



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



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

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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ  
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΚΑΙ ΛΙΞΙΣΔΥΣΗ ΤΟΥ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ»**

**ΕΛΕΝΗ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ  
Σεπτέμβριος 2012**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Α.Τσέζου, Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής  
Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή  
Ι.Ε.Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Γ.Σ.Ανυφαντής, Κλινικός Εμβρυολόγος

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

A.1 Τροφοβλάστη.....σελ.	7
A.2. Εμβρυική Εμφύτευση.....σελ.	8
A.3 Μοριακός Μηχανισμός Τροφοβλαστικής Διείσδυσης.....σελ.	14
A.4 Λιποκίνες.....σελ.	15
A.5 Αντιγονεκτίνη.....σελ.	15
A.5.1 Δομή.....σελ.	16
A.5.2 Λειτουργία.....σελ.	17
A.5.3 Υποδοχείς.....σελ.	18
A.5.4 Αντιγονεκτίνη και πλακούντας.....σελ.	20
A.5.5 Αντιγονεκτίνη και εμβρυική ανάπτυξη.....σελ.	21
A.6 Μεταλλοπρωτεϊνάσες.....σελ.	22
A.6.1 Αναστολείς Μεταλλοπρωτεϊνών.....σελ.	24
A.7 Ζελατινάσες.....σελ.	24

<b>ΣΚΟΠΟΣ.....σελ.</b>	<b>25</b>
------------------------	-----------

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

B.1.1 Συλλογή δειγμάτων.....σελ.26	σελ.26
B.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων.....σελ.26	σελ.26
B.1.3 Ανακαλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων.....σελ.28	σελ.28
B.1.4 Υπολογισμός αριθμού των κυττάρων από την ανακαλλιέργεια.....σελ.30	σελ.30
B.1.5 Κατάψυξη τροφοβλαστικών κυττάρων.....σελ.30	σελ.30
B.1.6 Απόψυξη τροφοβλαστικών κυττάρων.....σελ.30	σελ.30
B.1.7 Επίδραση σε τροφοβλαστικά κύτταρα με αντιπνεκτίνη.....σελ.31	σελ.31
B.1.8 Απομόνωση πρωτεΐνης από τροφοβλαστικά κύτταρα.....σελ.31	σελ.31
B.1.9 Απομόνωση RNA από τροφοβλαστικά κύτταρα.....σελ.32	σελ.32
B.1.10 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....σελ.34	σελ.34
B.1.11 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων MMP2, MMP9 και GAPDH με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR).....σελ.36	σελ.36
B.1.12 Στατιστική ανάλυση.....σελ.44	σελ.44

### **B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

B.2.1 Επίδραση της αντιπνεκτίνης στη διεύθυνση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο μητρικό ιστό.....σελ.45	σελ.45
B.2.1α Έκφραση της MMP-2 μετά από επίδραση με αντιπνεκτίνη.....σελ.45	σελ.45
B.2.1β Έκφραση της MMP-9 μετά από επίδραση με αντιπνεκτίνη.....σελ.46	σελ.46

### **B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.47**

### **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.50**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Βιολογία της Αναπαραγωγής», του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το πειραματικό κομμάτι της μελέτης διεξήχθη στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την επίβλεψη της Αν.Καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής κας Τσέζου Ασπασίας.

Ευχαριστώ την κα Τσέζου Ασπασία που με εμπιστεύτηκε για την ανάθεση αυτής της εργασίας, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ευχαριστώ τον κύριο Μεσσήνη Ιωάννη, υπεύθυνο καθηγητή του μεταπτυχιακού προγράμματος που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω βιβλιογραφική και πειραματική εργασία. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γκαρά Αντώνιο, Λέκτορα Γυναικολογίας και Μαιευτικής της Γυναικολογικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Λ., για τα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που μου έδωσε για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη διδακτορική φοιτήτρια Παπαθανασίου Ιωάννα και στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Παλιανοπούλου Μαρία, Δημουλού Γεωργία του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Βιολογίας και στη διδακτορική φοιτήτρια Κατσίανη Ελένη του εργαστηρίου Μητέρας-Παιδιού. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου που με στήριξαν και με υποστηρίζουν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιπονεκτίνη είναι μία λιποκίνη που αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη ενώ επίσης έχει αντιφλεγμονώδεις, αντιαθηρογενετικές και αντιμιτωτικές δράσεις. Η έκφραση των ειδικών υποδοχέων της από τον πλακούντα και το ενδομήτριο προτείνουν το ρόλο της στην δημιουργία του πλακούντα. Γνωρίζοντας ότι η διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι αυτή που καθορίζει τη γένεση του πλακούντα, μελετήσαμε τη δράση της αντιπονεκτίνης στις ικανότητες διείσδυσης ανθρώπινων κυττάρων τροφοβλαστικού ιστού. Παρατηρήσαμε ότι η αντιπονεκτίνη ενισχύει την διείσδυση των κυττάρων αυτών με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτή η δράση της αντιπονεκτίνης ρυθμίζεται μέσω της αύξησης των επιπέδων έκφρασης δύο μεταλλοπρωτεϊνών, των MMP-2 και MMP-9. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η αντιπονεκτίνη ενισχύει τη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο μητρικό ιστό, αυξάνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9 και προτείνει ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της δημιουργίας του πλακούντα.

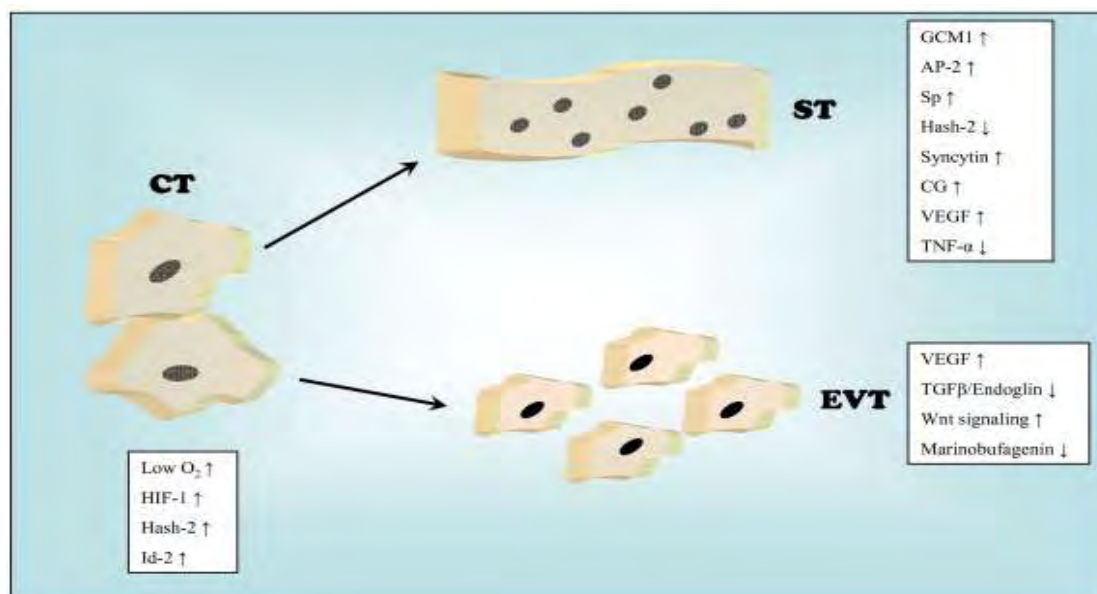
## A. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A.1. Τροφοβλάστη

Κατά τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, τα τροφοβλαστικά κύτταρα κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην εμβρυική εμφύτευση καθώς και στην ανάπτυξη του πλακούντα. Αναφερόμενοι στον όρο της τροφοβλάστης χαρακτηρίζουμε τα κύτταρα αυτά που προκύπτουν από τη βλαστοκύστη και τα οποία δεν θα αποτελέσουν μέρος του εμβρύου, αλλά είναι απαραίτητα για τη διατροφή του. Η ονομασία της έχει εισαχθεί από τον A.A.W. Hubrecht στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα (A.A.W. Hubrecht 1899).

Η έναρξη της δημιουργίας της βλαστοκύστης χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μιας εσωτερικής κοιλότητας στο έμβρυο περιβαλλόμενης από μια μάζα κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα τη εμφάνιση δύο διαφορετικών τύπων κυττάρων : της εξωτερικής κυτταρικής μάζας, η οποία καλείται και ως τροφοεκτόδερμα (TE), και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM). Το TE δίνει γένεση στην τροφοβλάστη και στις εξω-εμβρυονικές δομές όπως ο πλακούντας, ενώ η ICM στο έμβρυο (Kodaman and Taylor 2004; Lunghi, Ferretti et al. 2007). Πολλά γονίδια κατέχουν σημαντικό ρόλο στον παραπάνω διαχωρισμό της μοίρας των κυττάρων, όπως τα Oct4, Sox2, Nanog, Cdx2 και Eomespdermin (Johnson and McConnell 2004).

Τα κύτταρα της τροφοβλάστης (CT), διαφοροποιούνται σύμφωνα με δύο διαφορετικά μονοπάτια. Κατά το εξωλαχνικό (extravillous) μονοπάτι, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται σε διεισδυτικά κύτταρα και εισχωρούν στη μήτρα (extravillous trophoblast cells, EVT). Κατά το λαχνικό (villous) μονοπάτι, μονοπύρρηνα τροφοβλαστικά κύτταρα συνενώνονται για να δημιουργήσουν μια δομή πολυπύρρηνη, το συγκύτιο, και η οποία καλείται συγκυτιοτροφοβλάστη (ST) (Carson, Bagchi et al. 2000; Lunghi, Ferretti et al. 2007). Η διαφοροποίηση της CT σε κύτταρα ST και EVT υπόκειται κάτω από ακριβή έλεγχο διαφορετικών παραγόντων όπως μεταγραφικών παραγόντων, συγκεκριμένων γονιδίων, ορμονών, αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και επιπέδων O<sub>2</sub> (Εικόνα 1).



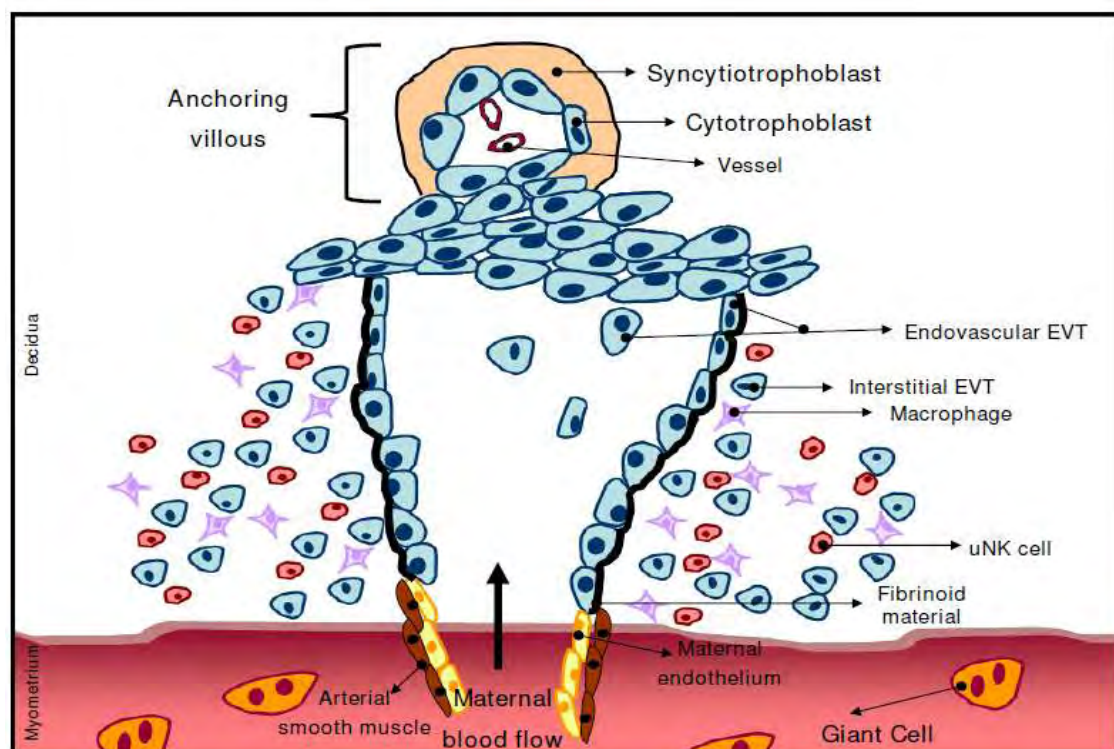
**Εικόνα 1,** Σχηματική αναπαράσταση της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων (CT) σε συγκυτιοτροφοβλάστη ή εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα καθώς και μερικούς από τους σημαντικούς παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτήν. Οι παράγοντες στο κουτί αριστερά ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των CT, ενώ αυτοί στα κουτιά δεξιά προωθούν ή καταστέλλουν τη δημιουργία των ST και EVT (Lunghi, Ferretti et al. 2007).

## A.2. Εμβρυική Εμφύτευση

Κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης, το συγκύτιο ST αποτελεί την εξωτερική και μη-πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα, η οποία αναπτύσσεται λόγω της σταθερής προσθήκης νέων τροφοβλαστικών κυττάρων CT σε αυτήν. Περίπου τη 14η ημέρα της εμφύτευσης, τα CT διασπούν τη στιβάδα του συγκυτίου ST και δίνουν γένεση στα EVTs. Τα τελευταία διεισδύουν στο στρώμα της μήτρας σχηματίζοντας στήλες τροφοβλαστικών κυττάρων. Από τις άκρες των στηλών αυτών, ένας υποπληθυσμός των EVTs κινείται πλευρικά προς σχηματισμό του τροφοβλαστικού κελύφους (trophoblastic shell) και στη συνέχεια διαμήκως διεισδύουν βαθύτερα στο φθαρτό και στο μυομήτριο, όπου προκαλούν σημαντικές αλλαγές (Loregger, Pollheimer et al. 2003). Ο υποπληθυσμός αυτός αναφέρεται ως διάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα (interstitial CTs, iCTs), περικλύει και καταστρέφει τα λεία μυϊκά κύτταρα των μητρικών σπειροειδών αρτηριών τα οποία αντικαθίστανται από άμορφο ινώδες υλικό. Στη συνέχεια αποκτούν ενδοθηλιακό φαινότυπο, eCTBs (endovascular CTBs), διεισδύουν στον αυλό των μητρικών αρτηριών και



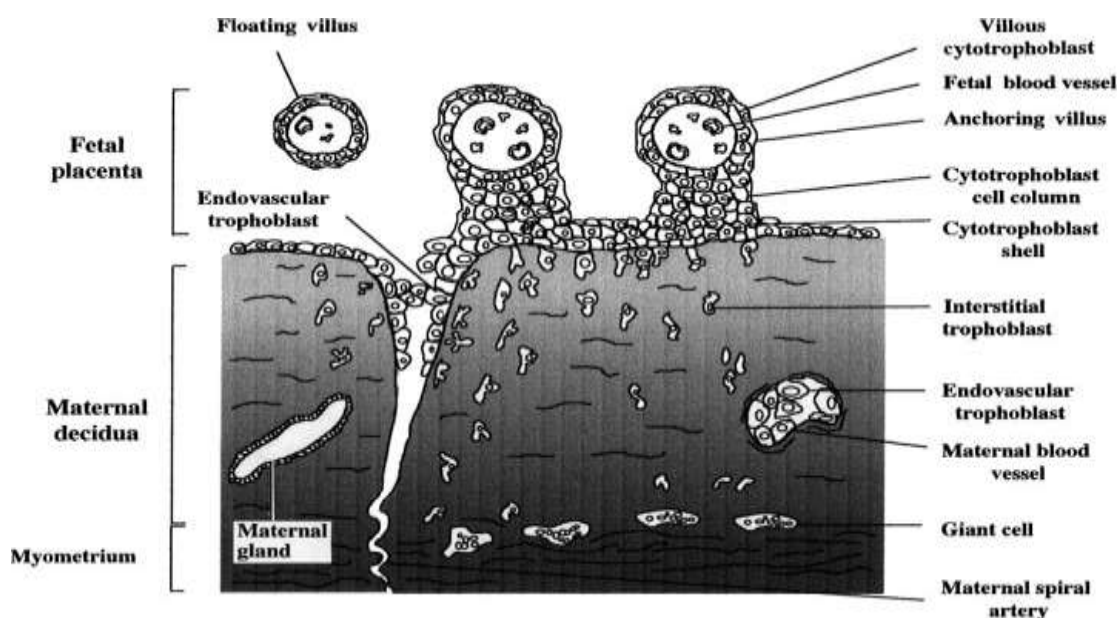
αντικαθιστούν τα μητρικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Zhou, Fisher et al. 1997) (Εικόνα 2). Τα διεισδυτικά EVT κύτταρα ρυθμίζουν την έκφραση πρωτεϊνών που ευνοούν τη διάνοιξη του μητρικού τοίχους, όπως είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι ιντεγκρίνες  $\alpha 5 \beta 1$  και  $\alpha 1 \beta 1$ , η VE-καδερίνη και η HLA-G. Αντιθέτως καταστέλλουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως της  $\alpha 6 \beta 4$  ιντεγκρίνης και της E-καδερίνης αλλά και ρυθμιστικών παραγόντων που αναστέλλουν τη διείσδυση των κυττάρων (Lyll, Simpson et al. 2001).



Εικόνα 2, Η αναδιαμόρφωση μητρικής σπειροειδούς αρτηρίας μέσω της δράσης των διάμεσων και των ενδοθηλιακών τροφοβλαστικών κυττάρων (Lunghi, Ferretti et al. 2007).

Η επιτυχημένη εμφύτευση εξαρτάται από τον συγχρονισμό μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων του εμβρύου και ενός συνόλου μοριακών και κυτταρικών γεγονότων που αναπτύσσονται κατά την κύηση μέσω παρακρινικής και αυτοκρινικής ρύθμισης (Krussel, Bielfeld et al. 2003). Η εμφύτευση αποτελεί μια δυναμική διαδικασία κατά την οποία η βλαστοκύστη διεισδύει στο επιθήλιο της μήτρας, διαπερνά τη βασική στοιβάδα και ενσωματώνεται τελικά στο στρώμα της μήτρας. Περίπου 8-10 μέρες μετά την ωοθυλάκιωρηξία το ενδομήτριο είναι πλέον «υποδεκτικό» και επιτρέπει στη βλαστοκύστη να προσκολληθεί στο μητρικό επιθήλιο. Η χρονική αυτή περίοδος καλείται «παράθυρο εμφύτευσης» και εξαρτάται

από στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Η φάση αυτή της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία της συγκυτιοτροφοβλάστης η οποία ξεκινά να εισχωρεί στο μητρικό ιστό. Παρουσιάζονται στήλες, αποτελούμενες από λαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας (Εικόνα 3), αυξάνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των στρωματικών κυττάρων της μήτρας και εμφανίζονται πινοπόδια στο μητρικό επιθήλιο (Lunghi, Ferretti et al. 2007; Banerjee and Fazleabas 2010). Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές είναι αποτέλεσμα της έκφρασης ενός αριθμού βιοχημικών και μοριακών δεικτών όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι ιντεγκρίνες, οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες (van Mourik et al., 2009).



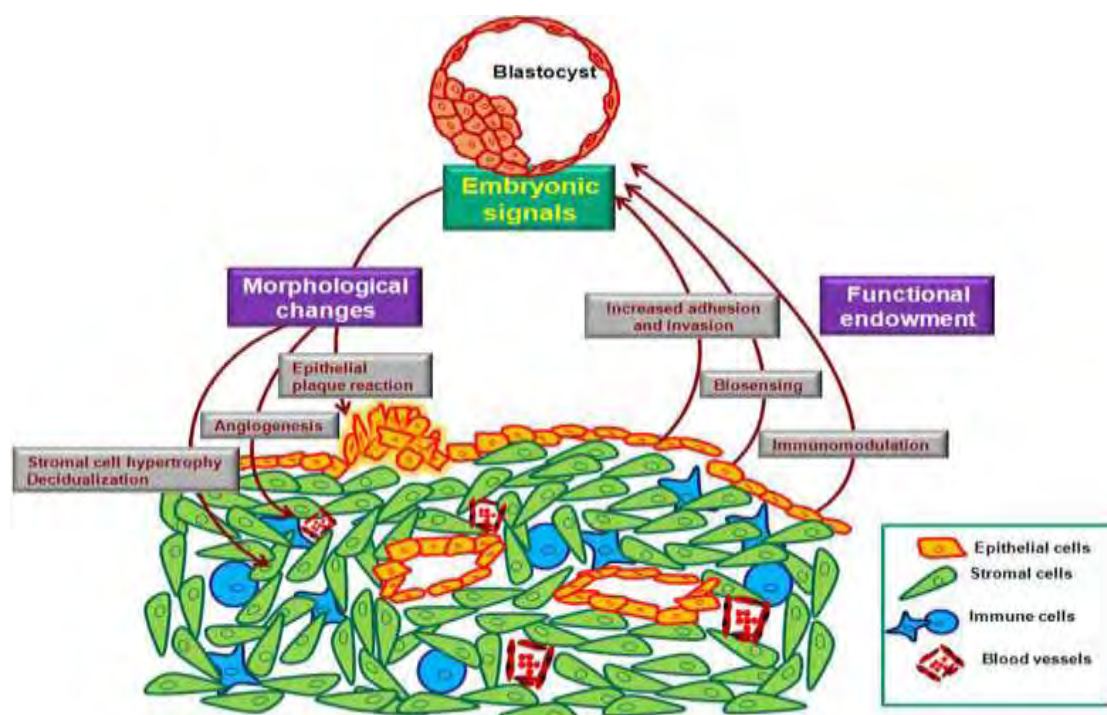
Εικόνα 3 , Η ανθρώπινη πλακουντιακή εμφύτευση (Burrows, King et al. 1996).

Η διαδικασία της εμφύτευσης ξεκινά έξι με επτά ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και περιλαμβάνει τρία στάδια (Norwitz, Schust et al. 2001). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η εναπόθεση της βλαστοκύστης στο τοίχωμα της μήτρας και η οποία δηλώνει την αρχική όμως ακόμη ασταθή προσκόλλησή της σε αυτό. (Lopata, Bentin-Ley et al. 2002). Στο επόμενο στάδιο σταθεροποιείται η προσκόλληση μέσω αυξημένης φυσικής επαφής της βλαστοκύστης με το μητρικό επιθήλιο. Σημαντική σημασία στο στάδιο αυτό κατέχει ο προσανατολισμός του εμβρυικού πόλου της βλαστοκύστης προς το ενδομητρικό επιθήλιο. Σε περίπτωση που δεν

πραγματοποιηθεί ο συγκεκριμένος προσανατολισμός, οι συνέπειες είναι η αυτόματη αποβολή του εμβρύου ή οι διαταραχές στην ανάπτυξή του. Έχουν προταθεί πολλές υποθέσεις ως προς τον υπεύθυνο μηχανισμό απόκτησης του προσανατολισμού αυτού, από τις οποίες σημαντική είναι αυτή που αφορά την συμμετοχή των χημειοκινών του ενδομητρίου (Dominguez, Yanez-Mo et al. 2005). Η διαδικασία της διείσδυσης, η οποία και αποτελεί το τελευταίο στάδιο της εμφύτευσης, ξεκινά με τη διάνοιξη του μητρικού επιθηλίου από τα EVTs και ακολουθείται από τη διήθηση των μονοπύρηνων κυττοτροφοβλαστικών κυττάρων στο ενδομήτριο. Η εμφύτευση και η τροφοβλαστική διείσδυση είναι χώρο – χρονικά εξαρτώμενες διαδικασίες και ρυθμίζονται από την εμβρυομητρική επικοινωνία. Αν κάποια από τις διαδικασίες αυτές δεν εξελιχθεί σωστά θα οδηγήσει σε τερματισμό της κύησης ή σε επιπλοκές αυτής. (Modi, Godbole et al. 2012).

Για να πραγματοποιηθεί η εμφύτευση, το ενδομήτριο πρέπει να μετατραπεί σε φθαρτό, διαδικασία κατά την οποία υφίστανται αλλαγές τα ενδομητρικά κύτταρα του στρώματος, οι μητρικοί αδένες και τα αγγεία καθώς και ο αριθμός των μητρικών ανοσοποιητικών κυττάρων. Στους ανθρώπους, σε αντίθεση με τα άλλα είδη (Salamonsen, Dimitriadis et al. 2003), η φθαρτοποίηση είναι ανεξάρτητη από τη παρουσία της βλαστοκύστης στην κοιλότητα της μήτρας και ξεκινά στην όψιμη εκκριτική φάση του έμμηνου κύκλου. Αποτελεί αποτέλεσμα της δράσης της προγεστερόνης όπως επίσης και ρυθμιστικών παραγόντων που ενισχύουν τα επίπεδα του κυκλικού AMP (Brosens, Hayashi et al. 1999; Brosens, Campo et al. 2002). Με τη δημιουργία του φθαρτού ρυθμίζεται η συνεχιζόμενη τροφοβλαστική διείσδυση και η δημιουργία του πλακούντα μεταβάλλοντας την έκφραση ρυθμιστικών παραγόντων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι κυτοκίνες, οι ιντεγκρίνες και μεγάλος αριθμός μορίων ιστοσυμβατότητας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ίδια η τροφοβλαστική δρα παρακρινικά στα στρωματικά κύτταρα του φθαρτού και μεταβάλλει τη γονιδιακή τους έκφραση (Hess AP et al 2006). Τα κύτταρά της γίνονται κυκλικά και αποκτούν δομικές ομοιότητες με τους μυικούς ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα (Oliver, Montes et al. 1999). Επίσης εκκρίνουν παράγοντες όπως προλακτίνη, ρελαξίνη, ρενίνη, IGFBP – 1 (insulin-like growth factor binding protein – 1) (Salamonsen et al. 2003, Brosens et al. 2002) αλλά και ειδικές πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας όπως η λαμνίνη και η φιμπρονεκτίνη (King A 2000). In vitro μελέτες έδειξαν ότι το φαινόμενο αυτό περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση των υποδοχέων των

στεροειδών ορμονών και στον στεροειδικό μεταβολισμό, στην αναδιοργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας και του κυτοσκελετού, στη μεταβολή της έκφρασης ενζύμων, αναπτυξιακών παραγόντων και κυτοκινών και στην ενίσχυση ρυθμιστών της απόπτωσης και μεταγραφικών παραγόντων (Brar AK et al.2001). Τα πλέον φθαρτοποιημένα κύτταρα όχι μόνο αναγνωρίζουν τα σήματα που προέρχονται από το έμβρυο και απαντούν με τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος προ-εμφύτευσης, αλλά μπορούν να αναγνωρίσουν και την ποιότητα των σημάτων αυτών ώστε να τερματίσουν το «παράθυρο της ενδομητρικής υποδεκτικότητας» στην περίπτωση που το έμβρυο δεν είναι φυσιολογικό. Στην εικόνα που ακολουθεί συνοψίζονται οι μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα του ενδομητρίου και οι ακόλουθες λειτουργικές διαφοροποιήσεις που συντελούν σε ανοσοτροποποιητικές αλλαγές και προσδίδουν στο ενδομήτριο ικανότητες προσκόλλησης και διείσδυσης (Modi, Godbole et al. 2012) (Εικόνα 4 ).



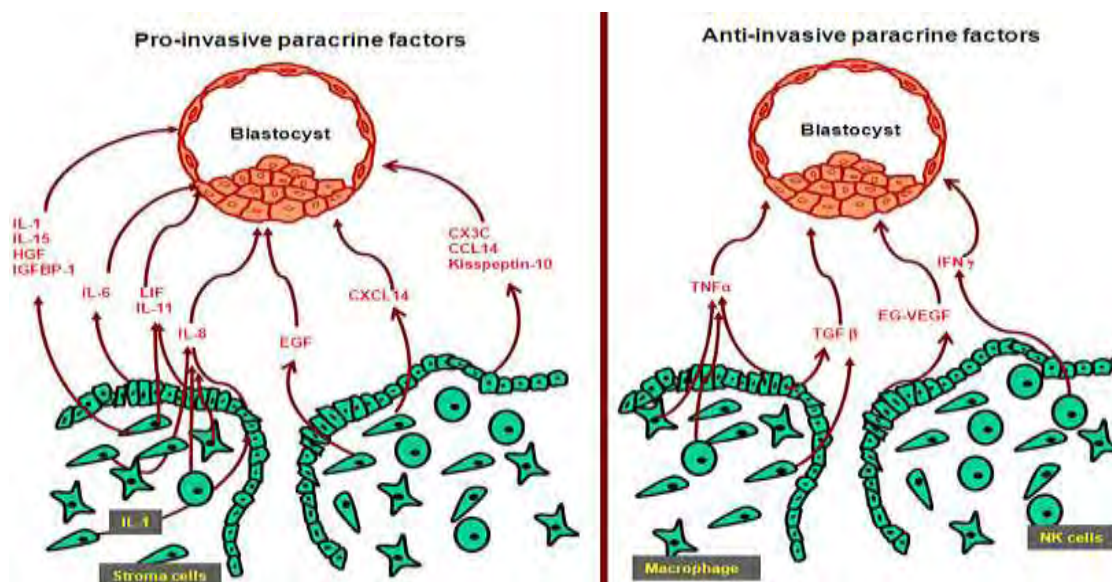
Εικόνα 4 , Εμβρυικά σήματα ενισχύουν μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές των κυττάρων του ενδομητρίου (Modi, Godbole et al. 2012).

Πολλοί τύποι κυττάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, τα στρωματικά κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες και τα μακροφάγα του φθαρτού είναι παρόντα στο υποδεκτικό ενδομήτριο και παράγουν μια ποικιλία παραγόντων οι οποίοι δρουν παρακρινικά και ρυθμίζουν την διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Σε αυτούς ανήκουν κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι παράγονται από το φθαρτό και είτε προωθούν είτε αναστέλλουν την τροφοβλαστική διείσδυση. Οι



δράσεις τους αυτές πραγματοποιούνται κυρίως μεταβάλλοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες  $\alpha 5$ ,  $\alpha 1$  και  $\beta 1$  και αυξάνοντας την ενζυματική δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών ή των αναστολέων τους. Οι IL-6, IL-11, LIF, IL-1, IL-8, IL-15, EGF, HGF, IGFBP-1 κ.α. αποτελούν προ-εμφυτευτικούς παρακρινικούς παράγοντες ενώ οι TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  κ.α. αποτελούν παρακρινικούς παράγοντες που δρουν αρνητικά στην τροφοβλαστική διείσδυση στο ενδρομήτριο (Godbole, Suman et al. 2011)(Εικόνα 5) .

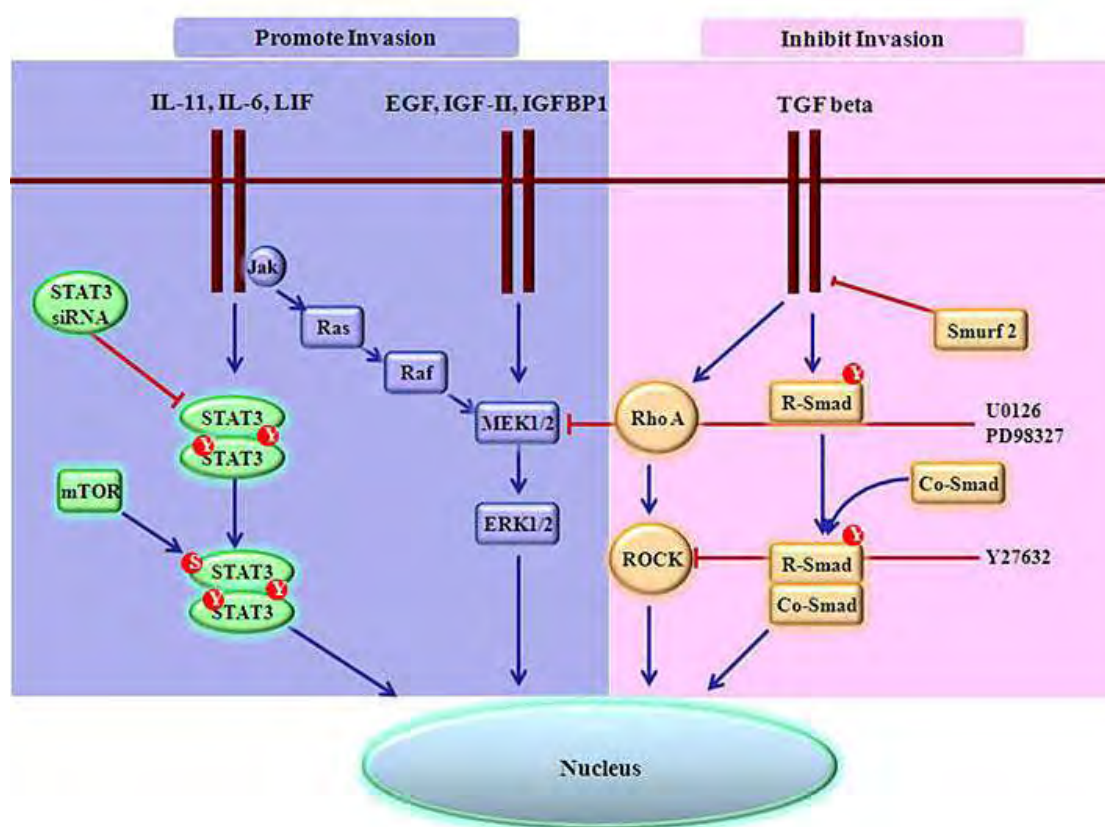
Οι IL-6 , IL-11 και LIF αποτελούν τις κυριότερες κυτοκίνες που παράγονται από τα ενδομητρικά κύτταρα και κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εμβρυικής εμφύτευσης μεταβάλλοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες  $\alpha 5$ ,  $\alpha 1$  και  $\beta 1$ . Επίσης, έχει βρεθεί ότι η IL-6 αυξάνει την ενζυματική δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και MMP-9 (Jovanovic and Vicovac 2009), (Meisser, Chardonens et al. 1999), δράση όμοια με αυτήν της IL-1 η οποία εκφράζεται από τα στρωματικά κύτταρα της μήτρας και όχι από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου (Bischof and Campana 2000). Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) εκφράζεται στο ενδομήτριο και ενισχύει την διείσδυση της τροφοβλάστης αυξάνοντας την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-9 και του αναστολέα TIMP-1 (Qiu, Yang et al. 2004).



Εικόνα 5, Παρακρινικοί παράγοντες στη ρύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης (Modi, Godbole et al. 2012)

### A.3 Μοριακός μηχανισμός της τροφοβλαστικής διείσδυσης

Στα τροφοβλαστικά κύτταρα, η ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης μέσω παρακρινικών ρυθμιστών μεταβάλλει την έκφραση των δραστικών μορίων. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης καθορίζει εάν θα υπάρξει προώθηση ή καταστολή της διείσδυσης. Αυτοί οι παρακρινικοί παράγοντες προέρχονται από τα κύτταρα του φθαρτού και ενεργοποιούν κυρίως τα Jak-STAT, MAPK και TGF-beta ρυθμιζόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια. Το Jak-STAT μονοπάτι ενεργοποιείται με τη σύνδεση κυτοκινών της ομάδας της IL-6 ενώ αναστολή της έκφρασης της STAT3 αναστέλλει την διείσδυση μέσω των κυτοκινών IL-11 και LIF. Ομοίως το ERK 1/2 ανεξαρτήτως του MAPK μονοπατιού ενεργοποιείται κυρίως από τους EGF, IGF-II, IGFBP. Σε αντίθεση το TGF-beta σηματοδοτικό μονοπάτι αναστέλλει τη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των Smad και Rho σηματοδοτικών μηχανισμών (Modi, Godbole et al. 2012)(Εικόνα 6).



Εικόνα 6, Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από παρακρινικούς παράγοντες στα τροφοβλαστικά κύτταρα (Modi, Godbole et al. 2012).

#### **A.4 Λιποκίνες**

Η ανθρώπινη εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από ενδοκρινικές και μεταβολικές μητρικές προσαρμογές περιλαμβανομένων της αύξησης του σωματικού βάρους, του λιπώδους ιστού και της αντίστασης στην ινσουλίνη (Zavalza-Gomez, Anaya-Prado et al. 2008; de Castro, Sevillano et al. 2011). Οι προσαρμογές αυτές αποτελούν φυσιολογικές αλλαγές απαραίτητες για την προσφορά ενέργειας προς το έμβρυο και την προετοιμασία του μητρικού οργανισμού για τον τοκετό και το θηλασμό. Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις προσαρμογές κατέχουν ο λιπώδης ιστός και ο πλακούντας. Πολλά δεδομένα έχουν συσσωρευτεί τα τελευταία χρόνια, τα οποία υποδηλώνουν ότι ο λιπώδης ιστός εκτός από ενεργειακή αποθήκη παρουσιάζει επιπλέον ενδοκρινική λειτουργία. Από τον ιστό αυτό εκκρίνονται μια κατηγορία κυτοκινών, γνωστές ως λιποκίνες με παρακρινικές και αυτοκρινικές δράσεις (Coppack 2001; Conde, Scotece et al. 2011) ενώ ο πλακούντας παράγει διάφορες ορμόνες όπως το πλακουντιακό λακτογόνο (hPL) και στεροειδείς ορμόνες. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι τα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν τις ίδιες λιποκίνες με αυτές του λιπώδους ιστού προτείνοντας τη δράση τους στην εμβρυομητρική επαφή από τη στιγμή της εμφύτευσης μέχρι και του τρίτου τριμήνου (Masuzaki, Ogawa et al. 1997; Senaris, Garcia-Caballero et al. 1997; Yura, Sagawa et al. 2003; Mitchell, Armstrong et al. 2005).

Η ανακάλυψη των τελευταίων ετών ότι ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει τις λιποκίνες λεπτίνη και ρεσιστίνη όπως και υποδοχείς λεπτίνης και αντιπονεκτίνης οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι λιποκίνες αποτελούν ρυθμιστές της λειτουργίας της τροφοβλάστης κατά την εμβρυική εμφύτευση (McDonald and Wolfe 2011). Αποτελούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες δουν πρακρινικά ή αυτοκρινικά στους τοπικούς ιστούς. Επηρεάζουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στην εμβρυική και μητρική επιφάνεια, ρυθμίζουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ της βλαστοκύστης με την μητρική επιφάνεια και προωθούν τη διείσδυση και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης (D'Ippolito, Tersigni et al. 2012).

#### **A.5 Αντιπονεκτίνη**

Η αντιπονεκτίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη αφθονή στο ανθρώπινο πλάσμα (5 – 30 mg/ml) κατέχοντας το 0,01% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος και

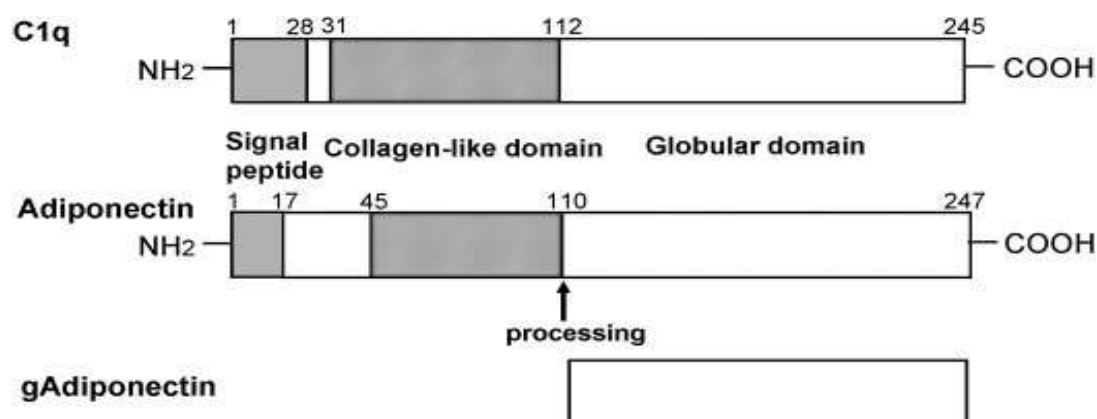
εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό (Zavalza-Gomez, Anaya-Prado et al. 2008). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι εκφράζεται και σε άλλους ιστούς όπως τα κόκκαλα, τους μαστικούς και σιελογόνους αδένες όμως σε ελάχιστες ποσότητες (Berner, Lyngstadaas et al. 2004; Martin, Woo et al. 2006). Χαρακτηρίζεται από ημερήσια και παλμική έκφραση με την υψηλότερη έκκριση το πρωί και μειωμένη το βράδυ (Gavrila, Chan et al. 2003). Τα επίπεδά της μειώνονται αναλογικά με την αύξηση της παχυσαρκίας (Ryan, Berman et al. 2003) και είναι φυλοεξαρτώμενη με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται στο πλάσμα των γυναικών (Chandran, Phillips et al. 2003) ως απόρροια της δράσης των ορμονών του φύλου.

### A.5.1 Δομή

Η αντιγονεκτίνη δομικά αποτελείται από 247 αμινοξέα, μοριακού μεγέθους 30kDa και περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικές περιοχές : την αμινοτελική περιοχή , την μεταβλητή περιοχή, την περιοχή κολλαγόνου και τη σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή. Ανήκει στην οικογένεια των Complement 1q (Crouch and Simson 1994; McCormack 1997; Wong, Wang et al. 2004) και η χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της, apM1, είναι η 3q27 αποτελούμενο από 3 εξόνια και 2 ιντρόνια (Vionnet, Hani et al. 2000). Την αντιγονεκτίνη τη συναντάμε στην μονομερή μορφή της (full length, fAd) ή σε μικρότερη, τη λεγόμενη σφαιρική ισομορφή (gAd, 16,5 kDa ). Η τελευταία αποτελείται από τη σφαιρική περιοχή, η οποία προκύπτει με πρωτεόλυση του μονομερούς της, εκπροσωπεί την ενεργή μορφή της και έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει τριμερή (Chandran, Phillips et al. 2003) (Εικόνα 7). Μετα-μεταγραφική τροποποίηση με υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση των τεσσάρων λυσινών της περιοχής κολλαγόνου της αντιγονεκτίνης παράγει πολλαπλές ισομορφές της. Στην κυκλοφορία η αντιγονεκτίνη συναντάται σε διάφορες ισομορφές οι οποίες περιλαμβάνουν τριμερή (LMW), εξαμερή (MMW) και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή (HMW). Τα τριμερή αποτελούν την πιο άφθονη ισομορφή της και δομούνται με τη συνένωση τριών μονομερών σφαιρικών περιοχών. Τα τριμερή αυτά συνενώνονται μέσω των περιοχών κολλαγόνου τους και προκύπτουν με αυτόν τον τον τρόπο υψηλότερου μοριακού βάρους ολιγομερή (εξαμερή, πολυμερή). Η δημιουργία των ολιγομερών της αντιγονεκτίνης εξαρτάται από την ύπαρξη δισουλφιδικού δεσμού ρυθμιζόμενου από την Cys-39. Στην κυκλοφορία συναντώνται κυρίως οι ισομορφές



LMW και HMW, των οποίων ο λόγος είναι αυτός που καθορίζει τη φυσιολογική δράση της ορμόνης και όχι οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις της καθεμιάς (Pajvani, Du et al. 2003; Pajvani, Hawkins et al. 2004).



Εικόνα 7, Η δομικές περιοχές της αντιπονεκτίνης (Kadowaki and Yamauchi 2005).

### A.5.2 Λειτουργία

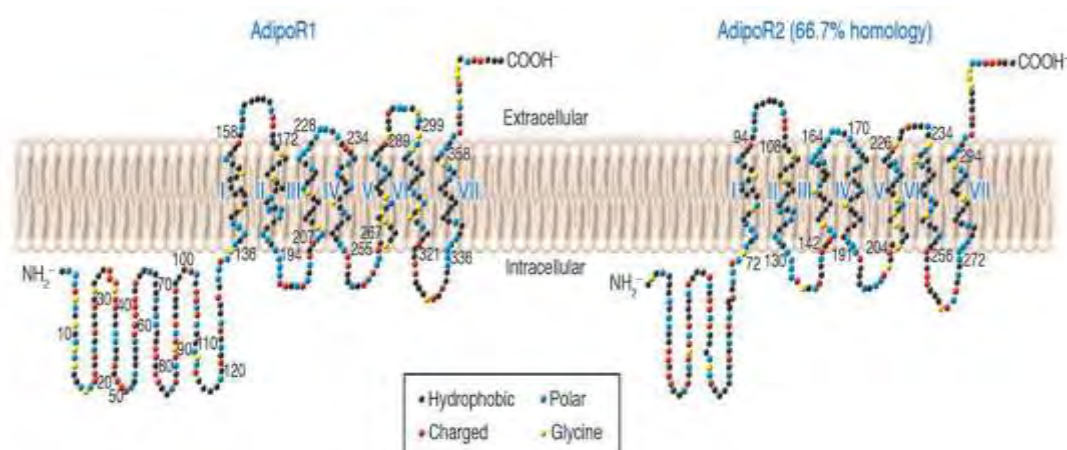
Έχει αποδειχθεί ότι αντιπονεκτίνη είναι ορμόνη που κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μεταβολικών, φλεγμονωδών και αποπτωτικών μονοπατιών. Ενισχύει την ευαισθησία στην ινσουλίνη με όργανα στόχους τους μυς και το συκώτι μέσω ειδικών υποδοχέων, αυξάνοντας την πρόσληψη της γλυκόζης και αναστέλλοντας την γλυκονεογένεση. Διατηρεί την υγεία των αγγείων και την επιβίωση των κυττάρων έχοντας αντιφλεγμονώδη, αντιαθηροσκληρωτική και αντιμιτωτική δράση σε ποικίλους τύπους κυττάρων (Yamauchi, Kamon et al. 2003; Fu, Luo et al. 2005; Tilg and Moschen 2006; Gu and Li 2012). Χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα στην κυκλοφορία σε καταστάσεις παχυσαρκίας, σακχαρώδους διαβήτη τύπου II και καρδιαγγειακής νόσου (Beltowski 2003). Επίσης κατέχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στην ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου, του προστάτη και του μαστού (Kelesidis, Kelesidis et al. 2006). Ρυθμίζει τις αναπαραγωγικές και πλακουντιακές διαδικασίες (Mitchell, Armstrong et al. 2005; Campos, Palin et al. 2008), έχοντας δράση στο ενδομήτριο κάτι που μαρτυρούν τα αυξημένα επίπεδα των υποδοχέων της κατά την ωχρινική φάση (Takemura, Osuga et al. 2006). Επιπλέον έχει δράση στον μεταβολισμό και πολλαπλασιασμό των κυττάρων των οστών (Berner, Lyngstadaas et al. 2004; Shinoda, Yamaguchi et al. 2006) όπως επίσης και στον πολλαπλασιασμό και

διαφοροποίηση των κυττάρων του λιπώδους ιστού (Fu, Luo et al. 2005). Τέλος συνδέεται με τη δράση των αιμοπεταλίων και τον πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων (Huypens 2007). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ένα θεραπευτικό ρόλο της αντιγονεκτίνης στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη, καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου (Gu and Li 2012). Έχουν βρεθεί 16 πολυμορφισμοί στο γονίδιο της αντιγονεκτίνης ενώ μικρός αριθμός αυτών έχουν συσχετιστεί με κλινικές επιπλοκές. Ένας πολυμορφισμός στο εξόνιο 2 και ένα έλλειμμα στο εξόνιο 3 έχουν συσχετιστεί με σημαντική μείωση της συγκέντρωσής της στο πλάσμα (Takahashi, Arita et al. 2000). Επίσης, δύο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) συσχετίστηκαν με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου II (Menzaghi, Ercolino et al. 2002). Ένα ακόμη SNP, το οποίο δεν προκαλεί αλλαγή στην πρωτεΐνη, έχει συνδεθεί με εμφάνιση παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη και δυσλιπιδαιμία (Kondo, Shimomura et al. 2002).

#### **A.5.4 Υποδοχείς**

Έχουν απομονωθεί και περιγραφεί δύο υποδοχείς της αντιγονεκτίνης οι AdipoR1 και AdipoR2 (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Οι δύο αυτοί υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στους σκελετικούς μυς και στο συκώτι, όμως έκφρασή τους παρατηρείται σε όλους τους ιστούς (Kharroubi, Rasschaert et al. 2003; Chinetti, Zawadzki et al. 2004). Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ο υποδοχέας AdipoR1 χαρακτηρίζεται από υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους σκελετικούς μυς και δεσμεύει πρωτίστως την ισομορφή gAd ενώ ο υποδοχέας AdipoR2 εκφράζεται κυρίως στο συκώτι και δεσμεύει την ισομορφή fAd με υψηλότερη συγγένεια (Jones, Jansson et al. 2010). Δομούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές όμως είναι διαφορετικοί δομικά και λειτουργικά από τους G-πρωτεϊνικούς υποδοχείς, έχοντας ενδομεμβρανικά την αμινοτελική περιοχή τους και εξωμεμβρανικά την καρβοξυτελική (Kadowaki, Yamauchi et al. 2006) (εικόνα). Και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στον πλακούντα (Hoggard, Haggarty et al. 2001; Caminos, Nogueiras et al. 2005; Benaitreau, Dieudonne et al.

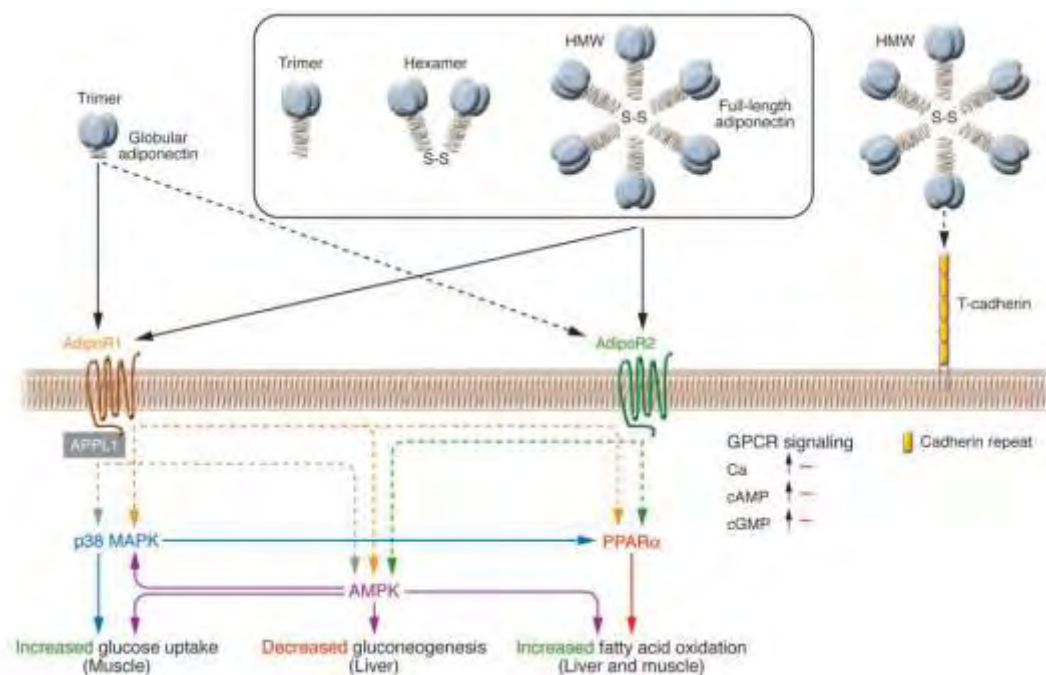
2009).



**Εικόνα 8,** Η δομή των υποδοχέων της αντιπονεκτίνης, AdipoR1 και AdipoR2 (66.7% αμινοξική ομολογία με AdipoR1) (Kadowaki, Yamauchi et al. 2006).

Οι δύο AdipoRs δεσμεύουν την αντιπονεκτίνη και ενεργοποιούν μόρια σηματοδότησης όπως η AMPK (adenosine monophosphate-activated kinase) , ο PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α), και η p38 MAPK , μέσω των οποίων ρυθμίζεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπιδίων στους σκελετικούς μύς και στα ηπατικά κύτταρα καθώς και οι διαδικασίες φλεγμονής αλλά και η διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού επιθηλίου. Πολλοί ενδοκυτταρικοί παράγοντες δεσμεύονται στην αμινοτελική περιοχή των AdipoRs όπως οι APPL1, CK2β και ERp46 και ελέγχουν τη σηματοδότηση των υποδοχέων. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η αντιπονεκτίνη προκαλεί τον διμερισμό και την εσωτερίκευση του υποδοχέα της προδίδοντας νέα δεδομένα για το μοριακό χαρακτήρα αυτού του ασυνήθιστου υποδοχέα (Kadowaki, Yamauchi et al. 2006).

Το 2004 προτάθηκε ένας τρίτος υποδοχέας της αντιπονεκτίνης, η T- καδερίνη, μέλος της υπερικογένειας των καδερινών, μίας ομάδας πρωτεϊνών που ενέχονται στην κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση. Έχει την δυνατότητα να δεσμεύει εξαμερή (MMW) και πολυμερή (HMW) της αντιπονεκτίνης όμως θεωρείται ότι δεν έχει ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση της ορμόνης, εξ' αιτίας του γεγονότος ότι δε διαθέτει ενδοκυτταρική περιοχή (Kadowaki, Yamauchi et al. 2006; Tilg and Moschen 2006).



Εικόνα 9, Μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της αντιπνεκτίνης (Kadowaki, Yamauchi et al. 2006).

#### A.5.5 Αντιπνεκτίνη και πλακούντας

Η αντιπνεκτίνη έχει βρεθεί κατά την εμβρυομητρική επικοινωνία κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή και η έκκρισή της από τον ανθρώπινο πλακούντα δεν επιβεβαιώνεται ενώ έχει εξακριβωθεί η έκφραση των υποδοχέων της από τα τροφοβλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου, μέσω των οποίων επηρεάζει λειτουργίες του πλακούντα (Corbetta, Bulfamante et al. 2005; Tie, Yu et al. 2009). Ο ρόλος της αντιπνεκτίνης στη δημιουργία του πλακούντα αναφέρεται στην μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων όπως επίσης στην αύξηση της έκκρισης χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) και στον υψηλότερο μεταναστευτικό δείκτη των κυττάρων αυτών. Η τελευταία δράση της πραγματοποιείται μέσω της αύξησης των δράσεων των MMP-2 και MMP-9 και παράλληλα με αναστολή της έκφρασης του TIMP-2. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα της δράσης της ορμόνης αυτής στη δημιουργία του πλακούντα, ενισχύοντας τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης χωρίς να αυξάνει τη μιτωτική τους δραστηριότητα

(Benaitreau, Dos Santos et al. 2010). Επί προσθέτως κατέχει ανοσοτροποποιητική δράση κατά την εμβρυομητρική επαφή ενισχύοντας την έκφραση των CD24 και Siglec10 από την τροφοβλάστη. Τα μόρια αυτά βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια και ενέχονται στην καταστολή της ανοσολογικής απάντησης της μητέρας έναντι στα εμβρυικά αντιγόνα αλλά και στην προστασία των τροφοβλαστικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας (McDonald and Wolfe 2011). Αντικρουόμενες είναι οι απόψεις που αφορούν στη δράση της αντιγονεκτίνης στην αγγειογένεση σύμφωνα με τις οποίες ενισχύεται η διαφοροποίηση των φλεβικών επιθηλιακών κυττάρων του ομφαλίου λώρου σε τριχοειδείς δομές και ενισχύει την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων ενώ σύμφωνα με άλλες η λιποκίνη αυτή αυξάνει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της δράσης των κασπασών (Ouchi, Kobayashi et al. 2004; Yang, Zhang et al. 2006).

#### **A.5.6 Αντιγονεκτίνη και εμβρυική ανάπτυξη**

Σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της κύησης στα επίπεδα της αντιγονεκτίνης με σημαντική μείωσή της κατά το δεύτερο μισό της κύησης. Ωστόσο τα επίπεδά της είναι υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά γυναικών που δεν κυοφορούν (Kajantie, Kaaja et al. 2005; Mazaki-Tovi, Kanety et al. 2007). Καταστάσεις υπερινσουλιναϊμίας, όπως είναι η εγκυμοσύνη, συνδέονται με μειωμένο αριθμό υποδοχέων της αντιγονεκτίνης με συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία στην αντιγονεκτίνη και την υψηλότερη έκκρισή της σε σύγκριση με καταστάσεις μη κύησης (Kadowaki and Yamauchi 2005). Επίσης έχειδειχθεί πως η αντιγονεκτίνη καταστέλλει την ινσουλινο-εξαρτώμενη διαπλακουντιακή μεταφορά αμινοξέων προσδίδοντάς της προστατευτικό ρόλο ως προς την υπερβολική μεταφορά θρεπτικών συστατικών σε περιπτώσεις κύησης με αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη (Jones, Jansson et al. 2010). Έχοντας δεδομένο το ρόλο της αντιγονεκτίνης στον μεταβολισμό της γλυκόζης σε ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς και στην ινσουλινο-εξαρτώμενη διαπλακουντιακή μεταφορά αμινοξέων προκύπτει και η συμμετοχή της στη ρύθμιση της εμβρυικής ανάπτυξης. Επιπλέον τα επίπεδά της είναι αυξημένα στον ομφάλιο λώρο σε σχέση με τους ενήλικες και εξαρτώνται από την ηλικία της κύησης. (Lindsay, Walker et al. 2003; Kajantie, Hytinen et al. 2004; Kotani, Yokota et al. 2004). Παραμένει αδιευκρίνιστη η προέλευση των υψηλών επιπέδων της στο έμβryo. Προτείνεται πως ίσως η μικρή μάζα του εμβρυικού

λιπώδους ιστού να δρα στα επίπεδα της ορμόνης μέσω αρνητικού ρυθμιστικού μηχανισμού (Lindsay, Walker et al. 2003; Kotani, Yokota et al. 2004), ενώ μια άλλη πρόταση αφορά στους πολλούς εμβρυικούς ιστούς που εκκρίνουν την ορμόνη αυτή όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων με αποτέλεσμα της υψηλής της συγκεντρώσεις (Henson, Swan et al. 1998). Έχει επίσης προταθεί πως η αντιγονεκτίνη δρα στην ανάπτυξη του εμβρύου αυξάνοντας την ευαισθησία των εμβρυικών ιστών στην ινσουλίνη και στα συστατικά του συστήματος IGF (Mantzoros, Petridou et al. 2004). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι διεγείρει την δραστηριότητα της οστεοβλάστης, προτείνοντας ρόλο στην γραμμική ανάπτυξη του εμβρύου (Oshima, Nampei et al. 2005).

#### **A.6 Μεταλλοπρωτεϊνάσες**

Η επιτυχημένη εμφύτευση απαιτεί την ικανότητα του εμβρύου να αποικοδομήσει τη βασική μεμβράνη του μητρικού επιθηλίου και να εισχωρήσει στο στρώμα της μήτρας. Η αποικοδόμηση αλλά και η αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας πραγματοποιείται μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών, MMPs, μία οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων εξαρτώμενων από ιόντα ψευδαργύρου. Οι MMPs μπορούν να αποικοδομήσουν μια ποικιλία υποστρωμάτων της εξωκυτταρικής μήτρας. Έχει προταθεί πως οι MMPs όχι μόνο αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια μήτρα αλλά επηρεάζουν την κυτταρική συμπεριφορά, μεταβάλλοντας το μικροπεριβάλλον της μητρικής επιφάνειας και ρυθμίζουν, μέσω της διάσπασης, τη δραστηριότητα βιολογικά ενεργών μορίων (Vu and Werb 2000). Διαμορφώνουν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους, οι οποίες επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση (Baker, Edwards et al. 2002). Η ανακάλυψη των MMPs βασίστηκε στην παρατήρηση της μεταμόρφωσης των αμφιβίων κατά τη διάρκεια της οποίας μία κολλαγονολυτική δραστηριότητα πρέπει να είναι παρούσα ώστε να πέπτεται η ουρά του γυρίνου (Gross and Lapiere 1962).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες συνθέτονται και εκκρίνονται ως διαμεμβρανικά προένζυμα τα οποία αποκτούν ενεργή μορφή με αφαίρεση ενός αμινοτελικού προπεπτιδίου. Τα προένζυμα αυτά αποτελούνται από 3 δομικές περιοχές, μία αμινοτελική περιοχή, 80 αμινοξέων, ακολουθούμενη από μία καταλυτική περιοχή, 170 αμινοξέων, και με εξαίρεση δύο μεταλλοπρωτεϊνών, των MMP-7 και MMP-26, όλες οι καταλυτικές περιοχές συνδέονται ομοιοπολικά με μία καρβοξυτελική

περιοχή, 195 αμινοξέων , μέσω ενός συνδέτη 10-70 βάσεων πλούσιου σε προλίνη. Αυτή η καρβοξυτελική περιοχή μπορεί να καθορίσει το υπόστρωμα στο οποίο δρουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αλλά κατέχει και λειτουργικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με τους εξειδικευμένους αναστολείς τους (Massova, Kotra et al. 1998; Guzeloglu-Kayisli, Basar et al. 2007). Επίσης οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-2 και MMP-9 περιλαμβάνουν τρεις επαναλαμβανόμενες, τύπου II φιμπρονεκτίνης, περιοχές οι οποίες είναι ενσωματωμένες στις καταλυτικές περιοχές τους.

Μέχρι σήμερα τουλάχιστον 26 μέλη της οικογένειας των MMPs έχουν αναφερθεί, τα οποία αποτελούνται από ένα προπεπτίδιο και μία καταλυτική περιοχή και διαχωρίζονται σε 4 κατηγορίες σύμφωνα με εξειδίκευση του υποστρώματος στο οποίο δρουν. Οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν τις κολλαγενάσες, οι οποίες αποικοδομούν κυρίως τα ινώδη κολλαγόνα I, II και III, τις ζελατινάσες, οι οποίες αποικοδομούν κυρίως αποδιαταγμένα κολλαγόνα (ζελατίνες) και το μητρικό κολλαγόνο IV, τις στρομεολυσίνες, οι οποίες αποικοδομούν τη φιμπρονεκτίνη, τη λαμίνη, τα κολλαγόνα III, IV, V, την ελαστίνη και την πρωτεογλυκάνη και τέλος τις μεμβρανικού τύπου MMPs(Sato H. et al. 1996, Kolkenbrock et al.1997, Takino T et al.1995, L lano E. et al. 1999).

Η δράση των MMPs ρυθμίζεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών, σε μεταγραφικό επίπεδο, σε επίπεδο έκκρισης, ενεργοποίησης, αναστολής και γλυκοσυλίσωσης. Σε μεταγραφικό επίπεδο, ρόλο κατέχουν μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο AP-1, ο E26 και ο p53. Σε επίπεδο έκκρισης, μέσω κινασών ρυθμίζεται η σηματοδότηση από μεμβρανικούς υποδοχείς ενεργοποιημένους από κυτοκίνες, ορμόνες, αναπτυξιακούς παράγοντες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μήτρας (Cohen, Meisser et al. 2006).

Μία ακόμη ομάδα ανήκει στις ψευδαργυρο-εξαρτώμενες μεταλλοπρωτεϊνάσες και ονομάζεται ADAM. Αναφέρονται επίσης ως μεταλλοπρωτεϊνάσες – ντισιντεγκρίνες με πλούσιες περιοχές σε κυστείνη. Διαθέτουν καταλυτικές περιοχές με ικανότητα σύνδεσης ψευδαργύρου και περιοχές ντισιντεγκρίνης παρόμοιες με αυτές των MMPs. Αυτή η κάπως πρόσφατα ανακαλυφθείσα ομάδα πρωτεολυτικών ενζύμων περιλαμβάνει επτά μέλη (ADAM-TS – ADAM-TS7) με όλες να παρουσιάζουν κοινές οργανωτικές περιοχές (Minas, Loutradis et al. 2005).

### **A.6.1 Αναστολείς Μεταλλοπρωτεϊνών**

Η αναστολή τους πραγματοποιείται μέσω ειδικών αναστολέων, τους ιστικούς αναστολείς TIMPs (tissue inhibitors) (Cohen, Meisser et al. 2006). Οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών είναι οι κύριοι αναστολείς τους και περιλαμβάνουν τέσσερις γνωστές πρωτεΐνες, TIMP 1-4. Και οι τέσσερις αυτοί αναστολείς μοιράζονται κοινές ακολουθίες και έχουν βασικές ομοιότητες, όμως παρουσιάζουν διαφορές σε δομικά χαρακτηριστικά, βιοχημικές ιδιότητες και μοτίβα έκφρασης. Η δράση τους πραγματοποιείται μέσω πρόσδεσής τους στην καταλυτική περιοχή των MMPs και ο κάθε αναστολέας διαφέρει ως προς την ικανότητά του να αναστέλλει τις διάφορες MMPs. Οι TIMP-1 και 2 κατέχουν ανασταλτική δράση σε όλες τις ενεργές μορφές των MMPs, με τον TIMP-1 να συνδέεται πρωταρχικά στην MMP-9 είτε στην ενεργή είτε όχι μορφή της και τον TIMP-2 στην MMP-2 (Staun-Ram, Goldman et al. 2004). Οι TIMPs έχουν μοριακό βάρος 21kDa, συγκρατούνται στο χώρο με έξι δισουλφιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν μια three loop αμινοτελική περιοχή και μια three loop καρβοξυτελική περιοχή (Baker, Edwards et al. 2002). Οι περισσότερες από τις βιολογικές τους δράσεις ωφείλονται σε περιοχές εντός της αμινοτελικής περιοχής, αν και οι καρβοξυτελικές περιοχές τους ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις με τις καταλυτικές περιοχές των MMPs (Brew, Dinakarpanian et al. 2000). Οι TIMPs παραγονται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα και τα κύτταρα του φθαρτού, είναι εκκριτικές πρωτεΐνες όμως μπορούν να βρεθούν και στην κυτταρική επιφάνεια συνδεδεμένες με εδραζόμενες, στην μεμβράνη, πρωτεΐνες. Αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες δρουν στην τροφοβλαστική διείσδυση μέσω καταστολής της δράσης των TIMPs (Yu, Yu et al. 2000; Staun-Ram, Goldman et al. 2004).

### **A.7 Ζελατινάσες**

Οι ζελατινάσες, ζελατινάση A (MMP-2) και ζελατινάση B (MMP-9), οι οποίες αποικοδομούν κυρίως το κολλαγόνο IV και έναν αριθμό πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μητρικής επιφάνειας, όπως Col I, V, VII, IX, φιπρονεκτίνη, λαμινίνη, ελαστίνη και βιντρονεκτίνη. Είναι οι περισσότερο μελετημένες MMPs στην διείσδυση του πλακούντα καθώς το κολλαγόνο IV αποτελεί το κυριότερο συστατικό της φθαρτοποιημένης εξωκυτταρικής μήτρας. Οι πρωτεάσες αυτές εκφράζονται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα ενώ τα φθαρτοποιημένα κύτταρα της μήτρας παράγουν τους



αναστολείς τους, TIMPs, ρυθμίζοντας έτσι την πρωτεολυτική δραστηριότητα των EVTs. Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης, στα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζεται η MMP-2 ενώ η MMP-9 στα λαχνικά κύτταρα (Higuchi, Kanzaki et al. 1995; Lockwood, Krikun et al. 1998; Irwin, Suen et al. 2001; Isaka, Usuda et al. 2003; Staun-Ram, Goldman et al. 2004; Dimitriadis, White et al. 2005). Το προφίλ της έκκριση των ζελατινασών εξαρτάται άμεσα από την ηλικία της κύησης. Δεν παρατηρείται έκφραση της MMP-9 από τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, όμως από την 7<sup>η</sup> έως την 11<sup>η</sup> η έκκρισή της αυξάνει σταδιακά. Σε αντίθεση, η έκφραση της MMP-2 μειώνεται από την 6<sup>η</sup> έως την 11<sup>η</sup> εβδομάδα. Αν η MMP-2 αποτελεί την κύρια ζελατινάση των πρώιμων τροφοβλαστικών κυττάρων (6-8 εβδομάδες), η MMP-9 επικρατεί αυτής σε κύτταρα τροφοβλάστης 9-12 εβδομάδων (Xu, Wang et al. 2000; Staun-Ram, Goldman et al. 2004). Η ρύθμιση της έκφρασης των ζελατινασών περιλαμβάνει διαφορετικά μονοπάτια παρακρινικών και αυτοκρινικών ενεργοποιητών. Οι κυτοκίνες IL-1α και TNFα ενισχύουν την έκφραση της MMP-9 στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου (Meisser, Chardonnens et al. 1999) ενώ η προγεστερόνη τη δράση της (Shimonovitz, Hurwitz et al. 1998). Επίσης, η λεπτίνη η οποία εκφράζεται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα ενισχύει τη δράση των MMP-2 και MMP-9 τη στιγμή που η κυτοκίνη LIF μειώνει την έκκρισή τους (Bischof, Martelli et al. 1995; Nachtigall, Kliman et al. 1996; Castellucci, De Matteis et al. 2000).

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο ρόλος της ορμόνης αντιγονεκτίνης στη διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης στο μητρικό ιστό. Τα γονίδια που μελετήθηκαν για τον σκοπό αυτό αφορούν σε αυτά που κωδικοποιούν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-2 και MMP-9.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **B.1.1 Συλλογή Δειγμάτων**

Τα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν από γυναίκες σε κύηση που υπεβλήθησαν σε λήψη χοριακών λαχνών (Chorionic Villus Sampling, CVS) στη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από όλα τα δείγματα ακολούθησε απομόνωση και καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων από κάθε δείγμα τροφοβλαστικού ιστού στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με την ορμόνη αντιπυνεκτίνη.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 4 δείγματα από γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 31 έτη και ηλικία κύησης των γυναικών κύησης όλων μεταξύ 12-14 εβδομάδας.

#### **B.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων**

Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα προκύπτουν από δείγμα χοριακών λαχνών τροφοβλάστης την 11<sup>η</sup>-13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης.

Μετά την παραλαβή του δείγματος έγινε έκπλυση του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS ώστε να απαλλαγεί από υπολείμματα του χειρουργείου και παράλληλα να διατηρηθεί σταθερό το pH του. Ο ιστός συλλέχθηκε σε στείρο φιαλίδιο στο οποίο γράφουμε την εβδομάδα κύησης και την ημερομηνία λήψης.

Για την απομόνωση των τροφοβλαστικών κυττάρων ο ιστός υπεβλήθη σε ενζυμική κατεργασία με κολλαγενάση (1μg/ml) και θρυψίνη με σκοπό τη διάσπαση των πρωτεογλυκανών ώστε να απελευθερωθούν οι ίνες του κολλαγόνου, και κατόπιν με κολλαγενάση, η οποία οδηγεί σε διάσπαση των κολλαγόνων ινών και απελευθέρωση των τροφοβλαστικών κυττάρων από το δίκτυο των πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας που τα περιβάλλει. Για την καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Το θρεπτικό υλικό πριν τη χρήση του εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 5% του όγκου του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει αναγκαίους αναπτυξιακούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S, Roche) σε

αναλογία 0,5% του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4° C.

Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37° C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

#### Αναλυτική Διαδικασία

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού (λάχνες) σε τριβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (σε θερμοκρασία δωματίου, room temperature, RT)
- Απομάκρυνση των πηγμάτων από τον ιστό και τεμαχισμός του για απελευθέρωση των κυττάρων με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας ινσουλίνης
- Αναρρόφηση του ιστού με αποστειρωμένη πλαστική πιπέτα μιας χρήσης μαζί με αρκετό διάλυμα PBS (οι λάχνες προσκολλώνται στα τοιχώματα με αποτέλεσμα να μην μεταφέρονται) και τις τοποθετούμε σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon)
- Κατακρήμνιση των λαχνών στο falcon ώστε να δημιουργήσουν ίζημα χωρίς φυγοκέντρωση και αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS (η σκοπιμότητα της χρήσης του είναι η πλύση των κύτταρων)
- Προσθήκη 1,5ml – 2ml κολλαγενάσης (1μg/ml) , ακολούθως 1,5ml – 2ml θρυψίνης (ανάλογα με την ποσότητα του ιστού) και ελαφριά ανάδευση
- Επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 90 λεπτά με λίγο ανοιχτό καπάκι (ανάδευση υπερκειμένου ανά 15 λεπτά)
- Προσθήκη (τουλάχιστον διπλάσιου όγκου) πλήρους καλλιεργητικού υλικού D-MEM F12 [ 10% FBS, 1%PENSTREP, 5% l-glutamin] για παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων
- Φυγοκέντρωση στις 1700rpm για 7min σε RT, απόρριψη του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 1ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και συνεχής αναρρόφηση με σύριγγα 5mm (σκοπός να απελευθερωθούν τα κύτταρα)
- Προσθήκη 6ml – 7ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού με μικρή ροή ξεπλένοντας και τα τοιχώματα του falcon (αποκόλληση όσων κυττάρων έχουν προσκολληθεί

σε αυτά), φυγοκέντρωση στις 800rpm για 10min σε RT και αφαίρεση του υπερκλειμένου

- Προσθήκη 3ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού, ανάδευση για αναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του υπερκλειμένου σε φλάσκα των 25cm<sup>2</sup> (το θρεπτικό υλικό μαζί με τα κύτταρα πρέπει να καλύπτει τον πάτο της φλάσκας) και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο για τον έλεγχο της ύπαρξης κυττάρων.

Την καλλιέργεια την παρατηρούμε σε οπτικό μικροσκόπιο κάθε 2-3 ημέρες και στην οποία προσθέτουμε νέο θρεπτικό υλικό όποτε απαιτείται (όταν έχει καταναλωθεί το θρεπτικό υλικό – αλλαγή χρώματός του από ερυθρό σε κίτρινο).

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα αρχικά είναι νηματοειδή κυλινδρικά και βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 48ώρες προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας και αποκτούν πεπλατυσμένο, νηματοειδές σχήμα (εικόνα 10).



Εικόνα 10, Τροφοβλαστικά κύτταρα σε καλλιέργεια 20-30 ημερών (20x μεγέθυνση).

### **B.1.3 Ανακαλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων**

Η ανακαλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων γινόταν κάθε 7 - 10 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν και όταν τα τροφοβλαστικά κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 4 έως 5 ανακαλλιέργειες γινόταν και κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτούνταν η αποκόλλησή τους. Αρχικά γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 3ml PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων από τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων κατά την ανάπτυξή τους και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 10 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχονταν στο μικροσκόπιο (πολλές φορές απαιτούσε και το χτύπημα της φλάσκας στον εργαστηριακό πάγκο) και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, γινόταν άμεσα προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε τριπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης και ακολουθούσε καλή ανάδευση. Τέλος μεταφερόταν η μισή ποσότητα των κυττάρων σε καινούργια αποστειρωμένη φλάσκα και γινόταν προσθήκη θρεπτικού υλικού και στις δύο φλάσκες έως ότου να καλυφθούν οι επιφάνειές τους.

Την ίδια διαδικασία ακολουθούμε και για να μεταφέρουμε τα τροφοβλαστικά κύτταρα από τις φλάσκες σε 6-wells (τοποθετούμε 1ml σε κάθε πηγαδάκι και συμπληρώνουμε με 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού) για να προχωρήσουμε στην επίδραση με την ορμόνη αντιπνεκτίνη.

Στη συνέχεια γινόταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με πλάκα Newbauer: 20μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20μl Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^6$  κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Για την αραίωση των κυττάρων στις φλάσκες, τα κύτταρα που έχουμε αποκολλήσει μεταφέρονταν σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο των 15ml και φυγοκεντρούνταν στις 2000rpm για 5min. Γινόταν αναδίλυση του ιζήματος που προέκυπτε με νέο πλήρες θρεπτικό υλικό και απόρριψη ενός μέρους του διαλύματος των κυττάρων. Το υπόλοιπο διάλυμα μεταφερόταν σε νέα αποστειρωμένη φλάσκα και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

#### **B.1.4 Υπολογισμός αριθμού των κυττάρων από την ανακαλλιέργεια**

Η μέτρηση των κυττάρων μετά την ανακαλλιέργεια γινόταν στο μικροσκόπιο με πλάκα Newbauer μετά από φυγοκέντρηση των αποκολλημένων κυττάρων και αναδιάλυσή τους σε 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού με τη χρήση αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας. 20μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονταν με 20μl Trypan Blue και στη συνέχεια τοποθετούνταν πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δεν βάφονται και είναι αυτά που μετρώνται. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος και γίνεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε καινούργιες φλάσκες σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^6$  κύτταρα/ml φρέσκου θρεπτικού υλικού.

#### **B.1.5 Κατάψυξη τροφοβλαστικών κυττάρων**

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα που έχουμε αποκολλήσει μεταφέρονται σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο των 15ml και φυγοκεντρούνται στις 2000rpm για 5min. Γινόταν αναδιάλυση του ιζήματος που προέκυπτε με 3ml διαλύματος PBS και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση. Μετά το πέρας της πραγματοποιούνταν αναδιάλυση του ιζήματος με θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών και τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση  $4-5 \times 10^6$ /ml. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 4 ώρες, κατόπιν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 24ώρες και τελικά στους  $-150^{\circ}\text{C}$ .

#### **B.1.6 Απόψυξη τροφοβλαστικών κυττάρων**

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γινόταν γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  και την άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο των 15ml το οποίο περιείχε 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το σωληνάριο φυγοκεντρούνταν στις 2000 στροφές για 7 λεπτά, το υπερκείμενο

απομακρύνονταν και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 8 - 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνταν σε φλάσκα των 25ml και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

#### **B.1.7 Επίδραση σε τροφοβλαστικά κύτταρα με αντιγονεκτίνη**

Αφού τα κύτταρα είχαν μοιραστεί σε 6-wells και στα οποία είχαν προσκολληθεί και πολλαπλασιαστεί προχωρούσαμε στην επίδραση με την αντιγονεκτίνη. Οι περιεκτικότητες της ορμόνης με τις οποίες έγινε επίδραση ήταν δύο: 25ng/ml και 250ng/ml και οι συνθήκες υπό τις οποίες μελετούσαμε τη δράση της ήταν μετά το πέρας των 24 ωρών και των 48 ωρών. Η διαδικασία διαρκούσε 5 συνεχόμενες ημέρες κατά τις οποίες:

##### 1<sup>η</sup> ημέρα

Αφαίρεση του πλήρους θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια των 6-wells και προσθήκη απλού θρεπτικού υλικού, χωρίς FBS, στο οποίο και παρέμεναν μέχρι την επόμενη ημέρα.

##### 2<sup>η</sup> ημέρα

Επίδραση με αντιγονεκτίνη αφού είχε αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό που υπήρχε και είχαν δημιουργηθεί τρία διαλύματα απλού θρεπτικού υλικού και αντιγονεκτίνης στις συγκεντρώσεις των 25ng/ml και 250ng/ml. Στο κάθε πηγαδάκι γινόταν προσθήκη 1ml από το κάθε διάλυμα οπότε συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3ml από το καθένα για τους 2 διαφορετικούς χρόνους που μελετήθηκαν (24h, 48h)

##### 3<sup>η</sup> ημέρα

Συλλογή των κυττάρων από τα πηγαδάκια της συνθήκης των 24h (25ng/ml και 250ng/ml) και απομόνωση του RNA.

##### 4<sup>η</sup> ημέρα

Συλλογή των κυττάρων από τα πηγαδάκια της συνθήκης των 48h (25ng/ml και 250ng/ml) και απομόνωση του RNA.

#### **B.1.8 Απομόνωση πρωτεΐνης από τροφοβλαστικά κύτταρα**

Τα κύτταρα αποκολλώνται ως ανωτέρω. Αφού δεσμεύσουμε τη δράση της θρυψίνης με καλλιεργητικό υλικό τα μεταφέρουμε σε στείρο falcon των 15ml. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 2000rpm για 5 λεπτά και μετά το πέρας της

αφαιρούμε το υπερκείμενο. Στο επόμενο βήμα προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS με το οποίο θα απομακρύνουμε τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο FBS, συστατικό του θρεπτικού υλικού, και οι οποίες παρέμειναν στο falcon. Σκοπός μας είναι να κρατήσουμε μόνο τις πρωτεΐνες του δείγματός μας. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα των κυττάρων αναδεύοντας έντονα το διάλυμα και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 2000rpm για 5 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αφαιρούμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε το falcon σε πάγο όπου και δουλεύουμε τα επόμενα βήματα. Σε αυτό προσθέτουμε διάλυμα με αναστολείς πρωτεασών (protein inhibitors) με σκοπό να εμποδίσουμε τις πρωτεάσες να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες. Επίσης προσθέτουμε RIPA buffer με το οποίο θα σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες και θα απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Ακολούθως αναδεύουμε τα διαλύματα αυτά με το δείγμα μας και μεταφέρουμε το σύνολο του διαλύματος που προκύπτει σε στείρα eppendorfs. Στη συνέχεια και για συνολικό διάστημα 30 λεπτών αναδεύουμε το διάλυμά μας κάθε 10 λεπτά με Vortex. Στο επόμενο βήμα πραγματοποιούμε φυγοκέντρωση στις 13500rpm για 15 λεπτά στους 4-8°C. Μετά το πέρας της συλλέγουμε το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες ενώ το ίζημα τις μεμβράνες των κυττάρων του δείγματος, και το μεταφέρουμε σε στείρο eppendorf. Τέλος φυλάσσουμε τις πρωτεΐνες στους -80°C.

### **B.1.9 Απομόνωση RNA από τροφοβλαστικά κύτταρα**

Στα τροφοβλαστικά κύτταρα που έχουμε απομονώσει από τον τροφοβλαστικό ιστό και έπειτα από επίδραση με την ορμόνη αντιπυνεκτίνη όπως περιγράφηκε παραπάνω πραγματοποιήθηκε εκτός από την απομόνωση mRNA της καλλιέργειας των κυττάρων, η διερεύνηση της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων υπό μελέτη.

Αρχικά πραγματοποιούμε αποκόλληση των κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω και αφού δεσμεύσουμε τη δράση της θρυψίνης με πλήρες καλλιεργητικό υλικό τα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο των 15ml. Φυγοκεντρούνται τα κύτταρα στις 2000rpm για 5min και μετά το πέρας της αφαιρείται το υπερκείμενο.

### **I. Ακεραιότητα του RNA.**

Η διατήρηση της ακεραιότητας του RNA των κυττάρων έγινε με προσθήκη 1 – 3ml Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) καθώς το RNA είναι πολύ



ασταθές λόγω της παρουσίας των υδροξυλικών ομάδων που μπορούν να σχηματίσουν ελεύθερες ρίζες και επώαση για 15min στους 15-30°C (ή φύλαξη στους -80°C). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου (Scharlau) για κάθε ml Trizol το οποίο προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολούθησε καλή ανάδευση με Vortex και επώαση σε 15-30°C με στόχο την λύση των κυττάρων.

## II. Διαχωρισμός φάσεων.

Στη συνέχεια κάθε δείγμα τροφοβλαστικών κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/ χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA.

## III. Κατακρήμνιση

Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml όπου πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε ml Trizol, καλή ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 10min στους 15-30°C.

## IV. Έκπλυση

Μετά την επώαση πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml κρύας αιθανόλης 70% για κάθε ml Trizol. Ακολουθεί ανάδευση με Vortex και φυγοκέντρωση για 10min στις 10000rpm στους 4°C.

## V. Επαναδιάλυση

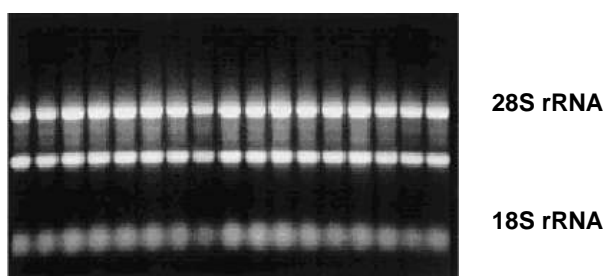
Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά (το σωληνάριο βρίσκεται σε απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι) διαλυτοποιείται. Η διάλυση γίνεται με προσθήκη 20 - 30μl ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί επώαση για 10min στους 55 - 60 °C και προσεκτική ανάδευση με την πιπέτα. Το RNA φυλάσσεται στους -80 °C.

## VI. Φωτομέτρηση – Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA με βάση τον τύπο: συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 40 (mgr/ml)

## VII. Ηλεκτροφόρηση – Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (εικόνα 11).



Εικόνα 11 . Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%

Η απομόνωση RNA από καλλιεργημένα χονδροκύτταρα γίνεται με την προσθήκη Trizol στο ίζημα που προκύπτει μετά από την φυγοκέντρηση αποκολλημένων από τη φλάσκα χονδροκυττάρων σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί.

#### B.1.10 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα RNA που απομονώθηκαν από τα καλλιεργημένα και μη τροφοβλαστικά κύτταρα, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση Super Script II. Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την αντίδραση σύνθεσης cDNA για όγκο RNA αντιστοιχεί σε 1μgr περιέχει:

➤ RNA	→	1	μgr
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x	→	4	μl
➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/m)	→	2	μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	→	2	μl
➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)	→	2	μl
➤ DTT (0,1 M)	→	2	μl
➤ Super Script II (200U/μL)	→	0.5	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	μέχρι τελικού όγκου 20μl	

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 70°C επί 10 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
- Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.
- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
  - 20°C , 10 λεπτά
  - 42°C , 45 λεπτά
  - 99 °C , 3 λεπτά
  - 18 °C , 5 λεπτά
  - τελική θερμοκρασία: 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου GAPDH το οποίο κωδικοποιεί . Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του προϊόντος, το cDNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του GAPDH cDNA . Οι εκκινητές για το γονίδιο GAPDH είναι:

**GAPDH F:** 5’ - GAGTCAACGGATTTGGTCGT -3’

**GAPDH R:** 5’ - GACAAGCTTCCCGTTCTCAG - 3’

- Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιέχει:

➤ cDNA	→	3	μl
➤ Biomix	→	10	μl
➤ Εκκινητής F (50p/mol)	→	1	μl
➤ Εκκινητής R (50p/mol)	→	1	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	5	μl

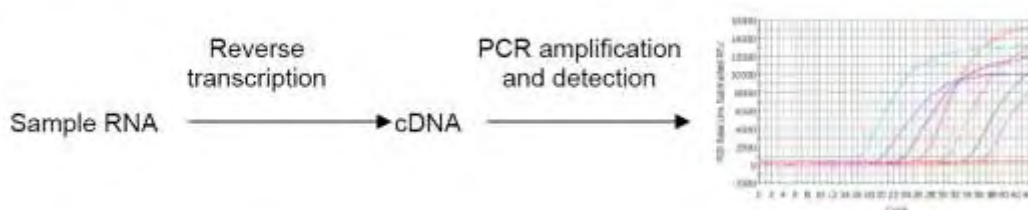
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 λεπτά
- 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 94°C για 10 λεπτά
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό
  - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

### **B.1.11 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων MMP2, MMP9 και GAPDH με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)**

#### I. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time polymerase chain reaction), είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA –στόχου. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά το τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού, σε πραγματικό χρόνο (real time) (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής μπορεί να γίνει είτε σε ξεχωριστή αντίδραση (two step RT-PCR) και το παραγόμενο cDNA να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την real-time PCR, είτε σε μία συνδυασμένη αντίδραση χρησιμοποιώντας θερμοανθεκτική DNA εξαρτώμενη πολυμεράση (one-step RT-PCR). Όλα τα υπόλοιπα στάδια διεξάγονται από τη συσκευή της Real-time PCR (thermal cycler/detector) και τα ποσοτικά αποτελέσματα προωθούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Υπάρχουν τέσσερις τεχνικές που ανιχνεύουν το πολλαπλασιαζόμενο προϊόν με την ίδια περίπου ευαισθησία και βασίζονται στην χρησιμοποίηση φθορίζοντων χρωστικών:

**Μοριακοί σηματοδότες** (molecular beacon): πρόκειται για μόρια υβριδισμού (hybridization probes) συμπληρωματικά με αλληλουχία του αναμενόμενου μετάγραφου (amplicon). Στο ένα άκρο τους φέρουν φθορίζον μόριο και στο άλλο άκρο τους μόριο που εμποδίζει το φθορισμό του πρώτου (quencher). Στο διάλυμα τα ελεύθερα μόρια του σηματοδότη λαμβάνουν διαμόρφωση φουρκέτας με αποτέλεσμα η επαφή των δύο άκρων τους να εμποδίζει το φθορισμό. Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing), παρουσία συμπληρωματικής αλληλουχίας του μορίου στόχου, υφίστανται αλλαγή της διαμόρφωσής τους, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των άκρων τους και το φθορισμό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο με αποτέλεσμα η ένταση του φθορισμού να αντικατοπτρίζει το ποσό του ενισχυμένου προϊόντος στο τέλος του προηγούμενου κύκλου. Πλεονέκτημα είναι η υψηλή ειδικότητα ενώ μειονέκτημα η δυσκολία στο σχεδιασμό του σηματοδότη.

**Μόρια υβριδισμού** (hybridization probes): βασίζεται στην παρουσία δύο μορίων συμπληρωματικών με την αλληλουχία του αναμενόμενου μετάγραφου (amplicon). Το πρώτο φέρει στο 3' άκρο φθορίζον μόριο δότη (fluorescein donor) και το δεύτερο μόριο δέκτη (fluorophore acceptor). Στο διάλυμα τα ελεύθερα μόρια είναι απομακρυσμένα και εκπέμπεται φθορισμός χαμηλού μήκους κύματος (background fluorescence). Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing) προσδένονται στη συμπληρωματική αλληλουχία του μορίου στόχου διαδοχικά (με διαμόρφωση κεφαλής-ουράς) με αποτέλεσμα οι δύο χρωστικές να έρχονται σε επαφή και να εκπέμπεται φθορισμός υψηλότερου μήκους κύματος. Η παρουσία δυο ανεξάρτητων μορίων υβριδισμού αυξάνει την ειδικότητα της μεθόδου και καθιστά πιο ευέλικτο το σχεδιασμό των μορίων υβριδισμού.

**Υδρολύσιμα μόρια** (hydrolysis probes): βασίζεται στην ιδιότητα της 5' νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία υδρολύει ειδικό μόριο (hybridization probe) που προσδένεται στο μετάγραφο. Κατά το στάδιο πρόσδεσης (annealing) – που συμβαίνει στην ίδια θερμοκρασία με το στάδιο πολυμερισμού (extension)- εκτός από τους ειδικούς εκκινητές (primers) προσδένεται και ένα τρίτο μόριο (hybridization probe). Το μόριο αυτό φέρει στο 5' άκρο του μία φθορίζουσα χρωστική (fluorescent reporter dye) και στο 3' άκρο ένα μόριο που εμποδίζει το φθορισμό της χρωστικής (quencher).

Η πολυμεράση εκτοπίζει και υδρολύει το σημασμένο μόριο με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής από το μόριο που εμποδίζει το φθορισμό και την ανίχνευση φθορισμού. Το σήμα που λαμβάνεται είναι ευθέως ανάλογο του αριθμού των μορίων που υπάρχουν στο τέλος του προηγούμενου κύκλου ή την αρχή του επόμενου. Η μέθοδος έχει μεγάλη ειδικότητα αλλά είναι πιο δύσκολη στο σχεδιασμό.

**Χρωστικές προσδεδεμένες στο DNA (DNA-binding dyes):** βασίζεται στην ανίχνευση ειδικής φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green) που προσδένεται στο δίκλωνο μόριο DNA. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα, ενώ κατά το στάδιο επιμήκυνσης (elongation) αυξανόμενα ποσά χρωστικής προσδένονται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την αύξηση στην ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος. Το σήμα αυτό μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation). Συνεπώς η ανίχνευση του σήματος στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου είναι εκείνη που καταγράφει το αυξανόμενο ποσό του DNA. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ειδικότητα καθορίζεται αποκλειστικά από τους εκκινητές. Αφού η παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου μορίου DNA εκπέμπει φθορισμό, η μέθοδος δεν είναι πιο ειδική από τη συμβατική RT-PCR. Ωστόσο η ειδικότητα των προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί δημιουργώντας την καμπύλη τήξεως ή αποδιάταξης (melting curve or dissociation curve) του προϊόντος. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας το φθορισμό που λαμβάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ) του πολλαπλασιαζόμενου μορίου (amplicon). Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση, είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

Στην παρούσα μελέτη επελέγη η μέθοδος ανίχνευσής τους με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής SYBR GREEN.

## II. Σχεδιασμός του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA

Το βέλτιστο μήκος του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA (μορίου-στόχου) για την Real-time PCR είναι μικρότερο από 100 ζεύγη βάσεων (bp). Τα μικρότερα μόρια πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη απόδοση και είναι πιο ανθεκτικά στις συνθήκες της αντίδρασης.

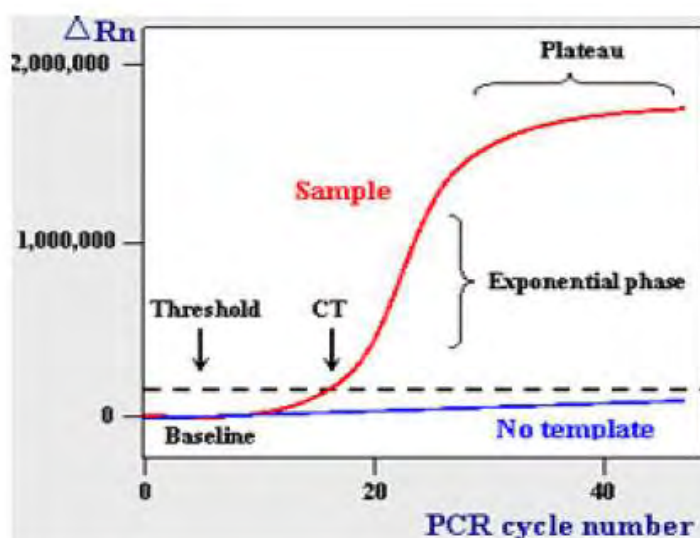
## III. Σχεδιασμός των ειδικών εκκινητών

Οι ειδικοί εκκινητές θα πρέπει να προσδένονται στην ένωση δύο εξονίων προκειμένου να αποφεύγονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από

τον πολλαπλασιασμό γενομικού DNA που έχει επιμολύνει το δείγμα. Ο σχεδιασμός τους βασίζεται στην εκτιμώμενη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ), στην προτίμηση για πολλαπλασιαζόμενα τμήματα DNA μικρού μεγέθους καθώς και στη θέση πρόσδεσης των probes. Το βέλτιστο μήκος τους είναι περίπου 15-20 βάσεις και η περιεκτικότητά τους σε βάσεις γουανίνης/κυτοσίνης (G/C) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-70%. Η θερμοκρασία τήξης τους δε θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 1-2°C, με ελάχιστη και μέγιστη τους 58°C και 60°C αντίστοιχα. Η παρουσία τους σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προάγει τη λανθασμένη πρόσδεσή τους (mispriming) και τη συσσώρευση μη ειδικού προϊόντος. Αντίθετα η χαμηλή συγκέντρωσή τους σπάνια αποτελεί πρόβλημα για τη Real-Time PCR διότι τα αντίγραφα του μορίου στόχου έχουν συνήθως υπολογιστεί πριν εξαντληθεί η ποσότητα των εκκινητών. Υπάρχουν διάφορα προγράμματα σχεδιασμού ειδικών εκκινητών. Αυτό που χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών στην παρούσα μελέτη είναι το λογισμικό Primer 3.

#### IV. Ποσοτικοποίηση

Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει μία αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) στην οποία φαίνονται οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται κατά την ποσοτικοποίηση (εικόνα 13). Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι το γράφημα του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης.



Εικόνα 13. Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) που προκύπτει κατά τη Real-time PCR (αναλυτικά στο κείμενο).

Στους αρχικούς κύκλους της PCR παρατηρείται μια μικρή αλλαγή στο σήμα φθορισμού. Αυτή η φάση αντιστοιχεί στο αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού (baseline) του γραφήματος. Οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο είναι το αρχικό ποσό του μορίου-στόχου (template) κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται προκειμένου να φτάσει η αντίδραση στο σημείο εκείνο που το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού (Gibson, Heid et al. 1996). Αυτό το σημείο ορίζεται ως Ct (threshold cycle) και εντοπίζεται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού (plateau). Το  $\Delta Rn$  (delta Rn) είναι το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού της χρωστικής διαιρούμενη από την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μιας χρωστικής αναφοράς αποτελεί το Rn (normalized reporter). Αυτή η χρωστική αναφοράς (passive reference dye) είναι απαραίτητη για την διόρθωση διακυμάνσεων που αφορούν αλλαγές στη συγκέντρωση ή τον όγκο και συμπεριλαμβάνεται σε όλα τα SDS kits της αντίδρασης PCR.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην real-time PCR μπορεί να είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Η **απόλυτη** ποσοτικοποίηση γίνεται όταν είναι αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του RNA στόχου, και πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης (absolute standard curve). Αυτό προϋποθέτει τη συμβολή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Η **σχετική** ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με πρότυπη καμπύλη ή με την συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT method). Και οι δύο μέθοδοι δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα. Όσον αφορά την πρότυπη καμπύλη, η ποσότητα του μορίου-στόχου εκφράζεται σε σχέση με ένα δείγμα που λέγεται ρυθμιστής (calibrator). Η ζητούμενη ποσότητα καθορίζεται από την πρότυπη καμπύλη και διαιρείται από την ποσότητα του ρυθμιστή. Έτσι ο ρυθμιστής αποτελεί το  $1 \times$  δείγμα και όλες οι άλλες ποσότητες εκφράζονται ως n-φορές σε σχέση με αυτόν. Επειδή ακριβώς η ποσότητα του δείγματος διαιρείται με την ποσότητα του ρυθμιστή, η γνώση της απόλυτης τιμής των



πρότυπων δειγμάτων (standards) που θα δημιουργήσουν την καμπύλη δεν είναι αναγκαία. Στην περίπτωση κατά την οποία η ποσότητα του δείγματος μας κανονικοποιείται ως προς ένα εσωτερικό μάρτυρα (endogenous control), οι πρότυπες καμπύλες δημιουργούνται τόσο για το μόριο-στόχο όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα. Για κάθε δείγμα το ποσό του στόχου και του εσωτερικού μάρτυρα καθορίζεται από την κατάλληλη πρότυπη καμπύλη, και από τον λόγο τους προκύπτει η κανονικοποιημένη τιμή του μορίου-στόχου (normalized target value). Κάθε κανονικοποιημένη τιμή στη συνέχεια διαιρείται από την κανονικοποιημένη τιμή του calibrator και έτσι προκύπτει το σχετικό επίπεδο έκφρασης ως προς αυτόν που, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί το 1×δείγμα.

Η δεύτερη μέθοδος, η συγκριτική CT μέθοδος (comparative CT method), είναι παρόμοια με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης αλλά βασίζεται σε αριθμητικούς τύπους για να επιτύχει το ίδιο αποτέλεσμα σχετικής ποσοτικοποίησης. Το ποσό του μορίου-στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο-ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Το πλεονέκτημα της συγκριτικής  $C_T$  μεθόδου είναι ακριβώς ότι δεν υπάρχει ανάγκη δημιουργίας πρότυπης καμπύλης και αποφεύγονται τα λάθη κατά την αραίωση των δειγμάτων για τη δημιουργία της. Επίσης επιτρέπει να παραμείνουν αχρησιμοποίητα αρκετά πηγαδάκια (wells) εξοικονομώντας χώρο για μεγαλύτερο προς μελέτη αριθμό δειγμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα συγκεκριμένα πειράματα όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι μεγάλος και κάθε δείγμα ελέγχεται δύο φορές σε κάθε αντίδραση. Για τους παραπάνω λόγους στην παρούσα μελέτη επελέγη η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με την συγκριτική μέθοδο (comparative CT method).

#### V. Κανονικοποίηση- Επιλογή εσωτερικού μάρτυρα

Κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι δυνατό να προκύψουν σφάλματα που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού του υλικού DNA ή RNA μεταξύ των δειγμάτων. Η διόρθωση αυτής της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού μάρτυρα (endogenous control) ως προς τον οποίο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, θα κανονικοποιηθεί στη συνέχεια το δείγμα. Ο ιδανικός εσωτερικός μάρτυρας θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφόρων ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης, και θα πρέπει να παραμένει ανεπηρέαστος από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης θα πρέπει να εκφράζεται

αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι η β-ακτίνη, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και άλλα RNAs. Στην παρούσα μελέτη ως εσωτερικός μάρτυρας επελέγη η η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Αποτελεί ένα από τα πρώτα RNA που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό. Εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας.

#### VI. Βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση two step RT- PCR. Αυτό σημαίνει ότι προηγήθηκε σε ξεχωριστό στάδιο η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και στη συνέχεια το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση της real-time PCR. Για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το σφάλμα που προκύπτει από διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης RT, όλα τα δείγματα cDNA παρασκευάστηκαν μαζί χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια και τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια συσκευή PCR. Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της αντίδρασης real-time PCR κάθε δείγμα «έτρεξε» στη αντίδραση εις διπλούν (duplicates). Στην ίδια αντίδραση τα ίδια δείγματα ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας και εκκινητές που ανίχνευαν τον εσωτερικό μάρτυρα GAPDH. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν δυο είδη αντιδράσεων control: αντιδράσεις με όλα τα συστατικά εκτός του cDNA και αντιδράσεις με όλα τα συστατικά στα οποία αντί του cDNA προστίθεται το προϊόν της αντίδρασης control της αντίστροφης μεταγραφής και για τα δύο είδη εκκινητών (του εκάστοτε γονιδίου και της GAPDH). Τέλος χρησιμοποιήθηκε και δείγμα που εκφράζει τα υπό μελέτη γονίδια και αποτέλεσε τον ρυθμιστή (calibrator) ως προς τον οποίο εκφράστηκαν τα ποσοτικά αποτελέσματα των γονιδίων.

Για κάθε δείγμα το μηχάνημα της real-time PCR μας δίνει την τιμή Ct, καθώς και τις γραφικές παραστάσεις πολλαπλασιασμού (amplification plot) και τις καμπύλες τήξεως ή αποδιάταξης (melting curve or dissociation curve) των προϊόντων και σύμφωνα με τα παραπάνω υπολογίζεται για κάθε δείγμα το  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Το σύνολο των τιμών επεξεργάζεται στη συνέχεια με στατιστικό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στους διαφορετικούς πληθυσμούς μελέτης.

## VII. Σχεδιασμός και προετοιμασία της αντίδρασης

Πριν την αντίδραση, στο cDNA κάθε δείγματος έγινε αραίωση 1:10 και χρησιμοποιήθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 1  $\mu\text{g}$  RNA. Ως calibrator χρησιμοποιήθηκε cDNA από ιστούς ανθρώπου ή κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τα γονίδια ενδιαφέροντος, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες-δείγματα χωρίς cDNA και RNA.

Για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων MMP2, MMP9 και GAPDH χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα SYBR Green PCR Master Mix της Applied Biosystems στη συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems Foster, CA), ενώ οι ειδικοί για κάθε αντίδραση εκκινητές καθώς και οι εκάστοτε συνθήκες αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει 44 επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους  $95^{\circ}\text{C}$
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους  $72^{\circ}\text{C}$ , έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, καθώς ο κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

Γονίδιο		Εκκινητές	Μεγεθος Προϊόντος (bp)	Tm	Κύκλοι
<b>MMP-2</b>	F	5'- TGATGGTGTCTGCTGGAAAG 3'	155	60	45
	R	5'- GAGGAAGCAAACCTCGAACA-3'			
<b>MMP-9</b>	F	5'- TTGACAGCGACAAGAAGTGG -3'	179	60	45
	R	5'- GCCATTCACGTCGTCCTTAT -3'			
<b>GAPDH</b>	F	5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT -3'	185	60	45
	R	5'- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG -3'			

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική RT-PCR για τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των αναφερθέντων γονιδίων καθώς και τα μεγέθη των προϊόντων, τα  $T_m$  των εκκινητών και οι κύκλοι ενίσχυσης της RT-PCR. Το stock διάλυμα των εκκινητών είχε συγκέντρωση 100pmol ενώ η συγκέντρωση στην τελική αντίδραση ήταν 20pmol.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιέχει:

➤ cDNA	→	2	μl
➤ SYBR Green	→	5	μl
➤ Εκκινητής Forward (20p/mol)	→	0,4	μl
➤ Εκκινητής Reverse (20p/mol)	→	0,4	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	2,2	μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
  - x κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature,  $T_m$ ) του κάθε εκκινητή για 30 δευτερόλεπτα
    - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

#### B.1.12 Στατιστική ανάλυση

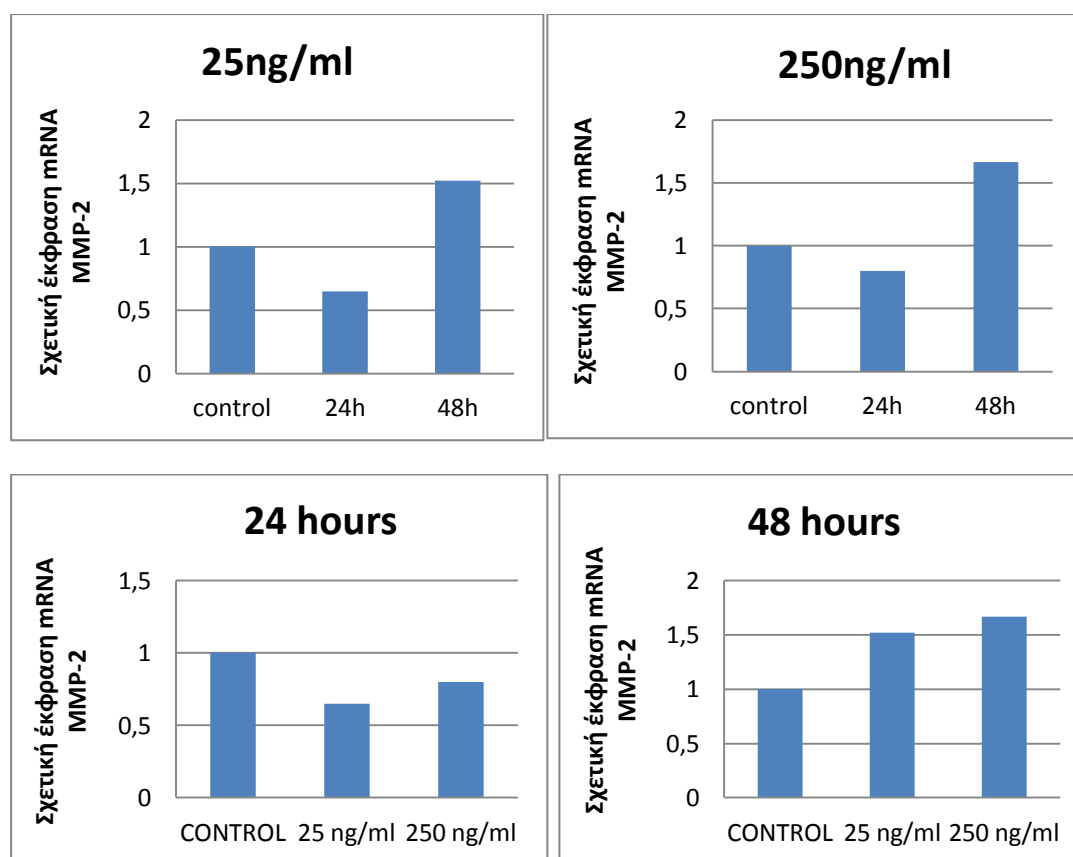
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS Statistics 11 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία ANOVA (analysis of variance) με Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ως post hoc test. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean + standard deviation, SD).

## B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### B.2.1 Επίδραση της αντιπνεκτίνης στη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο μητρικό ιστό

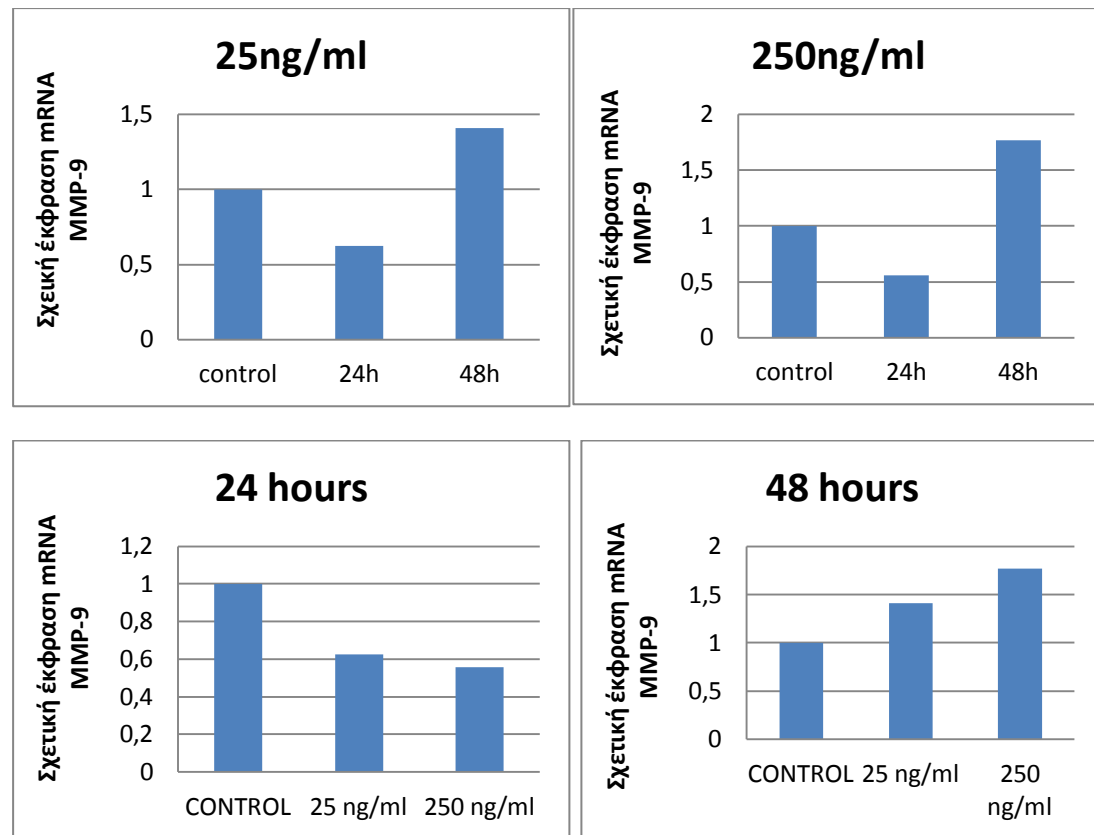
Για τη διερεύνηση του ρόλου της αντιπνεκτίνης (gAcrp30) στην τροφοβλαστική διείσδυση στο μητρικό ιστό πραγματοποιήθηκε επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις gAcrp30 (25ng/ml, 250ng/ml) σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων MMP2 και MMP9 μετά από 24h και 48h με χρήση της τεχνολογίας PCR πραγματικού χρόνου. Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων MMP2 και MMP9 στις συγκεντρώσεις των 25ng/ml και 250ng/ml μετά από 48h, ενώ αντίστοιχα διαπιστώθηκε μείωσή της μετά από 24h. Διαπιστώθηκε **δοσοεξαρτώμενη αλλά και χρονικά εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων MMP2 και MMP9.**

#### B.2.1a Έκφραση της MMP-2 μετά από επίδραση με αντιπνεκτίνη



Εικόνα 14. Ρύθμιση της έκφρασης του MMP-2 mRNA μετά από επίδραση με αντιπνεκτίνη (25ng/ml και 250ng/ml) στις 24h και 48h, (μη στατιστικά σημαντικά).

### Β.2.1β Έκφραση της MMP-9 μετά από επίδραση με αντιπονεκτίνη



Εικόνα 15. Ρύθμιση της έκφρασης του MMP-9 mRNA μετά από επίδραση με αντιπονεκτίνη (25ng/ml και 250ng/ml) στις 24h και 48h, (μη στατιστικά σημαντικά).

### B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθρώπινη εγκυμοσύνη συνδέεται με εκτεταμένη ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση της μήτρας και του πλακούντα. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα επιτρέπουν την εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο και ρυθμίζουν τη ροή του αίματος στον πλακούντα. Επομένως, η μετανάστευση και η διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο μητρικό ενδομήτριο αποτελούν τις κύριες διαδικασίες στην δημιουργία του πλακούντα και αποτελούν διαδικασίες αυστηρά χώρο-χρονικά καθορισμένες (Bischof and Campana 2000). Η διήθηση της τροφοβλάστης στο μητρικό φθαρτό και στις σπειροειδείς αρτηρίες ρυθμίζεται από την παραγωγή διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 – MMP16 (ζελατινάσες, κολλαγενάσες και στρομεολυσίνες), των φυσιολογικών ενεργοποιητών τους, όπως η πλασμίνη και των αναστολέων τους (TIMP1 και TIMP2) (Cohen and Bischof 2007). Πολλοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τη διεισδυτική ικανότητα των εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων, EVTs. Μερικές κυτοκίνες, όπως οι IL6, IL10, IL11, LIF, EGF, αγγειοτενσίνη II και λεπτίνη ρυθμίζουν την παραγωγή και την έκφραση των παραπάνω MMPs και TIMPs (Castellucci, De Matteis et al. 2000; Gonzalez, Devoto et al. 2001; Qiu, Yang et al. 2004; Araki-Taguchi, Nomura et al. 2008; Fitzgerald, McConnell et al. 2008). Η αντιγονεκτίνη είναι μία ακόμη κυτοκίνη που κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου (Caminos et al. 2005, Takemura et al. 2006b, Benaitreau et al. 2009, McDonald & Wolfe 2009). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι η αντιγονεκτίνη εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο, από το οποίο όμως εκφράζονται κυρίως οι AdipoRs. Επίσης η παρουσία της στην εμβρυο-μητρική επιφάνεια προέρχεται από το αίμα της μητέρας και τέλος συσχετίζεται με την παραγωγή και έκκρισή της από τους εμβρυικούς ιστούς (Corbetta, Bulfamante et al. 2005; Takemura, Osuga et al. 2006; Benaitreau, Dos Santos et al. 2010). Μελέτες έχουν αποδείξει την έκφραση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 σε πρώτου τριμήνου κύτταρα του πλακούντα, σε EVTs αλλά και σε κύτταρα τροφοβλάστης της κυτταρικής σειράς HTR-8/SVneo (Benaitreau, Dieudonne et al. 2009; Benaitreau, Dos Santos et al. 2010). Επίσης έχει δείχθει ότι η αντιγονεκτίνη προωθεί την μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων με δόσο-ανεξάρτητο τρόπο σε κύτταρα της σειράς HTR-8/SVneo καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων (Berner, Lyngstadaas et al. 2004; Dos Santos, Benaitreau et al. 2008; Benaitreau, Dieudonne et al. 2009; Benaitreau, Dos Santos et al. 2010). Μία πιθανή υπόθεση που θα μπορούσε

να εξηγήσει αυτή την παρατήρηση είναι ότι η αντιγονεκτίνη έχει την ικανότητα να καταστέλλει την παραγωγή των υποδοχέων της. Αυτή η ικανότητά της έχει ήδη παρατηρηθεί σε διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές (λιπώδης ιστός, κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων του προστάτη και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων του μαστού) (Bauche, Ait El Mkaem et al. 2006; Dos Santos, Benaitreau et al. 2008) καθώς και στον ανθρώπινο πλακούντα (Camino, Nogueiras et al. 2005; Mistry, Digby et al. 2006). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι σε τροφοβλαστικά κύτταρα της σειράς Bewo η αντιγονεκτίνη δεν επηρεάζει την AdipoR mRNA έκφραση στη χαμηλή συγκέντρωση των 25ng/ml για το χρονικό διάστημα των 24h. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η αντιγονεκτίνη δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της τροφοβλαστικής σειράς HTR-8/SVneo προτείνοντας ότι η αύξηση της μετανάστευσης δεν ωφείλεται σε αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα (Benaitreau, Dos Santos et al. 2010). Αυτό το αποτέλεσμα συνάδει με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Tang and Lu 2009), σε προγονικά επιθηλιακά κύτταρα (Nakamura, Naruse et al. 2009), ή σε κύτταρα χονδροσάρκωματος (Chiu, Shieh et al. 2009) και αφορούν στη θετική δράση της αντιγονεκτίνης στην κυτταρική μετανάστευση.

Η μετανάστευση της τροφοβλάστης είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διείσδυσή της στο μητρικό ιστό. Στα πειράματά μας μελετήσαμε τη δράση της αντιγονεκτίνης στη διεισδυτική συμπεριφορά τροφοβλαστικών κυττάρων δευτέρου τριμήνου. Σύμφωνα με την έκφραση των ζελατινασών MMP2 και MMP9 που ελέγχθηκαν, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν πως η αντιγονεκτίνη δρα θετικά στην τροφοβλαστική διείσδυση και μάλιστα με εξαρτώμενο τρόπο από τη δόσολογία της και το χρόνο επίδρασης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από μελέτες όπου έχει δειχθεί η δράση της αντιγονεκτίνης στη ρύθμιση αυτών των MMPs αλλά και των TIMPs σε τροφοβλαστικά κύτταρα της σειράς HTR-8/SVneo και σε ανθρώπινα EVTs (Benaitreau, Dos Santos et al. 2010), καθώς και σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα και μακροφάγα (Kumada, Kihara et al. 2004).

Ως προς τον μοριακό μηχανισμό της δράσης της αντιγονεκτίνης στην τροφοβλαστική διείσδυση, έχει αποδειχθεί σε κύτταρα της σειράς HTR-8/SVneo, πως το μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω AMPK δεν κατέχει ρόλο σε αυτήν (Kadowaki and Yamauchi 2005). Επί προσθέτως, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι σε δύο ανθρώπινες τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές JEG-3 και BeWo, η αντιγονεκτίνη άσκησε



αντιμιτωτική δράση μέσω των MAPK και PI3K σηματοδοτικών μονοπατιών (Benaitreau, Dieudonne et al. 2009).

Επίσης, η μειωμένη πλακουντιακή ανάπτυξη λόγω της μειωμένης τροφοβλαστικής διείσδυσης, συνδέεται με καταστάσεις προεκλαμψίας και ενδομητρικής αναπτυξιακής καθυστέρησης. Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στις συγκεντρώσεις της αντιγονεκτίνης στο πλάσμα σε γυναίκες με προεκλαμψία, προσδίδοντάς της ρόλο στη διείσδυση της τροφοβλάστης (Takemura, Osuga et al. 2006; Nien, Mazaki-Tovi et al. 2007; Fasshauer, Seeger et al. 2008; Herse, Bai et al. 2009).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε πως η αντιγονεκτίνη ενισχύει τη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο μητρικό ιστό, αυξάνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2 και MMP9 και της προτείνει έναν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της δημιουργίας του πλακούντα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Araki-Taguchi, M., S. Nomura, et al. (2008). "Angiotensin II mimics the hypoxic effect on regulating trophoblast proliferation and differentiation in human placental explant cultures." Life Sci **82**(1-2): 59-67.
- Baker, A. H., D. R. Edwards, et al. (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3719-3727.
- Banerjee, P. and A. T. Fazleabas (2010). "Endometrial responses to embryonic signals in the primate." Int J Dev Biol **54**(2-3): 295-302.
- Bauche, I. B., S. Ait El Mkaem, et al. (2006). "Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1414-1424.
- Beltowski, J. (2003). "Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue." Med Sci Monit **9**(2): RA55-61.
- Benaitreau, D., M. N. Dieudonne, et al. (2009). "Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo." Biol Reprod **80**(6): 1107-1114.
- Benaitreau, D., E. Dos Santos, et al. (2010). "Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells." Reprod Biol Endocrinol **8**: 128.
- Berner, H. S., S. P. Lyngstadaas, et al. (2004). "Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells." Bone **35**(4): 842-849.
- Bischof, P. and A. Campana (2000). "Molecular mediators of implantation." Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **14**(5): 801-814.
- Bischof, P., M. Martelli, et al. (1995). "Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion." Early Pregnancy **1**(4): 263-269.
- Brew, K., D. Dinakarpandian, et al. (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 267-283.
- Brosens, I., R. Campo, et al. (2002). "Reproductive disorders affecting fertility in endometriosis." Reprod Biomed Online **4 Suppl 3**: 59-63.
- Brosens, J. J., N. Hayashi, et al. (1999). "Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells." Endocrinology **140**(10): 4809-4820.
- Burrows, T. D., A. King, et al. (1996). "Trophoblast migration during human placental implantation." Hum Reprod Update **2**(4): 307-321.
- Caminos, J. E., R. Nogueiras, et al. (2005). "Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4276-4286.
- Campos, D. B., M. F. Palin, et al. (2008). "The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility." Int J Obes (Lond) **32**(2): 223-231.
- Carson, D. D., I. Bagchi, et al. (2000). "Embryo implantation." Dev Biol **223**(2): 217-237.
- Castellucci, M., R. De Matteis, et al. (2000). "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion." Mol Hum Reprod **6**(10): 951-958.
- Chandran, M., S. A. Phillips, et al. (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" Diabetes Care **26**(8): 2442-2450.
- Chinetti, G., C. Zawadzki, et al. (2004). "Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR." Biochem Biophys Res Commun **314**(1): 151-158.
- Chiu, Y. C., D. C. Shieh, et al. (2009). "Involvement of AdipoR receptor in adiponectin-induced motility and alpha2beta1 integrin upregulation in human chondrosarcoma cells." Carcinogenesis **30**(10): 1651-1659.

- Cohen, M. and P. Bischof (2007). "Factors regulating trophoblast invasion." Gynecol Obstet Invest **64**(3): 126-130.
- Cohen, M., A. Meisser, et al. (2006). "Metalloproteinases and human placental invasiveness." Placenta **27**(8): 783-793.
- Conde, J., M. Scotece, et al. (2011). "Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity." Biofactors **37**(6): 413-420.
- Coppack, S. W. (2001). "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue." Proc Nutr Soc **60**(3): 349-356.
- Corbetta, S., G. Bulfamante, et al. (2005). "Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2397-2402.
- Crouch, M. F. and L. Simson (1994). "The GTP-binding protein Gi alpha 2 is directly linked to and substrate of a serine kinase in Balb/c3T3 cells." Cell Signal **6**(6): 695-706.
- D'Ippolito, S., C. Tersigni, et al. (2012). "Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy." Biofactors **38**(1): 14-23.
- de Castro, J., J. Sevillano, et al. (2011). "Implication of low level inflammation in the insulin resistance of adipose tissue at late pregnancy." Endocrinology **152**(11): 4094-4105.
- Dimitriadis, E., C. A. White, et al. (2005). "Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation." Hum Reprod Update **11**(6): 613-630.
- Dominguez, F., M. Yanez-Mo, et al. (2005). "Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?" FASEB J **19**(9): 1056-1060.
- Dos Santos, E., D. Benaitreau, et al. (2008). "Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells." Oncol Rep **20**(4): 971-977.
- Fasshauer, M., J. Seeger, et al. (2008). "Serum levels of the adipokine adipocyte fatty acid-binding protein are increased in preeclampsia." Am J Hypertens **21**(5): 582-586.
- Fitzgerald, S. P., R. I. McConnell, et al. (2008). "Simultaneous analysis of circulating human cytokines using a high-sensitivity cytokine biochip array." J Proteome Res **7**(1): 450-455.
- Fu, Y., N. Luo, et al. (2005). "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." J Lipid Res **46**(7): 1369-1379.
- Gavrilu, A., J. L. Chan, et al. (2003). "Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4823-4831.
- Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." Genome Res **6**(10): 995-1001.
- Godbole, G., P. Suman, et al. (2011). "Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion." Fertil Steril **95**(4): 1278-1283.
- Gonzalez, R. R., L. Devoto, et al. (2001). "Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases." Endocrine **15**(2): 157-164.
- Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-1022.
- Gu, W. and Y. Li (2012). "The therapeutic potential of the adiponectin pathway." BioDrugs **26**(1): 1-8.
- Guzeloglu-Kayisli, O., M. Basar, et al. (2007). "Basic aspects of implantation." Reprod Biomed Online **15**(6): 728-739.
- Henson, M. C., K. F. Swan, et al. (1998). "Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term." Obstet Gynecol **92**(6): 1020-1028.

- Herse, F., Y. Bai, et al. (2009). "Circulating and uteroplacental adipocytokine concentrations in preeclampsia." Reprod Sci **16**(6): 584-590.
- Higuchi, T., H. Kanzaki, et al. (1995). "Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells." Endocrinology **136**(11): 4973-4981.
- Hoggard, N., P. Haggarty, et al. (2001). "Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role?" Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 57-63.
- Hubrecht, A. A. W (1899) . Studies on mammalian embryology. J Microb. Sci.30,283-404
- Huypens, P. R. (2007). "Leptin and adiponectin regulate compensatory beta cell growth in accordance to overweight." Med Hypotheses **68**(5): 1134-1137.
- Irwin, J. C., L. F. Suen, et al. (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 decidua:trophoblast interface during human implantation." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2060-2064.
- Isaka, K., S. Usuda, et al. (2003). "Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts." Placenta **24**(1): 53-64.
- Johnson, M. H. and J. M. McConnell (2004). "Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis." Semin Cell Dev Biol **15**(5): 583-597.
- Jones, H. N., T. Jansson, et al. (2010). "Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells." Diabetes **59**(5): 1161-1170.
- Jovanovic, M. and L. Vicovac (2009). "Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line." Placenta **30**(4): 320-328.
- Kadowaki, T. and T. Yamauchi (2005). "Adiponectin and adiponectin receptors." Endocr Rev **26**(3): 439-451.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, et al. (2006). "Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome." J Clin Invest **116**(7): 1784-1792.
- Kajantie, E., T. Hytinen, et al. (2004). "Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 4031-4036.
- Kajantie, E., R. Kaaja, et al. (2005). "Adiponectin concentrations in maternal serum: elevated in preeclampsia but unrelated to insulin sensitivity." J Soc Gynecol Investig **12**(6): 433-439.
- Kelesidis, I., T. Kelesidis, et al. (2006). "Adiponectin and cancer: a systematic review." Br J Cancer **94**(9): 1221-1225.
- Kharroubi, I., J. Rasschaert, et al. (2003). "Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1118-1122.
- Kodaman, P. H. and H. S. Taylor (2004). "Hormonal regulation of implantation." Obstet Gynecol Clin North Am **31**(4): 745-766, ix.
- Kondo, H., I. Shimomura, et al. (2002). "Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome." Diabetes **51**(7): 2325-2328.
- Kotani, Y., I. Yokota, et al. (2004). "Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight." Clin Endocrinol (Oxf) **61**(4): 418-423.
- Krussel, J. S., P. Bielfeld, et al. (2003). "Regulation of embryonic implantation." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **110 Suppl 1**: S2-9.
- Kumada, M., S. Kihara, et al. (2004). "Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages." Circulation **109**(17): 2046-2049.
- Lindsay, R. S., J. D. Walker, et al. (2003). "Adiponectin is present in cord blood but is unrelated to birth weight." Diabetes Care **26**(8): 2244-2249.

- Lockwood, C. J., G. Krikun, et al. (1998). "Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal." Endocrinology **139**(11): 4607-4613.
- Lopata, A., U. Bentin-Ley, et al. (2002). ""Pinopodes" and implantation." Rev Endocr Metab Disord **3**(2): 77-86.
- Loregger, T., J. Pollheimer, et al. (2003). "Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast--a review." Placenta **24 Suppl A**: S104-110.
- Lunghi, L., M. E. Ferretti, et al. (2007). "Control of human trophoblast function." Reprod Biol Endocrinol **5**: 6.
- Lyall, F., H. Simpson, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction." Am J Pathol **159**(5): 1827-1838.
- Mantzoros, C., E. Petridou, et al. (2004). "Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborns." Eur J Endocrinol **151**(6): 741-746.
- Martin, L. J., J. G. Woo, et al. (2006). "Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors." Am J Clin Nutr **83**(5): 1106-1111.
- Massova, I., L. P. Kotra, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification." FASEB J **12**(12): 1075-1095.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, et al. (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." Nat Med **3**(9): 1029-1033.
- Mazaki-Tovi, S., H. Kanety, et al. (2007). "Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy." J Perinatol **27**(2): 77-81.
- McCormack, F. (1997). "The structure and function of surfactant protein-A." Chest **111**(6 Suppl): 114S-119S.
- McDonald, E. A. and M. W. Wolfe (2011). "The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface." Am J Reprod Immunol **66**(2): 128-136.
- Meisser, A., D. Chardonens, et al. (1999). "Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases." Mol Hum Reprod **5**(3): 252-260.
- Menzaghi, C., T. Ercolino, et al. (2002). "A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome." Diabetes **51**(7): 2306-2312.
- Minas, V., D. Loutradis, et al. (2005). "Factors controlling blastocyst implantation." Reprod Biomed Online **10**(2): 205-216.
- Mistry, T., J. E. Digby, et al. (2006). "The regulation of adiponectin receptors in human prostate cancer cell lines." Biochem Biophys Res Commun **348**(3): 832-838.
- Mitchell, M., D. T. Armstrong, et al. (2005). "Adipokines: implications for female fertility and obesity." Reproduction **130**(5): 583-597.
- Modi, D. N., G. Godbole, et al. (2012). "Endometrial biology during trophoblast invasion." Front Biosci (Schol Ed) **4**: 1151-1171.
- Nachtigall, M. J., H. J. Kliman, et al. (1996). "The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation." J Clin Endocrinol Metab **81**(2): 801-806.
- Nakamura, N., K. Naruse, et al. (2009). "Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1." FEBS Lett **583**(15): 2457-2463.
- Nien, J. K., S. Mazaki-Tovi, et al. (2007). "Adiponectin in severe preeclampsia." J Perinat Med **35**(6): 503-512.

- Norwitz, E. R., D. J. Schust, et al. (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." N Engl J Med **345**(19): 1400-1408.
- Oliver, C., M. J. Montes, et al. (1999). "Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts." Hum Reprod **14**(6): 1599-1605.
- Oshima, K., A. Nampei, et al. (2005). "Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 520-526.
- Ouchi, N., H. Kobayashi, et al. (2004). "Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells." J Biol Chem **279**(2): 1304-1309.
- Pajvani, U. B., X. Du, et al. (2003). "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity." J Biol Chem **278**(11): 9073-9085.
- Pajvani, U. B., M. Hawkins, et al. (2004). "Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity." J Biol Chem **279**(13): 12152-12162.
- Qiu, Q., M. Yang, et al. (2004). "EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways." Reproduction **128**(3): 355-363.
- Ryan, A. S., D. M. Berman, et al. (2003). "Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity." Diabetes Care **26**(8): 2383-2388.
- Salamonsen, L. A., E. Dimitriadis, et al. (2003). "Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review." Placenta **24 Suppl A**: S76-85.
- Senaris, R., T. Garcia-Caballero, et al. (1997). "Synthesis of leptin in human placenta." Endocrinology **138**(10): 4501-4504.
- Shimonovitz, S., A. Hurwitz, et al. (1998). "Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone." Am J Obstet Gynecol **178**(3): 457-461.
- Shinoda, Y., M. Yamaguchi, et al. (2006). "Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways." J Cell Biochem **99**(1): 196-208.
- Staun-Ram, E., S. Goldman, et al. (2004). "Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion." Reprod Biol Endocrinol **2**: 59.
- Takahashi, M., Y. Arita, et al. (2000). "Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin." Int J Obes Relat Metab Disord **24**(7): 861-868.
- Takemura, Y., Y. Osuga, et al. (2006). "Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium." Endocrinology **147**(7): 3203-3210.
- Tang, C. H. and M. E. Lu (2009). "Adiponectin increases motility of human prostate cancer cells via adipoR, p38, AMPK, and NF-kappaB pathways." Prostate **69**(16): 1781-1789.
- Tie, W., H. Yu, et al. (2009). "Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia." Reprod Sci **16**(7): 676-684.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.
- Vionnet, N., E. H. Hani, et al. (2000). "Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24." Am J Hum Genet **67**(6): 1470-1480.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-2133.

- Wong, G. W., J. Wang, et al. (2004). "A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10302-10307.
- Xu, P., Y. L. Wang, et al. (2000). "Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester." Biol Reprod **62**(4): 988-994.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-769.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." J Biol Chem **278**(4): 2461-2468.
- Yang, H., R. Zhang, et al. (2006). "Adiponectin promotes endothelial cell differentiation from human peripheral CD14+ monocytes in vitro." J Cell Mol Med **10**(2): 459-469.
- Yu, W. H., S. Yu, et al. (2000). "TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix." J Biol Chem **275**(40): 31226-31232.
- Yura, S., N. Sagawa, et al. (2003). "Resistin is expressed in the human placenta." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 1394-1397.
- Zavalza-Gomez, A. B., R. Anaya-Prado, et al. (2008). "Adipokines and insulin resistance during pregnancy." Diabetes Res Clin Pract **80**(1): 8-15.
- Zhou, Y., S. J. Fisher, et al. (1997). "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?" J Clin Invest **99**(9): 2139-2151.

