

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ»**

**ΜΟΥΡΜΟΥΡΑ ΕΥΑΝΘΙΑ
ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ
ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΡΑΚΗΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ
2010**

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Ι.Ε ΜΕΣΣΗΝΗΣ, Επιστημονικός Υπεύθυνος Προγράμματος Μεταπτυχιακών
Σπουδών, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ, Διδάκτωρ Ιατρικής Πανεπιστημίου
Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ	
2.1 ΧΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΗ (hCG)	9
2.2 ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH).....	9
2.3 ΛΕΠΤΙΝΗ.....	10
2.4 ΓΛΥΚΟΔΕΛΙΝΗ	10
2.5 Wnt signaling	11
2.6 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	12
2.7 ΓΟΝΙΔΙΑ HOX.....	14
2.8 ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ (PGs)	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ	
3.1 ΜΕΤΤΑΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMP).....	15
3.2 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ.....	17
3.2.1 ΛΕΥΚΕΜΙΑ INHIBITORY FACTOR (LIF)	17
3.2.2 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-11 (IL-11)	19
3.2.3 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-6 (IL-6)	20
3.2.4 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-1 (IL-1)	21
3.2.5 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-15 (IL-15).....	22
3.2.6 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-12 (IL-12)/ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-18 (IL-18).....	22
3.2.7 MACROPHAGE – COLONY STIMULATING FACTOR (M-CSF)....	23
3.3 ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ	24
3.3.1 ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ.....	24
3.3.2 ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ.....	25
3.3.3 ΚΑΝΤΕΡΙΝΕΣ	26
3.3.4 ΜΟΥΚΙΝΕΣ.....	27
3.4 ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	28
3.4.1 INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR (IGF).....	28
3.4.2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β (TGF-β).....	29
3.4.3 HEPARIN-BINDING EPIDERMAL GROWTH FACTOR (HB-EGF).	29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η φυσιολογική γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στη λήκυθο των σαλίγγων του αναπαραγωγικού συστήματος της γυναίκας και αφορά την ένωση του αρσενικού και θηλυκού προπυρήνα ώστε να προκύψει ο ζυγώτης που θα δώσει το έμβρυο.

Το προϊόν της εκσπερμάτισης αποτελείται από σπερματικό πλάσμα, σπερματοζωάρια και ανασταλτικούς για την ενεργοποίησή τους παράγοντες και τοποθετείται στον οπίσθιο κολπικό θόλο, ενώ ρευστοποιείται εντός 15-20 λεπτών. Όσα σπερματοζωάρια καταφέρουν να αποχωριστούν το σπερματικό πλάσμα εισέρχονται στη μητρική κοιλότητα και από εκεί στις σάλπιγγες. Λόγω φυσικής επιλογής, τους φραγμούς διαπερνούν σπερματοζωάρια καλής κινητικότητας και χωρίς μορφολογικές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Τα σπερματοζωάρια πριν συναντήσουν το ωάριο πρέπει να έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία της ενεργοποίησης, της απόκτησης δηλαδή γονιμοποιητικής ικανότητας. Η συγκεκριμένη διαδικασία αφορά βιοχημικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις των σπερματοζωαρίων ώστε να καταφέρουν να γονιμοποιήσουν και να σταθεροποιήσουν την πλασματική τους μεμβράνη. Σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος σπέρματος όπου με την χρήση ειδικών καλλιεργητικών υλικών και την εφαρμογή διαδοχικών φυγοκεντρήσεων απομονώνονται τα σπερματοζωάρια καλύτερης μορφολογίας και κινητικότητας.

Στη συνέχεια τα σπερματοζωάρια που φτάνουν στις σάλπιγγες πρέπει να περάσουν από δύο στοιβάδες κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο. Πρόκειται για τη στοιβάδα του ωοφόρου δίσκου (εξωτερική στοιβάδα) που αποτελείται από κοκκιοκύτταρα και υαλουρονικό οξύ και τη διάφανα ζώνη που δεν αποτελείται από κύτταρα αλλά από τις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP2 και ZP3 ενωμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Όταν το σπερματοζωάριο συναντήσει το ωάριο, απελευθερώνει το ένζυμο υαλουρονιδάση ώστε να διαπεράσει τη στοιβάδα του ωοφόρου δίσκου. Στη συνέχεια παρατηρούνται μεταβολές των μεμβρανών του σπερματοζωαρίου και κυρίως του ακροσωμίου. Απελευθερώνεται το ένζυμο ακροσίνη (ακροσωμική αντίδραση) για τη διάλυση της διάφανης ζώνης και για να διευκολύνει την είσοδο των υπερκινούμενων σπερματοζωαρίων.

Με την ολοκλήρωση των διαδικασιών της ενεργοποίησης και της ακροσωμικής αντίδρασης, το σπερματοζώαριο ενώνεται με τη λεκιθική μεμβράνη του ωαρίου. Με την είσοδό του στο ωάριο, απελευθερώνονται από τα φλοιώδη κοκκία ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) που προκαλούν μεταβολές στη μεμβράνη του ωαρίου (μεταξύ ωαρίου και διάφανης ζώνης) ώστε να αποφευχθεί η πολυσπερμία.

Έπειτα πραγματοποιείται η σύντηξη των μεμβρανών του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου και έτσι το ωάριο ολοκληρώνει το στάδιο της μετάφασης II που χρονικά συμπίπτει με τη γονιμοποίηση και προχωρά στην ανάφαση II παράγοντας ένα ακόμη πολικό σωματίο. Οι δύο προπυρήνες συντήκονται και με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ο ζυγώτης.

Ο ζυγώτης διαιρείται μιτωτικά με τις μιτώσεις αυτές να ονομάζονται αυλακώσεις. Στις διαιρέσεις αυτές ο ζυγώτης υποδιαιρείται σε βλαστομερίδια και δεν παρατηρείται κυτταρική αύξηση. Τη δεύτερη ημέρα της γονιμοποίησης το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο των 2-4 κυττάρων, την τρίτη ημέρα στο στάδιο των 6-12 κυττάρων, την τέταρτη ημέρα στο στάδιο των 16-32 κυττάρων και την Πέμπτη ημέρα στο στάδιο της βλαστοκύστης. Στο στάδιο του μοριδίου (32 κύτταρα) πραγματοποιείται η διαδικασία της σύμπτυξης που αφορά τη δημιουργία πολικότητας καθώς επίσης σχηματίζεται στο εσωτερικό του μοριδίου η κοιλότητα της βλαστοκύστης.

Στο στάδιο της βλαστοκύστης το έμβρυο εμφυτεύεται στο ενδομήτριο της μήτρας. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιούνται τα εξής δύο γεγονότα απαραίτητα για την εμφύτευση: α) η εκκόλαψη της διάφανης ζώνης και β) ο διαχωρισμός των κυττάρων σε εσωτερική στοιβάδα από τα κύτταρα της οποίας προκύπτει το έμβρυο και σε εξωτερική στοιβάδα από όπου προέρχεται η τροφοβλάστη.

Οι παραπάνω διαδικασίες αναφέρονται στη φυσιολογική γονιμοποίηση και είναι αυτές που σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής προσπαθούμε να μιμηθούμε με την χρήση μεθόδων και καλλιερητικών υλικών που προσδίδουν την ψευδαίσθηση του φυσικού τους περιβάλλοντος σε ωάρια και σπερματοζώαρια. Στόχος των τεχνικών αυτών είναι επίτευξη μεγαλύτερων ποσοστών εμφύτευσης και κήσεως για περιπτώσεις υπογονιμότητας, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αντρικό ή γυναικείο παράγοντα ή ακόμα και σε περιστατικά ανεξήγητης υπογονιμότητας.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη των μηχανισμών και κυρίως μοριακής φύσεως μηχανισμών που ευθύνονται για την εμφύτευση των εμβρύων και πώς αυτοί επηρεάζουν τα ποσοστά εμφύτευσης σε περιπτώσεις κλασσικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και γενικά σε περιπτώσεις γονιμοποίησης in vitro.

1 - ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ

Η εμφύτευση του εμβρύου αποτελεί ένα από τα σημαντικά βήματα για την επιτυχή επίτευξη κύησης και προϋποθέτει την ωρίμανση του γονιμοποιημένου εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης και την δημιουργία υποδεκτικού ενδομητρίου (Psychoyos et al., 1986). Επίσης απαραίτητη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ βλαστοκύστης και υποδεκτικού ενδομητρίου (Nardo et al., 2006) που περιλαμβάνει πολλούς παρακρινικούς, ενδοκρινικούς και αυτοκρινικούς παράγοντες.

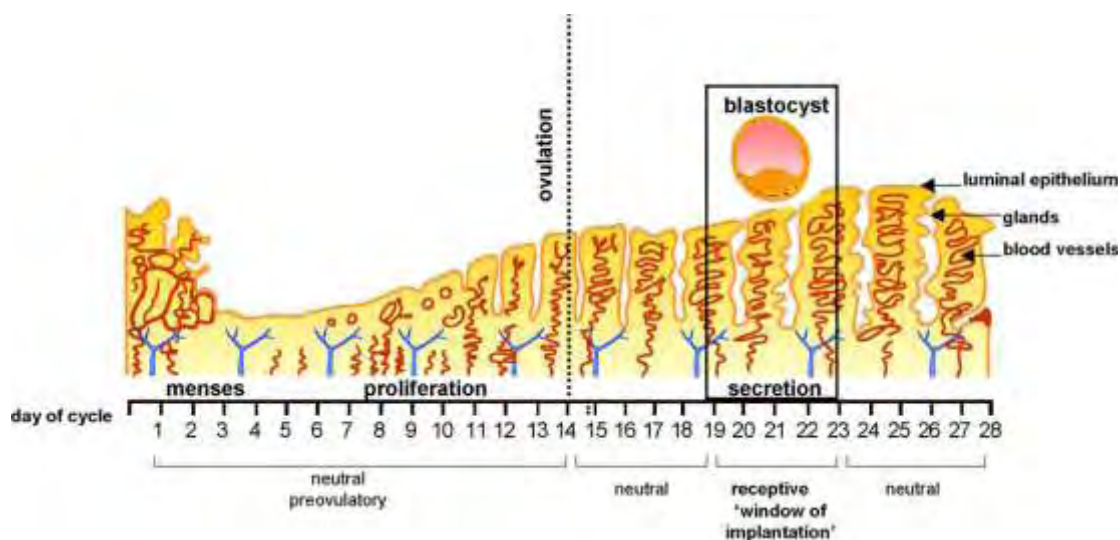
Για να μπορέσει να γίνει η εμφύτευση της βλαστοκύστης το ενδομήτριο θα πρέπει να μετατραπεί σε φθαρτό. Στον άνθρωπο αυτή η διαδικασία της φθαρτοποίησης πραγματοποιείται αυτόματα κατά την εκκριτική φάση του κύκλου υπό την επίδραση των ωοθηκικών στεροειδών. Κατά την προετοιμασία του ενδομητρίου τροποποιούνται τα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου, τα αδένια, τα αγγεία και ο πληθυσμός των ανοσοκυττάρων, με σκοπό την επιτυχή εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου (Guzeloglu-Kaysli et al., 2007 ; Aghajanova et al., 2008 ; Van Mourik et al., 2009).

Η διαδικασία της εμφύτευσης πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις: προσθήκη, προσκόλληση και διείσδυση. Η πρώτη φάση θεωρείται ως μη σταθερή προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδόμητριο και κατά τη διάρκειά της η τροφοβλάστη τοποθετείται κοντά στο βασικό επιθήλιο (Guzeloglu-Kaysli et al., 2007 ; Paiva et al., 2009). Στη δεύτερη φάση της εμφύτευσης, τοπικοί παρακρινικοί παράγοντες δρουν ώστε να σταθεροποιήσουν την προσκόλληση της βλαστοκύστης. Τέλος, η διείσδυση περιλαμβάνει την είσοδο του εμβρύου μέσω του βασικού επιθηλίου στο στρώμα ώστε να ξεκινήσει η επικοινωνία του με την μητέρα. Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος μεταναστεύουν μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και η τροφοβλάστη αρχίζει να αλληλεπιδρά με το στρώμα (Guzeloglu-Kaysli et al., 2007 ; Makrigiannakis and Minas., 2007). Απάντηση στη διείσδυση της τροφοβλάστης είναι η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου.

Αρχικά κατά την παραγωγική φάση του κύκλου, η οιστραδιόλη (E2) που παράγεται από το επικρατές ωοθυλάκιο, επάγει την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) και προγεστερόνης (PRs) στο στρώμα και στα αδένια του ενδομητρίου, με σκοπό την φθαρτοποίησή του κατά την εκκριτική φάση του κύκλου υπό την επίδραση της προγεστερόνης που παράγεται από το ωχρό σωματίο. Σε ένα κύκλο 28 ημερών, το ενδομήτριο είναι υποδεκτικό κατά την 20^η – 23^η ημέρα. Το

χρονικό αυτό διάστημα αποτελεί το «παράθυρο της εμφύτευσης» (Navot et al., 1991) (Εικ.1) χαρακτηριστικό του οποίου είναι η εμφάνιση των πινοποδίων. Τα πινοπόδια εντοπίζονται στην βασική στοιβάδα του ενδομητρίου και είναι αποτέλεσμα της δράσης της προγεστερόνης (Martel et al., 1987 ; Makrigiannakis and Minas, 2007 ; Van Mourik et al., 2009).

Όλα τα παραπάνω λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στο ενδομήτριο μέσω πολύπλοκων μηχανισμών. Στην εμφύτευση ενέχονται τέσσερις κατηγορίες μοριακών παραγόντων που αφορούν κυτοκίνες, μόρια προσκόλλησης, μεταλοπρωτεΐνάσες και αυξητικούς παράγοντες, ενώ επίσης ενέχονται και πληθώρα άλλων παραγόντων όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και διάφορα άλλα μόρια.



Εικόνα 1 : παράθυρο εμφύτευσης

2 - ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

2.1 ΧΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΗ (HCG)

Η χοριακή γοναδοτροπίνη αποτελεί το σήμα που στέλνει το έμβρυο προς την ωοθήκη ότι υπάρχει κύηση. Ο ρόλος της έγκειται στη διάσωση του ωχρού σωματίου ώστε να διατηρηθεί επαρκής η παραγωγή της προγεστερόνης για να υποστηριχθεί η κύηση, ενώ μελέτες έχουν αποδείξει και την επίδρασή της στο ενδομήτριο.

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι η χοριακή γοναδοτροπίνη συμβάλλει στην εμφύτευση επάγοντας κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτή όπως ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (LIF), ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και η πρωτεΐνη insulin growth factor binding protein-1 (IGFBP-1). Επίσης πειραματικά δεδομένα in vitro έχουν δείξει ότι η χοριακή γοναδοτροπίνη αυξάνει την έκφραση του mRNA της κυκλο-οξυγενάσης-2 και τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E2 στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι κατά το παράθυρο της εμφύτευσης η HCG τροποποιεί το ανοσολογικό περιβάλλον της μήτρας, αναστέλλει τη απόπτωση και επάγει τη διαφοροποίηση του στρώματος του ενδομητρίου (Makrigiannakis and Minas., 2007).

Παρόλα όμως τα παραπάνω, απαιτούνται περισσότερα πειραματικά δεδομένα για να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος της κατά την εμφύτευση.

2.2 ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH)

Η CRH παράγεται τοπικά στο ενδομήτριο και μελέτες έχουν δείξει ότι παίζει ρόλο στην εμφύτευση ως ρυθμιστικός παράγοντας με παρακρινή και αυτοκρινή ρόλο. Εκφράζεται από τα αδένια του ενδομητρίου και η ρύθμιση του γονιδίου της γίνεται θετικά από την προγεστερόνη και αρνητικά από τα οιστρογόνα και την κορτιζόλη.

Πειράματα έχουν αποδείξει ότι η CRH ενέχεται στην φθαρτοποίηση του ενδομητρίου ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει και την έκφραση παραγόντων που επίσης συμμετέχουν σε αυτή όπως ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ιντερλευκίνη-6 (IL-6) (Makrigiannakis et al., 2004 ; Zoumakis et al., 2009). Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η CRH παράγεται στο φθαρτοποιημένο ενδομήτριο στη σημείο εμφύτευσης (Makrigiannakis and Minas., 2007) και στην διεισδυτική τροφοβλάστη στο σημείο όπου υπάρχει συνύπαρξη εμβρύου και μητέρας ώστε να επιτευχθεί ανοσοανοχή στα πρώτα στάδια της εμφύτευσης.

2.3 ΛΕΠΤΙΝΗ

Ένα άλλο μόριο το οποίο έρευνες έχουν δείξει ότι ενέχεται στην εμφύτευση είναι η λεπτίνη. Η λεπτίνη μαζί με τον υποδοχέα της (OB-R) εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο και για την μεταγωγή του ενδοκυτταρικού της σήματος χρησιμοποιείται το μονοπάτι JAK/STAT. Μελέτες έχουν δείξει ότι επηρεάζει την έκφραση των κυττοκινών και αυξάνει την έκφραση της ιντεγκρίνης β_3 . Επίσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει μόρια που ενέχονται στη διαμόρφωση των ιστών όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και ίσως να επιδρά στην παραγωγή της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Νεότερα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η λεπτίνη και ο υποδοχέας της εκφράζονται στην βλαστοκύστη, ενώ επίσης παρατηρείται παραγωγή της από το έμβρυο στο παράθυρο εμφύτευσης κατά τη διάρκεια του οποίου επικοινωνεί με το σύστημα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1). Τέλος πειράματα σε ποντίκια έχουν αποδείξει ότι ποντίκια με ανεπάρκεια λεπτίνης είναι παχύσαρκα και στείρα καθώς επηρεάζεται η διαδικασία της εμφύτευσης, αλλά σε αυτά η γονιμότητα αποκαθίσταται με εξωγενή χορήγηση λεπτίνης (Van Mourik et al., 2009).

2.4 ΓΛΥΚΟΔΕΛΙΝΗ

Η γλυκοδελίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 24 kDa που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και αποτελεί δείκτη για την υποδεκτικότητα αυτού. Είναι δύσκολο να εντοπιστεί κατά την παραγωγική φάση του κύκλου, αλλά τα επίπεδά της αυξάνονται σταθερά κατά την εκκριτική φάση και τα πρώτα στάδια της κύησης. Μελέτες για την γονιδιακή έκφραση υποστηρίζουν ότι η έκφρασή της διεγείρεται κατά το παράθυρο της εμφύτευσης. Η προγεστερόνη φαίνεται να είναι ο κύριος διεγέρτης της καθώς τα επίπεδά τους αυξάνονται ταυτόχρονα κατά την εκκριτική φάση του κύκλου. Ένα άλλο μόριο που προκαλεί την παραγωγή της γλυκοδελίνης *in vivo* και *in vitro* είναι η ρηλαξίνη που παράγεται από το ωχρό σωματίο, ενώ επίσης πειράματα σε βαβουΐνους έχουν δείξει ότι η παραγωγή της επηρεάζεται και από τη χοριακή γοναδοτροπίνη.

Έρευνες υποστηρίζουν ότι συμμετέχει στη διαμόρφωση τοπικού περιβάλλοντος ανοσοανοχής για την μητέρα προς το έμβρυο, καθώς *in vitro* εμποδίζει τη μετανάστευση των T-λεμφοκυττάρων και τη λύση των κυττάρων από τα φονικά κύτταρα (NK cells) (Van Mourik et al., 2009).

2.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

Οι Wnt πρωτεΐνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μορίων πλούσια σε κυστεΐνη που ενέχονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων (Cadigan et al., 1998 ; Van and Berns., 2006 ; Chen et al., 2009). Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος όπου συμμετέχουν εντοπίζεται σε γεγονότα πριν και κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Στοιχεία του μονοπατιού είναι η πρωτεΐνη Dickkopf 1 (DKK-1) με τα επίπεδά της να είναι χαμηλά στην παραγωγική φάση και να αυξάνονται στην όψιμη ωχρινική φάση φυσικού κύκλου, η Dickkopf 2 (DKK-2) που παρουσιάζει την εκκριτική της αιχμή στη μέση ωχρινική φάση και η frizzled-related protein 4 (sFRP4) με υψηλά επίπεδα στην παραγωγική φάση φυσικού κύκλου. Το μονοπάτι ενεργοποιείται με την πρόσδεση των Wnt πρωτεϊνών σε δύο κατηγορίες υποδοχέων, α) την οικογένεια των Frizzled πρωτεϊνών και β) τον LRP5/6 (lipoprotein receptor related protein 5 and 6). Επίσης υπάρχουν δύο ομάδες ανταγωνιστών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις Wnt ligand-binding πρωτεΐνες και η δεύτερη τις πρωτεΐνες της οικογένειας Dickkopf (Kawano and Krypta., 2003 ; Liu et al., 2009).

Όσο αφορά τη δεύτερη κατηγορία ανταγωνιστών, από μελέτες που έγιναν σε ποντίκια από τον Li και την ομάδα του το 2008 αποδείχθηκε ότι η DKK-1 εκφράζεται στα κύτταρα του στρώματος της μήτρας και τα επίπεδα της αυξάνονται από την ωοθυλακική διέγερση για κύκλους IVF κατά το παράθυρο της εμφύτευσης, σε αντίθεση με τα άλλα δύο στοιχεία του μονοπατιού Wnt που τα επίπεδα τους επηρεάζονται αρνητικά από την διέγερση των ωοθηκών. Επίσης πειραματικά δεδομένα της ίδιας ομάδας έδειξαν ότι ένεση με antisense ολιγονουκλεοτίδο DKK-1 στη μήτρα ποντικών την τρίτη ημέρα της γονιμοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία της εμφύτευσης (Liu et al., 2009) ενώ επίσης το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η μείωση των επιπέδων έκφρασης της DKK-1 σε φυσικούς αλλά και σε ορμονικά διεγερόμενους κύκλους.

2.6 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Είναι γνωστό ότι η εμφύτευση χαρακτηρίζεται από ένα τοπικό περιβάλλον ανοσοανοχής ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη του εμβρύου από την μητέρα. Στη δημιουργία αυτού του περιβάλλοντος συμβάλλουν αρκετοί παράγοντες που αφορούν φονικά κύτταρα (NK cells), μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα.

Τα NK cells εντοπίζονται στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του φυσικού κύκλου και ο μέγιστος αριθμός του παρατηρείται κατά την όψιμη εκκριτική φάση και κατά το παράθυρο της εμφύτευσης. Φαινοτυπικά παρουσιάζουν ομοιότητες με τα CD54⁺ περιφερικά NK κύτταρα αν και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης έχουν διαφορές. Μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο τους στη φθαρτοποίηση και εμφύτευση καθώς σε ποντίκια με ανεπάρκεια NK κυττάρων η εμφύτευση παρουσιάζει ανωμαλίες. Επίσης ρόλο διαδραματίζει στην αγγείωση του ενδομητρίου στα ποντίκια παράγοντας VEGF (vascular endothelial growth factor), ο οποίος ελέγχει την ανοσολογική απόκριση της μητέρας ρυθμίζοντας την έκφραση των κυτοκινών (Guzeloglou-Kayisli et al., 2007 ; Van Mourik et al., 2009).

Τα επίπεδα των NK κυττάρων στο ενδομήτριο ρυθμίζονται από πληθώρα παραγόντων. Αρχικά τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη έχουν συσχετιστεί με τις κυκλικές μεταβολές τους αν και τα NK κύτταρα δεν εκφράζουν υποδοχείς προγεστερόνης. Επίσης οι χυμοκίνες, η ιντερλευκίνη-15 (IL-15) και η ιντερλευκίνη-11 (IL-11) ευθύνονται για την διαφοροποίηση και ωρίμανσή τους, ενώ η ιντερλευκίνη-12 (IL-12) και/ή ιντερλευκίνη-18 (IL-18) τα ενεργοποιούν για την παραγωγή IFN- γ (Guzeloglou-Kayisli et al., 2007 ; Van Mourik et al., 2009).

Τα μακροφάγα επίσης συμμετέχουν στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και στην εμφύτευση. Παραμένουν σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και έρευνες έχουν δείξει ότι διεγείρονται από την ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Μία πρόσφατη in vitro μελέτη απέδειξε ότι η τροφοβλάστη είναι ικανή να ανακτήσει μακροφάγα και διεγείροντάς τα να παράγει κυτοκίνες απαραίτητες στην εμφύτευση. Επιπλέον τα μακροφάγα παίζουν ρόλο κλειδί απαλλάσσοντας τον οργανισμό από αποπτωτικό υλικό ώστε να επιτευχθεί σωστά η εμφύτευση και προετοιμάζουν το ενδομήτριο διατηρώντας την ισορροπία στην παραγωγή κυτοκινών.

Επίσης από ανοσολογικής πλευράς, ρόλο στην εμφύτευση διαδραματίζουν και τα T-λεμφοκύτταρα μέσω της ισορροπίας των TH₁ και TH₂ αντιδράσεων (Van Mourik et al., 2009). Η εμφύτευση υποστηρίζεται από την TH₂ αντίδραση όπου παρατηρείται υπερπαραγωγή ιντερλευκίνης-4 (IL-4), ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και ιντερλευκίνης-10 (IL-10), ενώ η TH₁ αντίδραση έχει συσχετιστεί με την αποτυχία εμφύτευσης και την αποβολή καθώς η παραγωγή IFN-γ και TNF-α έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροτοξικών κυττάρων που καταστρέφουν την τροφοβλάστη. Τα παραπάνω αποδείχθηκαν με δύο μελέτες το 2000 και το 2004 από τις ομάδες του Lim και Shimada αντίστοιχα (Laird et al., 2006). Η πρώτη ομάδα μελέτησε την έκφραση του mRNA των TH₁ και TH₂ κυτοκινών στο ενδομήτριο γυναικών με υπογονιμότητα συγκρινόμενα με γόνιμες γυναίκες στο διάστημα πριν και κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και απέδειξε ότι γυναίκες με αποτυχία εμφύτευσης ή αποβολή είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση IFN-γ και TNF-α και λιγότερη της IL-6. Η δεύτερη μελέτη κατέληξε σε διαφορετικά συμπεράσματα αποδεικνύοντας ότι στις υπογόνιμες γυναίκες η συγκέντρωση των IFN-γ και TNF-α είχε μειωθεί στις αντίστοιχες περιπτώσεις.

Η διαφωνία των δύο μελετών επέφερε αντιδράσεις ως προς τη θεωρία της ισορροπίας TH₁ / TH₂ κυτοκινών καθώς πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι η δραστηριότητα TH₁ είναι απαραίτητη κατά τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης. Σε αυτό το χρονικό διάστημα μόρια όπως ο παράγοντας TNF-α καθιστούν δυνατή την κύηση διεγείροντας την παραγωγή του leukemia inhibitory factor (LIF) ή αυξάνοντας την αγγειογένεση. Αξιόλογο είναι το γεγονός ότι η TH₁ δραστηριότητα διεγείρει επίσης την παραγωγή των TH₂ κυτοκινών σύμφωνα με πειράματα knock-out που διεξήχθησαν σε ποντίκια.

Συμπερασματικά παρ' όλες τις αντιδράσεις, γίνεται αποδεκτή η θεωρία της ισορροπίας των TH₁ / TH₂ κυτοκινών, ενώ παράλληλα οι έρευνες συνεχίζονται για να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος τους στην εμφύτευση.

2.7 ΓΟΝΙΔΙΑ HOX

Τα γονίδια HOX είναι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του εμβρύου. Έρευνες έχουν δείξει ότι δύο από την οικογένεια των HOX γονιδίων, το Hoxa10 και Hoxa11, είναι σημαντικά για την εμφύτευση σε ποντίκια, καθώς μεταλλάξεις τους επηρεάζουν την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και κατ' επέκταση την εμφύτευση. Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα δύο αυτά γονίδια εμπλέκονται και στην εμφύτευση στον άνθρωπο όπου εκφράζονται από κύτταρα του στρώματος της μήτρας (Benson et al., 1996; Guzeloglou-Kayisli et al., 2007), με την έκφρασή τους να αυξάνεται δραματικά στο παράθυρο της εμφύτευσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης παραμένει άγνωστος, αν και ποντίκια ομοζυγωτικά ως προς την έλλειψη του Hoxa10 και Hoxa11 παρουσιάζουν μεταμόρφωση μικρού τμήματος της μήτρας και εμφύτευση με επιπλοκές δεδομένου ότι το ενδομήτριο χαρακτηρίζεται από μειωμένη υποδεκτικότητα (Benson et al., 1996 ; Lim et al., 1999 ; Daftary 2000).

2.8 ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ (PGs)

Οι προσταγλανδίνες ανήκουν στην οικογένεια των εικοσανοειδών και αποτελούνται από τέσσερα μέλη : την προσταγλανδίνη PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} και την προστακυκλίνη PGI₂ που προέρχονται από μεμβρανικά φωσφολιπίδια με τη δράση των ενζύμων κυκλο-οξυγενάση (COX) και τη φωσφολιπάση A2 (cPLA2). Έχουν αναφερθεί τρεις ισομορφές κυκλο-οξυγενάσης : η COX1, COX2 και COX3 (Smith and Dewitt., 1996 ; Vane et al., 1998 ; Achache and Revel., 2006).

Μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη των ενζύμων COX2 και cPLA2 απέδειξαν το ρόλο των προσταγλανδινών στην εμφύτευση. Ανεπάρκεια των συγκεκριμένων ενζύμων οδηγεί σε ελαττωματική σύνθεση των προσταγλανδινών με αποτέλεσμα εμφύτευση με προβλήματα. Συγκεκριμένα, cPLA2 knock-out ποντίκια χαρακτηρίζονται από καθυστερημένη εμφύτευση, μικρότερου μεγέθους έμβρυα και ίσως αποτυχία κήσεως (Ye et al., 2005).

3 - ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

3.1 ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMP)

Η διαμόρφωση των ιστών και η αγγειογένεση αποτελούν δύο χαρακτηριστικά γεγονότα της φθαρτοποίησης του ενδομητρίου και της εμφύτευσης. Παράγοντες κλειδιά στα γεγονότα αυτά είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP = matrix metalloproteinases) και οι αναστολείς τους (TIMP = tissue inhibitors of metalloproteinases). Οι MMP αποτελούν μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών δομικά και λειτουργικά όμοιων. Εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του εξωκυττάρου χώρου, ρυθμίζουν την προσκόλληση κυττάρων και επηρεάζουν τις κυκλικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του φυσικού κύκλου που υφίστανται μακρομόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο, η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη και οι πρωτεογλυκάνες. Η δράση τους χαρακτηρίζεται ζυμογόνος και εξαρτάται από ένα ιόν μετάλλου π.χ Zn^{2+} ή Ca^{2+} στο ενεργό τους κέντρο, ενώ η δραστηριότητά τους μπορεί να ανασταλεί από τους ενδογενείς αναστολείς τους, τους TIMP. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο περίπου 25 μεταλλοπρωτεϊνάσες των οποίων η οικογένεια αποτελείται από τέσσερα μέλη : τις κολλαγενάσες, ζελατινάσες, στρωμαλυσίνες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μεμβρανικού τύπου (Guzeloglou-Kayisli et al., 2007).

Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) και οι αναστολείς τους (TIMP) είναι απαραίτητοι παράγοντες της εμφύτευσης και συμμετέχουν *in vitro* στη διείσδυση της τροφοβλάστη. Η έκφρασή τους επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως από τον TGF- β και την κυτοκίνη ιντερλευκίνη-1 (IL-1) που εκφράζονται από φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα και κύτταρα της τροφοβλάστης. Ενδείξεις για την συμμετοχή τους στην εμφύτευση προήλθαν αρχικά από πειράματα σε ποντίκια με έλλειψη του παράγοντα Ets-2 και της MMP-9, στα οποία παρατηρήθηκε ότι ανεπάρκεια των δύο αυτών παραγόντων κατέληγε σε αποτυχία της εμφύτευσης. Ο παράγοντας Ets-2 ανήκει σε οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και έρευνες σε ποντίκια που υπερεκφράζουν τον αναστολέα TIMP-1. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 28.5 kDa που προσδένεται στοιχειομετρικά για τον σχηματισμό συμπλόκου από την κολλαγενάση-1, στρωμαλυσίνη-1 και την MMP-9. Ίδια δράση παρουσιάζει και ο αναστολέας

TIMP-2, ενώ ανασταλτική στο σύμπλοκο δράση έχει ο αναστολέας TIMP-3. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) στο τοίχωμα της μήτρας ποντικών οδηγεί σε εξασθένηση της διείσδυσης της τροφοβλάστη in vitro (Huang., 2007).

Συμπερασματικά, υπάρχουν απλώς ενδείξεις ότι η ισορροπία μεταξύ μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους είναι σημαντική για την εμφύτευση, καθώς δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο ελέγχονται τα γονίδια τους. Το σίγουρο είναι ότι δίκτυο αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών έχει συσχετιστεί με την έκφραση και δράση των MMP και TIMP (Vu and Werb., 2000).

3.2 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ

Ο μοριακός διάλογος μεταξύ βλαστοκύστης και του υποδοκτικού ενδομητρίου περιλαμβάνει μια σειρά κυτοκινών, των οποίων η δράση ρυθμίζεται κυρίως από τα ωοθηκικά στεροειδή. Οι κυτοκίνες είναι μικρές γλυκοπρωτεΐνες που ο ρόλος τους έχει συσχετιστεί με την εμφύτευση. Μια μεγάλη κατηγορία κυτοκινών είναι αυτές της οικογένειας IL-6. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τον leukemia inhibitory factor (LIF), την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), την ιντερλευκίνη-11 (IL-11), τον neurothrophic factor, την cardiotrophin και την oncostatin M. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι προσδένονται στους υποδοχείς του σχηματίζοντας ετεροδιμερές με την gp130 και έπειτα η μεταγωγή σήματος στο ενδομήτριο γίνεται μέσω μονοπατιού JAK/STAT. Επίσης στην εμφύτευση ενέχονται και άλλες κυτοκίνες που αφορούν τα συστήματα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), ιντερλευκίνης-15 (IL-15), ιντερλευκίνης-12 (IL-12), ιντερλευκίνης-18 (IL-18) και του macrophage colony-stimulating factor (M-CSF).

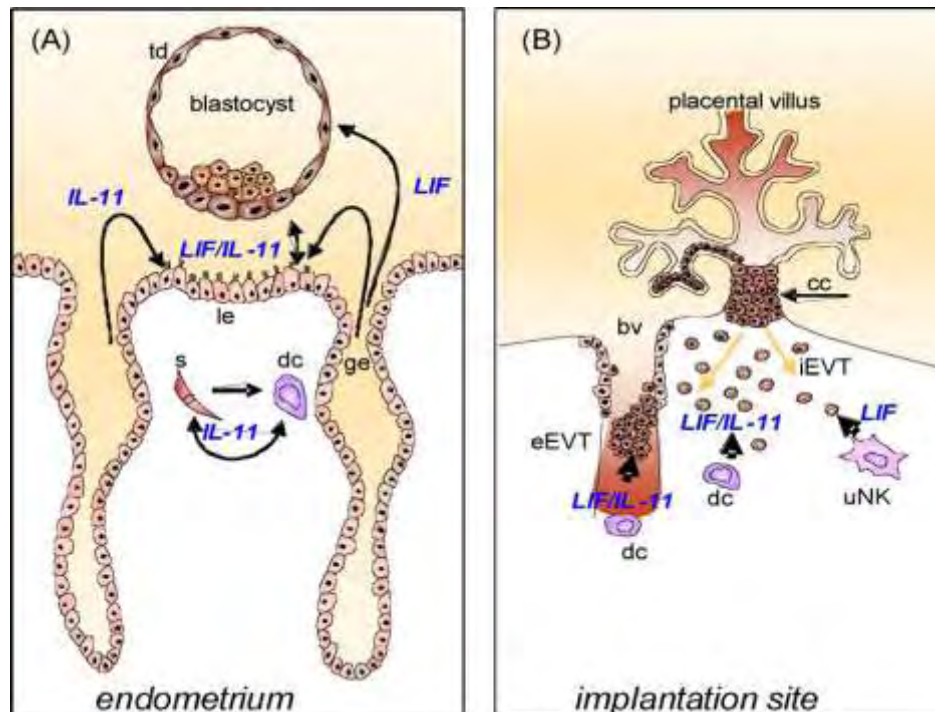
3.2.1 Leukemia inhibitory factor (LIF)

Ο LIF είναι μία προφλεγμονώδη κυτοκίνη που αρχικά περιγράφηκε ως παράγοντας που προκαλεί τη διαφοροποίηση των μακροφάγων. Εκφράζεται στο βασικό επιθήλιο 6-9 ημέρες μετά την εκκριτική αιχμή της LH (Aric et al., 1995 ; Sharkey et al., 1995 ; Dimitriadis et al., 2000 ; Van Mourik et al., 2009) με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του να παρατηρούνται κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Έρευνες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδά του μειώνονται στην όνιμη εκκριτική φάση του κύκλου σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα. Ο LIF δράει στα κύτταρα αφού προσδεθεί στον υποδοχέα του, τον LIF-βR, που αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες την gp130 και τον LIFR (LIF receptor) και ο οποίος ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως το JAK/STAT, των MAPK κινασών και της PI3K κινάσης.

Έχουν βρεθεί αρκετά μόρια που επηρεάζουν την έκφρασή του. Μεταξύ αυτών ο TNF-α, η λεπτίνη, το p53 (Hu et al., 2008), η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και ο heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) αποτελούν διεγερτικούς παράγοντες της παραγωγής του, καθώς επίσης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο διεγείρεται από τους παράγοντες IGF και τον transforming growth factor beta (TGF-β)

σύμφωνα με *in vitro* πειράματα από τους Arici το 1995 και Lessey το 2002 (Dimitriadis et al., 2007 ; Aghajanova et al., 2008).

Στο ενδομήτριο ο LIF έχει συσχετιστεί με πολλές λειτουργίες. Πιθανότατα ελέγχει την ποσότητα των ανοσοκυττάρων του ενδομητρίου κατά το παράθυρο της εμφύτευσης. Αυτό αποδείχθηκε με πειράματα σε *knock-out* ποντίκια όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των μακροφάγων του ενδομητρίου, ενώ αντίθετα τα επίπεδα των ηωσινόφιλων και των φονικών κυττάρων (NK cells) αυξήθηκαν (Makrigiannakis and Minas., 2007, Paiva et al., 2009). Επίσης συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φθαρτοποιημένων λευκοκυττάρων και τροφοβλάστη (Εικ.2) καθώς υπάρχουν ενδείξεις για *positive feedback-loop* μεταξύ της χοριακής γοναδοτροπίνης της βλαστοκύστης και του LIF του ενδομητρίου. Έρευνες έδειξαν ότι διαδραματίζει ρόλο και στην διαφοροποίηση και ανάπτυξη της τροφοβλάστη (Kojima et al., 1995 ; Sawai et al., 1995 ; Ren et al., 1997 ; Paiva et al., 2009), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι είναι απαραίτητος παράγοντας για την εμφύτευση της βλαστοκύστης και όχι για την βιωσιμότητά της. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες του Sherwin το 2004, ο LIF διεγείρει την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από την προγεστερόνη (P4).



Εικόνα 2 : επικοινωνία τροφοβλάστης και ενδομητρίου (A) πριν την εμφύτευση και (B) αλληλεπίδραση φθαρτοποιημένων κυττάρων και τροφοβλάστης κατά την εμφύτευση.

Μελέτες όπου η παραγωγή του LIF συγκρίθηκε μεταξύ γυναικών με προβλήματα γονιμότητας και φυσιολογικών, επιβεβαιώνουν την σημαντικότητά του στην εμφύτευση. Τα πρώτα πειράματα διεξήχθησαν από τον Stewart και την ομάδα του το 1992. Σε ποντίκια όπου έγινε Knock-out το γονίδιο του LIF αυτά παρατηρήθηκε ότι παρουσίαζαν αποτυχία στην εμφύτευση και στειρότητα λόγω απουσίας της φθαρτοποίησης του ενδομητρίου. Νεότερα πειραματικά δεδομένα σε πιθήκους έδειξαν μείωση του ποσοστού κηύσεων όταν γίνονταν χορήγηση από την μήτρα μονοκλωνικού αντισώματος LIF. Επιπλέον μειωμένη γονιμότητα και αποτυχία εμφύτευσης παρατηρείται σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του LIF, καθώς επίσης ίδια αποτελέσματα έχουν περιστατικά όπου η συγκέντρωση του LIF κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά ή πολύ υψηλά επίπεδα. Τέλος αποτυχία εμφύτευσης παρατηρήθηκε σε έμβρυα στα οποία είχε ανασταλεί η δράση του LIF και/ή της ιντερλευκίνης-11 (IL-11).

3.2.2 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-11 (IL-11)

Η ιντερλευκίνη-11 είναι μία κυτοκίνη που εκφράζεται από επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος με τα επίπεδά της να παρουσιάζουν αιχμή κατά την φθαρτοποίηση (Guzeloglou-Kayisli et al., 2007 ; Van Mourik et al., 2009). Η παραγωγή της επηρεάζεται από τοπικούς παράγοντες όπως PGE2 και στεροειδείς ορμόνες όπου τα οιστρογόνα την επάγουν ενώ η προγεστερόνη την αναστέλλει. Από την άλλη πλευρά, ο υποδοχέας της, ο IL-11Ra, εκφράζεται από τη βασική στοιβάδα και αδένες του επιθηλίου χωρίς να παρουσιάζει κυκλικές μεταβολές στα επίπεδά του.

In vitro μελέτες δείχνουν ότι, η IL-11 συμμετέχει στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου στους ανθρώπους πιθανότατα μέσω της δράσης της στα κύτταρα του στρώματος. Επίσης προκαλεί μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση στην παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF-α από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Η παραγωγή του TNF-α είναι η μέγιστη στην εκκριτική φάση του κύκλου και έπειτα μειώνεται στα πρώτα στάδια της κύησης. Αυτή η μείωση ίσως είναι αποτέλεσμα της παραγωγής της IL-11. Μελέτες έδειξαν ότι η παραγωγή του δεν επηρεάζεται από τον leukemia inhibitory factor (LIF) και την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ενώ ο ίδιος in vitro αυξάνει την παραγωγή της IL-11 (Van Mourik et al., 2009).

Επιπλέον σε πειραματικά knock-out ποντίκια για τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-11, τον IL-11Ra, η φθαρτοποίηση και η εμφύτευση παρουσίαζε προβλήματα με αποτέλεσμα αυτά να είναι υπογόνιμα (Robb et al., 1998 ; Makrigiannakis and Minas., 2007 ; Van Mourik et al., 2009). Μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί υποδοχείς ιντερλευκίνης-11 στο ανθρώπινο έμβρυο, αν και αρχικά το έμβρυο παράγει ιντερλευκίνη-11 κατά την διείσδυση της τροφοβλάστης.

3.2.3 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-6 (IL-6)

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) αποτελεί μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη που παράγεται από το επιθήλιο του ενδομητρίου και κύτταρα του στρώματος κατά την εμφύτευση. Η παραγωγή της από το βασικό επιθήλιο ακολουθεί κυκλικές μεταβολές και τα επίπεδά της είναι μέγιστα κατά το παράθυρο της εμφύτευσης. Βέβαια τα επίπεδά της δεν έχουν συσχετιστεί με περιπτώσεις υπογονιμότητας καθώς μελέτη του Sherwin το 2002, ο οποίος υπολόγισε τα επίπεδα της IL-6 σε γόνιμες και υπογόνιμες ημέρες κατά τις LH+6 μέχρι LH+13 ημέρες του κύκλου, δεν έδειξε διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (Van Mourik et al., 2009). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η IL-6 κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στην παραγωγική φάση του κύκλου τα οποία αυξάνονται σταθερά στην εκκριτική φάση ώστε να μειωθούν πάλι στο τέλος του κύκλου. Αυτές οι μεταβολές πιθανώς βρίσκονται υπό τον έλεγχο στεροειδών ορμονών και συγκεκριμένα τα οιστρογόνα επάγουν την έκφρασή της, ενώ η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και ο transforming growth factor beta (TGF-β) λειτουργούν ως ανασταλτικοί παράγοντες.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι χαμηλή παραγωγή IL-6 σχετίζεται με περιπτώσεις αποβολής, ενώ ανεπάρκεια αυτής δεν οδηγεί σε επιθυμητά αποτελέσματα εμφύτευσης. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε με πειράματα το 2006 από τον Robertson όπου ποντίκια με έλλειψη ιντερλευκίνης-6 χαρακτηρίζονταν από μειωμένη γονιμότητα και μειωμένα ποσοστά εμφύτευσης (Paiva et al., 2009 ; Van Mourik et al., 2009).

3.2.4 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-1 (IL-1)

Ένα ακόμη σύστημα που εμπλέκεται στην εμφύτευση είναι αυτό της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) που ανήκει στην υπερικογένεια IL-1β/TLR. Το σύστημά της περιλαμβάνει τα εξής (Makrigiannakis and Minas., 2007 ; Van Mourik et al., 2009) :

- Δύο αγωνιστές, τους IL-1α και IL-1β, οι οποίοι έχουν ίδια βιολογική δραστηριότητα και παράγονται ως πρόδρομα μόρια που ενεργοποιούνται αργότερα. Ο IL-1β εκφράζεται από μακροφάγα, λευκοκύτταρα και κύτταρα του στρώματος με τα επίπεδά του να είναι τα μέγιστα στην εκκριτική φάση του κύκλου.
- Δύο υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, τους IL-1R1 και IL-1R2. Ο IL-1R1 εντοπίζεται σε χαμηλά ποσοστά σε όλο το σώμα. Τα επίπεδά του στο επιθήλιο του ενδομητρίου παρουσιάζουν αιχμή στην όψιμη ωχρινική φάση του κύκλου, ενώ στο αδενικό επιθήλιο στη μέση ωχρινική φάση. Από την άλλη πλευρά, ο IL-1R2 εντοπίζεται μόνο σε λευκά αιμοσφαίρια. Έχει ανασταλτικό ρόλο στη δράση της IL-1 και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα κατά το παράθυρο της εμφύτευσης.
- Την πρωτεΐνη IL1RAcR.
- Τον ανταγωνιστή IL-1ra.

Αρκετές μελέτες είχαν εστιάσει στο ρόλο της IL-1 κατά την εμφύτευση και στην επιρροή της στον παρακρινικό έλεγχο του αναπαραγωγικού συστήματος. Αποδείχθηκε ότι η IL-1 ρυθμίζει την έκφραση αρκετών μορίων στο ενδομήτριο όπως της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), ιντερλευκίνης-8 (IL-8), του tumour nekrosis factor-α (TNF-α), της κυκλο-οξυγενάσης-2 (COX2), μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1 και MMP-9 καθώς και των αναστολέων τους TIMP-1 και TIMP-3. Επίσης διεγείρει την παραγωγή του leukemia inhibitory factor (LIF), της λεπτίνης και του υποδοχέα της από το ενδομήτριο. Τέλος αυξάνει την έκφραση της ιντεγκρίνης β3, ενός μορίου προσκόλλησης που ενέχεται στην εμφύτευση.

Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι ανεπάρκεια της ιντερλευκίνης-1 δεν επηρεάζει την αναπαραγωγή. Αντιθέτως, πιθανή αναστολή της δράσης της είτε αφαιρώντας σχετικά γονίδια είτε ενισχύοντας τον ανταγωνιστή της κατά την προεμφυτευτική περίοδο έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία της εμφύτευσης (Simon et al., 1994 ; Zheng et al., 1995 ; Abbondanzo et al., 1996 ; Van Mourik et al., 2009).

3.2.5 INTERLEUKIN-15 (IL-15)

Η ιντερλευκίνη-15 (IL-15) είναι μία κυτοκίνη που παράγεται από την τροφοβλάστη και αποτελεί διεγερτικό παράγοντα των T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Αναφορές υποστηρίζουν ότι η ιντερλευκίνη-15 (IL-15) θα μπορούσε να θεωρηθεί μεσολαβητής στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φθαρτοποιημένων κυττάρων και φονικών κυττάρων (NK cells) (Dunn et al., 2003 ; Makrigiannakis and Minas., 2007). Τέλος συμμετοχή της στην εμφύτευση αποδεικνύεται από πειράματα στα οποία τα IL-15 knock-out ποντίκια είναι μεν γόνιμα αλλά παρουσιάζουν επιπλοκές στην εμφύτευση και έλλειψη φονικών κυττάρων (NK cells) στη σημεία εμφύτευσης (Ashkar et al., 2003 ; Makrigiannakis and Minas., 2007).

3.2.6 INTERLEUKIN-12 (IL-12) / INTERLEUKIN-18 (IL-18)

Η ιντερλευκίνη-18 (IL-18) είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που δομικά παρουσιάζει ομοιότητες με την οικογένεια των IL-1 πρωτεϊνών. Η IL-18 και ο υποδοχέας της εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο με μικρές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του φυσικού κύκλου (Yoshino et al., 2001). Ανωμαλίες στην έκφραση του γονιδίου της αναφέρθηκαν σε περιπτώσεις γυναικών με αποτυχία εμφύτευσης έπειτα από θεραπεία IVF (Ledee-Bataille et al., 2004, Laird et al., 2007). Επίσης μελέτες δείχνουν ότι η έλλειψή της συσχετίζεται με χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης σε περιστατικά κλασσικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) (Makrigiannakis and Minas., 2007).

Η ιντερλευκίνη-12 (IL-12) είναι μία ακόμη προφλεγμονώδη κυτοκίνη που θεωρείται σημαντική για την εμφύτευση και την επίτευξη ή όχι της κύησης καθώς αυξάνει την παραγωγή της TH₁ κυτοκίνης. Έρευνες συσχέτισαν τα χαμηλά επίπεδα της έκφρασής της με αποτυχία εμφύτευσης μετά από IVF (Laird et al., 2007 ; Makrigiannakis and Minas., 2007).

3.2.7 MACROPHAGE-COLONY STIMULATING FACTOR (M-CSF)

Ο M-CSF ή CSF-1 είναι ένας παράγοντας που ρυθμίζει την παραγωγή και διαφοροποίηση των μακροφάγων. Συμμετοχή αυτής της κυτοκίνης στην εμφύτευση αποδείχθηκε από μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη του M-CSF (Pollard et al., 1991). Θηλυκά ποντίκια ομοζυγωτικά για μεταλλάξεις του γονιδίου του CSF-1 παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Στον άνθρωπο αυξημένη τοπική παραγωγή του CSF-1 και του υποδοχέα του έχει εντοπιστεί στο σημείο εμφύτευσης και την αρχή της εγκυμοσύνης (Kauma et al., 1991 ; Laird et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο M-CSF φαίνεται να συμμετέχει στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και ανάπτυξη του πλακούντα στα αρχικά στάδια της κύησης.

3.3 ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Η προσκόλληση του εμβρύου στο ενδομήτριο της μητέρας αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την εμφύτευση. Στη διαδικασία αυτή ενέχονται μόρια που αποτελούν μια ετερογενή ομάδα εξειδικευμένων κυτταρικών επιφανειακών πρωτεϊνών, οι οποίες συνδεδεμένες με υποδοχείς συμβάλλουν στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Η κατηγορία αυτή των παραγόντων εμφύτευσης περιλαμβάνει τις σελεκτίνες, τις ιντεγκρίνες, τις μουκίνες και τις καδερίνες.

3.3.1 ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ

Οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που ενέχονται κυρίως στα πρώτα στάδια της εμφύτευσης. Έχουν περιγραφεί τρεις σελεκτίνες, η P-selectin, η E-selectin και η L-selectin που κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια και διαφέρουν στην κατανομή, στην ενεργοποίηση και στον τρόπο έκφρασής τους. Συγκεκριμένα η E-selectin εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η P-selectin στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων μετά από έκθεση σε κατάλληλο ερέθισμα και η L-selectin σε όλα τα λευκοκύτταρα.

Η L-selectin αποτελείται από μία μεγάλη υψηλά γλυκοζυλιωμένη εξωκυττάρια περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά (Smalley and Ley., 2005 ; Achache and Revel., 2006). Μία παλαιότερη μελέτη έχει περιγράψει την έκφραση της λειτουργικής L-selectin στην τροφοβλάστη. Η σελεκτίνη αυτή αλληλεπιδρά με συνδεδετικά μόρια – ολιγοσακχαρίτες στο ενδομήτριο της μητέρας, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων. Η συμμετοχή της στην εμφύτευση αποδείχθηκε με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας τα αντισώματα MECA-79 και HECA-452 τα οποία εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στο ενδομήτριο κατά την φθαροποίηση. Αναστέλλοντας την δράση της L-selectin μέσω των αντισωμάτων παρατηρείται ασθενής προσκόλληση της βλαστοκύστης (Fukuda and Sugihara., 2008 ; Van Mourik et al., 2009).

Παρ' όλα όμως τα πειραματικά δεδομένα μέχρι σήμερα παραμένουν άγνωστες κάποιες πληροφορίες. Ορισμένα ερωτήματα προκύπτουν από διαφορές μεταξύ παλαιότερων και νεότερων μελετών που αφορούν την ύπαρξη ή όχι της L-selectin στη βλαστοκύστη. Επίσης αναπάντητο παραμένει το γεγονός του κατά πόσο η L-

selectin είναι απαραίτητη για την αναπαραγωγή και αν αυτό σχετίζεται με το ερώτημα γιατί τα ποντίκια με ανεπάρκεια της συγκεκριμένης σελεκτίνης είναι στείρα.

3.3.2 INTEΓΚΡΙΝΕΣ

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μία οικογένεια μορίων που έχουν μελετηθεί για την επιρροή τους στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου. Είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο αλυσίδες, την α και την β . Εκκρίνονται από επιθηλιακά και άλλα κύτταρα και το εξωτερικό τους τμήμα ενώνεται με συνδετικά μόρια (ligands) που λαμβάνουν το μήνυμα που θα διαβιβάσουν. Αυτά τα συνδετικά μόρια βρίσκονται είτε στην μεμβράνη του κύτταρου είτε σε μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (π.χ λαμινίνη, φμπρονεκτίνη) (Arlin., 2006 ; Van Mourik et al., 2009).

Έχει περιγραφεί μεγάλη ποικιλία ιντεγκρινών στο βασικό και αδενικό επιθήλιο (Lessey et al., 1992 ; Klentzeris et al., 1993 ; Achache and Revel., 2006) με αυτές που η έκφρασή τους είναι αυξημένη στη μέση ωχρινική φάση του κύκλου να αποτελούν δείκτες για το παράθυρο της εμφύτευσης. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί στο βασικό επιθήλιο της μήτρας οι ιντεγκρίνες $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_0\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_v\beta_6$. Το αδενικό επιθήλιο εκφράζει τις ίδιες πρωτεΐνες με τη διαφορά ότι αντί για $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_v\beta_6$ εκφράζει τις $\alpha_1\beta_1$ και $\alpha_4\beta_1$ (Hoozemans et al., 2004; Minas et al., 2005) . Η έκφρασή τους στο ενδομήτριο ελέγχεται από στεροειδείς ορμόνες και ορισμένες κυτοκίνες. Πολλές από τις ιντεγκρίνες έχουν συσχετιστεί με την αναπαραγωγή όπως η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ η οποία αυξάνεται κατά το παράθυρο της εμφύτευσης και αποτελεί δείκτη για την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου. Η έκφραση αυτής της ιντεγκρίνης ρυθμίζεται από διεγερτικούς παράγοντες όπως από τον epidermal growth factor (EGF) και τον heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) αλλά και ανασταλτικούς όπως η 17 β -estradiol. Στην παραγωγική φάση τα οιστρογόνα δρουν μέσω των υποδοχέων τους τύπου α (ER- α) για να αναστείλουν την έκφραση των ιντεγκρινών. Αντιθέτως η προγεστερόνη δρώντας ανασταλτικά για τους υποδοχείς οιστρογόνων, προκαλεί αύξηση των ιντεγκρινών. Πιθανώς η προγεστερόνη δρα θετικά αυξάνοντας παράγοντες του στρώματος του ενδομητρίου

με παρακρινική δράση ώστε να προκαλέσει την έκφραση των ιντεγκρινών (Bazer et al., 2008 ; Yoshinaga., 2008).

Πειράματα έδειξαν ότι το mRNA των ιντεγκρινών την 21^η ημέρα του κύκλου μπορεί να προβλέψει το ποσοστό επιτυχίας της IVF. Ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα ιντεγκρινών έχουν διπλάσιο ποσοστό εμφύτευσης και κύησης σε σύγκριση με αυτούς με χαμηλότερα επίπεδα. Τέλος δείκτης για το ποσοστό εμφύτευσης μετά από θεραπεία με IVF αποτελούν και τα επίπεδα της ιντεγκρίνης β3 (Thomas et al., 2003 ; Revel., 2005 ; Achache and Revel., 2006).

3.3.3 KANTEPINEΣ

Οι καντερίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μοιράζονται μια αλληλουχία 100 αμινοξέων. Αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της κυττάρου προς κύτταρο προσκόλλησης με μία σειρά ομοτυπικών ή ετεροτυπικών αντιδράσεων που εξαρτώνται από το ασβέστιο (Stemmler., 2008). Η οικογένεια τους περιλαμβάνει 16 μέλη από τα οποία η E-cadherin είναι αυτή που παίζει ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης και στην ανάπτυξη του εμβρύου στα προεμφυτευτικά στάδια. Η E-cadherin ανήκει στα μόρια προσκόλλησης που εξαρτώνται από το ασβέστιο, το οποίο είναι αυτό που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου μέσω της συγκεκριμένης καντερίνης. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα για το σχηματισμό της βλαστοκύστης καθώς μεταλλάξεις της έχουν ως αποτέλεσμα ελαττωματική εμβρυϊκή ανάπτυξη και αποτυχία εμφύτευσης (Rosales et al., 2005 ; Singh and Aplin., 2009). Τα παραπάνω αποδείχθηκαν με πειράματα σε ποντίκια, ενώ ο ρόλος της στην εμφύτευση της ανθρώπινης βλαστοκύστης δεν είναι ακόμα γνωστός. Βέβαια, λαμβάνοντας υπόψη το πρότυπο της γονιδιακής της έκφρασης όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα της παρατηρούνται στην εκκριτική φάση του κύκλου, πιθανολογείται η σπουδαιότητά της στην εμφύτευση.

3.3.4 ΜΟΥΚΙΝΕΣ

Οι μουκίνες αποτελούν μια κατηγορία μορίων προσκόλλησης με τον ρόλο τους να μην είναι πλήρως διευκρινισμένος, ενώ γενικά θεωρούνται αναστολείς των αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου. Εκφράζονται από επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου σε υψηλά επίπεδα κατά την εκκριτική φάση του κύκλου (Hey et al., 1994, 1995, 2003 ; Singh and Arlin., 2009) και φέρουν μικρές υδατανθρακικές αλυσίδες και συνδεδετικά μόρια όπως το ligand για την L-selectin. Από τα 14 μέλη της οικογένειάς τους μόνο η Mucin-1 (MUC-1) και η MUC-6 έχουν βρεθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο (Hey et al., 1994 ; Gipson et al., 1997 ; Achache and Revel., 2006).

Η MUC-1 είναι γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους μεγαλύτερου από 250 kDa και φέρει κυτταροπλασματική ουρά και μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή που αποτελείται από αριθμό επαναληπτικών αλληλουχιών (VNTRs) των 20 αμινοξέων. Σε ποντίκια, αρουραίους και γουρούνια κατά το χρονικό διάστημα που το ενδομήτριο είναι υποδεκτικό, η μουκίνη-1 (MUC-1) μειώνεται από την επίδραση της προγεστερόνης. Η παρουσία της MUC-1 όπως και η μείωση της έκφρασής της είναι απαραίτητα για επιτυχή εμφύτευση. Αυτές οι παρατηρήσεις στηρίζονταν στο γεγονός ότι οι υδατάνθρακες που φέρει η MUC-1 εμποδίζουν την προσκόλληση των κυττάρων και η μείωσή της προωθεί την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου (Van Mourik et al., 2009 ; Singh and Arlin., 2009).

Στους ανθρώπους η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη. Τα επίπεδα της MUC-1 αυξάνονται κατά το παράθυρο της εμφύτευσης λόγω της δράσης της προγεστερόνης κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα από τα ζωικά μοντέλα. In vitro πειράματα έδειξαν ότι, η επίδραση από την παρακρινική δράση από τη βλαστοκύστη στο ενδομήτριο ίσως προκαλεί τοπική κάθαρση της MUC-1 κατά την προσκόλληση επιτρέποντας έτσι την εμφύτευση του εμβρύου.

Συμπερασματικά, η MUC-1 φαίνεται να είναι αρνητικός παράγοντας για την εμφύτευση καθώς εξαφανίζεται στην περιοχή όπου αυτή γίνεται. Οι έρευνες όμως συνεχίζονται για να εξακριβωθεί ο ακριβής της ρόλος στην εμφύτευση.

3.4 ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η έκφραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους στη μήτρα κατά την προεμφυτευτική περίοδο δείχνει ότι κάποιοι από αυτούς είναι σημαντικοί για την εμφύτευση. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF) και ο insulin-like growth factor (IGF).

3.4.1 INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR (IGF)

Το σύστημα του IGF παίζει ρόλο στην επικοινωνία του εμβρύου και του ενδομητρίου. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τον IGF και την IGFBP (insuline-like growth factor binding protein) με κύρια μορφή της την IGFBP-1. Υπάρχουν δύο μορφές του IGF. Ο IGF-1 ενέχεται στις αλληλεπιδράσεις από τα οιστρογόνα στο ενδομήτριο κατά την παραγωγική φάση του κύκλου, ενώ ο IGF-2 αναφέρεται στις επιδράσεις από την προγεστερόνη στην εκκριτική φάση.

Η IGFBP-1 παράγεται από κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου και κυρίως κατά τη φθαρτοποίηση. Η έκφρασή της βρίσκεται υπό τον έλεγχο αρκετών παραγόντων όπως η ινσουλίνη και ο IGF που αναστέλλουν την παραγωγή της IGFBP-1. Διεγερτικοί για την παραγωγή της παράγοντες είναι το cAMP, η προγεστερόνη σε συνδυασμό με την χοριακή γοναδοτροπίνη από την βλάστοκύστη και ίσως και η IL-1β.

Έχει προταθεί η θεωρία ότι ο IGF-2 ευνοεί την εμφύτευση και τη διείδυση της τροφοβλάστης σε αντίθεση με την IGFBP-1 που αναστέλλει τη δράση του IGF-2. Αποδείξεις ότι ισχύουν τα παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι αυξημένα επίπεδα της IGFBP-1 έχουν ως αποτέλεσμα αποτυχία στην εμφύτευση καθώς εμποδίζουν την πρόσδεση του IGF-2 στους IGF-1Rs υποδοχείς.

Συμπερασματικά το σύστημα του IGF/ IGFBP είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ισορροπίας της εμφύτευσης παίζοντας ρόλο και στην ανοσολογία αυτής (Van Mourik et al., 2009).

3.4.2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β (TGF- β)

Και οι τρεις ισομορφές του TGF- β (TGF- β 1, 2, 3) φαίνεται ότι εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και το υποκείμενο στρώμα (Ando et al., 1998 ; Godkin and Dore., 1998 ; Simpson et al., 2002 ; Makrigiannakis and Minas et al., 2007). In vitro μελέτες έδειξαν ότι ο TGF- β συμμετέχει στη δημιουργία περιβάλλοντος ανοσοανοχής κατά την εμφύτευση και ρυθμίζει διάφορα μόρια που αφορούν αυτήν όπως τον vascular endothelial growth factor VEGF, την MMP-9, την IGFBP-1 και τον leukemia inhibitory factor (LIF) (Herrler et al., 2003 ; Dimitriadis et al., 2005).

Πρόσφατες έρευνες που αφορούν στην έκφραση του mRNA των υποδοχέων του TGF- β , τον συσχέτισαν με την εμφύτευση. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς φαίνεται να αυξάνονται κατά το χρονικό διάστημα που το ενδομήτριο γίνεται υποδεκτικό και αρχίζει η αλληλεπίδραση με το έμβρυο, ενώ με τη διεϊσδυση της τροφοβλάστης η έκφραση των υποδοχέων φαίνεται να μειώνεται.

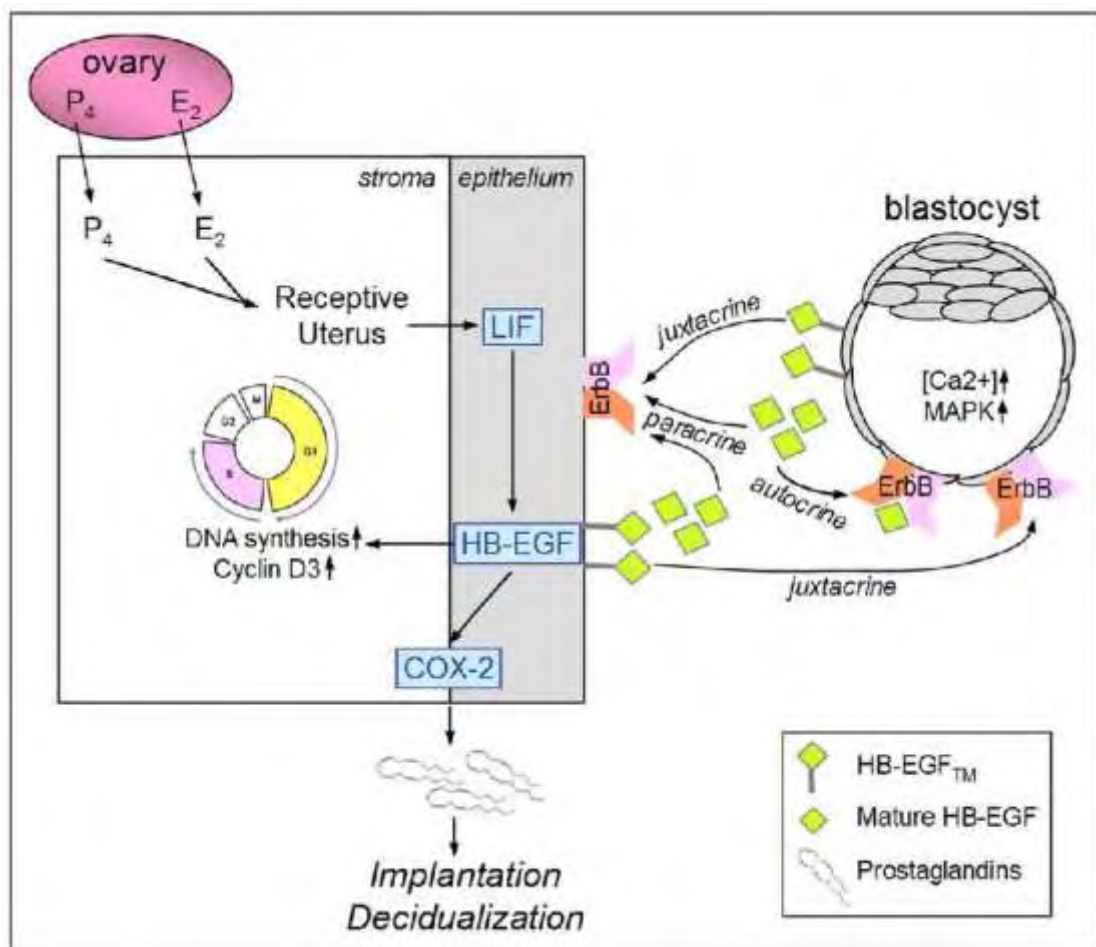
3.4.3 HEPARIN BINDING- EPIDERMAL GROWTH FACTOR (HB-EGF)

Ο HB-EGF ανήκει στους μοριακούς παράγοντες που πρώτοι βρέθηκαν στη μήτρα ποντικών και εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα την τέταρτη ημέρα της γονιμοποίησης. Η έκφρασή του δεν εξαρτάται από ορμόνες και παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα όταν τα πινοπόδια είναι πλήρως ανεπτυγμένα (Fukuda and Sugihata., 2008).

Ο HB-EGF αναγνωρίστηκε να έχει μιτογόνο δράση για ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Όπως και οι άλλοι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας EGF, εκφράζεται σε διαμεμβρανική μορφή, την HB-EGF_{TM}, όπου μετά από ενζυμική επεξεργασία απελευθερώνεται ο ώριμος παράγοντας που παρουσιάζει παρακρινική δράση (Lim and Dey., 2009).

Ο ώριμος παράγοντας, HB-EGF, προσδέεται στους υποδοχείς ErbB1 και ErbB4. Ο τελευταίος εκφράζεται σε κύτταρα του τροφοεξωδέρματος στην ανθρώπινη βλαστοκύστη. Στη συνέχεια ακολουθεί διμερισμός και αυτοφωσφορυλίωση, ενώ επίσης ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK κινασών (Εικ. 3) .

Η σημασία του στην εμφύτευση αποδείχθηκε αρχικά με δύο *in vitro* πειράματα σε ποντίκια. Στο πρώτο πείραμα, έμβρυο που βρίσκονταν στο στάδιο των οκτώ κυττάρων και εκτέθηκε σε HB-EGF, παρουσίασε υψηλότερους ρυθμούς εκκόλαψης και ανάπτυξης. Στο δεύτερο πείραμα, ο HB-EGF προωθούσε την ανάπτυξη της τροφοβλάστης *in vitro*, γεγονός που υποστηρίζει το ρόλο του στη διείσδυση κατά την εμφύτευση. Πιο πρόσφατα πειραματικά δεδομένα ενισχύουν το ρόλο του καθώς HB-EGF knock-out μοντέλα κατέληγαν σε αποτυχία της εμφύτευσης (Fukuda and Sugihata., 2008).



Εικόνα 3 : Απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω HB-EGF στην εμφύτευση. Ο HB-EGF επηρεάζει την ανάπτυξη και διείσδυση της τροφοβλάστη κατά την εμφύτευση, ενώ στο στρώμα της μήτρας αυξάνει τη σύνθεση του DNA.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Maaïke S. M. van Mourik, Nick S. Macklon, and Cobi J. Heijen (2009) Embryonic implantation : cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J. Leukoc. Biol.* 85:4-19;2009
2. Inge Van Vaerenbergh, M.Sc., Ramsey McIntire, PhD., Leentje Van Lommel, M.Sc., Paul Devroey, M.D., PhD., Linda Giudice, M.D., PhD., M.Sc., and Claire Bourgain, M.D., PhD. (2010) Gene expression during successful implantation in a nature cycle. *Fertility and sterility Vol.93, No1, January 2010*
3. Premila Paiva, Ellen Menkhorst, Lois Salamonsen, Evdokia Dimitriadis (2009) Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 : Critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (2009) 319-328
4. Koji Yoshinaga (2008) Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 161-169
5. Fuller W. Bazer, Robert C. Burghardt, Greg A. Johnson, Thomas E. Spencer, Guoyao Wu (2008) Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy : interactions among novel cell signalling pathways. *Reproductive Biology* (2008)
6. Wenwei Hu, Zhaohui Feng, Gurinder S. Atwal and Arnold J. Levine (2008) p53 a new player in reproduction. *Cell Cycle* 7:7, 848-852
7. Fuller W Bazer, Thomas E Spencer, Greg A Johnson, Robert C Burghardt (2009) Comparative aspects of implantation. *Reproduction* (2009) 138 195-209
8. Heather L. Franco, Jae-Wook Jeong, Sophia Y. Tsai, John P. Lydon, Francesco J. DeMayo (2008) In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (2008) 178-186
9. Yunao Liu, Suranga P. Kodithuwakku, Pak-Yiu Ng, Joyce Chai, Ernest H.Y. Ng, William S.B. Yeung, Pak-Chung Ho and Kai-Fai Lee (2008) Excessive ovarian stimulation up-regulates the Wnt-signalling molecule DKK1 in human endometrium and may affect implantation : an in vitro co-culture study.

10. Qi Chen, Ying Zhang, Jinhua Lu, Qiang Wang, Shuangjie Wang, Yujing Cao Haibin Wang, and Enkui Duan (2009) Embryo-uterine cross-talk during implantation : the role of Wnt-signalling. *Molecular Human Reproduction*, Vol.15, No.4 pp.215-221, 2009
11. Hyunjung Jade Lim and S. K. Dey (2009) HB-EGF : a unique mediator of embryo – uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res.*2009 February 15 ; 315 (4) : 619-626
12. Michiko N. Fukuda and Kazuhiro Sugihara (2008) An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J Obset Gynaecol Res.* 2008 April ; 34(2) : 129-136
13. Aghajanova, AE Hamilton and LC Giudice (2008) Uterine receptivity to human embryonic implantation : histology, biomarkers and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008 April ; 19(2) : 204-211
14. Nick A. Bersinger, Dorothea M. Wunder, Martin H. Birkhauser and Michael D. Mueller (2008) Gene expression in cultured endometrium from women with different outcomes following IVF. *Molecular Human Reproduction* Vol14. No8 pp. 475-484, 2008
15. Evdokia Dimitriadis, Andrew M Sharkey, Yee Lee Tan, Lois A Salamonsen and J Robert A Sherwin (2007) Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin-11 and leukemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007
16. Ozlem Guzeloglu-Kayisli, Murat Basar, Aydin Arici (2007) Basic aspects of implantation. *Reproductive Biomedicine* Vol 15, No6, 2007
17. SM Laird, EM Tuckerman, T-C Li (2006) Cytokin expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine* Vol 13, No1, 2006
18. Antonis Makrigiannakis, Vassilis Minas (2007) Mechanisms of implantation. *Reproductive Biomedicine* Vol 14, No1, 2007
19. Zoumakis E, Kalantaridou SN, Makrigiannakis A (2009) CRH-like peptide in human reproduction. *Curr Med Chem.* 2009 ; 16(32) : 4230-5
20. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G (2004) Endometrial and Placental CRH as regulator at human embryo implantation. *J. Reprod Immunol.* 2004 Jan ; 62(1-2) : 53-9

21. Ana-Maria Bamberger, Vassilis Minas, Sophia N. Kalantaridou, Jessica Radde, Helen Sadeghian, Thomas Loning, Ioannis Charalampopoulos, Jens Brummer, Christoph Wagener, Christoph M. Bamberger, Heinrich M. Schulte, George P. Chrousos and Antonis Makrigiannakis (2006) CRH-modulates human trophoblast invasion through carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *American Journal of Pathology*, 2006 ; 168 : 141-150
22. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G, Gravanis A (2004) A participation of maternal and fetal CRH in early phases of human implantation : the role of antalarmin. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2004 Mar ; 4(1) : 75-8
23. Hong-Yuan Huang, MD (2006) Cytokine network during embryo implantation. *Chang Chung Med J* 2006 ; 29 : 25-36
24. Daftary GS, Taylor HS (2000) Implantation in the human : the role of HOX genes. *Semin Reprod Med*. 2000 ; 18(3) : 311-20
25. Licht P, Fluhr H, Neuwinger D, Wildt L (2007) Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation?. *Mol Vell Endocrinol* 2007 ; 269(1-2) : 85-92
26. Ledee- Bataille N (2004) Secreted lumina cytokines in the uterine lumina are predicted subsequent implantation. Presence of IL-18 in the uterine flushing. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2004 Feb ; 33(1 Pt 2) : S29-32
27. Harmeet Singh and John D. Aplin (2009) Adhesion molecules in endometrial epithelium tissue integrity and embryo. *J Anat* (2009) 215, pp 3-13
28. Philip Jessmon, Richard E. Leach, and D. Randall Armant (2009) Diverse Functions of HB-EGF during pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2009 December ; 76(12) : 1116-1127
29. W.A Castro-Rendon, J.F. Castro-Alvarez, C.Guzman-Martinez and J.C. Bueno-Sanchez (2006) Blastocyst-endometrium interaction : intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res*, November 2006, Volume 39(11) : 1373-1385
30. Kogo H, Yoshie M, Kutsukae M, Tamura K, Yakuqaku Zasshi (2008) Role of implantation-related factors, stathmin and insulin-like growth factor-binding protein 7 in reproductive endocrinology. 2008 Apr ; 128(4) : 565-74

31. Achache H, Revel A (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2006 Nov-Dec ; 12(6) : 731-46

