέμβασης), παρατηρείται προαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων όχι όμως της γονιδιακής έκφρασης. Αυτό γίνεται μέσα από τη θετική ρύθμιση του VEGF-A, της κυκλίνης A, και της κυκλίνης D1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα HAECs. Η καρδιαγγειακή λειτουργία φαίνεται να ωφελείται από αυτή τη δράση, αφού ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στο ενδοθήλιο έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί διορθωτικά όσον αφορά στις καρδιαγγειακές βλάβες.

Α.5.5.4 Ο ρόλος της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης τεστοστερόνης στην αθηροσκλήρωση

Τα αποτελέσματα της εξωγενούς χορήγησης ανδρογόνων στα λιπίδια του πλάσματος εξαρτώνται από τη δόση, την οδό χορήγησης (από το στόμα ή παρεντερικά), το είδος του ανδρογόνου (αν είναι ικανό να αρωματοποιείται ή όχι), και τον πληθυσμό (νέοι και ηλικιωμένοι με υπογοναδισμό ή χωρίς). Ενώ οι υπερβολικές δόσεις τεστοστερόνης και τα ανδρογόνα που δεν υφίστανται αρωματοποίηση, αναμφίβολα μειώνουν τη χοληστερόλη HDL στο πλάσμα, η χορήγηση φυσιολογικής συγκέντρωσης τεστοστερόνης σε ηλικιωμένους άνδρες σχετίζεται με μικρή ή μηδενική μείωση στην HDL του πλάσματος.

Η χορήγηση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης τεστοστερόνης στους άνδρες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της LDL, της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, ενώ επιπλέον μειώθηκε η συσσώρευση των λιπαρών οξέων και ταυτόχρονα αυξήθηκε η HDL, καταδεικνύοντας τον προστατευτικό ρόλο της τεστοστερόνης ενάντια στην αθηροσκλήρωση [252]. Επίσης, σε υπογοναδικούς άρρενες η θεραπεία υποκατατάστασης τεστοστερόνης δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης [295]. Στον αντίποδα, η μελέτη των Bagatell et al. [296], απέδειξε ότι η χορήγηση τεστοστερόνης σε ευγοναδικούς άρρενες μείωσε την HDL, δεδομένα που αμφισβητούν το ρόλο της τεστοστερόνης ως καρδιοπροστατευτικό παράγοντα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η αυξημένη συγκέντρωση της τεστοστερόνης προκαλεί αγγειοδιαστολή, ενώ φυσιολογικές συγκεντρώσεις έχουν διφορούμενες δράσεις στο αγγειακό ενδοθήλιο. Από τη μία πλευρά η τεστοστερόνη ασκεί προ-αθηρογόνο δράση στα μακροφάγα, ενισχύοντας την πρόσληψη διαφοροποιημένων λιποπρωτεϊνών και από την άλλη πλευρά ασκεί αντι-αθηρογόνο δράση αυξάνοντας την HDL [191].

Σε αθηροσκληρωτικά μοντέλα ποντικών με ανεπάρκεια LDL υποδοχέων, η ορχεκτομή συνοδεύτηκε από ένα γρήγορο σχηματισμό πρώιμων αθηρωματικών βλαβών στην αορτή. Η χορήγηση τεστοστερόνης καθυστέρησε την εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών, αποτέλεσμα το οποίο ανεστάλη από την ταυτόχρονη χορήγηση ενός αναστολέα της αρωματάσης. Η επίδραση της τεστοστερόνης στην εξέλιξη της αθηροκλήρωσης είναι ανεξάρτητη των λιπιδίων του πλάσματος. Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω δεδομένα, φαίνεται ότι η τεστοστερόνη, μέσω της μετατροπής της σε οιστρογόνα (αρωματοποίηση), επιβραδύνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης σε αυτά τα ζωϊκά μοντέλα.

Σύμφωνα με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, η δράση της τεστοστερόνης στη διατήρηση της ομοιοστασίας του αγγειακού ενδοθηλίου και της προστασίας του από τυχόν βλαπτικές επιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε φλεγμονή και κατ'επέκταση σε αθηροσκλήρωση παραμένει ασαφής.

Α.6 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα της έναρξης και εξέλιξης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, προκαλώντας μεταβολές στο αγγειακό τοίχωμα του ενδοθηλίου [297]. Το οξειδωτικό στρες παράγεται όταν επέρχεται ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής των ROS και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου. Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες, όπως είναι πλέον τεκμηριωμένο, συνίστανται κυρίαρχα στην καταστροφή των μακρομορίων (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) με επακόλουθο τη βλάβη των ιστών, καθώς και στην ενεργοποίηση της διαδικασίας της οξείδωσης, η οποία ευθύνεται για τη γήρανση και άλλες δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Στα πλαίσια εκτίμησης του οξειδωτικού στρες, γίνεται χρήση ορισμένων δεικτών που αποτιμούν: 1) την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

όπως η μαλονδυαλδεϋδη, το F2-ισοπροστάνιο, τα συζυγή διένια, η Oxy-LDL [298], 2) την οξείδωση του DNA με τη χρήση της 8-υδροξυ-2΄-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) και 3) την οξείδωση των πρωτεϊνών με τη χρήση πρωτεϊνικών καρβονυλίων [299].

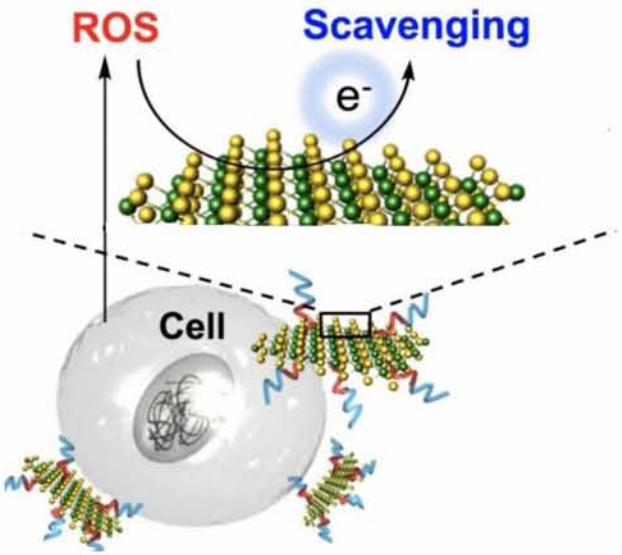
Α.6.1 Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Α.6.1.1 Γενικά

Αναφορικά με το οξυγόνο, πρόκειται για διατομικό μόριο, που παρουσιάζει παραμαγνητισμό, εξαιτίας της παρουσίας δύο μονήρων ηλεκτρονίων σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Το βασικότερο γνώρισμά του είναι η «υφαρπαγή» ενός ηλεκτρονίου, προς συμπλήρωση του χημικού του τύπου, με άμεσο επακόλουθο την «εξασθένηση» των χημικών ενώσεων. Έτσι, προκύπτει ένας αριθμός χημικών ενώσεων, ευρέως αποκαλούμενων ως «ελεύθερες ρίζες», που προξενούν σημαντικές βλάβες στην προσπάθεια ανεύρεσης του ενός και μόνου ηλεκτρονίου που έχουν απωλέσει. Επομένως, με τον όρο «ελεύθερη ρίζα» περιγράφεται το άτομο ή τα μόρια που αποτελούνται από ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Οι ρίζες διέπονται από ιδιαίτερη αστάθεια και έχουν σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν με παραπλεύρως ευρισκόμενα μόρια, αποσπώντας τα ηλεκτρόνια αυτών στην προσπάθειά τους να συμπληρώσουν την ηλεκτρονιακή τους στιβάδα (Εικόνα 18) [300]. Τα παρακείμενα μόρια μπορεί να μετατρέπονται επίσης σε ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε ποικίλες κυτταρικές βλάβες.

Ως απλούστερο παράδειγμα ελεύθερης ρίζας μπορεί να αναφερθεί το υδρογόνο, που απαρτίζεται από ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Υπάρχουν επίσης ρίζες που είναι εξαιρετικά δραστικές όπως είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$) και του χλωρίου ($Cl\cdot$), άλλες ρίζες που είναι λιγότερο δραστικές και διαχέονται, όπως οι ρίζες του αλκοξυλίου ($RO\cdot$) και του υδροπεροξυλίου ($HO_2\cdot$), και τέλος ρίζες οι οποίες είναι σταθερές όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) και το μονοξείδιο του αζώτου ($NO\cdot$).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της απομάκρυνσης ενός ηλεκτρονίου από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS).

Ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να δημιουργηθούν μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων αλλά και μέσω ομοιοπολικής διάσπασης, η οποία διακρίνεται στην ομολυτική και την ετερολυτική διάσπαση. Ειδικότερα:

α) η ομολυτική διάσπαση, αναφέρεται στη συμμετρική διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού, κατά τρόπο που το κάθε τμήμα του μορίου λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο και δημιουργούνται δύο ελεύθερες ρίζες:

$$\mathbf{A : B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}}$$

β) η ετερολυτική διάσπαση, αναφέρεται στην ασύμμετρη διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού, κατά τρόπο που τα δύο ηλεκτρόνια δεν απομακρύνονται από το ίδιο τμήμα. Στην περίπτωση αυτή δεν δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες αλλά δύο ιόντα, ένα κατιόν και ένα ανιόν:

$$\mathbf{A : B \rightarrow A:^{+} + B^{-}}$$

Στην περίπτωση που οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν με μία μη ρίζα, όπως άλλωστε είναι η πλειονότητα των βιολογικών μορίων, δημιουργούνται καινούργιες ρίζες, οι οποίες με τη σειρά τους δύνανται να αντιδράσουν με άλλα μόρια, με συνέπεια τη δημιουργία και άλλων ριζών με τελικό αποτέλεσμα την εξακολουθητική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αυτή διαδικασία αναπαραγωγής ριζών και την πρόκληση καταστροφικών βλαβών στον οργανισμό.

Α.6.1.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται με αυξημένη συχνότητα στον ανθρώπινο οργανισμό καθημερινά, και πηγάζουν είτε από εξωγενείς πηγές, όπως το εξωτερικό περιβάλλον, είτε από ενδογενείς πηγές, όπως είναι οι διάφορες ενζυμικές ή μη αντιδράσεις που επιτελούνται ενδογενώς στο ανθρώπινο σώμα. Στις εξωγενείς πηγές συγκαταλέγονται διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, ποικίλες χημικές ουσίες, φάρμακα, αιθαλομίχλη, καυσαέριο κλπ. Οι ενδογενείς πηγές διακρίνονται σε ενδοκυττάριες και εξωκυττάριες. Σε αυτές κατηγοριοποιούνται οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που καταλύονται ενζυμικά ή μη, χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντες διάφορα οξειδωτικά μέταλλα καθώς και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αναπνευστική μιτοχονδριακή αλυσίδα.

Ενδογενενείς πηγές

<u>Αναπνευστική Αλυσίδα μιτοχονδρίων</u>: Αναφέρεται στη δημιουργία ελευθέρων ριζών όταν διαφεύγουν ηλεκτρόνια κατά τη μεταφορά τους διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας. Λαμβάνει χώρα συνήθως στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

<u>Ενζυμικό σύστημα κυτοχρώματος P450:</u> Αναφέρεται στη δημιουργία δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) ως παραπροϊόντων, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH, στα πλαίσια αντίδρασης οξείδωσης ενός υποστρώματος (π.χ. φαρμάκου). Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 συνιστούν αιμοπρωτεΐνες οι οποίες ανιχνεύονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ηπατοκύτταρα, έχοντας ως βασικό ρόλο το μεταβολισμό ξένων προς τον οργανισμό ουσιών. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας είναι δυνατόν να προκύψουν τοξικές και καρκινογόνες ενώσεις.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Φλεγμονώδεις αντιδράσεις: Αναφέρονται στη δημιουργία σημαντικών ποσοτήτων ανιόντος του υπεροξειδίου, H_2O_2, $OH^{\cdot}$ και υποχλωριώδους οξέος (HOCl) από την καταλυτική δράση της μεμβρανικής NADPH οξειδάσης που διαθέτουν διάφορα φαγοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης στην περιοχή της ιστικής βλάβης [301].

Υπεροξειδιοσώματα: Αναφέρονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, στα πλαίσια αντιδράσεων οξείδωσης από τα μεμβρανικά κυστίδια με εξειδικευμένα ένζυμα.

Αυτοοξείδωση βιομορίων: Αναφέρεται στην απελευθέρωση ελεύθερων ριζών, στα πλαίσια της αυτοοξείδωσης των φλαβινών, κατεχολαμινών, θειολών, αιμοσφαιρινών και μυοσφαιρινών [302].

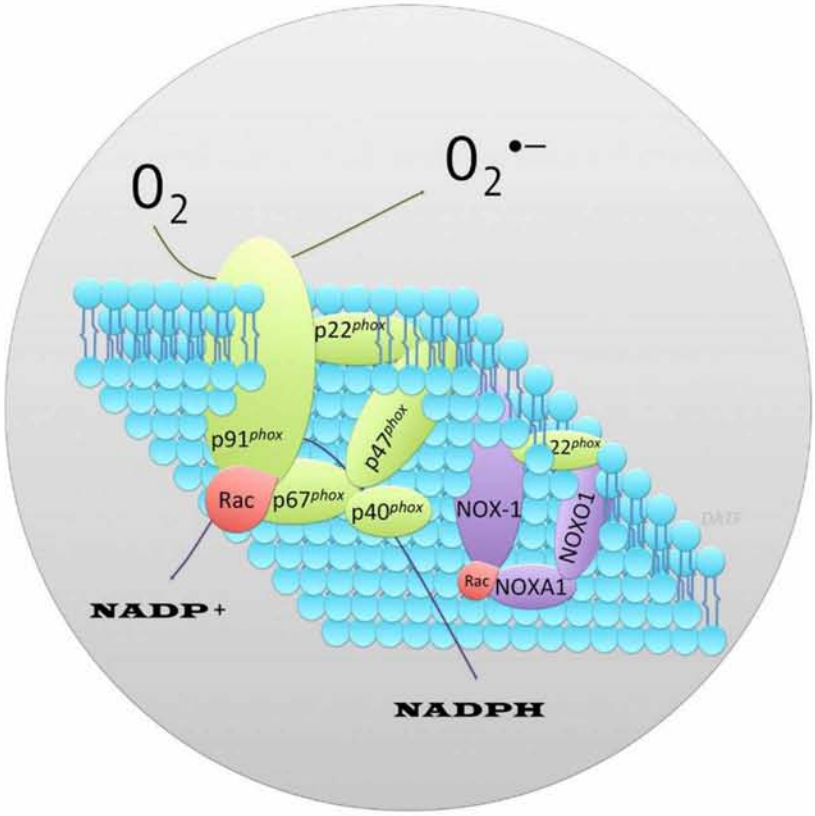
Κατεχολαμίνες: Αναφέρονται στην αύξηση των ελεύθερων ριζών, ως αποτέλεσμα της δράσης των κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, όπου μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων διεγείρουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των σκελετικών μυών και των καρδιομυοκυττάρων [303].

NADPH οξειδάση: Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται είτε από ενζυματικές, είτε από μη ενζυματικές πηγές, σημαντικό ποσοστό των οποίων ευρίσκεται στο αγγειακό σύστημα. Η NADPH οξειδάση, είναι μια διαμεμβρανική οξειδάση, μορφές της οποίας εμπεριέχονται στο ενδοθήλιο, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στους ινοβλάστες. Η καταλυτική της δράση έγκειται στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH, προκειμένου να παραχθεί ανιόν του υπεροξειδίου. Η ενεργοποίηση της εν λόγω οξειδάσης διενεργείται: α) από αγωνιστές των GPCR υποδοχέων, όπως η αγγειοτασίνη ΙΙ, η ET-1 και η βραδυκινίνη, β) από αυξητικούς παράγοντες, (πχ των αιμοπεταλίων) και γ) από κυτοκίνες, όπως ο TNF-α, ενώ σημειώνει ιδιαίτερη δραστικότητα σε συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης και σε συνθήκες μεγάλης διάρκειας έκθεσης στις LDL λιποπρωτεΐνες και στη νιτρογλυκερίνη.

Η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης διενεργείται έπειτα από τροποποίηση της μεμβρανοσύνδετης NADPH οξειδάσης (Nox) και της έκφρασης της υπομονάδας p22phox και των ρυθμιστικών κυτταροπλασματικών υπομονάδων $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, και της μικρής GTPάσης Rac1 (Εικόνα 19). Οι ισομορφές Nox-1, Nox2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

(gp91^{phox}), Nox4 και Nox5 εμπεριέχονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η Nox2 εμπεριέχεται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αρτηριών και τους ινοβλάστες και οι Nox1, NOx4 και Nox5 εκφράζονται από τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. Στην περίπτωση της οξείας ανόδου του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζεται το σύμπλοκο της οξειδάσης (p47^{phox} και Rac1), είτε σημειώνεται άνοδος των επιπέδων έκφρασης των υπομονάδων του ενζύμου [304].



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών δομών που απαρτίζουν την NADPH οξειδάση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η δομή p91^{phox} αποτελεί τον πυρήνα της φαγοκυτταρικής NADPH οξειδάσης που μαζί με τις σχετιζόμενες πρωτεϊνικές υπομονάδες είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητα του ενζύμου, το οποίο ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε υπεροξείδιο ($O_2^{\bullet-}$). Η NOX-1, που αποτελεί τον καταλυτικό πυρήνα, αλληλεπιδρά με τα ομόλογα των p47^{phox} και p67^{phox}, τα οποία λέγονται $NOXO_1$ (NOX organizer protein 1) και $NOXA_1$ (NOX activator protein 1) αντίστοιχα [304].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

<u>Οξειδάση της Ξανθίνης (ΧΟ)</u>: Το $O_2^{\bullet-}$, επίσης, παράγεται από το απαρτιζόμενο από μεταλλοφλαβοπρωτεΐνες σύστημα της οξειδορεδουκτάσης της ξανθίνης. Διακρίνονται δύο μορφές του: α) η δευδρογενάση της ξανθίνης και β) η οξειδάση της ξανθίνης, που πρόκειται για μεταμεταφραστικά τροποποιημένη μορφή. Το υπόψη σύστημα, που εκφράζεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πουρινών καταλύοντας την παραγωγή της ξανθίνης από την υποξανθίνη. Οι δύο μορφές του διαφέρουν στο ότι στη μεν (α) είναι απαραίτητη η ύπαρξη του δέκτη ηλεκτρονίων NAD^+, η δε (β) ανάγει το οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ [305].

<u>Συνθάσες του ΝΟ</u>: Ο ρόλος των συνθασών του ΝΟ έγκειται στην ενζυμική καταλυτική οξείδωση της L-αργινίνης προς L-κιτρουλλίνη με την ταυτόχρονη παραγωγή του ΝΟ. Όπως προαναφέρθηκε, η οικογένεια των ενζύμων των συνθασών του ΝΟ περιλαμβάνει 3 ισομορφές. Έως τώρα, τα βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν ένα ρόλο για την eNOS στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Η ισομορφή αυτή αποτελεί ομοδιμερές εξαρτώμενο από την καλμοδουλίνη, μόριο όπου, κάθε μονομερές αποτελείται από μία περιοχή ρεδουκτάσης με θέσεις πρόσδεσης για τους συμπαράγοντες NADPH, FMN και FAD, και μία περιοχή οξειδάσης, με θέσεις πρόσδεσης για τον συμπαράγοντα τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4), το υπόστρωμα L-αργινίνη, αίμη και ψευδάργυρο.

Φυσιολογικά, η eNOS με τη βοήθεια της τετραϋδροβιοπτερίνης, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται δίπλα στο μόριο της αίμης και να μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ομάδα γουανιδίνης-αζώτου του υποστρώματος της αργινίνης, προάγει την παραγωγή ΝΟ. Σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης BH_4 ή L-αργινίνης ή σε έλλειψη των συγκεκριμένων μορίων η μη συζευγμένη NOS προκαλεί την οξείδωση του μοριακού οξυγόνου προς παραγωγή $O2^{\bullet-}$ και H_2O_2.

Το ανωτέρω φαινόμενο, που ονομάζεται αποσύνδεση NOS (uncoupling NOS), είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αύξηση του οξειδωτικού στρες και κατ'επέκταση σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μέσω της αυξημένης παραγωγής $O2^{\bullet-}$, μείωσης της παραγωγής του ΝΟ ή της ταυτόχρονης παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου και της ρίζας του υπεροξειδίου [306].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

<u>Λιποοξυγενάσες (LOX)</u>: Αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων που καλούνται διοξυγενάσες και περιέχουν σίδηρο στο ενεργό τους κέντρο. Είναι υπεύθυνες για την καταλυτική αντίδραση σχηματισμού υπεροξειδίων από την ενσωμάτωση του μοριακού οξυγόνου στους διπλούς δεσμούς των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το αραχιδονικό και το λινολενικό οξύ. Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος από τις LOX πολλές φορές οδηγεί στην παραγωγή των ROS μέσω της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης, η οποία πιθανά δημιουργεί μία σηματοδοτική σύνδεση με τους διάφορους μεταβολίτες των LOX και των κυκλοοξυγενασών [307].

Εξωγενείς πηγές

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να παραχθούν και από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία Β (280-320nm), η οποία προκαλεί κυτταρικές βλάβες στο δέρμα και σε άλλους ιστούς ενώ η υψηλή θερμοκρασία ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HsP) ως απάντηση. Επίσης, οι διατροφικές συνήθειες επηρεάζουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, καθώς η μειωμένη πρόσληψη βιταμινών και μετάλλων, που αποτελούν συμπαράγοντες των αντιοξειδωτικών ενζύμων, μπορούν να δημιουργήσουν ανισορροπία μεταξύ του αντιοξειδωτικού κυτταρικού συστήματος και των ενδοκυττάριων ελευθέρων ριζών. Η χρήση επίσης, διαφόρων φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων ή άλλων εντομοκτόνων μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή των ριζών. Στην αύξηση των ROS, τέλος, συμβάλλει και ο τρόπος ζωής των ατόμων αφού η έντονη άσκηση, το καθημερινό άγχος, το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή των ριζών [308].

Α.6.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS) και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Ως «δραστικές μορφές οξυγόνου», (ROS: reactive oxygen species), συνήθως ορίζονται οι ελεύθερες ρίζες με κεντρικό στοιχείο το οξυγόνο, η αναγωγή του οποίου οδηγεί σε ευρεία και ιδιαίτερα δραστική ποικιλία ROS, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), αλλά και ελεύθερες ρίζες όπως το ιόν του υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) και το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), που είναι αποτέλεσμα της πρόσληψης ενός επιπλέον ηλεκτρονίου από το οξυγόνο (O_2) που του δημιουργεί ένα μονήρες ηλεκτρόνιο [309]. Η χρόνια ή η παρατεταμένη παραγωγή ROS,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

θεωρείται εξέχουσας σημασίας στην εξέλιξη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και φλεγμονώδους διαταραχής. Ως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τον τοπικό μεταβολισμό σχηματίζονται ταυτόχρονα και ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αυξάνουν το οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου και επιδρούν στη σταθερότητα της λειτουργίας του. Το ενδοθήλιο κατέχει καίριο ρόλο στην ομοιοστασία του μικροκυκλοφορικού συστήματος και συντελεί στην τοπική ομοιοστασία [310]. Η ανάπτυξη μεγάλου αριθμού διαταραχών, όπως η αθηρωμάτωση, η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος κλπ, αποδίδεται στα ROS.

Α.6.3 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS) και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Ως «δραστικές μορφές αζώτου», (RNS: reactive nitrogen species), ορίζονται οι ελεύθερες ρίζες με κεντρικό στοιχείο το άζωτο και περιλαμβάνουν τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($NO\cdot$), το υπεροξυ νιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$), στοιχεία που έχουν μεγάλη χημική δραστικότητα και δύνανται να προκαλέσουν την οξείδωση πλήθους βιομορίων [311]. Το ανιόν $ONOO^-$ αποτελεί προϊόν της αντίδρασης του NO με το οξυγόνο ή το ανιόν του υπεροξειδίου και αποτελεί την πιο δραστική ρίζα αζώτου.

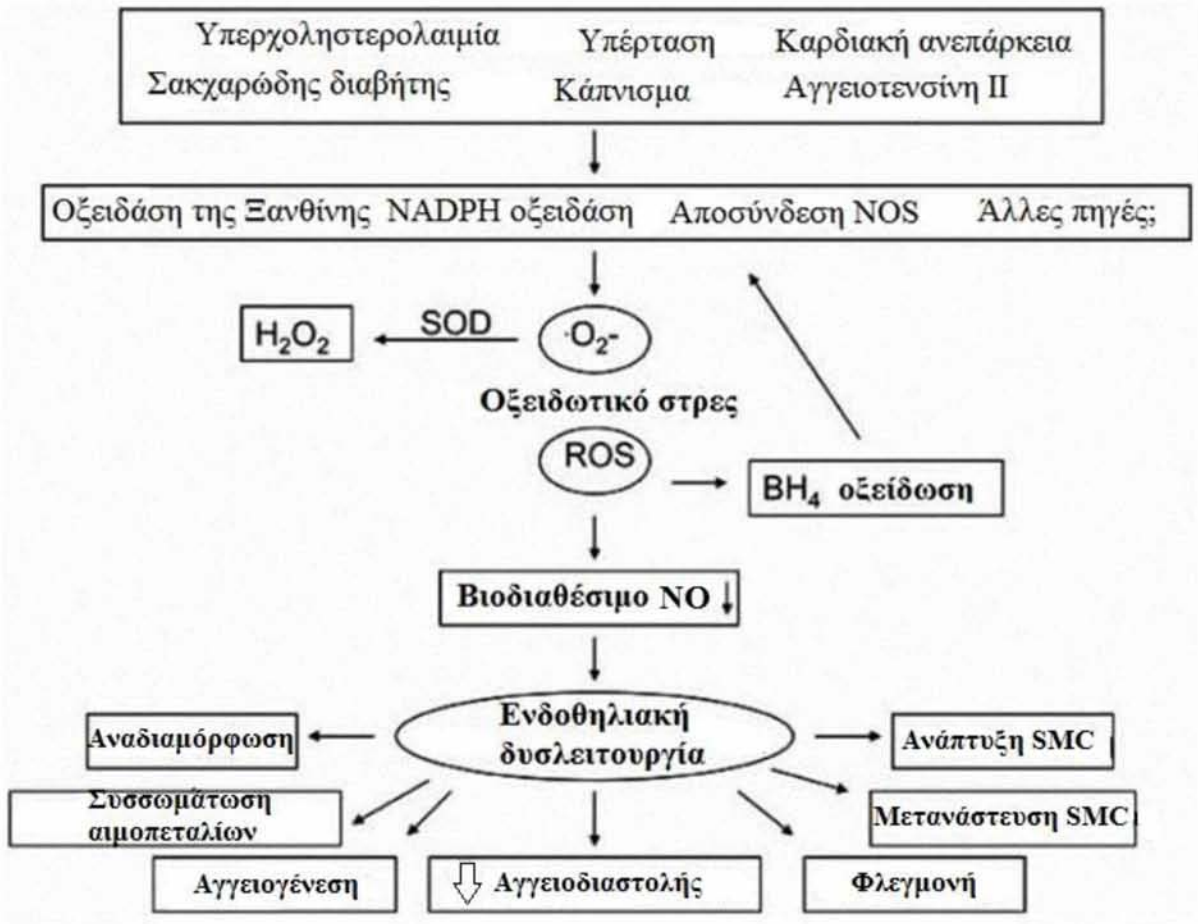
Κατά κοινή παραδοχή όταν ο λόγος NO / $O_2^{\bullet-}$ έχει υψηλή τιμή, είναι ωφέλιμο για το κύτταρο, υπό την έννοια ότι περιορίζεται η υπεροξείδωση των λιπιδίων, δοθέντος ότι το NO καταπολεμά τις υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, διακόπτει την προσκόλληση των φαγοκυττάρων στο ενδοθήλιο, αναστέλλει τη δράση του NF-kB, περιορίζει την έκλυση $O_2^{\bullet-}$ και αναστέλλει τη δράση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) θέτοντας σε ενέργεια έτερους (π.χ αιμοξυγενάσες).

Στον αντίποδα όμως, οι υψηλές συγκεντρώσεις του NO έχουν ως αποτέλεσμα: α) τη γένεση RNS, τα οποία τυγχάνουν εξαιρετικά επιβλαβή για τις πρωτεΐνες, β) την αναστολή της οξειδάσης του κυτοχρώματος των μιτοχονδρίων, με επακόλουθο τη λειτουργική διαταραχή τους και γ) την αύξηση της διαρροής ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα, με εξαιρετικά δυσμενείς συνέπειες.

Το NO έχει την ιδιότητα της άμεσης αντίδρασης με το ανιόν του υπεροξειδίου, σχηματίζοντας κατ΄ αυτόν τον τρόπο $ONOO\cdot$. Αποτέλεσμα αυτής της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αντίδρασης είναι η απώλεια των βιολογικών δράσεων του NO καθώς και η μείωση της βιοδιαθεσιμότητάς του, με επακόλουθο την έναρξη της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, της αγγειοσυστολής, της αγγειογένεσης, του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων και της προσκόλλησης των μονοκυττάρων, διαδικασίες οι οποίες χαρακτηρίζουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Εικόνα 20). Το NO, επιπλέον, επάγει την αγγειοδιαστολή και έχει αντιοξειδωτικές και αντιαθηρογόνες ιδιότητες. Αναστέλλει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και ελαττώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων [151].



Εικόνα 20: Πηγές ελευθέρων ριζών που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουγία στο καρδιαγγειακό σύστημα (τροποπ. από [156]).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.6.4 Ο διπλός ρόλος του NO στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Οι επικρατούσες απόψεις αποδίδουν στο NO διττή επίδραση στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και σε λοιπές, σχετιζόμενες με το οξειδωτικό φορτίο, παθήσεις, όπως πχ αθηροσκλήρωση, αφού δρα αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας τις δραστικές ρίζες οξυγόνου προκαλώντας την παραγωγή της γλουταθειόνης σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Παράλληλα, δρα οξειδωτικά στην περίπτωση υπερβολικής παραγωγής του [312].

Το ενδοθηλιακό NO, πέρα από την αγγειοδιασταλτική δράση του, έχει παρατηρηθεί ότι λειτουργεί και ως αντιφλεγμονώδες μόριο, αφού η σύνθεσή του δρα ανασταλτικά στην προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και στη δημιουργία φλεγμονωδών κυτοκινών. Η έκφραση της MCP-1 από τα λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία είχαν προεκτεθεί σε LPS ή oxyLDL διακόπτεται από τους δότες NO, ενώ το επαχθέν οξειδωτικό στρες περιορίζεται από το ενδογενές NO, αναστέλλοντας την αγγειοτασίνη ΙΙ στα αιμοφόρα αγγεία. Παράλληλα, με την εξέλιξη της φλεγμονής, σημειώνεται άνοδος των επιπέδων του αγγειακού ανιόντος του υπεροξειδίου, συνεπεία της επί μακρόν διακοπής της έκλυσης του NO [313].

Πειραματικά, σε διαγονιδιακά ποντίκια eNOS-knockout, διαπιστώθηκε ότι στην πρόκληση οξείας φλεγμονής, η μικροαγγειακή διαπερατότητα ρυθμίζεται καταλυτικά από την eNOS και το παραγόμενο εξ΄ αυτής NO [314]. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι στα *enos*$^{-/-}$ ποντίκια δεν υπήρξε απόκριση πρώτης φάσης, δηλαδή εξέλιξη της απόκρισης στο απόγειό της εντός τεσσάρων ωρών και ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι όταν αποκλείσθηκε το ενδοθηλιακό NO το οίδημα μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό στη δεύτερη φάση, κατά την οποία η απόκριση φθάνει στο απόγειό της με βραδύτερο ρυθμό, εντός 24 ωρών. Εξ΄ αυτών συνάγεται ότι η άνοδος των επιπέδων ροής του αίματος και της αγγειακής διαπερατότητας είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρώτης φάσης, τα οποία στη συνέχεια συμβάλλουν στην εξέλιξη της δεύτερης φάσης της φλεγμονώδους απόκρισης.

Η σύνθεση του NO σε χαμηλές συγκεντρώσεις όταν διενεργείται από την nNOS του προσδίδει την ιδιότητα να λειτουργεί βραχυπρόθεσμα ως νευροδιαβιβαστής, ενώ όταν διενεργείται από την eNOS καθορίζει φυσιολογικά την αγγειοδιαστολή και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Σε περιπτώσεις όμως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

σύνθεσής του σε υψηλές συγκεντρώσεις από την επαγόμενη NOS, ιδίως στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, το NO καθίσταται κυτταροτοξικό για τους ξενιστές στα αρχικά αμυντικά στάδια απέναντι σε μικροοργανισμούς ή καρκινικά κύτταρα [315, 316].

Η κυτταροτοξική ιδιότητα του NO αποδίδεται στο σχηματισμό συμπλόκων σιδήρου-νιτρικών (nitrosyl ion) με ένζυμα που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο Fe-S. Δύναται να καταστεί επιζήμιο, διότι οδηγεί σε απαμίνωση και σύνδεση της χρωματίνης στο DNA, εκ του οποίου ενισχύεται η μεταλλαξιγένεση. Όπως προαναφέρθηκε, η αντίδραση του $NO^{\cdot}$ με ανιόν υπεροξειδίου δημιουργεί υπεροξυνιτρικό και ενόσω αυτό επιδρά τοξικά, το $NO^{\cdot}$ ενδέχεται να εξουδετερώνει ισχυρά αντιοξειδωτικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η δισμουτάση του ανιόντος υπεροξειδίου, καθώς προκαλεί απόπτωση με: α) την άνοδο των επιπέδων δημιουργίας κεραμιδίων, διαμέσου της διεγερμένης κασπάσης 3, β) την άνοδο της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων και γ) τη διέγερση του Fas συστήματος [317].

Επίσης, οι υψηλές συγκεντρώσεις NO και cGMP εμποδίζουν τη διείσδυση ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο και ταυτόχρονα δημιουργούν διαδικασίες εκδίωξης ιόντων ασβεστίου, που έχει ως επακόλουθο την άμβλυνση του ενδοθηλιακού ασβεστίου με αρνητική ανατροφοδότηση [318]. Ο προαναφερόμενος υφιστάμενος μηχανισμός δύναται να λειτουργεί προστατευτικά για το ενδοθήλιο έναντι των επιζήμιων υψηλών συγκεντρώσεων NO και ιόντων ασβεστίου.

Α.6.5 Αντιοξειδωτικοί ενδοκυττάριοι μηχανισμοί

Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου οδηγεί στην ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, με στόχο την επαναφορά της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και τη μείωση των επιβλαβών συνεπειών του. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς (αντιοξειδωτικά ένζυμα) και μη-ενζυμικούς (ουσίες μικρού μοριακού βάρους που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες).

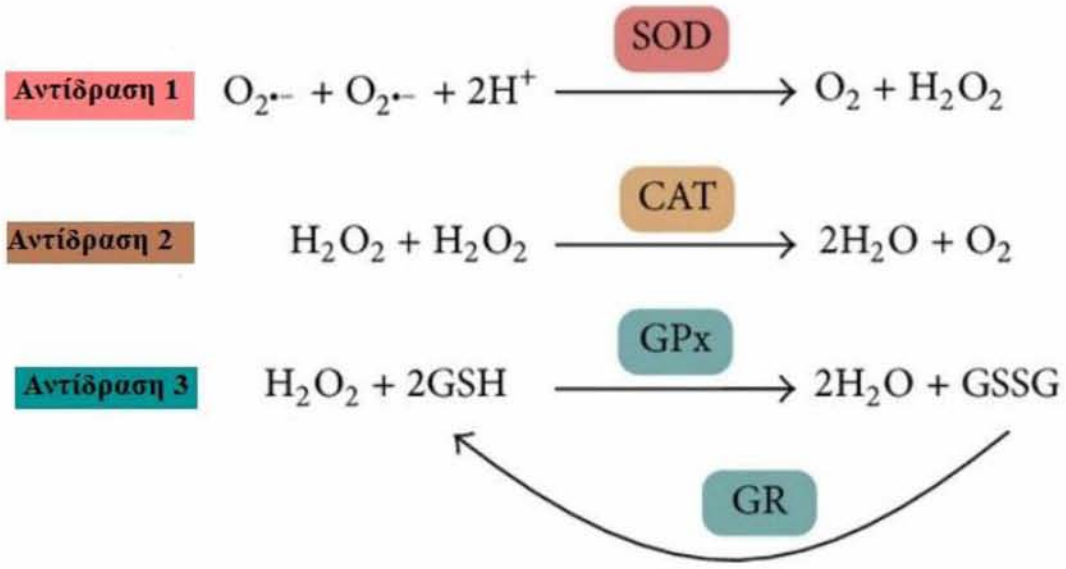
Στόχοι των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας και η αναστολή της ενδοθηλιακής κυτταρικής βλάβης, συνεπεία των παραγόμενων ελευθέρων ριζών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.6.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1. Δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD)

Έχει την ιδιότητα να μετατρέπει την ελεύθερη ρίζα του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, υποβαθμίζοντας έτσι τη δραστικότητά της και ουσιαστικά εξουδετερώνοντάς την, ενώ το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου εξουδετερώνεται ακολούθως από την καταλάση ή το σύστημα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Τα βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και οι αντιδράσεις που καταλύουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και του υπεροξειδίου. SOD (superoxide dismutase): Δισμουτάση του υπεροξειδίου; CAT (catalase): καταλάση; GPx (glutathione peroxidase): περοξειδάση της γλουταθειόνης; GR (glutathione reductase): αναγωγάση της γλουταθειόνης [319].

Η αντίδραση 1: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ διενεργείται με σημαντικά ταχύ ρυθμό.

Επίσης, η δισμουτάση λειτουργεί προστατευτικά για τις δεϋδρατάσες (ακονιτάση, 6-φωσφογλυκονική δεϋδρατάση, φουμαράση Α και Β, και δεϋδρατάση του διυδροξεικού) έναντι της εξουδετέρωσής τους από το $O_2^{\bullet-}$.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Ανάλογα με το περιεχόμενό της σε ψευδάργυρο, χαλκό, μονοπύρηνο σίδηρο, μαγγάνιο ή συμπαράγοντες νικελίου, η δισμουτάση διαχωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες, εκ των οποίων οι δισμουτάσες μαγγανίου και σιδήρου παρουσιάζουν ομολογία, ενέχουν ταυτόσημα κατάλοιπα μετάλλων στο ενεργό τους κέντρο και παρουσιάζουν σχεδόν όμοια τρισδιάστατη δομή. Εστιάζοντας ειδικότερα στον ανθρώπινο οργανισμό, διακρίνονται τρεις μορφές αυτής και πιο συγκεκριμένα η κυτταροπλασματική στην οποία εμπεριέχεται χαλκός ή ψευδάργυρος, η μιτοχονδριακή στην οποία εμπεριέχεται μαγγάνιο και η εξωκυτταρική. Αναλυτικότερα: 1) η κυτταροπλασματική SOD θεωρείται η αρχική κυτταρική αντιοξειδωτική ζώνη άμυνας, 2) η μιτοχονδριακή SOD εκλαμβάνεται ως η πλέον αναγκαία για να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος, δοθέντος ότι η αναπνευστική μιτοχονδριακή άλυσος τυγχάνει η κυριότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS, 3) η εξωκυτταρική SOD τυγχάνει γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται και παρατηρείται σε ιστούς και εξωκυτταρικά υγρά, όπως πλάσμα και λέμφος.

2. Καταλάση

Πρόκειται για τετραμερές ένζυμο, απαρτιζόμενο από τέσσερις σιδηροπρωτοπορφυρινικές ομάδες, με ιδιαίτερα μεγάλη δραστικότητα, σε βαθμό που δεν είναι δυνατός ο κορεσμός του από το υπόστρωμά της, H_2O_2, έστω και εάν υφίσταται μεγάλες συγκεντρώσεις του. Η καταλυτική αντίδραση του είναι:

$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$ ή $ROOH + AH_2 \rightarrow H_2O + ROH + A$

Παρότι η καταλάση δεν λογίζεται ως ζωτικής σημασίας για ορισμένους κυτταρικούς τύπους, τυγχάνει κομβικός παράγοντας για την κυτταρική ανεκτικότητα και προσαρμοστικότητα κατά το οξειδωτικό στρες. Όταν υπάρχουν συγκεντρώσεις ROS σε πολύ μεγάλο βαθμό, είναι κρίσιμη η απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών πριν τη διαφυγή τους από το κύτταρο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Τα βασικότερα ένζυμα αναγωγής πολλών υδροπεροξειδίων (ROOH, H_2O_2) αποτελούν οι υπεροξειδάσες στις οποίες εμπεριέχεται σελήνιο και επιτυγχάνουν την προαναφερόμενη αναγωγή διαμέσου της γλουταθειόνης (GSH).

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

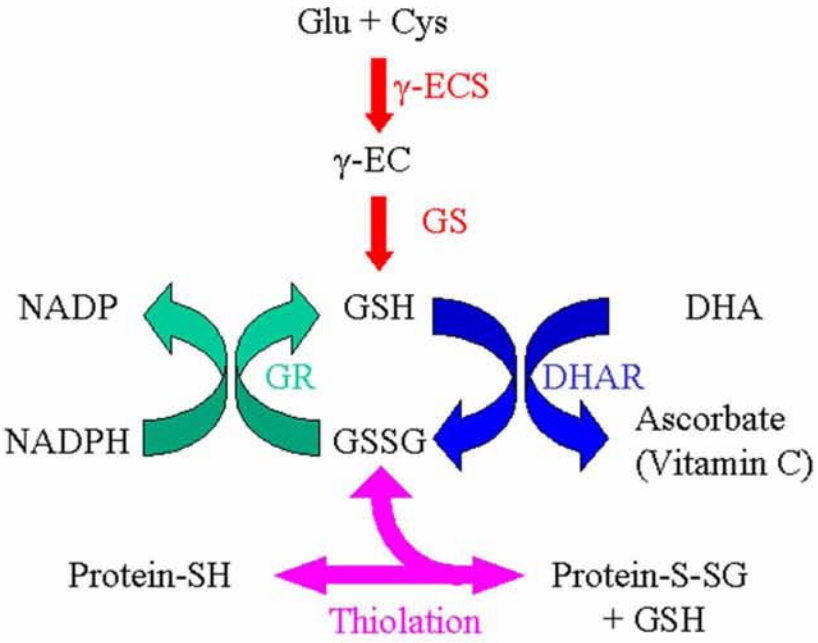
Ο τύπος του ιστού καθορίζει την έκφραση τουλάχιστον πέντε ισοενζύμων GPx.

Η αναγωγή των υδροπεροξειδίων των λιπαρών οξέων και του H_2O_2 διενεργείται, μέσω κατανάλωσης GSH, από την κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή GPx. Ο τύπος GPx 1 και 4 εντοπίζεται στο σύνολο των ιστών, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στη μεμβράνη, με τον πρώτο εξ΄ αυτών να παρατηρείται βασικώς στα ερυθροκύτταρα, στο ήπαρ και στους νεφρούς και τον δεύτερο στο επιθήλιο των νεφρών και τους όρχεις. Η κατανομή της κυτταροπλασματικής GPx2 και της εξωκυτταρικής GPx3 είναι σαφώς πιο περιορισμένη, αφού παρατηρούνται μόνο στο γαστρεντερικό σωλήνα και τα νεφρά αντιστοίχως.

Παρά το γεγονός ότι η GPx ευρίσκεται στο ίδιο με την καταλάση υπόστρωμα, έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει αντιδράσεις με λιπίδια και άλλα οργανικά υδροπεροξείδια, το υπεροξεινιτρικό και άλλες σεληνοπρωτεΐνες.

Σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες με μικρή ένταση, ο κρισιμότερος προστατευτικός παράγοντας είναι ο κύκλος αναγωγής της γλουταθειόνης (Εικόνα 22), ενώ σε αντίθετη περίπτωση, ήτοι όταν σημειώνεται οξειδωτικό στρες σημαντικής έντασης θεωρείται κρισιμότερη η καταλάση [320].

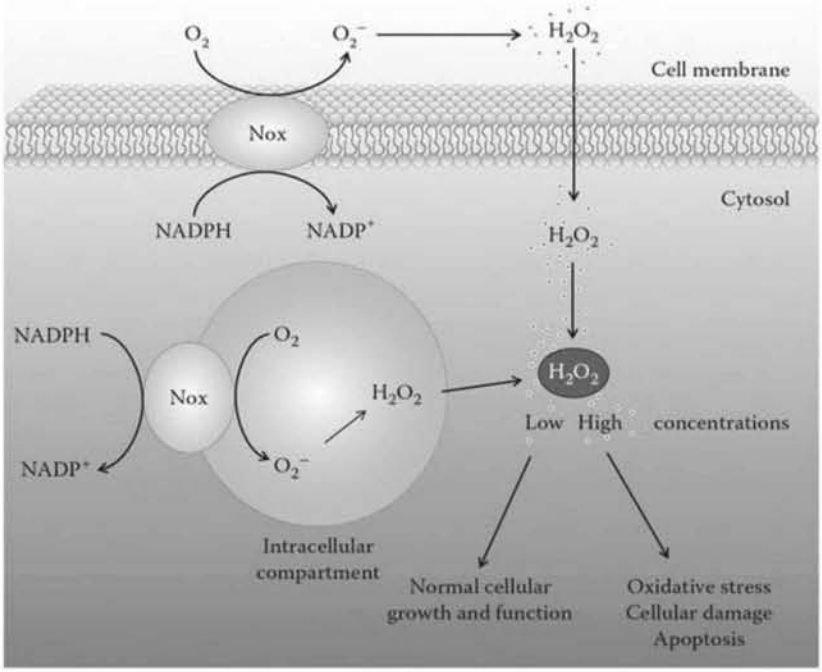
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 22: Ο κύκλος παραγωγής και ανακύκλωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG).

Το $O_2^{\bullet-}$ προέρχεται από τις NADPH οξειδάσες ή την ξανθίνη, ή ως παραπροϊόν του μεταβολισμού των κυττάρων και ειδικότερα κατά τη διαδικασία της αναπνοής στη μιτοχονδριακή αλυσίδα των ηλεκτρονίων (Εικόνα 23). Εν συνεχεία η SOD μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 το οποίο απομακρύνεται γρήγορα από την καταλυτική ενζυμική δράση της καταλάσης ή τις υπεροξειδάσες, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταναλώνει GSH ως δότη ηλεκτρονίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 23: Παραγωγή και μεταβολισμός των ελευθέρων ριζών [321].

4. Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GSSGR)

Η GSSGR ρυθμίζει την αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου και ως εκ τούτου ευθύνεται για τη συγκράτησή του εντός των φυσιολογικών τιμών. Η αντίδραση που καταλύει είναι:

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Απαρτίζεται από δύο υπομονάδες με ένα μόριο FAD σε κάθε ενεργό κέντρο. Η αναγωγή του FAD γίνεται από το προερχόμενο από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών NADPH και ακολούθως μετακινούνται στη δισουλφιδική γέφυρα τα ηλεκτρόνια του FAD, σχηματίζοντας έτσι 2 σουλφυδρυλομάδες, οι οποίες με τη σειρά τους ανάγουν την GSSG σε δύο μόρια GSH, κατόπιν αντίδρασης με αυτήν.

Α.6.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

Οι συγκεκριμένοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενδογενή αντιοξειδωτικά, πχ γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, στοιχεία μετάπτωσης, μελατονίνη, συνένζυμο Q10, και ενώσεις που προσλαμβάνονται διατροφικά από τον οργανισμό,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

πχ ασκορβικό οξύ, βιταμίνη Ε, Α, καροτενοειδή, φλαβονοειδή, σελήνιο, ψευδάργυρος και φυτικές φαινόλες.

1. Γλουταθειόνη (GSH)

Υπάγεται στις θειόλες, με βασικό γνώρισμα την ύπαρξη σουλφυδρυλικών καταλοίπων στο ενεργό τους κέντρο (Εικόνα 24), ενώ ενεργεί ως υπόστρωμα της GPx στην εξουδετέρωση των ROS, διαμέσου της διαρκούς μετατροπής της από την ανηγμένη της μορφή (GSH) στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) και το αντίστροφο [322]. Με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στη διατήρηση της ανηγμένης κατάστασης του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος.

Η GSH, ενδοκυττάρια, εξουδετερώνει το $OH^{\cdot}$ και το $O_2^{\bullet-}$ και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη λιπική υπεροξείδωση. Η αναγωγή του υδρογόνου και των οργανικών υπεροξειδίων καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Συντίθεται τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της τροφής, ωστόσο η de novo σύνθεσή της πραγματοποιείται στο ήπαρ. Η GSH έχει και άλλους ρόλους όπως είναι ο πολλαπλασιασμός των λευκοκυττάρων και επιθηλιακών εντερικών κυττάρων, η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, η παραγωγή κυτοκινών κ.ά [323].

Εικόνα 24: Η χημική δομή της γλουταθειόνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

2. Βιταμίνη Ε (α-Τοκοφερόλη)

Υπάγεται στις τοκοφερόλες και απαρτίζεται από υδροξυλιωμένους πολικούς αρωματικούς δακτυλίους και από ισοπρενοειδείς μη πολικές πλευρικές αλυσίδες. Τυγχάνει το βασικό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό των κυτταρικών μεμβρανών και για την ενεργοποίησή της απαιτείται συνδυασμός και με έτερες αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το συνένζυμο Q10. Έπειτα από άμεση δράση της με διάφορες ελεύθερες ρίζες, όπως τη ρίζα του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) και τη δημιουργία μίας σχετικά αδρανούς ρίζας τοκοφερόλης, λειτουργεί προστατευτικά έναντι της λιπιδικής υπεροξείδωσης.

$$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$$

$$ROO^{-} + A^{\bullet} \rightarrow ROOA$$

3. Βιταμίνη Α (ρετινόλη)- β-καροτένιο)

Πρόκειται για λιποδιαλυτή πρωτεΐνη, που βρίσκεται σε πλήθος λιπαρών ουσιών. Υπό συνθήκες ανάγκης του οργανισμού το β-καροτένιο μετατρέπεται σε βιταμίνη Α. Το β-καροτένιο βρίσκεται στις μεμβράνες των κυττάρων και σύμφωνα με ορισμένες θεωρήσεις εξουδετερώνει τα ROS και διακόπτει την υπεροξείδωση των λιπιδίων.

4. Ουρικό οξύ

Πρόκειται για παραπροϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, το οποίο παρότι ενέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αφού μπορεί να απενεργοποιήσει $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\cdot}$, το όζον, και το υποχλωριώδες οξύ, δεν κρίνεται σκόπιμη η χρήση του προς αυτό το σκοπό, δεδομένου ότι κατά την απενεργοποίηση των προαναφερόμενων ριζών, δημιουργούνται ταυτόχρονα έτερες ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες [324].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

5. Βιταμίνη C

Πρόκειται για υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, με σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και δυνατότητα αντίδρασης με τα ROS, επάγοντας το δευδροασκορβικό οξύ (DHA).

Ασκορβικό οξύ+$2H^{+}$+2 $O_2^{\bullet-}$ →$2H_2O_2$+ DHA

Η συγκεκριμένη βιταμίνη υπάρχει σε πληθώρα φυτών και ζωών και ο ανθρώπινος οργανισμός την προσλαμβάνει μέσω των τροφών.

Α.6.6 Προ-φλεγμονώδης και αντιφλεγμονώδης δράση των στεροειδών των γονάδων

Μία πρόσθετη όψη της αγγειακής πολυπλοκότητας της ορμονικής θεραπείας σε κλινικές δοκιμές σχετίζεται με τη δράση των οιστρογόνων στην αγγειακή φλεγμονή. Ο ρόλος των οιστρογόνων στη φλεγμονή είναι πολύπλευρος και εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της ανοσολογικής κατάστασης, του σταδίου της αθηροσκλήρωσης, της δόσης/χρόνου και μεταβολισμού των οιστρογόνων, της κατάστασης των ERs καθώς και της εμπλοκής άλλων παραγόντων όπως το οξειδωτικό στρες, η γήρανση και τα επίπεδα γλυκόζης [325-327]. Για παράδειγμα, η οιστραδιόλη μόνη ή με προγεστερόνη έχει ουδέτερες ή αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις στις κυτοκίνες, ενώ συζευγμένα οιστρογόνα με ή/χωρίς προγεστερόνη έχουν προ-φλεγμονώδες δυναμικό [328]. Επιπλέον, η από του στόματος, αλλά όχι η διαδερμική θεραπεία με οιστρογόνα οδηγεί σε αύξηση της CRP, πιθανόν αντανακλώντας την ηπατική μετατροπή της οιστραδιόλης σε προφλεγμονώδεις μεταβολίτες. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα της CRP μπορεί να μην αντανακλούν απαραίτητα φλεγμονή.

Α.6.6.1 Προ-φλεγμονώδης δράση των οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των ορμονοεξαρτώμενων οργάνων, για τη μεταγωγή του κυτταρικού μηνύματος μέσω των οιστρογονο-ειδικών υποδοχέων και για πολλές άλλες βιοχημικές και μοριακές δραστηριότητες. Ωστόσο, υπερβολικά μεγάλες ή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

φαρμακολογικές συγκεντρώσεις φυσικών ή/και συνθετικών οιστρογόνων προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα, όπως ανοσοτοξικότητα, τερατογένεση και καρκινογένεση [208].

Με το πέρασμα των χρόνων, η 17β-οιστραδιόλη (E2) και η διεθυλστιλβεστρόλη (DES) ήταν υπεύθυνες για την ανάπτυξη καρκινικών όγκων στη μήτρα, στην ουροδόχο κύστη, στους όρχεις και στο ουροποιητικό σύστημα ποντικών και αρουραίων, καρκινικών όγκων στη μήτρα και στις ωοθήκες σκύλων, καρκινώματος του ενδομητρίου σε κουνέλια και όγκων στους νεφρούς, το συκώτι και τους όρχεις μικρών ποντικών. Η νεοπλασματική μεταμόρφωση των ανθρώπινων επιθηλιακών μαστικών κυττάρων από την E2, καθορίζει ξεκάθαρα το ρόλο της οιστραδιόλης στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Οι ακριβείς μηχανισμοί της E2-εξαρτώμενης έναρξης και προόδου του καρκίνου του μαστού δεν έχουν γίνει ακόμα σαφείς.

Η E2 αυξάνει τον TNF-α στη μακροφαγική κυτταρική σειρά J774 ποντικών, μετά την επώαση της με καλλιεργητικό υλικό μόνο αλλά και μετά από επώαση με τον λιποπολυσκχαρίτη (LPS) [329]. Προέκθεση των ποντικών σε φαρμακολογικές δόσεις οιστριόλης, 0,4-2mg/kg, προκάλεσε σημαντική αύξηση του TNF-α στον ορό αυτοάνοσων και μη MRL/Lpr ποντικών. Η αύξηση του TNF-α, διεκόπη από τον ανταγωνιστή οιστρογόνων, ταμοξιφαίνη.

Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της E2, διεγείρουν τη γρήγορη παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου, η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση του c-jun και του CREB, και παράλληλα αυξάνει τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων Nrf-1, c-jun και CREB, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συγκεκριμένων γονιδίων.

Πρόσφατες μελέτες, καταδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα η οι μεταβολίτες αυτών που δρουν απευθείας στα μιτοχόνδρια ή τα ανοσολογικά κύτταρα προκαλούν παραγωγή των δραστικών ενώσεων οξυγόνου και αζώτου, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν οξειδωτική καταστροφή στο γονιδίωμα καρκινικών κυττάρων στόχων [208].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.6.6.2 Αντιφλεγμονώδης δράση των οιστρογόνων

Έχει δειχθεί ότι η θεραπεία με Ε2 μειώνει την έκφραση της VCAM- 1 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου διεγερμένα με TNF-α και κυτοκίνες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης σαφηνούς φλέβας μετά από διέγερση με LPS [330], και στο ενδοθήλιο υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών.

Η μειορύθμιση του VCAM- 1 mRNA από τα οιστρογόνα μπορεί να εμπλέκει την αναστολή των NF-kB, AP-1 και GATA μεταγραφικών παραγόντων, όπως αναφέρθηκε από τους Simoncini et al. [139]. Η υποκατάσταση των οιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει αναφερθεί ότι μειώνει τόσο τα επίπεδα της VCAM- 1 όσο και της ICAM- 1 στο αίμα. Τα οιστρογόνα μειώνουν επίσης τη φλεγμονώδη αθηροσκληρωτική διαδικασία με τη μείωση των επιπέδων πολλών μορίων προσκόλλησης και ελέγχουν την αγγειογένεση και την αγγειακή αναδιαμόρφωση μέσω της επαγωγής της έκφρασης του ενδοθηλιακού αγγειακού αυξητικού παράγοντα (VEGF: vascular endothelial growth factor).

Σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή, η χορήγηση 17β-οιστραδιόλης ελάττωσε την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα με αναστολή της έκφρασης των αγγειακών μορίων προσκόλλησης, καθώς και τον αριθμό των μονοκυττάρων υποενδοθηλιακά [263, 331].

Από τους πυρηνικούς υποδοχείς που έχουν αναγνωριστεί και μεσολαβούν στις δράσεις της Ε2, μόνο ο ERα είναι αναγκαίος και επαρκής για να μεσολαβήσει στις περισσότερες από τις αγγειακές επιδράσεις της Ε2, όπως η αύξηση στην παραγωγή του νιτρικού οξειδίου (NO), η επιτάχυνση της επανενδοθηλίωσης και η πρόληψη της φλεγμονής [332].

Σε γενικές γραμμές, η υποστήριξη ότι τα οιστρογόνα αποτελούν αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες, στο πλαίσιο της αθηροσκλήρωσης και του τοιχώματος των αγγείων, αυξάνεται.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.6.6.3 Αντιφλεγμονώδης δράση της τεστοστερόνης

Με βάση πειράματα που έγιναν σε ευνουχισμένους αρουραίους, βρέθηκε ότι ανεπαρκή επίπεδα τεστοστερόνης σχετίζονται με αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες και επαγωγή της φλεγμονής, καθώς παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της ασύμμετρης διμεθυλικής αργινίνης (ADMA: asymmetric dimthyl arginine), η οποία πιθανόν να οδηγεί σε βλάβη και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου του σηραγγώδους σώματος του πέους. Η ADMA, η οποία αποτελεί έναν ενδογενή αναστολέα της συνθάσης του NO (eNOS), παρουσιάζει αύξηση όσο διαρκεί η φλεγμονή [333]. Με βάση μελέτες που έγιναν σε αρουραίους με διαβήτη τύπου 2 κατά τις οποίες χορηγήθηκε θεραπεία υποκατάστασης με ανδρογόνα, βρέθηκε σημαντική βελτίωση της λειτουργίας της στύσης μέσω αναστολής της φλεγμονής στο σηραγγώδες σώμα [334]. Με βάση τις προρρηθείσες έρευνες, παρουσιάζονται στοιχεία για τις επιδράσεις της φλεγμονής και της ADMA στη λειτουργία του ενδοθηλίου των αρουραίων πειραματόζωων, οι οποίες είναι συγκεκριμένες και επηρεάζουν τη λειτουργία της στύσης. Προκύπτει, λοιπόν, ότι η ενδεχόμενη μείωση της ανεπάρκειας της τεστοστερόνης συμβάλλει στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας καθώς και στη βελτίωση της στυτικής δυσλειτουργίας.

Βρέθηκε, επίσης, ότι όταν χορηγήθηκε τεστοστερόνη για 1 μήνα σε άνδρες που παρουσίαζαν υπογοναδισμό ελαττώθηκαν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1b, ενώ παράλληλα ελλαττώθηκαν σημαντικά τα λιπίδια [291]. Η in vivo ευνοϊκή δράση που έχει η τεστοστερόνη μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός της χορήγησής της σε υπογοναδικούς ασθενείς.

Α.6.7 Η δράση της CRH και των στεροειδών των γονάδων στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου

Α.6.7.1 Ο αντιοξειδωτικός ρόλος των οιστρογόνων στο ενδοθήλιο

Έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα δρουν αντιοξειδωτικά και σταθεροποιητικά στην κυτταρική μεμβράνη [335]. Εξαιτίας της ύπαρξης της ομάδας υδροξυλίου στον Α φαινολικό τους δακτύλιο σχετίζονται χημικά με την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε), η οποία έχει αντιοξειδωτική δράση [336]. Η δράση των οιστρογόνων ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, έχει σχέση με τη φαινολική αυτή ομάδα Α, εκ της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

οποίας τα οιστρογόνα δίνουν άτομα υδρογόνου στα υπεροξειδωμένα λιπίδια διακόπτοντας με αυτό τον τρόπο την αλυσιδωτή τους αντίδραση [336].

Η οιστρογονοεπαγώμενη αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και η μεταβολή της ισορροπίας $NO/O_2^{\bullet-}$ συμβάλλουν στην αγγειοπροστατευτική δράση των οιστρογόνων. Αυτό κατέστη εμφανές σε καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs) φλέβας ομφάλιου λώρου, όπου η E2 μείωσε την έκφραση της υπομονάδας gp91phox της NADPH οξειδάσης και αύξησε την έκφραση της eNOS, οδηγώντας σε βελτιστοποίηση της ισορροπίας $NO/ O_2^{\bullet-}$ [337].

Επίσης, σε καλλιέργεια ECs αποδείχτηκε ότι τα οιστρογόνα μειώνουν τη μέσω Ang-II επαγώμενη έκφραση της NADPH οξειδάσης και του υπεροξειδίου του αζώτου, αναστέλλοντας την έκφραση του AT-1 υποδοχέα, την επαχθείσα από την Ang-II [338]. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των οιστρογόνων στα ECs οφείλονται στην επαγωγή της σύνθεσης οξειδοαναγωγασών, όπως η δισουλφιδική ισομεράση, η θειορεδοξίνη, η αναγωγάση της θειορεδοξίνης και η γλουταρεδοξίνη.

Τέλος, έχει βρεθεί ότι σε βόεια αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα (bAEC: bovine aortic endothelial cells) στα οποία προκλήθηκε αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS, με τη χρήση H_2O_2, η παρουσία 17β-οιστραδιόλης συνοδεύτηκε από σημαντική ελάττωση του οξειδωτικού φορτίου. Ευεργετική ήταν, επίσης, η δράση της E2 στην επαγόμενη από τον TNF-α απόπτωση κυττάρων bAEC ενεργοποιώντας την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO, μέσω του μονοπατιού της PI3K-Akt [339]. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι οι ανασταλτικές δράσεις της 17β-οιστραδιόλης στην αθηροσκλήρωση μεσολαβούνται και από την προστακυκλίνη την παραγόμενη από τη δράση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), ενώ ταυτόχρονα η E2 επάγει την παραγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και S-τρασνφεράσης της γλουταθειόνης (GST: glutathione S-transferase) [268].

Α.6.7.2 Ο ρόλος των ανδρογόνων στους οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η τεστοστερόνη επιτείνει τη βλαπτική επίπτωση του οξειδωτικού φορτίου στα κύτταρα και συγκεκριμένα σε καλλιέργειες νεοπλασματικών κυττάρων προστάτη [340]. Επιπλέον, τα ανδρογόνα μέσω του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ανδρογονικού υποδοχέα τους προάγουν το συστηματικό οξειδωτικό φορτίο ενεργώντας επί των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων του αίματος [341], ενώ δεδομένα αναφέρουν για μη γενωμική δράση της τεστοστερόνης στην αύξηση των ROS σε κύτταρα VSMC, μέσω του υποδοχέα GPCR6A [342]. Αυτή η προ-οξειδωτική δράση της τεστοστερόνης αναφέρεται και σε άλλη έρευνα, όπου η τεστοστερόνη αυξάνει τα ROS ενώ ταυτόχρονα μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, υποδεικνύοντας τον πιθανό προ-οξειδωτικό ρόλο της στο καρδιαγγειακό σύστημα [343].

Έχει δειχθεί, ότι η τεστοστερόνη πέρα από τις επιδράσεις της στην ενεργότητα της NADPH οξειδάσης επιφέρει επίσης μιτοχονδριακή παραγωγή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και απόπτωση των VSMCs κυττάρων μέσω του AR [344]. Επιπρόσθετα, η τεστοστερόνη αυξάνει την παραγωγή των ROS μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα AR και το μονοπάτι της PI3-Akt κινάσης. Η DHT έχει αντίστοιχη προ-οξειδωτική δράση με την τεστοστερόνη όπως αποδείχτηκε σε καρκινικά κύτταρα προστάτη αδένα όπου προκαλεί μιτοχονδριακή παραγωγή ROS μέσω της p66Shc πρωτεΐνης, δρώντας μέσω του υποδοχέα AR [345].

Η συγκέντρωση της τεστοστερόνης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη δράση της σε διάφορα κύτταρα και ιστούς όπως έχει αποδειχθεί σε ποικίλες μελέτες. Για παράδειγμα, σε κύτταρα EAhy926 που είχαν προεκτεθεί σε TNF-α, η τεστοστερόνη σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις προήγαγε τη διαδικασία της απόπτωσης όπως αυτό εκφράσθηκε από την ελάττωση της BCL-2 και την αύξηση της κασπάσης-1 [346]. Επιπλέον, σε υπερφυσιολογικές συγκεντρώσεις η τεστοστερόνη μείωσε την έκφραση του γονιδίου της SOD σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, καταδεικνύοντας την προ-οξειδωτική ικανότητα της τεστοστερόνης σε συγκεντρώσεις υπέρ του φυσιολογικού [343].

Στον αντίποδα, έχει βρεθεί ότι η παρουσία της DHT σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, προκάλεσε μείωση του οξειδωτικού φορτίου που έχει επαχθεί από λιποπολυσακχαρίτη ή TNF-α [347].

Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμη γνωστός ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η τεστοστερόνη επιδρά στο ενδοθήλιο, αφού μέσα από την επενέργεια της αρωματάσης μετατρέπεται σε οιστραδιόλη στους περιφερικούς ιστούς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.6.7.3 CRH και οξειδωτικό στρες

Μελέτες έχουν δείξει ότι το νευρικό -ενδοκρινικό σύστημα επηρεάζεται από το οξειδωτικό στρες. Έρευνα σε γηραιά ποντίκια, έδειξε ότι έπειτα από την πρόκληση υπεροξίας στον εγκέφαλο τους, αυξήθηκε το οξειδωτικό στρες καταστρέφοντας τον ιππόκαμπο αυτών των ποντικών. Η απόπτωση των κυττάρων ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες οδήγησε σε απώλεια των υποδοχέων των κορτικοστεροειδών (GR) στον ιππόκαμπο. Η μειωμένη αναστολή της αρνητικής ανατροφοδότησης των γλυκοκορτικοειδών επί του YYE άξονα έχει συσχετισθεί με την απώλεια των GR υποδοχέων στον ιππόκαμπο αρουραίων [348].

Έχει διαπιστωθεί ότι η δραστηριότητα του YYE άξονα τείνει να αυξάνεται με την ηλικία σε αρουραίους, καταλήγοντας σε αυξημένα επίπεδα της ACTH και της κορτικοστερόνης στο πλάσμα [349]. Η προκαλούμενη από το οξειδωτικό στρες αύξηση στη δραστηριότητα του άξονα YYE κατά τη γήρανση επάγει την υπερέκκριση της CRH, ACTH και κορτικοστερόνης. Επίσης, μελέτη σε ασθενείς με Alzheimer έδειξε ότι εξαιτίας αυξημένου οξειδωτικού φορτίου παρουσιάζεται υπερέκκριση της CRH και της κορτικοστερόνης στο πλάσμα [350].

Οι μελέτες των Zhu et al. [350] και Kobayashi et al. [351], καταδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται κατά τη διάρκεια της γήρανσης προάγει την υπερέκκριση της CRH και της κορτικοστερόνης μέσω της αυξημένης δραστηριότητας του άξονα YYE που προκαλείται από την οξειδωτική καταστροφή του ιππόκαμπου στον εγκέφαλο αρουραίων.

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν στοιχεία πέραν προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας [28], που αναφέρουν δεδομένα για την οξειδωτική ή προ-οξειδωτική δράση της CRH στους ενδοκυττάριους μηχανισμούς του ενδοθηλίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Α.7 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ-ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η αθηρωμάτωση αποτελεί συνέπεια δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αρτηριών στο πλαίσιο χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής. Στο ενδοθήλιο εκφράζεται η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) και οι υποδοχείς της, CRHR1 και CRHR2, μέσω των οποίων ρυθμίζει την τοπική φλεγμονώδη απόκριση [45, 352]. Συνωδό στοιχείο της φλεγμονής συνιστά η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου, που λειτουργεί άλλοτε ως ευοδωτικός και άλλοτε ως βλαπτικός παράγοντας. Η ενδοθηλιακή διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [157], γεγονός που υποσημαίνει την ανάγκη κατανόησης των επιμέρους μηχανισμών. Η CRH συμμετέχει τοπικά στην ενδοθηλιακή φλεγμονώδη απόκριση, όπως διαπιστώθηκε σε προηγούμενη μελέτη του Τμήματος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οποίας η CRH ρυθμίζει τους προ-οξειδωτικούς μηχανισμούς του ενδοθηλίου και επάγει την προσαρμογή του στο τοπικό στρες [28].

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τα οιστρογόνα στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σχετίζονται με μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων [180], στοιχείο που υποδηλώνει πιθανή προστατευτική δράση τους στο αγγειακό ενδοθήλιο. Έχει δειχθεί ότι τα οιστρογόνα προάγουν την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και τη διατήρηση της ενδοθηλιακής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας [353]. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους η οιστραδιόλη (Ε2) εμπλέκεται στη διατήρηση ενός αντι-αθηρογόνου περιβάλλοντος, παραμένουν άγνωστοι. Με βάση παρατηρήσεις in vitro μελετών σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ότι η οιστραδιόλη αυξάνει την έκφραση της eNOS και της βιοδιαθεσιμότητας του NO [337], ελαττώνει την Ang-II-επαγώμενη έκφραση της NADPH οξειδάσης και του υπεροξειδίου του αζώτου, αναστέλλει την TNF-α-προκαλούμενη απόπτωση και γενικά ασκεί αντιοξειδωτική και σταθεροποιητική δράση στην κυτταρική μεμβράνη [335], υποθέσαμε ότι πιθανώς συμμετέχει και επηρεάζει την προ-οξειδωτική δράση της CRH στα μακροενδοθηλιακά κύτταρα.

Ο ρόλος των ανδρογόνων στην αυξημένη επίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών σε άνδρες παραμένει αμφιλεγόμενος. Η επικρατούσα αντίληψη για την «αθηρογόνο» επίδραση των ανδρογόνων, που στηρίχθηκε κυρίως σε επιδημιολογικές παρατηρήσεις, αμφισβητείται από πρόσφατες κλινικές μελέτες οι οποίες δείχνουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

δυσμενή επίδραση στις αρτηρίες της ελαττωμένης ή της υπερφυσιολογικής τεστοστερόνης όχι όμως των φυσιολογικών συγκεντρώσεων [191, 282, 286-288]. Μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση της επίπτωσης της τεστοστερόνης στο οξειδωτικό στρες υπάρχουν λίγες [218, 284, 341]. Η περιορισμένη βιβλιογραφία οδήγησε στην απόφαση να μελετηθεί η in vitro επίδραση των ανδρογόνων στο κυτταρικό οξειδωτικό φορτίο σε βασικές συνθήκες και στην προ-οξειδωτική δράση της CRH στα μακροενδοθηλιακά κύτταρα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την αλληλεπίδραση στεροειδών ορμονών των γονάδων και CRH στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του ενδοθηλίου. Η διερεύνηση της επίδρασης των στεροειδών των γονάδων (17β-οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και διυδροτεστοστερόνης), σε βασικές συνθήκες στο κυτταρικό οξειδωτικό φορτίο και η επίδραση ανδρογόνων και οιστραδιόλης στην προ-οξειδωτική δράση της CRH σε μακροενδοθηλιακά κύτταρα ήταν οι στόχοι της παρούσας μελέτης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Για την υλοποίηση των στόχων της μελέτης διαμορφώθηκε πρωτόκολλο ενεργειών που στόχευε στην ιεραρχική απάντηση επιμέρους ερωτημάτων. Το πρώτο βήμα αφορούσε στην απόδειξη ότι τα γονίδια των υποδοχέων των οιστρογόνων και ανδρογόνων εκφράζονται στα μακροενδοθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς EAhy926.

Ακολούθως, εκτιμήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων εκάστης των ορμονών στην ενεργότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Η eNOS επιλέχθηκε γιατί υπήρχε ήδη εμπειρία από τη χρήση της CRH στη δραστικότητα της. Ως κεντρική τιμή κατανομής των συγκεντρώσεων ελήφθη η συγκέντρωση του ελεύθερου κλάσματος εκάστης των ορμονών, στο αίμα ενηλίκων γυναικών για την 17β- οιστραδιόλη, και ανδρών για τα ανδρογόνα.

Μετά την επιλογή της συγκέντρωσης των ορμονών που θα χρησιμοποιούνταν στα πειράματα, αναζητήθηκε ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στις ορμόνες και τη CRH. Προκρίθηκε ο χρόνος των δύο ωρών (2h), ο οποίος διασφαλίζει την ταχεία αντίδραση του ενδοθηλίου και ταυτόχρονα περιορίζει τη γενωμική δράση των ορμονών. Για τον αποκλεισμό των υποδοχέων της οιστραδιόλης και των δύο ανδρογόνων επιλέχθηκαν παράγοντες σε συγκεντρώσεις που προκαλούσαν πλήρη αναστολή, με βάση τη βιβλιογραφία.

Μετά την ολοκλήρωση των ως άνω προϋποθέσεων, μελετήθηκε στα μακροενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EAhy926 η επίδραση της οιστραδιόλης και των ανδρογόνων (τεστοστερόνη, DHT) στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS), στη δραστικότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) και τη συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), καθώς και στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), της καταλάσης (CAT), της γλουταθειόνης (GSH) και του κύκλου αναγωγής της (λόγος GSH/GSH+GSSG).

Ακολούθησαν πειράματα κατά τα οποία εκτιμήθηκε η επίδραση της οιστραδιόλης και των ανδρογόνων στην προ-οξειδωτική μεταβολή των προαναφερθεισών παραμέτρων που προκαλούσε η CRH.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία καθώς και οι πηγές προμήθειάς τους αναγράφονται στον πίνακα 1:

Πίνακας 1: Προμήθεια υλικών.

ΠΕΠΤΙΔΙΑ – ΔΙΑΛΥΤΑ ΜΟΡΙΑ- ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
17β-οιστραδιόλη	Sigma-Aldrich (50-28-2)
Τεστοστερόνη	Sigma-Aldrich (58-22-0)
Φλουταμίδη (εκλεκτικός αναστολέας AR)	Sigma-Aldrich (13311-84-7)
DHT	Sigma-Aldrich (521-18-6)
CRH	Sigma-Aldrich (86784-80-7)
Φουλβεστράνη (εκλεκτικός αναστολέας ERs)	Sigma-Aldrich (I4409)
ERα primers	Invitrogen (E0454G04/05)
ERβ primers	Invitrogen (E0454G06/07)
AR primers	Invitrogen (S6447E11/12)

Τα αναλώσιμα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EAhy926 αναγράφονται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2: Υλικά-Συσκευές Καλλιεργειών.

ΥΛΙΚΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	GIBCO (11-965-092)
DMEM (Phenol red free): Dulbecco's Modified Eagle's Medium Phenol red free (GIBCO)	GIBCO (31-053-028)
Ορός εμβρύου βοός: FBS (Foetal Bovine Serum)	GIBCO (F2442)
Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη (Antiobiotic)	GIBCO (15240062)
Αλβουμίνη ορού βοός: Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (9048-46-8)
Μικροσκόπιο ορατού φωτός	Zeiss, Axiovert 40C
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή	Neubauer
Επωαστικός κλίβανος	Bioair, Safeflow 1.2
Cell Freezing medium – DMSO	Sigma-Aldrich
Χρωστική Trypan Blue	Sigma-Aldrich

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά EAhy926, η οποία προέκυψε από τη σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου και ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα της σειράς A549. Αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες σειρές μακροενδοθηλιακών κυττάρων. Η χρήση της στη μελέτη της αγγειογένεσης, του καρκίνου, του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της απόκρισης του ενδοθηλίου σε αθηρωματικό περιβάλλον, αποτελεί τον κύριο λόγο που χρησιμοποιήσαμε αυτή την κυτταρική σειρά στη μελέτη μας [354, 355].

Β.1.2 Κατάψυξη κυτταρικής σειράς EAhy926

Η φύλαξη των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι απαραίτητη για μακροπρόθεσμη διατήρηση της λειτουργίας τους. Αυτό επιτεύχθηκε με την αποθήκευσή τους στους -80°C σε απενεργοποιημένο ορό βοός (FBS) παρουσία διαλύματος 10% διμεθυλοσουλφοξιδίου (DMSO). Το DMSO αποτελεί κρυοπροστατευτικό παράγοντα, ο οποίος μειώνει το σημείο πήξεως του θρεπτικού υλικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή πήξη του και άρα την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων που είναι βλαβεροί για τα κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρούνται σε 1000 στροφές (rpm) επί 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε απενεργοποιημένο FBS και 10% DMSO.

Η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος ρυθμιζόταν στα 5x10^{6} κύτταρα/mL. Από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφερόταν 1 mL σε ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια των 2 mL και στη συνέχεια προστίθετο στάγδην υπό συνεχή ανάδευση το κατάλληλο για ψύξη υλικό (Cell Freezing Medium). Η κατάψυξη γινόταν σταδιακά στους 4°C για μία ώρα και στη συνέχεια στους -20°C. Έπειτα από ακόμη μία ώρα μεταφέροταν στους -80°C ή σε υγρό άζωτο -180° C.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.1.3 Καλλιέργεια Κυτταρικής σειράς EAhy926

Η κυτταρική σειρά EAhy926 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) το οποίο περιείχε 10% FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικού (Penicillin/Streptomycin) και επωάστηκε σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO_2 / 95% αέρα και ποσοστό υγρασίας 100%. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Η αλλαγή των θρεπτικών υλικών στις καλλιέργειες γινόταν κάθε 48 ώρες. Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πληρότητα (confluent) 100% χρησιμοποιούνταν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Η αποκόλληση των κυττάρων από τις καλλιεργητικές φλάσκες επιτελούταν με τρυψίνη. Για τον υπολογισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων που θα χρησιμοποιούνταν για επίστρωση σε κάθε πείραμα, χρησιμοποιούταν ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα, το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue, που έχει την ιδιότητα να χρωματίζει μόνο τα νεκρά κύτταρα. Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού των καλλιεργειών υπολογιζόταν με τον τύπο:

βιωσιμότητα (%): ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων/ολικός αριθμός κυττάρων Χ 100

Κατάλληλες συγκεντρώσεις μέρους ή όλου του κυτταρικού περιεχομένου των φλασκών μεταφερόταν σε καινούργιες, για ανακαλλιέργεια ή προστίθοταν στα κατάλληλα για την εκτέλεση των πειραμάτων υποστρώματα, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό DMEM απουσία κόκκινης φαινόλης (Phenol red free).

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4, από 4 διαφορετικές αρχικές καλλιέργειες) επωάζονταν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό άνευ ορού. Έχοντας ως απώτερο σκοπό να εκτιμήσουμε τη βραχυπρόθεσμη δράση της Ε2, τεστοστερόνης και DHT, στην προ-οξειδωτική δράση της CRH, έγινε επιλογή του χρονικού διαστήματος των 2 ωρών για την επώαση των κυττάρων EAhy926 με τις ορμόνες. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάζονταν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M), οιστραδιόλη (0,5 pg/mL) απουσία / παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (φουλβεστράνη) (5pg/mL), ή τεστοστερόνη (0,5 nM) απουσία / παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του ανδρογονικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

υποδοχέα AR (φλουταμίδη 50nM), ή DHT (0,5nM) απουσία / παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του ανδρογονικού υποδοχέα AR (φλουταμίδη 50nM).

Ο εκλεκτικός αναστολέας των υποδοχέων οιστρογόνων α και β, φουλβεστράνη (ICI 182.724), δεν παρουσιάζει αγωνιστική οιστρογονική δράση με αποτέλεσμα να μην έχει επίδραση στα αποτελέσματα των πειραμάτων [356]. Η τεστοστερόνη, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, έχει την ιδιότητα να μετατρέπεται σε οιστραδιόλη στην κυκλοφορία μέσω του ενζύμου P450 αρωματάσης. Η DHT, αποτελεί ισχυρό ανδρογόνο που δεν υπόκειται σε μεταβολισμό προς οιστραδιόλη, παρά δεσμεύεται με μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης στον υποδοχέα AR και ασκεί τη δράση της. Για τη μελέτη της δράσης της τεστοστερόνης και της DHT στην προ-οξειδωτική δράση της CRH, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ο εκλεκτικός αναστολέας του υποδοχέα των ανδρογόνων, φλουταμίδη, ο οποίος δεν παρουσιάζει στεροειδική αγωνιστική δράση [357, 358].

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούταν φύλαξη των κυττάρων σε συνθήκες ψύξης -80° C ή/και υγρού αζώτου -180° C. Αυτό γινόταν ώστε τα κύτταρα να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και να βρίσκονται στην ίδια φάση της λογαριθμικής τους ανάπτυξης και στον ίδιο αριθμό γενιάς κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Η διαδικασία της ψύξης πραγματοποιούταν με τον τρόπο που αναφέρεται στην ενότητα Β.1.2.

Β.1.4 Απόψυξη κυτταρικής σειράς EAhy926

Η απόψυξη των κυττάρων από τους -80°C για την επαναχρησιμοποίηση τους, αποτελεί επίπονη διαδικασία που προκαλεί το θάνατό τους. Έτσι, η ταχεία θέρμανση και η απομάκρυνση του αντιδραστηρίου DMSO αποτελούν σημαντικές διαδικασίες για να διατηρείται υψηλή η επιβίωση των κυττάρων. Το κρυοάντοχο σωληνάριο, στο οποίο είχαν ψυχθεί τα κύτταρα, αποσυρόταν από τους -80°C και τοποθετούταν τάχιστα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Μόλις το περιεχόμενο υφίστατο υγροποίηση, αραιωνόταν περίπου είκοσι φορές με προθερμασμένο θρεπτικό υλικό στους 37°C σε φιάλες καλλιέργειας και τοποθετούταν στους 37°C, παρουσία 5% CO_2. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1900 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και στη συνέχεια γινόταν ανακαλλιέργεια όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην ενότητα Β.1.3.

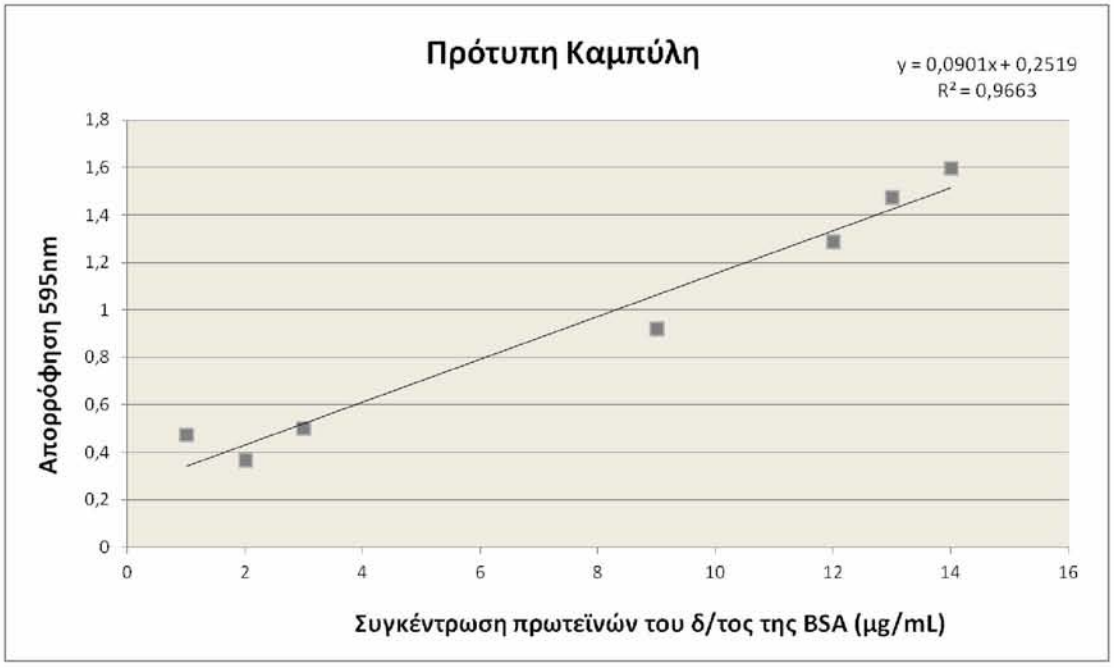
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των πρωτεϊνών, αλλάζοντας το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Καθώς δεσμεύεται στην πρωτεΐνη, οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της Coomassie Brilliant blue με την πρωτεΐνη μετατρέπουν τη χρωστική σε μια σταθερή ιονική μορφή που έχει χρώμα κυανό και απορροφά σε μήκος κύματος 595nm. Ο συντελεστής απορροφήσεως του συμπλόκου της χρωστικής με την πρωτεΐνη είναι σταθερός σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων συντελώντας στη μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου. Το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-χρωστικής δημιουργείται τάχιστα (2 λεπτά) και η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί εντός 60 λεπτών.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών κάθε δείγματος κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη συσχέτισης γνωστών συγκεντρώσεων βόειας αλβουμίνης (BSA: Bovine Serum Albumin, Bio-Rad protein assay). Συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις 1μg-20μg της BSA διαλύθηκαν σε 800μL ddH2O. Έπειτα στα δείγματα προστίθονταν 200μL της χρωστικής και ακολουθούσε επώαση του διαλύματος για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα υποβαλλόταν σε ήπια ανάδευση και στη συνέχεια μεταφερόταν σε πλαστική κυψελίδα όπου φωτομετρούταν στα 595nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης κατασκευαζόταν η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 25).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 25: Πρότυπη καμπύλη BSA με τη μέθοδο Bradford.

Η πειραματική διαδικασία για την παρασκευή των διαλυμάτων με τις πρωτεΐνες αγνώστου συγκέντρωσης είχε ως εξής: Σε πλαστική κυψελίδα 1,5ml που περιείχε 990μL του διαλύματος Coomassie Brilliant blue προστίθονταν 10μl αγνώστου δείγματος (κυτταρικού λύματος). Το διάλυμα αφηνόταν υπό ανάδευση για 5min και μετριόταν η οπτική πυκνότητα (O.D.) στο φωτόμετρο, σε μήκος κύματος 595nm. Με βάσει την πρότυπη καμπύλη της BSA υπολογιζόταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα. Η συγκέντρωση εκφράζεται σε μονάδες μg/mL. Για κάθε δείγμα η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν εις τριπλούν.

Η συλλογή των δειγμάτων με τα κυτταρικά λύματα προς προσδιορισμό της συγκέντρωσης είχε γίνει σε υπότονο διάλυμα Tris-HCl pH 7,5 παρουσία αναστολέα πρωτεασών PMSF.

Τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο Bradford αναγράφονται στον πίνακα 3.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Πίνακας 3: Υλικά-Συσκευές μεθόδου Bradford.

ΥΛΙΚΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250	Bio-Rad Protein Assay (5000006) (Bio-Rad Life Technologies)
Κυψελίδες 1,5ml	Brand
Αλβουμίνη ορού βοός: Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (9048-46-8)
Φωτόμετρο ορατού -UV	Perkin-Elmer, UV-VIS Lambda 20 Spectrometer

Β.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ (SOD)

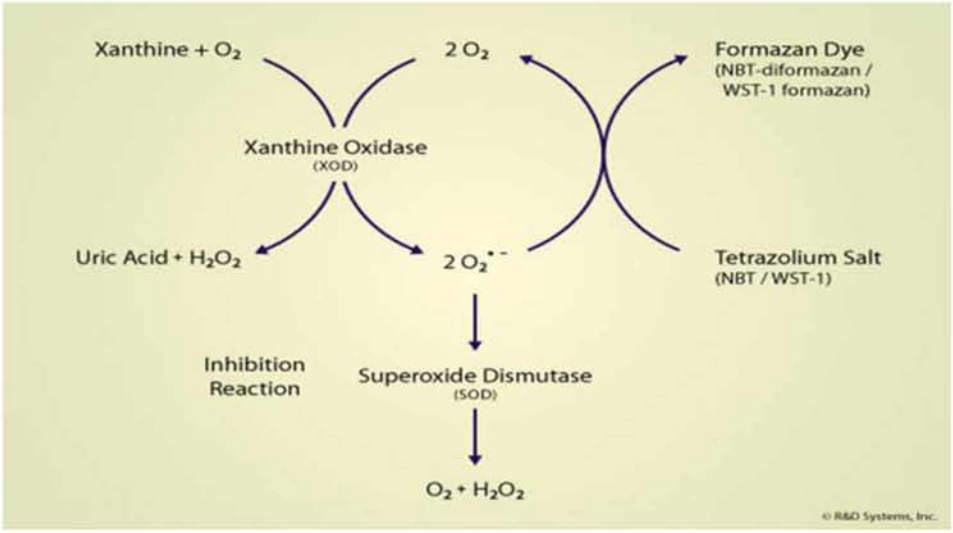
Η δισμουτάση του υπεροξειδίου καταλύει την αντίδραση $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$, και ως εκ τούτου παρέχει σημαντική προστασία ενάντια στην τοξικότητα της ρίζας του υπεροξειδίου.

Η βασική αρχή της μεθόδου για τον προσδιορισμό της SOD στα κύτταρα EAhy926 βασίζεται στο πρωτόκολλο του Trevigen's SOD assay kit (cat.No: 7500-100-K, ΑΝΤΙΣΕΛ). Τα ανιόντα του υπεροξειδίου που παράγονται από τη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ και H_2O_2, μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD), μετατρέπουν το NBT (Nitro Blue Tetrazolium) σε NBT-diformazan, το οποίο απορροφά φως στην περιοχή των 550nm. Η SOD μειώνει τη συγκέντρωση των ανιόντων υπεροξειδίου, με συνέπεια να ελαττώνεται ο ρυθμός παραγωγής του NBT-diformazan (Εικόνα 26). Ο βαθμός μείωσης της εμφάνισης του NBT-diformazan, αποτελεί μέτρο της δραστικότητας της SOD στο πειραματικό δείγμα.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της SOD στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: 20μL κυτταρικού λύματος προστίθονταν σε ένα μίγμα (master mix), το οποίο περιείχε 60μL διαλύματος αντίδρασης 25x (Reaction Buffer), 7,5μL ξανθίνη, 30μL NBT και 10μL οξειδάση της ξανθίνης. Το ένζυμο XOD προστίθοταν τελευταία στιγμή στο διάλυμα, λίγο πριν τη φωτομέτρηση. Η φωτομέτρηση του διαλύματος γινόταν σε πλαστική κυψελίδα σε μήκος κύματος 550nm για 5min.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η δραστικότητα της SOD προσδιοριζόταν από την ποσοστιαία αναστολή του ρυθμού (ΔO.D/min) σχηματισμού του NBT-diformazan. Ως τυφλό δείγμα (blank) χρησιμοποιήθηκαν 20 μL ddH_2O.



Εικόνα 26: Κύκλος ενζυμικής δραστικότητας της SOD.

Β.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

Η δραστικότητα της καταλάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα της μελέτης μας υπολογίστηκε με βάση τη μέθοδο του Aebi 1984 [359]. Το ένζυμο καταλύει την αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και νερό:

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της καταλάσης στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: 20 μL κυτταρικού λύματος προστίθονταν σε 2,975 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου συγκέντρωσης 67mM και pH 7,4. Το διάλυμα επωαζόταν για 10 min στους 37^0C ώστε το ένζυμο να φτάσει στη μέγιστη δραστικότητα. Εν συνεχεία 5μL από διάλυμα 30% H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 15mM) προστίθονταν στο παραπάνω διάλυμα και το τελικό δείγμα φωτομετρούταν στα 240nm για 3min σε κυψελίδα χαλαζία, για τη μέτρηση υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο χρονικό διάστημα των 3min υπολογιζόταν ο ρυθμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και καταγραφόταν η τιμή που λαμβανόταν από τη φωτομέτρηση. Ως τυφλό δείγμα (blank), χρησιμοποιούταν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ρυθμιστικό διάλυμα. Για κάθε δείγμα η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν εις τριπλούν.

Για τον υπολογισμό της δραστικότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$\textbf{Δραστικότητα} = \frac{\Delta O.D \times 3 \times 10^6}{62{,}4 \times 20} \quad \textbf{μmoles/min/mL}$$

Β.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ GSH

Για τον προσδιορισμό της GSH εφαρμόσθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από τους Reddy et al. [360]. Η GPx απομακρύνει το H_2O_2 προς σχηματισμό H_2O οξειδώνοντας την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης:

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

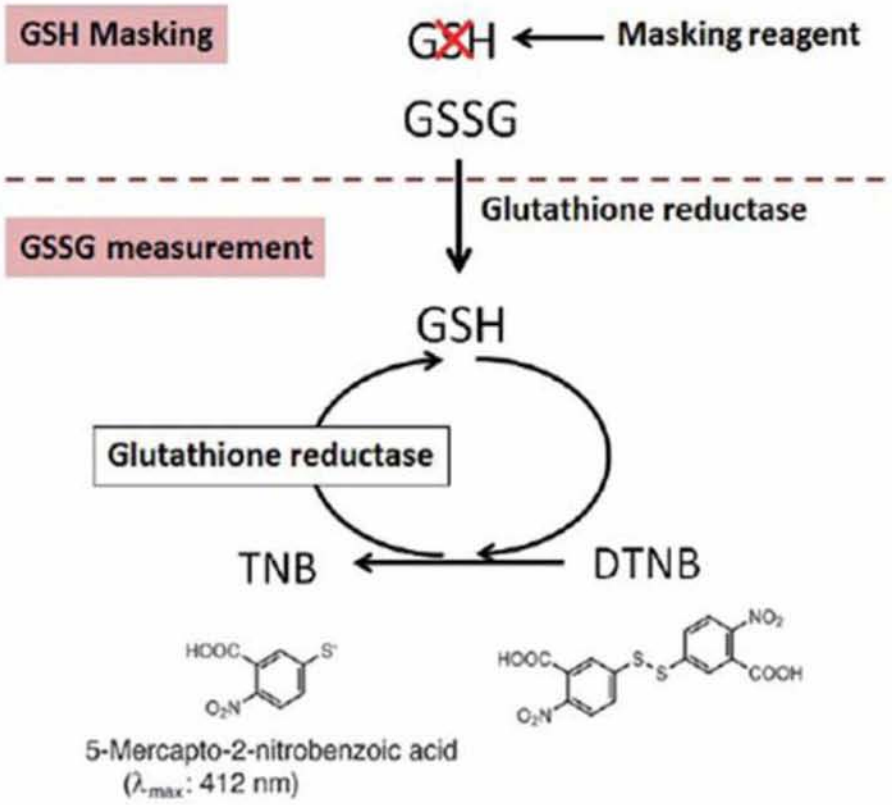
Στη συνέχεια, η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης, η GSSG, μετατρέπεται στην ανηγμένη της μορφή με αναγωγή του NADPH. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αναγωγάση της GSH (GR):

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της GSH στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: 10 μL κυτταρικού λύματος προστίθονταν σε 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου και καλίου συγκέντρωσης 67mM και pH 7,95. Στο ίδιο διάλυμα προστίθονταν και 330μL διαλύματος DTNB (39,6 mg DTNB σε 100ml 1% κιτρικού νατρίου). Το διάλυμα υφίστατο ανάδευση και στη συνέχεια επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 30 min. Η απορρόφηση μετριόταν στα 412 nm. Ως blank (δείγμα ελέγχου) χρησιμοποιήθηκαν 10 μL dH_2O. Για κάθε δείγμα η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν εις τριπλούν**.**

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων βασίζεται στην αρχή που περιέγραψαν οι Kiran & Devi [361], σύμφωνα με την οποία η σύνδεση των ελεύθερων σουλφυδρυλικών ομάδων της GSH με τον παράγοντα DTNB σχηματίζει έγχρωμο προϊόν (TNB) (Εικόνα 27) με συντελεστή απορρόφησης 13,6 mM^{-1} cm^{-1}.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 27: Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού της GSSG/GSH μέσω της αντίδρασης παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.

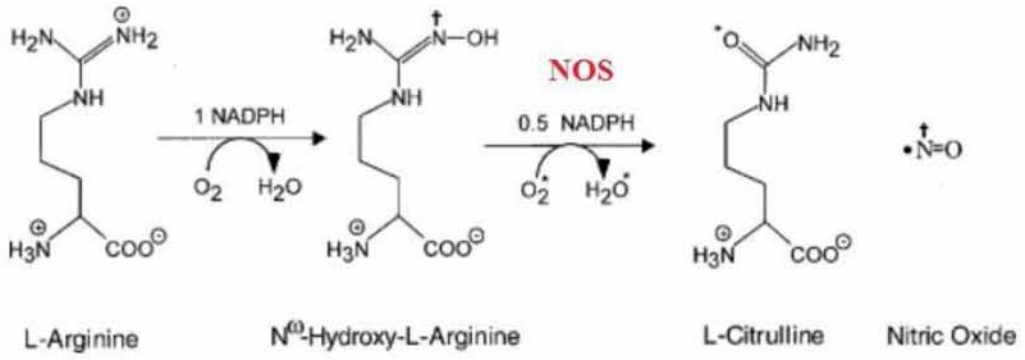
Β.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ GSSG ΚΑΙ GSH

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης GSH και GSSG στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: 10μL κυτταρικού λύματος προστίθονταν σε 660μL ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 67mM και pH 7,95 που περιείχε 1mM NADH και 1U του ενζύμου ρεδουκτάση της γλουταθειόνης. Το διάλυμα επωαζόταν στους 37° C για 1 ώρα. Σε αυτό το διάστημα η GSSG, μετατρεπόταν σε GSH. Η αρχή του πειραματικού πρωτοκόλλου βασίζεται στους Shaik & Mehvar [362]. Η μέθοδος έπειτα συνεχιζόταν όπως περιγράφηκε στην ενότητα Β.5 για τον προσδιορισμό της GSH.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (eNOS)

Η βασική αρχή της μεθόδου για τον προσδιορισμό της eNOS βασίζεται στο πρωτόκολλο που περιέγραψαν οι Knowles et al. [363], Stuehr et al. [364] και Pollock et al. [365]. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου η καταλυτική δραστικότητα της eNOS παράγει κιτρουλίνη (L-citrulline) και NO, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την αργινίνη (L-arginine monohydrochlorid, cat. No NET 1123001M ΑΝΤΙΣΕΛ), η οποία υφίσταται οξείδωση 5 ηλεκτρονίων στη γουανιδινο-νιτρική ομάδα της (Εικόνα 28). Για να επάγει την καταλυτική δραστικότητα της η eNOS χρειάζεται την παρουσία συγκεκριμένων συμπαραγόντων στην αντίδραση όπως, NADPH, O_2, Ca^{2+}, καλμοδουλίνη και τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4).



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της καταλυτικής δραστικότητας της eNOS [366].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας της eNOS στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: 25μg κυτταρικού λύματος προστίθονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH 7,4 που περιείχε 6μM BH_4, 2 μM FAD, 2 μM FAM, 1mM NADH, 0,6 mM $CaCl_2$, 1μCi/mL ραδιενεργά σημασμένης αργινίνης (L-[^{3}H] arginine) και 0,1μM καλμοδουλίνης. Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονταν στους 37^{0}C απουσία φωτός για 1 ώρα, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση σχηματισμού κιτρουλίνης (L-[^{3}H] citrulline) από αργινίνη (L-[^{3}H] arginine). Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστίθοταν σε κάθε δείγμα 1mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES-EDTA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

pH 5,5. 1mL από κάθε δείγμα στη συνέχεια μεταφερόταν σε ειδικά φυαλίδια πολυστυρενίου και προστίθονταν 2mL ειδικού υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid). Στα δείγματα αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν δεν γινόταν προσθήκη NADPH και Ca^{2+}.

Η ανίχνευση της ενζυμικής δραστικότητας της eNOS ουσιαστικά προσδιορίζεται από τη μέτρηση της κατανάλωσης του υποστρώματος της, L-[^{3}H] arginine, σε μετρητή σπινθηρισμού β-ακτινοβολίας (Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter) (Εργαστήριο Βιοχημείας, Π.Θ). Για την πιστοποίηση της εγκυρότητας της μεθόδου και της ευαισθησίας της κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις της eNOS που κυμαίνονταν από 2-20μM.

Αρχικά, στα πειράματα μας προσδιορίστηκε η δοσοεξαρτώμενη επίδραση της οιστραδιόλης και της τεστοστερόνης στη δραστικότητα της eNOS, το ένζυμο που αποτελεί δείκτη της ομαλής ενδοθηλιακής λειτουργίας, ώστε να επιλεχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση η οποία συμβάλλει στη μέγιστη δραστικότητα της eNOS.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της Ε2 στο ανθρώπινο πλάσμα κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 20pg/mL [367], προσπαθήσαμε να μιμηθούμε το φυσιολογικό πρότυπο και γι αυτό επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 2, 5 και 10pg/mL, ώστε να μελετηθεί η δοσο-εξαρτώμενη βραχυχρόνια (2 ώρες) δράση της Ε2. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την τεστοστερόνη. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της τεστοστερόνης κυμαίνονται από 0,1nM-1000nM [368] και γι αυτό επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι συγκεντρώσεις 0,1, 0,5, 1 και 5nM.

Έπειτα από παραμονή των EAhy926 ενδοθηλιακών κυττάρων (passage 4) σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία ορού βοός, για 24 ώρες, τα κύτταρα επωάσθηκαν με Ε2 σε συγκεντρώσεις 0,5, 2, 5 και 10pg/mL για 2 ώρες. Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε και για την τεστοστερόνη σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,5, 1 και 5nM. Τα κυτταρικά λύματα στη συνέχεια συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η δραστικότητα της eNOS.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ NO

Η παρουσία του NO μετράται έμμεσα στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό των EAhy926 βασιζόμενη στην αρχή της ενζυμικής μετατροπής των νιτρικών (NO^{3-}) ιόντων σε νιτρώδη (NO^{2-}) μέσω του ενζύμου της νιτρικής αναγωγάσης (ρεδουκτάσης) (NR: nitrite reductase NAD[P]H from Aspergillus niger 2UN, Cat. No N-7265, ΑΝΤΙΣΕΛ). Στη συνέχεια οι ρίζες NO^{2-} που έχουν παραχθεί μετατρέπονται σε ένα αζίδιο που αποτελεί έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης Griess και απορροφά σε μήκος κύματος 540nm.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση της έκλυσης του NO στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων EAhy926 έχει ως εξής: 80μL υπερκείμενου καλλιεργητικού υλικού προστίθονταν σε Elisa plates πολυστυρενίου των 96 πηγαδιών μαζί με 0,1U/mL ενζύμου νιτρικής ρεδουκτάσης και 0,1mM β-NADH. Εν συνεχεία προστίθονταν 100μL σε κάθε πηγαδάκι από το αντιδραστήριο Griess (Sigma-Aldrich) για να πραγματοποιηθεί το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, στο οποίο παράγεται το έγχρωμο προϊόν. Η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν σε Elisa Reader σε μήκος κύματος 540nm. Έπειτα κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων του διαλύματος νιτρικού νατρίου (NaNO3) για τον προσδιορισμό των επιπέδων του NO. Οι συγκεντρώσεις του NaNO3 κυμαίνονταν από 200μM έως 0,2μM. Για κάθε δείγμα η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν εις τριπλούν.

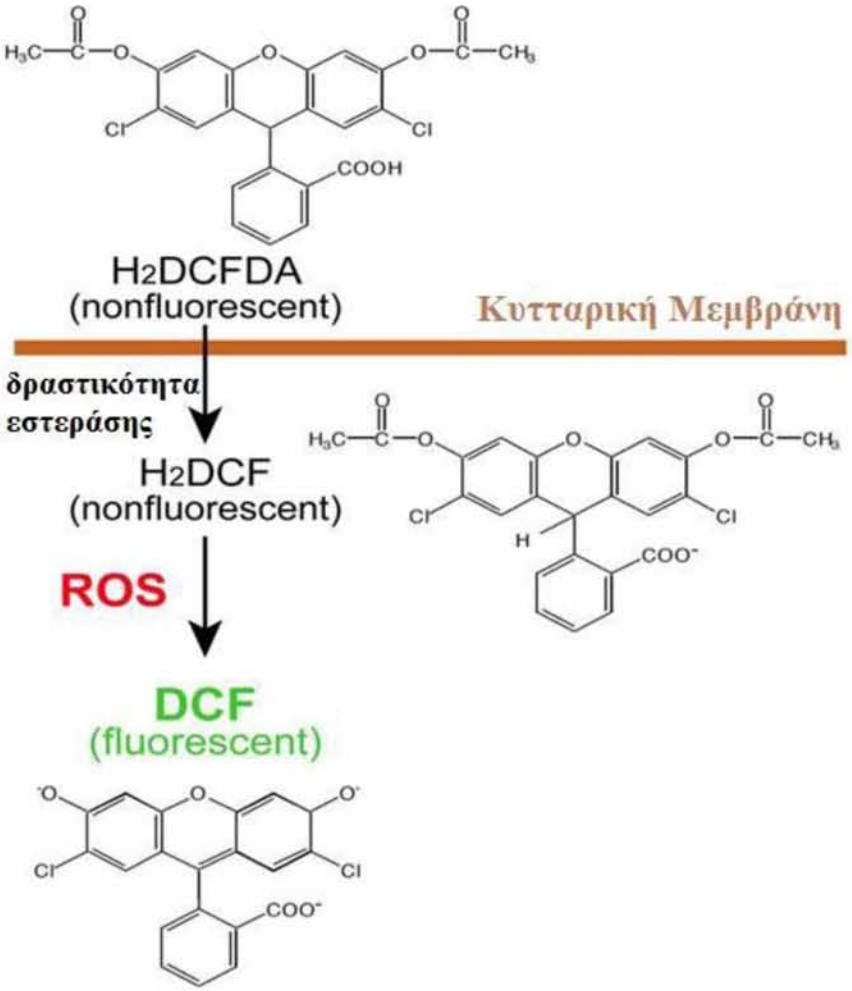
Β.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών ROS βασίζεται στη χρήση ενός φθορίζοντος ανιχνευτή (**H_2**DCFDA-AM, 2'-7' dichlorodihydrofluorescein diacetate), ο οποίος στην ακετυλιωμένη του μορφή δύναται να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχεται στο κύτταρο. Εκεί, οι κυτταροπλασματικές εστεράσες ενεργούν μετατρέποντας τον εστέρα σε ένα μη φθορίζον ιονικής φύσεως μόριο, το H_2DCF, το οποίο εγκλωβίζεται στο κύτταρο. Τα ROS που υπάρχουν στο κύτταρο μπορούν να οξειδώσουν το μη φθορίζον μόριο σε ένα ισχυρά φθορίζον μόριο, το 2'-7' dichlorodihydrofluorescein (DCF) (Εικόνα 29).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων των ROS ουσιαστικά προσδιορίζεται από τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS στα κύτταρα EAhy926 έχει ως εξής: Τα κύτταρα EAhy926 επωάζονταν με 10μM H_2DCF-DA στους 37° C για τριάντα λεπτά. Εν συνεχεία τα κύτταρα υφίσταντο αποκόλληση με τρυψίνη και επαναιώρηση σε PBS (10^6cells/mL). Από κάθε δείγμα μεταφερόταν 1mL σε κυψελίδα χαλαζία και μετριόταν ο φθορισμός στα 520nm με μήκος εκμπομπής στα 488nm, σε φθορισμόμετρο Versa Fluor TM Fluorometer (Biorad).



Εικόνα 29: Αρχή της μεθόδου μέτρησης των ενδοκυττάριων ROS. Παραγωγή έγχρωμου προϊόντος DCF από τη δράση των ενδοκυττάριων ROS [369].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Β.10 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Η εκχύλιση του ϊϊκού RNA έγινε με την μέθοδο της θεικονυανιούχου γουανιδίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [370]. Μετά το πέρας της καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε φτγοκέντρηση στις 1.500 στροφές/ λεπτό επί 10 min. Στην συνέχεια, ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1x και διαλύθηκαν σε 1 ml Trizol που αποτελούταν από μίγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Αφέθηκαν επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση (15sec), το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 15 min. Για τον διαχωρισμό των φάσεων ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές/λεπτό για 15 min. Με τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται το μίγμα σε 3 φάσεις: την οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες, τη μεσόφαση που περιλαμβάνει το DNA και την υδατική φάση (άχρωμη) που περιλαμβάνει το RNA. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο και προστέθηκαν 500μL ισοπροπανόλης για 5-10 min. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές/λεπτό για 10 min για την κατακρήμνιση του RNA. Μετά την απομάκρυνση της υπερκείμενης ισοπροπανόλης στο ίζημα προστέθηκε 1mL διαλύματος αιθανόλης 75% ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα πρωτεϊνών και DNA. Ακολούθησε ανάδευση και μία ακόμη φυγοκέντρηση και στη συνέχεια το ίζημα που είχε ανακτηθεί από την απομάκρυνση της αιθανόλης αφέθηκε να στεγνώσει και επαναδιαλύθηκε σε 50μL dH_2O. Ακολούθησε θέρμανσή του για 5 λεπτά στους 65° C. Τα δείγματα του RNA που ανακτήθηκαν αποθηκεύτηκαν στους $–80^oC$ μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν.

Η εκτίμηση της καθαρότητας του RNA και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο ορατού φωτός-UV (Perkin-Elmer, UV-VIS Lambda 20 Spectrometer), μετρώντας την οπτική απορρόφηση σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, στα οποία απορροφούν αντίστοιχα το RNA και το DNA. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων αποδίδει την καθαρότητα του RNA και η συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260nm, δεδομένου ότι το διάλυμα RNA συγκέντρωσης 40μg/ml έχει απορρόφηση 1 a.u (absorbance unit). Ένα παρασκεύασμα το οποίο δεν περιλαμβάνει πρωτεϊνικές προσμίξεις, έχει λόγο OD260/OD280 = 2. Η καθαρότητα του RNA θεωρείται πολύ υψηλή με ελάχιστες προσμίξεις DNA και πρωτεϊνών όταν ο λόγος κυμαίνεται από 1,7 έως 2.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της εκχύλισης RNA αναγράφονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Υλικά-Συσκευές μεθόδου εκχύλισης RNA.

ΥΛΙΚΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Trizol: Tri reagentTM	Sigma -Aldrich (MFCD00213058)
Χλωροφόρμιο	Sigma -Aldrich (67-66-3)
Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη	Merck (67-63-0)

Β.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Β.11.1 Συσκευές και Υλικά μεθόδου RT-PCR

Thermoscript RT kit (Invitrogen /Thermo Fisher Scientific) το οποίο περιλαμβάνει:

- Τυχαία εξαμερή: random hexamers
- Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H20)
- Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer
- Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM
- Διθειοθρεϊτόλη: DTT, 0.1 M
- Διάλυμα αναστολέων RNασών: RNase OUT, 40 U/μL
- Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT

Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen /Thermo Fisher Scientific) το οποίο περιλαμβάνει:

- Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA: 10X PCR buffer 25mM $MgCl_2$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

- Νερό κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H_20)

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

- dNTP mix

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης:

- Δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (100bp (Cat. No. 10488058) και 50bp (Cat. No. 10488043) DNA Ladder) (Invitrogen /Thermo Fisher Scientific)

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

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

- Αγαρόζη 2% (A9539 Sigma-Aldrich)

- Διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου (1.11608 Sigma-Aldrich)

- TAE διάλυμα: Tris 10 nM, EDTA 10 nM, οξικό Ca 5 nM, NaCl 10 nM

- Loading Dye (Cat. No. 10816015 Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)

Β.11.2 Μέθοδος - Αντίδραση RT

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι απαραίτητη, για τη μετατροπή του RNA των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το cDNA που παράγεται είναι απαραίτητο για το επόμενο στάδιο που θα ακολουθήσει, που είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας ετοιμάστηκε ένα αρχικό μίγμα αντίδρασης με τελικό όγκο 10μL στο οποίο προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια (βλ. Β.11.1): 1 μg ολικού RNA από κάθε δείγμα, 1μL εκκινητή (εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας) και DEPC-H_2O. Στη συνέχεια το διάλυμα επωάστηκε για 5min στους 65°C με σκοπό να καταστραφούν και να αποδιαταχθούν τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές του RNA που θα μπορούσαν να παρακωλύσουν το σχηματισμό του cDNA. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση του διαλύματος στον πάγο για 5min ώστε να σταθεροποιηθεί η αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA. Εν συνεχεία προετοιμάσθηκε το κύριο διάλυμα της

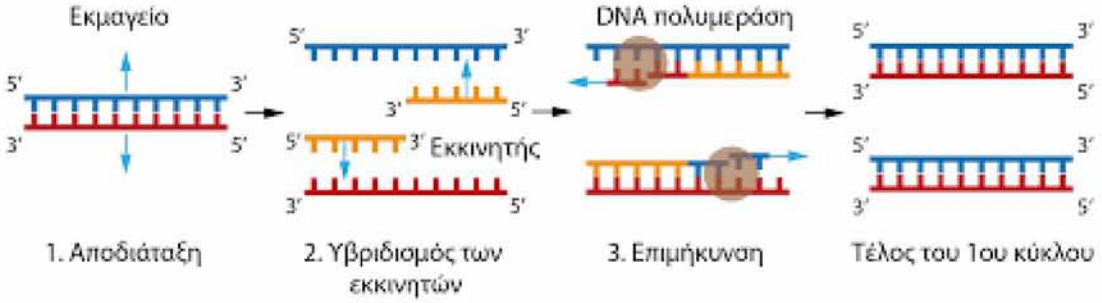
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

αντίδρασης. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνταν 4 μL cDNA buffer (5x), 1 μL DTT, 1 μL RNAse OUT, 1 μL DEPC-H_2O, 2μL dNTPs και 1μL ενζύμου Thermoscript. Το κύριο διάλυμα προστίθοταν στο αρχικό και το τελικό μίγμα τοποθετούταν σε συσκευή PCR για 60 min στους 50^oC. Σε αυτό το στάδιο γινόταν υβριδοποίηση του εκκινητή και δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το επόμενο στάδιο ήταν η αντίδραση τερματισμού με επώαση του δείγματος για 5min στους 85°C, ώστε να γίνει αποδιάταξη των υβριδίων και να σταματήσει η δράση της αντίστροφης μεταφραφάσης. Τα cDNA των δειγμάτων που παράχθηκαν παρέμειναν σε θερμοκρασία 4° C. Στη συνέχεια είτε χρησιμοποιήθηκαν αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάχθηκαν στους -20°C για μετέπειτα χρήση τους.

Β.11.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται, in vitro, για την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος cDNA σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό αντιγράφων με τη χρήση ειδικών εκκινητών μορίων (primers). Το πρώτο στάδιο της PCR περιλαμβάνει τη μετουσίωση του cDNA στην οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, σε υψηλές θερμοκρασίες. Εν συνεχεία δύο εκκινητές (primers) που αποτελούνται από συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια υβριδίζονται στα μονόκλωνα τμήματα DNA, τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση DNA. Έπειτα το ένζυμο DNA πολυμεράση επιμηκύνει την αλυσίδα του DNA προσθέτοντας συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3’ άκρο κάθε εκκινητή. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δύο καινούργιων αλυσίδων DNA που είναι συμπληρωματικές των κλώνων του προτύπου DNA (Εικόνα 30). Τα στάδια που προαναφέρθηκαν, η μετουσίωση, ο υβριδισμός των εκκινητών και η επιμήκυνση των εκκινητών από τη DNA πολυμεράση αποτελούν τον 1° κύκλο της αντίδρασης PCR. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Ο κύκλος της αντίδρασης επαναλαμβάνεται όταν το μίγμα της αντίδρασης θερμανθεί εκ νέου για να γίνει αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA και στη συνέχεια μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της νέας αλληλουχίας με τη δράση της DNA πολυμεράσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 30. Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η πειραματική διαδικασία της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl και η επώαση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PCR (θερμικός κυκλοποιητής). Αρχικά, έγινε προετοιμασία ενός μίγματος το οποίο αποτελούταν από: 2 μL 10X ρυθμιστικού διαλύματος (PCR Buffer), 0,4μL διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 0,8μL primers (0,4μL από τον sense και 0,4μL από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmoL/μL), 0,2μL ενζύμου Platinum Taq Polumerase (2,5u/t) και νερό (nuclease free) μέχρι τελικού όγκου 19μl. Τέλος, σε κάθε μικροσωληνάριο προστίθοταν 1μL cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος. Τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση RT-PCR αναγράφονται στην ενότητα Β.11.1.

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τους εκκινητές των ERα και ERβ σχεδιάστηκαν από το online πρόγραμμα Oligo Perfect designer της Invitrogen και αγοράστηκαν από την ίδια εταιρεία (Πίνακας 5).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Πίνακας 5: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	Sense	Antisense
ERα (218bp)	5'-GGAATCTGCCAAGGAGACTCGC-3'	5'-CCCACTTCGTAGCATTTGCGG-3'
ERβ (236bp)	5'-TGCAGCGATTACGCATCGGG-3'	5'-TTCTCTGTCTCCGCACAAGGCG-3'
AR (257bp)	5'-CCAGGAGACCTGCCTCATCTG-3'	5'–CCTCCTGTAGTTTCAGATTACC-3' [330]

Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετούνταν στο θερμικό κυκλοποιητή σε συνθήκες, οι οποίες ήταν ειδικές για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε (Πίνακας 6). Στην αρχή πραγματοποιούταν αποδιάταξη του cDNA στους 94°C για 5min και ακολουθούσε η τελική αντίδραση πολυμερισμού με ένα στάδιο επώασης στους 72°C για 10min. Έπειτα τα δείγματα διατηρούνταν στους 4°C. Η ανωτέρω διαδικασία επαναλαμβανόταν 35 φορές (κύκλοι), με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών αντιγράφων του γονιδίου.

Πίνακας 6: Οι συνθήκες ενίσχυσης των γονιδίων με τη μέθοδο της PCR.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΚΥΚΛΟΙ
ERα	94 °C 45s, 51 °C 1min, 72 °C 45s	35
ERβ	94 °C 45s, 48 °C 1min, 72 °C 45s	35
AR	94 °C 45s, 48 °C 1min, 72 °C 45s	35

Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίζονταν με βάση το μέγεθος και προσδιορίζονταν ποιοτικά μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 2%. Για την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάζονταν κατάλληλα με την ανάμιξη 12 μL από κάθε προϊόν με 2μL διαλύματος «φόρτωσης» (Loading Dye) 10X. Το διάλυμα φόρτωσης αποτελούταν από: 1) γλυκερόλη, η οποία βοηθάει τα δείγματα να καθιζάνουν στις θέσεις - υποδοχές του πηκτώματος και από 2) χρωστική, μπλε της βρωμοφαινόλης, η οποία διευκολύνει τη διαδικασία τοποθέτησης (φόρτωμα) των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια τα κατάλληλα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

προετοιμασμένα δείγματα τοποθετούνταν στις υποδοχές του πηκτώματος αγαρόζης εφαρμόζοντας ηλεκτρική τάση 1-5 V/cm στη συσκευή τροφοδότησης. Κατά την προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης προστίθονταν 5μL βρωμιούχου αιθιδίου, ουσία η οποία έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό εξαιτίας του σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής με το δίκλωνο DNA όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης του DNA των δειγμάτων έπειτα από παρατήρηση του πηκτώματος της ηλεκτροφόρησης σε τράπεζα υπεριώδους. Τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται στην ενότητα Β.11.1.

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθος τους, το οποίο καθορίζεται από το μοριακό τους βάρος. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA πραγματοποιούταν με τη χρήση δύο μαρτύρων μοριακών βαρών, τον DNA ladder 100bp και τον DNA ladder 50bp (βλ. Ενότητα Β.11.1).

Β.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real Time, RT-PCR)

Η Real-Time PCR αποτελεί παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR και χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται με τη χρήση φθοριζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA. Η αλλαγή στα επίπεδα του φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αντανακλούν τα επίπεδα έκφρασης του μελετηθέντος γονιδίου, εφόσον η χρωστική παράγει φθορισμό μόνο στην περίπτωση που προσδένεται σε διπλή έλικα του DNA.

Μετά την παραγωγή των αντιγράφων cDNA από την αντίδραση της PCR (βλ. Ενότητα Β.11.3) πραγματοποιούταν η αντίδραση της Real-Time PCR με τη μέθοδο των φθορίζουσων χρωστικών με τη χρωστική SYBR Green. Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να προσδένεται με μη ειδικό τρόπο στο δίκλωνο DNA και να εκπέμπει ακτινοβολία, εν αντιθέσει με τη μη δεσμευμένη χρωστική, η οποία δεν εκπέμπει. Επομένως, κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης του DNA προσδένεται συνεχώς περισσότερη χρωστική με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η αντίδραση της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Light Cycler 96 (Roche Life Science, Basel, Switzerland).

Η αντίδραση ξεκινούσε με την προετοιμασία ενός αρχικού μίγματος (master mix) για κάθε ζεύγος εκκινητών, το οποίο περιελάμβανε το ζεύγος των δύο εκκινητών (τελικής συγκέντρωσης 0,4pmol/μL), το διάλυμα της χρωστικής SYBR Green Master Mix και δις απεσταγμένο H_2O. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε ειδικά πλαστικά 96 οπών. Σε κάθε οπή προστίθονταν 7,5 μL από το master mix και 2,5 μL από κάθε δείγμα cDNA. Κάθε αντίδραση πραγματοποιούταν εις διπλούν. Ως δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιούνταν δείγματα RNA από αντίστοιχες κυτταρικές σειρές, τα οποία δεν είχαν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (RT), καθώς και δείγματα στα οποία είχε προστεθεί ddH_2O στη θέση του cDNA.

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης της Real-time PCR ήταν οι εξής:

1. 50° C για 2 min
2. 94° C για 10min
3. 95° C για 15 sec
4. 60° C για 1min

Αρχικά στους 50° C έγινε η ενεργοποίηση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, η οποία ακολουθήθηκε από την αρχική αποδιάταξη της δίκλωνης αλληλουχίας του DNA στους 94° C. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 40 κύκλους και η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιήθηκε διαδοχικά σε τρία στάδια: έγινε αποδιάταξη του DNA στους 95° C και στη συνέχεια έγινε υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλωνα μόρια DNA. Στους 60° C έγινε η τελική επιμήκυνση για 2 sec.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου προσφέρει τη δυνατότητα να παρακολουθείται η αντίδραση σε πραγματικό χρόνο, και την ίδια στιγμή να προσδιορίζεται η ποσότητα των προϊόντων που παράγονται είτε με απόλυτο είτε με σχετικό υπολογισμό. Με τον απόλυτο υπολογισμό της ποσότητας προσδιορίζεται, με καμπύλη ποσοτικοποίησης, ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος, ενώ με το σχετικό υπολογισμό της ποσότητας προσδιορίζεται ο ρυθμός έκφρασης όσον αφορά στην παραγωγή mRNA του κυττάρου. Η παρούσα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

διατριβή έκανε χρήση της μεθόδου του σχετικού υπολογισμού της ποσότητας προκειμένου να εξάγει αποτελέσματα. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται υπολογισμός των αλλαγών στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων της μελέτης συγκριτικά με το επίπεδο έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς. Στην παρούσα εργασία το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 18S rRNA. Η βάση της μεθόδου του σχετικού υπολογισμού της ποσότητας είναι ο λόγος των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς, ο οποίος υπολογίζεται με την εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου $2^{-\Delta\Delta C}$. Η εκδοχή $2^{-\Delta\Delta C}$ του παραπάνω μοντέλου, η οποία χρησιμοποιείται και περισσότερο, είναι η πλέον ενδεδειγμένη για αντιδράσεις με παρόμοιες τιμές απόδοσης (E, efficiency), αφού δεν περιέχει εξομάλυνση για τις αποδόσεις. Ο υπολογισμός των λόγων έκφρασης στηρίζεται στην εξίσωση:

$$R= 2^{-(\Delta Ct\ \text{δείγμα}-\ \Delta Ct\ \text{γον. αναφοράς})} \quad [371]$$

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της Real time RT-PCR για τα γονίδια της SOD 1, SOD 2, της καταλάσης και της GPX 1 σχεδιάστηκαν από τη βιολόγο - διδάκτορα Μπεφάνη Χριστίνα υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Λιάκου Παναγιώτη (Εργαστήριο Βιοχημείας Π.Θ) και κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech (Αυστρία). Οι εκκινητές και οι συνθήκες της ενίσχυσης για κάθε ζεύγος παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Πίνακας 7: Οι εκκινητές και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της Real time RT-PCR για τα γονίδια της SOD 1, SOD 2, της καταλάσης και της GPX 1.

ΓΟΝΙΔΙΑ	Sense	Antisense
SOD 2	**GCA CTA GCA GCA TGT TGA GC** 20nt, Tm=62°C	**CTC CTC GGT GAC GTT CAG G** 19nt, Tm=62°C PCR product: 210nt (144-354)
SOD 1	**GGA GAC TTG GGC AAT GTG AC** 20nt, Tm=62°C	**GAT CCC AAT TAC ACC ACA AGC** 21nt, Tm=60°C PCR product: 210nt (394-604)
ΚΑΤΑΛΑΣΗ	**CTG ATG TCC TGA CCA CTG G** 19nt, Tm= 60°C	**GAC CTC AAA GTA GCC AAA GG** 20nt, Tm= 60°C PCR product: 190nt (71-261)
GPX1	**CTA CAC CCA GAT GAA CGA GC** 20nt, Tm=62°C	**CTC GCA CTT CTC GAA GAG C** 19nt, Tm=60°C PCR product: 184nt (189-383)

Β.13 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της ερευνητικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Graph Pad Instat Statistical package for Windows και συγκεκριμένα η δοκιμασία ANOVA. Η διόρθωση έγινε με Bonferroni post hoc test. Τα δεδομένα είναι αποτέλεσμα πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε παράμετρο που προσδιορίστηκε και εκφράζονται ως μέσος όρος (mean) ± τυπική απόκλιση (SD). Σε κάθε ένα από τα 5 πειράματα, η μέτρηση έγινε εις τριπλούν. Η στατιστική σημαντικότητα επιλέχθηκε για τιμές του p-value <0.05.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

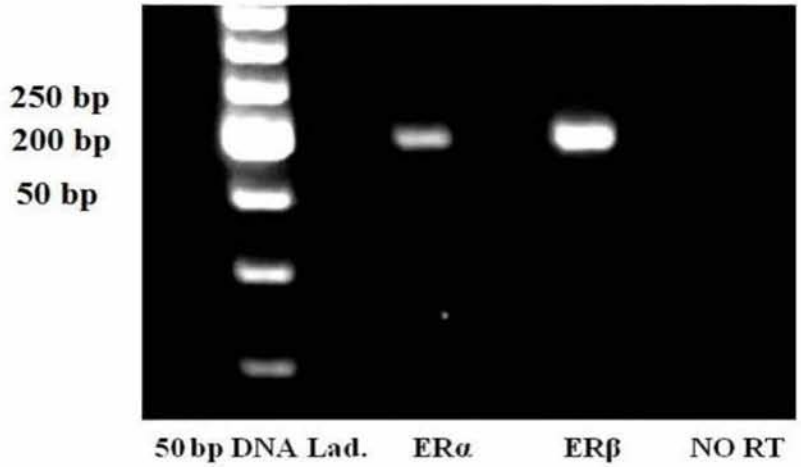
Γ.1 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ EAhy926

Αρχικά αναζητήθηκε η παρουσία των γονιδίων των υποδοχέων των οιστρογόνων (ERα, ERβ) και του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) στα κύτταρα της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EAhy926, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα Β.11.3, Υλικά και Μέθοδοι. Ο έλεγχος της έκφρασης των προαναφερθέντων υποδοχέων στο κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε (EAhy926 ενδοθηλιακή σειρά), υπήρξε βασική προϋπόθεση για τη διερεύνηση της δράσης των αντίστοιχων προσδετών στο εν λόγω κυτταρικό σύστημα. Η έκφραση των γονιδίων των CRH υποδοχέων (CRHR1 και CRHR2) στα ενδοθηλιακά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε έχει επιβεβαιωθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας [28].

Γ.1.1 Γονιδιακή έκφραση των οιστρογονικών (ERα - ERβ) υποδοχέων στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926

Με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR (όπως περιγράφεται στο Τμήμα Β.11.2), πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των υποδοχέων ERs. Έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR, παρατηρήθηκε η έκφραση των γονιδίων ERα και ERβ στα κύτταρα της σειράς EAhy926 (φωτογραφία 1).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

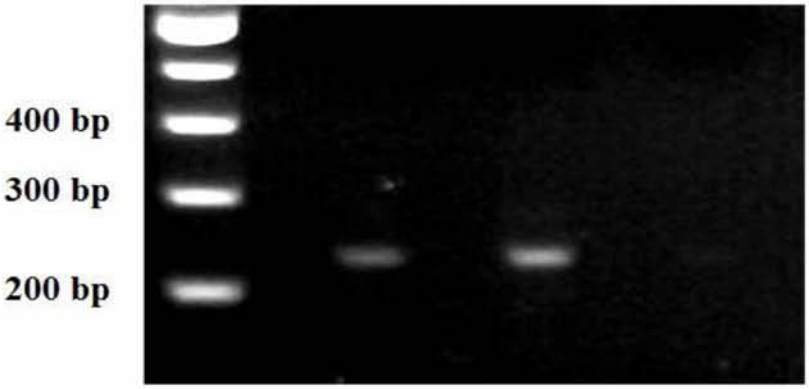


Φωτογραφία 1: Έκφραση των mRNA των υποδοχέων ERs στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά. Η ενισχυμένη γονιδιακή περιοχή του ERα παρατηρείται στις 218 bp και του ERβ στις 236bp. Το μέγεθος των γονιδίων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια δείκτη μοριακού βάρους 50bp DNA ladder (βλ. ενότητα Β.11.2). Οι αντίστοιχοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της RT-PCR αναγράφονται στον πίνακα 5 (Β.11.3, Υλικά και Μέθοδοι). Το δείγμα NO RT αποτελεί το δείγμα κοντρόλ το οποίο δεν έχει μετατραπεί σε cDNA μέσω της RT και χρησιμοποιείται για την απόκλειση τυχόν επιμόλυνσης των αρχικών δειγμάτων RNA με DNA.

Γ.1.2 Γονιδιακή έκφραση του ανδρογονικού (AR) υποδοχέα στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EAhy926

Με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR (όπως περιγράφεται στο Τμήμα Β.11.2) πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του υποδοχέα των ανδρογόνων. Έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR, παρατηρήθηκε η έκφραση του γονιδίου του AR στα κύτταρα της σειράς EAhy926 (φωτογραφία 2).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Φωτογραφία 2: Έκφραση του mRNA του AR υποδοχέα στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά. Η ενισχυμένη γονιδιακή περιοχή του AR παρατηρείται στις 257 bp [(Εις διπλούν (1, 2)]. Το μέγεθος των γονιδίων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια δείκτη μοριακού βάρους 100bp DNA ladder (βλ. ενότητα Β.11.2). Οι αντίστοιχοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της RT-PCR αναγράφονται στον πίνακα 5 (Β.11.3, Υλικά και Μέθοδοι). Το δείγμα NO RT αποτελεί το δείγμα κοντρόλ το οποίο δεν έχει μετατραπεί σε cDNA μέσω της RT και χρησιμοποιείται για την απόκλειση τυχόν επιμόλυνσης των αρχικών δειγμάτων RNA με DNA.

Γ.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Γ.2.1 Επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και DHT που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

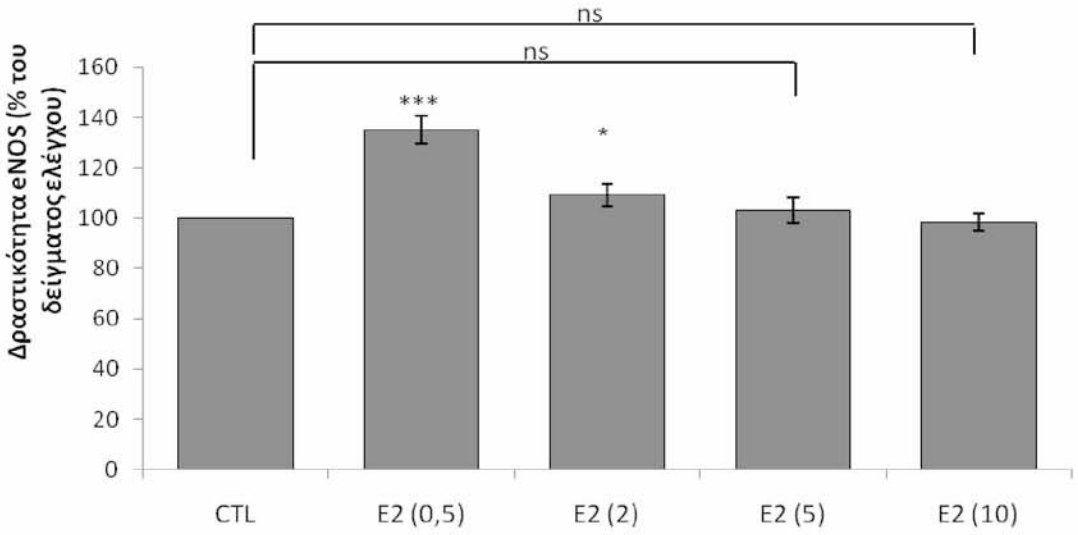
Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης των στεροειδών ορμονών που χρησιμοποιήθηκαν στα μετέπειτα πειράματα, η καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων EAhy926 έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα Β.7 «Υλικά και Μέθοδοι». Όσον αφορά στη συγκέντρωση της CRH, στηριχτήκαμε σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας [28] όπου παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη δράση της CRH στην παρεμπόδιση της έκλυσης του NO ασκήθηκε στη συγκέντρωση 10^{-7} M, την οποία και χρησιμοποιήσαμε στα επόμενα πειράματα μας.

Η Ε2 στη συγκέντρωση 0,5 pg/mL προκάλεσε τη μεγαλύτερη διέγερση στη δραστικότητα της eNOS (~38%) ($p<0.001$) συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου (Εικόνα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

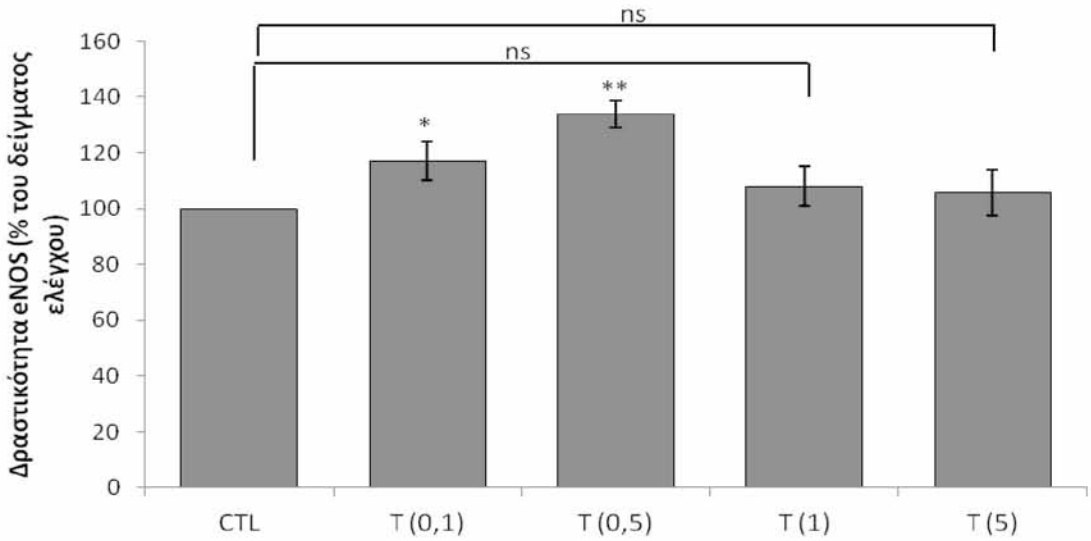
31). Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη αύξηση στην eNOS ($p<0.01$) συγκριτικά με το κοντρόλ παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 0,5 nM της τεστοστερόνης (Εικόνα 32). Η E2 στη συγκέντρωση 2 pg/mL προκάλεσε επίσης σημαντική αύξηση στη δραστικότητα της eNOS που όμως διέφερε σημαντικά από τη δόση των 0,5 pg/mL. Αντίστοιχα, το ίδιο παρατηρήθηκε και με την τεστοστερόνη στη συγκέντρωση 0,1 nM.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν στα μετέπειτα πειράματα μας οι συγκεντρώσεις που προκάλεσαν τη μεγαλύτερη αύξηση στη δραστικότητα της eNOS, για την 17β-E2 η συγκέντρωση 0,5pg/mL και για την τεστοστερόνη η συγκέντρωση 0,5nM.



Εικόνα 31: Η δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της E2 στη δραστικότητα της eNOS. Έπειτα από παραμονή των EAhy926 ενδοθηλιακών κυττάρων (passage 4) σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία ορού βοός, για 24 ώρες, τα κύτταρα επωάσθηκαν με E2 σε συγκεντρώσεις 0,5, 2, 5 και 10pg/mL για 2 ώρες. Τα κυτταρικά λύματα στη συνέχεια συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η δραστικότητα της eNOS, όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β.7, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *$p<0.05$, *** $p<0.001$ ως προς το control,. ns: non significant, μη στατιστική σημαντικότητα)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 32: Η δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της τεστοστερόνης στη δραστικότητα της eNOS. Έπειτα από παραμονή των EAhy926 ενδοθηλιακών κυττάρων (passage 4) σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία ορού βοός, για 24 ώρες, τα κύτταρα επωάσθηκαν με τεστοστερόνη σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,5, 1 και 5nM για 2 ώρες. Τα κυτταρικά λύματα στη συνέχεια συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η δραστικότητα της eNOS, όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β.7, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *p<0.05, **p<0.001 ως προς το control, ns: non significant, μη στατιστική σημαντικότητα).

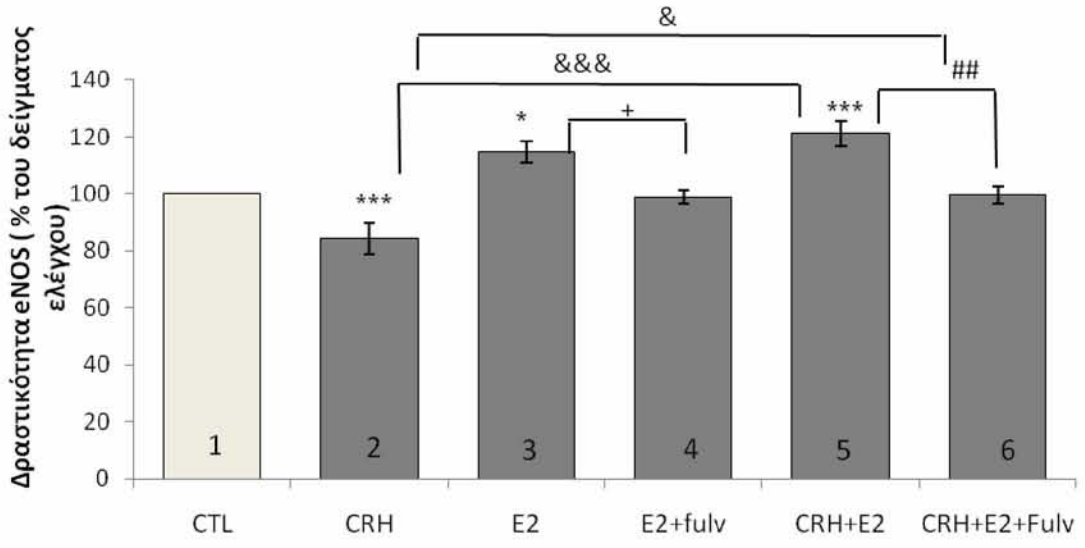
Γ.2.2 Προ-οξειδωτική δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσης μελέτης επιβεβαίωσαν τη γνωστή προ-οξειδωτική δράση της CRH επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, που χαρακτηρίζεται από αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και ταυτόχρονη μείωση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO και της παραγωγής του NO με παράλληλη αύξηση της ενεργότητας της καταλάσης και της SOD αλλά χωρίς μεταβολή της γλουταθειόνης [28].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.2.2.1 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της eNOS παρουσία οιστραδιόλης

Η παρουσία CRH σε συγκέντρωση 10^{-7}M, προκάλεσε στατιστικά σημαντική ($p<0.001$) μείωση της δραστικότητας της eNOS (50% συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου) (Εικόνα 33). Η Ε2 αύξησε σημαντικά ($p<0.05$), τη δραστικότητα του ενζύμου, συγκριτικά με το κοντρόλ. Η δράση της Ε2 στη δραστικότητα της eNOS, απαλείφτηκε από την επίδραση του αναστολέα φουλβεστράνη, ο οποίος επανέφερε την eNOS, σε επίπεδα συγκρίσιμα με του δείγματος ελέγχου (Εικόνα 33, μπάρα 4). Η προσθήκη της οιστραδιόλης (0,5 pg/mL), στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό με τη CRH, είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά της δραστικότητας του ενζύμου σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.001$) και της CRH ($p<0.001$) (μπάρα 5). Η προσθήκη του αναστολέα των ERs στο μέσο της CRH με την Ε2, εξουδετέρωσε τη δράση της Ε2, όπως φαίνεται στην εικόνα 33, όπου τα επίπεδα της eNOS επέστρεψαν στα επίπεδα του δείγματος ελέγχου. Τα συγκεκριμένα δεδομένα δείχνουν ότι η Ε2 εξουδετερώνει την ανασταλτική δράση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, μέσω των υποδοχέων των οιστρογόνων της (ERα και ERβ).



Εικόνα 33: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

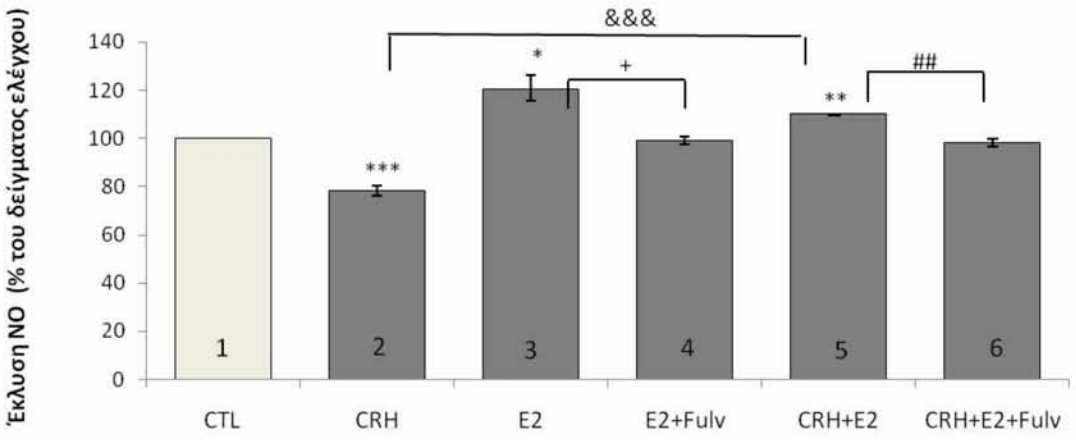
υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και E2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η δραστικότητα της eNOS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 7, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: * $p<0.05$, *** $p<0.001$ ως προς control, $^{+}p<0.05$ ως προς E2, $^{\&}p<0.05$, $^{\&\&\&}p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#}p<0.01$ ως προς CRH+E2).

Γ.2.2.2 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της έκλυσης του NO παρουσία οιστραδιόλης

Συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (κοντρόλ), όπως ήταν αναμενόμενο, η CRH επέφερε σημαντική αναστολή στην έκλυση του NO ($p<0.001$). Αντίστοιχα, η οιστραδιόλη αύξησε σημαντικά την έκλυσή του ($p<0.05$) (Εικόνα 34). Η επίδραση της E2 στην έκλυση του NO, εξουδετερώθηκε παρουσία του αναστολέα φουλβεστράνη, ο οποίος επανάφερε τη συγκέντρωση του NO, σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου ($p<0.05$) (μπάρα 4).

Η προσθήκη οιστραδιόλης στο καλλιεργητικό υλικό όπου ήταν παρούσα η CRH, είχε ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της ανασταλτικής δράσης της δεύτερης και την επαναφορά των επιπέδων του NO σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.01$) και της CRH ($p<0.001$) (Εικόνα 34) (μπάρα 5). Η δράση αυτή της οιστραδιόλης απαλείφθηκε μετά την προσθήκη φουλβεστράνης, ειδικού αναστολέα των ERs. Τα δεδομένα υποδηλώνουν πως η οιστραδιόλη, εξουδετερώνει την ανασταλτική επίδραση της CRH στην έκλυση του NO. Η δράση αυτή ερμηνεύεται, κατά ένα μέρος τουλάχιστον, από την αντίστοιχη διεγερτική επίδραση της οιστραδιόλης στη δραστικότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO, ενζύμου παραγωγής του NO (Εικόνα 33). Η επίδραση αυτή της E2 διαμεσολαβείται από τους οιστρογονικούς υποδοχείς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



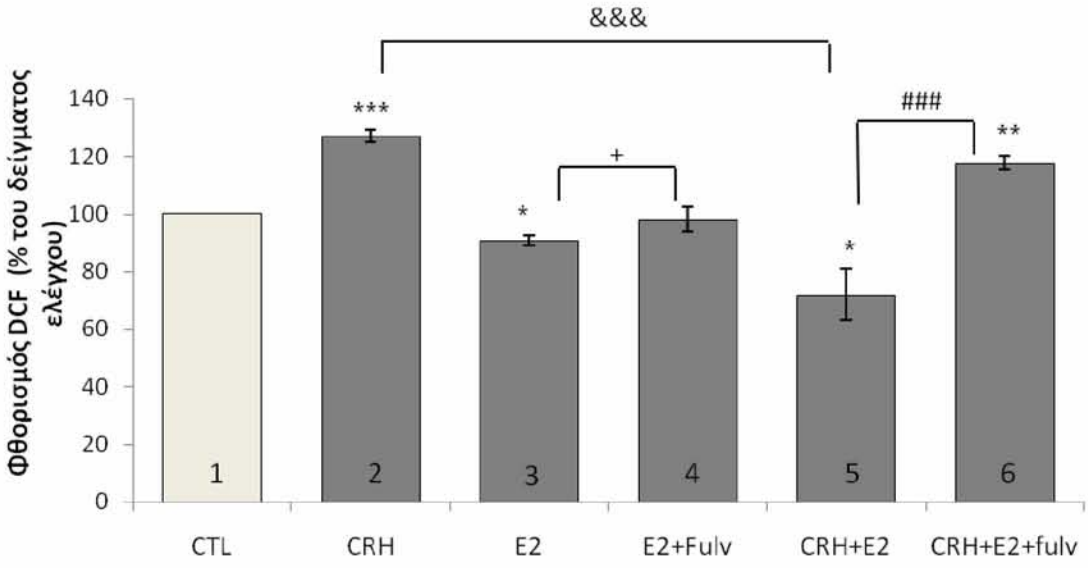
Εικόνα 34: Η επίδραση της CRH στην έκλυση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και E2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η έκλυση του NO όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β.8, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ ως προς το control, $^{+}p<0.05$ ως προς E2, $^{\&\&\&}p<0.001$ ως προς CRH, , $^{\#\#}p<0.01$ ως προς CRH+E2).

Γ.2.2.3 Επίδραση της CRH στα επίπεδα των ROS παρουσία οιστραδιόλης

Στην εικόνα 35, φαίνεται ότι η CRH προκάλεσε σημαντική αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου (35% αύξηση, $p<0.001$), ενώ η παρουσία της οιστραδιόλης μείωσε σημαντικά ($p<0.05$) τη συγκέντρωση τους. Η ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ROS, εξουδετερώθηκε από την επίδραση της φουλβεστράνης, αναστολέα των ERs, η οποία επανέφερε τα ROS σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (μπάρα 4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η προσθήκη της οιστραδιόλης στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό με τη CRH (CRH+E2), ανέστειλε τη CRH-προκαλούμενη αύξηση των ROS και επανέφερε τη συγκέντρωση τους σε επίπεδα χαμηλότερα ακόμη και από τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.05$) (μπάρα 5). Η συγκεκριμένη δράση αναστάλθηκε παρουσία της φουλβεστράνης ($p<0.001$) (μπάρα 6). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η οιστραδιόλη εξουδετερώνει την επαγωγική επίδραση της CRH στη δημιουργία των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δράση που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς της.



Εικόνα 35: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και E2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η παραγωγή των ROS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 9, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ ως προς το control, $^{+}$ $p<0.05$ ως προς E2, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+E2).

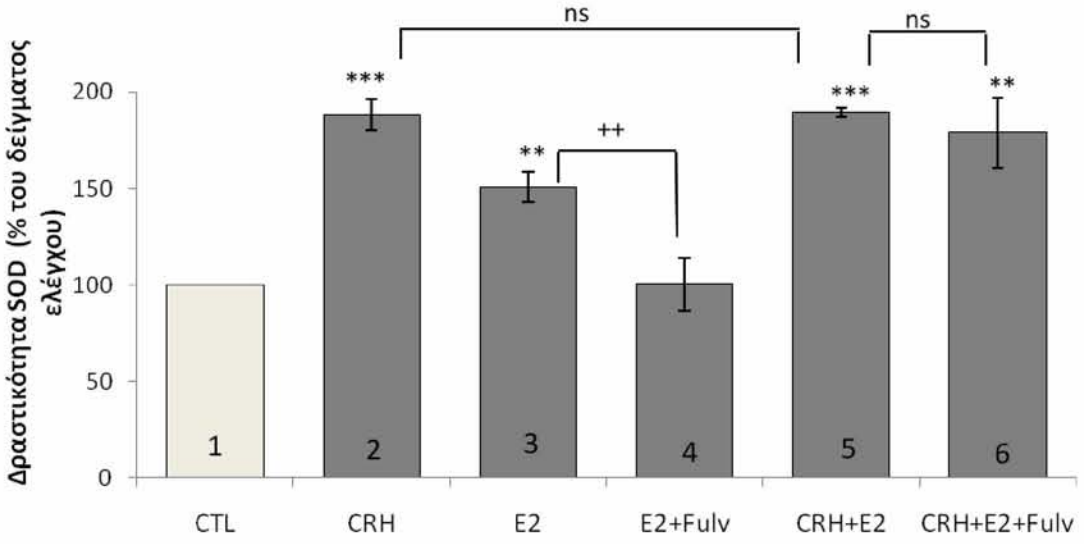
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.2.2.4 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της SOD και της έκφρασης του γονιδίου της παρουσία οιστραδιόλης

Στην εικόνα 36, φαίνεται ότι η CRH αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα της SOD, φθάνοντας ακόμα και σε επίπεδα μέχρι και 100% υψηλότερα απ' ότι τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.001$). Αντίστοιχα, η οιστραδιόλη παρομοίως αύξησε σημαντικά ($p<0.01$) τη δραστικότητα του ενζύμου, πλην όμως σε χαμηλότερα επίπεδα (50% πάνω από τα επίπεδα ελέγχου). Η επαγωγική δράση της Ε2 εξουδετερώθηκε μετά τον αποκλεισμό των οιστρογονικών υποδοχέων από τη φουλβεστράνη (μπάρα 4).

Η συμπαρουσία CRH και οιστραδιόλης οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας της SOD ($p<0.001$) (μπάρα 5) σε επίπεδα μη διαφορετικά από εκείνα μόνης της CRH. Η προσθήκη του αναστολέα των υποδοχέων οιστρογόνων δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση στη δραστικότητα του ενζύμου (μπάρα 6). Τα ευρήματα μας δείχνουν ότι η δράση της CRH στο σύστημα της SOD, δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία της οιστραδιόλης στα EAhy926 ενδοθηλιακά κύτταρα, υποδεικνύοντας ένα πιθανό επικρατή ρόλο της CRH στη δραστικότητα του ενζύμου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



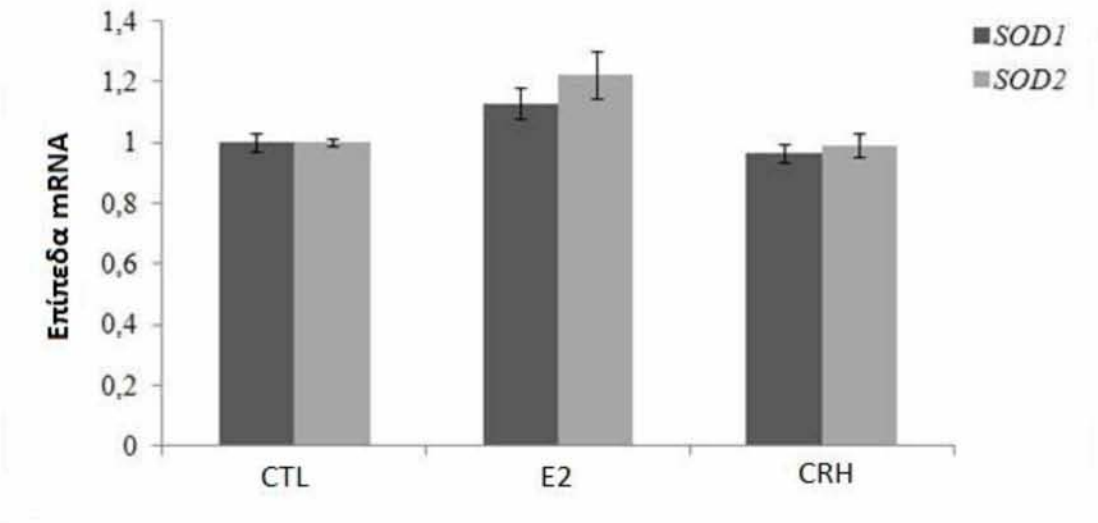
Εικόνα 36: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2 ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και E2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της SOD όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 3, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: ** $p< 0.01$, *** $p<0.001$ προς το control, $^{++}$ $p<0.01$ ως προς E2, ns: non significant, μη στατιστική σημαντικότητα).

Παράλληλα με την ενεργότητα της SOD στα EAhy926 ενδοθηλιακά κύτταρα, υπό την επίδραση των προαναφερθέντων συνθηκών, και δεδομένου ότι υπάρχουν 2 ισομορφές της SOD που μελετώνται ενδοκυτταρικά - η κυτταροπλασματική Cu/ZnSOD (SOD1) και η μιτοχονδριακή MnSOD (SOD2), [372] - διερευνήθηκε και η επίδραση των ίδιων παραγόντων, CRH και οιστραδιόλης, στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των SOD1 και SOD2.

Στην εικόνα 37 φαίνεται ότι η παρουσία της E2 και της CRH δεν επηρέασε τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων της SOD1 και SOD2 συγκριτικά με το δείγμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι το χρονικό διάστημα των 2 ωρών επώασης είναι σχετικά μικρό ώστε να ανιχνευθούν αλλαγές στα επίπεδα των mRNA μεταγράφων.



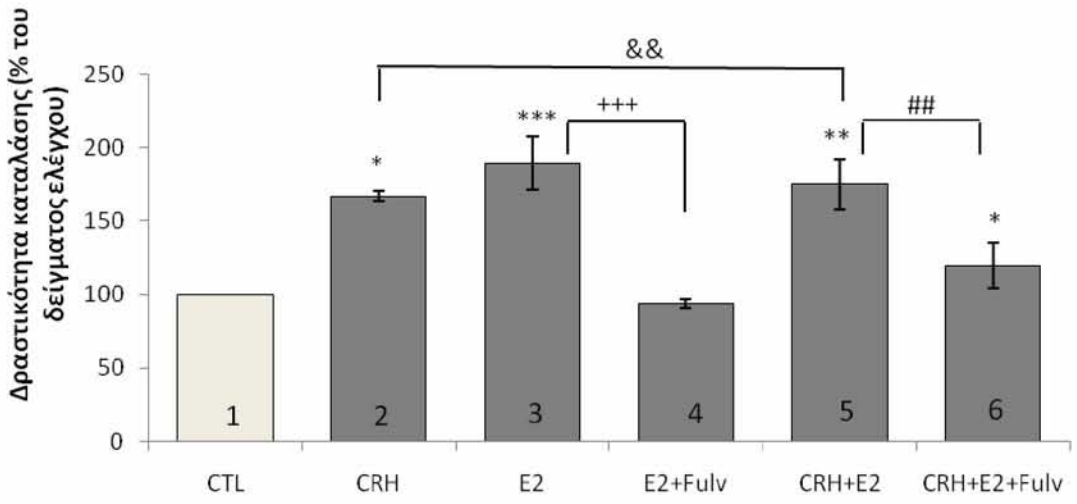
Εικόνα 37: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της SOD1 και SOD2. Προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της *SOD1* και *SOD2* με τη μέθοδο της ποσοτικής real-time PCR στα κύτταρα EAhy926 τα οποία καλλιεργήθηκαν για 2h στους 37 °C σε DMEM θρεπτικό υλικό, CTL (control cells); ή σε θρεπτικό υλικό που περιέχει E2 (0,5 pg/mL) ή CRH (10^{-7} M). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Γ.2.2.5 Επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης και της έκφρασης του γονιδίου της παρουσία οιστραδιόλης

Στην εικόνα 38, φαίνεται ότι η CRH αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.05$). Σημαντικά, επίσης, αύξησε τη δραστικότητα του ενζύμου και η οιστραδιόλη ($p<0.001$) και μάλιστα σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα της CRH. Η επαγωγική δράση της E2 εξουδετερώθηκε υπό την επίδραση του αναστολέα των οιστρογονικών υποδοχέων, ο οποίος επανέφερε τη δραστικότητα του ενζύμου σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (μπάρα 4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η προσθήκη της Ε2 στο καλλιεργητικό υλικό όπου ήταν παρούσα η CRH, αύξησε σημαντικά την ήδη αυξημένη λόγω της CRH δραστικότητα του ενζύμου ($p<0.001$ ως προς το κοντρόλ, $p<0.01$ ως προς CRH) (μπάρα 5). Η εξουδετέρωση της οιστρογονικής δράσης με την προσθήκη της φουλβεστράνης είχε ως αποτέλεσμα σημαντική ($p<0.01$ vs CRH+E2) μείωση της δραστικότητας της καταλάσης (μπάρα 6), σε επίπεδα τα οποία ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα του κοντρόλ ($p<0.05$) και σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της οιστραδιόλης ($p<0.01$). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η διεγερτική επίδραση της οιστραδιόλης στη δραστικότητα της καταλάσης είναι επικρατέστερη εκείνης της CRH.

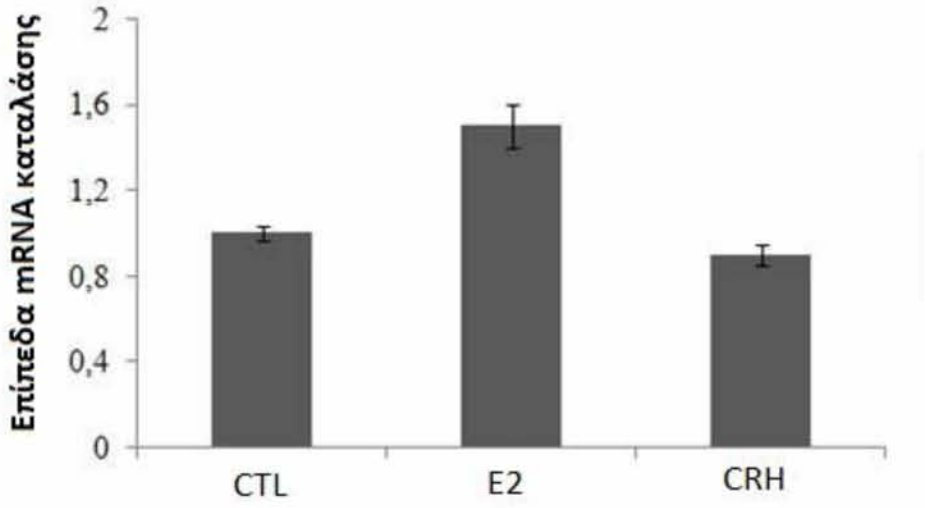


Εικόνα 38: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2 ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και Ε2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της καταλάσης όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 4, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: * $p<0.05$, **$p<0.01$,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

*** p<0.001ως προς το control, $^{+++}$ p<0.001 ως προς E2, $^{\&\&}$p<0.01 ως προς CRH, $^{\#\#}$ p<0.01 ως προς CRH+E2).

Όσον αφορά στην έκφραση του mRNA του γονιδίου της καταλάσης διαπιστώθηκε ότι κανένας από τους δύο παράγοντες (οιστραδιόλη και CRH) δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου του ενζύμου (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της καταλάσης. Προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της καταλάσης με τη μέθοδο της ποσοτικής real-time PCR στα κύτταρα EA.hy926 τα οποία καλλιεργήθηκαν για 2h στους 37 ºC σε DMEM θρεπτικό υλικό, CTL (control cells); ή σε θρεπτικό υλικό που περιέχει E2 (0.5 pg/mL) ή CRH (10^{-7} M). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

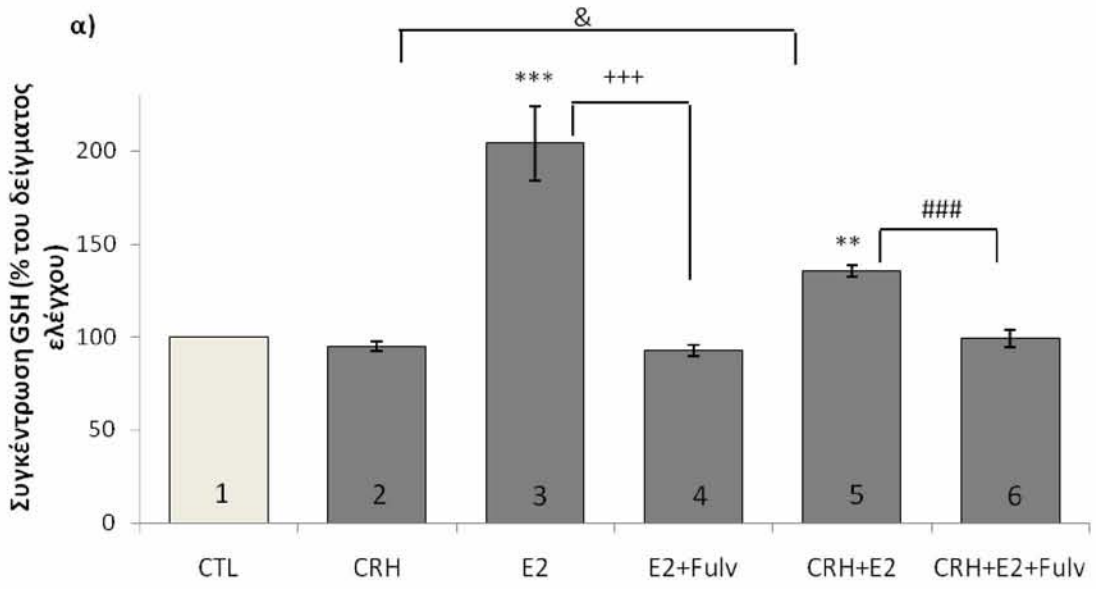
Γ.2.2.6 Επίδραση της CRH στα επίπεδα της GSH, το λόγο GSH/GSH+GSSG και την έκφραση του γονιδίου της παρουσία οιστραδιόλης

Στην εικόνα 40 φαίνεται ότι, η CRH, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, προκάλεσε ελαφρά μείωση στα επίπεδα της GSH η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά

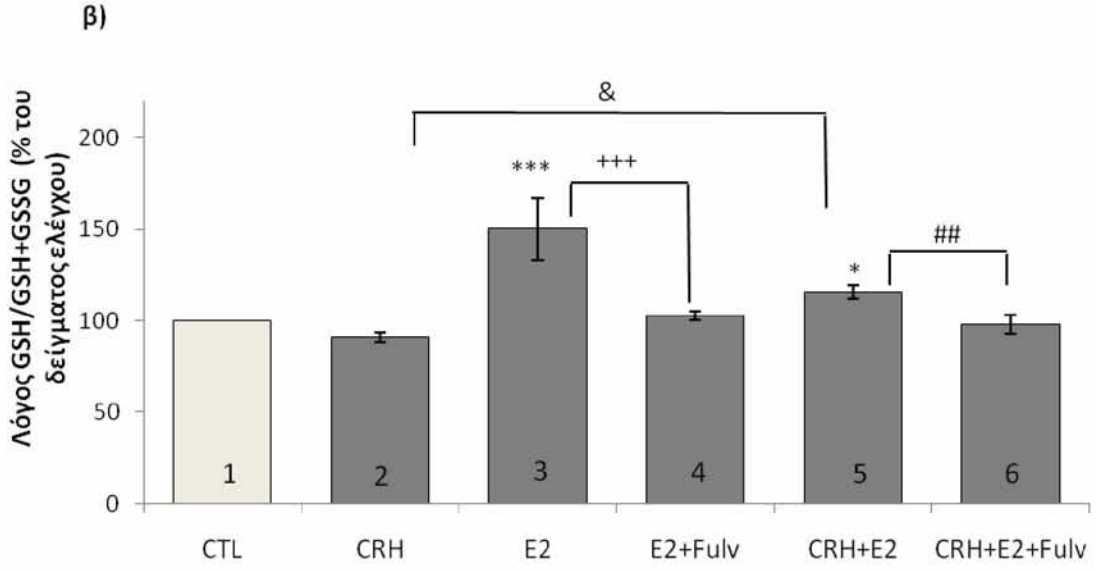
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

σημαντική ($p<0.062$). Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων παρουσία οιστραδιόλης συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της GSH ($p<0.001$) (Εικόνα 40A). Παρόμοιες ήταν οι μεταβολές του λόγου GSH/GSH+GSSG υπό την επίδραση, αντίστοιχα, της CRH και της οιστραδιόλης ($p<0.001$) (Εικόνα 40B). Ο αποκλεισμός των οιστρογονικών υποδοχέων από τη φουλβεστράνη ακολουθήθηκε από επαναφορά της συγκέντρωσης της GSH σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (μπάρα 4).

Η επώαση των κυττάρων με τη συμπαρουσία CRH και 17β-οιστραδιόλης, συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ($p<0.01$) και την επίδραση μόνης της CRH ($p<0.05$). Ωστόσο, αυτή η αύξηση ήταν σημαντικά μικρότερη από την προκληθείσα μόνης της οιστραδιόλης ($p<0.001$), (μπάρα 5) υποδηλώνοντας πιθανό ανταγωνισμό μεταξύ των δύο παραγόντων στη ρύθμιση της δραστικότητας της γλουταθειόνης. Ο αποκλεισμός της οιστρογονικής δράσης με την προσθήκη φουλβεστράνης συνοδεύτηκε από επαναφορά της συγκέντρωσης της GSH και του λόγου στα επίπεδα του δείγματος ελέγχου (μπάρα 6).



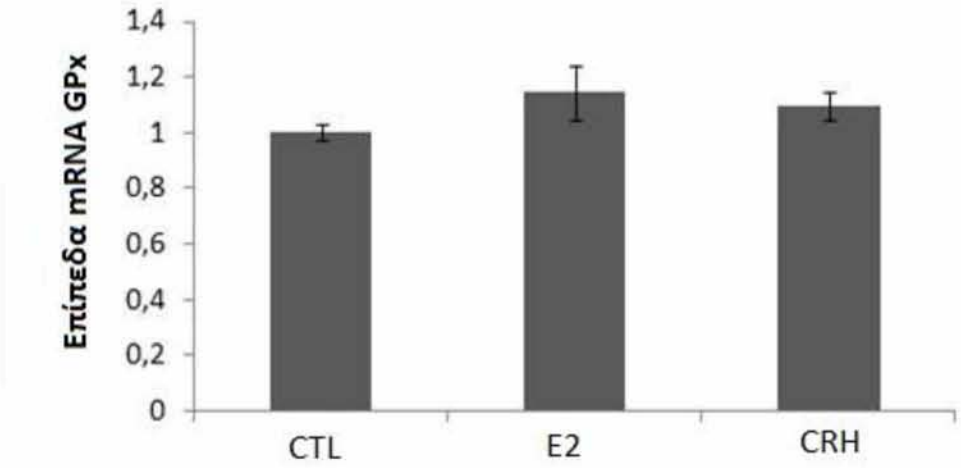
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 40: Προσδιορισμός της επίδρασης της CRH α) στα επίπεδα της GSH και β) στο λόγο GSH/GSH+GSSG, παρουσία οιστραδιόλης και αναστολέα των υποδοχέων της. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και E2 (0,5 pg/mL) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα των ERs, (fulv: fulvestrant, φουλβεστράνη) (5pg/mL). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκαν α) τα επίπεδα της GSH και β) τα επίπεδα του λόγου GSH/GSH+GSSG όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 5 και Β.6, αντίστοιχα, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ ως προς το control, $^{+++}p<0.001$ ως προς E2, $^{\&}p<0.05$, ως προς CRH, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$ ως προς CRH+E2).

Η επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της GPx φαίνεται στην εικόνα 41. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της επίδρασης της E2 και της CRH στην έκφραση του mRNA σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 41: Επίδραση της E2 και της CRH στα επίπεδα mRNA της GPx. Προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της *GPx* με τη μέθοδο της ποσοτικής real-time PCR στα κύτταρα EA.hy926 τα οποία καλλιεργήθηκαν για 2h στους 37 ºC σε DMEM θρεπτικό υλικό, CTL (control cells); ή σε θρεπτικό υλικό που περιέχει E2 (0.5 pg/mL) ή CRH (10^{-7} M). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Γ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στην παρούσα ενότητα παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν στην επίδραση των ανδρογόνων στην προ-οξειδωτική δράση της CRH. Επειδή η τεστοστερόνη αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή οιστραδιόλης - υπό την επίδραση του κυτταρικού ενζύμου αρωματάση - η οποία επηρεάζει την προ-οξειδωτική δράση της CRH, χρησιμοποιήθηκε παράλληλα και η διυδροτεστοστερόνη, η οποία είναι ανεπηρέαστη από την επίδραση της αρωματάσης. Να αναφερθεί ότι και τα δύο ανδρογόνα προσδένονται στον μοναδικό υποδοχέα ανδρογόνων για τον αποκλεισμό του οποίου χρησιμοποιήθηκε η φλουταμίδη.

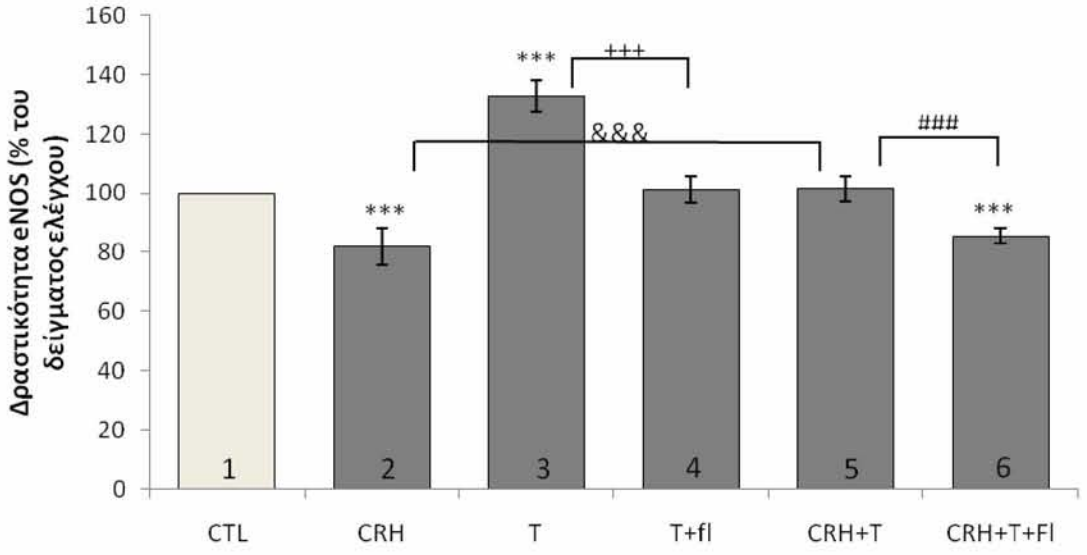
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.3.1 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της eNOS παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Στην εικόνα 42 φαίνεται η σημαντική μείωση ($p<0.001$) που προκαλεί η CRH στη δραστικότητα της eNOS, συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου, ενώ η τεστοστερόνη αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα του ενζύμου συγκριτικά με το κοντρόλ ($p<0.001$). Η διεγερτική δράση της τεστοστερόνης στη δραστικότητα της eNOS, απαλείφθηκε πλήρως μετά τον αποκλεισμό του ανδρογονικού υποδοχέα από τη φλουταμίδη (Εικόνα 42, μπάρα 4).

Η προσθήκη τεστοστερόνης στο καλλιεργητικό μέσο όπου υπήρχε CRH, δεν συνοδεύτηκε από σημαντική μεταβολή της δραστικότητας του ενζύμου (μπάρα 5), που ήταν συγκρίσιμη με εκείνη του δείγματος ελέγχου, αλλά σημαντικά χαμηλότερη από την επίδραση της τεστοστερόνης μόνης. Η εξουδετέρωση της δράσης της τεστοστερόνης με την προσθήκη του αναστολέα του AR συνοδεύτηκε από σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS ($p<0.001$ vs CTL, μπάρα 6) και επαναφορά της σε επίπεδα που ήταν συγκρίσιμα με εκείνα της CRH μόνης. Τα ως άνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ανταγωνιστική δράση της τεστοστερόνης στη CRH-προκαλούμενη αναστολή της δραστικότητας της eNOS που περιορίζεται όμως στην επαναφορά της στα φυσιολογικά επίπεδα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



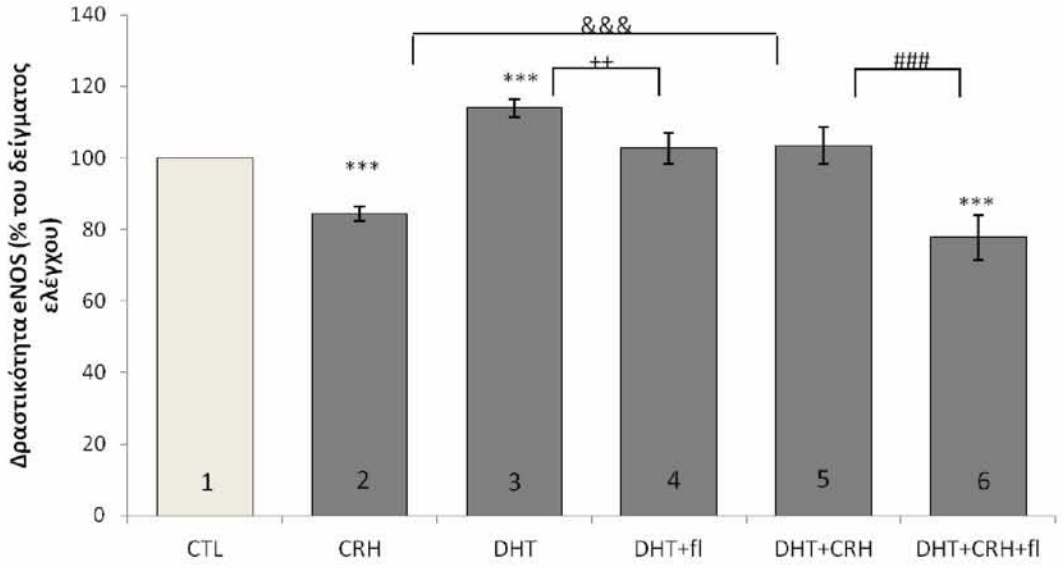
Εικόνα 42: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και τεστοστερόνη (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της eNOS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 7, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς T, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+T).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 43, η DHT, παρόμοια με την τεστοστερόνη, αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα του ενζύμου ($p<0.001$) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, δράση που εξουδετερώθηκε με τον αποκλεισμό των υποδοχέων των ανδρογόνων (Μπάρα 4). Επίσης, παρόμοια με την τεστοστερόνη, η DHT εξουδετέρωσε την ανασταλτική δράση της CRH, επαναφέροντας τα επίπεδα του ενζύμου σε επίπεδα μη σημαντικά σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, ωστόσο σημαντικά μεγαλύτερα από αυτά της CRH ($p<0.001$) (μπάρα 5). Η εξουδετέρωση της δράσης της DHT, με την προσθήκη του αναστολέα του AR, συνοδεύτηκε από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

σημαντική ελάττωση της δραστικότητας της eNOS (μπάρα 6) και επαναφορά της σε επίπεδα που ήταν συγκρίσιμα με εκείνα της CRH μόνης.

Η εξουδετέρωση της δράσης αμφοτέρων των ανδρογόνων με τη χρήση της φλουταμίδης υποδηλώνει ότι αυτή διαμεσολαβείται από το μονοπάτι του ανδρογονικού υποδοχέα (AR).



Εικόνα 43: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της eNOS, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl:flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της eNOS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 7, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{++}$ $p<0.01$ ως προς DHT, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.01$ ως προς CRH+DHT).

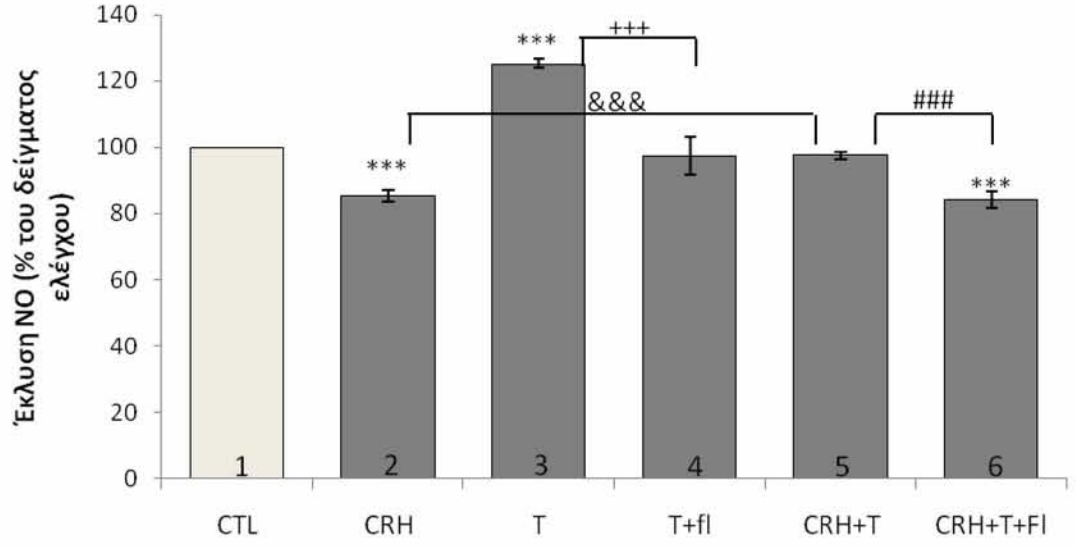
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.3.2 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της έκλυσης του NO παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Όπως ήταν αναμενόμενο από τις μεταβολές της eNOS, που περιγράφηκαν προηγουμένως, η CRH προκάλεσε σημαντική αναστολή στην έκλυση του NO, ($p<0.001$) ενώ η τεστοστερόνη αύξησε σημαντικά την έκλυση του ($p<0.001$) (Εικόνα 44). Η δράση της τεστοστερόνης στην έκλυση του NO, εξουδετερώθηκε από την επίδραση της φλουταμίδης, η οποία επανέφερε τη συγκέντρωση του NO σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του δείγματος ελέγχου (Εικόνα 44, μπάρα 4).

Η προσθήκη τεστοστερόνης στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό με τη CRH, είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά της συγκέντρωσης του NO σε επίπεδα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου ($p<0.001$) (Εικόνα 44, μπάρα 5). Η δράση αυτή απαλείφθηκε μετά την προσθήκη της φλουταμίδης που είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων του NO σε επίπεδα χαμηλότερα από τα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου (μπάρα 6, $p<0.001$) αλλά συγκρίσιμα με εκείνα της CRH μόνης.

Τα δεδομένα υποδηλώνουν ανταγωνιστική δράση της τεστοστερόνης στην προκαλούμενη από τη CRH ανασταλτική έκλυση του NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



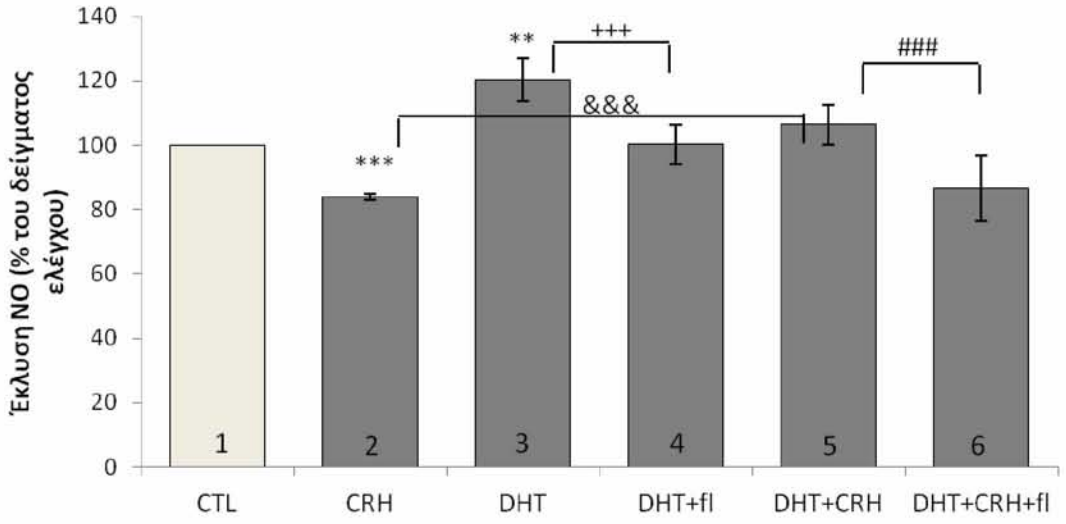
Εικόνα 44: Η επίδραση της CRH στην έκλυση του NO παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

τεστοστερόνη (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η έκλυση του NO όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 8, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς T, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+T).

Στην εικόνα 45 φαίνεται ότι η DHT προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκλυσης του NO ($p<0.01$ vs control), δράση που εξουδετέρωσε πλήρως ο αποκλεισμός του ανδρογονικού υποδοχέα (μπάρα 4).

Η ανασταλτική δράση της CRH στην έκλυση του NO εξουδετερώθηκε πλήρως από τη DHT, η οποία επανάφερε τη συγκέντρωση του NO (μπάρα 5) σε επίπεδα μη διαφορετικά από εκείνα που προκάλεσε μόνη η DHT, αλλά σημαντικά μεγαλύτερα των επιπέδων της CRH ($p<0.001$). Η επίδραση αυτή εξουδετερώθηκε μετά τον αποκλεισμό του υποδοχέα των ανδρογόνων με φλουταμίδη (μπάρα 6).



Εικόνα 45: Η επίδραση της CRH στην έκλυση του NO παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

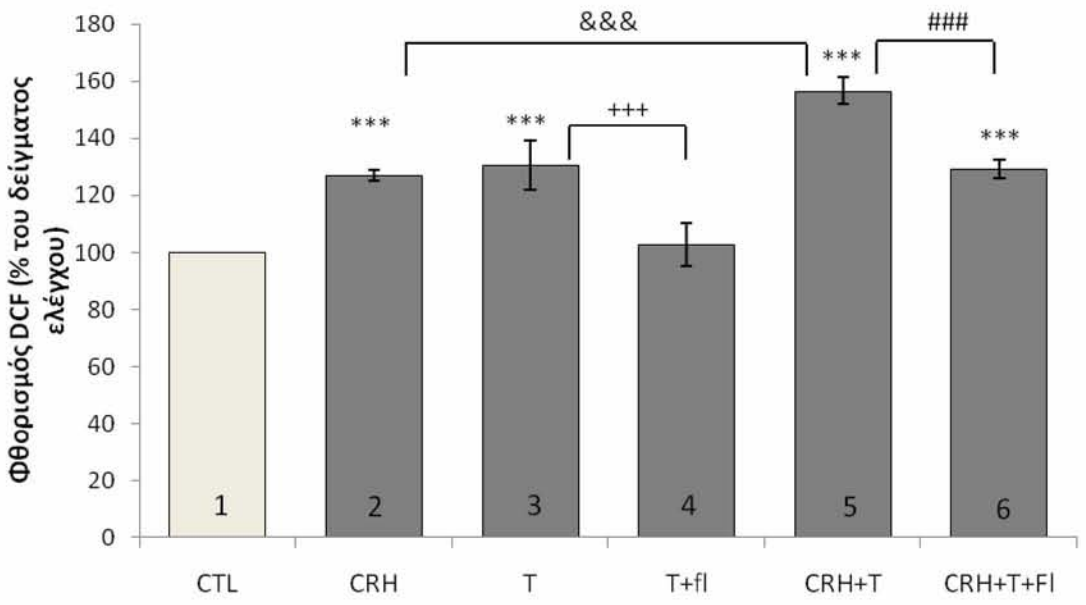
DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η έκλυση του NO όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 8, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: ** $p<0.01$ ως προς CTL, ***$p<0.001$ προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς DHT, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+DHT).

Γ.3.3 Επίδραση της CRH στα επίπεδα των ROS παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Όπως φαίνεται στην εικόνα 46, η τεστοστερόνη (T) προκάλεσε σημαντική αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS (~38% αύξηση, $p<0.001$) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, δράση που εξουδετερώθηκε από την προσθήκη φλουταμίδης, αναστολέα του υποδοχέα των ανδρογόνων. Επίσης, και η CRH αύξησε σημαντικά τα ROS ($p<0.001$) σε σύγκριση με το κοντρόλ.

Η προσθήκη της τεστοστερόνης στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό με τη CRH, συνοδεύτηκε από ακόμα μεγαλύτερη αύξηση των ROS ($p<0.001$, Μπάρα 5) σε σύγκριση με τον κάθε παράγοντα χωριστά, υποδηλώνοντας πιθανή συνεργιστική δράση. Η ενισχυτική δράση της τεστοστερόνης στη δημιουργία των ROS, εξουδετερώθηκε από την επίδραση του αναστολέα του ανδρογονικού υποδοχέα, ο οποίος επανάφερε τα ROS, σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα της CRH μόνης (Μπάρα 6).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



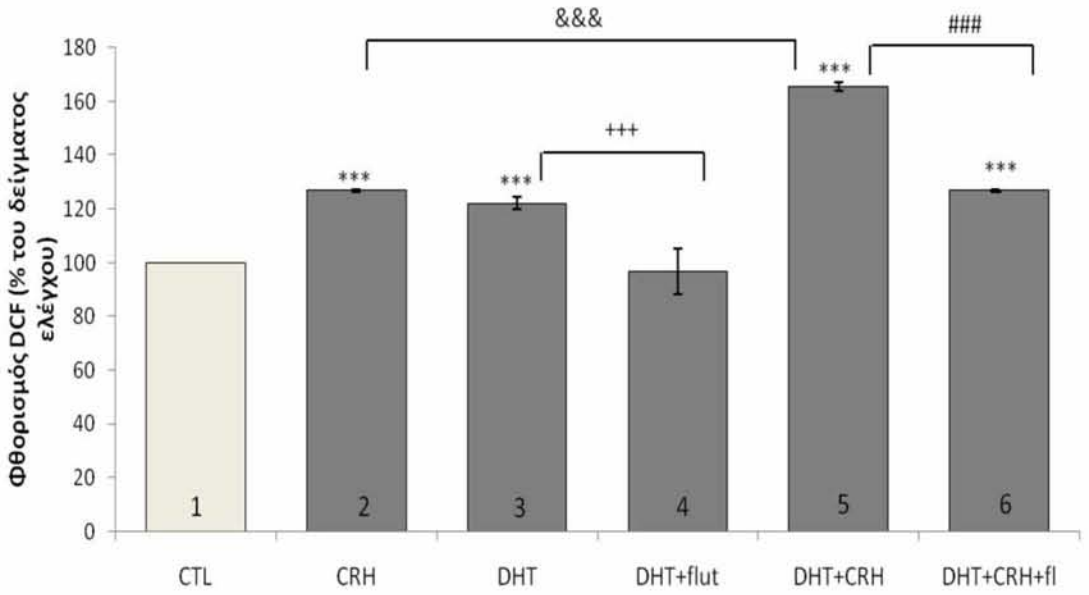
Εικόνα 46: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν γεπί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και τεστοστερόνη (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η παραγωγή των ROS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 9, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς T, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+T).

Παρόμοια με την τεστοστερόνη και η DHT αύξησε σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS (Εικόνα 47, $p<0.001$ vs CTL), δράση που εξουδετερώθηκε με τον αποκλεισμό του ανδρογονικού υποδοχέα. Σημαντική αύξηση των ROS παρατηρήθηκε επίσης από την επίδραση της CRH ($p<0.001$ vs CTL).

Η προσθήκη της DHT στο ίδιο καλλιεργητικό υλικό με τη CRH συνοδεύτηκε από ενίσχυση της αύξησης των επιπέδων των ROS (Μπάρα 5, $p<0.001$ vs CTL), υποδηλώνοντας πιθανή συνεργιστική δράση των δύο παραγόντων, φαινόμενο που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

εξουδετερώθηκε πλήρως κατά τον αποκλεισμό του ανδρογονικού υποδοχέα (μπάρα 6, Εικόνα 47).



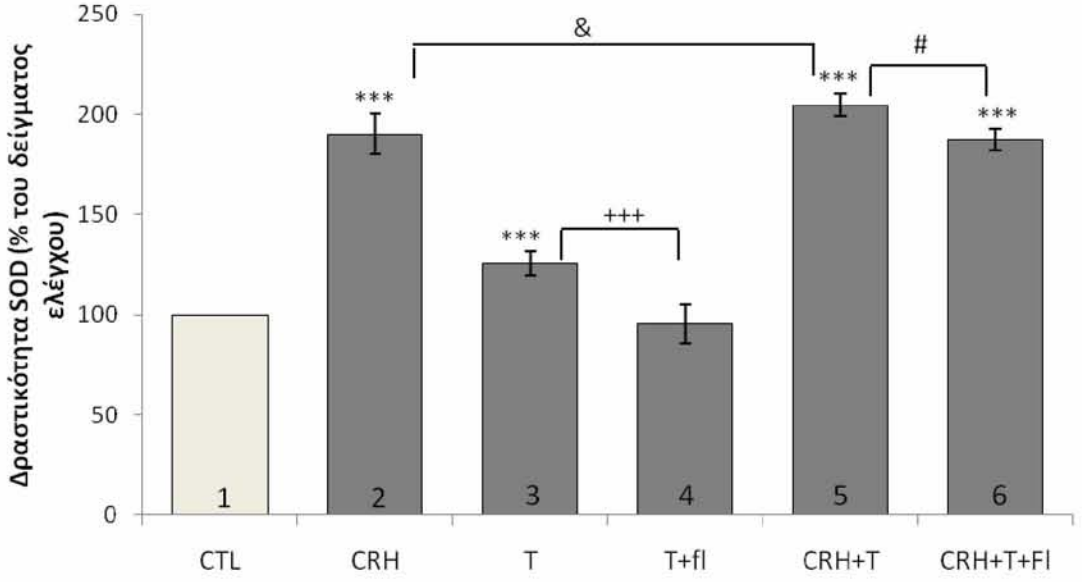
Εικόνα 47: Η επίδραση της CRH στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η παραγωγή των ROS όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 9, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς DHT, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+DHT).

Γ.3.4 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της SOD παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η CRH ασκεί σημαντική ($p<0.001$) διεγερτική δράση στη δραστηριότητα της SOD. Η έκθεση των κυττάρων στην επίδραση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

τεστοστερόνης συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου ($p<0.001$), σε σύγκριση με το κοντρόλ, δράση που εξουδετερώθηκε πλήρως από τη φλουταμίδη (Εικόνα 48, μπάρα 4). Η ταυτόχρονη επίδραση τεστοστερόνης και CRH οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας της SOD σε επίπεδα σημαντικά μεγαλύτερα σε σύγκριση με εκείνα της CRH μόνης ($p<0.05$ vs CRH, Μπάρα 5). Η επίδραση αυτή αναστάλθηκε με την προσθήκη του αναστολέα του υποδοχέα ανδρογόνων και η δραστικότητα του ενζύμου επανήλθε σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα της CRH μόνης (Εικόνα 48, Μπάρα 6).

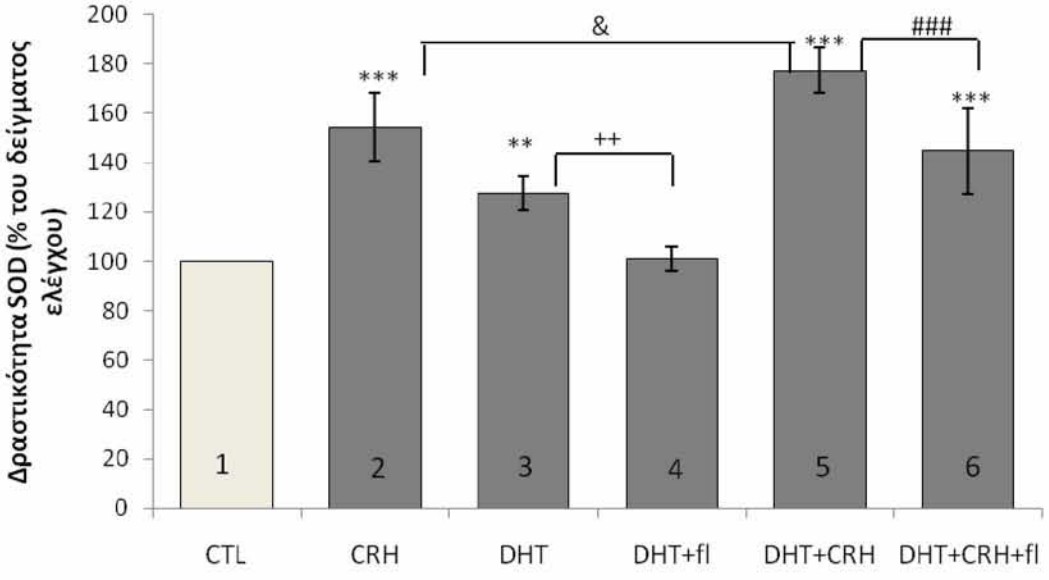


Εικόνα 48: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και τεστοστερόνης (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της SOD όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 3, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς T, $^{\&}$ $p<0.05$ ως προς CRH, $^{\#}$ $p<0.05$ ως προς CRH+T).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 49, η DHT είχε παρόμοια δράση με την τεστοστερόνη στη δραστικότητα της SOD. Προκάλεσε ισχυρή επαγωγή του ενζύμου ($p<0.01$) σε σύγκριση με το κοντρόλ, η οποία αντιστράφηκε πλήρως από τη φλουταμίδη (μπάρα 4). Ο συνδυασμός CRH με DHT προκάλεσε, παρόμοια με το συνδυασμό CRH και τεστοστερόνης, σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου ($p<0.001$ vs κοντρόλ) που ήταν επίσης σημαντικά ανώτερη αυτής που προκάλεσε η CRH μόνη ($p<0.05$ vs CRH, Μπάρα 5), υποδηλώνοντας πιθανή συνεργατική δράση των δύο παραγόντων. Η δράση αυτή της DHT αναστάλθηκε μετά τον αποκλεισμό του υποδοχέα των ανδρογόνων με φλουταμίδη (Μπάρα 6, $p<0.001$ vs DHT+CRH).

Τα ευρήματα μας δείχνουν ότι η επαγωγική δράση της CRH στη δραστικότητα της SOD ενισχύεται από τα ανδρογόνα (τεστοστερόνη και DHT) μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων.



Εικόνα 49: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της SOD, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide,

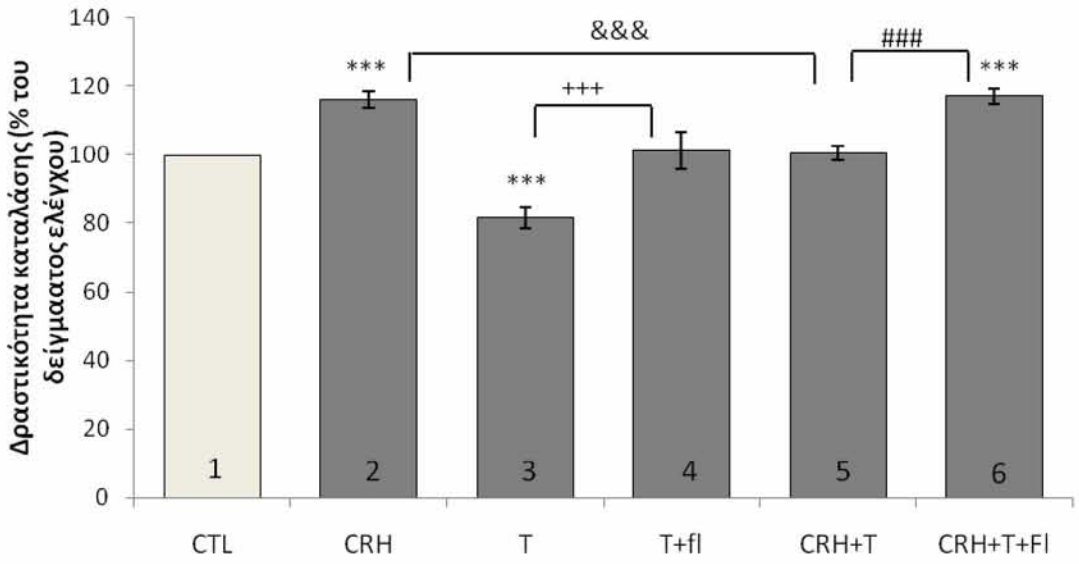
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της SOD όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 3, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: **$p<0.01$, *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{++}$ $p<0.01$ ως προς DHT, $^{\&}$ $p<0.05$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+DHT).

Γ.3.5 Επίδραση της CRH στη ρύθμιση της δραστικότητας της καταλάσης παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Όπως φαίνεται στην εικόνα 50, η τεστοστερόνη ελάττωσε σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου ($p<0.001$), δράση που αποκλείστηκε παρουσία φλουταμίδης (Εικόνα 50, μπάρα 4). Η αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου, υπό την επίδραση της CRH, επανήλθε σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του κοντρόλ όταν προστέθηκε τεστοστερόνη στο ίδιο καλλιεργητικό μέσο με τη CRH (Μπάρα 5, Εικόνα 50, $p<0.001$ vs CRH). Η ανασταλτική δράση της τεστοστερόνης στην προκαλούμενη από τη CRH διέγερση του ενζύμου εξουδετερώθηκε με τον αποκλεισμό του ανδρογονικού υποδοχέα από τη φλουταμίδη ($p<0.001$ vs CRH+T, μπάρα 6).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

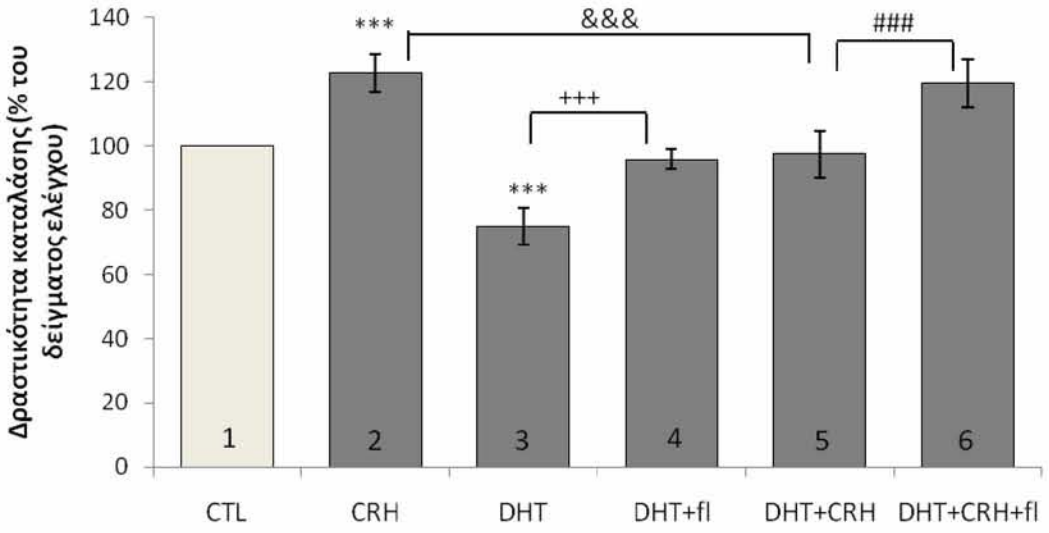


Εικόνα 50: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και τεστοστερόνης (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της καταλάσης όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 4, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37° C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς T, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+T).

Παρόμοια με την τεστοστερόνη ήταν και η επίδραση της DHT στην προ-οξειδωτική δράση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως απεικονίζεται στην εικόνα 51. Ειδικότερα, η DHT ελάττωσε σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης, σε σύγκριση με το κοντρόλ ($p<0.001$), δράση που εξουδετέρωσε η φλουταμίδη. Όπως και η τεστοστερόνη προηγουμένως, έτσι και η DHT ανέστειλε την προκαλούμενη από τη CRH αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης, επαναφέροντάς την σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του κοντρόλ (μπάρα 5), δράση που εξουδετερώθηκε από τη φλουταμίδη (μπάρα 6, Εικόνα 51).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα συνάγεται ότι τα ανδρογόνα, μέσω του μονοπατιού του ανδρογονικού υποδοχέα αναστέλλουν πλήρως την επαγωγική δράση που προκαλεί η CRH στη δραστικότητα της καταλάσης.

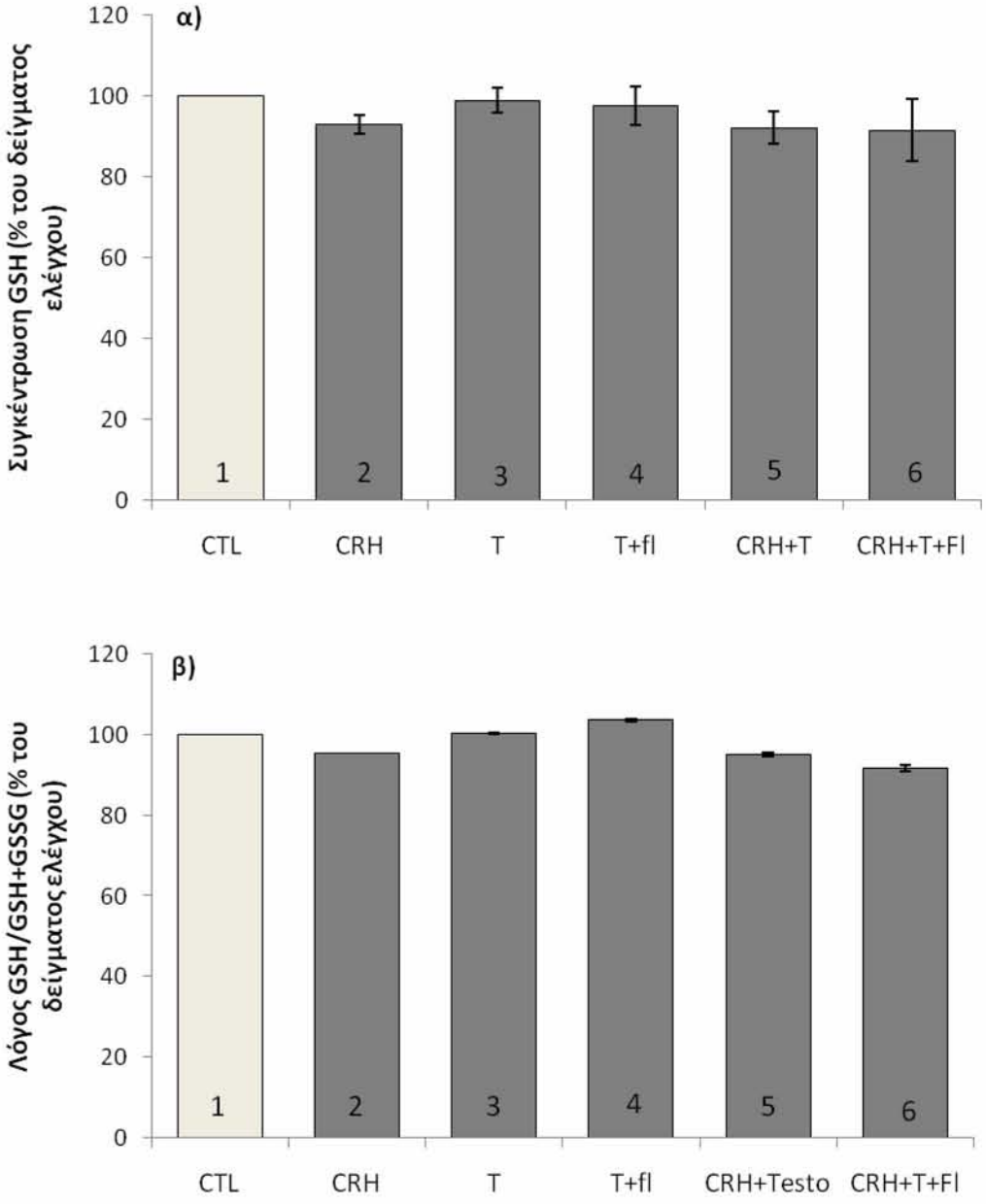


Εικόνα 51: Η επίδραση της CRH στη δραστικότητα της καταλάσης, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκε η δραστικότητα της καταλάσης όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 4, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37ο C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν. (Στατιστική σημαντικότητα: *** $p<0.001$ ως προς CTL, $^{+++}$ $p<0.001$ ως προς DHT, $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ ως προς CRH, $^{\#\#\#}$ $p<0.001$ ως προς CRH+DHT).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Γ.3.6 Επίδραση της CRH στα επίπεδα της GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG παρουσία τεστοστερόνης ή DHT

Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 52α η τεστοστερόνη δεν επηρέασε σημαντικά τη συγκέντρωση της GSH και το λόγο ανακύκλωσής της (Εικόνα 52β). Την ίδια επίδραση είχε και η CRH όπως επίσης και ο συνδυασμός CRH και τεστοστερόνης.

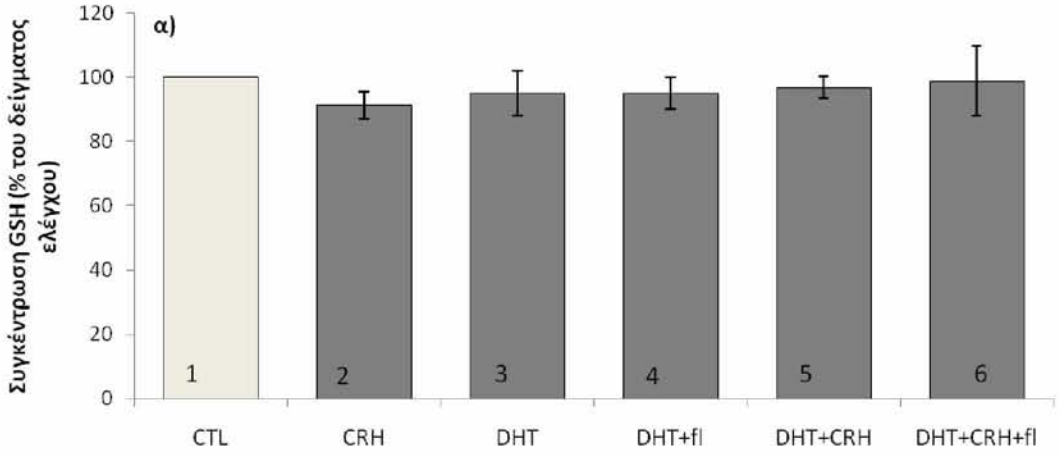


Εικόνα 52: Η επίδραση της CRH στα επίπεδα της α) GSH και του λόγου β) GSH/GSH+GSSG, παρουσία τεστοστερόνης και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία

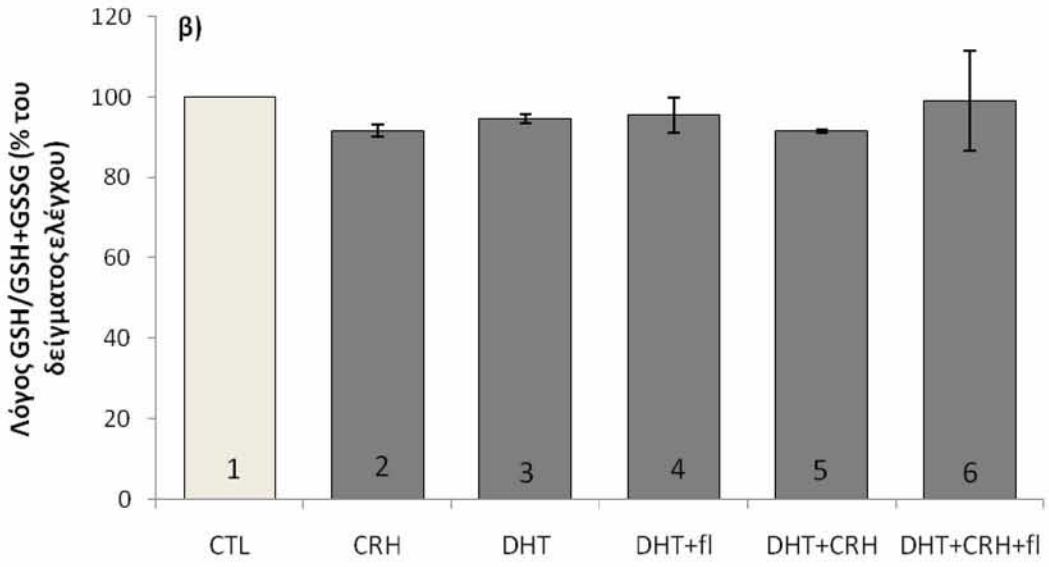
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και τεστοστερόνη (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκαν α) τα επίπεδα της GSH και β) τα επίπεδα του λόγου GSH/GSH+GSSG όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 5 και Β.6, αντίστοιχα, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37ο C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα με την τεστοστερόνη είχε, στη συγκέντρωση της GSH και στο λόγο ανακύκλωσής της, η DHT (Εικόνα 53).



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162



Εικόνα 53: Η επίδραση της CRH στα επίπεδα της α) GSH και του λόγου β) GSH/GSH+GSSG, παρουσία DHT και αναστολέα του υποδοχέα AR. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πέρασμα 4), επωάσθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στη συνέχεια επωάσθηκαν επί 2ώρου σε θρεπτικό υλικό, DMEM (δείγμα ελέγχου-control), ή σε DMEM που περιελάμβανε CRH (10^{-7}M) και DHT (0,5 nM) απουσία και παρουσία εκλεκτικού αναστολέα του AR, (fl: flutamide, φλουταμίδη) (50nM). Τα κυτταρικά λύματα συλλέχθηκαν και προσδιορίσθηκαν α) τα επίπεδα της GSH και β) τα επίπεδα του λόγου GSH/GSH+GSSG όπως αναφέρεται στην ενότητα «Β. 5 και Β.6, αντίστοιχα, Υλικά και Μέθοδοι». CTL (control): Κύτταρα που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 37ο C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε σύγκριση με τις συνθήκες κοντρόλ ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (± s.e.m) πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων που εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Δ.1 ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΣΕ Η ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΆΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης, η CRH μείωσε τη δραστικότητα της eNOS και το παραγόμενο NO ενώ αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση των ενδοκυττάριων ελευθέρων ριζών οξυγόνου και τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και καταλάση, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Το σύστημα της γλουταθειόνης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη δράση της CRH. Επίσης, ενώ φαίνεται ότι η CRH είχε άμεση επιρροή στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και καταλάση, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των ανωτέρω ενζύμων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με το γονίδιο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Η E2 αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα της eNOS και το παραγόμενο NO, τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και καταλάση καθώς και το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης GSH, GSH/GSH+GSSG, ενώ ταυτόχρονα κατέστειλε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των mRNA μεταγράφων της καταλάσης, της SOD και της GPx από τη δράση της E2.

Η E2, ασκώντας την προαναφερθείσα δράση, κατέστειλε την ανασταλτική δράση που προκάλεσε η CRH στην έκλυση του NO και τη δραστικότητα του υπεύθυνου ενζύμου eNOS, όταν οι δύο ορμόνες έδρασαν ταυτόχρονα στο ίδιο καλλιεργητικό μέσο (CRH+E2). Επίσης, η E2 ανέστειλε την επαγωγική δράση της CRH στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, προκαλώντας σημαντική μείωση. Όσον αφορά στο αντιοξειδωτικό σύστημα των EAhy926, φαίνεται ότι η επαγωγική δράση της CRH όσον αφορά στην ενεργότητα της καταλάσης ενισχύθηκε παρουσία της E2. Αντίθετα, η προκαλούμενη αύξηση της SOD από τη CRH, δεν επηρεάστηκε παρουσία E2. Τέλος, η E2 προκάλεσε επαγωγή του συστήματος της γλουταθειόνης στατιστικά σημαντικά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Η δράση της Ε2 στο προαναφερθέν πειραματικό μοντέλο, ασκήθηκε μέσω των ERα και ERβ οιστρογονικών υποδοχέων, με εξαίρεση την επαγωγή του ενζύμου SOD όπου η δράση της CRH φαίνεται να είναι επικρατής.

Δ.2 ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΣΕ Η ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΌΝΗ ΚΑΙ Η DHT ΣΤΗΝ ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΆΣΗ ΤΗΣ CRH ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης, η τεστοστερόνη και η DHT αύξησαν σημαντικά τη δραστικότητα της eNOS και το παραγόμενο NO, το οξειδωτικό φορτίο και την SOD. Ταυτόχρονα, μείωσαν σημαντικά την καταλάση ενώ δεν επηρέασαν το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

Η συμπαρουσία των δύο ανδρογόνων με τη CRH, επανέφερε τα χαμηλά επίπεδα του NO και της eNOS, σε επίπεδα συγκρίσιμα με των κυττάρων ελέγχου, αναστρέφοντας τη δράση της CRH. Επίσης, η τεστοστερόνη και η DHT δρώντας μέσω του AR, ενίσχυσαν την αύξηση που είχε προκαλέσει η CRH στη συγκέντρωση του οξειδωτικού φορτίου, καθώς και στη δραστικότητα της SOD. Τα δύο ανδρογόνα επανέφεραν τη δραστικότητα της καταλάσης σε επίπεδα αντίστοιχα του δείγματος ελέγχου, αναστέλλοντας την αύξηση της, την προκληθείσα από τη CRH. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στο σύστημα της γλουταθειόνης.

Η δράση της τεστοστερόνης και της DHT στο προαναφερθέν πειραματικό μοντέλο ασκήθηκε μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα AR.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

CRH και E2

Στο αρχικό τμήμα της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η βραχυχρόνια επίδραση της CRH στην ενδοθηλιακή οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία των EAhy926, παρουσία 17β-οιστραδιόλης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, παρατηρήσαμε ότι η E2 αναστέλλει την επαγώμενη από τη CRH αύξηση των ελευθέρων ριζών και αυξάνει τη δραστικότητα της eNOS και τα επίπεδα του NO, υποδεικνύοντας την αντιφλεγμονώδη δράση της. Επιπλέον, η E2 δεν επηρεάζει την αύξηση της δραστικότητας της SOD που προκαλεί η CRH, αλλά βελτιώνει την αδρή διεγερτική επίδραση της CRH στην καταλάση, ενισχύοντας την αύξηση της δραστικότητάς της. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι η E2 προκάλεσε σημαντική αύξηση της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG, δράση η οποία αναστάλθηκε από τη CRH. Τα επίπεδα ωστόσο της GSH και του ρυθμού ανακύκλωσής της παρέμειναν στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας δείξαμε ότι η CRH εμπλέκεται στη ρύθμιση της οξειδωτικής ισορροπίας του ενδοθηλίου σε κατάσταση ηρεμίας [28]. Ειδικότερα, βρήκαμε ότι η CRH ρυθμίζει τους αντι-φλεγμονώδεις μηχανισμούς των ενδοθηλιακών κυττάρων προάγοντας την αύξηση των ενδοκυττάριων ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ταυτόχρονα τη μείωση της δραστικότητας της eNOS και της απελευθέρωσης του NO. Παράλληλα, αυξάνει σημαντικά τη δραστικότητα της SOD και της καταλάσης, αλλά σε μικρότερο βαθμό, ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση της GSH [28].

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι η διεγερτική δράση της E2 στη δραστικότητα της eNOS και της απελευθέρωσης του NO εξουδετερώνει την ανασταλτική επίδραση της CRH στην ενδοκυτταρική eNOS και στη συγκέντρωση του NO. Αυτή η δράση φαίνεται να καταργείται από την παρουσία της φουλβεστράνης, του ειδικού αναστολέα των υποδοχέων οιστρογόνων. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη σε ενδοθηλιακά κύτταρα μήτρας όπου η αναστολή των ERs από τη φουλβεστράνη παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του συστήματος της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO/έκλυση NO [373]. Έχει προταθεί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ότι η Ε2-επαγώμενη παραγωγή του NO διενεργείται μέσω της γρήγορης φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της eNOS μέσω του MAPK-PI3K/Akt μονοπατιού [265, 374]. Επίσης, έχει προταθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα η συμμετοχή μίας παραλλαγής του υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ERα (ER46), στην ενεργοποίηση της eNOS και τη συνεπακόλουθη τάχιστη απελευθέρωση του NO. Ο υποδοχέας αυτός έχει εντοπιστεί σε εκχυλίσματα των ενδοθηλιακών κυττάρων της σειράς EAhy926 [375, 376]. Πλήθος δεδομένων αποδεικνύουν την παρουσία μεμβρανικών οιστρογονικών υποδοχέων (mERs) οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγωγή των σημάτων τους μέσω μη-γενωμικών μηχανισμών [377]. Αυτοί οι υποδοχείς ίσως να εμπλέκονται στη μεταγωγή της δράσης της Ε2 στη μελέτη μας. Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με μελέτη όπου σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα πλακούντα, που εκφράζουν δύο ERα παραλλαγές ματίσματος, βρέθηκε ότι η προαναφερόμενη ERα παραλλαγή μετάγει ταχεία (μη-γενωμική) σηματοδότηση ενώ μία άλλη παραλλαγή 66 KDa προκαλεί γενωμική (αργή) σηματοδότηση, η οποία ενεργοποιείται από την Ε2 [375]. Η σηματοδότηση από τους υποδοχείς mERs γίνεται κυρίως μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών επαγωγικών μονοπατιών που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) [378], κανάλια ιόντων [379] και υποδοχείς συνδεδεμένους με ένζυμα.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS ελέγχονται από τη δυναμική ισορροπία μεταξύ των ROS-επαγώμενων ενζύμων και των αντιοξειδωτικών ενζύμων που περιλαμβάνουν την SOD, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px). Παρατηρήσαμε, ότι η επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με Ε2 προκαλεί αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου SOD και σημαντική αύξηση της καταλάσης. Αυτή η αύξηση αναστάλθηκε πλήρως από τη φουλβεστράνη υποδεικνύοντας ότι η Ε2 ελέγχει τις δραστικότητες και των δύο ενζύμων, μέσω των δύο υποδοχέων της (ERα και ERβ). Παρόμοια δράση της Ε2 έχει αναφερθεί για τη μιτοχονδριακή SOD, σε ποντίκια, in vitro, και σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής [380]. Επίσης, η παρουσία της CRH σε ενδοθηλιακά κύτταρα προκάλεσε σημαντική αύξηση της SOD δραστικότητας και σε μικρότερο βαθμό αύξηση της καταλάσης. Αφού επωάσαμε τα ενδοθηλιακά κύτταρα με ένα μίγμα της CRH και της Ε2 μαζί, παρατηρήσαμε ότι το αποτέλεσμα ήταν η μέγιστη διέγερση της δραστικότητας των δύο ενζύμων. Η διέγερση που προκλήθηκε στην καταλάση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ακυρώθηκε από την παρουσία της φουλβεστράνης, ενώ δεν συνέβη το ίδιο και για την SOD. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της CRH μαζί με την E2 ταυτόχρονα, έχουν διαφορετική απόκριση σε σύγκριση με τη συμπεριφορά τους όταν επωαστούν με κάθε έναν παράγοντα ξεχωριστά. Απόρροια των ανωτέρω δεδομένων είναι ότι η CRH ίσως να έχει έναν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της δραστικότητας της SOD ενώ η E2 στην καταλάση, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι η CRH προκάλεσε ταυτόχρονη αύξηση της SOD δραστικότητας και της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών. Αυτή η δράση ίσως να αντικατοπτρίζει τη γρήγορη απόκριση των κυττάρων ώστε να αντισταθμίσουν το αυξημένο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο. Στην πραγματικότητα, η SOD αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων ενάντια στην αύξηση των ROS, εμποδίζοντας την απενεργοποίηση του NO και το σχηματισμό ισχυρών οξειδωτικών μορίων [372], επάγοντας την αποσύνδεση («uncoupling») της eNOS. Κατά την αποσύνδεση της eNOS η φυσιολογική ροή των ηλεκτρονίων του ενζύμου μεταβάλλεται και η eNOS παράγει $O_2^{\bullet-}$ αντί για NO. Στην παρούσα μελέτη, η παρατηρούμενη αύξηση της ενδοθηλιακής SOD από την E2 συνδέεται με πρόσφατα δεδομένα των Borras et al. [381] και Bellanti et al. [382], όπου η E2 σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της SOD. Η προσθήκη της E2 στο ίδιο καλλιεργητικό μέσο με τη CRH, φαίνεται να ενισχύει την αύξηση που προκαλεί από μόνη της η CRH στην SOD, στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926. Ωστόσο, η σύγκριση των αποτελεσμάτων μετά τη διέγερση των κυττάρων με CRH ή με CRH και E2 ταυτόχρονα και ιδιαίτερα ότι δεν άλλαξε σημαντικά η δραστικότητα της SOD μετά από την αναστολή των ERs υποδοχέων αποδυναμώνει την πιθανότητα η επίδραση της E2 στην SOD να είναι προσθετική.

Η SOD λειτουργεί συνεργιστικά με την καταλάση στη διατήρηση χαμηλών επιπέδων του H_2O_2 που προέρχεται από την καταλυτική δράση της SOD. Υπό αυτό το πρίσμα η επαγώμενη από την E2 αύξηση της SOD συνδέθηκε με την αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης η οποία ήταν συγκρίσιμη με αυτή που προκλήθηκε από την επίδραση της CRH και της E2 μαζί. Η θετική επίδραση της E2 στη δραστικότητα της καταλάσης που παρατηρήσαμε στη μελέτη μας έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα από τη μελέτη των Kirkman et al. [383], όπου σε περιφερικά μονοκύτταρα η έκφραση του mRNA της καταλάσης δεν μεταβλήθηκε από την E2.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Ίσως η επίδραση της Ε2 στην έκφραση και δραστικότητα της καταλάσης να διαμορφώνεται διαφορετικά μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με την προηγούμενη μελέτη, καθώς η παρουσία της Ε2 δεν επέφερε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης της καταλάσης στα κύτταρα EAhy926 που μελετήσαμε. Το ίδιο συνέβη και παρουσία της CRH. Οι δύο ορμόνες δεν επηρέασαν σε γονιδιακό επίπεδο την καταλάση. Ωστόσο, η μερική αναστολή στη δραστικότητα της καταλάσης μετά τον ER αποκλεισμό που παρατηρήσαμε, ίσως να υποδηλώνει τη συμμετοχή και της CRH και της Ε2 στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστικότητας. Με δεδομένο ότι η καταλυτική δραστικότητα της καταλάσης επικρατεί στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του H_2O_2 [383], υποθέτουμε ότι η Ε2 ίσως ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση σε υψηλά επίπεδα οξειδωτικού φορτίου, ενεργοποιώντας τη γλουταθειόνη (GSH).

Στο πλαίσιο της αντιοξειδωτικής άμυνας των ενδοθηλιακών κυττάρων παράλληλα με την SOD και την καταλάση, συμμετέχει και η GSH, η οποία λειτουργεί ως ένα σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο μπορεί να εξουδετερώσει τα ROS, όπως πχ τα λιπιδικά υπεροξειδιοσώματα ή το H_2O_2 μέσω της GSH-Px υπεροξειδάσης καταναλώνοντας GSH [384, 385]. Θεωρείται ως αντιοξειδωτική άμυνα δεύτερης γραμμής του κυττάρου, με την SOD και την καταλάση να αποτελούν το αρχικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα που αποβάλλει την περίσσεια οξειδωτικού φορτίου (πχ H_2O_2). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η παρουσία της Ε2 αυξάνει τη δραστικότητα της SOD αλλά περισσότερο σημαντικά αυξάνει την καταλάση. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει την ικανότητά της να μειώνει τα επίπεδα του H_2O_2. Τα χαμηλά επίπεδα του H_2O_2 μειώνουν την ενεργοποίηση της GPx χωρίς να καταναλώνεται η GSH, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου. Έτσι, δημιουργείται μία περίσσεια GSH η οποία μετράται ως αύξηση της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG. Αυτή η διεγερτική δράση της Ε2 στα επίπεδα της GSH, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Urata et al. [386], σε κύτταρα H9c2 καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα αρτηρίας βοός διεγερμένα με έναν προ-οξειδωτικό παράγοντα [387]. Έχει δειχθεί, επίσης, ότι η Ε2 σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου της GSH-Px, μέσω του μονοπατιού της MAPK [381]. Επιπλέον, η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων σε προ-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

εμμηνοπαυσιακές γυναίκες που έχουν υποστεί αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή αντέστρεψε την αύξηση που προκλήθηκε στο οξειδωτικό φορτίο και τη μείωση στην έκφραση του mRNA της GSH-Px [382]. Η μικρότερη αύξηση που προκαλεί στη GSH και στο λόγο GSH/GSH+GSSG η CRH μαζί με την E2 σε σύγκριση με την αύξηση που προκαλεί μόνη της η E2, καθώς παρατηρούμε από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ίσως να υποδηλώνει την ανασταλτική παρεμβολή της CRH στην προκαλούμενη από την E2 διέγερση μέσω των υποδοχέων της. Η παρουσία και των δύο παραγόντων (E2 και CRH) ίσως να δημιουργεί μία νέα οξειδωτική ισορροπία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της GSH και του ρυθμού ανακύκλωσής της.

Παράλληλα, μελετήσαμε την επίδραση της CRH και της οιστραδιόλης στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, καταλάση και GPx) με τη μέθοδο της ποσοτικής Real-time PCR, χωρίς ωστόσο να παρατηρήσουμε σημαντική διαφορά στα επίπεδα των mRNA τους. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το χρονικό διάστημα (2h) επώασης των κυττάρων μας με τις προαναφερθείσες ορμόνες ήταν πιθανότατα πολύ μικρό ώστε να ανιχνευθούν οποιεσδήποτε αλλαγές στο γονιδιακό επίπεδο αυτών των ενζύμων, σε σύγκριση με το κοντρόλ. Υποθέσαμε ότι ίσως απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επώασης για την ανίχνευση αλλαγών στα επίπεδα των mRNA μεταγράφων ή πρωτεϊνών των κυτταροκαλλιεργειών με RT-PCR και Western Blot, αντίστοιχα. Οι Meilhac et al. [388] βρήκαν ότι η καλλιέργεια αγγειακών κυττάρων με λιπιδικά υπεροξείδια οδήγησε στην αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της καταλάσης έπειτα από 16h, ενώ σε διαφορετική μελέτη πρότειναν ότι το χρονικό διάστημα των 6 ωρών είναι ο απαραίτητος χρόνος για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της MnSOD από κυτοκίνες [389].

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι η E2 εξασθενεί την προ-οξειδωτική επίδραση της CRH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926, διεγείροντας τη δραστικότητα της eNOS, την παραγωγή του NO και τη δραστικότητα του ενδοθηλιακού αντιοξειδωτικού ενζυμικού συστήματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η E2 αναστέλλει την προ-οξειδωτική δράση της CRH στο σύστημα των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω αμφοτέρων των οιστρογονικών υποδοχέων της.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

CRH και Τεστοστερόνη/DHT

Ο επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής, ήταν η διερεύνηση του ρόλου των ανδρογόνων (τεστοστερόνης και DHT) στην προ-οξειδωτική δράση της CRH.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, αμφότερα τα ανδρογόνα, τεστοστερόνη και DHT, ανέστειλαν την προκληθείσα από τη CRH μείωση της eNOS και του NO, ενίσχυσαν την επαγωγική δράση της CRH στην αύξηση της συγκέντρωσης των ROS και της ενεργότητας της SOD και ανέστειλαν την επαγώμενη από τη CRH αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι δεν προκάλεσαν σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση της GSH και του λόγου GSH/GSH+GSSG, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

Οι ως άνω επιδράσεις των ανδρογόνων εξουδετερώθηκαν όταν αποκλείστηκε η δράση τους από τη φλουταμίδη γεγονός που υποδηλώνει άσκηση της δράσης τους μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα. Τα ευρήματα μας συμφωνούν με τις παρατηρήσεις άλλης μελέτης σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAECs) όπου η αναστολή της αρωματάσης και του υποδοχέα ERα δεν επηρέασε την αύξηση που προκάλεσε η τεστοστερόνη στην eNOS και το NO [390], γεγονός που υποδηλώνει μη συμμετοχή της οιστραδιόλης στη δράση της τεστοστερόνης. Τα ευρήματά μας, επίσης, είναι εν μέρει σύμφωνα με εκείνα άλλης μελέτης στην οποία βρέθηκε ότι η τεστοστερόνη και η DHT, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, αύξησαν τη δραστικότητα και έκφραση της eNOS καθώς και την απελευθέρωση του NO [368]. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η τεστοστερόνη άσκησε τη δράση της εν μέρει μέσω του AR και εν μέρει μέσω της μετατροπής της σε E2, ενώ η δράση της DHT διαμεσολαβήθηκε αποκλειστικά μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα. Τα δικά μας ευρήματα δεν συνηγορούν υπέρ της δράσης της τεστοστερόνης μέσω μετατροπής της σε οιστραδιόλη δεδομένου ότι η επίδρασή της στη δραστικότητα της eNOS είναι συγκρίσιμη με εκείνη της DHT, η οποία δεν υφίσταται μετατροπή σε οιστρογόνο υπό την επίδραση της αρωματάσης. Τα αποτελέσματα μας είναι επίσης αντίθετα από εκείνα μιας άλλης in vitro μελέτης, σε κύτταρα HUVEC, όπου υπό την επίδραση υπερφυσιολογικών δόσεων τεστοστερόνης επί 48 ώρες, παρατηρήθηκε ελάττωση της έκφρασης του mRNA της eNOS και κατ' αντιστοιχία του NO [343]. Η διαφορά μας από τις παρατηρήσεις αυτές πιθανώς εξηγείται από το γεγονός του διαφορετικού χρόνου επώασης αλλά κυρίως από το ότι εμείς χρησιμοποιήσαμε φυσιολογική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

συγκέντρωση τεστοστερόνης. Έχει προταθεί ότι η δράση της τεστοστερόνης ασκείται μέσω της γρήγορης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3/Akt κινάσης και της αλληλεπίδρασης του ανδρογονικού υποδοχέα AR με το σύμπλοκο p85a/c-Src/caveolin -1, που οδηγούν στην επαγωγή της φωσφορυλίωσης της eNOS [252].

Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου από αμφότερα τα ανδρογόνα σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα της CRH υποδηλώνει δράση αντίθετη εκείνης των οιστρογόνων. Η σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου των ενδοθηλιακών κυττάρων στη συν-παρουσία ανδρογόνου και CRH, σε σύγκριση με το καθένα χωριστά, συνηγορεί υπέρ συνέργειας των ανδρογόνων με τη CRH. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με προηγούμενη δημοσίευση στην οποία η 2ωρη, in vitro, επίδραση της τεστοστερόνης, σε VSMCs κύτταρα ποντικών Wistar Kyoto (WKY), αύξησε το σχηματισμό των ROS, δράση η οποία αναστάλθηκε από τη φλουταμίδη [391]. Σχετικά με το μηχανισμό δράσης, δεδομένα στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι ορισμένες από τις δράσεις της τεστοστερόνης δεν στηρίζονται στην ενεργοποίηση του κλασικού ανδρογονικού υποδοχέα AR [294, 342, 391, 392]. Οι Barton et al. [342] υπέθεσαν ότι μέσω του υποδοχέα GPCR6A, που ανήκει στην οικογένεια των G πρωτεϊνών, η τεστοστερόνη ασκεί την πιθανή μη γενωμική δράση στην αύξηση των ROS στη μελέτη των Chignalia et al. [391]. Η παραδοχή αυτή δικαιολογεί το ότι στη μελέτη μας παρατηρήθηκε επίδραση των ανδρογόνων εντός δύο ωρών, χρόνου σχετικά περιορισμένου για τη γενωμική έκφραση δράσης μέσω του κλασσικού AR.

Είναι ενδιαφέρον ότι η τεστοστερόνη και η DHT αύξησαν περισσότερο την παραγωγή των ROS παρουσία της CRH, στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι η τεστοστερόνη, όταν υπάρχει ήδη αυξημένο οξειδωτικό φορτίο στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, ενισχύει το οξειδωτικό ερέθισμα. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με παρόμοια μελέτη στην οποία η 2ωρη επίδραση της τεστοστερόνης σε VSMCs κύτταρα υπερτασικών ποντικών οδήγησε σε αύξηση των ROS, σε βαθμό μεγαλύτερο εν συγκρίσει με αντίστοιχα κύτταρα φυσιολογικών ποντικών [391].

Ανάμεσα στις ποικίλες δράσεις της τεστοστερόνης στο καρδιαγγειακό συγκαταλέγονται και οι άμεσες δράσεις που σχετίζονται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, και η μείωση της έκφρασης του γονιδίου της eNOS και της παραγωγής του NO [343, 368, 391] υποδεικνύοντας ίσως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

έναν προ-οξειδωτικό ρόλο της τεστοστερόνης στο καρδιαγγειακό σύστημα σε δόσεις υψηλότερες του φυσιολογικού. Το γεγονός ότι στη μελέτη μας βρήκαμε ότι η αύξηση των ROS από την τεστοστερόνη δεν συνοδεύτηκε από μείωση της ενεργότητας της eNOS και του εκλυόμενου NO πιθανώς υποδηλώνει μια διαφορετική ρύθμιση στα κύτταρα της μελέτης μας και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ανδρογόνου. Στη μελέτη μας, η ταυτόχρονη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και της δραστικότητας της eNOS πιθανώς σημαίνει μετάβαση της προ-οξειδωτικής κατάστασης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε υψηλότερο λειτουργικό επίπεδο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η τεστοστερόνη και η DHT διεγείρουν σημαντικά τη δραστικότητα της SOD. Το γεγονός ότι ο συνδυασμός CRH και ανδρογόνου αυξάνει τη δραστικότητα του ενζύμου σημαντικά περισσότερο από ότι ο καθένας παράγοντας ξεχωριστά υποδηλώνει πιθανή συνεργική δράση. Η ταυτόχρονη αύξηση της SOD με τη δραστικότητα της eNOS και των ριζών οξυγόνου από τα ανδρογόνα ενισχύουν την άποψη της μετακίνησης της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας σε υψηλότερο λειτουργικό επίπεδο. Η αύξηση της SOD από την τεστοστερόνη, στην παρούσα μελέτη, έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα των Skogastierra et al., σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα [343]. Ωστόσο αυτό μπορεί να αποδοθεί στις μεγάλες συγκεντρώσεις τεστοστερόνης που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη. Η θετική επίδραση των ανδρογόνων στη δραστικότητα της SOD ενισχύεται από τις παρατηρήσεις του Zhang et al. [393], οι οποίοι έδειξαν ότι οι δραστικότητες των ενζύμων SOD και GPx μειώθηκαν σε καρδιομυοκύτταρα υπογοναδικών ποντικών, δράση που αποκαταστάθηκε μετά τη χορήγηση τεστοστερόνης. Αντίθετα, οι Klapcinska et al. [394], δεν παρατήρησαν αποκατάσταση του αντιοξειδωτικού συστήματος έπειτα από θεραπεία υποκατάστασης τεστοστερόνης σε ιστούς αριστερής κοιλίας υπογοναδικών ποντικών. Τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η συγκέντρωση της τεστοστερόνης πιθανώς ρυθμίζει την ενεργότητα της ενδοκυτταρικής οξειδωτικής ισορροπίας που ίσως επηρεάζεται από το είδος των κυττάρων.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα ανδρογόνα ενώ διεγείρουν το σύστημα της SOD προκαλούν αναστολή στη δραστικότητα του συστήματος της καταλάσης το οποίο αποτελεί βασικό αντιοξειδωτικό βραχίονα του κυττάρου. Ενδιαφέρον αποτελεί επίσης το γεγονός ότι η ανασταλτική δράση των ανδρογόνων στη δραστικότητα της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

καταλάσης εκφράστηκε και μέσω της εξουδετέρωσης της διεγερτικής δράσης της CRH στην καταλάση, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν με την παρουσία ανδρογόνων. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει πιθανή ανταγωνιστική δράση μεταξύ CRH και ανδρογόνων στη ρύθμιση της δραστικότητας της καταλάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρόλο που στη βιλβιογραφία τα δεδομένα για τη δράση της τεστοστερόνης ή της DHT στην ενεργότητα της καταλάσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα είναι περιορισμένα, μία μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου της καταλάσης, in vitro, σε κύτταρα HUVEC's μειώνεται υπό την 8ωρη επίδραση αυξημένων συγκεντρώσεων τεστοστερόνης [343]. Αυτή η μείωση στη γονιδιακή έκφραση της καταλάσης συνάδει με την παρατηρούμενη μείωση της δραστικότητας του ενζύμου, στη μελέτη μας. Επίσης, έχει δειχθεί ότι σε ομογενοποιημένους ιστούς καρδιάς υπογοναδικών ποντικών η ενεργότητα της καταλάσης καθώς και η συγκέντρωση της γλουταθειόνης δεν είχαν σημαντική μεταβολή [395].

Τέλος, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της μελέτης μας δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της γλουταθειόνης και του ρυθμού ανακύκλωσής της παρουσία τεστοστερόνης και DHT, ούτε μεταβλήθηκε σημαντικά η αντίστοιχη επίδραση της CRH στο σύστημα της γλουταθειόνης. Είναι πιθανόν να απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης των κυττάρων στα συγκεκριμένα ανδρογόνα ώστε να ανιχνευθούν μεταβολές στο αντιοξειδωτικό σύστημα της GSH.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η τεστοστερόνη και η DHT ασκούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα αύξηση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (προ-οξειδωτική δράση) μέσω της διέγερσης της eNOS και της παραγωγής NO και παράλληλη αύξηση της δραστικότητας της SOD αλλά μείωση στη δραστικότητα της καταλάσης, υποδηλώνοντας μετακίνηση της προ-οξειδωτικής κατάστασης του ενδοθηλίου σε υψηλότερο λειτουργικό επίπεδο. Επίσης, τα ανδρογόνα ενεργούν συνεργιστικά με τη CRH στην αύξηση του οξειδωτικού φορτίου και ταυτόχρονα, της αντιοξειδωτικής δραστικότητας της SOD ενώ μειώνουν την προκαλούμενη από τη CRH αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης. Επιπλέον, η συνδυαστική δράση των ανδρογόνων και της CRH οδηγεί σε επαναφορά της ελαττωμένης δραστικότητας της eNOS που προκαλεί η CRH και της αυξημένης δραστικότητας του ενζύμου που προκαλούν τα ανδρογόνα. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στην έκλυση του NO. Η μεταβολή αυτή της δραστικότητας της eNOS και της παραγωγής NO πιθανώς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

υποδηλώνει ανασταλτική δράση της CRH στην προκαλούμενη από τα ανδρογόνα σημαντική αύξησή τους.

Τελικό συμπέρασμα- Μελλοντική προσέγγιση

Υπό το φως των ευρημάτων μας προτείνεται ότι τα οιστρογόνα αντισταθμίζουν την προ-φλεγμονώδη δραστηριότητα της CRH διατηρώντας το ενδοκυτταρικό ενδοθηλιακό περιβάλλον σε επίπεδο οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Αντίθετα, τα ανδρογόνα φαίνεται ότι αυξάνουν την προ-φλεγμονώδη δράση της CRH μετακινώντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία του ενδοθηλίου σε υψηλότερο λειτουργικό επίπεδο. Η εξουδετέρωση της διεγερτικής δράσης των ανδρογόνων στη δραστικότητα της eNOS και την παραγωγή του NO από την CRH υποδηλώνει πιθανή ρυθμιστική επίδραση της τελευταίας στο λειτουργικό επίπεδο της προ-οξειδωτικής κατάστασης του ενδοθηλίου. Για την αποσαφήνιση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης απαιτούνται πρόσθετες μελέτες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1]. Tsigos C, Kyrou I, Kassi E, Chrousos, GP. Stress, endocrine physiology and pathophysiology. In Feingold KR et al. Endotext [Internet]. Comprehensive FREE Online Endocrinology Book. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2016. p. 119.

[2]. Arck P, Slominski A, Theoharides T, Peters E, Paus R. Neuroimmunology of Stress: Skin Takes Center Stage. Journal of Investigative Dermatology, 126(8). 2006: p. 1697-1704.

[3]. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. Psychopharmacology (Berl), 233 (9). 2016: p. 1637-50.

[4]. Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. JAMA, 298(14). 2007: p. 1685-7.

[5]. Liu YZ, Wang YX, Jiang CL. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. Front Hum Neurosci, 11. 2017: p. 316.

[6]. Binsiya T.K , Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Hyder I, Manimaran A, Lees A.M, Gaughan J.B and Bhatta R. Significance of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis to adapt to climate change in livestock. Int Res J of Agricutlural and food sciences, 2(1). 2017: p. 1-20.

[7]. Cameron V, Fleming A. Novel Sites of Adrenomedullin Gene Expression in Mouse and Rat Tissues1. Endocrinology, 139(5). 1998: p. 2253-2264.

[8]. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2CRF receptors. J Comp Neurol, 415(3). 1999: p. 285-312.

[9]. Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, Blount AL, Vale WW. Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide abd glucocorticoids. Endocrinology, 140(12). 1999: p. 5651-8.

[10]. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

urocortin, and CRH receptors. FASEB J, 15(10). 2004: p. 1678-1693.

[11]. Seres J, Bornstein S, Seres P, Willenberg H, Schulte K, Scherbaum W, Ehrhart-Bornstein M. Corticotropin-Releasing Hormone System in Human Adipose Tissue. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(2). 2004: p. 965-970.

[12]. Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W. Urocortin II gene is higly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR)1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. Endocrinology, 145(5). 2004: p. 2445-2457.

[13]. Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. Nat Med, 7(5). 2001: p. 605-611.

[14]. Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H. Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. Peptides, 26(7). 2005: p. 1196-1206.

[15]. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Saruta M, Nakabayashi M, Suzuki T, Sasano H, Shibahara S. Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney. J Clin Endocrinol Metab, 89(4). 2004: p. 1897-1903.

[16]. Takefuji M, Murohara T. Corticotropin-Releasing hormone family and their recpetors in the cardiovascular system. Circ J, 83(2). 2019: p. 261-266.

[17]. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science, 213(4514). 1981: p. 1394-1397.

[18]. Lowry C, Moore F. Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. General and Comparative Endocrinology, 146(1). 2006: p. 19-27.

[19]. Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, Nemeroff CB. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. J Neurosci, 6(10). 1986.

[20]. Morin S, Ling N, Liu X, Kahl S, Gehlert D. Differential distribution of

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. Neuroscience, 92(1). 1999: p. 281-291.

[21]. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. Distribution and Characterization of Immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor in Human Tissues. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 59(5). 1984: p. 861-866.

[22]. Brouxhon S, Prasad A, Joseph S, Felten D, Bellinger D. Localization of Corticotropin-Releasing Factor in Primary and Secondary Lymphoid Organs of the Rat. Brain, Behavior, and Immunity, 12(2). 1998: p. 107-122.

[23]. Sato H, Igarashi H, Kishimoto Y, Yamaguchi K, Saito T, Ishida H, Okada K, Okano T. Combined tumor consisting of non-functioning adrenocortical adenoma and pheochromocytoma in the same gland. International Journal of Urology, 9(7). 2002: p. 398-401.

[24]. Jessop D, Cunnah D, Millar J, Neville E, Coates P, Doniach I, Besser G, Rees L. A phaeochromocytoma presenting with Cushing's syndrome associated with increased concentrations of circulating corticotrophin-releasing factor. Journal of Endocrinology, 113(1). 1987: p. 133-NP.

[25]. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Mitsiades N, Margioris A, Chrousos G, Gravanis A. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. Biochemical Pharmacology, 65(6). 2003: p. 917-921.

[26]. Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, Chanalaris A, Townsend PA, Carroll CJ, Hubank M, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression. Faseb J, 17(15). 2003: p. 2313-15.

[27]. Baigent S. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. Peptides, 22(5). 2001: p. 809-820.

[28]. Gougoura S, Liakos P, Koukoulis G. Effect of CRH on NO bioavailability, ROS production and antioxidant defense systems in endothelial EAhy926 cells. Free Radical Research, 44(7). 2010: p. 803-812.

[29]. Zhao L, Donaldson C, Smith G, Vale W. The Structures of the Mouse and Human Urocortin Genes (Ucn and UCN). Genomics, 50(1). 1998: p. 23-33.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[30]. Chen Y, Hatalski C, Brunson K, Baram T. Rapid phosphorylation of the CRE binding protein precedes stress-induced activation of the corticotropin releasing hormone gene in medial parvocellular hypothalamic neurons of the immature rat. Molecular Brain Research, 96(1-2). 2001: p. 39-49.

[31]. Seth K, Majzoub J. Repressor Element Silencing Transcription Factor/Neuron-restrictive Silencing Factor (REST/NRSF) Can Act as an Enhancer as Well as a Repressor of Corticotropin-releasing Hormone Gene Transcription. Journal of Biological Chemistry, 276(17). 2001: p. 13917-13923.

[32]. Ramkumar T, Adler S. A Requirement for the POU Transcription Factor, Brn-2, in Corticotropin-Releasing Hormone Expression in a Neuronal Cell Line. Molecular Endocrinology, 13(8). 1999: p. 1237-1248.

[33]. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 90(19). 1993: p. 8967-71.

[34]. Liaw C, Lovenberg T, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis D, de Souza E. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. Endocrinology, 137(1). 1996: p. 72-77.

[35]. Arai M, Assil I, Abou-Samra A. Characterization of Three Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Catfish: A Novel Third Receptor Is Predominantly Expressed in Pituitary and Urophysis12. Endocrinology, 142(1). 2001: p. 446-454.

[36]. Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. Pharmacol Rev 55(1). 2003: p. 21-26.

[37]. Reyes T, Lewis K, Perrin M, Kunitake K, Vaughan J, Arias C, Hogenesch J, Gulyas J, Rivier J, Vale W, Sawchenko P. Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(5). 2001: p. 2843-2848.

[38]. Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM. Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. J

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Pharmacol Exp Ther 306(2). 2003: p. 794-803.

[39]. Reubi J, Waser B, Vale W, Rivier J. Expression of CRF1 and CRF2 Receptors in Human Cancers. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(7). 2003: p. 3312-3320.

[40]. Chatzaki E, Crowe P, Wang L, Million M, Tache Y, Grigoriadis D. CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. Journal of Neurochemistry, 90(2). 2004: p. 309-316.

[41]. Lovenberg T, Chalmers D, Liu C, De Souza E. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. Endocrinology, 136(9). 1995: p. 4139-4142.

[42]. Perrin M, Vale W. Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family. Annals of the New York Academy of Sciences, 885(1). 2006: p. 312-328.

[43]. Kostich W, Chen A, Sperle K, Largent B. Molecular Identification and Analysis of a Novel Human Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptor: The CRF2γReceptor. Molecular Endocrinology, 12(8). 1998: p. 1077-1085.

[44]. Suda T, Tozawa F, Dobashi I, Horiba N, Ohmori N, Yamakado M, Yamada M, Demura H. Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro. Journal of Clinical Investigation, 92(6). 1993: p. 2790-2795.

[45]. Im E. Corticotropin-Releasing hormone and its biological diversity towards angiogenesis. Intest Res, 12(2). 2014: p. 96-102.

[46]. Valentino R, Van Bockstaele E, Bangasser D. Sex-specific cell signaling: the corticotropin-releasing factor receptor model. Trends in Pharmacological Sciences, 34(8). 2013: p. 437-477.

[47]. Dautzenberg F, Hauger R. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. Trends in Pharmacological Sciences, 23(2). 2002: p. 71-77.

[48]. Kageyama K, Bradbury M, Zhao L, Blount A, Vale W. Urocortin Messenger Ribonucleic Acid: Tissue Distribution in the Rat and Regulation in Thymus by Lipopolysaccharide and Glucocorticoids1. Endocrinology, 140(12). 1999: p. 5651-5658.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[49]. Coste S, Heldwein K, Stevens S, Tobar-Dupres E, Stenzel-Poore M. IL-1α and TNFα Down-Regulate CRH Receptor-2 mRNA Expression in the Mouse Heart. Endocrinology, 142(8). 2001: p. 3537-3545.

[50]. Grigoriadis S, Kaplan A, Carter J, Woodside B. What treatments patients seek after inpatient care: A follow-up of 24 patients with anorexia nervosa. Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia. Bulimia and Obesity, 6(3). 2001: p. 115-120.

[51]. Halmos G, Schally A, Pinski J, Vadillo-Buenfil M, Groot K. Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(6). 1996: p. 2398-2402.

[52]. Chen A, Perrin M, DiGruccio M, Vaughan J, Brar B, Arias C, Lewis K, Rivier J, Sawchenko P, Vale W. A soluble mouse brain splice variant of type 2 corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(7). 2005: p. 2620-2625.

[53]. Catalano RD, Kyriakou T, Chen J, Easton A, Hillhouse EW. Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splcing: identification of multiple splice variants. Mol Endocrinol, 17(3). 2003: p. 395-410.

[54]. Suda T, Iwashita M, Tozawa F, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K. Characterization of Corticotropin-Releasing Hormone Binding Protein in Human Plasma by Chemical Cross-Linking and its Binding during Pregnancy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 67(6). 1988: p. 1278-1283.

[55]. Westphal NJ, Seasholtz AF. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. Front Biosci, 11. 2006: p. 1878-91.

[56]. Chatzaki E, Margioris A, Gravanis A. Expression and regulation of corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP) in rat adrenals. Journal of Neurochemistry, 80(1). 2002: p. 81-90.

[57]. Rivier J, Rivier C, Vale W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. Science, 224(4651). 1984: p. 889-891.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[58]. Miranda A, Koerber S, Gulyas J, Lahrichi S, Craig A, Corrigan A, Hagler A, Rivier C, Vale W, Rivier J. Conformationally Restricted Competitive Antagonists of Human/Rat Corticotropin-Releasing Factor. Journal of Medicinal Chemistry, 37(10). 1994: p. 1450-1459.

[59]. Rivier J, Gulyas J, Kirby D, Low W, Perrin M, Kunitake K, DiGruccio M, Vaughan J, Reubi J, Waser B, Koerber S, Martinez V, Wang L, Taché Y, Vale W. Potent and Long-Acting Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor 2 Selective Peptide Competitive Antagonists. Journal of Medicinal Chemistry, 45(21). 2002: p. 4737-4747.

[60]. Ruhmann A, Bonk I, Lin C, Rosenfeld M, Spiess J. Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): Development of CRFR2 -selective antisauvagine-30. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(26). 1998: p. 15264-15269.

[61]. Smagin G, Heinrichs S, Dunn A. The role of CRH in behavioral responses to stress. Peptides, 22(5). 2001: p. 713-724.

[62]. Dunn A, Berridge C. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? Brain Research Reviews, 15(2). 1990: p. 71-100.

[63]. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder R, Chrousos G. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. Science, 254(5030). 1991: p. 421-423.

[64]. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL. Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. Brain Behav Immun, 4(1). 1990: p. 67-73.

[65]. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, Friedman TC, Epps HR, Remmers EF, Mathern P, Chrousos GP, Wilder RL. Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Immunol 151(3). 1993: p. 1587-96.

[66]. Crofford L, Sano H, Karalis K, Webster E, Goldmuntz E, Chrousos G, Wilder R. Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. Journal of Clinical Investigation, 90(6). 1992: p. 2555-2564.

[67]. Scopa CD, Mastorakos G, FriedmanTC, Melachrinou M, Merino MJ, Chrousos

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

GP. Presence of immunoreactive corticotropin releasing hormone in thyroid lesions. Am J Pathol, 145(5). 1994: p. 1159-67.

[68]. van Tol E, Petrusz P, Lund P, Yamauchi M, Sartor R. Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. Gut, 39(3). 1996: p. 385-392.

[69]. Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. Proc Natl Acad Sci U S A 90. 1993: p. 7104-8.

[70]. Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone and cortisol molecules in invertebrate haemocytes and lower and higher vertebrate thymus. Histochem, 30(2). 1998: p. 61-7.

[71]. Grino M, Chrousos GP, Margioris AN. The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. Biochem Biophys Res Commun, 148(3). 1987: p. 1208-1214.

[72]. Mastorakos G, Scopa C, Kao L, Chrousos GP. Presence of immunoreactive CRH in human endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1996: p. 1046-1050.

[73]. Fabbri A, Tinajero J, Dufau M. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. Endocrinology, 127. 1990: p. 1541-1543.

[74]. Ferrari A, Petraglia F, Gurpide E. Corticotropin-releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progestin. J steroid Biochem Mol Biol, 54(5-6). 1995: p. 251-255.

[75]. Kravchenco I, Furalev V. Secretion of Immunoreactive Corticotropin Releasing Factor and Adrenocorticotropic Hormone by T- and B-Lymphocytes in Response to Cellular Stress Factors. Biochemical and Biophysical Research Communications, 204(2). 1994: p. 828-834.

[76]. Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. J Leukoc Biol, 77(4). 2005: p. 487-495.

[77]. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(3). 2005: p. 281-286.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[78]. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation at the inflammatory site. Crit Rev Immunol, 9(4). 1989: p. 313-362.

[79]. Cronkite DA, Strutt TM. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. J Immunol Res. 2018.

[80]. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. Injury, 38(12). 2007: p. 1336-1345.

[81]. Jubin V, Ventre E, Leverrier Y, Djebali S, Mayol K, Tomkowiak M et al. T inflammatory memory CD8 T cells participate to antiviral response and generate secondary memory cells with an advantage in XCL1 production. Immunol Res, 52(3). 2012: p. 284-293.

[82]. Barbera Betancourt A, Lyu Q, Broere F, Sijts A, Rutten VPMG, van Eden W. T Cell-Mediated Chronic Inflammatory Diseases Are Candidates for Therapeutic Tolerance Induction with Heat Shock Proteins. Front Immunol, 8. 2017: p. 1408.

[83]. Dumitru C, Kabat AM, Maloy KJ. Metabolic Adaptations of CD4+ T Cells in Inflammatory Disease. Front Immunol, 9. 2018: p. 540.

[84]. Cavaillon JM. Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms. Pathol Biol (Paris), 41(8). 1993: p. 799-811.

[85]. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond), 116(3). 2009: p. 219-30.

[86]. Yoshida L, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H2O2-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor-α. International Immunopharmacology, 8(10). 2008: p. 1377-1385.

[87]. Zhang C, Hein T, Wang W, Ren Y, Shipley R, Kuo L. Activation of JNK and xanthine oxidase by TNF-α impairs nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 40(2). 2006: p. 247-257.

[88]. Jessop D, Harbuz M, Lightman S. CRH in chronic inflammatory stress. Peptides, 22(5). 2001: p. 803-807.

[89]. Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Front Neuroendocrinol 15. 1994: p. 321-50.

[90]. Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis K. Corticotropin-Releasing Hormone Deficiency Is Associated with Reduced Local Inflammation in a Mouse Model of Experimental Colitis. Endocrinology, 149(7). 2008: p. 3403-3409.

[91]. Kempuraj D, Papadopoulou N, Lytinas M, Huang M, Kandere-Grzybowska K, Madhappan B, et al. Corticotropin-Releasing Hormone and Its Structurally Related Urocortin Are Synthesized and Secreted by Human Mast Cells. Endocrinology, 145(1). 2004: p. 43-48.

[92]. Casadevall M, Saperas E, Panés J, Salas A, Anderson D, Malagelada J, Piqué J. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of central corticotropin-releasing factor. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 276(4). 1999: p. G1016-G1026.

[93]. Jain V, Vedernikov Y, Saade G, Chwalisz K, Garfield R. Endothelium-dependent and -independent mechanisms of vasorelaxation by corticotrophin-releasing factor in pregnant rat uterine artery. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 288(2). 1999: p. 407-13.

[94]. Fisher L, Jessen G, Brown M. Corticotropin-releasing factor (CRF): mechanism to elevate mean arterial pressure and heart rate. Regulatory Peptides, 5(2). 1983: p. 153-161.

[95]. Gardiner S, Bennett T. Cardiac baroreflex sensitivities in conscious, unrestrained, Long Evans and Brattleboro rats. Journal of the Autonomic Nervous System, 23(3). 1988: p. 213-219.

[96]. Lumpkin MD. The regulation of ACTH secretion by IL-1. Science, 238(4826). 1987: p. 452-454.

[97]. Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris A.. Corticotropin-releasing Hormone Induces Fas Ligand Production and Apoptosis in PC12 Cells via Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase. Journal of Biological Chemistry, 277(14). 2002: p. 12280-12287.

[98]. Zhao J, Karalis K. Regulation of Nuclear Factor-κB by Corticotropin-Releasing Hormone in Mouse Thymocytes. Molecular Endocrinology, 16(11). 2002: p. 2561-2570.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[99]. Zbytek B, Pfeffer L, Slominski A. CRH inhibits NF-κB naling in human melanocytes. Peptides, 27(12). 2006: p. 3276-3283.

[100]. Karalis K, Venihaki M, Zhao J, van Vlerken L, Chandras C. NF-κB Participates in the Corticotropin-releasing, Hormone-induced Regulation of the Pituitary Proopiomelanocortin Gene. Journal of Biological Chemistry, 279(12). 2004: p. 10837-10.

[101]. Androulidaki A, Dermitzaki E, Venihaki M, Karagianni E, Rassouli O, Andreakou E, et al. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. Molecular Cancer, 8(1). 2009: p. 30.

[102]. Bale T, Giordano F, Hickey R, Huang Y, Nath A, Peterson K, Vale W, Lee K. Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(11). 2002: p. 7734-773.

[103]. Webster E, Battaglia G, De Souza E. Functional corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in mouse spleen: Evidence from adenylate cyclase studies. Peptides, 10(2). 1989: p. 395-401.

[104]. Webster E, Tracey D, Jutila M, Wolfe S, De Souza E. Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Mouse Spleen: Identification of Receptor-Bearing Cells as Resident Macrophages. Endocrinology, 127(1). 1990: p. 440-452.

[105]. Kavelaars A, Berkenbosch F, Croiset G, Ballieux R, Heijnen C. Induction of β-Endorphin Secretion by Lymphocytes after Subcutaneous Administration of Corticotropin-Releasing Factor. Endocrinology, 126(2). 1990: p. 759-764.

[106]. Radulovic M, Dautzenberg FM, Sydow S, Radulovic J, Spiess J. Corticotropin-releasing factor receptor 1 in mouse spleen: expression after immune stimulation and identification of receptor-bearing cells. J Immunol, 162(5). 1999: p. 3013-21.

[107]. Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(7). 2005: p. 995-1014.

[108]. Audhya T, Jain R, Hollander C. Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. Cellular Immunology, 134(1). 1991: p. 77-84.

[109]. Singh V, Leu S. Corticotropin-releasing factor-induced production of cyclic

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

AMP by human peripheral blood immunocytes. Immunology Letters, 35(3). 1993: p. 239-245.

[110]. Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Seretakis D, Green M, Theoharides TC. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. J Pharmacol Exp Ther, 288(3). 1999: p. 1349-56.

[111]. Baigent S. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. Journal of Molecular Endocrinology, 25(1). 2000: p. 43-52.

[112]. Webster EL, Barrientos RM, Contoreggi C, Isaac MG, Ligier S, Gabry KE, Chrousos GP, McCarthy EF, Rice KC, Gold PW, Sternberg EM. Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. J Rheumatol, 29(6). 2002: p. 1252-61.

[113]. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. Infect Immun 70. 2002: p. 6068-74.

[114]. Wlk M, Wang C, Venihaki M, Liu J, Zhao D, Anton P, Mykoniatis A, Pan A, Zacks J, Karalis K, Pothoulakis C. Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum. Gastroenterology, 123(2). 2002: p. 505-515.

[115]. Kawahito Y, Sano H, Mukai S, Asai K, Kimura S, Yamamura Y, Kato H, Chrousos G, Wilder R, Kondo M. Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. Gut, 37(4). 1995: p. 544-551.

[116]. Poliak S, Mor F, Conlon P, Wong T, Ling N, Rivier J, Vale W, Steinman L. Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropin-releasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. J Immunol, 158(12). 1997: p. 5751-6.

[117]. Tsagarakis S, Grossman A. Corticotropin-Releasing Hormone: Interactions with the Immune System. Neuroimmunomodulation, 1(6). 1994: p. 329-334.

[118]. Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P. Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

urocortin. Am J Physiol 275. 1998: p. E757-62.

[119]. Singh V. Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. Journal of Neuroimmunology, 23(3). 1989: p. 257-262.

[120]. Singh V, Leu S. Enhancing effect of corticotropin-releasing neurohormone on the production of interleukin-1 and interleukin-2. Neuroscience Letters, 120(2). 1990: p. 151-154.

[121]. Leu S, Singh V. Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor. Cellular Immunology, 143(1). 1992: p. 220-227.

[122]. Genedani S, Bernardi M, Baldini M, Bertolini A. Influence of CRF and α-MSH on the migration of human monocytes in vitro. Neuropeptides, 23(2). 1992: p. 99-102.

[123]. Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, Cossarizza A, Franceschi C, Muscettola M, Genazzani A, Surico N, Genazzani A. Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. Life Sciences, 53(23). 1993: p. 1735-1742.

[124]. Carr D, DeCosta B, Jacobson A, Rice K, Blalock J. Corticotropin-releasing hormone augments natural killer cell activity through a naloxone-sensitive pathway. Journal of Neuroimmunology, 28(1). 1990: p. 53-61.

[125]. Theoharides TK, Singh L, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, Chrousos G. Corticotropin-Releasing Hormone Induces Skin Mast Cell Degranulation and Increased Vascular Permeability, A Possible Explanation for Its Proinflammatory Effects1. Endocrinology, 139(1). 1998: p. 403-413.

[126]. Cantarella G, Lempereur L, Lombardo G, Chiarenza A, Pafumi C, Zappalà G, Bernardini R. Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. British Journal of Pharmacology, 134(4). 2001: p. 837-844.

[127]. Behrendt D, Ganz P. Endothelium Function: From vascular Biology to Clinical Implications. Am J Cardio, 90(10C). 2002: p. 40L-48L.

[128]. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation, 109(21). 2004: p. 27-33.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[129]. Santiago-Delpín E, Juan S. The endothelium and early immune activation: New perspective and interactions. Transplantation Proceedings, 36(6). 2004: p. 1709-1713.

[130]. Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R, Yang Z. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. J Pineal Res. 2008: p. 44(1): 107-14.

[131]. Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm A. Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. Br J Pharmacol, 114(8). 1995: p. 1621-1624.

[132]. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med, 329(27). 1993: p. 2002-2012.

[133]. Cockcroft J. Exploring Vascular Benefits of Endothelium-Derived Nitric Oxide. American Journal of Hypertension, 18(12). 2005: p. 177-183.

[134]. Sopi RB, Zaidi SI, Mladenov M, Sahiti H, Istrefi Z, Gjorgoski I et al. L-citrulline supplementation reverses the impaired airway relaxation in neonatal rats exposed to hyperoxia. Respir Res. 2012: p. 13-68.

[135]. Kielbassa K, Schmitz C, Gerke V. Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes. Exp Cell Res, 243(1). 1998: p. 129-141.

[136]. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. PLoS One, 6(1). 2011: p. e14525.

[137]. Steinberg D. The pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part iv: the 1984 coronary primary prevention trial ends it-almost. J Lipid Res, 47(1). 2006: p. 1-14.

[138]. Correa S, Riera C, Spiess J, Bianco I. Modulation of the inflammatory response by corticotropin-releasing factor. European Journal of Pharmacology, 319(1). 1997: p. 85-90.

[139]. Simoncini T, Apa R, Reis FM, Miceli F, Stomati M, Driul L, et al. Human umbilical vein endothelial cells: a new source and potential target for corticotropin-releasing factor. J Clin Endocrinol Metab, 84(8). 1999: p. 2802-6.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[140]. Fleisher-Berkovich S, Danon A. Effect of corticotropin-releasing factor on prostaglandin synthesis in endothelial cells and fibroblasts. Endocrinology, 136(9). 1995: p. 4068-4072.

[141]. Cao J, Cetrulo CL, Theoharides TC. Corticotropin-releasing hormone induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells via the cAMP/protein kinase A/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Mol Pharmacol, 69(3). 2006: p. 998-1006.

[142]. Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. Trends Endocrinol Metab, 13(10). 2002: p. 436-444.

[143]. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science, 298(5600). 2002: p. 1911-1912.

[144]. Wilbert-Lampen U, Trapp A, Modrzik M, Fiedler B, Straube F, Plasse A. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: A potential link between stress and endothelial dysfunction? Journal of Psychosomatic Research, 61(4). 2006: p. 453-460.

[145]. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. Circulation, 108(17). 2003: p. 2041-2048.

[146]. Clapp B, Hingorani A, Kharbanda R, Mohamedali V, Stephens J, Vallance P, et al. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. Cardiovascular Research, 64(1). 2004: p. 172-178.

[147]. Maturana M, Irigoyen M, Spritzer P. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. Clinics, 62(1). 2007: p. 77-86.

[148]. Epstein F, Vane J, Änggård E, Botting R. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. New England Journal of Medicine, 323(1). 1990: p. 27-36.

[149]. Κρεμαστινός Δ. Καρδιολογία. 2nd ed. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης; 2008.

[150]. Rateri DL, Moorleghen JJ, Balakrishnan A, Owens AP, Howatt DA,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Subramanian V, et al. Endothelial Cell-specific Deficiency of AngII Type 1a Receptors Attenuates AngII-induced Ascending Aortic Aneurysms in LDL Receptor −/−. Mice Circ Res, 108(5). 2011: p. 574–581.

[151]. Huang A, Vita J. Effects of Systemic Inflammation on Endothelium-Dependent Vasodilation. Trends in Cardiovascular. Medicine, 16(1). 2006: p. 15-20.

[152]. Widlansky M, Gokce N, Keaney J, Vita J. The clinical implications of endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology, 42(7). 2003: p. 1149-1160.

[153]. Widlansky M, Price D, Gokce N, Eberhardt R, Duffy S, Holbrook M, et al. Short- and Long-Term COX-2 Inhibition Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Hypertension. Hypertension, 42(3). 2003: p. 310-315.

[154]. Tedgui A, Mallat Z. Anti-Mechanisms in the Vascular Wall. Circulation Research, 88(9). 2001: p. 877-887.

[155]. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease, 340(2). 1999: p. 115-126.

[156]. Cai H, Harrison D. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. Circulation Research, 87(10). 2000: p. 840-844.

[157]. Gimbrone M, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circulation Research, 118(4). 2016: p. 620-636.

[158]. Takano M, Mizuno K, Okamatsu K, Yokoyama S, Ohba T. Sakai S. Mechanical and structural characteristics of vulnerable plaques: analysis by coronary angioscopy and intravascular ultrasound. Journal of the American College of Cardiology, 38(1). 2001: p. 99-104.

[159]. Paoletti R, Gotto A, Hajjar D. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. Circulation, 109(1). 2004: p. 20-26.

[160]. Endemann, DT. and Schiffrin, EL. Endothelial dysfunction. J Am Soc Nephrol,15(8). 2004: p. 1983-92.

[161]. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, USA, 16th ed: The McGraw-Hill Companies; 2005.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[162]. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation,inflammation and genetics. Circulation, 91(9). 1995: p. 2488-96.

[163]. Sandhofer A, Kaser S, Ritsch A, Laimer M, Engl J, Paulweber B, et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein in Metabolic Syndrome. Obesity, 14(5). 2006: p. 812-818.

[164]. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. J Lipid Res, 39(4). 1998: p. 777-788.

[165]. Morrow D. Chronic ischemic heart disease. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2005.

[166]. Deckelbaum L. Heart attacts and coronary artery disease. Yale University School of Medicine. Heart Book, 11. 1992: p. 133-148.

[167]. McLaughlin K, Jardine AG, Moss JG. ABC of arterial and venous disease. Renal artery stenosis. BMJ, 320. 2000: p. 1124-1127.

[168]. Fernández-Ortiz A, Badimon J, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah P, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture. Journal of the American College of Cardiology, 23(7). 1994: p. 1562-1569.

[169]. Cho W, Kang JL, Park YM. Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Promotes Macrophage Foam Cell Formation via Reduced Expression of ATP Binding Cassette Transporter-1 (ABCA1). PLoS One, 10(6). 2015: p. e0130587.

[170]. Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T et al. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. J Immunol, 176(3). 2006: p. 1869-1877.

[171]. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med, 352(16). 2005: p. 1685-1695.

[172]. Wu Y, Zhang R, Zhou C, Xu Y, Guan X, Hu J, Xu Y, Li S. Enhanced expression of vascular cell adhesion molecule-1 by corticotrophin-releasing

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

hormone contributes to progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. Atherosclerosis, 203(2). 2009: p. 360-370.

[173]. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA, 287(19). 2002: p. 2570-81.

[174]. American Heart Association. Statistical Fact Sheet. Populations 2009 Update:International Cardiovascular Disease Statistics. [Online]. [cited 2018 06 9. Available from: http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1236204012112INTL.pdf.

[175]. Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M. European cardiovascular disease statistics, 2008 edition. British Heart Foundation Statistics Website. [Online].; 2008 [cited 2018 03 14. Available from: http://www.heartstats.org/uploads/documents%5Cproof30NOV2007.pdf.

[176]. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends Mol Med, 19(3). 2013: p. 197-209.

[177]. Hochman JS, Tamis JE, Thompson TD, Weaver WD, White HD, Van de Werf F, et al. Sex, clinical presentation, and outcome in patients with acute coronary syndromes. Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes IIb Investigators. N Engl J Med, 341(4). 1999: p. 226-232.

[178]. Arbustini E, Morbini P, Bello B, Prati F, Specchia G. From plaque biology to clinical setting. American Heart Journal, 138(2). 1999: p. S55-S60.

[179]. Schoenhagen P, Nissen S, Tuzcu E. Coronary arterial remodeling: From bench to bedside. Current Atherosclerosis Reports, 5(2). 2003: p. 150-154.

[180]. Villablanca A, Jayachandran M, Banka C. Atherosclerosis and sex hormones: current concepts. Clinical Science, 119(12). 2010: p. 493-513.

[181]. Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor– deficient mice. J Lipid Res, 40(5). 1999: p. 893-900.

[182]. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. Nat Rev Immunol, 8(10). 2008: p. 802-815.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[183]. Elhage R, Arnal J, Pieraggi M, Duverger N, Fievet C, Faye J, Bayard F. Estradiol Prevents Fatty Streak Formation in Apolipoprotein E Deficient Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular. Biology, 17(11). 1997: p. 2679-2684.

[184]. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. Physiological Reviews, 86(2). 2006: p. 515-581.

[185]. White M, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore L. Estrogen, Progesterone, and Vascular Reactivity: Potential Cellular Mechanisms. Endocrine Reviews, 16(6). 1995: p. 739-751.

[186]. Bourassa P, Milos P, Gaynor B, Breslow J, Aiello R. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(19). 1996: p. 10022-10027.

[187]. Sullivan T, Karas R, Aronovitz M, Faller G, Ziar J, Smith J, O'Donnell T, Mendelsohn M. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. Journal of Clinical Investigation, 96(5). 1995: p. 2482-2488.

[188]. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Sato H, Kuzuya T, Hori M. Roles of NO and Ca2+-activated K+ channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure. FASEB J, 11(10). 1997: p. 7393-9.

[189]. McHugh N, Cook S, Schairer J, Bidgoli M, Merrill G. Ischemia- and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs: effects of estrogen. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 268(6). 1995: p. H2569-H2573.

[190]. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. Testosterone for secondary prevention in men with ischaemic heart disease? QJM, 96(7). 2003: p. 521-529.

[191]. Wu FC, von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. Endocr Rev 24. 2003: p. 183-217.

[192]. Jones T, Saad F. The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. Atherosclerosis, 207(2). 2009: p. 318-327.

[193]. Foster C, Costill D, Daniels J, Fink W. Skeletal muscle enzyme activity, fiber

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

composition and VO2 max in relation to distance running performance. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 39(2). 1978: p. 73-80.

[194]. Savoie S, Forest MG, Bourel B, Saez JM, Collu R, Bertrand J, Ducharme JR. Perinatal activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the lamb. I. Circulating levels of LH, FSH, prolactin and testosterone and in vivo response to hCG in the first two months of life. Biol Reprod. 1979 Dec: p. 21(5): 1051-6.

[195]. Jegou B, Dacheux J, Terqui M, Garnier D, Courot M. Studies of the androgen binding protein in the rete testis fluid of the ram and its relation to sexual season. Molecular and Cellular Endocrinology, 9(3). 1978: p. 335-346.

[196]. Lee V, Cumming I, de Kretser D, Findlay J, Hudson B, Keogh E. Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. Reproduction, 46(1). 1976: p. 7-11.

[197]. Illius A, Haynes N, Purvis K, Lamming G. Plasma concentrations of testosterone in the developing ram in different social environments. Reproduction, 48(1). 1976: p. 17-24.

[198]. Skinner J, Rowson L. Effects of testosterone injected unilaterally down the vas deferens on the accessory glands of the ram. Journal of Endocrinology, 42(2). 1968: p. 355-6.

[199]. Cotta Y, Terqui M, Pelletier J, Courot M. Plasma testosterone and LH levels in the male lamb from birth to puberty. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 280(12). 1975: p. 1473-6.

[200]. Saez, J.M. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. Endocr Rev, 15. 1994: p. 574-626.

[201]. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in stereidogenic cells. Endocr Rev, 17(3). 1996: p. 221-244.

[202]. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract Endocrinology WTo, editor.: Polonsky (eds), 10th Ed, Elsevier; 2008.

[203]. Tepperman J, Tepperman H. Metabolic and Endocrine Physiology. 5th ed. Chicago: Year Book Medical Publ.; 1987.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[204]. Martin C. Endocrine Physiology New York: Oxford University Press; 1985.

[205]. Shangold M. Exercise and the Adult Female. Exercise and Sport Sciences Reviews, 12(1). 1984: p. 53-80.

[206]. Nakano Y, Yamashita T, Okuno M, Fukusaki E, Bamba T. In vitro steroid profiling system for the evaluation of endocrine disruptors. J Biosci Bioeng, 122(3). 2016: p. 370-377.

[207]. Singh KP, Roy D. Somatic mutations in stilbene estrogen-induced Syrian hamster kidney tumors identified by DNA fingerprinting. J Carcinog, 5;3(1). 2004: p. 4.

[208]. Roy D, Cai Q, Felty Q, Narayan S. Estrogen-Induced Generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Gene Damage, and Estrogen-Dependent Cancers. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 10(4). 2007: p. 235-257.

[209]. Lee JR, Zava D, Hopkins V. What your doctor may not tell you about breast cancer. How hormone balance can help save your life. New York: Warner Books, Ch. 6; 2002.

[210]. Radovick S, Levine JE, Wolfe A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. Front Endocrinol (Lausanne, 3. 2012: p. 1-52.

[211]. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. Mol Pharmacol, 54(1). 1998: p. 105-12.

[212]. Barone M, Tanzi S, Lofano K, Scavo MP, Guido R, Demarinis L. Estrogens, phytoestrogens and colorectal neoproliferative lesions. Genes Nutr, 3(1). 2008: p. 7-13.

[213]. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. Mol Cell Endocrinol, 308(1-2). 2009: p. 9-16.

[214]. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. Endocrinology, 153(7). 2012: p. 2953-2962.

[215]. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. Steroids, 69(8-9). 2004: p. 537-542.

[216]. Pastore M, Jobe S, Ramadoss J, Magness R. Estrogen Receptor-α and Estrogen Receptor-β in the Uterine Vascular Endothelium during Pregnancy: Functional Implications for Regulating Uterine Blood Flow.. Seminars in Reproductive Medicine, 30(01). 2012: p. 46-61.

[217]. Toth B, Saadat G, Geller A, Scholz C, Schulze S, Friese K, Jeschke U. Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ERβ) and progesterone receptor A (PR-A), but not ERα and PR-B. Histochemistry and Cell Biology, 130(2). 2008: p. 399-405.

[218]. Gonzales R, Ansar S, Duckles S, Krause D. Androgenic/Estrogenic Balance in the Male Rat Cerebral Circulation: Metabolic Enzymes and Sex Steroid Receptors. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 27(11). 2007: p. 1841-1852.

[219]. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. Hypertension, 47(6). 2006: p. 1019-1026.

[220]. Kim K, Bender J. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. Molecular and Cellular Endocrinology, 308(1-2). 2009: p. 3-8.

[221]. Billon-Galés A, Fontaine C, Filipe C, Douin-Echinard V, Fouque MJ, Flouriot G, et al. The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(6). 2009: p. 2053-2058.

[222]. Weng C, Cai J, Wen J, Yuan H, Yang K, Imperato-Mcginley J,et al. Differential effects of estrogen receptor ligands on regulation of dihydrotestosterone-induced cell proliferation in endothelial and prostate cancer cells. International Journal of Oncology, 42(1). 2012: p. 327-337.

[223]. Wiseman H, Quinn P, Halliwell B. Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. FEBS Letters, 330(1). 1993: p. 53-56.

[224]. Hall J, Couse J, Korach K. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. Journal of Biological Chemistry, 276(40). 2001: p. 36869-36872.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[225]. Doevendans P, Van Bilsen M. Transcription factors and the cardiac gene programme. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28(4). 1996: p. 387-403.

[226]. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory Regulation of Hypertrophy by Endogenous Atrial Natriuretic Peptide in Cultured Cardiac Myocytes. Hypertension, 35(1). 2000: p. 19-24.

[227]. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 22(10). 2002: p. 1585-90.

[228]. Szego CM, Davis JS. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. Proc Natl Acad Sci USA, 58(4). 1967: p. 1711-1718.

[229]. Prabhushankar R, Krueger C, Manrique C. Membrane estrogen receptors: their role in blood pressure regulation and cardiovascular disease. Curr Hypertens Rep, 16(1). 2014: p. 408.

[230]. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen Biology: New Insights into GPER Function and Clinical Opportunities. Mol Cell Endocrinol, 389(1-2). 2014: p. 71-83.

[231]. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol, 14(10). 2000: p. 1649-60.

[232]. Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. Nat Chem Biol, 2(4). 2006: p. 207-12.

[233]. Pang Y, Thomas P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish. Developmental Biology, 342(2). 2010: p. 194-206.

[234]. Wyckoff M, Chambliss K, Mineo C, Yuhanna I, Mendelsohn M, Mumby S, Shaul P. Plasma Membrane Estrogen Receptors Are Coupled to Endothelial Nitric-oxide Synthase through Gαi. Journal of Biological Chemistry, 276(29). 2001: p. 27071-27076.

[235]. Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi A. Non-genomic mechanism of

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. The Journal of Physiology, 499(2). 1997: p. 497-511.

[236]. Lincoln T, Dey N, Sellak H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. Journal of Applied Physiology, 91(3). 2001: p. 1421-1430.

[237]. Power R, Mani S, Codina J, Conneely O, O'Malley B. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. Science, 254(5038). 1991: p. 1636-1639.

[238]. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohé C. Estrogen Receptor α Rapidly Activates the IGF-1 Receptor Pathway. Journal of Biological Chemistry, 275(24). 2000: p. 18447-18453.

[239]. Heber D, Swerdloff RS. LHRH antagonists for male contraception. In: Vickery BH, Nestor JJ, Hafez ESE (eds) LHRH and Its Analogs. Advances in Reproductive Health Care, vol 1. Springer, Dordrecht. 1984.

[240]. HG., Burger. Androgen production in women. Fertil Steril, 77(4). 2002: p. S3-5.

[241]. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. Endocrinology, 126(2). 1990: p. 1165-1172.

[242]. Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM et al. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A, 86(23). 1989: p. 9534-8.

[243]. Crona DJ, Whang YE. Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. Cancers (Basel), 9(6). 2017: p. E67.

[244]. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol Rev, 81(3). 2001: p. 1269-1304.

[245]. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. Endocr Rev, 16(3). 1995: p. 271-321.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[246]. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. Endocr Rev 24. 2003: p. 313-340.

[247]. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol, 175(1). 2002: p. 113-120.

[248]. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell. 2001: p. 719-730.

[249]. Bagchi G, Wu J, French J, Kim J, Moniri NH, Daaka Y. Androgens transduce the G alphas-mediated activation of protein kinase A in prostate cells. Cancer Res, 68(9). 2008: p. 3225-3231.

[250]. Sen A, O'Malley K, Wang Z, Raj GV, Defranco DB, Hammes SR. Paxillin regulates androgen- and epidermal growth factor-induced MAPK signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. J Biol Chem, 285(37). 2010: p. 28787-95.

[251]. Gatson JW, Kaur P, Singh M. Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. Endocrinology, 147(4). 2006: p. 2028-2034.

[252]. Lucas-Herald AK, Alves-Lopes R, Montezano AC, Ahmed SF, Touyz RM. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. Clin Sci (Lond), 131(13). 2017: p. 1405-1418.

[253]. Pi M, Kapoor K, Ye R1, Smith JC, Baudry J, Quarles LD. GPCR6A Is a Molecular Target for the Natural Products Gallate and EGCG in Green Tea. Mol Nutr Food Res, 62(8). 2018: p. e1700770.

[254]. Ko E, Choi H, Kim B, Kim M, Park KN, Bae IH et al. Testosterone stimulates Duox1 activity through GPRC6A in skin keratinocytes. J Biol Chem, 289(42). 2014: p. 28835-45.

[255]. Tostes RC, Carneiro FS, Carvalho MH, Reckelhoff JF. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 310(1). 2016: p. 1-14.

[256]. Cai J, Hong Y, Weng C, Tan C, Imperato-McGinley J, Zhu Y. Androgen stimulates endothelial cell proliferation via an androgen receptor/VEGF/cyclin

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

A-mediated mechanism. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 300(4). 2011: p. H1210-H1221.

[257]. Alvarez-García V, González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. Oncol Rep 29(5). 2013: p. 2058-64.

[258]. Lamon-Fava S, Fisher E, Nelson M, Evans W, Millar J, Ordovas J, Schaefer E. Effect of Exercise and Menstrual Cycle Status on Plasma Lipids, Low Density Lipoprotein Particle Size, and Apolipoproteins. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 68(1). 1989: p. 17-21.

[259]. Schaefer E, Foster D, Zech L, Lindgren F, Brewer H, Levy R. The Effects of Estrogen Administration on Plasma Lipoprotein Metabolism in Premenopausal Females. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 57(2). 1983: p. 262-267.

[260]. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner J, Losordo D. Estradiol Accelerates Functional Endothelial Recovery After Arterial Injury. Circulation, 95(7). 1997: p. 1768-1772.

[261]. Sarrel P. Ovarian hormones and the circulation. Maturitas, 12(3). 1990: p. 287-298.

[262]. Cicinelli E, Ignarro L, Lograno M, Galantino P, Balzano G, Schonauer L. Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle. Fertility and Sterility, 66(6). 1996: p. 1036-1038.

[263]. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. Circ Res, 85(4). 1999: p. 377-385.

[264]. Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. Pharmacol Rev, 60(2). 2008: p. 210-241.

[265]. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohé C. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. Cardiovasc Res, 43(3). 1999: p. 666-74.

[266]. Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, Krause DN. Estrogen receptor activation

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. Mol Pharmacol, 67(1). 2005: p. 105-113.

[267]. Akarasereenont P, Techatraisak K, Thaworn A, Chotewuttakorn S. The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. Inflamm Res, 49(9). 2000: p. 460-465.

[268]. Chakrabarti S, Lekontseva O, Peters A, Davidge S. 17 -Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. Cardiovascular Research, 85(4). 2009: p. 796-805.

[269]. Murakami H, Harada N, Sasano H. Aromatase in atherosclerotic lesions of human aorta. J Steroid Biochem Mol Biol, 79(1-5). 1999: p. 67-74.

[270]. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. J Clin Endocrinol Metab, 80(12). 1995: p. 3689-3698.

[271]. Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lusis AJ et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(6). 2001: p. 3589-3593.

[272]. Lew R, Komesaroff P, Williams M, Dawood T, Sudhir K. Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. Circ Res, 93(11). 2003: p. 1127-1133.

[273]. Meyer M, Haas E, Barton M. Need for research on estrogen receptor function: Importance for postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis. Gender Medicine, 5. 2008: p. S19-S33.

[274]. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA, 288(3). 2002: p. 321-333.

[275]. Manson JE, Bassuk SS. Invited commentary: hormone therapy and risk of coronary heart disease why renew the focus on the early years of menopause? Am J Epidemiol, 166(5). 2007: p. 511-517.

[276]. Hodgin JB, Krege JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

atheroprotective effects on lesion size in Apoe-/- mice. J Clin Invest, 107(3). 2001: p. 333-340.

[277]. Hanke H, Kamenz J, Hanke S, Spiess J, Lenz C, Brehme U, et al. Effect of 17-beta estradiol on pre-existing atherosclerotic lesions: role of the endothelium. Atherosclerosis, 147(1). 1999: p. 123-132.

[278]. Villablanca AC, Tenwolde A, Lee M, Huck M, Mumenthaler S, Rutledge JC. 17beta-estradiol prevents early-stage atherosclerosis in estrogen receptor-alpha deficient female mice. J Cardiovasc Transl Res, 2(3). 2009: p. 289-299.

[279]. Hodgin JB, Maeda N. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. Endocrinology, 143(12). 2002: p. 4495-4501.

[280]. Christian RC, Liu PY, Harrington S, Ruan M, Miller VM, Fitzpatrick LA. Intimal estrogen receptor (ER)beta, but not ERalpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre- and postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 91(7). 2006: p. 2713-2720.

[281]. Phillips LS, Langer RD. Postmenopausal hormone therapy: critical reappraisal and a unified hypothesis. Fertil Steril, 83(3). 2005: p. 558-566.

[282]. Nettleship JE, Jones RD, Channer KS, Jones TH. Testosterone and coronary artery disease. Front Horm Res 37. 2009: p. 91-107.

[283]. Dunaif A, Graf M. Insulin administration alters gonadal steroid metabolism independent of changes in gonadotropin secretion in insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. J Clin Invest. 1989 Jan: p. 83(1): 23-9.

[284]. Diamond MP, Grainger D, Diamond MC, Sherwin RS, Defronzo RA. Effects of methyltestosterone on insulin secretion and sensitivity in women. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Dec : p. 83(12): 4420-5.

[285]. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. Clin Biochem, 34(5). 2001: p. 407-413.

[286]. Khaw K, Dowsett M, Folkerd E, Bingham S, Wareham N, Luben R, Welch A, Day N. Endogenous Testosterone and Mortality Due to All Causes, Cardiovascular Disease, and Cancer in Men: European Prospective Investigation Into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study. Circulation, 116(23). 2007: p. 2694-2701.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[287]. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men. J Clin Endocrinol Metab 93. 2008: p. 68-75.

[288]. Shores M, Matsumoto A, Sloan K, Kivlahan D. Low Serum Testosterone and Mortality in Male Veterans. Archives of Internal Medicine, 166(15). 2006: p. 1660.

[289]. Kintzel P, Chase S, Schultz L, O'Rourke T. Increased Risk of Metabolic Syndrome, Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease in Men Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. Pharmacotherapy, 28(12). 2008: p. 1511-1522.

[290]. English K, Steeds R, Jones T, Diver M, Channer K. Low-Dose Transdermal Testosterone Therapy Improves Angina Threshold in Men With Chronic Stable Angina: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Circulation, 102(16). 2000: p. 1906-1911.

[291]. Malkin C, Pugh P, Jones R, Kapoor D, Channer K, Jones T. The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(7). 2004: p. 3313-3318.

[292]. Bernini G, Versari D, Moretti A, Virdis A, Ghiadoni L, Bardini M, Taurino C, Canale D, Taddei S, Salvetti A al Men before and after Testosterone Replacement Therapy. Vascular Reactivity in Congenital Hypogonad. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 91(5). 2006: p. 1691-1697.

[293]. Channer K. Cardiovascular effects of testosterone: implications of the "male menopause"? Heart, 89(2). 2003: p. 121-122.

[294]. Somjen D, Kohen F, Gayer B, Kulik T, Knoll E, Stern N. Role of putative membrane receptors in the effect of androgens on human vascular cell growth. J Endocrinol 180. 2004: p. 97-106.

[295]. Whitsel EA, Boyko EJ, Matsumoto AM, Anawalt BD, Siscovick DS. Intramuscular testosterone esters and plasma lipids in hypogonadal men: a meta-analysis. Am J Med, 111(4). 2001: p. 261-629.

[296]. Bagatell CJ, Knopp RH, Vale WW, Rivier JE, Bremner WJ. Physiologic testosterone levels in normal men suppress high-density lipoprotein cholesterol levels. Ann Intern Med, 116(1). 1992: p. 967-973.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[297]. Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. Biochim Biophys Acta, 1832(12). 2013: p. 2216-2231.

[298]. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo,13(3). 1999: p. 295-309.

[299]. Vincent H, Bourguignon C, Vincent K, Weltman A, Bryant M, Taylor A. Antioxidant Supplementation Lowers Exercise-Induced Oxidative Stress in Young Overweight Adults. Obesity, 14(12). 2006: p. 2224-2235.

[300]. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med, 36(4). 2006: p. 327-58.

[301]. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann Intern Med, 93(3). 1980: p. 480-489.

[302]. Brantley RE Jr, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autooxidation of myoglobin. J Biol Chem, 268(10). 1993: p. 6995-7010.

[303]. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, et al.. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. Atherosclerosis, 167(2). 2003: p. 327-334.

[304]. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta Cell Dysfunction. Front Endocrinol (Lausanne), 4. 2013: p. 40.

[305]. Fulton DJR, Li X, Bordan Z, Haigh S, Bentley A, Chen F. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Development of Pulmonary Hypertension. Antioxidants (Basel), 6(3). 2017: p. E54.

[306]. Sugamura K, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med, 51(5). 2011: p. 978-992.

[307]. Cho KJ, Seo JM, Kim JH. Bioactive lipoxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. Mol Cells, 32(1). 2011: p. 1-5.

[308]. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in Biology and Medicine. third Edition. Third Edition ed. Midsomer Norton, Avon, England: Oxford

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

University Press; 1999.

[309]. Vollaard N, Shearman J, Cooper C. Exercise-Induced Oxidative Stress. Sports Medicine, 35(12). 2005: p. 1045-1062.

[310]. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. Free Radic Res. 41(12). 2007: p. 1364-75.

[311]. Kohen R, Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicologic Pathology, 30(6). 2002: p. 620-650.

[312]. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. The FASEB Journal, 20(11). 2006: p. 1889-91.

[313]. Black P, Garbutt L. Stress, inflammation and cardiovascular disease. Journal of Psychosomatic Research, 52(1). 2002: p. 1-23.

[314]. Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa W, et al. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. Proceedings of the National Academy of Schience, 102(3). 2005: p. 904-908.

[315]. Connelly L, Madhani M, Hobbs A. Resistance to Endotoxic Shock in Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Knock-out Mice. Journal of Biological Chemistry, 280(11). 2005: p. 10040-10046.

[316]. Connelly S, Macabeo-Ong M, Dekker N, Jordan R, Schmidt B. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncology, 41(3). 2005: p. 261-267.

[317]. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 29(3-4). 2000: p. 323-333.

[318]. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri J, Sessa W. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. Journal of Clinical Investigation, 100(12). 1997: p. 3131-3139.

[319]. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM et al. Biology of ageing and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

role of dietary antioxidants. Biomed Res Int. 2014: p. 831-841.

[320]. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci, 4. 1999: p. D339-45.

[321]. Shamim I. Ahmad. Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health. 1st ed.: CRC press; 2016.

[322]. Erden-İnal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. Cell Biochemistry and Function, 20(1). 2002: p. 61.

[323]. Aw TY. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. News Physiol Sci. 2003: p. 201-204.

[324]. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. Int J Cardiol, 213. 2016: p. 8-14.

[325]. Monteiro R, Teixeira D, Calhau C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. Mediators Inflamm. 2014: p. doi: 10.1155/2014/615917.

[326]. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. Endocr Rev, 28(5). 2007: p. 521-574.

[327]. Somjen D, Paller CJ, Gayer B, Kohen F, Knoll E, Stern N. High glucose blocks the effects of estradiol on human vascular cell growth: differential interaction with estradiol and raloxifene. J Steroid Biochem Mol Biol, 88(1). 2004: p. 101-110.

[328]. Piercy KT, Donnell RL, Kirkpatrick SS, Timaran CH, Stevens SL, Freeman MB, et al. Effects of estrogen, progesterone, and combination exposure on interleukin-1 beta-induced expression of VCAM-1, ICAM-1, PECAM, and E-selectin by human female iliac artery endothelial cells. J Surg Res, 105(2). 2002: p. 215-219.

[329]. D'agostino P, Milano S, Barbera C, Bella G, Rosa M, Ferlazzo V, Farruggio R, Miceli D, Miele M., Castagnetta L, Cillari E. Sex Hormones Modulate Inflammatory Mediators Produced by Macrophagesa. Annals of the New York Academy of Sciences, 876(1 NEUROENDOCRIN). 1999: p. 426-429.

[330]. Zhang X, Wang LY, Jiang TY, Zhang HP, Dou Y, Zhao JH, et al. Effects of testosterone and 17-beta-estradiol on TNF-alpha-induced E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells. Analysis of the underlying receptor

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

pathways. Life Sci. 2002;71: p. 15-29.

[331]. Nilsson B. Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes. Inflammation Research, 56(7). 2007: p. 269-273.

[332]. Kulpa J, Chinnappareddy N, Pyle WG. Rapid changes in cardiac myofilament function following the acute activation of estrogen receptor-alpha. PLoS One, 7(7). 2012: p. e41076.

[333]. Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. Hypertension; 42(5). 2003: p. 985-90.

[334]. Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K. Assessment of androgen replacement therapy for erectile function in rats with type 2 diabetes mellitus by examining nitric oxide-related and inflammatory factors. J Sex Med. 11(4). 2014 Apr: p. 920-929.

[335]. Subbiah M, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 77(4). 1993: p. 1095-1097.

[336]. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. FEBS Letters, 210(1). 1987: p. 37-39.

[337]. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. FASEB J, 15(12). 2001: p. 2121-30.

[338]. Nickenig G, Baumer A, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits J, Daemen M, Vetter H, Bohm M. Estrogen Modulates AT1 Receptor Gene Expression In Vitro and In Vivo. Circulation, 97(22). 1998: p. 2197-2201.

[339]. Song J, Kim M, Jo H, Hwang S, Chae B, Chung J, Kwon D, Lew Y, Lim Y, Kim J, Kim J, Kim M. Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 11. 2009.

[340]. Ripple MO, Hagopian K, Oberley TD, Schatten H, Weindruch P. Androgen-induced oxidative stress in human LNCaP prostate cancer cells is associated

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

with multiple mitochondrial modifications. Antiox Redox Signal 1. 1999: p. 71-81.

[341]. Liu S, Navarro G, Mauvais-Jarvis F. Androgen excess produces oxidative stress and predisposes to b-cell failure in female mice. PLOS one 5:e11302 doi:10.1371/Journal.pone.0011302. 2010.

[342]. Barton M, Prossnitz ER, Meyer MR. Testosterone and secondary hypertension: new pieces to the puzzle. Hypertension, 59(6). 2012: p. 1101-1103.

[343]. Skogastierna C, Hotzen M, Rane A, Ekström L. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. Eur J Prev Cardiol, 21(8). 2014: p. 1049-1054.

[344]. Lopes RA, Neves KB, Pestana CR, Queiroz AL, Zanotto CZ, Chignalia AZ. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 306(11). 2014: p. 1485-1494.

[345]. Veeramani S, Yuan TC, Lin FF, Lin MF. Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells. Oncogene, 27(37). 2008: p. 5057-5068.

[346]. Ling S, Dai A, Williams MRI, Myles K. Testosterone enhances apoptosis – related damage in human vascular endothelial cells. Endocrinology 143. 2002: p. 1119-1125.

[347]. Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. J Clin Endocrinol Metab. 91(2). 2006 Feb: p. 546-54.

[348]. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. Brain Res, 289(1-2). 1983: p. 235-240.

[349]. Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. J Neurosci, 10(10). 1990: p. 3247-3254.

[350]. Zhu X, Smith MA, Honda K, Aliev G, Moreira PI, Nunomura A. Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. J Neurol Sci, 257(1-2). 2007: p. 240-246.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[351]. Kobayashi N, Machida T, Takahashi T, Takatsu H, Shinkai T, Abe K et al. Elevation by oxidative stress and aging of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats and its prevention by vitamin e. J Clin Biochem Nutr, 45(2). 2009: p. 207-213.

[352]. Nazarloo HP, Buttrick PM, Saadat H, Dunn AJ. The roles of corticotropin-releasing factor-related peptides and their receptors in the cardiovascular system. Curr Protein Pept Sci, 7(3). 2006: p. 229-239.

[353]. Cossette É, Cloutier I, Tardif K, DonPierre G, Tanguay JF. Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein. Mol Cell Biochem, 373(1-2). 2013: p. 137-147.

[354]. Lu Z, Ren Y, Wang G, Song Q, Li M, Jiang S, et al. Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. Journal of Experimental & Clinical Cancer Reasearch, 28(1). 2009: p. 16.

[355]. Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. Angiogenesis, 4(2). 2001: p. 91-102.

[356]. Robertson JF, Come SE, Jones SE, Beex L, Kaufmann M, Makris A, Nortier JW. Possinger K, Rutqvist LE Endocrine treatment options for advanced breast cancer--the role of fulvestrant Eur. J Cancer.;41(3). 2005 Feb: p. 346-56.

[357]. Bhatia H, Kumar A, Du J, Chapman JC, McLaughlin MJ. Co-treatment with the non-steroidal anti-androgen drug, flutamide and the natural estrogen, 17β-estradiol does not lead to additive reproductive impairment in juvenile Murray rainbowfish (Melanotaenia fluviatilis). J Appl Toxicol, 35(11). 2015: p. 1241-1253.

[358]. Geisler J. Differences between the non-steroidal aromatase inhibitors anastrozole and letrozole--of clinical importance? Br J Cancer. 2011, 104(7): p. 1059-1066.

[359]. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105. 1984: p. 121-6.

[360]. Reddy P, Murthy C, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. Neuroscience Letters, 368(1). 2004: p. 15-20.

[361]. Kiran RT, Subramanyam MV, Devi AS. Swim exercise training and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.;137(2). 2004 Feb: p. 187-96.

[362]. Shaik I, Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385(1). 2006: p. 105-113.

[363]. Knowles R, Palacios M, Palmer R, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(13). 1989: p. 5159-5162.

[364]. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. J Biol Chem, 266(10). 1991: p. 6259-6263.

[365]. Pollock J, Forstermann U, Mitchell J, Warner T, Schmidt H, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(23). 1991: p. 10480-10484.

[366]. Cadenas E, Packer L. Hydrogen Sulfide in Redox Biology. Part A.: Academic Press; 2015.

[367]. Santanam N, Shern-Brewer R, McClatchey R, Castellano PZ, Murphy AA, Voelkel S, et al. Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. J Lipid Res, 39(11). 1998: p. 2111-8.

[368]. Goglia L, Tosi V, Sanchez AM, Flamini MI, Fu XD, Zullino S et al. Endothelial regulation of eNOS, PAI-1 and t-PA by testosterone and dihydrotestosterone in vitro and in vivo. Mol Hum Repro, 16(10). 2010: p. 761-769.

[369]. Yoon D.S, Lee M, Cha D.S. Measurement of intracellular ROS in Caenorhabditis elegans using 2'-7' Dichlorodihydrofluorescence in Diacetate. Bio-protocol (8)6. 2018: p. e2774.

[370]. Casas I, Powell L, Klapper P, Cleator G. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

reaction assay. Journal of Virological Methods, 53(1). 1995: p. 25-36.

[371]. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25(4). 2001: p. 402-408.

[372]. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. Antioxidants & Redox Signaling, 15. 2011: p. 1583-1606.

[373]. Chen D, Bird I, Zheng J, Magness R. Membrane Estrogen Receptor-Dependent Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Mediates Acute Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Estrogen in Uterine Artery Endothelial Cells. Endocrinology, 145. 2004: p. 113-125.

[374]. Chen Z, Yu K, Zheng H, Dong K. Estrogen receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) promoter activity in transfected CHO-K1 cells. Molecular and Cellular Endocrinology, 158(1-2). 1999: p. 131-142.

[375]. Li L, Haynes M, Bender J. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor variant (ER46) in human endothelial cells. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 100. 2003 : p. 4807-4812.

[376]. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(11). 2000: p. 5930-5935.

[377]. Vivar O, Zhao X, Saunier E, Griffin C, Mayba O, Tagliaferri M. Estrogen Receptor β Binds to and Regulates Three Distinct Classes of Target Genes. Journal Of Biological Chemistry, 285(29). 2010: p. 22059-22066.

[378]. Lu Q, Pallas D, Surks H, Baur W, Mendelsohn M, Karas R. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 101. 2004: p. 17126-17131.

[379]. Stefano G, Prevot V, Beauvillain J, Cadet P, Fimiani C, Welters I. Cell-Surface Estrogen Receptors Mediate Calcium-Dependent Nitric Oxide Release in Human Endothelia. Circulation, 101. 2000: p. 1594-1597.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

[380]. Liu Z, Gou Y, Zhang H, Zuo H, Zhang H, Liu Z, Yao D. Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. Redox Biology, 3. 2014: p. 88-99.

[381]. Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera M, Sastre J, Pallardó F, Mann G, Viña J. 17β-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFκB cascade. Aging Cell, 4. 2005: p. 113-118.

[382]. Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, Serviddio G. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. Redox Biology, 1(1). 2013: p. 340-346.

[383]. Kirkman H, Gaetani G. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends In Biochemical Sciences, 32. 2007: p. 44-50.

[384]. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo M. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Frontiers In Pharmacology, 5. 2014.

[385]. Coyle C, Kader K. Mechanisms of H2O2-Induced Oxidative Stress in Endothelial Cells Exposed to Physiologic Shear Stress. ASAIO Journal, 53. 2007: p. 17-22.

[386]. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J. 17β-Estradiol Protects against Oxidative Stress-induced Cell Death through the Glutathione/Glutaredoxin-dependent Redox Regulation of Akt in Myocardiac H9c2 Cells. Journal Of Biological Chemistry, 281. 2006: p. 13092-13102.

[387]. Dimitrova KR, DeGroot KW, Suyderhoud JP, Pirovic EA, Munro TJ, Wieneke J, Myers AK, Kim YD. 17-β Estradiol Preserves Endothelial Cell Viability in an In Vitro Model of Homocysteine-Induced Oxidative Stress. Journal Of Cardiovascular Pharmacology, 39. 2002: p. 347-353.

[388]. Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. J Lipid Res, 41(8). 2000: p. 1205-1213.

[389]. Darville MI, Ho YS, Eizirik DL. NF-kappaB is required for cytokine-induced manganese superoxide dismutase expression in insulin-producing cells. Endocrinology, 141(1). 2000: p. 153-162.

[390]. Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X et al. An integrated network

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. Cancer Cell, 17(5). 2010: p. 443-454.

[391]. Chignalia AZ, Schuldt EZ, Camargo LL, Montezano AC, Callera GE, Laurindo FR, et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. Hypertension, 59(6). 2012: p. 1263-1271.

[392]. Pi M, Parrill AL, Quarles LD. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. J Biol Chem, 281(51). 2010: p. 39953-39964.

[393]. Zhang L, Wu S, Ruan Y, Hong L, Xing X, Lai W. Testosterone suppresses oxidative stress via androgen receptor-independent pathway in murine cardiomyocytes. Mol Med Rep, 4(6). 2011: p. 1183-1188.

[394]. Kłapcińska B, Jagsz S, Sadowska-Krepa E, Górski J, Kempa K, Langfort J. Effects of castration and testosterone replacement on the antioxidant defense system in rat left ventricle. J Physiol Sci, 58(3). 2008: p. 173-177.

[395]. Barp J, Araújo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. Braz J Med Biol Res, 35(9). 2002: p. 1075-1081.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Cell Biology International ISSN 1065-6995
doi: 10.1002/cbin.11188

RESEARCH ARTICLE

17-β estradiol attenuates the pro-oxidant activity of corticotropin-releasing hormone in macroendothelial cells

Maria Filiponi[1], Sofia G Gougoura[1], Christina Befani[2], Alexandra Bargiota[1], Panagiotis Liakos[2] and George N Koukoulis[1]*

1 Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Research Laboratory, Larissa University Hospital, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Biopolis, 41500, Larissa, Greece
2 Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Biopolis, 41500, Larissa, Greece

Abstract

Corticotropin-releasing hormone, which is the predominant regulator of neuroendocrine responses to stress, attenuates inflammation through stimulation of glucocorticoid release. Enhanced corticotropin-releasing hormone expression has been detected in inflammatory cells of the vascular endothelium, where it acts as a local regulator of endothelial redox homeostasis. Estrogens have beneficial effects on endothelial integrity and function, though the mechanism underlying their antioxidative effect remains as yet largely unknown. We therefore investigated the effect of 17β-estradiol on pro-oxidant action of corticotropin-releasing hormone in vitro in macroendothelial cells, and, more specifically, the role of 17β-estradiol on corticotropin-releasing hormone-induced activities/release of the antioxidant enzymes namely, endothelial nitric oxide synthase, superoxide dismutase, catalase, and glutathione. We observed that 17β-estradiol abolished the stimulatory effect of corticotropin-releasing hormone on intracellular reactive oxygen species levels and counteracted its inhibitory effect on endothelial nitric oxide synthase activity and nitric oxide release. In addition, 17β-estradiol significantly induced superoxide dismutase and catalase activity, an effect that was not significantly influenced by corticotropin-releasing hormone. Finally, 17β-estradiol significantly increased glutathione levels and the glutathione/glutathione + glutathione disulfide ratio, an action that was partially blocked by corticotropin-releasing hormone. Our results reveal that 17β-estradiol counterbalances corticotropin-releasing hormone-mediated pro-inflammatory action and thereby maintains the physiological threshold of the endothelial cell redox environment. These observations may be of importance, considering the protective role of estrogen in the development of atherosclerosis.

Keywords: 17β-estradiol; antioxidative mechanisms; atherosclerosis; corticotropin-releasing hormone; oxidative stress; reactive oxygen species

Introduction

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall where both innate and adaptive immune responses to local stress contribute to disease initiation and progression (Geovanini and Libby, 2018). The predominant regulator of neuroendocrine responses to stress which attenuates inflammation through stimulation of glucocorticoid release, is the stress peptide corticotropin-releasing hormone (CRH) (Vale et al., 1981; Rivier and Rivier 2014; Akiba et al., 2015). In addition to the hypothalamus, CRH has been detected in inflammatory sites of peripheral tissues where its expression and concentration are enhanced in inflamed tissue fibroblasts and vascular endothelial cells (Karalis et al., 1991). Peripheral CRH acts as a local endocrine or paracrine mediator of inflammation through surface receptors, which are expressed on different tissue cells as well as the endothelium (Nazarloo et al., 2006).

An early abnormality in atherosclerosis is endothelial cell dysfunction which appears to be an indicator of vascular damage predicting both progression of atherosclerosis (Halcox et al., 2009) and incidence of cardiovascular events (Yeboah et al., 2007; Husain et al., 2015; Su, 2015).

*Corresponding author: e-mail: gnkouk@med.uth.gr
Abbreviations: CAT, catalase; CRH, corticotropin-releasing hormone; CTL, control; E2, 17β-estradiol; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GSH, glutathione; GSH/GSH+GSSG, glutathione/glutathione + glutathione disulfide; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Endothelial dysfunction, a risk factor for cardiovascular disease is characterized by disturbed redox balance (Huang & Vita, 2006) and oxidative stress (Husain et al., 2015; Su, 2015). Reactive oxygen species (ROS) act as major initiators of tissue damage through up regulation of enzyme activity, signal transcription, and gene expression (Boegehold et al., 2015). However, these effects are counteracted by intracellular antioxidant defense mechanisms aimed at maintaining an optimal redox balance (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

Reproductive-age women have a lower incidence of cardiovascular diseases than men (Villablanca et al., 2010). This sex difference is attributed to the protective effects of estrogens on the endothelium that disappear after menopause, which is characterized by estrogen deficiency (Colditz et al., 1987; Wenger et al., 1993). Estrogens may benefit arterial integrity through different mechanisms, among which antioxidative properties (Liehr, 1996). It has been shown that in bovine aortic endothelial cells, estradiol preserves the endothelial redox balance (Cossette et al., 2013) by suppressing pro-oxidant and pro-inflammatory actions induced by a number of stress stimulators (Song et al., 2009). However, in ovariectomized spontaneous hypertensive rats, estrogen deficiency leads to increased vascular free radical production (Wassmann et al., 2001). Excessive ROS generation plays an important role in several cardiovascular diseases, including hypertension, atherosclerosis, and myocardial ischemia/reperfusion injury (Levonen et al., 2008).

In a previous study (Gougoura et al., 2010), we showed that in endothelial cells in vitro, CRH acts as a local regulator of redox balance. This action is dependent on the oxidative status of the endothelial cells. Under basal conditions, CRH increases intracellular ROS by inhibiting endothelial nitric oxide synthase (eNOS), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) activity, whereas in the presence of increased oxidative stress it acts as an anti-inflammatory factor.

CRH may act as a local regulator of endothelial redox homeostasis, while estrogens apparently have beneficial effects on endothelial integrity and function. Given that the underlying mechanism of the antioxidative effect of estrogens is still largely unknown, we investigated the effect of 17β-estradiol (E2) on the pro-oxidant action of CRH in macroendothelial cells in vitro.

Materials and methods

Reagents

CRH, 17β-estradiol (E2), fulvestrant (ICI 182.780), competitive estrogen receptor (ER) antagonist with an affinity comparable to estradiol, sodium nitrite, nitrate, nitrate reductase, nicotinamide adenine dinucleotide, hydrogen peroxide, glutathione reductase, and other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Cell culture media Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 11-965-092 and DMEM [phenol red free] 31-053-028) were obtained from Gibco (Gibco BRL, CA, USA).

Cell cultures and factors

The human endothelial cells EA.hy926 were kindly provided by Dr. Ch. Tsatsanis (University of Crete, School of Medicine, Laboratory of Clinical Chemistry, Greece). EA.hy926 cells were plated in 25 cm dishes and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (Invitrogen, CA, USA), at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere (Gougoura et al., 2010). For each experiment, confluent cells were starved in medium (phenol red free) without FBS for 24 h. Growth medium was replaced with new growth medium supplemented with CRH (10^{-7} M), E2 (0.5 pg/mL), and fulvestrant (5 pg/mL), a selective ERα and β antagonist (Robertson and Harrison, 2004), either individually or in combination as needed, for 2 h.

Experiments were performed with cells from passage 4. Phenol red free medium was used to minimize possible estrogenic effects of the medium, since red phenol acts as a weak estrogen (Berthois et al., 1986). All experiments were carried out in triplicate and repeated at least five times. Cell lysates were collected using a hypotonic Tris buffer, pH 7.5, in the presence of a cocktail of protease inhibitors. Protein concentrations were determined via the Bio-Rad Protein Assay (Cat.#: 5000002) according to the standard protocol using a spectrometer (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 20; MA, USA). Culture supernatant medium was collected and both cell lysates and medium were stored at −80°C.

ROS measurement in cells

ROS levels were measured using 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA; Molecular Probes; Invitrogen Detection Technologies, CA, USA). EA.hy926 treated cells were loaded with 10 μM H2DCF-DA for 30 min at 37°C. Cells were then trypsinized, resuspended in PBS (10^6 cells/mL) and analyzed by fluorescence assay. Fluorescence was measured at 520 nm following excitation with 488 nm light in a VersaFluor Fluorometer (Biorad, Hercules, CA, USA).

eNOS activity assay

Catalytic activity of eNOS was determined by the conversion of L-[^{3}H] arginine to L-[^{3}H] citrulline. The assay was performed as previously described (Gougoura et al., 2010).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Briefly, EA.hy926 cells treated with various effectors, were lysed and protein lysates (25 μg) were incubated with 1 mCi/mL L-[3 H] arginine, in the presence of 6 mM $CaCl_2$, for 1 h at 37°C. The reaction was stopped with EDTA-HEPES buffer and scintillation fluid was added to the vials. Incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation *b*-counter (Wallace 1409). Furthermore, a standard curve of known eNOS units was carried out in order to determine the correlation between eNOS concentration and activity expressed in counts.

Measurement of nitrite (NO^{2-}) and nitrate (NO^{3-}) in culture supernatant media

The concentration of the NO^{2-} and NO^{3-} sum was determined in the culture medium. The Griess reaction was repeated after the nitrate in each specimen had been enzymatically converted to nitrite, as previously described (Gougoura et al., 2010). Aliquots of the culture media were incubated for 30 min at 37°C with nitrate reductase (10 mU) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphohydrogenase (100 μM). Griess reagent (100 μL; 5% v/v H_3PO_4 with 1% w/v sulphanilic acid, and 0.1% w/v N-1-napthylethylenediamine) was added to aliquots containing 80 μL of culture medium and samples were incubated for 15 min at 37°C. Addition of the reagent converted nitrite into a deep purple azo compound, the absorbance of which was measured at 540 nm by a spectrophotometric plate reader (Biotek-Instruments Inc, Highland Park, NY, USA). The concentration of the sum of nitrite and nitrate (NO) in each sample was determined by comparing the measured absorbance to a standard curve with known sodium nitrite ($NaNO_2$) concentrations. The lowest detection limit of the method was 0.2 μM. Each sample was analyzed in triplicates.

CAT activity determination

Catalase activity was performed as previously described (Aebi, 1984). Cell lysates (20 μg) were prepared in 67 mM phosphate buffer, pH 7.4, and incubated at 37°C for 10 min prior to measurement. Following this, 15 mM H_2O_2 was added and the rate of H_2O_2 reduction was measured in a quartz cuvette for 5 min at 240 nm. Experiments were performed in triplicates and repeated five times.

SOD activity determination

SOD catalyses the dismutation of superoxide radical (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2), and elemental oxygen (O_2). By means of Trevigen's SOD assay kit, superoxide anions convert NBT to NBT-diformazan, which absorbs light at 550 nm. SOD reduces superoxide anion concentration and thereby lowers the rate of NBT-diformazan formation. The extent of reduction in the appearance of NBT-diformazan is a measure of SOD activity present in the experimental sample. SOD activity is determined from percent inhibition of the rate (ΔOD/min) of formation of NBT-diformazan. NBT-diformazan production was measured for 5 min. Assays were performed in triplicates and repeated five times.

Quantitative determination of glutathione (GSH) in cell lysates

The method is based on the ability of GSH to react with 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and produce a yellow compound with extinction coefficient 13.6 mM^{-1} cm^{-1}, based on Chakrapani et al. (1995). Cell lysates (10 μg) were added in 67 mM phosphate buffer pH 7.95 and DTNB 0.00396 g/mL. The optical density was measured after incubating the samples in the dark for 30 min, at 412 nm and in triplicate for each sample.

Statistical analysis

We used the GraphPad InStat Statistical package for Windows for statistical analysis. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). One-way analysis of variance with the Bonferroni post hoc test was used for the comparison of data and the statistical significance limit was set at $P < 0.05$.

Results

In order to mimic the physiological context of the oxidative stress defense system in endothelial cells, we examined the role of E2 on CRH-induced activities/release of several antioxidant enzymes, including: eNOS, NO, SOD, CAT, and GSH. The use of fulvestrant (a selective ERα and ERβ inhibitor) was to verify the participation of the ERs in any potential effects of E2 on CRH-induced activation of the antioxidant enzymes.

Effect of E2 on CRH-induced inhibition on eNOS activity and NO release

In a previous study of our group in EA.hy926 endothelial cells, we found that CRH exerts its maximum effect on NO release at the concentration of 10^{-7} M during 2 h incubation at 37°C (Gougoura et al., 2010). Thus, we used the same concentration in our subsequent experimental model. We also decided to use concentrations of E2 that are representative of its free physiological human levels, ranging from 0.5 to 20 pg/mL (Santanam et al., 1998). As such, EA.hy926 cells are incubated for 2 h in the presence of E2 at increasing concentrations of 0.5, 2, 5, and 10 pg/mL and eNOS activity was measured. We observed that E2 significantly increased eNOS activity and exerted its maximal effect at the lowest physiological concentration of

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

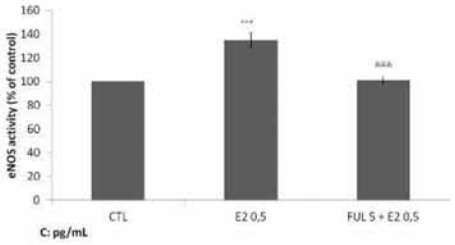


Figure 1 Effect of 17β-estradio (E2) on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity. After starvation for 24 h, EA.hy926 cells were incubated for 2 h at 37°C with medium alone (control cells) or medium containing E2 at 0.5 pg/mL and/or medium containing fulvestrant at 5 pg/mL. Cell lysates were collected and eNOS activity was measured. Data are shown as means ± SD of normalized data obtained in five independent experiments. All measurements were performed in triplicates. $^{***}P < 0.001$ versus control, $^{\&\&\&}P < 0.001$ versus E2.

0.5 pg/mL (Figure 1). This effect was blocked in the presence of fulvestrant (Figure 1). Therefore, the concentration of E2 at 0.5 pg/mL was used in all our experiments.

Subsequently, the effect of 17-β estradiol on eNOS activity and NO release in the presence of CRH was investigated. We observed that CRH significantly inhibits eNOS activity and NO secretion compared with control ($P < 0.001$) (Figure 2). On the contrary, E2 induces a significant increase in NOS activity ($P < 0.05$). When endothelial cells were treated with CRH plus E2, we observed a significant increase in eNOS activity compared to control ($P < 0.001$) and to CRH alone ($P < 0.001$). This effect was abolished in the presence of fulvestrant. The changes in NO secretion were similar except that its increase in the presence of CRH plus E2 was significantly lower compared to E2 alone ($P < 0.05$). These results indicate that under basal conditions, E2 counteracts the inhibitory effect of CRH on endothelial NO synthase activity and NO release.

Effect of E2 on CRH-induced levels of ROS

In order to investigate the effect of 17-β estradiol on intracellular ROS content, EA.hy926 cells were incubated with E2 (0.5 pg/mL), CRH (10^{-7} M), and CRH + E2 simultaneously and fulvestrant (5 pg/mL). Under our culturing conditions, we observed that CRH stimulated the production of cellular ROS at significantly higher levels in comparison to control ($P < 0.001$) (Figure 3). On the contrary, E2 alone significantly decreased the intracellular ROS cell content compared to controls ($P < 0.05$) an action that disappeared when ERs were blocked by fulvestrant (Figure 3). When cells were incubated in the presence of CRH plus E2, the stimulatory effect of CRH on intracellular oxidative stress was abolished and ROS cell content reached levels which were significantly lower than those induced by E2 alone. This inhibiting effect of CRH plus E2 on intracellular ROS content was also abolished in the presence of fulvestrant.

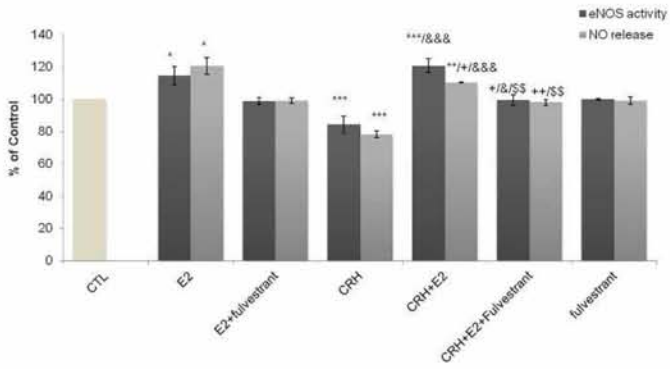


Figure 2 Effect of E2 and CRH on eNOS activity and NO release. After starvation, EA.hy926 cells were incubated for 2 h at 37°C in DMEM medium alone, (control cells (CTL cells)); in the presence of CRH (10^{-7} M) or E2 and/or both compounds and fulvestrant (5 pg/mL). Cell lysates were collected and eNOs activity was determined. The concentration of nitrite (NO_2-) and nitrate (NO_3-) in the culture media supernatant was determined. Bar graphs are presented as means ± SD of normalized data obtained in five independent experiments. All measurements were performed in triplicates. $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ versus CTL, $^{+}P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ versus E2, $^{\&\&\&}P < 0.001$ versus CRH, $^{\$\$}P < 0.01$ versus CRH + E2. CRH, corticotropin-releasing hormone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; E2, 17β-estradiol; NO, nitric oxide.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

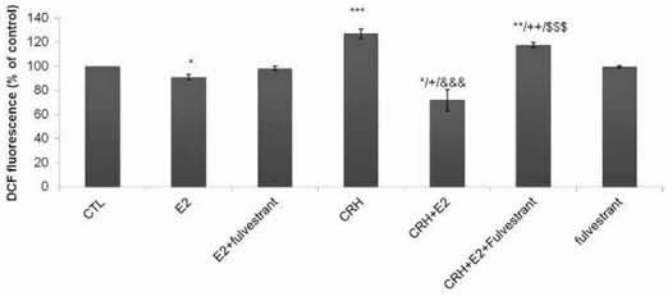


Figure 3 Effect of E2 and CRH on intracellular ROS levels. After starvation, EA.hy926 cells, were incubated for 2 h at 37°C with medium alone (CTL cells) or medium containing E2 (0.5 pg/mL), CRH (10^{-7} M), and CRH + E2 simultaneously and fulvestrant (5 pg/mL). Cells were incubated with 10 μM H2DCF-DA. Relative change in mean fluorescence was calculated as the ratio of mean fluorescence for the treated to untreated (CTL) cells. The bar graph is presented as means ± SD of normalized data obtained in five independent experiments. All measurements were performed in triplicates. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ versus CTL, $^{+}P < 0.05$. $^{++}P < 0.01$ versus E2, $^{\&\&\&}P < 0.001$ versus CRH, $^{\$\$\$}P < 0.001$ versus CRH + E2. CRH, corticotropin-releasing hormone; CTL, control; E2, 17β-estradiol; H2DCF-DA, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; ROS, reactive oxygen

Effect of E2 on CRH-mediated SOD and CAT activity

The effect of 17-β estradiol on SOD and catalase activity in the presence of CRH was also investigated. We observed that E2 alone significantly induced SOD and catalase activity compared with control ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) and this effect was abolished in the presence of fulvestrant (Figure 4). CRH alone also significantly induced SOD and catalase activity compared with control ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). However, the effect of E2 was more predominant on catalase activity, while CRH was predominant on SOD. The incubation of endothelial cells with CRH plus E2 was also followed by a significant increase of SOD and catalase activity compared with control ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively). The effect of E2 alone compared with CRH plus E2 on SOD activity was significantly lower ($P < 0.01$), while it was unchanged for CAT activity. SOD activity levels were not influenced in the presence of fulvestrant in cells treated with CRH plus E2, whereas CAT activity was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared to CRH alone, the effect of CRH plus E2 on

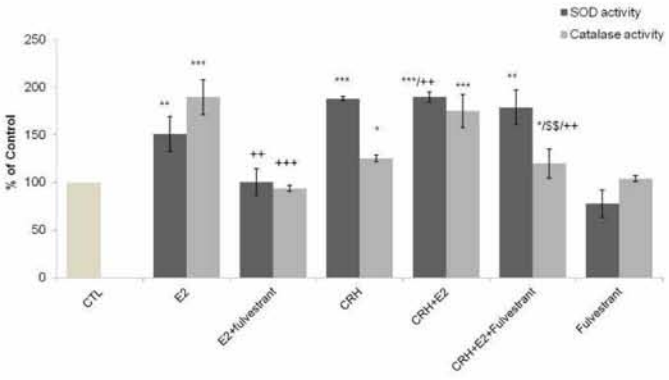


Figure 4 Effect of E2 and CRH on catalase activity and SOD activity. After starvation, EA.hy926 cells were incubated for 2 h at 37°C in DMEM medium alone, CTL cells; in the presence of CRH (10^{-7} M) or E2, separately or in combination, and fulvestrant (5 pg/mL). Cell lysates were prepared and analyzed for catalase activity (light blue columns) and superoxide dismutase (dark blue columns). An equal amount of proteins was used in each analysis condition. The bar graphs are presented as mean ± SD of normalized data obtained in five independent experiments. All measurements were performed in triplicates. $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ versus CTL, $^{++}P < 0.01$ versus E2. $^{\$\$}P < 0.01$ versus CRH + E2. CRH, corticotropin-releasing hormone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E2, 17β-estradiol; SOD, superoxide dismutase.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

SOD activity was similar whereas on CAT activity it was significantly higher ($P < 0.01$). In addition, the effect of E2 or CRH on *SOD1*, *SOD2*, and *catalase* mRNA levels was investigated by quantitative real-time PCR; however, no statistical change was observed (Figures S1 and S2). These results may indicate that E2 does not modify induction of SOD activity by CRH but enhances catalase activity.

Effect of E2 on CRH-induced changes on GSH concentration and the GSH/GSH + GSSG ratio

Finally, the effect of 17-β estradiol on GSH concentration and the GSH/GSH + GSSG ratio was investigated in the presence of CRH. We observed that EA.hy926 cells treated with CRH showed no significant changes in GSH levels, compared with untreated control cells. On the contrary, E2 provoked a large and significant increase in cellular GSH concentration ($P < 0.001$) and GSH/GSH + GSSH ratio ($P < 0.001$) that was completely abolished by the addition of fulvestrant (Figure 5). In addition, the effect of E2 or CRH on *GPx* mRNA levels was investigated by quantitative real-time PCR, however, no statistical change was observed (Figure S3). Co-incubation of cells with CRH plus E2, resulted in a significant increase in GSH levels and GSH/GSH + GSSH ratio compared with control and CRH treated cells ($P < 0.05$). However, the observed increase was far less than that induced by E2 alone ($P < 0.001$), indicating an inhibitory interference of CRH in the E2-induced strong stimulation of GSH levels and GSH/GSH + GSSH ratio. In addition, the complete reversal of the action of E2 alone or CRH plus E2 on GSH levels and GSH/GSH + GSSH ratio by the presence of fulvestrant indicates an estrogen-dependent effect.

Discussion

In the present study, we found that E2 counteracts the CRH-induced increase in intracellular free radicals and decrease in eNOS activity and NO levels, indicating an anti-inflammatory action. Moreover, E2 did not affect the CRH-induced significant SOD activity, whereas it improved the weak stimulatory effect of CRH on catalase activity. Finally, we observed that E2 had a significant stimulatory effect on GSH levels and GSH/GSH + GSSG ratio. This effect was attenuated by CRH, but remained significant compared to control conditions.

We previously showed that CRH is involved in the regulation of oxidative balance in endothelial cells in the basal state (Gougoura et al., 2010). This work suggested that CRH regulates pro-inflammatory mechanisms in endothelial cells by inducing an increase in intracellular free radicals associated with reduced eNOS activity and NO secretion, a significant increase mainly in SOD activity, and to a lesser extent in CAT activity without affecting GSH levels (Gougoura et al., 2010).

Here, we have shown that the stimulating effect of E2 on eNOS activity and NO release counteracts the inhibitory effect of CRH on endothelial NO synthase activity and NO release. This effect was abolished in the presence of the ERs antagonist, fulvestrant. Our results are consistent with

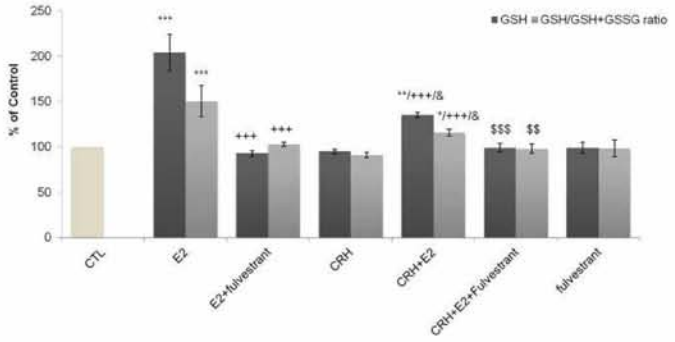


Figure 5 Effect of CRH treatment of EA.hy926 cells on GSH levels and on reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) of glutathione. Starved P4 EA.hy926 cells were incubated for 2 h at 37°C in DMEM medium alone, CTL cells; in the presence of CRH (10^{-7} M) or E2, separately or in combination and fulvestrant (5 pg/mL). Cell lysates were prepared and analyzed for GSH levels and the total amount of reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) of glutathione. Bar graph is presented as means ± SD of normalized data obtained in five independent experiments. All measurements were performed in triplicates. $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ versus CTL, $^{+++}P < 0.001$ versus E2, $^{\&}P < 0.05$ versus CRH, $^{\$\$}P < 0.01$, $^{\$\$\$}P < 0.001$ versus CRH + E2. CRH, corticotropin-releasing hormone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; CTL, control; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

findings from an earlier study in uterine artery endothelial cells, where the blockade of ERs with fulvestrant prevented estradiol eNOS activation and NO release (Chen et al., 2004). It has been suggested that E2-mediated NO production involves rapid eNOS phosphorylation and activation through MAPK and PI3K/Akt pathways (Chen et al., 1999; Chambliss et al., 2002). Rapid NO release via eNOS activation has been reported in human endothelial cells through the involvement of a plasma membrane ERα variant (ER46) which has been detected in extracts from EAhy926 endothelial cells (Russel et al., 2000; Li et al., 2003). Accumulating evidence clearly indicates the presence of membrane ERs (mERs) that transduce their effects through diverse signaling pathways mediating non-genomic events (Vivar et al., 2010). This receptor may be involved in the transduction of E2 action in our study. Interestingly, in human umbilical vein endothelial cells which express two ERα variants, the above-mentioned ERα variant transduces rapid (non-genomic) signaling whereas a 66 kDa variant transduces genomic signaling, triggered by E2 (Li et al., 2003). Signaling from mERs occurs mainly through the activation of various signal transduction pathways that are often associated with G protein-coupled receptors (GPCRs) (Lu et al., 2004), ion channels (Stefano et al., 2000), and enzyme-linked receptors.

The levels of intracellular ROS are regulated by the fine-tuning between ROS-generating factors and antioxidant enzymes, including: SOD, CAT, and glutathione peroxidase (GSH-Px). In this study, we observed that incubation of endothelial cells with E2 was followed by an increase in SOD activity and a significant increase in catalase activity. Their increase was totally abolished by inhibition of ERs by fulvestrant, indicating that E2 regulates both SOD and CAT activities through its receptors (ERα, ERβ). A similar effect of E2 on mitochondrial SOD in mice and in human aorta endothelial cells (in vitro) was previously reported (Liu et al., 2014). Endothelial cells treated with CRH significantly increased their SOD activity and to a lesser extent catalase activity. When we treated endothelial cells with CRH plus E2, we observed maximum stimulation of SOD and CAT activities. The addition of fulvestrant completely abolished only the CAT activity. This observation indicates that endothelial cells under the influence of CRH plus E2 respond differently compared to each substance alone. CRH may have the dominant effect on SOD activity, whereas regulation of CAT activity is more dependent on E2.

We also observed a simultaneous increase of SOD activity with the CRH-induced increase of intracellular free radicals, which may represent a quick cellular response in order to adjust the increased ROS levels. SOD serves as the front-line defense against ROS, implicated in the regulation of endothelial function inhibiting oxidative inactivation of NO (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). The observed increase of endothelial SOD activity induced by E2 in this study is consistent with recently published data showing that physiological concentrations of E2 upregulate SOD gene expression (Bellanti et al., 2013). The higher stimulatory effect of CRH plus E2 on SOD activity compared to that induced by E2 alone may indicate an additive effect. However, the comparable SOD activity levels after stimulation of cells with CRH or CRH plus E2 and mainly the non-change of SOD activity after ERs blocking reduces this probability.

SOD operates in conjunction with CAT to maintain hydrogen peroxide levels resulting from SOD catalysis. In this context the increase of SOD activity induced by E2 was associated with an increase in CAT activity which was comparable to that observed with CRH plus E2. However, the observed partial inhibition of CAT activity after blockage of ERs may indicate involvement of both factors in the regulation of its enzyme activity. Considering that the catalytic reaction of CAT predominates at higher H_2O_2 concentrations (Kirkman and Gaetani, 2007), we can speculate that E2 may exerts its antioxidant effect at higher levels of cell oxidative stress, activating GSH.

Besides SOD and CAT, GSH is an important water-soluble antioxidant, which can directly neutralize ROS, such as lipid peroxides or H_2O_2, by GSH-Px consuming GSH (Coyle et al., 2006; Aquilano et al., 2014). It can be considered as "the second line defense" of the antioxidant response system, with SOD and CAT comprising the first enzymatic system that removes excessive H_2O_2. Here, we found that E2 increases SOD activity but increases more significantly CAT action, which confirms its ability to reduce H_2O_2 levels. Lower H2O2 levels are associated with a similar trend of GPx which leads to lower consumption of GSH. Thus, GSH levels are preserved and measured as an increase of GSH and ratio GSH/GSH + GSSG. This stimulatory effect of E2 on GSH levels is in accordance with that observed in H9c2 cells (Urata et al., 2006), as well as in bovine arterial endothelial cells challenged with a pro-oxidant stimulator (Dimitrova et al., 2002). In addition, it has been shown that physiological concentrations of E2 upregulate *GSH-Px* gene expression, mediated by MAPK (Borrás et al., 2005). Moreover, estrogen replacement therapy in premenopausal women after bilateral oophorectomy reversed the oophorectomy-induced increase of oxidative stress and the reduction in mRNA expression of GSH-Px (Bellanti et al., 2013). However, the far lesser increase in GSH levels and GSH + GSSG ratio under the action of CRH plus E2 compared to that induced by E2 may indicate an inhibitory interference of CRH on E2-induced stimulation through ERs. Probably, the presence of both E2 and CRH creates a new oxidative balance at higher levels of GSH and its ratio.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Conclusion

In conclusion, our data indicate that E2 attenuates the CRH-induced pro-oxidant effect on EAhy926 cells by stimulating eNOS activity, NO production, and the endothelial antioxidant defense system. We suggest that estrogens counterbalance the CRH-mediated pro-inflammatory action, maintaining the physiological threshold of the intracellular endothelial cell redox environment. These observations may be of importance in atherosclerosis pathogenesis considering the protective role of estrogens in the development of atherosclerosis.

Acknowledgments

The authors would like to kindly acknowledge the Faculty of Medicine of University of Thessaly who hosted the present research.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105: 121–6.

Akiba Y, Kaunitz J, Million M (2015) Peripheral corticotropin-releasing factor receptor type 2 activation increases colonic blood flow through nitric oxide pathway in rats. Dig Dis Sci 60: 858–67. https://doi.org/10.1007/s10620-015-3579-y

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo M (2014) Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Front Pharmacol 5: 5. https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196

Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, Serviddio G (2013) Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. Redox Biol 1(1): 340–6. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.003

Berthois Y, Katzenellenbogen J, Katzenellenbogen B (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. Proc Natl Acad Sci 83: 2496–500. https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2496

Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH (2015) Salt, angiotensin II, superoxide, and endothelial function. Compr Physiol 6: 215–54. https://doi.org/10.1002/cphy.c150008

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera M, Sastre J, Pallardó F, Mann G, Viña J (2005) 17β-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFκB cascade. Aging Cell 4: 113–8. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00151.x

Chakrapani B, Yedavally S, Leverenz V, Giblin F, Ready V (1995) Simultaneous measurement of reduced and oxidized glutathione in human aqueous humor and cataracts by electrochemical detection. Ophthalmic Res 27: 69–77. https://doi.org/10.1159/000267843

Chambliss K, Yuhanna I, Anderson R, Mendelsohn M, Shaul P (2002) ERβ has nongenomic action in caveolae. Mol Endocrinol 16: 938–46. https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0827

Chen D, Bird I, Zheng J, Magness R (2004) Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. Endocrinology 145: 113–25. https://doi.org/10.1210/en.2003-0547

Chen Z, Yuhanna I, Galcheva-Gargova Z, Karas R, Mendelsohn M, Shaul P (1999) Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. J Clin Invest 103: 401–6. https://doi.org/10.1172/jci5347e1

Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1987) Menopause and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 316: 1105–10. https://doi.org/10.1056/NEJM198704303161801

Cossette É, Cloutier I, Tardif K, DonPierre G, Tanguay J (2013) Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein. Mol Cell Biochem 373: 137–47. https://doi.org/10.1007/s11010-012-1482-9

Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN (2006) Mechanisms of H2O2-induced oxidative stress in endothelial cells. Free Radic Biol Med 40(12): 2206–13. https://doi.org/10.1097/01.mat.0000247157.84350.e8

Dimitrova KR, DeGroot KW, Suyderhoud JP, Pirovic EA, Munro TJ, Wieneke J, Myers AK, Kim YD (2002) 17-β estradiol preserves endothelial cell viability in an in vitro model of homocysteine-induced oxidative stress. J Cardiovasc Pharmacol 39: 347–53. https://doi.org/10.1097/00005344-200203000-00005

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxidants Redox Signal 15: 1583–606. https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999

Geovanini GR, Libby P (2018) Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. Clin Sci 132(12): 1243–52.

Gougoura S, Liakos P, Koukoulis G (2010) Effect of CRH on NO bioavailability, ROS production and antioxidant defense systems in endothelial EAhy926 cells. Free Radic Res 44: 803–12. https://doi.org/10.3109/10715762.2010.485988

Halcox J, Donald A, Ellins E, Witte D, Shipley M, Brunner E (2009) Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. Circulation 119: 1005–12. https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.765701

Huang A, Vita J (2006) Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation. Trends Cardiovascr Med 16: 15–20. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.10.002

Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L (2015) Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. World J Biol Chem 6: 209. https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.209

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162

Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder R, Chrousos G (1991) Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. Science 254: 421–3. https://doi.org/10.1126/science.1925600

Kirkman H, Gaetani G (2007) Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem Sci 32: 44–50. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003

Levonen A, Vähäkangas E, Koponen J, Ylä-Herttuala S (2008) Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease. Circulation 117: 2142–50. https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.718585

Li L, Haynes M, Bender J (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor variant (ER46) in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 100: 4807–12. https://doi.org/10.1073/pnas.0831079100

Liehr J (1996) Antioxidant and prooxidant properties of estrogens. J Lab Clin Med 128: 344–5. https://doi.org/10.1016/s0022-2143(96)80002-3

Liu Z, Gou Y, Zhang H, Zuo H, Zhang H, Liu Z, Yao D (2014) Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. Redox Biol 3: 88–99. https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.001

Lu Q, Pallas D, Surks H, Baur W, Mendelsohn M, Karas R (2004) Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor. Proc Nat Acad Sci 101: 17126–31. https://doi.org/10.1073/pnas.0407492101

Nazarloo H, Buttrick P, Saadat H, Dunn A (2006) The roles of corticotropin-releasing factor-related peptides and their receptors in the cardiovascular system. Curr Protein Pept Sci 7(3): 229–39. https://doi.org/10.2174/138920306777452358

Rivier J, Rivier C (2014) Corticotropin-releasing factor peptide antagonists: design, characterization and potential clinical relevance. Front Neuroendocrinol 35: 161–70. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.006

Robertson J, Harrison M (2004) Fulvestrant: pharmacokinetics and pharmacology. Br J Cancer 90: S7–10. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601630

Russell K, Haynes M, Sinha D, Clerisme E, Bender J (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. Proc Natl Acad Sci 97(11): 5930–5. https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.5930

Santanam N, Shern-Brewer R, McClatchey R, Castellano PZ, Murphy AA, Voelkel S, Parthasarathy S (1998) Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. J Lipid Res 39(11): 2111–8.

Song J, Kim M, Jo H, Hwang S, Chae B, Chung J (2009) Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. J Steroid Biochem Mol Biol 117: 74–80. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.07.006

Stefano G, Prevot V, Beauvillain J, Cadet P, Fimiani C, Welters I (2000) Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. Circulation 101: 1594–7. https://doi.org/10.1161/01.cir.101.13.1594

Su J (2015) Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. World J Cardiol 7: 719. https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i11.719

Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J (2006) 17β-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2 Cells. J Biol Chem 281: 13092–102. https://doi.org/10.1074/jbc.m601984200

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science 213: 1394–7. https://doi.org/10.1126/science.6267699

Villablanca AC, Jayachandran M, Banka C (2010) Atherosclerosis and sex hormones: current concepts. Clin Sci (Lond) 119: 493–513. https://doi.org/10.1042/CS20100248

Vivar O, Zhao X, Saunier E, Griffin C, Mayba O, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP, Leitman DC (2010) Estrogen receptor β binds to and regulates three distinct classes of target genes. J Biol Chem 285(29): 22059–66. https://doi.org/10.1074/jbc.m110.114116

Wassmann S, Bäumer A, Strehlow K, van Eickels M, Grohe C, Ahlbory K (2001) Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. Circulation 103: 435–41. https://doi.org/10.1161/01.cir.103.3.435

Wenger NK, Speroff L, Packard B (1993) Cardiovascular health and disease in women. N Engl J Med 329: 247–56. https://doi.org/10.1056/NEJM199307223290406

Yeboah J, Crouse J, Hsu F, Burke G, Herrington D (2007) Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults. Circulation 115: 2390–7. https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.678276.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Received 9 January 2019; accepted 25 May 2019.
Final version published online 00 Month 2019.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
23/04/2024 11:01:01 EEST - 3.141.30.162