



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΚΛΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΙΣ,

ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ

ΑΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ”

ΜΑΡΙΑ ΜΠΙΜΠΑ

Μοριακός βιολόγος - Κλινικός Εμβρυολόγος

ΛΑΡΙΣΑ 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***“ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΚΛΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΙΣ,
ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ
ΑΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ”***

υπό

ΜΑΡΙΑ ΜΠΙΜΠΑ

Μοριακός βιολόγος - Κλινικός Εμβρυολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. Αντώνιος Μακρυγιαννάκης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
3. Αθανάσιος Καλλιτσάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. Αντώνης Μακρυγιαννάκης, Καθηγητής Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, Μέλος της Τριμελούς
3. Αθανάσιος Καλλιτσάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος της Τριμελούς
4. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος, Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορας Μαιευτικής, Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και κυρίως τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Μεσσήνη, Διευθυντή της Γυναικολογικής και Μαιευτικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που μου παρείχε τη δυνατότητα εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Σε όλα αυτά τα χρόνια, αντιμετώπισα πολλαπλές δυσκολίες που είχαν να κάνουν τόσο με την αρχική υπόθεση της μελέτης, όσο και με τις εργαστηριακές τεχνικές συλλογής και επεξεργασίας των δειγμάτων και ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Μεσσήνη που με κάθε τρόπο που διέθετε, μου έδωσε απαντήσεις και λύσεις, οι οποίες συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Ο καθηγητής κ. Μεσσήνης ήταν πάντα διαθέσιμος να με συμβουλευτεί, να με κατευθύνει, να με καθοδηγήσει και να με επιβλέπει κατά τη διάρκεια της μελέτης και συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής, σε μία περίοδο πολύ δύσκολη για εμένα σε προσωπικό επίπεδο, μιας και παράλληλα εργαζόμουν ως εμβρυολόγος και ήμουν μητέρα πια δύο μικρών παιδιών. Για τους λόγους αυτούς, του χρωστάω αμέριστη ευγνωμοσύνη που στάθηκε δίπλα μου και μου παρείχε την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε δυσκολία. Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Μακρυγιαννάκη και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Καλλιτσάρη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τη συμβολή τους στην οριοθέτηση και τροποποίησης του θέματος της παρούσας διατριβής, όταν κρίθηκε αναγκαίο.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κωνσταντίνο Πάντο, Διευθυντή της Κλινικής Γένεσις Αθηνών, για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια εργασίας μου στην κλινική του. Ο κ. Πάντος ήταν εκείνος που με προέτρεψε να ασχοληθώ με αυτή τη μελέτη και συναίνεσε στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής και τον ευχαριστώ θερμά για αυτό. Με διευκόλυνε με κάθε μέσο στην κλινική εφαρμογή της μελέτης και ήταν δίπλα μου με το να με στηρίζει και να με εμπνυχώνει σε κάθε βήμα μου μέχρι το τέλος, με αμέριστη υπομονή και επιμονή.

Ευχαριστώ θερμά επίσης την κ. Μαριγούλα Βάρλα - Λευθεριώτη, Διευθύντρια του Ανοσοβιολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου-Μαιευτηρίου «Έλενα Βενιζέλου», που ενδιαφέρθηκε προσωπικά για το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής και μου επέτρεψε την πρόσβαση στο σύστημα Luminex, με το οποίο έγινε

η ανάλυση και μέτρηση όλων των δειγμάτων της παρούσας μελέτης. Αμέριστη ευγνωμοσύνη θέλω να εκφράσω στην κ. Θεοδώρα Κεραμιτζόγλου, βιολόγο του Ανοσοβιολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου «Ελενα Βενιζέλου» για το ενδιαφέρον και τη βοήθειά της στη μέτρηση και ανάλυση των δειγμάτων, τις πολύτιμες υποδείξεις της, αλλά και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και το Μαιευτήρα-Γυναικολόγο κ. Προμπονά που με έφερε σε επαφή με την κ. Βάρλα – Λευθεριώτη και το εργαστήριό της.

Ευχαριστώ θερμά την Προϋσταμένη του Τμήματος Εμβρυολογίας της Κλινικής Γένεσις Αθηνών κ. Βαξεβάνογλου, η οποία με στήριξε με κάθε μέσο και λειτούργησε καταλυτικά στο συντονισμό και οργάνωση της κλινικής εφαρμογής της παρούσας μελέτης, παρέχοντάς μου βοήθεια σε κάθε βήμα από την αρχή μέχρι το τέλος. Ευχαριστώ επίσης όλες τις συναδέλφους μου, κλινικούς εμβρυολόγους της Κλινικής Γένεσις Αθηνών Μαργαρίτα Χρονοπούλου, Γεωργία Κόκκαλη, Κωνσταντίνα Πετρούτσου, Ρένα Αγγελή, Αφροδίτη Κατούνα, Χριστίνα Μαρκομιχάλη, Μαρία Φακιρίδου, Έφη Μπαξεβάνη, Έφη Κυριτσοπούλου και Δώρα Γρίβα για όλη τη συμπαράσταση, βοήθεια και εμπύχωση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της περιόδου εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, τις ευχαριστώ που ήταν δίπλα μου σε κάθε προσωπικό μου πρόβλημα και αισθάνομαι πραγματικά τυχερή που εργάζομαι ανάμεσά τους.

Επίσης ευχαριστώ πολύ την κλινική εμβρυολόγο Dr Gayle Jones, από το Πανεπιστήμιο Monash της Μελβούρνης, η οποία μου αφιέρωσε πολύτιμο χρόνο και βοήθησε στην οργάνωση και το συντονισμό του πειράματος, καθοδηγώντας με κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου της παρούσας μελέτης και προτείνοντάς μου τεχνικές φύλαξης και επεξεργασίας των δειγμάτων αργότερα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μπίμπα Δημήτριο και Φωτεινή που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια με αυτοθυσία πολλές φορές, τους ευχαριστώ για την αμέτρητη αγάπη και συμπαράσταση, για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν και γιατί δε με άφησαν ποτέ να ξεχάσω τα όνειρά μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ, το σύζυγό μου Νίκο Λύκο που χωρίς τη δική του υποστήριξη, κατανόηση και υπομονή, η παρούσα διδακτορική διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί. Στάθηκε δίπλα μου και

δίπλα στα παιδιά μας σε κάθε στάδιο σε όλο αυτό το διάστημα που τους στέρησα πολύτιμο χρόνο για να τον αφιερώσω στην εργασία αυτή. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω στους γιους μου Αλέξανδρο και Δημήτρη γιατί η ύπαρξή τους μου δίνει καθημερινά χαρά, δύναμη και κουράγιο να συνεχίσω, τους ζητάω να με συγχωρέσουν αν αυτό το διάστημα δεν μπορούσα να είμαι δίπλα τους όσο θα το ήθελα και τους αφιερώνω αυτή τη διατριβή.

Μπίμπα Μαρία

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Μαρία Μπίμπα
Διεύθυνση: Δρόμος 57, Αρ. 10, Αρτέμιδα Αττικής, 190 16, Ελλάδα
Τηλέφωνο: 6978779438
Ημερομηνία Γέννησης: 14 Ιανουαρίου 1981
E-mail: mbiba@hotmail.com / biba@pantos.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2003-2005 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στην Κλινική Εμβρυολογία (MSc Clinical Embryology), Πανεπιστήμιο του Leeds, M. Βρετανία)**
School of Medicine, Faculty of Medicine and Health,
University of Leeds, U.K.
Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (Distinction)

2000-2003 **Bachelor of Science (BSc) στην Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία (BSc Cell & Molecular Biology), Πανεπιστήμιο του Essex, M. Βρετανία**
Department of Biological Sciences,
University of Essex, U.K.
Βαθμός Πτυχίου: 2:2 (Honours Class II Division 2)

1995-1998 **Απολυτήριο Γενικού Λυκείου**
Λύκειο Σπάτων
Βαθμός απολυτηρίου: 17 και 3/10

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2004-2005 **Μεταπτυχιακή Διατριβή, School of Medicine, Faculty of Medicine and Health, University of Leeds, U.K.**

Τίτλος: Καλλιέργεια ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων σε καλλιεργητικό υλικό μιας ή δύο φάσεων και σύγκριση της ποιότητας και ανάπτυξης τους από την 1^η έως την 6^η ημέρα. (Comparison of the development and quality of Day 1 to Day 6 human embryos cultured in sequential versus single culture media systems)
Βαθμός: 73/100

2002-2003

Πτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Department of Biological Sciences, University of Essex, U.K.

Τίτλος: Διερεύνηση του πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης CTCF στην προστασία των καρκινικών κυττάρων του προστάτη από την απόπτωση. (Investigation of the potential role of CTCF in protecting prostate cancer cells from apoptosis)
Βαθμός: 64.6/100

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

2014

Biba, M., Keramitzoglou, Th., Goukos, D., Varla-leftherioti, M., Pantos, K., Makrigiannakis, A., Messinis, J. Interleukin-1β (IL-1b) and -6 (IL-6) levels in blastocyst culture supernatants and their role in human implantation. *RBMOnline*, υπεβλήθη 10/2014.

2014

Biba, M., Keramitzoglou, Th., Goukos, D., Varla-leftherioti, M., Pantos, K., Messinis, J. "Interleukin -1b and -6 levels in human embryo culture supernatants and their role in implantation after IVF." (Poster) 11th Congress of the European Society for Reproductive Immunology, Budapest, Hungary, 30 March - 1 April 2014.

2014

Kokkali, G., Chronopoulou, M., Baxevas, E., **Biba, M.,** Angeli, I., Fakiridou, M., Katouna, A., Markomichali, C., Petroutsou, K., Vaxevanoglou, T., Kellaris, V., Konstantopoulos, T., Bathrellos, N., Sfakianoudis, K., Pantos,

K. "A randomized control pilot study of the use of intrauterine human chorionic gonadotrophin injection before embryo transfer in egg recipient cycles." (Poster) ESHRE 30th Annual Meeting, Munich, Germany, 29 June - 2 July 2014.

- 2013** **Μπίμπα, Μ.**, Κεραμιτζόγλου, Θ. , Γούκος, Δ., Βάρλα-Λευθεριώτη, Μ., Πάντος Κ., Μεσσήνης Ι. "Μέτρηση ιντερλευκινών στο υπερκείμενο καλλιέργειών βλαστοκύστεων σε περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης." *Ανοσία*: ειδικό τεύχος που διανεμήθηκε στο 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας, 12-14 Δεκεμβρίου 2013
- 2012** Jones, G., M., **Biba, M.**, Kokkali, G., Vaxevanoglou, T., Chronopoulou, M., Petroutsou, K., Sfakianoudis, K., Pantos, K. "Does deferral of blastocyst transfer to Day 6 compromise outcomes?" (Poster) 28th ESHRE Annual Meeting, Istanbul, Turkey, 1-4 July 2012
- 2010** Κόκκαλη, Γ., Πετρούτσου, Κ., **Μπίμπα, Μ.**, Αγγελή, Ρ., Κατούνα, Α., Μαρκομιχάλη, Χ., Κωνσταντόπουλος, Α., Γραμμάτης, Μ., Σταύρου, Δ., Πάντος, Κ. «Παρατηρήσεις από τη βιοψία 4093 γονιμοποιημένων ωαρίων και 234 βλαστοκύστεων για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση» (Αναρτημένη ανακοίνωση). 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γονιμότητας και Στεριότητας, Αθήνα 10-12 Δεκεμβρίου 2010
- 2010** Jones, G., M., **Biba, M.**, Katouna, A., Markomichali, C., Kokkali, G., Sfakianoudis, K., Pantos, K. "Blastocyst transfer outcomes with and without laser hatching." 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γονιμότητας και Στεριότητας, Αθήνα 10-12 Δεκεμβρίου 2010
- 2009** Κόκκαλη, Γ., Πετρούτσου, Κ., **Μπίμπα, Μ.**, Κατούνα, Α., Γραμμάτης Μ., Σταύρου, Δ., Πάντος, Κ. «Παρατηρήσεις από τη βιοψία 1773 γονιμοποιημένων ωαρίων στο στάδιο

αυτάκωξης και 200 βλαστοκύστεων για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση»

2007

Pantos, K., Makrakis, E., Chronopoulou, M., **Biba, M.**, Perdikaris, A., Dafereras, A. (2007) Day-4 versus Day-3 Embryo Transfer: a prospective study of clinical outcomes. *Fertility and Sterility*: 89(3), 573-577

ΕΡΓΑΣΙΑ

2005-μέχρι σήμερα Βιολόγος-Κλινικός Εμβρυολόγος στην Κλινική ΓΕΝΕΣΙΣ ΑΘΗΝΩΝ Α.Ε.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ-ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

IVF (άνθρωπος) Ανάλυση και προετοιμασία σπέρματος για γονιμοποίηση *in vitro* (IVF)

Ωοληψία

Μορφολογικός προσδιορισμός ωαρίων και εμβρύων

Εφαρμογή απλής εξωσωματικής και μικρογονιμοποίησης (conventional IVF and ICSI)

Προετοιμασία ωαρίων για μικρογονιμοποίηση (ICSI)

Κατάψυξη/απόψυξη ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων και βλαστοκύστεων

Κατάψυξη/απόψυξη ωαρίων/ωοθηκικού ιστού

Υποβοηθούμενη εκκόλαψη γονιμοποιημένων ωαρίων με laser (laser assisted hatching)

In vitro καλλιέργεια εμβρύων και αξιολόγηση της καταλληλότητας τους για εμβρυομεταφορά

Τεχνική εμβρυομεταφοράς

Άλλα

Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας

Ανοσολογικές (π.χ. ELISA) αναλύσεις

Χρήση στερεοσκοπίου, μικροσκοπίου αντίθετης φάσεων, φθορισμού και ανάστροφου μικροσκοπίου

Χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας (π.χ. PCR) και
κυτταρογενετικής (π.χ. FISH)

ΛΟΙΠΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ

Ξένες Γλώσσες **Αγγλικά:** First Certificate of English, University of Cambridge
(1994), IELTS, University of Cambridge (2000)

Γαλλικά: Certificat pratique de langue française (Sorbonne
I)(1996),
Certificat de langue française (DELF) (1995)

Γνώσεις Η/Υ Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον Windows 2008
Προγράμματα Word, Excel, Power Point, Internet Explorer

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	xvi
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	xix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Υπογονιμότητα και Εξωσωματική Γονιμοποίηση.....	1
1.1.1 Υπογονιμότητα – Ενδείξεις για Εξωσωματική Γονιμοποίηση	1
1.1.2 Πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών – Υπερηχογραφική παρακολούθηση.....	2
1.1.3. Γονιμοποίηση <i>in vitro</i>	4
1.1.4 Ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης.....	7
1.1.5. Εμβρυομεταφορά κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση	10
1.2. Καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων <i>in vitro</i>	14
1.2.1 Μεταβολισμός του γονιμοποιημένου ωαρίου	14
1.2.2. Η επιλογή της χημικής σύστασης καλλιεργητικών υλικών για την <i>in vitro</i> καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων – Ιστορική Αναδρομή	14
1.2.1 Μεταβολισμός του γονιμοποιημένου ωαρίου	14
1.2.3. Θεωρίες σχεδιασμού καλλιεργητικών υγρών βασιζόμενων στην χημική σύσταση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.	16
1.2.4. Διαδοχικά ή διπλής φάσης καλλιεργητικά υλικά (<i>sequential media</i>) στην εξωσωματική γονιμοποίηση	19
1.2.5 Μονής φάσης καλλιεργητικά υλικά (<i>monoculture media</i>) στην εξωσωματική γονιμοποίηση	20
1.3 Ανθρώπινη Βλαστοκύστη.....	22
1.3.1 Η διαδικασία σχηματισμού βλαστοκύστης	22
1.3.2 Μορφολογική και ποιοτική κατηγοριοποίηση των βλαστοκύστεων	25
1.3.3 Καλλιέργεια των βλαστοκύστεων και εμβρυομεταφορά- Ιστορική Αναδρομή	27
1.3.4 Πλεονεκτήματα της μεθόδου εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων	28
1.4 Η εμφύτευση των γονιμοποιημένων ωαρίων στη μήτρα	31
1.4.1 Το “παράθυρο εμφύτευσης”- Υποδεκτικότητα ενδομητρίου	31
1.4.2 Μηχανισμός της εμφύτευσης	33
1.4.3 Ορμονικές προϋποθέσεις για την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης.....	36
1.4.4 Ο “διάλογος” μεταξύ ενδομητρίου και βλαστοκύστης κατά την εμφύτευση	37

1.4.4 (i) Εμπλεκόμενα μόρια προσκόλλησης	37
1.4.4 (ii) Πρωτεΐνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ)	41
1.4.4 (iii) Αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors)	42
1.4.4 (iv) Πρωτεΐνες αποικοδόμησης του εξωκυττάριου υποστρώματος (Extracellular degrading matrix proteinases)	44
1.4.4 (v) Φλεγμονώδεις και προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης.....	46
1.4.5 Γονίδια εμπλεκόμενα στη διαδικασία της εμφύτευσης	61
1.5 Μη παρεμβατικοί μέθοδοι αξιολόγησης των γονιμοποιημένων ωαρίων	63
1.6 Σκοπός της μελέτης	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
2.1 Υλικό.....	68
2.1.1 Βιολογικά εργαστήρια που έλαβαν μέρος στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης	68
2.1.2 Κριτήρια ένταξης ασθενών στην παρούσα μελέτη	68
2.1.3 Κριτήρια ασθενών που εντάσσονται σε μέθοδο εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων	70
2.1.4 Συλλογή γαμετών στο εργαστήριο εμβρυολογίας	70
2.1.5 Διαδικασία συλλογής υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού για την ανίχνευση φλεγμονωδών παραγόντων	70
2.1.6 Σύστημα LUMINEX- Μέθοδος ανάλυσης και μέτρησης δειγμάτων	71
2.1.7 Σφαιρίδια Luminex	72
2.1.8 Οπτικό σύστημα Luminex.....	74
2.1.9 Αντιδραστήρια-Υλικά Τεχνολογίας xMAP για την ανάλυση των κυτταροκινών που μελετήθηκαν από την παρούσα μελέτη	74
2.2 Μεθοδολογία	77
2.2.1 Χειρισμός γαμετών <i>in vitro</i>	77
2.2.2 Μέθοδοι γονιμοποίησης <i>in vitro</i>	81
2.2.3 Αξιολόγηση αποτελέσματος γονιμοποίησης (ημέρα πρώτη - D1)	85
2.2.4 Μέθοδος καλλιέργειας <i>in vitro</i> γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης	86
2.2.5 Συλλογή υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού για τη μέτρηση των προς εξέταση φλεγμονωδών παραγόντων	87
2.2.6 Εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων στη μήτρα της γυναίκας	88

2.2.7 Luminex IS 200 - Ανάλυση και μέτρηση των κυτταροκινών IL6 και IL1b στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα.....	89
2.3 Αποτελέσματα.....	95
2.3.1 Αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκαν και μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη - Επιλογή των κατάλληλων γραφημάτων για την απόδοση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων – Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	95
2.3.2 Σύγκριση αποτελέσματος εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών (5 ^{ης} και 6 ^{ης} ημέρας).....	97
2.3.4 Αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς γυναικών σε συνάρτηση με τον φλεγμονώδη παράγοντα IL6.	104
2.3.5 Αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς γυναικών σε συνάρτηση με τον φλεγμονώδη παράγοντα IL1β.	106
2.3.6 Έκκριση των ιντερλευκινών IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα.....	109
2.3.7 Ιντερλευκίνες IL6 και IL1β και συσχετισμός τους με το ποσοστό κύησης μετά από εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων.....	110
2.3.8 Ιντερλευκίνες IL1β και IL6 και συσχετισμός τους με το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων.	113
2.4 Συζήτηση	117
2.4.1 Η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών δεν επηρεάζει το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση..	117
2.4.2 Έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες προ της εμβρυομεταφοράς τους και ο ρόλος τους στην εμφύτευση.	119
2.4.3 Η έκκριση της ιντερλευκίνης IL6 από τις βλαστοκύστες δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης.....	120
2.4.4 Η έκκριση της ιντερλευκίνης IL1β από τις βλαστοκύστες πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα δεν σχετίζεται με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά.....	123
2.4.5 Συνδυασμός της έκφρασης-έκκρισης των ιντερλευκινών IL1β και IL6 από τις βλαστοκύστες και η επίδρασή τους στο αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς..	125
2.4.6 Ο συνδυασμός έκφρασης-έκκρισης των ιντερλευκινών IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες δεν βελτιώνει το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά..	126
2.4.7 Οι φλεγμονώδεις παράγοντες IL6 και IL1β που εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα δεν σχετίζονται με το αναπτυξιακό στάδιο των βλαστοκύστεων... ..	127
2.5 Συμπεράσματα και προοπτική της παρούσας μελέτης.....	129

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	130
SUMMARY.....	134
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	188
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	191
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.....	195
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.....	197
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5.....	200
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6.....	229

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Από τη στιγμή της γέννησης του πρώτου παιδιού μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση το 1978 και μέχρι σήμερα, οι εξελίξεις στην αναπαραγωγική ιατρική και κλινική εμβρυολογία έχουν οδηγήσει στη γέννηση πάνω από 4.000.000 μωρών ανά τον κόσμο. Η υπογονιμότητα αφορά σήμερα πια στο 15% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία, ποσοστό που φαίνεται να αυξάνεται συνεχώς. Το υψηλό κόστος, οικονομικό και ψυχολογικό, στο οποίο υποβάλλονται τα υπογόνιμα ζευγάρια έχει οδηγήσει στην ανάγκη αύξησης του ποσοστού εμφύτευσης και κήσεως μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και σήμερα αποτελεί τον κατεξοχήν τομέα έρευνας στο χώρο αυτό. Στόχος είναι η μεταφορά ενός γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα της γυναίκας με ποσοστά επιτυχίας υψηλότερα της φυσικής σύλληψης. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, ερευνητές ανά τον κόσμο έχουν επιδοθεί στην ανεύρεση μεθόδων επιλογής του καταλληλότερου προεμβρύου για εμβρυομεταφορά με παρεμβατικούς ή μη τρόπους ως προς τα γονιμοποιημένα ωάρια.

Μέχρι σήμερα η μέθοδος αξιολόγησης των αναπτυσσόμενων γονιμοποιημένων ωαρίων είναι η μορφολογική τους αξιολόγηση, που σε συνδυασμό με διάφορες παραμέτρους όπως ο προσανατολισμός των προπυρηνίων, ο χρόνος διεξαγωγής της πρώτης αυλάκωσης, ο ρυθμός ανάπτυξης των προεμβρύων και η παρατήρηση της μειωτικής ατράκτου στα ωάρια, αποτελούν διαδικασίες με τις οποίες επιλέγονται τα καταλληλότερα γονιμοποιημένα ωάρια προς μεταφορά στη μήτρα. Η χρήση των βλαστοκύστεων ως κριτήριο επιλογής τα τελευταία χρόνια επικρατεί στα εργαστήρια εμβρυολογίας παγκοσμίως, διότι αποτελεί ένδειξη της βιωσιμότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων, αυξάνοντας το ποσοστό εμφύτευσης ανά μεταφορά.

Σε όλες αυτές τις μεθόδους αξιολόγησης, οι ερευνητές πρότειναν την προσθήκη μεταβολικών και βιοχημικών δεικτών, που σε συνδυασμό με τα μορφολογικά κριτήρια και την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων υπόσχονται υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης. Δυστυχώς όμως μέχρι σήμερα οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί, είτε δεν έχουν την απαραίτητη ευαισθησία για την ανάλυση των εκλυόμενων μορίων από τα προέμβρυα, ή ο χρόνος που απαιτείται για τη

διακπεραίωση της ανάλυσής τους είναι τέτοιος που τελικά δε μπορούν να έχουν το διαγνωστικό όφελος που υπόσχονται.

Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί και επεμβατικές μέθοδοι για την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για εμβρυομεταφορά. Τέτοιες μεθόδους αποτελούν η βιοψία πολικού σωματίου, η βιοψία βλαστομεριδίου (3^{ης} ημέρας) και η βιοψία τροφεκτοδερμικών κυττάρων βλαστοκύστης. Όλες οι τεχνικές αυτές συντελούν στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση γονιμοποιημένων ωαρίων προ της μεταφοράς τους στη μήτρα της γυναίκας. Παρότι ο τομέας της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης έχει κάνει άλματα τα τελευταία χρόνια, εξακολουθεί να είναι ένας παρεμβατικός τρόπος αξιολόγησης των γονιμοποιημένων ωαρίων και για το λόγο αυτό δεν είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ως μέθοδος επιλογής του καταλληλότερου προεμβρύου για μεταφορά σε όλα τα υπογόνιμα ζευγάρια που καταφεύγουν στην εξωσωματική γονιμοποίηση.

Μία ακόμα παρατήρηση που έφερε επανάσταση στο χώρο της εξωσωματικής είναι ότι η αντίδραση της μήτρας κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο δείχνει μεγάλη ομοιότητα με το φαινόμενο της φλεγμονής. Ανοσολογικοί παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες έχουν αναδειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στο “διάλογο” μεταξύ βλαστοκύστης και μητέρας κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης και λειτουργούν ρυθμιστικά ως προς τη προσκόλληση και διεύθυνση του προεμβρύου στο ενδομήτριο. Αυτοί οι ανοσολογικοί διαμεσολαβητές απελευθερώνονται από τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης, από τα κύτταρα του ενδομητρίου και του ανοσολογικού συστήματος και έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη συσχέτισή τους με το ποσοστό εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση. Προς το παρόν όμως, δεν έχει βρεθεί τρόπος συσχέτισης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης εμφύτευσης και να εφαρμοστεί κλινικά.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται σε αυτό το σημείο, στους φλεγμονώδεις παράγοντες που εκλύονται από τις βλαστοκύστες προ της εμφύτευσής τους, με σκοπό να αναδειχθεί ένας ή περισσότεροι επιπλέον παράγοντες με διαγνωστικό όφελος για την επιλογή της καταλληλότερης βλαστοκύστης προς μεταφορά στη μήτρα. Όπως θα αναδειχθεί στα επόμενα κεφάλαια, η ανάλυση συγκεκριμένων

κυτταροκινών σε συνδυασμό με τα μορφολογικά κριτήρια των βλαστοκύστεων, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο στα εργαστήρια εξωσωματικής γονιμοποίησης, με απώτερο σκοπό την επιλογή ενός και μόνο γονιμοποιημένου ωαρίου με υψηλό ποσοστό εμφύτευσης. Η τεχνική αυτή θα μπορούσε να συντελέσει σαν έναυσμα στην ανάλυση επιπλέον φλεγμονωδών παραγόντων και να ωθήσει την έρευνα σε νέα μονοπάτια, χρήσιμα για το χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ATP:	τριφωσφορική αδενοσίνη (ενεργειακό νόμισμα κυττάρων)
CC:	κιτρική κλομιφαίνη
CO ₂ :	διοξείδιο του άνθρακα
DNA:	δε(σ)οξυρουνουκλεϊκό οξύ
E ₂ :	οιστραδιόλη
EGF:	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EPI:	επιβλάστη
FSH:	θυλακιοτρόπος ορμόνη
rFSH:	ανασυνδιασμένη θυλακιοτρόπος ορμόνη
GnRHα:	ανάλογο γοναδοεκλυτίνης
GnRH(l):	“μακρύ” πρωτόκολλο αγωνιστών γοναδοεκλυτίνης
GnRH(s):	“βραχύ” πρωτόκολλο αγωνιστών γοναδοεκλυτίνης
β-HCG:	β-χοριακή γοναδοτροπίνη
hMG:	ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη
H ₂ O:	νερό
ICM:	έσω κυτταρική μάζα
ICSI:	ενδοκυτταρική έγχυση σπερματοζωαρίου
IFNs:	ιντερφερόνες
ILs:	ιντερλευκίνες
IVF:	εξωσωματική γονιμοποίηση
LAH:	υποβοηθούμενη εκκόλαψη με Laser

LH:	ωχρινοτρόπος ορμόνη
rLH:	ανασχεδιασμένη ωχρινοτρόπος ορμόνη
LIF:	ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας
MMPs:	μεταλλοπρωτεϊνάσες
N ₂ :	άζωτο
NK:	κυτταροκτόνα ή “φονικά” κύτταρα
uNK:	μητρικά κυτταροκτόνα ή “φονικά” κύτταρα
O ₂ :	οξυγόνο
PE:	πρωτογενές ενδόδερμα
PGD:	προεμφυτευτική γενετική διάγνωση
PLCζ:	φωσφολιπάση C-ζ (phospholipase C-zeta)
PRG:	προγεστερόνη
mRNA:	αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
TE:	τροφεκτοδερμικά κύτταρα ή τροφοβλάστης
TIMPs:	αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών
TNF-α:	παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα
ZGA:	ενεργοποίηση ζυγωτικού ή εμβρυϊκού γονιδιώματος
ΕΘΟ:	εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
ΠΟΥ:	παγκόσμιος οργανισμός υγείας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Υπογονιμότητα και Εξωσωματική Γονιμοποίηση

Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ωοκύτταρα που λαμβάνονται με διακολπική αναρρόφηση από τις ωοθήκες γονιμοποιούνται έξω από το ανθρώπινο σώμα σε καλλιέργεια *in vitro*. Τα γονιμοποιημένα ωάρια που προκύπτουν αναπτύσσονται μέσα σε εργαστηριακό περιβάλλον για να μεταφερθούν την κατάλληλη στιγμή στη μήτρα της γυναίκας. Η διαδικασία αυτή αποτελείται από ένα σύνολο διεργασιών που σκοπό έχουν να δώσουν απαντήσεις και τις περισσότερες φορές τη λύση σε προβλήματα υπογονιμότητας ζευγαριών.

1.1.1 Υπογονιμότητα – Ενδείξεις για Εξωσωματική Γονιμοποίηση

Η υπογονιμότητα είναι η αδυναμία σύλληψης και εγκυμοσύνης μετά από προσπάθειες ενός έτους τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς αντισύλληψη. Περιλαμβάνει επίσης και την αδυναμία της γυναίκας να ολοκληρώσει τη περίοδο της κύησης, ώστε το έμβρυο να είναι σε βιώσιμη ηλικία. Η υπογονιμότητα αφορά το 10-15% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία και διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή, σύμφωνα με το αν έχει προηγηθεί εγκυμοσύνη. Τα στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι τα αίτια υπογονιμότητας είναι πλέον σχεδόν μοιρασμένα σε ποσοστό 40-45% στη γυναικεία υπογονιμότητα, 40% στην ανδρική υπογονιμότητα και περίπου 15-20% και στους δύο ή στην ανεξήγητη υπογονιμότητα (Balén and Jacobs, 2003; de Mouzon *et al*, 2010; Bushnik *et al*, 2012).

Τον Ιούλιο του 1978, το πρώτο «παιδί του σωλήνα», η Louise Brown γεννήθηκε μετά από συνεργασία του βιοχημικού Robert Edwards και του γυναικολόγου Patrick Steptoe. Από τότε και μέχρι σήμερα οι εξελίξεις στην ιατρική επιστήμη και εμβρυολογία είναι ραγδαίες και έχουν οδηγήσει στη γέννηση περισσότερων από 4.000.000 μωρών ανά τον κόσμο με τη βοήθεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ειδικά τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των υπογόνιμων ζευγαριών που καταφεύγουν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει αυξηθεί σημαντικά (Biggers, 2012).

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι πιο κοινές αιτίες υπογονιμότητας στον ανδρικό παράγοντα είναι οι διάφορες ανωμαλίες του σπέρματος όπως ανώμαλη κίνηση και μορφολογία, ολιγοσπερμία και αζωοσπερμία και σε μικρότερο βαθμό τα προβλήματα στύσης. Στον γυναικείο παράγοντα είναι η δυσλειτουργία ωοθυλακιορρηξίας, τα προβλήματα ή βλάβες σαλπίγγων που δεν επιδέχονται επέμβαση και η ενδομητρίωση. Σε μικρότερο ποσοστό, η μη επίτευξη

εγκυμοσύνης οφείλεται στην ανεξήγητη υπογονιμότητα, κατάσταση κατά την οποία οι κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις δεν δύνανται να αποκαλύψουν την αιτία της υπογονιμότητας (Kamel, 2010).

Το πρώτο βήμα στη βοήθεια των υπογόνιμων ζευγαριών και της επιλογής της πιο κατάλληλης μεθόδου υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η λήψη ενός λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού του ζευγαριού. Έπειτα, το σπερμοδιάγραμμα, το οποίο συγκρίνεται με τις τιμές που ορίζει ο ΠΟΥ, οι ορμονολογικές εξετάσεις της γυναίκας (FSH, LH, PRG), ο έλεγχος βατότητας των σαλπίγγων και ο έλεγχος ωοθυλακιορρηξίας είναι απαραίτητα για να ολοκληρωθεί η διερεύνηση της αιτίας υπογονιμότητας του ζευγαριού. Τα υπογόνιμα ζευγάρια που καταφεύγουν τελικά στην εξωσωματική γονιμοποίηση ακολουθούν μία θεραπεία που αποτελείται από τα παρακάτω στάδια: την πρόκληση ωορρηξίας μετά από διέγερση της λειτουργίας των ωοθηκών, τη διακολλική συλλογή των ωαρίων, τη λήψη σπέρματος, τη γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro* και την ανάπτυξη και καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* μέχρι τη μεταφορά τους στη μήτρα της γυναίκας. Ο κύκλος κάθε θεραπείας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ολοκληρώνεται με τη μέτρηση της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG) στο αίμα που υποδεικνύει την επίτευξη ή όχι της εγκυμοσύνης (McLachlan, 2005; Kamel, 2010).

1.1.2 Πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών – Υπερηχογραφική παρακολούθηση

Πριν το 1978, η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) θεωρείτο πειραματική και όσες φορές είχε επιχειρηθεί κατέληγε σε ανεπιτυχή εγκυμοσύνη ή σε αποβολή του εμβρύου. Το 1978 γεννήθηκε το πρώτο μωρό εξωσωματικής γονιμοποίησης μετά από λαπαροσκοπική λήψη του μοναδικού ωαρίου που προήλθε από φυσικό εμμηνορρυσιακό κύκλο της γυναίκας, χωρίς τη χρήση φαρμακευτικής αγωγής για τη διέγερση των ωοθηκών της (Wang and Sauer, 2006).

Η προσπάθεια να αυξηθούν τα ποσοστά εμφύτευσης μετά από την εξωσωματική γονιμοποίηση, οδήγησε τους επιστήμονες στη χρήση φαρμακευτικής αγωγής με σκοπό τη διέγερση των ωοθηκών για την ανάπτυξη και διακολλική λήψη περισσότερων του ενός ωαρίου. Η αρχή έγινε με τη χρήση της ανθρώπινης εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (hMG) και στη συνέχεια προστέθηκε η κιτρική κλομιφαίνη (CC) και η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), που σε συνδυασμό με την hMG έφεραν μεν καλύτερα αποτελέσματα, αλλά όχι τα προσδοκώμενα. Το βασικό μειονέκτημα αυτών των φαρμακευτικών αγωγών ήταν η αδυναμία επίτευξης ικανοποιητικού ελέγχου της διέγερσης των ωοθηκών και κυρίως της

ωοθυλακιορρηξίας. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ακύρωση περίπου του 20% των περιστατικών εξωσωματικής γονιμοποίησης λόγω πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας.

Από το 1984, έγινε στροφή της φαρμακευτικής θεραπείας προς τους “αγωνιστές” της γοναδοεκλυτίνης (GnRH-α) και αργότερα των ανταγωνιστών αυτής και μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται σχεδόν παγκοσμίως στις κλινικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με τα υψηλότερα ποσοστά κύησης (Olivennes and Frydman, 1998; Elter and Nelson 2001; Shalev and Leung, 2003; Griesinger *et al*, 2005; Wang and Sauer, 2006; Huirne *et al*, 2007; Al-Inany *et al*, 2009; Verberg *et al*, 2009; Gibraiel *et al*, 2012).

Η φαρμακευτική αγωγή που χορηγείται σε μία γυναίκα κατά την προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης αναφέρεται ως πρωτόκολλο διέγερσης ωοθηκών και εξατομικεύεται ανάλογα με το ιατρικό ιστορικό της. Σκοπό έχει την ανάπτυξη περισσότερων του ενός ωοθυλακίου, την αναστολή της πρόωρης αύξησης της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH), που αλλιώς επιφέρει ωοθυλακιορρηξία και την ελεγχόμενη πρόκληση της τελευταίας. Όλα αυτά γίνονται σε συνδυασμό με τη διακοπική υπερηχογραφική παρακολούθηση των ωοθηκών και ορμονικών προσδιορισμών, προκειμένου να προσδιοριστεί η καταλληλότερη ημέρα της ωοληψίας, να αποφευχθεί η περίπτωση της υπερδιέγερσης των ωοθηκών και να τροποποιηθεί η δόση της αγωγής με βάση την ανταπόκριση της γυναίκας σε αυτή. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται προετοιμάζει επίσης και το ενδομήτριο ώστε να είναι έτοιμο-δεκτικό για τη μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων σε αυτό (Olivennes and Frydman, 1998; Wang and Sauer, 2006; Kamel 2010; Kwan *et al*, 2008; Santos *et al*, 2010; van der Linden *et al*, 2011).

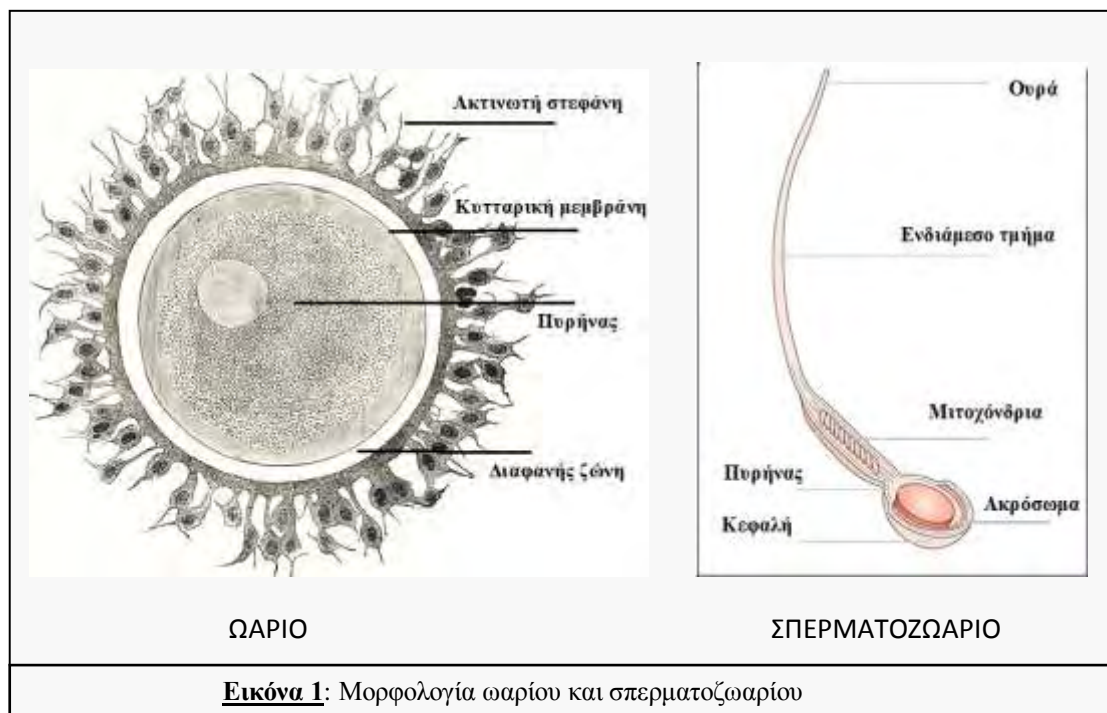
Τα κυριότερα πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι το “μακρύ” (long) και το “βραχύ” (short) πρωτόκολλο αγωνιστών γοναδοεκλυτίνης (GnRH). Η δράση τους βασίζεται στην απευαισθητοποίηση της υπόφυσης που οδηγεί στην καταστολή της ωοθηκικής λειτουργίας. Η διαφορά τους έγκειται κυρίως στη διάρκεια χορήγησης των αγωνιστών GnRH και στο αν η καταστολή και η διέγερση των ωοθηκών γίνονται σε δυο χρόνους (long) ή ταυτόχρονα (short). Τα τελευταία χρόνια το πρωτόκολλο των ανταγωνιστών GnRH χρησιμοποιείται επίσης ευρέως. Έχει την ίδια δράση με τους αγωνιστές μέσω διαφορετικού μηχανισμού και καταλήγει σε πιο γρήγορη αλλά αναστρέψιμη καταστολή της λειτουργίας των αδένων (έκκριση γοναδοτροπινών) (Shalev and Leung, 2003; Griesinger *et al*, 2005; Huirne *et al*, 2007; Santos *et al*, 2010; Maheshwari *et al*, 2011).

Σε όλα τα παραπάνω πρωτόκολλα, χρησιμοποιούνται ανασχεδιασμένες υποφυσιακές γοναδοτροπίνες (r-FSH, r-LH) ή γοναδοτροπίνες ούρων (hMG) για την ανάπτυξη και

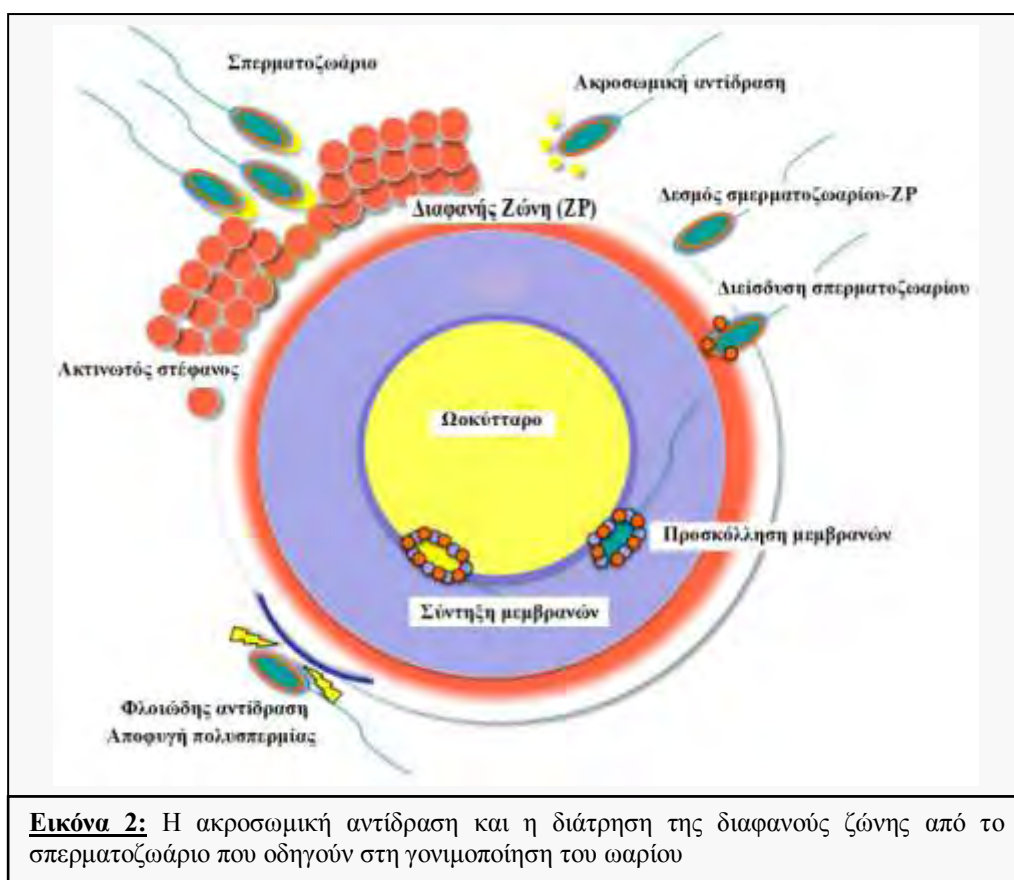
ωρίμανση πολλαπλών ωοθυλακίων κατά τη φάση διέγερσης των ωοθηκών μετά την καταστολή τους. Όταν κριθεί ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι ικανοποιητική, τότε με τη χρήση της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), η οποία χορηγείται εφάπαξ, προκαλείται η τελική ωρίμανση των ωαρίων έτσι ώστε να ακολουθήσει η ωοληψία (36-38 ώρες μετά). Η διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας ελέγχεται με διακολπικά υπερηχογραφήματα κάθε 2 μέρες σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό των ορμονών (οιστραδιόλη E_2) με εξέταση αίματος. Το πάχος του ενδομητρίου επίσης μετράται υπερηχογραφικά και καταγράφεται. Το πρωτόκολλο κάθε εξωσωματικής γονιμοποίησης περιέχει μετά την εμβρυομεταφορά, υποστήριξη της ωχρινικής φάσης που προετοιμάζει το ενδομήτριο να δεχτεί και να υποστηρίξει το εμφυτευόμενο γονιμοποιημένο ωάριο. Αυτή η ορμονική υποστήριξη γίνεται με τη χορήγηση προγεστερόνης, hCG ή ανάλογα GnRH (Shalev and Leung, 2003; Griesinger *et al*, 2005; Daya, 2007; Huirne *et al*, 2007; Kwan *et al*, 2008; Santos *et al*, 2010; van der Linden *et al*, 2011; Westergaard *et al*, 2011).

1.1.3. Γονιμοποίηση *in vitro*

Η γονιμοποίηση είναι μία σύνθετη και καλά συντονισμένη διαδικασία αλληλεπιδράσεων των απλοειδών γαμετών (ωάριο - σπερματοζωάριο) που αρχίζει με την αναγνώριση και σύντηξη τους και καταλήγει με τη συνένωση του αρσενικού και θηλυκού προπυρήνα για να δημιουργηθεί ο ζυγώτης (Elder and Dale, 2011).



Το σπερματοζωάριο περνά πρώτα από τα κύτταρα της ακτινωτής στεφάνης του ωαρίου και προσδένεται στη διαφανή του ζώνη (*zona pellucida*). Η διαδικασία αυτή δημιουργεί πολλαπλά ανοίγματα στη μεμβράνη του ακροσώματος και υδρολυτικά ένζυμα απελευθερώνονται (ακροσωμική αντίδραση), με αποτέλεσμα το σπερματοζωάριο να συνδεθεί τελικά με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου. Επειδή κατά την ακροσωμική αντίδραση έχει αναλωθεί το μεγαλύτερο τμήμα της μεμβράνης της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, η σύνδεση αυτή γίνεται μεταξύ της μεμβράνης του ωαρίου και της μεταπυρηνικής καλύπτρας του σπερματοζωαρίου, όπου και δημιουργείται ο γονιμοποιητικός κώνος (εικόνα 2) (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Elder and Dale, 2000; Talbot *et al*, 2003; Gadella and Evans, 2011; Tulsiani and Abou-Haila, 2011).



Εικόνα 2: Η ακροσωμική αντίδραση και η διάτρηση της διαφανούς ζώνης από το σπερματοζωάριο που οδηγούν στη γονιμοποίηση του ωαρίου

Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου που συνοδεύει τη μεταβολή της δομής της διαφανούς ζώνης (φλοιώδης αντίδραση) μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα της, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα πολυσπερμίας, τα οποία συνήθως καταλήγουν σε ανώμαλη ανάπτυξη του προεμβρύου (Elder and Dale, 2011; Gadella and Evans, 2011). Η ενεργοποίηση του ωαρίου περιλαμβάνει επίσης τη συμπλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης σχηματίζοντας τελικά το δεύτερο πολικό σωματίο και το


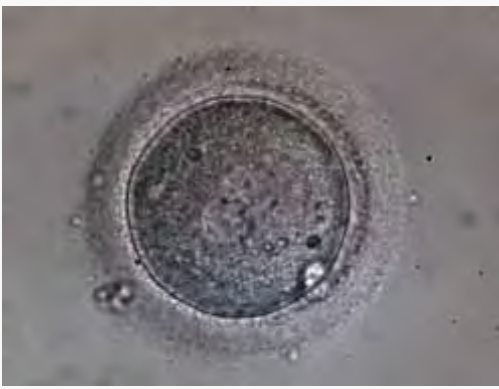
μητρικό προπυρήνα. Ο πατρικός προπυρήνας που δημιουργείται από το σπερματοζωάριο έπειτα από μία σειρά μεταβολών του πυρήνα του (αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων), μετά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (ωόπλασμα), μετακινείται μέχρι να φτάσει κοντά στο μητρικό. Οι προπυρήνες εμφανίζονται περίπου 16-22 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και εντοπίζονται συνήθως στο κέντρο του ωαρίου (εικόνα 4). Ακολουθούν ο διπλασιασμός του DNA και η επανασυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, η συνένωση των προπυρήνων και η αυλάκωση του γονιμοποιημένου ωαρίου μέσω μιτωτικών διαιρέσεων (Greenstein, 2005; Elder and Dale, 2000; Plachot, 2000; Branzini *et al*, 2007; Robertson and Lin, 2013).

Στην εξωσωματική γονιμοποίηση, τα ωάρια που συλλέγονται μετά από διακολπική ωοληψία και το σπέρμα μετά από την επεξεργασία ενεργοποίησης που έχει υποστεί, ώστε να απομονωθούν τα ταχέως κινούμενα και ομαλά μορφολογικά σπερματοζωάρια, έρχονται σε επαφή είτε μέσω της τεχνικής της απλής εξωσωματικής γονιμοποίησης, είτε μέσω της τεχνικής μικρογονιμοποίησης. Στην απλή εξωσωματική γονιμοποίηση (conventional-IVF) όλη η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω λαμβάνει μέρος μέσα σε ένα τρυβλίο (petri-dish), στο οποίο τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια έχουν τοποθετηθεί μαζί με σκοπό της επίτευξης γονιμοποίησης χωρίς άλλη παρέμβαση. Η επιτυχία της γονιμοποίησης εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα του σπέρματος και το στάδιο ωρίμανσης των ωαρίων (Παταργιάς και Αλεπόρου, 1998; Elder and Dale, 2011).

Στην τεχνική όμως της μικρογονιμοποίησης (ICSI) ή αλλιώς ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (εικόνα 3), η ακροσωμική αντίδραση και η δημιουργία γονιμοποιητικού κώνου παρακάμπτονται, καθώς το σπερματοζωάριο εισέρχεται παρεμβατικά μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, με τη βοήθεια μιας βελόνας (ICSI pipette). Η βελόνα αυτή διεγείρει το ωάριο με την είσοδό της, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίησή του ώστε να ξεκινήσουν τα υπόλοιπα στάδια της γονιμοποίησης μέχρι τη δημιουργία του διπλοειδή ζυγώτη. Από τα ωάρια που θα γονιμοποιηθούν *in vitro* με αυτή τη τεχνική, έχουν απομακρυνθεί τα κοκκιώδη κύτταρα και ο ακτινωτός στέφανος που τα περιβάλλουν, έτσι ώστε αφενός μεν να είναι πιο εύκολος ο χειρισμός τους και αφετέρου δεν να διαχωριστούν αυτά τα οποία έχουν πολικό σωματίο και άρα είναι στο στάδιο αυτό της μείωσης (ωρίμανσης) που είναι απαραίτητο για να επέλθει γονιμοποίηση (Palermo *et al*, 1992; Elder and Dale, 2011).

Αρχικά θεωρείτο ότι η είσοδος της βελόνας μέσα από την κυτταρική μεμβράνη στο κέντρο του ωοπλάσματος ήταν αρκετή για την ενεργοποίηση του ωαρίου. Αργότερα όμως η τεχνική

τροποποιήθηκε, έτσι ώστε μετά την είσοδο της βελόνας να αναρροφείται μέρος του ωοπλάσματος μέχρι αυτό να υποστεί ρήξη (Carrillo *et al*, 1998a). Η τεχνική τροποποιημένη χρησιμοποιείται έτσι μέχρι και σήμερα με πολύ υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Τελευταίες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ενεργοποίηση του ωαρίου εξαρτάται από μία φωσφολιπάση C, την PLCζ, πρωτεΐνη που βρίσκεται στο σπερματοζωάριο σε ανενεργή αρχικά μορφή πριν την είσοδό του στο ωάριο. Η ενεργοποίηση του παράγοντα PLCζ γίνεται μέσω της σύντηξης μεμβρανών του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου και πιθανότατα σε συνάρτηση με κάποιο παράγοντα του ωαρίου, ο οποίος δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η φωσφολιπάση PLCζ εμπλέκεται και στην ακροσωμική αντίδραση (Ramadan *et al*, 2012).

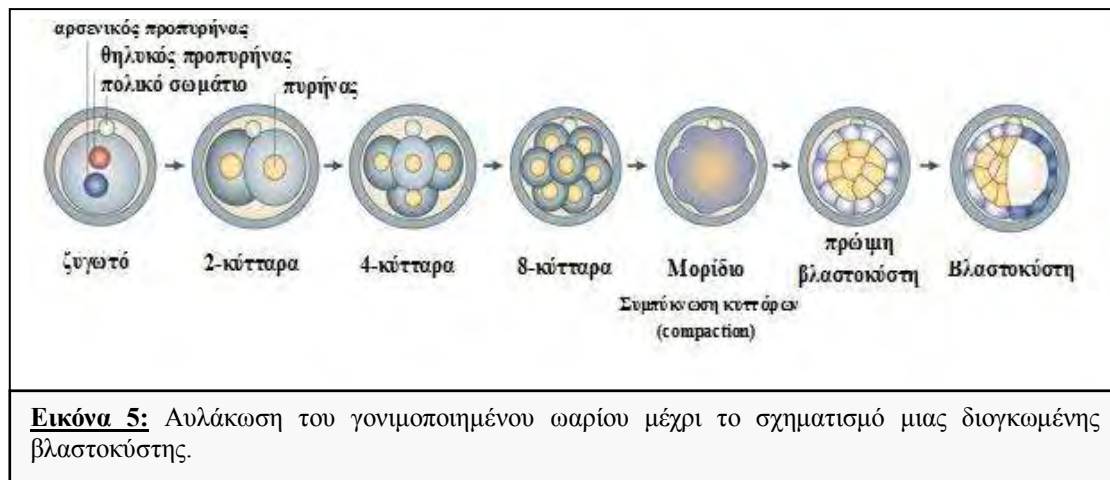
	
<p>Εικόνα 3: Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) (Γένεσις Αθηνών). Το ωάριο βρίσκεται στη φάση ΜΙΙ της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και το πρώτο πολικό σωματίο είναι εμφανές στην ώρα 12. Για τα υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης το πολικό σωματίο πρέπει να είναι πάντα στην ώρα 12 ή 6 κατά την εφαρμογή της μεθόδου ICSI (Palermo <i>et al</i>, 1992; Carrillo <i>et al</i>, 1998).</p>	<p>Εικόνα 4: Γονιμοποιημένο ωάριο. Εμφάνιση δύο προπυρήνων και διπλού πολικού σωματίου. Μέσα στους προπυρήνες διακρίνονται οι πυρηνίσκοι (Γένεσις Αθηνών).</p>

Η γονιμοποίηση καταλήγει στη συνένωση των προπυρήνων (syngamy), κατά την οποία οι μεμβράνες των προπυρήνων αποσυντίθενται και τα χρωμοσώματά τους οργανώνονται τελικά σε μιτωτική άτρακτο για να ξεκινήσει η πρώτη κυτταρική διαίρεση (Bras *et al*, 1996).

1.1.4 Ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης

Μετά τη γονιμοποίηση, ο ζυγώτης διαιρείται με μιτωτικές διαιρέσεις σε μικρότερα κύτταρα που ονομάζονται βλαστομερίδια (blastomeres). Κάθε βλαστομερίδιο είναι περίπου μισό σε μέγεθος σε σχέση με αυτό από το οποίο προήρθε, με αποτέλεσμα το μέγεθος του προεμβρύου να είναι περίπου ίσο με αυτό του ζυγώτη. Η διαδικασία αυτή της διαίρεσης ονομάζεται αυλάκωση (cleavage) και οδηγεί αρχικά σε όμοια κύτταρα όσον αφορά στη μορφολογία, τη



λειτουργία και τη δυνατότητα ανάπτυξης (εικόνα 5 & 6). Τα βλαστομερίδια αναφέρονται ως ολοδύναμα κύτταρα, διότι διακατέχονται από την ικανότητα να σχηματίσουν κάθε κυτταρικό τύπο, ενώ απομονωμένο το κάθε βλαστομερίδιο μπορεί να δώσει ένα πλήρη οργανισμό. Η πρόοδος της αυλάκωσης οδηγεί σε πόλωση του γονιμοποιημένου ωαρίου και σε διαφοροποίηση των βλαστομεριδίων (Κουσουλάκος, 2004).



Ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί ο πρώτος κυτταρικός κύκλος είναι περίπου 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και καταλήγει στη δημιουργία δύο βλαστομεριδίων. Από εκεί και έπειτα ο κάθε κυτταρικός κύκλος χρειάζεται λιγότερες ώρες (12-18 ώρες) για να ολοκληρωθεί (Bras *et al*, 1996). Σε αυτά τα πρώτα στάδια αυλάκωσης του γονιμοποιημένου ωαρίου συντίθεται ελάχιστο mRNA. Το mRNA που προϋπάρχει στο ωοκύτταρο και γενικότερα το μητρικό γένωμα είναι υπεύθυνο για τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου (Nothias *et al*, 1995; Hamatani *et al*, 2004; Schier, 2007; Walser and Lipshitz, 2011).

Στην τρίτη με τέταρτη αυλάκωση, όταν το προέμβρυο έχει φτάσει τα 16-32 περίπου κύτταρα, μεταβάλλεται μορφολογικά. Τα κύτταρα στο στάδιο αυτό αποπλατύνονται και δημιουργούν μεταξύ τους τόσα σημεία συνένωσης με συνδέσεις πρόσφυσης και δεσμοσώματα, ώστε τα όρια μεταξύ των βλαστομεριδίων δεν είναι πια εμφανή (compaction), σχηματίζοντας έτσι το μορίδιο (morula) (εικόνα 7), ενώ χασματικές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων βοηθούν στην κυτταρική επικοινωνία (Dale *et al*, 1991; Nikas *et al*, 1996; Oron and Ivanova, 2012). Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται η ενεργοποίηση των γονιδίων του προεμβρύου, αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας και της κυτταρικής κινητικότητας. Οι γενετικές πληροφορίες μητρικής προελεύσεως παύουν να παίζουν το κυρίαρχο ρόλο και τα γονίδια του γονιμοποιημένου ωαρίου ενεργοποιούνται σταδιακά για να γίνει η έκφραση του ζυγωτικού


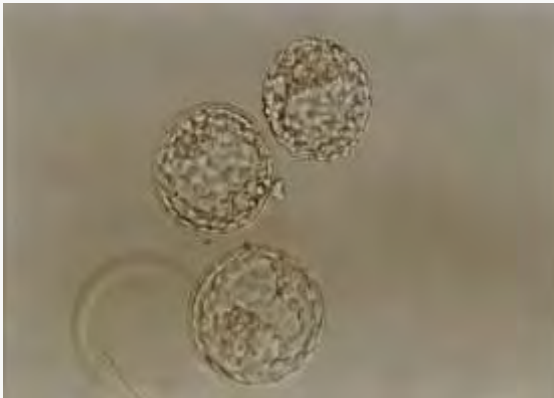
πια γονιδιώματος. Το στάδιο αυτό είναι κρίσιμο και απαραίτητο για το σχηματισμό του μοριδίου και της βλαστοκύστης αμέσως μετά (Schulz and Worrada, 1995; Nothias *et al*, 1995; Scholtes and Zeilmaker, 1998; Kanka, 2003; Oron and Ivanova, 2012; Hamatani *et al*, 2006; Schier, 2007; Walser and Lipshitz, 2011).

 <p>Γονιμοποιημένα ωάρια 8-10 κυττάρων</p>	 <p>Προέμβρυο σε διαδικασία σύμπτυξης κυττάρων (compaction) για το σχηματισμό μοριδίου</p>
<p>Εικόνα 6: Προέμβρυα τρίτης ημέρας (Γένεσις Αθηνών)</p>	<p>Εικόνα 7: Μορίδιο πριν το σχηματισμό βλαστοκύστης (Γένεσις Αθηνών)</p>

Το μορίδιο θα αναπτυχθεί σε βλαστοκύστη (εικόνες 8 & 9) μετά από μία σειρά μορφολογικών μεταβολών που περιλαμβάνει τη συγκέντρωση υγρού στο εσωτερικό του μοριδίου (βλαστόκοιλο) και το σχηματισμό τελικά δύο τύπων κυττάρων. Ο πρώτος τύπος κυττάρων βρίσκεται στο εσωτερικό της βλαστοκύστης, αναφέρεται ως μάζα εσωτερικών κυττάρων (inner cell mass-ICM) και αποτελεί τον πρόδρομο του εμβρύου και των εξωεμβρυϊκών μεμβρανών. Ο δεύτερος τύπος κυττάρων αναφέρεται ως τροφοβλάστης ή τροφεκτοδερμικά κύτταρα (trophectoderm cells-TE), βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος της βλαστοκύστης, χρησιμεύει για τη διατροφή της και αποτελεί πρόδρομο του πλακούντα (Gardner *et al*, 2002; Plachot, 2000; Oron and Ivanova, 2012). Μετά τη σύμπτυξη των κυττάρων στο στάδιο του μοριδίου, η πρωταρχική λειτουργία των τροφεκτοδερμικών κυττάρων, είναι να στέλνουν ιόντα και νερό μέσω των αντλιών Na^+/K^+ ATP-άσης στο εσωτερικό του μοριδίου, που σε συνδυασμό με τη παθητική μετακίνηση του υγρού λόγω όσμωσης οδηγούν στο σχηματισμό του βλαστόκοιλου στην αναπτυσσόμενη βλαστοκύστη, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της (Kidder, 2002; Madan and Watson, 2007).

Στα πρώτα στάδια αυλάκωσης του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι και τα αρχικά στάδια της βλαστοκύστης, το προέμβρυο εγκλείεται μέσα στη διαφανή ζώνη, η οποία το προστατεύει και συγκρατεί τα κύτταρα μαζί κατά το σχηματισμό του μοριδίου (compaction). Αργότερα καθώς

η βλαστοκύστη αναπτύσσεται και διογκώνεται, η διαφανής ζώνη λεπταίνει και τελικά με τη βοήθεια του ενζύμου στρυψίνη που βρίσκεται στη κυτταρική μεμβράνη, δημιουργείται ένα άνοιγμα στη ζώνη μέσω υδρόλυσης, η βλαστοκύστη εκκολάπτεται και η ζώνη απορρίπτεται για να ξεκινήσει η διαδικασία της εμφύτευσης (Αναγνωστοπούλου –Μπέη, 1993; Plachot, 2000; Gardner *et al*, 2002).

	
<p>Μορίδιο με εμφανή στοιχεία έναρξης της βλαστικής κοιλότητας</p>	<p>Βλαστοκύστες: εκκολάπτουσα, εκκολαπτόμενη και πλήρως διογκωμένη</p>
<p>Εικόνα 8: Πρώιμη βλαστοκύστη (Γένεσις Αθηνών)</p>	<p>Εικόνα 9: Βλαστοκύστες. Η μεσαία κατά σειρά δείχνει εμφανή στοιχεία εκκόλαψης και η πάνω έχει πλήρως εκκολαφθεί. Κάτω αριστερά διαφαίνεται η διαφανής ζώνη που έχει απορριφθεί (Γένεσις Αθηνών)</p>

Οι γαμέτες μετά τη συλλογή και επεξεργασία τους και τα γονιμοποιημένα ωάρια καθ' όλη την καλλιέργειά τους *in vitro* μέχρι και πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα, βρίσκονται σε εργαστηριακό περιβάλλον που εξομοιώνει τις *in vivo* συνθήκες. Οι γαμέτες και τα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται μέσα σε καλλιεργητικά υγρά που τους δίνουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για κάθε στάδιο αντίστοιχα της καλλιέργειας και ανάπτυξής τους *in vitro*. Επωαστικοί κλίβανοι στο εργαστήριο προσφέρουν τη σωστή θερμοκρασία (37°C) και το απαιτούμενο ποσοστό CO₂, O₂, N₂ ώστε να διατηρηθεί παράλληλα το pH των καλλιεργητικών υγρών σε φυσιολογικά για τα προέμβρυα επίπεδα (λίγο μικρότερο του 7.5) (Elder and Dale, 2000; Elder and Dale, 2011).

1.1.5. Εμβρυομεταφορά κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση

Η εμβρυομεταφορά κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ένα ή περισσότερα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται στη μήτρα της γυναίκας με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης. Η εμβρυομεταφορά είναι ίσως το πιο κρίσιμο και

σημαντικό κομμάτι των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ο θεράπων ιατρός που την εφαρμόζει οφείλει να είναι πολύ προσεκτικός ώστε τα προέμβρυα να τοποθετηθούν σωστά και ατραυματικά στην κοιλότητα της μήτρας, αλλιώς διακινδυνεύεται το αποτέλεσμα της εμφύτευσης, ανεξάρτητα από την ποιότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων που μεταφέρονται (Mansour and Aboulghar, 2002; Mains and van Voorhis, 2010).

Τα γονιμοποιημένα ωάρια μπορούν να μεταφερθούν στη μήτρα της γυναίκας σε όλα τα στάδια ανάπτυξης τους από την πρώτη κιόλας ημέρα του σχηματισμού προπυρηνίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων. Κατά τα πρώτα χρόνια της εφαρμογής της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η εμβρυομεταφορά γινόταν περίπου δύο ημέρες μετά τη διακολπική συλλογή των ωαρίων (στάδιο 2-4 κυττάρων) που έδινε τη δυνατότητα της αξιολόγησης των προεμβρύων βάση της κυτταρικής τους διαίρεσης, χωρίς παράλληλα να τα υποβάλλει σε επιβαρυντικούς παράγοντες, εξαιτίας της καλλιέργειας *in vitro* και της παρατεταμένης παραμονής τους στο εργαστήριο (Oatway *et al*, 2004). Δεδομένου όμως ότι τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν πολύ χαμηλά, υπήρξε μία μεγάλη στροφή της έρευνας προς την κατεύθυνση του ποια είναι η πιο κατάλληλη ημέρα εμβρυομεταφοράς και ποια είναι τα κριτήρια με τα οποία πρέπει να επιλέγονται τα γονιμοποιημένα ωάρια που τοποθετούνται στη μήτρα.

Τα τελευταία χρόνια υπήρξαν ενδείξεις ότι είναι δυνατή η επιλογή ζυγωτών για εμβρυομεταφορά με αποδεκτά ποσοστά εμφύτευσης. Τα κριτήρια επιλογής των καλύτερων ζυγωτών, αυτών που θεωρητικά θα εξελιχθούν σε βιώσιμες βλαστοκύστες, βασίζονται στην παρουσία προπυρηνίων στο κέντρο του γονιμοποιημένου ωαρίου, στην ευθυγράμμιση τους σε σχέση με τους πυρηνίσκους τους, στη μορφολογία του ετερογενούς κυτταροπλάσματος του ζυγώτη και στο χρόνο που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί ο πρώτος κυτταρικός κύκλος (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Tesarik *et al*, 2000; Dale *et al*, 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε περιπτώσεις που οι συνθήκες στο εργαστήριο δεν είναι ευνοϊκές, τότε η μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων νωρίτερα, στο στάδιο του ζυγώτη, μπορεί να καταλήξει σε υψηλότερα ποσοστά κύησης (Quinn *et al*, 1990).

Τα τελευταία περίπου είκοσι χρόνια, η εμβρυομεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων την τρίτη ημέρα χρησιμοποιείται από τις κλινικές εξωσωματικής γονιμοποίησης ως η πιο συνηθισμένη μέθοδος εμβρυομεταφοράς. Ως μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της επιλογής προεμβρύων με περισσότερα κριτήρια αξιολόγησης από αυτή της δεύτερης ημέρας, διότι στο στάδιο αυτό τα γονιμοποιημένα ωάρια είναι περισσότερο εξελιγμένα και έχουν αποκλειστεί αυτά που έχουν υποστεί διακοπή της αυλάκωσής τους στο προηγούμενο στάδιο. Οι συγκριτικές μελέτες

μεταξύ της δεύτερης και τρίτης ημέρας μεταφοράς έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ τους και ακόμα και όταν υπάρχει, δεν είναι στατιστικά σημαντική όσον αφορά στο ποσοστό κυήσεων ή εμφύτευσης ανά μεταφερόμενο γονιμοποιημένο ωάριο (Ertzeid *et al*, 1999; Laverge *et al*, 2001; Aboulghar *et al*, 2003).

Εν τούτοις, στις συγκριτικές αυτές μελέτες παρατηρείται μία διαφορά στο ποσοστό βιώσιμων εγκυμοσυνών, με υψηλότερο αυτό μετά από μεταφορά τρίτης ημέρας γονιμοποιημένων ωαρίων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι την τρίτη ημέρα, η επιλογή του καταλληλότερου προεμβρύου για εμβρυομεταφορά βασίζεται σε περισσότερα κριτήρια αξιολόγησης (Van Os *et al*, 1989; Carillo *et al*, 1998b; Oatway *et al*, 2004). Ωστόσο, η μέθοδος εμβρυομεταφοράς δεύτερης ημέρας έχει προταθεί να βελτιώνει τα ποσοστά εγκυμοσυνών έναντι της τρίτης ημέρας σε γυναίκες που έχουν φτωχή ανταπόκριση στη διέγερση ωοθηκών. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έχουν αποφανθεί ότι ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων (Shahine *et al*, 2011).

Σε πολλά εργαστήρια εξωσωματικής γονιμοποίησης πραγματοποιείται επίσης η εμβρυομεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων την τέταρτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, όπου τα προέμβρυα βρίσκονται στο στάδιο του μοριδίου. Η επιλογή της μεθόδου αυτής δίνει τη δυνατότητα αναγνώρισης γονιμοποιημένων ωαρίων με υψηλή δυναμική εμφύτευσης, διότι το στάδιο του μοριδίου σηματοδοτεί και την ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος. Επίσης η τέταρτη ημέρα ανάπτυξης των προεμβρύων επιτρέπει την πιο εύκολη και ασφαλή διεκπεραίωση της μεθόδου υποβοηθούμενης εκκόλαψης με laser (LAH) όταν χρειάζεται, λόγω του ότι τα κύτταρα του μοριδίου συγκρατούνται πολύ στενά μεταξύ τους με διακυτταρικούς δεσμούς (Goto *et al*, 1994; Huisman *et al*, 1994; Tao *et al*, 2001; Tao *et al*, 2004; Pantos *et al*, 2008).

Η καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων (5^η ή 6^η ημέρα) προτείνεται ως η μέθοδος που προσφέρει τα υψηλότερα ποσοστά κυήσεων. Με την παρατεταμένη καλλιέργεια *in vitro* έχει παρατηρηθεί ότι γονιμοποιημένα ωάρια καλής ποιότητας τη δεύτερη και τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους μπορεί να αποτύχουν να εξελιχθούν σε βλαστοκύστες, ενώ γονιμοποιημένα ωάρια με φτωχή ανάπτυξη μέχρι τη τρίτη ημέρα μπορεί να καταλήξουν στο σχηματισμό τελικά βιώσιμων βλαστοκύστεων (Jones and Trounson, 1999). Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέθοδος εμβρυομεταφοράς των βλαστοκύστεων προσφέρει ποσοστά κλινικών κυήσεων που ξεπερνούν το 50% και δίνουν τη δυνατότητα να συμπεριληφθεί μικρότερος αριθμός προεμβρύων κατά την εμβρυομεταφορά,

χωρίς να διακινδυνεύεται το ποσοστό επιτυχίας. Με αυτό τον τρόπο, το ποσοστό πολύδυμων κυήσεων που αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης μειώνεται σημαντικά (Gardner *et al*, 1998; Gardner, 2000; Gardner *et al*, 2000; Schoolcraft and Gardner, 2001; Karaki *et al*, 2002; Pantos *et al*, 2004; Blake *et al*, 2007; Malgalraj *et al*, 2009; Glujovsky *et al*, 2012).

Τα μορφολογικά κριτήρια επιλογής των γονιμοποιημένων ωαρίων για εμβρυομεταφορά σε κάθε στάδιο ανάπτυξης τους κατά την καλλιέργεια *in vitro* περιγράφονται στο Παράρτημα 1. Το Παράρτημα 1 παραθέτει τα κριτήρια που η διεθνής εμβρυολογική κοινότητα αποφάσισε το 2011 στο συνέδριο της Κωνσταντινούπολης να είναι παγκοσμίως τα κοινά κριτήρια αξιολόγησης των γονιμοποιημένων ωαρίων μεταξύ των διαφόρων κέντρων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Alpha scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

1.2. Καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro*

Η καλλιέργεια και η ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης απαιτούν ευνοϊκές *in vitro* συνθήκες και βελτιστοποιημένα καλλιεργητικά μέσα. Τις δυο τελευταίες δεκαετίες οι έρευνες έχουν εντατικοποιηθεί ως προς τη τροποποίηση και βελτίωση των καλλιεργητικών υγρών που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* με σπουδαία αποτελέσματα όσον αφορά στην ανάπτυξη των βλαστοκύστεων και των ποσοστών κήσεων μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

1.2.1 Μεταβολισμός του γονιμοποιημένου ωαρίου

Από τη στιγμή της γονιμοποίησης, στα πρώτα στάδια αυλάκωσης του προεμβρύου μέχρι και το σχηματισμό βλαστοκύστης, το γονιμοποιημένο ωάριο χρειάζεται ενέργεια για να φέρει εις πέρας μια σειρά από διαδικασίες που συνδέονται με τη σωστή ανάπτυξή του. Η πρωταρχική πηγή ενέργειας είναι η παραγωγή ATP είτε μέσω αερόβιας οξείδωσης υποστρωμάτων σε CO₂ και H₂O, είτε μέσω αναερόβιας γλυκόλυσης της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ. Τα γονιμοποιημένα ωάρια *in vitro* στα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους παράγουν ATP μέσω του μεταβολισμού αερόβιας οξείδωσης του πυροσταφυλικού οξέος, του γαλακτικού οξέος, κάποιων αμινοξέων και πιθανότατα κάποιων λιπιδίων. Η μεταβολική αυτή διαδικασία μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου, πυροσταφυλικού και γαλακτικού οξέος, την παραγωγή γαλακτικού οξέος και του μεταβολισμού των αμινοξέων (Leese, 1991; Gardner and Lane, 1996; Copichandran and Leese, 2003; Sturmey and Leese, 2003; Leese, 2003; Leese *et al*, 2008).

Το πυροσταφυλικό και το γαλακτικό οξύ φαίνεται να είναι οι βασικές πηγές ενέργειας των γονιμοποιημένων ωαρίων πριν την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος. Το πυροσταφυλικό οξύ επιπλέον απομακρύνει τα ιόντα αμμωνίας, παράγωγα μεταβολισμού που είναι τοξικά για τα προέμβρυα *in vitro*. Κατά τη διάρκεια των πρώτων αυλακώσεων, έχει παρατηρηθεί ότι οι ενεργειακές ανάγκες των γονιμοποιημένων ωαρίων είναι σχετικά χαμηλές (χαμηλή βιοσύνθεση) (Turner *et al*, 1992; Lane and Gardner 2001; Gardner *et al*, 2002; Stokes *et al*, 2007). Αυτό μεταφράζεται σε περιορισμένη κατανάλωση οξυγόνου που οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), γεγονός πολύ σημαντικό για την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος, η οποία ξεκινάει στο στάδιο των 4-8 κυττάρων του προεμβρύου (Noda *et al*, 1991; Burton *et al*, 2003; Harvey *et al*, 2004; Harvey *et al*, 2007). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου φαίνεται να δημιουργούν βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα, σε

λιπίδια και σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος ή της κυτταρικής μεμβράνης (Doherty and Jackson, 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Όταν το γονιμοποιημένο ωάριο έχει ξεκινήσει την τέταρτη αυλάκωση που οδηγεί στη συνένωση των κυττάρων μέχρι το σχηματισμό του μοριδίου και στη συνέχεια της βλαστοκύστης, οι ενεργειακές του ανάγκες αυξάνονται δραματικά (υψηλή βιοσύνθεση). Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές συνδυάζονται με αύξηση του μεταβολισμού του προεμβρύου μέσω δύο κυτταρικών διεργασιών. Η πρώτη είναι ο σχηματισμός του βλαστόκοιλου που οφείλεται κυρίως στην αντλία Na^+ , K^+ ΑΤΡάση και η δεύτερη είναι η σύνθεση πρωτεϊνών του προεμβρύου, το οποίο αρχίζει να αυξάνεται σε όγκο για να καταλήξει στο σχηματισμό μιας πλήρως διογκωμένης βλαστοκύστης που στη συνέχεια θα εκκολαφθεί από τη διαφανή της ζώνη για να εμφυτευθεί. Χαρακτηριστικό αυτής της περιόδου μεταβολισμού του γονιμοποιημένου ωαρίου είναι η αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης και η αναερόβια γλυκόλυσή της. Αυτή η στροφή στην αναερόβια λειτουργία έχει προταθεί να προετοιμάζει το προέμβρυο για το υποξικό περιβάλλον που θα βρεθεί στη μήτρα κατά την εμφύτευση (Hardy *et al*, 1989; Conaghan *et al*, 1993; Gardner and Lane, 1996; Gardner *et al*, 2001; Leese *et al*, 2008).

Ο μεταβολισμός των γονιμοποιημένων ωαρίων είναι ο μηχανισμός που έχει μελετηθεί πολύ εντατικά και μελετείται ακόμα ως το πιο σημαντικό μέσο για τη βελτιστοποίηση του συστήματος καλλιέργειας. Ο όρος βελτιστοποίηση συμπεριλαμβάνει το υψηλό ποσοστό ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων, αλλά και το αυξημένο ποσοστό κλινικών κύψεων αργότερα.

1.2.2. Η επιλογή της χημικής σύστασης καλλιεργητικών υλικών για την *in vitro* καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων – Ιστορική Αναδρομή.

Οι πρώτες έρευνες για τη καλλιέργεια κυττάρων χρονολογούνται το 1907 που πρώτος ο ερευνητής Harrison χρησιμοποίησε ένα βιολογικό σύστημα θρεπτικών υλικών που υποστήριζε την ιστοκαλλιέργεια. Πολύ αργότερα, ο ερευνητής Lewis και οι συνεργάτες του συνέχισαν τις έρευνες προτείνοντας τη πρώτη καθορισμένη χημική σύσταση καλλιεργητικών υλικών κυτταροκαλλιέργειας (Biggers, 1998). Τα επόμενα χρόνια νέα καλλιεργητικά υγρά με τροποποιημένη τη χημική σύσταση των ήδη υπαρχόντων δημοσιεύτηκαν από τον Biggers (1957) και τον Waymouth (1965, 1972) (Summers and Biggers, 2003). Όσον αφορά στην καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων των θηλαστικών, τα κουνέλια και τα ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν σχεδόν αποκλειστικά σαν πρότυπα για την επιλογή των κατάλληλων

θρεπτικών υλικών, που θα επέτρεπαν την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων. Ο ερευνητής Whitten πρώτος απέδειξε ότι η χημική σύσταση 9 μόνο συστατικών ήταν αρκετή για να υποστηρίξει την καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων στα τρωκτικά και το 1958 οι πρώτες κυήσεις και γεννήσεις απογόνων αναφέρθηκαν (Hammer, 1998; Summers and Biggers, 2003).

Μελέτες πάνω σε τροποποιήσεις του καλλιεργητικού μέσου που προτάθηκε από τον Whitten, έδειξαν ότι η προσθήκη γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού ανάπτυξης των προεμβρύων *in vitro*. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η δράση του κάθε συστατικού του καλλιεργητικού μέσου εξαρτάται άμεσα από τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων συστατικών που βρίσκονται σε αυτό (Biggers, 1998; Hammer, 1998). Τελικά το 1989 δημοσιεύτηκε η πρώτη χημική σύσταση του τροποποιημένου καλλιεργητικού υγρού του Whitten με την απουσία της γλυκόζης, η οποία φαινόταν να δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων στα πρώτα στάδια αυλάκωσής τους. Το νέο τροποποιημένο υγρό κατάφερε να ξεπεράσει το πρόβλημα της αναστολής διαίρεσης των προεμβρύων στο στάδιο των 2 κυττάρων (2-cell block), που μέχρι τότε ήταν το βασικό εμπόδιο, και να οδηγήσει σε μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων (Chatot *et al*, 1989).

Τελικά μετά από έρευνες χρόνων, το πρώτο καλλιεργητικό μέσο διαδοχικής καλλιέργειας με χαμηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου σχεδιάστηκε και ονομάστηκε SOM. Αργότερα τροποποιήθηκε και πάλι αυξάνοντας τη συγκέντρωση του χλωριούχου καλίου, μετονομάστηκε KSOM και είχε σαν αποτέλεσμα την ευνοϊκότερη υποστήριξη της καλλιέργειας των προεμβρύων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων από κάθε άλλο καλλιεργητικό μέσο που είχε ως τότε δημοσιευτεί (Biggers *et al*, 1993; Lawitts and Biggers, 1993; Erbach *et al*, 1994; Biggers, 1998).

1.2.3. Θεωρίες σχεδιασμού καλλιεργητικών υγρών βασιζόμενων στην χημική σύσταση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.

Οι μελέτες πάνω στα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων θηλαστικών βασίζονται στην γενική αρχή “πίσω στη φύση (back to nature)” που αντιπροσωπεύει την ιδέα ότι τα συστατικά των καλλιεργητικών μέσων πρέπει να υπόκεινται στη σύσταση και τις συγκεντρώσεις του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (Summers and Biggers, 2003). Το 1972 ήταν η πρώτη φορά που ένα τέτοιου είδους υλικό σχεδιάστηκε για τις ανάγκες καλλιέργειας γονιμοποιημένων ωαρίων προβάτου (Amoah and Gelaye, 1991).

Ένα άλλο καλλιεργητικό μέσο που σχεδιάστηκε αργότερα για την υποστήριξη της ιστοκαλλιέργειας, το “Earle” υγρό (τροποποιημένο υγρό Whitten), βρέθηκε επίσης να ενισχύει την αυλάκωση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο του μοριδίου (Edwards, 1981).

Ένα από τα πρώτα και πιο γνωστά απλά καλλιεργητικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια ανθρώπινων προεμβρύων ήταν το “ανθρώπινο σαλπινγικό υγρό” (HTF). Στο παρελθόν πολλές προσπάθειες είχαν γίνει για τον προσδιορισμό της σύστασης του υγρού των σαλπίγγων με διάφορες τεχνικές, αλλά τελικά η σύσταση του HTF καλλιεργητικού υλικού δημοσιεύτηκε από τον Quinn το 1985 (Conaghan *et al*, 1998). Το HTF αλλά και όλα τα προηγούμενα από αυτό καλλιεργητικά υγρά είναι ισορροπημένα διαλύματα αλάτων στα οποία έχουν προστεθεί υδατάνθρακες ως ενεργειακά υποστρώματα, όπως γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ και γλυκόζη (Gardner and Lane, 1997).

Εκτός από την αρχή “πίσω στη φύση”, υπήρξε παράλληλα και μία άλλη προσέγγιση ως προς το σχεδιασμό χημικά καθορισμένων καλλιεργητικών υγρών, η γενική αρχή “το έμβρυο επιλέγει” (let the embryo choose). Στις αντίστοιχες μελέτες, η ανάπτυξη των προεμβρύων καταγράφεται και συγκρίνεται κάθε φορά που αλλάζει η συγκέντρωση ενός συστατικού του καλλιεργητικού υλικού, ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν σταθερά σε συγκέντρωση. Και στις δυο αρχές, η κεντρική ιδέα είναι η προσομοίωση *in vitro* του φυσικού περιβάλλοντος μέσα στο οποίο αναπτύσσονται τα γονιμοποιημένα ωάρια (Summers and Biggers, 2003).

Η πρόταση ότι ο σχεδιασμός βιοχημικών καλλιεργητικών υγρών μπορεί να προσφέρει καλύτερες συνθήκες στην ανάπτυξη των προεμβρύων από ότι το φυσικό περιβάλλον, προήλθε από την άποψη ότι το φυσικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι και το μέγιστο δυνατό. Έτσι πολλοί ερευνητές όπως ο Leese, που ήταν μεγάλος υποστηρικτής της αρχής “πίσω στη φύση” έστρεψε το ενδιαφέρον του στην προσέγγιση “το έμβρυο επιλέγει” σε ότι σχετιζόταν με τις υψηλές απαιτήσεις για αμινοξέα των ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων σε *in vitro* καλλιέργεια (Houghton *et al*, 2002).

Νεότερες έρευνες προτείνουν ότι ο συνδυασμός και των δύο αρχών-προσεγγίσεων είναι απαραίτητος για το σχεδιασμό ενός καλλιεργητικού υλικού που θα υποστηρίξει την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* τόσο αποτελεσματικά όσο *in vivo* (Summers and Biggers, 2003). Πιο συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί μία νέα προσέγγιση για τη βελτιστοποίηση των καλλιεργητικών υλικών που ονομάζεται “ήσυχος μεταβολισμός” (quite metabolism). Η αρχή αυτή διατυπώθηκε από τον ερευνητή Leese το 2002 και προτείνει

ότι τα βιώσιμα γονιμοποιημένα ωάρια έχουν πιο “ήσυχο” μεταβολισμό (βιοσύνθεση) από αυτά που έχουν υποστεί αναστολή διαίρεσης. Τα κύτταρα των βιώσιμων προεμβρύων εκδηλώνουν χαμηλότερο μεταβολισμό διότι απαιτείται μικρότερη ενέργεια για να επιδιορθώσουν τις πιθανές βλάβες στο γονιδίωμα, τις βλάβες κατά τη μεταγραφή του γενετικού υλικού και κατά την πρωτεϊνολογική σύνθεση. Πιστεύεται ότι αυτό συμβαίνει γιατί τα βιώσιμα γονιμοποιημένα ωάρια είτε είναι καλύτερα εξοπλισμένα στο να επιδιορθώνουν τις όποιες βλάβες, είτε πιο πιθανά το μέγεθος των βλαβών αυτών είναι πολύ μικρότερο από αυτό των μη βιώσιμων προεμβρύων (Leese, 2002; Leese *et al*, 2007; Sturmey *et al*, 2009). Κατά συνέπεια, τα βιώσιμα προέμβρυα λόγω του χαμηλού μεταβολισμού τους καταναλώνουν λιγότερο οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά (Leese *et al*, 2008).

Η ίδια υπόθεση του “ήσυχου” μεταβολισμού εξηγεί επίσης γιατί κάτω από αντίξοες συνθήκες και στρεσογόνους παράγοντες (ακτινοβολία, μεταλλαξιογόνοι και καρκινογόνοι παράγοντες) τα γονιμοποιημένα ωάρια αποτυγχάνουν να διαιρεθούν. Τέτοιοι παράγοντες δημιουργούν βλάβες στο γονιδίωμα με συνέπεια το προέμβρυο να καταναλώνει πολύ περισσότερη ενέργεια για να τις επιδιορθώσει και κατ’ επέκταση να χρησιμοποιεί μεγαλύτερη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των μεταβολικών διεργασιών που στην ίδια θεωρία ονομάζεται “ενεργός μεταβολισμός” (active metabolism) και καταλήγει σε προέμβρυα με χαμηλή βιωσιμότητα. Κατά συνέπεια, παράγοντες που ενοχοποιούνται για τη δημιουργία βλαβών στο γονιδίωμα του προεμβρύου ή τη πρωτεϊνολογική σύνθεση καθορίζουν και το αν ο ζυγώτης θα αναπτυχθεί ή όχι σε βλαστοκύστη, πράγμα που σημαίνει ότι ο μεταβολισμός του γονιμοποιημένου ωαρίου σχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητα ανάπτυξής του (Baumann *et al*, 2007; Leese *et al*, 2007; Sturmey *et al*, 2009).

Βάση των νέων θεωριών, η βελτιστοποίηση των καλλιεργητικών υγρών στηρίζεται στη δυνατότητά τους να δημιουργούν τέτοιο περιβάλλον *in vitro* που να επιτρέπει στα γονιμοποιημένα ωάρια να έχουν χαμηλό μεταβολισμό. Αυτό επιτυγχάνεται με την ελεγχόμενη χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και σύστασης, ώστε να προσομοιώνεται καλύτερα το περιβάλλον του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (Leese, 1991; Leese, 1998; Fleming *et al* 2004; Leese *et al*, 2007; Sills and Palermo, 2010).

Μία τέτοια στρατηγική ωθεί τα προέμβρυα να χρησιμοποιήσουν ενδογενή θρεπτικά συστατικά, γεγονός που έχει προταθεί να είναι στις φυσικές τους δυνατότητες και ικανότητες και πλησιάζει περισσότερο τις *in vivo* συνθήκες και λειτουργίες (Leese, 2003; Ferguson and Leese, 2006; Leese *et al*, 2007). Παράλληλα με τα παραπάνω, τα καλλιεργητικά συστήματα είναι εξίσου σημαντικό να ελαχιστοποιούν τη πιθανότητα δημιουργίας στρεσογόνων

παραγόντων για τα γονιμοποιημένα ωάρια, επιτρέποντάς τους να αναπτύσσονται σε ένα ασφαλές περιβάλλον *in vitro* (Fleming *et al*, 2004; Lane and Gardner, 2005; Sills and Palermo, 2010).

1.2.4. Διαδοχικά ή διπλής φάσης καλλιεργητικά υλικά (sequential media) στην εξωσωματική γονιμοποίηση

Οι θεωρίες που προαναφέρθηκαν σε συνδυασμό με εντατικές μελέτες στη διάρκεια όλων αυτών των ετών, οδήγησαν στο σχεδιασμό των διαδοχικών καλλιεργητικών υλικών. Η ιδέα προήρθε από την παρατήρηση ότι πρώτον τα αμινοξέα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη βιώσιμων γονιμοποιημένων ωαρίων και δεύτερον ότι το προέμβρυο στα πρώτα στάδια αυλάκωσής του βρίσκεται στη σάλπιγγα, ενώ μετά τη σύμπτυξη των κυττάρων του και το σχηματισμό του μοριδίου περνάει σιγά-σιγά από τη σάλπιγγα στη μήτρα ως βλαστοκύστη, όπου και εμφυτεύεται (Gardner and Lane, 1997; Jones *et al*, 1998; Gardner *et al*, 2002). Χαρακτηριστικό της σύνθεσης διαδοχικών καλλιεργητικών υγρών είναι η προσθήκη υδατανθράκων και αμινοξέων έτσι ώστε να πλησιάζουν πολύ περισσότερο τις *in vivo* συνθήκες (Gardner *et al*, 1998b; Plachot, 2000). Επιπλέον, στο σχεδιασμό των διαδοχικών υλικών μεγάλο ρόλο έπαιξαν οι ενδείξεις ότι συστατικά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του προεμβρύου μέχρι το στάδιο του μοριδίου, είναι ανασταλικά για το σχηματισμό βλαστοκύστεων και το αντίθετο (Gardner *et al*, 1998b; Plachot, 2000; Devreker *et al*, 2001; Macklon *et al*, 2002; Sills and Palermo, 2010).

Βασικές παρατηρήσεις πάνω στις οποίες στηρίχτηκε η ιδέα των διαδοχικών καλλιεργητικών υλικών είναι ότι το πυροσταφυλικό οξύ και κάποια μη-βασικά (μη- απαραίτητα) αμινοξέα χρησιμοποιούνται ως πρωταρχική πηγή ενέργειας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του γονιμοποιημένου ωαρίου προ του σχηματισμού του μοριδίου. Τα προέμβρυα μέχρι το στάδιο αυτό, έχουν ελάχιστη δυνατότητα μεταβολισμού της γλυκόζης (Lane and Gardner, 2001; Gardner *et al*, 2002). Από τη συνένωση των κυττάρων μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, το προέμβρυο χρησιμοποιεί κυρίως τη γλυκόζη ως ενεργειακό υπόστρωμα και βασικά και μη-βασικά αμινοξέα είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της βλαστοκύστης σε κύτταρα τροφοβλάστη και κύτταρα έσω κυτταρικής μάζας (Gardner *et al*, 2001). Μελέτες των ερευνητών Gardner και Lane έχουν δείξει ότι τα βασικά αμινοξέα αναστέλλουν την ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου στα πρώτα στάδια αυλάκωσής του, ενώ είναι απαραίτητα για τη βλαστοκύστη αργότερα. Αντίθετα, τα μη-βασικά αμινοξέα έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη του προεμβρύου σε όλα τα στάδιά του

από τις πρώτες διαιρέσεις του μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης (Gardner and Lane, 1996; Gardner *et al*, 1996; Lane and Gardner, 1997; 2001).

Με βάση όλα τα παραπάνω πορίσματα, το 1998 ο Gardner και οι συνεργάτες του σχεδίασαν το πρώτο διαδοχικό καλλιεργητικό υλικό για την καλλιέργεια ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* που αποτελείται από δύο υγρά (G1 και G2), τα οποία χρησιμοποιούνται διαδοχικά. Το πρώτο υποστηρίζει την ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο της τρίτης ημέρας (πριν τη σύμπτυξη) και το δεύτερο υποστηρίζει το προέμβρυο από την τρίτη μέχρι το στάδιο της πέμπτης ή έκτης ημέρας (βλαστοκύστη) (Plachot 2000; Jones *et al*, 1998; Gardner *et al*, 1998b). Η διαδοχική καλλιέργεια είναι ευρέως διαδεδομένη στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα με υψηλότατα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικών κυήσεων (Sills and Palermo, 2010).

1.2.5 Μονής φάσης καλλιεργητικά υλικά (monoculture media) στην εξωσωματική γονιμοποίηση

Παράλληλα με τη προσπάθεια σχεδιασμού διαδοχικών (διφασικών) καλλιεργητικών υγρών, υπήρξε έντονο ενδιαφέρον για τη δημιουργία ενός συστήματος μονής φάσης που θα υποστήριζε την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων από τη στιγμή της γονιμοποίησης μέχρι και το σχηματισμό βλαστοκύστεων, ενός συστήματος δηλαδή που θα χρησιμοποιούσε ένα καλλιεργητικό υλικό για όλα τα στάδια ανάπτυξης του προεμβρύου. Η ιδέα προήλθε από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των υγρών συστατικών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος στις οποίες στηρίζεται ο σχεδιασμός των καλλιεργητικών μέσων παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα. Κατά συνέπεια, οι μετρήσεις που έχουν γίνει μέχρι στιγμής μπορεί να μην ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον γύρω από το προέμβρυο (Rieger, 2005).

Μελέτες πάνω στο καλλιεργητικό υγρό μέσο KSOM, η σύσταση του οποίου δημοσιεύτηκε το 1993 και απέδειξε ότι η χρήση του μπορούσε να ξεπεράσει την αναστολή διαίρεσης των προεμβρύων μετά το στάδιο των 2 κυττάρων (2-cell block), έφεραν στο χώρο της καλλιέργειας των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* νέα δεδομένα (Lawitts and Biggers, 1993; Erbach *et al*, 1994). Δύο χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι η προσθήκη ενός μείγματος βασικών και μη-βασικών αμινοξέων στο αρχικό διάλυμα βελτίωσε το ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων σε αριθμό και ποιότητα (Biggers *et al*, 2000). Το υγρό τροποποιήθηκε αργότερα με την προσθήκη γλυκόζης και αλβουμίνης βοοειδούς ορού (BSA) που αργότερα αντικαταστάθηκε από πολυβινυλαλκοόλη (PVA), μετά από την παρατήρηση ότι ο ορός BSA είχε ανασταλτική δράση στα περισσότερα αμινοξέα. Το νέο καλλιεργητικό υγρό που

ονομάστηκε KSOM_{PVA}^{AA} έφερε θεαματικά αποτελέσματα στο χώρο της εκτεταμένης καλλιέργειας μονής φάσης μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων (Biggers, 1998; Biggers *et al*, 2000; Summers *et al*, 2000).

Οι παραπάνω μελέτες εφαρμόστηκαν επίσης σε καλλιέργεια ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων και τα αποτελέσματα αντιπαρατάχθηκαν με αυτά από την καλλιέργεια με διαδοχικά μέσα, καταλήγοντας σε αντίστοιχα ποσοστά ανάπτυξης βλαστοκύστεων και κλινικών κυήσεων. Τελικά το μονής φάσης καλλιεργητικό υγρό τροποποιήθηκε ξανά με την προσθήκη υδατανθράκων και αμινοξέων ώστε να ανταποκρίνεται καλύτερα στην καλλιέργεια ανθρώπινων προεμβρύων *in vitro* κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση και είναι τα τελευταία χρόνια διαθέσιμο στο εμπόριο (Biggers and Racowsky, 2002; Wiemer *et al*, 2002; Rieger, 2005). Οι έρευνες στον τομέα του σχεδιασμού καλλιεργητικών μέσων για την εξωσωματική γονιμοποίηση συνεχίζονται μέχρι και σήμερα με διαφορετικές εταιρείες να προτείνουν διαδοχικής ή μονής φάσης εκτεταμένη καλλιέργεια ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων για την επίτευξη υψηλότερων ποσοστών κυήσεων.

1.3 Ανθρώπινη Βλαστοκύστη

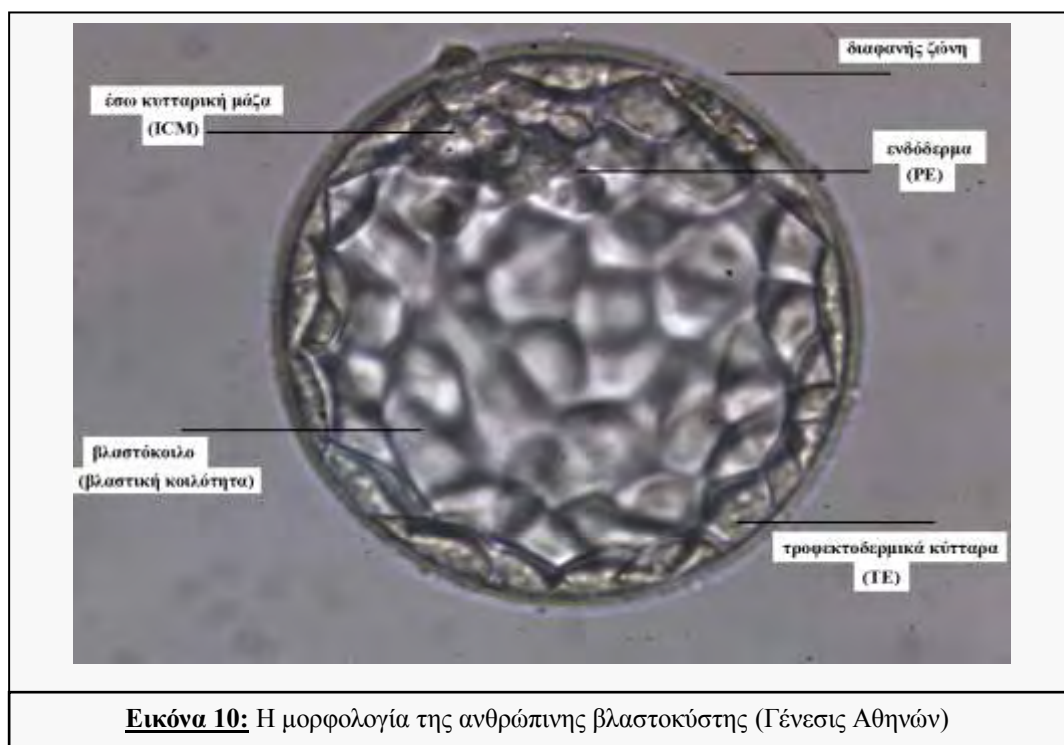
Βλαστοκύστη ονομάζεται το αναπτυξιακό στάδιο του γονιμοποιημένου ωαρίου την πέμπτη ή έκτη ημέρα μετά τη γονιμοποίησή του. Είναι ένας σφαιρικός σχηματισμός αποτελούμενος από κύτταρα δύο τύπων (κύτταρα έσω κυτταρικής μάζας και τροφεκτοδερμικά κύτταρα) και μία κοιλότητα με υγρό στο εσωτερικό της. Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, διότι ο σχηματισμός της είναι απαραίτητος για την εμφύτευση και κατά επέκταση για την επίτευξη εγκυμοσύνης. Η μορφολογία της και η ποιότητά της είναι καθοριστικοί παράγοντες ως προς την έκβαση της εμβρυομεταφοράς.

1.3.1 Η διαδικασία σχηματισμού βλαστοκύστης

Ο όρος βλαστοκύστη χρησιμοποιείται για να περιγράψει το γονιμοποιημένο ωάριο την πέμπτη με έκτη ημέρα ανάπτυξής του (η ημέρα της γονιμοποίησης θεωρείται ημέρα μηδέν). Στους ανθρώπους η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στη σάλπιγγα της γυναίκας, όπου και το γονιμοποιημένο ωάριο που προκύπτει αναπτύσσεται μέχρι το στάδιο του μοριδίου (3-4 ημέρες). Μέχρι και πριν το σχηματισμό του μοριδίου, τα κύτταρα του προεμβρύου (βλαστομερίδια) είναι διακριτά κύτταρα και μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν (Plachot, 2000). Ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα της περιόδου αυτής είναι η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (ZGA) και συνοδεύεται από την αποικοδόμηση του μητρικού RNA που ολοκληρώνεται στο στάδιο των 2 κυττάρων και μέχρι εκείνη τη στιγμή καθορίζει την εξέλιξη του ζυγώτη (Hamatani *et al*, 2006; Schier, 2007; Walser and Lipshitz, 2011). Μετά την τρίτη αυλάκωση του γονιμοποιημένου ωαρίου, αρχίζει η διαδικασία σύμπτυξης των κυττάρων και η πόλωση του προεμβρύου (Johnson and McConnell, 2004) που σηματοδοτούν την αρχή σχηματισμού της βλαστοκύστης.

Κατά τη σύμπτυξη των κυττάρων του προεμβρύου, τα βλαστομερίδια αποπλατύνονται και δυνατοί δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ τους. Δεσμοί χάσματος μεταξύ των κυττάρων επιτρέπουν το πέρασμα μικρών ενώσεων όπως σακχάρων, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων για να διευκολυνθεί η διακυτταρική επικοινωνία. Υπάρχουν όμως και δεσμοί συνοχής μεταξύ των κυττάρων, οι οποίοι είναι κυρίως συμπλέγματα πρωτεϊνών αποτελούμενα από κατερίνη-E και κατενίνες (άλφα, βήτα και δέλτα) και βρίσκονται ενωμένα με τον κυτταροσκελετό (Ducibella *et al*, 1977; Hyafil *et al*, 1980; Larue *et al*, 1994; Riethmacher *et al*, 1995). Η διαδικασία της σύμπτυξης των κυττάρων οδηγεί σε πόλωση των βλαστομεριδίων με τέτοιο τρόπο ώστε οι εξωτερικές περιοχές του γονιμοποιημένου ωαρίου να διαχωρίζονται από τις εσωτερικές και διαφορετικά συμπλέγματα πρωτεϊνών να εντοπίζονται σε αυτές (Pauken and

Carco, 2000; Vinot *et al*, 2005; Plusa *et al*, 2005). Ο αμοιβαίος ανταγωνισμός μεταξύ πρωτεϊνών που βρίσκονται στις δύο αυτές περιοχές του προεμβρύου πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνος για τη συντήρηση της πόλωσης του γονιμοποιημένου ωαρίου (Suzuki and Ohno, 2006). Παρότι είναι ακόμα ασαφής ο ακριβής μηχανισμός της σύμπτυξης των κυττάρων και της πόλωσής τους και οι δύο διεργασίες είναι απαραίτητες και σημαντικές για τη σωστή διαφοροποίηση των κυττάρων της βλαστοκύστης (Johnson and McConnell, 2004; Rossant, 2004).



Μόλις ολοκληρωθούν οι διαδικασίες σύμπτυξης και πόλωσης του γονιμοποιημένου ωαρίου, δύο επιπλέον αυλακώσεις λαμβάνουν χώρα για να δημιουργήσουν δύο ξεχωριστές στρώσεις κυττάρων. Κάθε κύτταρο που διαιρείται κάθετα στον εσωτερικό-εξωτερικό άξονα δημιουργεί δυο όμοια θυγατρικά πολωμένα κύτταρα, τα οποία διατηρούν τη θέση τους στο εξωτερικό του προεμβρύου. Κάθε κύτταρο που διαιρείται παράλληλα με τον εσωτερικό-εξωτερικό άξονα δημιουργεί ένα πολωμένο κύτταρο στο εξωτερικό και ένα μη-πολωμένο στο εσωτερικό του προεμβρύου. Αυτοί οι δύο πληθυσμοί κυττάρων έχουν διαφορετική αναπτυξιακή πορεία. Τα εξωτερικά κύτταρα θα διαφοροποιηθούν για να δημιουργήσουν τα τροφικοδερμικά κύτταρα (TE), ενώ τα εσωτερικά θα σχηματίσουν την έσω κυτταρική μάζα (ICM), που αργότερα θα διαχωριστεί στην επιβλάστη (EPI) και στο ενδόδερμα (PE) (εικόνα 10). Από την επιβλάστη θα προκύψουν αργότερα όλα τα κύτταρα του νέου οργανισμού, ενώ το ενδόδερμα συμβάλει στη δημιουργία διαφόρων ιστών του εμβρυϊκού σάκου και κάποιων οργάνων του

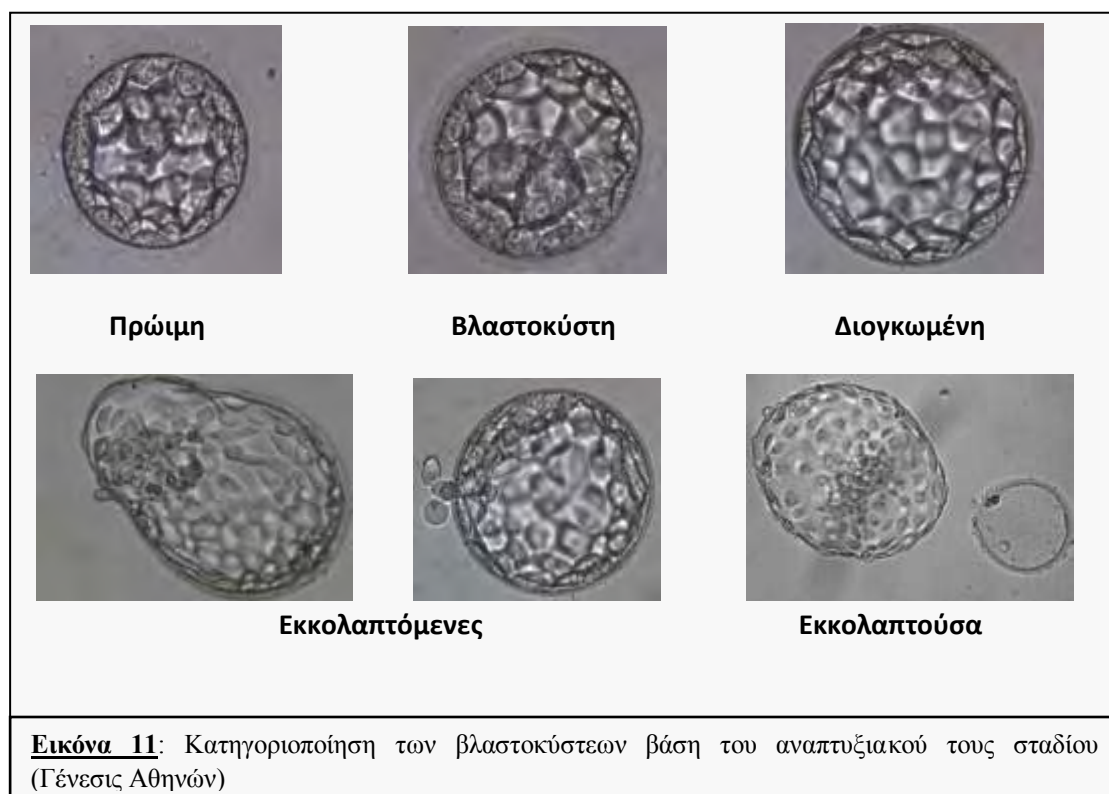
αναπτυσσόμενου εμβρύου (Graham and Deussen, 1978; Graham and Lehtonen, 1979; Pedersen *et al*, 1986; Johnson and Ziomek, 1981; 1983; Oron and Ivanova, 2012).

Παράλληλα με τα παραπάνω και ξεκινώντας από το στάδιο του προεμβρύου των 32 κυττάρων, επέρχεται και μία ακόμα μορφολογική μεταβολή που σχετίζεται με τη συγκέντρωση υγρού στο εσωτερικό του μοριδίου για να σχηματιστεί το βλαστόκοιλο. Η μετακίνηση νερού πιστεύεται ότι προέρχεται μέσω συσσώρευσης ιόντων νατρίου (Na^+) στην εσωτερική περιοχή της τροφεκτοδερμικής στρώσης κυττάρων και διευκολύνεται μέσω καναλιών νερού στις κυτταρικές μεμβράνες (aquaporins) (Watson and Barcroft, 2001; Barcroft *et al*, 2003; Eckert *et al*, 2004). Ταυτόχρονα οι μεμβράνες των τροφεκτοδερμικών κυττάρων ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα υδατοστεγανό φραγμό, ο οποίος διατηρεί το βλαστόκοιλο (Kim *et al*, 2004; Violette *et al*, 2006; Moriwaki *et al*, 2007). Καθώς το βλαστόκοιλο αυξάνεται σε μέγεθος, πιέζει την έσω κυτταρική μάζα στη μία άκρη της βλαστοκύστης. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας που επικαλύπτουν την επιφάνεια του βλαστόκοιλου γίνονται μορφολογικά διακριτά και θα διαφοροποιηθούν αργότερα για να δώσουν το ενδόδερμα, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται πιο βαθιά μέσα στη μάζα, μεταξύ των κυττάρων του ενδοδέρματος και των τροφεκτοδερμικών κυττάρων, θα διαφοροποιηθούν για να δημιουργήσουν την επιβλάστη. Την πέμπτη ημέρα του γονιμοποιημένου ωαρίου, έχει τελικά ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της βλαστοκύστης (107-256 κύτταρα) και το προέμβρυο είναι έτοιμο να εμφυτευθεί στο ενδομήτριο της γυναίκας (Oron and Ivanova, 2012).

Ένα θέμα πολύ συζητημένο και αμφιλεγόμενο μέχρι και σήμερα είναι το αν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της ασυμμετρίας του γονιμοποιημένου ωαρίου στα πρώτα στάδια αυλάκωσής του και της ασυμμετρίας της βλαστοκύστης αργότερα. Μελέτες έχουν προσπαθήσει να αναδείξουν τη σχέση μεταξύ των βλαστομεριδίων του γονιμοποιημένου ωαρίου, με την πορεία που έχει το καθένα αργότερα στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του προεμβρύου και να προτείνουν ένα μηχανισμό καθοριστικό για την αναπτυξιακή πορεία του κάθε κυττάρου. Οι ερευνητές έχουν καταλήξει σε διαφορετικές θεωρίες ανά τα χρόνια για το αν υπάρχει ή όχι τελικά σχέση ή κάποιος ακριβής μηχανισμός, αλλά μέχρι σήμερα καμία από αυτές δεν είναι ευρέως αποδεκτή (Scott, 2000; Zernicka-Goetz, 2002; Motosugi *et al*, 2005; Gardner, 2007; Kurotaki *et al*, 2007; Dard *et al*, 2008). Ωστόσο, η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων κατευθύνουν την πορεία του γονιμοποιημένου ωαρίου όσον αφορά στην πολικότητά του, τη διαφοροποίηση των κυττάρων του και γενικότερα την ανάπτυξή του (Watson and Barcroft, 2001; Watson *et al*, 2004; Rossant and Tam, 2009).

1.3.2 Μορφολογική και ποιοτική κατηγοριοποίηση των βλαστοκύστεων

Οι βλαστοκύστες κατηγοριοποιούνται μορφολογικά-αναπτυξιακά σε πρώιμες, σε βλαστοκύστες ή επεκτεινόμενες, σε διογκωμένες ή διευρυμένες, σε εκκολαπτόμενες και σε εκκολάπτουσες ανάλογα με το πάχος της διαφανούς ζώνης και το μέγεθος του βλαστοκόκκου (εικόνα 11). Ο αριθμός των κυττάρων της έσω κυτταρικής μάζας και της τροφοβλάστης σε συνάρτηση με την οργάνωση και συνοχή των κυττάρων δίνουν τις απαιτούμενες πληροφορίες για τη ποιότητα της κάθε βλαστοκύστης στο αντίστοιχο αναπτυξιακό της στάδιο (εικόνα 12) (Dokras *et al*, 1993; Gardner and Schoolcraft, 1999; Alpha scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (Παράρτημα 1).

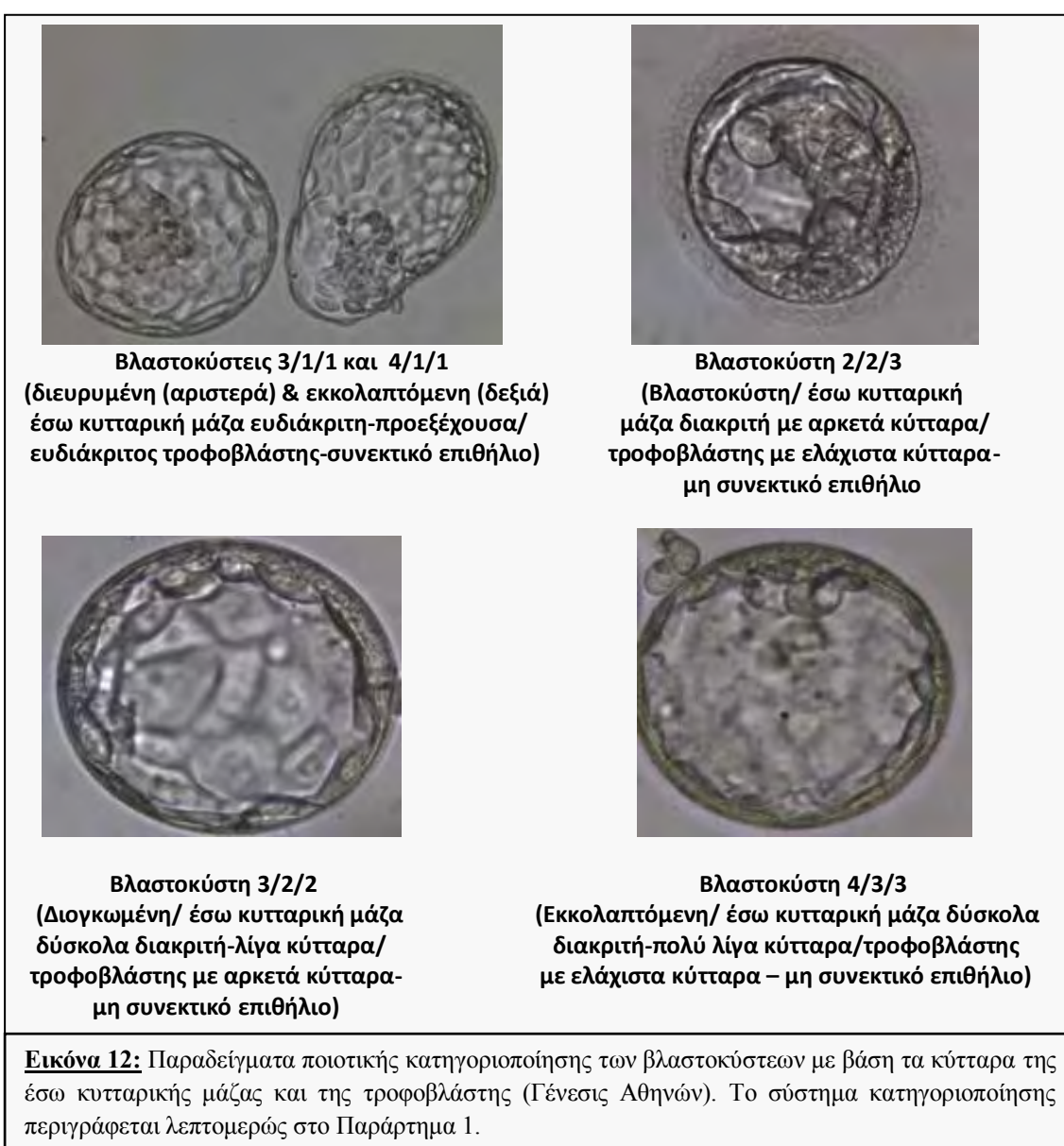


Πρώιμη Βλαστοκύστη: Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας και της τροφοβλάστης μόλις έχουν αρχίσει να διακρίνονται, ενώ η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει όγκο μικρότερο του μισού του προεμβρύου.

Βλαστοκύστη ή επεκτεινόμενη: Η έσω κυτταρική μάζα και τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα είναι ευδιάκριτα, ενώ η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει όγκο μεγαλύτερο ή ίσο του αρχικού όγκου του προεμβρύου.

Διογκωμένη ή διευρυμένη: Το προέμβρυο έχει αυξηθεί σε όγκο σε σχέση με την επεκτεινόμενη βλαστοκύστη και το βλαστοκόκκο καταλαμβάνει σχεδόν όλο τον όγκο του. Η έσω κυτταρική μάζα βρίσκεται σε μία άκρη της περιφέρειας της βλαστοκύστης και τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα περιβάλλονται από τη διαφανή ζώνη η οποία έχει λεπτύνει εμφανώς.

Εκκολαπτόμενη ή εκκολάπτουσα: Κύτταρα της βλαστοκύστης εξέρχονται από τη διαφανή ζώνη με αποτέλεσμα το προέμβρυο να έχει εκκολαφθεί μερικώς (εκκολαπτόμενη) ή πλήρως (εκκολάπτουσα) από τη διαφανή ζώνη. Αυτό είναι το τελευταίο απαιτούμενο στάδιο για την εμφύτευση του προεμβρύου στο ενδομήτριο της γυναίκας (εικόνα 11).



1.3.3 Καλλιέργεια των βλαστοκύστεων και εμβρυομεταφορά- Ιστορική Αναδρομή

Η πρώτη εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων πραγματοποιήθηκε το 1981 από τον John Buster αν και οι πρώτες βλαστοκύστες αναπτύχθηκαν μετά από καλλιέργεια σε τυποποιημένο καλλιεργητικό υγρό από τον Steptoe και τους συνεργάτες του το 1971 (Plachot, 2000). Οι δοκιμές του Buster στηρίχτηκαν σε ανάπτυξη βλαστοκύστεων *in vivo* σε ένα πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων, όπου τα ωάρια γονιμοποιούνταν με το σπέρμα του υποψήφιου πατέρα. Περίπου 100 ώρες μετά, οι βλαστοκύστες αναρροφούνταν από τη μήτρα της δότριας και μεταφέρονταν στη μήτρα της λήπτριας. Η τεχνική αυτή δεν έγινε ευρέως αποδεκτή λόγω σοβαρών επιπλοκών που ενείχε, όπως εξωμήτριες κυήσεις εξαιτίας του τρόπου μεταφοράς των βλαστοκύστεων στη μήτρα της λήπτριας ή ανεπιθύμητες κυήσεις σε περιπτώσεις που δεν ήταν επιτυχής η αναρρόφηση όλων των γονιμοποιημένων ωαρίων από τη μήτρα της δότριας (Jansen *et al*, 2003).

Η πρώτη εγκυμοσύνη μετά από μεταφορά βλαστοκύστεων που είχαν αναπτυχθεί σε *in vitro* καλλιέργεια, δημοσιεύτηκε από τον Cohen και τους συνεργάτες του το 1985. Αυτή η προσπάθεια επιτεύχθηκε με τη μεταφορά ενός γονιμοποιημένου ωαρίου που είχε καταψυχθεί στο στάδιο της βλαστοκύστης και μεταφέρθηκε στη μήτρα της γυναίκας μετά την απόψυξή του (Jansen *et al*, 2003). Από τότε και μέχρι σήμερα, εντατικές έρευνες σε όλο τον κόσμο έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη και μεταφορά βλαστοκύστεων, που πιστεύεται ότι αυξάνει το ποσοστό εμφύτευσης και κλινικών κυήσεων. Το 1991, ο Bolton και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν ένα άρθρο με αποτελέσματα εγκυμοσυνών μετά από *in vitro* γονιμοποίηση και μεταφορά ανθρώπινων βλαστοκύστεων χρησιμοποιώντας το καλλιεργητικό υγρό “Earle”, στο οποίο είχε προστεθεί ορός. Τα ποσοστά κυήσεων όμως ήταν χαμηλότερα από αυτά μετά από εμβρυομεταφορά δεύτερης ημέρας, που χρησιμοποιείτο ευρέως ως μέθοδος μέχρι τότε (Bolton *et al*, 1991).

Το 1992, ο Menezo και η ερευνητική του ομάδα καλλιέργησαν βλαστοκύστες χρησιμοποιώντας συστήματα συγκαλλιέργειών με μονοκυτταρικές σειρές σωματικών κυττάρων του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (κύτταρα Vero). Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής έδειξαν μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων και υψηλότερο ποσοστό εμφύτευσης από ότι μετά από εμβρυομεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων δεύτερης ημέρας (Jones and Trounson, 1999). Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν και από άλλους ερευνητές χρησιμοποιώντας συστήματα συγκαλλιέργειας με σειρές άλλων σωματικών κυττάρων (κοκκιώδη κύτταρα, ανθρώπινα σαλπινγικά κύτταρα, βοοειδή κύτταρα) με παρόμοια ποσοστά επιτυχίας (Plachot *et al*, 1993; Olivennes *et al*, 1994; Jones and Trounson,

1999). Η τεχνική αυτή επίσης δεν έγινε ευρέως αποδεκτή στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, λόγω των εγγενών κινδύνων που ενείχε, όπως ιογενών και βακτηριακών επιμολύνσεων (Desai and Goldfarb, 1998; Jansen *et al*, 2003). Τα τελευταία χρόνια, οι συγκαλλιέργειες έχουν αντικατασταθεί με τη χρήση διαδοχικών υγρών καλλιέργειας ή σύνθετων μέσων καλλιέργειας που έχουν αποδειχθεί να υποστηρίζουν το υψηλό ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων με πολύ υψηλά ποσοστά εμφύτευσης και κλινικών κυήσεων (Gardner *et al*, 1996; 1998a; 2002; Lane and Gardner 2001; Wiemer *et al*, 2002; Rieger, 2005; Teranishi *et al*, 2009; Sills and Palermo, 2010).

1.3.4 Πλεονεκτήματα της μεθόδου εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων

Η εκτεταμένη καλλιέργεια ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων δίνει την προοπτική επιλογής προεμβρύων με αυξημένη αναπτυξιακή ικανότητα. Η ικανότητα του γονιμοποιημένου ωαρίου να αναπτυχθεί σε βλαστοκύστη είναι απόλυτα εξαρτημένη από την ενεργοποίηση ενός ικανού εμβρυϊκού γονιδιώματος, η οποία ξεκινάει μετά τη 2-3 ημέρα ανάπτυξης του γονιμοποιημένου ωαρίου. Κατά συνέπεια ένας αριθμός χρωμοσωμικών ή άλλων γενετικών ανωμαλιών μπορεί να εκδηλωθούν αργότερα κατά την ανάπτυξη του προεμβρύου. Αυτός είναι και ο λόγος εξαιτίας του οποίου γονιμοποιημένα ωάρια, ακόμα και καλής ποιότητας, παρουσιάζουν αναστολή της διαίρεσής ή της ανάπτυξής τους ή ακόμα και αποσυντίθενται πριν φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τα ίδια προέμβρυα δεν θα είχαν τη δυναμική να δώσουν εγκυμοσύνη ακόμα και αν μεταφέρονταν στο στάδιο της δεύτερης ή τρίτης ημέρας. Ως εκ τούτου, η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων χρησιμοποιείται ευρέως σε περιπτώσεις που υπάρχει περίσσεια εμβρύων με εφάμιλλη μορφολογία μέχρι το στάδιο της τρίτης ημέρας, με σκοπό να αναδειχθούν εκείνα με τη μεγαλύτερη αναπτυξιακή δυναμική. Έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν αποδείξει ότι η χρήση των βλαστοκύστεων ως μέθοδος εμβρυομεταφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιπροσωπευτικό κριτήριο βιωσιμότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων (Jones and Trounson, 1999; Jansen *et al*, 2003; Kanka, 2003 ; Hamatani *et al*, 2006; Blake *et al*, 2007; Rehman *et al*, 2007; Schier, 2007; Papanikolaou *et al*, 2008; Teranishi *et al*, 2009; Elder and Dale, 2011; Walser and Lipshitz, 2011).

Το “παράθυρο εμφύτευσης”, όπως αναφέρεται, είναι μία μικρή χρονική περίοδος κατά την οποία το ενδομήτριο της γυναίκας αλλάζει τελείως το γονιδιακό του προφίλ εκφράζοντας εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες και είναι έτοιμο-δεκτικό να υποδεχθεί το προέμβρυο. Το “παράθυρο” αυτό δεν είναι γνωστό με ακρίβεια πότε είναι “ανοικτό”, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι πλησιάζει πιο πολύ τη τέταρτη με πέμπτη ημέρα του γονιμοποιημένου ωαρίου, βάσει των παρατηρήσεων *in vivo*. Κατά συνέπεια ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου

εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων είναι ο συγχρονισμός του προεμβρύου με το ενδομήτριο που οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά εμφύτευσης και ελαχιστοποιεί την ανάγκη μεταφοράς πολλών γονιμοποιημένων ωαρίων στη μήτρα, μειώνοντας έτσι το ποσοστό πολύδυμων κυήσεων (Gardner and Lane 1997; Gardner *et al*, 1998a; Macklon *et al*, 2002; Teranishi *et al*, 2009; Sills and Palermo, 2010; Elder and Dale, 2011).

Η μέθοδος εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων βοηθάει επίσης σε περιπτώσεις που επιχειρείται προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD). Η εκτεταμένη καλλιέργεια δίνει τη δυνατότητα ύπαρξης περισσότερου χρόνου μεταξύ της βιοψίας του προεμβρύου (3^{ης} ημέρας) και της εμβρυομεταφοράς, χρόνου σημαντικού για την ανάλυση του βιολογικού υλικού (Gardner and Lane, 1997; Goossens *et al*, 2009). Παράλληλα έχει ωθήσει τα τελευταία χρόνια σε μία νέα προσέγγιση της βιοψίας προεμβρύων, τη βιοψία τροφεκτοδερμικών κυττάρων από γονιμοποιημένα ωάρια πέμπτης ή έκτης ημέρας. Η βιοψία τροφεκτοδερμικών κυττάρων παρέχει περισσότερο γενετικό υλικό για ανάλυση (8-10 κύτταρα) από ότι η βιοψία τρίτης ημέρας (1-2 κύτταρα). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η κρυοσυντήρηση των γονιμοποιημένων ωαρίων μετά από βιοψία βλαστοκύστεων είναι περισσότερο επιτυχής από ότι μετά από βιοψία τρίτης ημέρας, σε ότι έχει να κάνει με το ποσοστό επιβίωσης και εμφύτευσης μετά την απόψυξη. Έχει επίσης προταθεί ότι με τη βιοψία βλαστοκύστεων μπορεί να υπάρξει τρόπος, μέσω γενετικής ανάλυσης, να ξεχωρίσουμε γενετικά τα προέμβρυα αυτά που έχουν υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας (Dokras *et al*, 1990; Joris *et al*, 1999; De Vos *et al*, 2001; Jones *et al*, 2008).

Συγκριτικές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει με σκοπό να εξετασθεί αν υπάρχει διαφορά στα ποσοστά επιτυχίας μετά από εμβρυομεταφορά πέμπτης και έκτης ημέρας. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έχουν δείξει υπεροχή της μεταφοράς πέμπτης ημέρας, ακόμα και σε ποσοστό εμφύτευσης διπλάσιο από αυτό μετά από μεταφορά έκτης ημέρας. Αυτός είναι και ο λόγος που η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων την πέμπτη ημέρα προτιμάται έναντι της έκτης, όταν υπάρχουν σχηματισμένες βλαστοκύστες για εμβρυομεταφορά. Σε περιπτώσεις όμως που τα γονιμοποιημένα ωάρια έχουν καθυστερήσει στην ανάπτυξή τους, είναι σύνηθες να πραγματοποιείται μεταφορά την έκτη ημέρα (Khorram *et al*, 2000; Shapiro *et al*, 2001; Barrenetxea *et al*, 2005; Elgindy and Elseddek, 2012).

Παρόλα αυτά σε εμβρυομεταφορές μετά από κύκλους απόψυξης βλαστοκύστεων δεν έχει βρεθεί να υπάρχει διαφορά μεταξύ βλαστοκύστεων πέμπτης ή έκτης ημέρας. Το γεγονός αυτό ωθεί στη σκέψη ότι η διαφορά στο ποσοστό κυήσεων μεταξύ “φρέσκων” και αποψυγμένων βλαστοκύστεων έκτης ημέρας οφείλεται μάλλον στη δεκτικότητα του ενδομητρίου, η οποία

πιθανότατα αποδυναμώνεται κατά κάποιο τρόπο, όταν τα προέμβρυα καθυστερούν ως προς το σχηματισμό της βλαστοκύστης (Mukaida *et al*, 2003; Hiraoka *et al*, 2004; Hiraoka *et al*, 2009; Guerif *et al*, 2009; El-Toukhy *et al*, 2011; Elgindy and Elsedek, 2012).

1.4 Η εμφύτευση των γονιμοποιημένων ωαρίων στη μήτρα

Η εμφύτευση είναι το τελευταίο και πιο σημαντικό στάδιο της εμβρυογένεσης και κατά συνέπεια της επιτυχημένης κύησης. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχει γίνει μεγάλη πρόοδος ως προς την κατανόηση της ανάπτυξης των ανθρώπινων γονιμοποιημένων ωαρίων και της εμφύτευσής τους στη μήτρα της γυναίκας αποκαλύπτοντας μία σύνθετη διαδικασία, η οποία αποτελείται από μία σειρά γεγονότων που σκοπό έχουν την επιτυχή αλληλεπίδραση της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο.

1.4.1 Το “παράθυρο εμφύτευσης”- Υποδεκτικότητα ενδομητρίου

Τα γονιμοποιημένα ωάρια προετοιμάζονται για την εμφύτευσή τους από τα πρώτα κιάλας στάδια αυλάκωσής τους. Οι διαδοχικές αυλακώσεις του ζυγώτη πρέπει να καταλήγουν σε επαρκή αριθμό θυγατρικών κυττάρων που θα επιτρέψει τον πλήρη σχηματισμό της έσω κυτταρικής μάζας και των τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης. Ο σχηματισμός της βλαστοκύστης είναι απαραίτητος για την εμφύτευση και κατά επέκταση για την επίτευξη εγκυμοσύνης.

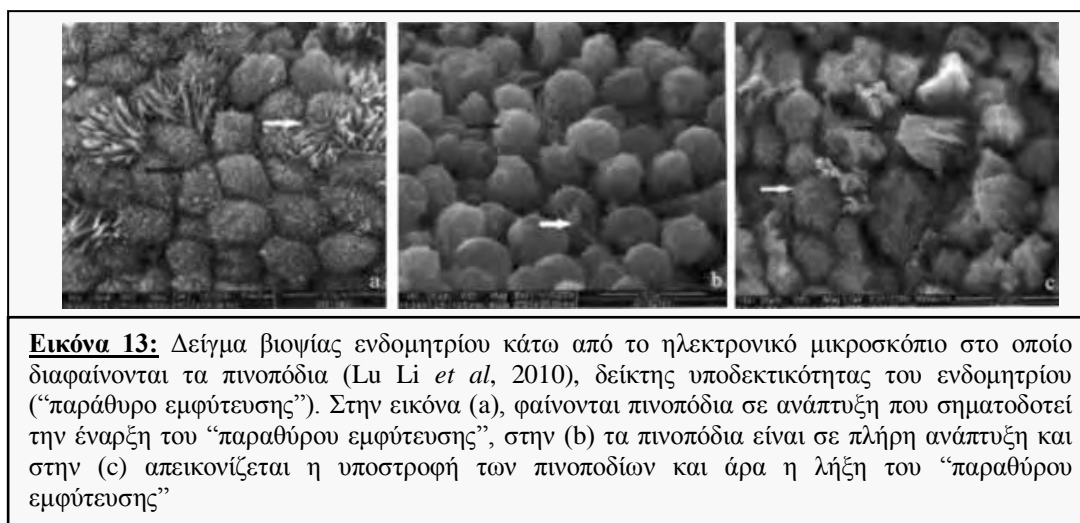
Στα πρώτα στάδια της εμφύτευσης τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με τις επιφανειακές μεμβράνες του ενδομητρίου και στη συνέχεια γίνεται κατάδυση της βλαστοκύστης στο επιφανειακό ενδομήτριο. Καθώς η εμφύτευση εξελίσσεται, η τροφοβλάστη πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Τα κύτταρα της εξωτερικής στοιβάδας της τροφοβλάστης που έρχονται σε επαφή με το μυομήτριο, υφίστανται σύντηξη σχηματίζοντας τη μονόστοιβη πολυπύρνηνη συγκυτιοτροφοβλάστη, ενώ τα κύτταρα της εσωτερικής στοιβάδας, τα οποία δεν υφίστανται σύντηξη, σχηματίζουν τη μονοπύρνηνη πολύστοιβη εξωλαχνώδη κυτταροτροφοβλάστη. Μιτώσεις παρατηρούνται μόνο στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης, τα οποία μεταναστεύουν στη συνεχώς αυξανόμενη συγκυτιοτροφοβλάστη και ενώνονται με το υπάρχον συγκύτιο. Τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με το μητρικό αίμα και σχηματίζουν τις χοριακές λάχνες, σηματοδοτώντας την αρχή σχηματισμού του πλακούντα (Bischof and Campana, 2000; Staun-Ram and Shalev, 2005).

Η επιτυχής εμφύτευση εξαρτάται άμεσα από το συγχρονισμό της εξέλιξης του γονιμοποιημένου ωαρίου σε βλαστοκύστη και της διαφοροποίησης μιας συγκεκριμένης περιοχής του ενδομητρίου, μέσω μοριακών και κυτταρικών μεταβολών ρυθμιζόμενων από παράγοντες με ενδοκρινή, παρακρινή ή αυτοκρινή δράση (Krussel *et al*, 2003; Rashid *et al*,

2011). Ο συγχρονισμός αυτός συμβαίνει σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ονομάζεται “παράθυρο εμφύτευσης” και προϋποθέτει την ορμονική προετοιμασία της μήτρας και την αλληλεπίδραση της εκκριτικής δραστηριότητας του ενδομητρίου, με αυτή της βλαστοκύστης. Για την ολοκλήρωση των ιδανικών συνθηκών υποδεκτικότητας του ενδομητρίου είναι απαραίτητη η αυξημένη αγγειογένεση, η οποία οδηγεί σε αιμάτωση της περιοχής της εμφύτευσης και η τοπική μείωση των ανοσολογικών μηχανισμών, ώστε το προέμβρυο να μην απορριφθεί ως αλλογενές. Τέλος, η αυστηρά ελεγχόμενη κατάδυση των τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο ενδοθήλιο του ενδομητρίου αποτελεί το μηχανισμό με τον οποίο η βλαστοκύστη προσδένεται στο ενδομήτριο (Staun-Ram and Shalev, 2005; Nardo *et al*, 2006; Guzeloglou-Kayisli *et al*, 2007; Makrigiannakis and Minas, 2007; Rashid *et al*, 2011).

Το “παράθυρο της εμφύτευσης” προϋποθέτει μία σειρά από μεταβολές στη μήτρα της γυναίκας που σκοπό έχουν την προετοιμασία της για την υποδοχή της βλαστοκύστης (το ενδομήτριο μετατρέπεται σε φθαρτό). Το ενδομήτριο αυξάνεται σε πάχος, γίνεται οίδηματώδες, λόγω της αυξημένης αγγείωσης και τα αδένια αυξάνουν κατά πολύ την εκκριτική τους δραστηριότητα. Αυτές οι μεταβολές φτάνουν στο μέγιστο περίπου 7 ημέρες μετά την ωοθυλακιωρρηξία και οδηγούν στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου κατά την οποία τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου διαποτίζονται με λιπίδια και γλυκογόνο, λαμβάνοντας τελικά το πολυεδρικό χαρακτηριστικό σχήμα (επιθηλιοειδή μορφολογία) που έχουν τα κύτταρα του φθαρτού. Μετά την εμφύτευση, ο φθαρτός παραμένει τουλάχιστον μέχρι το πρώτο τρίμηνο της κύησης, ενώ η λειτουργία του ως περιβάλλοντας ιστός αντικαθίσταται προοδευτικά από τον πλακούντα (Nikas and Psychoyos, 1997; Boron and Boulpaep, 2004; Sharma and Kumar, 2012).

Μία ακόμα μορφολογική αλλαγή που σηματοδοτεί το “παράθυρο εμφύτευσης” είναι η εμφάνιση πινοποδίων (εικόνα 13). Τα πινοπόδια είναι προεξοχές κυτταρικών μεμβρανών (θυμίζουν φυσαλίδες) των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου και μπορούν να απεικονιστούν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Martel *et al*, 1991; Usadi *et al*, 2003). Εμφανίζονται περίπου την πέμπτη με έβδομη ημέρα μετά την ωοθυλακιωρρηξία (μετά τη γονιμοποίηση), συμπίπτουν με το παράθυρο εμφύτευσης και παραμένουν για περίπου 2 ημέρες (Nikas and Psychoyos, 1997; Nikas, 1999; Nikas and Aghajanova, 2002; Aghajanova *et al*, 2003; Sharma and Kumar, 2012).



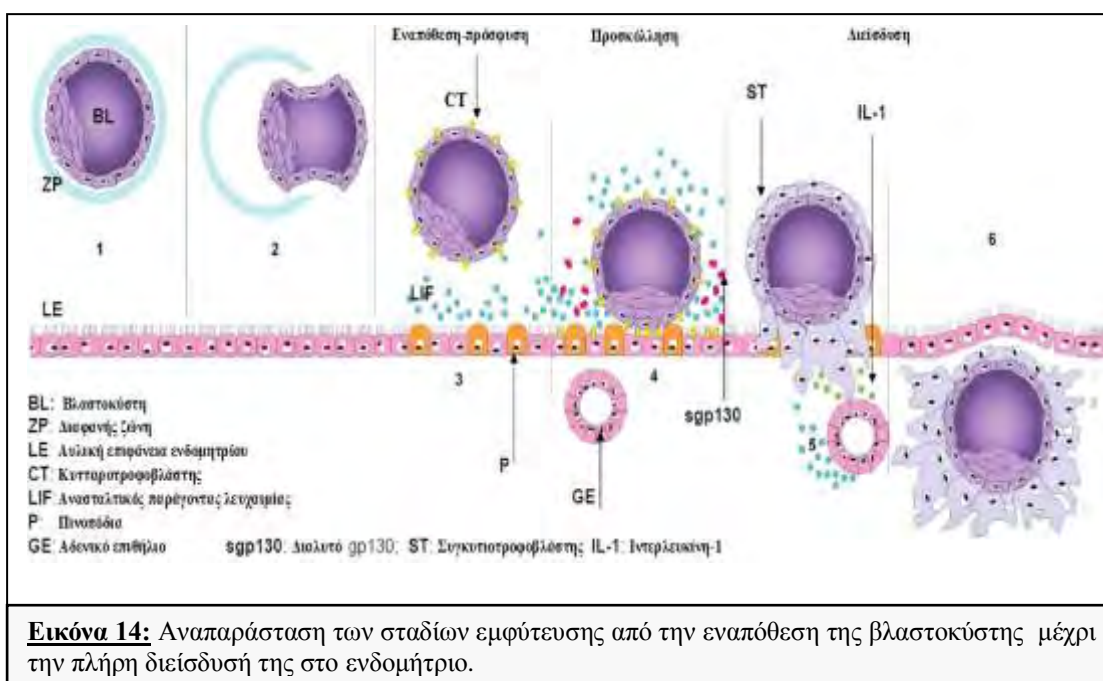
Η χαρακτηριστική τους μορφολογία κατά την εμφύτευση πιστεύεται ότι είναι μεγάλης σημασίας και για το λόγο αυτό η εμφάνισή τους υποστηρίζει τη χρήση τους ως δείκτη εμφύτευσης (Nikas and Psychoyos, 1997; Aghajanova *et al*, 2003). Η ανίχνευση των πινοποδίων, κατά συνέπεια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόπος για να εκτιμηθεί η υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και να βελτιστοποιηθούν τα ποσοστά εμφύτευσης. Ο μηχανισμός λειτουργίας των πινοποδίων δεν είναι απολύτως σαφής, αλλά πιστεύεται ότι διευκολύνει με κάποιο τρόπο την προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Αυτό πιθανολογείται ότι γίνεται μέσω ενδοκυττάρωσης των υγρών της μήτρας και άλλων μακρομορίων, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο τη μείωση του όγκου της μήτρας, με αποτέλεσμα τα τοιχώματά της να έρχονται πιο κοντά στην επιπλέονσα βλαστοκύστη, βοηθώντας την προσκόλλησή της στο ενδομήτριο (Hoozemans *et al*, 2004; Boron and Boulpraep, 2004).

1.4.2 Μηχανισμός της εμφύτευσης

Η εμφύτευση ξεκινάει όταν η βλαστοκύστη έρχεται σε επαφή με το βλεννογόνο της μήτρας και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρία στάδια (εικόνα 14) (Norwitz *et al*, 2001):

1. Πρόσφυση της βλαστοκύστης στο επιθήλιο του ενδομητρίου (apposition)
2. Προσκόλληση της βλαστοκύστης στο επιθήλιο του ενδομητρίου (Adhesion)
3. Διείσδυση των τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο ενδομήτριο (Invasion)

Βασική προϋπόθεση για την έναρξη της διαδικασίας εμφύτευσης είναι η εκκόλαψη της βλαστοκύστης από τη ζώνη που τη περιβάλλει. Στο σημείο εμφύτευσης, τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα που υδρολύουν τη ζώνη σε ένα σημείο, δημιουργώντας το πέρασμα από το οποίο η βλαστοκύστη εκκόλλεται έξω από αυτή. Το περιβάλλον της μήτρας πιθανολογείται επίσης ότι μπορεί να περιέχει κάποια πρωτεολυτικά ένζυμα που βοηθούν στην εκκόλαψη της βλαστοκύστης. Γενικά όμως ο μοριακός μηχανισμός της εκκόλαψης δεν έχει αποσαφηνιστεί και πολύ λίγα γνωρίζουμε για αυτόν (Elder and Dale, 2011).



Η πρόσφυση που είναι το πρώτο στάδιο στη διαδικασία της εμφύτευσης σημαίνει την αρχική αλλά ασταθή ακόμα προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Σε αυτό το στάδιο τα πινοπόδια αναπτύσσουν χαλαρούς δεσμούς με προεκβολές της εξωτερικής επιφάνειας της συγκυτιοτροφωβλάστης (Lopata *et al*, 2002), μέσω κυρίως του συστήματος των L-σελεκτινών (Genbacev *et al*, 2003). Τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα μετά την εκκόλαψή τους από τη διαφανή ζώνη, εκφράζουν μόρια προσκόλλησης L-σελεκτίνης, τα οποία συνδέονται με ολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται στο επιθήλιο του ενδομητρίου, σηματοδοτώντας την έναρξη της εμφύτευσης (Genbacev *et al*, 2003; Ley and Kansas, 2004; Dominguez *et al*, 2005). Πρόσφατες έρευνες αναγνώρισαν την τροφινίνη ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που μαζί με το σύστημα της L-σελεκτίνης δημιουργούν τον αρχικό μηχανισμό προσκόλλησης της

βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, ενισχύοντας τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ τους (Fukuda and Sugihara, 2008).

Μετά την πρόσφυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, οι δεσμοί μεταξύ τους γίνονται πιο ισχυροί, με αποτέλεσμα την προσκόλληση της βλαστοκύστης στο επιθήλιο του ενδομητρίου. Κατά τη διαδικασία αυτή, η βλαστοκύστη προσδένεται με τρόπο ώστε τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας να είναι προσανατολισμένα προς το επιθήλιο (Dominquez *et al*, 2005). Παρακρινικά σήματα που εκφράζονται τοπικά μεταξύ της βλαστοκύστης και του ενδομητρίου πιστεύεται ότι οδηγούν στην προσκόλληση της βλαστοκύστης με το επιθήλιο της μήτρας, η οποία υποβοηθείται από γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένοι. Τα πρώτα σημάδια προσκόλλησης φαίνονται την 20-21^η ημέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου στις γυναίκες και συμπίπτουν με αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στο σημείο της πρόσφυσης της βλαστοκύστης (Nagaoka *et al*, 2003; Sharkey and Smith, 2003; Dominquez *et al*, 2005). Προεκβολές της συγκυτιοτροφοβλάστης συνδέονται με το ενδομήτριο εισχωρώντας μέσα σε αυτό, με τη βοήθεια διαφόρων μορίων κυτταρικής προσκόλλησης όπως μόρια κυτταροκινών, ιντεγκρινών, σελεκτινών, κατεχινών, ανοσοσφαιρίνης και μόρια νευροπεπτιδίων (Makrigiannakis and Minas, 2007; Singh and Aplin, 2009; Sharma and Kumar, 2012).

Το τρίτο στάδιο στο μηχανισμό της εμφύτευσης είναι η διείσδυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την αρχική κατάδυση του προεμβρύου στο επιθήλιο του ενδομητρίου και τη βασική μεμβράνη και τελικά τη διείσδυσή του στο στρώμα, μέσω διάβρωσης των τριχοειδών αγγείων του ενδομητρίου. Το τελικό στάδιο της διείσδυσης της βλαστοκύστης είναι η ανάπτυξη μιας αγγειακής πια σχέσης με τη μητέρα που κυοφορεί (Nikas, 2000; Norwitz *et al*, 2001). Καθώς η τροφοβλάστη διαπερνά και διεισδύει τη βασική μεμβράνη και το στρώμα, σημαίνει την αρχή της φθαρτοποίησης του ενδομητρίου. Ο χρόνος μέσα στον οποίο γίνεται η προσκόλληση της βλαστοκύστης και η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου είναι σημαντικός σε ότι αφορά τη βιωσιμότητα της εγκυμοσύνης. Στις περισσότερες κήσεις, η HCG είναι ανιχνεύσιμη στο αίμα της μητέρας μεταξύ της 8-10^{ης} ημέρας μετά την ωορρηξία (Enders, 2000; Sharkey and Smith, 2003; Guzeloglu-Kayisli *et al*, 2007).

Το ανθρώπινο ενδομήτριο υποβάλλεται σε μία σειρά από συντονισμένες αλλαγές πολλαπλασιασμού και εκκρίσεων σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο, οι οποίες το προετοιμάζουν να υποδεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο. Αν τελικά δεν πραγματοποιηθεί εμφύτευση, το ενδομήτριο που έχει σχηματιστεί, αποικοδομείται μέσω μίας εξίσου

συντονισμένης διαδικασίας που οδηγεί στην έμμηνο ρύση, για να είναι και πάλι έτοιμο στον επόμενο κύκλο να υποστεί τις προαπαιτούμενες αλλαγές για να υποδεχτεί μία νέα βλαστοκύστη (Kayisli *et al*, 2004; Stowitzki *et al*, 2006).

1.4.3 Ορμονικές προϋποθέσεις για την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης

Τα ωοθηκικά στεροειδή, η οιστραδιόλη (E_2) και η προγεστερόνη (PRG) είναι πρωταρχικοί παράγοντες στην εμφύτευση, οι οποίοι προετοιμάζουν το ενδομήτριο να δεχτεί τη βλαστοκύστη, μετατρέποντάς το σε φθαρτό κατά την εκκριτική φάση του κύκλου. Η έκφραση των ορμονών αυτών προκαλεί μία σειρά παρακρινικών και αυτοκρινικών σημάτων, τα οποία μέσω διαδικασιών μορίων προσκόλλησης, οδηγούν τελικά στην προσκόλληση και διείσδυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Hoozemans *et al*, 2004). Κατά την παραγωγική φάση του κύκλου, η οιστραδιόλη επάγει τη πεπτιδική σύνθεση των υποδοχέων προγεστερόνης και οιστραδιόλης στο στρώμα και τα αδένια του ενδομητρίου (Garcia *et al*, 1988; Bergeron, 2000) και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου με σκοπό την φθαρτοποίησή του κατά την εκκριτική φάση (Nikas *et al*, 2000). Κατά συνέπεια, η οιστραδιόλη στην παραγωγική φάση, προετοιμάζει το ενδομήτριο για τη δράση της προγεστερόνης στη μετέπειτα εκκριτική φάση του κύκλου (Huet-Hudson and Dey, 1990). Η επίδραση των ωοθηκικών στεροειδών στη μήτρα σε ότι έχει να κάνει με τη δημιουργία του φθαρτού, γίνεται μέσω των υποδοχέων τους (Carpenter and Korach, 2006).

Η προγεστερόνη είναι καθοριστικός παράγοντας στην δημιουργία του “παράθυρου εμφύτευσης” και τη διατήρηση της κύησης. Τα στρωματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του φθαρτού ανταποκρινόμενα στη προγεστερόνη κατά τη διαδικασία φθαρτοποίησης, η οποία χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές (πινοπόδια) και έκκριση της προλακτίνης (Dunn *et al*, 2003). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η δημιουργία πινοποδίων είναι άμεσα εξαρτώμενη από την προγεστερόνη (Nikas *et al*, 2000). Έχει επίσης προταθεί ότι η προγεστερόνη επηρεάζει τη διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο και λειτουργεί ως αρωγός στη διατήρηση της εγκυμοσύνης, με το να διεγείρει και να ρυθμίζει λειτουργίες της μήτρας απαραίτητες για την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη, εμφύτευση και πλακουντοποίηση (Shimonovitz *et al*, 1998; Dai *et al*, 2003; Goldman and Shalev, 2005).

Η παραγωγή της προγεστερόνης ρυθμίζεται από τη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) (Spenser and Bazer, 2004), η οποία εκφράζεται από τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και παίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση. Η hCG επηρεάζει πολλές λειτουργίες κατά τη

διάρκεια της εγκυμοσύνης. Διατηρεί το ωχρό σωματίο που είναι και η πρωταρχική πηγή προγεστερόνης και επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης κατά την εμφύτευση, μέσω λειτουργιών με αυτοκρινή δράση (Licht *et al*, 2001).

Παρότι ο ρόλος της χοριακής γοναδοτροπίνης στη διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο δεν είναι διασαφηνισμένος ακόμα, εν τούτοις υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβάλει στη διαδικασία αυτή. Μελέτες έχουν αποφανθεί ότι η hCG αυξάνει την μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-9, σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία κατάδυσης της τροφοβλάστης (Licht *et al*, 2001; Staun-Ram *et al*, 2004) και διεγείρει τη δράση του αυξητικού παράγοντα IGF-II, ο οποίος συνδέεται με το μηχανισμό μετανάστευσης της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Zygmunt *et al*, 2005). Η διαδικασία φθαρτοποίησης του ενδομητρίου φαίνεται επίσης να επηρεάζεται από τη χοριακή γοναδοτροπίνη, η οποία αυξάνει την έκφραση του γονιδίου COX-2 (Simon *et al*, 2000), του LIF (ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας) και του αυξητικού παράγοντα VEGF, πιθανολογώντας με αυτό τον τρόπο ότι η hCG παίζει κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση του φθαρτού (Licht *et al*, 2001; Srisuparp *et al*, 2001).

1.4.4 Ο “διάλογος” μεταξύ ενδομητρίου και βλαστοκύστης κατά την εμφύτευση

Η επιτυχία της εμφύτευσης έγκειται στην ύπαρξη ενός υποδεκτικού ενδομητρίου, μιας καλής ποιοτικά και βιώσιμης βλαστοκύστης και στη συγχρονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ τους (διάλογος). Ο διάλογος αυτός είναι μία πολύπλοκη μοριακή διαδικασία που δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη μέχρι τώρα. Μελέτες όμως έχουν υποδείξει μία σειρά από μόρια προσκόλλησης, πρωτεΐνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες αποικοδόμησης εξωκυττάριου υποστρώματος, φλεγμονώδεις και προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.

1.4.4 (i) Εμπλεκόμενα μόρια προσκόλλησης

Η αρχική πρόσφυση και προσκόλληση της βλαστοκύστης οφείλεται σε μία σειρά μορίων προσκόλλησης που διασφαλίζουν το σωστό “διάλογο” μεταξύ προεμβρύου-μητέρας.

A) ΚΑΤΧΕΡΙΝΕΣ

Οι κατχερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που δρουν ως κυτταροσυνδετικά μόρια μέσω δεσμών ασβεστίου (Stemmler, 2008). Στο ενδομήτριο, η E-κατχερίνη βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση των συνδέσεων προσκόλλησης της βλαστοκύστης (Gumbiner,

1996; Huber *et al*, 1996; Poncelet *et al*, 2002). Στο ενδομήτριο παρουσιάζονται και άλλες κατχερίνες όπως η N-κατχερίνη, η P-κατχερίνη και η K-κατχερίνη (Van der Linden *et al*, 1995; Getsios *et al*, 1998; MacCalman *et al*, 1998; Dai *et al*, 2002; Tsuchiya *et al*, 2006).

Διάφορα πειράματα *in vitro* έχουν δείξει ότι η ελεγχόμενη λειτουργία της ομοιόστασης του ασβεστίου, η οποία γίνεται κυρίως μέσω της καλσιτονίνης, παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση. Η καλσιτονίνη, η οποία έχει άμεση επίδραση στην Ε-κατχερίνη επηρεάζοντας τη δράση της διότι επιδρά στη συγκέντρωση του ασβεστίου (Li *et al*, 2002; Li *et al* 2006), έχει βρεθεί να προωθεί τη μετανάστευση των τροφεκτοδερμικών κυττάρων και τη διείσδυσή τους στο ενδομήτριο (Li *et al*, 2008). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η αύξηση της προγεστερόνης κατά την εκκριτική φάση του κύκλου στους ανθρώπους, επάγει την έκφραση της καλσιτονίνης στο ενδομήτριο (Ding *et al*, 1994; Kumar *et al*, 1998; Zhu *et al*, 1998).

Επειδή η Ε-κατχερίνη έχει βρεθεί στη τροφοβλάστη και στο ενδομήτριο, έχει προταθεί να συμμετέχει στην αρχική πρόσφυση-προσκόλληση της βλαστοκύστης κατά την εμφύτευση (Coutifaris *et al*, 1991), με το να συνδράμει στην αλληλεπίδραση της βλαστοκύστης με τα πινοπόδια του ενδομητρίου (Lopata *et al*, 2002). Είναι επίσης πιθανό ότι η Ε-κατχερίνη (ή άλλες κατχερίνες) έχει διπλή δράση κατά την εμφύτευση, με τρόπο που αρχικά βοηθάει την προσκόλληση της βλαστοκύστης, ενώ έπειτα η δράση της αναστέλλεται για να επέλθει η διείσδυση της τροφοβλάστη στο ενδομήτριο (Singh and Aplin, 2009).

Β) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ β-KATENINΗΣ ΚΑΙ ΒΛΕΝΝΟΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η β-κατενίνη έχει παρατηρηθεί να βρίσκεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά την παραγωγική και εκκριτική φάση (Fujimoto *et al*, 1996; Shih *et al*, 2004) και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη πιθανότητα να έχει κάποια δράση στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου (Tulac *et al*, 2003). Πέρα από το ρόλο που έχει στο να διατηρεί τους δεσμούς πρόσφυσης που αναπτύσσονται μέσω των κατχερινών (Hartsock and Nelson, 2008; Stemmler, 2008), αλληλεπιδρά επίσης και με τη βλεννογλυκοπρωτεΐνη MUC1 (Yamamoto *et al*, 1997; Li *et al*, 1998).

Κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, η MUC1 εκφράζεται στο ενδομήτριο (Hey *et al*, 1994; 1995; 2003) και έχει προταθεί να παίζει ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία (Wen *et al*, 2003). Η κυτταροπλασματική περιοχή της MUC1 εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων σε συνδυασμό με τη β-κατενίνη. Στο σημείο πρόσφυσης της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο, έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα του ενδομητρίου που βρίσκονται γειτονικά με το προέμβρυο, δεν εκφράζουν τη MUC1. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη διατύπωση ενός

μηχανισμού κατά τον οποίο η β-κατενίνη σε συνδυασμό με τη βλεννογλυκοπρωτεΐνη MUC1, μεταναστεύουν στον πυρήνα διαταράσσοντας τις συνδέσεις των κατχερινών, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη διείσδυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Meseguer *et al*, 2001; Wen *et al*, 2003; Singh and Arplin, 2009). Μια ακόμα βλεννογλυκοπρωτεΐνη που υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα το ενδομητρίου είναι η MUC16, η οποία αναστέλλει τους δεσμούς κυτταρικής πρόσφυσης. Η MUC16 απομακρύνεται από τα κύτταρα κατά τη δημιουργία των πινοποδίων, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την προσκόλληση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Gipson *et al*, 2008).

Γ) ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ (IgSF)

Μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IgSF) εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής συμπεριφοράς δρώντας ως υποδοχείς μορίων προσκόλλησης ή υποδοχείς μεταγωγής σήματος μεταξύ κυττάρων ή και τα δύο (Aricescu and Jones, 2007). Μέλη της IgSF μπορεί να εμπλέκονται σε ομοφιλικούς δεσμούς ή δρουν ως σύνδεσμοι για ιντεγκρίνες μεσολαβώντας σε ετεροφιλικούς δεσμούς μεταξύ κυττάρων (Singh and Arplin, 2009).

Το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1 ή CD54) είναι σύνδεσμος της β₂-ιντεγκρίνης και μέσω αλληλεπιδράσεων προσκόλλησης μεσολαβεί στη διαενδοθηλιακή μετανάστευση λευκοκυττάρων και άλλων ανοσολογικών λειτουργιών κατά την εμφύτευση (Van de Stolpe and Van der Saag, 1996). Η ICAM-1 εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου σε όλο τον εμμηνορρυσιακό κύκλο (Thomson *et al*, 1999). Επιπλέον, η ICAM-1 (σε διαλυτή μορφή-sICAM-1) παρεμβαίνει σε λειτουργίες κατά τις οποίες τα κύτταρα του ενδομητρίου διαφεύγουν της ανοσολογικής παρακολούθησης. Η απόρριψη της sICAM-1 έχει συσχετιστεί επίσης με τη παθολογία της ενδομητρίωσης (Defrere *et al*, 2005). Άλλα μόρια της ίδιας οικογένειας που παρουσιάζονται στην επιφάνεια της τροφοβλάστης κατά την εμφύτευση είναι το μόριο προσκόλλησης C-CAM (Svalender *et al*, 1987) και το N-CAM (Kimber *et al*, 1994).

Η CD146 ανοσοσφαιρίνη εκφράζεται στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης που έχουν διεισδυτική λειτουργία, αλλά όχι σε αυτά που δεν λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της κατάδυσης (Shih *et al*, 1998b; Liu *et al*, 2004). Μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει ότι η CD146 έχει λειτουργικό ρόλο κατά τη διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Shih *et al*, 1998a) και η αναστολή της λειτουργίας της εμποδίζει την προσκόλληση της βλαστοκύστης, οδηγώντας σε αποτυχία εμφύτευσης, όπως έχει φανεί από έρευνες σε ποντίκια (Liu *et al*, 2008). Επίσης η CD147 και η CD166 (ALCAM) παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση της

προτεόλυσης μέσω των μεταλλοπροτεϊνών (MMP), οι οποίες είναι πρωτεΐνες αποικοδόμησης του εξωκυττάριου υποστρώματος που μεσολαβούν στη διαδικασία της εμφύτευσης με τη σειρά τους (Iacono *et al*, 2007; Lunder *et al*, 2005).

Δ) INTEΓΚΡΙΝΕΣ (Integrins)

Οι ιντεγκρίνες είναι μία οικογένεια διαμεμβρανικών συνδετικών γλυκοπρωτεϊνών που αποτελούνται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες την α και τη β . Η κάθε υπομονάδα περιέχει ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, ένα διαμεμβρανικό και ένα εξωκυτταρικό. Οι ιντεγκρίνες λειτουργούν ως υποδοχείς μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ), γλυκοπρωτεϊνών και άλλων κυττάρων. Η συγκέντρωση των ιντεγκρινών σε σημεία προσκόλλησης οδηγεί στη δημιουργία ενός δικτύου κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Burghardt *et al*, 2002; Arnaout *et al*, 2007). Οι ιντεγκρίνες παρούσες στο ενδομήτριο είναι ορμονοεξαρτώμενες και ποικίλλουν καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Lessey *et al*, 1995). Ο ρόλος τους δεν στην εμφύτευση έχει αξιολογηθεί ευρέως από πολλούς ερευνητές (Lessey *et al*, 2000; Lessey 2002; Aplin and Kimber, 2004; Kimber, 2008).

Οι ιντεγκρίνες $\alpha_2\beta_1$ και $\alpha_3\beta_1$ (β_1 ιντεγκρίνες) εκφράζονται κατά τη διάρκεια όλου του εμμηνορρυσιακού κύκλου και δρουν ως υποδοχείς για το κολλαγόνο και άλλων μορίων της ΕΘΟ παίζοντας ρόλο στην επαναεπιθηλίωση του ενδομητρίου μετά την έμμηνο ρύση. Οι ιντεγκρίνες $\alpha_1\beta_1$ και $\alpha_4\beta_1$ εκφράζονται την 20-24^η ημέρα του κύκλου. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι β_1 ιντεγκρίνες είναι παρούσες, αν και σε ποικίλες ποσότητες, στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου και συχνά επιδεικνύουν μία έντονη εγκάρσια κατανομή (Quenby *et al*, 2007). Μελέτες σε ποντίκια έχουν αποφανθεί ότι οι βλαστοκύστες που δεν έχουν την υπομονάδα β_1 αποτυγχάνουν να εμφυτευθούν (Brakebusch *et al*, 1997; Basak *et al*, 2002).

Οι ιντεγκρίνες $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_v\beta_6$ (α_v ιντεγκρίνες) έχουν βρεθεί επίσης στο ενδομήτριο (Aplin *et al*, 1996), ενώ παράλληλα και τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα εκφράζουν διάφορες ιντεγκρίνες όπως α_3 , α_5 , β_1 , β_3 , β_4 , β_5 κατά την εμφύτευση, οι οποίες έχει προταθεί να εμπλέκονται στη διαδικασία της προσκόλλησης της βλαστοκύστης στην επιφάνεια του επιθηλίου (Campbell *et al*, 1995; Bloor *et al*, 2002; Kabir-Salmani *et al*, 2003; 2004). Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η τροφοβλάστης τροποποιεί τη συγκέντρωση και τη σύσταση των ιντεγκρινών που εκφράζει κατά τη διείσδυση του στρώματος και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων

της σε κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη (Bischof and Campana, 2000; Bowen and Hunt, 2000).

Μελέτες που έχουν γίνει χρησιμοποιώντας ως πρότυπα ποντίκια και κουνέλια έχουν δείξει ότι η αναστολή της λειτουργίας της $\alpha\beta_3$ επηρεάζει αρνητικά τη διαδικασία της εμφύτευσης (Illera *et al*, 2000; Illera *et al*, 2003). Επίσης η $\alpha\beta_3$ έχει παρατηρηθεί να εκφράζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις κατά την προσκόλληση της βλαστοκύστης και σε αντίθετη περίπτωση οδηγεί σε υπογονιμότητα (Lessey *et al*, 1995; Lessey *et al*, 1996). Κατά τη διαδικασία προσκόλλησης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο εκτός από τη $\alpha\beta_3$, έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται και η $\alpha_4\beta_1$, γεγονός που έχει οδηγήσει στο να θεωρούνται και οι δύο δείκτες υποδεκτικότητας του ενδομητρίου (Lessey *et al*, 1994; Lessey, 1998; Nardo *et al*, 2003). Γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές επιδεικνύουν χαμηλή συγκέντρωση των $\alpha_4\beta_1$ και $\alpha_5\beta_1$ ιντεγκρινών κατά τη διάρκεια του παραθύρου εμφύτευσης, από ότι γυναίκες που χαρακτηρίζονται από ανεξήγητη υπογονιμότητα (Skrzypczak *et al*, 2001).

Μόρια με τα οποία προσκολλώνται οι ιντεγκρίνες και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμφύτευση αποτελεί η οστεοποντίνη (White *et al*, 2006; Quenby *et al*, 2007), η φιμπρονεκτίνη (Turpeenniemi-Hujanen *et al*, 1995), η πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαράνης (HSPG) περλεκάνη (perlecan) (Carson *et al*, 1993) και η θρομβοσπονδίνη (O'Shea *et al*, 1990). Επίσης, παράγοντες γνωστοί ως προς το ρόλο τους στην εμφύτευση ενεργούν μέσω της διαμεσολάβησης των ιντεγκρινών. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (IGF-I), ο οποίος εμπλέκεται στη μετανάστευση της τροφοβλάστης, απενεργοποιώντας την $\alpha_5\beta_1$ ιντεγκρίνη (Kabir-Salmani *et al*, 2004) και επηρεάζοντας τη δράση της $\alpha\beta_3$ (Kabir-Salmani *et al*, 2003).

1.4.4 (ii) Πρωτεΐνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ)

Τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα αντιμετωπίζουν μία σειρά από πρωτεΐνες της ΕΘΟ, καθώς διεισδύουν το ενδομήτριο. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι το κολλαγόνο (Col), η φιμπρονεκτίνη (FN), η λαμινίνη (LN), η βιτρονεκτίνη (VN), η τροφινίνη και η ταστίνη, οι οποίες επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες μέσω δεσμών που αναπτύσσουν με τις ιντεγκρίνες, συμμετέχοντας έτσι στην προσκόλληση, μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την εμφύτευση (Bischof and Campana, 2000; Staun-Ram and Shalev, 2005). Η τροφινίνη και η ταστίνη έχουν βρεθεί στο επιθήλιο της μήτρας και στην τροφοβλάστη και έχει προταθεί να έχουν λειτουργικό ρόλο στην πρόσφυση-προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Hill, 2001).

Η σύσταση της ΕΘΟ, αλλάζει στις διαφορετικές φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου, επηρεάζοντας τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου, διαδικασία απαραίτητη για την επίτευξη της εμφύτευσης (Salamonsen *et al*, 2001; Salamonsen and Nie, 2002). Επίσης, επιδρά στη λειτουργία των τροφεκτοδερμικών κυττάρων, μέσω της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και των αναστολέων τους (TIMPs), δημιουργώντας ίσως ένα μηχανισμό αυτοκρινούς δράσης που ρυθμίζει την έκφραση των MMPs και τη διείσδυση των τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο ενδομήτριο (Xu *et al*, 2001).

1.4.4 (iii) Αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors)

Οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν μία οικογένεια μορίων σηματοδότησης των οποίων η δράση επάγει το πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Αυτοί οι παράγοντες δημιουργούν δεσμούς με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, ενεργοποιώντας το μηχανισμό διακυτταρικής επικοινωνίας (Singh *et al*, 2011).

A) ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (epidermal growth factor –EGF)

Η παρουσία του EGF στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου στη παραγωγική και εκκριτική φάση του κύκλου, καθώς και η παρουσία του στα τροφεκτοδερμικά κύτταρα υποδηλώνουν την ανάμειξή του στην εμφύτευση της βλαστοκύστης (Hofmann *et al*, 1991). Η επίδραση του EGF στην εμφύτευση μετά από εξωγενή προσθήκη του, έχει μελετηθεί *in vitro* στα τρωκτικά και έδειξε ότι το ποσοστό της εμφύτευσης ήταν πολύ υψηλότερο σε βλαστοκύστες παρουσία του EGF, από εκείνο απουσία του (Aflalo *et al*, 2007). Άλλες τέτοιες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και του υποδοχέα του είναι υψηλότερη τη στιγμή της εμφύτευσης και αμέσως μετά την ολοκλήρωσή της μειώνεται σταδιακά (Byun *et al*, 2008).

Υποδοχείς του EGF έχουν βρεθεί να είναι παρόντες στα πρωταρχικά στάδια του αναπτυσσόμενου γονιμοποιημένου ωαρίου, καθώς επίσης και στη μήτρα κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Wiley *et al*, 1992). Εκτός από τους υποδοχείς του και ο ίδιος ο αυξητικός παράγοντας EGF εκφράζεται από το προ της εμφύτευσης έμβρυο και είναι σημαντικός για την ανάπτυξή του μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης (Chia *et al*, 1995). Η παρουσία του στο ενδομήτριο έχει επίσης αναφερθεί (Haining *et al*, 1991). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, αποδείχθηκε ότι η αναστολή της δράσης του παράγοντα αυτού και του υποδοχέα του, οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση και καθυστερημένη ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου (Dadi *et al*, 2009).

Β) ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΗΠΑΡΙΝΗ (Heparin-binding-epidermal growth factor- HB-EGF)

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας που προσδένεται με την ηπαρίνη είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που χρειάζεται την ηπαρίνη σα μέσο για να ενωθεί με τους υποδοχείς του. Ο HB-EGF μοιράζεται τον ίδιο υποδοχέα με τον EGF και τον TGF-α (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-α). Οι πρώτες μελέτες που υπέδειξαν το ρόλο του HB-EGF στην εμφύτευση έγιναν χρησιμοποιώντας ως μοντέλα τρωκτικά (Das *et al*, 1994; Birdsall *et al*, 1996). Τα στρωματικά και τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου εκφράζουν τον HB-EGF, ο οποίος φαίνεται να παίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φθαρτοποίηση και την έκκριση ορμονών από τα αδένια του ενδομητρίου (Simon *et al*, 2000). Η έκφραση του παράγοντα αυτού είναι ορμονοεξαρτώμενη από την οιστραδιόλη και τη προγεστερόνη (Wang *et al*, 1994).

Η ύπαρξη του HB-EGF σε μεγάλες συγκεντρώσεις πριν τη δημιουργία του παραθύρου εμφύτευσης, υποδηλώνει ότι αυτός ο αυξητικός παράγοντας ελέγχει τη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης (Yoo *et al*, 1997), ενώ έρευνες εστιασμένες στο γονίδιο του HB-EGF έχουν δείξει πως ο παράγοντας αυτός πιθανότατα ρυθμίζει λειτουργίες των ωοθηκών και του ενδομητρίου (Xie *et al*, 2007). Η ικανότητά του επίσης να αναστέλλει την απόπτωση και να επάγει τη διείσδυση της βλαστοκύστης στο ανθρώπινο ενδομήτριο, καταστεί τον HB-EGF έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της εμφύτευσης (Martin *et al*, 1998). Η παρατήρηση ότι η έκφρασή του είναι υψηλότερη όταν υπάρχουν πλήρως σχηματισμένα πινοπόδια, έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος του είναι καίριος σε ότι έχει να κάνει με την προσκόλληση και διείσδυση της τροφοβλάστης (Stavreus-Evers *et al*, 2002).

Γ) ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΟΡΦΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (Insulin-like growth factor-IGF)

Ο IGF επιδεικνύει μεγάλη ομολογία αμινοξέων με την ινσουλίνη και ασκεί τη βιολογική του δράση όταν ενώνεται με συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς υποδοχείς (IGF-R) που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων του (Rechler and Nissley, 1985). Έρευνες σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι ο IGF-I (τύπου 1) συμμετέχει στη φθαρτοποίηση των στρωματικών κυττάρων της μήτρας (Oner and Oner, 2007) και η προσθήκη του σε καλλιέργεια *in vitro* φαίνεται να βελτιώνει την ανάπτυξη και την ποιότητα του γονιμοποιημένου ωαρίου, οδηγώντας σε βλαστοκύστες με μεγαλύτερο αριθμό τροφεκτοδερμικών κυττάρων και έσω κυτταρικής μάζας (Yoshida *et al*, 2009). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η καλλιέργεια

εξωλαχικών τροφοβλαστικών κυττάρων παρουσία του IGF-I έχει σαν αποτέλεσμα την προώθηση της μετανάστευσης της τροφοβλάστης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Kabir-Salmani *et al*, 2004). Προσθήκη στα καλλιεργητικά υγρά του IGF-I αυξάνει το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων και η παρουσία του στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του προεμβρύου (Lighten *et al*, 1998).

Ο IGF-II (τύπου 2) παράγοντας είναι εξίσου σημαντικός για την ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Η απουσία του ή η αναστολή της δράσης του επηρεάζει το ποσοστό των βλαστοκύστεων και τον αριθμό των κυττάρων τους (Harvey and Kaye, 1992; Rappolee *et al*, 1992). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ο IGF-II λειτουργεί ως εξισορροπητικός παράγοντας μεταξύ της διαδικασίας διείσδυσης της τροφοβλάστης και καταστολή της, συμβάλλοντας έτσι στη διεκπεραίωση της εμφύτευσης και της πλακουντοποίησης (Giudice *et al*, 1993; Fowler *et al*, 2000).

Οι αυξητικοί παράγοντες IGF-I και IGF-II θεωρούνται φλεγμονώδεις παράγοντες που επηρεάζουν την εμφύτευση και θα περιγραφούν λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο (παράγραφος 1.4.4(v)).

Δ) ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ-Β (transforming growth factor-β –TGF-β)

Ο TGF-β υπάρχει σε τρεις ισομορφές (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των προτεολυτικών ενζύμων της. Ισομορφές του IGF-β είναι παρούσες κατά την αλληλεπίδραση προεμβρύου-μητέρας αναδεικνύοντας έτσι το ρόλο τους στην εμφύτευση. Μέλη της οικογένειας των TGF εκφράζονται από το ενδομήτριο και έχουν λειτουργικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη φθαρτοποίηση και την εμφύτευση (Jones *et al*, 2006b). Επειδή ο TGF θεωρείται φλεγμονώδης παράγοντας που επηρεάζει την εμφύτευση, θα περιγραφεί λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο (παράγραφος 1.4.4(v)).

1.4.4 (iv) Πρωτεΐνες αποικοδόμησης του εξωκυττάριου υποστρώματος (Extracellular degrading matrix proteinases)

Α) ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMPs) ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ (TIMPs)

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος είναι το εξωκυττάριο υπόστρωμα (εξωκυττάρια θεμέλια ουσία- ΕΘΟ), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της αναπαραγωγής. Η λειτουργία της ΕΘΟ ρυθμίζεται από ένα σύνθετο

δίκτυο παρακρινικών παραγόντων, σημαντικότεροι των οποίων είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και οι αναστολείς τους (TIMPs) (Nagase and Woessner, 1999; Elkington *et al*, 2005). Στους ανθρώπους έχουν αναγνωριστεί 27 διαφορετικές MMPs (Malemud, 2006). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι μία οικογένεια ενδοπεπτιδασών που σε συνδυασμό με τους αναστολείς τους συμμετέχουν στην αποδόμηση των μορίων της ΕΘΟ και εμπλέκονται με αυτό τον τρόπο σε πολλές λειτουργίες, όπως η διαδικασία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης (Matrisian, 1992; Salomonsen and Woolley, 1996; Freitas *et al*, 1999; Koks *et al*, 2000).

Η τροφοβλάστη εκκρίνει μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι οποίες αποικοδομούν μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, για να επιτύχει την πρόσβασή της στο στρώμα του ενδομητρίου (Glasser *et al*, 2002). Οι MMPs που εκκρίνονται από την κυτταροτροφοβλάστη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 διαφορετικές υποοικογένειες: τις ζελατινάσες (MMP-2, MMP-9), τις κολλαγενάσες (MMP-1, MMP-8, MMP-13), τις στρωμολυσίνες (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12) και μία υποοικογένεια που περιλαμβάνει τύπους μεμβρανικών μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17 (Minas *et al*, 2005). Η ρύθμιση της λειτουργίας αυτών των MMPs γίνεται από τους αναστολείς τους, η οικογένεια των οποίων με τη σειρά τους αποτελείται από 4 μέλη (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) (Curry and Osteen, 2003).

Αν και μελέτες στους ανθρώπους είναι πολύ δύσκολο να γίνουν, εν τούτοις μελέτες σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι η αναλογία MMP/TIMP είναι πολύ σημαντική ως προς τη διεύθυνση της κυτταροτροφοβλάστης και την επιτυχία της εμφύτευσης. Η MMP-2 και η MMP-9 εκφράζονται μαζί με τους αναστολείς TIMP-1, -2, -3 στη μήτρα του ποντικίου, γεγονός που τις καθιστά πολύ σημαντικές στην επιτυχία και διατήρηση της κύησης (Das *et al*, 1997; Qiu *et al*, 2011; Rashid *et al*, 2011). Οι MMP-2 και MMP-9 διασπούν το κολλαγόνο τύπου IV, που είναι το κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, λαμβάνοντας έτσι την κυρίαρχη θέση μεταξύ των ενζύμων που εμπλέκονται στην εμφύτευση. Κατά συνέπεια, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες 2 και 9 ενεργοποιούν τη διεύθυνση της τροφοβλάστης στο φθαρτό και τελικά μέσα στο αγγειακό σύστημα της μητέρας (Librach *et al*, 1991; Bischof *et al*, 1995; Xu *et al*, 2000; Isaka *et al*, 2003; Staun-Ram *et al*, 2004).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 και MMP-10, καθώς και οι αναστολείς τους TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 έχουν βρεθεί να εκφράζονται στο ενδομήτριο και στη τροφοβλάστη (Hurskainen *et al*, 1996; Ruck *et al*, 1996; Niu *et al*, 2000; Nardo *et al*, 2002;) και η δράση τους είναι εξαρτώμενη από ορμονικά στεροειδή, αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες που ρυθμίζουν το αναπαραγωγικό σύστημα (Diaz *et al*, 2012).

B) ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ

Το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου αποτελείται από τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου (uPA), τον ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tPA), τους αναστολείς του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (PAI-1, PAI-2) και τον υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας πλασμινογόνου (uPA). Αυτό το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου μετατρέπει το πλασμινογόνο σε ενεργή πρωτεάση σερίνης, η οποία με τη σειρά της αποικοδομεί μόρια της ΕΘΟ (Vassalli *et al*, 1991). Εκτός από την άμεση λειτουργία αποδόμησης μορίων της ΕΘΟ, το σύστημα αυτό έχει έμμεση δράση μέσω της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης μεταλλοπρωτεϊνών. Ο uPA και η πλασμίνη έχουν βρεθεί να εκφράζονται από το ενδομήτριο και την τροφοβλάστη στα ποντίκια, γεγονός που έχει προτείνει το ρόλο του συστήματος αυτού στη διαδικασία της εμφύτευσης (Floridon *et al*, 1999; Aflalo *et al*, 2004; Staun-Ram, 2005) και ειδικότερα στο μηχανισμό διείσδυσης της τροφοβλάστης (Zhang *et al*, 2005).

1.4.4 (v) Φλεγμονώδεις και προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης

Ανοσολογικοί παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες έχουν αναδειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στο “διάλογο” μεταξύ βλαστοκύστης και μητέρας κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης και λειτουργούν ρυθμιστικά ως προς τη προσκόλληση και διείσδυση του προεμβρύου στο ενδομήτριο. Αυτοί οι ανοσολογικοί διαμεσολαβητές απελευθερώνονται από τα κύτταρα του ενδομητρίου και τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (Dekel *et al*, 2010; Dimitriadis *et al*, 2005; van Sinderen *et al*, 2012).

A) ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Οι κυτταροκίνες είναι μικρές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες δρουν μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης ως ισχυρά ενδοκυτταρικά σήματα, ρυθμίζοντας διάφορες λειτουργίες των κυττάρων του ενδομητρίου και των αλληλεπιδράσεων προεμβρύου-μητέρας (Singh *et al*, 2011). Η είσοδος της βλαστοκύστης στη μήτρα είναι πολύ σημαντική για τη παραγωγή κυτταροκινών από τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα και το επιθήλιο του ενδομητρίου, η οποία με τη σειρά της διαμορφώνει την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου, σηματοδοτώντας την έκφραση μιας σειράς μορίων προσκόλλησης (Simon *et al*, 2000). Στα θηλαστικά, η απορρύθμιση της λειτουργίας του κυτταροκινών και των σημάτων τους έχει ως αποτέλεσμα την ολική ή μερική αποτυχία εμφύτευσης και τον ανώμαλο σχηματισμό του

πλακούντα (Guzeloglu-Kayisli *et al*, 2009). Τα ωθητικά στεροειδή ρυθμίζουν τη δράση του δικτύου των κυτταροκινών με τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο “διάλογος” ενδομητρίου-βλαστοκύστης και να διασφαλιστεί η εμφύτευση του προεμβρύου. Η διαδικασία της εμφύτευσης δημιουργεί ένα περιβάλλον άσηπτης φλεγμονής μέσω διαφόρων φλεγμονωδών και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (Makrigiannakis *et al*, 2006).

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-6 (IL6) : IL6, IL11, LIF

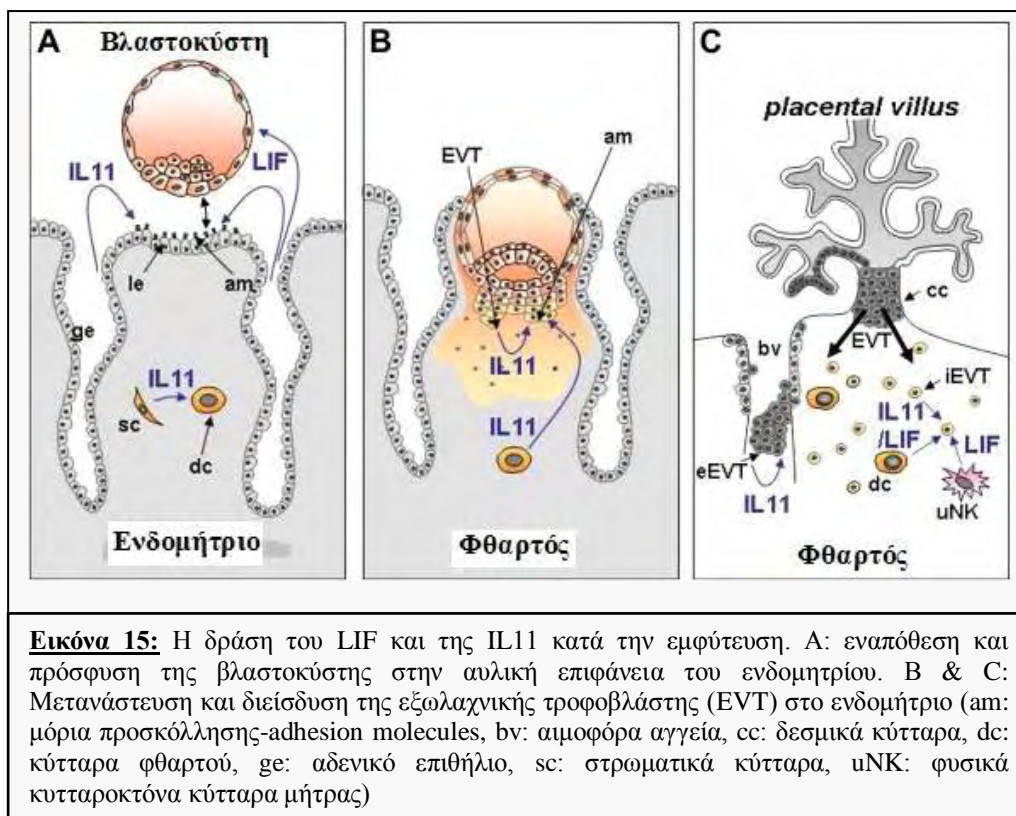
Τα μέλη της οικογένειας της ιντερλευκίνης-6 δρουν ως προ-φλεγμονώδεις και αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες διαμεσολαβώντας στη δημιουργία της φλεγμονής στον οργανισμό. Οι IL6 ιντερλευκίνες συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και επιβίωση των κυττάρων (Jones *et al*, 2001; van Sinderen *et al*, 2012). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν τα μέλη IL6, IL11 και ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF), τα οποία είναι γνωστά και ως gp130 κυτταροκίνες και ο ρόλος τους στην εμφύτευση είναι καθοριστικός (Makrigiannakis *et al*, 2006; Dimitriadis *et al*, 2010a; Dimitriadis *et al*, 2010b; Prins *et al*, 2012). Στις γυναίκες, και τα τρία μέλη της οικογένειας αυτής μαζί με τους υποδοχείς τους παράγονται από το επιθήλιο και εκφράζονται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου όταν το ενδομήτριο είναι υποδεκτικό και έτοιμο για την εμφύτευση (Charnock-Jones *et al*, 1994; Tabibzadeh *et al*, 1995; Vandermolen and Gu, 1996; Lim *et al*, 1998; Chen *et al*, 2002; Cork *et al*, 2002; Karpovich *et al*, 2003).

Ο υποδοχέας της IL6 και του LIF (LIFR) έχουν παρατηρηθεί να εκφράζονται και από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης (Zolti *et al*, 1991; Charnock-Jones *et al*, 1994; Sharkey *et al*, 1995), ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ωθητική διέγερση μειώνει την έκφραση των υποδοχέων της IL6 από την βλαστοκύστη (Yu *et al*, 2012). Η απορρύθμιση της IL6 στα ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με τη μείωση στη ποιότητα του γονιμοποιημένου ωαρίου και για το λόγο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της (Salamonsen *et al*, 2000; Sighn *et al*, 2011). Επίσης, η ανώμαλη έκφραση της IL6 έχει αναφερθεί σε ασθενείς που πάσχουν από καθ'έξιν αποβολές (Lim *et al*, 2000; Von Wolff *et al*, 2000).

Η έκφραση του LIF και της IL11 ρυθμίζεται από την hCG στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, γεγονός που οδηγεί στην πρόταση ότι η έκκριση hCG από τη βλαστοκύστη διεγείρει τον LIF και την IL11 διευκολύνοντας έτσι την εμφύτευση της (Paiva *et al*, 2011). Έρευνες έχουν δείξει ότι οι δύο αυτές κυτταροκίνες διεγείρουν με τη σειρά τους την έκφραση και λειτουργία μορίων προσκόλλησης στο επιθήλιο, οπότε και συμμετέχουν έτσι στη

διαδικασία προσκόλλησης της βλαστοκύστης (Marwood *et al*, 2009). Το σύστημα σηματοδότησης της IL11 βρέθηκε επίσης να συμμετέχει στη ρύθμιση της διείσδυσης της τροφοβλάστης (von Rango *et al*, 2004). Η IL11 έχει προταθεί να εμπλέκεται και στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου (Dimitriadis *et al*, 2000). Στους ανθρώπους, βιοψίες ενδομητρίου έχουν δείξει ότι η IL11 και ο υποδοχέας της (IL11Rα) εκφράζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές από ότι σε γόνιμες γυναίκες (Linjawi *et al*, 2004). Όλα αυτά συνηγορούν στο να θεωρηθεί η IL11 ως σημαντικός παράγοντας για την επιτυχή εμφύτευση και κύηση (Sighn *et al*, 2011).

Η πρώτη απόδειξη ότι ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας LIF έχει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση ήρθε από την παρατήρηση ότι η έλλειψή του σε ποντίκια θηλυκού γένους, οδηγεί σε αποτυχία εμφύτευσης, ενώ η προσθήκη του στο ίδιο μοντέλο αποκαθιστά την ομαλή διεκπεραίωση της εμφύτευσης (Steward, 1994). Αργότερα, μελετήθηκε και ο ρόλος του στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου, χρησιμοποιώντας μοντέλα ποντικών για το σκοπό της έρευνας και οι ερευνητές αναφέρουν ότι υποδοχείς του LIF εκφράζονται από τα κύτταρα του φθαρτού που βρίσκονται σε επαφή με τη βλαστοκύστη (Ni *et al*, 2002). Πρόσφατα αποδείχθηκε επίσης και ο ρόλος του εκτός από την προσκόλληση της βλαστοκύστης και στη διείσδυσή της στο ενδομήτριο (Dimitriadis *et al*, 2010b).



Στους ανθρώπους, οι πληροφορίες που λήφθηκαν μετά από βιοψίες ενδομητρίου απέδειξαν ότι ο LIF εκφράζεται καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρησιακού κύκλου, με αυξημένη τη συγκέντρωσή του κατά την εκκριτική φάση, όπου λαμβάνει μέρος η εμφύτευση (Charnock-Jones *et al*, 1994, Arici *et al*, 1995). Μεταλλάξεις του γονιδίου του LIF έχει βρεθεί σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα και επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης (Steck *et al*, 2004). Επίσης γυναίκες στις οποίες παρατηρείται ισχυρή έκφραση του LIF έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να κυοφορήσουν (άρα να επέλθει εμφύτευση) από ότι γυναίκες στις οποίες παρατηρείται ισχνή έκφρασή του (Serafini *et al*, 2009). Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του LIF και της ιντερλευκίνης IL11 κατά την εμφύτευση παρουσιάζεται στην εικόνα 15.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ-1 (IL1)

Τα μέλη της οικογένειας IL1 έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης και της ανοσολογικής απόκρισης κατά την εμφύτευση. Οι αγωνιστές της IL1 παράγονται από μακροφάγα, μονοκύτταρα, ινοβλάστες και δένδριτικά κύτταρα. Η δράση τους μεσολαβεί στην αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και στην ενίσχυση της καταπολέμησης της λοίμωξης (Barksby *et al*, 2007; Boraschi *et al*, 2011). Οι οικογένεια της IL1 ιντερλευκίνης αποτελείται από τους αγωνιστές IL1α, IL1β, δύο υποδοχείς (R) IL1R1 και IL1R2 και έναν υποδοχέα ανταγωνιστή IL1 (ra). Η έκφραση της IL1 ρυθμίζει τοπικές και ενδοκρινολογικές διεργασίες σε όλο το αναπαραγωγικό σύστημα (Bellehumeur *et al*, 2009). Τα μέλη της οικογενείας IL1 έχουν βρεθεί να εκφράζονται από το ενδομήτριο (Kauma *et al*, 1990; De los Santos *et al*, 1996; Sharkey, 1998; Boucher *et al*, 2001; Tierney *et al*, 2003; Garrido-Gomez *et al*, 2010) και από τη βλαστοκύστη (De los Santos *et al*, 1996) και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμφύτευση.

Οι αγωνιστές (α και β) και ο υποδοχέας IL1R1 εκφράζονται στο ενδομήτριο σε όλο τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και επιδεικνύουν μέγιστη συγκέντρωση κατά την υποδεκτική φάση (παράθυρο εμφύτευσης), ενώ εκφράζονται-εκκρίνονται και από τη βλαστοκύστη (Sheth *et al*, 1991; Simon *et al*, 1993; Simon *et al*, 1994; De los Santos *et al*, 1996; Baranao *et al*, 1997; Krussels *et al*, 1998). Ειδικά η IL1β έχει αναφερθεί να εμπλέκεται στην ανοσοανοχή μητέρας-πλακούντα και τη ζωοτοκία στα θηλαστικά (Geisert *et al*, 2012). Ωστόσο, ο υποδοχέας IL1R2 αναστέλλει τη δράση των αγωνιστών IL1, ενώ κατά την υποδεκτική φάση του κύκλου η υπο-έκφρασή του μέσω της δράσης της hCG, επιτρέπει την ένωση της IL1 με τον υποδοχέα IL1R1, ενισχύοντας έτσι την εμφύτευση (Hermann-Lavoie *et al*, 2007).

Η IL1β έχει προταθεί να είναι ένα από τα πρώτα σήματα της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο μιας και η έκφρασή της έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της προσταγλανδίνης E2, των ιντεγκρινών και του LIF στο ενδομήτριο (Simon *et al*, 1997; Vigano *et al*, 2003; Gonzalez *et al*, 2004), επηρεάζοντας σημαντικά την υποδεκτικότητα του. Παράλληλα, δρα ως διαμεσολαβητής στη διαδικασία της διείσδυσης της βλαστοκύστης μέσω της αναδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών της ΕΘΟ (Hess *et al*, 2007). Χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης του IL1β mRNA σε ενδομήτριο γυναικών, έχει επίσης συνδεθεί με τις καθ'έξιν αποβολές (Laird *et al*, 2006), ενώ μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών IL1α και IL1β έχουν βρεθεί σε ένα μικρό ποσοστό γυναικών με ανεξήγητες επαναλαμβανόμενες αποβολές (Makrigiannakis and Minas, 2007). Για όλους αυτούς τους λόγους τα μέλη της οικογένειας IL1 είναι πολύ σημαντικά στο “διάλογο” ενδομητρίου-βλαστοκύστης, με την IL1β να επιδεικνύει λειτουργικό ρόλο στη βελτίωση των ποσοστών εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (van Sinderen *et al*, 2012).

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ IL10 ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ (IFNs)

Τα μέλη της οικογένειας της IL10 δρουν ως αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανοσορρύθμιση και φλεγμονή. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την υπο-έκφραση των κυτταροκινών, αντιγόνων και άλλων συν-διεγερτικών μορίων από τα μακροφάγα κύτταρα, ενώ παράλληλα ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την παραγωγή αντισωμάτων (Asadullah *et al*, 2003; van Sinderen *et al*, 2012). Η IL10 εκκρίνεται από την ανθρώπινη βλαστοκύστη, αλλά μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί διαφορά στα επίπεδα της έκφρασής της μεταξύ των βλαστοκύστεων που εμφυτεύονται και αυτών που δεν εμφυτεύονται (Ozornek *et al*, 1995). Εκκρίνεται επίσης και από τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασής της από τα κύτταρα του φθαρτού, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι παίζει κάποιο ρόλο κατά τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου (Vigano *et al*, 2002).

Η IL10 έχει αναφερθεί ότι δρα ως ρυθμιστής της διείσδυσης της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο (Roth *et al*, 1999; Szonyi *et al*, 1999). Η ιντερλευκίνη IL10 παράγεται *in vitro* από την κυτταροτροφοβλάστη του πρώτου τριμήνου, τα κύτταρα της οποίας έχουν βρεθεί να εκφράζουν και τον υποδοχέα mRNA της IL10. Όπως έχει αναφερθεί σε μελέτες *in vitro* και *in vivo*, η IL10 οδηγεί σε υπο-έκφραση της MMP-9, γεγονός που οδηγεί στη πρόταση ότι η IL10 ρυθμίζει τη δραστηριότητα και διείσδυση της κυτοτροφοβλάστης στο ενδομήτριο, μέσω αυτοκρινούς δράσης (Makrigiannakis and Minas, 2007).

Οι ιντερφερόνες (IFNs) εμπλέκονται στην επικοινωνία του ανοσολογικού συστήματος κατά την αντιμετώπιση των παθογόνων. Αυτό γίνεται μέσω ενεργοποίησης άλλων ανοσολογικών κυττάρων όπως μακροφάγων και φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων. Κάποια μέλη της οικογένειας των ιντερφερονών πιστεύεται ότι διακατέχουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο στο ενδομήτριο και κατά τη διάρκεια της κύησης (Tabibzadeh, 1994; Robertson, 2000). Η IFN γ έχει ανιχνευθεί στις εκκρίσεις ανθρώπινων βλαστοκύστεων αν και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν κατά την 3-4 ημέρα της καλλιέργειας των γονιμοποιημένων ωαρίων (δηλαδή λίγο πριν την εμφύτευση), αλλά δεν έχει αναφερθεί διαφορά στα επίπεδα συγκέντρωσης μεταξύ προεμβρύων που εμφυτεύθηκαν και μη (Ozornek *et al*, 1997; Lim *et al*, 1998). Επίσης η IFN α τύπου I έχει βρεθεί στο ενδομήτριο κατά την εκκριτική φάση του κύκλου (Ozaki *et al*, 2005), αλλά δεν έχει ανιχνευθεί στις εκκρίσεις βλαστοκύστεων (Gunn *et al*, 1994).

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ IL15 ΚΑΙ IL18

Η IL15 είναι μία κυτταροκίνη που παράγεται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης και έχει ανάλογες λειτουργίες με την ιντερλευκίνη IL2. Προωθεί την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων, των T-κυττάρων και ελέγχει τη λειτουργία και τη συντήρηση των λεμφοκυττάρων (Kang and Der, 2004). Έχει προταθεί επίσης ότι δρα ως μεσολαβητής στη διακυτταρική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του φθαρτού και των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (uNK) της μήτρας, που αποτελούν το μεγαλύτερο πληθυσμό κυττάρων προερχόμενων του μυελού των οστών στο φθαρτό, κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης (Dunn *et al*, 2003; Eriksson *et al*, 2004). Σε αντίθεση με τη δράση της IL15 στα κυτταροκτόνα κύτταρα του αίματος, στη μήτρα δεν μετατρέπει τα uNK κύτταρα σε κυτταρολυτικά, γεγονός πολύ σημαντικό για τα κύτταρα που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μητέρας-βλαστοκύστης, που διαφορετικά η δράση τους θα κατέστρεφε την τροφοβλάστη. Κατά συνέπεια έχει προταθεί ότι η IL15 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση, επιβίωση και διατήρηση των uNK κυττάρων στο ενδομήτριο (Verma *et al*, 2000; Makrigiannakis and Minas, 2007; Guzeloglu-Kayisli *et al*, 2009).

Το mRNA της IL15 έχει ανιχνευθεί επίσης στο ενδομήτριο, στο φθαρτό και τον πλακούντα γυναικών (Verma *et al*, 2000), ενώ η πρωτεΐνη της IL15 έχει εντοπιστεί στους ινοβλάστες του στρώματος κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου κατά την παραγωγική φάση και στο φθαρτό του πρώτου τριμήνου κύησης (Kitaya *et al*, 2003). Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η απουσία έκφρασης της IL15 δεν οδηγεί σε στειρότητα, αλλά σε διαταραγμένη ακεραιότητα του φθαρτού, σε απουσία φυσικών

μεταβολών στις σπειροειδείς αρτηρίες και σε έλλειψη των κυττάρων NK από τις θέσεις εμφύτευσης (Ashkar *et al*, 2003).

Η IL18 είναι επίσης μία προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη, η αύξηση στην έκφραση της οποίας μπορεί να είναι μοιραία για την έναρξη της εγκυμοσύνης. Έχει προταθεί ότι η ανίχνευσή της IL18 στο ενδομήτριο κατά την ωληψία και περίπου 48 ώρες πριν την εμβρυομεταφορά, σχετίζεται με μειωμένα ποσοστά εμφύτευσης (Makrigiannakis and Minas, 2007). Μελέτες στο ενδομήτριο γυναικών μετά από αποτυχημένη εμφύτευση έχουν επίσης αναδείξει μεγάλη συγκέντρωση της IL18, γεγονός που έχει οδηγήσει στην πρόταση ότι η IL18 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο δείκτης υποδοκτικότητας του ενδομητρίου (Ledee-Bataille *et al*, 2004a; 2004b).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ (CSF)

Ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων GM-CSF είναι μία κυτταροκίνη που εμπλέκεται στη παραγωγή λευκοκυττάρων, διακατέχοντας εξέχοντα ρόλο στην ανοσολογική άμυνα και τη κυτταρική επιβίωση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό (Ballinger *et al*, 2006). Ο GM-CSF έχει σημαντική θέση στους παράγοντες του ενδομητρίου που συμμετέχουν στη εμφύτευση και την κύηση (Robertson and Seamark, 1992; Robertson, 2007). Τα επίπεδα συγκέντρωσής του φτάνουν στο μέγιστο κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, ενώ το mRNA και η πρωτεΐνη του έχουν εντοπιστεί στην αυλική επιφάνεια και στο αδενικό επιθήλιο του ενδομητρίου (Zhao *et al*, 1999). Στους ανθρώπους υπάρχει μία αυξημένη τοπικά παραγωγή του CSF σε ιστούς που βρίσκονται σε θέσεις εμφύτευσης, κατά την αλληλεπίδραση μητέρας-προεμβρύου και στα πρώτα στάδια της κύησης (Kauma *et al*, 1991). Στους ιστούς αυτούς εντοπίζονται και υποδοχείς του CSF, γεγονός που προτείνει ότι ο CSF μπορεί να παίζει ρόλο στη φθαρτοποίηση και την ανάπτυξη του πλακούντα (Makrigiannakis and Minas 2007). Χαμηλή συγκέντρωση του CSF στο αίμα έχει συσχετιστεί με ανεξήγητες καθ'έξιν αποβολές (Katano *et al*, 1997). Πιο πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι η παραγωγή CFS, όπως και άλλων κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένου του LIF, από κλώνους T-κυττάρων του φθαρτού γυναικών με ανεξήγητες καθ'έξιν αποβολές, έχει παρατηρηθεί να είναι αρκετά χαμηλή (Piccinni *et al*, 2001).

Ο υποδοχέας-β (GMRβ) δείχνει ανάλογη έκφραση με τον GM-CSF, ενώ ο υποδοχέας-α εντοπίζεται στα κύτταρα του στρώματος, του ενδοθηλίου των αγγείων και στα φλεγμονώδη κύτταρα (Zhao *et al*, 1999). Ο GMRα υποδοχέας έχει βρεθεί να εκφράζεται και από τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης (Sjoblom *et al*, 2002). Η προσθήκη του GM-

CSF σε καλλιεργητικά υγρά βλαστοκύστεων φαίνεται να προωθεί την ανάπτυξη των βλαστοκύστεων (Sjoblom *et al*, 1999), ενώ η προσθήκη αντισωμάτων εξουδετέρωσης του υποδοχέα GMRA στα καλλιεργητικά υγρά ανατρέπει αυτό το αποτέλεσμα (Sjoblom *et al*, 2002).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ- α (TNF- α)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου TNF- α είναι μία κυτταροκίνη που εκφράζεται από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης και τα κύτταρα του φθαρτού του ενδομητρίου και παράγεται από διάφορων τύπων κύτταρα, όπως κύτταρα του ενδομητρίου και μακροφάγα κύτταρα του φθαρτού. Η δράση του είναι πολλαπλή συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης διαφόρων ουσιών, της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Le *et al*, 1987). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι ο TNF- α μεταβάλλει τη λειτουργία πρόσφυσης της τροφοβλάστης αναστέλλοντας έτσι την κινητικότητα της (Makrigiannakis and Minas, 2007). Η έκφραση mRNA του TNF- α έχει ανιχνευθεί στο ενδομήτριο γυναικών, στο φθαρτό και στην τροφοβλάστη (Toder *et al*, 2003), ενώ έχει εντοπιστεί επίσης και στα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης των λαχνών (Ben-Yair *et al*, 1997). Παρόλα αυτά, μελέτες σε ποντίκια υπό την απουσία του TNF- α δεν έδειξαν ιδιαίτερα προβλήματα στην εμφύτευση (Dey *et al*, 2004).

B) ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η έκφραση αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους που δρουν ως φλεγμονώδεις παράγοντες κατά την εμφύτευση είναι συγκεκριμένη χρονικά και τοπικά κατά την προεμφυτευτική περίοδο στο ενδομήτριο, προτείνοντας αυτούς τους παράγοντες ως καθοριστικούς για το “διάλογο” ενδομητρίου-βλαστοκύστης και τη διαδικασία εμφύτευσης (Tazuke *et al*, 1996; Van Sinderen *et al*, 2012).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ-B (transforming growth factor- β – TGF- β)

Ο TGF- β είναι μία κυτταροκίνη με σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανοσία μέσω της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, μετανάστευσης, αγγειογένεσης και μιας σειράς άλλων κυτταρικών λειτουργιών (Elliott and Blobe, 2005). Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων TGF- β περιέχει τρεις ισομορφές: τη $\beta 1$, τη $\beta 2$ και τη $\beta 3$ και δύο υποδοχείς, τους TGF β -RI και TGF β -RII. Τα μέλη της οικογενείας TGF- β θεωρούνται ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της αποδόμησης

πρωτεϊνών της ΕΘΟ και έχουν προταθεί ως κύριοι παράγοντες για τη διαφοροποίηση των ενδομητριακών κυττάρων κατά την εμφύτευση και κύηση (Jones *et al*, 2006b). Όλες οι ισομορφές έχουν ανιχνευθεί στο ενδομήτριο, με την TGFβ2 να εντοπίζεται κυρίως στα στρωματικά κύτταρα, ενώ οι TGFβ1 και TGFβ3 παρουσιάζονται και στα επιθηλιακά και στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου (Gold *et al*, 1994; Godkin and Dore, 1998; Bischof and Campana, 2000).

Μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι το mRNA του TGFβ1, του TGFβ-RI και του TGFβ-RII, καθώς και τα επίπεδα πρωτεΐνης τους είναι σταθερά σε όλο τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, ενώ ο TGFβ1 και ο υποδοχέας TGFβ-RI επιδεικνύουν μία μικρή αύξηση κατά την έμμηνο ρύση. Το mRNA του TGFβ2 και η έκφραση της πρωτεΐνης του είναι αυξημένα κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, σε αντίθεση με τον TGFβ3, του οποίου η έκφραση είναι αυξημένη κατά την παραγωγική φάση (Gaide *et al*, 2008). Επιπλέον, η παρουσία του TGFβ1 σε υγρά της μήτρας υποδεικνύει την έκκρισή του από τα αδένια του ενδομητρίου (Polli *et al*, 1996). Κατά συνέπεια, το ενδομήτριο προετοιμάζεται για την εμφύτευση κατά την παραγωγική και εκκριτική φάση μέσω παραγωγής και έκκρισης TGFβ ισομορφών από τα επιθηλιακά κύτταρα (Singh *et al*, 2011).

Η άποψη ότι τα μέλη του TGFβ παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμφύτευση έρχεται και από το γεγονός ότι διεγείρουν τη φимπρονεκτίνη και την παραγωγή άλλων αυξητικών παραγόντων στο ενδοθήλιο των αγγείων (Feinberg *et al*, 1994; Chung *et al*, 2000), ενώ παράλληλα προωθούν την προσκόλληση των κυττάρων της τροφοβλάστης με μόρια της ΕΘΟ (Irving and Lala, 1995). Πιο συγκεκριμένα, ο TGFβ1 αυξάνει τα επίπεδα φимпρονεκτίνης της ΕΘΟ, με αποτέλεσμα να εμπλέκεται στην προσκόλληση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο κατά την εμφύτευση (Tamada *et al*, 1990; Feinberg *et al*, 1994). Άλλα μέλη της TGF-β οικογένειας, οι ακτιβίνες, εκφράζονται από τα κύτταρα του φθαρτού και εμπλέκονται στη διαδικασία φθαρτοποίησης (Jones *et al*, 2000; 2002), ενώ διακατέχουν σημαντικό ρόλο και στη διείσδυση της τροφοβλάστης προωθώντας την υπερέκφραση μεταλλοπρωτεϊνών (Jones *et al*, 2006a). Η απορρύθμιση της ακτιβίνης Α έχει βρεθεί επίσης να επηρεάζει την ικανότητα προσκόλλησης της βλαστοκύστης οδηγώντας σε αποτυχία εμφύτευσης (Stoikos *et al*, 2006).

Μελέτες έχουν εντοπίσει την έκφραση και των τριών ισομορφών του TGFβ από τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα (Adjaye *et al*, 2005; Adhajanova and Giudice, 2011). Η παραγωγή και έκκριση του TGFβ από το επιθήλιο του ενδομητρίου και τα κύτταρα της βλαστοκύστης, οδηγούν στην πρόταση ότι τα μέλη του TGFβ προετοιμάζουν το ενδομήτριο για την

εμφύτευση ή επιδρούν πάνω στο γονιμοποιημένο ωάριο, διευκολύνοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίησή του δίνοντάς του την ικανότητα να εμφυτευθεί (van Sinderen *et al*, 2012).

ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΟΡΦΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (Insulin-like growth factor-IGF)

Οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες (IGFs) έχουν αναγνωριστεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, στον πολλαπλασιασμό και μεσολαβούν στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης (Yu and Rohan, 2000). Τα μέλη της οικογενείας αυτής των αυξητικών παραγόντων δρουν ως βασικοί παράγοντες στην επικοινωνία της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο κατά την εμφύτευση, καθώς ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση (Lighten *et al*, 1998). Οι αυξητικοί παράγοντες IGF1 και IGF2 έχουν εντοπιστεί στο ενδομήτριο (Lighten *et al*, 1998). Η έκφραση του IGF2 ρυθμίζεται από την προγεστερόνη κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, ενώ τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκφραση της IGF1 κατά την παραγωγική φάση του κύκλου (van Mourik *et al*, 2009).

Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι η IGF2 εκφράζεται και από τη βλαστοκύστη και σχετίζεται με την επιθετική διείσδυση στο ενδομήτριο (Fowler *et al*, 2000; Hess *et al*, 2007). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη του IGF1 σε καλλιεργητικά μέσα κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση, αυξάνει τον αριθμό των γονιμοποιημένων ωαρίων που αναπτύσσονται σε βλαστοκύστες, γεγονός που οδηγεί στην πρόταση ότι ο IGF1 παράγοντας παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια αυλάκωσης του προεμβρύου (Lighten *et al*, 1998; Singh *et al*, 2011). Ο ίδιος παράγοντας επάγει επίσης τη φωσφορυλίωση του Akt, βασική διαδικασία για την αποικοδόμηση των μορίων της ΕΘΟ και της διείσδυσης της τροφοβλάστης (Toyofuku *et al*, 2006). Οι αυξητικοί παράγοντες IGF1 και IGF2 δρουν μέσω του υποδοχέα τύπου 1 (IGF1R), ο οποίος εντοπίζεται στο ενδομήτριο σε όλο τον εμμηνορρυσιακό κύκλο (Sharkey, 1998), καθώς επίσης και στη βλαστοκύστη (Lighten *et al*, 1998; Sharkey, 1998). Σε αντίθεση με τον υποδοχέα τύπου 1, ο υποδοχέας τύπου 2 (IGF2R) ενώνεται αποκλειστικά με τον παράγοντα IGF2 και έχει βρεθεί να εκφράζεται από τη βλαστοκύστη (Sharkey *et al*, 1995).

Οι αυξητικοί παράγοντες IGF1 και IGF2 έχουν εντοπιστεί και σε ενώσεις με πρωτεΐνες (IGFBPs) και ως συμπλέγματα πια πρωτεϊνών ελέγχουν τη διαδικασία της εμφύτευσης παρατείνοντας τη επίδραση του IGF1 και IGF2 και προετοιμάζοντας έτσι κατάλληλα το ενδομήτριο (Firth and Baxter, 2002; van Sinderen *et al*, 2012). Το σύμπλεγμα IGFBP1 είναι σημαντικός παράγοντας στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και θεωρείται ως δείκτης αυτής της διεργασίας *in vitro* (Garrido-Gomez *et al*, 2011). Τα συμπλέγματα IGFBP2-7 εκφράζονται επίσης από το ενδομήτριο κατά τη διαδικασία της φθαρτοποίησης (Han *et al*,

1996), ενώ το σύμπλεγμα IGFBP-6 ρυθμίζει τη διείσδυση της τροφοβλάστης, διασφαλίζοντας έτσι μία βιώσιμη κύηση μέσω της αντισταθμιστικής δράσης που έχει στους παράγοντες IGFs (Irwin *et al*, 2001).

Γ) ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ

Οι χημειοκίνες είναι μία οικογένεια κυτταροκινών χαμηλού μοριακού βάρους (8-10 kDa), με παρόμοια χημική δομή. Οι χημειοκίνες έλκουν διαφόρων ειδών κύτταρα που παίρνουν μέρος στην κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση και ελέγχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως λεμφοκύτταρα, παίζοντας με αυτό τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μητέρας-προεμβρύου μέσω των διαφόρων μορίων προσκόλλησης και άλλων παραγόντων (Dominguez *et al*, 2003a; van Sinderen *et al*, 2012). Οι χημειοκίνες χωρίζονται σε δύο υπό-ομάδες: τις α-χημειοκίνες (CXC) και τις β-χημειοκίνες (CC), των οποίων η διαφορά στη δομή τους είναι η έλλειψη ενός αμινοξέος στις β-χημειοκίνες. Οι υποδοχείς τους ανήκουν στην οικογένεια των G- συζευγμένων πρωτεϊνών και παίρνουν το όνομά τους ανάλογα από τα μόρια προσδετών τους (Dominguez *et al*, 2003a).

Οι χημειοκίνες έχουν αναγνωριστεί στο ανθρώπινο αναπαραγωγικό σύστημα να σχετίζονται με την ωοθυλακιορρηξία, την έμμηνο ρύση, την εμφύτευση, την ενδομητρίωση και τον τοκετό (Dominguez *et al*, 2003b). Πρόσφατα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι χημειοκίνες προετοιμάζουν το ενδομήτριο να υποδεχθεί τη βλαστοκύστη (van Mourik *et al*, 2009). Μία σειρά από CXC και CC χημειοκίνες έχουν εντοπιστεί στο ενδομήτριο στο χρονικό περιθώριο του “παραθύρου εμφύτευσης” (Caballero-Campo *et al*, 2002; Dominguez *et al*, 2003b; Jones *et al*, 2004; Hannan *et al*, 2006). Επίσης οι υποδοχείς CCR2 και CCR5 εκφράζονται και από τη βλαστοκύστη (Dominguez *et al*, 2003b). Οι χημειοκίνες που σχετίζονται με τη βλαστοκύστη πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην εναπόθεση-πρόσφυση της βλαστοκύστης και στην πόλωση των υποδοχέων του ενδομητρίου, μεσολαβώντας έτσι στην προσκόλληση της βλαστοκύστης και στην αλληλεπίδραση μητέρας-προεμβρύου (Dominguez *et al*, 2003a).

Δ) ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Wnt (Wnt family proteins)

Η οικογένεια πρωτεϊνών Wnt αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη διακυτταρική επικοινωνία και τη φλεγμονή (Nusse and Varmus, 1992; Wodarz and Nusse, 1998; Pereira *et al*, 2009). Τα μεταγωγικά μονοπάτια που δημιουργούν οι Wnt πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στη διαδικασία της εμβρυογένεσης (Logan and Nusse, 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν μέσω των υποδοχέων τους (FZD), οι οποίοι εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και η σύνδεσή τους

οδηγεί στη συσσώρευση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης και την είσοδό της στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζει τη γονιδιακή μεταγραφή (van Noort *et al*, 2002).

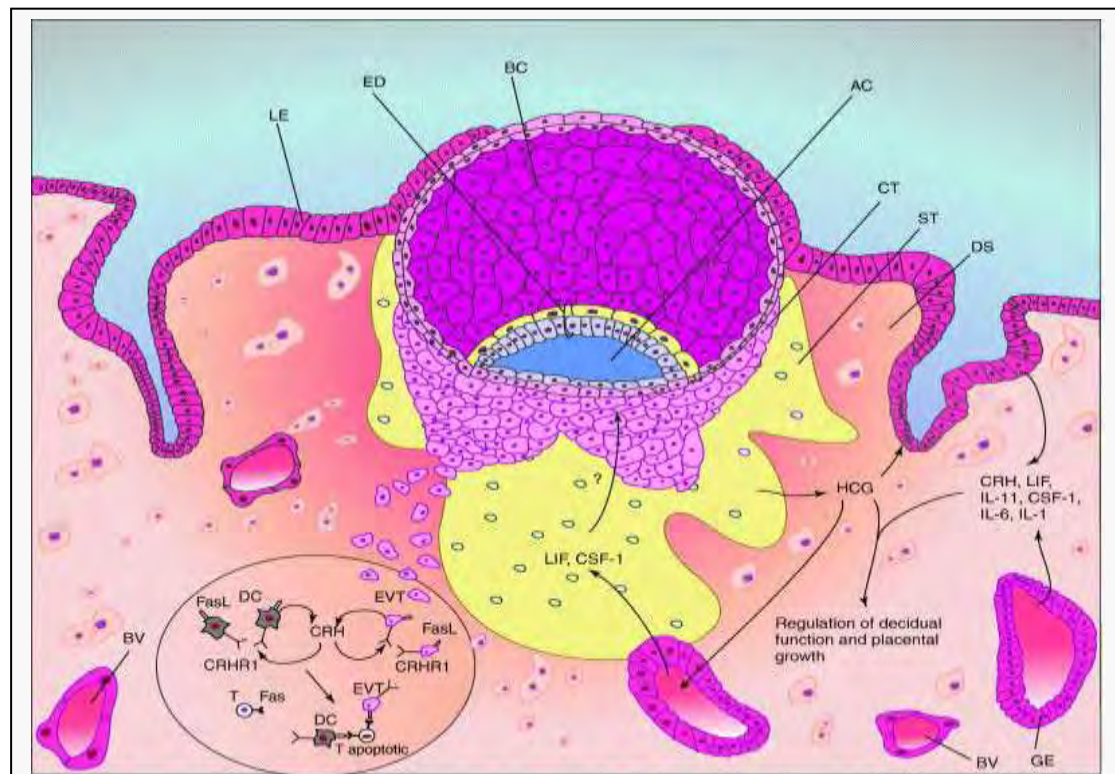
Μέχρι σήμερα, οι πρωτεΐνες Wnt-2, -3, -4, -5a, -7a, -8b και οι υποδοχείς FZD-1, -4, -6, -10 έχουν εντοπιστεί στο ενδομήτριο με σταθερή την έκφρασή τους σε όλο το μήκος του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Bui *et al*, 1997; Tulac *et al*, 2003). Επιπλέον, αναστολές κάποιων Wnt πρωτεϊνών έχει βρεθεί να υπό-εκφράζονται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, γεγονός που έχει οδηγήσει στη σκέψη ότι το μεταγωγικό μονοπάτι των Wnt πρωτεϊνών συμμετέχει με κάποιο τρόπο στη δημιουργία του “παραθύρου εμφύτευσης” (Kao *et al*, 2002; Borthwick *et al*, 2003). Οι πρωτεΐνες της οικογενείας αυτής, μαζί με τους υποδοχείς τους εκφράζονται επίσης και από τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα της βλαστοκύστης, με αποτέλεσμα το σύστημα αυτό μεταγωγής σήματος να θεωρείται σημαντικό και για τα πρώτα στάδια εμφύτευσης του προεμβρύου στο ενδομήτριο (Adjaye *et al*, 2005).

Ε) ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (corticotrophin releasing hormone, CRH)

Η CRH παράγεται τοπικά από τα αδένια του ενδομητρίου, τα στρωματικά κύτταρα του φθαρτού και από την τροφοβλάστη, τη συγκυτιοτροφοβλάστη και τον πλακουντικό ιστό (Kalantaridou *et al*, 2003). Τα αδένια του ενδομητρίου εκφράζουν CRH σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ειδικά κατά την εκκριτική φάση του κύκλου (Makrigiannakis *et al*, 1995). Η παραγωγή της CRH είναι ορμονοεξαρτώμενη, με την προγεστερόνη να επάγει την έκφρασή της (Makrigiannakis *et al*, 1999) και τα οιστρογόνα και τη κορτιζόλη να αναστέλλουν την παραγωγή της (Makrigiannakis *et al*, 1996). Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η CRH επάγει τη φθαρτοποίηση του στρώματος του ενδομητρίου μέσω της δράσης της προγεστερόνης, ενώ παράλληλα αναστέλλει τη δράση της προσταγλανδίνης PGE₂, επάγει την έκφραση του αναστολέα ιντερλευκίνης IL-1 και διεγείρει την έκφραση της ιντερλευκίνης IL-6, παραγόντων που δρουν ως ρυθμιστές της διαδικασίας της φθαρτοποίησης (Makrigiannakis *et al*, 1999; Zoumakis *et al*, 2000). Κατά συνέπεια, η CRH μέσω αυτών των παραγόντων-ρυθμιστών της φθαρτοποίησης, συμμετέχει μέσω παρακρινούς δράσης στο δίκτυο ελέγχου της διαδικασίας αυτής (Makrigiannakis and Minas, 2007).

Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης έχει προταθεί να συμμετέχει στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος φλεγμονής στη θέση εμφύτευσης, μετατρέποντας έτσι το ενδομήτριο σε δεκτικό για την εναπόθεση και προσκόλληση της βλαστοκύστης. Η εμβρυϊκή τροφοβλάστη και τα κύτταρα του φθαρτού παράγουν CRH, η οποία με τη σειρά της επάγει τη σύνθεση της

FasL από τα κύτταρα αυτά, μία προ-αποπτωτική κυτταροκίνη που προκαλεί την απόπτωση μέσω των υποδοχέων της Fas. Η αλληλεπίδραση Fas-FasL παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοανοχής, διότι οδηγεί στην απόπτωση των μητρικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα Fas. Η δράση της CRH στην εξουδετέρωση των T λεμφοκυττάρων, την καθιστά πολύ σημαντική στη διαδικασία μη-απόρριψης του αλλογενούς εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας και για το λόγο αυτό θεωρείται ως ένας από τους πιο κριτικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της εμφύτευσης. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν επίσης ότι η αναστολή της δράσης της CRH μέσω της δράσης ενός ανταγωνιστή της, έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των θέσεων εμφύτευσης (Makrigiannakis *et al*, 2001; Kalantaridou *et al*, 2007; Makrigiannakis and Minas, 2007; Makrigiannakis *et al*, 2008).



Εικόνα 16: Ορμονικοί παράγοντες και κυτταροκίνες που δρουν τοπικά στο σημείο αλληλεπίδρασης της μητέρας με τη βλαστοκύστη κατά τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης. Η CRH που παράγεται τοπικά από την εξωλαχνική τροφοβλάστη (EVT) και τα στρωματικά κύτταρα, δρα μέσω του υποδοχέα CRHR1 και διεγείρει τη σύνθεση του FasL, δίνοντας τη δυνατότητα στα κύτταρα αυτά να προκαλέσουν απόπτωση των ενεργοποιημένων μητρικών T κυττάρων. Η CRH, ο LIF, η IL11, ο CSF-1, η IL6 και η IL1 παράγονται από το επιθήλιο του ενδομητρίου και συμμετέχουν στη διαδικασία φθαρτοποίησης και την ανάπτυξη του πλακούντα. Η hCG που παράγεται από τη συγκυτιοτροφοβλάστη δρα στο στρώμα και επάγει τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου (AC: αμνιακή κοιλότητα, BC: βλαστοκύστη, BV: αιμοφόρα αγγεία, CT: κυτταροτροφοβλάστης, DC: κύτταρα φθαρού, DS: φθαρός, ED: εμβρυϊκός δίσκος, GE: αδενικό επιθήλιο, ST: συγκυτιοτροφοβλάστης, T: T λεμφοκύτταρο) (Makrigiannakis *et al*, 2006).

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η CRH μέσω των υποδοχέων της (CRHR1) προκαλεί την αναστολή έκφρασης του μορίου CEACAM-1 που εκφράζεται από τη διεισδυτική τροφοβλάστη (Bamberger *et al*, 2006a). Με αυτό τον τρόπο η CRH ρυθμίζει τη διαδικασία εμφύτευσης με το να εμποδίζει τη μη ελεγχόμενη διείσδυση της τροφοβλάστης και συμμετέχει στη διατήρηση της κύησης στα πρώτα στάδια (Bamberger *et al*, 2006a; Vrekoussis *et al*, 2010).

Η ουροκορτίνη, ένα ακόμα νευροπεπτίδιο της ίδιας οικογένειας με την CRH έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται από την τροφοβλάστη του πρώτου τριμήνου (Bamberger *et al*, 2006b). Παρότι ο ρόλος της ουροκορτίνης στη τροφοβλάστη δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, το γεγονός ότι συνδέεται και με τους δύο τύπους υποδοχέων της CRH οδηγεί στη σκέψη ότι πιθανόν να αποτελεί έναν επίσης ρυθμιστικό παράγοντα της διαδικασίας εμφύτευσης (Makrigiannakis and Minas, 2007). Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της CRH κατά την εμφύτευση παρουσιάζεται στην εικόνα 16.

ΣΤ) ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ (PGs)

Η αντίδραση της μήτρας κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο δείχνει μεγάλη ομοιότητα με το φαινόμενο της φλεγμονής, μιας και η προσκόλληση και διείσδυση του προεμβρύου στο ενδομήτριο απαιτεί σύνδεση με το μητρικό αγγειακό σύστημα (McMaster *et al*, 1993). Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, το ενδομήτριο παρουσιάζει αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές της τοπικής φλεγμονής, όπως οίδημα και αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων (Chakraborty *et al*, 1996). Κατά συνέπεια, οι προσταγλανδίνες (PGs), ως αγγειοδραστικοί παράγοντες, έχουν προταθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακιωρρηξία, γονιμοποίηση και σε διάφορες διαδικασίες της προχωρημένης εγκυμοσύνης (Espey, 1994), ενώ έχει παράλληλα αποδειχθεί να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη της εμφύτευσης (Song *et al*, 2002; Ye *et al*, 2005).

Οι PGs αποτελούνται από 4 μέλη: PGD₂, PGE₂, PGF₂, και την προστακυκλίνη PGI₂, τα οποία παράγονται από φωσφολιπίδια της μεμβράνης μέσω της δράσης δύο ενζύμων, της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A₂ (cPLA₂) και της κυκλοοξυγενάσης (COX). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 3 ισομορφές του ενζύμου COX, η COX-1, η COX-2 και η COX-3 (Smith and Dewitt, 1996; Vane *et al*, 1998; Chandrasekharan *et al*, 2002).

Μελέτες σε θηλυκά ποντίκια που δεν εκφράζουν τα ένζυμα cPLA₂ ή την COX-2, έχουν οδηγήσει στην παρατήρηση ότι οι προσταγλανδίνες έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης. Η έλλειψη αυτών των ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σύνθεσης

των PGs, γεγονός που καταλήγει σε διάφορα σφάλματα κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης (Song *et al*, 2002). Η εξωγενής χορήγηση προσταγλανδινών σε τέτοιες περιπτώσεις έλλειψής τους, μπορεί να αποκαταστήσει τη σωστή διεκπεραίωση της διαδικασίας της εμφύτευσης (Song *et al*, 2002; Ye *et al*, 2005).

Όσον αφορά στο ανθρώπινο ενδομήτριο, η έκφραση των PGs και των ενζύμων που δρουν ως διαμεσολαβητές για τη σύνθεσή τους, εντοπίζονται σε όλο τον εμμηνορρυσιακό κύκλο της γυναίκας. Η σύνθεση της PGE₂ έχει αναφερθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο σε όλα τα στάδια του κύκλου και παρουσιάζει μειωμένη έκφραση κατά την εκκριτική φάση, ενώ έχει προταθεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών αδενικών κυττάρων του ενδομητρίου κατά την παραγωγική φάση (Milne *et al*, 2001). Οι PGF₂ και η PGI₂ υποπτεύεται ότι συμμετέχουν στην αγγειακή λειτουργία και έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου (Milne and Jabbour, 2003) και στη διαδικασία της έμμηνης ρήσης (Battersby *et al*, 2004). Επίσης έχει βρεθεί ότι η έκφραση του ενζύμου COX είναι μέγιστη κατά την παραγωγική φάση του κύκλου και έχει εντοπιστεί κυρίως στα επιθηλιακά και περιαγγειακά κύτταρα (Rees *et al*, 1982; Rees *et al*, 1984; Marions and Danielsson, 1999).

Παρόλα αυτά δεν υπάρχει απόδειξη ότι η απουσία της έκφρασης προσταγλανδινών από το ανθρώπινο ενδομήτριο εμποδίζει την ανθρώπινη γονιμότητα. Όμως, με βάση την παρατήρηση ότι ποντίκια που δεν εκφράζουν PGs είναι μεν γόνιμα, αλλά παρουσιάζουν διακυμάνσεις, βραχυχρόνιες παρόλα αυτά, στη ικανότητα κύησης (καθυστερημένη εμφύτευση, εκτός παραθύρου εμφύτευσης), έχει προταθεί ότι κάτι ανάλογο συμβαίνει και με τους ανθρώπους (Wilcox *et al*, 1999). Μετά τη σύνθεσή τους, οι προσταγλανδίνες μεταφέρονται από τα κύτταρα μέσω ενός PG μεταφορέα (PGT) (Schuster, 1998; Schuster, 2002). Η έκφραση του μεταφορέα PGT έχει εντοπιστεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια όλου του εμμηνορρυσιακού κύκλου σε επιθηλιακά, στρωματικά και αδενικά κύτταρα. Η ύπαρξη του PGT μεταφορέα στα επιθηλιακά κύτταρα σε όλο τον κύκλο υποδηλώνει το ρόλο του στη ρύθμιση της δράσης των προσταγλανδινών στο ανθρώπινο ενδομήτριο (Kang *et al*, 2005). Παρόλα αυτά ο ρόλος του στην εμφύτευση δεν έχει ακόμα καθοριστεί (Achache and Revel, 2006).

Μόλις οι PGs απελευθερωθούν από τα κύτταρα, ενώνονται με συγκεκριμένους υποδοχείς κυτταρικών μεμβρανών (Kang *et al*, 2005). Η εντατική έρευνα της δράσης των υποδοχέων τους μπορεί να δώσει απαντήσεις σε σχέση με το ρόλο των προσταγλανδινών στην ανθρώπινη εμφύτευση, μιας και οι υποδοχείς τους παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο και

ρυθμιζόμενο μοτίβο έκφρασης, εφόσον εκφράζονται κυρίως πριν την εκκριτική φάση του κύκλου, ανταποκρινόμενοι στο παράθυρο εμφύτευσης (Achache and Revel, 2006). Η παραγωγή των PGs έχει αναφερθεί να ρυθμίζεται από την οξυτοκίνη, η οποία είναι ορμονοεξαρτώμενη από τη προγεστερόνη, επάγοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή της PGE₂ *in vitro* (Kotani *et al*, 2005). Μελέτες σε ανθρώπινα βλαστοκύτταρα έχουν δείξει ότι η έκφραση του ενζύμου COX-2 ρυθμίζεται από την κυτταροκίνη IL1β (Wu *et al*, 2005), η οποία έχει καθοριστικό ρόλο στην υποδεκτικότητα του ενδομήτριου και προφανώς μέσω του COX-2 διεγείρει την έκφραση των προσταγλανδινών (Achache and Revel, 2006). Σε ότι έχει να κάνει με την ανθρώπινη εμφύτευση και το ρόλο των PGs, περαιτέρω έρευνες χρειάζονται για να αναδείξουν τη δράση τους. Με δεδομένο όμως ότι στα ποντίκια, οι PGs εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης και πιο συγκεκριμένα στη διαφύλαξη του χρονοδιαγράμματος του παραθύρου εμφύτευσης, πιστεύεται ότι με αντίστοιχο τρόπο συμμετέχουν και στη διαδικασία εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης (Achache and Revel, 2006).

1.4.5 Γονίδια εμπλεκόμενα στη διαδικασία της εμφύτευσης

Η βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων πειραμάτων μικροσυστοιχιών για την ανεύρεση δεικτών εμφύτευσης, έχει αποκαλύψει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που εκφράζονται στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του “παραθύρου εμφύτευσης” (Poronici *et al*, 2000; Carson *et al*, 2002; Dominguez *et al*, 2003c; Giudice, 2004). Οι μελέτες αυτές έχουν δώσει σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τη συμμετοχή κάποιων γονιδίων στην εμφύτευση, χωρίς όμως μέχρι τώρα να είναι δυνατός ο καθορισμός της ακριβούς τους λειτουργίας στο ανθρώπινο ενδομήτριο, ενώ περιορισμένες πληροφορίες ως προς τη λειτουργία τους, έχουμε πάνω σε πειραματικά μοντέλα ποντικών (Stewart *et al*, 1992; Satokata *et al*, 1995; Riesewijk *et al*, 2003).

Μελέτες από τους ερευνητές Kao, Carson, Borthwick, Riesewijk, Mirkin και τις ομάδες τους έχουν δείξει ότι γονίδια πρωτεϊνών κυτταρικής μεμβράνης, εξωκυτταρικών συστατικών δεικτών, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, καθώς επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν μόρια της διακυτταρικής σηματοδότησης και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο αριθμό ενεργοποιημένων γονιδίων κατά την εκκριτική φάση του κύκλου. Γονίδια του ανοσολογικού συστήματος έχουν εντοπιστεί να συμμετέχουν στη διαδικασία της εμφύτευσης, γεγονός που οδηγεί στην πρόταση ότι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παίζουν σημαντικό ρόλο στο ενδομήτριο, πριν και κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Γονίδια που υπό-εκφράζονται κατά την εμφύτευση έχουν αναφερθεί να είναι αυτά που κωδικοποιούν δεσμευτικές πρωτεΐνες του

DNA, μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα που τροποποιούν το DNA (Carson *et al*, 2002; Kao *et al*, 2002; Borthwick *et al*, 2003; Riesewijk *et al*, 2003; Mirkin *et al*, 2005; Hess *et al*, 2007). Περαιτέρω έρευνες στο τομέα αυτό αναμένουν να αναδείξουν το μηχανισμό και τη δράση τους στη διαδικασία της ανθρώπινης εμφύτευσης.

1.5 Μη παρεμβατικοί μέθοδοι αξιολόγησης των γονιμοποιημένων ωαρίων

Η επιλογή του καταλληλότερου προεμβρύου για εμβρυομεταφορά στην εξωσωματική γονιμοποίηση γίνεται μέσω μορφολογικών αξιολογήσεων των γονιμοποιημένων ωαρίων. Τα τελευταία χρόνια όμως υπάρχει μία στροφή της έρευνας στην αναπαραγωγική ιατρική ως προς την ανεύρεση μίας άλλης μη-επεμβατικής μεθόδου αξιολόγησης, που σε συνδυασμό με τα μορφολογικά κριτήρια θα εξασφαλίσει ίσως υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης (Dominguez *et al*, 2008). Μία προσέγγιση τέτοιου τύπου έχει αναφερθεί να συνδυάζει τη μεταβολική δράση της βλαστοκύστης με τη βιωσιμότητά της, σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια (Lane and Gardner, 1996). Αργότερα, αναφέρθηκε ότι η κατανάλωση γλυκόζης από το προέμβryo την 4^η ημέρα ανάπτυξής του, είναι διπλάσια στα γονιμοποιημένα ωάρια που αναπτύσσονται τελικά σε βλαστοκύστες (Gardner *et al*, 2001b). Μία ακόμα μελέτη που ασχολήθηκε με το μεταβολισμό των αμινοξέων, αναφέρει ότι η διαφορά μεταξύ προεμβρύων στη χρησιμοποίηση των αμινοξέων Asn, Gly και Leu από το καλλιεργητικό υλικού μέσο την 2^η ημέρα ανάπτυξής τους, συνδέεται με το ποσοστό κλινικών και βιώσιμων κυήσεων (Brison *et al*, 2004). Άλλοι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην απελευθέρωση διαλυτού αντιγόνου ανθρώπινου λευκοκυττάρου G (HLA-G) στο καλλιεργητικό μέσο, ως ένα πιθανό δείκτη επιλογής και αξιολόγησης της ποιότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων (Noci *et al* 2005; Sher *et al*, 2005).

Οι νέες προσεγγίσεις ως προς την αξιολόγηση των προεμβρύων έχουν να κάνουν με την ανάλυση του πρωτεώματος τους (πρωτεωμική), που σημαίνει την ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγει το προέμβryo σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Σε αντίθεση με το ανθρώπινο γονιδίωμα το οποίο είναι σταθερό και μοναδικό σε όλο το ανθρώπινο σώμα, το εμβρυϊκό πρωτέωμα, το οποίο εκτιμάται να ξεπερνά το ένα εκατομμύριο πρωτεΐνες, χαρακτηρίζεται από δυναμική και ποικιλότητα. Ένα γονιδίωμα παράγει πολλά πρωτεώματα, ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται το κάθε κύτταρο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (Dominguez *et al*, 2007; Katz-Jaffe *et al*, 2009).

Η κλασσική πρωτεωμική ανάλυση περιλαμβάνει τη χρήση 2-διαστάσεων ηλεκτροφόρησης, η οποία όμως έχει πολύ περιορισμένη επιτυχία στο τομέα της εμβρυολογίας, εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας της ως μεθόδου (Latham *et al*, 1992; Shi *et al*, 1994). Χρησιμοποιήθηκε όμως αρκετά η μέθοδος αποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Navarrete Santos *et al*, 2004; Noci *et al*, 2005; Wang *et al*, 2005). Οι μέθοδοι αυτοί επίσης δεν αποδείχθηκαν αρκετά λειτουργικοί στο χώρο της εμβρυολογίας. Τα τελευταία χρόνια, οι εξελίξεις στον τομέα της σπεκτρομετρίας

μάζας σε συνδυασμό με την χρήση πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων, έχει δώσει νέες δυνατότητες στον τομέα της πρωτεωμικής, διευκρινίζοντας βασικές βιολογικές διεργασίες (Hale *et al*, 2003; Katz-Jaffe *et al*, 2005; Shankar *et al*, 2005; Katz-Jaffe *et al*, 2006). Η τεχνική σπεκτρομετρίας μάζας SELDI-TOF έχει μεγάλη ευαισθησία σαν μέθοδος ανάλυσης πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου και αυτών με πολύ μικρό μοριακό βάρος (Merchant and Weinberger, 2000). Η μέθοδος αυτή έχει οδηγήσει στη δημιουργία καινούργιων πρωτοκόλλων πρωτεωμικής ανάλυσης προεμβρύων ποντικών (Katz-Jaffe *et al*, 2005) και ανθρώπινων βλαστοκύστεων (Katz-Jaffe *et al*, 2006).

Έχει προταθεί ότι τα βιώσιμα γονιμοποιημένα ωάρια έχουν ένα πολύ συγκεκριμένο και μοναδικό πρωτέωμα (proteome) και έχει βρεθεί ότι κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες εκκρίνονται στον περιβάλλοντα χώρο τους, που στην *in vitro* καλλιέργεια είναι το καλλιεργητικό υγρό (Katz-Jaffe *et al*, 2009). Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται μέσα στο προέμβρυο και εκκρίνονται (secretome) στον περιβάλλοντα χώρο αποτελεί μεγάλο ενδιαφέρον στην αναπαραγωγική ιατρική. Ο προσδιορισμός όλων αυτών των πρωτεϊνών θα διευρύνει πιθανότατα τη γνώση μας σε ότι έχει να κάνει με διεργασίες που γίνονται μέσα στο γονιμοποιημένο ωάριο, αλλά και με αυτές που λαμβάνουν μέρος κατά την εμφύτευση, ενώ παράλληλα μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση αυτών των προεμβρύων με τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφύτευσης (Bielanska *et al*, 2005; Gardner *et al*, 2005; Hathout, 2007 ; Katz-Jaffe *et al*, 2009). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει πληροφορία που να συνδέει τις πρωτεΐνες που εκκρίνονται/μεταβολίζονται από τη βλαστοκύστη με την εμφυτευτική της ικανότητα (implantome) (Dominguez *et al*, 2008).

Παρόλα αυτά, πρωτεωμικές μελέτες έχουν συσχετίσει διάφορους εκκρινόμενους παράγοντες, όπως τον raf, τη λεπτίνη, την πρωτεΐνη acrogranin, το αντιγόνο s-HLA-G και ένα διαλυτό μόριο που ρυθμίζει την έκφραση του HOXA10, με την βιωσιμότητα και ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων, καθώς και με τα ποσοστά κύησης σε κάποιες περιπτώσεις (Diaz-Cueto *et al*, 2000; Gonzalez *et al*, 2000; Sakkas *et al*, 2003; Cervero *et al*, 2005; Noci *et al*, 2005; O'Neill, 2005; Sher *et al*, 2005; Sargent *et al*, 2007). Όλες αυτές οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί η κάθε μία σε μία μεταβλητή. Δεδομένης όμως της πολυπλοκότητας της διαδικασίας της ανθρώπινης εμβρυϊκής ανάπτυξης και εμφύτευσης, το πιθανότερο είναι ότι χρειάζεται η ανάλυση πολλών παραγόντων για να είναι δυνατή η πρόβλεψη της αναπτυξιακής ή εμφυτευτικής ικανότητας των προεμβρύων (Katz-Jaffe *et al*, 2009).

Περαιτέρω έρευνες και μελέτες χρειάζονται για να δώσουν τη δυνατότητα εύρεσης μίας μεθόδου μη παρεμβατικής, ως προς την επιλογή του καταλληλότερου εμβρύου για μεταφορά,

γεγονός το οποίο σε συνδυασμό με τη μορφολογία των γονιμοποιημένων ωαρίων θα οδηγήσει σε επανάσταση στο χώρο της αναπαραγωγικής ιατρικής. Μία τέτοιου είδους έρευνα θα περιγραφεί σε παρακάτω κεφάλαια με σκοπό τον συσχετισμό κάποιων φλεγμονωδών παραγόντων που εκκρίνονται από βλαστοκύστες στο περιβάλλον καλλιεργητικό υγρό, με την εμφυτευτική ικανότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων.

1.6 Σκοπός της μελέτης

Στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, λόγω της φύσης των διαφόρων αιτιών υπογονιμότητας και της ψυχολογικής και σωματικής καταπόνησης που υφίστανται τα υπογόνιμα ζευγάρια, η επίτευξη υψηλών ποσοστών εμφύτευσης είναι σημαντική και καθοριστική για κάθε κύκλο προσπάθειας των ζευγαριών αυτών. Έρευνες παγκοσμίως έχουν εστιάσει τα τελευταία χρόνια στην ανεύρεση ενός τρόπου επιλογής του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για εμβρυομεταφορά, ο οποίος δεν θα είναι χρονοβόρος, αλλά παράλληλα θα είναι αποτελεσματικός και όσο το δυνατόν μη παρεμβατικός ως προς τα γονιμοποιημένα ωάρια.

Η παρατήρηση ότι η αντίδραση της μήτρας κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο δείχνει μεγάλη ομοιότητα με το φαινόμενο της φλεγμονής, έφερε στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης επανάσταση και μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο να συνδέσουν αυτή την παρατήρηση με την επίτευξη της κύησης. Ανοσολογικοί παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες έχουν αναδειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στο “διάλογο” μεταξύ βλαστοκύστης και μητέρας κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης και λειτουργούν ρυθμιστικά ως προς τη προσκόλληση και διείσδυση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Αυτοί οι ανοσολογικοί διαμεσολαβητές απελευθερώνονται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης, του ενδομητρίου και τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος.

Η παρούσα μελέτη είναι μία συγκριτική τυχαιοποιημένη μελέτη 300 περιστατικών, με σκοπό να εξετασθεί εάν η μέτρηση συγκεκριμένων φλεγμονωδών παραγόντων που εκλύονται από βλαστοκύστες πέμπτης ή έκτης ημέρας, σχετίζονται με την εξέλιξη των γονιμοποιημένων ωαρίων και το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες που επιλέχθηκαν να αναλυθούν είναι οι κυτταροκίνες IL1β και IL6, λόγω του σημαντικού ρόλου τους στη διαδικασία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο της γυναίκας. Το πρώτο μέρος της μελέτης σκοπό είχε να αναδείξει εάν αυτές οι κυτταροκίνες, οι οποίες εκφράζονται από το ενδομήτριο κατά την εμφύτευση, εκλύονται και από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα της γυναίκας και σε ποιές συγκεντρώσεις. Το δεύτερο μέρος αφορούσε στον έλεγχο της ύπαρξης συσχετισμού μεταξύ των IL1β και IL6 και του αναπτυξιακού σταδίου της βλαστοκύστης, της ποιότητά της και τελικά του ποσοστού εμφύτευσης.

Η μελέτη διεξήχθη σε ασθενείς που είχαν προγραμματιστεί για εμβρυομεταφορά πέμπτης ή έκτης ημέρας με στόχο να αποδειχθεί αν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό εμφύτευσης βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών και αν αυτό σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων από τις βλαστοκύστες αυτές. Η σύγκριση του ποσοστού εμφύτευσης και κύησης μεταξύ βλαστοκύστεων 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας έγινε με σκοπό να δοθεί μία απάντηση για το εάν η καθυστέρηση της εμβρυομεταφοράς κατά μία ημέρα διακυβεύει την έκβαση του αποτελέσματος μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση. Το χρονικό διάστημα αυτό θεωρείται πολύ σημαντικό για την ανίχνευση και ανάλυση παραγόντων σχετικών με την επιλογή του καταλληλότερου προεμβρύου για μεταφορά.

Το τελευταίο στάδιο της μελέτης αυτής σκοπό είχε να ελέγξει το ενδεχόμενο χρήσης των κυτταροκινών IL1β και IL6 ως δείκτες εμφύτευσης. Η μέτρηση συγκεκριμένων παραγόντων πριν την εμβρυομεταφορά, σε συνδυασμό με τα μορφολογικά κριτήρια των βλαστοκύστεων, θα μπορούσε να έχει άμεση κλινική εφαρμογή στην ανάδειξη του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για μεταφορά στη μήτρα, αυξάνοντας τα ποσοστά εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και αποτελώντας έτσι ένα καινούργιο κριτήριο αξιολόγησης των βλαστοκύστεων και επιλογής τους για μεταφορά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικό

2.1.1 Βιολογικά εργαστήρια που έλαβαν μέρος στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης

Όλες οι εμβρυολογικές εργαστηριακές τεχνικές της συλλογής ωαρίων και σπερματοζωαρίων, της επεξεργασίας τους, της γονιμοποίησης, της καλλιέργειας των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων και της εμβρυομεταφοράς τους, έλαβαν μέρος στο εργαστήριο κλινικής εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών. Οι μετρήσεις των κυτταροκινών που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν στο Ανοσοβιολογικό Εργαστήριο του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου- Μαιευτηρίου «Ελενα Βενιζέλου», το οποίο εξειδικεύεται στη διερεύνηση και παρακολούθηση ζευγαριών με προβλήματα υπογονιμότητας.

2.1.2 Κριτήρια ένταξης ασθενών στην παρούσα μελέτη

Η παρούσα τυχαιοποιημένη μελέτη συμπεριέλαβε όλους τους υπογόνιμους ασθενείς που ακολούθησαν πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης από το Σεπτέμβριο του 2011 μέχρι και τον Ιούλιο του 2013 και οι οποίοι υπόκεινταν στα παρακάτω κριτήρια:

1. Σε όλους τους ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, έγινε λήψη λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού, διερεύνηση αιτίας υπογονιμότητας και θεραπεία.
2. Η εμβρυομεταφορά των ασθενών προγραμματίστηκε την πέμπτη ή έκτη ημέρα ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων τους.
3. Οι παραπάνω ασθενείς ενημερώθηκαν εκτενώς για τα πλεονεκτήματα της μεθόδου και τους επικείμενους κινδύνους της εκτεταμένης καλλιέργειας των γονιμοποιημένων ωαρίων τους μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων.
4. Όλοι οι ασθενείς την ημέρα της προγραμματισμένης ωοληψίας τους υπέγραψαν ειδική συγκατάθεση που περιέγραφε όλες τις εργαστηριακές τεχνικές στις οποίες υπεβλήθησαν οι γαμέτες και τα γονιμοποιημένα τους ωάρια καθόλη τη διάρκεια παραμονής τους στο εργαστήριο, μέχρι και την εμβρυομεταφορά τους στη μήτρα της γυναίκας.
5. Όλα τα γονιμοποιημένα ωάρια που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά ήταν βλαστοκύστες που προέκυψαν μετά από ωοληψία της γυναίκας (“φρέσκος” κύκλος). Αν έστω και ένα γονιμοποιημένο ωάριο που συμπεριλαμβανόταν στην εμβρυομεταφορά της ασθενούς ήταν στο στάδιο του μοριδίου την 5η ημέρα καλλιέργειάς του, ανεξάρτητα από το

αν η εμβρυομεταφορά ήταν προγραμματισμένη την 5η ή 6η ημέρα ή είχε προκύψει μετά από απόψυξη γονιμοποιημένων ωαρίων προηγούμενου κύκλου της γυναίκας, η ασθενής εξαιρούνταν από την μελέτη.

6. Για την ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων σε βλαστοκύστες ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαδοχικής καλλιέργειας G1/G2 (διφασικό καλλιεργητικό υγρό μέσο).

7. Ο αριθμός των γονιμοποιημένων ωαρίων που συμπεριλαμβάνονταν στην εμβρυομεταφορά ήταν μέχρι τρεις βλαστοκύστες. Σε διαφορετική περίπτωση η ασθενής εξαιρούνταν από τη μελέτη.

8. Η επιλογή των γυναικών που εντάχθηκαν στη μελέτη είχε να κάνει με τη μέθοδο εμβρυομεταφοράς τους (στάδιο βλαστοκύστεων) και ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία τους, το πρωτόκολλο διέγερσης ωοθηκών που ακολούθησαν ή την αιτία υπογονιμότητάς τους. Συμπεριλήφθησαν ακόμα και περιπτώσεις σοβαρής μορφής ανδρικής υπογονιμότητας στις οποίες κρίθηκε αναγκαία η βιοψία όρχεων ως μέθοδο λήψης σπερματοζωαρίων ή και γυναίκες που λόγω εμμηνόπαυσης ακολούθησαν πρόγραμμα αποδοχής ωαρίων δότριας. Αυτό αποφασίστηκε με σκοπό η μελέτη να δώσει, αν είναι εφικτό, μία απάντηση σε όλες τις γυναίκες που καταφεύγουν στην εξωσωματική γονιμοποίηση και όχι μόνο σε μία συγκεκριμένη ομάδα υπογόνιμων ασθενών.

9. Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 300 ασθενείς οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν τυχαιοποιημένα σε δύο ομάδες. Η κάθε ομάδα αποτελείτο από 150 ασθενείς των οποίων η εμβρυομεταφορά είχε προγραμματιστεί την πέμπτη ή την έκτη ημέρα αντίστοιχα των γονιμοποιημένων ωαρίων τους.

Το καλλιεργητικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονταν οι βλαστοκύστες όλων των ασθενών την πέμπτη ημέρα ανεξάρτητα από το αν η εμβρυομεταφορά ήταν προγραμματισμένη την πέμπτη ή την έκτη ημέρα, συλλέχθηκε και ελέγχθηκε για τυχόν μεταβολές σε φλεγμονώδεις παράγοντες. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες οι οποίοι μετρήθηκαν και αναλύθηκαν ήταν η ιντερλευκίνη IL1β (κυτταροκίνη) και η ιντελευκίνη IL6 (κυτταροκίνη). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών αντιπαρατέθηκαν με τα ποσοστά κύησης και εμφύτευσης μεταξύ των δύο ομάδων και έγινε μία προσπάθεια συσχετισμού μεταξύ τους, με σκοπό να αναδειχθεί ένας καινούργιος δείκτης εμφύτευσης που θα μπορούσε να ωφελήσει υπογόνιμα ζευγάρια στο χώρο της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

2.1.3 Κριτήρια ασθενών που εντάσσονται σε μέθοδο εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων

Οι γυναίκες που προγραμματίζονται σε εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων είναι συνήθως γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης μετά από εμβρυομεταφορές 2^{ης} και 3^{ης} ημέρας. Οι ασθενείς που ακολουθούν το πρωτόκολλο των βλαστοκύστεων προτιμάται να έχουν τουλάχιστον 6-7 γονιμοποιημένα ωάρια την πρώτη ημέρα καλλιέργειάς τους, μιας και η εκτεταμένη καλλιέργεια καταλήγει στην ανάπτυξη περίπου του 50-60% των προ-εμβρύων στο στάδιο των βλαστοκύστεων. Η ηλικία δεν θεωρείται παράμετρος ένταξης ασθενών σε αυτόν τον τύπο εμβρυομεταφοράς, αν και η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων προτιμάται σε γυναίκες άνω των 35 ετών, διότι ως μέθοδος αυξάνει το ποσοστό εμφύτευσης ανά μεταφερόμενο γονιμοποιημένο ωάριο. Ένα ακόμα κριτήριο επιλογής ασθενών για εμβρυομεταφορά πέμπτης ή έκτης ημέρας είναι η υπερδιέγερση των ωοθηκών μετά το πρωτόκολλο διέγερσης που ακολούθησαν. Η εκτεταμένη καλλιέργεια σε αυτή την περίπτωση, διασφαλίζει ότι η γυναίκα δεν θα αναπτύξει το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών, δίνοντας παράλληλα το πλεονέκτημα να συμπεριληφθούν στην εμβρυομεταφορά λιγότερα γονιμοποιημένα ωάρια (1-2).

2.1.4 Συλλογή γαμετών στο εργαστήριο εμβρυολογίας

Το πρώτο στάδιο για την έναρξη της διαδικασίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, είναι η συλλογή των γαμετών, ωαρίων και σπερματοζωαρίων στο εργαστήριο. Στόχος είναι η επεξεργασία και διατήρηση του γενετικού υλικού, η γονιμοποίηση των γαμετών και η καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων. Το ζευγάρι που ακολουθεί πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης, πρέπει να έχει υποβληθεί σε απαραίτητες αιματολογικές εξετάσεις και να έχει ενημερωθεί ώστε την ημέρα της ωοληψίας να συμπληρώσει τα απαραίτητα έγγραφα και συγκαταθέσεις που νομιμοποιούν και επιτρέπουν την διεκπεραίωση της διαδικασίας. Το εργαστηριακό προσωπικό και ο θεράπων ιατρός εξατομικεύουν και μελετούν προσεκτικά το ιστορικό του ζευγαριού προκειμένου να επιλέξουν την κατάλληλη μέθοδο γονιμοποίησης που αρμόζει σε κάθε υπογόνιμο ζευγάρι.

2.1.5 Διαδικασία συλλογής υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού για την ανίχνευση φλεγμονωδών παραγόντων

Τα γονιμοποιημένα ωάρια των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη καλλιεργήθηκαν σε αριθμημένες σταγόνες με συγκεκριμένη ποσότητα καλλιεργητικού υγρού, που η κάθε σταγόνα συμπεριελάμβανε ένα αναπτυσσόμενο γονιμοποιημένο ωάριο (κάθε αριθμός

αντιστοιχούσε σε συγκεκριμένο γονιμοποιημένο ωάριο και σταγόνα καλλιεργητικού υγρού). Όλα τα γονιμοποιημένα ωάρια την πέμπτη ημέρα ανάπτυξής τους μεταφέρθηκαν σε καινούργιο καλλιεργητικό υγρό σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαδοχικής καλλιέργειας G1/G2 (λεπτομερής περιγραφή σε παρακάτω κεφάλαιο). Η διαδικασία συλλογής του υπερκείμενου υγρού διαχωρίστηκε σε δύο στάδια ανάλογα με την ημέρα εμβρυομεταφοράς της γυναίκας:

1. Στις γυναίκες με προγραμματισμένη εμβρυομεταφορά την 5η ημέρα, οι βλαστοκύστες που επιλέχθηκαν για εμβρυομεταφορά μεταφέρθηκαν σε καινούργιο καλλιεργητικό υγρό. Το υπερκείμενο υγρό μέσα στο οποίο βρίσκονταν, συλλέχθηκε και καταψύχθηκε στους -20°C για μετέπειτα ανάλυση.

2. Στις γυναίκες με προγραμματισμένη εμβρυομεταφορά την 6η ημέρα, το υπερκείμενο υγρό μέσα στο οποίο αναπτύσσονταν όλα τα γονιμοποιημένα ωάρια που είχαν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων την 5η ημέρα, συλλέχθηκε και καταψύχθηκε στους -20°C . Την 6η ημέρα καλλιέργειας που επιλέχθηκαν ποιες από αυτές τις βλαστοκύστες θα μεταφερθούν στη γυναίκα, διαχωρίστηκαν τα αντίστοιχα δείγματα στην κατάψυξη και τα υπόλοιπα απορρίφθηκαν.

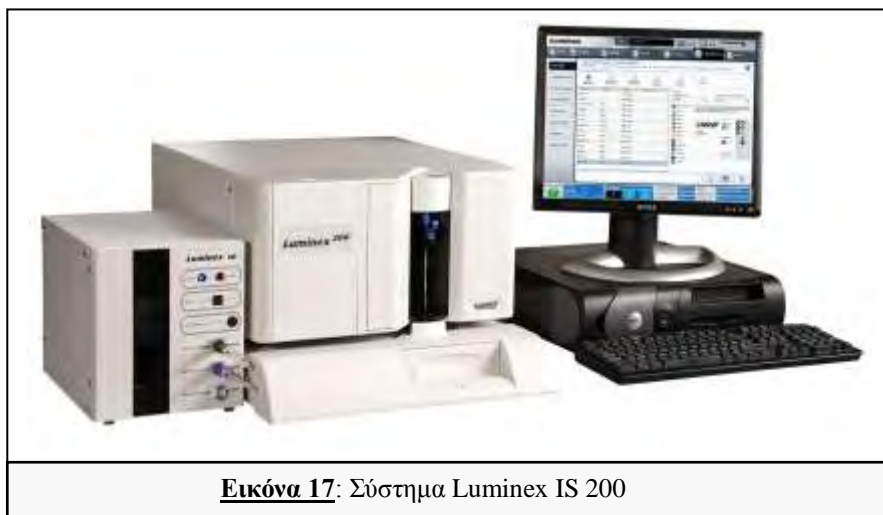
Το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ήταν 845 δείγματα και ανταποκρίνεται στο συνολικό αριθμό των βλαστοκύστεων που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά των γυναικών που έλαβαν μέρος στη μελέτη.

2.1.6 Σύστημα LUMINEX- Μέθοδος ανάλυσης και μέτρησης δειγμάτων

Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό όλων των δειγμάτων το οποίο μελετήθηκε για την ύπαρξη των κυτταροκινών IL1 β και IL6, αναλύθηκε και μετρήθηκε με τη βοήθεια του συστήματος Luminex IS 200. Η τεχνολογία xMAP που εφαρμόζεται στο Luminex στηρίζεται σε σφαιρίδια με διακριτό φασματικό κώδικα και δεν απαιτεί τα σφαιρίδια να είναι ακινητοποιημένα. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με βάση τις αρχές της φθορισμομετρίας κυτταρικής ροής με μέτρηση βιομοριακών αντιδράσεων στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων. Δεδομένης της φύσης λειτουργίας του συστήματος, το Luminex χρησιμοποιείται για πολυπαραμετρικές αναλύσεις, με βασικά πλεονεκτήματα την υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια και το μικρό σχετικά χρόνο που χρειάζεται για κάθε κύκλο ανάλυσης των δειγμάτων.

Το Luminex 200 IS είναι ένα επιτραπέζιο σύστημα, το οποίο αποτελείται από τον αναλυτή Luminex, τον υπολογιστή, την οθόνη, το πληκτρολόγιο, το ποντίκι, το όργανο Luminex XY

Platform, το λογισμικό, τον αναγνώστη γραμμωτού κώδικα, τα δοχεία περιβλήματος και αποβλήτων και τα αντιδραστήρια xMAP (εικόνα 17). Το λογισμικό Luminex είναι σχεδιασμένο για να χρησιμοποιεί την τεχνολογία xMAP με κιτ προσδιορισμού τα οποία διατίθενται από τους κατασκευαστές των κιτ.



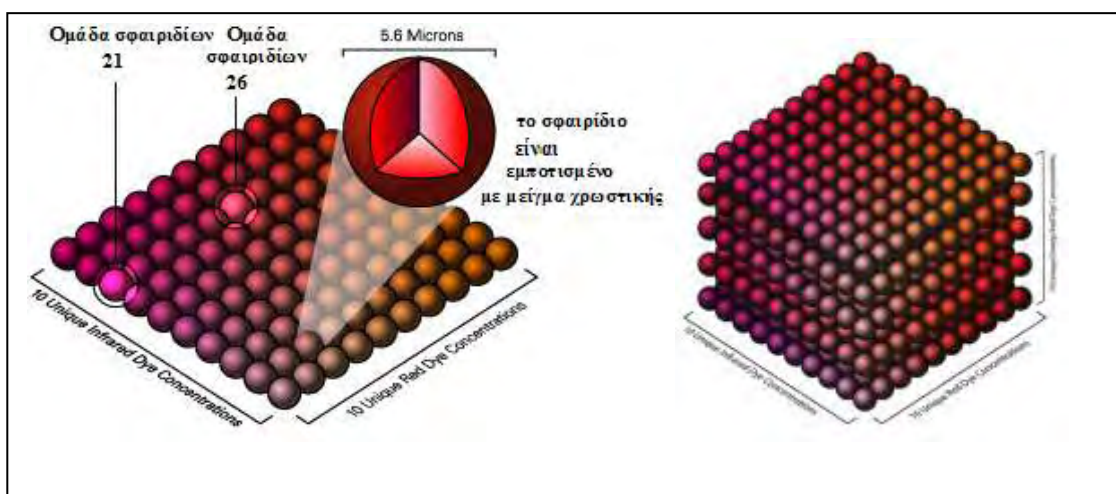
Εικόνα 17: Σύστημα Luminex IS 200

Το σύστημα Luminex 200 IS είναι ένας συνδυασμός τριών τμημάτων της xMAP τεχνολογίας. Το πρώτο μέρος είναι τα μικροσφαιρίδια xMAP, ένα σύνολο 100-500 φθορίζοντων μικροσφαιριδίων (5.6 micron-sized) πολυστυρενίου που δρουν ταυτόχρονα ως αναγνωριστές και ως στερεή επιφάνεια για να γίνει ο προσδιορισμός. Το δεύτερο τμήμα είναι ο αναλυτής ροής και το όργανο Luminex XY Platform (πλατφόρμα- συσκευή ανάγνωσης 96 δειγμάτων) που ανιχνεύει συστατικά και περιλαμβάνει: δύο Laser, οπτικά και υδροδυναμικά συστήματα, επεξεργαστές ψηφιακού σήματος υψηλής ταχύτητας και προηγμένους αλγόριθμους υπολογιστών, οι οποίοι εκτελούν την ανάλυση των μικροσφαιριδίων xMAP. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων υποβάλλονται σε επεξεργασία και παρέχονται με μορφή αναφοράς, μέσω του λογισμικού Luminex IS, που αποτελεί το τρίτο και τελευταίο τμήμα του συστήματος. Η τεχνολογία xMAP έχει πλέον τη δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης ως 500 διαφορετικών παραμέτρων ανάλυσης σε μία μόνο θέση μιας μικροπλάκας, χρησιμοποιώντας πολύ μικρούς όγκους εξεταζόμενου δείγματος.

2.1.7 Σφαιρίδια Luminex

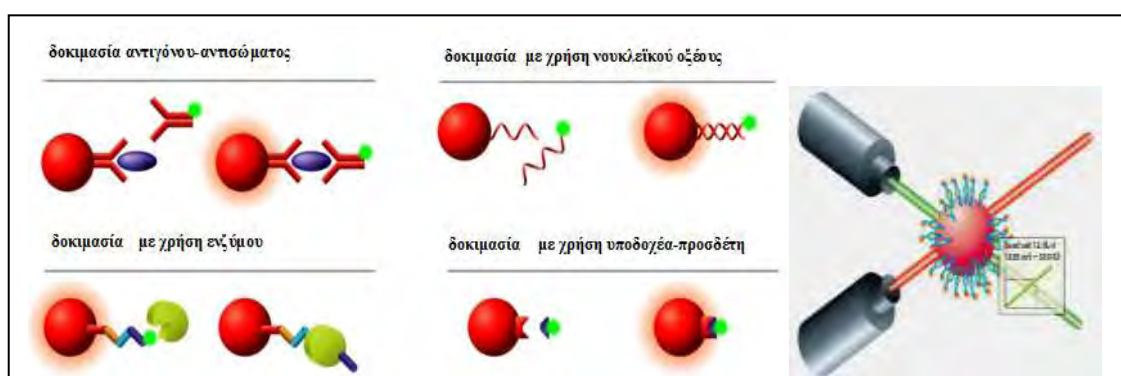
Τα σφαιρίδια Luminex είναι σφαιρίδια πολυστυρενίου (5.6 μ) τα οποία είναι σεσημασμένα εσωτερικά με δύο φθορίζουσες ουσίες (ερυθρό και υπέρυθρο φθοριόχρωμα) (εικόνα 18). Κάθε σφαιρίδιο περιέχει διαφορετική αναλογία φθορίζουσών ουσιών με τέτοιο τρόπο, ώστε

το καθένα να έχει τη δική του φασματική ταυτότητα, η οποία ανιχνεύεται από το σύστημα ανάγνωσης του οργάνου Luminex (κόκκινο Laser).



Εικόνα 18: Τεχνολογία xMAP-Luminex. Μέχρι σήμερα η τεχνολογία Luminex έδινε τη δυνατότητα ανάλυσης 100 παραμέτρων (αριστερά) και σήμερα δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης έως και 500 παραμέτρων (δεξιά), των οποίων ο πυρήνας είναι σημασμένος με διαφορετική αναλογία ερυθρού-υπέρυθρου φθοριοχρώματος.

Στην επιφάνεια των σφαιριδίων μπορούν να ακινητοποιηθούν αντιγόνα, αντισώματα ή ολιγονουκλεοτίδια, η χρήση των οποίων επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του προς ανάλυση παράγοντα (πράσινο Laser). Με τον αναλυτή Luminex, τα δύο laser που χρησιμοποιούνται (κόκκινο και πράσινο) διεγείρουν αντίστοιχα την εσωτερική και εξωτερική φθορίζουσα ουσία η οποία ταυτοποιεί το κάθε μικροσφαιρίδιο, επιτυγχάνοντας έτσι την ανάλυση των εξεταζόμενων παραγόντων (εικόνα 19). Για την επιβεβαίωση της σταθερότητας του σήματος, είναι απαραίτητο τα μικροσφαιρίδια να προστατεύονται από το φως.



Εικόνα 19: Τεχνολογία xMAP-Luminex. Η επιφάνεια κάθε οικογένειας μικροσφαιριδίων μπορεί να επικαλυφθεί με το κατάλληλο για μια δοκιμασία αντιδραστήριο, που επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του παράγοντα προς ανάλυση, χρησιμοποιώντας χρωστική ανιχνεύσιμη σε διαφορετικό μήκος κύματος από αυτό του πυρήνα. Δεξιά φαίνεται και ο τρόπος με τον οποίο τα δύο Laser διεγείρουν και ανιχνεύουν τις φθορίζουσες ουσίες.

2.1.8 Οπτικό σύστημα Luminex

Το οπτικό σύστημα του συστήματος Luminex αποτελείται από το οπτικό συγκρότημα και δύο Laser διέγερσης στερεάς κατάστασης. Ένα Laser ταξινόμησης που διεγείρει το ερυθρό και υπέρυθρο φθοριόχρωμα που περιέχεται σε διαφορετικές αναλογίες στα μικροσφαιρίδια xMAP και ένα Laser ανταποκριτή που διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια που είναι συνδεδεμένα σε βιολογικά αντιδρώντα πάνω στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού του χρωστικών ανιχνεύεται μέσω ανιχνευτών φωτοδιόδων και εν συνεχεία μία φωτοπολλαπλασιαστική λυχνία με υψηλή ευαισθησία ανιχνεύει την ένταση εκπομπής φθορισμού του διεγερμένου μορίου αναφοράς, το οποίο είναι συνδεδεμένο στην εξωτερική επιφάνεια των μικροσφαιριδίων xMAP. Ο αναλυτής Luminex στη συνέχεια αναλαμβάνει μέσω αλγορίθμων και υψηλής ταχύτητας υπολογιστών να αναλύσει τα μικροσφαιρίδια, ψηφιοποιώντας της κυματομορφές και μεταβιβάζοντας σήματα σε έναν επεξεργαστή ψηφιακού σήματος.

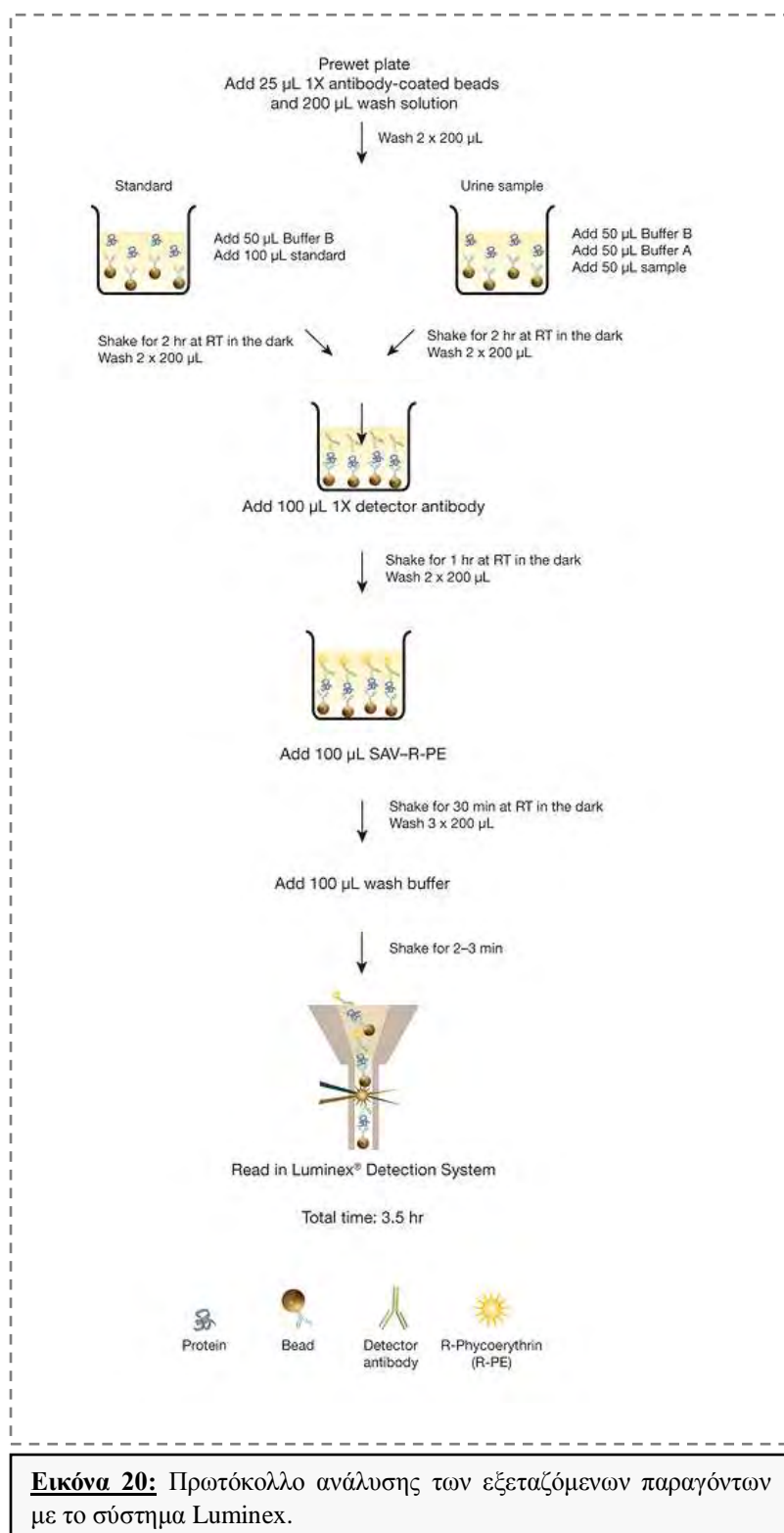
Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας της εξεταζόμενης ουσίας που είναι συνδεδεμένη σε ένα συγκεκριμένο μικροσφαιρίδιο. Τα σφαιρίδια στην επιφάνεια των οποίων πραγματοποιούνται οι βιομοριακές αντιδράσεις οδηγούνται διαδοχικά σε μονή σειρά και περνούν από την κυψελίδα ανάμεσα στα δύο Laser, όπου διεγείρονται και ανιχνεύονται. Απαραίτητη προϋπόθεση για τις μετρήσεις των δειγμάτων είναι η καταγραφή και των δύο σημάτων Laser (εικόνα 19 δεξιά).

2.1.9 Αντιδραστήρια-Υλικά Τεχνολογίας xMAP για την ανάλυση των κυτταροκινών που μελετήθηκαν από την παρούσα μελέτη

Για την ανάλυση των ιντερλευκινών IL1β και IL6 σε υπερκείμενα υγρά καλλιιεργειών βλαστοκύστεων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια κατάλληλα για τη χρήση σε Luminex:

1. Συμπυκνωμένο διάλυμα (10x) σφαιριδίων καλυμμένων με αντισώματα έναντι της ανθρώπινης κυτταροκίνης IL6 (Hu-IL-6) (περιέχει 0.05% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό)
2. Συμπυκνωμένο διάλυμα (10x) σφαιριδίων καλυμμένων με αντισώματα έναντι της ανθρώπινης κυτταροκίνης IL1β (Hu -IL-1b) (περιέχει 0.05% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό)

3. Συμπυκνωμένο (10x) διάλυμα βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης κυτταροκίνης IL6 (Hu-IL-6) (περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Αυτό αποτελεί το αντίσωμα ανίχνευσης.
 4. Συμπυκνωμένο (10x) διάλυμα βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων έναντι της ανθρώπινης κυτταροκίνης IL1β (περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Αυτό αποτελεί το αντίσωμα ανίχνευσης.
 5. Αραιωτικό διάλυμα βιοτίνης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της κατάλληλης συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένου αντισώματος.
 6. Διάλυμα στρεπταβιδίνης-RPE (10x) που αποτελεί τη φθορίζουσα ουσία που θα ανιχνευθεί από το σύστημα Luminex με σκοπό να καθοριστεί η συγκέντρωση των εξεταζόμενων κυτταροκινών.
 7. Αραιωτικό διάλυμα στρεπταβιδίνης –RPE που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της κατάλληλης συγκέντρωσης στρεπταβιδίνης.
 8. Αραιωτικό διάλυμα δειγμάτων και βαθμονομητών (Assay Diluent) .
 9. Διάλυμα επώασης.
 - 10.Βαθμονομητές (standards) IL6 και IL1β.
 - 11.Συμπυκνωμένο (20x) διάλυμα πλύσης (WWS Working wash solution), το οποίο χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των θέσεων της μικροπλάκας και για την αραίωση.
- Το πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο στις μεθόδους και μία περίληψή του εμφανίζεται στην εικόνα 20 τις επόμενης σελίδας.



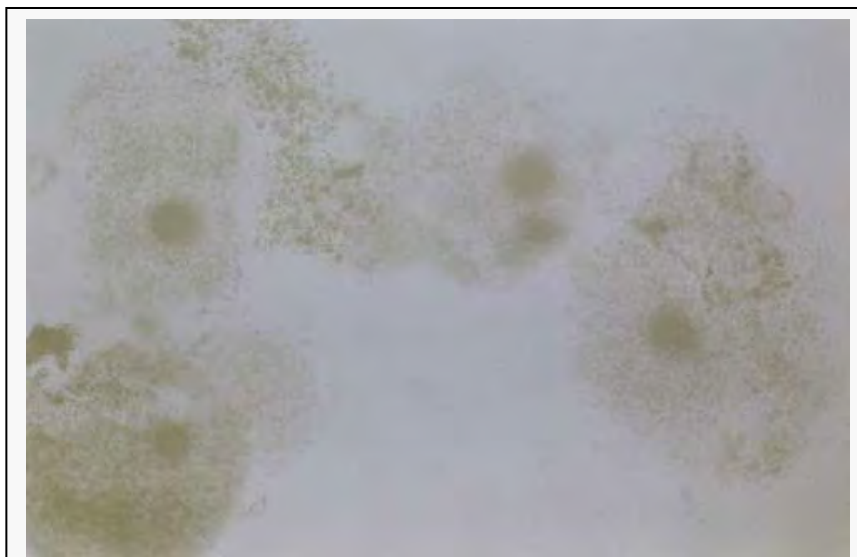
2.2 Μεθοδολογία¹

2.2.1 Χειρισμός γαμετών *in vitro*

Ωοληψία και συλλογή ωαρίων

Η ωοληψία έγινε με διακολπική παρακέντηση των ωοθυλακίων από τις ωοθήκες. Για την αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού χρησιμοποιήθηκε μονού αυλού βελόνα και υπερηχογραφικός έλεγχος κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας.

Το ωοθυλακικό υγρό αναρροφήθηκε σε σωληνάκια 15 ml BD Falcon και εξετάστηκε σε στερεοσκόπιο (SMZ-104, Nikon) με τη χρήση τρυβλίων 60mm για την ύπαρξη ωαρίων. Τα ωάρια που συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν σε τρυβλίο με καλλιεργητικό υλικό G-IVF (Vitrolife) εμπλουτισμένο με 5% HSA (Irvine Scientific), όπου ξεπλύθηκαν από το αίμα και το ωοθυλακικό υγρό. Ένα ακόμα ξέπλυμα έγινε με το ίδιο καλλιεργητικό υγρό σε νέο τρυβλίο (BD 60X15mm, με ένα πηγάδι στη μέση) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο 4 θέσεων (Nunc), το οποίο περιείχε επίσης καλλιεργητικό υγρό G-IVF με HSA (0.5ml καλλιεργητικού υγρού ανά θέση), καλυμμένο με εξισορροπημένο και πλυμένο παραφινέλαιο (0.3ml ανά θέση) (Irvine Scientific), προκειμένου να αποτελούν «κλειστές» καλλιέργειες (εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ωάρια *in vitro* μετά τη συλλογή τους στο τρυβλίο καλλιέργειας (Γένεσις Αθηνών)

¹ Όλα τα αναλώσιμα υλικά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν έχουν παρατεθεί λεπτομερώς στο παράρτημα 4

Όλη η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε ένα είδος επωαστή (EM-CELL) με θερμοκρασία 37°C και 6% CO₂ και μεγάλης χωρητικότητας, στον οποίο είναι τοποθετημένο το στερεοσκόπιο και όλος ο απαραίτητος εξοπλισμός για την ωοληψία (πιπέττες Pasteur, τρυβλία). Με το τέλος της ωοληψίας και την ολοκλήρωση της συλλογής ωαρίων, το όνομα της ασθενούς αναγράφηκε πάνω στο τρυβλίο που περιείχε τα ωάρια και το τρυβλίο τελικά μεταφέρθηκε σε επωαστικό κλίβανο (6% CO₂, 37°C), όπου και παρέμεινε για 3-5 ώρες μέχρι τη στιγμή της γονιμοποίησης.

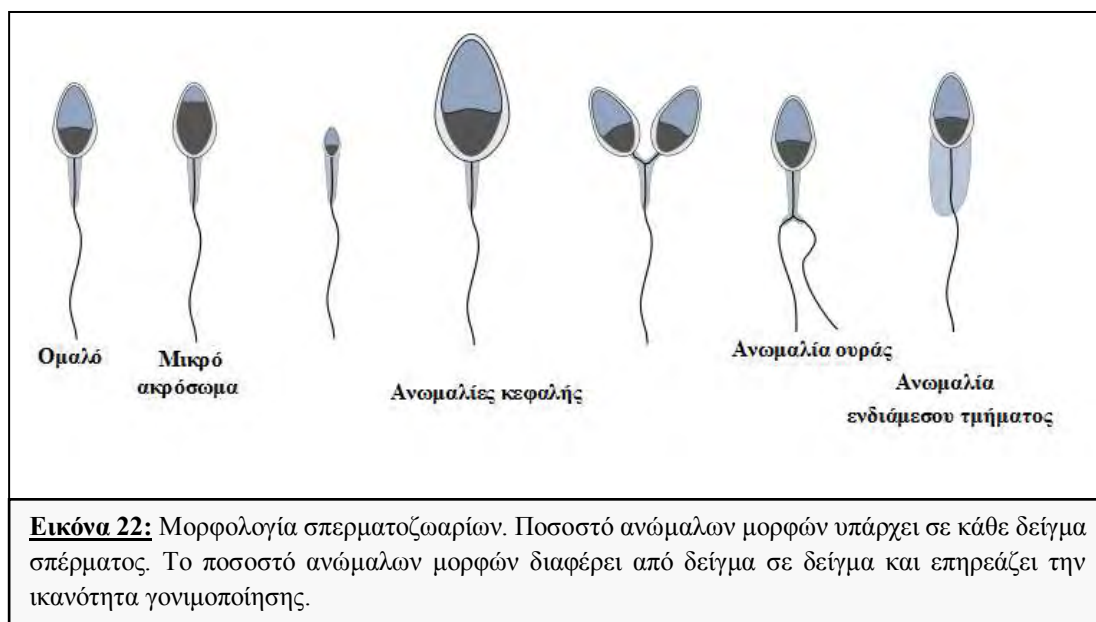
Λήψη και Αξιολόγηση σπέρματος

Στα ζευγάρια που ακολουθούν πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης, συνιστάται αποχή επαφής 2-4 ημέρες πριν την προκαθορισμένη ημέρα της ωοληψίας. Η συλλογή του δείγματος του σπέρματος έγινε την ίδια ημέρα της ωοληψίας μέσα σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη και τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο 37°C χωρίς CO₂, μέχρι να ρευστοποιηθεί. Οι παράμετροι του σπέρματος αξιολογήθηκαν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά σύμφωνα με το εγχειρίδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ, 2010) και περιλαμβάνουν (πίνακας 1):

1. Τον όγκο του δείγματος
2. Το χρόνο ρευστοποίησης
3. Το χρώμα του δείγματος
4. Το pH
5. Τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ανά ml δείγματος
6. Το ολικό ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και ποιοτική κατηγοριοποίηση της κίνησής τους
7. Τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (ποσοστό ανωμάτων μορφών) (εικόνα 22)
8. Την ύπαρξη συγκολλήσεων σπερματοζωαρίων και ποιάς μορφής (συγκολλήσεις ουρών ή κεφαλών)
9. Την ύπαρξη πυοσφαιρίων στο δείγμα

Παράμετροι σπέρματος προς αξιολόγηση	Τιμές Αναφοράς κατά ΠΟΥ
Όγκος	>1.5 ml
Συγκέντρωση	>15x10 ⁶ /ml
Κινητικότητα	40%
Συνολική προωθητική κινητικότητα	32%
Ομαλές μορφές	4%

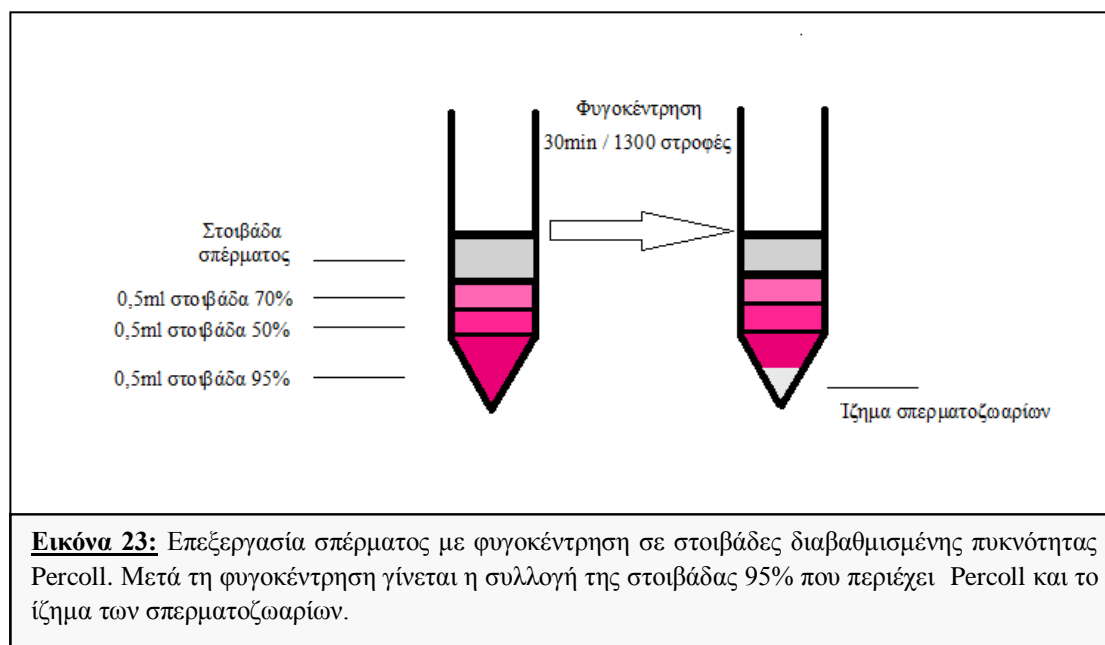
Πίνακας 1: Νέες τιμές αναφοράς και ισχύουσες κατά ΠΟΥ (2010) για τις βασικές σπερματολογικές παραμέτρους.



Με βάση τα παραπάνω κριτήρια αξιολόγησης και το συνολικό ιατρικό ιστορικό του ζευγαριού, κρίθηκε η μέθοδος γονιμοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στους ασθενείς.

Επεξεργασία σπέρματος

Η επεξεργασία των δειγμάτων σπέρματος έγινε με φυγοκέντρηση σε κλάσματα διαβαθμισμένης πυκνότητας Percoll τριών στοιβάδων με συγκέντρωση 95%, 70% και 50%, με σκοπό να απομακρυνθεί το σπερματικό πλάσμα, να απομονωθούν κυρίως τα ταχέως κινούμενα και ομαλά σπερματοζωάρια και να επιτευχθεί η ενεργοποίησή τους. Σε κωνικό φιαλίδιο τοποθετήθηκε περίπου 1ml δείγματος σπέρματος πάνω από τις 3 στοιβάδες του Percoll και η φυγοκέντρηση έγινε στις 1300 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά (εικόνα 23).

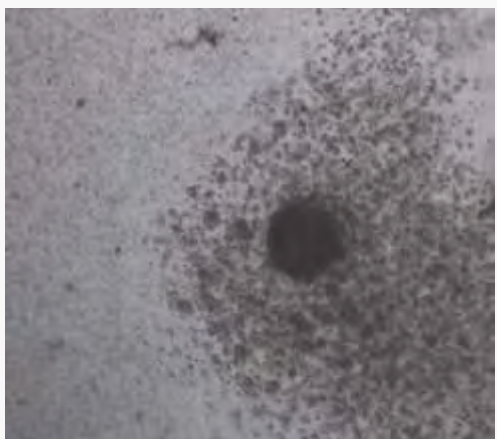



Μετά τη πρώτη φυγοκέντρηση, το ίζημα που συλλέχτηκε, μεταφέρθηκε σε ένα νέο κωνικό φιαλίδιο που περιείχε 3ml καλλιεργητικού υγρού G-MOPS (+ 5% HSA) (Vitrolife) και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση που εξυπηρετεί ως ξέπλυμα του ιζήματος από τα υπολείμματα Percoll, στις 3000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση και εφόσον το υπερκείμενο υγρό αναρροφήθηκε, το ίζημα στο φιαλίδιο αραιώθηκε με καθαρό καλλιεργητικό υγρό G-MOPS ή G-IVF (+ 5% HSA). Η αραιώση του τελικού δείγματος και το είδος του καλλιεργητικού υγρού που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογα της μεθόδου γονιμοποίησης που επιλέχθηκε για κάθε ασθενή.

2.2.2 Μέθοδοι γονιμοποίησης *in vitro*

Απλή γονιμοποίηση (conventional IVF)

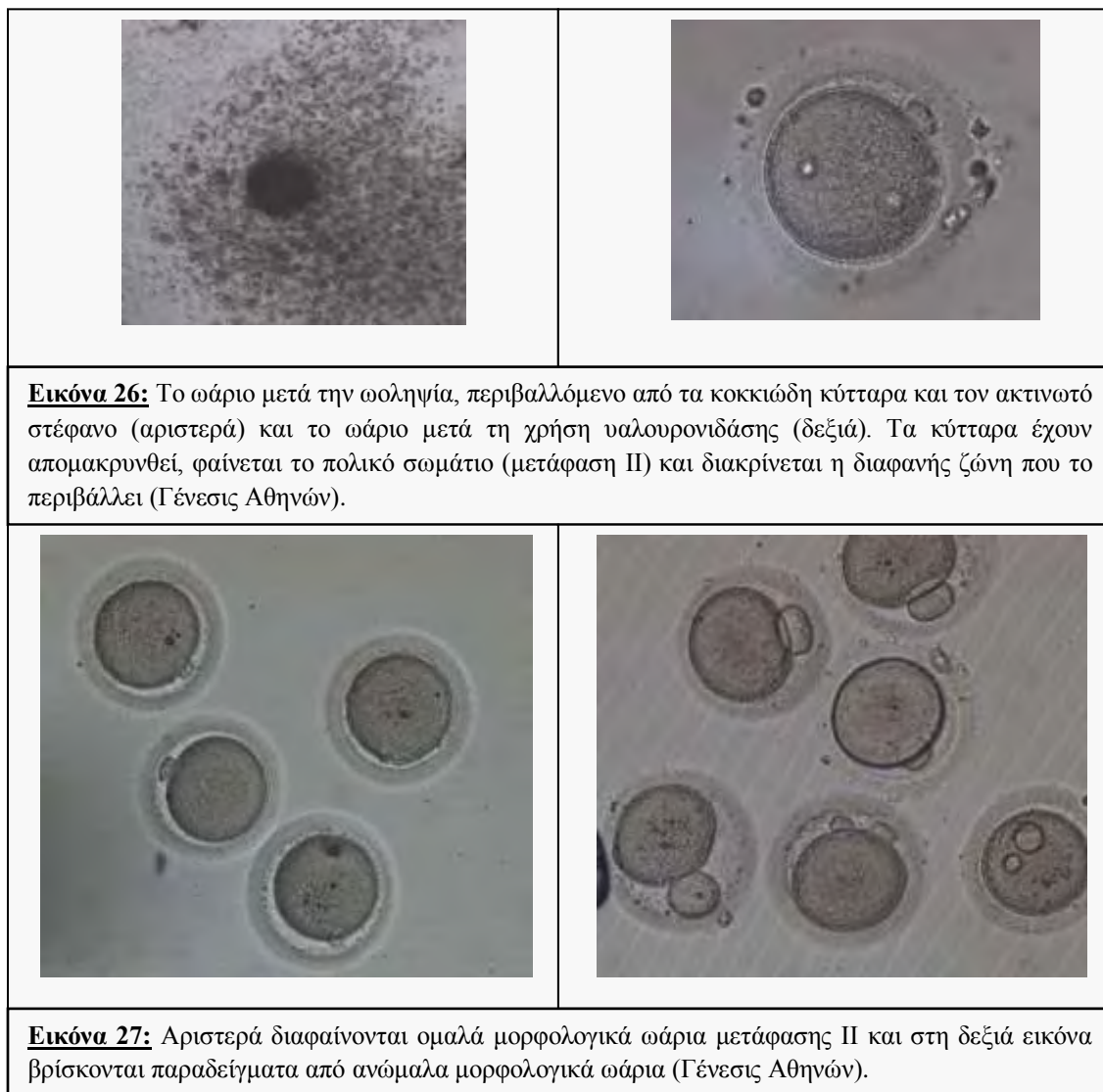
Για τη απλή μέθοδο γονιμοποίησης (conventional-IVF), το επεξεργασμένο δείγμα του σπέρματος αραιώθηκε με καλλιεργητικό υγρό G-IVF (+ 5% HSA), έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 200.000-250.000 σπερματοζωάρια ανά σταγόνα. Τα ωάρια αντίστοιχα τοποθετήθηκαν ανά 4-5, σε τρυβλίο Nunc 4 θέσεων, με όγκο καλλιεργητικού υγρού 0.5ml G-IVF (+ 5% HSA) ανά πηγάδι, καλυμμένου με 0.3ml παραφινέλαιου. Τρεις με πέντε ώρες μετά την ωοληψία, 1 σταγόνα επεξεργασμένου σπέρματος προστέθηκε σε κάθε θέση (πηγάδι) του τρυβλίου που περιείχε τα ωάρια. Μετά τη γονιμοποίηση το τρυβλίο τοποθετήθηκε πίσω στον κλίβανο για 1 ώρα και 30 λεπτά περίπου. Με το πέρας αυτού του διαστήματος, τα ωάρια (εικόνα 24) μεταφέρθηκαν σε διπλανό πηγάδι του τρυβλίου (χωρίς σπέρμα) και παρέμειναν εκεί μέσα στον κλίβανο, μέχρι την επόμενη ημέρα (16-20 ώρες μετά) όπου και ελέγχθηκαν για το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης (εικόνα 32).

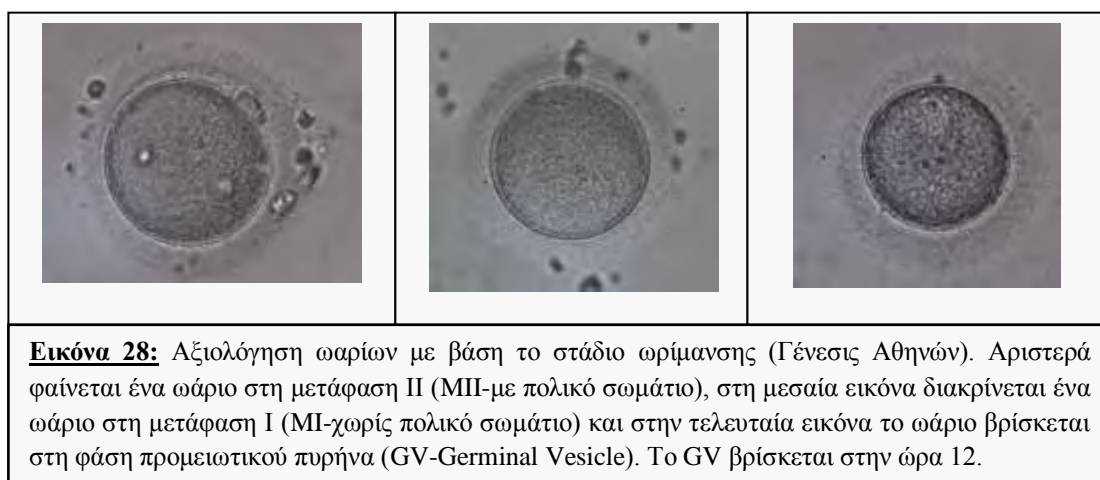
	
<p>Εικόνα 24: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο αμέσως μετά την προσθήκη επεξεργασμένου δείγματος σπέρματος στα ωάρια (Γένεσις Αθηνών).</p>	<p>Εικόνα 25: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο περίπου 1 ώρα μετά την προσθήκη σπερματοζωαρίων στο τρυβλίο. Τα κοκκιώδη κύτταρα έχουν διαλυθεί και το ωάριο περιβάλλεται μόνο από την ακτινωτή του στεφάνη (Γένεσις Αθηνών).</p>

Ενδοκυτταρική έγχυση σπερματοζωαρίου (Intracytoplasmic Sperm Injection-ICSI)

Σε περιπτώσεις που επιλέχθηκε η ICSI ως μέθοδος γονιμοποίησης, η αραιώση του σπέρματος έγινε με καλλιεργητικό υλικό G-MOPS (+ 5% HSA) και το τελικό δείγμα το σπέρματος τοποθετήθηκε σε κλίβανο 37°C που δεν περιέχει CO₂. Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής,

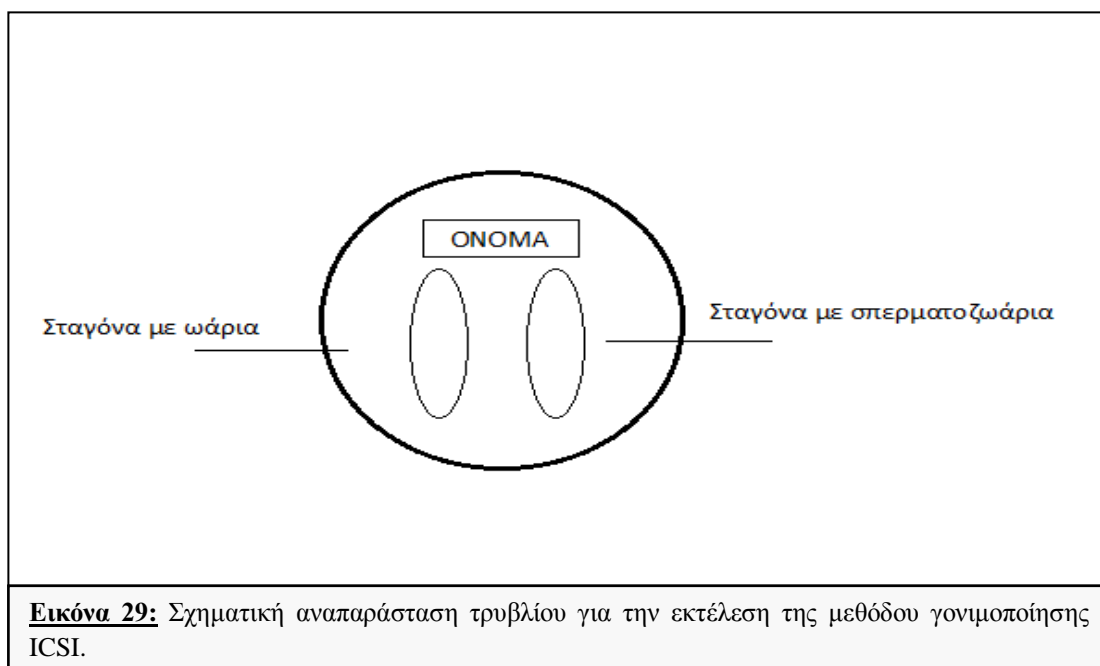
τα ωάρια υπεβλήθησαν σε έναν επιπλέον χειρισμό περίπου 2 ώρες μετά την ωοληψία, ώστε να απομακρυνθούν τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου που τα περιβάλλουν (εικόνα 26). Η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε τρυβλίο 4 θέσεων Nunc, το οποίο στο πρώτο πηγάδι περιείχε 0.5ml υαλουρονιδάση (Hyaluronidase- Ferti-Pro) εξισορροπημένη στους 37°C. Η υαλουρονιδάση είναι ένζυμο που χρησιμοποιείται *in vitro* για τη λύση των κυττάρων που περιβάλλουν τα ωάρια. Τα ωάρια τοποθετήθηκαν εκεί και παρέμειναν για 30 περίπου δευτερόλεπτα. Τα υπόλοιπα 3 πηγάδια του τρυβλίου περιείχαν καλλιεργητικό υγρό G-MOPS (+ 5% HSA), το οποίο είχε νωρίτερα εξισορροπηθεί στους 37°C και χρησιμοποιήθηκε για το ξέπλυμα των ωαρίων από το ένζυμο. Η τελική απομάκρυνση των κυττάρων του ωαρίου έγινε με τη χρήση πιπετών Pasteur διαφορετικής διαμέτρου. Στο τελευταίο πηγάδι έγινε η εκτίμηση του σταδίου ωρίμανσης των «καθαρισμένων» πια ωαρίων και αξιολόγησης της ποιότητάς τους (εικόνα 27 και 28).





Μετά τη διαδικασία αξιολόγησης των ωαρίων, τα ωάρια που ήταν στο στάδιο της μετάφασης II, μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο petri 3035 που περιείχε καλλιεργητικό υγρό G-IVF (+ 5% HSA) σε σταγόνες 20μl (7-8 σταγόνες/τρυβλίο) και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο μέχρι να περάσει διάστημα 3-5 ωρών από την ωοληψία, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία γονιμοποίησής τους με τη μέθοδο ICSI.

Για την ενδοκυτταρική έγχυση σπερματοζωαρίων τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια τοποθετήθηκαν χωριστά σε σταγόνες με καλλιεργητικό υγρό G-MOPS (+ 5% HSA) επικαλυμμένες με παραφινέλαιο (εικόνα 29).

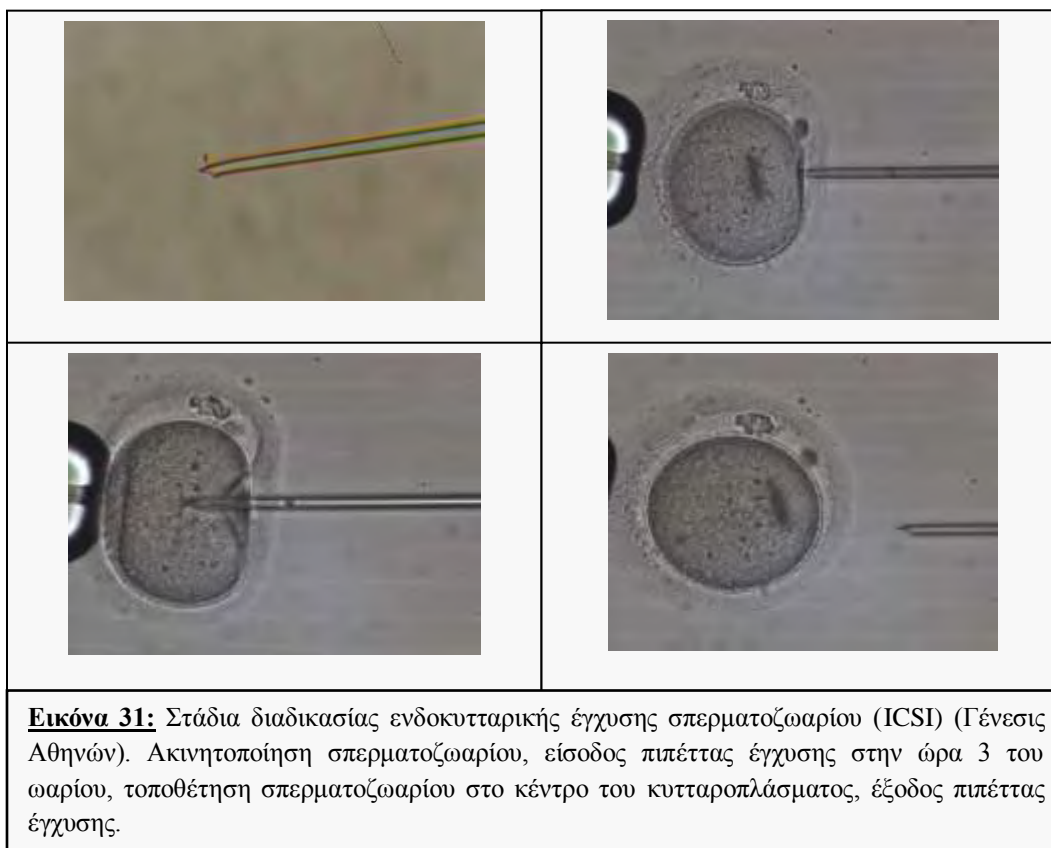


Η τεχνική ICSI έγινε με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου Nikon, μοντέλου Eclipse TE300, το οποίο λειτουργεί με υδραυλικό σύστημα ηλεκτρικών μικροχειριστηρίων λαδιού Narishige και βρίσκονται αριστερά και δεξιά από το κυρίως μικροσκόπιο (εικόνα 30). Το κάθε μικροχειριστήριο έχει υποδοχή για μία πιπέττα-βελόνα ICSI. Το ένα έχει προσαρμοσμένη μία πιπέττα συγκράτησης (Holding pipette, Cook), που βοηθάει στη συγκράτηση του ωαρίου κατά τη διάρκεια έγχυσης του σπερματοζωαρίου σε αυτό και το άλλο έχει προσαρμοσμένη τη πιπέττα έγχυσης (ICSI pipette, Humagen). Κάθε σπερματοζωάριο ακινητοποιήθηκε με τσάκισμα της ουράς του, χρησιμοποιώντας την πιπέττα έγχυσης, έπειτα αναρροφήθηκε από αυτή και μεταφέρθηκε στη σταγόνα του ωαρίου, προκειμένου να εισαχθεί στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου.



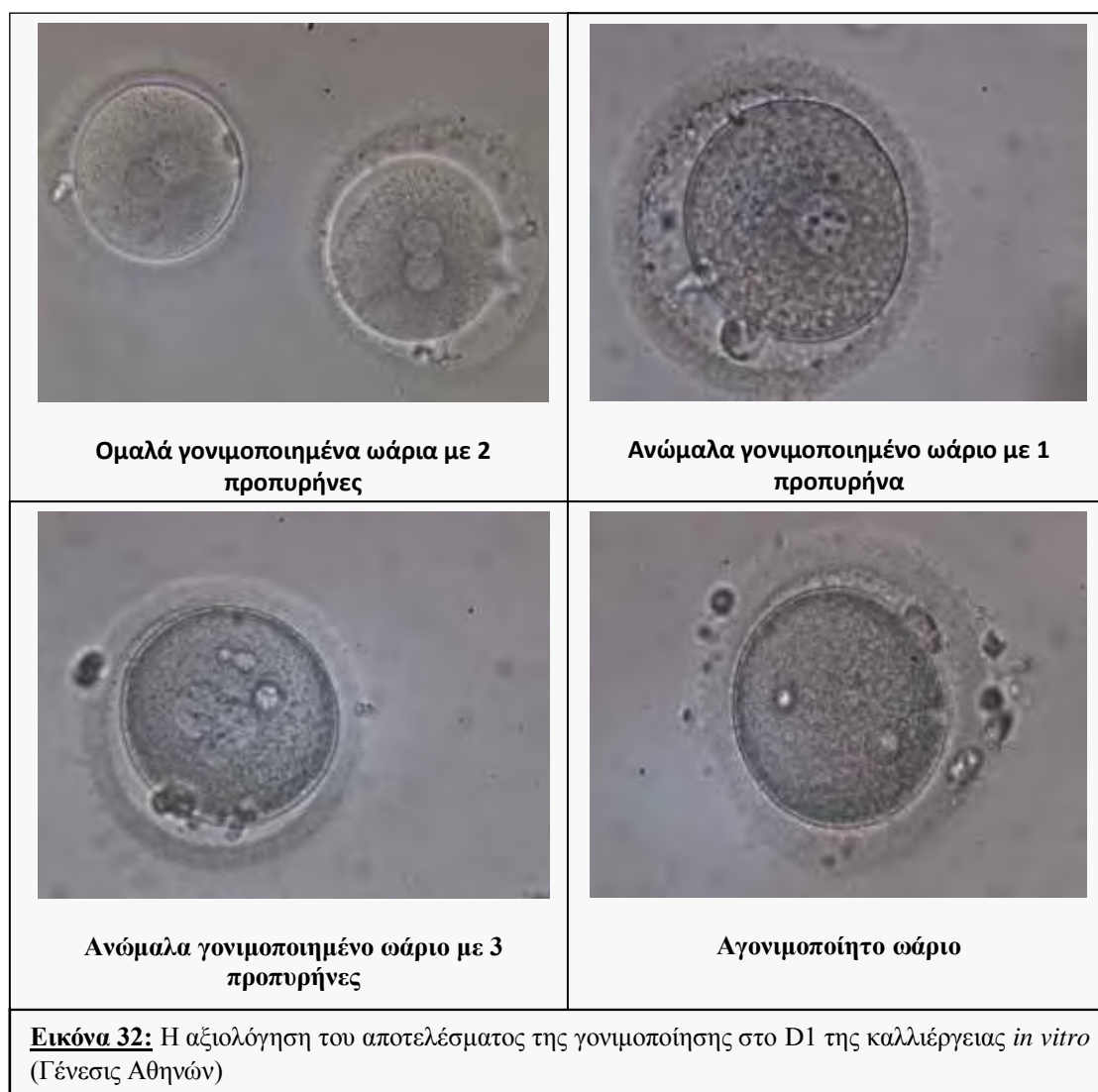
Εικόνα 30: Ανάστροφο μικροσκόπιο (Nikon), με μικροχειριστήρια για την εφαρμογή της μεθόδου γονιμοποίησης ICSI (Γένεσις Αθηνών).

Το ωάριο που ακινητοποιήθηκε με την πιπέττα συγκράτησης, τοποθετήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε το πολικό σωματίο να βρίσκεται στην ώρα 6 ή 12, σύμφωνα με τη γενική αρχή της τεχνικής (Palermo *et al*, 1992; Carrillo *et al*, 1998a). Η πιπέττα έγχυσης ICSI τρύπησε το ωάριο στην ώρα 3 και εισήλθε στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, το οποίο και αναρρόφησε με σκοπό να επέλθει η ρήξη του και στη συνέχεια τοποθέτησε το σπερματοζωάριο στο κέντρο του ωαρίου (εικόνα 31). Η διαδικασία αυτή έγινε για όλα τα ωάρια ΜΠ του κάθε περιστατικού και με την ολοκλήρωσή της, τα ωάρια μεταφέρθηκαν πάλι σε επωαστικό κλίβανο μέσα σε τρυβλίο με καλλιεργητικό υγρό G-IVF σε σταγόνες, μέχρι την επόμενη ημέρα (16-20 ώρες μετά) που έγινε η αξιολόγηση του αποτελέσματος της γονιμοποίησης (εικόνα 32).



2.2.3 Αξιολόγηση αποτελέσματος γονιμοποίησης (ημέρα πρώτη - D1)

Η αξιολόγηση του αποτελέσματος γονιμοποίησης έγινε 16-20 ώρες μετά την εφαρμογή της μεθόδου γονιμοποίησης ICSI ή απλής IVF με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου (Nikon-Eclipse 300). Τα ομαλά γονιμοποιημένα ωάρια μεταφέρθηκαν ανά 3, σε σταγόνες 20μl εξισορροπημένου καλλιεργητικού υγρού G1 (+ 5% HSA) (Vitrolife) στους 37°C και 6% CO₂, επικαλυμμένου με παραφινέλαιο, εφόσον πρώτα ξεπλύθηκαν σε εξισορροπημένο G1 υγρό για να απομακρυνθούν όποια υπολείμματα από το προηγούμενο G-IVF καλλιεργητικό υγρό υπήρχαν. Τα τρυβλία με τα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετήθηκαν σε επωαστικούς κλιβάνους τύπου MINC (Cook), οι οποίοι παρέχουν ένα μείγμα αερίου που αποτελείται από 6% CO₂, 89% N₂, και 5% O₂. Παρέμειναν εκεί μέχρι την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους (D3), περίπου 48-50 ώρες, όπου και αξιολογήθηκε η εξέλιξή τους.



2.2.4 Μέθοδος καλλιέργειας *in vitro* γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης

Τα γονιμοποιημένα ωάρια που βρίσκονταν σε επωαστικούς κλιβάνους MINC μέσα σε εξισορροπημένες σταγόνες G1 (+ 5% HSA) καλλιεργητικού υγρού, μεταφέρθηκαν την τρίτη ημέρα καλλιέργειάς τους το καθένα ξεχωριστά σε σταγόνες 80μl προ-εξισορροπημένου καλλιεργητικού υγρού G2 (+ 5% HSA) (Vitrolife) επικαλυμμένου με παραφινέλαιο (8 αριθμημένες σταγόνες ανά τρυβλίο Falcon BD 60mm). Μετά την τοποθέτησή τους στο νέο καλλιεργητικό μέσο και εφόσον πρώτα ξεπλύθηκαν με αυτό σε μία κεντρική σταγόνα, αξιολογήθηκαν ποιοτικά και τα αποτελέσματα της αξιολόγησης καταγράφηκαν αριθμητικά,

έτσι ώστε κάθε αριθμός να αντιστοιχεί σε ένα και μόνο γονιμοποιημένο ωάριο και ένα συγκεκριμένο όγκο καλλιεργητικού υγρού G2 μέσα στο οποίο αναπτυσσόταν.

Η ίδια διαδικασία αλλαγής του καλλιεργητικού υγρού των γονιμοποιημένων ωαρίων σε σταγόνες 80μl G2 (+ 5% HSA), ακολουθήθηκε και την πέμπτη ημέρα ανάπτυξής τους. Τα αριθμημένα γονιμοποιημένα ωάρια την πέμπτη ημέρα καλλιέργειάς τους, το καθένα με ξεχωριστή πιπέττα, για να μη μεταβληθεί η σύσταση της σταγόνας στην οποία αναπτύσσονταν, μεταφέρθηκαν σε αριθμημένες σταγόνες 80μl νέου προ-εξισορροπημένου G2 (+10% HSA) υγρού και η μορφολογία τους αξιολογήθηκε εκ νέου. Μετά την αξιολόγησή τους, τα γονιμοποιημένα ωάρια επέστρεψαν πάλι στους κλιβάνους MINC. Τα κριτήρια αξιολόγησης των γονιμοποιημένων ωαρίων τρίτης και πέμπτης ημέρας περιγράφονται στο παράρτημα 1.

2.2.5 Συλλογή υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού για τη μέτρηση των προς εξέταση φλεγμονωδών παραγόντων

Στο στάδιο της 5^{ης} ημέρας καλλιέργειας, δύο διαδικασίες έλαβαν μέρος. Στα περιστατικά που είχαν προγραμματιστεί να κάνουν εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων 5^{ης} ημέρας, μετά την ποιοτική τους αξιολόγηση, έγινε και η επιλογή των καταλληλότερων βλαστοκύστεων για μεταφορά. Οι αριθμημένες σταγόνες υγρού που περιείχαν τις προς μεταφορά βλαστοκύστες, συλλέχθηκαν (75μl από τη κάθε σταγόνα) με πιπέττα Gilson (p200) και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Simport 0.2ml, το καθένα κωδικοποιημένο με το νούμερο του ασθενή και το νούμερο της σταγόνας. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Στα περιστατικά που είχαν προγραμματιστεί να κάνουν εμβρυομεταφορά την 6^η ημέρα, μετά τη μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων τους σε νέο καλλιεργητικό υγρό και την ποιοτική τους αξιολόγηση την 5^η ημέρα ανάπτυξής τους, τοποθετήθηκαν πίσω στον κλίβανο MINC, μέχρι το πρωί της επόμενης μέρας. Όλες οι αριθμημένες σταγόνες καλλιεργητικού υγρού που περιείχαν τα γονιμοποιημένα ωάρια από την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους μέχρι και την πέμπτη και οι οποίες αντιστοιχούσαν σε βλαστοκύστες, συλλέχθηκαν (75μl από τη κάθε σταγόνα) με πιπέττα Gilson (p200) και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια Simport 0.2ml, το καθένα κωδικοποιημένο με το νούμερο του ασθενή και το νούμερο της σταγόνας. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Την επόμενη ημέρα το πρωί, ημέρα εμβρυομεταφοράς, μετά την επιλογή των καταλληλότερων βλαστοκύστεων για μεταφορά, τα δείγματα στην κατάψυξη διαχωρίστηκαν και τα υπόλοιπα απορρίφθηκαν.

2.2.6 Εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων στη μήτρα της γυναίκας

Η εμβρυομεταφορά κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ένα ή περισσότερα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται στη μήτρα της γυναίκας με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης. Η εμβρυομεταφορά είναι ίσως το τελευταίο, πιο κρίσιμο και σημαντικό κομμάτι των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ο θεράπων ιατρός που την εφαρμόζει οφείλει να είναι πολύ προσεκτικός ώστε τα γονιμοποιημένα ωάρια να τοποθετηθούν σωστά και ατραυματικά στην κοιλότητα της μήτρας.

Η επιλογή των βλαστοκύστεων προς μεταφορά έγινε με βάση τα μορφολογικά κριτήρια που περιγράφονται στο παράρτημα 1 και ο συνολικός αριθμός τους δεν υπερέβαινε τις 3 βλαστοκύστες. Οι βλαστοκύστες που επιλέχθηκαν για τη μεταφορά μεταφέρθηκαν με ξεχωριστές πιπέττες η κάθε μία, σε τρυβλίο με προ-εξισορροπημένες σταγόνες 20μl G2 καλλιεργητικού υγρού, εμπλουτισμένου με 10% HSA (αντί για 5% που χρησιμοποιήθηκε προηγούμενα για την καλλιέργεια) και επικαλυμμένου με παραφινέλαιο. Αυτή η τροποποίηση στην προσθήκη του HSA ήταν απαιτούμενη για να διασφαλιστεί ότι οι βλαστοκύστες, οι οποίες είναι πολύ ευαίσθητες στους εργαστηριακούς χειρισμούς, δεν θα κολλήσουν στο τρυβλίο, τον καθετήρα ή την πιπέττα κατά τη μεταφορά τους από το τρυβλίο μέχρι τη μήτρα της γυναίκας.

Για την εμβρυομεταφορά, οι βλαστοκύστες που βρίσκονταν σε νέο καλλιεργητικό υγρό G2 (+10% HSA), αναρροφήθηκαν από ένα λεπτό καθετήρα (Wallace), με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης γυάλινης σύριγγας ακριβείας (Wallace). Στη συνέχεια, ο θεράπων ιατρός πέρασε τον καθετήρα διατραχηλικά στη μητρική κοιλότητα της γυναίκας και 15μl καλλιεργητικού υγρού του καθετήρα που περιλάμβανε τις βλαστοκύστες, τοποθετήθηκαν στον πυθμένα της μήτρας. Η διαδικασία αυτή μεταφοράς των γονιμοποιημένων ωαρίων από το εργαστηριακό περιβάλλον μέχρι τη μήτρα της γυναίκας, γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και ταχύτητα ώστε να μεταβληθούν στο ελάχιστο το pH του καλλιεργητικού υγρού μέσα στο οποίο βρίσκονται οι βλαστοκύστες στον καθετήρα.

Το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς διαπιστώθηκε με μέτρηση της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (b-hCG) με εξέταση αίματος περίπου 2 εβδομάδες μετά τη μεταφορά. Στις περιπτώσεις θετικού αποτελέσματος, προγραμματίστηκε υπερηχογραφική εξέταση για τη διαπίστωση της καρδιακής λειτουργίας του εμβρύου, 2 εβδομάδες αργότερα.

2.2.7 Luminex IS 200 - Ανάλυση και μέτρηση των κυτταροκινών IL6 και IL1β στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα

Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό μέσα στο οποίο βρίσκονταν οι βλαστοκύστες μέχρι και πριν τη μεταφορά τους, αρχικά συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.5 και έπειτα αναλύθηκε με χρήση του συστήματος Luminex και της τεχνολογίας x-MAP. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω, ενώ τα αναλώσιμα υλικά και τα αντιδραστήρια περιγράφονται λεπτομερώς στο παράρτημα 4 και στην παράγραφο 2.1.9.

Αρχή της μεθόδου



Μικροσφαιρίδια καλυμμένα με αντισώματα έναντι των ζητούμενων ιντερλευκινών επωάζονται με τα εξεταστέα δείγματα και τα standards μέσα σε θέσεις ειδικής πλάκας με φίλτρο στον πυθμένα. Κατά τη διάρκεια της επώασης (2 ώρες) οι ιντερλευκίνες συνδέονται με τα αντίστοιχα αντισώματα.

Ακολουθεί έκπλυση των μικροσφαιριδίων και προστίθεται ειδικό για τις ζητούμενες ιντερλευκίνες βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης, το οποίο συνδέεται με τις δεσμευμένες πάνω στα σφαιρίδια ιντερλευκίνες.

Ακολουθεί μία ακόμα έκπλυση για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντιδραστηρίων και προστίθεται στρεπταβιδίνη-R PhycoErythrin, η οποία δεσμεύεται στο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης, το οποίο έχει ήδη συνδεθεί με την ιντερλευκίνη που βρίσκεται συνδεδεμένη με το αντίσωμά της πάνω στο σφαιρίδιο. Μετά την τελευταία έκπλυση για την απομάκρυνση της αδέσμευτης στρεπταβιδίνης-RPE, τα σφαιρίδια αναλύονται στο σύστημα Luminex με βάση τον εσωτερικό και εξωτερικό φθορισμό τους.

Εικόνα 33: Αρχή της μεθόδου λειτουργίας της x-MAP τεχνολογίας

Μέτρηση IL1β και IL6 στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά

Το πρωτόκολλο που παρατίθεται στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κυτταροκινών IL1β και IL6 στα καλλιεργητικά υλικά των βλαστοκύστεων που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά της κάθε ασθενούς της μελέτης. Σε κάθε μέτρηση, καμπύλη 8 βαθμονομητών (standards) ήταν απαραίτητη για τη λήψη των αποτελεσμάτων.

A) Προετοιμασία

1.Παρασκευή διαλύματος πλύσης (WWS Working wash solution): Αραίωση του συμπυκνωμένου 20x διαλύματος πλύσης (Wash Solution Concentrate 15ml) με 285 ml απεσταγμένου H₂O.

2.Παρασκευή διαλύματος αραίωσης δειγμάτων (Assay Diluent) / υλικού καλλιέργειας (G2) (AD/G2) σε αναλογία 1:1

3.Ανασύσταση standard: προσθήκη 1 ml διαλύματος AD/G2 στο σωληνάριο με το λυοφιλοποιημένο standard. Επώση σε ηρεμία και θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά. Ελαφρά ανάδευση, επώση σε ηρεμία και θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Άμεση χρήση.

4.Παρασκευή αραιώσεων standards: χρησιμοποιώντας το σωληνάριο με το ανασυσταμένο standard ως αυτό με τη μέγιστη συγκέντρωση (οι συγκεντρώσεις αυτές παρέχονται από τον κατασκευαστή και συνοδεύουν κάθε σωληνάριο – το ίδιο σωληνάριο περιέχει IL1β και IL6) γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με διάλυμα AD/G2, έτσι ώστε να ληφθούν τελικά 8 standards διαφορετικών συγκεντρώσεων (το standard μηδενικής συγκέντρωσης ή background αποτελείται μόνο από AD/G2).

5.Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος μικροσφαιριδίων καλυμμένων με αντισώματα έναντι των κυτταροκινών IL1β και IL6 (Antibody beads). Οι απαιτούμενες ποσότητες WWS και μικροσφαιριδίων, αμέσως πριν τη χρήση προστέθηκαν σε σκουρόχρωμο σωληνάριο ή σωληνάριο καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των θέσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην πλάκα (αριθμός δειγμάτων και standards – τα standards μετρούνται εις διπλούν). Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τις ποσότητες με τις οποίες τα διαφορετικά αντιδραστήρια προστέθηκαν στην πλάκα. Πριν τη χρήση του συμπυκνωμένου ή αραιωμένου διαλύματος μικροσφαιριδίων πραγματοποιήθηκε έντονο vortex για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση στο λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά.

Antibody beads IL-6	2.5 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
Antibody beads IL-1b	2.5 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
WWS	22,5 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
Πίνακας 2: Ποσότητες με τις οποίες τα διαφορετικά αντιδραστήρια προστέθηκαν στην πλάκα.		

6. Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος βιοτινυλιωμένου αντισώματος ανίχνευσης. Οι απαιτούμενες ποσότητες αραιωτικού βιοτίνης, αμέσως πριν τη χρήση προστέθηκαν σε σωληνάριο, ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των θέσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην πλάκα (αριθμός δειγμάτων και standards – τα standards μετρούνται εις διπλούν). Ο πίνακας 3 αναδεικνύει τις ποσότητες αραιωτικού βιοτίνης (Biotin Diluent) και αντισωμάτων ανίχνευσης, οι οποίες προστέθηκαν στην πλάκα.

Biotinylated Detector Antibody IL-6	10 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
Biotinylated Detector Antibody IL-1b	10 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
Biotin Diluent	90 µl	X συνολικό αριθμό θέσεων
Πίνακας 3: Ποσότητες με τις οποίες το αραιωτικό βιοτίνης και τα αντισώματα ανίχνευσης προστέθηκαν στην πλάκα.		

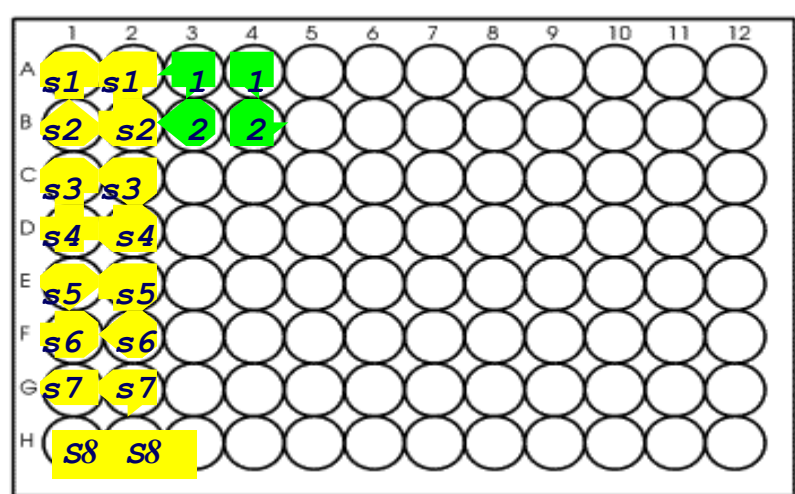
7.Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος στρεπταβιδίνης-RPE. Η απαιτούμενη ποσότητα αραιωτικού RPE (RPE diluent), αμέσως πριν τη χρήση προστέθηκε σε σκουρόχρωμο σωληνάριο ή σωληνάριο καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των θέσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην πλάκα (αριθμός δειγμάτων και standards – τα standards μετρούνται εις διπλούν). Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις ποσότητες αραιωτικού RPE (RPE diluent) και στρεπταβιδίνης-RPE που συμπεριλήφθησαν στην πλάκα.

Στρεπταβιδίνης-RPE	10 μ l	X συνολικό αριθμό θέσεων
RPE Diluent	100 μ l	X συνολικό αριθμό θέσεων

Πίνακας 4: Ποσότητες RPE και RPE diluent που συμπεριλήφθησαν στην πλάκα.

B) Κυρίως Πρωτόκολλο

Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ειδική πλάκα 96 θέσεων με φίλτρο (Millipore filterplate, 1.2 μ) (εικόνα 34).



Εικόνα 34: Σχεδιάγραμμα τοποθέτησης standards και εξεταζόμενων δειγμάτων στην πλάκα

Οι θέσεις της πλάκας που δεν χρησιμοποιήθηκαν καλύφθηκαν με αυτοκόλλητο σκέπασμα.

1. Προσθήκη 200μl WWS στις χρησιμοποιούμενες θέσεις. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
2. Vortex για 30 δευτερόλεπτα των αραιωμένων μικροσφαιριδίων. Τοποθέτηση στο λουτρό υπερήχων για 30 δευτερόλεπτα.
3. Προσθήκη 25μl αραιωμένων μικροσφαιριδίων στις χρησιμοποιούμενες θέσεις.
4. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
5. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
6. Τοποθέτηση της πλάκας σε χαρτοπετσέτα για 15-30 δευτερόλεπτα.
7. Προσθήκη 50μl διαλύματος επώασης (Incubation buffer).
8. Προσθήκη 100μl από κάθε αραιώση στις αντίστοιχες θέσεις των standards.
9. Προσθήκη 50μl διαλύματος αραιώσης (Assay diluent) στις θέσεις που αντιστοιχούσαν στα δείγματα.
10. Προσθήκη 50μl δείγμα στις θέσεις που αντιστοιχούσαν στα δείγματα.
11. Κάλυψη της πλάκας με σκέπασμα καλυμμένο με αλουμινόχαρτο.
12. Επώαση στο σκοτάδι για 2 ώρες σε ανακινούμενη πλάκα.
13. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
14. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
15. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
16. Τοποθέτηση της πλάκας σε χαρτοπετσέτα για 15-30 δευτερόλεπτα.
17. Προσθήκη 100μl αραιωμένου διαλύματος βιοτινυλιωμένου αντισώματος ανίχνευσης σε όλες τις θέσεις.
18. Επώαση στο σκοτάδι για 1 ώρα σε ανακινούμενη πλάκα.
19. Εκκίνηση του συστήματος Luminex
20. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
21. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
22. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
23. Τοποθέτηση της πλάκας σε χαρτοπετσέτα για 15-30 δευτερόλεπτα.
24. Προσθήκη 100μl αραιωμένου διαλύματος στρεπταβιδίνης-RPE σε όλες τις θέσεις.
25. Επώαση στο σκοτάδι για 30 λεπτά σε ανακινούμενη πλάκα.

26. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
27. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
28. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
29. Προσθήκη 200μl WWS. Επώαση για 15-30 δευτερόλεπτα. Αναρρόφηση σε αντλία κενού.
30. Τοποθέτηση της πλάκας σε χαρτοπετσέτα για 15-30 δευτερόλεπτα.
31. Προσθήκη 100μl WWS σε όλες τις θέσεις.
32. Επώαση στο σκοτάδι για 2-3 λεπτά σε ανακινούμενη πλάκα

Γ) Μέτρηση

Τοποθέτηση της πλάκας στο σύστημα Luminex και ανάλυση σύμφωνα με προεπιλεγμένο πρωτόκολλο μέτρησης. Ο προγραμματισμός του λογισμικού του συστήματος Luminex για τη μέτρηση και την ανάλυση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα από την κατασκευάστρια εταιρία πρωτόκολλα.

Για μετάφραση των μετρούμενων τιμών μέσης έντασης φθορισμού (MFI) σε pg/ml, χρησιμοποιήθηκε καμπύλη 5 παραμέτρων (5-parameter logistics curve).

Κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου αποφεύχθηκε η άμεση και παρατεταμένη έκθεση των μικροσφαιριδίων στο φως.

Τα αποτελέσματα κάθε μέτρησης καταγράφηκαν, αναλύθηκαν και παρατίθενται στο επόμενο κεφάλαιο (2.3 Αποτελέσματα).

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 Αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκαν και μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη - Επιλογή των κατάλληλων γραφημάτων για την απόδοση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων – Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με σκοπό να απαντήσει σε τρία βασικά ερωτήματα. Αρχικά διερευνήθηκε το αν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό εμφύτευσης και κλινικών κύσεων μετά από εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών, έπειτα αν οι βλαστοκύστες αυτές εκκρίνουν, πριν την μεταφορά τους στη μήτρα, φλεγμονώδεις παράγοντες και τέλος αν οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης μετά την εμβρυομεταφορά.

Οι φλεγμονώδεις παράγοντες που επιλέχθηκαν να μετρηθούν, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο είναι οι ιντερλευκίνες IL6 και IL1β. Το σύνολο των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη αυτή είναι 300 και τα δείγματα που συλλέχθηκαν είναι 845. Από τις 300 ασθενείς και τα 845 δείγματα, τελικά μετρήθηκαν μόνο τα 683 που αντιστοιχούν σε 245 γυναίκες (πίνακας 5), διότι ο τρόπος συλλογής των υπολοίπων δεν ανταποκρινόταν στις προδιαγραφές των kits που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των IL-6 και IL-1β. Για τη μέτρηση των κυτταροκινών με το σύστημα LumineX, ήταν αναγκαίος όγκος δείγματος μεγαλύτερος από 50μl, ενώ η καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων στα εργαστήρια εμβρυολογίας συνήθως γίνεται σε σταγόνες καλλιεργητικού υλικού όγκου 25μl. Η αύξηση του όγκου της σταγόνας καλλιέργειας, έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές των kits, είχε σαν αποτέλεσμα την έλλειψη σταθερότητάς τους, με επακόλουθο τη μετακίνηση καλλιεργητικού υγρού από τη μία σταγόνα στην άλλη και την απόκλιση τελικά 162 δειγμάτων από τις μετρήσεις.

Η ιδέα της κατηγοριοποίησης των γυναικών ανά ηλικία, πρωτόκολλο διέγερσης ή αιτία υπογονιμότητας εγκαταλείφτηκε εξ αρχής, διότι ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να βρεθεί ένα επιπλέον κριτήριο αξιολόγησης των βλαστοκύστεων αντίστοιχο σε διαγνωστική και κλινική αξία και εφαρμογή με αυτό της μορφολογίας των γονιμοποιημένων ωαρίων. Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν, ανεξάρτητα από τη φυσιολογία της γυναίκας και την αιτία υπογονιμότητας του ζευγαριού, να βρεθεί ένα ακόμα κριτήριο, το οποίο είτε παράλληλα με τα μορφολογικά κριτήρια των γονιμοποιημένων ωαρίων, είτε μεμονωμένα, να αποτελέσει δείκτη επιλογής της καταλληλότερης βλαστοκύστης για μεταφορά στη μήτρα της γυναίκας. Κατά συνέπεια τα γραφήματα που έχουν παρατεθεί παρακάτω συμπεριλαμβάνουν

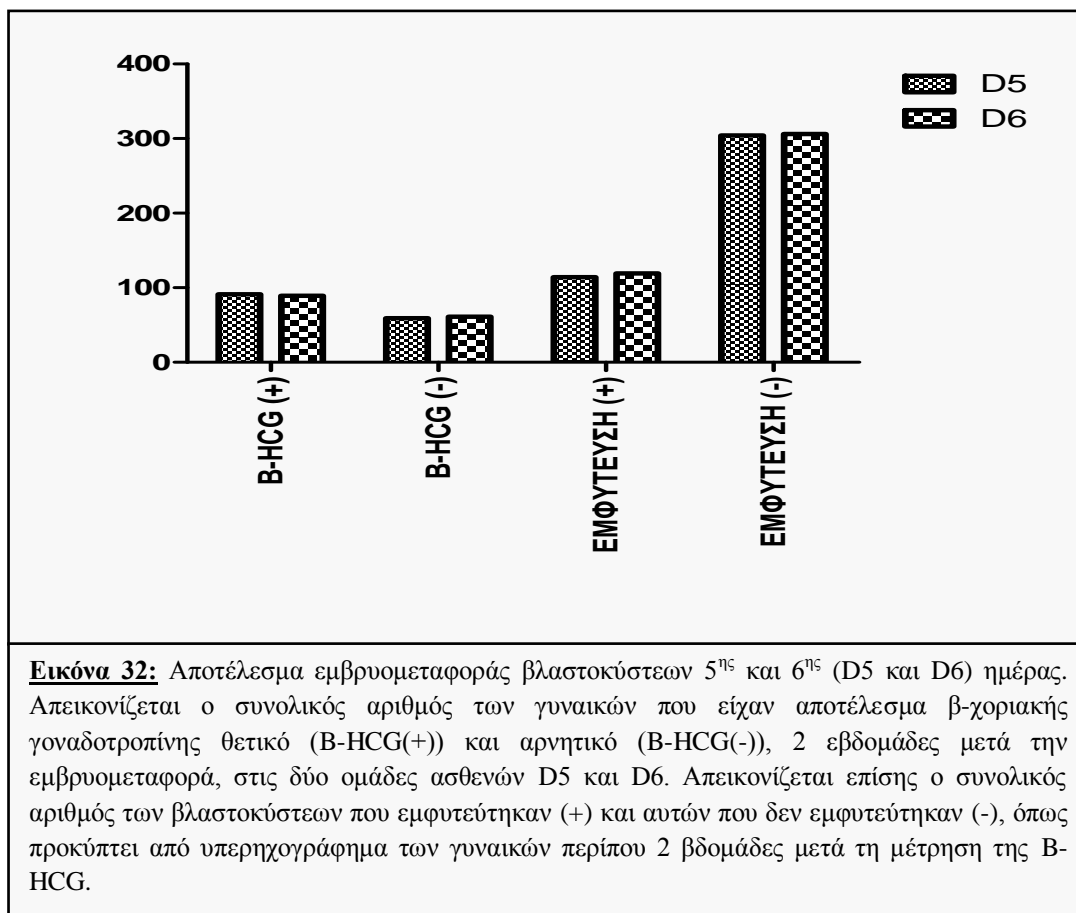
το σύνολο των γυναικών που έλαβαν μέρος στη μελέτη και δεν υπάρχει περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους.

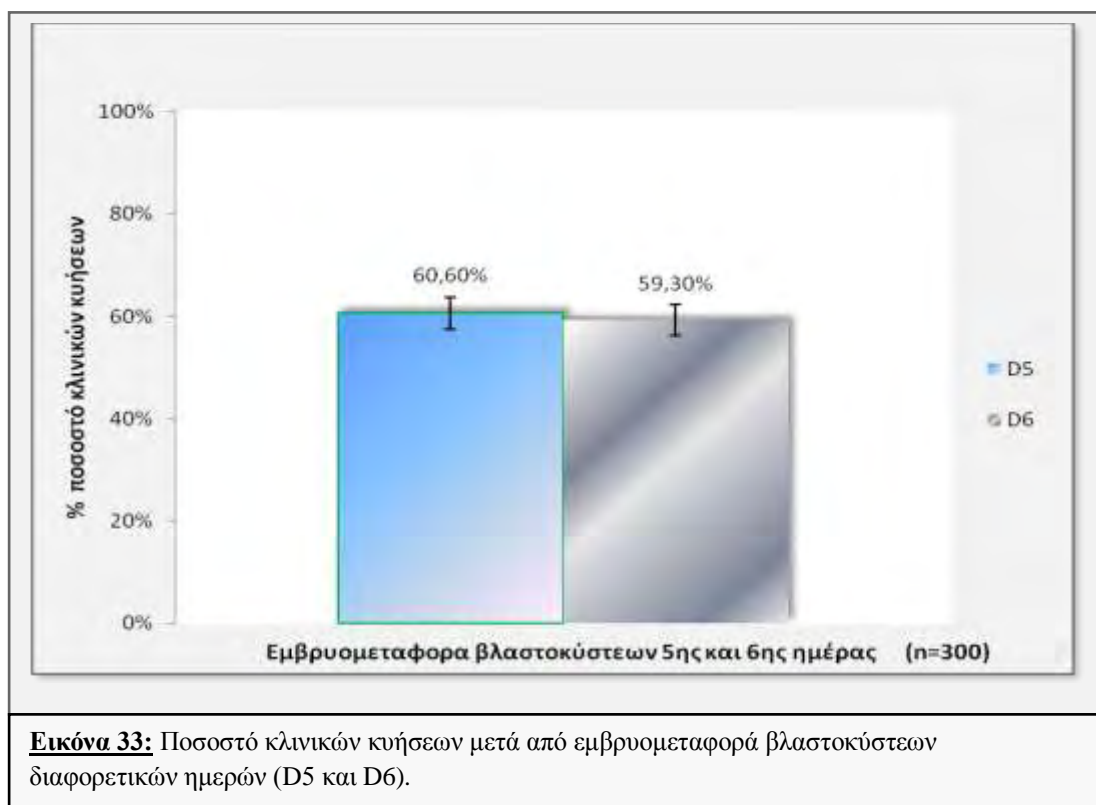
Ασθενείς μελέτης (σύνολο)	300
Δείγματα (σύνολο)	845
Ασθενείς -μέτρηση IL1b & IL6	245
Δείγματα μέτρησης IL1b & IL6	683
Βλαστοκύστες στην ET (σύνολο)	683
Βλαστοκύστες που εμφυτεύθηκαν	182 (26,6%)
Βλαστοκύστες ανά ET	2,81
Πίνακας 5: Συνοπτική εικόνα των μεγεθών των ασθενών και των δειγμάτων προς ανάλυση της παρούσας μελέτης.	

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα GraphPad Prism 5 και τα tests που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική συμπερασματολογία είναι τα Mann-Whitney U test, Chi-square test και 1-way ANOVA test. Η πιθανότητα $P < 0.05$ χρησιμοποιήθηκε για να υποδείξει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Στα γραφήματα που παρατίθενται παρακάτω έχει υπολογιστεί και το SEM (τυπικό σφάλμα εκτίμησης του μέσου) το οποίο δείχνει τη διακύμανση της δειγματικής κατανομής και ως εκ τούτου είναι ένα μέτρο του σφάλματος εκτίμησης της πληθυσμιακής τιμής. Το παράρτημα 6 παραθέτει τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων των αποτελεσμάτων.

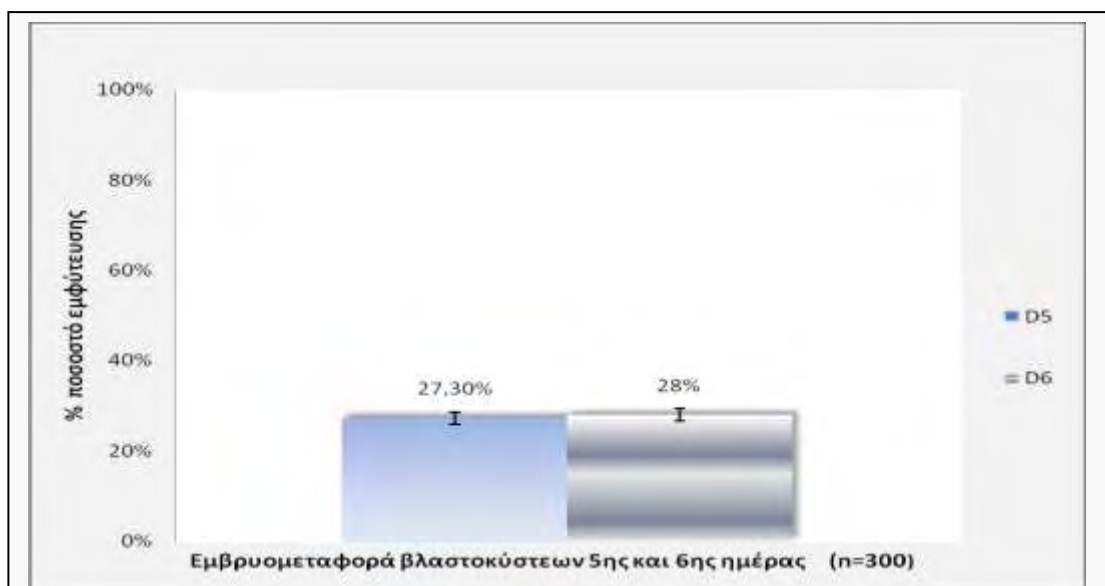
2.3.2 Σύγκριση αποτελέσματος εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών (5^{ης} και 6^{ης} ημέρας)

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 300 ασθενείς οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν τυχαιοποιημένα σε δύο ομάδες. Η κάθε ομάδα αποτελείτο από 150 ασθενείς των οποίων η εμβρυομεταφορά προγραμματίστηκε την πέμπτη ή την έκτη ημέρα αντίστοιχα των γονιμοποιημένων ωαρίων τους. Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους για την ύπαρξη διαφοράς στο ποσοστό κύησης και εμφύτευσης και τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις (εικόνες 32, 33, 34, 35, 36).





Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) στο ποσοστό κύησης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων D5 και D6. Η εικόνα 34 υποδεικνύει επίσης ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εμφύτευσης ($P > 0.05$) μετά από εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας. Συνεπώς, η πρώτη υπόθεση μπορεί να διατυπωθεί, με βάση την οποία αν κατά την εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων 6^{ης} ημέρας συμπεριλαμβάνονται γονιμοποιημένα ωάρια, τα οποία έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων ήδη από την 5^η ημέρα (κριτήρια ένταξης στη μελέτη, βλέπε κεφάλαιο 2.1.2), τότε το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ότι έχει να κάνει με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης, είναι ίδιο με αυτό της 5^{ης} ημέρας.



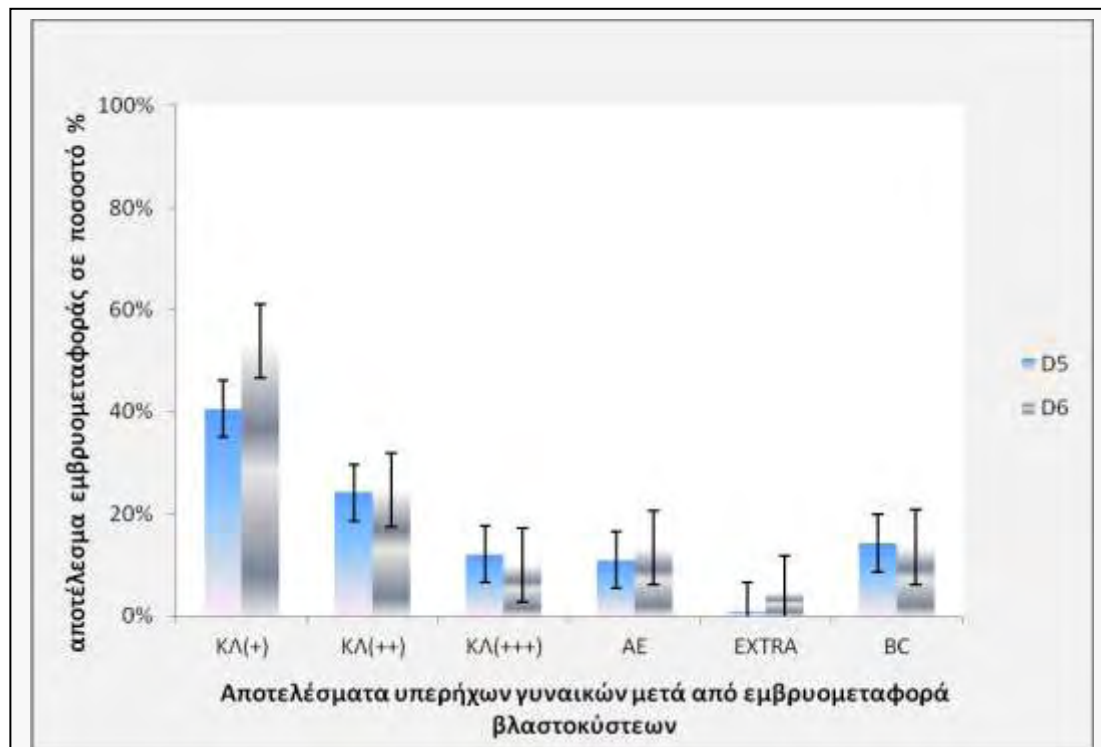
Εικόνα 34: Ποσοστό εμφύτευσης μετά από εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών (D5 και D6)



Εικόνα 35: Αποτέλεσμα κύσεων γυναικών μετά από τη μέτρηση της β-hCG και τον υπέρηχο των γυναικών 2-3 εβδομάδες μετά. Στο γράφημα απεικονίζεται ο συνολικός αριθμός των γυναικών στις κατηγορίες D5 και D6 με αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς: ΚΛ(+)=1 σάκος, 1 καρδιακή λειτουργία, ΚΛ(++)=2 σάκοι, 2 καρδιακές λειτουργίες, ΚΛ(+++)= 3 σάκοι, 3 καρδιακές λειτουργίες, ΑΕ= αποβολή, EXTRA= εξωμήτρια κύηση, BC= βιοχημική κύηση.

Οι εικόνες 35 και 36 δείχνουν το αποτέλεσμα των υπερηχογραφημάτων των γυναικών, δύο περίπου εβδομάδες μετά τη μέτρηση της β-hCG και επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση. Σε όλες τις υποομάδες που παρατίθενται και οι οποίες αναφέρονται στα αποτελέσματα

κνήσεων του συνόλου των γυναικών που συμπεριλήφθησαν στην παρούσα μελέτη, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών D5 και D6 ($P>0.05$ σε όλες τις υποομάδες).

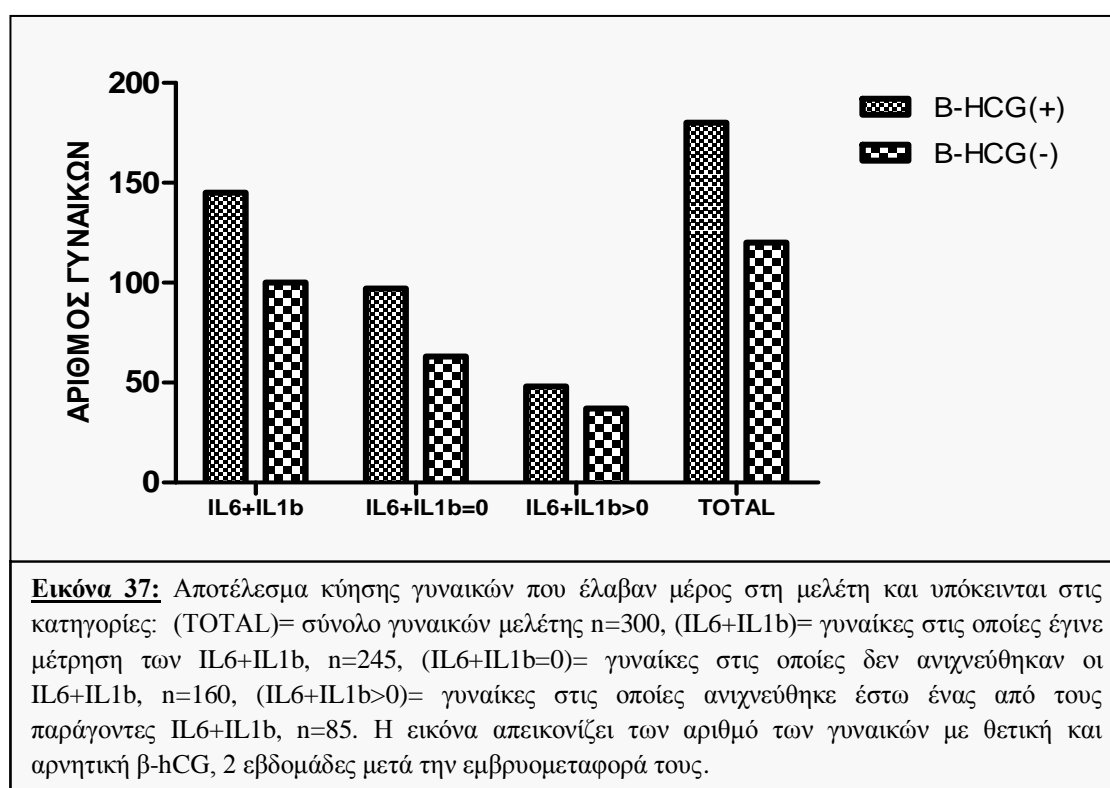


Εικόνα 36: Ποσοστά αποτελεσμάτων κύησης στις ομάδες D5 και D6 όπως αναφέρθηκαν μετά από μέτρηση της β-hCG σε συνδυασμό με το υπερηχογράφημα των γυναικών 2-3 περίπου εβδομάδες μετά. ΚΛ(+)=1 σάκος, 1 καρδιακή λειτουργία, ΚΛ(++)=2 σάκοι, 2 καρδιακές λειτουργίες, ΚΛ(+++)= 3 σάκοι, 3 καρδιακές λειτουργίες, ΑΕ= αποβολή, EXTRA= εξωμήτρια κύηση, BC= βιοχημική κύηση.

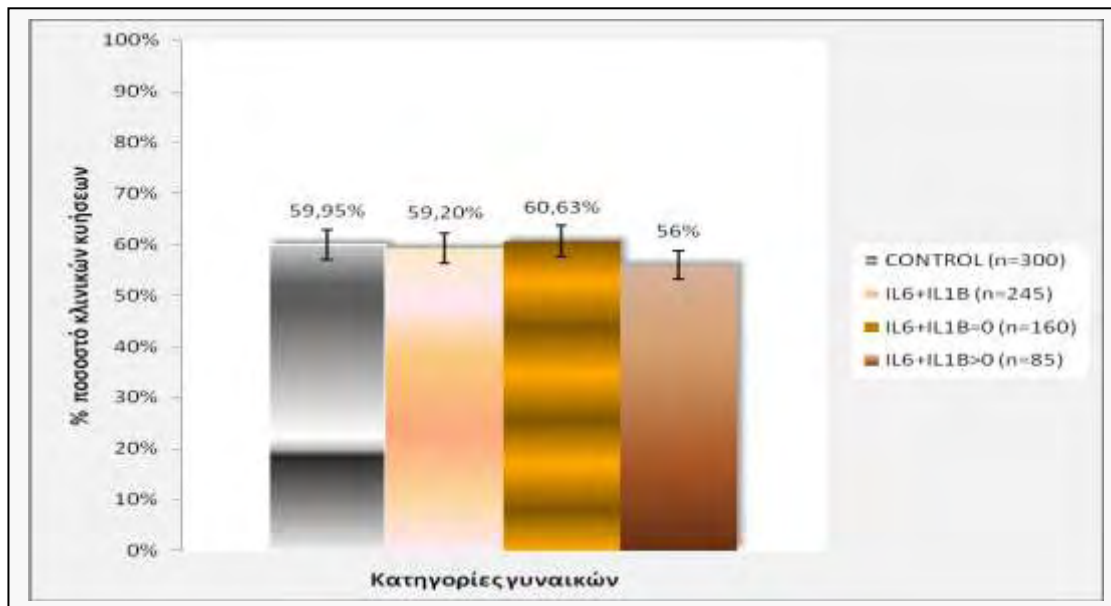
Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις και αποτελέσματα, η μελέτη και ανάλυση των μετρήσεων των φλεγμονωδών παραγόντων που εκλύονται από βλαστοκύστες πριν την εμβρυομεταφορά τους, δεν συσχετίστηκαν με την ημέρα της προγραμματισμένης μεταφοράς τους (5^η και 6^η ημέρα), διότι δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ημερών. Ως εκ τούτου, όλες οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα, χωρίς περαιτέρω κατηγοριοποίηση.

2.3.3 Σύγκριση αποτελέσματος εμβρυομεταφοράς μεταξύ ομάδων γυναικών όπως διαμορφώθηκαν μετά τη μέτρηση των ιντερλευκινών IL6 και IL1β στα υπερκείμενα υγρά των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα τους.

Από τις 300 γυναίκες που έλαβαν μέρος στη μελέτη, μόνο στις 245 γυναίκες έγινε επιτυχής συλλογή του υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού των βλαστοκύστεων που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά τους. Από αυτές, στις 160 δεν ανιχνεύθηκαν οι παράγοντες IL6 και IL1β (η μέτρηση ήταν μηδενική) σε κανένα από τα υπερκείμενα υγρά (που αντιστοιχούν σε βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν) και μόνο στις 85 γυναίκες, υπήρξε έστω μία μέτρηση που ήταν μεγαλύτερη του μηδενός σε κάποιον από τους δύο παράγοντες.



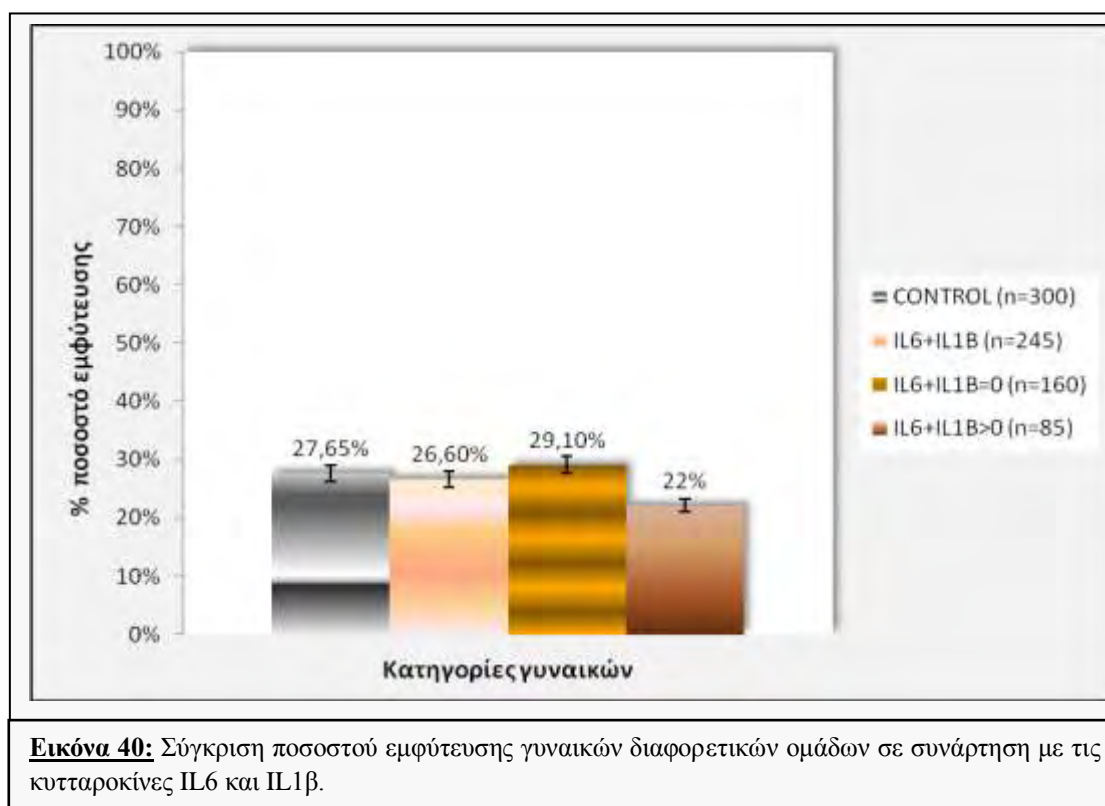
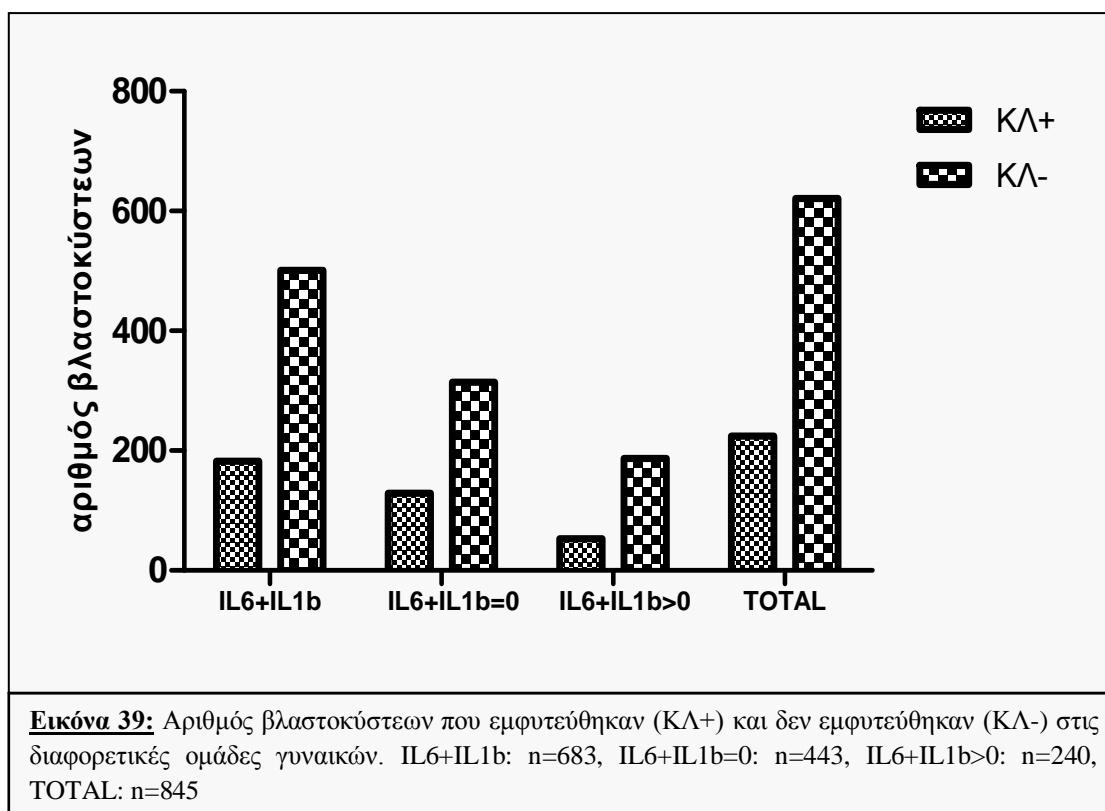
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) στο ποσοστό κύησης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων γυναικών της μελέτης. Η εικόνα 38 αναδεικνύει το συμπέρασμα αυτό παραθέτοντας τα ποσοστά κύησης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.



Εικόνα 38: Ποσοστά κύησης γυναικών σε συνάρτηση με τις κυτταροκίνες IL6 και IL1β. (TOTAL)=σύνολο γυναικών μελέτης, (IL6+IL1b)= γυναίκες στις οποίες έγινε μέτρηση των IL6+IL1b, (IL6+IL1b=0)= γυναίκες στις οποίες δεν ανιχνεύθηκαν οι IL6+IL1b, (IL6+IL1b>0)= γυναίκες στις οποίες ανιχνεύθηκε έστω ένας από τους παράγοντες IL6+IL1b.

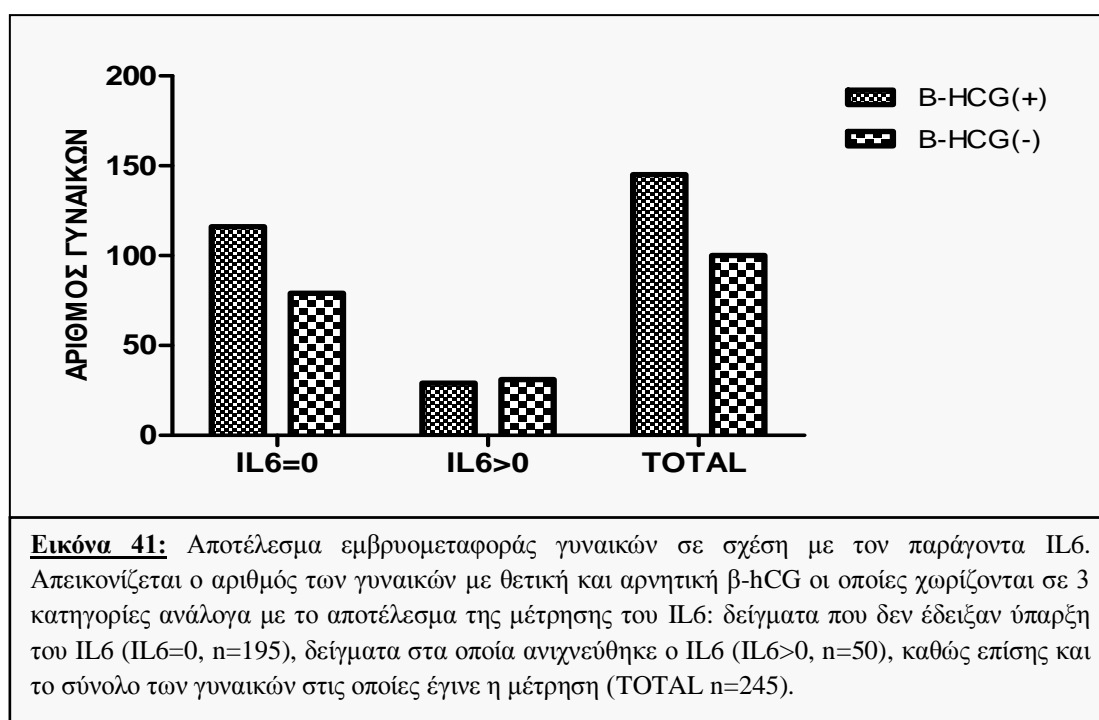
Η σύγκριση των ποσοστών εμφύτευσης (εικόνες 39, 40) επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση και οδηγεί στο πρώτο συμπέρασμα αναφορικά με τις κυτταροκίνες IL6 και IL1β και την επίδρασή τους στην εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι η έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα δεν σχετίζεται με τη βιωσιμότητα και την ικανότητα εμφύτευσης των βλαστοκύστεων αυτών.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων εμφύτευσης στις 4 διαφορετικές ομάδες που απεικονίζονται στις εικόνες 39 και 40 επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) μεταξύ τους. Συνεπώς μία ακόμα υπόθεση μπορεί να διατυπωθεί σε σχέση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων και με βάση την οποία, η έκκριση των κυτταροκινών IL6 και IL1β από βλαστοκύστες πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα, δεν φαίνεται να σχετίζεται με το ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης αργότερα. Η υπόθεση αυτή χρειάζεται επιπλέον έλεγχο και ανάλυση για να τεκμηριωθεί και οι επόμενες παράγραφοι θα ασχοληθούν με την περαιτέρω διερεύνησή της.

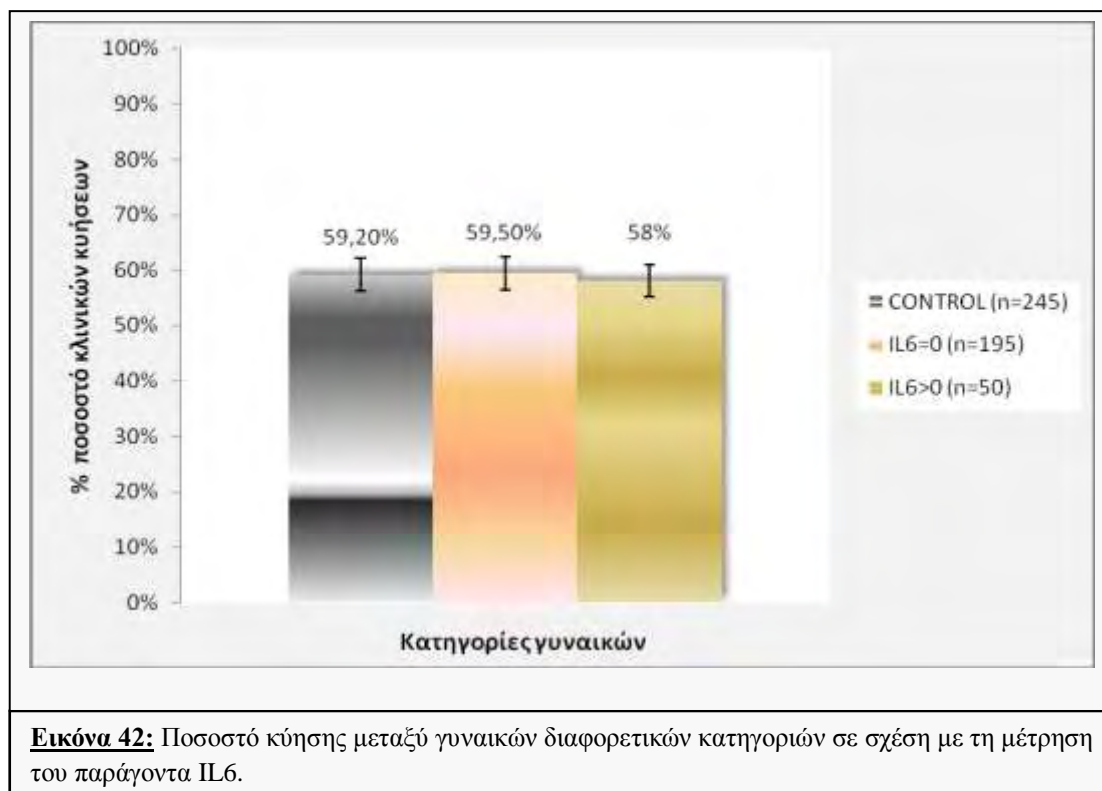


2.3.4 Αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς γυναικών σε συνάρτηση με τον φλεγμονώδη παράγοντα IL6.

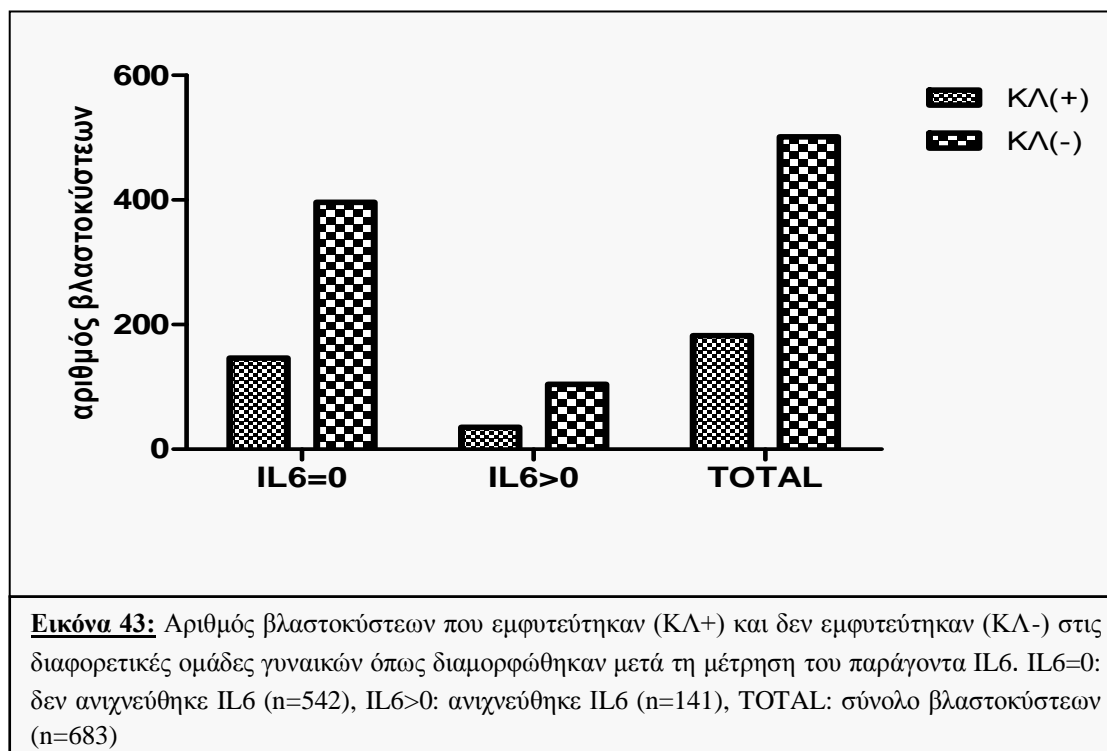
Από τις 245 γυναίκες (683 δείγματα) στις οποίες έγινε η μέτρηση του παράγοντα IL6, στις 195 (542 δείγματα) δεν ανιχνεύθηκε ο παράγοντας και μόνο στις 50 (141 δείγματα) η τιμή του ήταν μεγαλύτερη του μηδενός. Τα στοιχεία αυτά είναι ανεξάρτητα από τις τιμές που έλαβε ο δεύτερος παράγοντας που μελετήθηκε (IL1β). Τα ποσοστά κύησης και εμφύτευσης ανάμεσα στις κατηγορίες αυτές των γυναικών μετρήθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους και τα αποτελέσματα παρατίθενται στις παρακάτω εικόνες.

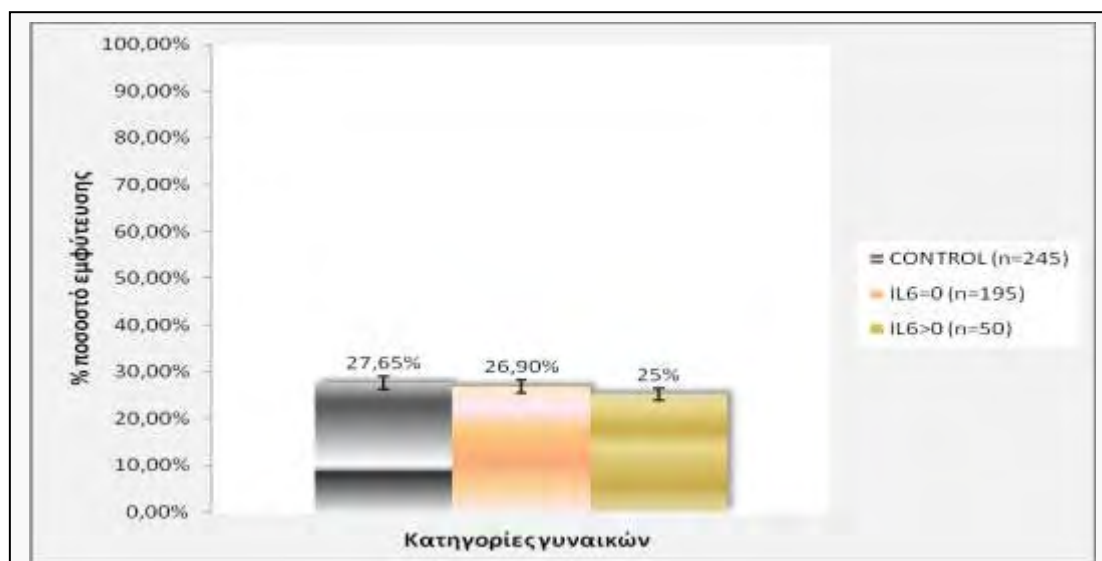


Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε και πάλι την απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($P>0.05$). Το ποσοστό κλινικών κυήσεων των αντίστοιχων κατηγοριών παρουσιάζεται στην εικόνα 42 και αποτελεί μία ακόμα ένδειξη στην απουσία διαφοράς μεταξύ των τριών κατηγοριών των γυναικών.



Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται και το αποτέλεσμα εμφύτευσης μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών των γυναικών σε συνάρτηση πάλι με τον παράγοντα IL6 (εικόνα 43, 44).



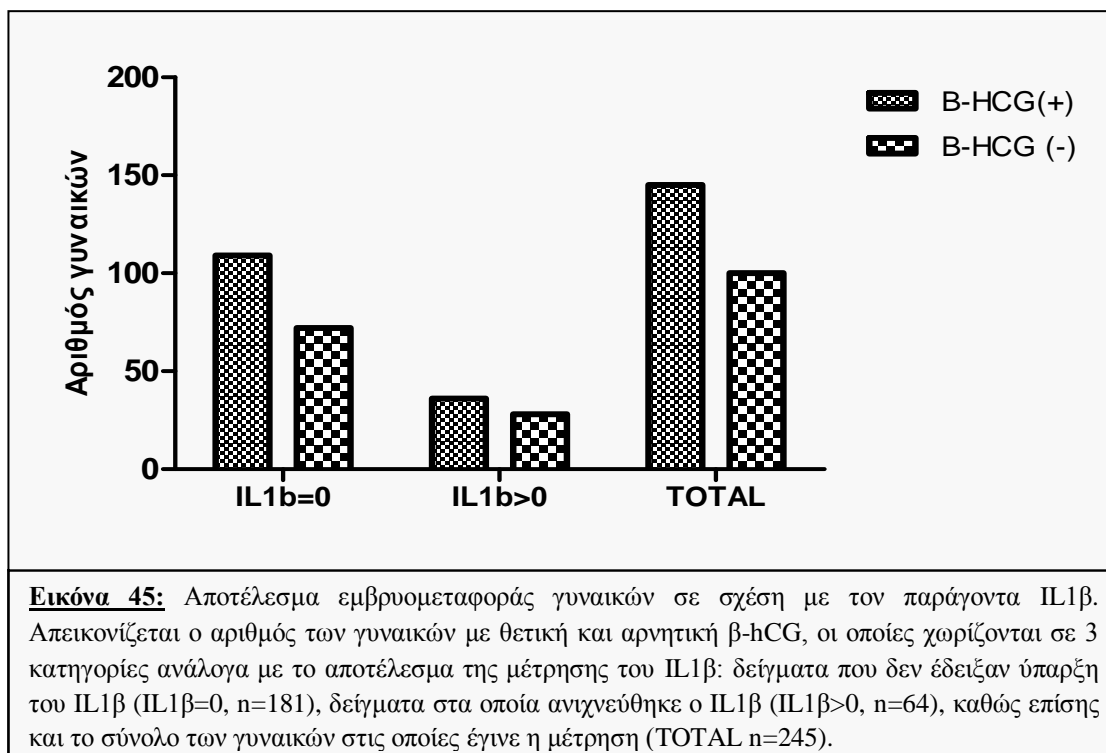


Εικόνα 44: Ποσοστό εμφύτευσης γυναικών διαφορετικών κατηγοριών όπως διαμορφώθηκαν μετά τη μέτρηση του παράγοντα IL6.

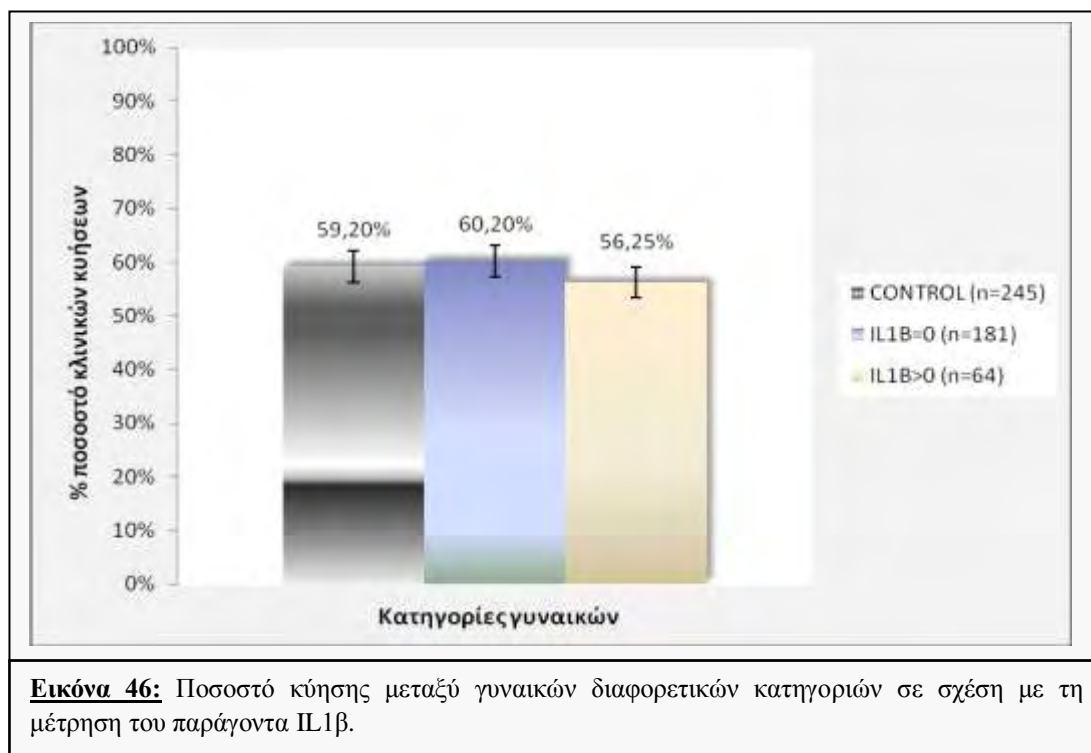
Τα αποτελέσματα εμφύτευσης βλαστοκύστεων μετά την εμβρυομεταφορά τους όπως παρατίθενται στις εικόνες 43 και 44, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) και επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι η έκκριση της ιντερλευκίνης IL6 από τις προς μεταφορά βλαστοκύστες, δεν φαίνεται να επηρεάζει το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης. Ως εκ τούτου, όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη, η έκκριση του φλεγμονώδη παράγοντα IL6 δεν επηρεάζει την εμφυτευτική ικανότητα και βιωσιμότητα των βλαστοκύστεων.

2.3.5 Αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς γυναικών σε συνάρτηση με τον φλεγμονώδη παράγοντα IL-1β.

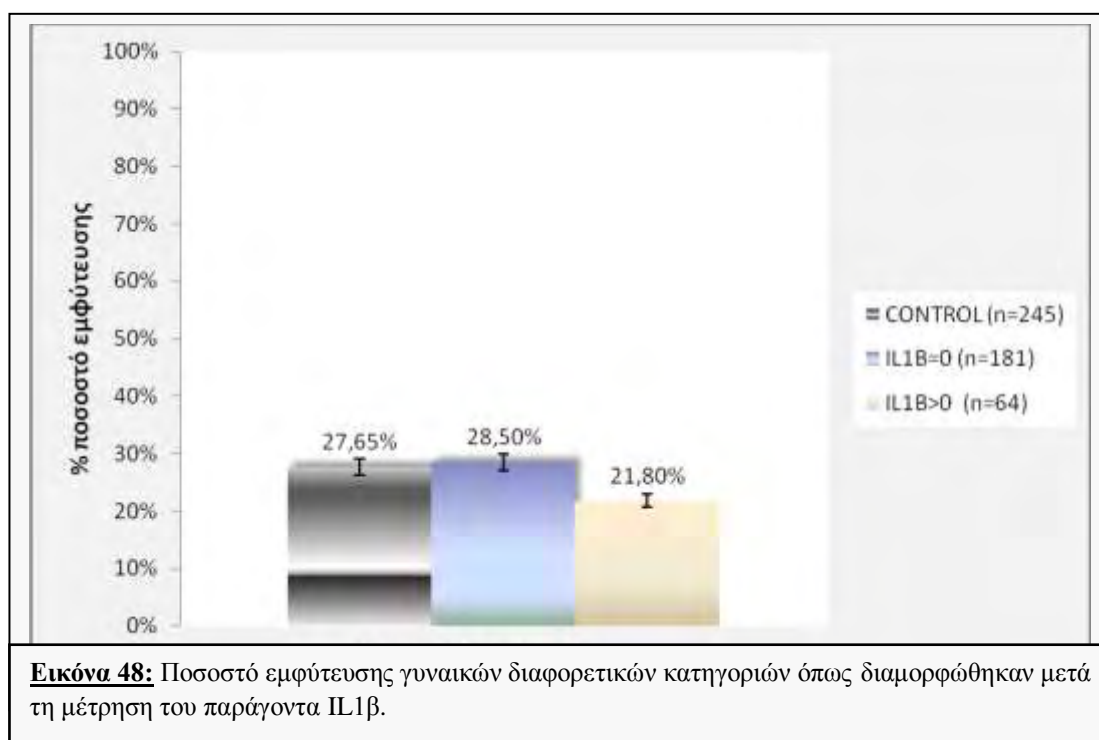
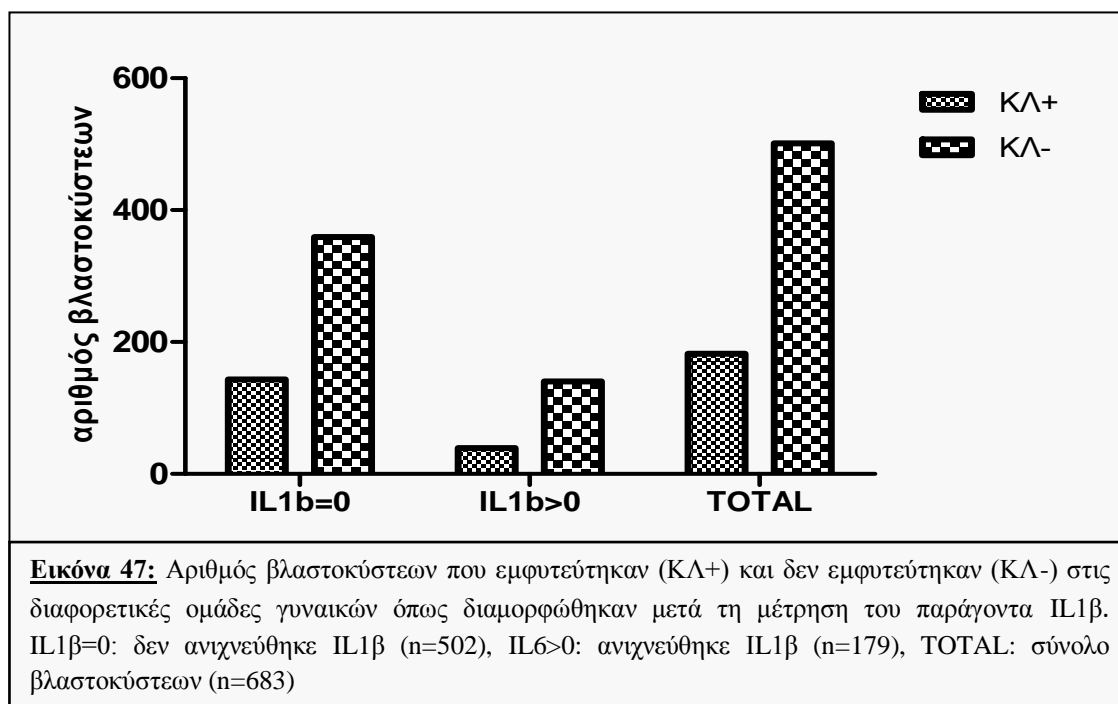
Από τις 245 γυναίκες (683 δείγματα) στις οποίες έγινε η μέτρηση του υπερκείμενου υγρού των βλαστοκύστεων που συμπεριλήφθηκαν στην εμβρυομεταφορά τους, μόνο στις 64 γυναίκες (179 δείγματα) έγινε ανίχνευση της ιντερλευκίνης IL1β έστω σε ένα από τα δείγματά τους (έστω σε μία από τις βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν). Στις υπόλοιπες 181 γυναίκες (504 δείγματα) δεν ανιχνεύθηκε ο παράγοντας IL1β. Τα στοιχεία αυτά είναι ανεξάρτητα από τις τιμές που έλαβε η ιντερλευκίνη IL6 για τα ίδια δείγματα. Οι εικόνες 45, 46, 47 και 48 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων και αναδεικνύουν την επίδραση της IL1β στο ποσοστό εμφύτευσης και κύησης των γυναικών της παρούσας μελέτης.



Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της IL1β και η ανάλυσή τους έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των γυναικών, όπως διαμορφώθηκαν μετά τη μέτρηση της ιντερλευκίνης IL1β. Η εικόνα 46 απεικονίζει τα ποσοστά κύησης στις ίδιες κατηγορίες γυναικών και επιβεβαιώνει την απουσία στατιστικής διαφοράς μεταξύ τους.



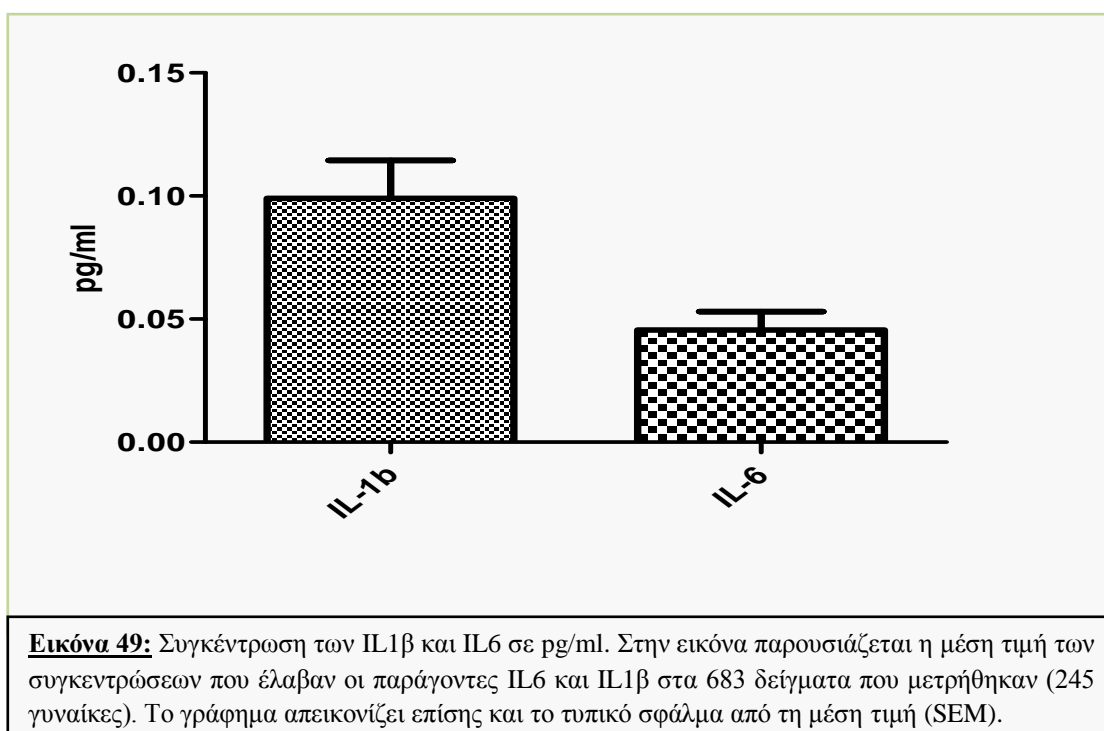
Στις παρακάτω εικόνες 47 και 48, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα εμφύτευσης μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών των γυναικών σε συνάρτηση πάλι με τον παράγοντα IL1β.



Η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το ποσοστό εμφύτευσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων γυναικών έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($P>0.05$). Κατά συνέπεια, η έκκριση της ιντερλευκίνης IL1β από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα, δεν φαίνεται να επηρεάζει το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης. Κατά επέκταση, η έκκριση του φλεγμονώδη παράγοντα IL1β από τα γονιμοποιημένα ωάρια 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας δεν επηρεάζει την εμφυτευτική τους ικανότητα και βιωσιμότητα και δεν φαίνεται να συνδέεται με κάποιο τρόπο με την επιλογή της καταλληλότερης βλαστοκύστης για εμβρυομεταφορά.

2.3.6 Έκκριση των ιντερλευκινών IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα

Ο έλεγχος για την ύπαρξη των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β έγινε στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υγρά μέσα στα οποία αναπτύσσονταν τα γονιμοποιημένα ωάρια από την 3^η ημέρα μέχρι την 5^η ή 6^η ημέρα (στάδιο βλαστοκύστεων) ανάπτυξής τους. Η ανίχνευσή τους έγινε με τη βοήθεια του συστήματος Lumiplex και παρουσιάστηκε σε μονάδα μέτρησης pg/ml. Η εικόνα 49 παρουσιάζει τη μέση τιμή των μετρήσεων των ιντερλευκινών IL6 και IL1β, η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση που εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα της γυναίκας.



Από την εικόνα 49, φαίνεται ότι η ιντερλευκίνη IL1β εκκρίνεται από τις βλαστοκύστες σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την ιντερλευκίνη IL6. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων επιβεβαίωσε αυτή την παρατήρηση δίνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$. Ο πίνακας 6 παρουσιάζει τη μέγιστη και την ελάχιστη τιμή που έλαβαν οι συγκεντρώσεις των IL6 και IL1β, καθώς και τη μέση τιμή τους, αποδίδοντας τη σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

	IL1β (pg/ml)	IL6 (pg/ml)
Ελάχιστη τιμή	0	0
Μέγιστη τιμή	6.230	3.2
Μέση τιμή	0.09904	0.04559
Πίνακας 6: Συγκέντρωση των ιντερλευκινών IL1β και IL6 σε 683 δείγματα υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού βλαστοκύστεων		

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν στις παραγράφους 2.3.3, 2.3.4 και 2.3.5, η έκκριση των IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα, φαίνεται να μη σχετίζεται με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης των γυναικών που έλαβαν μέρος στη παρούσα μελέτη. Με δεδομένο όμως τη μεγάλη ετερογένεια στις τιμές που έλαβαν οι παράγοντες και τη στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών μεταξύ των παραγόντων, θα πρέπει επίσης να εξεταστεί αν οι συγκεντρώσεις τους έρχονται σε συνάρτηση με το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς, ή έστω αν υπάρχει ένα εύρος τιμών του καθενός ξεχωριστά που σχετίζεται με το θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης των γυναικών της μελέτης αυτής. Οι επόμενες παράγραφοι θα εξετάσουν αυτή την υπόθεση.

2.3.7 Ιντερλευκίνες IL6 και IL1β και συσχετισμός τους με το ποσοστό κύησης μετά από εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων.

Από τις 245 γυναίκες στα δείγματα των οποίων έγινε η μέτρηση των IL6 και IL1β, οι 145 είχαν θετικό αποτέλεσμα κύησης (θετική β-hCG) 2 εβδομάδες μετά την εμβρυομεταφορά τους. Οι πίνακες 7 και 8 παραθέτουν το εύρος των τιμών που έλαβαν οι παράγοντες αυτοί, όταν το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς ήταν θετικό ή αρνητικό αντίστοιχα σε κύηση.

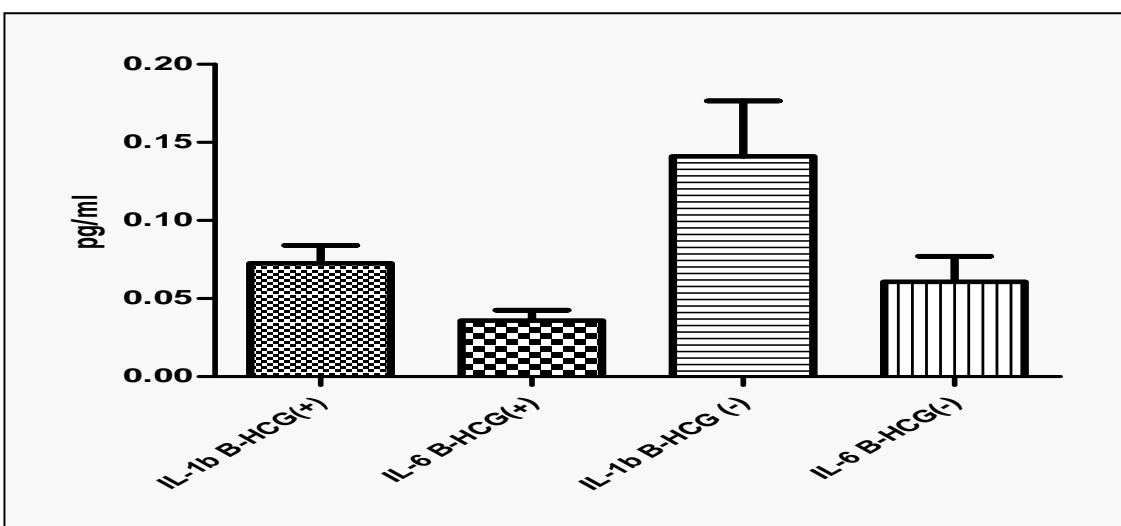
B-hCG (+)	IL1β (pg/ml)	IL6 (pg/ml)
Ελάχιστη τιμή	0	0
Μέγιστη τιμή	2.160	1.780
Μέση τιμή	0.07259	0.03599

Πίνακας 7: Συγκέντρωση των ιντερλευκινών IL1 β και IL6 σε 418 δείγματα υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού βλαστοκύστεων 145 γυναικών με θετικό αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς.

B-hCG (-)	IL1β (pg/ml)	IL6 (pg/ml)
Ελάχιστη τιμή	0	0
Μέγιστη τιμή	6.230	3.2
Μέση τιμή	0.1411	0.06076

Πίνακας 8: Συγκέντρωση των ιντερλευκινών IL1 β και IL6 σε 265 δείγματα υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού βλαστοκύστεων 100 γυναικών με αρνητικό αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς.

Η εικόνα 50 παρουσιάζει τη μέση τιμή των μετρήσεων των ιντερλευκινών IL6 και IL1 β σε συνάρτηση με το θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα (β -hCG) της εμβρυομεταφοράς.



Εικόνα 50: Συγκέντρωση των IL1 β και IL6 σε pg/ml σε συνάρτηση με το αποτέλεσμα της β -hCG. Στην εικόνα παρουσιάζεται η μέση τιμή των συγκεντρώσεων που έλαβαν οι παράγοντες IL6 και IL1 β στα δείγματα που μετρήθηκαν (245 γυναίκες). Το γράφημα απεικονίζει επίσης και το τυπικό σφάλμα από τη μέση τιμή (SEM).

Από τους πίνακες 6, 7 και 8 και την εικόνα 50, είναι φανερό ότι υπάρχει διαφορά στις συγκεντρώσεις ανάμεσα στην IL6 και την IL1β που εκλύονται από τις βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν στη μήτρα και των δύο κατηγοριών θετικής και αρνητικής β-hCG. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων απέδειξε ότι υπάρχει και στατιστικά σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεων ($P<0.05$) μεταξύ των δύο παραγόντων στις κατηγορίες B-HCG(+) και B-HCG(-). Επίσης, μία ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι και οι δύο παράγοντες φαίνεται να λαμβάνουν μεγαλύτερες τιμές στην περίπτωση του αρνητικού αποτελέσματος B-HCG(-), σε σύγκριση με το θετικό B-HCG(+).

Στο σημείο αυτό έχει ολοκληρωθεί η σύγκριση των παραγόντων μεταξύ τους όσον αφορά στις συγκεντρώσεις με τις οποίες εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες και έχει προκύψει ότι η ιντερλευκίνη IL1β εκκρίνεται σε μεγαλύτερες από στατιστικής άποψης συγκεντρώσεις έναντι της ιντερλευκίνης IL6. Η σύγκριση όμως κάθε παράγοντα ξεχωριστά με το αποτέλεσμα της β-hCG μετά την εμβρυομεταφορά είναι εξέχουσας σημασίας, ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι το συμπέρασμα των προηγούμενων αποτελεσμάτων που θέλουν την έκκριση των ιντερλευκινών αυτών από τις βλαστοκύστες να είναι ανεξάρτητη με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης αργότερα. Οι πίνακες 9 και 10 δίνουν μία συνοπτική εικόνα των τιμών που συγκρίθηκαν ανά παράγοντα στις δύο κατηγορίες αποτελέσματος κύησης και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

IL1β (pg/ml)	B-HCG (+)	B-HCG(-)
Ελάχιστη τιμή	0	0
Μέγιστη τιμή	2.160	6.230
Μέση τιμή	0.07259	0.1411
Πίνακας 9: Συγκέντρωση της ιντερλευκίνης IL1β στα 683 δείγματα των 245 γυναικών που μετρήθηκαν. Οι τιμές χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: σε γυναίκες με θετικό αποτέλεσμα (n=145) και σε γυναίκες με αρνητικό αποτέλεσμα (n=100).		

IL6 (pg/ml)	B-HCG (+)	B-HCG(-)
Ελάχιστη τιμή	0	0
Μέγιστη τιμή	1.780	3.2
Μέση τιμή	0.03599	0.06076
Πίνακας 10: Συγκέντρωση της ιντερλευκίνης IL6 στα 683 δείγματα των 245 γυναικών που μετρήθηκαν. Οι τιμές χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: σε γυναίκες με θετικό αποτέλεσμα (n=145) και σε γυναίκες με αρνητικό αποτέλεσμα (n=100).		

Η ανάλυση των μετρήσεων έδειξε ότι από στατιστικής άποψης δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($P>0.05$) των συγκεντρώσεων της IL1β μεταξύ των γυναικών με θετικό (B-HCG+) και αρνητικό (B-HCG-) αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς. Το ίδιο έδειξε και η ανάλυση των μετρήσεων της IL6. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν και επιβεβαιώνουν το αρχικό συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι φλεγμονώδεις παράγοντες δεν σχετίζονται με το ποσοστό κύησης ή εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

Επίσης, δεν βρέθηκε να υπάρχει ένα εύρος τιμών των παραγόντων αυτών που να σχετίζεται με κάποιο τρόπο με το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς. Η μόνη παρατήρηση είναι ότι οι μεγαλύτερες τιμές των συγκεντρώσεων και των δύο παραγόντων παρουσιάζονται στην κατηγορία με την αρνητική β-hCG, χωρίς όμως να αποκλείονται και οι μικρότερες ή και μηδενικές τιμές από την κατηγορία αυτή. Πιο συγκεκριμένα, η κατηγορία των γυναικών με αποτέλεσμα β-hCG(-) εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές που έλαβαν οι παράγοντες, αλλά συγχρόνως εμπεριέχει και τις τιμές της κατηγορίας β-hCG(+). Κατά συνέπεια, είναι μία παρατήρηση που δεν μπορεί να έχει διαγνωστικό όφελος, διότι το εύρος των τιμών που λαμβάνει δεν ξεχωρίζει από την άλλη κατηγορία, παρά μόνο σε πολύ λίγες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, μόνο 2 μετρήσεις από τις 265 είχαν τιμές εκτός του εύρους της κατηγορίας β-hCG(+) για την IL1β και 1 μέτρηση για την IL6 (Το παράρτημα 5 αναφέρει τα αποτελέσματα των μετρήσεων των IL6 και IL1β).

2.3.8 Ιντερλευκίνες IL1β και IL6 και συσχετισμός τους με το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων.

Σε όλες τις γυναίκες που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, πριν την εμβρυομεταφορά τους καταγράφηκε η μορφολογία και η ποιότητα των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα και ορίστηκε ένας μοναδικός κωδικός για την κάθε βλαστοκύστη που την καθορίζει

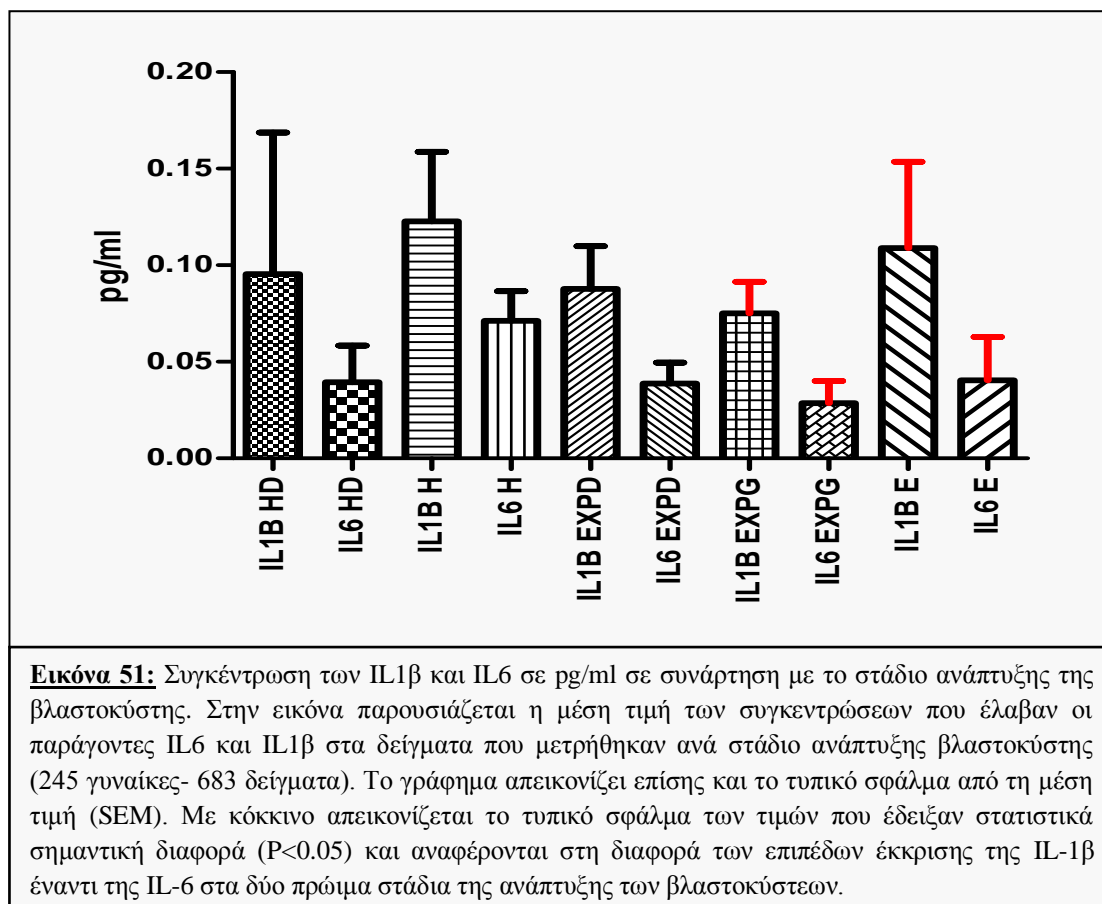
και που ανταποκρίνεται σε μία τιμή μέτρησης καθενός από τους παράγοντες IL1β και IL6. Στο σύνολο μεταφέρθηκαν 683 γονιμοποιημένα ωάρια με μέσο όρο 2,81 βλαστοκύστες ανά μεταφορά. Η κάθε βλαστοκύστη βρισκόταν σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο και μορφολογία όπως περιγράφεται στον πίνακα 11. Τα στοιχεία αυτά συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν με σκοπό να εξετασθεί το ενδεχόμενο συσχετισμού μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιντερλευκινών και του σταδίου ανάπτυξης των βλαστοκύστεων. Ο πίνακας 12 δίνει μία συνοπτική εικόνα των τιμών που συγκρίθηκαν ανά κατηγορία και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω (εικόνα 51).

	ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ				
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ	ΚΑΛΗ ΤΕ/ICM	ΚΑΛΗ ΤΕ/ΜΕΤΡΙΑ ICM	ΜΕΤΡΙΑ ΤΕ/ΚΑΛΗ ICM	ΜΕΤΡΙΑ ΤΕ/ICM	ΠΤΩΧΗ ΤΕ/ICM
ΠΡΩΙΜΗ (Ε)	9,95% (68)	10,1% (69)	0,58% (4)	1,02 (7)	-
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΗ (EXPG)	14,34% (98)	10,39% (71)	0,58% (4)	0,29% (2)	-
ΔΙΟΓΚΩΜΕΝΗ (EXPD)	14,78% (101)	5,12% (35)	0,29% (2)	0,44% (3)	-
ΕΚΚΟΛΑΠΤΟΜΕΝΗ (HATCHG)	17,86% (122)	8,2% (56)	1,02% (7)	0,44% (3)	-
ΕΚΚΟΛΑΠΤΟΥΣΑ (HATCHD)	2,19% (15)	1,75% (12)	0,44% (3)	0,14% (1)	-

Πίνακας 11: Ποιότητα ανά αναπτυξιακό στάδιο των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στην εμβρυομεταφορά των γυναικών της παρούσας μελέτης. Ο συνολικός αριθμός μεταφερόμενων βλαστοκύστεων ήταν 683 βλαστοκύστες με μέσο όρο 2,81 βλαστοκύστες ανά εμβρυομεταφορά. Ο αριθμός μέσα στην παρένθεση είναι ο συνολικός αριθμός των βλαστοκύστεων ανά κατηγοριοποίηση. Το Παράρτημα 1 περιγράφει αναλυτικά τη μέθοδο κατηγοριοποίησης των βλαστοκύστεων με βάση την ποιότητα και ανάπτυξη τους, παραθέτοντας και παραδείγματα φωτογραφιών αυτών. Βλαστοκύστες με πτωχή τροφοβλάστη (TE) και πτωχή έσω κυτταρική μάζα (ICM) δεν θεωρήθηκαν βιώσιμες βλαστοκύστες και ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκαν στην εμβρυομεταφορά των ασθενών της μελέτης.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων ανάμεσα στους δύο παράγοντες ανά στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων, παρότι δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) για τα στάδια HD, D, EXPD, παρουσίασε διαφορά ($P<0.05$) στις συγκεντρώσεις

τους για τα στάδια EXPG, E (εικόνα 51, πίνακας 12). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στα στάδια αυτά με τη στατιστική διαφορά, αναφέρθηκαν και οι μεγαλύτερες τιμές που έλαβαν οι παράγοντες IL1β και IL6 (παράρτημα 5). Το τελευταίο, σε συνδυασμό με το ότι αυτές οι τιμές μπορεί να είναι και τυχαίες, δεδομένου ότι αναφέρθηκαν μόνο σε 2 μετρήσεις από τις 683 για την IL1β και σε 1 για την IL6, μπορεί να δίνει και μία εξήγηση για το λόγο που αναδείχθηκε αυτή η στατιστική διαφορά.



Η παραπάνω παρατήρηση δεν έχει κάποια διαγνωστική αξία σε ένα εργαστήριο εμβρυολογίας ως προς την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου προς εμβρυομεταφορά, διότι αναφέρεται σε μία διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο παραγόντων IL6 και IL1β, αναδεικνύοντας ότι τα επίπεδα έκκρισης της IL1β είναι υψηλότερα από της IL6 για τις πρώιμες και αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες. Από τη στατιστική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του κάθε παράγοντα ξεχωριστά ανά διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$), γεγονός που φαίνεται να είναι συμβατό και με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα οποία δεν ανέδειξαν καμία επίδραση των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β με το ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης των γυναικών της παρούσας μελέτης.

TIMH (pg/ml)	ΕΛΑΧΙΣΤΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ	ΜΕΣΗ
HD IL1B	0	2.160	0.009533
HD IL6	0	0.5500	0.03933
H IL1B	0	4.390	0.1227
H IL6	0	1.720	0.07128
EXPD IL1B	0	1.880	0.08773
EXPD IL6	0	1.030	0.03872
EXPG IL1B	0	1.460	0.07514
EXPG IL6	0	1.780	0.02860
E IL1B	0	6.230	0.1090
E IL6	0	3.20	0.04041

Πίνακας 12: Συγκέντρωση IL1β και IL6 σε συνάρτηση με το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων στα 683 δείγματα των 245 γυναικών που μετρήθηκαν. HD: εκκολάπτουσα βλαστοκύστη, H: εκκολαπτόμενη, EXPD: Διογκωμένη, EXPG: βλαστοκύστη ή αναπτυσσόμενη, E: πρόιμη βλαστοκύστη. Στον πίνακα έχουν τονιστεί οι τιμές οι οποίες παρουσίασαν στατιστική διαφορά ($P < 0.05$) στην έκκριση των ιντερλευκινών, με υψηλότερα επίπεδα να παρουσιάζονται από την IL-1β έναντι της IL-6 στα αναπτυξιακά στάδια των πρόιμων και αναπτυσσόμενων βλαστοκύστεων.

Συμπερασματικά μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι φλεγμονώδεις παράγοντες IL6 και IL1β όχι μόνο δεν σχετίζονται με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης, αλλά ότι και η έκκρισή τους δεν επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων ή την ποιότητά τους. Συνεπώς οι ιντερλευκίνες αυτές δεν συνδέονται με κάποιο τρόπο με την εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων και τη βιωσιμότητά τους. Ως εκ τούτου, από τα παραπάνω δεν φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες επιλογής της καταλληλότερης βλαστοκύστης για εμβρυομεταφορά.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κεφάλαιο αυτό θα επικεντρωθεί στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης και στα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή, με σκοπό να δοθούν πιθανές ερμηνείες ως προς το ρόλο των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β στις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα και να αναδειχθεί η προοπτική περαιτέρω έρευνας στον τομέα αυτό.

2.4.1 Η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών δεν επηρεάζει το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

Η παρούσα τυχαιοποιημένη μελέτη συμπεριέλαβε 300 ασθενείς, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 2 ισάριθμες ομάδες σύμφωνα με την ημέρα της προγραμματισμένης εμβρυομεταφοράς τους (5^η και 6^η ημέρα). Τα αποτελέσματα της εμβρυομεταφοράς τους σε σχέση με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης μεταξύ των δύο ομάδων δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) (εικόνες 32, 33, 34). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες δημοσιευμένες συγκριτικές μελέτες και ανασκοπήσεις, που έχουν δείξει ότι υπάρχει υπεροχή της εμβρυομεταφοράς 5^{ης} ημέρας βλαστοκύστεων σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης, το οποίο έχει αναφερθεί να φτάνει μέχρι και σε διπλάσια ποσοστά, έναντι της 6^{ης} ημέρας (Shapiro *et al*, 2001; Barrenextea *et al*, 2005; Miller *et al*, 2007; Hiraoka *et al*, 2009).

Υπάρχουν όμως δύο βασικές προϋποθέσεις που κάνουν την παρούσα μελέτη να διαφοροποιείται από τις μέχρι τώρα δημοσιεύσεις σχετικές με τη σύγκριση εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών. Η καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων από την τρίτη ημέρα ανάπτυξής τους μέχρι και το στάδιο εμβρυομεταφοράς τους, έγινε σε αριθμημένες σταγόνες καλλιεργητικού υγρού που η κάθε μία περιείχε ένα μόνο γονιμοποιημένο ωάριο (κεφάλαιο 2.1.5 και 2.2.4). Αυτό έδωσε τη δυνατότητα επιλογής των βλαστοκύστεων προς μεταφορά, έχοντας ως βασικό κριτήριο επιλογής την εξελικτική πορεία των γονιμοποιημένων ωαρίων κατά τη διάρκεια της εκτεταμένης καλλιέργειάς τους μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων.

Μία ακόμα προϋπόθεση της μελέτης ήταν ότι οι δύο ομάδες γυναικών, για να είναι συγκρίσιμες σε αποτελέσματα όχι μόνο κύησης και εμφύτευσης, αλλά και στα αποτελέσματα των μετρήσεων των φλεγμονωδών παραγόντων αργότερα, έπρεπε να έχουν τα ίδια κριτήρια την 5^η ημέρα, σε ότι αφορούσε την εξέλιξη των γονιμοποιημένων ωαρίων τους. Η 5^η ημέρα ήταν η ημέρα συλλογής του υπερκείμενου υγρού και έτσι τηρήθηκε η προϋπόθεση ότι η συλλογή γινόταν μόνο από σταγόνες οι οποίες περιείχαν βλαστοκύστες και όχι

γονιμοποιημένα ωάρια καθυστερημένα στην εξέλιξή τους, ακόμα και αν αυτά την 6^η ημέρα είχαν αναπτυχθεί τελικά σε βλαστοκύστες. Συνεπώς, αν κατά την εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων 6^{ης} ημέρας συμπεριλαμβάνονται γονιμοποιημένα ωάρια, τα οποία έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων ήδη από την 5^η ημέρα (κριτήρια ένταξης στη μελέτη, βλέπε κεφάλαιο 2.1.2), τότε το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ότι έχει να κάνει με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης, είναι ίδιο με αυτό της 5^{ης} ημέρας. Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε ως προς το αποτέλεσμα των υπερήχων των γυναικών 2-3 εβδομάδες μετά τη μέτρηση της β-hCG στο αίμα. Τα ποσοστά καρδιακών λειτουργιών, εξωμήτριων κύσεων, αποβολών και βιοχημικών κύσεων μεταξύ των δύο ομάδων των γυναικών ήταν αντίστοιχα, γεγονός που ενδυναμώνει την υπόθεση ότι κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις η εμβρυομεταφορά 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας δεν διαφοροποιείται σε σχέση με το αποτέλεσμα της κύησης (εικόνες 35, 36).

Το συμπέρασμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει μία πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη 221 γυναικών που παρουσιάζει ότι το ποσοστό κύησης, εμφύτευσης και γέννησης είναι διπλάσιο όταν στην εμβρυομεταφορά συμπεριλαμβάνονται γονιμοποιημένα ωάρια που έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων την 5^η ημέρα, ανεξάρτητα από το αν η μεταφορά τους θα πραγματοποιηθεί την 5^η ή 6^η ημέρα, έναντι των ποσοστών μετά από εμβρυομεταφορά 6^{ης} ημέρας, στην οποία συμπεριλαμβάνονται γονιμοποιημένα ωάρια με καθυστερημένη ανάπτυξη βλαστοκύστεων (Elgindy and Elsedee, 2012). Συνεπώς, μπορεί να σημειωθεί ότι το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά συνδέεται άμεσα με το ρυθμό ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων από την πρώτη ημέρα γονιμοποίησής τους μέχρι την 5^η ημέρα καλλιέργειάς τους (Miller *et al*, 2007).

Αν και το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην πρόταση ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων αποτελεί σημαντικό κριτήριο της βιωσιμότητας των βλαστοκύστεων, εν τούτοις μελέτες σε αποψυγμένες βλαστοκύστες 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας έρχονται να δώσουν μία επιπλέον εξήγηση των συνήθως μειωμένων ποσοστών μετά από εμβρυομεταφορά 6^{ης} ημέρας. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων εμβρυομεταφορών σε κύκλους γυναικών μετά από απόψυξη βλαστοκύστεων 5^{ης} ημέρας και καθυστερημένων σε εξέλιξη βλαστοκύστεων 6^{ης} ημέρας δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Murata *et al*, 2005; Liebermann and Tucker, 2006; El-Toukhy *et al*, 2011). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών οδηγούν στη σκέψη ότι οι διαφορές στα ποσοστά κύησης και εμφύτευσης μεταξύ εμβρυομεταφορών βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών, μπορεί να οφείλονται σε μειωμένη υποδεκτικότητα του ενδομητρίου τη χρονική στιγμή που τελικά τα γονιμοποιημένα

ωάρια αναπτύσσονται σε βλαστοκύστες, στάδιο απαραίτητο για τη διαδικασία της εμφύτευσης (Hiraoka *et al*, 2009). Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και των μέχρι τώρα αντίστοιχων μελετών, το πιθανότερο είναι ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων σε βλαστοκύστες, ως δείκτης βιωσιμότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων, σε συνδυασμό με την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου της κάθε γυναίκας ξεχωριστά λειτουργούν συνδυαστικά ως προς το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

Το συμπέρασμα αυτό, της μη ύπαρξης διαφοράς μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας εμβρυομεταφοράς κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις είναι δέουσας σημασίας για το χώρο της αναπαραγωγικής ιατρικής. Το χρονικό διάστημα αυτό της μίας ημέρας περίπου (μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων), είναι πολύ σημαντικό ως προς την ανίχνευση και ανάλυση παραγόντων σχετικών με την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για μεταφορά στη μήτρα, δίχως να διακυβεύεται το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς. Τέτοιες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα στο στάδιο αυτό για την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για μεταφορά και χρειάζονται το χρονικό περιθώριο για την κυτταρική και μοριακή ανάλυση, είναι η βιοψία βλαστοκύστεων, μία παρεμβατική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης γονιμοποιημένων ωαρίων προς αποφυγή γενετικών συνδρόμων και λοιπών παθήσεων των εμβρύων. Η παρατήρηση ότι μπορεί να υπάρξει χρόνος μεταξύ μιας ανάλυσης στο στάδιο των βλαστοκύστεων και στην εμβρυομεταφορά, θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει το έναυσμα για περαιτέρω έρευνες, μελέτες και αναλύσεις μη παρεμβατικού χαρακτήρα ως προς τα γονιμοποιημένα ωάρια, με διαγνωστικό και κλινικό όφελος ως προς την εξωσωματική γονιμοποίηση.

2.4.2 Έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL-6 και IL1-β από τις βλαστοκύστες προ της εμβρυομεταφοράς τους και ο ρόλος τους στην εμφύτευση.

Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό μέσα στο οποίο αναπτύσσονταν τα γονιμοποιημένα από την 3^η ημέρα μέχρι το στάδιο της 5^{ης} ημέρας, συλλέχθηκε με σκοπό την ανίχνευση και τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των ιντερλευκινών IL6 και IL1β που εκλύονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφορά τους στη μήτρα. Το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και μετρήθηκαν ήταν 683 δείγματα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σημείωσαν την ανίχνευση των παραγόντων αυτών στο υπερκείμενο υγρό κάποιων βλαστοκύστεων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι κυτταροκίνες αυτές εκλύονται από τις βλαστοκύστες προ της εμφύτευσής τους. Παράλληλα με αυτή την παρατήρηση, έγινε

μία προσπάθεια να αντιπαρατεθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά των γυναικών που έλαβαν μέρος στη μελέτη, αλλά τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κανένα συσχετισμό με το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς.

2.4.3 Η έκκριση της ιντερλευκίνης IL6 από τις βλαστοκύστες δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης.

Τα δείγματα του υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού μετά τη συλλογή τους, αναλύθηκαν με τη χρήση του συστήματος Luminex για την ύπαρξη της πρωτεΐνης IL6. Από τις 245 γυναίκες (683 δείγματα), στις οποίες έγινε η μέτρηση του παράγοντα IL6 στα υπερκείμενα υγρά των βλαστοκύστεων που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά τους, στις 195 (542 δείγματα) δεν έγινε ανίχνευση του παράγοντα και μόνο στις 50 (141 δείγματα), υπήρξε έστω μία βλαστοκύστη από το σύνολο που μεταφέρθηκαν σε κάθε γυναίκα, η οποία εμφάνισε έκφραση του παράγοντα. Οι τρεις αυτές ομάδες γυναικών, συγκρίθηκαν μεταξύ τους σε ποσοστό εμφύτευσης και κύησης και η στατιστική ανάλυση δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$). Ως εκ τούτου, όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη, η έκκριση του φλεγμονώδη παράγοντα IL6 δεν επηρεάζει την εμφυτευτική ικανότητα και βιωσιμότητα των βλαστοκύστεων (εικόνες 41, 42, 43, 44).

Η ιντερλευκίνη IL6 θεωρείται φλεγμονώδης παράγοντας που επηρεάζει τη διαδικασία της εμφύτευσης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι κατέχει κάποιο ρόλο στην ελεγχόμενη διείσδυση των τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο ενδομήτριο, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι επάγει διάφορες κυτταρικές διεργασίες των τροφεκτοδερμικών κυττάρων και αναστέλλει την έκφραση και έκκριση των T-κυττάρων, τα οποία εμπλέκονται σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες (Jovanovic and Vicovac, 2009; Dubrinsky *et al*, 2010; Champion *et al*, 2012). Σε ότι αφορά την έκφρασή της και του υποδοχέα της IL6R από τις βλαστοκύστες, υπάρχει περιορισμένη γνώση. Μελέτες έχουν δείξει περιορισμένη έκφραση του mRNA της IL6 και IL6R από τις βλαστοκύστες, γεγονός που θεωρήθηκε ότι συνδέεται με τη μη έκφραση της πρωτεΐνης σε προηγούμενα στάδια των γονιμοποιημένων ωαρίων (Sharkey *et al*, 1995). Πρόσφατες μελέτες ωστόσο έδειξαν ότι η ιντερλευκίνη IL6 εκφράζεται από τα γονιμοποιημένα ωάρια στα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους (Yu *et al*, 2012) και υπέδειξαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αξιολόγησης της ικανότητας ανάπτυξής τους σε επόμενα στάδια. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η ωοθηκική διέγερση μπορεί να προκαλέσει τη μειωμένη έκφραση της IL6 από τα γονιμοποιημένα ωάρια και να οδηγήσει σε περιορισμένη αναπτυξιακή τους πορεία (Yu *et al*, 2012). Η παρατήρηση αυτή δεν επιβεβαιώνεται από την παρούσα μελέτη για τις βλαστοκύστες και ως εκ τούτου δεν φαίνεται ότι η IL6 μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως ένας μη-παρεμβατικός δείκτης επιλογής της καταλληλότερης βλαστοκύστης για μεταφορά.

Ο εμπλουτισμός των καλλιεργητικών υγρών με IL6 έχει παρατηρηθεί να αυξάνει το ποσοστό ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων σε βλαστοκύστες και τον αριθμό των κυττάρων των βλαστοκύστεων, επηρεάζοντας κατά επέκταση το ποσοστό εμφύτευσης ανά μεταφορά (Liu *et al*, 2009; Shen *et al*, 2009; Dominguez *et al*, 2010). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι παρότι δεν έχει αναφερθεί συσχετισμός της IL6 με τη μορφολογία των γονιμοποιημένων ωαρίων (Austgulen *et al*, 1995), η μείωση των επιπέδων της IL6 στα καλλιεργητικά υγρά, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού εμφύτευσης και κύησης μετά από εμβρυομεταφορά (Rinaudo and Schultz, 2004; Lee *et al*, 2005), προσδίδοντας στον παράγοντα αυτό ένα ρόλο πολύ σημαντικό ως προς την επίδρασή του στην βιωσιμότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων.

Μία παρατήρηση που είναι εξίσου σημαντική είναι ότι αν και η IL6 έχει βρεθεί να εκφράζεται και να εκκρίνεται στο καλλιεργητικό υγρό από γονιμοποιημένα ωάρια 1 έως 8 κυττάρων, εν τούτοις τα επίπεδα της είναι υψηλότερα το πρώτο 24ωρο καλλιέργειας τους, από ότι το δεύτερο (Austgulen *et al*, 1995; Yu *et al*, 2012). Αν θεωρηθεί με βάση αυτές τις μελέτες, ότι υπάρχει μία προοδευτική μείωση της έκφρασης της IL6 καθώς το γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται, τότε μπορεί να δοθεί και μία ερμηνεία στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν ότι από τα 683 δείγματα, στα 542 δεν υπήρξε ανίχνευση του παράγοντα.

Ένα ακόμα στοιχείο που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών που έλαβαν μέρος στη μελέτη προγραμματίστηκαν για εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων, λόγω υπερδιέγερσης των ωοθηκών τους. Οπότε συσχετίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με αυτά που έχουν αναφερθεί από τους Yu *et al*, 2012 και κατά τα οποία η διέγερση ωοθηκών οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της IL6, τότε δίνεται και μία επιπλέον εξήγηση στο ερώτημα του γιατί τα περισσότερα δείγματα δεν παρουσίασαν ανίχνευση του παράγοντα. Δεδομένου ότι στις βλαστοκύστες δεν υπάρχει γνώση για την έκκριση της IL6, αλλά και ότι η έκφραση του mRNA της που έχει ανιχνευθεί παλαιότερα ήταν πολύ περιορισμένη και δεν συνδέεται απαραίτητα και με την έκκριση του παράγοντα, τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζουν μία κατάσταση που έχει ήδη υποπτευθεί στο παρελθόν και που η παρούσα μελέτη έρχεται να επιβεβαιώσει.

Μία επιπλέον ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά στις συγκεντρώσεις που λαμβάνει ο παράγοντας IL6 μεταξύ των γυναικών με θετική και αρνητική β-hCG. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε και πάλι ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) των συγκεντρώσεων του παράγοντα ανάμεσα στις δύο κατηγορίες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η έκκρισή του από τις βλαστοκύστες δεν συνδέεται με το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς (πίνακας 10). Επίσης, δεν βρέθηκε να υπάρχει ένα εύρος τιμών της IL6 που να σχετίζεται με κάποιο τρόπο με το ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης ανά μεταφορά.

Η μόνη παρατήρηση είναι ότι οι μεγαλύτερες τιμές των συγκεντρώσεων της IL6 παρουσιάζονται στην κατηγορία με την αρνητική β-hCG, χωρίς όμως να αποκλείονται από την κατηγορία αυτή και οι μικρότερες ή και μηδενικές τιμές. Κατά συνέπεια, η παρατήρηση αυτή δεν έχει κανένα διαγνωστικό όφελος. Η κατηγορία των γυναικών με αρνητικό αποτέλεσμα β-hCG εμφανίζει μεν τα μεγαλύτερα επίπεδα τιμών που έλαβε ο παράγοντας, αλλά συγχρόνως εμπεριέχει και τις τιμές της κατηγορίας με θετική β-hCG. Πιο συγκεκριμένα, μόνο μία μέτρηση στις 265 (100 γυναίκες) από την ομάδα με την αρνητική β-hCG έλαβε τιμή εκτός του εύρους της ομάδας με την θετική β-hCG. Σύμφωνα όμως με τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, η οποία δεν έδειξε διαφορά ($P>0.05$) στη συγκέντρωση με την οποία εκλύεται η IL6 μεταξύ γυναικών με θετική και αρνητική β-hCG, πιθανότατα η παραπάνω παρατήρηση να αποτελεί τυχαίο γεγονός, που δεν συνδέεται με κάποιο τρόπο με το αρνητικό αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς. Σαν παρατήρηση όμως έχει επίσης αναφερθεί πρόσφατα σε μελέτη κατά την οποία τα γονιμοποιημένα ωάρια καλλιεργήθηκαν με διπλής φάσης καλλιεργητικά υγρά μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων και τα αποτελέσματα των μετρήσεων της IL6 στο υπερκείμενο υγρό ήταν αντίστοιχα με αυτά της παρούσας μελέτης (Dominguez *et al*, 2010).

Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, εστιασμένες ενδεχομένως στη συγκεκριμένη παρατήρηση, και εμβρυομεταφορά μίας μόνο βλαστοκύστης ανά γυναίκα, θα μπορούσαν να απαντήσουν στο ερώτημα αν τα αυξημένα επίπεδα IL-6 στο υπερκείμενο υγρό των γονιμοποιημένων ωαρίων σχετίζονται και με αρνητικό αποτέλεσμα κύησης. Το γεγονός ωστόσο ότι οι συγκεντρώσεις της IL6 που ανιχνεύονται στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό είναι τόσο χαμηλές, θα αποτελεί πάντα ένα εμπόδιο στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και την ευαισθησία των μεθόδων, όσον αφορά στη διερεύνηση της έκκρισης του παράγοντα από τις βλαστοκύστες προ της εμφύτευσής τους.

2.4.4 Η έκκριση της ιντερλευκίνης IL1β από τις βλαστοκύστες πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα δεν σχετίζεται με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά.

Τα 683 δείγματα που συλλέχθηκαν, εξετάσθηκαν και αναλύθηκαν για την ύπαρξη της ιντερλευκίνης IL1β. Από το σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο Lumipex, τα 504 (181 γυναίκες) δεν παρουσίασαν την ύπαρξη του παράγοντα στο υπερκείμενο υγρό των βλαστοκύστεων και μόνο στις 64 γυναίκες (179 δείγματα) υπήρξε έστω μία από τις βλαστοκύστες που συμπεριλήφθησαν στην εμβρυομεταφορά τους και εμφάνισε έκφραση-έκκριση του παράγοντα στο καλλιεργητικό υγρό των δειγμάτων. Με την ανάλυση των δειγμάτων για την ανίχνευση και μέτρηση της IL1β, διαμορφώθηκαν 2 ομάδες γυναικών. Γυναίκες των οποίων οι βλαστοκύστες δεν εξέφρασαν τον παράγοντα και γυναίκες των οποίων οι βλαστοκύστες έδειξαν έκκριση του παράγοντα. Οι δύο αυτές ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους καθώς και με το σύνολο του πληθυσμού των γυναικών της μελέτης και τα αποτελέσματα των ποσοστών εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) μεταξύ τους (εικόνες 45, 46, 47, 48).

Υπάρχει πληθώρα μελετών που τοποθετούν την IL1β στο ενδομήτριο, αναδεικνύοντας τον πολύ σημαντικό ρόλο που κατέχει στη διαδικασία της εμφύτευσης (Kauma *et al*, 1990; De los Santos *et al*, 1996; Sharkey, 1998; Boucher *et al*, 2001; Tierney *et al*, 2003; Garrido-Gomez *et al*, 2010). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η IL1β εμπλέκεται στην ανοσοανοχή μητέρας-πλακούντα και τη ζωοτοκία στα θηλαστικά (Geisert *et al*, 2012), ενώ παράλληλα, δρα ως διαμεσολαβητής στη διαδικασία διείσδυσης της βλαστοκύστης μέσω της αναδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών της ΕΘΟ (Hess *et al*, 2007). Η έκφραση και έκκρισή της από τις βλαστοκύστες έχει επίσης αναφερθεί αρκετές φορές (Sheth *et al*, 1991; Simon *et al*, 1993; Simon *et al*, 1994; De los Santos *et al*, 1996; Baranao *et al*, 1997; Krussels *et al*, 1998) και έχει προταθεί να επιδεικνύει λειτουργικό ρόλο στη βελτίωση των ποσοστών εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις (van Sinderen *et al*, 2012).

Μελέτες στο παρελθόν έχουν αναφέρει τη διαμόρφωση δύο διαφορετικών ομάδων βλαστοκύστεων, μετά τη μέτρηση της IL1β στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υγρά τους. Η μία ομάδα περιλαμβάνει βλαστοκύστες οι οποίες δεν εκκρίνουν τον παράγοντα IL1β και η άλλη περιλαμβάνει βλαστοκύστες οι οποίες φαίνεται να εκφράζουν και να εκκρίνουν τον παράγοντα (De los Santos *et al*, 1996). Σημαντική παρατήρηση των μελετών αυτών είναι ότι οι βλαστοκύστες εκκρίνουν την IL1β μόνο όταν βρίσκονται σε συγκαλλιέργεια με κύτταρα του ενδομητρίου, γεγονός που οδηγεί στη σκέψη ότι η βλαστοκύστη για να εκκρίνει την

ιντερλευκίνη IL1β πρέπει πρώτα να έρθει σε επαφή με το ενδομήτριο (De los Santos *et al*, 1996; van Sinderen *et al*, 2012). Κατά επέκταση, η IL1β έχει προταθεί να είναι ένα από τα πρώτα σήματα της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο μιας και η έκφρασή της έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της προσταγλανδίνης E2, των ιντεγκρινών και του LIF στο ενδομήτριο (Simon *et al*, 1997; Vigano *et al*, 2003; Gonzalez *et al*, 2004), επηρεάζοντας σημαντικά την υποδεκτικότητά του.

Δυστυχώς, πολύ πρόσφατες μελέτες δεν υπάρχουν σχετικά με την έκφραση της IL1β από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα, αλλά τα αποτελέσματα που ήδη υπάρχουν φαίνεται να έρχονται σε συνοχή με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν στο 73% των βλαστοκύστεων τη μη ανίχνευση του παράγοντα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ιντερλευκίνης IL1β, παρότι ανέδειξαν την έκφραση-έκκριση της IL1β από τις βλαστοκύστες προ της επαφής τους με το ενδομήτριο της γυναίκας, αν και σε μικρό σχετικά ποσοστό (27%) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των βλαστοκύστεων που ελέγχθηκαν, εν τούτοις δεν επιβεβαίωσαν την πρόταση ότι ο παράγοντας αυτός μπορεί να βελτιώσει το ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης ανά μεταφορά. Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των βλαστοκύστεων ανά μεταφορά είναι 2,81 βλαστοκύστες, δεν βοηθάει στην ακριβή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Μια αντίστοιχη μελέτη με τη μεταφορά μόνο μίας βλαστοκύστης ανά μεταφορά, μπορεί να έδινε πιο σαφή αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του παράγοντα στο ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης.

Παρόλα αυτά όμως, το αναμενόμενο ήταν ακόμα και με τα κριτήρια της παρούσας μελέτης να αναδειχθεί κάποια διαφορά, έστω και μικρή ή όχι στατιστικά σημαντική μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των γυναικών, παρατήρηση που δεν μπορεί να προκύψει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ο έλεγχος ύπαρξης διαφοράς στις συγκεντρώσεις που έλαβε ο παράγοντας IL1β μεταξύ των ομάδων των γυναικών με θετική και αρνητική β-hCG δεν έδειξε επίσης κάποια διαφορά στατιστικής σημασίας ($P > 0.05$), ούτε βρέθηκε ένα εύρος τιμών που να συνδέεται με αυξημένο ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης ανά μεταφορά (πίνακας 9). Υπήρξε όμως η παρατήρηση, όπως και στην IL6, ότι οι μεγαλύτερες τιμές που έλαβε η IL1β ήταν στην ομάδα της αρνητικής β-hCG. Αντίστοιχα και με την IL6, η ομάδα της αρνητικής β-hCG, αναδεικνύει τις μεγαλύτερες τιμές για την IL1β, αλλά εμπεριέχει και τις τιμές της ομάδας με τη θετική β-hCG. Με δεδομένο παράλληλα ότι μόνο 2 μετρήσεις από τις 265 (100 γυναίκες με αρνητική β-hCG) είχαν τιμές εκτός του εύρους της κατηγορίας με τη θετική β-hCG, η παρατήρηση αυτή δεν φαίνεται να έχει διαγνωστικό όφελος.

Κατά συνέπεια, η έκκριση της ιντερλευκίνης IL1β από τις βλαστοκύστες, οι οποίες καλλιεργούνται σε διπλής φάσης καλλιεργητικό υγρό, δεν φαίνεται να επηρεάζει το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς σε ποσοστό κύησης και εμφύτευσης και συνεπώς η έκκριση του φλεγμονώδη παράγοντα IL1β από τα γονιμοποιημένα ωάρια 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας δεν επηρεάζει την εμφυτευτική τους ικανότητα και βιωσιμότητα και δεν φαίνεται να συνδέεται με κάποιο τρόπο με την επιλογή της καταλληλότερης βλαστοκύστης για εμβρυομεταφορά.

Το γεγονός όμως ότι και για τους δύο παράγοντες IL6 και IL1β οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν στην ομάδα γυναικών με αρνητικό αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς, μπορεί να λειτουργήσει ως έναυσμα για περαιτέρω μελέτες σχετικές με τους συγκεκριμένους φλεγμονώδεις παράγοντες από τις βλαστοκύστες, με στόχο να βρεθεί ένα εύρος τιμών που να σχετίζεται με την εμφυτευτική ικανότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας.

2.4.5 Συνδυασμός της έκφρασης-έκκρισης των ιντερλευκινών IL1β και IL6 από τις βλαστοκύστες και η επίδρασή τους στο αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς.

Δεδομένης της φύσης των IL1β και IL6 και του σημαντικού τους ρόλου στην εμφύτευση, εξετάσθηκε επίσης το ενδεχόμενο επίδρασής τους στο ποσοστό εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά, στην περίπτωση που και οι δύο παράγοντες εκφράζονται παράλληλα από τις βλαστοκύστες. Αρχικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων εξετάσθηκαν και αναλύθηκαν με σκοπό να αναδειχθεί η οποιαδήποτε διαφορά μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων σε ότι έχει να κάνει με τα επίπεδα έκφρασης-έκκρισής τους. Η ανάλυση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ιντερλευκίνη IL1β εκκρίνεται από τις βλαστοκύστες σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (περίπου διπλάσιες) από την ιντερλευκίνη IL6 με $P < 0.05$ (πίνακας 6). Το αποτέλεσμα αυτό είναι το ίδιο και μεταξύ των διαφορετικών ομάδων γυναικών με θετική και αρνητική β-hCG (πίνακες 7, 8). Από την εικόνα 50, φαίνεται επίσης ότι και οι δύο παράγοντες λαμβάνουν μεγαλύτερες τιμές στην ομάδα της αρνητικής β-hCG, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$).

Σημαντική επίσης παρατήρηση είναι ότι και οι δύο παράγοντες φαίνεται να εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Προηγούμενες μελέτες σε υπερκείμενα καλλιεργητικά υγρά γονιμοποιημένων ωαρίων έχουν δείξει ότι μέχρι το στάδιο της 2^{ης} ημέρας ανάπτυξής τους, η IL6 έχει συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5pg/ml και η IL1β παρουσιάζει τιμές μεγαλύτερες των 30pg/ml, ενώ στο στάδιο των βλαστοκύστεων υπάρχει περιορισμένη

έκφραση των παραγόντων απουσία των κυττάρων του ενδομητρίου που σηματοδοτούν την έκφραση και έκκρισή τους (Sheth *et al*, 1991; Sharkey *et al*, 1995; Yu *et al*, 2012).

Οι συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι μικρότερες του 0.1pg/ml και για τους δύο παράγοντες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχει πιθανότητα μία διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων των IL6 και IL1β καθώς το γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται. Η υπόθεση αυτή είναι πολύ πιθανή δεδομένου ότι μετά το στάδιο των 2 κυττάρων παρατηρείται η ενεργοποίηση των γονιδίων του προεμβρύου, αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας και της κυτταρικής του κινητικότητας. Οι γενετικές πληροφορίες μητρικής προελεύσεως παύουν να παίζουν το κυρίαρχο ρόλο και τα γονίδια του γονιμοποιημένου ωαρίου ενεργοποιούνται σταδιακά για να γίνει η έκφραση του ζυγωτικού πια γονιδιώματος. Μέσα σε όλες αυτές τις αλλαγές είναι πολύ πιθανό τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση και έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL1β και IL6 να υποεκφράζονται, μέχρι και τη στιγμή που το γονιμοποιημένο ωάριο θα εισέλθει στο ενδομήτριο της γυναίκας και θα δεχθεί συγκεκριμένα σήματα, τα οποία θα ενεργοποιήσουν την έκφρασή τους για να ξεκινήσει και ολοκληρωθεί τελικά η διαδικασία της εμφύτευσης.

2.4.6 Ο συνδυασμός έκφρασης-έκκρισης των ιντερλευκινών IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες δεν βελτιώνει το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά.

Από τις 245 γυναίκες (683 δείγματα) στις οποίες έγινε η μέτρηση των παραγόντων IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν στη μήτρα τους, στις 160 (443 δείγματα) δεν ανιχνεύθηκε κανένας από τους παράγοντες προς μελέτη και μόνο στις 85 (240 δείγματα) υπήρξε έστω μία μέτρηση των IL6 και IL1β ανά γυναίκα που έλαβε τιμή μεγαλύτερη του μηδενός. Οι ομάδες που διαμορφώθηκαν με βάση την παρατήρηση αυτή συγκρίθηκαν μεταξύ τους σε ποσοστό εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά και το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($P>0.05$). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι η έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL6 και IL1β από τις βλαστοκύστες πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα δεν σχετίζεται με τη βιωσιμότητα και την ικανότητα εμφύτευσης των βλαστοκύστεων αυτών και δεν φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ούτε συνδυαστικά ως δείκτης επιλογής της καταλληλότερης βλαστοκύστης προς μεταφορά (εικόνες 37, 38, 39, 40).

Παρά την μη ύπαρξη διαφοράς μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, εν τούτοις με μία παρατήρηση των αποτελεσμάτων μπορεί να διακριθεί ότι στην κατηγορία όπου οι παράγοντες IL6 και IL1β είναι ανιχνεύσιμοι το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης είναι

χαμηλότερο των υπολοίπων ομάδων. Για τη περεταίρω διερεύνηση αυτής της παρατήρησης και με βάση τη θεωρία που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4.4, χρειάζεται μία μελέτη με αρκετά μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, έτσι ώστε να αποδειχθεί αν όντως η τάση αυτή ισχύει με στατιστικά σημαντική διαφορά ή είναι απλά ένα τυχαίο γεγονός.

2.4.7 Οι φλεγμονώδεις παράγοντες IL6 και IL1β που εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα δεν σχετίζονται με το αναπτυξιακό στάδιο των βλαστοκύστεων.

Σε όλες τις γυναίκες που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, πριν την εμβρυομεταφορά τους καταγράφηκε η μορφολογία και η ποιότητα των βλαστοκύστεων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα. Τα στοιχεία αυτά συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν με σκοπό να εξετασθεί το ενδεχόμενο συσχετισμού μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιντερλευκινών IL6 και IL1β και του σταδίου ανάπτυξης των βλαστοκύστεων (πίνακας 12, εικόνα 51). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε να υπάρχει διαφορά ($P>0.05$) μεταξύ του κάθε παράγοντα ξεχωριστά με το στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης.

Ερευνητές έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την IL6 και IL1β με τη μορφολογία των γονιμοποιημένων ωαρίων, αλλά τα ευρήματα των μελετών τους δεν ήταν ικανά να στηρίξουν αυτή την υπόθεση (Sheth *et al*, 1991; De los Santos *et al*, 1996; Van Sinderen *et al*, 2012; Yu *et al*, 2012). Υπάρχει παρόλα αυτά μία μελέτη που συνδέει την ιντερλευκίνη IL1β με το στάδιο ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων, αλλά όχι και την ποιότητά τους και αναφέρει ότι η IL1β εκκρίνεται στο υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό των γονιμοποιημένων ωαρίων 2^{ης} και 3^{ης} ημέρας σε συγκεντρώσεις ανάλογες του αριθμού των κυττάρων τους (Taskin *et al*, 2012). Ο συσχετισμός όμως αυτός δεν φαίνεται να ανταποκρίνεται και στις βλαστοκύστες με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η στατιστική ανάλυση των οποίων δεν ανέδειξε καμία σχέση μεταξύ του σταδίου ανάπτυξής τους, το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των κυττάρων τους και την έκκριση των ιντερλευκινών IL6 και IL1β.

Η περαιτέρω ανάλυση των τιμών μεταξύ των δύο παραγόντων ανά στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) για τα στάδια HD, D, EXPD, ενώ έδειξε διαφορά ($P<0.05$) στις μεταξύ τους συγκεντρώσεις για τα στάδια EXPG, E. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στα στάδια αυτά με τη στατιστική διαφορά, αναφέρθηκαν και οι μεγαλύτερες τιμές που έλαβαν οι παράγοντες IL1β και IL6 (παράρτημα 5) και ανταποκρίνονται στην ομάδα με το αρνητικό αποτέλεσμα της β-hCG. Το τελευταίο, σε συνδυασμό με το ότι αυτές οι τιμές μπορεί να είναι και τυχαίες, δεδομένου ότι αναφέρθηκαν

μόνο σε 2 μετρήσεις από τις 683 για την IL1β και σε 1 για την IL6, μπορεί να εξηγεί αφενός το λόγο που αναδείχθηκε αυτή η στατιστική διαφορά και αφετέρου μπορεί να οδηγήσει και στην υπόθεση ότι η διαφορά αυτή είναι πλασματική. Εν τούτοις, αν υπάρχει, το γεγονός ότι οι μεγαλύτερες τιμές συνδυάζονται με το αρνητικό αποτέλεσμα κύησης και τα δύο πρώιμα στάδια ανάπτυξης των βλαστοκύστεων έχει μία συνέπεια, με τη λογική ότι είναι πιθανότερο για μία βλαστοκύστη περισσότερο ανεπτυγμένη, διευρυμένη να εμφυτευθεί από ότι μία πρώιμη βλαστοκύστη.

Η παραπάνω παρατήρηση δεν έχει κάποια διαγνωστική αξία σε ένα εργαστήριο εμβρυολογίας ως προς την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου προς εμβρυομεταφορά, διότι αναφέρεται σε μία διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο παραγόντων IL6 και IL1β και όχι για τον καθένα ξεχωριστά. Από στατιστικής άποψης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν υπάρχει διαφορά του κάθε παράγοντα ξεχωριστά με τα στάδια ανάπτυξης των βλαστοκύστεων, γεγονός που είναι συμβατό και με τα υπόλοιπα αποτελέσματα, τα οποία δεν αναδεικνύουν καμία επίδραση των φλεγμονωδών αυτών παραγόντων στο ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης ανά μεταφορά. Συνεπώς με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι φλεγμονώδεις παράγοντες IL6 και IL1β, όχι μόνο δεν επηρεάζουν το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά, αλλά και η έκκρισή τους δεν σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων ή την ποιότητά τους. Συνεπώς οι ιντερλευκίνες αυτές δεν συνδέονται με κάποιο τρόπο με την εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων και τη βιωσιμότητά τους.

2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη κατέληξε στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών δεν επηρεάζει το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση ($P>0.05$), με την προϋπόθεση ότι τα γονιμοποιημένα ωάρια που συμπεριλαμβάνονται στην εμβρυομεταφορά την έκτη ημέρα έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων ήδη από την πέμπτη ημέρα.
2. Οι ιντερλευκίνες IL6 και IL1β εκλύονται από τις βλαστοκύστες στο υπερκείμενο υγρό στο οποίο καλλιεργούνται προ της μεταφορά τους στη μήτρα της γυναίκας. Κατά συνέπεια δεν είναι απαραίτητα αναγκαίος ο “διάλογος” του προ-εμβρύου με το ενδομήτριο για την έκφραση των IL6 και IL1β από την βλαστοκύστη.
3. Η IL1β εκκρίνεται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την IL6 ($P<0.05$).
4. Η έκκριση των κυτταροκινών IL1β και IL6 από τις βλαστοκύστες δεν σχετίζεται με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά ($P>0.05$).
5. Η έκκριση των κυτταροκινών IL1β και IL6 από τις βλαστοκύστες δεν φαίνεται να σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων ή την ποιότητά τους ($P>0.05$).
6. Από την παρούσα μελέτη δεν προκύπτει ότι οι ιντερλευκίνες IL6 και IL1β σχετίζονται με την εμφυτευτική ικανότητα και βιωσιμότητα των βλαστοκύστεων.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανεύρεση μίας μη-παρεμβατικής ως προς τα γονιμοποιημένα ωάρια τεχνικής, η οποία θα χαρακτηριζόταν όπως και τα μορφολογικά κριτήρια αξιολόγησης, από μία σχετική αντικειμενικότητα. Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν αρνητικό ως προς την ανεύρεση καινούργιων δεικτών βιωσιμότητας των βλαστοκύστεων. Εν τούτοις, η τεχνική ανίχνευσης και ανάλυσης παραγόντων από το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό των βλαστοκύστεων, θα μπορούσε να συντελέσει ως έναυσμα για την ανάλυση περισσότερων φλεγμονωδών ή άλλων παραγόντων και να ωθήσει στην πιθανή δημιουργία ενός kit, με το οποίο θα μπορεί να προβλεφθεί η εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων, συνδράμοντας με αυτό τον τρόπο στην εμβρυομεταφορά ενός μόνο γονιμοποιημένου ωαρίου και τη μείωση του ποσοστού πολύδυμων κύησης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της αναπαραγωγικής ιατρικής είναι η μεταφορά ενός γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα της γυναίκας με ποσοστά επιτυχίας μεγαλύτερα από αυτά της φυσικής σύλληψης. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, ερευνητές ανά τον κόσμο έχουν επιδοθεί στην ανεύρεση μεθόδων επιλογής του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για εμβρυομεταφορά. Η καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι το στάδιο των βλαστοκύστεων (5^η ή 6^η ημέρα) προτείνεται από την εξωσωματική γονιμοποίηση ως η μέθοδος με τα υψηλότερα ποσοστά κύησης μετά από εμβρυομεταφορά. Η χρήση των βλαστοκύστεων ως κριτήριο επιλογής τα τελευταία χρόνια επικρατεί στα εργαστήρια εμβρυολογίας παγκοσμίως, διότι αποτελεί ένδειξη της βιωσιμότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων, αυξάνοντας το ποσοστό εμφύτευσης ανά μεταφορά.

Συγκριτικές τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι η μέθοδος εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων, προσφέρει ποσοστά κλινικών κύησης που ξεπερνούν το 50% δίνοντας τη δυνατότητα να συμπεριληφθεί μικρότερος αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων στην εμβρυομεταφορά, δίχως να διακινδυνεύεται το ποσοστό επιτυχίας. Παρόλα αυτά, η επίτευξη αυτού του ποσοστού εξασφαλίζεται με την επιλογή 2-3 βλαστοκύστεων ανά μεταφορά. Κατά συνέπεια, η ανάγκη ανεύρεσης ενός επιπλέον δείκτη εμφύτευσης με διαγνωστικό όφελος και ικανότητα κλινικής εφαρμογής έχει γίνει τα τελευταία χρόνια επιτακτική, με σκοπό να μειωθεί ακόμα περισσότερο ο αριθμός των γονιμοποιημένων ωαρίων που μεταφέρονται (1-2) και να περιοριστεί το ποσοστό πολύδυμων κύησης, που αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Η παρατήρηση ότι η αντίδραση της μήτρας κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο δείχνει μεγάλη ομοιότητα με το φαινόμενο της φλεγμονής, οδήγησε την έρευνα στον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης σε νέες κατευθύνσεις σχετικά με την ανεύρεση δεικτών εμφύτευσης. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην ανίχνευση φλεγμονωδών παραγόντων που εκλύονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα και στη συσχέτισή τους με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης ανά μεταφορά. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες που επιλέχθηκαν να μετρηθούν ανήκουν στην κατηγορία των κυτταροκινών και είναι η ιντερλευκίνη IL1β και IL6.

Η μελέτη αυτή είναι μία συγκριτική τυχαιοποιημένη μελέτη 300 γυναικών, οι οποίες έχουν χωριστεί σε 2 ομάδες ανάλογα με το αν η προγραμματισμένη εμβρυομεταφορά τους είναι την 5^η ή την 6^η ημέρα ανάπτυξης των βλαστοκύστεων. Το πρώτο στάδιο της μελέτης σκοπό είχε

να αναδείξει εάν οι ιντερλευκίνες IL1β και IL6, οι οποίες εκφράζονται από το ενδομήτριο κατά την εμφύτευση, εκλύονται και από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα της γυναίκας και σε ποιές συγκεντρώσεις. Έπειτα, εξετάσθηκε εάν η έκφραση ή η συγκέντρωσή των φλεγμονωδών αυτών παραγόντων σχετίζονται με το αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης, την ποιότητά της και τελικά με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά. Η μελέτη διεξήχθη σε ασθενείς που προγραμματίστηκαν για εμβρυομεταφορά 5^{ης} ή 6^{ης} ημέρας με σκοπό να αναδειχθεί, αν υπάρχει, διαφορά στο ποσοστό εμφύτευσης βλαστοκύστεων διαφορετικών ημερών και αν αυτό σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων από τις βλαστοκύστες αυτές.

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης τα γονιμοποιημένα ωάρια καλλιεργήθηκαν σε αριθμημένες σταγόνες καλλιεργητικού υγρού, που η κάθε σταγόνα περιείχε ένα αναπτυσσόμενο γονιμοποιημένο ωάριο. Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό μέσα στο οποίο αναπτύσσονταν τα γονιμοποιημένα ωάρια, συλλέχθηκε την 5^η ημέρα ανάπτυξής τους, ανεξάρτητα από την ημέρα της προγραμματισμένης εμβρυομεταφοράς τους. Το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ήταν 845, αλλά τελικά μετρήθηκαν τα 683 δείγματα, τα οποία αντιστοιχούν σε 245 γυναίκες και 683 βλαστοκύστες. Η απόκλιση 162 δειγμάτων από τη μέτρηση οφείλεται σε διάφορες δυσκολίες που αντιμετωπίστηκαν σε σχέση με τη διαδικασία συλλογής των δειγμάτων. Το σύστημα Luminex είναι η μέθοδος που επιλέχθηκε για την ανίχνευση και τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών IL1β και IL6, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας της μεθόδου και το μικρό σχετικά χρόνο που χρειάζεται για κάθε κύκλο ανάλυσης των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας εμβρυομεταφοράς βλαστοκύστεων σε ποσοστό εμφύτευσης και κύησης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση, με την προϋπόθεση ότι κατά την εμβρυομεταφορά βλαστοκύστεων 6^{ης} ημέρας συμπεριλαμβάνονται γονιμοποιημένα ωάρια, τα οποία έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων ήδη από την 5^η ημέρα. Η παρατήρηση αυτή είναι δέουσας σημασίας, διότι προσφέρει ένα ικανοποιητικό χρονικό διάστημα περίπου 24 ωρών (μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας ανάπτυξης των βλαστοκύστεων), το οποίο είναι πολύ σημαντικό ως προς την ανίχνευση και ανάλυση παραγόντων σχετικών με την επιλογή του καταλληλότερου γονιμοποιημένου ωαρίου για μεταφορά στη μήτρα, δίχως να διακυβεύεται το αποτέλεσμα της εμβρυομεταφοράς μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση. Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, η μελέτη και ανάλυση των συγκεντρώσεων των IL6 και IL1β που εκλύονται από βλαστοκύστες πριν την εμβρυομεταφορά τους, δεν συσχετίστηκαν με την ημέρα της προγραμματισμένης μεταφοράς τους (5^η ή 6^η ημέρα) και ως εκ τούτου, όλες οι ασθενείς που

συμπεριλήφθησαν στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα, χωρίς περαιτέρω κατηγοριοποίηση.

Σε ότι αφορά τους φλεγμονώδεις παράγοντες IL1β και IL6 που εκκρίνονται από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα, δεν βρέθηκε κανένας συσχετισμός με το ποσοστό εμφύτευσης και κύησης μετά την εμβρυομεταφορά. Πιο συγκεκριμένα, από τις 245 γυναίκες στις οποίες έγινε επιτυχής συλλογή του υπερκείμενου καλλιεργητικού υγρού, στις 160 δεν ανιχνεύθηκαν οι παράγοντες IL6 και IL1β (η μέτρηση ήταν μηδενική) σε κανένα από τα υπερκείμενα υγρά (που αντιστοιχούν σε βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν) και μόνο στις 85 γυναίκες, υπήρξε έστω μία μέτρηση που ήταν μεγαλύτερη του μηδενός σε κάποιον από τους δύο παράγοντες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$) στο ποσοστό κύησης και εμφύτευσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων γυναικών της μελέτης.

Από τις 245 γυναίκες (683 δείγματα) στις οποίες έγινε η μέτρηση των παραγόντων IL6 και IL1β, στις 195 (542 δείγματα) για την IL6 και στις 181 γυναίκες (504 δείγματα) για την IL1β δεν ανιχνεύθηκε ο παράγοντας, ενώ μόνο στις 50 γυναίκες (141 δείγματα) για τον IL6 και στις 64 γυναίκες (179 δείγματα) για την IL1β, η τιμή τους ήταν μεγαλύτερη του μηδενός έστω σε μία από τις βλαστοκύστες που μεταφέρθηκαν ανά γυναίκα. Τα ποσοστά κύησης και εμφύτευσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των γυναικών τόσο για την ιντερλευκίνη IL6 όσο και για την ιντερλευκίνη IL1β δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P>0.05$). Η ανάλυση των μετρήσεων οδήγησε επίσης στο συμπέρασμα ότι από στατιστικής άποψης δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($P>0.05$) των συγκεντρώσεων των IL6 και IL1β μεταξύ των γυναικών με θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα εμβρυομεταφοράς (μέτρηση β-hCG). Κατά επέκταση, η έκκριση των φλεγμονωδών παραγόντων IL1β και IL6 από τα γονιμοποιημένα ωάρια 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας δεν φαίνεται να συνδέεται με κάποιο τρόπο με την επιλογή της καταλληλότερης βλαστοκύστης για εμβρυομεταφορά.

Η μόνη διαφορά στατιστικής σημασίας που αναδείχθηκε ($P<0.05$) είναι μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο παραγόντων που ανιχνεύθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ιντερλευκίνη IL1β εκκρίνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι η IL6 από τις βλαστοκύστες προ της μεταφοράς τους στη μήτρα. Παράλληλα, εξετάστηκε και το ενδεχόμενο συσχετισμού της συγκέντρωσης των ιντερλευκινών και του σταδίου ανάπτυξης των βλαστοκύστεων και από στατιστικής άποψης δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά στην έκφραση των παραγόντων ($P>0.05$) με τα στάδια ανάπτυξης των βλαστοκύστεων.

Συμπερασματικά μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι φλεγμονώδεις παράγοντες IL6 και IL1β, όχι μόνο δεν σχετίζονται με το ποσοστό κύησης και εμφύτευσης ανά μεταφορά, αλλά και ότι η έκκρισή τους δεν επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων ή την ποιότητά τους. Συνεπώς, οι ιντερλευκίνες αυτές δεν συνδέονται με κάποιο τρόπο με την εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων ή τη βιωσιμότητά τους. Ως εκ τούτου, δεν φαίνεται να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες εμφύτευσης, με απώτερο σκοπό την επιλογή ενός και μόνο γονιμοποιημένου ωαρίου για μεταφορά στη μήτρα, που ήταν και ο στόχος της παρούσας μελέτης. Η τεχνική ανίχνευσης και ανάλυσης παραγόντων από το υπερκείμενο καλλιεργητικό υγρό των βλαστοκύστεων, θα μπορούσε να συντελέσει ως έναυσμα στην ανάλυση περισσότερων φλεγμονωδών παραγόντων και των υποδοχέων τους και να ωθήσει την έρευνα σε νέα μονοπάτια, χρήσιμα για το χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Εν τούτοις, περαιτέρω έρευνες στον τομέα αυτόν χρειάζονται, ώστε να αναδειχθεί το ενδεχόμενο ύπαρξης συσχετισμού των φλεγμονωδών παραγόντων που εκλύονται από τις βλαστοκύστες με το ποσοστό εμφύτευσης ή κύησης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

SUMMARY

The aim of reproductive medicine is the transfer of one embryo to the woman's uterus with success rate greater than natural conception. To achieve this goal, researchers all over the world have been focused in finding new techniques and methods for the selection of viable embryos for embryotransfer (ET). The culture of human embryos to the blastocyst stage (Day 5 or Day 6) has been proposed to have the highest pregnancy and implantation rates after IVF. Blastocysts over the last years have been used at the embryological labs worldwide as a marker of embryo viability, increasing the percentage of clinical and pregnancy rates after IVF. Comparative randomized studies have shown that blastocyst embryotransfer offers pregnancy rates higher than 50%, giving thus a greater chance of including fewer embryos in the ET, without compromising the success rate. However, most of the studies published have pointed out that in order to achieve this pregnancy rate, 2-3 blastocysts need to be transferred to the woman's uterus. Consequently, there is a mandatory need of finding an extra marker of implantation, other than the blastocysts themselves or the morphological criteria, that would increase the probability of choosing the most viable embryo for transfer; minimizing thus the probability of multiple pregnancies that constitutes the biggest default of IVF.

The observation, that the mechanism of implantation shows high similarity to inflammation, led to new insights in the field of IVF, as it concerns to the need of finding new markers of implantation. Immune factors as cytokines, chemokines and some growth factors have been shown to play a vital role into the mother-embryo "dialogue" during adhesion and invasion of the blastocyst to the endometrium. The current study has been focused to the detection of inflammatory factors secreted by blastocysts before they are transferred to the uterus and their relation to the pregnancy and implantation rate after IVF. The inflammatory factors that have been chosen to be analyzed belong to the cytokine family and they are interleukin IL1b and IL6.

This is a comparative randomized study of 300 women that have been separated in two groups depending on whether their ET day had been scheduled on day 5 or day 6. The initial purpose of the study was to prove if interleukins IL6 and IL1b, which are known to be expressed by the endometrium during implantation, are also expressed and secreted by blastocysts before their transfer to the woman's uterus. Following, it was examined if the expression or the concentration of these factors is related to the developmental stage and quality of blastocysts and finally to the implantation rate per transfer. This study was conducted to patients programmed to day 5 or day 6 embryotransfer, in order to examine

whether there is a difference in implantation rates between the two groups and if this is related in any way to the production of IL6 and IL1b by the blastocysts.

For the purposes of the current study, embryos were cultured in numbered drops of culture medium, containing one embryo per drop. Drops were collected on day 5 of embryo development, regardless the day of the programmed embryotransfer (day 5 or day 6). The total amount of samples collected was 845, but finally 683 were measured, corresponding to 245 women and 683 blastocysts. 162 samples were excluded due to difficulties occurred during the collection procedure. The detection and measurement of IL6 and IL1b concentrations were carried out using LUMINEX technology, a highly sensitive method requiring a relatively short time period for every cycle to be completed.

Based on the results, day 6 embryo transfer shows no statistically significant difference ($P>0.05$) in clinical pregnancy rate and implantation rate compared to day 5 embryo transfer, under the condition that embryos being transferred have already been developed to the blastocyst stage by day 5. This observation is of great importance, as it provides a satisfactory time period (almost 24 hrs), time essential for the detection and analysis of several implantation markers, without compromising the result of the embryotransfer. Consequently, in respect to this study, the analysis and measurement of inflammatory factors secreted by blastocysts before embryotransfer were not separated in day 5 and day 6 results; all women were considered to belong in the same group of patients programmed to have a blastocyst embryotransfer.

As it concerns to the inflammatory factors IL6 and IL1b secreted by blastocysts before transfer, results indicated no significant difference ($P>0.05$) in pregnancy and implantation rates related to these factors. Out of 245 women, 160 showed no detection of IL6 and IL1b and only in 85 women, there has been at least one sample per patient with a positive value for one of these factors. Statistical analysis led to the conclusion that there is no correlation of those factors with the viability and implantation competence of blastocysts.

Out of 245 patients, 195 (542 samples) for IL6 and 181 (504 samples) women for IL1b showed no detection of the factors tested, while only 50 (141 samples) for IL6 and 64 (179 samples) for IL1b, that had at least one measurement per patient with a positive value. Statistical analysis showed no difference ($P>0.05$) in pregnancy and implantation rates between the two groups of women for IL6 and IL1b respectively. Comparison of the concentrations of IL6 and IL1b between women with a positive and negative b-hCG resulted

also in no statistically significant difference ($P>0.05$) for both of the factors tested. Concluding, secretion of IL6 and IL1b by blastocysts cannot be correlated in any way with the selection of the best blastocyst for embryotransfer.

The only difference statistically significant demonstrated by the results was between IL6 and IL1b levels secreted ($P<0.05$). Interleukin's IL1-b secretion levels are higher than interleukin's IL6. Another analysis of the results was carried out in order to examine whether the IL6 and IL1b concentrations secreted by blastocysts are related to their developmental stage or quality. Again no difference resulted from the analysis ($P>0.05$) confirming thus the previous conclusions demonstrating no correlation of IL6 and IL1b secretion with blastocyst viability and clinical pregnancy rates after IVF.

As a conclusion, inflammatory factors IL6 and IL1b secreted by blastocysts before embryo transfer do not affect pregnancy and implantation rates and do not correlate with the developmental stage and quality of blastocysts. As a consequence, those factors cannot be used as indicators of blastocyst viability and implantation competence and therefore they cannot be used as markers for the selection of the best blastocyst for transfer. This technique of detection and analysis of secreted factors from the supernatant culture medium of embryos, it can trigger the study and analysis of more factors related to implantation offering new insights in reproductive medicine. However, further research is needed to indicate whether inflammatory factors secreted by blastocysts before their embryotransfer can affect pregnancy and implantation rates after IVF.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Επιστημονικά Άρθρα

Abou-Haila, A., Tulsiani, D., R. (2000) Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 379(2), 173-182

Aboulghar, M., M., Aboulghar, M., A., Mansour, R., T., Serour, R., T., Amin, Y., M., Abou-Setta, A., M. (2003) Pregnancy rate is not improved by delaying embryo transfer from days 2 to 3. *European Journal of Obstetrics and Gynecologists and Reproductive Biology*: 107(2), 176-179

Achache, H., Revel, A. (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*: 12(6), 731-746

Adjaye, J., Huntriss, J., Herwig, R., BenKahla, A., Brink, T., C. Wierling, C., Hultschig, C., Groth, D., Yaspo, M., L., Picton, H., M. Gosden, R., G., Lehrach, H. (2005) Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells*: 23, 1514-1525

Aflalo, E., D., Sod-Moriah, U., A., Potashnik, G. & Har-Vardi, I. (2007) EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 54 [doi: 10.1186/1477-7827-5-4]

Aghajanova, L., Stavreus-Evers, A., Nikas, Y., Hovatta, O., Landgren, B., M. (2003) Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertility and Sterility*: 79(suppl 1), 808-814

Aghajanova, L., Giudice, L., C. (2011) Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. *Reproductive Sciences*: 18, 229-251

Al-Inany, H., G., Abou-Setta, A., M., Aboulghar, M., A., Mansour, R., T., Serour, G., I. (2009) Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. *Gynecological Endocrinology*: 25(6), 372-378

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*: 0(0), 1-14

- Amoah, E., A., Gelaye, S. (1991) Embryo recovery, Evaluation, Storage and Transfer in Goats. URL: <http://www.ag.fvsu.edu/html/publication/GoatCenter/amoah1.htm>
- Aplin, J., D., Kimber, S., J. (2004) Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 2, 48
- Aplin, J., D., Spanswick, C., Behzad, F., Kimber, S., J., Vicovac, L. (1996) Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Molecular Human Reproduction*: 2, 527–534
- Aricescu, A., R., Jones, E., Y. (2007) Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Current Opinion in Cell Biology*: 19, 543–550
- Arici, A., Engin, O., Attar, E., Olive, D., L. (1995) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 80, 1908-1915
- Arnaout, M., A., Goodman, S., L., Xiong, J., P. (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current Opinions in Cell Biology*: 19, 495–50
- Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H., D. (2003) Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacological Reviews*: 55, 241-269
- Ashkar, A., A., Black, G., P., Wei, Q., He, H., Liang, L., Head, J., R., Croy, B., A. (2003) Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *Journal of Immunology*: 171, 2937-2944
- Austgulen, R., Arntzen, K., J., Vatten, I., J., Kahn, J., Sunde, A. (1995) Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor-beta) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization. *Human Reproduction*: 10(1), 171-176
- Ballinger, M., N., Paine, R. 3rd, Serezani, C., H., Aronoff, D., M., Choi, E., S., Standiford, T., J., Toews, G., B., Moore, B., B. (2006) Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*: 34, 766-774
- Bamberger, A., M., Minas, V., Kalantaridou, S., N., Radde, J., Sadeghian, H., Löning, T., Charalampopoulos, I., Brümmer, J., Wagener, C., Bamberger, C., M., Schulte, H., M., Chrousos, G., P., Makrigiannakis, A. (2006a) Corticotropin-releasing hormone modulates

human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *American Journal of Pathology*: 168, 141-150

Bamberger, C., M., Minas, V., Bamberger, A., M., Charalampopoulos, I., Fragouli, Y., Schulte, H., M., Makrigiannakis, A. (2006b) Expression of urocortin in the extravillous human trophoblast at the implantation site. *Placenta*: 28(2-3), 127-132

Baranao, R., I., Piazza, A., Rumi, L., S., Polak de Fried, E. (1997) Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. *American Journal of Reproductive Immunology*: 37, 191-194

Barcroft, L., C., Offenberg, H., Thomsen, P., Watson, A., J. (2003) Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Developmental Biology*: 256(2), 342-354

Barksby, H., E., Lea, S., R., Preshaw, P., M., Taylor, J., J. (2007) The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical Experiments of Immunology*: 149, 217-225

Barrenetxea, G., Lopez de Larruzea, A., Ganzabal, T., Jimenez, R., Carbonero, K., Mandiola, M. (2005) Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertility and Sterility*: 83, 49-53

Basak, S., Dhar, R., Das, C. (2002) Steroids modulate the expression of alpha4 integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biology of Reproduction*: 66, 1784–1789

Battersby, S., Critchley, H., O., de Brum-Fernades, A., J., Jabbour, H., N. (2004) Temporal expression and signaling of prostacyclin receptor in the human endometrium across the menstrual cycle. *Reproduction*: 127, 79-86

Baumann, C., G., Morris, D., G., Sreenan, J., M., Leese, H., J. (2007) the quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Molecular Reproduction and Development*: 74(10), 1345-1353

Bellehumeur, C., Blanchet, J., Fontaine, J., Y., Bourcier, N., Akoum, A. (2009) Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. *Human Reproduction*: 24, 2193-2204

- Ben-Yair, E., Less, A., Lev, S., Ben-Yehoshua, L., Tartakovsky, B. (1997) Tumour necrosis factor alpha binding to human and mouse trophoblast. *Cytokine*: 9, 830-836
- Bergeron, C. (2000) Problems of endometrial histology interpretation. *Climacteric*: 3(4), 288-293
- Bielanska, M., Jin, S., Bernier, M., Tan, S., L., Ao, A. (2005) Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*: 84, 336-342
- Biggers, J., D., Lawitts, J., A., Lechene, C., P. (1993) The prospective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development*: 34, 380-390
- Biggers, J., D. (1998) Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *International Journal of developmental biology*: 42, 879-884
- Biggers, J., D., McGinnis, L., Raffin, M. (2000) Amino acids and Preimplantation Development of the Mouse in Protein-Free Potassium Simplex Optimized Medium. *Biology of Reproduction*: 63, 281-293
- Biggers, J., D., Racowsky, C. (2002) The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in medium KSOM^{AA}: is a two-step protocol necessary? *Reproduction Biomedicine Online*: 5, 133-140
- Biggers, J., D. (2012) IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reproductive BioMedicine Online*: 25(2), 118-127
- Birdsall, M., A., Hopkisson, J., F., Grant, K., E., Barlow, D., H. & Mardon, H., J. (1996) Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium. *Molecular Human Reproduction*: 2, 31-34 [doi:10.1093/molehr/2.1.31]
- Bischof, P., Campana, A. (2000) Molecular mediators of implantation. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*: 14(5), 801-814
- Blake, D., A., Farfuhar, C., M., Johnson, N., Proctor, M. (2007) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database System Reviews*: (4): CD002118

- Bloor, D., J., Metcalfe, A., D., Rutherford, A., Brison, D., R., Kimber, S., J. (2002) Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction*: 8, 237–245
- Bolton, V., N., Wren, M., E., Parsons, J., H. (1991) Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertility and Sterility*: 55, 830-832
- Boraschi, D., Lucchesi, D., Hainzl, S., Leitner, M., Maier, E., Mangelberger, D., Oostingh, G., J., Pfaller, P., Pixner, P., Dinarello, C., A. (2011) IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European Cytokine Network*: 22, 127-147
- Bothwick, J., M., Charnock-Jones, D., S., Tom, B., D., Hull, M., L., Teirney, R., Philips, S., C., Smith, S., K. (2003) Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular Human Reproduction*: 9, 19-33
- Boucher, A., Kharfi, A., A.-Akoum, M., Bossu, P., Akoum, A. (2001) Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biology for Reproduction*: 65, 890-898
- Bowen, J., A., Hunt, J., S. (2000) The role of integrins in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 223(4), 331-43
- Brakebusch, C., Hirsch, E., Potocnik, A., Fassler, R. (1997) Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science*: 110(Pt 23), 2895–2904
- Branzini, C., Lavalpe, M., Nodar, F., Rawe, V. (2007) Visualization of cytoskeleton components during fertilization in mammals. *Fertility and Sterility*: 88, 1435-1436
- Brison, D., R., Houghton, F., D., Falconer, D., Roberts, S., A., Hawkhead, J., Humpherson, P., G., Lieberman, B., A., Leese, H., J. (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction*: 19(10), 2319-2324
- Bui, T., D., Zhang, L., Rees, M., C., Bicknell, R., Harris, A., L. (1997) Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b, and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *British Journal of Cancer*: 75, 1131-1136

- Burghardt, R., C., Johnson, G., A., Jaeger, L., A., Ka, H., Garlow, J., E., Spencer, T., E., Bazer, F., W. (2002) Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs*: 172(3):202-17
- Burton, G., J., Hempstock, J., Jauniaux, E. (2003) Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reproductive Biomedicine Online*: 6, 84-96
- Bushnik, T., Cook, J., Hughes, E., Tough, T. (2012) Seeking medical help to conceive. *Health Reports*: 23 (4), 7-13
- Byun, H., S., Lee, G., S., Lee, B., M., Hyun, S., H., Choi, K., C. & Jeung, E., B. (2008) Implantation-related expression of epidermal growth factor family molecules and their regulation by progesterone in the pregnant rat. *Reproductive Sciences*: 15, 678–689 [doi: 10.1177/1933719108317581]
- Caballero-Campo, P., Dominguez, F., Coloma, J., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (2002) Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation. *Molecular human Reproduction*: 8, 375-384
- Campbell, S., Swann, H., R., Seif, M., W., Kimber, S., J., Aplin, J., D. (1995) Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction*: 10, 1571–1578
- Carillo, A., J., Atiee, S., H., Lane, B., Pridham, D., D., Risch, P., Silverman, I., H., Cook, C., L. (1998a) Oolemma rupture inside the intracytoplasmic sperm injection needle significantly improves the fertilization rate and reduces oocyte damage. *Fertility and Sterility*: 70(4), 676-679
- Carillo, A., J., Lane, B., Pridman, D., D., Risch, P., P., Pool, T., B., Silverman, I., H., Cook, C., L. (1998b) Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphate-free media. *Fertility and Sterility*: 69(2), 329-334
- Carpenter, K., D., Korach, K., S. (2006) Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 1092, 361-373

Carson, D., D., Tang, J., P., Julian, J. (1993) Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Developmental Biology*: 155, 97–106

Carson, D., D., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M., C., Vermon, M., Yuan, L., Fritz, M., A., Lessey, B. (2002) Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Molecular Human Reproduction*: 8, 871-879

Cervero, A., Horcajadas, J., A., Dominquez, F., Pellicer, A., Simon, C. (2005) Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproductive BioMedicine Online*: 10, 217-223

Chakraborty, I., Das, S., K., Wang, J., Dey, S., K. (1996) Developmental expression of the cyclo-oxygenase-I and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *Journal of Molecular Endocrinology*: 16, 107-122

Champion, H., Innes, B., A., Robson, S., C., Lash, G., Bulmer, J., N. (2012) Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. *Molecular Human Reproduction*: 18(8), 391-400

Chandrasekharan, N., V., Dai, H., Roos, K., L., Evanson, N., K., Tomsik, J., Elton, T., S., Simmons, D., L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proceedings in National Academy of Science*: 99, 13926-13931

Charnock-Jones, D., S., Sharkey, A., M., Fenwick, P., Smith, S., K. (1994) Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at the time. *Journal of Reproductive Fertility*: 101, 421-426

Chatot, C., L., Ziomek, C., A., Bavister, B., D., Lewis, J., L., Torres, I. (1989) An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*: 86, 679-688

- Chen, H., F., Lin, C., Y., Chao, K., H., Wu, M., Y., Yang, Y., S., Ho, H., N. (2002) Defective production of interleukin-11 by deciduas and chorionic villi in human an embryonic pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 87, 2320-2328
- Chia, C., M., Winston, R., M. & Handyside, A., H. (1995) EGF, TGF- α and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development*: 121, 299–307
- Chung, I., B., Yelian, F., D., Zaher, F., M., Gonik, B., Evans, M., I., Diamond, M., P., Svinarich, D., M. (2000) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta*: 21, 320-324
- Conaghan, J., Hardy, K., Handyside, A., H., Winston, R., M., Leese, H., J. (1993) Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 10, 21-30
- Conaghan, J., Hardy, K., Leese, H., J., Winston, R., M., L., Handyside, A., H. (1998) Culture of human preimplantation embryos to the blastocyst stage: a comparison of three media. *International journal of developmental Biology*: 42, 885-893
- Copichandran, N., Leese, H., J. (2003) Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction*: 126(3), 299-308
- Cork, B., A., Tuckerman, E., M., Li, T., C., Laird, S., M. (2002) Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Molecular Human Reproduction*: 8, 841-848
- Coutifaris, C., Kao, L., C., Sehdev, H., M., Chin, U., Babalola, G., O., Blaschuk, O., W., Strauss, J., F., 3rd (1991) E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development*: 113, 767–777
- Dadi, T., D., Li, M., W. & Lloyd, K., C. (2009) Decreased growth factor expression through RNA interference inhibits development of mouse preimplantation embryos. *Comparative Medicine*: 59, 331–338
- Dai, D., Wolf, D., M., Litman, E., S., White, M., J., Leslie, K., K. (2002) Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Research*: 62, 881–886

- Dai, B., Cao, Y., Liu, W., Yang, Y., Chen, D., Duan, E. (2003) Dual roles of progesterone in embryo implantation in mouse. *Endocrine*: 21(2), 123-132
- Dale, B., Santella, L., Tosti, E. (1991) Gap-junctional permeability in early and cleavage-arrested ascidian embryos. *Development*: 112(1), 153-160
- Dale, B., Fiorentino, A., de Simone, M., L., di Matteo, L., di Frega, A., S., Wilding, M, Fehr, P., Bassan, E., Lo Giudice, C., Maseli, A., Cappiello, F., Zullo, F. (2002) Zygote versus embryo transfer: a prospective randomized multicenter trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 19(10), 456-461
- Dard, N., Breuer, M., Maro, B., Louvet-Vallee, S. (2008) Morphogenesis of the mammalian blastocyst. *Molecular and Cellular Endocrinology*: 282(1-2), 70-77
- Das, S.,K., Wang, X.,N., Paria, B.,C., Damm, D., Abraham, J.,A., Klagsbrun, M., Andrews, G ., K. & Dey, S., K. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*: 120, 1071–1083
- Daya, S. (2007) WITHDRAWN: Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane database of systematic reviews*: 18(1): CD001299
- Defrere, S., Van Langendonck, A., Moulin, P., Befahy, P., Gonzalez, D., Martinez-Madrid, B., Dolmans, M., M., Donnez, J. (2005) Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *American Journal of Reproductive Immunology*: 54, 5–12
- Dekel, N., Grainsky, Y., Granot, I., Mor, G. (2010) Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*: 63, 17-21
- De los Santos, M., J., Mercader, A., Frances, A., Portoles, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biology of Reproduction*: 54, 563-574
- De Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J., A., Ferreretti, A., P., Korsak, V., Kupka, M., Nygren, K., G., Andersen, A., N. (2010) Assisted reproductive technology in

Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*: 25 (8), 1851-1862

De Vos, A., Steirteghem, A., V. (2001) Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis*: 21, 767-780

Desai, N., Goldfarb, J. (1998) Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor / cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Human Reproduction*: 13(6), 1600-1605

Devreker, F., Hardy, K., van den Bergh, M., Vannin, A., S., Emiliani, S., Englert, Y. (2001) Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*: 16, 749-756

Dey, S., K., Lim, H., Das, S., K., Reese, J., Paria, B., C., Daikoku, T., Wang, H. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocrinology Reviews*: 25, 341-373

Diaz-Cueto, L., Stein, P., Jacobs, A., Schultz, R., M., Gerton, G., L. (2000) Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin. (epithelin/granulin precursor). *Molecular Medicine*: 217, 406-418

Dimitriadis, E., Salamonsen, L., A., Robb, L. (2000) Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukemia inhibitory factor and prolactin. *Molecular Human Reproduction*: 6, 907-914

Dimitriadis, E., White, C., A., Jones, R., L., Salamonsen, L., A. (2005) Cytokines, Chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*: 11, 613-630

Dimitriadis, E., Menkhorst, E., Salamonsen, L., A., Paiva, P. (2010a) Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta*: 31(suppl), S99-S104

Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N., J., Paiva, P., Salamonsen, L., A. (2010b) Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *The international journal of developmental biology*: 54, 313-322

Ding, Y., Q., Zhu, L., J., Bagchi, M., K., Bagchi, I., C. (1994) Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology*: 135, 2265-2274

- Doherty, A., J., Jackson, S., P. (2001) DNA repair: how Ku makes ends meet. *Current Biology*: 11, R920-R924
- Dokras, A., Sargent, I., L., Ross, C., Gardner, R., L., Barlow, D., H. (1990) Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Human Reproduction*: 5, 821-825
- Dokras, A., Sargent, I., L., Barlow, D., H. (1993) Human Blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Human Reproduction*: 8(12), 2119-2127
- Dominquez, F., Pellicer, A., Simon, C. (2003a) The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface-a review. *Placenta*: 24(suppl B), S48-S55
- Dominquez, F., Galan, A., Martin, J., J., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (2003b) Hormonal and embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5 and CCR2B in the human endometrium and the human blastocyst. *Molecular Human Reproduction*: 9, 189-198
- Dominquez, F., Pellicer, A., Simon, C. (2003c) Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Reproductive Biomedicine Online*: 6, 332-338
- Dominguez, F., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., Simon, C. (2005) Embryonic Implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *The FASEB Journal*: 19(9), 1056-1060
- Dominquez, D., C., Lopes, R., Torres, M., L. (2007) Proteomics: clinical applications. *Clinical Laboratory Science*: 20, 245-248
- Dominquez, F., Gadea, B., Esteban, F., J., Horcajadas, J., A., Pellicer, A., Simon, C. (2008) Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Human Reproduction*: 23, 1993-2000
- Dominquez, F., Gadea, B., Mercader, A., Esteban, F., J., Pellicer, A., Simon, C. (2010) Embryologic outcomes and secretome profile of implanted blastocyst obtained after co-culture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertility and Sterility*: 93, 774e1-782e1

- Dubinsky, V., Pehlmann, T., G., Suman, P, Gentile, T., Markert, U., R., Gutierrez, G. (2010) Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *American Journal of Reproduction*: 63, 193-199
- Ducibella, T., Ukena, T., Karnovsky, M., Anderson, E. (1977) Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Cell Biology*: 74(1), 153-167
- Dunn, C., L., Kelly, R., W., Critchley, H., O. (2003) Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive Biomedicine Online*: 7(2), 151-161
- Eckert, J., J., McCallum, A., Mears, A., Rumsby, M., G., Cameron, I., T., Fleming, T., P. (2004) Specific PKC isoforms regulate blastocoels formation during mouse preimplantation development. *Developmental Biology*: 274, 384-401
- Edwards, R., G. (1981) Test tube babies. *Nature*: 293, 253-256
- El-Toukhy, T., Wharf, E., Walavalkar, R., Singh, A., Bolton, V., Kharaf, Y., Braude, P. (2011) Delayed blastocyst development does not influence the outcome of frozen-thawed transfer cycles. *BJOG*: 118(13), 1551-1556
- Elder K., Nelson, L., R. (2001) Use of third generation gonadotrophin-releasing hormone antagonists in *in vitro* fertilization-embryo transfer: a review. *Obstetrical and Gynecological Survey*: 56, 576-588
- Elgindy, E., Elsedek, M., S. (2012) Day 5 expanded blastocysts transferred on same day have comparable outcome to those left for more extended culture and transferred on day 6. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 29(10), 1111-1115
- Elliott, R., L., Blobe, G., C. (2005) Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*: 2078-2093
- Enders, A., C. (2000) Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Seminars in Reproductive Medicine*: 18(3), 255-263

- Erbach, G., T., Lawitts, J., A., Papaioannou, V., E., Biggers, J., D. (1994) Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biology of Reproduction*: 50, 1027-1033
- Eriksson, M., Meadows, S., K., Wira, C., R., Sentman, C., L. (2004) Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *Journal of Leukocyte Biology*: 76, 667-675
- Ertzeid, G., Dale, P., O., Tanbo, T., Storeng, R., Kjekshus, E., Abyholm, T. (1999) Clinical outcome of day2 versus day3 embryo transfer using serum-free culture media: a prospective randomized study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 16(10), 529-534
- Espey, L., L. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*: 50, 233-238
- Feinberg, R., F., Kliman, H., J., Wang, C., L. (1994) Transforming growth factor-beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 78, 1241-1248
- Ferguson, E., M., Leese, H., J. (2006) A potential role of triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*: 73, 1195-1201
- Firth, S., M., Baxter, R., C. (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrinology Reviews*: 23, 824-854
- Flemming, T., P., Kwong, W., Y., Porte, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D., J., Watkins, A., J., Eckert, J., J. (2004) The embryo and its future. *Biology of Reproduction*: 71, 1046-1054
- Fowler, D., J., Nicolaides, K., H., Miell, J., P. (2000) Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Human Reproduction Update*: 6(5), 495-504
- Fujimoto, J., Ichigo, S., Hori, M., Tamaya, T. (1996) Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecology and Endocrinology*: 10, 187-191

- Fukuda, M., N., Sugihara, K. (2008) An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*: 34(2), 129-136
- Gadella, B., M., Evans, J., P (2011) Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 713, 65-80
- Gaide Chevronnay, H., P., Cornet, P., B., Delvaux, D., Lemoine, P., Courtoy, P., J., Henriet, P., Marbaix, E. (2008) Opposite regulation of transforming growth factor-beta 2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology*: 149, 1015-1025
- Garcia, E., Bouchard, P., De Brux, J., Berdah, J., Frydman, R., Schaison, G., Milgrom, E., Perrot-Applanat, M. (1988) Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 67(1), 80-87
- Gardner, D., K., Lane, M. (1996) Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction*: 11(12), 2703-2712
- Gardner, D., K., Lane, M., Calderon, I., Leeton, J. (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolic analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility*: 65, 349-353
- Gardner, D., K., Lane, M. (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction*: 3, 367-382
- Gardner, D., K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, M., A., Scholcraft, W., B. (1998a) Culture and transfer of human blastocysts increase implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility*: 69, 84-88
- Gardner, D., K., Scholcraft, W., B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., Hesla, J. (1998b) A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*: 13(12), 3434-3440
- Gardner, D., K., Scholcraft, W., B. (1999) Culture and transfer of human blastocysts. *Current Opinions in Obstetrics and Gynecology*: 11(3), 307-311
- Gardner, D., K. (2000) Blastocyst culture: toward single embryo transfers. *Human Fertility (Cambridge)*: 3(4), 229-237

- Gardner, D., K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., Schoolcraft, W., B. (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*: 73(6), 1155-1158
- Gardner, D., K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W., B. (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility*: 76(6), 1175-1180
- Gardner, D., K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W., B. (2001) Non-invasiveness assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility*: 76, 1175-1180
- Gardner, D., K., Lane, M., Schoolcraft, W., B. (2002) Physiology and culture of the human blastocyst. *Journal of Reproductive Immunology*: 55(1-2), 85-100
- Gardner, D., K., Lane, M. (2005) Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproductive Fertility and Development*: 17, 361-370
- Gardner, R., L. (2007) The axis of polarity of the mouse blastocyst is specified before blastulation and independently of the zona pellucida. *Human Reproduction*: 22(3), 798-806
- Garido-Gomez, T., Dominguez, F., Simon, C. (2010) Proteomics of embryonic implantation. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 67-78
- Garido-Gomez, T., Dominguez, F., Lopez, J., A., Camafeita, E., Quinonero, A., Martinez-Conejero, J., A., Pellicer, A., Conesa, A., Simon, C. (2011) Modelling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 96, 706-716
- Geisert, R., Fazleabas, A., Lucy, M., Mathew, D. (2012) Interactions of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals role of interleukin1 beta. *Cell Tissue Reviews*: 349, 825-838
- Genbacev, O., D., Prakobphol, A., Foulk, R., A., Krtolica, A., R., Ilic, D., Singer, M., S., Yang, Z., Q., Kiessling, L., L., Rosen, S., D., Fischer, S., J. (2003) Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*: 299, 405-408
- Getsios, S., Chen, G., T., Stephenson, M., D., Leclerc, P., Blaschuk, O., W., MacCalman, C., D. (1998) Regulated expression of cadherin-6 and cadherin-11 in the glandular epithelial and stromal cells of the human endometrium. *Developmental Dynamics*: 211, 238-247

Gibrael, A., Maheshwari, A., Bhattacharya, S. (2012) Clomiphene citrate in combination with gonadotropins for controlled ovarian stimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Cochrane database of systematic reviews*: 14(11): CD008528 [doi:10.1002/14651858.CD008528.pub2]

Gipson, I., K., Blalock, T., Tisdale, A., Spurr-Michaud, S., Allcorn, S., Stavreus-Evers, A., Gemzell, K. (2008) MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: *in vitro* evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of Reproduction*: 78, 134–142

Giudice, L., C., Irwin, J., C., Dsupin, B., A., Pannier, E., M., Jin, I., H., Vu, T., H., Hoffman, A., R. (1993) Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Human Reproduction*: 8(11), 1796-1806

Giudice, L. (2004) Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *American Journal of Pharmacogenomics*: 4, 299-312

Glujovsky, D., Blake, D., Farguhar, C., Bardach, A. (2012) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database System Reviews*: (7): CD002118

Godkin, J., D., Dore, J., J. (1998) Transforming growth factor beta and the endometrium. *Reviews in Reproduction*: 3, 1-6

Gold, L., I., Saxena, B., Mittal, K., R., Marmor, M., Goswami, S., Nactigal, L., Korc, M., Demopoulos, R., I. (1994) Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Research*: 54, 2347-2358

Goldman, S., Shalev, E. (2005) Difference in Progesterone Receptor Isoforms Ratio, Between Early and Late First Trimester Human Trophoblast, Is Associated with Differential Cell Invasion and Matrix Metalloproteinase2 (MMP-2) Expression. *Biology of Reproduction*: 74(1), 13-22

Gonzalez, R., R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., Simon, C. (2000) Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 85, 4883-4888

- Gonzalez, R., R., Rueda, B., R., Ramos, M., P., Littell, R., D., Glasser, S., Leavis, P., C. (2004) Leptin-induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. *Endocrinology*: 145, 3850-3857
- Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Traeger-Synodinos, J., van Rij, M., Harperm J., C. (2009) ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Human Reproduction*: 24(8), 1786-1810
- Goto, Y., Kanzaki, H., Nakayama, T., Takabatake, K., Himeno, T., Mori, T., Noda, Y. (1994) Relationship between the day of embryo transfer and the outcome in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 11(8), 401-404
- Graham, C., F., Deussen, Z., A. (1978) Features of cell lineage in preimplantation mouse development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*: 48, 53-72
- Graham, C., F., Lehtonen, E. (1979) Formation and consequences of cell patterns in preimplantation mouse development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*: 49, 277-294
- Greenstein, D. (2005) Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *Wormbook*: 28, 1-12
- Griesinger, G., Felberbaum, R., Diedrich, K. (2005) GnRH-antagonists in reproductive medicine. *Archives of Gynecology and Obstetrics*: 273(2), 71-78
- Guerif, F., Lemseffer, M., Bidault, R., Gasnier, O., Saussereau, M., H., Cadoret, V., Jamet, C., Royere, D. (2009) Single day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Human Reproduction*: 24(5), 1051-1058
- Gumbiner, B., M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*: 84, 345–357
- Gunn, L., K., Homa, S., T., Searle, M., J., Chard, T. (1994) Lack of evidence for the production of interferon-alpha-like species by the cultured human pre-embryo. *Human Reproduction*: 9, 1522-1527
- Guzeloglou-Kayisli, O., Basar, M., Arici, A. (2007) Basic aspects of implantation. *RBM Online*: 15(6), 728-739

Guzeloglou-Kayisli, O., Kayisli, A., U., Taylor, H., S. (2009) The role of growth factors and cytokines during implantation: Endocrine and Paracrine Interactions. *Seminars in Reproductive Medicine*: 27(1), 62-79

Haining, R., E., Schofield, J., P., Jones, D., S., Rajput-Williams, J. & Smith, S., K. (1991) Identification of mRNA for epidermal growth factor and transforming growth factor- α present in low copy number in human endometrium and decidua using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Endocrinology*: 6, 207–214 [doi:10.1677/jme.0.0060207]

Hale, J., E., Gelfanova, V., Ludwig, J., R., Kniermen, M., D. (2003) Application of proteomics for discovery of protein biomarkers. *Briefing in Functional Genomics and Proteomics*: 2, 185-193

Hamatani, T., Carter, M., G., Sharov, A., A. (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental Cell*: 6(1), 117-131

Hamatani, T., Ko, M., Sh., Yamada, Y., Kuji, N., Mizusawa, Y., Shoji, M., Hada, T., Asada, H., Maruyama, T., Yoshimura, Y. (2006) Global gene expression profiling of preimplantation embryos. *Human Cell*: 19(3), 98-117

Hammer, R., E. (1998) Egg culture. The foundation. *International Journal of developmental Biology*: 42, 833-839

Han, V., K., Bassett, N., Walton, J., Challis, J., R. (1996) The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 81, 2680-2693

Hannan, N., J., Jones, R., L., White, C., A., Salamonsen, L., A. (2006) The chemokines, CX3CL1, CCL14 and CCL4, promote human trophoblast migration at the fetomaternal interface. *Biology of Reproduction*: 74, 896-904

Hardy, K., Hooper, M., A., K., Handyside, A., H., Rutherford, A., J., Winston, R., M., L., Leese, H., J. (1989) Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individuals oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*: 4, 188-191

Hartsock, A., Nelson, W., J. (2008) Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*: 1778, 660–669

Harvey, M., B. & Kaye, P., L. (1992) IGF-2 stimulates growth and metabolism of early mouse embryos. *Mechanisms of Development*: 38, 169–173 [doi: 10.1016/0925-4773(92)90050-T]

Harvey, A., J., Kind, K., L., Pantaleon, M., Armstrong, D., T., Thompson, J., G. (2004) Oxygen-related gene expression in bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*: 71, 1108-1119

Harvey, A., J., Kind, K., L., Thompson, J., G. (2007) Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biology of Reproduction*: 77, 93-101

Hathout, Y. (2007) Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Review of Proteomics*: 4, 239-248

Herrmann-Lavoie, C., Rao, C., V., Akoum, A. (2007) Chorionic gonadotrophin down-regulates the expression of the decoy inhibitory interleukin 1 receptor type II in human endometrial epithelial cells. *Endocrinology*: 148, 5377-5384

Hess A., P., Hamilton, A., E., Talbi, S., Dosiou, C., Nyegaard, M., Nayak, N., Genbecev-Krtolica, O., Mavrogiannis, P., Ferrer, K., Krussel, J., Fazleabas, A., T., Fischer, S., J., Giudice, L., C. (2007) Decidual stromal cell response to paracrine signal from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biology of Reproduction*: 76, 102-117

Hey, N., A., Meseguer, M., Simon, C., Smorodinsky, N., Y., Wreschner, D., H., Ortiz, M., E., Aplin, J., D. (2003) Transmembrane and truncated (SEC) isoforms of MUC1 in the human endometrium and Fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 1, 2

Hey, N., A., Li, T., C., Devine, P., L., Graham, R., A., Saravelos, H., Aplin, J., D. (1995) MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Human Reproduction*: 10, 2655–2662

Hey, N., A., Graham, R., A., Seif, M., W., Aplin, J., D. (1994) The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 78, 337–342

Hill, J., A. (2001) Maternal-Embryonic Cross-Talk. *Annals of the New York Academy of Science*: 943, 17–25

Hiraoka, K., Hiraoka, K., Kimutani, K. (2004) Blastocoele Collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reproduction*: 19, 2884-2888

Hiraoka, K., Hiraoka, K., Miyazaki, M., Fukunaga, E., Horiuchi, T., Kusuda, T., Okano, S., Kinutani, M., Kinutani, K. (2009) Perinatal outcomes following transfer of human blastocysts vitrified at day 5, 6, and 7. *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction*: 6, 4-8

Hofmann, G, E., Scott, R., T. Jr., Bergh, P., A. & Deligdisch, L. (1991) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua and placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 73, 882–887 [doi: 10.1210/jcem-73-4-882]

Hoozemans, D., A., Schats, R., Lambalk, C., B., Homburg, R., Hompes, G., A. (2004) Human embryo implantation: current knowledge and clinical implication in assisted reproductive technology. *RBM Online*: 9(6), 692-715

Houghton, F., D., Hawkhead, J., A., Humpherson, P., G., Hogg, J., E., Balen, A., H., Rutherford, A., J., Leese, H., J. (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction*: 17, 999-1005

Huber O, Bierkamp C, Kemler R. (1996) Cadherins and catenins in development. *Current Opinion in Cell Biology*: 8, 685–691

Huet-Hudson, Y., M., Dey, S., K. (1990) Requirements of pregesteron priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 193(4), 259-263

Huirne, J., A., Homburg, R., Lambalk, C., B. (2007) Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF? *Human Reproduction*: 22(11), 2805-2813

Huisman, G., J., Alberta, A., T., Leerentveld, R., A., Verhoeff, A., Zeilmaker, G., H. (1994) A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertility and Sterility*: 61(5), 970-971

Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C., Jacob, F. (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*: 21(3), 927-934

Iacono, K., T., Brown, A., L., Greene, M., I., Saouaf, S., J. (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Experimental and Molecular Pathology*: 83, 283–295

Illera, M., J., Lorenzo, P., L., Gui, Y., T., Beyler, S., A., Apparao, K., B., Lessey, B., A. (2003) A role for alphavbeta3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biology of Reproduction*: 68, 766–771

Illera, M., J., Cullinan, E., Gui, Y., Yuan, L., Beyler, S., A., Lessey, B., A. (2000) Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biology of Reproduction*: 62, 1285–1290

Irving, J., A., Lala, P., K. (1995) Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II and IGFBP-1. *Experimental Cell Research*: 217, 419-427

Irving, J., C., Suen, L., F., Faessen, G., H., Popovici, R., M., Giudice, L., C. (2001) Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the deciduas: trophoblast interface during human implantation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 86, 2060-2064

Jansen, C., A., Rijnders, P., M., Tucker, K., E. (2003) Benefits and drawbacks of extended embryo culture. *The art and science of Assisted Reproductive Techniques (ART)*: 34, 241-245

Johnson, M., H., Ziomek, C., A. (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*: 24, 71-80

Johnson, M., H., Ziomek, C., A. (1983) Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32- cell stage. *Developmental Biology*: 95, 211-218

Johnson, M., H., McConnell, J., M. (2004) Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Seminars and Developmental Biology*: 15(5), 583-597

Jones, R., L., Hannan, N., J., Kaitu'u T., J., Zhang, J., Salamonsen, L., A. (2004) Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 89, 6155-6167

- Jones, R., L., Stoikos, C., Findlay, J., K., Salamonsen, L., A. (2006) TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*: 132, 217-232
- Jones, G., M., Trounson, A., O., Gardner, D., K., Kausche, A., Lolatgis, N., Wood, C. (1998) Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reproduction*: 13, 169-177
- Jones, G., M., Trounson, A., O. (1999) Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. The benefits of extended culture. *Human Reproduction*: 14(6), 1405-1408
- Jones, R., L., Salamonsen, L., A., Critchley, H., O., Rogers, P., A., Affandi, B., Findlay, J., K. (2000) Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only concentration. *Molecular Human Reproduction*: 6, 1107-1117
- Jones, S., A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., Fuller, G., M. (2001) The soluble interleukin-6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Journal of FASEB*: 15, 43-58
- Jones, R., L., Salamonsen, L., A., Findlay, J., K. (2002) Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 13, 144-150
- Jones, R., L., Findlay, J., K., Farnworth, P., G., Robertson, D., M., Wallace, E., Salamonsen, L., A. (2006a) Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology*: 147, 724-732
- Jones, R., L., Stoikos, C., Findlay, J., K., Salamonsen, L., A. (2006b) TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*: 132, 217-232
- Jones, G., M., Cram, D., S., Song, B., Kokkali, G., Pantos, K., Trounson, A., O. (2008) Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocysts. *Human Reproduction*: 23(8), 1748-1759
- Jorris, H., Abbeel, V., E., De Vos, A., Sterteghem, A., V. (1999) Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Human Reproduction*: 14, 2833-2837
- Jovanovic, M., Vicovac, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. (2009) *Placenta*: 30, 320-328

- Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M (2004) The role of alpha(5)beta(1)-integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation. *Molecular Human Reproduction*: 10(2), 91-7.
- Kabir-Salmani, M., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Sakai, K., Nagamatsu, S., Sakai, K., Nakamura, Y., Lotfi, A., Kawakami, H., Iwashita, M. (2003) Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor I-stimulated human extravillous trophoblast cell migration. *Endocrinology*: 144(4), 1620-30
- Kalantaridou, S., N., Makrigiannakis, A., Mastorakos, G., Chrousos, G., P. (2003) Roles of reproductive corticotrophin-releasing hormone. *Annals of the New York Academy of Science*: 997, 129-135
- Kamel, R., M. (2010) Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 8, 21-27
- Kang, J., Der, S., D. (2004) Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. *Current Opinion in Immunology*: 16, 180-190
- Kang, J., Chapdelaine, P., Parent, J., Madore, E., Laberge, P., Y., Fortier, M., A. (2005) Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 90, 2308-2313
- Kanka, J., Bryova, A., Duranthon, V., Oudin, J., F., Peynot, N., Renard, J., P. (2003) Identification of differentially expressed mRNAs in bovine preimplantation embryos. *Zygote*: 11(1), 43-52
- Kao, L., C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J., P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R., N., Lessey, B., A., Giudice, L., C. (2002) Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*: 143, 2119-2138s
- Karaki, R., Z., Samarraie, S., S., Yonis, N., A., Lahloub, T., M., Ibrahim, M., H. (2002) blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility*: 77(1), 114-118
- Karpovich, N., Chobotova, K., Carver, J., Heath, J., K., Barlow, D., H., Mardon, H., J. (2003) Expression and function of interleukin-11 and its receptor alpha in the human endometrium. *Molecular Human Reproduction*: 9, 75-80

- Katano, K., Matsumoto, Y., Ogasawara, M., Aoyama, T., Ozaki, Y., Kajiura, S., Aoki, K. (1997) Low serum M-CSF levels are associated with unexplained recurrent abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*: 38, 1-5
- Katz-Jaffe, M., G., Linck, D., W., Schoolcraft, W., B., Gardner, D., K. (2005) A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction*: 130, 899-905
- Katz-Jaffe, M., G., Gardner, D., K., Schoolcraft, W., B. (2006) Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertility and Sterility*: 85, 101-107
- Katz-Jaffe, M., G., McReynolds, S., Gardner, D., K., Schoolcraft, W., B. (2009) The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Molecular Human Reproduction*: 15(5), 271-277
- Kauma, S., Matt, D., Strom, S., Eierman, D., Turner, T. (1990) Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placenta membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*: 163, 1430-1437
- Kauma, S., W., Aukerman, S., L., Eierman, D., Turner, T. (1991) Colony-stimulating factor-1 and c-fms expression in human endometrial tissues and placenta during the menstrual cycle and early pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 73, 746-751
- Kayisli, U., A., Guzeloglu-Kayisli, O., Arici, A. (2004) Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Annals on the New York Academy of Sciences*: 1034, 50-63
- Khorram, O., Shapiro, S., S., Jones, J., M. (2000) Transfer of Nonassisted Hatched and Hatching Human Blastocysts after in Vitro Fertilization. *Fertility and Sterility*: 74, 163-165
- Kidder, G., M. (2002) Trophectoderm development and function: the ropse of Na⁺/K⁺ (+)-ATPase subunit isoforms. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*: 80(2), 110-115
- Kim, J., Gye, M., C., Kim, M., K. (2004) Role of occluding, a tight junction protein, in blastocoels formation, and in the paracellular permeability and differentiation of trophoctoderm in preimplantation mouse embryos. *Molecules and Cells*: 17, 248-254
- Kimber, S., J., Bentley, J., Ciemerych, M., Moller, C., J., Bock, E. (1994) Expression of N-CAM in fertilized pre- and periimplantation and parthenogenetically activated mouse embryos. *European Journal of Cell Biology*: 63, 102-113

Kitaya, K., Nakayama, T., Okudo, T., Kuroboshi, H., Fushiki, S., Honjo, J. (2003) Expression of macrophage inflammatory protein-1 beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 88, 1809-1914

Kotani, Y., Iwase, A., Ando, H., Mizutani, S. (2005) Oxytocin-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis is regulated by progesterone via oxytocinase in Ishikawa cells. *Hormone and Metabolic Research*: 37, 4-9

Krussel, J., S., Simon, C., Rubio, M., C., Pape, A., R., Wen, Y., Huang, H., Y., Bielfeld, P., Polan, M., L. (1998) Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Human Reproduction*: 13, 2206-2211

Krussel, J., S., Bielfeld, P., Polan, M., L., Simon, C. (2003) Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*: 110, 2-9

Kumar, S., Zhu, L., J., Polihronis, M., Cameron, S., T., Baird, D., T., Schatz, F., Dua, A., Ying, Y., K., Bagchi, M., K., Bagchi, A., C. (1998) Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 83, 4443-4450

Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., Fujimori, T. (2007) Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science*: 316(5825), 719-723

Kwan, I., Bhattacharya, S., McNeil, A., van Rumste, M., M. (2008) Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). *Cochrane database of systematic reviews*: 16(2): CD005289 [doi:10.1002/14651858.CD005289.pub2]

Laird, S., M., Tuckerman, E., M., Li, T., C. (2006) Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine Online*: 13, 13-23

Lane, M., Gardner, D., K. (1996) Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Human Reproduction*: 11, 1975-1978

Lane, M., Gardner, D., K. (1997) Non-essential amino acids and glutamine decrease the time of the first cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 14, 398-403

- Lane, M., Gardner, D., K. (2001) Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 18, 519-525
- Lane, M., Gardner, D., K. (2005) Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*: 17, 371-378
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R. (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proceedings of the National Academy of Science*: 91(17), 8263-8267
- Lathan, K., E., Garrels, J., L., Chang, C., Solter, D. (1992) Analysis of embryonic mouse development construction of a high-resolution, two-dimensional gel protein database. *Applied and Theoretical Electrophoresis*: 2, 163-170
- Laverge, H., De Sutter, P., Van der Elst, J., Dhont, M. (2001) A prospective randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Human Reproduction*: 16(3) 476-480
- Lawitts, J., A., Biggers, J., D. (1993) Culture of preimplantation embryos. *Methods in Enzymology*: 225, 153-164
- Le, J., Vilcek, J. (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Laboratory Investigation*: 56, 234-248
- Ledee-Bataille, N., Dubanchet, S., Coulomb-L'hermine, A. Durand-Gasselien, I., Frydman, R., Chaouat, G. (2004a) A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*: 81, 59-65
- Ledee-Bataille, N., Olivennes, F., Kadoch, J., Dubanchet, S., Frydman, N., Chaouat, G., Frydman, R. (2004b) Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer. *Human Reproduction*: 19, 1968-1973
- Lee, S., Lee, J., Choi, K., Lee, Y., Lee, S., Min, C. (2005) Down-regulation of IL-6 in mouse blastocysts from the embryos vitrified at early stage of development. *Fertility and Sterility*: 84(suppl 1): S380
- Leese, H., J. (1991) Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*: 13, 35-72

Leese, H., J., Humoherson, P., G., Hardy, K., Hooper, M., A., Winston, R., M., Handyside, A., H. (1991) Profiles of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and adenine phosphoribosyl transferase activities measured in single preimplantation human embryos by high-performance liquid chromatography. *Journal of Reproduction and Fertility*: 91(1), 197-202

Leese, H., J. (1998) Human embryo culture: back to nature. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 15, 446-448

Leese, H., J. (2002) Quiet please, does not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays*: 24(9), 845-9

Leese, H., J. (2003) What does an embryo need? *Human Fertility (Cambridge)*: 6(4), 180-185

Leese, H., J., Sturmey, R., G., Baumann, C., G., McEvoy, T., G. (2007) Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction*: 22(12), 3047-3050

Leese, H., J., Baumann, C., G., Brison, D., R., McEvoy, T., G., Sturmey, R., G. (2008) Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular human Reproduction*: 14(12), 667-672

Lessey, B., A. (2002) Adhesion molecules and implantation. *Journal of Reproductive Immunology*: 55, 101-112

Lessey, B., A., Castelbaum, A., J., Wolf, L., Green, W., Paulson, M., Meyer, W., R., Fritz, M., A. (2000) Use of integrins to date the endometrium. *Fertility and Sterility*: 73, 779-787

Lessey, B., A. (1998) Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Human Reproduction*: 13(Suppl 3), 247-258. Discussion 259-261

Lessey, B., A., Ilesanmi, A., O., Lessey, M., A., Riben, M., Harris, J., E., Chwalisz, K. (1996) Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*: 35, 195-204

Lessey, B., A., Castelbaum, A., J., Sawin, S., W., Sun, J. (1995) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertility and Sterility*: 63, 535-542

- Lessey, B., A., Castelbaum, A., J., Sawin, S., W., Buck, C., A., Schinnar, R., Bilker, W., Strom, B., L. (1994) Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 79, 643–649
- Ley, K., Kansas, G., S. (2004) Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Natural Reviews of Immunology*: 5, 325-335
- Li, H., Y., Shen, J., T., Chang, S., P., Hsu, W., L., Sung, Y., J. (2008) Calcitonin promotes outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells: involvement of calcium mobilization and protein kinase C activation. *Placenta*: 29, 20–29
- Li, Q., Wang, J., Armant, D., R., Bagchi, M., K., Bagchi, I., C. (2002) Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *Journal of Biology and Chemistry*: 277, 46447–46455
- Li, Q., Bagchi, M., K., Bagchi, I., C. (2006) Identification of a signaling pathway involving progesterone receptor, calcitonin, and tissue transglutaminase in Ishikawa endometrial cells. *Endocrinology*: 147, 2147–2154
- Li, Y., Bharti, A., Chen, D., Gong, J., Kufe, D. (1998) Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Molecular and Cellular Biology*: 18, 7216–7224
- Licht, P., Russu, V., Wildt, L. (2001) On the role of human chorionic gonadotrophin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Seminars in Reproductive Medicine*: 19, 37-47
- Lighten, A., D., Moore, G., E., Winston, R., M. & Hardy, K. (1998) Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in-vitro* fertilization culture. *Human Reproduction*: 13, 3144–3150 [doi:10.1093/humrep/13.11.3144]
- Lim, K., J., Odukoya, O., A., Ajjan, R., A., Li, T., C., Weetman, A., P., Cooke, I., D (1998) Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Molecular Human Reproduction*: 4, 77-81
- Lim, K., J., Odukoya, O., A., Ajjan, R., A., Li, T., C., Weetman, A., P., Cooke, I., D. (2000) The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertility and Sterility*: 73, 136-142

- Linjawi, S., Li, T., C., Tuckerman, E., M., Blakemore, A., I., Laird, S., M. (2004) Expression of interleukin-11 receptor alpha and interleukin-11 protein in the endometrium of normal fertile women and women with recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology*: 64, 145-155
- Liu, Q., Zhang, B., Zhao, X., Zhang, Y., Liu, Y., Yan, X. (2008) Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice. *Journal of Cell Physiology*: 215, 621–626
- Liu, Q., Yan, X., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Shen, Y. (2004) Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. *Laboratory Investigation*: 84, 221–228
- Liu, Z., de Matos, D., G., Fan, H., Y., Shimada, M., Palmer, S., Richards, J., S. (2009) Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology*: 150, 3360-3368
- Logan, C., Y., Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*: 20, 781-810
- Lopata, A., Bentin-Ley, U., Enders, A. (2002) “Pinopodes” and Implantation. *Reviews in Endocrine and metabolic Disorders*: 3, 77-86
- Lunter, P., C., van Kilsdonk, J., W., van Beek, H., Cornelissen, I., M., Bergers, M., Willems, P., H., van Muijen, G., N., Swart, G., W. (2005) Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Research*: 65, 8801–8808
- MacCalman, C., D., Getsios, S., Chen, G., T. (1998) Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. *American Journal of Reproductive Immunology*: 39, 96–107
- Macklon, N., S., Pieters, M., H., E., C., Hassan, M., A., Jeucken, P., H., M., Eijkemans, M., J., C., Fauser, B., C., J., M. (2002) A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Human Reproduction*: 17, 2700-2705
- Madan, P., Rose, K., Watson, A., J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *Journal of biological Chemistry*: 20(282), 12127-12134

- Maheshwari, A., Gibrael, A., Siristatidis, C., S., Bhattacharya, S. (2011) Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction. *Cochrane database of systematic reviews*: 10(8): CD006919 [doi:10.1002/14651858.CD006919.pub3]
- Mains, L., van Voorhis, B., J. (2010) Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertility and Sterility*: 94(3), 785-790
- Makrigiannakis, A., Margioris, A., N., Le Goascogne, C. Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A. (1995) The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *Life Sciences*: 57, 1869-1875
- Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Margioris, A., N. Stournaras, C., Chrousos, G., P., Gravanis, A. (1996) Regulation of the promoter of the human cortotropon-releasing hormone gene in transfected human endometrial cells. *Neuroendocrinology*: 64, 85-92
- Makrigiannakis, A., Margioris, A., N., Chatzaki, E., Zoumakis, E., Chrousos, G., P., Gravanis, A. (1999) The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*: 5, 789-796
- Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Coutifaris, C., Margioris, A., N., Coukos, G., Rice, K., C., Gravanis, A., Chrousos, G., P. (2001) Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nature Immunology*: 2, 1018-1024
- Makrigiannakis, A., Minas, V., Kalantaridou, S., N., Nikas, G., Chrousos., G., P. (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 17(5), 178-185
- Makrigiannakis, A., Minas, V. (2007) Mechanisms of implantation. *RBM Online*: 14(1), 102-109
- Makrigiannakis, A., Karamouti, M., Drakakis, P., Loutradis, D., Antsaklis, A. (2008) Fetomaternal Immunotolerance. *American Journal of Reproductive Immunology*: 60(6), 482-496

- Mangalraj, A., M., Muthukumar, K., Aleymma, T., Kamath, M., S., George, K. (2009) Blastocyst stage transfer vs cleavage stage embryo transfer. *Journal of Human Reproductive Science*: 2(1), 23-26
- Mansour, R., T., Aboulghar, M., A. (2002) Optimizing the embryo transfer technique. *Human Reproduction*: 17(5), 1149-1153
- Marions, L., Danielsson, K., G. (1999) Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Molecular Human Reproduction*: 5, 961-965
- Martel, D., Monier, M., N., Roche, D., Psychoyos, A. (1991) Hormonal Dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Human Reproduction*: 6(4), 597-603
- Martin KL, Barlow DH & Sargent IL (1998) Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Human Reproduction*: 13, 1645–1652 [doi:10.1093/humrep/13.6.1645]
- Marwood, M., Visser, K., Salamonsen, L., A., Dimitriadis, E. (2009) Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. *Endocrinology*: 150, 2915-2923
- McLachlan, R., I., Yazdani, A., Kovacs, G., Howlett, D. (2005) Management of the infertile couple. *Australian Family Physician*: 34(3), 11-3, 115-7
- McMaster, M., T., Dey, S., K., Andrews, G., K. (1993) Association of monocytes and neutrophils with early events of blastocyst implantation in mice. *Journal of Reproductive Immunology*: 99, 561-569
- Merchant, M., Wienberger, S., R. (2000) Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*: 21, 1164-1177
- Meseguer, M., Aplin, J., D., Caballero-Campo P., O'Connor, J., E., Martin, J., C., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated *in vitro* by the human blastocyst. *Biology of Reproduction*: 64(2), 590-601
- Miller, K., A., Fratarelli, J., L., Bergh, P., A., Drews, M., R., Scott, R., T. (2007) The rate of embryonic progression is more important to implantation and pregnancy rates than the

embryonic stage of transfers: a comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*: 88 (suppl.1), S327

Milne, S., A., Perchick, G., B., Boddy, S., C., Jabbour, H., N. (2001) Expression, localization, and signaling of PGE (2) and EP2/EP4 receptors in human non-pregnant endometrium across the menstrual cycle. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*: 86, 4453-4459

Milne, S., A., Jabbour, H., N. (2003) Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 88, 1825-1832

Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J., I., Williams, S., Bocca, S., Oehninger, S. (2005) In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Human Reproduction*: 20(8), 2104-2117

Moriwaki, K., Tsukita, S., Furuse, M. (2007) Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology*: 312, 509-522

Motosugi, N., Bauer, T., Polanski, A., Solter, D., Hiraqi, T. (2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes and Development*: 19(9), 1081-1092

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Oka, C., Kasai, M., Takahashi, K. (2003) Vitrification of Human Blastocysts Using Cryoloops: Clinical Outcome of 223 Cycles. *Human Reproduction*: 18, 384-391

Murata, Y., Oku, H., Morimoto, Y., Tokuda, M., Murata, T., Sugihara, K., Nagata, F., Nakaoda, Y., Fukuda, A. (2005) Freeze-thaw programs rescue the implantation of day-6 blastocysts. *RBMOnline*: 11(4), 428-433

Nagaoka, K., Nojima, H., Watanabe, F., Chang, K., T., Christenson, R., K., Sakai, S., Imakawa, K. (2003) Regulation of blastocyst migration, apposition, and initial adhesion by a chemokine, interferon gamma-inducible protein 10kDa (IP-10), during early gestation. *Journal of Biology and Chemistry*: 278, 29048-29056

Nardo, L., G., Nikas, G., Makrigiannakis, A., Sinatra, F., Nardo, F. (2003) Synchronous expression of pinopodes and alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrins in the endometrial

surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *Journal of Reproductive medicine*: 63(3), 535-542

Navarrete Santos, A., Tonack, S., Kirstein, M., Kietz, S., Fischer, B. (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction*: 128, 503-516

Ni, H., Ding, N., Z., Harper, M., J., Yang, Z., M. (2002) Expression of leukemia inhibitory factor and gp 130 in mouse uterus during early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*: 63, 143-150

Nikas, G., Ao, A., Winston, R., M., Handyside, A., H. (1996) Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biology of Reproduction*: 55. 32-7

Nikas, G., Psychoyos, A. (1997) Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical Relevance. *Annals of the New York Academy of sciences*: 816, 129-142

Nikas, G. (1999) Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Human Reproduction*: 14(suppl 2), 99-106

Nikas, G. (2000) Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Seminars in Reproductive medicine*: 18(3), 229-235

Nikas, G., Makrigiannakis, A., Hovatta, O., Jones, H., W., Jr. (2000) Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 900, 316-324

Nikas, G., Aghajanova, L. (2002) Endometrial Pinopodes: some more understanding on human implantation? *Reproductive Biomedicine Online*: 4(suppl 3), 18-23

Noci, I., Fuzzi, B., Rizzo, R., Melchiorri, L., Criscuoli, L., Dabizzi, S., Biagiotti, R., Pellegrini, S., Menicucci, A., Barricordi, O., R. (2005) Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Human Reproduction*: 20(1), 138-146

Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T. (1991) Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development*: 28, 356-360

Norwitz, E., R., Schust, D., J., Fisher, S., J. (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*: 345, 1400-1408

Nothias, J., Y., Majumder, S., Kaneko, K., J., DePamphilis, M., L. (1995) Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *Journal of Biological Chemistry* 270(38), 22077-80

Nuss, R., Varmus, H., E. (1992) Wnt genes. *Cell*: 69, 1073-1087

Oatway, C., Gunby, J., Daya, S. (2004) Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database System Reviews*: (2): CD004378

Olivienes, F., Hazout, A., Lelaidier, C., Freitas, S., Fanchin, R., de Ziegler, D., Frydman, R. (1994) Four indicators for embryo transfer at the blastocyst stage. *Human Reproduction*: 9, 2367-2373

Olivienes, F., Frydman, R. (1998) Friendly IVF: the way of the future. *Human Reproduction*: 13(5), 1121-1124

O'Neill, C. (2005) The role of paf in embryo physiology. *Human Reproduction update*: 11, 215-228

Oner J & Oner H (2007) Immunolocalization of insulin-like growth factor I (IGF-I) during preimplantation in rat uterus. *Growth Hormone & IGF Research*: 17, 271–278 [doi:10.1016/j.ghir.2007.01.015]

Oron, E., Ivanova, N. (2012) Cell fate regulation in early mammalian development. *Physical Biology*: 9(4), 045002 (17pp)

O'Shea, K., S., Liu, L., H., Kinnunen, L., H., Dixit, V., M. (1990) Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *Journal of Cellular Biology*: 111, 2713–2723

Ozaki, T., Takahashi, K., Kanasaki, H., Lida, K., Miyazaki, K. (2005) Expression of the type I interferon receptor and the interferon-induced Mx protein in human endometrium during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*: 83, 163-170

Ozornec, M., H., Bielfeld, P., Krussel, J., S., Moustafa, M., Mikat-Drozdowski, B., Koldvsky, U., Kuhn, U. (1995) Interferon gamma and interleukin-10 levels in preimplantation embryo culture media. *Journal of Assisted Reproductive Genetics*: 12, 590-593

- Ozornec, M., H., Bielfeld, P., Krussel, J., S., Cupisti, S., Jeyendran, R., S., Koldovsky, U. (1997) Interferon-gamma production by the human preimplantation embryo. *American Journal of Reproductive Immunology*: 37, 435-437
- Paiva, P., Hanna, N., J., Hincks, C., Meehan, K., L., Pruysers, E., Dimitriadis, E., Salamonsen, L., A. (2011) Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Human Reproduction*: 26, 1153-1162
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., van Steirteghem, A., C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*: 340(8810), 17-18
- Pantos, K., Makrakis, E., Karantzis, P., Stavrou, D., Grammatidis, M., Chronopoulos, K. (2004) Blastocyst versus early cleavage embryo transfer: a retrospective analysis of 4,165 transfers. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*: 31(1), 42-44
- Pantos, K., Makrakis, E., Chronopoulou, M., Biba, M., Perdikaris, A., Dafereras, A. (2008) Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes. *Fertility and Sterility*: 89(3), 573-577
- Papanikolaou, E., G., Kolibianakis, E., M., Tournaye, H., Venetis, C., A., Fatemi, H., Tarlatzis, B., Devroey, P. (2008) Live birth rates transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*: 23(1), 91-99
- Pauken, C., M., Capco, D., G. (2000) The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Developmental Biology*: 223, 411-421
- Pedersen RA, Wu K, Balakier H. (1986) Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Developmental Biology*: 117(2), 581-595
- Pereira, C., P., Bachli, E., B., Schoedon, G. (2009) The wnt pathway: a macrophage effector molecule that triggers inflammation. *Current Atherosclerosis Report*: 11, 236-242
- Piccini, M., P., Scaletti, C., Vultaggio, A., Maggi, E., Romagnani, S. (2001) Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokine by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *Journal of Reproductive immunology*: 52, 35-43

- Plachot, M., Antoine, J., Alvarez, S., Firmin, C., Pfister, A., Mandelbaum, J., Junca, A., M., Salat-Baroux, J. (1993) Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Human Reproduction*: 8, 2133-2140
- Plachot, M. (2000) Fertilization. *Human Reproduction*: 15(4), 19-30
- Plusa, B., Hadjantonakis, A., K., Gray, D., Piotrowska-Nitsche, K., Jedrusik, A., Papaioannou, V., E., Glover, D., M., Zernicka-Goetz, M. (2005) The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature*: 434, 391-395
- Polli, V., Bulletti, C., Galassi, A., Ciotti, P., M., Seracchioli, R., Alfieri, S., Flamigni, D. (1996) Transforming growth factor-beta 1 in the human endometrium. *Journal of Gynecology and Endocrinology*: 10m 297-302
- Poncelet, C., Leblanc, M., Walker-Combrouze, F., Soriano, D., Feldmann, G., Madelenat, P., Scoazec, J., Y., Darai, E. (2002) Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*: 81, 195-203
- Popovici, R., M., Giudice, L., C. (2000) Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*: 141, 3510-3513
- Prins, J., R., Gomez-Lopez, N., Robertson, S., A. (2012) Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of Reproductive Immunology*: 95(1-2), 1-14
- Quenby, S., Anim-Somuah, M., Kalumbi, C., Farquharson, R., Aplin, J., D. (2007) Different types of recurrent miscarriage are associated with varying patterns of adhesion molecule expression in endometrium. *Reproductive Biomedicine Online*: 14, 224-234
- Quinn, P., Stone, B., A., Marrs, R., P. (1990) Suboptimal laboratory conditions can affect pregnancy outcome after embryo transfer on day1 or 2 after insemination in vitro. *Fertility and Sterility*: 53(1), 168-170
- Ramadan, M., W., Kashir, J., Jones, C., Coward, K. (2012) Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Communication and Signalling*: 10, 12

- Rappolee, D., A., Sturm, K., S., Behrendtsen, O., Schultz G., A., Pedersen, R., A. & Werb, Z. (1992) Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes and Development*: 6, 939–952 [doi:10.1101/gad.6.6.939]
- Rashid, N., A., Lalitkumar, S., Lalitkuman, P., G., Gemzell-Danielsson, K. (2011) Endometrial Receptivity and Human Embryo Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*: 66(suppl.1), 23-30
- Rechler, M., M. & Nissley, S., P. (1985) The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annual Review of Physiology*: 47, 25–442 [doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.002233]
- Rees, M., C., Parry, D., M., Anderson, A., B., Turnbull, A., C. (1982) Immunohistochemical localization of cyclogenase in the human uterus. *Prostaglandins*: 23, 207-214
- Rees, M., C., Anderson, A., B., Demers, L., M., Turnbull, A., C. (1984) Endometrial and myometrial prostaglandin release during the menstrual cycle in relation to menstrual blood loss. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 58, 813-818
- Rehman, K., S., Bukulmez, O., Langley, M., Carr, B., R., Nackley, A., C., Doody, K., M., Doody, K., J. (2007) Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertility and Sterility*: 87(5), 1041-1052
- Rieger, D. (2005) A single medium can support development of human embryos to the blastocyst stage. *13th World Congress on In Vitro Fertilization, Assisted Reproduction and Genetics*: Abstract Book
- Riesewijk, A., van OsR, Horcajadas, J., A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S., Simon, C. (2003) Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Molecular Human Reproduction*: 9, 253-264
- Riethmacher, D., Brinkmann, V., Birchmeier, C. (1995) A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Science*: 92(3), 855-859

- Rinaudo, P., Schultz, R., M. (2004) Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in pre implantation mouse embryos. *Reproduction*: 128, 301-311
- Robertson, S., A., Seamark, R., F. (1992) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): one of a family of epithelial cell derived cytokines in the preimplantation uterus. *Reproductive Fertility and Development*: 4, 435-448
- Robertson, S., A. (2000) Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews in Reproduction*: 5, 164-174
- Robertson, S., A. (2007) GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Reviews*: 18, 287-298
- Robertson, S., Lin, R. (2013) The oocyte-to-embryo transition. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 757, 351-372
- Rossant, J. (2004) Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Seminars in Cell and Developmental Biology*: 15(5), 573-81
- Rossant, J., Tam, P., L. (2009) Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*: 136, 701-713
- Roth, I., Fisherm S., J. (1999) IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Developmental Biology*: 205, 194-204
- Sakkas, D., Lu, C., Zulfikaroglu, E., Neuber, E., Taylor, H., S. (2003) A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertility and Sterility*: 80, 1169-1174
- Salamonsen, L., A., Dimitriadis, E., Robb, L. (2000) Cytokines in implantation. *Seminars in Reproductive Medicine*: 18(3), 299-310
- Salamonsen, L., A., Nie, G. (2002) Proteinases at the Endometrial-Trophoblast Interface: Their Role in Implantation. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*: 3, 133–143. doi: 10.1023/A:1015407012559
- Salamonsen, L., A., Shuster, S., Stern, R. (2001) Deposition of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle: implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Research*: 306, 335–340. doi: 10.1007/s004410100452.
- Santos, M., A., Kuijk, E., W., Macklon, N., S. (2010) the impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*: 139, 23-34

- Sargent, I., Swales, A., Ledee, N., Kozma, N., Tabiasco, J., Le Bouteiller, P. (2007) sHLA-G production by human IVF embryos: can it be measured reliably? *Journal of Reproductive Immunology*: 75, 128-132
- Satokata, I., Maas, R. (1995) Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10 deficient mice. *Nature*: 37, 460-463
- Schier, A., F. (2007) The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*: 316(5823), 406-407
- Scholtes, M., C., Zeilmaker, G., H. (1998) Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertility and Sterility*: 69(1), 78-83
- Schoolcraft, W., B., Gardner, D., K. (2001) Blastocyst versus day2 or 3 transfer. *Seminars in Reproductive Medicine*: 19(3), 259-268
- Schultz, R., M., Worrad, D., M. (1995) Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo. *Seminars in Cell Biology*: 6(4), 201-208
- Schuster, V., L. (1998) Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annual Review in Physiology*: 60, 221-242
- Schuster, V., L., (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*: 68-69, 633-647
- Scott, L., A., Smith, S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction*: 13(4), 1003-1013
- Scott, L., A. (2000) Oocyte and embryo polarity. *Seminars in Reproductive Medicine*: 18(2), 171-183
- Serafini, P., C., Silve, I., D., Motta, E., I., Rocha, A., M., Baracat, E., C. (2009) Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 7, 30
- Shahine, L., K., Milki, A., A., Westphal, L., M., Baker, V., L., Behr, B., Lathi, R., B. (2011) Day2 versus day 3 embryo transfer in poor responders: a prospective randomized trial. *Fertility and Sterility*: 95(1), 330-332

- Shalev, E., Leung, P., C. (2003) Gonadotropin-releasing hormone and reproductive medicine. *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada*: 25(2), 998-113
- Shankar, R., Gude, N., Cullinane, F., Brennecke, S., Purcell, A., W., Moses, E., K. (2005) An emerging role for comprehensive proteome analysis in human pregnancy research. *Reproduction*: 129, 685-696
- Shapiro, B., S., Richter, K., S., Harris, D., C., Daneshmand, S., T. (2001) A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*: 75, 1126-1130
- Sharkey, A., M., Dellow, K., Blayney, M., Macnamee, M., Charnock-Jones, S., Smith, S., K. (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*: 53, 974-981
- Sharkey, A. (1998) Cytokines and implantation. *Reviews in Reproduction*: 3, 52-61
- Sharkey, A., M., Smith, S., K. (2003) The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*: 17(2), 289-307
- Sharma, A., Kumar, P. (2012) Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of Human Reproductive Sciences*: 6(1), 2-6
- Shen, X., H., Han, Y., J., Jhang, D., X., Cui, X., S., Kim, N., H. (2009) A link between the interleukin-6/Stat 3 anti-apoptotic pathway and microRNA-21 in pre-implantation mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*: 76, 854-862
- Sher, G., Kespintepe, L., Fisch, J., D., Acadio, B., A., Ahlering, P., Batzofin, J., Ginsburg, M. (2005) Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertility and Sterility*: 83, 1410-1413
- Sheth, K., V., Roca, G., L., al-Sedairy, S., T., Parhar, R., S., Hamilton, C., J., Al-abdul Jabbar, F. (1991) Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid. *Fertility and Sterility*: 55, 952-957
- Shi, C., Z., Collins, H., W., Garside, W., T., Buetter, C., W., Matschinsky, F., M., Heyner, S. (1994) Protein databases for compacted eight-cell and blastocyst-stage mouse embryos. *Molecular Reproductive Biology*: 37, 34-47

Shih, H., C., Shiozawa, T., Miyamoto, T., Kashima, H., Feng, Y., Z., Kurai, M., Konishi, I. (2004) Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in the normal and malignant human endometrium: an inverse correlation between E-cadherin and nuclear beta-catenin expression. *Anticancer Research*: 24, 3843–3850

Shih, I., Wang, T., Wu, T., Kurman, R., J., Gearhart, J., D. (1998a) Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*: 111(Pt 17), 2655–2664

Shih, I., M., Nesbit, M., Herlyn, M., Kurman, R., J. (1998b) A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Modern Pathology*: 11, 1098–1106

Shimonovitz, S., Hurwitz, A., Hochner-Celnikier, D., Dushnik, M., Anteby, E., Yagel, S. (1998) Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*: 178, 457-461

Sills, E., S., Palermo, G., D. (2010) Human blastocyst culture in IVF: current laboratory application in reproductive medicine practice. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*: 51(3), 441-445

Simon, C., Piquette, G., N., Frances, A., Polan, M., L. (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 77, 549-555

Simon, C., Frances, A., Piquette, G., N., Hendrickson, M., Milki, A., Polan, M., L. (1994) Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *Journal of Endocrinology and Metabolism*: 78, 847-854

Simon, C., Mercader, A., Gimeno, M., J., Pellicer, A. (1997) The interleukin-1 system and human implantation. *American Journal Of Reproductive Immunology*: 37, 64-72

Simon, C., Martin, J., C., Pellicer, A. (2000) Paracrine regulators of implantation. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*: 14(5), 815-826

Singh, M., Chaudhry, P., Asselin, E. (2011) Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines and growth factors. *Journal of Endocrinology*: 210, 5-14

- Singh, H., Aplin, J., D. (2009) Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of Anatomy*: 215, 3-13
- Sjoblom, C., Wikland, M., Robertson, S., A. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*: 14, 3069-3076
- Sjoblom, C., Wikland, M., Robertson, S., A. (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biology of Reproduction*: 67, 1817-1823
- Skrzypczak, J., Mikołajczyk, M., Szymanowski, K. (2001) Endometrial receptivity: expression of alpha3beta1, alpha4beta1 and alphaVbeta1 endometrial integrins in women with impaired fertility. *Reproductive Biology*: 1(2), 85-94
- Smith, W., L., Dewitt, D., L. (1996) Prostaglandin endopeptidase H synthases-1 and -2. *Advances in Immunology*: 62, 167-215
- Song, H., Lim, H., Paria, B., C., Matsumoto, H., Swift, L., L., Morrow, J., Bonventre, J., V., Dey, S., K. (2002) Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for “on-time” embryo implantation that directs subsequent development. *Development*: 129, 2879-2889
- Spencer, T., E., Bazer, F., W. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 2, 49
- Srisuparp, S., Strakova, Z., Fazleabas, A., T. (2001) The role of chorionic gonadotrophin (CG) in blastocyst implantation. *Archives of Medical Research*: 32(6), 627-634
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., Shalev, E. (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 2(1), 59
- Staun-Ram, E., Shalev, E. (2005) Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 3, 56 [doi: 10.1186/1477-7827-3-56]
- Stavreus-Evers, A., Aghajanova, L., Brismar, H., Eriksson, H., Landgren, B., M., Hovatta, O. (2002) Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and

pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Molecular Human Reproduction*: 8, 765–769 [doi:10.1093/molehr/8.8.765]

Steck, T., Giess, R., Suetterlin, M., W., Bolland, M., Wiest, S., Poehls, U., G., Dietl, J. (2004) Leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*: 112, 69-73

Stemmler, M., P. (2008) Cadherins in development and cancer. *Molecular Biosystems*: 4, 835–850

Steward, C., L. (1994) The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 734, 157-165

Stewart, C., L., Kaspar, P., Brunet, L., J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., Abbondanzo, S., J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*: 359, 76-79

Stoikos, C., J., Salamonsen, L., A., Hannan, N., J., O'Connor, A., E., Rombauts, L., Dimitriadis, E. (2006) Activin A regulates trophoblast cell adhesive properties: implications for implantation failure in women endometriosis-associated infertility: *Human Reproduction*: 25, 1767-1774

Stokes, P., J., Hawkhead, J., A., Fawthrop, R., K., Picton, H., M., Sharma, V., Leese, H., J., Houghton, F., D. (2007) Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Human Reproduction*: 22, 829-835

Stowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., von Wolff, M. (2006) The human endometrium as a fertility determining factor. *Human Reproduction Update*: 12(5), 617-630

Sturmey RG, Leese HJ. (2003) Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*: 126(2), 197-204

Sturmey, R., G., Hawkhead, A., J., Barker, E., A., Leese, H., J. (2009) DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Human Reproduction*: 24(1), 81-91

- Summers, M., C., McGinnis, L., K., Lawitts, J., A., Raffin, M., Biggers, J., D. (2000) IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Human Reproduction*: 15, 1791-1801
- Summers, M., C., Biggers, J., D. (2003) Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*: 9, 557-582
- Suzuki, A., Ohno, S. (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of Cell Science*: 119(Pt 6), 979-87
- Svalander, P., C., Odin, P., Nilsson, B., O., Obrink, B. (1987) Trophectoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development*: 100, 653-660
- Szonyi, B., J., Bata-Csorgo, Z., Bartfai, G., Kemeny, L., Dobozy, A., Kovacs, L. (1999) Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, $\alpha(6)$ integrin(+) cytotrophoblast cells in early human placenta. *Molecular Human Reproduction*: 5, 1059-1065
- Tabibzadeh, S. (1994) Regulatory roles of FN-gamma in human endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 734, 1-6
- Tabibzadeh, S., Kong, Q., F., Babaknia, A., May, L., T (1995) Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Human Reproduction*: 10, 2793-2799
- Talbot, P., Shur, B., D., Myles, D., G. (2003) Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucid interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction*: 68(1), 1-9
- Tamada, H., McMaster, M., T., Flanders, K., C., Andrews, G., K., Dey, S., K. (1990) Cell type-specific expression of transforming growth factor-beta-1 in the mouse uterus during the periimplantation period. *Molecular Endocrinology*: 4, 965-972
- Tao, J., Tamis, R., Fink, K. (2001) Pregnancies achieved after transferring frozen morula/compact stage embryos. *Fertility and Sterility*: 75(3), 629-631
- Tao, J., Craig, R., H., Johnson, M., Williams, B., Lewis, W., White, J., Buehler, N. (2004) Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertility and Sterility*: 82(1), 108-118

Taskin, E., A., Baltaci, V., Cagiran, G., Aytac, R. (2012) Detection of IL1 β in culture media supernatants of preimplantation human embryos; its relation with embryo grades and development. *Gynecology and Endocrinology*: 28 (4), 296-298

Tazuke, S., I., Guidice, L., C. (1996) Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: embryonic interactions. *Seminars in Reproductive Endocrinology*: 14, 231-245

Teranishi, A., Kuwata, A., Fumino, T., Hamai, H. (2009) a theoretical model for single blastocyst transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 26, 327-334

Tesarik J, Greco E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction*: 14(5), 1318-1323

Tesarik, J., Junca, A., M., Hazout, A., Aubriot F., X., Nathan, C., Cohen-Bacrie, P., Dumont-Hassan, M. (2000) Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Human Reproduction*: 15(6), 1396-1399

Thomson, A., J., Greer, M., R., Young, A., Boswell, F., Telfer, J., F., Cameron, I., T., Norman, J., E., Cambell, S. (1999) Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon-gamma. *Molecular Human Reproduction*: 5, 64–70

Tierney, T., Christian, H., C., Morris, J., F., Solito, E., Buckingham, J., C. (2003) Evidence from studies on co-cultures of TtT/GF and AtT20 cells that Annexin 1 acts as a paracrine or juxtacrine mediator of the early inhibitory effects of glucocorticoids on ACTH release. *Journal of Neuroendocrinology*: 15, 1134-1143

Toder, V., Fein, A., Carp, H., Torchinsky, A. (2000) TNF-a in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetomaternal unit? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 20, 73-81

Toyofuku, A., Hara, T., Taguchi, T., Katsura, Y., Ohama, K., Kudo, Y. (2006) Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Human Reproduction*: 21, 1122-1128

Tsuchiya, B., Sato, Y., Kameya, T., Okayasu, I., Mukai, K. (2006) Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Archives of Histology and Cytology*: 69, 135–145

Tulac, S., Nayak, N., R., Kao, L., C., Van Waes, M., Huang, H., Lobo, S., Germeyer, A., Lessey, B., A., Taylor, R., N., Suchanek, E., Giudice, L., C. (2003) Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 88, 3860–3866

Tulsiani, D., R., Abou-Haila, A. (2011) Molecular events that regulate mammalian fertilization. *Minerva Gynecologica Journal*: 63(2), 103-118

Turner, K., Goldstein, D., J., Rogers, A., W. (1992) Variation in the dry mass of mouse embryos throughout the preimplantation embryo. *Human Reproduction*: 7, 112-116

Turpeenniemi-Hujanen, T., Feinberg, R., F., Kauppila, A., Puistola, U. (1995) Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertility and Sterility*: 64. 132–138

Usadi, R., S., Murray, M., J., Bagnell, R., C., Fritz, M., A., Kowalik, A., L., Meyer, W., R., Lessey, B., A. (2003) Temporal and morphologic characteristics of pinopode expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertility and Sterility*: 79, 970-974

Van der Linden, P., J., de Goeij, A., F., Dunselman, G., A., Erkens, H., W., Evers JL. (1995) Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*: 63, 1210–1216

Van der Linden, M., Buckingham, K., Farguhar, C., Kremer, J., A., Metwally, M. (2011) Luteal phase support for assisted reproductive cycles. *Cochrane database of systematic reviews*: 5(10): CD009154 [doi:10.1002/14651858.CD009154.pub2]

Van de Stolpe, A., Van der Saag P., T. (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Molecular Medicine*: 74, 13–33

Van Mourik, M., S., Macklon, N., S., Heijnen, C., J. (2009) Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *Journal of leukocyte Biology*: 85, 4-19

- Van Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O., Clevers, H. (2002) Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*: 277, 17901-17905
- Van Os, H., C., Alberda, A., T., Janssen-Caspers, H., A., Leerentveld, R., A., Scholtes, M., C., Zeilmaker, G., H. (1989) the influence of the interval between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome. *Fertility and Sterility*: 51(2), 360-362
- Van Sinderen, M., Menkhorst, E., Winship, A., Cuman, A., Dimitriadis, A. (2012) Preimplantation Human Blastocyst-Endometrial Interactions: The role of Inflammatory Mediators. *American Journal of Reproductive Immunology*: 69(5), 427-440
- Vandermolen, D., T., Gu, Y. (1996) Human endometrial interleukin-6 (IL-6) in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production and stimulation thereof by IL-1 beta. *Fertility and Sterility*: 66, 741-747
- Vane, J., R., Bakhle, Y., S., Botting, R., M. (1998) Cyclogenases 1 and 2. *Annual Review in Pharmacology and Toxicology*: 38, 97-120
- Verberg, M., F., G., Macklon, N., S., Nargund, G., Frydman, R., Devroey, P., Broekmans, F., J., Fauser, B., C., J., M. (2009) Mild ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*: 15(1), 13-19
- Verma, S., Hiby, S., E., Loke, Y., W., King, A. (2000) Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin-15. *Biology of Reproduction*: 62, 959-968
- Vigano, P., Somigliana, E., Mangioni, S., Vignali, M., Di Blasio, A., M. (2002) Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 87, 5730-5736
- Vigano, P., Mangioni, S., Pompei, F., Chiodo, I. (2003) Maternal-conceptus cross-talk-a review. *Placenta*: 24(suppl B), S56-S61
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., Louvet-Vallee, S. (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental Biology*: 282, 307-319

- Violette, M., I., Madan, P., Watson, A., J. (2006) Na⁺/K⁺ -ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. *Developmental Biology*: 289, 406-419
- Von Rango, U., Alfer, J., Kertschanska, S., Kemp, B., Muller-Newen, G., Heinrich, P., C., Beier, H., M., Classen-Linke, I. (2004) Interleukin-11 expression: its significance in eutopic and ectopic human implantation. *Molecular Human Reproduction*: 10, 783-792
- Von Wolff, M., Thaler, C., J., Strowitzki, T., Broome, J., Stolz, W., Tabibzadeh, S. (2000) Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Molecular human reproduction*: 6, 627-634
- Vrekoussis, T., Kalantaridou, S., N., Mastorakos, G., Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Syrrou, M., Lavasidis, L., G., Relakis, K., Chrousos, G., P. (2010) The role of stress in female reproduction and pregnancy: an update. *Annals of the New York Academy of Science*: 1205, 69-75
- Walser, C., B., Lipshitz, H., D. (2011) Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Current Opinion in Genetics and Development*: 21(4), 431-443
- Wang, J., Sauer, M., V. (2006) In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management*: 2(4), 355-364
- Wang, X., N., Das, S., K., Damm, D., Klagsbrun, M., Abraham, J., A. & Dey, S., K. (1994) Differential regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the adult ovariectomized mouse uterus by progesterone and estrogen. *Endocrinology*: 135, 1264–1271 [doi:10.1210/en.135.3.1264]
- Wang, Y., Puscheck, E., E., Lewis, J., J., Trostinskaia, A., B., Wang, F., Rappolee, D., A. (2005) Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38<APK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertility and Sterility*: 83, 1144-1154
- Watson, A., J., Barcroft, L., C. (2001) Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*: 6, D708-730

- Wen, Y., Caffrey, T., C., Wheelock, M., J., Johnson, K., R., Hollingsworth, M., A. (2003) Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*: 278, 38029–38039
- Westergaard, L., W., Bossuyt, P., M, van der Veen, F., van Wely, M. (2011) WITHDRAWN: human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane database of systematic reviews*: 16(2): CD003973 [doi:10.1002/14651858.CD003973.pub2]
- White, F., J., Burghardt, R., C., Hu, J., Joyce, M., M., Spencer, T., E., Johnson, G., A. (2006) Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction*: 132, 919–929
- Wiemer, K., E., Anderson, A., R., Kyslinger, M., L., Weikert, M., L. (2002) Embryonic development and pregnancies following sequential culture in human tubal fluid and a modified simplex optimized medium containing amino acids. *Reproductive Biomedicine Online*: 5, 323-327
- Wilcox, A., J., Baird, D., D., Weinberg, C., R. (1999) Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *The New England Journal of Medicine*: 340, 1796-1799
- Wiley, L., M., Wu, J., X., Harari, I. & Adamson, E., D. (1992) Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Developmental Biology*: 149, 247–260 [doi: 10.1016/0012-1606(92)90282-L]
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annuals Review Of Cell Developmental Biology*: 14, 59-88
- World Health Organization (2010) World Health Organization reference values for human sperm characteristics. *Human Reproduction Update*: 16(3), 231-245
- Wu, M., H., Wang, C., A., Lin, C., C., Chen, L., C., Chang, W., C., Tsai, S., J. (2005) Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 beta in normal and endometriotic stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 90, 286-295
- Xie, H., Wang, H., Tranguch, S., Iwamoto, R., Mekada, E., Demayo, F., J., Lydon, J., P., Das, S., K. & Dey, S., K. (2007) Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *PNAS*: 104, 18315–18320 [doi:10.1073/pnas.0707909104]

Xu, P., Wang, Y., Piao, Y., Bai, S., Xiao, Z., Jia, Y., Luo, S., Zhuang, L. (2001) 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. *Biology of Reproduction*: 65, 240–246. [doi: 10.1095/biolreprod65.1.240]

Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., Kufe, D. (1997) Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*: 272, 12492–12494

Ye, X., Hama, K., Contos, J., J., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M., K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J., Chun, J. (2005) LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*: 435, 104-108

Yoo, H., J., Barlow, D., H. & Mardon, H., J. (1997) Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Developmental Genetics*: 21, 102–108 [doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1997)21:1<102:AID-DVG12>3.0.CO;2-C]

Yoshida, M., Obata, R. & Tsujii, H. (2009) Effect of relaxin and IGF-I on the pre-implantation development of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) embryos *in vitro*. *Reproductive Medicine and Biology*: 8, 39–43 [doi: 10.1007/s12522-008-0007-4]

Yu, H., Rohan, T. (2000) Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of National Cancer Institute*: 92, 1472-1489

Yu, C., Wang, L., Li, J., Guo, X., Zhang, X., Xu., Y., Yao, Y. (2012) Ovarian stimulation reduces IL-6 release from mouse and human pre-implantation embryos. *American Journal Of Reproductive Immunology*: 68, 199-204

Zernicka-Goetz, M. (2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development*: 129(4), 815-829

Zhao, Y., Chegini, N. (1999) The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium. *American Journal of Reproductive Immunology*: 42, 303-311

Zhu, L., J., Bagchi, M., K., Bagchi, I., C. (1998) Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation. *Endocrinology*: 139, 330–339

Zolti, M., Ben-Rafael, Z., Meiron, R., Shemesh, M., Bider, D., Mashiach, S., Apte, R., N. (1991) Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertility and Sterility*: 56, 265-272

Zoumakis, E., Margioris, A., N., Stournaras, C. Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Gravanis A. (2000) Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Molecular Human Reproduction*: 6, 344-351

Zygmunt, M., McKinnon, T., Herr, F., Lala, P., K., Han, V., K. (2005) HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Molecular Human Reproduction*: 11(4), 261-267

2. Επιστημονικά Βιβλία

Balen, A., H., Jacobs, H., S. (2003) *Infertility in Practice*. Elsevier Science, printed in China, 2nd edition

Boron, W., Boulpaep, E. (2004) *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. Elsevier, Oxford. ISBN. 1-4160-2328-3

Bras, M., Lens, J., W., Piederiet, M., H., Rijnders, P., M., Verveld, M., Zeilmaker, G., H. (1996) *IVF lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. N.V. Organon

Elder, K., Dale, B (2000) *In vitro fertilization*. Cambridge University Press, UK, 2nd edition

Elder, K., Dale, B (2011) *In vitro fertilization*. Cambridge University Press, UK, 3rd edition

Halliwell, B., Gutteridge, J., M., C. (2007) *Free radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford: Oxford University Press, 2007

Kimber, S. (2008) *Blastocyst implantation: the adhesion cascade*. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC, editors. *The Endometrium*. London: Informa

Αναγνωστοπούλου-Μπέη, Α. (1993) *Βιολογία Ανάπτυξης*. Εκδόσεις ART of TEXT, Θεσσαλονίκη

Κουσουλάκος, Σ., Λ. (2004) *Εισαγωγή στην Αναπτυξιακή Βιολογία και Ιστολογία*. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα

Παταργιάς, Θ., Α., Αλεπόρου, Β. (1998) *Γενετική Ανθρώπου*. Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα




ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Μορφολογικά κριτήρια επιλογής γονιμοποιημένων ωαρίων για εμβρυομεταφορά (φωτογραφίες από το αρχείο του εργαστηρίου της Κλινικής Γένεσης Αθηνών)

1. Κριτήρια αξιολόγησης του ζυγώτη στο στάδιο των προπυρηνίων

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΟΙΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Συμμετρικά	Προπυρήνες στο κέντρο του ζυγωτού-Ισάριθμοι σε πυρηνίσκους
2	Μη-συμμετρικά	Προπυρήνες στην περιφέρεια ή αλλού-άνισοι σε αριθμό πυρηνίσκων
3	Ανώμαλα	Κανένας ή ένας πυρηνίσκος

2. Κριτήρια αξιολόγησης προεμβρύων 2^{ης} ή 3^{ης} ημέρας μετά τη γονιμοποίηση (Σε συνάρτηση πάντα με τον αριθμό κυττάρων. Προέμβρυα 2^{ης} ημέρας: 2-4 κύτταρα, 3^{ης} ημέρας: 6-8 κύτταρα)

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΟΙΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Καλό 	<10% κυτταρικά θραύσματα, ισομεγέθη κύτταρα –αριθμός κυττάρων ανάλογος του σταδίου ανάπτυξης- δεν παρατηρούνται πολυπύρηνα κύτταρα
2	Μέτριο 	10-25% κυτταρικά θραύσματα-τα περισσότερα κύτταρα ισομεγέθη- αριθμός κυττάρων ανάλογος του σταδίου ανάπτυξης- δεν παρατηρούνται πολυπύρηνα κύτταρα
3	Πτωχό 	>25% κυτταρικά θραύσματα- ανισομεγέθη κύτταρα- αριθμός κυττάρων δυσανάλογος του σταδίου ανάπτυξης- παρατηρούνται πολυπύρηνα κύτταρα

3. Κριτήρια αξιολόγησης προεμβρύων 4^{ης} ημέρας μετά τη γονιμοποίηση

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΟΙΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Καλό 	4 ^η αυλάκωση-σύμπτυξη κυττάρων σε όλο τον όγκο του εμβρύου
2	Μέτριο 	4 ^η αυλάκωση- σύμπτυξη κυττάρων στο μεγαλύτερο όγκο του εμβρύου
3	Πτωχό 	Σύμπτυξη κυττάρων σε μικρότερο του μισού του όγκου του εμβρύου με 2-3 ευδιακριτά βλαστομερίδια

4. Κριτήρια αξιολόγησης προεμβρύων 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας (βλαστοκύστες). Συνδυασμός σταδίου ανάπτυξης και ποιότητας έσω κυτταρικής μάζας και τροφεκτοδερμικών κυττάρων (βασισμένο στην κλίμακα αξιολόγησης του Gardner)

Στάδιο Ανάπτυξης Βλαστοκύστεων

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Πρώιμη βλαστοκύστη
2	Βλαστοκύστη
3	Διογκωμένη βλαστοκύστη
4	Εκκολαπτόμενη-Εκκολαπούσα βλαστοκύστη

Έσω κυτταρική μάζα (ICM)

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΟΙΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Καλή 	Εξέχουσα- ευδιάκριτη-με πολλά κύτταρα σε σύντηξη και προσκολλημένα σφιχτά μεταξύ τους
2	Μέτρια 	Ευδιάκριτη-με πολλά κύτταρα ομαδοποιημένα σε χαλαρή διάταξη
3	Πτωχή 	Δύσκολα διακριτή- με πολύ λίγα κύτταρα

Τροφεκτοδερμικά κύτταρα (TE)-τροφοβλάστης

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΟΙΟΤΗΤΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Καλή 	Πολλά κύτταρα που δημιουργούν συνεκτικό επιθήλιο
2	Μέτρια 	Λίγα κύτταρα-μη συνεκτικό επιθήλιο
3	Πτωχή 	Πολύ λίγα κύτταρα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Βιβλιογραφία - Παραπομπές για τις εικόνες του κειμένου

Οι εικόνες και τα διαγράμματα έχουν τροποποιηθεί και μεταφραστεί από τα πρωτότυπα σύμφωνα με τις ανάγκες του κειμένου, όπου αυτό κρίθηκε αναγκαίο.

Εικόνα 1: Μορφολογία ωαρίου και σπερματοζωαρίου

Βικιπαίδεια: Ωάριο. (2013)

URL://<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A9%CE%AC%CF%81%CE%B9%CE%BF>

This page is in the public domain because its copyright has expired. This applies worldwide.

Evans, Janice P, Hardy, Daniel M, and Storey, Bayard T. (Jan 2006) Sperm–Egg Interactions: Sperm–Egg Binding in Mammals. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0004206]

Εικόνα 2: Η ακροσωμική αντίδραση και η διάτρηση της διαφανούς ζώνης από το σπερματοζωάριο που οδηγούν στη γονιμοποίηση του ωαρίου

Ohnami, N., Nakamura, A., Miyado, M., Sato, M., Kawano, N., Yoshida, K., Harada, Y., Takezawa, Y., Kanai, S., Ono, C., Takahashi, Y., Kimura, K., Shida, T., Miyado, K., Umezawa, A. (2012). CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open*, 000: 1-8 [doi: 10.1242/bio.20121420]

Εικόνα 3: Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI)

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση.

Εικόνα 4: Γονιμοποιημένο ωάριο

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση.

Εικόνα 5: Αυλάκωση του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το σχηματισμό διογκωμένης βλαστοκύστης.

Zernicka-Goetz, M. (2005). Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 6, 919-928 [doi: 10.1038/nrm1782]

Εικόνα 6: Γονιμοποιημένα ωάρια τρίτης ημέρας

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 7: Μορίδιο πριν το σχηματισμό βλαστοκύστης

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 8: Πρώιμη βλαστοκύστη

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 9: Βλαστοκύστες

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 10: Η μορφολογία της ανθρώπινης βλαστοκύστης

Εικόνα από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 11: Κατηγοριοποίηση των βλαστοκύστεων βάση του αναπτυξιακού τους σταδίου

Εικόνες από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 12: Παραδείγματα ποιοτικής κατηγοριοποίησης των βλαστοκύστεων

Εικόνες από το αρχείο φωτογραφιών του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών Α.Ε. στο οποίο έχει επιτραπεί η πλήρης πρόσβαση

Εικόνα 13: Δείγμα βιοψίας ενδομητρίου κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο οποίο διαφαίνονται τα πινοπόδια

Li, L., Xu, B., Chen, Q., Sun, X. (2010) Effects of hydrosalpinx on pinopodes, leukaemia inhibitory factor, integrin $\beta 3$ and MUC1 expression in the peri-implantation endometrium.

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: 151 (2), 171-175
URL//: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.04.024>

Εικόνα 14: Αναπαράσταση των σταδίων εμφύτευσης

Fitzgerald, J., S., Poehlmann, T., G., Schleussner, E., Markert, U., R. (2008) Trophoblast invasion: The role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Human Reproduction Update*: 14 (4), 335-344 [doi: 10.1093/humupd/dmn010]

Εικόνα 15: Η δράση του LIF και της IL11 κατά την εμφύτευση

Dimitriadis, E., Menkhurst, E., Salamonsen, L., A., Paiva, P. (2010) Review: LIF and IL-11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta*: 31, S99-S104 [<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.027>]

Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση ορμονικών παραγόντων και κυτταροκινών που δρουν τοπικά στο σημείο αλληλεπίδρασης της μητέρας με το έμβρυο κατά τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης.

Makrigiannakis, A., Minas, V., Kalantaridou, S., Nikas, G., Chrousos, G., P. (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 17 (5), 178-185 [<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.05.001>]

Εικόνα 17: Εικόνα από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας LUMINEX (www.luminexcorp.com)

Εικόνα 18: Εικόνα από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας LUMINEX (www.luminexcorp.com)

Εικόνα 19: Εικόνα από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας LUMINEX (www.luminexcorp.com)

Εικόνα 20: Εικόνα από το εγχειρίδιο διαχείρισης των κιτ της επίσημης ιστοσελίδας της εταιρίας Invitrogen- κατασκευαστή και προμηθευτή των κιτ (www.invitrogen.com)

Εικόνα 21: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 22: Μορφολογία σπερματοζωαρίων-Ανώμαλες μορφές

Wikipedia-Semen Analysis (2011): URL: // http://en.wikipedia.org/wiki/Semen_analysis

Εικόνα 24: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 25: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 26: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 27: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 28: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 30: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

Εικόνα 31: Εικόνα από το αρχείο του εργαστηρίου εμβρυολογίας της κλινικής Γένεσις Αθηνών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Χημική σύνθεση του G1 καλλιεργητικού υγρού- πρώτης φάσης (πηγή προέλευσης η επίσημη ιστοσελίδα της Vitrolife: www.vitrolife.com)

Alanine	Magnesium sulphate	Sodium lactate
Alanyl-glutamine	Penicillin G	Sodium pyruvate
Aspartate	Potassium chloride	Taurine
Calcium chloride	Proline	Hyaluronan
EDTA	Serine	Sodium lactate
Glucose	Sodium bicarbonate	Water for injection
Glutamate	Sodium Chloride	
Glycine	Sodium Dihydrogen phosphate	

Χημική σύνθεση του G2 καλλιεργητικού υγρού-δεύτερης φάσης (πηγή προέλευσης η επίσημη ιστοσελίδα της Vitrolife: www.vitrolife.com)

Alanine	Histidine	Pyridoxine
Alanyl-glutamine	Hyaluronan	Riboflavin
Arginine	Isoleucine	Serine
Asparagine	Lysine	Sodium Bicarbonate
Aspartate	Magnesium sulphate	Sodium Chloride
Calcium chloride	Methionine	sodium lactate
Calcium pantothenate	Water for injection	sodium pyruvate
Cystine	Penicillin G	thiamine

Glucose	Phenylalanine	threonine
Glutamate	Potassium Chloride	tryptophan
Glycine	Proline	tyrosine
Valine		
Sodium dihydrogen phosphate		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

1. Καλλιεργητικά υλικά

G-IVFTM + 5% HSA (100mg/ml): Vitrolife, Goteborg, Sweden- φυλάσσεται στους +2°C και προφυλάσσεται από το φως- προ-εξισορρόπηση από το προηγούμενο βράδυ πριν τη χρήση στους 37°C και 6% CO₂.

G-MOPSTM + 5% HSA (100mg/ml): Σειρά 5- Vitrolife, Goteborg, Sweden- φυλάσσεται στους +2°C και προφυλάσσεται από το φως- προ-εξισορρόπηση από το προηγούμενο βράδυ πριν τη χρήση στους 37°C.

G1TM v5+ 5% HSA (100mg/ml): Σειρά 5- Vitrolife, Goteborg, Sweden- φυλάσσεται στους +2°C και προφυλάσσεται από το φως- προ-εξισορρόπηση από το προηγούμενο βράδυ πριν τη χρήση στους 37°C και 6% CO₂.

G2TM v5+ 5% HSA (100mg/ml): Σειρά 5- Vitrolife, Goteborg, Sweden- φυλάσσεται στους +2°C και προφυλάσσεται από το φως- προ-εξισορρόπηση από το προηγούμενο βράδυ πριν τη χρήση στους 37°C και 6% CO₂.

G2TM v5+ 10% HSA (100mg/ml): Σειρά 5- Vitrolife, Goteborg, Sweden- φυλάσσεται στους +2°C και προφυλάσσεται από το φως- προ-εξισορρόπηση από το προηγούμενο βράδυ πριν τη χρήση στους 37°C και 6% CO₂ – χρησιμοποιείται σαν καλλιεργητικό υγρό μόνο για την προετοιμασία των βλαστοκύστεων λίγο πριν την εμβρυομεταφορά.

2. Άλλα υλικά για επεξεργασία και καλλιέργεια γαμετών και γονιμοποιημένων ωαρίων

HSA: 100mg/ml- Irvine Scientific^R, Santa Ana, California, USA- φυλάσσεται στους +2°C

Παραφινέλαιο: Light Mineral Oil (100ml)- Irvine Scientific^R, Santa Ana, California, USA- μετά το άνοιγμά του φυλάσσεται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 6% CO₂.

PercollTM: 1.130g/ml- Amsterdam Biosciences, Uppsala, Sweden- φυλάσσεται στους +4 - 8°C

Υαλουρονιδάση – Hyaluronidase- 80iu (10ml) in flushing- FertiPro, Beernem, Belgium- φυλάσσεται στους +2°C

3. Αναλώσιμα υλικά

BD Falcon (2001) -15ml: σωληνάρια αποθήκευσης ωοθυλακικού υγρού κατά την ωοληψία μέχρι τον έλεγχο για την ανεύρεση ωαρίων- Becton & Dickinson, USA

BD Falcon (2095) - 15ml: κωνικά σωληνάρια για την επεξεργασία του σπέρματος (Percoll, ξέπλυμα)-Becton & Dickinson, USA

Petri 60x15mm BD: τρυβλίο με ένα πηγάδι στη μέση-χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα ωαρίων και γονιμοποιημένων ωαρίων καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας όταν χρειάζεται, Falcon, Becton & Dickinson, USA

Petri 60x15mm BD (Ref 353652): τρυβλίο για έλεγχο ωαρίων κατά την ωοληψία και για καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων από την τρίτη ημέρα ανάπτυξης μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης

Petri dish Nunc (Ref 150255): τρυβλίο για τη συλλογή ωαρίων και την καλλιέργεια γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι την 3^η ημέρα ανάπτυξής τους (G-IVF και G1 καλλιεργητικό υγρό) - Nunc International, Denmark

Petri ICSI 1006: τρυβλίο μέσα στο οποίο τοποθετούνται οι σταγόνες ωαρίων και σπερματοζωαρίων για την εκτέλεση της μεθόδου ICSI-50x9mm- Becton & Dickinson, USA

Nunc: Αποστειρωμένα τρυβλία 4 θέσεων (4-well) - Nunc International, Denmark

Βελόνες Ωοληψίας: Wallace, Kent, UK

Borocilicate Pasteur Pipettes: Πιπέττες Pasteur προς αποστείρωση- χρησιμοποιούνται για το χειρισμό των γαμετών και των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro*- PINOH, Αθήνα, Ελλάδα

Holding pipette: COOK, K-HPIP-1035, Ireland

ICSI pipette- Humagen, MIC-50-35, Virginia, USA

3. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Στερεοσκόπιο: Brightfield microscope SMZ-10A, Nikon, Japan

Ανάστροφο μικροσκόπιο: Inverted microscope, Eclipse TE300, Nikon, Japan

Επωαστής EM-CELL: HDS Scientific Supplies Pty Ltd, Australia

Επωαστικός κλίβανος: Benchtop NAPCO, series 5400 CO₂ Incubator, France

Επωαστικός κλίβανος: MINC-1000, Cook^R Medical Technology, Australia

Gilson Pipette: p20, p200

Wallace Catheter: Wallace, Kent, UK

Wallace injection: Wallace, Kent, UK

4. Αντιδραστήρια, υλικά και εξοπλισμός για τη μέτρηση των κυτταροκινών

Human Il-1b Singleplex Bead Kit: Invitrogen Carlsbad, CA USA- φυλάσσεται στους +2-8

Human Il-6 Singleplex Bead Kit: Invitrogen Carlsbad, CA USA

Extracellular Protein Buffer Reagent Kit for Human or Monkey: Invitrogen Carlsbad, CA USA

Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 10-1000μl (Eppendorf, Germany)

8κάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 10-100μl (Eppendorf, Germany)

Επαναληπτική Πιπέτα (Eppendorf, Germany)

Ρύχνη για τις προαναφερόμενες πιπέτες

Αυτοκόλλητα καλύμματα (plate sealers)

Αλουμινόχαρτο

Αναδευτήρας (Vortex)

Ανακινούμενη πλάκα (orbital shaker)

Λουτρό υπερήχων

Αντλία κενού με κατάλληλο σύστημα αναρρόφησης από πλάκα 96 θέσεων (Millipore, USA)

Σωληνάρια, κωνικές φιάλες και ογκομετρικοί κύλινδροι

Σύστημα Luminex

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

Τιμές (pg/ml) των IL-1b vs IL-6 στο σύνολο των δειγμάτων (683 δείγματα-245 ασθενείς).

IL-1b	IL-6
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0,03
0	0
0	0
0,01	0,01
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0,73
0,01	0
0,01	0,24
1,32	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0	0,1
0,01	0,24
0	0
0	0
0,01	0
0,17	0
0	0
0,01	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0,01	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0,9

0,12	0
1,46	0
0,81	0,2
0,12	0
0,24	0,06
0	0
0	0
0	0
0	0
2,16	0,03
0	0
0	0
0	0
0,01	0
0,01	0,03
0,01	0
0	0
0	0,12
0	0,12
0	0,12
0	0
0,01	0
0	0
0	0,12
0	0,12
0	0,12
0	0,12
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0,01
0	0,02
0,55	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0
0	0,01
0	0
0	0
0	0,01
0	0
0	0,01
0	0
0	0
0	0,05

0	0
0	0,3
0	0
0	0,05
0	0,17
0	0
0	0,3
0,02	0
0	0
0	0,05
0	0,05
0	0,3
0	0,05
0	0,05
0	0,05
0	0,05
0,02	0,05
0	0
0	0
0	0
0	0,05
0	0
0,74	0
0	0,02
0,03	0
0,38	0
0	0
0,74	0
0,03	0
0	0,02
0	0
0,03	0
0,03	0
0	0
0	0,02
0,38	0
0,38	0,02
0,03	0
0,03	0,02
0,03	0
0,03	0,02
0,03	0
0,03	0
0,03	0
0,03	0
0,03	0
0,38	0,02
0	0
0	0,01

0	0,01
0	0
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,31
0	0,16
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0,79	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,16
0	0,01
0	0,16
0	0
0	0
0	0
0,01	0
0,01	0
0	0,04
0,01	0
0,01	0
0,01	0,08
0,01	0
0,01	0
0,2	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0

0,01	0,2
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0
0,21	0,55
0,01	0,01
0,01	0,1
0,01	0
0,01	0,1
0,01	0
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,24
0,01	0,24
0,21	0,03
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,21	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
6,23	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,21	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,24	0
0,01	0
0,95	0
0,24	1,31
0,95	0,03
0,95	0,03
0,24	0,03
0,6	0
0,95	0
0,24	0
0,24	0
0,24	0,06
0	0
0	0

0,42	0
0	0
0	0
0	0
0,01	0,12
0,01	0,12
0,01	0,12
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
2,16	0,36
0,01	0,12
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0	0
0	0,94
0,01	0,94
0,01	0
0,01	0
0,32	0
0	0
0,01	0
0	0,01
0	0
0	0,01
0	0,01
0	0,03
0	0,03
0	0
0	0,17
0	0,01
0	0,05
0	0,17
0	0
0	0
0	0,05
0,12	0
1,14	0
1,14	0
1,14	0,05
0,12	0
0,24	0
0	0
0	0,3
0	0,17
0,57	0,3
0	0,05
0	0

0	0,05
4,39	0,05
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,05
0	0
0	0,11
0	0
0	0
0	0
0,01	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0,02
0	0,02
0	0
0	0
0,55	0
0,55	0,02
0	0
0	0
0	0,02
0,55	0,02
0	0
0	0
0,55	0
0	0,02
0	0
0	0
0	0
0	0,47
0	0,01
0	0
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
1,14	0,01
0	0,16
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01

0,11	0,01
0	0,01
0,38	0,16
0,02	0,01
0,03	0,01
0,74	0,01
0,03	0,01
0	0,01
0,03	0,01
0,03	0,01
0,03	0,31
0	0
0	0
0	0
0	0
0,03	0
0	0
0	0
0,74	0
0,74	0
0,03	0
0,03	0
0,03	0
0,03	0
0	0
0,03	0
0	0
0,03	0
0	0
0,03	0
0,74	0
0	0
0	0
0	0,01
0,23	0
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01

0	0,01
0	0
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0,23	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,03
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0
0,92	0
0,01	0
0	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0,01
0,01	0,03
0,01	0,03
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0,1
0,01	0
0,01	0
0,01	0,24
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0

0,01	0
0,2	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,11
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,05	0
0,01	0
0,01	1,72
0,01	0,03
0,01	0,06
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,12
0,01	0,12
0,01	0,12
0,01	0,12
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,94
0,01	1,78
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,01
0,01	0,01
0,01	0
0,01	0,01
0,01	0,01
0,01	0,01
0,01	0
0,01	0,05
0,21	0,65
0,01	0,17
0,01	0
0,21	0
0,01	0

0,01	0
0,01	0,05
0,01	0
0,01	0
0,01	0,05
0,01	1,03
0,01	0
0,01	0
0,01	0,05
0,01	0
0,46	0,05
0,01	0
0,01	0,05
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,05
0,21	0
0,24	0,02
0,24	0
0,24	0
0,95	0
0,24	0
0,24	0
0,24	0
0,6	0
0,24	0,02
0,24	0
0,95	0
0	0
0	0,02
0	0,02
0	0
0	0,02
0	0,02
0	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0
0,01	0,02
0,01	0
0,01	0
0	0,01
0,01	0,01
0	0,01
0,01	0,01
0	0,01
0,01	0,01
0	0,01
0,01	0,01

0	0,01
0,6	0,16
0,01	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,03
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0,47	0,16
0,24	0
0	0
0	0
0	0
0	0,04
0	0
0	0
3,77	0,18
0,01	0
0,01	0
0	0
0	0,04
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0,04
0	0
0	0
0	0
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0,55	0,01
0,55	0,01
0	0,01
0	0,01
0,02	0,01
1,14	0,01
1,14	0,01

0	0,16
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0	0,01
0,02	0,01
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
1,88	0
0,03	0
0	0
0	
0	
0	
0,05	
0	
0	
0	
0,03	
1,88	
0	
0,03	
0,03	
0,03	
0,03	
0,03	
0,03	
0,38	
0,03	
0	
0,38	
0,03	
0,03	
0	
0	
0	
0	
0	
0	

0	
0	
0	
0	
0,23	
0	
0	
0	
0	
0	
0	
0	
0	
0	
0	
0,11	
0	
0	
0	
0	
0	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,2	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,2	

0,01	
0,01	
0,01	
0,01	
0,24	
0,24	
0	
0,24	
0,24	
0,24	
0,24	
0,24	

IL-1b vs IL6 στις κατηγορίες B-HCG(+) και B-HCG(-)

IL-1b B-HCG(+)	IL-6 B-HCG(+)	IL-1b B-HCG(-)	IL-6 B-HCG(-)
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0,01	0	0	0,03
0,01	0,03	0,01	0
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0,24	0,01	0,03
0,01	0,1	1,32	0,73
0,01	0,1	0	0,1
0	0,1	0	0,1
0,01	0,1	0,17	0,24
0,01	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0,01	0
0	0	0	0
0,12	0	0	0
0,12	0	0	0
0,24	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	1,46	0
2,16	0,9	0,81	0
0	0	0	0,2
0	0	0,01	0,03
0,01	0	0	0
0,01	0	0	0
0,01	0,06	0	0

0	0	0	0,12
0	0	0	0,12
0	0	0	0,12
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0,03	0,74	0,3
0	0	0	0
0,55	0	0,03	0
0	0	0	0
0	0,12	0,03	0,05
0	0,12	0,38	0,05
0	0,12	0	0
0	0,12	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0,79	0
0	0,01	0	0
0	0,02	0	0
0	0,01	0	0
0,02	0,01	0	0
0	0,01	0	0,02
0	0,01	0	0
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0,01	0,01	0,01
0	0	0,01	0,16
0,02	0,01	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0,05	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0,03	0,05	0,01	0,01
0,38	0,17	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0,74	0,3	0,01	0,01
0,03	0	0,01	0,01
0,03	0,05	0,01	0,16
0	0,05	0,01	0,01
0,38	0,3	0,01	0
0,38	0,05	0,01	0,04
0,03	0,05	0,01	0
0,03	0,05	0,01	0
0,03	0,05	0,01	0
0,03	0	0,01	0
0,03	0	0,01	0
0,03	0	0,01	0,77
0	0	0,01	0

0,01	0,01	0	0
0,01	0,01		
0,01	0,01	0	0
0,01	0,01	0	0,94
0,01	0,01	0	0,01
0,01	0,01	0,03	0,05
0,01	0,01	0,03	0
0,01	0,01	0,03	0
0,01	0,01	0	0
0,01	0,01	0	0,05
0,24	0	0,03	0
0,95	0	0,74	0,11
0,6	0,23	0,23	0
0,24	0	0	0
0,24	0	0	0
0	0	0	0,02
0,42	0,2	0	0
0	0,2	0	0
0,01	0,03	0	0,02
0,01	0	0	0
0,01	0,01		
0,01	0,1	0	0
0,01	0	0	0
0	0,1	0	0
0,01	0,1	0,92	0,47
0,01	0,1	0,01	0,01
0,01	0,03	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0,12	0	0,01	0,01
0,12	0	0,01	0,01
0,24	0	0,01	0,16
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0,57	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0,01	0,03	0,01	0
0,01	0,03	0,05	0
0,01	0,03	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0

0	0	0,01	0,01
0,55	0	0,01	0,01
0	0		
0	0	0,01	0,01
0,55	0,36	0,01	0
0	0,12	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0	0,46	0,01
0	0,94	0,01	0,01
0	0		
1,14	0	0,01	0,03
0	0		
0	0	0,01	0,01
0	0	0,01	0,01
0	0,01	0,24	0
0	0	0,24	0
0	0,01	0,24	0
0	0,03	0,24	0
0,11	0,03	0	0
0	0	0	0
0,38	0,17	0	0
0,02	0,01	0,01	0,03
0,03	0,05	0,01	0,03
0,74	0,17	0,01	0,01
0,03	0	0,01	0,03
0	0		
0,03	0		
0		0	0,1
0	0	0,6	0,24
0	0,05	0,01	0
0	0	0	0
0,74	0,3	0	0
0,74	0,17		
0,03	0,3	0	0
0,03	0,05	0	0
0,03	0	0	0
0,03	0,05		
0,03	0		
0	0		
0,03	0		
0	0,05		
0	0	3,77	1,72
0	0		
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0,12
0	0,02		
0	0	0	0,12
0	0		

0,23	0,02	0,55	0
0	0,02	0,02	0,94
0	0	0	0,01
0	0	0	0
0	0,02	0	0
0	0	0	0
0	0		
0,01	0,01	0,03	0
0,01	0,01	0,03	0,05
0,01	0,01	0,03	0
0,01	0,16	0	0
0,01	0,01	0	0
0,01	0,01		
0,01	0,01	0	0,02
0,01	0,01	0,23	0
0,01	0,01	0	0
0,01	0,01	0	0,02
0,01	0,01	0	0,02
0,01	0,01		
0,2	0,31	0,11	0
0,01	0	0	0,02
0,01	0	0	0
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0	0,01	0,03
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0	0,01	0,01
0,01	0,01	0,01	0
0,01	0,01		
0,01	0,01	0,01	0,04
0,01	0,01		
0,01	0,01	0,01	0
0,21	0,01		
0,01	0,01	0,01	0
0,21	0,01	0,01	0,04
0,01	0,01	0,01	0
0,01	0,01	0,01	0,01
0,01	0,01		
0,01	0,01	0,01	0,01
0,01	0,01	0,01	0,01

0,21	0,01		
		0,01	0,01
0,95	0		
0,24	0	0,01	0,01
0,6	0	0,21	0,16
0,24	0	0,21	0,01
0,95	0		
0	0	0,01	0,01
0	0		
0	0		
0,01	0,03		
0,01	0,03	0,01	0,01
0	0,1	0,01	0,01
0,01	0,1	0,24	0
0	0,1	0,24	0
0,01	0,1	0,24	0
0,01	0	0,24	0
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0,47	0,11		
0,24	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0,01	0,03		
0,01	0,06		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0,12		
0	0,12		
0,55	0		

0	0		
0	0		
1,14	1,78		
1,14	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0,01		
0	0		
0,02	0,01		
0	0,01		
0	0,01		
0	0		
0	0,05		
1,88	0,65		
0,03	0,17		
0	0		
0	0		
0,05			
0	0,05		
0	0		
0,03	0,05		
1,88	1,03		
0	0		
0,03	0		
0,03	0,05		
0,03	0		
0,03	0,05		
0,38	0,05		
0,03	0		
0	0		
0,38	0		
0	0,02		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0,02		
0	0		
0	0,02		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
0,01	0,01		

0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,2	0,16		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,2	0,16		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,47	0,18		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,21	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0,01	0,01		
0	0		
0,24	0		
0,24	0		
0,24	0		

IL-1b vs IL-6 σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης βλαστοκύστεων

IL1B HD	IL6 HD	IL1B H	IL6 H	IL1B EXPD	IL6 EXPD	IL1B EXPG	IL6 EXPG	IL1B E	IL6 E
0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0
0	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
0	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,12	0	0	0	0
0	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,01	0	0	0	0
0	0	0	0,2	0	0,01	0	0,02	0	0
0	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0,12
0,01	0,01	0	0,03	0	0	0	0	0	0
0,01	0,01	0	0,12	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0
0,01	0	0	0,12	0	0,02	0	0	0	0
0,01	0,03	0	0,12	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0,12	0	0	0	0	0	0
0,01	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0,24	0	0	0	0
0,01	0,03	0	0,01	0	0	0	0	0	0
0,01	0,01	0	0,02	0	0	0	0	0	0,02
0,01	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0
0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,55	0,12	0	0,01	0	0	0	0,05	0	0
2,16	0,55	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0,94	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,02	0	0	0	0,02	0	0
		0	0	0	0,01	0	0	0	0,01
		0	0	0	0	0	0	0	0,01
		0	0	0	0,01	0	0	0	0
		0	0,02	0	0	0	0,1	0	0
		0	0	0	0	0	0,1	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,02	0	0,05	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0,02
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0,02
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,2	0	0,02	0	0	0	0,02

	0	0,1	0	0	0	0	0,01	0,03
	0	0	0	0	0	0	0,01	0
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,16
	0	0	0	0	0	0	0,01	0
	0	0	0	0,1	0	0,02	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0,12	0	0,12	0	0	0,01	0,01
	0	0,94	0	0,12	0	0	0,01	0,03
	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0,01	0	0	0	0	0,01	0,01
	0	0,03	0	0,01	0	0	0,01	0,01
	0	0	0	0,01	0	0	0,01	0,01
	0	0,05	0	0	0	0,1	0,01	0
	0	0,02	0	0,05	0,01	0	0,01	0
	0	0,02	0	0	0,01	0	0,01	0
	0	0	0	0	0,01	0	0,01	0
	0	0	0	0,02	0,01	0,01	0,01	0
	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0
	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0
	0	0	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
	0	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0	0,01	0,08	0,01	0,04	0,01	0
	0	0,12	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01
	0	0	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01
	0	0,05	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0	0,01	0,01	0,01	0,77	0,01	0,03
	0	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0,02	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,03	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,24	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
	0,01	0,1	0,01	0,16	0,01	0,01	0,01	0,01
	0,01	0,1	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0
	0,01	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0,16	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0,16	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0	0,01	0
	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0

		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,04
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,06	0,01	0
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0,16	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0,03	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,03	0	0,01	0	0,01	0,01
		0,01	0	0,03	0	0,01	0	0,02	0,01
		0,01	0	0,03	0,05	0,01	0,01	0,03	0,05
		0,01	0	0,03	0,05	0,01	0,01	0,03	0
		0,01	0,01	0,03	0	0,01	0,01	0,03	0,05
		0,01	0,03	0,03	0	0,01	0,01	0,03	0,05
		0,01	0,03	0,03	0	0,01	0,01	0,05	0
		0,01	0,1	0,03	0	0,01	0,01	0,11	0
		0,01	0,1	0,11	0,03	0,01	0,01	0,17	0,24
		0,01	0,1	0,12	0	0,01	0,01	0,21	0,01
		0,01	0,03	0,12	0	0,01	0,01	0,21	0,01
		0,01	0,03	0,12	0	0,01	0,03	0,21	0,01
		0,01	0,01	0,12	0	0,01	0,03	0,21	0,01
		0,01	0,01	0,2	0,16	0,01	0,01	0,21	0,16
		0,01	0,01	0,21	0,01	0,01	0,01	0,23	0
		0,01	0,01	0,23	0	0,01	0,01	0,24	0
		0,01	0,01	0,24	0	0,01	0,01	0,24	0
		0,01	0,01	0,47	0,11	0,01	0,01	0,24	0
		0,01	0,01	0,55	0	0,01	0,01	0,24	0
		0,01	0	0,55	0	0,01	0,04	0,24	0
		0,01	0	0,55	0,36	0,01	0,04	0,24	0
		0,01	0	0,6	0,23	0,01	0	0,24	0
		0,01	0	0,74	0,3	0,01	0	0,24	0
		0,01	0,01	0,74	0,3	0,01	0	0,24	0
		0,01	0,03	0,74	0,11	0,01	0,01	0,24	0
		0,01	0,1	1,14	0	0,01	0,01	0,32	0,24
		0,01	0,1	1,14	0	0,01	0,01	0,46	0,01
		0,01	0	1,14	0	0,01	0,01	0,57	0
		0,01	0,06	1,88	1,03	0,01	0,01	0,74	0,3
		0,01	0,01			0,01	0,01	0,79	0
		0,01	0,01			0,01	0,01	0,92	0,47
		0,01	0			0,01	0,01	0,95	0
		0,02	0,01			0,01	0	6,23	3,2
		0,02	0,94			0,02	0		
		0,02	0,01			0,03	0		
		0,03	0,05			0,03	0,16		

		0,03	0,05			0,03	0,16		
		0,03	0,05			0,05	0,01		
		0,03	0,05			0,2	0,01		
		0,03	0,05			0,21	0,01		
		0,03	0			0,21	0,01		
		0,03	0			0,21	0		
		0,03	0			0,21	0		
		0,03	0,05			0,21	0		
		0,03	0,3			0,24	0		
		0,03	0			0,24	0		
		0,03	0,05			0,24	0		
		0,03	0			0,24	0		
		0,03	0			0,24	0,17		
		0,03	0			0,24	0,05		
		0,03	0,17			0,24	0,12		
		0,03	0,05			0,38	0		
		0,03	0,05			0,38	0		
		0,2	0,31			0,55	0,24		
		0,2	0,31			0,55	0,17		
		0,23	0,02			0,6	0		
		0,24	0			0,6	0		
		0,24	0			0,74	0		
		0,24	0			0,95	1,78		
		0,38	0,3			0,95	0		
		0,38	0,05			0,95			
		0,38	0,17			1,14			
		0,38	0,05			1,46			
		0,38	0						
		0,42	0,2						
		0,47	0,18						
		0,55	0						
		0,74	0,17						
		0,81	0						
		0,95	0						
		1,14	0						
		1,32	0,73						
		1,88	0,65						
		2,16	0,9						
		3,77	1,72						
		4,39	1,31						

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων

t test of Total cases IL-1b vs IL-6:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	Total cases IL-1b vs IL-6
Column A	IL-1b
vs	vs
Column B	IL-6
Mann Whitney test	
P value	0.0008
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	***
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	482900 , 435800
Mann-Whitney U	207000

t test of Total cases IL-1b vs IL-6:Column statistics

	IL-1b	IL-6
Number of values	679	676
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	6.230	3.200
Mean	0.09904	0.04559
Std. Deviation	0.4028	0.1941
Std. Error	0.01546	0.007465
Lower 95% CI	0.06869	0.03093
Upper 95% CI	0.1294	0.06025

t test of IL-1b vs IL6 positive:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL6 positive and negative subcategories
Column A	IL-1b pos result
vs	vs
Column B	IL-6 pos result
Mann Whitney test	
P value	0.0106
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	181652 , 164044
Mann-Whitney U	78140

t test of IL-1b vs IL6 positive:Column statistics

	IL-1b pos result	IL-6 pos result
Number of values	417	414
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	2.160	1.780
Mean	0.07259	0.03599
Std. Deviation	0.2362	0.1328
Std. Error	0.01157	0.006526
Lower 95% CI	0.04985	0.02316
Upper 95% CI	0.09533	0.04882

t test of IL-1b vs IL6 negative:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL6 positive and negative subcategories
Column C	IL-1b neg result
vs	vs
Column D	IL-6 neg result
Mann Whitney test	
P value	0.0288
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	72323 , 65227
Mann-Whitney U	30770

t test of IL-1b vs IL6 negative:Column statistics

	IL-1b neg result	IL-6 neg result
Number of values	262	262
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0100
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	6.230	3.200
Mean	0.1411	0.06076
Std. Deviation	0.5741	0.2630
Std. Error	0.03547	0.01625
Lower 95% CI	0.07131	0.02877
Upper 95% CI	0.2110	0.09276

t test of IL-1b vs IL1b positive and negative:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL6 positive and negative subcategories
Column A	IL-1b pos result
vs	vs
Column C	IL-1b neg result
Mann Whitney test	
P value	0.1566
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	138500 , 92370
Mann-Whitney U	51330

t test of IL-1b vs IL1b positive and negative:Column statistics

	IL-1b pos result	IL-1b neg result
Number of values	417	262
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0100
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	2.160	6.230
Mean	0.07259	0.1411
Std. Deviation	0.2362	0.5741
Std. Error	0.01157	0.03547
Lower 95% CI	0.04985	0.07131
Upper 95% CI	0.09533	0.2110

t test of IL-6 vs IL6 positive and negative:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL6 positive and negative subcategories
Column B	IL-6 pos result
vs	vs
Column D	IL-6 neg result
Mann Whitney test	
P value	0.2318
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,D	137432 , 91394
Mann-Whitney U	51530

t test of IL-6 vs IL6 positive and negative:Column statistics

	IL-6 pos result	IL-6 neg result
Number of values	414	262
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0000	0.0100
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	1.780	3.200
Mean	0.03599	0.06076
Std. Deviation	0.1328	0.2630
Std. Error	0.006526	0.01625
Lower 95% CI	0.02316	0.02877
Upper 95% CI	0.04882	0.09276

t test of IL-1b vs IL-6 in HD:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage
Column A	IL1B HD
vs	vs
Column B	IL6 HD
Mann Whitney test	
P value	0.8519
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	903 , 927
Mann-Whitney U	438.0

t test of IL-1b vs IL-6 in HD:Column statistics

	IL1B HD	IL6 HD
Number of values	30	30
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0050	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0300
Maximum	2.160	0.5500
Mean	0.09533	0.03933
Std. Deviation	0.4025	0.1041
Std. Error	0.07348	0.01901
Lower 95% CI	-0.05495	0.0004539
Upper 95% CI	0.2456	0.07821

t test of IL-1b vs IL-6 in H:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage
Column C	IL1B H
vs	vs
Column D	IL6 H
Mann Whitney test	
P value	0.5202
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	34798 , 36078
Mann-Whitney U	17030

t test of IL-1b vs IL-6 in H:Column statistics

	IL1B H	IL6 H
Number of values	188	188
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0100
75% Percentile	0.0100	0.0500
Maximum	4.390	1.720
Mean	0.1227	0.07128
Std. Deviation	0.4946	0.2094
Std. Error	0.03608	0.01528
Lower 95% CI	0.05155	0.04114
Upper 95% CI	0.1939	0.1014

t test of IL-1b vs IL-6 in EXPD:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage
Column E	IL1B EXPD
vs	vs
Column F	IL6 EXPD
Mann Whitney test	
P value	0.4223
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	20455 , 19448
Mann-Whitney U	9437

t test of IL-1b vs IL-6 in EXPD:Column statistics

	IL1B EXPD	IL6 EXPD
Number of values	141	141
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	1.880	1.030
Mean	0.08773	0.03872
Std. Deviation	0.2640	0.1292
Std. Error	0.02223	0.01088
Lower 95% CI	0.04378	0.01721
Upper 95% CI	0.1317	0.06023

t test of IL-1b vs IL-6 EXPG:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage
Column G	IL1B EXPG
vs	vs
Column H	IL6 EXPG
Mann Whitney test	
P value	0.0004
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	***
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column G,H	33470 , 26910
Mann-Whitney U	12030

t test of IL-1b vs IL-6 EXPG:Column statistics

	IL1B EXPG	IL6 EXPG
Number of values	175	172
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	1.460	1.780
Mean	0.07514	0.02860
Std. Deviation	0.2143	0.1503
Std. Error	0.01620	0.01146
Lower 95% CI	0.04317	0.005978
Upper 95% CI	0.1071	0.05123

t test of IL-1b vs IL-6 in E:Tabular results

	Data Set-A
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage
Column I	IL1B E
vs	vs
Column J	IL6 E
Mann Whitney test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	***
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column I,J	23527 , 18668
Mann-Whitney U	8083

t test of IL-1b vs IL-6 in E:Column statistics

	IL1B E	IL6 E
Number of values	145	145
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.0100	0.0000
75% Percentile	0.0100	0.0100
Maximum	6.230	3.200
Mean	0.1090	0.04041
Std. Deviation	0.5372	0.2704
Std. Error	0.04461	0.02245
Lower 95% CI	0.02079	-0.003969
Upper 95% CI	0.1971	0.08480

Pregnancy rate between D5 and D6

	Data Set-A
Table Analyzed	Pregnancy rate between D5 and D6
Chi-square	
Chi-square, df	0.1265, 3
P value	0.9885
P value summary	ns
One- or two-sided	NA
Statistically significant? (alpha<0.05)	No
Data analyzed	
Number of rows	4
Number of columns	2

Contingency of Implantation rate between D5 and D6

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	Implantation rate between D5 and D6		
Fisher's exact test			
P value	0.8178		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9818		
95% confidence interval	0.8421 to 1.145		
Odds ratio	0.9643		
95% confidence interval	0.7129 to 1.304		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	114	119	233
NOT-IMPLANTED	304	306	610
Total	418	425	843

Contingency of IR KL+

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR KL+		
Fisher's exact test			
P value	0.1002		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.7658		
95% confidence interval	0.5679 to 1.033		
Odds ratio	0.5853		
95% confidence interval	0.3242 to 1.056		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	37	48	85
NOT-IMPLANTED	54	41	95
Total	91	89	180

Contingency of IR kl++

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR kl++		
Fisher's exact test			
P value	1.0000		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9855		
95% confidence interval	0.7023 to 1.383		
Odds ratio	0.9710		
95% confidence interval	0.4919 to 1.917		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	22	22	44
NOT-IMPLANTED	69	67	136
Total	91	89	180

Contingency of IR KL+++

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR KL+++		
Fisher's exact test			
P value	0.8134		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.100		
95% confidence interval	0.7186 to 1.684		
Odds ratio	1.222		
95% confidence interval	0.4803 to 3.110		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	11	9	20
NOT-IMPLANTED	80	80	160
Total	91	89	180

Contingency of IR AE

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR AE		
Fisher's exact test			
P value	0.6544		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.8866		
95% confidence interval	0.5473 to 1.436		
Odds ratio	0.7922		
95% confidence interval	0.3235 to 1.940		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	10	12	22
NOT-IMPLANTED	81	77	158
Total	91	89	180

Contingency of IR EXTRA

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR EXTRA		
Fisher's exact test			
P value	0.2083		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.3889		
95% confidence interval	0.06695 to 2.259		
Odds ratio	0.2361		
95% confidence interval	0.02585 to 2.156		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	1	4	5
NOT-IMPLANTED	90	85	175
Total	91	89	180

Contingency of IR BC

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR BC		
Fisher's exact test			
P value	1.0000		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.033		
95% confidence interval	0.6872 to 1.554		
Odds ratio	1.069		
95% confidence interval	0.4591 to 2.491		
Data analyzed	D5	D6	Total
IMPLANTED	13	12	25
NOT-IMPLANTED	78	77	155
Total	91	89	180

Contingency of PR FOR B vs C

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR FOR B vs C		
Fisher's exact test			
P value	0.5855		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.074		
95% confidence interval	0.8576 to 1.344		
Odds ratio	1.187		
95% confidence interval	0.6962 to 2.023		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
B	97	63	160
C	48	37	85
Total	145	100	245

Contingency of IR for B vs C

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR for B vs C		
Fisher's exact test			
P value	0.0568		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.319		
95% confidence interval	0.9980 to 1.742		
Odds ratio	1.450		
95% confidence interval	1.004 to 2.093		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
B	129	314	443
C	53	187	240
Total	182	501	683

Contingency of PR for A vs B

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR for A vs B		
Fisher's exact test			
P value	0.8359		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9762		
95% confidence interval	0.8298 to 1.149		
Odds ratio	0.9418		
95% confidence interval	0.6269 to 1.415		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	145	100	245
B	97	63	160
Total	242	163	405

Contingency of IR for A vs B

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR for A vs B		
Fisher's exact test			
P value	0.3756		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9151		
95% confidence interval	0.7557 to 1.108		
Odds ratio	0.8842		
95% confidence interval	0.6776 to 1.154		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	182	501	683
B	129	314	443
Total	311	815	1126

Contingency of PR for A vs C

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR for A vs C		
Fisher's exact test			
P value	0.7023		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.048		
95% confidence interval	0.8464 to 1.298		
Odds ratio	1.118		
95% confidence interval	0.6787 to 1.841		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	145	100	245
C	48	37	85
Total	193	137	330

Contingency of IR for A vs C

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR for A vs C		
Fisher's exact test			
P value	0.1692		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.207		
95% confidence interval	0.9227 to 1.578		
Odds ratio	1.282		
95% confidence interval	0.9041 to 1.817		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	182	501	683
C	53	187	240
Total	235	688	923

Contingency of PR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.8610		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9864		
95% confidence interval	0.8583 to 1.134		
Odds ratio	0.9667		
95% confidence interval	0.6853 to 1.364		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	145	100	245
TOTAL	180	120	300
Total	325	220	545

Contingency of IR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.9536		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.005		
95% confidence interval	0.8501 to 1.189		
Odds ratio	1.007		
95% confidence interval	0.8015 to 1.265		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	182	501	683
TOTAL	224	621	845
Total	406	1122	1528

Contingency of PR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.9206		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.010		
95% confidence interval	0.8650 to 1.180		
Odds ratio	1.026		
95% confidence interval	0.6933 to 1.520		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
B	97	63	160
TOTAL	180	120	300
Total	277	183	460

Contingency of IR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.3245		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.098		
95% confidence interval	0.9142 to 1.320		
Odds ratio	1.139		
95% confidence interval	0.8820 to 1.471		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
B	129	314	443
TOTAL	224	621	845
Total	353	935	1288

Contingency of PR C vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	PR C vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.6173		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9412		
95% confidence interval	0.7642 to 1.159		
Odds ratio	0.8649		
95% confidence interval	0.5313 to 1.408		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
C	48	37	85
TOTAL	180	120	300
Total	228	157	385

Contingency of IR C vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	IR C vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.1799		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.8331		
95% confidence interval	0.6405 to 1.084		
Odds ratio	0.7857		
95% confidence interval	0.5586 to 1.105		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
C	53	187	240
TOTAL	224	621	845
Total	277	808	1085

Contingency of 2a PR A vs B

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a PR A vs B		
Fisher's exact test			
P value	0.1381		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.231		
95% confidence interval	0.9245 to 1.639		
Odds ratio	1.570		
95% confidence interval	0.8774 to 2.808		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	116	79	195
B	29	31	60
Total	145	110	255

Contingency of 2a IR A vs B

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a IR A vs B		
Fisher's exact test			
P value	0.7471		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.070		
95% confidence interval	0.7781 to 1.471		
Odds ratio	1.096		
95% confidence interval	0.7144 to 1.680		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	146	396	542
B	35	104	139
Total	181	500	681

Contingency of 2a PR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a PR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.9255		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9915		
95% confidence interval	0.8549 to 1.150		
Odds ratio	0.9789		
95% confidence interval	0.6778 to 1.414		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	116	79	195
TOTAL	180	120	300
Total	296	199	495

Contingency of 2a IR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a IR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.9010		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.016		
95% confidence interval	0.8501 to 1.215		
Odds ratio	1.022		
95% confidence interval	0.8011 to 1.304		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	146	396	542
TOTAL	224	621	845
Total	370	1017	1387

Contingency of 2a PR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a PR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.1148		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.8056		
95% confidence interval	0.6103 to 1.063		
Odds ratio	0.6237		
95% confidence interval	0.3574 to 1.088		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
B	29	31	60
TOTAL	180	120	300
Total	209	151	360

Contingency of 2a IR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2a IR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.8354		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9499		
95% confidence interval	0.6982 to 1.292		
Odds ratio	0.9330		
95% confidence interval	0.6177 to 1.409		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
B	35	104	139
TOTAL	224	621	845
Total	259	725	984

Contingency of 2b PR A vs b

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2b PR A vs b		
Fisher's exact test			
P value	0.6574		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.071		
95% confidence interval	0.8368 to 1.370		
Odds ratio	1.177		
95% confidence interval	0.6614 to 2.096		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
A	109	72	181
B	36	28	64
Total	145	100	245

Contingency of 2b IR A vs B

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2b IR A vs B		
Fisher's exact test			
P value	0.0944		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.307		
95% confidence interval	0.9586 to 1.783		
Odds ratio	1.430		
95% confidence interval	0.9542 to 2.143		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	143	359	502
B	39	140	179
Total	182	499	681

Contingency of 2b PR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2b PR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	1.0000		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.004		
95% confidence interval	0.8637 to 1.166		
Odds ratio	1.009		
95% confidence interval	0.6924 to 1.471		
Data analyzed	PREGNANT	NOT PREGNANT	Total
A	109	72	181
TOTAL	180	120	300
Total	289	192	481

Contingency of 2b IR A vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2b IR A vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.4478		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	1.075		
95% confidence interval	0.8990 to 1.284		
Odds ratio	1.104		
95% confidence interval	0.8627 to 1.413		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
A	143	359	502
TOTAL	224	621	845
Total	367	980	1347

Contingency of 2bPR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2bPR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.5785		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.9375		
95% confidence interval	0.7411 to 1.186		
Odds ratio	0.8571		
95% confidence interval	0.4968 to 1.479		
Data analyzed	PREGNANT	NOT-PREGNANT	Total
B	36	28	64
TOTAL	180	120	300
Total	216	148	364

Contingency of 2b IR B vs TOTAL

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	2b IR B vs TOTAL		
Fisher's exact test			
P value	0.2207		
P value summary	ns		
One- or two-sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Relative Risk	0.8219		
95% confidence interval	0.6092 to 1.109		
Odds ratio	0.7723		
95% confidence interval	0.5247 to 1.137		
Data analyzed	IMPLANTED	NOT-IMPLANTED	Total
B	39	140	179
TOTAL	224	621	845
Total	263	761	1024

1way ANOVA of IL-6 according to developmental stage:Tabular results

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage				
One-way analysis of variance					
P value	0.2960				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	5				
F	1.232				
R squared	0.007289				
Bartlett's test for equal variances	112.1				
Bartlett's statistic (corrected)	< 0.0001				
P value	***				
P value summary	Yes				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)		df	MS		
ANOVA Table	SS	4	0.04634		
Treatment (between columns)	0.1854	671	0.03762		
Residual (within columns)	25.25	675			
Total	25.43				
Tukey's Multiple Comparison Test		q	Significant? P < 0.05?	Sum mary	95% CI of diff
IL6 HD vs IL6 H	Mean Diff.	1.18	No	ns	-0.1373 to 0.07338
IL6 HD vs IL6 EXPD	-0.03194	5	No	ns	-0.1071 to 0.1083
IL6 HD vs IL6 EXPG	0.0006099	0.02	No	ns	-0.09526 to 0.1167
IL6 HD vs IL6 E	0.01073	212	No	ns	-0.1085 to 0.1064
IL6 H vs IL6 EXPD	-0.001080	0.39	No	ns	-0.02713 to 0.09223
IL6 H vs IL6 EXPG	0.03255	53	No	ns	-0.01385 to 0.09920
IL6 H vs IL6 E	0.04267	0.03	No	ns	-0.02834 to 0.09007
IL6 EXPD vs IL6 EXPG	0.03086	927	No	ns	-0.05074 to 0.07098
IL6 EXPD vs IL6 E	0.01012	2.13	No	ns	-0.06505 to 0.06167
IL6 EXPG vs IL6 E	-0.001690	0	No	ns	-0.07220 to 0.04859
	-0.01181	2.94	No	ns	
		9			
		2.03			
		6			
		0.64			
		94			
		0.10			
		42			
		0.76			
		37			

1way ANOVA of IL-6 according to developmental stage:Column statistics

	IL6 HD	IL6 H	IL6 EXPD	IL6 EXPG	IL6 E
Number of values	30	188	141	172	145
Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Median	0.0	0.0100	0.0	0.0	0.0
75% Percentile	0.0300	0.0500	0.0100	0.0100	0.0100
Maximum	0.5500	1.720	1.030	1.780	3.200
Mean	0.03933	0.07128	0.03872	0.02860	0.04041
Std. Deviation	0.1041	0.2094	0.1292	0.1503	0.2704
Std. Error	0.01901	0.01528	0.01088	0.01146	0.02245
Lower 95% CI	0.0004539	0.04114	0.01721	0.005978	-0.003969
Upper 95% CI	0.07821	0.1014	0.06023	0.05123	0.08480

1way ANOVA of IL-1b according to developmental stage:Tabular results

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	IL-1b vs IL-6 according to developmental stage				
One-way analysis of variance					
P value	0.8333				
P value summary	ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	5				
F	0.3654				
R squared	0.002164				
Bartlett's test for equal variances	179.8				
Bartlett's statistic (corrected)	< 0.0001				
P value	***				
P value summary	Yes				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)		df	MS		
		4	0.05951		
		674	0.1628		
		678			
ANOVA Table		q	Significant?	Sum	95% CI of

Treatment (between columns)	Mean Diff.	0.4	P < 0.05?	mary	diff
Residual (within columns)	-0.02738	881	No	ns	-0.2465 to 0.1917
Total	0.007603	0.1	No	ns	-0.2165 to 0.2317
	0.02019	325	No	ns	-0.2000 to 0.2404
	-0.01363	0.3	No	ns	-0.2372 to 0.2099
	0.03498	581	No	ns	-0.08917 to 0.1591
Tukey's Multiple Comparison Test	0.04757	0.2	No	ns	-0.06949 to 0.1646
IL1B HD vs IL1B H	0.01375	382	No	ns	-0.1094 to 0.1369
IL1B HD vs IL1B EXPD	0.01259	1.1	No	ns	-0.1135 to 0.1387
IL1B HD vs IL1B EXPG	-0.02124	00	No	ns	-0.1530 to 0.1106
IL1B HD vs IL1B E	-0.03382	1.5	No	ns	-0.1590 to 0.09132
IL1B H vs IL1B EXPD		87			
IL1B H vs IL1B EXPG		0.4			
IL1B H vs IL1B E		359			
IL1B EXPD vs IL1B EXPG		0.3			
IL1B EXPD vs IL1B E		898			
IL1B EXPG vs IL1B E		0.6			
		292			
		1.0			
		56			

1way ANOVA of IL-1b according to developmental stage:Column statistics

	IL1B HD	IL1B H	IL1B EXPD	IL1B EXPG	IL1B E
Number of values	30	188	141	175	145
Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Median	0.0050	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100
75% Percentile	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100
Maximum	2.160	4.390	1.880	1.460	6.230
Mean	0.09533	0.1227	0.08773	0.07514	0.1090
Std. Deviation	0.4025	0.4946	0.2640	0.2143	0.5372
Std. Error	0.07348	0.03608	0.02223	0.01620	0.04461
Lower 95% CI	-0.05495	0.05155	0.04378	0.04317	0.02079
Upper 95% CI	0.2456	0.1939	0.1317	0.1071	0.1971