



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μεταλλοπρωτεάσες σαν βιοδείκτες στην παλίνδρομη και εξωμήτρια
κύηση: ο ρόλος της ADAM12**

ΔΗΜΟΥ ΑΣΗΜΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2015

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Σύμβουλος: ΔΑΠΟΝΤΕ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΔΑΠΟΝΤΕ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΚΑΡΑΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

DIMOU ASIMINA

MASTER THESIS

**Metalloproteases as biomarkers in missed abortion and
ectopic pregnancy: the role of a disintegrin and
metalloprotease protein 12 (ADAM12)**

SUPERVISOR: TSEZOU ASPASIA
PROFESSOR

CONSULTANT: DAPONTE ALEXANDROS
ASSOCIATE PROFESSOR

LARISSA 2015

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους βοήθησαν, ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταπτυχιακή μου εργασία.

Κατ'αρχήν, ευχαριστώ από καρδιάς την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής και Επιβλέπουσα, κ. Τσέζου Ασπασία, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Σύμβουλο, κ. Δαπόντε Αλέξανδρο, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, αλλά και για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια του πειραματικού και θεωρητικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, και ιδιαίτερα την Πανεπιστημιακή Υπότροφο, κ. Παπαθανασίου Ιωάννα, για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Όμως, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη βοήθεια, την κατανόηση, την αγάπη τους, την ηθική και οικονομική στήριξη, αλλά και τη συνεχή τους παρουσία όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ θερμά από τα βάθη της καρδιάς μου.

Με εκτίμηση,
Δήμου Ασημίνα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
B. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
<i>B1. Εμφύτευση και πλακουντοποίηση.....</i>	<i>9</i>
<i>B2. Εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση.....</i>	<i>12</i>
<i>B2.1. Εξωμήτρια κύηση.....</i>	<i>12</i>
<i>B2.2. Αίτια εξωμήτριας κύησης.....</i>	<i>12</i>
<i>B2.3. Σημεία εντοπισμού και μορφές εξωμήτριας κύησης.....</i>	<i>13</i>
<i>B2.4. Διάγνωση εξωμήτριας κύησης.....</i>	<i>15</i>
<i>B2.5. Παλίνδρομη κύηση.....</i>	<i>17</i>
<i>B3. Βιοδείκτες.....</i>	<i>17</i>
<i>B3.1. Δείκτες διείσδυσης τροφοβλάστης.....</i>	<i>18</i>
<i>B3.2. Δείκτες νουκλειικών οξέων.....</i>	<i>20</i>
<i>B3.3. Δείκτες λειτουργίας ωχρού σωματίου.....</i>	<i>21</i>
<i>B3.4. Δείκτες αγγειογένεσης.....</i>	<i>21</i>
<i>B3.5. Δείκτες λειτουργίας ενδομητρίου.....</i>	<i>22</i>
<i>B3.6. Δείκτες για φλεγμονώδη αντίδραση και αλλοίωση των μυών.....</i>	<i>23</i>
<i>B3.7. Χρήση βιοδεικτών σε περιπτώσεις εξωμητρίων και παλίνδρομων κυήσεων.....</i>	<i>24</i>
<i>B4. Μεταλλοπρωτεάσες.....</i>	<i>25</i>
<i>B4.1. Μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs).....</i>	<i>26</i>
<i>B4.1.1. Δομή των MMPs.....</i>	<i>27</i>
<i>B4.1.2. Λειτουργίες και έκφραση των MMPs.....</i>	<i>28</i>
<i>B4.1.3. MMPs και κύηση.....</i>	<i>30</i>
<i>B4.2. Μεταλλοπρωτεάσες ντισιντεγκρίνης (ADAMs).....</i>	<i>31</i>
<i>B4.2.1. Δομή των ADAMs.....</i>	<i>33</i>
<i>B4.2.2. Λειτουργίες και έκφραση των ADAMs.....</i>	<i>35</i>
<i>B4.2.3. ADAM-12.....</i>	<i>37</i>
<i>B4.2.4. ADAM-12 και κύηση.....</i>	<i>38</i>
<i>B4.3. Μεταλλοπρωτεάσες ντισιντεγκρίνης με μοτίβο θρομβοσποντίνης (ADAMTSs).....</i>	<i>40</i>
<i>B4.3.1. Δομή των ADAMTSs.....</i>	<i>40</i>

<i>B4.3.2. Λειτουργίες και έκφραση των ADAMTSs.....</i>	42
<i>B4.3.3. ADAMTS-12.....</i>	44
<i>B4.3.4. ADAMTS-12 και κήση.....</i>	45
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
<i>Γ1. Γενικά στοιχεία και περιγραφή των τεχνικών ELISA.....</i>	46
<i>Γ2. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων.....</i>	50
<i>Γ3. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας.....</i>	50
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εξωμήτριες και παλίνδρομες κύσεις αποτελούν σοβαρές επιπλοκές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, κυρίως κατά το πρώτο τρίμηνο, και παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η άμεση και ακριβής διάγνωση.

Έχουν καταβληθεί προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση με σκοπό την εύρεση αξιόπιστων μεθόδων, οι οποίες θα προσφέρουν έγκαιρα και έγκυρα διαγνωστικά αποτελέσματα. Η ανακάλυψη κατάλληλων βιοδεικτών για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών εδώ και πολλά χρόνια. Μεταξύ των δυνητικών βιοδεικτών που μελετώνται, συγκαταλέγονται και ορισμένες μεταλλοπρωτεάσες των οικογενειών MMPs, ADAMs και ADAMTSs.

Στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της μεταλλοπρωτεάσης ADAM12 στην εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση. Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από γυναίκες με φυσιολογική, εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων της ADAM12 στον ορό με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού ELISA. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η ADAM12 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης για την ανίχνευση και το διαχωρισμό μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης από μια φυσιολογική κύηση. Ωστόσο, αδυνατεί να διαχωρίσει μια εξωμήτρια από μια παλίνδρομη κύηση.

A. ABSTRACT

Ectopic pregnancies and missed abortions constitute serious pregnancy complications, mostly during the first trimester, and present high morbidity and mortality rates. Thus, an immediate and accurate diagnosis is of great significance.

A lot of effort has been put into finding reliable methods, which would provide timely and valid diagnostic results. For many years now, the discovery of suitable biomarkers for the diagnosis of ectopic pregnancy or missed abortion, has attracted the interest of several scientists. Putative biomarkers being currently studied, include members of the MMPs, ADAMs and ADAMTSs families of metalloproteases.

The objective of this thesis was to investigate the role of ADAM12 in ectopic pregnancies and missed abortions. Blood samples were collected from women diagnosed with normal intrauterine and ectopic pregnancies, as well as with missed abortions, and ADAM12 serum levels were evaluated using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). We found that ADAM12 could be utilized as a reliable marker for the detection and separation between ectopic pregnancies or missed abortions and viable intrauterine pregnancies. Nevertheless, it failed to distinguish between ectopic pregnancies and missed abortions.

B. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

B1. Εμφύτευση και πλακουντοποίηση

Η πολύπλοκη διαδικασία της εμφύτευσης και της διείσδυσης της τροφοβλάστης είναι κρίσιμη για την επιτυχημένη πορεία της κύησης. Φυσιολογικά, ένα έμβρυο εμφυτεύεται στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του παραθύρου εμφύτευσης, οπότε και η υποδεκτικότητα της μητρικής κοιλότητας είναι μέγιστη.

Η υποδεκτικότητα του ενδομητρίου περιλαμβάνει την έκφραση μοριακών παραγόντων που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην εμβρυομητρική επικοινωνία και ξεκινούν τη φθαρτοποίηση του ενδομητρικού στρώματος. Υποψήφια μόρια, συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών και των αυξητικών παραγόντων, εκκρίνονται από ενδομητρικά και σαλπγγικά επιθηλιακά κύτταρα και έχουν περιγραφεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της εμφύτευσης της βλαστοκύστης (Bassem Refaat, 2014).

Πιο συγκεκριμένα, η εμφύτευση της ανθρώπινης βλαστοκύστης και η ανάπτυξη του πλακούντα στη συνέχεια, περιλαμβάνουν τρία στάδια:

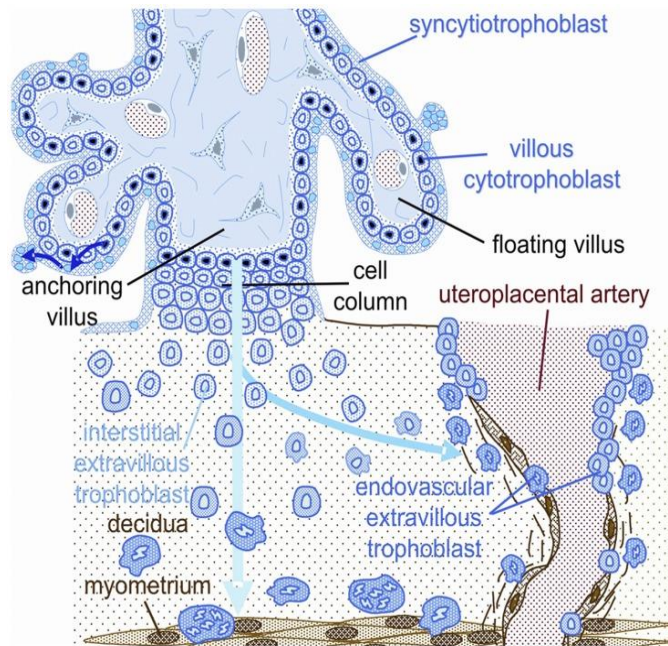
- i. την απόθεση της βλαστοκύστης στο επιθήλιο του ενδομητρίου. Σε αυτό το στάδιο, η βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από μια εσωτερική κυτταρική μάζα που περιβάλλεται από το τροφοεκτόδερμα, το οποίο αποτελεί πρόδρομο του πλακούντα.
- ii. τη σύνδεση του τροφοεκτοδέρματος με το τοίχωμα της μήτρας, κατά την οποία ξεκινάει η εμβρυομητρική επικοινωνία μέσω της προσκόλλησης της κορυφαίας επιφάνειας του τροφοεκτοδέρματος στο επιθήλιο της μήτρας (Enders AC & Mead RA, 1996). Επομένως, οι τροφοβλάστες που προέρχονται από το τροφοεκτόδερμα διεισδύουν στο επιθήλιο της μήτρας και στη βασική της μεμβράνη, επικοινωνώντας με το υποκείμενο στρώμα.
- iii. τη διείσδυση της τροφοβλάστης, η οποία διασχίζει το φθαρτό της μήτρας και εμβολιάζει μητρικά αιμοφόρα αγγεία, ώστε να δημιουργηθεί ένας λειτουργικός πλακούντας (Aplin JD, 1991; Tabibzadeh S & Bakaknia A, 1995; Paria BC et al., 2002; Dimitriadis E et al., 2010).

Η διαφοροποίηση της τροφοβλάστης πιθανόν προκαλείται από τη διαδικασία της προσκόλλησης (Armant DR, 2005). Πριν την έναρξη της διείσδυσης, το τροφοεκτόδερμα διαφοροποιείται σε δύο ξεχωριστές τροφοβλαστικές υποομάδες, την εξωτερική συγκυτιοτροφοβλάστη και την εσωτερική διεισδύουσα κυτοτροφοβλάστη.

Οι συγκυτιοτροφοβλάστες είναι μεγάλα, πολυμορφικά, πολυπύρρηνα κύτταρα και είναι υπεύθυνες για την ανταλλαγή θρεπτικών στοιχείων και αερίων με τον πλακούντα και την παραγωγή και έκκριση της πλειονότητας των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων του πλακούντα (Kliman HJ et al., 1986). Μια συγκυτιοτροφοβλάστη δημιουργείται από τη σύντηξη μετα-μιτωτικών κυτοτροφοβλαστών. Αρχικά, οι εξωτερικές συγκυτιοτροφοβλάστες εκτείνονται εντός του φθαρτού, με αποτέλεσμα η βλαστοκύστη να ενσωματώνεται στο ενδομήτριο (Bischof P & Campana A, 1997). Επομένως, οι συγκυτιοτροφοβλάστες διαθέτουν την ικανότητα να επεκτείνονται μέσα στο ενδομήτριο κατά την εμφύτευση. Μετά από αυτή την περίοδο, οι συγκυτιοτροφοβλάστες ασκούν μια πιο συγκεκριμένη ενδοκρινική λειτουργία.

Ταυτόχρονα, οι τροφοβλάστες που εντοπίζονται στις κορυφές των χοριακών λαχνών, θεωρούνται βλαστικά κύτταρα τροφοβλάστης και υπόκεινται σε εκτενή πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, γεγονός που ενισχύει το διεισδυτικό τους φαινότυπο. Διαρρηγνύουν τη συγκυτιοτροφοβλάστη και κατά συνέπεια, δημιουργούνται κυτταρικές στήλες των λαχνών που εισχωρούν στο ενδομήτριο και διευκολύνουν τη σύνδεση του πλακούντα στο τοίχωμα της μήτρας κατά την κύηση (Muhlhauser J et al., 1993). Οι τροφοβλάστες που εντοπίζονται εκτός αυτού του ενδολαχνικού χώρου ορίζονται ως εξωλαχνικές τροφοβλάστες (EVTs) και χαρακτηρίζονται από έναν πολύ διεισδυτικό φαινότυπο.

Ένας υποπληθυσμός των εξωλαχνικών τροφοβλαστών αποκολλάται από τις προηγηθείσες κυτταρικές στήλες των λαχνών, εισχωρεί μέσα στη θεμέλια ουσία του φθαρτού, και κατά συνέπεια ορίζεται ως διάμεση ή ενδοαγγειακή εξωλαχνική τροφοβλάστη. Οι διάμεσες εξωλαχνικές τροφοβλάστες μεταναστεύουν και εισχωρούν στο φθαρτοποιημένο στρώμα και βυθίζουν τις λάχνες στο φθαρτό, ενώ οι ενδοαγγειακές εξωλαχνικές τροφοβλάστες μεταναστεύουν στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας. Εκεί, οι τροφοβλάστες αναδιαμορφώνουν και αντικαθιστούν την εσωτερική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των σπειροειδών αρτηριών, αποδομώντας το μυ και παρέχοντας έτσι, ικανοποιητική αιματική ροή στον πλακούντα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της διείσδυσης της διάμεσης και της ενδοαγγειακής τροφοβλάστης (Kaufmann et al., 2003; Kweider N, Huppertz B, Wruck CJ et al., 2012) Μπλε: εμβρυϊκοί ιστοί, συμπεριλαμβανομένων της διάμεσης τροφοβλάστης και των ενδοαγγειακών της παραγώγων. Καφέ: μητρικοί ιστοί. Η ενδοαγγειακή τροφοβλάστη προκύπτει μέσω μιας άλλης οδού, από τη διάμεση τροφοβλάστη

Έτσι, με την ολοκλήρωση του πρώτου τριμήνου, το οποίο αντιστοιχεί σε 12 εβδομάδες από τη σύλληψη ή 14 εβδομάδες από την πρώτη μέρα της τελευταίας φυσιολογικής εμμηνου ρύσεως της γυναίκας, η μητροπλακουντιακή επικοινωνία έχει εγκαθιδρυθεί και όλοι οι διαφοροποιημένοι υπότυποι των τροφοβλαστών εμφανίζονται στην επαφή μεταξύ μητέρας και εμβρύου.

Στο διάστημα που ακολουθεί, ο πλακούντας διαφοροποιείται και οι κυτοτροφοβλάστες συναντώνται όλο και λιγότερο, καθώς συντήκονται επιτυχώς για τη δημιουργία της συγκυτιοτροφοβλάστης (Simpson RA, Mayhew TM & Barnes PR, 1992). Αυτή η διαδικασία σύντηξης συνεχίζεται μέχρι τους τελευταίους μήνες της κύησης, οπότε και οι κυτοτροφοβλάστες παύουν να πολλαπλασιάζονται (Morrish DW et al., 2007).

B2. Εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση

B2.1. Εξωμήτρια κύηση

Σε περιπτώσεις παθολογικής κύησης, οι διαδικασίες της εμφύτευσης και της πλακουντοποίησης δεν επιτελούνται φυσιολογικά. Μία από αυτές τις περιπτώσεις αποτελεί και η εξωμήτρια κύηση, κατά την οποία το γονιμοποιημένο ωάριο εμφυτεύεται εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας (Bassem Refaat, 2014).

Η αποτυχία κύησης σε αρχικά στάδια είναι η πιο συχνή επιπλοκή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Περίπου το 25% των κυήσεων καταλήγουν σε αποβολή, εκ των οποίων το 1-2% αποτελούν περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης (Ana Martinez-Ruiz et al., 2014).

Το ποσοστό θνησιμότητας που προκαλείται από επιπλοκές σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης ανέρχεται στο 6% κατά το πρώτο τρίμηνο (Peter Takacs et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, η εξωμήτρια κύηση συμβάλλει στο 9-13% των θανάτων εγκύων σε αναπτυσσόμενες χώρες και στο 10-30% σε αφρικανικές αναπτυσσόμενες χώρες (Zhen Zhao et al., 2012).

B2.2. Αίτια εξωμήτριας κύησης

Η εξωμήτρια εμφύτευση πιστεύεται ότι οφείλεται σε αποτυχία του μηχανισμού σαλπινγικής μετακίνησης. Είτε η ρυθμική σύσπαση των λείων μυϊκών ινών στη σάλπιγγα, η οποία εξαρτάται από ωοθηκικές ορμόνες και άλλους παράγοντες που εκκρίνονται από τη σάλπιγγα, όπως οι προσταγλανδίνες, το νιτρικό οξείδιο, η προστακυκλίνη και το cAMP (Leyla Fath Bayati et al., 2014), είτε η κίνηση των βλεφαρίδων, η οποία ρυθμίζεται από παράγοντες, όπως οι στεροειδικές ορμόνες και η IL-6 (Leyla Fath Bayati et al., 2014), δεν πραγματοποιούνται φυσιολογικά έχοντας ως αποτέλεσμα την εξωμήτρια κύηση. Μια άλλη εξήγηση μπορεί να είναι η αύξηση της υποδεκτικότητας του σαλπινγικού επιθηλίου, ως αποτέλεσμα της καθυστέρησης της μετακίνησης του γονιμοποιημένου ωαρίου διαμέσου της σάλπιγγας και της διαταραγμένης υποδεκτικότητας του ενδομητρίου (Bassem Refaat, 2014).

Η μη φυσιολογική λειτουργία των παραπάνω μηχανισμών μπορεί να οφείλεται σε διάφορα αίτια. Αλλοίωση των σαλπίγγων λόγω φλεγμονώδους νόσου της πυέλου, προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις στις σάλπιγγες ή μια προϋπάρχουσα

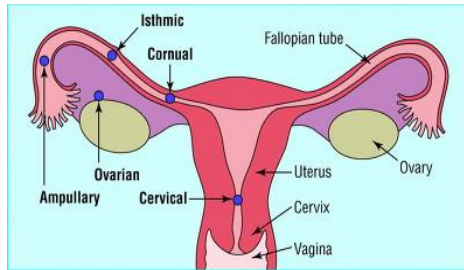
εξωμήτρια, σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με αυξημένο κίνδυνο για εξωμήτρια κύηση (Kurt T. Barnhart, 2009). Επίσης, η λοίμωξη από *Chlamydia trachomatis* θεωρείται ως μία εκ των επικρατέστερων αιτιών υπογονιμότητας και ασθενειών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, όπως είναι η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (Chrysostomou et al., 1992; Low et al., 2006; Bjartling et al., 2007). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει, ότι η ανοσία που προκαλείται μετά από γλαμυδιακή λοίμωξη σχετίζεται έντονα με αποτυχημένες κυήσεις, και ειδικότερα με εμφύτευση του εμβρύου στη σάλπιγγα ή με αποτυχία φυσιολογικής εμφύτευσης (Walters et al., 1988; Chrysostomou et al., 1992; Odland et al., 1993; Machado et al., 2007).

Στους παράγοντες μικρότερου κινδύνου συμπεριλαμβάνονται το ιστορικό καπνίσματος, η ηλικία άνω των 35 χρόνων και ο μεγάλος αριθμός σεξουαλικών συντρόφων κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας. Δεν υφίσταται ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της εξωμήτριας κύησης και της χρήσης αντισυλληπτικών από του στόματος, προηγούμενου επιλεγμένου τερματισμού εγκυμοσύνης, αποβολής ή καισαρικής τομής. Η σύλληψη μετά από τοποθέτηση ενδομητρικής συσκευής αντισύλληψης ή μετά από μια απολίνωση σάλπιγγας είναι σπάνιο φαινόμενο, ωστόσο το 25-50% αυτών των κυήσεων είναι εξωμήτριες. Γυναίκες που είναι υπογόνιμες διατρέχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο για εξωμήτρια κύηση, γιατί αλλοιώσεις στις σάλπιγγες (μορφολογικά και λειτουργικά) συμβάλλουν και στις δύο καταστάσεις. Επιπλέον, η χρήση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ειδικά της IVF, αυξάνει τον κίνδυνο για εξωμήτρια, ακόμα και στις γυναίκες που έχουν απόλυτα φυσιολογικές σάλπιγγες (Kurt T. Barnhart, 2009).

B2.3. Σημεία εντοπισμού και μορφές εξωμήτριας κύησης

Οι περισσότερες εξωμήτριες κυήσεις (93-98%) εντοπίζονται στη σάλπιγγα. Από αυτές, 13% εντοπίζονται στον ισθμό της σάλπιγγας, 75% στη λήκυθο, 12% στον κώδωνα και 2% στο κέρασ ή τη διάμεσο (Yoan Paltieli et al., 2000; Bouyer et al., 2002; Walker et al., 2007; Varma & Gupta, 2009).

Εξωμήτρια κύηση μπορεί επίσης να εντοπιστεί στην κοιλιακή χώρα, στον τράχηλο, στην ωοθήκη (Yoan Paltieli et al., 2000), και σε σπανιότερες περιπτώσεις στο σημείο καισαρικής τομής και στο μυομήτριο. Αυτές αποτελούν το 7% περίπου των εξωμητρίων κυήσεων που εντοπίζονται εκτός της σάλπιγγας (Bouyer et al., 2002) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σημεία εντοπισμού εξωμήτριας κύησης
(*West J Med 2000; 173(2):131-134*)

Εξωμήτρια κύηση στη σάλπιγγα

Το μεγαλύτερο ποσοστό των εξωμητρίων κύσεων αποτελούν οι σαλπιγγικές κύσεις, με το πιο σύνηθες σημείο εμφύτευσης να είναι η περιοχή της ληκύθου. Η πιο συχνή αιτία μητρικής θνησιμότητας στο πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι η αιμορραγία λόγω ρήξης της σάλπιγγας (Bassem Refaat, 2014).

Εξωμήτρια κύηση στην κοιλιακή χώρα

Η κοιλιακή εξωμήτρια κύηση είναι μια πολύ σπάνια μορφή εξωμητρίου, όπου η εμφύτευση πραγματοποιείται μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα, έξω από τη σάλπιγγα και την ωοθήκη. Μια τέτοια κατάσταση συχνά αποτυγχάνει διάγνωσης, παρά την τακτική παρακολούθηση με τη χρήση κοιλιακού υπερήχου (Amal A Dahab et al., 2011).

Εξωμήτρια κύηση στον τράχηλο

Η εξωμήτρια κύηση στον τράχηλο είναι μια σπάνια και επικίνδυνη μορφή εξωμήτριας, που χαρακτηρίζεται από εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στον ενδοτραχηλικό αγωγό. Η συχνότητά της είναι μικρότερη από 1% όλων των εξωμητρίων κύσεων. Παρ' όλο που η τραχηλική εξωμήτρια κύηση χαρακτηρίζεται συχνά από υψηλή νοσηρότητα λόγω βαριάς αιμορραγίας, το ποσοστό θνησιμότητας είναι χαμηλό και οφείλεται στην έγκαιρη υπερηχογραφική διάγνωση (Firoozeh Ahmadi et al., 2012).

Εξωμήτρια κύηση στην ωοθήκη

Η ωοθηκική εξωμήτρια κύηση αποτελεί το 3% όλων των εξωμητρίων κυήσεων. Αν και η ωοθήκη μπορεί να φιλοξενήσει σε μεγαλύτερο βαθμό το αναπτυσσόμενο κύημα σε σχέση με τη σάλπιγγα, συνήθως επέρχεται ρήξη σε αρχικό στάδιο της εγκυμοσύνης. Τα συμπτώματα συνήθως μιμούνται αυτά της σαλπινγικής εξωμήτριας κύησης ή ενός ωχρού σωματίου που αιμορραγεί. Περίπου στο 1/3 των περιπτώσεων παρατηρείται σοβαρή αιμορραγία (Hatav Ghasemi Tehrani et al., 2014).

Εξωμήτρια κύηση στο σημείο καισαρικής τομής

Αυτή η περίπτωση εξωμήτριας κύησης αποτελεί μια σπάνια επιπλοκή, η οποία μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες για τη γονιμότητα της γυναίκας στο μέλλον και μπορεί να απειλήσει ακόμα και τη ζωή της. Πιστεύεται ότι οφείλεται στην παρουσία μιας μικροσκοπικής οδού στην ουλή, η οποία προκύπτει μετά την καισαρική τομή, επιτρέποντας στη βλαστοκύστη να εμφυτευτεί βαθιά στο μυομήτριο (Adel Al-Nazer et al., 2009).

Εξωμήτρια κύηση εντός του μυομητρίου

Αυτή η μορφή συγκαταλέγεται μεταξύ των σπανιότερων μορφών εξωμήτριας κύησης. Σε αυτή την περίπτωση, ο αμνιακός σάκος εντοπίζεται μέσα στο μυομήτριο χωρίς να υπάρχει καμία σύνδεση με την ενδομητρική κοιλότητα, τις σάλπιγγες ή το στρογγυλό σύνδεσμο (Tina Verghese et al., 2012).

B2.4. Διάγνωση εξωμήτριας κύησης

Η μέθοδος που εφαρμόζεται μέχρι σήμερα για τη διάγνωση της εξωμήτριας κύησης, περιλαμβάνει τη μέτρηση των επιπέδων της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) στον ορό του αίματος και την παρακολούθηση με τη βοήθεια διακολπικού υπερήχου (Ana Martinez-Ruiz et al., 2014).

Αρχικά πραγματοποιείται υπερηχογράφημα για τον αποκλεισμό μιας φυσιολογικής ενδομητρικής κύησης (Diana Desai et al., 2014), στην περίπτωση που απεικονίζεται μια άδεια μήτρα και φαίνεται να υπάρχει αμνιακός σάκος ή κάποια μάζα

στην περιοχή των εξαρτημάτων (Stephen A. Butler et al., 2013). Ωστόσο, ο υπέρηχος δεν παρέχει εμπειριστατωμένη διάγνωση σε 40% των γυναικών κατά την αρχική επίσκεψη, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο ότι η εγκυμοσύνη δεν είναι αρκετά προχωρημένη, ώστε να είναι δυνατή η απεικόνισή της μέσω του υπερηχογραφήματος, ή έχει ήδη αποτύχει πριν σχηματιστεί ο αμνιακός σάκος (Ana Martinez-Ruiz et al., 2014).

Όταν δεν μπορεί να γίνει εμπειριστατωμένη διάγνωση με τη βοήθεια του διακολπικού υπερήχου, η κύρια οδός διάγνωσης που ακολουθείται είναι οι τακτικές μετρήσεις β-hCG στον ορό του αίματος της ασθενούς και βασίζεται στο διπλασιασμό των επιπέδων της χοριακής γοναδοτροφίνης του ορού εντός 48 ωρών (Stephen A. Butler et al., 2013).

Η συγκέντρωση της β-hCG στον ορό του αίματος χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την επιτυχή εμφύτευση της τροφοβλάστης και την ηλικία κύησης (Fabio Roberto Cabar et al., 2008; Diana Desai et al., 2014) και η τιμή της αντιπαρατίθεται συνήθως με τη 'διευκρινιστική ζώνη τιμών της β-hCG', όπου οι τιμές της κυμαίνονται από 1500 μέχρι 2000, 2500 ή 3000 IU/L. Όταν οι μετρούμενες τιμές συγκέντρωσης β-hCG στον ορό του αίματος μιας ασθενούς υπερβαίνουν τα όρια της διευκρινιστικής αυτής ζώνης, αποτελεί ένδειξη εξωμήτριας κύησης σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα εξέτασης με τη χρήση διακολπικού υπερήχου (Diana Desai et al., 2014).

Από μόνες τους οι μετρήσεις της β-hCG μπορούν μεν να διαχωρίσουν μια φυσιολογική ενδομητρική κύηση από μια μη βιώσιμη, αλλά όχι μια φυσιολογική κύηση που διεκόπη από μια εξωμήτρια κύηση (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Μια διαγνωσμένη εξωμήτρια κύηση μπορεί να αντιμετωπιστεί χειρουργικά αφαιρώντας το κύημα ή τη σάλπιγγα, ιατρικά χορηγώντας μεθοτρεξάτη ή με συντηρητική αντιμετώπιση (Barnhart 2009; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2012; van Mello, 2012a; Rana et al., 2013).

B2.5. Παλίνδρομη κύηση

Ο όρος ‘παλίνδρομη κύηση’ αναφέρεται σε κύησεις, όπου επέρχεται θάνατος του εμβρύου χωρίς εξωτερική παρέμβαση. Ωστόσο, δεν υφίσταται η κατάλληλη δραστηριότητα της μήτρας, ώστε να αποβληθούν τα προϊόντα της σύλληψης πριν τις 20 εβδομάδες κύησης (Griebel et al., 2005; Honglei Chen et al., 2015).

Έχουν αναγνωριστεί πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ανωμαλιών των πατρικών χρωμοσωμάτων, των ανοσολογικών παραγόντων, των ενδοκρινολογικών διαταραχών, των ανωμαλιών της μήτρας, της κληρονομικής θρομβοφιλίας, των λοιμώξεων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτές οι καταστάσεις μπορεί να εμφανιστούν σε περίπου 50% όλων των γυναικών με αποβολές (Clifford et al., 1994; Hatasaka, 1994).

Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, έχουν προταθεί επίσης γενετικοί πολυμορφισμοί ως ένας παράγοντας επιδεκτικότητας που αυξάνει την πιθανότητα αποβολής σε υγιείς, κατά τα άλλα, γυναίκες (Pietrowski et al., 2003, 2005).

B3. Βιοδείκτες

Η διάγνωση της εξωμήτριας κύησης, καθώς και άλλων δυσμενών εκβάσεων κατά τα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης, όπως είναι η παλίνδρομη κύηση, είναι πολύπλοκη λόγω μιας κλινικής εικόνας που δεν είναι ξεκάθαρη, έλλειψης ενός σύντομου και απλού διαγνωστικού πρωτοκόλλου και απουσίας ενός εξακριβωμένου διαγνωστικού δείκτη (Shimon Segal et al., 2008).

Η κύρια μέθοδος διάγνωσης και παρακολούθησης που ακολουθείται μέχρι και σήμερα σε περιπτώσεις πιθανές για μη φυσιολογική κύηση, όπως είναι η εξωμήτρια και η παλίνδρομη, είναι χρονοβόρα και συχνά τα αποτελέσματα μπορεί να είναι είτε ψευδώς θετικά είτε ψευδώς αρνητικά. Κατά συνέπεια, είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση και χρήση ενός ή περισσότερων κατάλληλων βιοδεικτών, ώστε να είναι δυνατή η άμεση, έγκαιρη και ακριβής διάγνωση ή ακόμα και η πρόγνωση μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης.

Ένας βιοδείκτης ορίζεται επίσημα από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) ως ‘ένα χαρακτηριστικό που μετράται και αξιολογείται αντικειμενικά ως ένας δείκτης φυσιολογικών βιολογικών λειτουργικών, παθολογικών λειτουργιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση’. Ένας μοριακός

βιοδείκτης θα πρέπει να απομονώνεται και να μετράται εύκολα, ώστε να παρέχει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα για την εύρεση μιας παθολογικής κατάστασης (Stephen S. Palmer, 2013).

Παρά την κλινική αναγκαιότητα για βιοδείκτες σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης, αυτοί που χρησιμοποιούνται προς το παρόν είναι περιορισμένοι.

Οι βιοδείκτες που έχουν διερευνηθεί μέχρι σήμερα, έχουν αξιολογηθεί με βάση τις διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες, οι οποίες θεωρητικά μεταβάλλονται κατά τη μη φυσιολογική ανάπτυξη του κυήματος σε εξωμήτριες κύσεις στη σάλπιγγα. Μπορούν να χωριστούν σε:

- i. δείκτες μη φυσιολογικής λειτουργίας της τροφοβλάστης, του ωχρού σωματίου και του ενδομητρίου
- ii. δείκτες εμφύτευσης και αύξησης στη σάλπιγγα, όπως αυτοί που σχετίζονται με αγγειογένεση και αλλοίωση των μυϊκών κυττάρων
- iii. δείκτες φλεγμονώδους αντίδρασης (Mary E. Rausch & Kurt Barnhart, 2012)

B3.1. Δείκτες διείσδυσης τροφοβλάστης

β-χοριακή γοναδοτροφίνη (β-hCG)

Ο πιο ευρέως μελετημένος βιοδείκτης για την πορεία της εγκυμοσύνης σε αρχικό στάδιο και ο μόνος που χρησιμοποιείται κατά κόρον στην κλινική πράξη είναι η β-χοριακή γοναδοτροφίνη (β-hCG). Ως μοναδική τιμή δεν έχει διαγνωστική αξία. Ωστόσο, οι συνεχείς μετρήσεις των επιπέδων της β-hCG στον ορό του αίματος βοηθούν στην αναγνώριση ασθενών που χρήζουν στενότερης παρακολούθησης για αποτυχημένες κύσεις σε αρχικά στάδια (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Υπάρχουν υποψίες για μια μη φυσιολογική κύηση, όταν οι τιμές της β-hCG, μετά από τακτικές μετρήσεις, μειώνονται ή δεν αυξάνονται με τον αναμενόμενο ρυθμό σε περίπτωση φυσιολογικής κύησης. Ωστόσο, μειωμένες τιμές ή μικρές μόνο αυξήσεις στις συγκεντρώσεις β-hCG δεν είναι δυνατόν να διευκρινίσουν εάν πρόκειται για αποβολή ή εξωμήτρια κύηση. Συνεπώς, η μέτρηση της β-χοριακής γοναδοτροφίνης δεν είναι πρακτική, όταν η ασθενής χρήζει επείγουσας διάγνωσης (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Υπεργλυκοζυλιωμένη hCG

Η υπεργλυκοζυλιωμένη hCG (hCG-H) παράγεται από εξωλαχνικές κυτοτροφοβλάστεις και εκκρίνεται από τη στιγμή της εμφύτευσης. Ως μοναδικός δείκτης, η hCG-H δεν έχει μεγάλη ακρίβεια (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Ακτιβίνη A

Είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη της TGF-β υπεροικογένειας και προϊόν του πλακούντα, που προωθεί τη διείσδυση της κυτοτροφοβλάστης. Επομένως, ανωμαλίες στα επίπεδα της ακτιβίνης A μπορεί να είναι προάγγελος μιας μη φυσιολογικής εμφύτευσης και βιωσιμότητας της κύησης. Ωστόσο, δεν είναι δυνατή η χρήση αυτού του μορίου ως μοναδικού δείκτη για εξωμήτρια κύηση (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Πρωτεΐνη πλάσματος που σχετίζεται με κύηση-A (PAPP-A)

Η PAPP-A συντίθεται από τα κύτταρα του τροφοβλαστικού στρώματος και οι συγκεντρώσεις της αυξάνονται προοδευτικά με την κύηση (Fabio Roberto Cabar et al., 2008). Έτσι, έχει μελετηθεί εκτενώς ως δείκτης αποτυχημένης κύησης σε αρχικό στάδιο και ανευπλοειδίας (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013). Ωστόσο, η PAPP-A μπορεί επίσης να βρεθεί σε γυναίκες που δεν εγκυμονούν, σε σημεία εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας, όπως στα ωοθυλάκια, στο ωοθυλακικό υγρό, στα ωχρά σωματίδια και στις σάλπιγγες.

Γενικά, όσον αφορά στις πρωτεΐνες που παράγονται από τον πλακούντα, παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών μειώνονται πολύ σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης, σε σύγκριση με φυσιολογικές κύσεις με την ίδια ηλικία. Τα μειωμένα αυτά επίπεδα πρωτεϊνών στην κυκλοφορία σε εξωμήτριες κύσεις, θεωρείται ότι υποδεικνύουν την ύπαρξη μικρότερης συγκυτιοτροφοβλαστικής μάζας (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Η PAPP-A μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη βιωσιμότητα της κύησης, αλλά όχι για το διαχωρισμό μιας εξωμήτριας από μια φυσιολογική κύηση (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

β-γλυκοπρωτεΐνη 1 ειδική για κύηση (SP-1)

Αποτελεί μία από τις αρχικές πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν σε καλλιέργειες τροφοβλάστης και με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας για την εύρεση βιοδεικτών. Ο δυνητικός τους ρόλος στη διάγνωση της εξωμήτριας κύησης υποστηρίχθηκε επιπλέον από αμερόληπτα ευρήματα με τη βοήθεια της πρωτεωμικής. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να αξιολογηθεί η προγνωστική αξία της εξωμήτριας κύησης (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Λακτογόνο ανθρώπινου πλακούντα (hPL)

Το hPL παράγεται επίσης από την τροφοβλάστη και έχει μελετηθεί ως ένας πιθανός δείκτης για μια μη φυσιολογική κύηση. Έχει περιορισμένη χρησιμότητα ως ανεξάρτητος δείκτης για εξωμήτρια κύηση (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Ντισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση-12 (ADAM-12)

Μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται πρωταρχικά από πλακουντιακές συγκυτιοτροφοβλάστες και θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη συγκυτιακή σύντηξη. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός δείκτης ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

B3.2. Δείκτες νουκλεϊκών οξέων

Τα mRNAs του πλακούντα έχουν μεταβλημένα μοτίβα έκκρισης από εξωλαχνικές τροφοβλάστες σε μη φυσιολογικές κύσεις, και επομένως έχουν ληφθεί υπ' όψιν ως δυνητικοί διαγνωστικοί δείκτες.

Τα miRNAs του πλακούντα είναι μονόκλωνα, μη κωδικά RNAs 19-25 νουκλεοτιδίων, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Έχουν συσχετιστεί τουλάχιστον 31 miRNAs με την κύηση. Σε συνδυασμό με άλλους δείκτες, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αποδεκτοί δείκτες για εξωμήτρια κύηση (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

B3.3. Δείκτες λειτουργίας ωχρού σωματίου

Προγεστερόνη

Η προγεστερόνη έχει μελετηθεί εκτενώς ως ένας δυναμικός βιοδείκτης για αποτυχημένη κύηση στα αρχικά στάδια και για εξωμήτρια κύηση, ως μοναδικός δείκτης, αλλά και σε συνδυασμό με άλλους (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις της β-hCG, τα επίπεδα της προγεστερόνης στον ορό είναι σταθερά για τις πρώτες 8-10 εβδομάδες της κύησης. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν, ότι οι συγκεντρώσεις είναι υψηλότερες στη φυσιολογική ενδομητρική κύηση (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Η προγεστερόνη μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση των ασθενών που διατρέχουν κίνδυνο για εξωμήτρια κύηση, αλλά η βέλτιστη χρησιμότητά της για την πρόγνωση της εξωμήτριας κύησης, μάλλον παρατηρείται σε συνδυασμό με άλλους δείκτες (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Ινχιμπίνη Α

Είναι ένα ετεροδιμερές πεπτίδιο που κυρίως εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο. Ενώ φαίνεται να είναι ένας υποσχόμενος δείκτης βιωσιμότητας, αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη χρησιμότητά της ως δείκτη για εξωμήτρια κύηση απαιτούν περαιτέρω μελέτες, ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί κλινικά (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

B3.4. Δείκτες αγγειογένεσης

Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF)

Ο VEGF είναι ένας αγγειογενετικός παράγοντας που δρα ως ρυθμιστής της αγγειακής αύξησης, της ανακατασκευής και της διαπερατότητας του ενδομητρίου, του φθαρτού και της τροφοβλάστης, καθώς και κατά τη διάρκεια της αγγειακής ανάπτυξης, λειτουργίες που είναι όλες κρίσιμες και σχετίζονται με τη φυσιολογική εμφύτευση και πλακουντοποίηση (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Επομένως, ο VEGF συμβάλλει σημαντικά στην αγγειακή ανάπτυξη της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας και μπορεί να επηρεαστεί λόγω υποξίας και από διάφορες κυτοκίνες στο εμβρυϊκό περιβάλλον (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Η έκφραση και η έκκριση του VEGF μπορεί να επηρεαστούν σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης (Fabio Roberto Cabar et al., 2008). Ο VEGF μπορεί να είναι ένας υποσχόμενος δείκτης για εξωμήτρια κύηση, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις γυναικών βρέθηκε ότι αυξάνονται πολύ οι τιμές του σε σχέση με φυσιολογικές ενδομητρικές κύησεις, ενώ σε άλλες δεν υπήρχε καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις του VEGF (Fabio Roberto Cabar et al., 2008; Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

PIGF

Είναι ένας προαγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας που παράγεται κυρίως από τροφοβλαστικά κύτταρα και έχει εντοπιστεί σε σημεία εμφύτευσης. Ο PIGF χρειάζεται να εξακριβωθεί ως δείκτης με επιπλέον μελέτες (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

B3.5. Δείκτες λειτουργίας ενδομητρίου

LIF

Είναι μια κυτοκίνη της οικογένειας της ιντερλευκίνης 6 που παίζει ρόλο στην εμφύτευση και σε φλεγμονώδη αντίδραση. Ο ρόλος του LIF ως βιοδείκτη για εξωμήτρια κύηση είναι περιορισμένος λόγω ασαφών αποτελεσμάτων (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Γλυκοδελίνη

Είναι μια πρωτεΐνη που βρέθηκε στο ενδομήτριο και στη σάλπιγγα και η οποία σχετίζεται με την ανοσολογική ρύθμιση κατά την εμφύτευση. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για τη χρησιμοποίησή της ως δείκτη εξωμήτριας κύησης (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Μυκίνη-1 (MUC 1)

Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της κορυφαίας επιφάνειας του επιθηλίου που εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στο επιθήλιο της σάλπιγγας, το οποίο περιλαμβάνεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βλαστοκύστης και ενδομητρίου κατά την εμφύτευση. Δεν έχει διερευνηθεί ακόμα η χρησιμότητά της ως βιοδείκτη (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Αδρενομεδουλίνη

Είναι μια πεπτιδική ορμόνη της οικογένειας πεπτιδίων που σχετίζονται με τα γονίδια της καλσιτονίνης/καλιτονίνης (CGRP)/αμυλίνης, η οποία προωθεί την ενδομήτρια αγγειογένεση. Χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της χρησιμότητάς της ως δείκτη για εξωμήτρια κύηση στην κλινική πράξη (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

B3.6. Δείκτες για φλεγμονώδη αντίδραση και αλλοίωση των μυών

Έχουν προταθεί διάφοροι δείκτες περιτοναϊκής φλεγμονώδους αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CA-125 και TNF-α. Οι δείκτες αυτοί μπορεί να είναι θεωρητικά υποσχόμενοι, αλλά η έμφυτη ποικιλότητα της φλεγμονώδους αντίδρασης περιορίζει την ακρίβεια και συνέπεια που χρειάζονται για τη χρήση τους στην κλινική πράξη (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

CA-125

Το CA-125 είναι ένας αντιγονικός καθοριστής που εντοπίζεται σε μια γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους. Τα επίπεδα του CA-125 στον ορό αγγίζουν το υψηλότερο σημείο κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, μεταξύ έκτης και έβδομης εβδομάδας, και κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο πέφτουν σε τιμές που παρατηρούνται σε μη εγκύους.

Αυξημένα επίπεδα CA-125 στον ορό της εγκυμονούσας προέρχονται από φθαρτοποιημένα κύτταρα, που επηρεάζονται από τη χοριονική δεισδυση ή τον αποχωρισμό του πλακούντα. Σε κάποιες μελέτες, το CA-125 βρέθηκε σε χαμηλότερες

τιμές σε περιπτώσεις εξωμήτριας και θεωρήθηκε χρήσιμος διαγνωστικός δείκτης για μια τέτοια κατάσταση, σε συνδυασμό με τις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης. Σε άλλες μελέτες, οι συγκεντρώσεις CA-125 σε εξωμήτριες κύσεις ήταν μεγαλύτερες, ενώ σε μερικές δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

Δείκτες αλλοίωσης των μυών, συμπεριλαμβανομένων της κρεατινικής κινάσης, της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των λείων μυών και της μυογλοβίνης, έχουν επίσης διερευνηθεί για την πρόβλεψη της εξωμήτριας κύησης. Οι δείκτες αυτοί είναι πιο πιθανό να εντοπίσουν μια επικείμενη ρήξη, παρά μια εξωμήτρια κύηση σε αρχικό στάδιο (Suneeta Senapati & Kurt T. Barnhart, 2013).

Κρεατινική κινάση (CK)

Η έλλειψη υποβλεννογόνου στιβάδας στη σάλπιγγα επιτρέπει στο ζυγώτη να διεισδύσει στο επιθήλιο και να παραμείνει δίπλα στην μυϊκή στιβάδα, στην περίπτωση των σαλπγγικών κύσεων. Η τροφοβλάστη συνήθως διεισδύει στη μυϊκή στιβάδα και τα μητρικά αιμοφόρα αγγεία διαβρώνονται, επιτρέποντας τα προϊόντα των μυϊκών κυττάρων, όπως η κρεατινική κινάση (CK), να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος. Για το λόγο αυτό, σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης, τα επίπεδα της κρεατινικής κινάσης στον ορό αναμένεται να είναι αυξημένα.

Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν, ότι η κρεατινική κινάση αποτελεί ένα σημαντικό βιοχημικό δείκτη για την περίπτωση της εξωμήτριας κύησης, ενώ σε άλλες φαίνεται, ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη ως αξιόπιστος βιοδείκτης (Fabio Roberto Cabar et al., 2008).

B3.7. Χρήση βιοδεικτών σε περιπτώσεις εξωμητρίων και παλίνδρομων κύσεων

Αναλογιζόμενοι τις συνέπειες ενός ψευδούς θετικού ή ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, μόνο μια εξέταση με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη. Καθώς κανείς από τους μέχρι τώρα διερευνηθέντες βιοδείκτες δεν έχει κατορθώσει να διαχωρίσει τις περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης από τις φυσιολογικές με ακρίβεια, αρκετοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να συνδυάσουν πολλούς δείκτες σε μια εξέταση για καλύτερο διαγνωστικό αποτέλεσμα. Πράγματι, ο

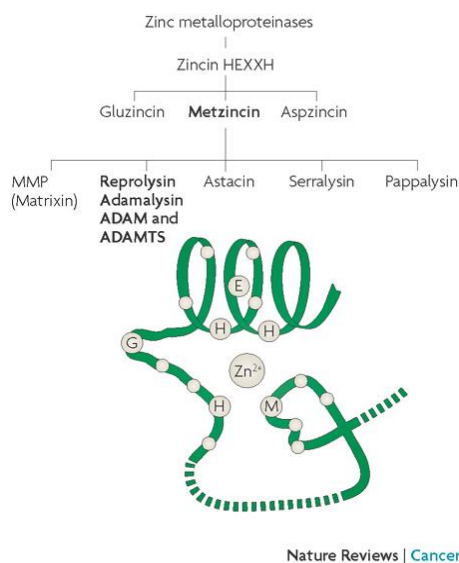
συνδυασμός δεικτών με πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες έχει αποδειχθεί πιο επιτυχής (Mary E Rausch & Kurt T. Barnhart, 2012).

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση του ρόλου των μεταλλοπρωτεασών στην κύηση, και κατ' επέκταση, με τη διερεύνηση του ρόλου τους ως βιοδείκτες για την παλίνδρομη και εξωμήτρια κύηση.

B4. Μεταλλοπρωτεάσες

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα κατηγοριοποιούνται ως εξωπεπτιδάσες ή ενδοπεπτιδάσες με βάση το αν λύουν τελικούς δεσμούς ή εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς, αντίστοιχα. Οι περισσότερες ενδοπεπτιδάσες χωρίζονται σε ενδοπεπτιδάσες σερίνης, κυστεΐνης, ασπαρτικού οξέος ή μεταλλοπρωτεάσες με βάση τον καταλυτικό μηχανισμό τους και την ευαισθησία των αναστολέων τους.

Οι μετζινκίνες, μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών, οι οποίες εκφράζονται παντού (Stöcker & Bode, 1995) και χωρίζονται περαιτέρω σε έξι πολυγονιδιακές οικογένειες, τις βακτηριακές σεραλυσίνες (Nakahama et al., 1986), τις αστακίνες (συμπεριλαμβανομένων των μεπρινών) (Butler et al., 1987; Bode et al., 1992), τις ADAMs/ανταμαλυσίνες (White, 2003), τις ADAMs με μοτίβο θρομβοσποντίνης (ADAMTSS) (Tang, 2001), τις μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) (Nagase & Woessner, 1999) και τις παππαλυσίνες (Gillian Murphy, 2008) (Εικόνα 3).



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 3: Ταξινόμηση μεταλλοπρωτεασών
(*Nature Reviews Cancer* 2008; 8:932-941)

Αυτή η υπεροικογένεια πρωτεασών καθορίζεται από την παρουσία ενός ιόντος ψευδαργύρου (Zn^{2+}) στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο συντονίζεται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης στην κοινώς αποδεκτή αλληλουχία σύνδεσης με ψευδάργυρο, η οποία είναι παρούσα σε όλες τις πρωτεολυτικά ενεργές μετζινκίνες, και από μια χαρακτηριστική, αυστηρά συντηρημένη, συστροφή της 1,4 βήτα περιοχής που περιέχει μεθειονίνη, σχηματίζοντας έναν υδροφοβικό δακτύλιο για το καταλυτικό ιόν ψευδαργύρου (Bode et al., 1993). Η αλληλουχία αυτή που συνδέεται με ψευδάργυρο, είναι HEBXHXBGBXHZ, όπου τα κατάλοιπα ιστιδίνης (H), γλουταμινικού οξέος (E) και γλυκίνης (G) είναι αμετάβλητα, το B ένα ογκώδες υδροφοβικό κατάλοιπο, το X ένα μεταβλητό κατάλοιπο και το Z, ένα αμινοξύ συγκεκριμένο για κάθε οικογένεια (Stöcker et al., 1995).

Η κύρια φυσιολογική λειτουργία των μεταλλοπρωτεασών, αρχικά είχε σχέση με την αλλαγή της διαμόρφωσης και της ρύθμισης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μέσω άμεσης πρωτεολυτικής αποδόμησης των πρωτεϊνών της (όπως κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και φμπρονεκτίνη) (Woessner, 1991).

Μια άλλη σημαντική λειτουργία είναι η απελευθέρωση βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών, όπως είναι οι κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και χημοκίνες από τις πρωταρχικές τους μορφές, οι οποίες είναι 'αγκυροβολημένες' στη μεμβράνη (T. Klein & R. Bischoff, 2011).

B4.1. Μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs)

Οι μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας ή ματριξίνες (MMPs) είναι μια υποοικογένεια των μεταλλοπρωτεασών, που συνίσταται από 23 διακριτές πρωτεάσες στον άνθρωπο και 24 στο ποντίκι (T. Klein & R. Bischoff, 2011).

Οι MMPs κατηγοριοποιούνται γενικά σύμφωνα με την εξειδίκευση του υποστρώματος που πρωτεολύουν, οδηγώντας έτσι σε τέσσερις κύριες ομάδες, τις κολλαγενάσες, τις ζελατινάσες, τις στρομελυσίνες, τις μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs) και μία ετερογενή ομάδα που περιέχει τη ματριλυσίνη, τη μεταλλοελαστάση, την εναμελυσίνη, την ενδομετάση και την επιλυσίνη (Woessner & Nagase, 2000; Sternlicht & Werb, 2001).

Δύο μεταλλοπρωτεάσες, η MMP-2 (ζελατινάση A/72 kDa τύπου IV κολλαγενάση) και η MMP-9 (ζελατινάση B/92 kDa τύπου IV κολλαγενάση) μπορούν να διασπάσουν το κολλαγόνο τύπου IV, το κύριο συστατικό των βασικών μεμβρανών,

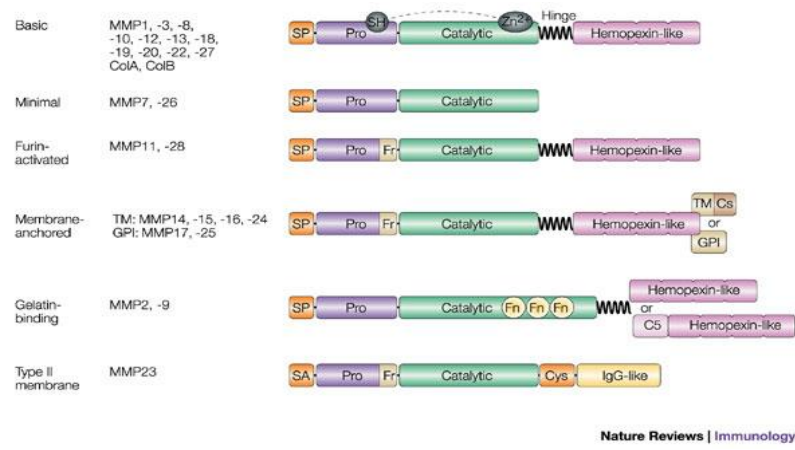
καθώς και μερικές άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως είναι τα κολλαγόνα I, V, VII, IX και X, η φιμπρονεκτίνη (FN), η λαμινίνη (LN), η ελαστίνη και η βιτρονεκτίνη, και επομένως θεωρούνται ως ένζυμα-κλειδιά στη διαδικασία της διείσδυσης της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Bjorn SF et al., 2000; Woessner & Nagase, 2000). Οι MT-MMPs περιλαμβάνουν έξι μέλη, απ'τα οποία το καλύτερα χαρακτηρισμένο είναι η MT1-MMP ή αλλιώς MMP-14 (Ohuchi et al., 1997). Έχει βρεθεί ότι η MMP-14 λειτουργεί, όχι μόνο ως ενεργοποιητής για κάποιες MMPs, όπως είναι οι MMP-2 και MMP-13 (Strongin et al., 1995; Knauper et al., 1996), αλλά και ως πρωτεολυτικό ένζυμο που αποδομεί τη φιμπρονεκτίνη, τη λαμινίνη και τα κολλαγόνα I και III (D'Ortho et al., 1997; Ohuchi et al., 1997).

Εκτός από τα υποστρώματα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οι MMPs λύουν επίσης μόρια της κυτταρικής επιφάνειας και άλλες περικυτταρικές πρωτεΐνες που δεν περιέχονται στη θεμέλια ουσία, ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική συμπεριφορά με πολλούς τρόπους (Sternlicht et al., 2000).

B4.1.1. Δομή των MMPs

Γενικά, οι μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας αποτελούνται από τέσσερις διακριτές επικράτειες, την αμινοτελική προ-επικράτεια, την καταλυτική επικράτεια, τη συνδετική περιοχή και την καρβοξυτελική περιοχή που μοιάζει με αυτή της αιμοπηξίνης. Αυτή μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του μακρομοριακού υποστρώματος, καθώς και για την αλληλεπίδραση με τις TIMPs.

Οι μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs), ωστόσο, περιέχουν μια επιπλέον διαμεμβρανική επικράτεια και μια κυτταροπλασματική ουρά ή μια υδροφοβική επιμήκυνση στο καρβοξυτελικό άκρο, που δρα ως σήμα GPI-αγκυροβόλιου γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης (Itoh et al., 1999; Kojima et al., 2000; Velasco et al., 2000). Η γενική τοπολογία του ενεργού κέντρου του ενζύμου είναι συντηρημένη σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών MMPs και το μοτίβο της αλληλουχίας του συντηρημένου ενεργού κέντρου, HEXXHXXGXXH, συντονίζει το καταλυτικό ιόν ψευδαργύρου και περιέχει κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος, το οποίο διευκολύνει την κατάλυση (Rajeshwar P. Verma & Corwin Hansch, 2007) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Απεικόνιση δομής των MMPs
(*Nature Reviews Immunology* 2004; 4:617-629)

Εκτός από κοινή δομή επικρατειών, οι MMPs έχουν και παρόμοια γενετική διευσθέτηση, το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι προήλθαν από διπλασιασμούς ενός προγονικού γονιδίου. Τουλάχιστον 8 από τα γνωστά MMP γονίδια εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 11q21-q23 (MMPs 1, 3, 7, 8, 10, 12, 13 και 20) (Pendas et al., 1997). Άλλα γνωστά MMP γονίδια είναι διασκορπισμένα στα χρωμοσώματα 1, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 20 και 22 (Llano et al., 1997; Puente et al., 1998; Shapiro, 1998; Velasco et al., 1999; Lohi et al., 2001; Marchenko & Strongin, 2001).

Έχουν αναγνωριστεί γονίδια MMPs σε διάφορα είδη ασπονδύλων. Ο νηματώδης σκόληκας *Caenorhabditis elegans* διαθέτει μερικές MMPs, συμπεριλαμβανομένων των C31, H19, Y19. Υπάρχει μια MMP στη *Drosophila melanogaster*, οι αχινοί διαθέτουν μια MMP απαραίτητη για την εκκόλαψη, γνωστή ως ενβελυσίνη και η ύδρα έχει μια MMP, η οποία είναι αναγκαία για τη διαδικασία αναάπτυξης του ποδός. Επίσης, υπάρχει μια MMP στο πράσινο φύκος, καθώς και σε φυτά, όπως η σόγια και το *Arabidopsis thaliana* (Robert PT Somerville et al., 2003).

B4.1.2. Λειτουργίες και έκφραση των MMPs

Επομένως, οι μεταλλοπρωτεάσες MMPs συνιστούν μια οικογένεια δομικά συγγενικών πρωτεολυτικών ενζύμων, οι οποίες παίζουν κρίσιμο ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η δημιουργία ιστών και οργάνων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια και η αναδιαμόρφωση ιστών σε περιπτώσεις επούλωσης τραυμάτων, καθώς και η εμφύτευση των εμβρύων μέσα στον ενδομητρικό ιστό (Xuesong Yang et al., 2007).

Επίσης, θεωρούνται απαραίτητες σε διαδικασίες, όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη (Brenner et al., 1989; Sappino et al., 1989; Werb et al., 1992), η διείσδυση καρκινικών κυττάρων (Dano et al., 1985; Tryggvason et al., 1987), και σε αναπαραγωγικούς ιστούς (Hulboy et al., 1997).

Δρουν μεταβάλλοντας και αποδομώντας τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Nagase & Woessner, 1999). Επιπλέον, πολλές MMPs μεταβάλλουν τη δράση των αυξητικών παραγόντων ή των υποδοχέων τους, όπως του TNF-α, του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, των αυξητικών παραγόντων ινοβλαστών και του IGF-1 (McCawley & Matrisian, 2001).

Οι μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα του συνδετικού ιστού και προ-φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, οστεοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, μακροφάγων, ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων. Αυτά τα ένζυμα εκφράζονται ως ζυμογόνα, τα οποία στη συνέχεια επεξεργάζονται από άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα (όπως οι πρωτεάσες σερίνης, η φουρίνη, η πλασμίνη και άλλα), ώστε να παραχθούν οι ενεργές μορφές τους (Rajeshwar P. Verma & Corwin Hansch, 2007) μετά την πρωτεολυτική απομάκρυνση της αμινοτελικής τους προ-επικράτειας (Katja Ahokas et al., 2002)

Οι MMPs εκφράζονται συνήθως ελάχιστα υπό φυσιολογικές συνθήκες, διατηρώντας έτσι την ομοιόσταση (Rajeshwar P. Verma & Corwin Hansch, 2007). Επομένως, η μη φυσιολογική έκφραση των MMPs μπορεί να συμβάλλει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση, το εμφύσημα και ο καρκίνος (Xuesong Yang et al., 2007).

Η πρωτεολυτική δράση των MMPs ελέγχεται σε οποιοδήποτε από τα τρία γνωστά στάδια που ακολουθούν:

- i. ενεργοποίηση των ζυμογόνων
- ii. μεταγραφή και αναστολή των ενεργών μορφών από διάφορους ενδογενείς αναστολείς των MMPs (MMPIs) και αναστολείς των MMPs στους ιστούς (TIMPs).

Επίσης, οι MMPs ρυθμίζονται από ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες (Rajeshwar P. Verma & Corwin Hansch, 2007).

B4.1.3. MMPs και κύηση

Οι MMPs ελέγχουν στοιχεία της αναπαραγωγικής λειτουργίας. Στην ωοθήκη και τη μήτρα θεωρείται ότι ρυθμίζουν τις δυναμικές δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και την περίοδο του οίστρου.

Στα αρχικά στάδια της εμφύτευσης, οι ενδομητρικοί ινοβλάστες που περιβάλλουν το έμβρυο μεταμορφώνονται σε έναν επιθηλιοειδή κυτταρικό τύπο, μέσω μιας αντίδρασης που ονομάζεται φθαρτοποίηση, η οποία εξαρτάται από ένα έναυσμα που προκαλείται από τις ωοθηκικές στεροειδείς ορμόνες. Η φθαρτοποίηση των τοιχωμάτων του ενδομητρίου περιλαμβάνει την κυτταρική ανάπτυξη και μια αρκετά μεγάλη μείωση των εξωκυττάρων χώρων, συνοδευόμενη από αλλαγές σε πολλά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Μεταξύ των παραγόντων που συμμετέχουν στην αναδιάταξη των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, που επέρχεται με τη φθαρτοποίηση, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) και οι αναστολείς αυτών στους ιστούς (TIMPs) (Jiyoung Kim et al., 2006).

Κατά τη διαδικασία της διείσδυσης των κυττάρων της τροφοβλάστης παίζει σημαντικό ρόλο η πρωτεολυτική δράση των MMPs, καθώς και οι TIMP-1, -2 και -3 που ρυθμίζουν τη βιολογική αυτή διαδικασία (Librach et al., 1991; Polette et al., 1994; Bass et al., 1997; Bai SX et al., 2005). Ειδικότερα, φαίνεται ότι η MMP-2 και -14 και η TIMP-2 παίζουν μεγάλο ρόλο στη διείσδυση της τροφοβλάστης στο μητρικό ιστό στα αρχικά στάδια της εμφύτευσης. Αργότερα, οι αυξημένοι υποδοχείς της λαμινίνης και φιμπρονεκτίνης, καθώς και αυτοί της ιντεγκρίνης στα κύτταρα των τροφοβλαστών, μπορεί να ρυθμίζουν την παραγωγή των MMP-9 και TIMP-1 και -3 για την προώθηση της διείσδυσης της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Bai SX et al., 2005).

Τα ανθρώπινα έμβρυα παράγουν κολλαγενάση τύπου IV, που δρα κιάλας από το στάδιο των οχτώ κυττάρων (Puistola et al., 1989) και η διείσδυση της κυτοτροφοβλάστης *in vitro* μπορεί να ανασταλεί με TIMP και ένα αντίσωμα για την MMP-9 (Librach et al., 1991). Αυτό, ίσως, υποδεικνύει ότι η MMP-9 παίζει πιο σημαντικό ρόλο από την MMP-2 για τη διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Librach et al., 1991, 1994; Polette et al., 1994; Shimonovitz et al., 1994; Hurskainen et al., 1996; Xu et al., 2000).

Σύμφωνα με τους Shimonovitz et al (1994), η μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης της ανθρώπινης τροφοβλάστης κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης σε

σύγκριση με το τρίτο τρίμηνο, οφείλεται στη μεγαλύτερη έκφραση των MMP-2 και MMP-9.

Οι Harvey et al (1995), Reponen et al (1995), Alexander et al (1996) και Leco et al (1996) υποστήριξαν, ότι η MMP-9 είναι η κύρια πρωτεάση της τροφοβλάστης, η οποία συμμετέχει στην εμφύτευση στα ποντίκια, και ότι η TIMP-3 εκφράζεται μητρικά για να ρυθμίσει το βαθμό της εμβρυϊκής διείσδυσης.

Συγκεκριμένα, την 6^η και 7^η εβδομάδα της κύησης η έκκριση της MMP-9 στον πλακούντα είναι πολύ χαμηλή, αλλά αυξάνεται σταδιακά μετά την 8^η εβδομάδα, και την 11^η εβδομάδα τα κύτταρα παράγουν μεγάλη ποσότητα MMP-9. Αντίθετα, η βιοσύνθεση της MMP-2 είναι σημαντικά υψηλότερη στα πρώτα στάδια της κύησης. Η MMP-2 έχει προταθεί ως ο κύριος ρυθμιστής της διείσδυσης της τροφοβλάστης στα αρχικά στάδια κύησης. Από την 6^η μέχρι την 8^η εβδομάδα κύησης, τα επίπεδα MMP-2 είναι υψηλότερα από αυτά της MMP-9 στην τροφοβλάστη (Nissi R et al., 2013).

Οι MMP-2, -9 και -14, καθώς και οι TIMP-1, -2 και -3 παράγονται από κύτταρα της λαχνικής κυτοτροφοβλάστης στη σαλπινγική εξωμήτρια κύηση και παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα έκφρασης με αυτά σε μια φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (Bai SX et al., 2005).

Εκτός από τις μεταλλοπρωτεάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) έχουν βρεθεί και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα άλλων οικογενειών μεταλλοπρωτεασών, όπως είναι οι ADAMs και οι ADAMTSs, των οποίων οι λειτουργίες συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.

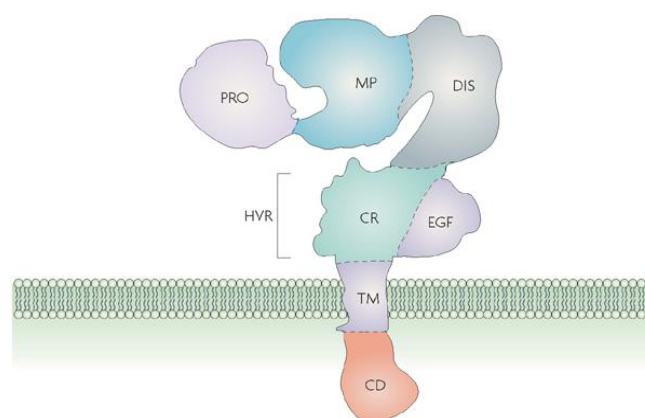
B4.2. Μεταλλοπρωτεάσες ντισιντεγκρίνης (ADAMs)

Οι ADAMs αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών με πολλές επικράτειες και λειτουργίες που εξαρτώνται από ένα κατιόν ψευδαργύρου και φαίνεται να συμμετέχουν στην πρωτεόλυση, την προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων (Michael J Duffy et al., 2011; Angela X Zhou et al., 2013; Erin K Nyren-Erickson et al., 2013).

Η οικογένεια αυτή είναι συμπληρωματική των MMPs, όσον αφορά στην εξωκυτταρική λειτουργία (Gillian Murphy, 2010).

Οι πρωτεΐνες ADAMs είναι μονοτοπικές διαμεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες που περιέχουν μια επικράτεια ντισιντεγκρίνης (Dominique Alfandari et al., 2009)

(Εικόνα 5). Ο όρος ‘ντισιντεγκρίνη’ στις ADAMs αναφέρεται στη ρήξη της σύνδεσης της ιντεγκρίνης μέσω της επικράτειας ντισιντεγκρίνης (Gould et al., 1990).



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 5: Απεικόνιση πρωτεΐνης ADAM
(*Nature Reviews Cancer* 2008; 8:932-941)

Το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών ADAMs εντοπίζεται σε μια περιοχή κοντά στον πυρήνα και σε κάποιες περιπτώσεις, συνεντοπίζονται με δείκτες Golgi (Lum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Hougaard et al., 2000; Schlondorff et al., 2000; Kang et al., 2002). Ωστόσο, οι ADAMs μπορούν να εντοπιστούν και στην κυτταρική επιφάνεια. Σε πολλές περιπτώσεις (ADAMs 9, 10, 15, 17 και 28), η μορφή πρωτεΐνης της κυτταρικής επιφάνειας είναι επεξεργασμένη και επομένως, καταλυτικά ενεργή (Black et al., 1997; Lum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Roghani et al., 1999; Howard et al., 2000; Schlondorff et al., 2000). Αν και εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη, έχουν περιγραφεί και διαλυτές μορφές για κάποιες ADAMs (Michael J Duffy et al., 2011). Οι ADAMs εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (Dominique Alfandari et al., 2009).

Οι ADAMs ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως νέες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σπέρματος τύπου I, ομόλογες με συνδέτες ιντεγκρίνης του δηλητηριού των φιδιών και έπαιζαν λειτουργικό ρόλο κατά τη σύντηξη ωαρίου και σπερματοζωαρίου στα ινδικά χοιρίδια (Blobel et al., 1992; Dominique Alfandari et al., 2009).

Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 40 μέλη της οικογένειας ADAMs στο γονιδίωμα των θηλαστικών (Puate & Lopez-Otin, 2004; Edwards et al., 2008), εκ των οποίων τα 37 εκφράζονται στο ποντίκι. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 23 ADAMs,

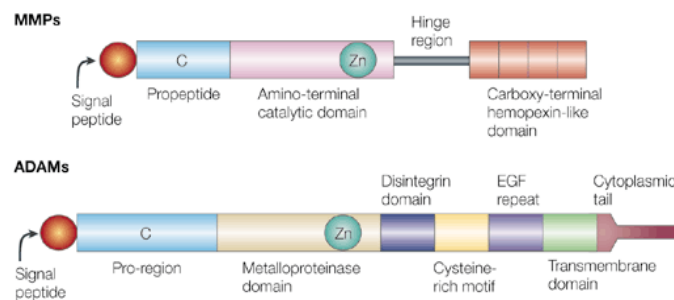
οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας με πολλές επικράτειες (Angela X Zhou et al., 2013). Επίσης, έχουν περιγραφεί, τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο, κωδικές αλληλουχίες χωρίς ιντρόνια που πιθανόν αντιπροσωπεύουν ψευδογονίδια (όπως για παράδειγμα η ανθρώπινη ADAMSP και η ADAM-6). Η έκφραση των ADAMs ή πρωτεϊνών συγγενικών προς τις ADAMs έχει περιγραφεί επίσης σε πολλά διαφορετικά είδη σπονδυλωτών και ασπονδύλων, συμπεριλαμβανομένων του *Schizosaccharomyces pombe*, του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*, του βατράχου *Xenopus laevis*, του ψαριού *Danio cerio* και της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster* (Alfandari et al., 1997; Nakamura et al., 2004; Huxley-Jones et al., 2007; Iida et al., 2010).

B4.2.1. Δομή των ADAMs

Η γενική δομή μιας πρωτεΐνης ADAM συνίσταται από οχτώ διακριτές επικράτειες ή περιοχές. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, μια τυπική ADAM πρωτεΐνη διαθέτει:

- i. ένα πεπτίδιο-σήμα που μαρκάρει την πρωτεΐνη για το εκκριτικό μονοπάτι.
- ii. μια προ-επικράτεια που βοηθά, ώστε να αναδιπλωθεί καταλλήλως η πρωτεΐνη και να αποτρέψει την ενζυμική δράση της επικράτειας της μεταλλοπρωτεάσης (με ένα μηχανισμό-διακόπτη κυστεΐνης) μέχρι την πέψη στη συσκευή Golgi από μια μετατραπάση προ-πρωτεΐνης, ή με αυτοκατάλυση.
- iii. μια επικράτεια μεταλλοπρωτεάσης που μπορεί ή όχι, να διαθέτει πρωτεολυτική δράση. Η παρουσία της κοινώς αποδεκτής αλληλουχίας HEXGHXXGXXHD μέσα στην επικράτεια αυτή, έχει συσχετιστεί με δράση πρωτεάσης και βρίσκεται σε περίπου 50% των πρωτεϊνών ADAMs (Erin K Nyren-Erickson et al., 2013).
- iv. μια συντηρημένη, σε μεγάλο βαθμό, επικράτεια ντισιντεγκρίνης που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και στη σύνδεση των ADAMs με μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως οι ιντεγκρίνες και με πρωτεογλυκάνες, όπως οι συνδεκάνες. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών προσκόλλησης που συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και σηματοδότηση (Dominique Alfandari et al., 2009; Erin K Nyren-Erickson et al., 2013).

- v. μια επικράτεια πλούσια σε κυστεΐνη που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της καταλυτικής δράσης και την αναγνώριση του υποστρώματος (Milla et al., 1999; Smith et al., 2002; Janes et al., 2009). Έχει προταθεί, ότι η εξωκυττάρια δομή μεταλλοπρωτεάσης/ντισιντεγκρίνης/πλούσια σε κυστεΐνη παρουσιάζεται ως ένα μόριο σχήματος C, όπου μέρος της πλούσιας σε κυστεΐνη επικράτειας βρίσκεται σε στενή επαφή με την καταλυτική περιοχή της επικράτειας της μεταλλοπρωτεάσης. Αυτή η περιοχή φαίνεται να είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης του υποστρώματος ή για τη ρύθμιση της πρωτεολυτικής δράσης (Takeda et al., 2006).
- vi. μια επικράτεια που μοιάζει με αυτή του EGF, η οποία απουσιάζει εμφανώς στις ADAM-10 και -17 και θεωρείται ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της σύνδεσης του υποστρώματος στην πλούσια σε κυστεΐνη επικράτεια, καθώς και σε πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας (Zolkiewska, 1999; Iba et al., 2000; Janes et al., 2005; Erin K Nyren-Erickson et al., 2013).
- vii. μια διαμεμβρανική περιοχή.
- viii. μια κυτταροπλασματική επικράτεια που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν την επικράτεια ομολογίας Src, και η οποία αποτελεί το πιο ποικιλόμορφο τμήμα του μορίου και, σε μερικές ADAMs, ελέγχει τη λειτουργία και την υποκυτταρική τοποθέτησή τους (Dominique Alfandari et al., 2009; Erin K Nyren-Erickson et al., 2013) (Εικόνα 6).



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 6: Απεικόνιση δομής των ADAMs σε σύγκριση με τις MMPs

(*Nature Reviews Neuroscience 2001; 2:502-511*)

Οι ADAMs συντίθενται ως πρόιμες, ενζυματικά ανενεργές μορφές πρωτεϊνών. Όπως συμβαίνει και με τις MMPs, αυτή η ανενεργή κατάσταση των περισσότερων ADAMs οφείλεται στην αλληλεπίδραση ενός καταλοίπου κυστεΐνης στην προ-επικράτεια με το ιόν ψευδαργύρου στην καταλυτική περιοχή. Για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, αυτή η προ-επικράτεια απομακρύνεται από μια μετατραπάση που μοιάζει με φουρίνη, ή με αυτοκατάλυση, αναλόγως με τη συγκεκριμένη ADAM. Μόνο 13 ADAMs είναι πρωτεολυτικά ενεργές. Αυτές που παρουσιάζουν πρωτεολυτική δράση περιλαμβάνουν τις ADAM-9, -10, -12, -15, -17, -19, -28 και -33 (Michael J Duffy et al, 2011).

Τα υποστρώματα των μεταλλοπρωτεασών ADAMs περιλαμβάνουν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, χημοκίνες και τους υποδοχείς τους, παράγοντες διαφοροποίησης, καθώς και υποδοχείς και συνδέτες των μορίων μεταγωγής σήματος (Dominique Alfandari et al, 2009; Silvio Weber & Paul Saftig, 2012).

B4.2.2. Λειτουργίες και έκφραση των ADAMs

Οι λειτουργίες των ADAMs είναι βασικές για πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος από το κύτταρο προς το περιβάλλον του και αντιστρόφως, καθώς και γενικά στη διατήρηση της λειτουργίας του κυττάρου (Edwards et al., 2008).

Η ικανότητα των ADAMs να αλληλεπιδρούν με ιντεγκρίνες, συνδεκάνες και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι ένδειξη του ότι οι ADAMs θα μπορούσαν να παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Επίσης, η πρωτεόλυση συνδετών (όπως ο TNF-α) από τις ADAMs, καθώς και συγγενών υποδοχέων (όπως οι TNF-α υποδοχείς) είναι ενδεικτική του σημαντικού ρόλου που μπορεί να παίζουν οι ADAMs στη ρύθμιση των εξωκυτταρικών γεγονότων μεταγωγής σήματος (Judith M White, 2003).

Μια βασική λειτουργία των ενεργών μορφών μιας μεταλλοπρωτεάσης των ADAMs αποτελεί η πρωτεόλυση ολόκληρης της εξωεπικράτειας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται με τον όρο 'shedding'. Μέσω αυτής της διαδικασίας απελευθερώνονται διαλυτές και εν μέρει λειτουργικά ακέραιες μορφές της εξωεπικράτειας της πρωτεΐνης, που σχετίζεται με τη μεμβράνη (Edwards et al., 2008).

Η πρωτεόλυση της εξωεπικράτειας είναι μια διαδικασία που πρωταρχικά επηρεάζει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και τύπου II, αν και οι GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης έχουν επίσης αναφερθεί ως στόχοι για πρωτεόλυση της επιφάνειας (Vincent et al., 2001). Ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο αν και οι πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν υποστρώματα για τις ADAMs. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρωτεόλυση της εξωεπικράτειας οδηγεί στη ρύθμιση της πρωτεολυτικής δράσης στα ίδια ή σε γειτονικά κύτταρα, είτε μέσω μειορύθμισης των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, είτε μέσω αυξημένης απελευθέρωσης διαλυτών συνδέτων, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF- α) ή συνδέτες του υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) (Blobel, 2005; Edwards et al., 2008; Reiss & Saftig, 2009).

Η ικανότητα μιας πρωτεΐνης ADAM να απελευθερώνει ένα υπόστρωμα μπορεί να ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης ή με τη σύνδεση βοηθητικών πρωτεϊνών στις κυτταροπλασματικές περιοχές των ADAMs.

Αλλαγές στην κυτταροπλασματική περιοχή μιας ADAM είναι δυνατό να επηρεάσουν την έκφραση της πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια, τον εντοπισμό της σε μια συγκεκριμένη μεμβρανική επικράτεια, τη σχέση της με άλλες πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, τη σταθερότητά της ή την ικανότητά της να λύει συγκεκριμένα υποστρώματα, ως απόκριση σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα. Ορισμένες ADAMs μπορεί να υφίστανται ως εκκρινόμενες πρωτεΐνες, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος ή αυτοπρωτεόλυσης. Αν και οι εκκρινόμενες ADAMs έχουν πρωτεολυτική δράση, τα υποστρώματα που λύνουν μπορεί να διαφέρουν από εκείνα, τα οποία λύνουν οι ομόλογές τους πρωτεΐνες ADAMs που βρίσκονται 'αγκυροβολημένες' στη μεμβράνη (Judith M White, 2003).

Μέλη της οικογένειας ADAMs συμμετέχουν στη διαδικασία της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική εξειδίκευση, την κυτταρική μετανάστευση, την επιμήκυνση του άξονα και τη μορφογένεση των οργάνων και των άκρων (Dominique Alfandari et al., 2009). Επίσης, παίζουν ρόλο στην αναδιαμόρφωση ή επεξεργασία των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης σε αναπτυξιακές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της γονιμοποίησης, της μυογένεσης, της νευρογένεσης, της λιπογένεσης και της μετανάστευσης της νευρικής ακρολοφίας, ρυθμίζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου και θεμέλιας ουσίας, καθώς και τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, τη μεταγωγή

σήματος από τον υποδοχέα στον προσδέτη ή την απομάκρυνσή τους (Becherer & Blobel, 2003).

Οι ADAMs εμπλέκονται και σε ασθένειες, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος του Crohn, ο διαβήτης, το Alzheimer's, η καρδιακή υπερτροφία, ο καρκίνος και μικροβιακές λοιμώξεις (Judith M White, 2003).

Στα θηλαστικά, πολλές από τις ADAMs (ADAM-2, -7, -18, -20, -21, -29 και -30) εκφράζονται αποκλειστικά ή κυρίως στον όρχι και σε δομές που σχετίζονται με τον όρχι. Άλλα μέλη της οικογένειας ADAMs (ADAM-8, -9, -10, -11, -12, -15, -17, -19, -22, -23, -28 και -33) παρουσιάζουν μεγαλύτερη σωματική διασπορά (Darren F Seals & Sara A Courtneidge, 2003).

B4.2.3. ADAM12

Η ADAM12 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελεί πρωτεολυτικό μέλος της οικογένειας ADAMs (Jiexia Jang et al., 2014). Έχει δύο μορφές, ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος: μια μορφή συνδεδεμένη με τη μεμβράνη (ADAM12-L), η οποία διαθέτει όλες τις επικράτειες των ADAMs, συμπεριλαμβανομένων της διαμεμβρανικής και της κυτταροπλασματικής περιοχής, και μια εκκρινόμενη μορφή (ADAM12-S), η οποία δε διαθέτει τις προαναφερθείσες περιοχές (Erin K Nyren-Erickson et al., 2013). Και οι δύο μορφές, ADAM12-L και ADAM12-S, επεξεργάζονται πρωτεολυτικά και οι ώριμες μορφές τους μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και στον εξωκυττάριο χώρο, αντίστοιχα (Young Mi Kim et al., 2012).

Η ADAM12 περιγράφηκε αρχικά στα ποντίκια, όπου συμμετείχε στην κυτταρική σύντηξη *in vitro* (Yagami-Hiromasa et al., 1995). Εκφράζεται κυρίως σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από κυτταρική σύντηξη ή αύξηση και επιδιόρθωση, όπως είναι ο χόνδρος, τα οστά, ο μυϊκός ιστός, ο λιπώδης ιστός, ο ηπατικός, ο ενδομήτριος και ο εγκεφαλικός ιστός (Erin K Nyren-Erickson et al., 2013). Η ADAM12 εκφράζεται πρωταρχικά στους σκελετικούς μύες, όπου θεωρείται ότι προάγει τη διαφοροποίηση και τη σύντηξη των μυοβλαστών. Επίσης, εντοπίζεται στον πλακούντα με την εκκρινόμενη μορφή της (ADAM12-S) και η έκφρασή της αυξάνεται δραματικά σε κυτταρικές σειρές πολλών όγκων (Yi Cao et al., 2001).

Γονιδιακές αναλύσεις ανθρώπινων όγκων ταυτοποίησαν την ADAM12, ως ένα νέο υποψήφιο καρκινικό γονίδιο (Sjoblom et al., 2006) και θεωρείται πλέον ως ένας

προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Roy et al., 2004; Fröhlich et al., 2006) και τον καρκίνο του μαστού (Pories et al., 2008; Narita et al., 2010). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ADAM12 ρυθμίζει την εξέλιξη του όγκου σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια-μοντέλα (Kveiborg et al., 2005; Peduto et al., 2006).

Εκτός του καρκίνου, η ADAM12 έχει εμπλακεί και σε άλλες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των μυοσκελετικών και νευρολογικών διαταραχών (Angela X Zhou et al., 2013).

Σε μοντέλα ποντικών, η υπερέκφραση του *adam12* γονιδίου φαίνεται ότι δεν επιβαρύνει την παθολογία της μυϊκής δυστροφίας, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει τη συμμετοχή του στη μυϊκή αναγέννηση.

Επιπλέον, η δημιουργία λιπώδους ιστού με αυξορύθμιση του γονιδίου, σε ποντίκια με υπερέκφραση του *adam12* και μικρές ανωμαλίες στο καφέ λίπος και στη δημιουργία του προσκείμενου μυός σε κάποια ποντίκια *adam12^{-/-}*, μπορεί να είναι ενδεικτικά μιας ρυθμιστικής λειτουργίας της ADAM12 στην ανάπτυξη των μυών και του λιπώδους ιστού. Η έλλειψη προφανούς παθολογικού φαινοτύπου στα ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη των λειτουργικών ADAM9, ADAM12 ή ADAM15, θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει κάποια πιθανή αλληλοεπικάλυψη λειτουργίας με άλλες πρωτεάσες (πιθανώς ADAMs) (Ari-Pekka J Huovila et al., 2005).

B4.2.4. ADAM12 και κύηση

Στον πλακούντα των θηλαστικών εκφράζεται η εκκρινόμενη μορφή της ADAM12, η ADAM12-S, και δυνητικά προκαλεί τη μυογένεση, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου και εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος της μητέρας από τις αρχές του πρώτου τριμήνου (Gilpin et al., 1998; Ito et al., 2003; Laigaard et al., 2003; Mary E Rausch et al., 2011). Η συγκέντρωση της ADAM12 αυξάνεται με την ηλικία κύησης στον ορό του αίματος της μητέρας (Laigaard et al, 2003) και δεν ανιχνεύεται στον ορό του αίματος γυναικών που δεν κυοφορούν (Gilpin et al., 1998; Shi et al., 2000).

Σε πλακούντες πρώτου τριμήνου, η ADAM12 εντοπίζεται στις κυτοτροφοβλάστες, καθώς και στην κορυφαία πλευρά των συγκυτιοτροφοβλαστών. Δεδομένου του σημείου εντοπισμού της και του ρόλου που παίζει στην κυτταρική σύντηξη σε άλλους ιστούς, έχει θεωρηθεί ότι συμβάλλει στη σύντηξη του συγκυτίου στην τροφοβλάστη, γεγονός κρίσιμο για τη διατήρηση μιας υγιούς εγκυμοσύνης (Hans-

Gert Bernstein et al., 2010; Mary E Rausch et al., 2011). Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα καθ'όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και είναι σημαντική για τη διατήρηση του στρώματος της συγκυτιοτροφοβλάστης, το οποίο αποτελεί το άμεσο όριο μεταξύ της μητρικής κυκλοφορίας και των εμβρυϊκών ιστών.

Πρόσφατα στοιχεία επίσης δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική συμμετοχή της ADAM12 στην προώθηση της φθαρτοποίησης της μήτρας, η οποία χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος και τη διαφοροποίησή τους σε εξειδικευμένα, φθαρτοποιημένα κύτταρα που περιβάλλουν την εμφυτευόμενη βλαστοκύστη. Η σωστή φθαρτοποίηση είναι ακόμα μία απαραίτητη προϋπόθεση για μια υγιή εγκυμοσύνη (Hans-Gert Bernstein et al., 2010).

Η ADAM12 λειτουργεί και ως ρυθμιστής των επιπέδων IGF. Το σύστημα IGF είναι κρίσιμο για την εμβρυϊκή αύξηση και ανάπτυξη (Dechiara, Efstratiadis & Robertson, 1990; Dechiara, Robertson & Efstratiadis, 1991; Hans-Gert Bernstein et al., 2010). Η ADAM12-S μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αύξηση των επιπέδων του IGF στην κυκλοφορία κατά την κύηση, μέσω πρωτεόλυσης της IGFBP (Laurson et al., 2001; Rivera & Fortune, 2003).

Επίσης, η ADAM12 πρωτεολύει την αμινοπεπτιδάση λευκίνης του πλακούντα, ένα ένζυμο που εμπλέκεται σημαντικά στην πρόκληση τοκετού και επομένως, πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο και σε πρόωρους τοκετούς (Hans-Gert Bernstein et al., 2010).

Η ADAM12 έχει μελετηθεί ως ένας δείκτης πρώτου τριμήνου για την πρόβλεψη εμβρύων με μέγεθος που δεν αντιστοιχεί στην ηλικία κύησης, ανευπλοειδίας (Τρισωμία-18 και Τρισωμία-21) και προεκλαμψίας. Και στις τρεις αυτές περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις της ADAM12 στη μητρική κυκλοφορία είναι σημαντικά χαμηλότερες (Laigaard et al., 2003, 2005a,b, 2006; Laigaard, Cuckle, Weber & Christiansen, 2006; Mary E Rausch et al, 2011).

Σε εξωμήτριες κήσεις εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακουντιακό ιστό και υποτίθεται ότι συμμετέχει στον έλεγχο της αύξησης και ανάπτυξης του πλακούντα και του εμβρύου. Ως βιοδείκτης για κήσεις με δυσμενή κατάληξη στα αρχικά στάδια, η ADAM12 βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος της μητέρας, συμπεριλαμβανομένων των περιπτώσεων της εξωμήτριας κήσης (Jiexia Jang et al., 2014).

B4.3. Μεταλλοπρωτεάσες ντισιντεγκρίνης με μοτίβο θρομβοσποντίνης (ADAMTSs)

Η οικογένεια ADAMTSs περιλαμβάνει 19 μέλη, τα οποία αποτελούν μεταλλοπρωτεάσες ADAMs με ένα ή περισσότερα μοτίβα θρομβοσποντίνης τύπου I, και οι οποίες δε διαθέτουν διαμεμβρανική επικράτεια, σε αντίθεση με τις ADAMs μεταλλοπρωτεάσες (Apte, 2009; Gillian Murphy, 2010; Takayuki Shiomi et al., 2010). Η πέψη αυτών των μοτίβων, τα οποία θεωρείται ότι συνάπτονται στην κυτταρική μεμβράνη, ρυθμίζει την πρωτεολυτική δράση και τον εντοπισμό του ενζύμου (Takayuki Shiomi et al., 2010) και γίνεται εντός της διαχωριστικής περιοχής των ADAMTSs γενικά. Στην περίπτωση της ADAMTS-12 συμβαίνει στην επικράτεια της μυκίνης (Vazquez F et al., 1999; Rodriguez-Manzaneque JC et al., 2000; Gao G et al., 2002; Flannery CR et al., 2002; Luque A et al., 2003; Gao G et al., 2004).

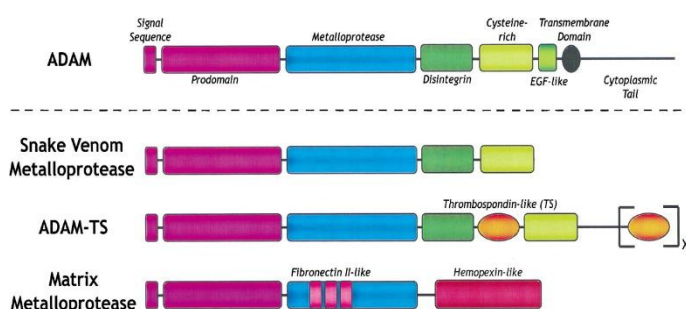
B4.3.1. Δομή των ADAMTSs

Η μοριακή δομή των ADAMTS πρωτεϊνών μπορεί να υποκατηγοριοποιηθεί σε επικράτειες, περιοχές και μοτίβα. Μπορούν να δημιουργηθούν πολλές ισομορφές των ADAMTSs μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Γενικά, υπάρχει περισσότερη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών στο καρβοξυτελικό άκρο απ' ό,τι στο αμινοτελικό άκρο.

Όλες οι ADAMTSs συντίθενται αρχικά ως ανενεργά προ-ένζυμα. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, καθεμιά από αυτές αποτελείται από:

- i. ένα πεπτίδιο-σήμα.
- ii. μια προ-επικράτεια.
- iii. μια καταλυτική επικράτεια μεταλλοπρωτεάσης με ένα μοτίβο τύπου ρεπρολυσίνης που συνδέεται με ψευδάργυρο, το HEXXHXXG/N/SXXHD (όπου το 'X' αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε κατάλοιπο αμινοξέος, 'D', διαφοροποιούν τις ADAMTSs από άλλες μεταλλοπρωτεάσες), και με ένα κατάλοιπο μεθειονίνης εντός της ακολουθίας V/IMA/S, αμέσως μετά την τρίτη ιστιδίνη που συνδέεται με ψευδάργυρο.
- iv. μια επικράτεια ντισιντεγκρίνης, η οποία παρουσιάζει ομοιότητα, όσον αφορά στην αλληλουχία, με τις διαλυτές ντισιντεγκρίνης του δηλητηρίου των φιδιών.

- v. μια κεντρική επανάληψη θρομβοσποντίνης τύπου I.
- vi. μια πλούσια σε κυστεΐνη επικράτεια με μεγάλη ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των ADAMTSs, η οποία περιλαμβάνει 10 συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης.
- vii. μια διαχωριστική περιοχή ποικίλου μήκους χωρίς διακριτά δομικά χαρακτηριστικά.
- viii. διαφορετικού αριθμού επαναλήψεις TS στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι επικράτειες εντός της περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου των ADAMTSs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με θειϊκές γλυκοσαμινογλυκάνες και οι βοηθητικές καρβοξυτελικές επικράτειες έχουν μεγάλη επίδραση στην εξειδίκευση του υποστρώματος, αλλά και στην τοπολογία των ενζύμων (Perutelli P, 1995; Judith M White, 2003; Llamazares M et al., 2003; Somerville RP Longpre et al., 2003) (Εικόνα 7).



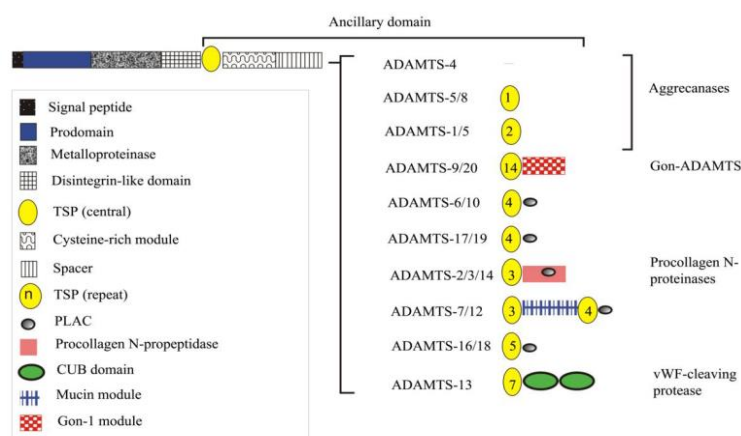
Εικόνα 7: Απεικόνιση δομής των ADAMTSs σε σύγκριση με τις MMPs και τις ADAMs

(*Genes & Dev* 2003; 17:7-30)

Οι ADAMTS-2, -3, -6, -7, -10, -12, -14, -16 -17, -18 και -19 διαθέτουν όλες μια επικράτεια πρωτεάσης και λακουίνης (PLAC) (Apte, 2009), η οποία περιγράφηκε αρχικά ως καρβοξυτελική επικράτεια με άγνωστη λειτουργία της πρωτεΐνης λακουίνης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αυτή η επικράτεια PLAC συσχετίστηκε με την αναδιαμόρφωση του επιθηλίου στα έμβρυα και την ανάπτυξη της νυχτοπεταλούδας *Manduca sexta* (Nardi JB et al., 1999; Cal S et al., 2001; Engle JM et al., 2001).

B4.3.2. Λειτουργίες και έκφραση των ADAMTSs

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ADAMTS διαιρούνται σε διάφορους υποτύπους, σύμφωνα με τις δράσεις τους στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Μερικοί από αυτούς τους υποτύπους των ADAMTSs χωρίζονται περαιτέρω σε υποομάδες με βάση την ύπαρξη επιπλέον καρβοξυτελικών περιοχών ή την αναγνώριση κοινών υποστρωμάτων (Alexander G Beristain et al., 2011; Kadir Demircan et al., 2014) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση δομής όλων των ADAMTSs

(*JBC* 2009; 284 (46))

Οι ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 και -18 θεωρείται ότι πέπτουν συγκεκριμένους δεσμούς Glu-X της πρωτεΐνης αγγρεκάνης, η οποία αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Έτσι, οι παραπάνω πρωτεΐνες ονομάζονται αγγρεκανάσες (Takayuki Shiomi et al., 2010; Kadir Demircan et al., 2014).

Οι ADAMTS-1, -4 και -5 αποδομούν την μπρεβικάνη και τη βερσικάνη, που αποτελούν άλλα δομικά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Richards JS et al., 2005). Η βερσικάνη βοηθά την υαλουρονάνη, η οποία είναι βασικό στοιχείο της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, να σταθεροποιήσει τη θεμέλια ουσία (Brown HM et al., 2010).

Οι ADAMTS-5 και -6 εκφράζονται ειδικά στον πλακούντα και θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφύτευση (Kim J et al., 2005).

Οι ADAMTS-7 και -12 αποδομούν την ολιγομερική πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας του χόνδρου (COMP), η οποία αποτελεί μια απαραίτητη γλυκοπρωτεΐνη στη θεμέλια ουσία του χόνδρου (Liu CJ, 2009).

Η ADAMTS-10 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ιστών του δέρματος και του φακού (Dagoneau N et al., 2004).

Η ADAMTS-13, γνωστή και ως von Willebrand πεπτιδάση, επιδρά στην πήξη, αποτρέποντας τη δημιουργία θρόμβου, και στην ομοιοστάση (Ohnishi J et al., 2005).

Η ADAMTS-16 αποδομεί την α -2 μακρογλομπουλίνη στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

Η ADAMTS-17 εμπλέκεται στην απόπτωση που προκαλείται από οιστρογόνα στα καρκινικά κύτταρα (Jia Z et al., 2014).

Οι ADAMTS-9 και -20 είναι γνωστές ως Gon-ADAMTSs (Somerville RP et al., 2003).

Οι ADAMTS-10 και -19 λέγονται και ορφανές πρωτεάσες ADAMTSs (Demircan K et al., 2013).

Η έκφραση του mRNA των ADAMTSs φαίνεται να λαμβάνει χώρα σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ενήλικων ιστών. Ωστόσο, σε εμβρυϊκούς ιστούς η έκφρασή τους είναι γενικά πιο περιορισμένη (Porter S et al., 2005).

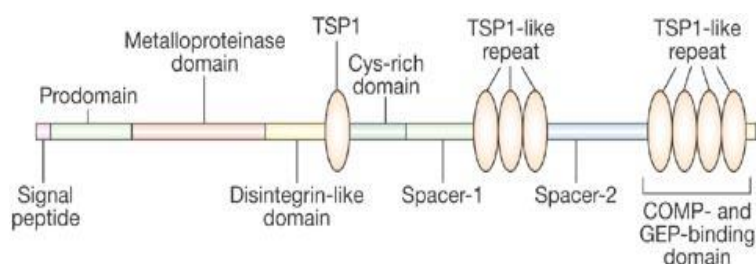
Επομένως, οι πρωτεΐνες ADAMTSs σχετίζονται με πολλές σημαντικές για τη φυσιολογία διαδικασίες στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, και διακριτοί υπότυποί τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη των ιστών και στην εμφάνιση και εξέλιξη εκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου (Porter S et al., 2004,2006; Held-Feindt J et al., 2006), της αρθρίτιδας (Nagase H et al., 2003), του Alzheimer's και μιας σειράς φλεγμονωδών και θρομβωτικών ασθενειών (Kuno K et al., 1997; Levy GG et al., 2001; Alexander G Beristain et al., 2011; Kadir Demircan et al., 2014).

Η ρύθμιση αρκετών γονιδίων των πρωτεϊνών ADAMTS πραγματοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και κυτοκίνες φλεγμονώδους αντίδρασης. Ο TGF- β προάγει την έκφραση του γονιδίου της ADAMTS-12 σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες στον άνθρωπο (Cal S et al., 2001).

B4.3.3. ADAMTS-12

Το γονίδιο της πρωτεΐνης ADAMTS-12 εντοπίζεται στην τελομερική περιοχή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5 (5q35).

Ο αριθμός και η οργάνωση των επαναλήψεων θρομβοσποντίνης είναι μοναδικά στην ADAMTS-12, η οποία διαθέτει συνολικά οχτώ επαναλήψεις θρομβοσποντίνης οργανωμένες σε τρία τμήματα (Εικόνα 9), ενώ όλες οι υπόλοιπες ανθρώπινες ADAMTS πρωτεΐνες περιλαμβάνουν από μία έως τέσσερις επαναλήψεις οργανωμένες σε ένα ή δύο τμήματα.



Εικόνα 9: Απεικόνιση δομής της ADAMTS-12
(*Nature Clinical Practice Rheumatology* 2009; 5:38-45)

Η ADAMTS-12 περιλαμβάνει εν δυνάμει μοτίβα διακόπτη κυστεΐνης και πέψης φουρίνης, τα οποία θα μπορούσαν να εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης αυτού του ενζύμου με απομάκρυνση της ανασταλτικής προ-επικράτειας, ενώ η επεξεργασία της καρβοξυτελικής επικράτειας εξαρτάται και από μια επιπλέον μεταλλοπρωτεάση, εφόσον παρεμποδίζεται από ένα ευρύ φάσμα του αναστολέα υδροξαμάτης BB-94, αλλά όχι από μετάλλαξη του καταλυτικού κέντρου (Cal S et al., 2001).

Εκφράζεται στα ανθρώπινα τροφοβλαστικά κύτταρα και σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία ελέγχουν, εν μέρει τουλάχιστον, τη διαδικασία της διείσδυσης μειορρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση της ADAMTS-12 (Alexander G Beristain et al., 2011).

Η επιγενετική αποσιώπηση της ADAMTS-12 γίνεται μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή σε διάφορα είδη καρκίνου (Moncada-Pazos A et al., 2009). Σε ποντίκια μοντέλα knockout, *adamts-12*^{-/-}, παρουσιάζεται μεγαλύτερη αγγειογενετική απόκριση

και καρκινική διείσδυση (El Hour M et al., 2010). Επιπλέον, αυξημένη έκφραση της ADAMTS-12 παρατηρείται στα κύτταρα στρώματος που περιβάλλουν επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Παρομοίως, σε συγκαλλιέργειες ινοβλαστών του παχέος εντέρου και καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου, η ADAMTS-12 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα συγκρινόμενα με αυτά που θα παρατηρούνταν σε ξεχωριστές καλλιέργειες. Αυτά τα μοτίβα αυξημένης έκφρασης της ADAMTS-12 έχουν συσχετιστεί με μη πολλαπλασιαστικές και μη αγγειογενετικές ιδιότητες σε καρκινικά κύτταρα (Moncada-Pazos A et al., 2009).

B4.3.4. ADAMTS-12 και κύηση

Η ADAMTS-12 εντοπίζεται στον πλακούντα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και σε πρωταρχικές καλλιέργειες εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων, τα οποία πολλαπλασιάζονται από αυτούς τους ιστούς (Alexander G Beristain et al., 2011).

Οι διαφορές στα επίπεδα των mRNAs της ADAMTS-12 στον πλακούντα μπορεί να οφείλονται στις αλλαγές των υποπληθυσμών των κυτταροτροφοβλαστών, οι οποίες συνιστούν αυτό το δυναμικό ιστό κατά τη διάρκεια της κύησης. Συγκεκριμένα, τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα κυριαρχούν κατά το πρώτο τρίμηνο, ενώ στη συνέχεια ο αριθμός των κυττάρων αυτών μειώνεται δραματικά και απουσιάζουν τελείως σε πλακουντιακούς ιστούς τελειόμηνης κύησης (Aplin JD, 1991).

Σε μελέτη των Santiago Cal et al (2001) υποστηρίχθηκε ότι παράγοντες, όπως οι TGF- α , IL-1 α , IL-1 β , ο όξινος αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, δεν έχουν εμφανή επίδραση αυξορύθμισης στη μεταγραφή του γονιδίου της ADAMTS-12. Διαφορετικά δεδομένα παρουσιάστηκαν μετά από κάποια χρόνια σε μελέτες, όπου σε δείγματα ιστού από πλακούντα εγκύων γυναικών στο πρώτο τρίμηνο βρέθηκε, ότι η έκφραση της ADAMTS-12 ρυθμίζεται από τα μόρια IL-1 β και TGF- β 1. Ανεξάρτητα από την πρωτεολυτική της δράση, παίζει ρόλο στην προσκόλληση του κυττάρου με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, καθώς και στη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων *in vitro*, μέσω ενός μηχανισμού που ελέγχει την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Alexander G Beristain, 2011; Kadir Demircan et al., 2014).

Τροφοβλαστικά κύτταρα που εκφράζουν την ADAMTS-12, συνδέονται πιο εύκολα στο κολλαγόνο II, στο κολλαγόνο IV και στη βιτρονεκτίνη, και παρουσιάζουν

αυξορύθμιση της έκφρασης των ιντεγκρινών α_v και $\alpha_v\beta_3$ στην κυτταρική τους επιφάνεια. Επιπλέον, αυτή η αυξορύθμιση συσχετίζεται με μια αύξηση στη δράση μεταγωγής σήματος της ιντεγκρίνης και με την κυτταρική διείσδυση. Το κολλαγόνο IV είναι μια πρωτεΐνη της βασικής μεμβράνης, ενώ το κολλαγόνο II αποτελεί ινώδες κολλαγόνο που εντοπίζεται κυρίως σε συνδετικό ιστό χόνδρου και αλληλεπιδρά συνηθέστερα με τις ιντεγκρίνες β_1 ή β_2 (Eyre D, 2004; Kuphal S et al., 2006).

Λόγω της ομοιότητας που υπάρχει μεταξύ των ADAM-12 και ADAMTS-12 όσον αφορά στη δομή και στο ρόλο που διαδραματίζουν κατά την εμφύτευση, είναι πιθανόν τα επίπεδα της συγκέντρωσης της ADAMTS-12 να είναι, ομοίως, εμφανώς χαμηλότερα στον ορό του αίματος μιας γυναίκας που έχει διαγνωστεί με εξωμήτρια ή παλίνδρομη κύηση, σε σχέση με τα αντίστοιχα στην περίπτωση μιας φυσιολογικής κύησης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

A) ο προσδιορισμός των επιπέδων της ADAM12 στον ορό γυναικών με παλίνδρομη ή εξωμήτρια κύηση, και

B) η διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στο εάν η ADAM12 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ακριβή βιολογικό δείκτη για την ανίχνευση εξωμήτριας και παλίνδρομης κύησης σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ1. Γενικά στοιχεία και περιγραφή των τεχνικών ELISA

Η ELISA είναι μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Μπορεί να εφαρμοστεί για την αξιολόγηση είτε της παρουσίας ενός αντιγόνου είτε της παρουσίας ενός αντισώματος σε ένα δείγμα, και επομένως, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αντισωμάτων στον ορό (όπως στην εξέταση HIV). Επίσης, η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων για τον εντοπισμό δυνητικά αλλεργιογόνων τροφών, όπως είναι το γάλα, τα φυστίκια, τα καρύδια, τα αμύγδαλα και τα αυγά. Η ELISA μπορεί να

χρησιμοποιηθεί και στην τοξικολογία ως μια ταχεία προκαταρκτική διάγνωση για ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων και ναρκωτικών.

Οι τεχνικές της ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλώς ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (OD) του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μια πρότυπη καμπύλη, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα.

Η ELISA βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab). Αρχή της μεθόδου είναι ότι το αντιγόνο με το αντίσωμα συνδέονται με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια που περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα.

Παρουσία, λοιπόν, ενός κατάλληλου υποστρώματος, το αντίσωμα που είναι σημασμένο με φθορίζον χρώμα ενεργοποιείται και παράγει ένα συγκεκριμένο χρώμα, και η ένταση του χρώματος αυτού ελέγχεται με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου (Essential Clinical Immunology, 2009).

Υπάρχουν τρεις βασικές τεχνικές που διαμορφώνουν τη βάση για όλες τις ELISA:

- Άμεση ELISA
- Έμμεση ELISA
- Sandwich ELISA

Άμεση ELISA

Η άμεση ELISA θεωρείται ως η απλούστερη μορφή ELISA. Το αντιγόνο διαλύεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), το οποίο συνήθως είναι ένα καρβονικό ή δικαρβονικό διάλυμα υψηλού pH (9.6) ή το PBS. Το βασικό είναι να μην περιλαμβάνονται άλλες πρωτεΐνες στο ρυθμιστικό διάλυμα, οι οποίες μπορεί να ανταγωνίζονται τα αντιγόνα-στόχους ως προς την προσκόλλησή τους στον πυθμένα των πηγαδιών στο 'πίατο' μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων της ELISA. Τα αντιγόνα είναι κυρίως πρωτεϊνικής φύσης και προσκολλώνται παθητικά στον πυθμένα των πηγαδιών κατά τη διάρκεια της επώασης. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της επώασης δεν είναι τόσο κρίσιμα, αλλά είναι πολύ σημαντική η τυποποίηση των συνθηκών, και επομένως, ευνοείται η χρήση επωαστών στους 37°C. Μετά την επώαση, οποιαδήποτε

πλεονάζουσα ποσότητα αντιγόνου απομακρύνεται με ένα απλό ξέπλυμα, γεμίζοντας τα πηγάδια με ένα ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα (όπως PBS) και αδειάζοντάς τα αμέσως μετά. Στη συνέχεια προστίθενται σημασμένα αντισώματα, τα οποία κατευθύνονται ειδικά προς αντιγονικές περιοχές εντός των πηγαδιών. Τα σημασμένα αντισώματα διαλύονται μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιλαμβάνει κάποια ουσία, η οποία αναστέλλει την παθητική προσρόφηση της πρωτεΐνης, αλλά επιτρέπει παράλληλα την ανοσολογική σύνδεση. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι άλλες πρωτεΐνες που προστίθενται σε υψηλή συγκέντρωση, ώστε να ανταγωνίζονται για τις ίδιες θέσεις στα πηγάδια με την πρωτεΐνη-αντίσωμα, ή είναι απορρυπαντικές ουσίες σε χαμηλή συγκέντρωση, που ορίζονται ως παράγοντες αποκλεισμού, και τα ρυθμιστικά διαλύματα που βοηθούν να δημιουργηθούν, τα οποία ορίζονται ως ρυθμιστικά διαλύματα αποκλεισμού. Κατά την επώαση, τα αντισώματα συνδέονται στο αντιγόνο. Ακολουθεί απλό ξέπλυμα πάλι για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων αντισωμάτων. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα κατάλληλο υπόστρωμα ή συνδυασμός υποστρώματος/χρωμογόνου για το συγκεκριμένο ένζυμο που είναι συνδεδεμένο στα αντισώματα. Στόχος είναι να επιτραπεί μια χρωματική αντίδραση μέσω ενζυμικής κατάλυσης. Η αντίδραση αυτή συνεχίζεται για μια καθορισμένη χρονική περίοδο, μετά την οποία η αντίδραση σταματά αλλάζοντας το pH του συστήματος, ή προσθέτοντας ένα ανασταλτικό αντιδραστήριο. Τέλος, το χρώμα ποσοτικοποιείται με τη χρήση ενός σπεκτροφωτομέτρου, το οποίο 'διαβάζει' στο κατάλληλο μήκος κύματος για το χρώμα που παράγεται.

Έμμεση ELISA

Στην έμμεση ELISA τα δύο πρώτα στάδια είναι όμοια με αυτά της άμεσης ELISA. Η διαφορά σε αυτή τη μέθοδο είναι η προσθήκη μη σημασμένων αντισωμάτων, τα οποία διαλύονται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα για να αποφευχθεί η μη ειδική προσκόλληση πρωτεϊνών του αντιορού στα πηγάδια (ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού). Ακολουθεί επώαση και ξέπλυμα για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων αντισωμάτων, ώστε να επιτευχθεί ειδική σύνδεση. Έπειτα, προστίθενται σημασμένα, αντιειδικά αντισώματα, διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού, και ακολουθεί πάλι επώαση και ξέπλυμα, ώστε να γίνει σύνδεση των σημασμένων αντισωμάτων. Μετά προστίθεται υπόστρωμα/ χρωμοφόρο στο συνδεδεμένο αντίσωμα και εμφανίζεται χρώμα, το οποίο στη συνέχεια 'διαβάζεται' με τη χρήση

σπεκτροφωτομέτρου. Επομένως, η έμμεση ELISA είναι παρόμοια με την άμεση ELISA όσον αφορά στο ότι το αντιγόνο προσκολλάται απ'ευθείας στον πυθμένα του πηγαδιού και στοχεύεται από αντισώματα, τα οποία προστίθενται στη συνέχεια. Ωστόσο, αυτά τα αντισώματα που προστίθενται δεν είναι σημασμένα με ένζυμο, αλλά στοχεύονται τα ίδια από άλλα αντισώματα που συνδέονται με το ένζυμο.

Sandwich ELISA

Η άμεση sandwich ELISA περιλαμβάνει την παθητική προσκόλληση των αντισωμάτων στον πυθμένα του πηγαδιού. Σε αυτά τα αντισώματα συνδέονται αντιγόνα που προστίθενται στη συνέχεια. Τα αντιγόνα διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού για την αποφυγή μη ειδικής σύνδεσής τους στο πηγάδι. Τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος αποκλεισμού δεν πρέπει να περιέχουν αντιγόνα που θα μπορούσαν να συνδεθούν στα προσκολλημένα αντισώματα στον πυθμένα του πηγαδιού. Μετά την επώαση και το ξέπλυμα, το σύμπλοκο αντίσωμα-αντιγόνο είναι προσκολλημένο στον πυθμένα του πηγαδιού. Στη συνέχεια, το αντιγόνο του συμπλόκου εντοπίζεται από σημασμένο ειδικό αντίσωμα που προστίθεται, και ακολουθεί επώαση. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα μπορεί να είναι το ίδιο με το αντίσωμα που έχει συνδεθεί αρχικά στον πυθμένα του πηγαδιού, ή και διαφορετικό, όσον αφορά στην πηγή παραγωγής τους (από κάποιο συγκεκριμένο ζώο ή είδος). Μετά την επώαση και το ξέπλυμα προστίθεται ένα υπόστρωμα/χρωμογόνο και παράγεται χρώμα, το οποίο 'διαβάζεται' με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου.

Η έμμεση sandwich ELISA χαρακτηρίζεται από τα ίδια αρχικά στάδια με αυτά της άμεσης sandwich ELISA. Δηλαδή, και σε αυτή τη μέθοδο τα αντισώματα προσκολλώνται παθητικά στον πυθμένα του πηγαδιού και στα αντισώματα συνδέονται αντιγόνα. Ωστόσο, ακολουθεί προσθήκη μη σημασμένων αντισωμάτων. Μετά την επώαση και το ξέπλυμα, τα μη σημασμένα αντισώματα εντοπίζονται από ένα σύμπλοκο αντιειδικών ενζύμων, που προστίθενται και επωάζονται μαζί με τα αντισώματα και τα αντιγόνα στο πηγάδι (Crowther JR, *Methods in Molecular Biology-The ELISA Guidebook*, 2001).

Γ2. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Για το σκοπό της διπλωματικής εργασίας συλλέχθηκαν 48 δείγματα περιφερικού αίματος από γυναίκες σε πρώιμο στάδιο εγκυμοσύνης, οι οποίες προσήλθαν στο Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, είτε λόγω επιπλοκών σε περιπτώσεις παλίνδρομης και εξωμήτριας είτε για διακοπή μιας φυσιολογικής κύησης. Από τα δείγματα αυτά διαχωρίστηκαν όσα αντιστοιχούσαν σε γυναίκες με εξωμήτρια, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση που διεκόπη, στο στάδιο των 6-8 εβδομάδων. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες των 18, 17 και 13 δειγμάτων, οι οποίες αποτελούν τις ομάδες της εξωμήτριας κύησης, της παλίνδρομης κύησης και της διακοπής μιας φυσιολογικής κύησης (control), αντιστοίχως. Επιπλέον κλινικά δεδομένα για τις τρεις αυτές ομάδες αποτέλεσαν οι τιμές της β-χοριακής γοναδοτροφίνης και της προγεστερόνης.

Αρχικά, έπρεπε να διαχωριστεί ο ορός από το πλάσμα, καθώς η μέτρηση των επιπέδων της ADAM12 με τη χρήση ειδικού kit για την πραγματοποίηση της μεθόδου ανοσοφθορισμού ELISA γίνεται στον ορό του αίματος. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρέμειναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξουν. Αμέσως μετά, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 1000 στροφές ανά λεπτό. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε ο ορός κάθε δείγματος και τα δείγματα μοιράστηκαν σε στήλες, που διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση της δοκιμασίας ELISA.

Γ3. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

Για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε kit της εταιρείας R&D Systems, το οποίο επέτρεψε τη μέτρηση των επιπέδων της ανθρώπινης ADAM12 στον ορό του αίματος των δειγμάτων, με τη βοήθεια της ανοσοδοκιμασίας Quantikine ELISA. Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην ποσοτική τεχνική ανοσοφθορισμού sandwich ELISA, οι βασικές αρχές της οποίας περιγράφησαν παραπάνω.

Τα στάδια της δοκιμασίας sandwich ELISA για την ADAM12 αναλυτικά, περιγράφονται στη συνέχεια.

Αρχικά έγινε η απαραίτητη προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων, των δειγμάτων και των συνηθικών εργασίας στο εργαστήριο.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Wash Buffer – προσθέσαμε 20 mL από το Wash Buffer Concentrate σε απεσταγμένο νερό, ώστε να προκύψουν 500 mL Wash Buffer.

Calibrator Diluent RD5-26 (με αραιώση 1:4) – Προσθέσαμε 12.5 mL από το Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate σε 37.5 mL απεσταγμένο νερό, ώστε να προκύψουν 50 mL αραιωμένου Calibrator Diluent RD5-26.

Human ADAM12 Standard – Διαλύσαμε το περιεχόμενο του Human ADAM12 Standard σε 1 mL απεσταγμένο νερό και προέκυψε ένα αρχικό διάλυμα με συγκέντρωση 100 ng/mL. Αναμίξαμε καλά το standard και το αφήσαμε για τουλάχιστον 15 λεπτά στον πάγκο εργασίας, ανακινώντας το απαλά μερικές φορές, πριν τη δημιουργία στηλών.

Μεταφέραμε 900 μ L από το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5-26 (με αραιώση 1:4) σε ένα eppendorf και προσθέσαμε 100 μ L από το αρχικό διάλυμα Human ADAM12 Standard με συγκέντρωση 100 ng/mL, ώστε να προκύψει διάλυμα standard με συγκέντρωση 10 ng/mL (St_1). Στη συνέχεια, προσθέσαμε σε καθένα από τα υπόλοιπα eppendorf 500 μ L από το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5-26. Από το διάλυμα standard με συγκέντρωση 10 ng/mL μεταφέραμε 500 μ L στο δεύτερο eppendorf και αναμίξαμε καλά, ώστε να προκύψει διάλυμα standard με συγκέντρωση 5 ng/mL (St_2). Επαναλάβαμε τη διαδικασία, ώστε τελικά να προκύψουν διαλύματα standard με συγκεντρώσεις 2.5 ng/mL (St_3), 1.25 ng/mL (St_4), 0.625 ng/mL (St_5), 0.313 ng/mL (St_6) και 0.156 ng/mL (St_7). Το eppendorf, το οποίο περιείχε μόνο 500 μ L από το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5-26, ήταν το μηδενικό standard (St_0). Το standard των 10 ng/mL (St_1) είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ το standard των 0.156 ng/mL (St_7) είχε τη μικρότερη συγκέντρωση.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα ορού αίματος γυναικών με φυσιολογική, εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση αραιώθηκαν, μεταφέροντας 50 μL από κάθε δείγμα σε ξεχωριστό eppendorf και προσθέτοντας σε καθένα από τα δείγματα, 50 μL από το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5-26 (αραίωση 1:4).

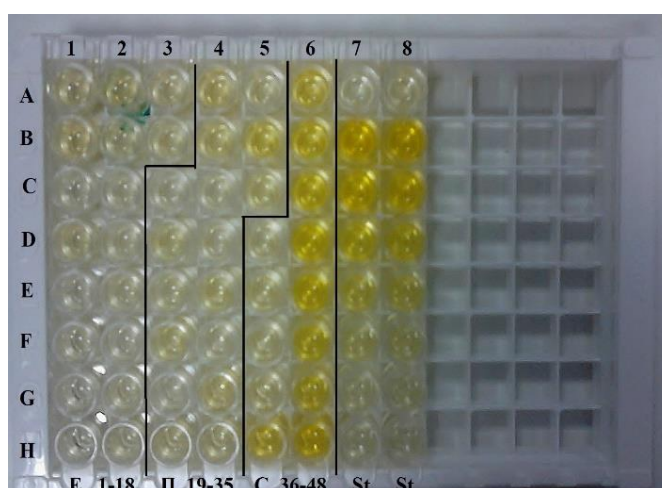
Αφού ολοκληρώθηκε η παραπάνω προεργασία, απομακρύναμε τις επιπλέον σειρές πηγαδιών από το πιάτο μικροτιτλοδότησης και τα επανατοποθετήσαμε στη συσκευασία, όπου και βρίσκονταν αρχικά. Έπειτα, προσθέσαμε 100 μL Assay Diluent RD1X σε κάθε πηγάδι. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 50 μL standard, δείγματος ορού φυσιολογικής, εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης σε κάθε πηγάδι. Σφραγίσαμε το πιάτο μικροτιτλοδότησης με αυτοκόλλητη διαφάνεια και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πάνω σε οριζόντιο αναδευτή τροχιάς ρυθμισμένο σε 500 ± 50 στροφές ανά λεπτό (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Οριζόντιος αναδευτής τροχιάς

Μετά την παρέλευση των 2 ωρών αφαιρέσαμε το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού και ξεπλύναμε. Επαναλάβουμε τη διαδικασία αυτή, ώστε συνολικά να έχουν πραγματοποιηθεί τέσσερα ξεπλύματα. Κατά τη διάρκεια του ξεπλύματος, γεμίσαμε κάθε πηγάδι με Wash Buffer (200 μL). Ήταν απαραίτητο σε κάθε στάδιο να απομακρύνεται εντελώς το Wash Buffer για την καλύτερη δυνατή απόδοση της δοκιμασίας. Μετά την ολοκλήρωση και του τελευταίου ξεπλύματος, απομακρύναμε όσο Wash Buffer είχε απομείνει στα πηγάδια με ελαφρύ τίναγμα του πιάτου. Στη συνέχεια, το γυρίσαμε ανάποδα και το στραγγίσαμε σε καθαρό χαρτί.

Συνεχίσαμε με προσθήκη 200 μL από το Human ADAM12 Conjugate σε κάθε πηγάδι. Σφραγίσαμε το πιάτο μικροτιτλοδότησης με αυτοκόλλητη διαφάνεια και ακολούθησε δεύτερη επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πάνω στον αναδευτή. Μετά την επώαση, επαναλάβαμε τη διαδικασία του ξεπλύματος με Wash Buffer, όπως ακριβώς περιεγράφη παραπάνω. Έπειτα, ετοιμάσαμε το Substrate Solution, αναμιγνύοντας καλά 7 mL από το Color Reagent A και 7 mL από το Color Reagent B. Προσθέσαμε 200 μL από το Substrate Solution σε κάθε πηγάδι και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο εργασίας και σε σκιερό μέρος. Τέλος, προσθέσαμε 50 μL Stop Solution σε κάθε πηγάδι και παρατηρήσαμε ότι το χρώμα στα πηγάδια από μπλε μετετρέπη σε κίτρινο, ως αναμενόταν (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μετατροπή χρώματος από μπλε σε κίτρινο μετά από προσθήκη διαλύματος διακοπής

Με τη βοήθεια ενός σπεκτροφωτομέτρου (Εικόνα 12) προσδιορίσαμε την οπτική πυκνότητα σε κάθε πηγάδι, αρχικά σε μήκος κύματος 450 nm και στη συνέχεια, στα 570 nm.



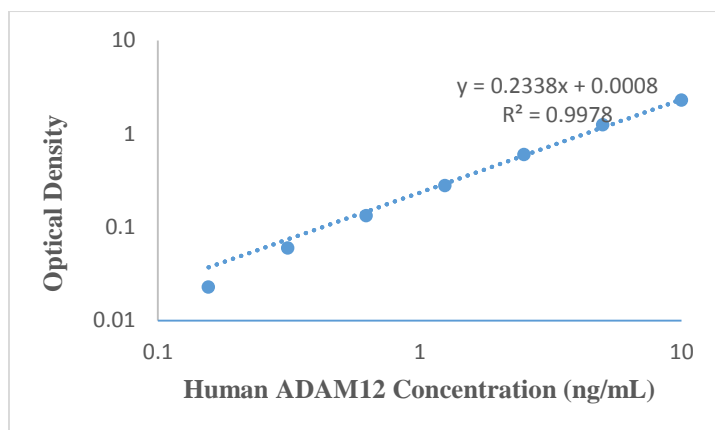
Εικόνα 12: EnSpire® Multimode Plate Reader της εταιρείας PerkinElmer

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των πηγαδιών στα 450 nm και στα 570 nm, προέκυψαν τρεις τιμές για καθένα από τα δύο μήκη κύματος. Υπολογίσαμε τη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης, ώστε να κατασκευάσουμε μια πρότυπη καμπύλη (Γράφημα 1) με βάση τις τιμές της οπτικής πυκνότητας, οι οποίες αντιστοιχούν σε καθένα από τα διαλύματα Human ADAM12 Standard με γνωστές συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω στοιχεία συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας σε καθένα από τα διαλύματα Human ADAM12 Standard σε 450 nm και σε 570 nm.

Human ADAM12 Standard Concentration (ng/mL)	O.D.		Average	Corrected
	450 nm	570 nm		
0	0.124	0.039	0.090	—
	0.129	0.039		
	0.135	0.039		
0.156	0.144	0.039	0.113	0.023
	0.153	0.039		
	0.160	0.039		
0.313	0.178	0.037	0.150	0.060
	0.187	0.037		
	0.195	0.037		
0.625	0.253	0.042	0.223	0.133
	0.267	0.043		
	0.278	0.044		
1.25	0.394	0.039	0.370	0.280
	0.411	0.040		
	0.424	0.040		
2.5	0.716	0.042	0.690	0.600
	0.733	0.042		
	0.746	0.042		
5	1.372	0.045	1.342	1.252
	1.388	0.045		
	1.400	0.045		
10	2.413	0.053	2.387	2.297
	2.447	0.053		
	2.461	0.053		



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης για τα διαλύματα Human ADAM12 Standard με γνωστές συγκεντρώσεις.

Χρησιμοποιήσαμε την εξίσωση της καμπύλης $y = 0,2338x + 0,0008$ και λύνουμε ως προς x , αντικαθιστώντας τη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης για κάθε δείγμα ως y , ώστε να βρούμε τη συγκέντρωση της ADAM12 σε ng/mL. Στη συνέχεια, πολλαπλασιάσαμε τη συγκέντρωση που βρήκαμε με το συντελεστή αραιώσης των δειγμάτων.

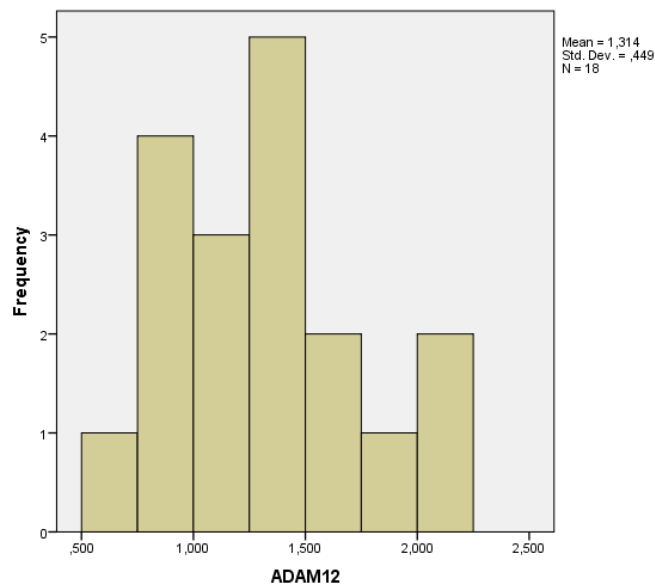
Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας, όπου παρατίθενται οι τιμές της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση που διεκόπη (control), καθώς και οι τιμές της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) και της προγεστερόνης (P4) των ομάδων αυτών.

Πίνακας 2: Οι τιμές της ADAM12, της β-χοριακής γοναδοτροφίνης και της προγεστερόνης για τα δείγματα ορού αίματος γυναικών με εξωμήτρια, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση (control).

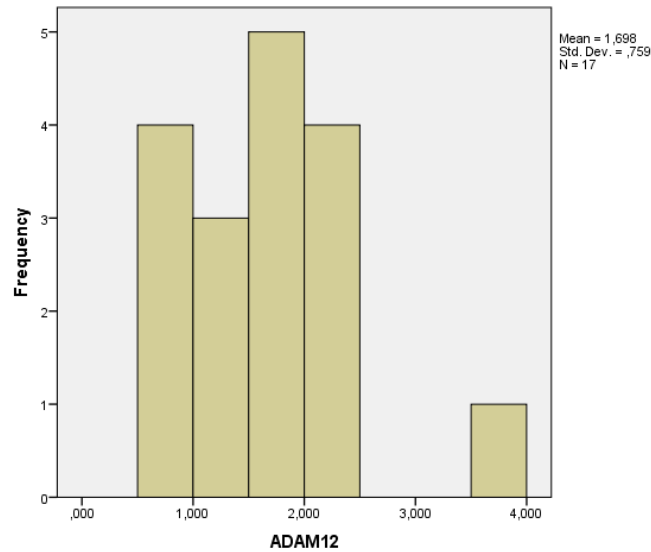
	Εξωμήτρια κύηση			Παλίνδρομη κύηση			Φυσιολογική κύηση (control)				
	ADAM12 (ng/mL)	β-hCG (mIU/mL)	P4 (ng/mL)	ADAM12 (ng/mL)	β-hCG (mIU/mL)	P4 (ng/mL)	ADAM12 (ng/mL)	β-hCG (mIU/mL)	P4 (ng/mL)		
1	1.704	2375	6.03	1	0.883	47.7	0.36	1	1.251	585.6	7.31
2	2.157	1757	5.24	2	1.875	40156	9.62	2	1.687	33761	14.93
3	0.908	264	1.71	3	1.490	11033	6.61	3	1.430	3714	8.37
4	1.781	840.6	16.29	4	2.166	57515	11.23	4	1.661	9564	13.48
5	0.678	3083	2.59	5	0.703	14.2	0.72	5	6.263	3092	38.31
6	1.097	1100	1.04	6	1.687	21855	4.73	6	4.210	7632	24.3

7	0.814	5291	2.47	7	2.328	4254	34.42	7	5.117	2837	15.38
8	0.772	2841	3.53	8	2.038	33108	6.91	8	6.298	2978	18.75
9	2.175	7134	9.84	9	0.977	29398	12.81	9	8.642	1870	21.88
10	1.678	14	0.46	10	0.943	125.8	2.09	10	7.880	1978	56.24
11	1.062	10551	6.39	11	1.926	97034	22.16	11	5.896	3415	24.15
12	1.071	9079	2.89	12	1.011	40846	20.28	12	5.271	2053	28.87
13	1.311	434.7	0.63	13	2.423	57599	12.87	13	11.541	2510	22.62
14	0.943	1640	0.58	14	1.678	6532	14.98				
15	1.259	10460	10.01	15	1.182	515.4	0.48				
16	1.319	5545	2.79	16	3.783	1851	1.55				
17	1.439	10901	10.56	17	1.772	27743	9.23				
18	1.490	1717	1.6								

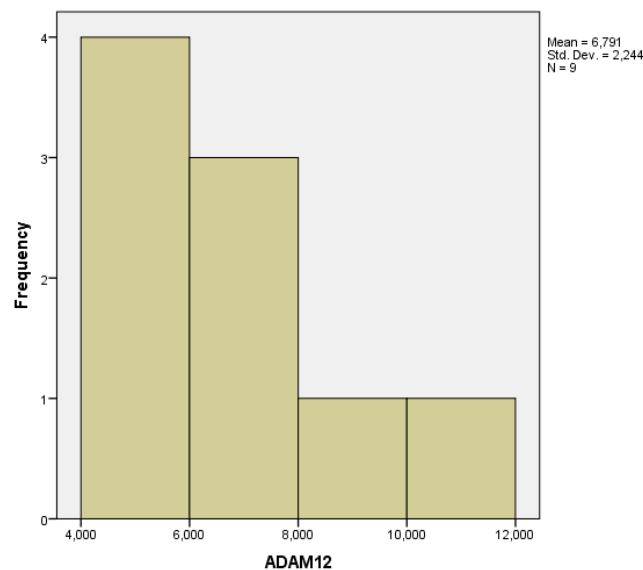
Με τη βοήθεια του προγράμματος IBM SPSS Statistics 20 προχωρήσαμε σε στατιστικές αναλύσεις των παραπάνω τιμών. Αρχικά, κατασκευάσαμε ιστογράμματα για να δούμε την κατανομή των τιμών της ADAM12 σε κάθε ομάδα που μελετήθηκε, ξεχωριστά.



Γράφημα 2: Μη κανονική κατανομή των τιμών της ADAM12 στον ορό αίματος γυναικών με εξωμήτρια κύηση. Η μέση τιμή της ADAM12 είναι 1.314 ng/mL και η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε ένα εύρος τιμών από 1.25 έως 1.5 ng/mL.



Γράφημα 3: Μη κανονική κατανομή των τιμών της ADAM12 στον ορό αίματος γυναικών με παλίνδρομη κύηση. Η μέση τιμή της ADAM12 είναι 1.698 ng/mL και η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε ένα εύρος τιμών από 1.5 έως 2 ng/mL.



Γράφημα 4: Μη κανονική κατανομή των τιμών της ADAM12 στον ορό αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση που διεκόπη (control). Η μέση τιμή της ADAM12 είναι 6.791 ng/mL και η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε ένα εύρος τιμών από 4 έως 6 ng/mL.

Από τα παραπάνω ιστογράμματα φαίνεται η μη κανονική κατανομή των τιμών της ADAM12 σε όλες τις ομάδες των δειγμάτων. Επομένως, προκειμένου να διερευνήσουμε εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης (control) όσον αφορά στις τιμές της ADAM12, εφαρμόσαμε το Kruskal-Wallis H test για το μη παραμετρικό έλεγχο δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων δειγμάτων. Από τη σύγκριση των τριών ομάδων προέκυψε, ότι τα επίπεδα της ADAM12 στα δείγματα της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης διαφέρουν, και αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική με $p = 0.0004$ ($< p = 0.05$).

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε εάν υπάρχει διαφορά στις τιμές της ADAM12 εντός των τριών ομάδων της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης, συγκρίνοντας τα δείγματα της εξωμήτριας με αυτά της φυσιολογικής κύησης, τα δείγματα της παλίνδρομης με αυτά της φυσιολογικής κύησης και τα δείγματα της εξωμήτριας με αυτά της παλίνδρομης κύησης. Για το σκοπό αυτό εφαρμόσαμε το Post-hoc Mann-Whitney-Wilcoxon test για το μη παραμετρικό έλεγχο δύο ανεξάρτητων δειγμάτων. Ενώ αριθμητικά, όλες οι ομάδες διέφεραν μεταξύ τους, όσον αφορά στα επίπεδα της ADAM12, η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική μόνο, όταν συγκρίναμε την ομάδα της εξωμήτριας με αυτή της φυσιολογικής κύησης (με $p = 0.0003 < 0.05$), και την ομάδα της παλίνδρομης με αυτή της φυσιολογικής κύησης (με $p = 0.003 < 0.05$). Μεταξύ των ομάδων της εξωμήτριας και της παλίνδρομης κύησης, ωστόσο, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της ADAM12 (με $p = 0.117 > 0.05$).

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή του Kruskal-Wallis H test και του Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Kruskal-Wallis H test			
		Mean Rank	P-value
	Εξωμήτρια κύηση	16.81	
ADAM12	Παλίνδρομη κύηση	23.18	0.0004**
	Φυσιολογική κύηση	36.88	
Mann-Whitney-Wilcoxon test (pairwise comparison)			
		Mean Rank	P-value
	Εξωμήτρια κύηση	10.94	
	Φυσιολογική κύηση	23.00	0.0003**
ADAM12	Παλίνδρομη κύηση	11.38	0.003**
	Φυσιολογική κύηση	20.88	
	Εξωμήτρια κύηση	15.36	
	Παλίνδρομη κύηση	20.79	0.117

** Στατιστικά σημαντικό

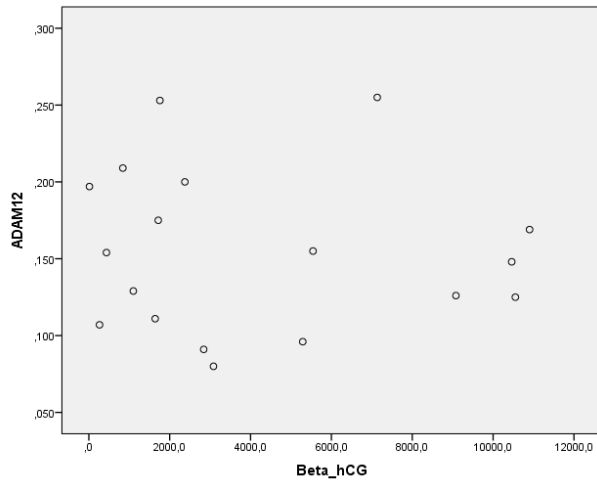
Επίσης, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει οποιαδήποτε συσχέτιση, θετική ή αρνητική, μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της β-χοριακής γοναδοτροφίνης, καθώς και μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της προγεστερόνης, χρησιμοποιήσαμε το συντελεστή συσχέτισης Spearman.

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή του συντελεστή συσχέτισης Spearman's rho μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) σε καθεμιά από τις ομάδες της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης.

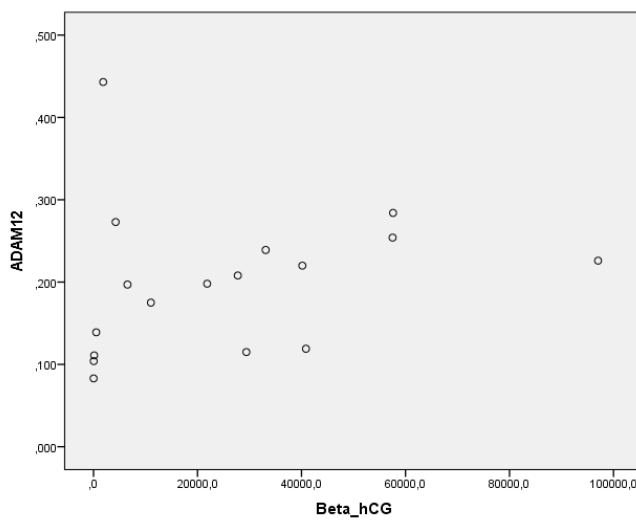
Correlation Spearman's rho		
	Correlation Coefficient	P-value
Εξωμήτρια κύηση	-0.098	0.699
Παλίνδρομη κύηση	0.520**	0.033**
Φυσιολογική κύηση	-0.401	0.174

** Στατιστικά σημαντική συσχέτιση για $p = 0.05$ (2-tailed)

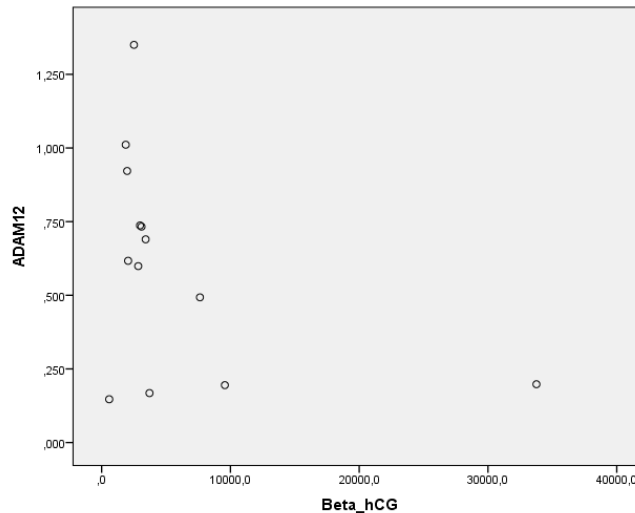
Βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 και της β-χοριακής στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια ($r = -0.098$, $p = 0.699$) (Γράφημα 5) και φυσιολογική κύηση ($r = -0.401$, $p = 0.174$) (Γράφημα 7), ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, υπάρχει μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 και της β-χοριακής στον ορό του αίματος γυναικών με παλίνδρομη κύηση, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($r = 0.520$, $p = 0.033$) (Γράφημα 6). Αν και ενδεικτική, αυτή η συσχέτιση δεν αποδεικνύει ότι η β-χοριακή γοναδοτροφίνη είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές των επιπέδων συγκέντρωσης της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με παλίνδρομη κύηση.



Γράφημα 5: Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) στην ομάδα της εξωμήτριας κύησης.



Γράφημα 6: Θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) στην ομάδα της παλίνδρομης κύησης.



Γράφημα 7: Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της β-χοριακής γοναδοτροφίνης (β-hCG) στην ομάδα της φυσιολογικής κύησης.

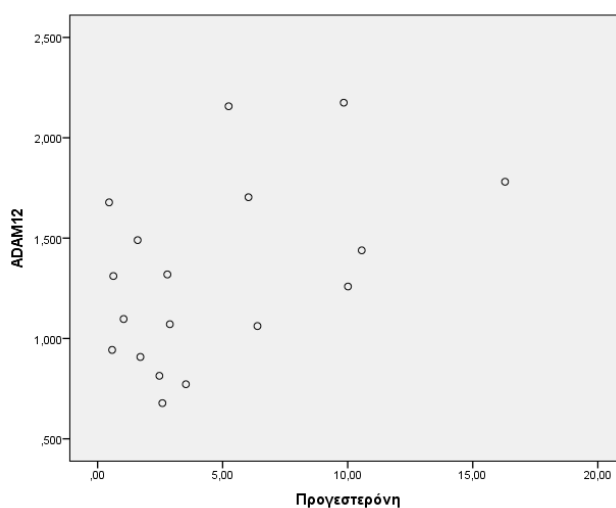
Αντίστοιχα οι στατιστικές αναλύσεις για τη διερεύνηση οποιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ των τιμών της ADAM12 και αυτών της προγεστερόνης σε καθεμιά από τις ομάδες της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης, φαίνονται στον Πίνακα 5 και, απεικονιστικά, στα γραφήματα που ακολουθούν.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή του συντελεστή συσχέτισης Spearman's rho μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της προγεστερόνης (P4) σε καθεμιά από τις ομάδες της εξωμήτριας, παλίνδρομης και φυσιολογικής κύησης.

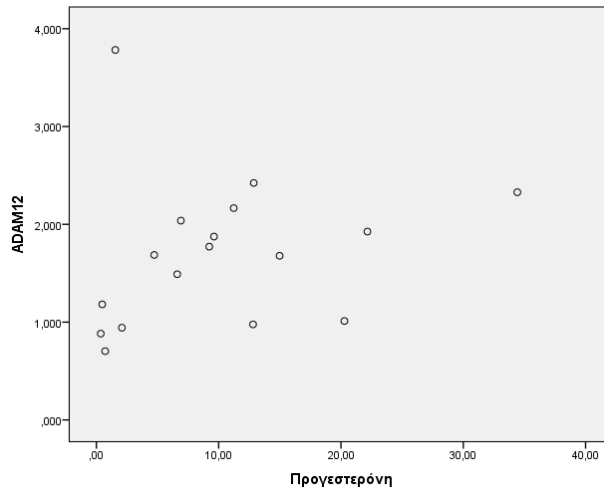
Correlation Spearman's rho		
	Correlation Coefficient	P-value
Εξωμήτρια κύηση	0.329	0.182
Παλίνδρομη κύηση	0.426	0.088
Φυσιολογική κύηση	0.665**	0.013**

** Στατιστικά σημαντική συσχέτιση για $p = 0.05$ (2-tailed)

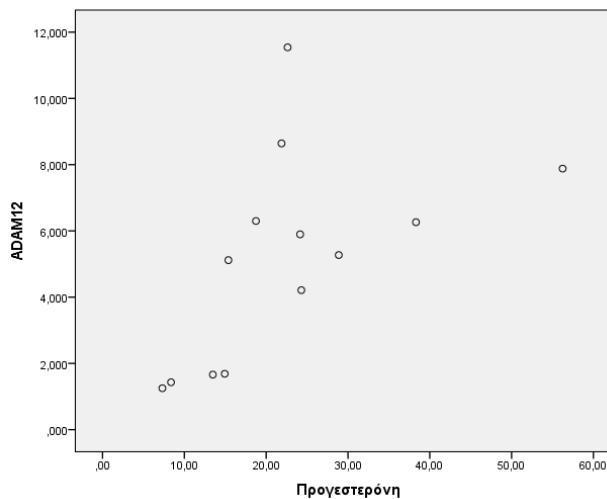
Βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 και της προγεστερόνης στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια ($r = 0.329$, $p = 0.182$) (Γράφημα 8) και παλίνδρομη κύηση ($r = 0.426$, $p = 0.088$) (Γράφημα 9), ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, υπάρχει μικρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 και της προγεστερόνης στον ορό του αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($r = 0.665$, $p = 0.013$) (Γράφημα 10). Αν και ενδεικτική, αυτή η συσχέτιση δεν αποδεικνύει ότι η προγεστερόνη είναι υπεύθυνη για τα επίπεδα συγκέντρωσης της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση.



Γράφημα 8: Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της προγεστερόνης στην ομάδα της εξωμήτριας κύησης.



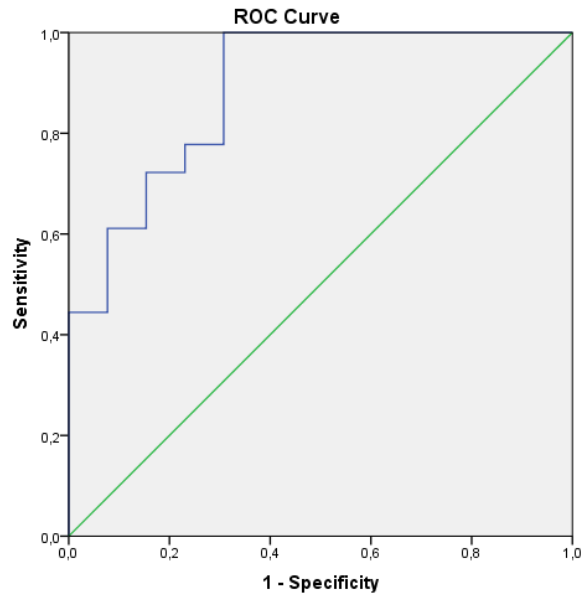
Γράφημα 9: Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της προγεστερόνης στην ομάδα της παλίνδρομης κύησης.



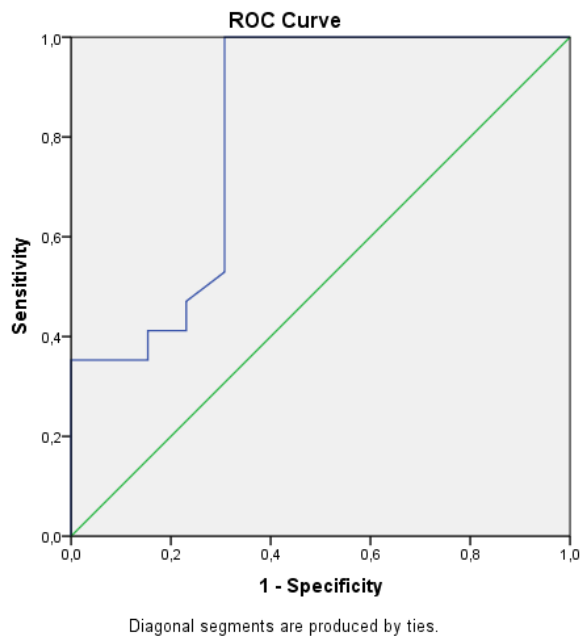
Γράφημα 10: Θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ADAM12 και της προγεστερόνης στην ομάδα της φυσιολογικής κύησης.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε το κατά πόσο η ADAM12 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη για την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης, καθώς και την ευαισθησία και ειδικότητα που τη χαρακτηρίζουν ως πιθανό διαγνωστικό τεστ. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε μια καμπύλη ROC για καθεμιά από τις ομάδες της εξωμήτριας και παλίνδρομης κύησης.

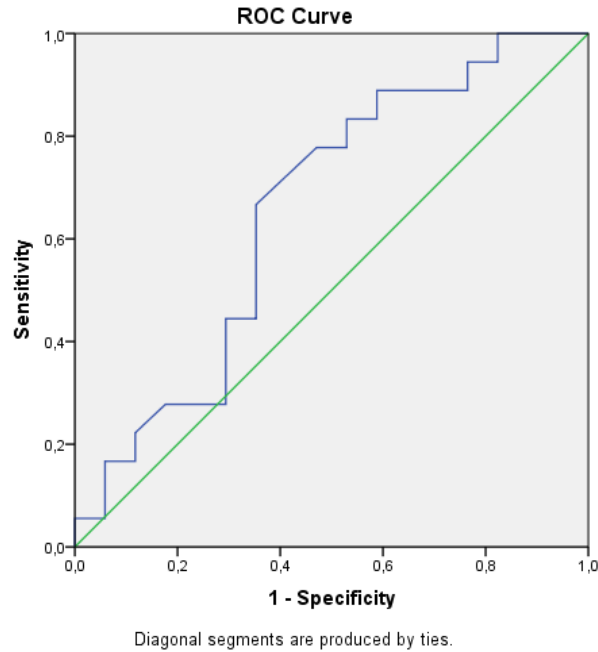
Μια τέτοια καμπύλη δίνει πληροφορίες σχετικά με την ευαισθησία και την ειδικότητα ενός διαγνωστικού τεστ. Η ευαισθησία αναφέρεται στα αληθώς θετικά αποτελέσματα του τεστ, δηλαδή ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι θετικά ως προς την ύπαρξη μιας παθολογικής κατάστασης, η οποία πράγματι υφίσταται. Αντίθετα, η ειδικότητα αναφέρεται στα ψευδώς θετικά αποτελέσματα ενός διαγνωστικού τεστ και επομένως, τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι θετικά ως προς την ύπαρξη μιας παθολογικής κατάστασης, χωρίς όμως αυτή να υφίσταται. Στη μελέτη αυτή, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω στοιχεία, η ευαισθησία του διαγνωστικού τεστ της ADAM12 αναφέρεται σε περιπτώσεις, οι οποίες διαγιγνώσκονται ως εξωμήτριες ή παλίνδρομες κύσεις και το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με την πραγματικότητα, επομένως είναι απαραίτητη η έγκαιρη επέμβαση. Η ειδικότητα του διαγνωστικού τεστ της ADAM12 αναφέρεται σε περιπτώσεις, οι οποίες διαγιγνώσκονται μεν ως εξωμήτριες ή παλίνδρομες κύσεις, αλλά στην πραγματικότητα αποτελούν φυσιολογικές κύσεις. Το ζητούμενο είναι να αποφεύγεται μια λανθασμένη διάγνωση, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή μιας βιώσιμης ενδομήτριας κύησης και να εντοπίζονται εγκαίρως και με αξιόπιστο τρόπο οι εξωμήτριες και παλίνδρομες κύσεις. Κατά συνέπεια, είναι επιθυμητός ο χαρακτηρισμός ενός διαγνωστικού τεστ από υψηλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας (Πίνακας 6), η ADAM12 θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη για τη διάκριση μεταξύ εξωμητρίων και φυσιολογικών κύσεων με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς και μεταξύ παλίνδρομων και φυσιολογικών κύσεων με σχετικά χαμηλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα. Ωστόσο, δε θα μπορούσε να διαχωρίσει αποτελεσματικά και αξιόπιστα τις περιπτώσεις της εξωμήτριας από αυτές της παλίνδρομης κύησης. Το cut off point για μια εξωμήτρια κύηση με βάση την αντίστοιχη καμπύλη ROC (Γράφημα 11) είναι 1.628 ng/mL, ενώ το cut off point για μια παλίνδρομη κύηση που προκύπτει από την αντίστοιχη καμπύλη ROC (Γράφημα 12) είναι 1.683 ng/mL. Αυτές οι τιμές αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις της ADAM12, κάτω από τις οποίες θα μπορούσε να γίνει διάγνωση εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης, αντίστοιχα. Επομένως, η ADAM12 φαίνεται ότι θα μπορούσε να αποτελέσει καλύτερο δείκτη για τις εξωμήτριες κύσεις, λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας και ειδικότητας.



Γράφημα 11: Η ADAM12 θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των περιπτώσεων μιας εξωμήτριας από αυτές μιας φυσιολογικής κύησης.



Γράφημα 12: Η ADAM12 θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των περιπτώσεων μιας παλίνδρομης από αυτές μιας φυσιολογικής κύησης.



Γράφημα 13: Η ADAM12 δε θα μπορούσε να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των περιπτώσεων μιας εξωμήτριας από αυτές μιας παλίνδρομης κύησης.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις καμπύλες ROC.

		Sensitivity	Specificity	AUC	P-value	Cut off point
ADAM12	Εξωμήτρια κύηση	0.720	0.830	0.889	0.0003**	1.628
	Φυσιολογική κύηση					
	Παλίνδρομη κύηση	0.480	0.770	0.817	0.003**	1.683
	Φυσιολογική κύηση					
	Εξωμήτρια κύηση	0.450	0.700	0.655	0.117	1.140
	Παλίνδρομη κύηση					

** Στατιστικά σημαντικό

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία στόχος μας ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων συγκέντρωσης της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση σε πρώιμο στάδιο (6-8 εβδομάδες). Επίσης, διερευνήσαμε εάν θα μπορούσε η ADAM12 να αποτελέσει έναν αξιόπιστο βιοδείκτη για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης, καθώς και για το μεταξύ τους διαχωρισμό.

Η ADAM12, μια γλυκοπρωτεΐνη της οικογένειας ADAMs (Jiexia Jang et al., 2014), εκφράζεται στον ιστό του ενδομητρίου (Erin K Nyren-Erickson et al., 2013) και εντοπίζεται στον πλακούντα (Yi Cao et al., 2001), όπου θεωρείται ότι συμβάλλει στη συγκυτιακή σύντηξη στην τροφοβλάστη, γεγονός κρίσιμο για τη διατήρηση μιας υγιούς εγκυμοσύνης (Hans-Gert Bernstein et al., 2010; Mary E Rausch et al., 2011). Επίσης, έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην προώθηση της φθαρτοποίησης της μήτρας (Hans-Gert Bernstein et al., 2010) και ρυθμίζει τα επίπεδα του IGF, ο οποίος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εμβρυϊκή αύξηση και ανάπτυξη (Dechiara, Efstratiadis & Robertson, 1990; Dechiara, Robertson & Efstratiadis, 1991; Hans-Gert Bernstein et al., 2010).

Λόγω των δράσεων αυτών της ADAM12, καθώς και του σημείου εντοπισμού και έκφρασής της κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ερευνητές έχουν μελετήσει κατά καιρούς τη συγκεκριμένη μεταλλοπρωτεάση ντισιντεγκρίνης, με σκοπό να διερευνήσουν τη δυνητική λειτουργία της ως αξιόπιστου μοναδικού δείκτη ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες για την ανίχνευση και το διαχωρισμό παθολογικών κύσεων, όπως είναι η εξωμήτρια και η παλίνδρομη κύηση.

Οι Rausch ME, Beer L, Sammel MD et al (2011) σε μια μελέτη 199 ατόμων για τη διερεύνηση του ρόλου της ADAM12 ως πιθανού βιοδείκτη για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας κύησης, έδειξαν ότι τα επίπεδα της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια κύηση ήταν εμφανώς μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα στον ορό του αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση, με αποτέλεσμα τον επιτυχή διαχωρισμό μιας εξωμήτριας από μια φυσιολογική κύηση. Η μελέτη αυτή ήταν η πρώτη που επιβεβαίωσε την ύπαρξη ενός νέου βιοδείκτη για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας κύησης.

Αντιθέτως, οι Horne AW, Brown JK, Tong S et al. (2012) σε μελέτη 120 εγκύων με κύηση αγνώστου τοποθεσίας, βρήκαν ότι οι συγκεντρώσεις της ADAM12 στον ορό

του αίματος των ασθενών ήταν αυξημένες σε γυναίκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένη εξωμήτρια κύηση συγκριτικά με τα αντίστοιχα γυναικών με φυσιολογική ενδομήτρια κύηση ή γυναικών, οι οποίες απέβαλαν. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η ADAM12 ως μοναδικός δείκτης για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας κύησης δεν είχε μεγάλη αξία.

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη των Zou S, Li X, Feng Y et al. (2013) δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων συγκέντρωσης της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με εξωμήτρια και των αντιστοιχών στον ορό του αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση. Επίσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 και της προγεστερόνης στον ορό του αίματος γυναικών με φυσιολογική κύηση. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ADAM12 με την προγεστερόνη παρατηρήθηκε μόνο σε γυναίκες με εξωμήτρια κύηση πριν τη χειρουργική επέμβαση.

Οι Yang J, Wu J, Guo F et al. (2014) διερεύνησαν το ρόλο της ADAM12 ως δυνητικού δείκτη για παθολογικές κυήσεις διεξάγοντας μια μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 204 άτομα, εκ των οποίων τα 9 αντιστοιχούσαν σε περιπτώσεις αυτόματων αποβολών, 27 σε περιπτώσεις παλίνδρομης κύησης, 56 σε περιπτώσεις εξωμήτριας κύησης, 12 σε περιπτώσεις υδατιδόμορφης μύλης κύησης και 100 σε περιπτώσεις φυσιολογικής κύησης. Βρήκαν ότι τα επίπεδα της ADAM12 σε εξωμήτριες κυήσεις 5 έως 9⁺⁶ εβδομάδων ήταν μειωμένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα σε φυσιολογικές κυήσεις, ενώ δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της ADAM12 στον ορό του αίματος γυναικών με παλίνδρομη κύηση και αυτών με φυσιολογική κύηση. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η ADAM12 μπορεί να διαχωρίσει επιτυχώς τις ομάδες των αυτόματων αποβολών, της εξωμήτριας κύησης και της υδατιδόμορφης μύλης κύησης από την ομάδα της φυσιολογικής κύησης, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση παθολογικών κυήσεων.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης της ADAM12 είναι μειωμένα σε περιπτώσεις εξωμητρίων και παλίνδρομων κυήσεων και η ADAM12 είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη διάγνωση μιας εξωμήτριας ή παλίνδρομης κύησης, αλλά αδυνατεί να διαχωρίσει τις περιπτώσεις εξωμητρίων από αυτές των παλίνδρομων κυήσεων. Απατείται όμως μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmadi F & Irani S. Cervical ectopic pregnancy following assisted reproductive technology: A case report. *Int J Fertil Steril* 2012; 6(3): 201-204.

Ahokas K et al. Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene* 2002; 301: 31-41.

Al-Nazer A, Omar L, Wahba M et al. Ectopic intramural pregnancy developing at the site of a cesarean section scar: A case report. *Cases Journal* 2009; 2: 9404.

Alfandari D et al. ADAM function in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20(2): 153-163.

Alfandari D, Wolfsberg TG, White JM et al. ADAM 13, a novel ADAM expressed in somitic mesoderm and neural crest cells during *Xenopus laevis* development. *Dev Biol* 1997; 182: 314-330.

Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 2009; 284(46): 31493-31497.

Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991; 99(4): 681-692.

Armant DR. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol* 2005; 280(2): 260-280.

Bai SX et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reprod* 2005; 129: 103-113.

Barnhart KT. Ectopic pregnancy-Clinical practice. *New Engl J Med* 2009; 361: 379-87.

Bass KE, Li H, Hawkes SP et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion in vitro. *Dev Genet* 1997; 21: 61-67.

Bayati LF et al. Association between increased expression of endothelial isoform of nitric oxide synthase in the human fallopian tube and tubal ectopic pregnancy. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(1): 19-28.

Becherer JD & Blobel CP. Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr Top Dev Biol* 2003; 54: 101-123.

Beristain AG et al. Regulated expression of ADAMTS-12 in human trophoblastic cells: a role for ADAMTS-12 in epithelial cell invasion? *PLoS ONE* 2011; 6(4): e18473.

Beristain HG et al. Association between paternal schizophrenia and low birthweight: ADAM 12 may matter. *Asian J Androl* 2010; 12: 453-454.

Bischof P & Campana A. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation. *Early Pregnancy* 1997; 3(2): 81-95.

Bjartling C et al. Deoxyribonucleic acid of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue from the fallopian tubes of patients with ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 134: 95-100.

Bjorn SF et al. Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(8): 713-723.

Bjorn SF, Hastrup N, Larsen JF et al. Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta* 2000; 21: 170-176.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733.

Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signaling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:32-43.

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW et al. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992; 356: 248-252.

Bode W, Gomis-Ruth FX, Huber R et al. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* 1992; 358: 164-167.

Bode W, Gomis-Ruth FX & Stockler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 1993; 331: 134-140.

Bouyer J, Coste J, Fernandez H et al. Sites of ectopic pregnancy : a 10 year population-based study of 1800 cases. *Hum Reprod* 2002; 17: 3224-3230.

Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA et al. Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genet Dev* 1989; 3: 848-859.

Brown HM, Dunning KR, Robker RL et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. *Biol Reprod* 2010; 83: 549-57.

Butler PE, McKay MJ & Bond JS. Characterization of meprin, a membrane-bound metalloendopeptidase from mouse kidney. *Biochem J* 1987; 241: 229-235.

Butler SA, Abban TKA, Borrelli PTA et al. Single point biochemical measurement algorithm for early diagnosis of ectopic pregnancy. *Clin Biochem* 2013; 46: 1257-1263.

Cabar FR, Fettback PB, Pereira PP et al. Serum markers in the diagnosis of tubal pregnancy. *Clinics* 2008; 63(5): 701-708.

Cal S, Argüelles JM, Fernandez PL et al. Identification, characterization, and intracellular processing of ADAMTS-12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J Biol Chem* 2001; 276(21): 17932-17940.

Cao Y et al. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with α -actinin-1. *Biochem J* 2001; 357: 353-361.

Cartwright J et al. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reprod* 2009; 138: 9-22.

Chen H et al. Expression of GRIM-19 in missed abortion and possible pathogenesis. *Fertil Steril* 2015; 103(1).

Chrysostomou M et al. Serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* in women with ectopic pregnancy, normal pregnancy or salpingitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 44: 101-105.

Clifford K, Rai R, Watson H et al. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage : preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994; 9: 1328-1332.

Cowans NJ et al. ADAM-12 stability in first trimester maternal serum. *Prenat Diagn* 2010; 30: 555-560.

Crowther JR. *Methods in Molecular Biology-The ELISA Guidebook*. Ed Walker John, The International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria 2001; Vol 149; Humana Press.

Curry TE et al. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews* 2003; 24(4): 428-465.

Dagoneau N, Benoist-Lassel C, Huber C et al. ADAMTS 10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 801-806.

Dahab AA, Aburass R, Shawkat W et al. Full-term extrauterine abdominal pregnancy: A case report. *J Med Case Reports* 2011; 5: 531.

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J et al. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 1985 ; 44 : 139-266.

Daponte A, Pournaras S, Deligeoroglou E et al. Serum interleukin-1 β , interleukin-8 and anti-heat shock 60 *Chlamydia trachomatis* antibodies as markers of ectopic pregnancy. *J Reprod Immunol* 2012; 93: 102-108.

DeChiara TM, Efstratiadis A & Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; 345: 78-80.

DeChiara TM, Robertson EJ & Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991; 64: 849-859.

Demircan K et al. A new biological marker candidate in female reproductive system diseases: Matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS). *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2014; 15: 250-255.

Demircan K, Akyol S & Armutçu F. A multifunctional gene family from arthritis to cancer: a disintegrin-like metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif (ADAMTS). *J Clin Anal Med* 2013; 4: 429-434.

Desai D et al. Human chorionic gonadotropin discriminatory zone in ectopic pregnancy: does assay harmonization matter? *Fertil Steril* 2014; 101(6).

Dimitriadis E et al. Review: LIF and IL-11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta* 2010; 31: 99-104.

D'Ortho MP, Will H, Atkinson S et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 and 2 exhibit broad spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; 250: 751-757.

Duffy MJ et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteom* 2011; 8: 9.

Edwards DR, Handsley MM & Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 258-289.

Enders AC & Mead RA. Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the western spotted skunk. *Anat Rec* 1996; 244(3): 297-315.

Engle JM, Tam L, Goldring M et al. ADAMTS-9 and ADAMTS-10, two novel, unusual ADAMTS proteases and regulation of the ADAMTS family in three human chondrocyte cell lines. 47th Annu Meet Orthop Res Soc 2001.

El Hour M et al. Higher sensitivity of Adamts12-deficient mice to tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2010; 29(20): 3025-3032.

Essential Clinical Immunology, Ed Zabriskie JB 2009; p.23; Cambridge University Press.

Eyre D. Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 427: 118-122.

Farquhar CM. Ectopic pregnancy. *Lancet* 2005; 366(9485): 583-591.

Fang Y, Kong B, Yang Q et al. MDM2 309 polymorphism is associated with missed abortion. *Hum Reprod* 2009; 24(6): 1346-1349.

Flannery CR, Zeng W, Corcoran C et al. Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *J Biol Chem* 2002; 277: 42775-42780.

Fröhlich C, Albrechtsen R, Dyrskjot L et al. Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7359-7368.

Gao G, Plaas A, Thompson VP et al. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol- anchored membrane type-4 matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 10042-10051.

Gao G, Westling J, Thompson VP et al. Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem* 2002; 277: 11034-11041.

Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG et al. A novel, secreted form of human ADAM12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273: 157-166.

Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 195: 168-171.

Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB et al. Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1243-1250.

Hatasaka HH. Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence. *Clin Obstet Gynecol* 1994; 37: 625-634.

Held-Feindt J, Paredes EB, Blomer U et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer* 2006; 118: 55-61.

Hougaard S, Loechel F, Xu X et al. Trafficking of human ADAM12-L: Retention in the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 261-267.

Howard L, Maciewicz RA & Blobel CP. Cloning and characterization of ADAM28: Evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J* 2000; 348: 21-27.

Hulboy DL, Rudolph LA & Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 27-45.

Huovila APJ et al. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *TRENDS in Biochem Sci* 2005; 30(7): 413-422.

Hurskainen T, Höyhty M, Tuuttila A et al. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-kDa type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1379-1388.

Hurskainen T, Seiki M, Apte SS et al. Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT MMP-1) in early human placenta. A possible role in placental implantation? *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 221-229.

Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C et al. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 63.

Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B et al. The cysteine-rich domain of human ADAM12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 2000; 149: 1143-1156.

Iida A, Sakaguchi K, Sato K et al. Metalloprotease-dependent onset of blood circulation in zebrafish. *Curr Biol* 2010; 20: 1110-1116.

Ito N, Nomura S, Iwase A et al. ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 1008-1013.

Itoh Y, Kaijta M, Kinoh H et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 34260-34266.

Janes PW, Saha N, Barton WA et al. ADAM meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 2005; 123: 291-304.

Janes PW, Wimmer-Kleikamp SH, Frangakis AS et al. Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000215.

Jang J et al. Maternal serum disintegrin and metalloprotease protein-12 in early pregnancy as a potential marker of adverse pregnancy outcomes. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e97284.

Jia Z, Gao S, M'Rabet N et al. Sp1 is necessary for gene activation of Adamts17 by estrogen. *J Cell Biochem* 2014; 115: 1829-1839.

Kang T, Zhao YG, Pei D et al. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J Biol Chem* 2002; 277: 25583-25591.

Khokka R, Aditya M & Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Rev Immunol* 2013; 13: 649-665.

Kim J et al. Implication of ADAM-8, -9, -10, -12, -15, -17, and ADAMTS-1 in implantational remodeling of a mouse uterus. *Yonsei Med J* 2006; 47(4): 558-567.

Kim J, Kim H, Lee SJ et al. Abundance of ADAM-8, -9, -10, -12, -15 and -17 and ADAMTS-1 in mouse uterus during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 543-555.

Kim YM et al. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF- β 1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PLoS ONE* 2012; 7(7): e40820.

Kirk E, Bottomley C et al. Diagnosing ectopic pregnancy and current concepts in the management of pregnancy of unknown location. *Hum Reprod Update* 2014; 20(2): 250-261.

Klein T & Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011; 41: 271-290.

Kliman HJ et al. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118(4): 1567-1582.

Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S et al. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett* 2000; 480: 142-146.

Kuno K, Kanada N, Nakashima E et al. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 556-562.

Kuphal S & Bosserhoff A. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* 2006; 25: 248-259.

Kveiborg M et al. Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem & Cell Biol* 2008; 40: 1685-1702.

Kveiborg M, Fröhlich C, Albrechtsen R et al. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 4754-4761.

Kweider N, Huppertz B, Wruck CJ et al. A role for Nrf2 in redox signalling of the invasive extravillous trophoblast in severe early onset IUGR associated with preeclampsia. *PLoS ONE* 2012; 7(10): e47055.

Laigaard J, Christiansen M, Fröhlich C, et al. The level of ADAM12-S in maternal serum is an early first trimester marker of fetal trisomy 18. *Prenat Diagn* 2005; 25: 45-46.

Laigaard J, Cuckle H, Wewer U et al. Maternal serum ADAM12 levels in Down and Edward's syndrome pregnancies at 9-12 weeks' gestation. *Prenat Diagn* 2006; 26: 689-691.

Laigaard J, Sorensen T, Fröhlich C et al. ADAM12: A novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat Diagn* 2003; 23: 1086-1091.

Lammich S, Kojro E, Postina R et al. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 3922-3927.

Levy GG, Nichols WC, Lian EC et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 475-476.

Leyme A et al. Identification of ILK as a new partner of the ADAM12 disintegrin and metalloprotease in cell adhesion and survival. *Mol Biol at the Cell* 2012; 23: 3461-3472.

Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE et al. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269: 17125-17131.

Librach C, Werb Z, Fitzgerald M et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113: 437-449.

Liu CJ. The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis. *Nature Clin Pract Rheumatol* 2009; 5: 38-45.

Llamazares M, Cal S, Quesada V et al. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J Biol Chem* 2003; 278: 13382-13389.

Llano E, Pendas AM, Knäuper V et al. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 1997; 36: 15101-15108.

Lohi J, Wilson CL, Roby JD et al. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem* 2001; 276: 10134-10144.

Low N et al. Incidence of severe reproductive tract complications associated with diagnosed genital chlamydial infection: The Uppsala Women's Cohort Study. *Sex Transm Infect* 2006; 82: 212-218.

Lum L, Reid MS & Blobel CP. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* 1998; 273: 26236-26247.

Luque A, Carpizo DR & Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF 16S. *J Biol Chem* 2003; 278: 23656-23665.

McCawley LJ & Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-540.

Machado AC et al. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007; 24816.

Makrydimas G et al. ADAM12-S in coelomic fluid and maternal serum in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2006; 26: 1197-1200.

Marchenko GN & Strongin AY. MMP-28, a new matrix metalloproteinase with an unusual cysteine switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001; 265: 87-93.

Martinez-Ruiz A, Sarabia-Meseguer MD, Perez-Fornieles J et al. Placental growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and progesterone as diagnostic biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *Clin Biochem* 2014; 47: 844-847.

Menino AR et al. Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig. *Dev Genet* 1997; 21: 68-74.

Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML et al. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 1999; 274: 30563-30570.

Moncada-Pazos A et al. The ADAMTS-12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer. *J Cell Sci* 2009; 122(16): 2906-2913.

Morrish DW et al. Growth factors and trophoblast differentiation-Workshop report. *Placenta* 2007; 28: 121-124.

Muhlhauser J et al. Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(2): 165-173.

Murphy G. The ADAMs: signaling scissors in the tumour microenvironment. *Nature Rev Cancer* 2008; 8: 932-941.

Murphy G. Metalloproteinases: from demolition squad to master regulators. *Int J Exp Path* 2010; 91: 303-313.

Nagase H & Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 94-103.

Nagase H & Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.

Nakahama K, Yoshimura K, Marumoto R et al. Cloning and sequencing of Serratia protease gene. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 5843-5855.

Nakamura T, Abe H, Hirata A et al. ADAM family protein Mde 10 is essential for development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2004; 3: 27-39.

Nardi JB, Martos R, Walden KK et al. Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 1999; 29: 883-897.

Narita D, Anghel A, Seclaman E et al. Molecular profiling of ADAM12 gene in breast cancers. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51: 669-676.

National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management in early pregnancy of ectopic pregnancy and miscarriage. NICE Clinical Guidelines, RCOG 2012; 154.

Nawrocki B, Polette M, Marchand V et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression at the site of human placentation. *Placenta* 1996; 17: 565-572.

Nissi R, Talvensaari-Nattila A, Kotila V et al. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reprod Biol & Endocrinol* 2013; 11(2): 1-6.

Nyren-Erickson EK et al. A disintegrin and metalloproteinase-12 (ADAM12): Function, roles in disease progression, and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(10): 4445-4455.

Odland JO et al. Ectopic pregnancy and chlamydial serology. *Int J Gynecol Obstet* 1993; 43: 271-275.

Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H et al. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1751: 95-109.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272 : 2446-2451.

Palmer SS & Barnhart TK. Biomarkers in reproductive medicine : the promise, and can it be fulfilled ? *Fertil Steril* 2013; 99(4).

Paltieli Y, Eibschitz I, Ziskind G et al. High progesterone levels and ciliary dysfunction- A possible cause of ectopic pregnancy. *J Assisted Reprod & Genet* 2000; 17(2).

Paria BC et al. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296(5576): 2185-2188.

Parks WC, Wilson CL & Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 617-629.

Peduto L, Reuter VE, Sehara-Fujisawa A et al. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene* 2006; 25: 5462-5466.

Pendas AM, Balbin M, Llano E et al. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). ? 1997; 40: 222-233.

Perutelli P. Disintegrins: potent inhibitors of platelet aggregation. *Recenti Prog Med* 1995; 86: 168-174.

Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK et al. Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumor suppressor gene. *Hum Reprod* 2005; 4: 848-851.

Pietrowski D, Tempfer C, Bettendorf H et al. Angiopoietin-2 polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2003; 4: 1026-1029.

Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A et al. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Investig* 1994; 71: 838-846.

Pories SE et al. Urinary metalloproteinases: noninvasive biomarkers for breast cancer risk assessment. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2008; 17: 1034-1042.

Porter S et al. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 2005; 386: 15-27.

Porter S, Scott SD, Sasson EM et al. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2429-2440.

Porter S, Span PN, Sweep FC et al. ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 118: 1241-1247.

Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C et al. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 1993; 7: 2609-2617.

Puente XS & Lopez-Otin C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res* 2004; 14: 609-622.

Puente XS, Pendas AM, Llano E et al. Localization of the human membrane type 4-matrix metalloproteinase gene (MMP17) to chromosome 12q24. *Genomics* 1998; 54: 578-579.

Puistola U, Ronnberg L, Martikainen H et al. The human embryo produces basement membrane collagen (type IV collagen)-degrading protease activity. *Hum Reprod* 1989; 4: 309-311.

Rana P, Kazmi I, Singh R et al. Ectopic pregnancy: A review. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 747-757.

Rausch ME et al. ADAM-12 as a novel marker for the diagnosis of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1373-1378.

Rausch ME & Barnhart TK. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55(2): 418-423.

Refaat Bassem. Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: A review. *Reprod Biol & Endocrin* 2014; 12: 116.

Reiss K et al. Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol & Therap* 2006; 111: 985-1006.

Reiss K & Saftig P. The 'a disintegrin and metalloprotease' (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 126-137.

Richards JS, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I et al. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol Reprod* 2005; 72: 1241-1255.

Rodriguez-Manzaneque JC, Milchanowski AB, Dufour EK et al. Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *J Biol Chem* 2000; 275: 33471-33479.

Roghani M, Becherer JD, Moss ML et al. Metalloprotease-disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 3531-3540.

Roy R, Wewer UM, Zurakowski D et al. ADAM12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem* 2004; 279: 51323-51330.

Sappino AP, Huarte J, Belin D et al. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 1989; 109: 2471-2479.

Schlondorff J, Becherer JD & Blobel CP. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor- α convertase (TACE). *Biochem J* 2000; 347: 131-138.

Seals DF & Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Gen & Dev* 2003; 17: 7-30.

Segal S, Gor H, Correa N et al. Inhibin A: marker for diagnosis of ectopic and early abnormal pregnancies. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(6): 789-794.

Senapati S & Barnhart KT. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril* 2013; 99(4): 1107-1116.

Shao R. Understanding the mechanisms of human tubal ectopic pregnancies: new evidence from knockout mouse models. *Hum Reprod* 2010; 25(3): 584-587.

Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 602-608.

Shi Z, Xu W, Loechel F et al. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 2000; 275: 18574-18580.

Shimonovitz S, Hurwitz A, Dushnik M et al. Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kDa type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 832-838.

Shiomi T et al. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int* 2010; 60(7): 477-496.

Simpson RA, Mayhew TM & Barnes PR. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units : a study of nuclear number using the disector. *Placenta* 1992; 13(5): 501-512.

Sjoblom T et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-274.

Smith KM, Gaultier A, Cousin H et al. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 2002; 159: 893-902.

Somerville RPT et al. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Gen Biol* 2003; 4: 216.

Somerville RPT, Longpre JM, Jungers KA et al. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem* 2003; 278: 9503-9513.

Sternlicht MD, Bissell MJ & Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000; 19: 1102-1113.

Sternlicht MD & Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.

Stöcker W & Bode W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5: 383-390.

Stöcker W, Grams F, Baumann U et al. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 1995; 4: 823-840.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 5331-5338.

Tabibzadeh S & Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995; 10(6): 1579-1602.

Takacs P, Jaramillo S, Datar R et al. Placental mRNA in maternal plasma as a predictor of ectopic pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* 2012; 117(2): 131-133.

Takeda S, Igarashi T, Mori H et al. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 2006; 25: 2388-2396.

Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 33-44.

Tay J, Moore J & Walker JJ. Ectopic pregnancy. *West J Med* 2000; 173(2): 131-134.

Tehrani HG, Hamoush Z, Ghasemi M et al. Ovarian ectopic pregnancy : A rare case. *Iran J Reprod med* 2014; 12(4): 281-284.

Tryggvason K, Hoyhtya M & Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987; 907: 191-217.

van Mello NM, Mol F, Ankum WM et al. Ectopic pregnancy: how the diagnostic and therapeutic management has changed. *Fertil Steril* 2012a; 98: 1066-1073.

Varma R & Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *Clin Evid Online* 2009; Pii: 1406.

Vazquez F, Hastings G, Ortega MA et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 23349-23357.

Velasco G, Cal S, Merlos-Suares A et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 877-882.

Velasco G, Pendas AM, Fueyo A et al. Cloning and characterization of human MMP-23 a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* 1999; 274: 4570-4576.

Vergheze T, Wahba K & Shah A. An interesting case of intramyometrial pregnancy. *BMJ Case Reports* 2012.

Verma RP & Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q) SARs. *Bioorg & Med Chem* 2007; 15: 2223-2268.

Vincent B, Paitel E, Saftig P et al. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 37743-37746.

Walker J. Ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 89-99.

Walters MD et al. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* and risk for tubal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 942-946.

Weber S & Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 2012; 139: 3693-3709.

Werb Z, Adler CM & Adler RR. Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix* 1992; 1: 337-343.

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 598-606.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.

Woessner JF & Nagase H. Introduction to the matrix metalloproteinases (MMPs). *Matrix metalloproteinases and TIMPS* 2001; pp1-10. Eds JF Woessner & H Nagase. New York: Oxford University Press.

Xu P, Wang YL, Piao YS et al. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod* 2001; 65: 240-246.

Xu P, Wang YL, Zhu SJ et al. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod* 2000; 62: 988-994.

Yang X et al. Increased expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) is associated with the invasion of endometrial adenocarcinoma. *Pathol-Res and Pract* 2007; 203: 499-505.

Yong VW, Power C, Forsyth P et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Rev Neurosci* 2001; 2: 502-511.

Zee J, Sammel MD, Chung K et al. Ectopic pregnancy prediction in women with a pregnancy of unknown location: data beyond 48h are necessary. *Hum Reprod* 2014; 29(3): 441-447.

Zhao Z et al. Circulating miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem* 2012; 58(5): 896-905.

Zhou AX et al. The metalloprotease ADAM12 regulates the effector function of human Th17 cells. PLoS ONE 2013; 8(11): e81146.

Zolkiewska A. Disintegrin-like/cysteine-rich region of ADAM12 is an active cell adhesion domain. Exp Cell Res 1999; 252: 423-431.