

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ»

Έκφραση και ρόλος του
συστήματος CRF στα
ουδετερόφιλα ασθενών με
μεσογειακό πυρετό.

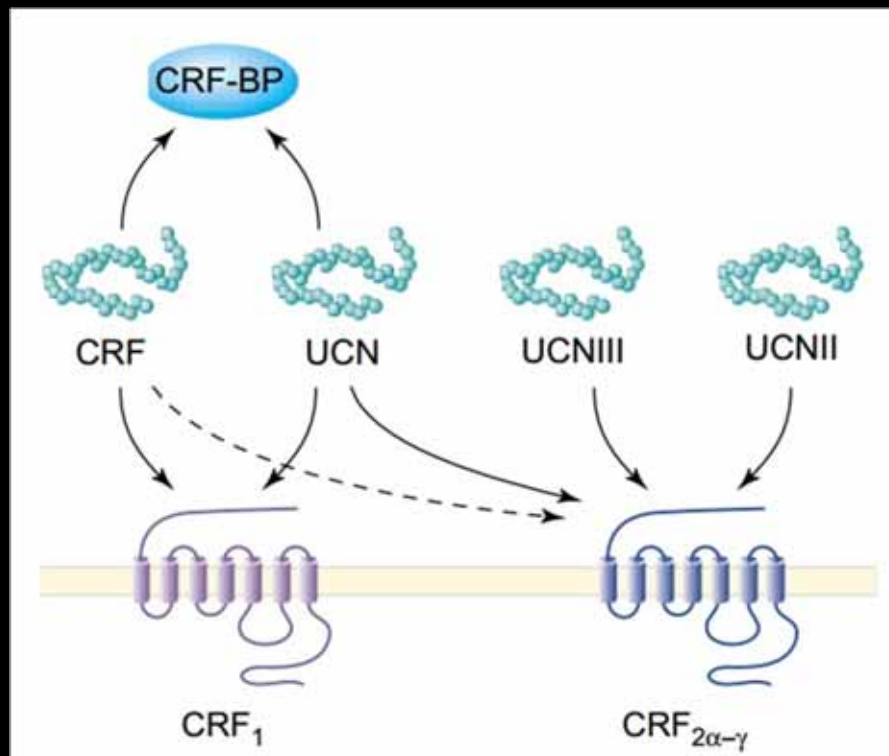
Επιβλέπουσα: Αικατερίνη Αλεξίου-Χατζάκη

Αν.Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

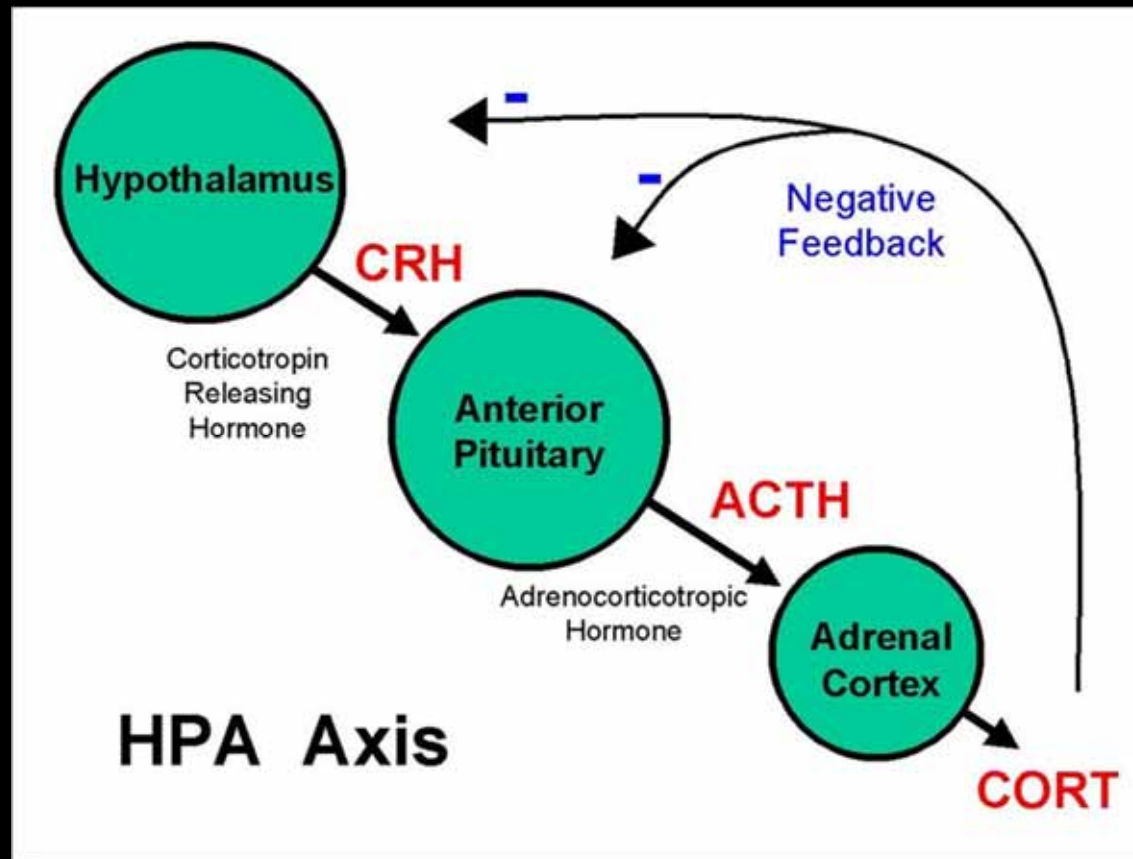
Δεκαβάλλας Σπύρος

Αλεξανδρούπολη , Ιούλιος 2015

ΣΥΣΤΗΜΑ CRF



HPA ΑΞΟΝΑΣ



THE EFFECTS OF CRF RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTS IN INFLAMMATION

CRF receptor		Agonists or antagonists	Inflammatory diseases or disorders	Tissues or cells	Biological effects	References
CRFR1	Pro-inflammation	CRF	Rheumatoid arthritis	Human synoviocyte and ECs	NOS III ↑ and activates NF-κB	Ralph et al. [15]
		UCN 1	Rheumatoid arthritis	Human synovial tissue and peripheral blood mononuclear cells	IL-1β and IL-6 ↑	Kohno et al. [16]
		UCN 1	Inflammatory lung disorders	Rat lungs	Induces lung mast cell activation and degranulation	Wu et al. [18, 19]
	Anti-inflammation	CRF	Atherosclerosis	Mouse aorta	VCAM-1 ↓	Wu et al. [20]
		CRF, UCN 1	Thromboangiitis obliterans	Rat femoral arteries	COX-2 and ICAM-1 ↓	Xu et al. [21]
		CRF	Acute inflammation	Rat pawskin	Inhibits swelling and protein leakages on cold injury	Serda and Wei [23]
		Antalarmin	Vascular inflammation	Human aortic ECs	TNF-α induced expression of VCAM-1 and E-selectin ↓	Inada et al. [27]
CRFR2	Pro-inflammation	UCN 2	Colitis	Human colonic epithelial cells	IL-8 and MCP-1 ↑; activates NF-κB and MAPK	Kokkotou et al. [28]; Moss et al. [29]
		UCN 1	Systemic inflammation	Rat mesenteric venules	Microvascular permeability ↓	Cureton et al. [30]
		UCN 1 and UCN 2	Vasculitis	Rat aortic ECs	COX-2, ICAM-1 and PGE2 ↓	Zhang et al. [31]
	Anti-inflammation	UCN 3	Pulmonary inflammation	Mouse tracheal tissue	Number of neutrophils retrieved by bronchoalveolar lavage ↓	Moffatt et al. [32]
		UCN 1	Neurodegenerative disease	Rat dopaminergic neurons and microglia	TNF-α ↓ and inhibits microglial activation	Wang et al. [33]
		UCN 1	Placental inflammation	Human trophoblast cells	Reverses LPS-induced TNF-α release	Torricelli et al. [34]
		UCN 1 and UCN 2	–	RAW 264.7 cells and mouse macrophages	Induces the apoptosis of macrophages by regulating Bax and Bad	Tsatsanis et al. [35]
		UCN 1	Crohn's disease	Mouse colons	Ameliorates the clinical and histopathological severity of inflammatory colitis via inhibiting Th1 cytokine response and stimulating IL-10/TGF-β1 production	Gonzalez-Rey et al. [57]
		UCN 1	Rheumatoid arthritis	Mouse joint tissue	Abolishes joint swelling and cartilage and bone destruction	Gonzalez-Rey et al. [58]

ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ

- Κληρονομούμενη **φλεγμονώδης** ασθένεια.
- Περιοδική εμφάνιση συμπτωμάτων.
- Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *Mefv* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη πυρίνη, απαραίτητη για την καταστολή της φλεγμονής.
- Το εν λόγω γονίδιο εκφράζεται κυρίως στα **ουδετερόφιλα** γεγονός που συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την νόσο.
- Ένα σημαντικό στοιχείο των φλεγμονωδών προσβολών στον μεσογειακό πυρετό αποτελεί η εμφάνιση μιας χαρακτηριστικής αύξησης ουδετερόφιλων στο αίμα καθώς και εισροής πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων (polymorphonuclear leukocytes, PMN) στην περιοχή της προσβολής.

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS

- Τα NETs είναι δίκτυα εξωκυττάρων ινών αποτελούμενα κυρίως από χρωματίνη και πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα με σκοπό να δεσμεύσουν, να αδρανοποιήσουν και να εξουδετερώσουν παθογόνα.
- Την τελευταία δεκαετία η απελευθέρωση των neutrophil extracellular traps (NET, NETosis) έχει περιγραφεί ως μηχανισμός δράσης για τον ρόλο των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων σε αρκετές μολυσματικές και μη φλεγμονώδεις ασθένειες αλλά πρόσφατα συσχετίστηκαν και με τον μεσογειακό πυρετό (Apostolidou *et al.* , 2014)

ΗΡΑ-ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ

Τα επίπεδα κορτιζόλης εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα κατά την περίοδο εμφάνισης συμπτωμάτων σε σχέση με την μη-συμπτωματική περίοδο. Καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι ο ΗΡΑ άξονας πιθανώς να διεγείρεται από κυτοκίνες ΜΟΝΟ κατά την υποτροπή (Tansu et al 2006).

CRF – ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ(1)

Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes.

Brain Behav Immun. 1990 Mar;4(1):67-73. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL.

Unstimulated normal leukocytes were studied for their expression of corticotrophin-releasing factor (CRF)-like mRNA and peptide. **In situ hybridization demonstrated CRF mRNA** in T and B lymphocytes and in **neutrophils**. Northern blot analysis also detected the presence of a CRF mRNA species of approximately 1.7 Kb from lymphocytes and **a peptide that reacted with anti-CRF antiserum** was also detected by radioimmunoassay. **This lymphocyte-derived peptide eluted earlier than standard CRF on high performance liquid chromatography.** These findings suggest that regulatory mechanisms within the hypothalamus and the immune system may utilize closely related peptides.

CRF-ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ(2)

- Ο CRF φαίνεται να επιδρά σε περιφερικούς υποδοχείς του σε όργανα που εμφανίζουν φλεγμονή και να καταστέλλει έτσι μηχανισμούς που προκαλούν οίδημα κάποιοι από τους οποίους προέρχονται από τα ουδετερόφιλα (Bozkurt et al 2001).
- Οπιοειδή πεπτίδια(για την καταστολή του πόνου σε σημείο φλεγμονής) εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα ύστερα από διέγερση τους με χημειοκίνες και με CRF (Kobayashi 2013).

CRF-ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ(3)

- Αλλαγή σχήματος ουδετερόφιλων σε ολικό αίμα μετά από έκθεσή τους σε CRF. **Ιδιαίτερα μετά από περίοδο εντόνου στρες.** (Lavicoli *et al.* 1997).

CRFR1 ΣΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

- Ο CRFR1 δεν παράγεται ανελλιπώς από τα ουδετερόφιλα. Η έκφρασή του είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους ερεθίσματος (Radulovic et al 1999).
- Με βάση αυτή την παρατήρηση προτείνεται ότι η έκφραση του CRFR1 στα ουδετερόφιλα πυροδοτείται μόνο κατά την είσοδο τους στον σπλήνα πιθανώς επαγόμενο από έναν παράγοντα ειδικό για το συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον (Radulovic et al 2000).

CRFR2-ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ

- Φλεγμονή στον πνεύμονα ποντικών προκαλούμενη απο LPS.
- Μείωση της εισόδου ουδετερόφιλων στον πνεύμονα ύστερα από επίδραση με UCNIII.
- Η μείωση στην εισροή των ουδετεροφίλων φαίνεται να ρυθμίζεται συστηματικά.
- Οι αγωνιστές των CRFR2 υποδοχέων φαίνεται να παρουσιάζουν αντι-φλεγμονώδης δράση. (Moffatt et al. 2006)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της ποσοτικής έκφρασης των υποδοχέων του συστήματος εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (CRF) στα ουδετερόφιλα ασθενών με μεσογειακό πυρετό.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

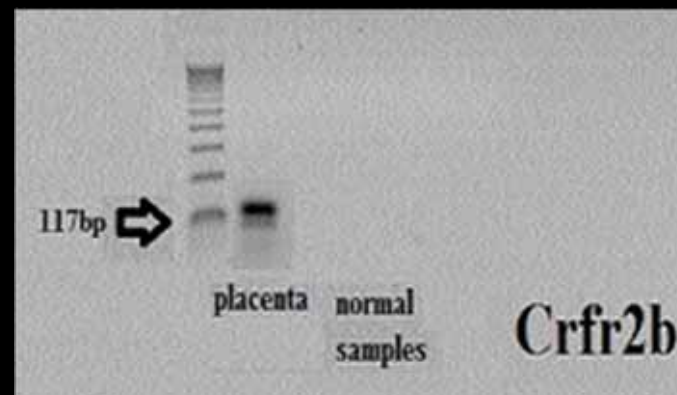
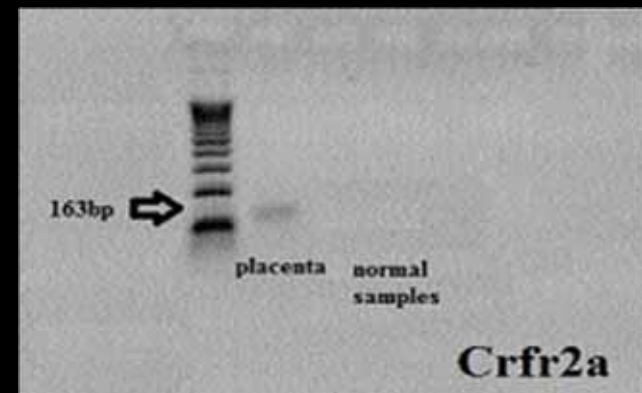
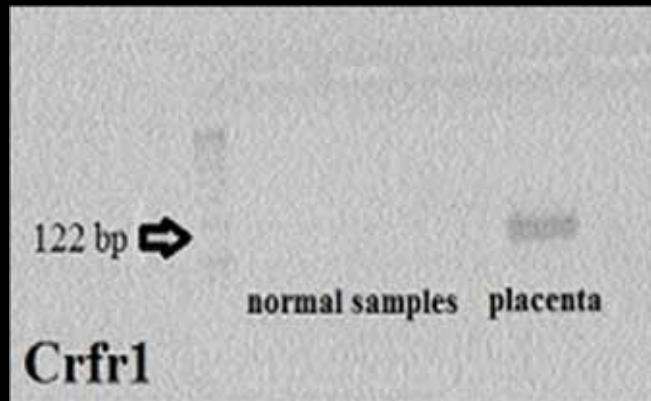
- Απομόνωση ουδετερόφιλων από αίμα :
 - A) Ασθενών με μεσογειακό πυρετό σε
 - i) ύφεση
 - ii) υποτροπή
 - B) Υγιών δοτών
 - Γ) Ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
- RNA extraction από τον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό.
- Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης.
- Ποσοτική Real-time PCR στο σύνολο των δειγμάτων για τους υποδοχείς: CRFR1, CRFR2a και CRFR2b.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

- Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης.
- Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 10 δείγματα από 3 ασθενείς με μεσογειακό πυρετό σε περίοδο κρίσης αλλά και ύφεσης.
- 6 ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο.
- 9 υγιείς δότες.
- Η μελέτη έχει εγκριθεί από την ΕΕ του ΠΓΝΑ. Για καθένα από τα δείγματα υπάρχει έντυπη έγκριση για χρήση του βιολογικού υλικού για ερευνητικούς σκοπούς υπογεγραμμένη από τον δότη.

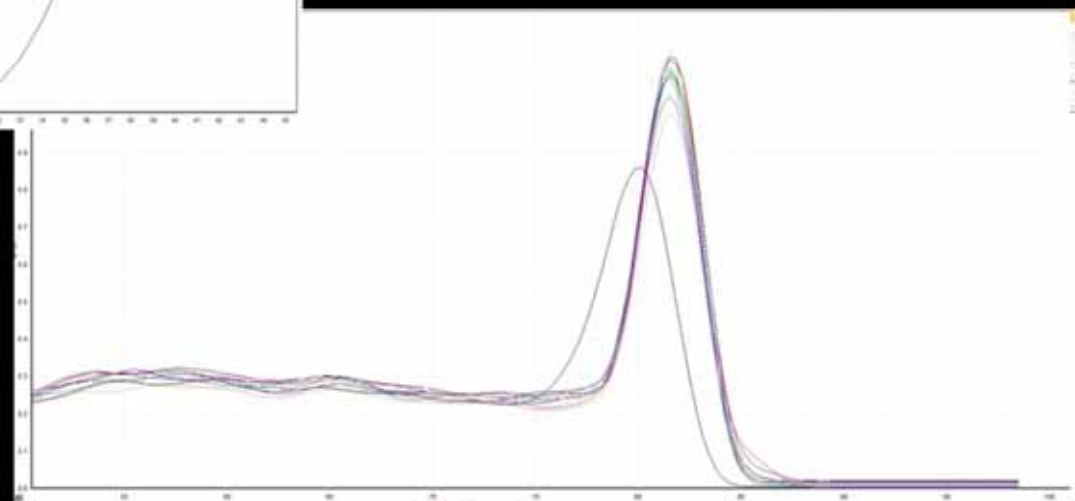
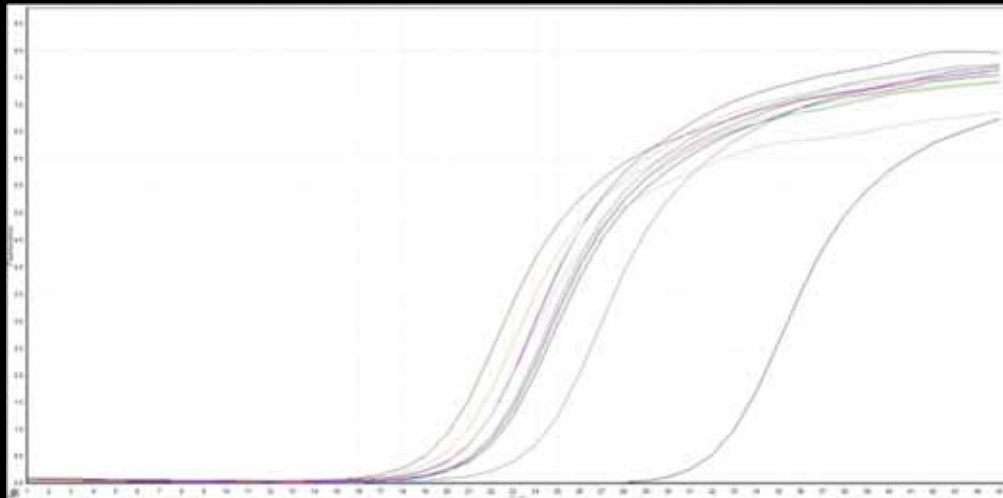
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (I)

Υγιείς δότες



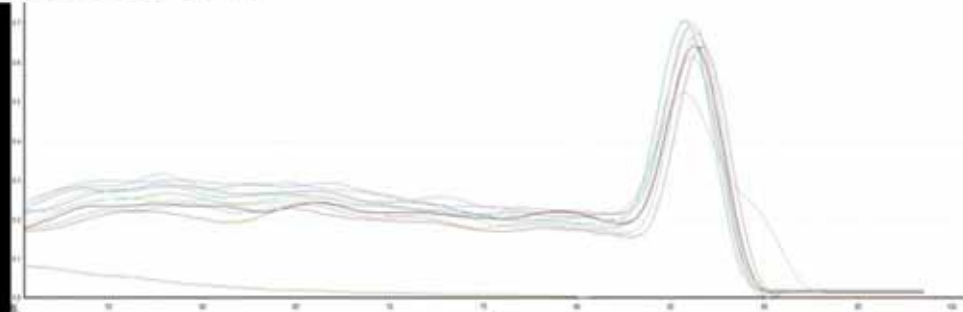
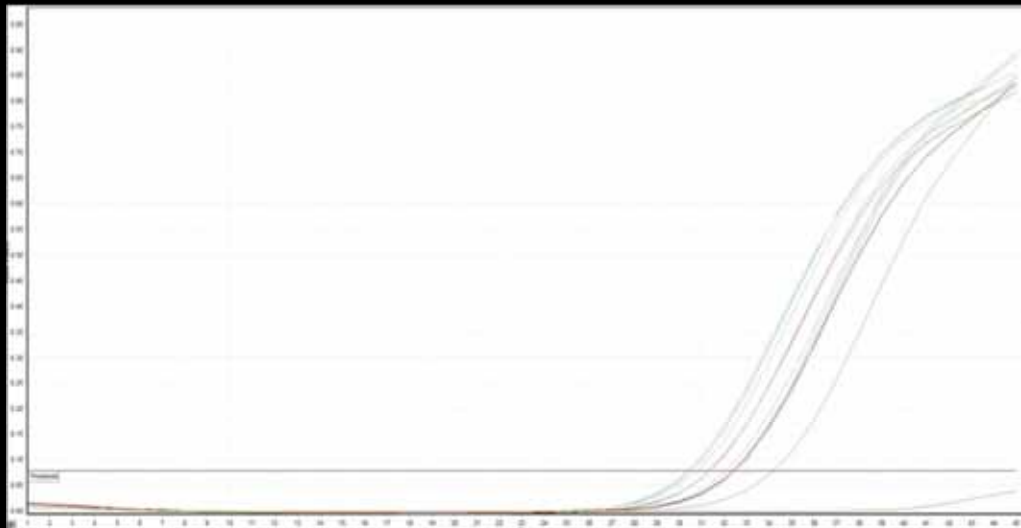
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (II)

Γονίδιο GAPDH



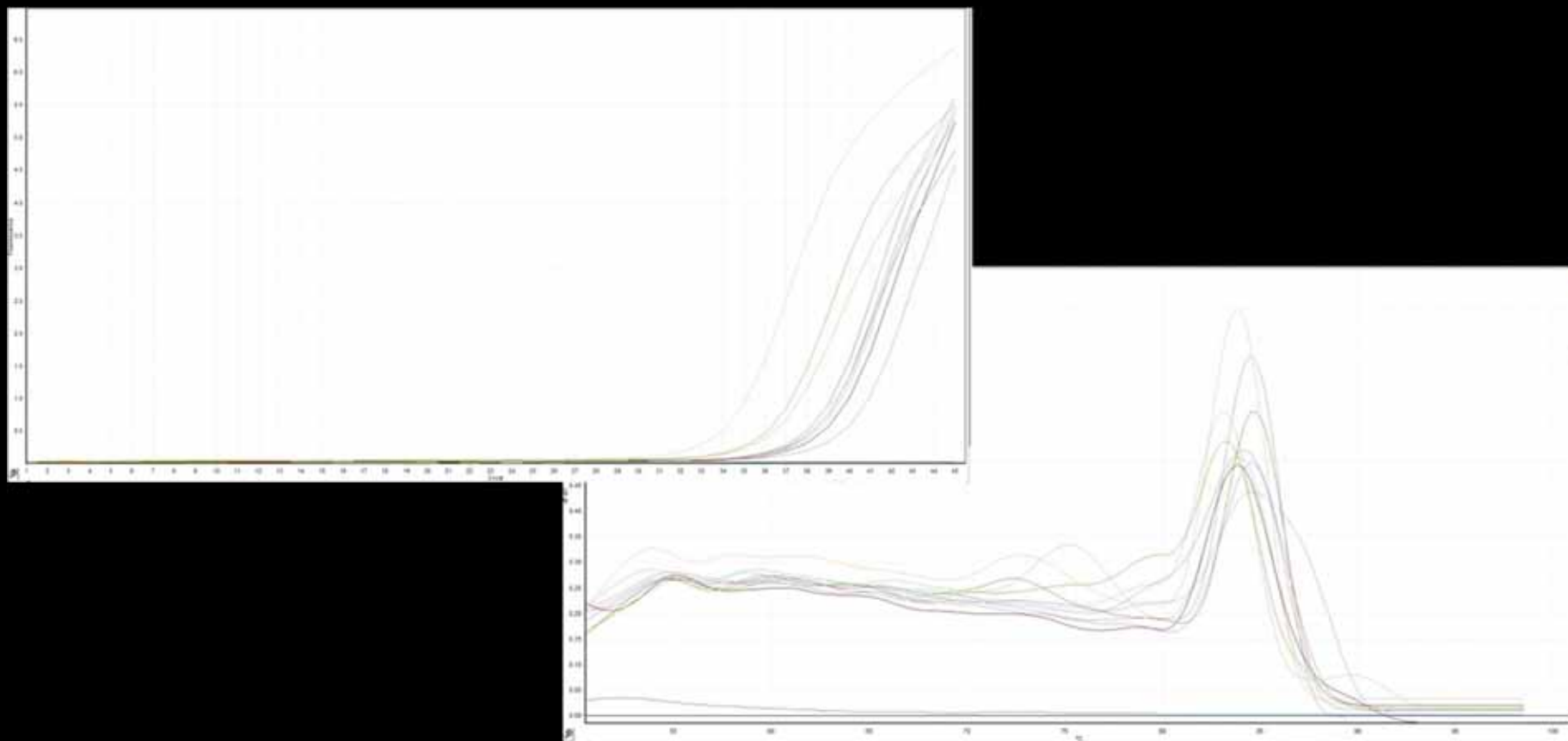
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (III)

Γονίδιο CRFR1



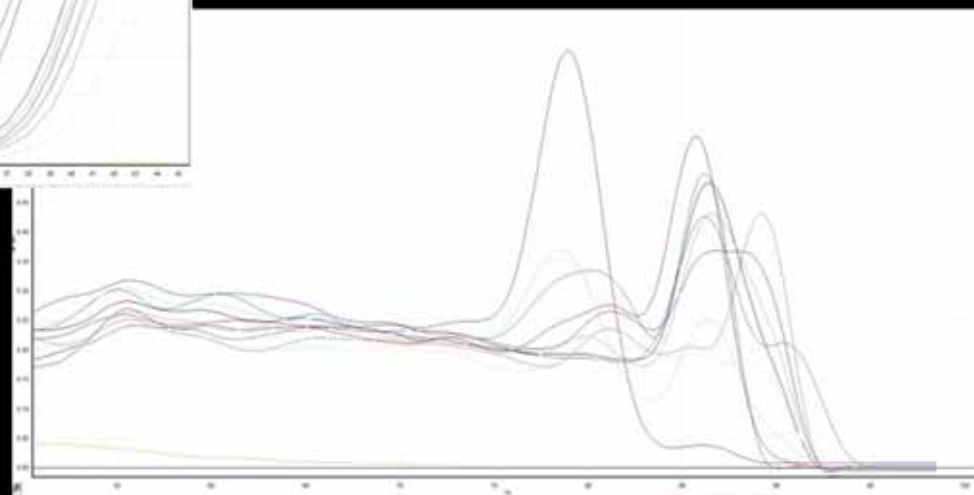
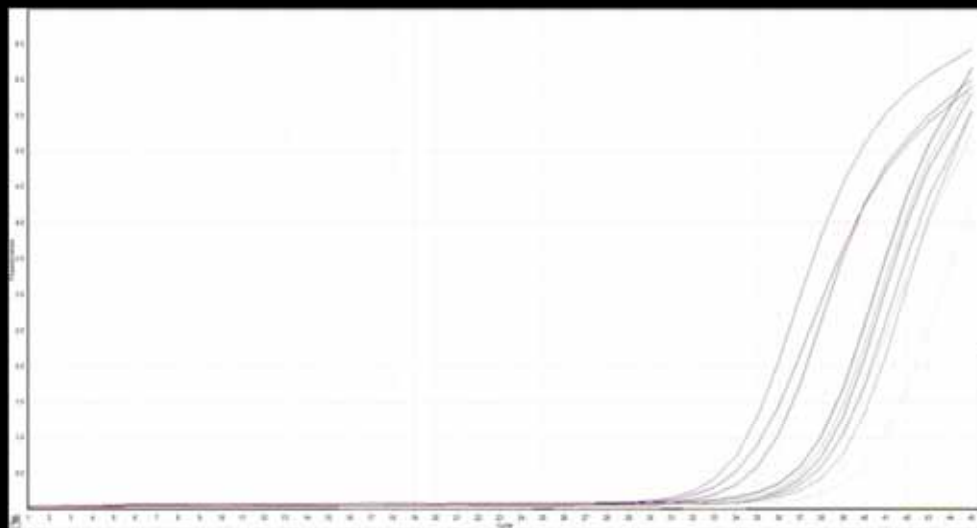
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (IV)

Γονίδιο CRFR2A



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (V)

Γονίδιο CRFR2B



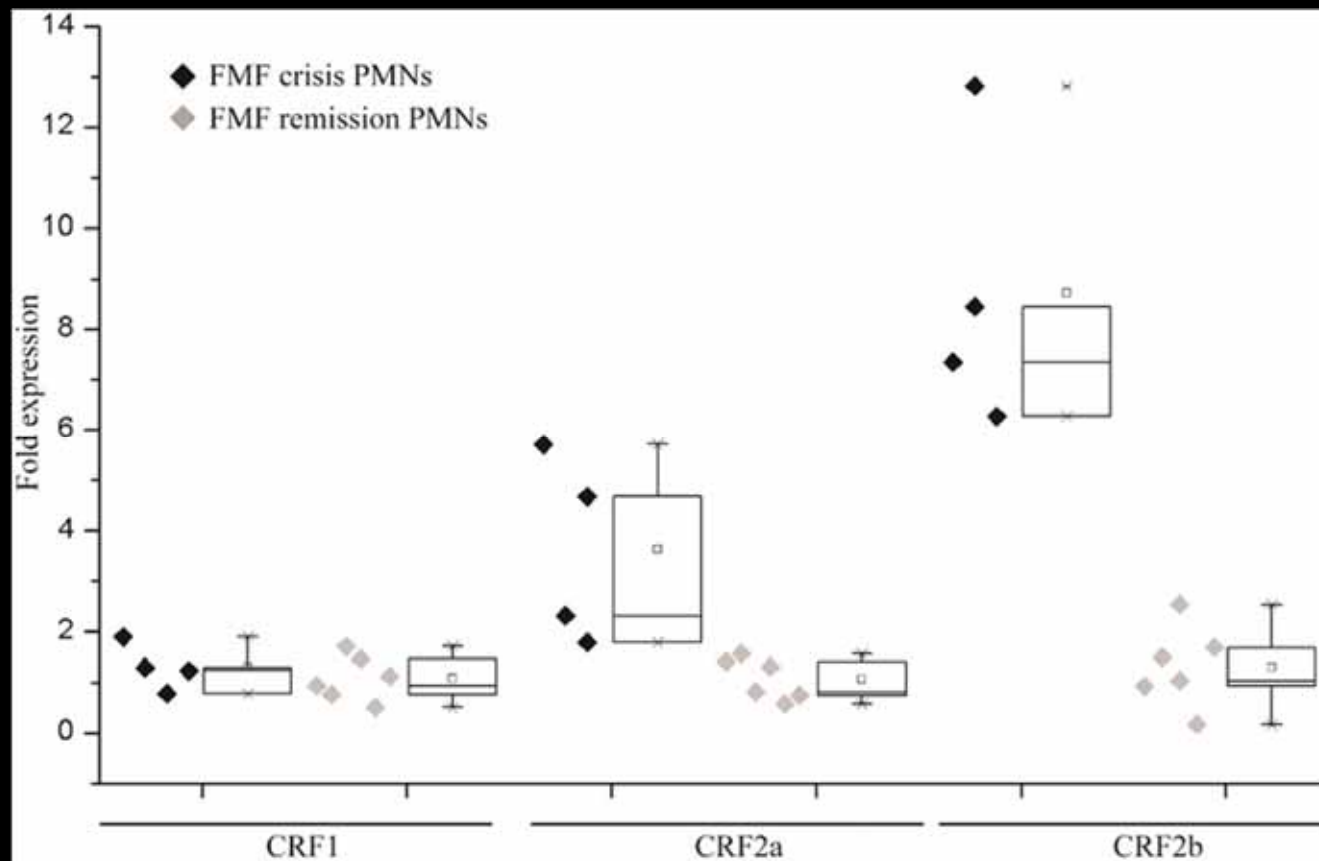
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (VI)

Δείγματα υγριών

- Δεν παρατηρήθηκε έκφραση κανενός από τους υποδοχείς του συστήματος.
- Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με ευρήματα από άλλους ερευνητές (Radulovic *et al.* 2000, Lavicoli *et al.* 1997).
- Αύξηση του αριθμού των δειγμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (VII)

Δείγματα ασθενών με οικογενή μεσογειακό πυρετό



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (VIII)

Δείγματα ασθενών με οικογενή μεσογειακό πυρετό

- Έκφραση όλων των υποδοχέων του συστήματος
- Σημαντική αύξηση των CRFR2A και CRFR2B κατά την υποτροπή.
- CRFR1 ανεπηρέαστος.
- Οργανισμός σε κατάσταση στρες λόγω της φλεγμονής.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (ΙΧ)

Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο

- Έκφραση του CRFR₁ σε όλα τα δείγματα χωρίς αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης.
- CRFR_{2a} και CRFR_{2b} εκφράζονται σε ελάχιστα δείγματα.
- Μικρός αριθμός δειγμάτων.
- Το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο δεν φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με τον οικογενή μεσογειακό πυρετό όσον αφορά τους υποδοχείς του συστήματος του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης πολύ πιθανό γιατί επηρεάζεται από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων του συστήματος CRF αποτελεί μια βάσιμη βιοχημική και νευροενδοκρινική εξήγηση για την συσχέτιση του στρες με την υποτροπή στον μεσογειακό πυρετό.
- Οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν ισχυρές ενδείξεις αλλά κρίνεται απαραίτητη η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων, ο σχεδιασμός μιας μεγαλύτερης μελέτης και η δημιουργία ενός πειραματικού μοντέλου για να μπορούν τα αποτελέσματα αυτά να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα για την εύρεση νέων φαρμακευτικών στόχων και τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων στον οικογενή μεσογειακό πυρετό.