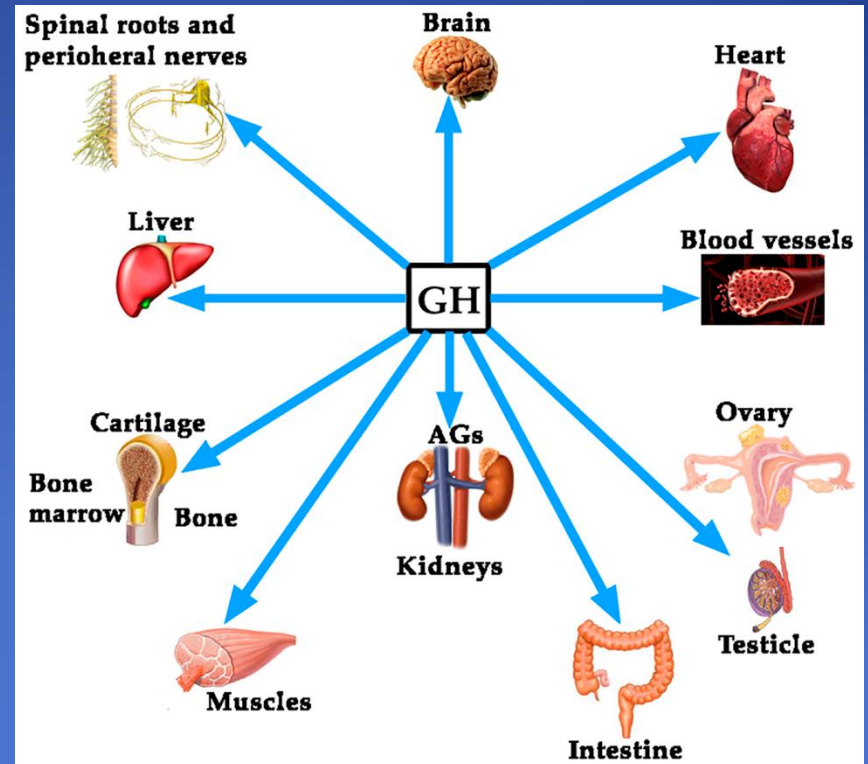


# Μοριακοί μηχανισμοί διαταραχών αυξητικής ορμόνης και τον ρόλο τους στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή

Βασιλική Ε. Γκρέκα- Σπηλιώτη  
Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας

# Εισαγωγή - Αυξητική Ορμόνη

- Η αυξητική ορμόνη είναι μία απαραίτητη ορμόνη του οργανισμού που παίζει ρόλο σε πολλά όργανα και ιστούς του οργανισμού

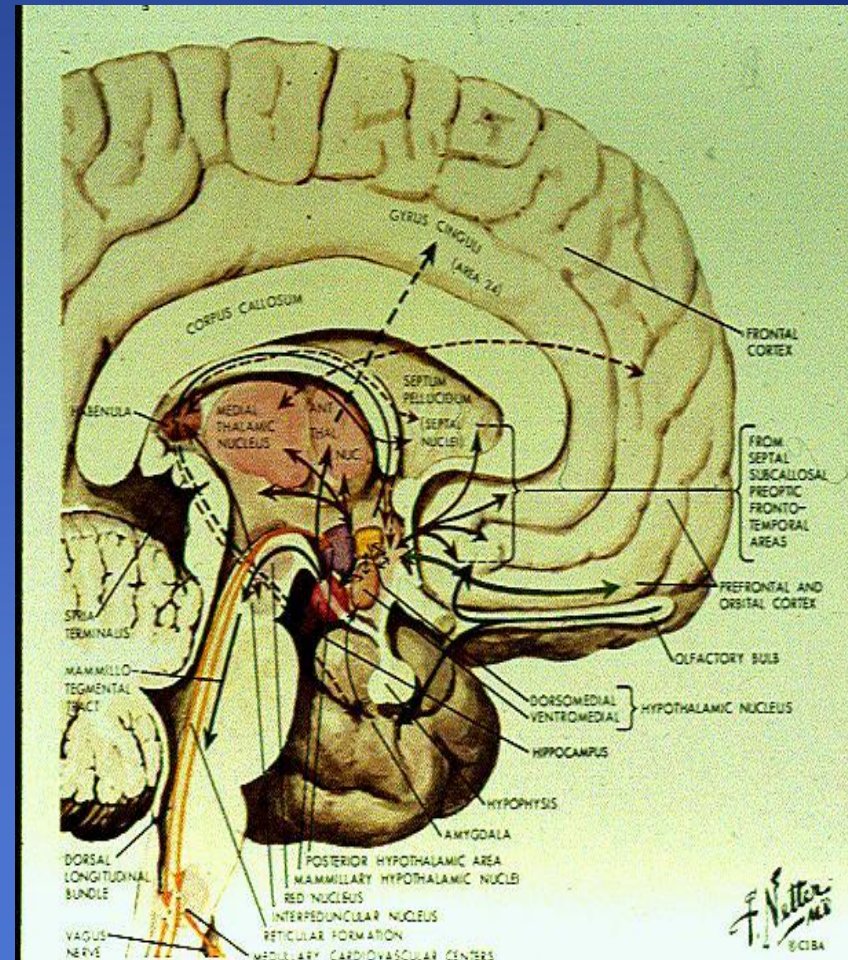


# Νευρορύθμιση της GH στον εγκέφαλο

- 5 ρυθμιστικοί οδοί:
  - (1) α-αδρενεργειών ουσιών,
  - (2) ντοπαμίνης,
  - (3) ακετυλχολίνης,
  - (4) σεροτονίνης
  - (5) GABA

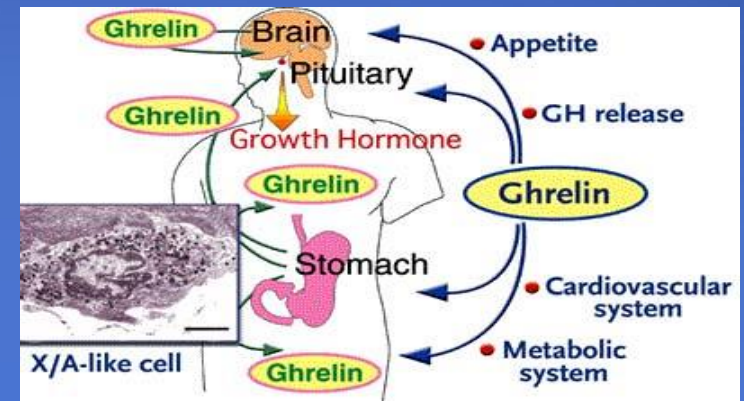
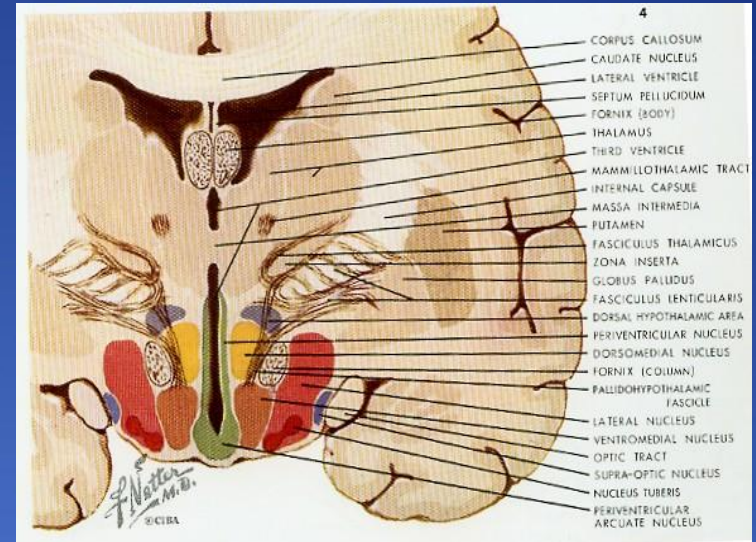
- Ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα:  
Αμυγδαλή και ιππόκαμπος

*Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2013; 163C: 76–85.*



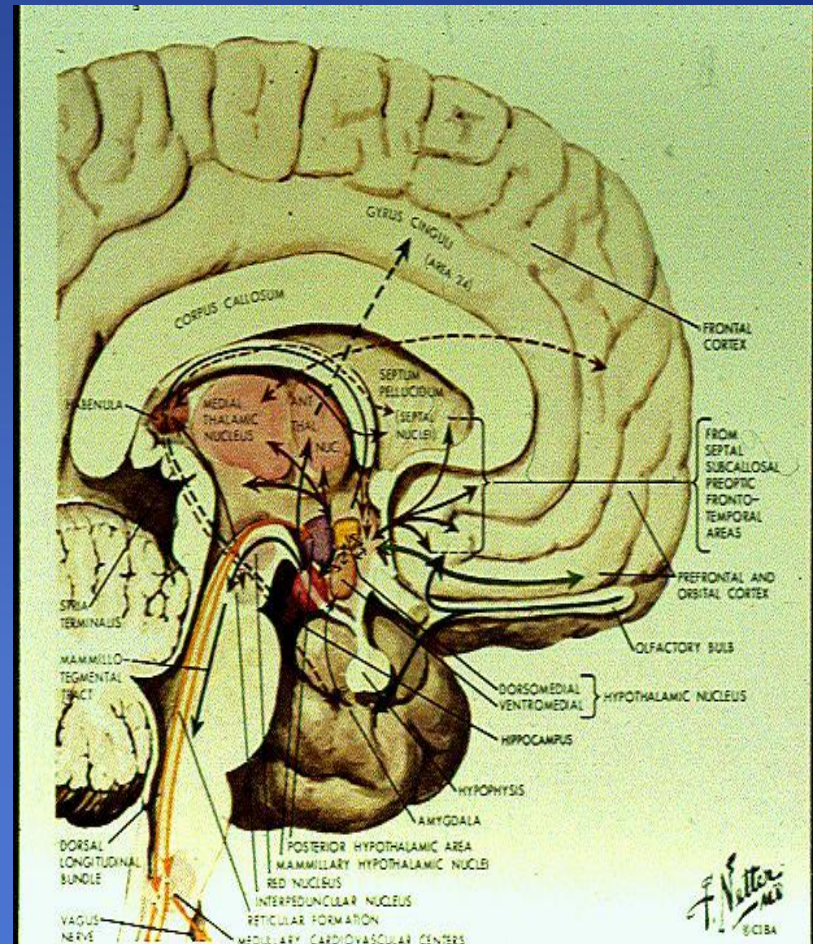
# Νευρορύθμιση της GH στον υποθάλαμο

- **Πυρήνες:** τοξοειδής (arcuate) και προσθιοκοιλιακός (ventromedial)
- (1) Εκλυτικός παράγοντας GH: GHRH
- (2) συνεργασία μεταξύ acyl-Ghrelin + GHRH
- (3) Ανασταλτικός παράγοντας GH : Σωματοστατίνη



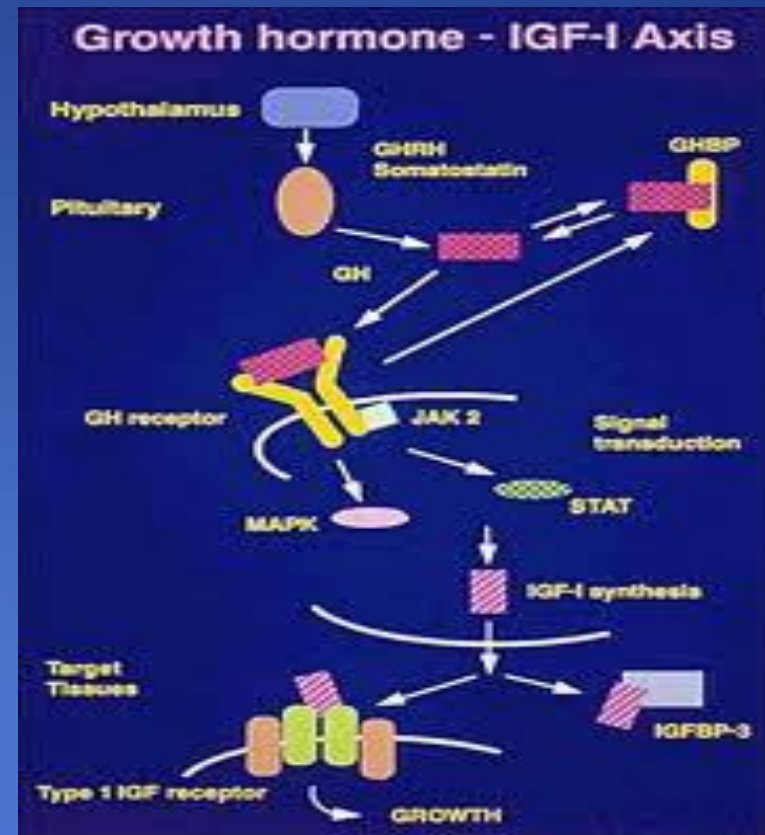
# Υπόφυση

- Μίσχος -Πρόσθιο Λοβό της Υπόφυσης
- Σωματοτρόπα κύτταρα : σύνθεση και έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH)



# GH από την υπόφυση στο κύτταρο Άξονα: GH/IGF-I

- Μετά την έκκριση της από την υπόφυση η GH είτε:
- 1) Θα συνδεθεί με την δεσμευτική πρωτεΐνη (GHBP): το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (GHR) **ή**
- 2) Θα συνδεθεί με τον GHR και θα γίνει μεταγωγή του σήματος της GH για την δημιουργία της σωματομεδίνης (IGF-I)

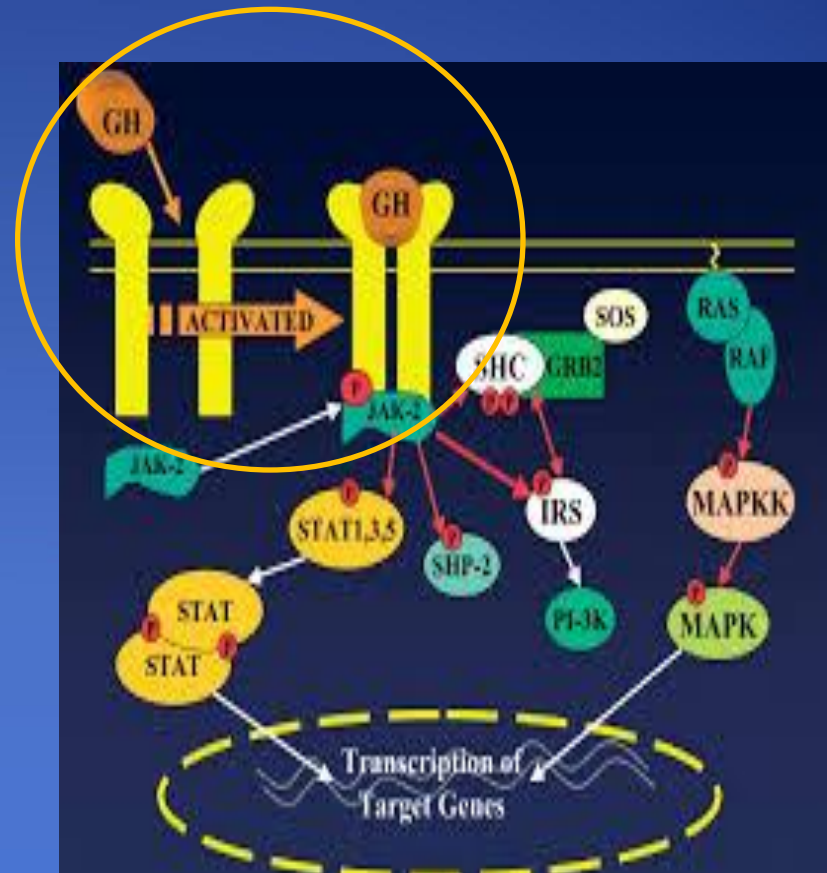


*Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013; 163C:

76-85.

# ΣΥΝΔΕΣΔΗ GH – GHR ΜΕΤΑΓΩΓΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ GH

- Συνδέεται 1 μόρια GH με 2 μόρια GHR →
- Ενεργοποιείται η τυροσινκινάση JAK<sub>2</sub> →
- Η JAK<sub>2</sub> ενεργοποιεί τον GHR

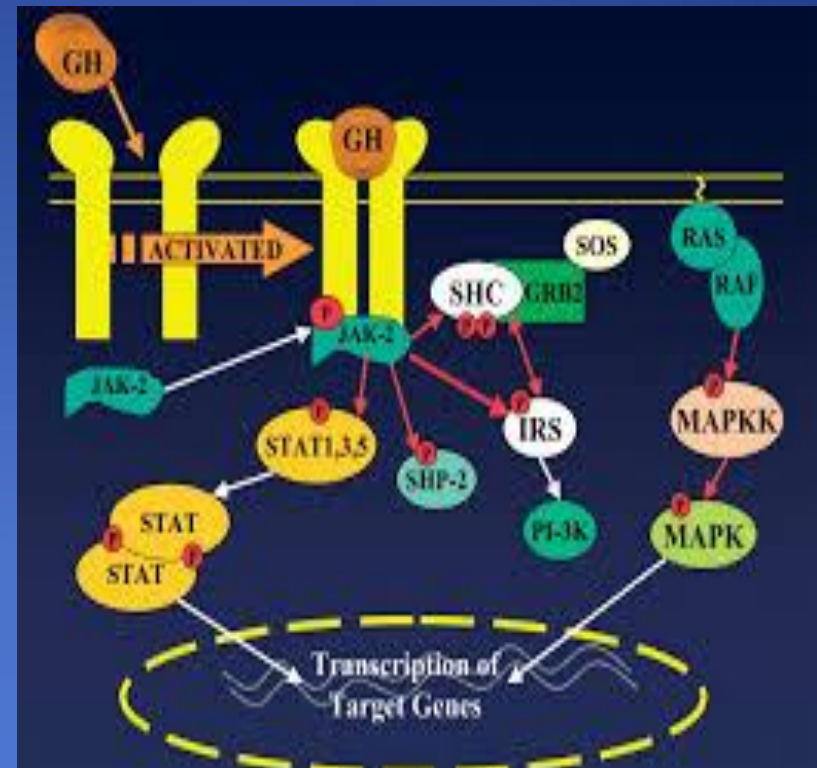


# ΜΕΤΑΓΩΓΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ GH

Μετά την ενεργοποίηση της JAK-2

- 3 μείζονα σηματοδοτικά συστήματα ενεργοποιούνται :

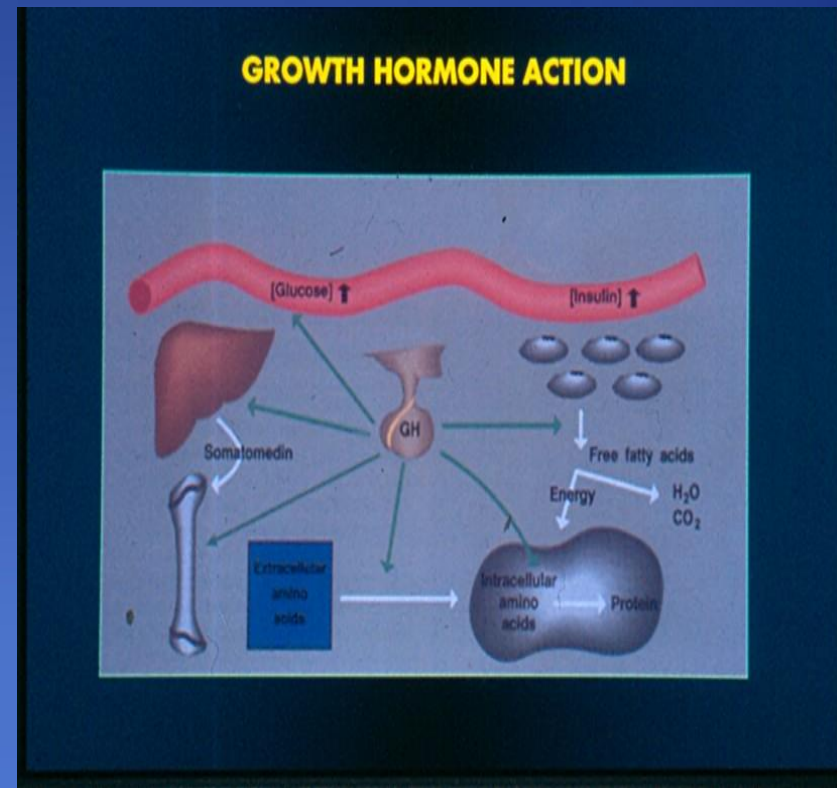
1. STATs 1,3, & 5
2. PI3- Κινάση
3. MAP- Κινάση





# Δράσεις της Αυξητικής Ορμόνης-1

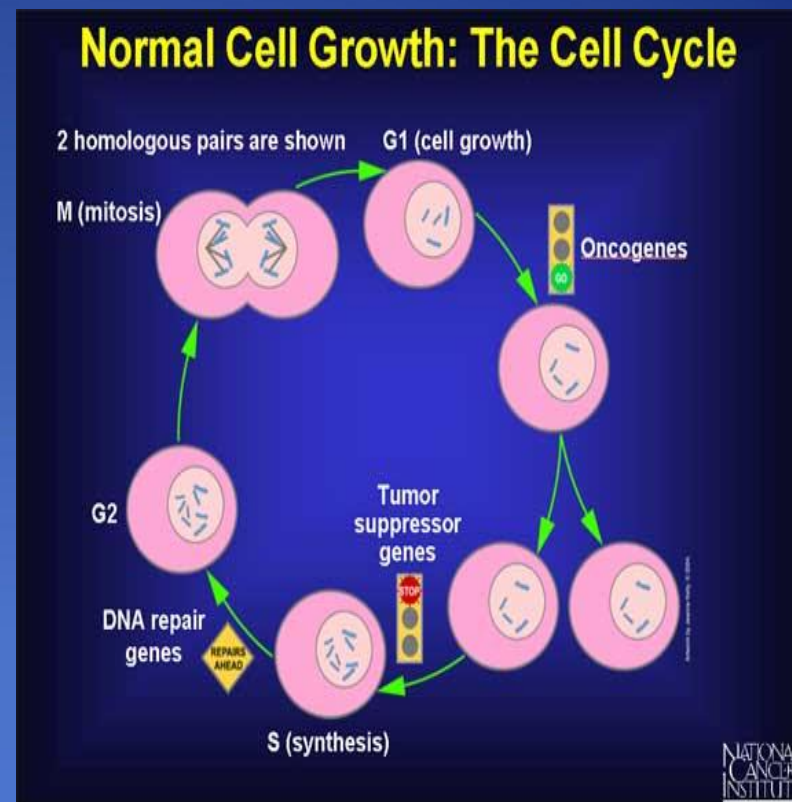
- Κατά μήκος αύξηση των οστών
- Μεταβολισμό πρωτεϊνών και μυϊκή ισχύ
- Μεταβολισμό λιπαρών οξέων –λιπόλυση
- Ινσουλινοευαισθησία και ρύθμιση γλυκόζη αίματος



## Δράσεις της Αυξητικής Ορμόνης-2

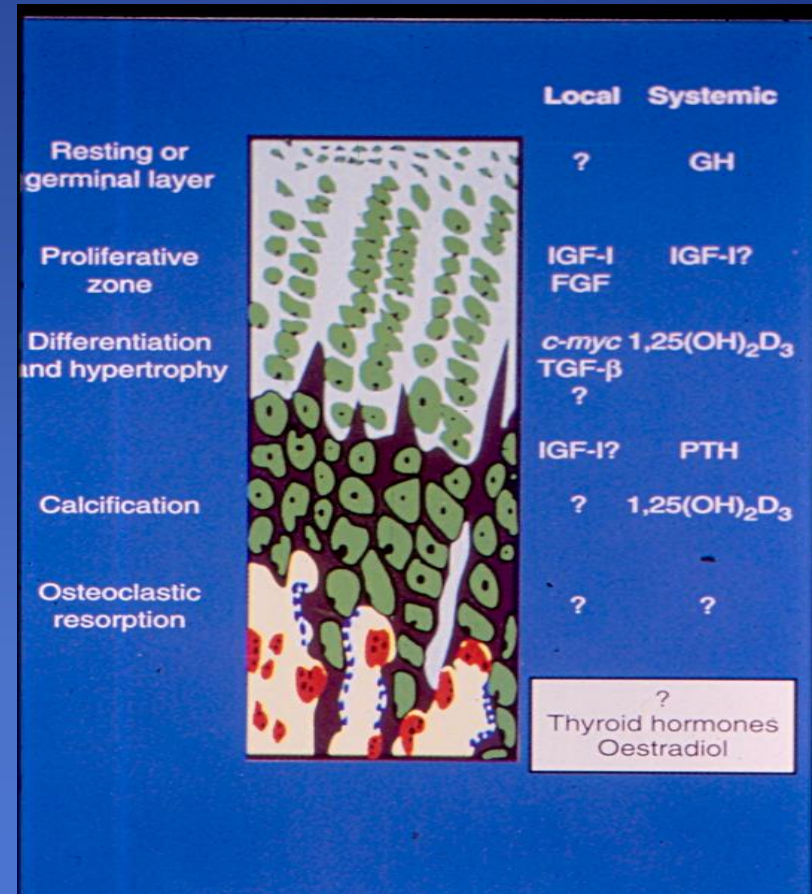
- Αύξηση και επιβίωση των κυττάρων
- Επισκευή και ανανέωση ιστών
- Ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος
- Λειτουργία και αναγέννηση νευρώνων

**Clin Med Insights: Endocrin and Diab 9:47-7, 2016**



# Επίδραση GH και IGF-I στον οστικό πυρήνα

- GH στην βασική στιβάδα
- IGF-I στην στιβάδα πολλαπλασιασμού χονδροκυττάρων
- IGF-I στην στιβάδα ασβεστοποίησης χονδροκυττάρων



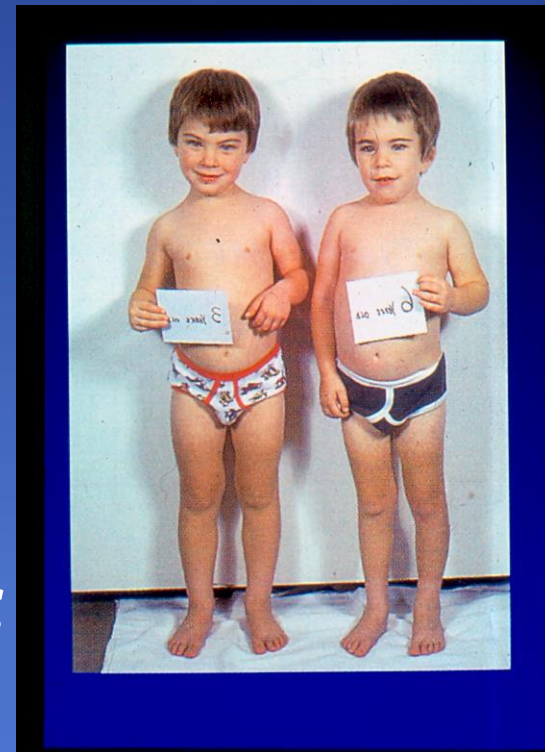
# Οστική ηλικία

- Η οστική ηλικία δείχνει την επίδραση GH - IGF-I (και άλλων ορμονών) στην ωρίμανση των οστών



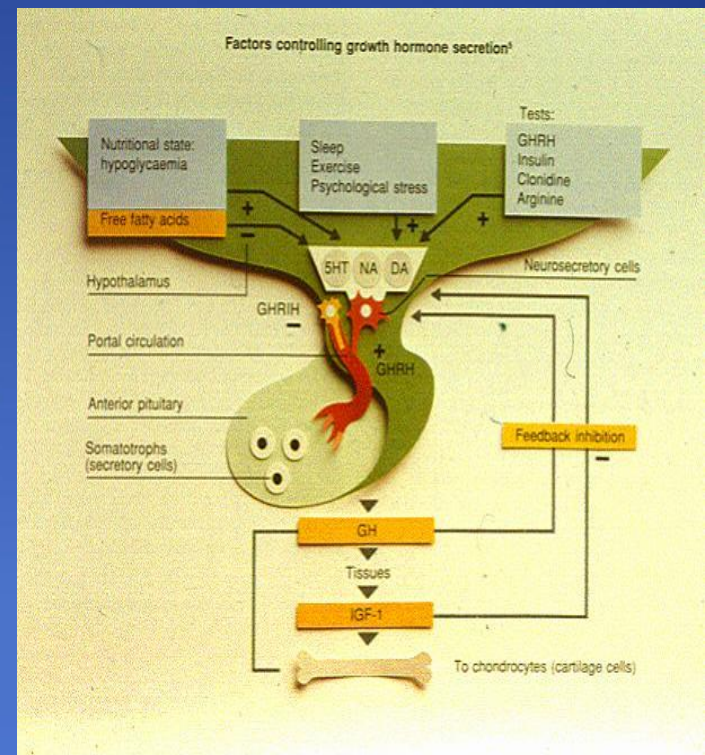
# Απαραίτητες γνώσεις για την κατανόηση της Ανεπάρκειας GH

- Νευρορύθμιση GH
- Μεταγωγικό Μονοπάτι GH στο κύτταρο
- Δράσεις GH
- Εξετάσεις επάρκειας και ικανότητα δράσης GH
- Κλασικές Μορφές Ανεπάρκειας GH
- Καινούργια μορφή ανεπάρκειας GH



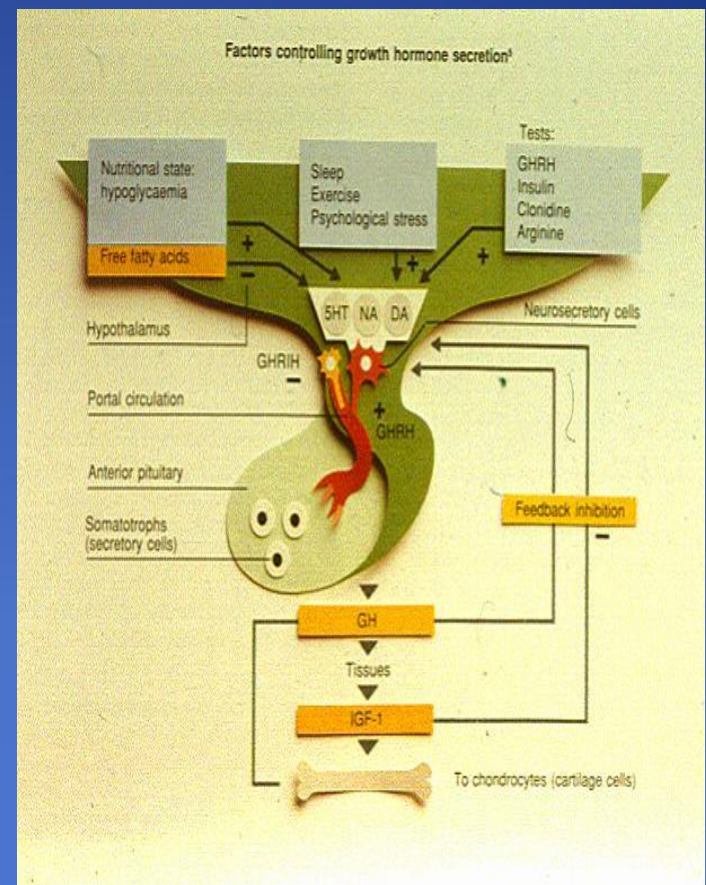
# Εξετάσεις επάρκειας GH

- 1) Προκλητές εξετάσεις GH
- 2) 24 ωρη Εξέταση GH

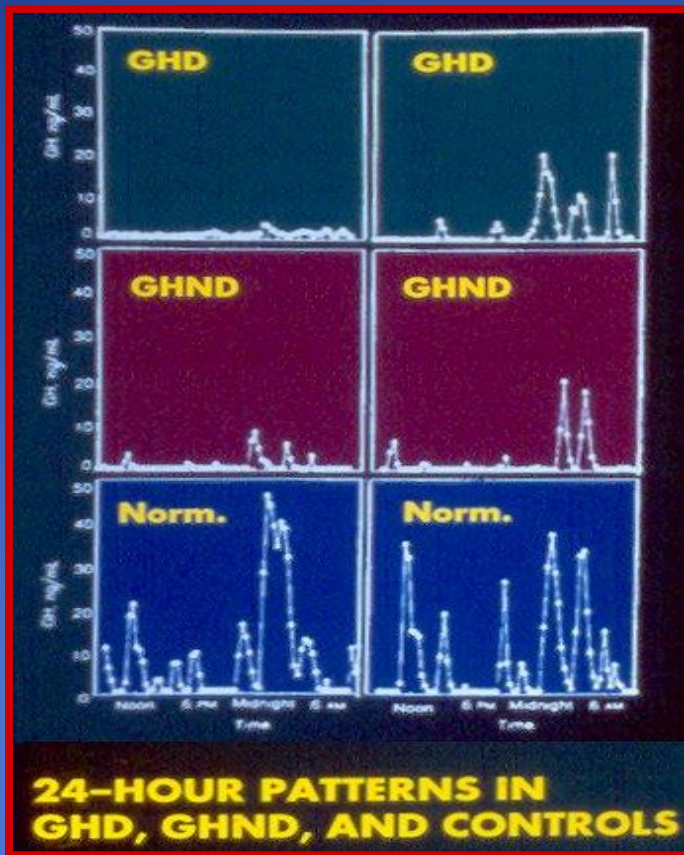


# 1) Προκλητές Εξετάσεις GH

- Βασίζονται στην φαρμακολογική διέγερση νευρορρυθμιστικών μηχανισμών έκκρισης GH
- Εξετάσεις πρόκλησης της GH:
  - κλονιδίνη
  - L-dopa
  - ινσουλίνη και άλλα



## 2) Εξέταση 24ωρης έκκρισης GH



★ Βασίζεται στην μέτρηση της ενδογενή έκκρισης της GH μετά από φυσιολογικά ερεθίσματα GH

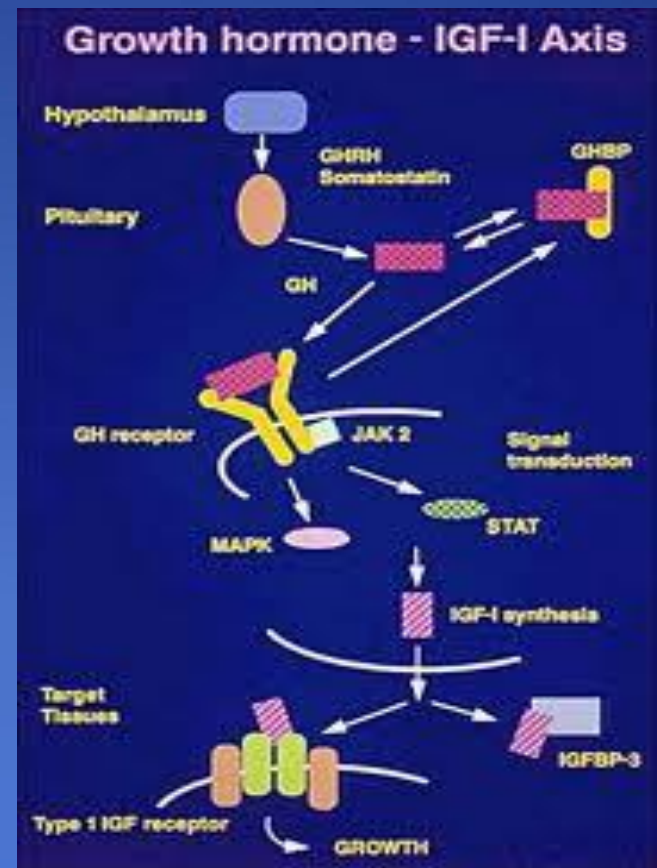


# Εξέταση επάρκειας δράσης GH IGF-I generation test

Έμμεση Εξέταση της  
λειτουργίας του Υποδοχέα της  
GH

- 4 ημέρες χορήγησης GH και εξέταση ανταπόκρισης του IGF-I

(Φυσιολογική αύξηση:  $\geq 100$  % αύξηση)



# Κλασσικές Μορφές Ανεπάρκειας Αυξητικής Ορμόνης

- 1) Κλασσική Ανεπάρκεια της GH  
(Classic GH Deficiency)
- 2) Νευροεκκριτική Δυσλειτουργία της GH  
[GH Neurosecretory Dysfunction (GHND)]

# Κλασσικές μορφές Ανεπάρκειας GH (GHD)

1) Κλασσική Ανεπάρκεια  
Αυξητικής Ορμόνης



2) Νευροεκκριτική  
Δυσλειτουργία Αυξητικής  
Ορμόνης



# 1) Κλασσική Ανεπάρκεια της GH

3 ΕΤΩΝ

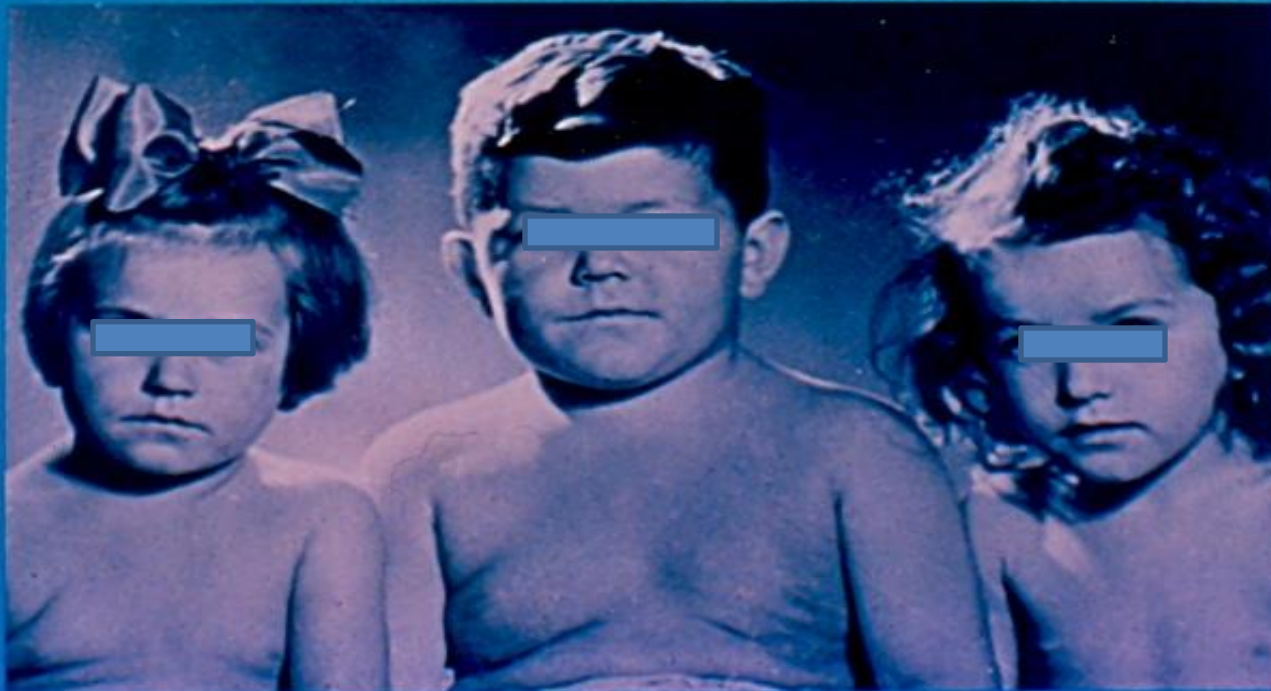
6 ΕΤΩΝ (GHD)

- Φυσιολογικό βάρος σώματος ή παχυσαρκία
- ύψος < 3<sup>η</sup> % θέση
- Χαμηλό IGF-I
- Παθολογική τιμή GH μετά από φαρμακολογική πρόκληση

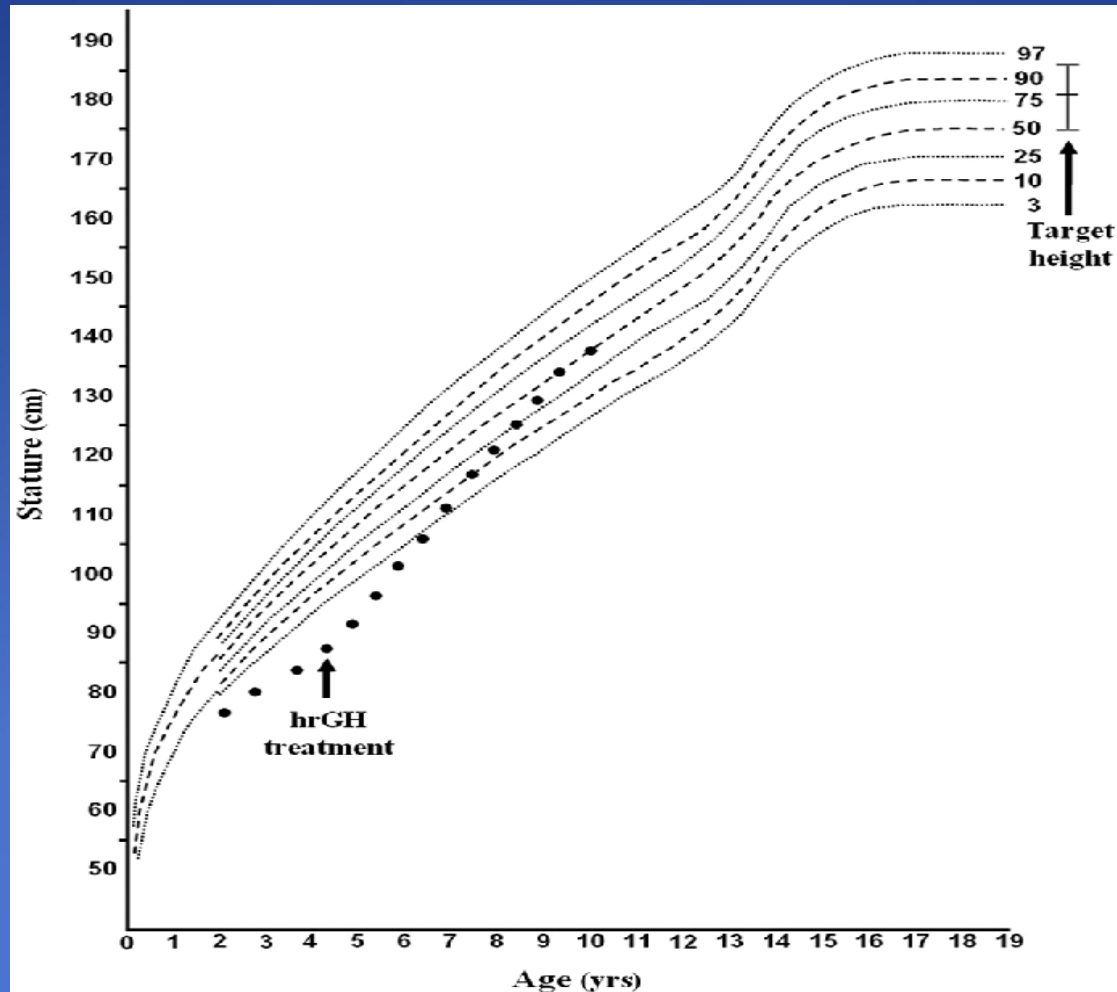


# Κλασική Ανεπάρκεια της GH

Two Pituitary Dwarfs and Normal Sister:  
General appearance



# GHD μετά από θεραπεία με hGH



# Κλασική Ανεπάρκεια της GH

35 ετών γυναίκα  
με GHD



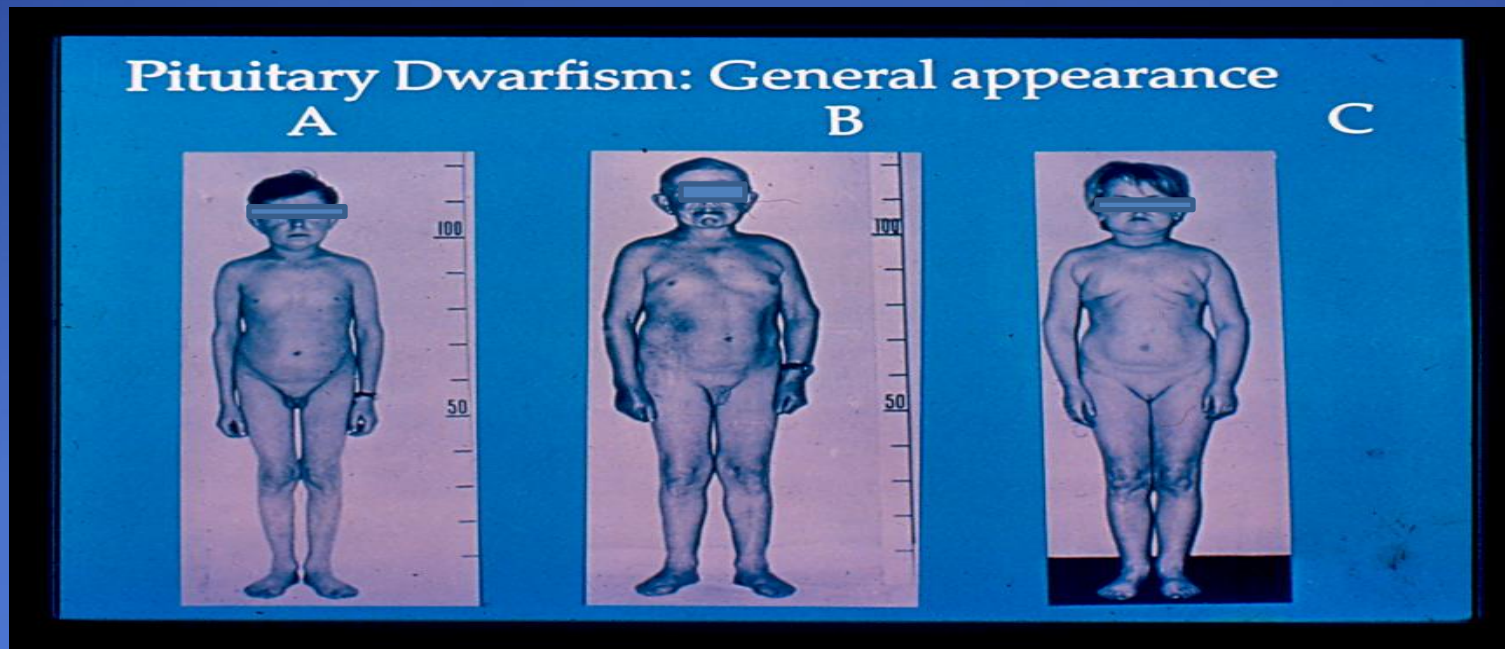
# Κλασική Ανεπάρκεια GH

- Χωρίς θεραπεία με GH προκαλεί καθυστέρηση της ήβης και πρόωρη γήρανση

**14 ετών**

**50 ετών**

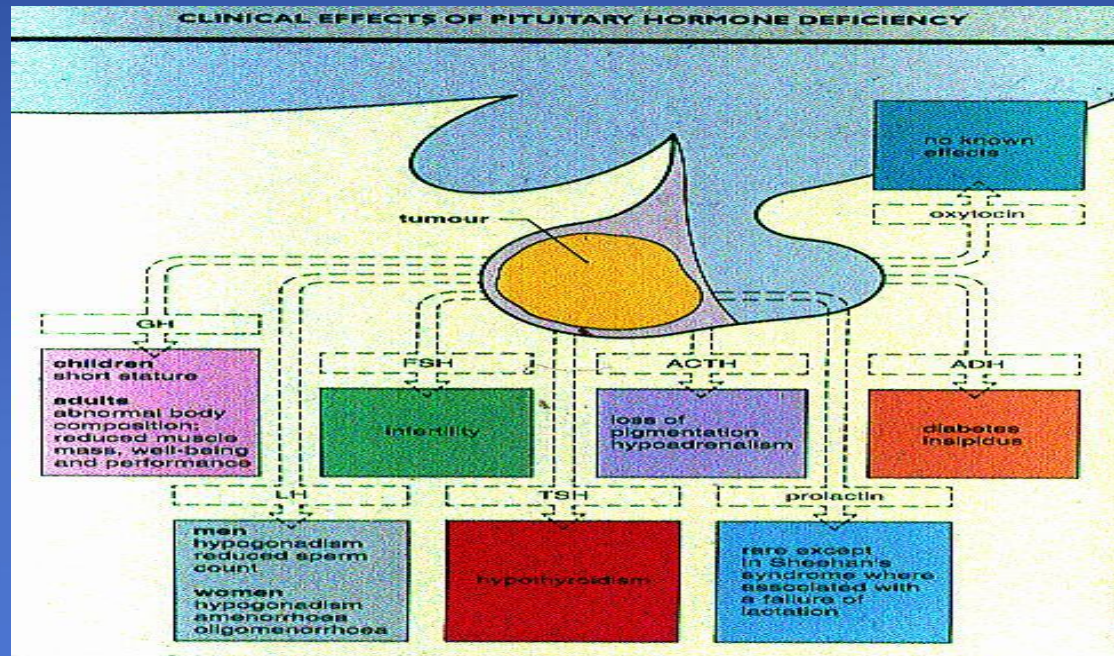
**14 ετών**





# Όγκος και GH Ανεπάρκεια

- GH ανεπάρκεια: μπορεί να υπάρχει όγκος στην υπόφυση ή στον υποθάλαμο

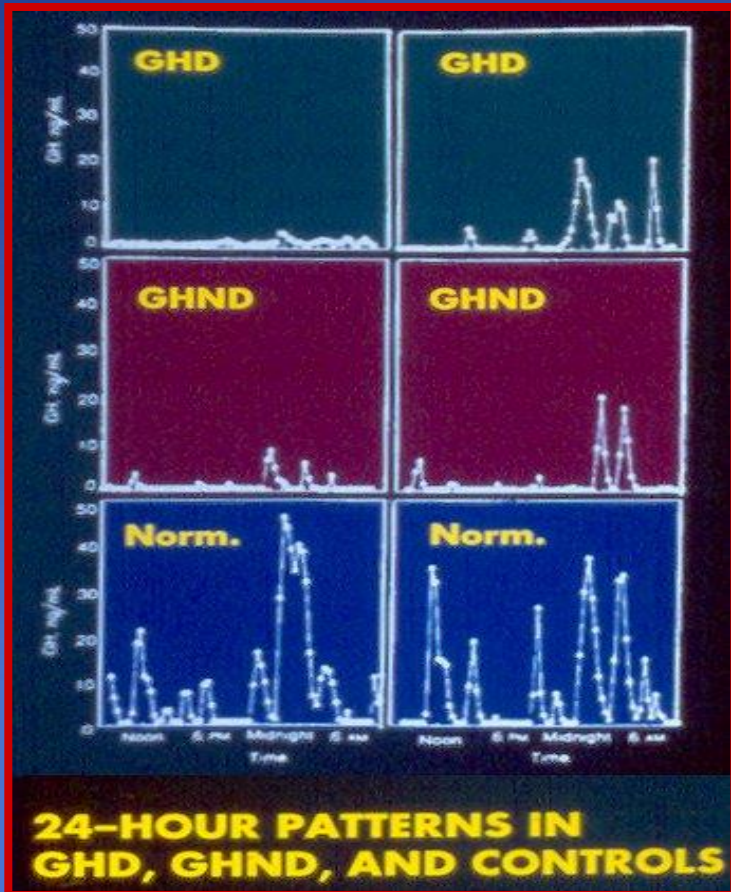


## 2) Νευροεκκριτική Δυσλειτουργία της Αυξητικής Ορμόνης ( GHND) Spiliotis, BE, JAMA 251(17): 2223-2230, 1984

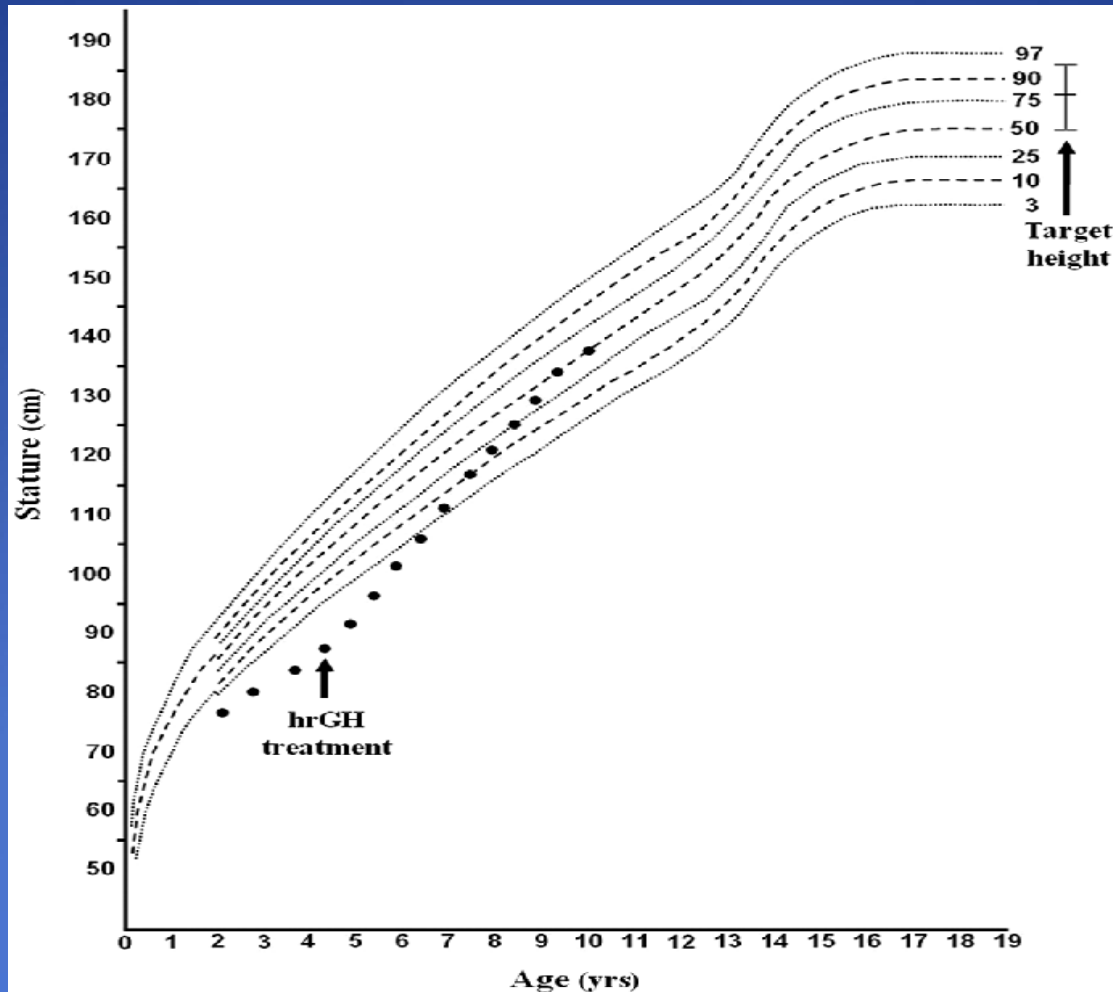
- Φυσιολογικό βάρος σώματος ή παχυσαρκία
- ύψος < 3<sup>η</sup> % θέση Χαμηλό IGF-I
- Φυσιολογική τιμή GH (ΦΤ:  $\geq 10$  ng/ml) μετά από φαρμακολογική πρόκληση
- Αυξημένη ανταπόκριση IGF-I στο IGF-I Generation Test (300-400 % αύξηση)
- Παθολογική τιμή 24ωρης έκκρισης GH



# Νευροεκκριτική Δυσλειτουργία της Αυξητικής Ορμόνης



# GHND μετά από θεραπεία με hGH



# Διαταραχές της GH - Θεραπεία με hGH

## 1) Κλασσική Ανεπάρκεια Αυξητικής Ορμόνης

- Χαμηλό IGF-I
- Παθολογικές Εξετάσεις Πρόκλησης GH



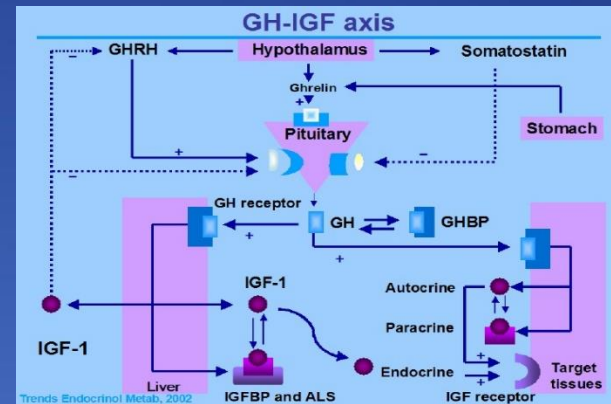
## 2) Νευροεκκριτική Δυσλειτουργία Αυξητικής Ορμόνης

- Χαμηλό IGF-I
- Φυσιολογικές Εξετάσεις Πρόκλησης GH
- Παθολογική 24ωρη Εξέταση GH

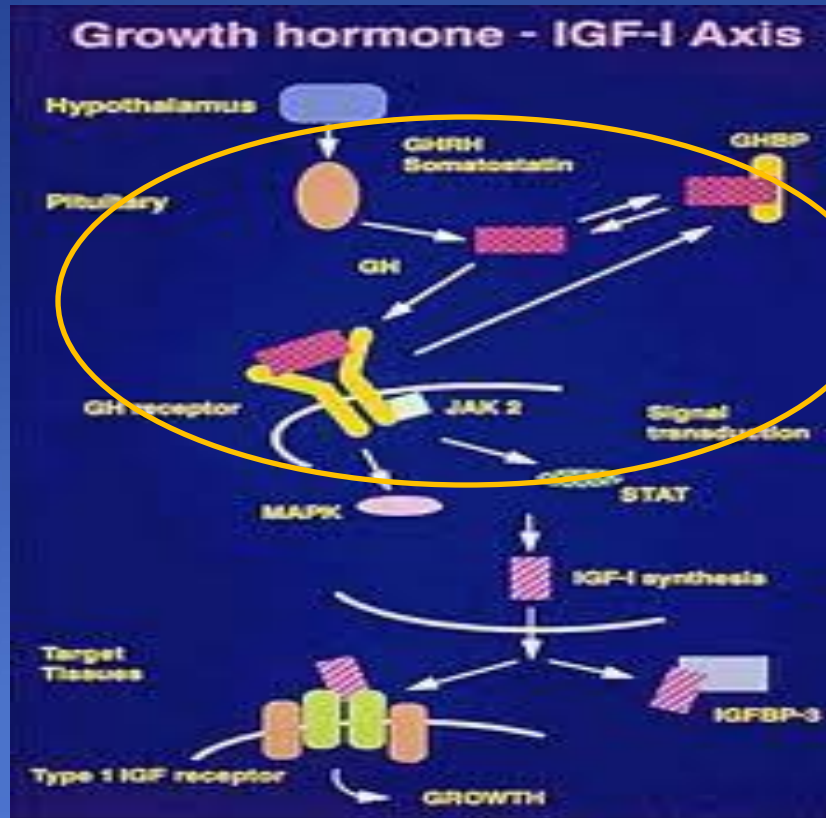


# Σύνδρομα Μη Ανταπόκρισης GH (GH Insensitivity Syndromes)

- 1) Μεταλλάξεις Υποδοχέα GH
  - 2) Μεταλλάξεις IGF-I
  - 3) Ανεπάρκεια IGF-ALS
  - 4) Μετάλλαξη STAT5b
- 
- Παθολογική ανταπόκριση IGF-I στο IGF-I Generation Test (< 30 % αύξηση)
  - Θεραπεία με συνθετική IGF-I



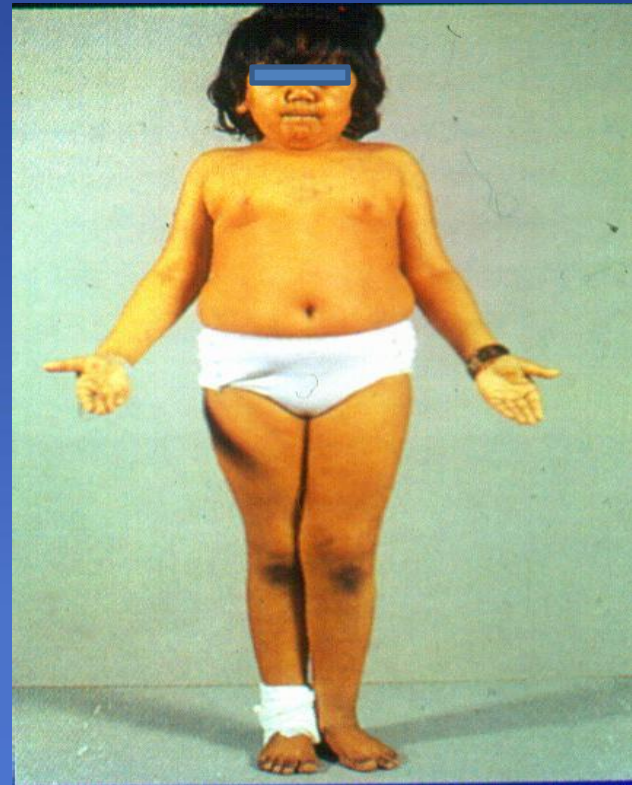
# Μεταλλάξεις Υποδοχέα GH



# Σύνδρομο Laron

## Μεταλλάξεις στον Υποδοχέα GH

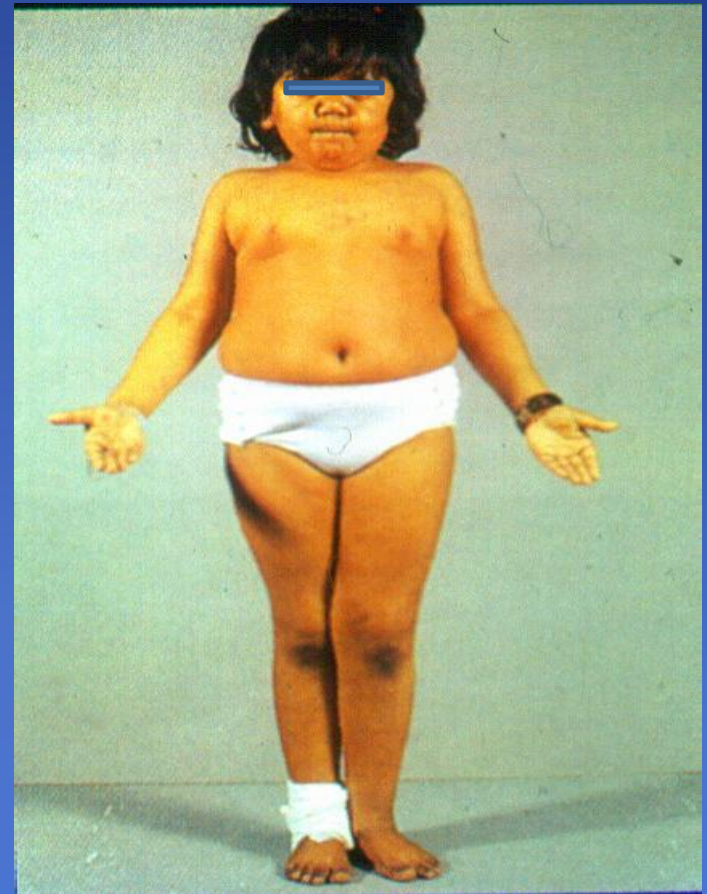
- Κοντό ανάστημα (ύψος  $< 3^{\eta}$  % θέση)
- Φυσιολογικό βάρος σώματος
- Χαμηλό IGF-I
- Φυσιολογική τιμή GH (ΦΤ:  $\geq 10$  ng/ml) μετά από φαρμακολογική πρόκληση
- Φυσιολογική 24ωρη έκκριση της GH
- Παθολογική ανταπόκριση IGF-I στο IGF-I Generation Test ( $< 30$  % αύξηση)





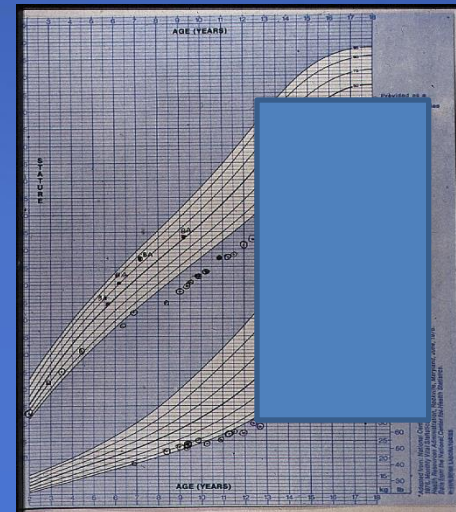
# Σύνδρομο Laron:

(θεραπεία με συνθετικό IGF-I)



# Καινούργια Διαταραχή GH

- Κοντό ανάστημα (ύψος < 3<sup>η</sup> % θέση)
- Φυσιολογικό βάρος σώματος
- Χαμηλό IGF-I
- Φυσιολογική τιμή GH (ΦΤ:  $\geq 10$  ng/ml) μετά από φαρμακολογική πρόκληση
- Φυσιολογική 24ωρη έκκριση της GH
- Αυξημένη ανταπόκριση IGF-I στο IGF-I Generation Test: (200-300 % αύξηση)



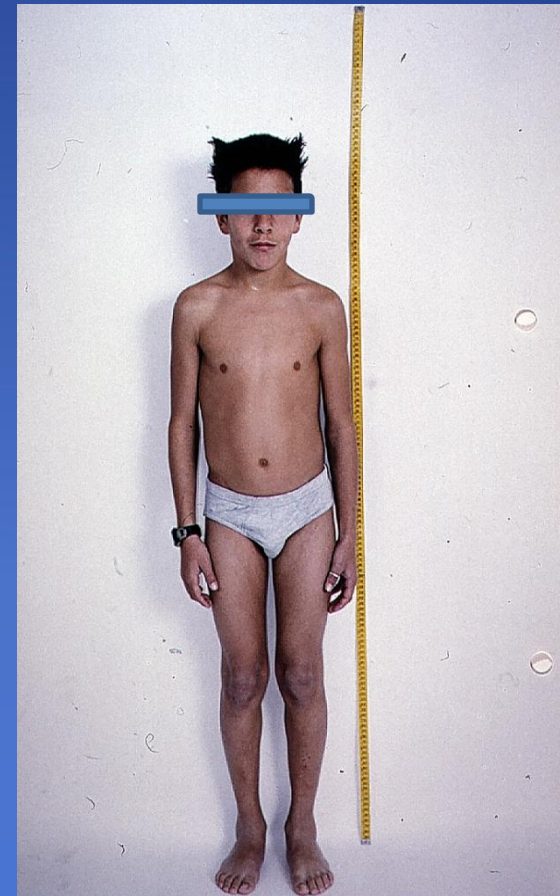
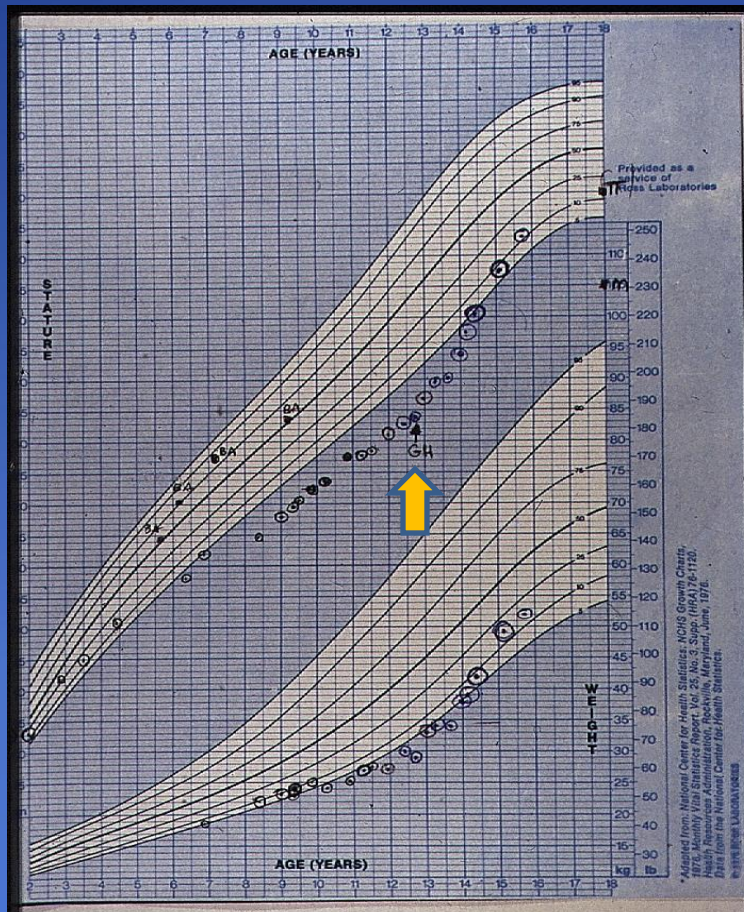
# «Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)»

FEBS Journal 273: 3454-3466, 2006

- Κοντό ανάστημα (ύψος < 3<sup>η</sup> % θέση)
- Φυσιολογικό βάρος σώματος
- Χαμηλό IGF-I
- Φυσιολογική τιμή GH (ΦΤ:  $\geq 10$  ng/ml) μετά από φαρμακολογική πρόκληση
- Φυσιολογική 24ωρη έκκριση της GH
- Αυξημένη ανταπόκριση IGF-I στο IGF-I Generation Test: (200-300 % αύξηση)



# Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD) (Θεραπεία με hGH)

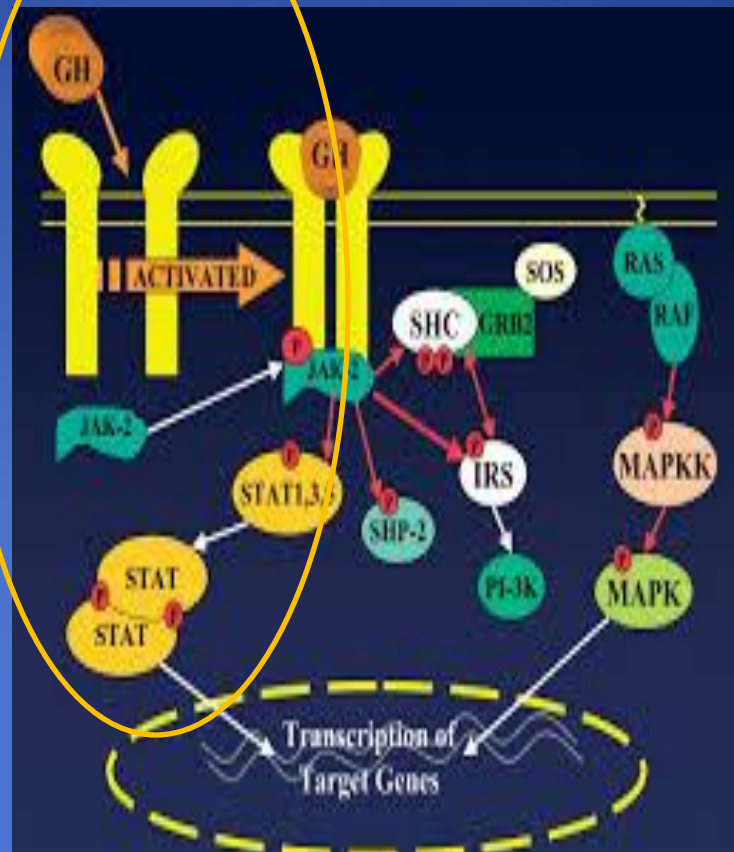


# Ταχύτητα Ανάπτυξης Παιδιών με GHTD πριν και μετά από θεραπεία με συνθετική αυξητική ορμόνη (hGH)

n	Before (cm/yr)	1 <sup>st</sup> yr (cm/yr)	2 <sup>nd</sup> yr (cm/yr)	3 <sup>rd</sup> yr (cm/yr)
4	2.3 $\pm$ 0.6	9.5 $\pm$ 2.0	8.8 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 0.7

# Ερευνητική Μελέτη στο Μοριακό Εργαστήριο Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Παν/μιου Πατρών για την «Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)»

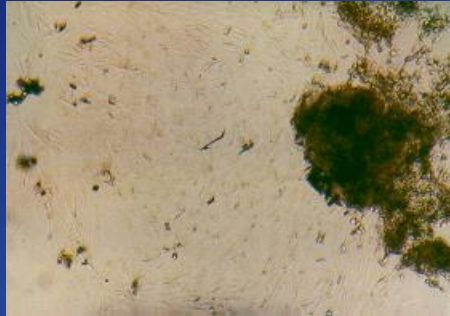
► 1) Βιοψία ούλων για την δημιουργία καλλιέργειων ινοβλαστών: 4 ασθενείς και 4 μάρτυρες



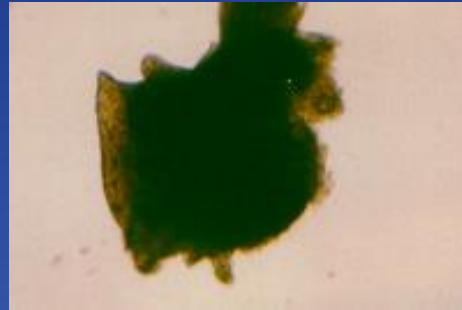
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## Καλλιέργειες ινοβλαστών:

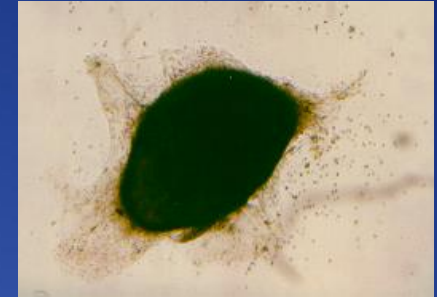
A



B



C



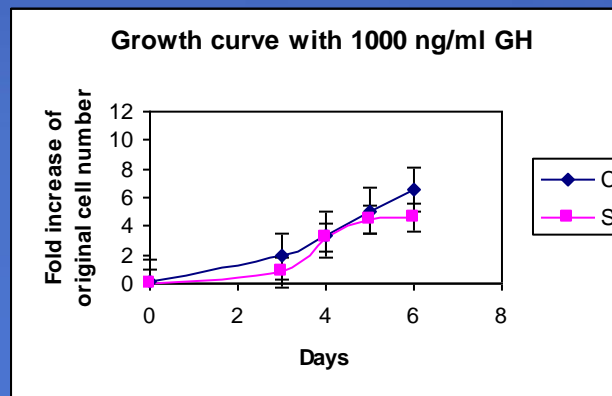
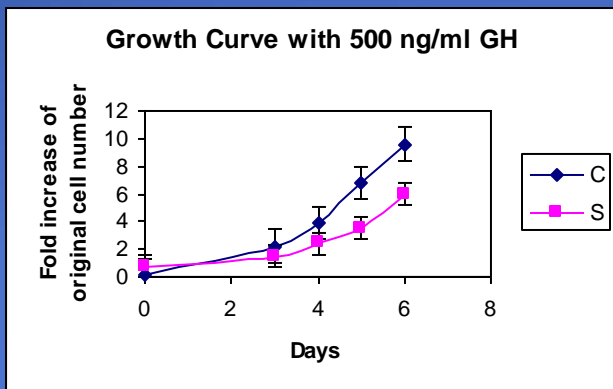
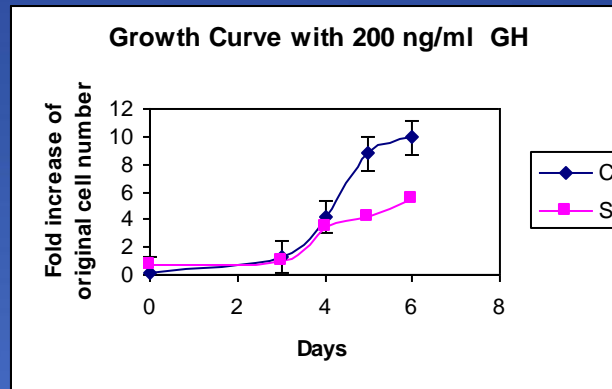
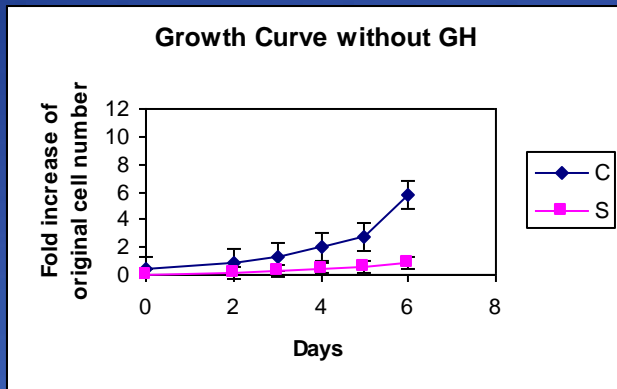
A. Μάρτυρας: gingival biopsy in DMEM without GH

B. Ασθενείς: gingival biopsy in DMEM without GH

C. Ασθενείς: gingival biopsy in DMEM with 5μg/ml GH

Η προσθήκη hGH (5 μg/ml) στις βιοψίες ούλων των ασθενών ήταν αναγκαία για να δημιουργηθούν οι ινοβλάστες ενώ δεν ήταν αναγκαία στις βιοψίες ούλων των μαρτύρων

# Καμπύλες αύξησης ινοβλαστών μαρτύρων (C) και ασθενών (S) μετά από χορήγηση hGH

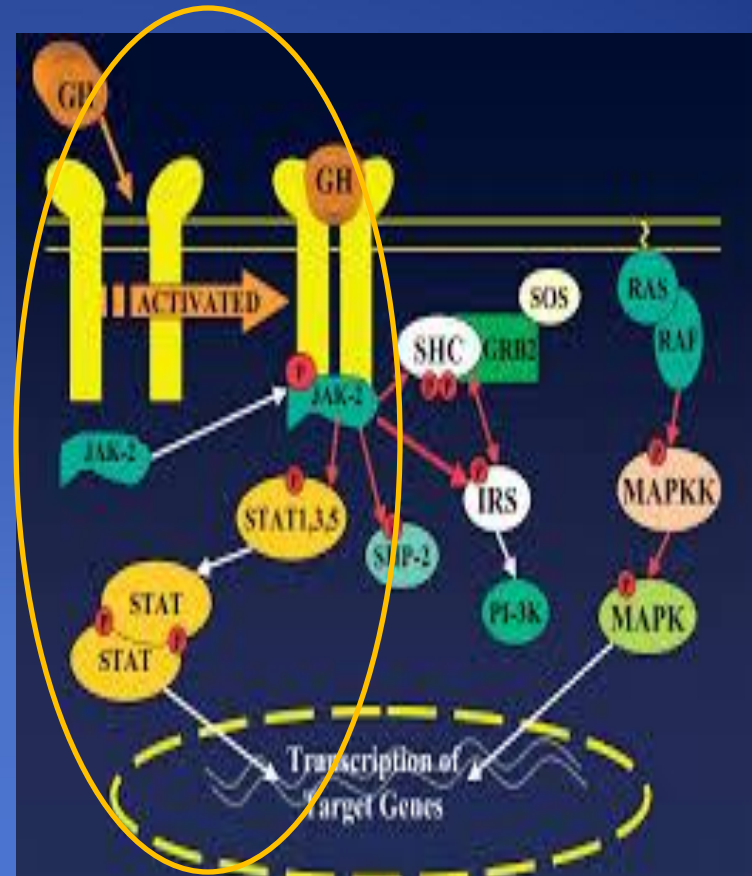




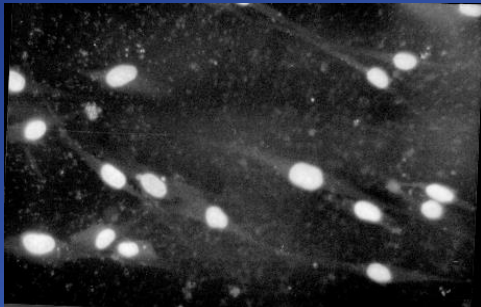
# Ερευνητική Μελέτη στο Μοριακό Εργαστήριο Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Παν/μιου Πατρών για την «Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)»

2) Ενσωμάτωση BrDU  
(Bromodeoxyuridine) στους  
ινοβλάστες

Μόνο κύτταρα που συνθέτουν  
DNA ενσωματώνουν την  
BrDU



## Προσθήκης BrDU για μελέτη κυττάρων που συνθέτουν DNA



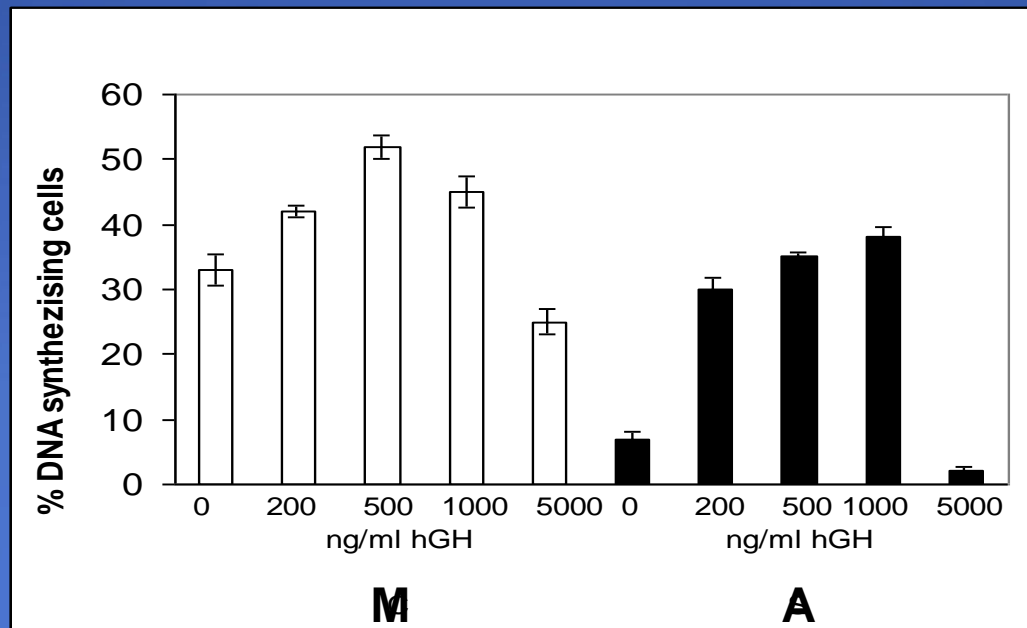
BrDU στους  
Ινοβλάστες  
Μαρτύρων  
(M)



BrDU στους  
Ινοβλάστες  
Ασθενών  
(A)

Μεγάλη μείωση των κυττάρων που συνθέτουν DNA στους ινοβλάστες των A (31% χαμηλότερο από των M)

# Αύξηση κυττάρων που συνθέτουν DNA (ενσωμάτωσης BrDU) μετά από προσθήκης hGH

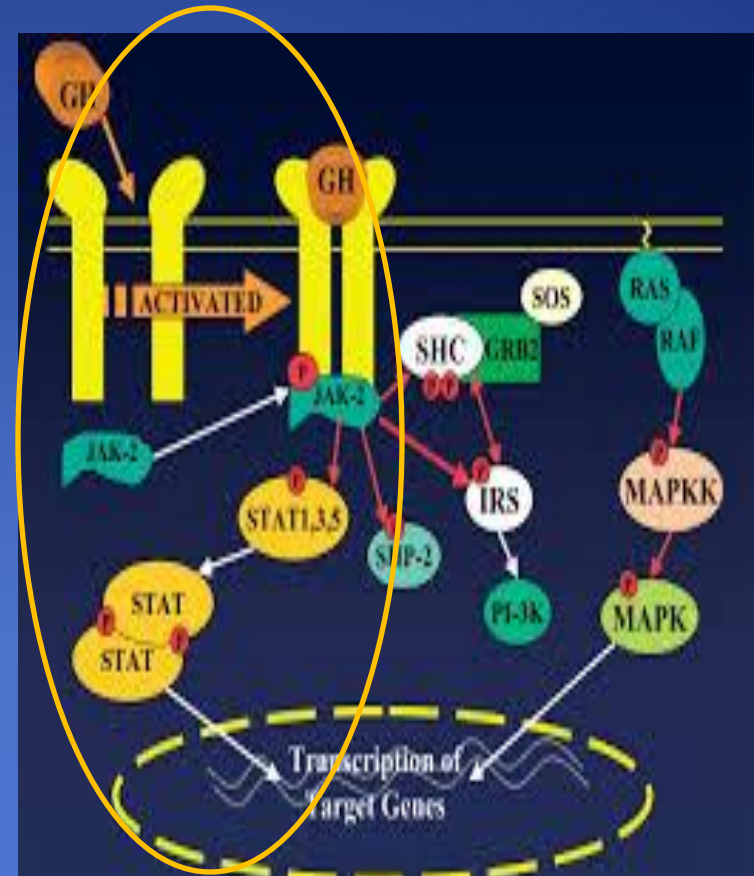


# Ερευνητική Μελέτη στο Μοριακό Εργαστήριο Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Παν/μιου Πατρών για την «Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)»

3) ) Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού της GH με Western blotting

- GHR
- JAK<sub>2</sub>
- STATs 1,3,5

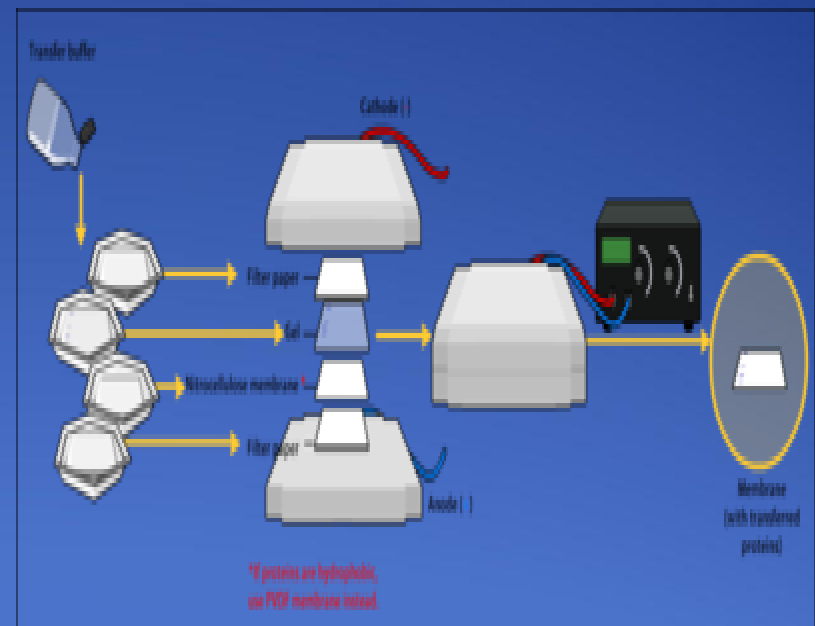
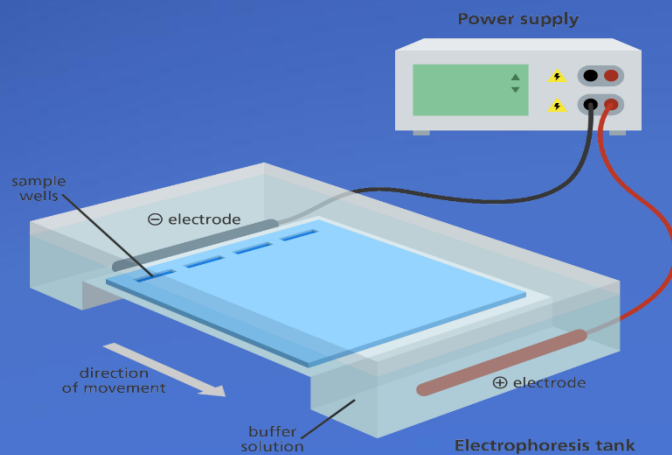
(παράγοντες μεταγραφής και μεταφοράς σήματος)



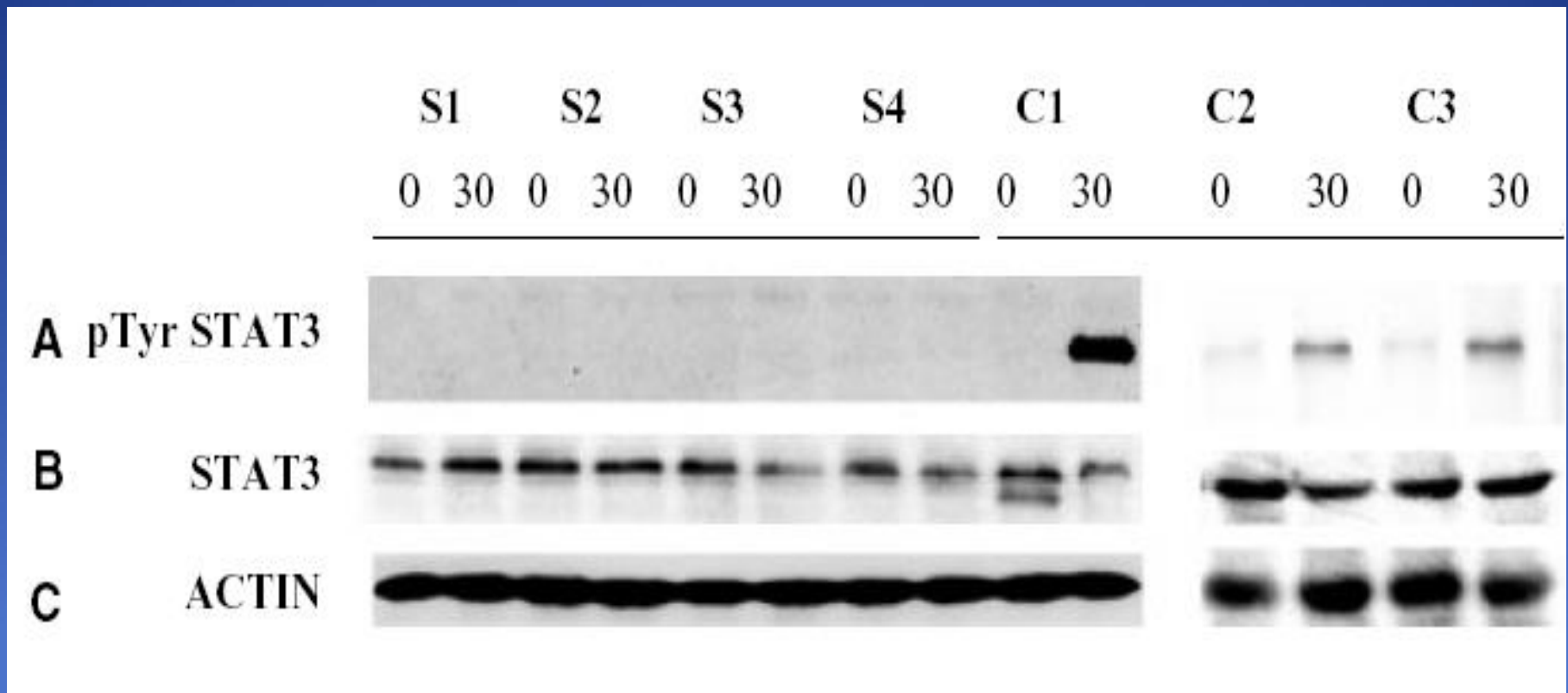
# Western blots

## Ανοσοκατακρήμνιση κατά Western

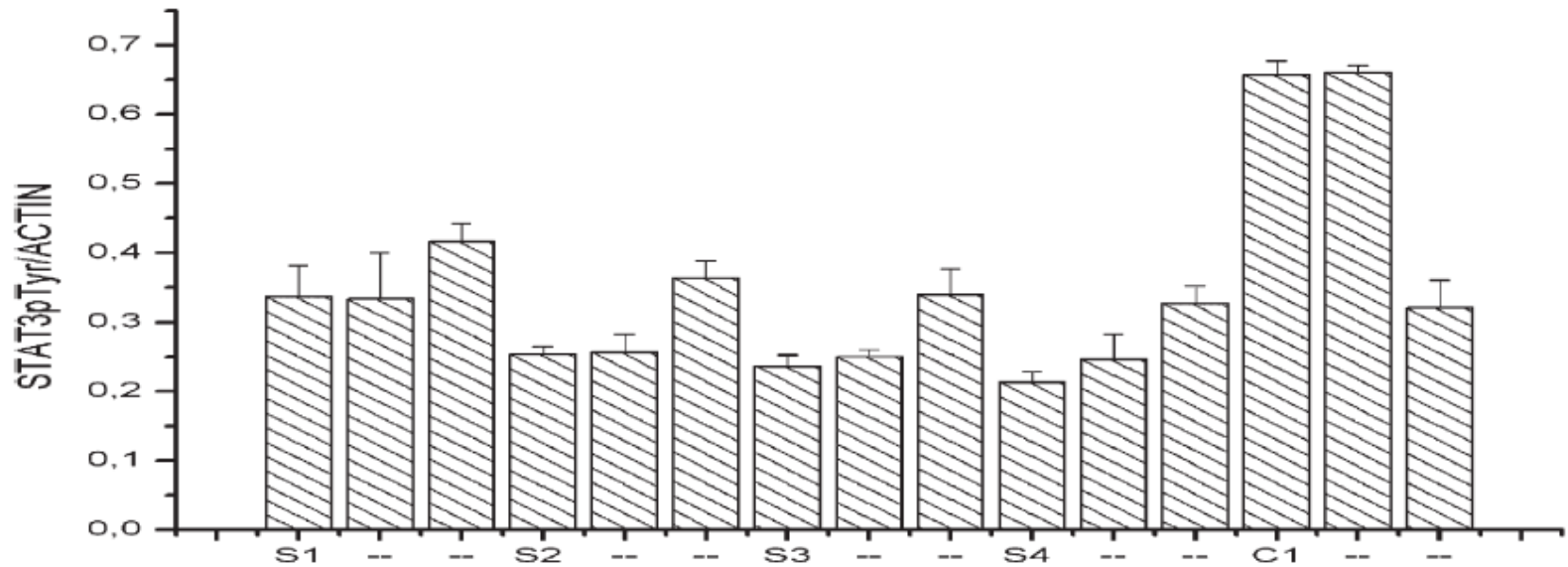
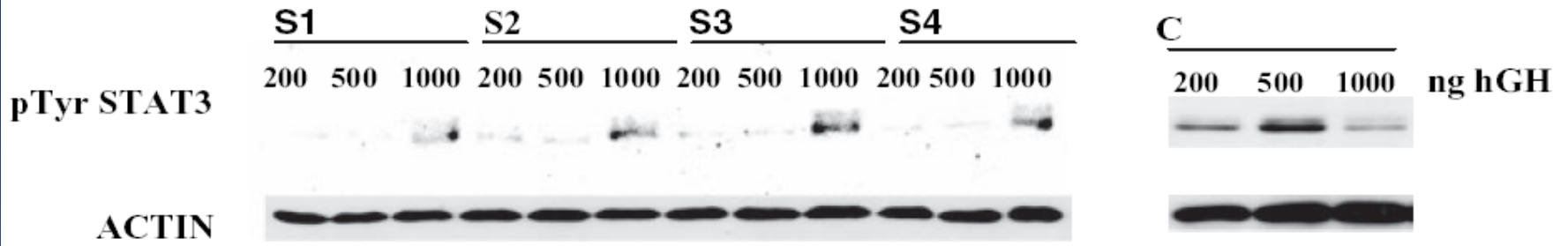
- Χρησιμοποιείται για την Ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών



Διαταραχή στην Φωσφορυλίωση του STAT-3 μετά από αγωγή με 200 ng/ml hGH. ( ανοσοκατακρήνιση κατα Western)

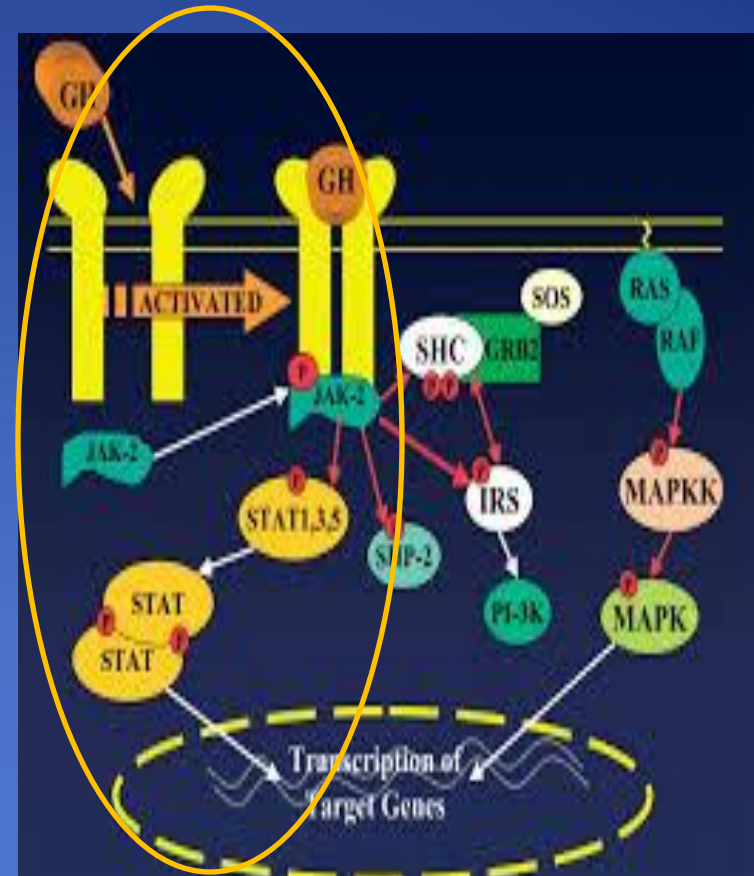


# Ενεργοποίηση του STAT-3 με αυξημένη δόση hGH (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )



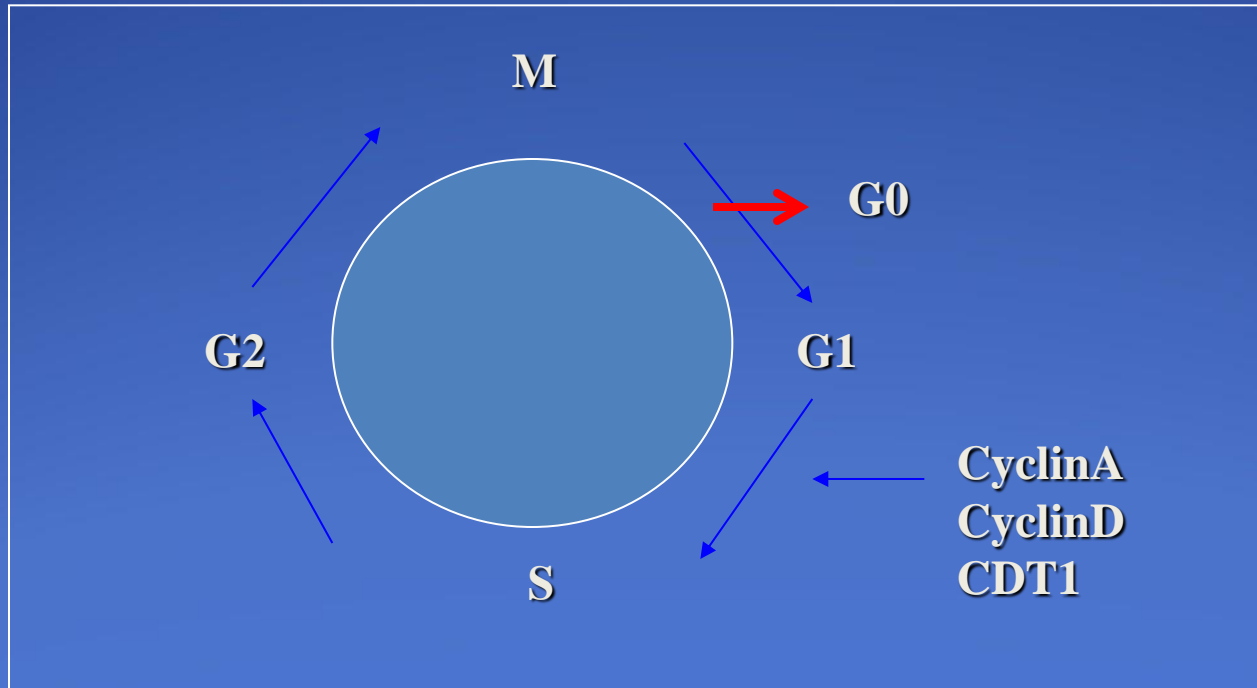
Ερευνητική Μελέτη στο Μοριακό Εργαστήριο Παιδιατρικής  
Ενδοκρινολογίας Παν/μιου Πατρών για την  
«Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD) »

- ▶ 4) Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με FACS (Flow cytometry cell cycle analysis)

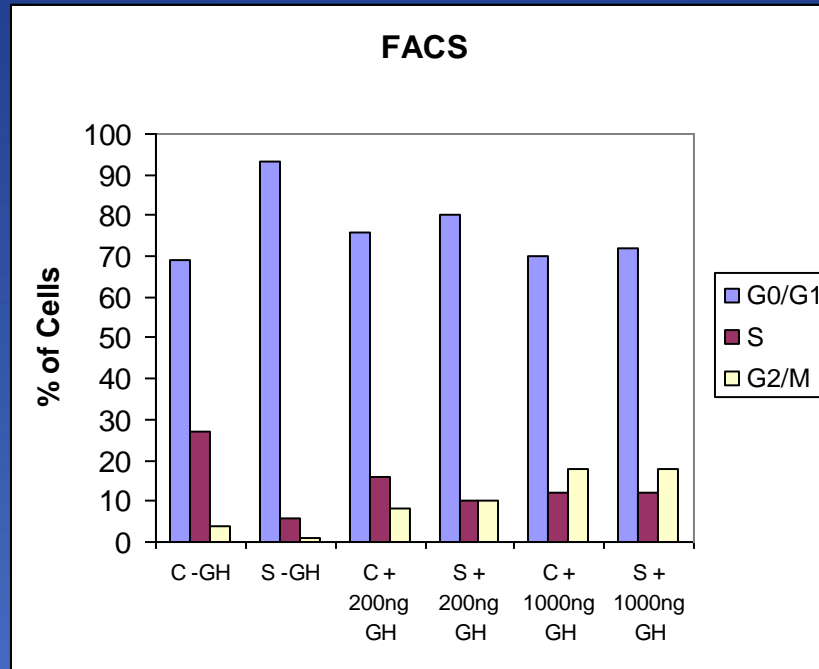




# Κυτταρικός Κύκλος

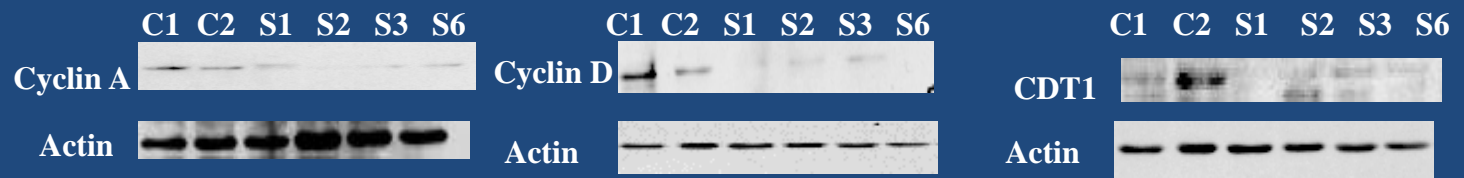


# Ανάλυση κυτταρικού Κύκλου

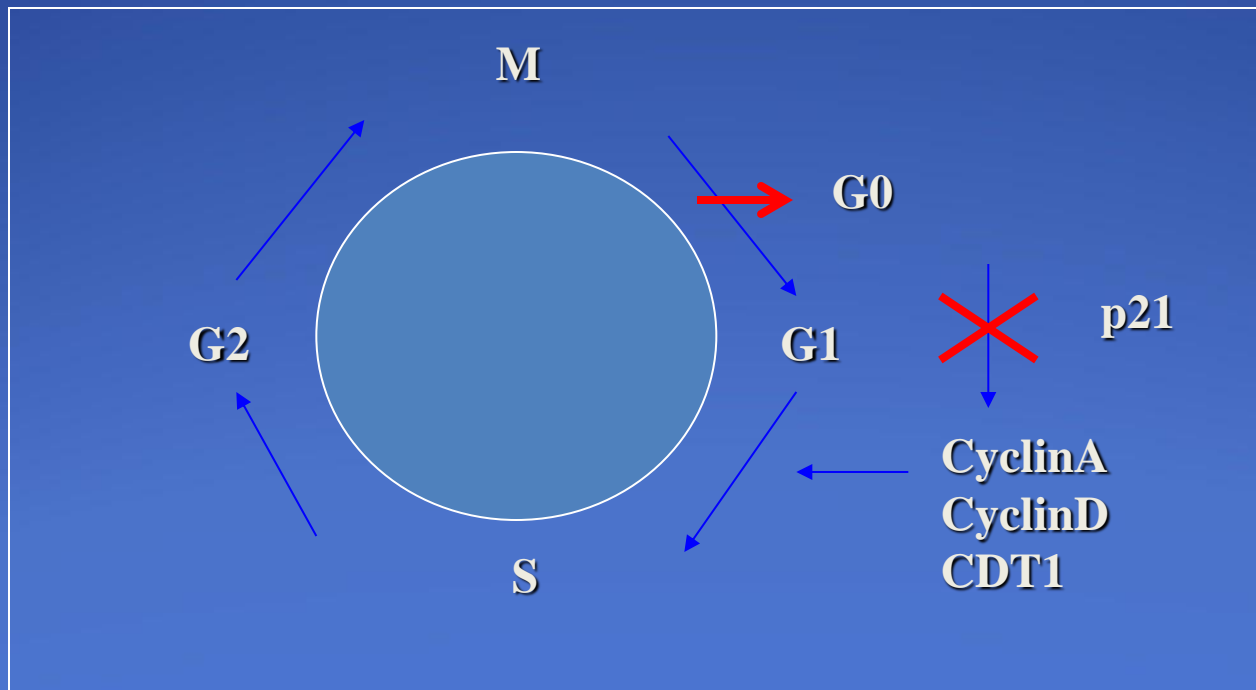


S: Ασθενείς  
C: Μάρτυρες

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ινοβλαστών των ασθενών (χωρίς την προσθήκη hGH) είχαν παραμείνει στην G0/G1 φάση

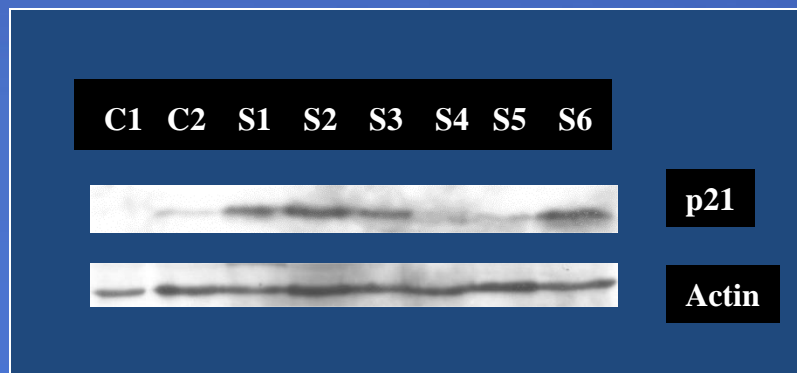
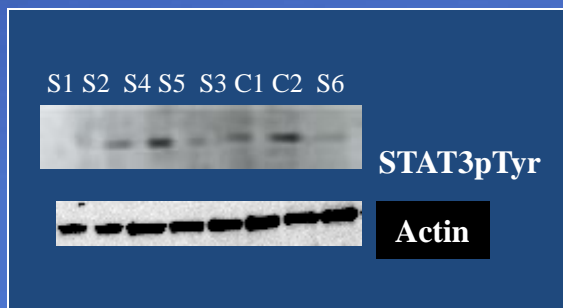


## Μείωση Κυκλινών A και D και CDT1 στους ασθενείς (S)

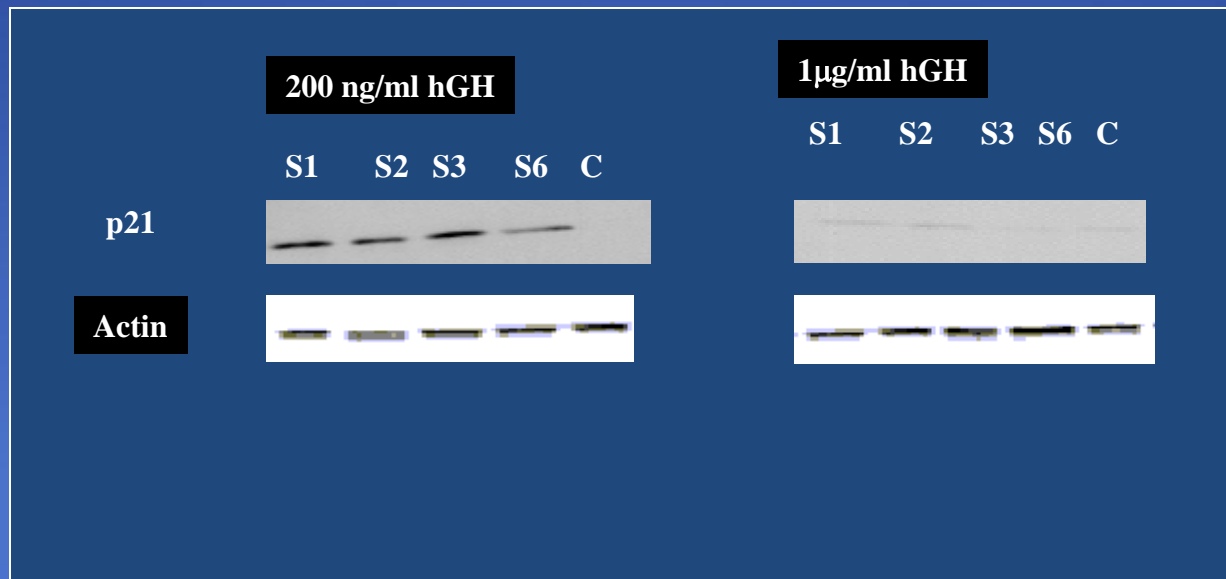


# Υπερέκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21

Στους ίδιους ασθενείς με την διαταραχή στην φωσφορυλίωση του STAT3 οι ινοβλάστες δείχνουν υπερέκφραση του αναστολέα των κυκλινών **p21**



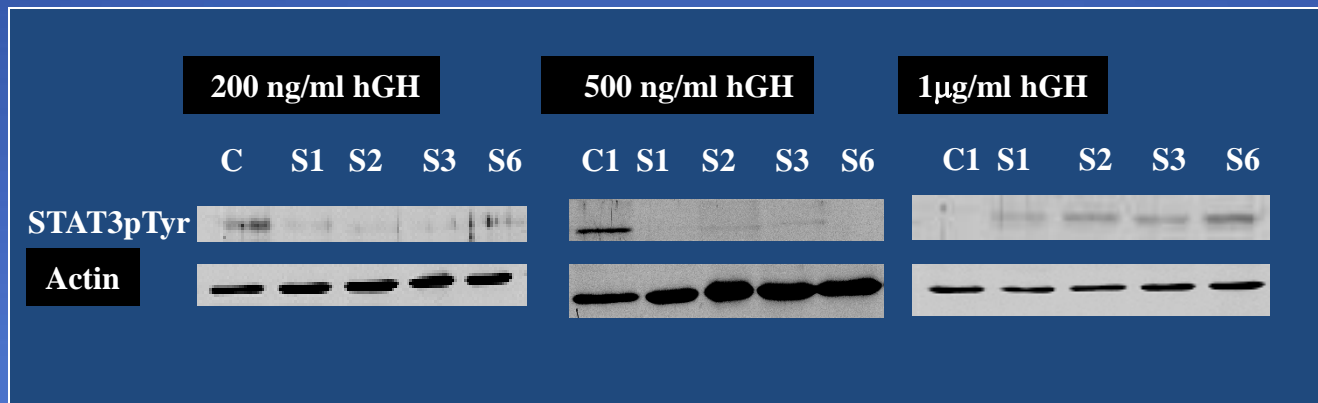
# Παράδοξη ελάττωση της έκφρασης του p21 μετά από μεγαλύτερες δόσεις hGH στους ινοβλάστες των ασθενών



C: Μάρτυρες και S: Ασθενείς

# Φωσφορυλίωση του STAT3

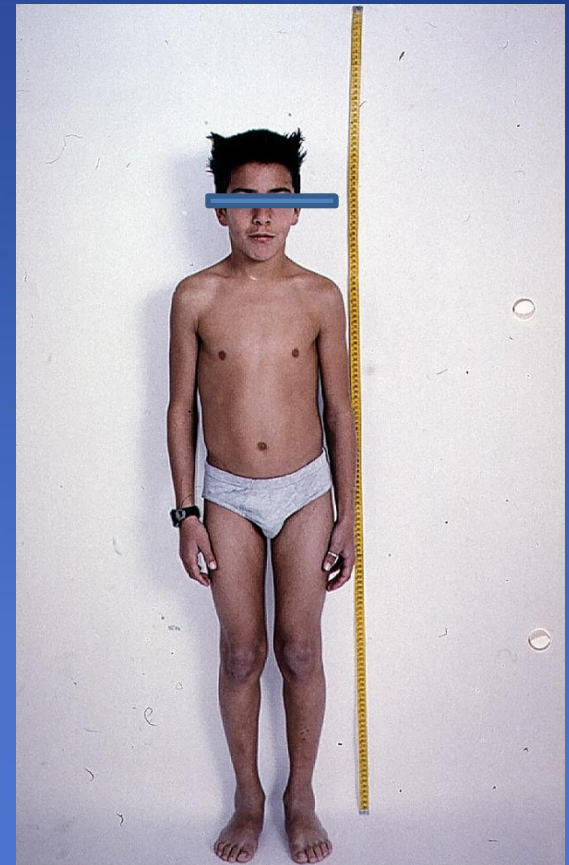
Η φωσφορυλίωση του STAT3 (STAT3pTyr) στους ινοβλάστες των ασθενών πραγματοποιείται με μεγαλύτερη δόση της hGH (1  $\mu\text{g/ml}$ ), ενώ η ίδια δόση καταστέλλει την φωσφορυλίωση του STAT3 pTyr στους ινοβλάστες των μαρτύρων



C: Μάρτυρες και S: Ασθενείς

# Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)

- Διαταραχές στο μοριακό επίπεδο:
  - 1) Παθολογική ενεργοποίηση του μεταγραφικού και μεταβιβαστικού παράγοντα STAT-3
  - 2) Υπερέκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21



# Συμπεράσματα

Στους 4 ασθενείς με «Διαταραχή Σηματοδότησης GH» βρέθηκαν τα εξής:

- ▶ 1) Μειωμένη αύξηση των κυττάρων και μειωμένος αριθμός κυττάρων που συνθέτουν DNA
- ▶ 2) Μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου
- ▶ 3) Υπερέκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p21
- ▶ 4) Μειωμένη φωσφορυλίωση του STAT3 στα κύτταρα
- ▶ 5) Σημαντική βελτίωση των κυτταρικών διαταραχών μετά από χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων αυξητικής ορμόνης



# Θεραπεία «Διαταραχή Σηματοδότησης GH (GHTD)»

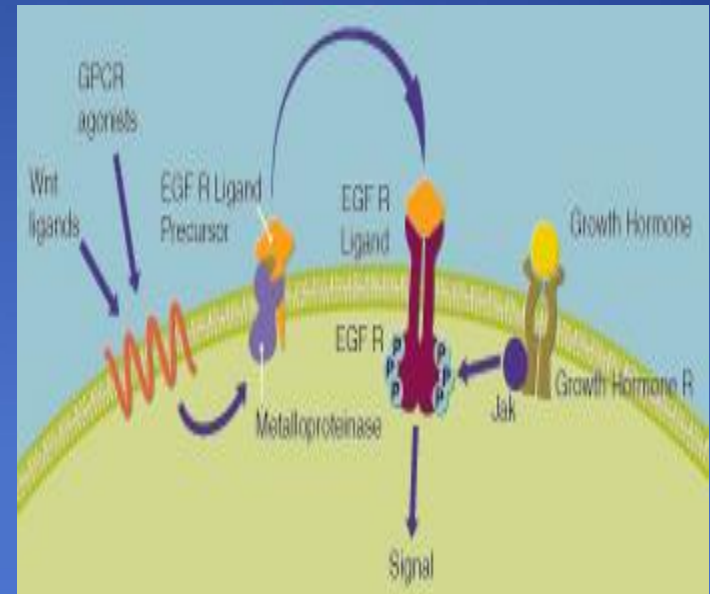
- Γιατί είναι επιτυχής η θεραπεία με GH στην «Διαταραχή Σηματοδότησης GH» ενώ υπάρχει πρόβλημα στο μεταγωγικό μονοπάτι της GH;



# Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in successful growth hormone (GH) signaling in GH transduction defect

Kostopoulou.E. et al. *JPEM*. 2017 Feb 1;30(2):221-230

- Ο EGFR (που συνομιλεί με το μονοπάτι GH) φαίνεται να συμμετέχει στην επιτυχή μεταγωγή του σήματος GH μετά από χορήγηση αυξημένης δόσης hGH
- Το EGF/EGFR μονοπάτι, σε αντίθεση με το GH μονοπάτι, ενεργοποιείται με μεγαλύτερη ευχέρεια στους ασθενείς με GHTD

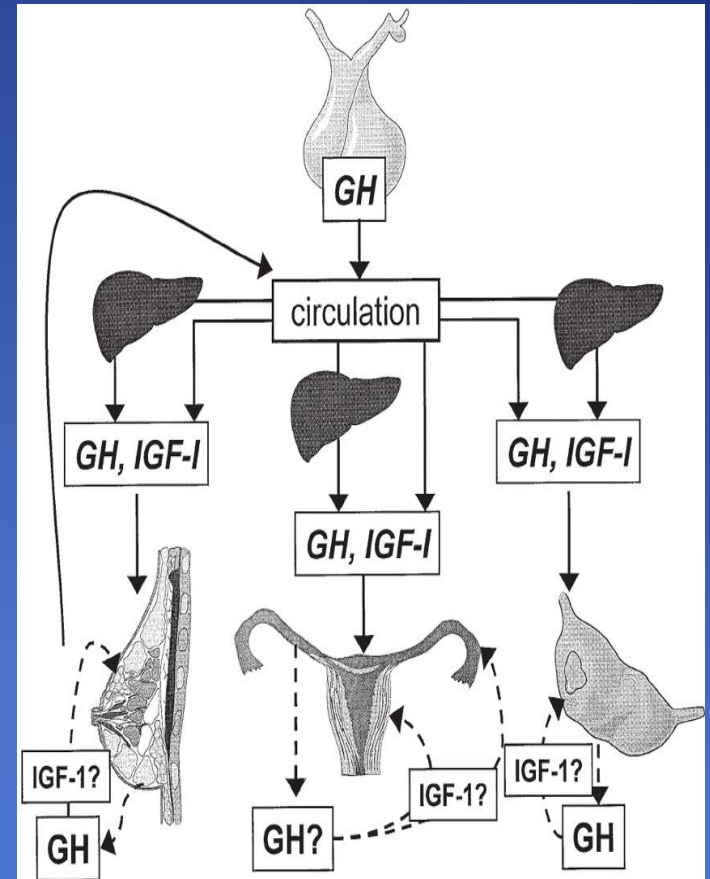


# Δράσεις της Αυξητικής Ορμόνης στην Αναπαραγωγή

- Υποφυσιακή GH και ηπατική IGF-I ρυθμίζουν την λειτουργία των μαζικών αδένων, ωοθηκών και σαλπίγγων
- GH δημιουργείται επίσης στους μαζικούς αδένες, πλακούντα ωοθήκες και σάλπιγγες και μαζί με την τοπική IGF-I επηρεάζουν την αναπαραγωγή

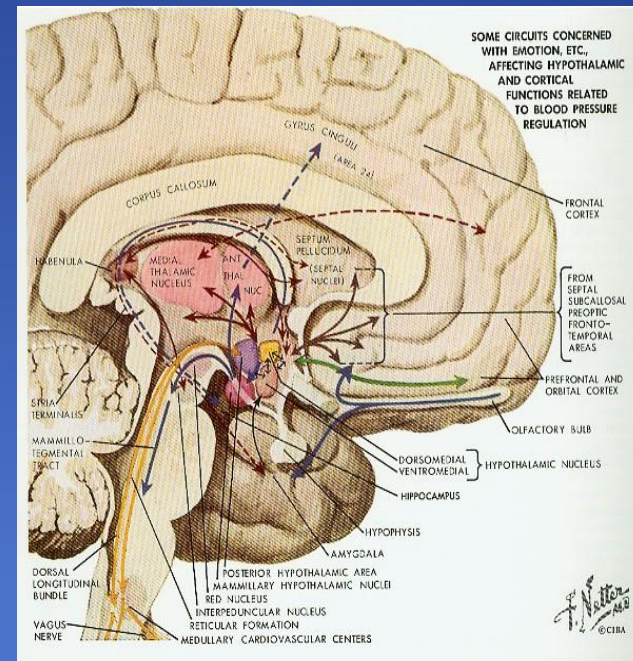
**J Endocrinol 2001; 168(1):1- 23**

**BMC Pregnancy and Childbirth 2020; 20, 310:2-10**



# Ρύθμιση της Ήβης

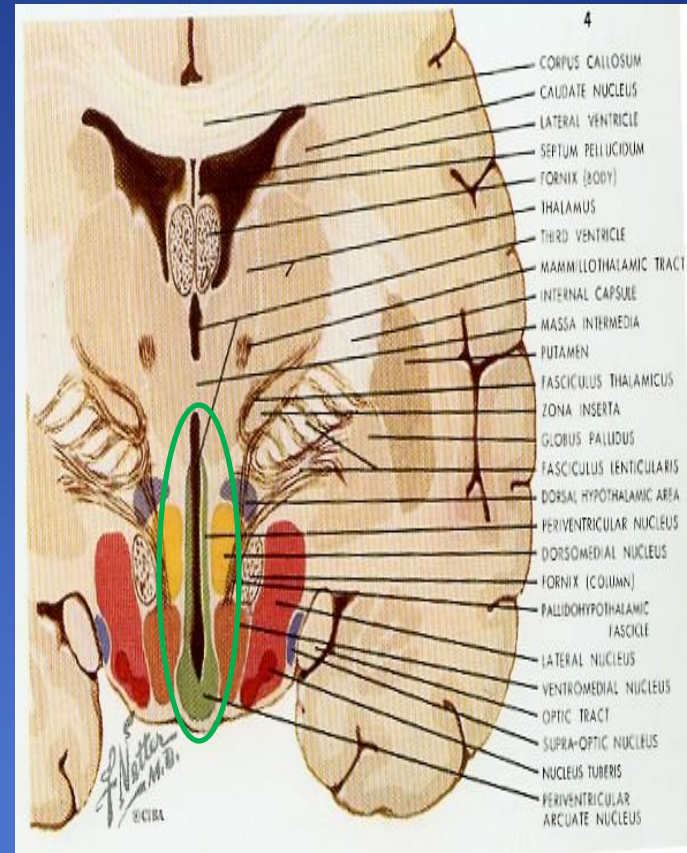
- Υποθάλαμο: Εκλυτικός παράγοντας των γοναδοτροπινών, **GnRH**
- Υπόφυση: Γοναδοτροπίνες, **LH** και **FSH**



## Ρύθμιση της Ήβης

- Ο βηματοδότης των νευρώνων του GnRH εντοπίζεται στον τοξοειδή πυρήνα (arcuate nucleus) του υποθαλάμου και ρυθμίζει της αυξομειώσεις του GnRH

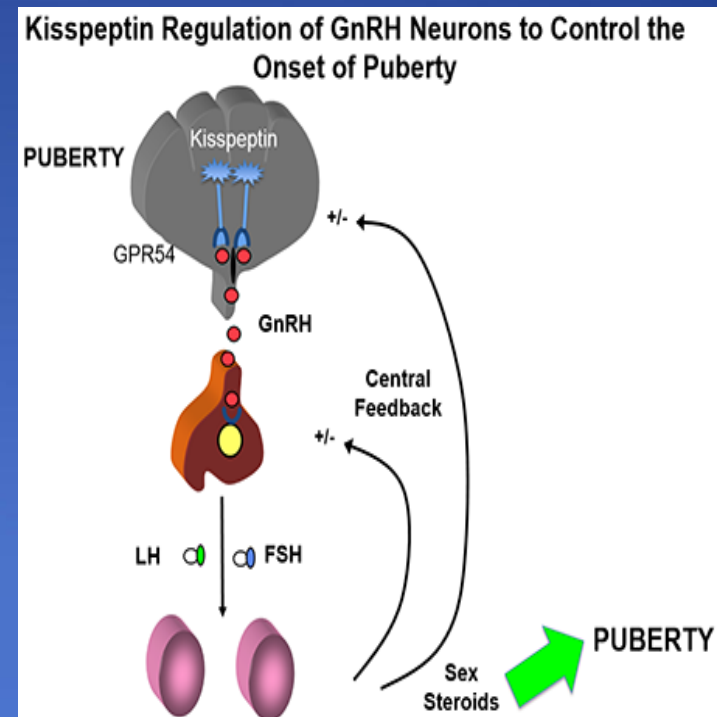
**Knobil, E. Proc Natl Acad Sci, Dec. 84(23): 8745-9, 1987.**



# Kisspeptins-GPR54

- Οι μελέτες δείχνουν ότι ο **Βηματοδότης** που επηρεάζει τις αυξομειώσεις του GnRH μπορεί να είναι **Kisspeptin πεπτίδιο** που συνδεεται με τον υποδοχέα: GPR54(KISSR1)

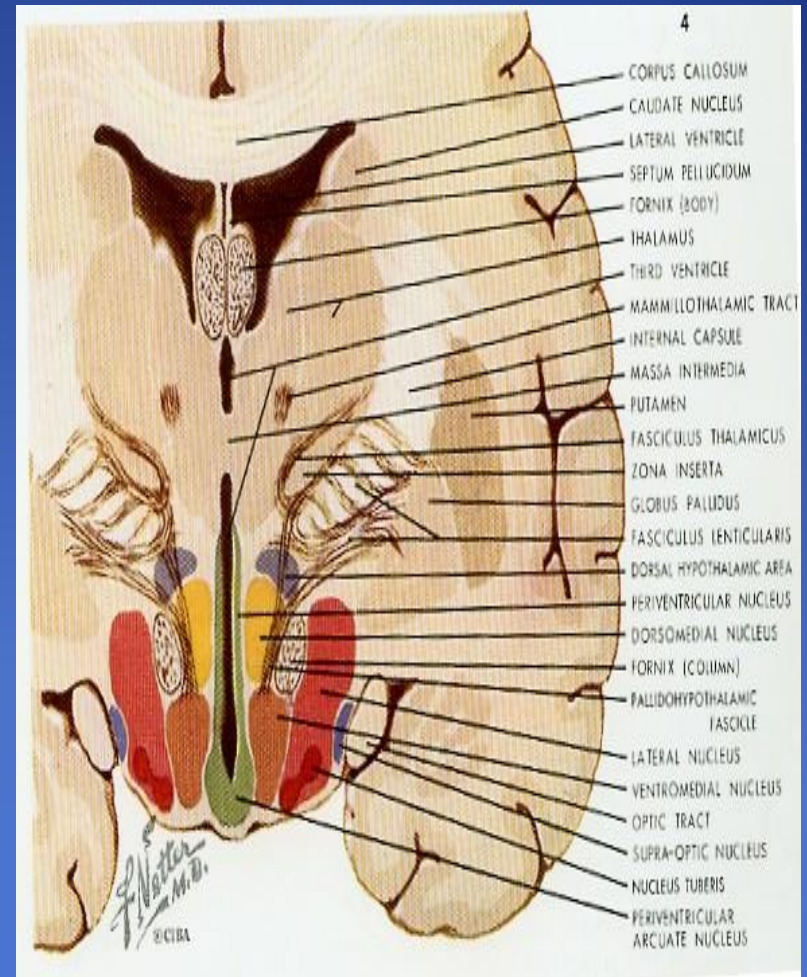
Human Reproduction Update, Vol.20, No.4 pp. 485-500, 2014



# GH και GnRH – ρύθμιση της ήβης

- Η GH φαίνεται να συμμετέχει στην ρύθμιση της ήβης επηρεάζοντας την ενεργοποίηση του Βηματοδότη του GnRH

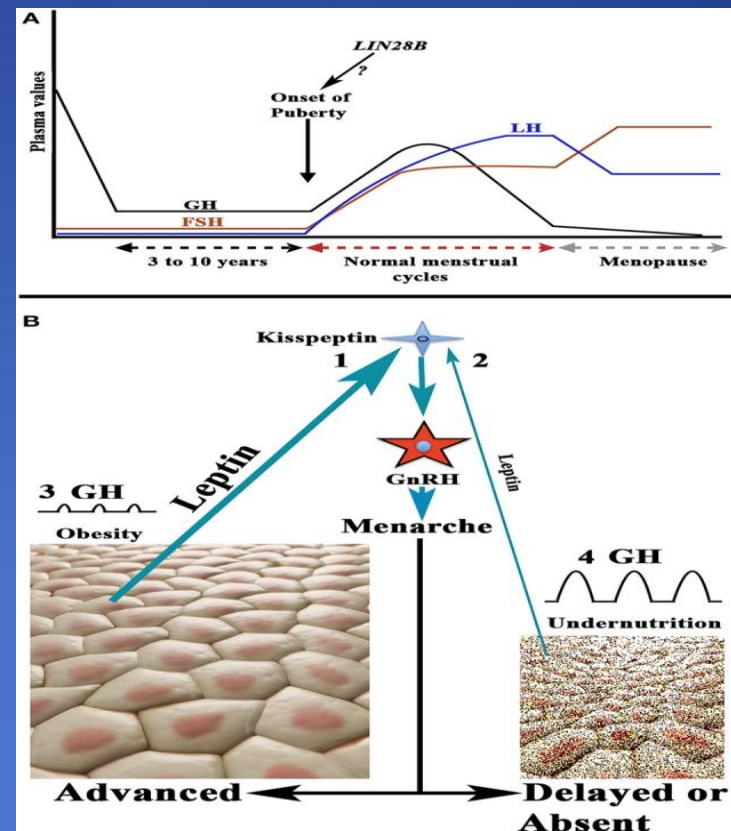
Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 375



# Kisspeptin και GH

- Η **GH** φαίνεται να επηρεάζει την εμμηναρχή και την έμμηνος ρύση διαμέσου της **Kisspeptin**

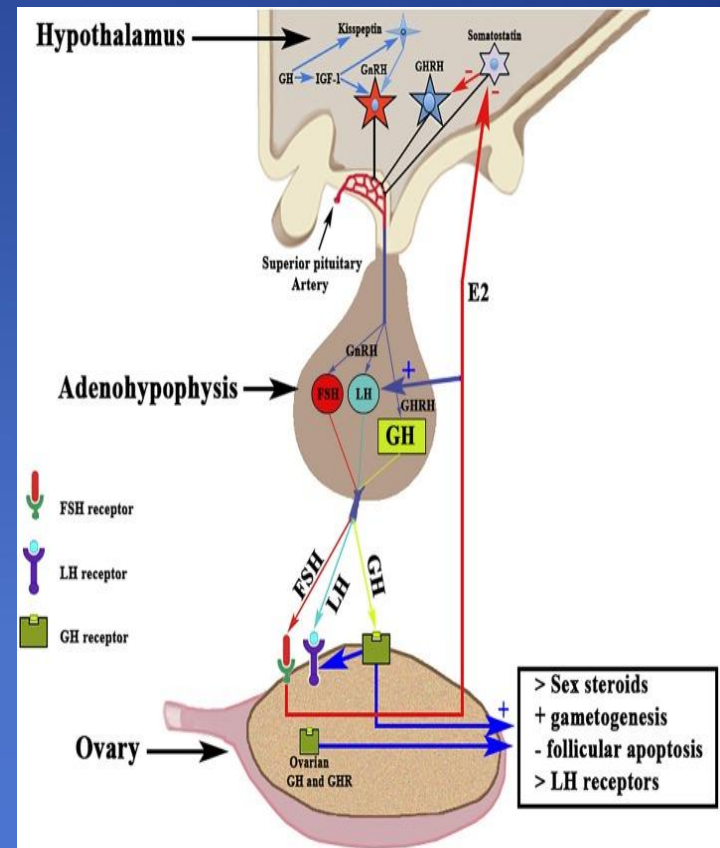
Frontiers in Endocrinol July 2019; 10, 450





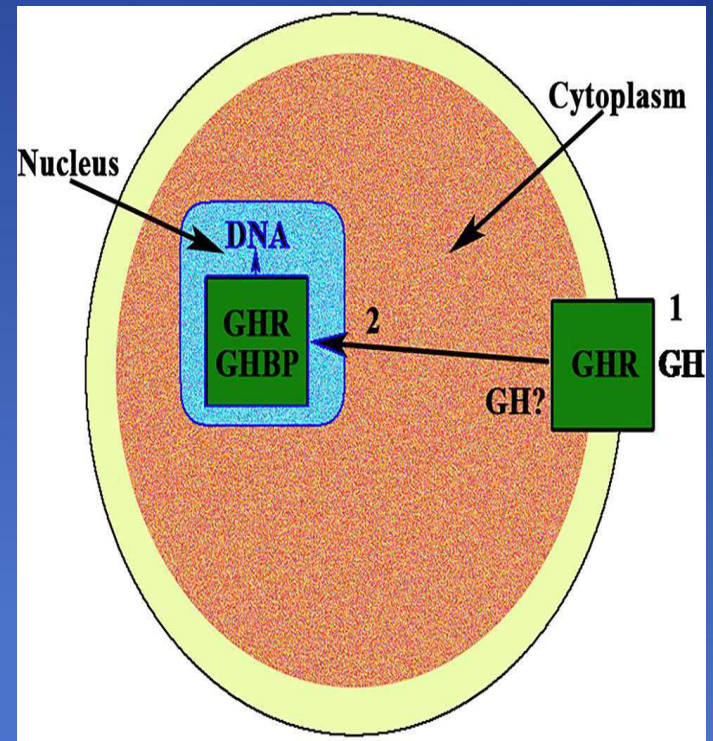
# Δράση GH στις ωοθήκες

- **Επιδρά:**
- στην παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης
- στην γαμετογένεση (gametogenesis)
- στην απόπτωση των ωοθυλακίων
- στον LH υποδοχέα



# GH, GHBP και GHR στα ωάρια

- Η GH δρα:
- στους υποδοχείς της GH στην πλασματική μεμβράνη και στον πυρήνα των ωαρίων και
- στην αγγειογένεση των ωοθηκών



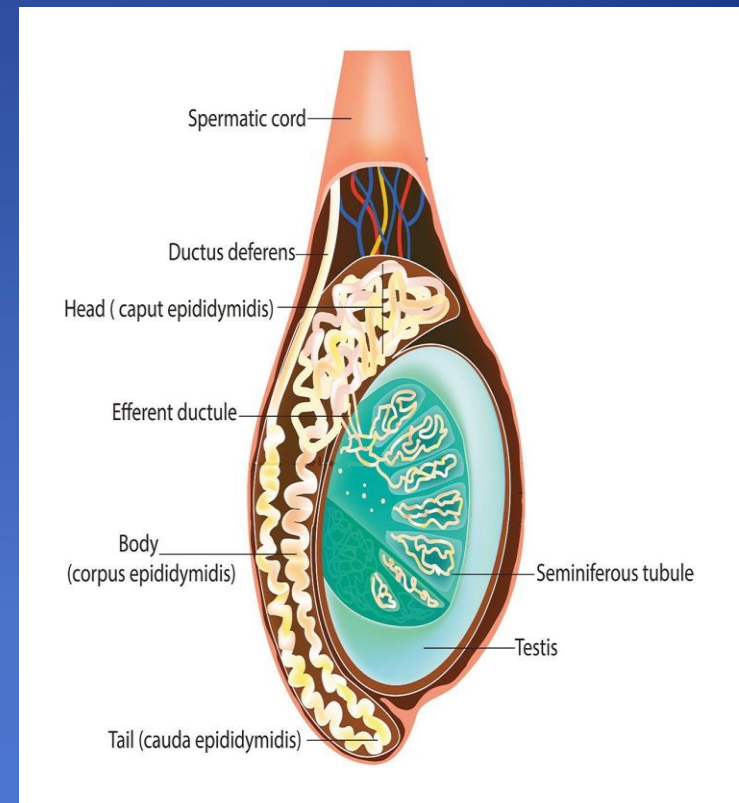
# GH και IGF-I στους όρχεις

## 1) Η GH δρα:

- στα κύτταρα Leydig και κύτταρα Sertoli
- στην σπερματοδόχο κύστη, στην επιδυμιίδα και στον σπερμικό πόρο και
- στον προστάτη

## 2) Μετά από χορήγηση GH σε άνδρες με ολιγοσπερμία:

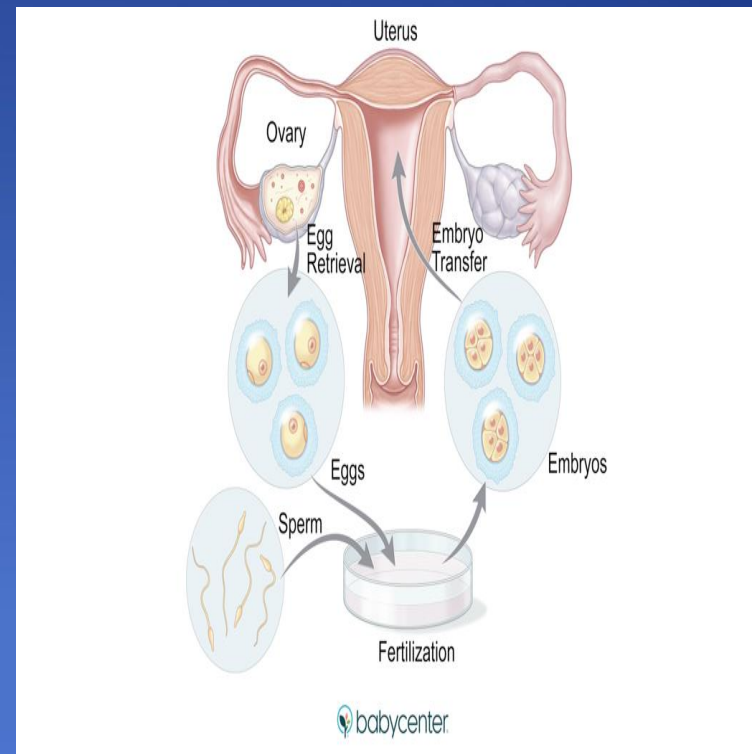
- αυξήθηκε ο όγκος του σπέρματος και
- αυξήθηκε η κινητικότητα του σπέρματος



# Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και GH

- Φαίνεται ότι η χορήγηση hGH στα IVF πρωτόκολλα μπορεί να δημιουργεί πιο βιώσιμα ωοκύτταρα και περισσότερες βιώσιμες γέννες.

**BMC Pregnancy and Childbirth 2020;**  
**20:310:2-10**



# Συμπεράσματα

- Οι δράσεις της Αυξητικής Ορμόνης σε ολόκληρο τον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολύπλοκες αλλά απαραίτητες για την ομαλή ανάπτυξη και συντήρηση όλων των οργάνων και ιστών.

