



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επικοινωνία εμβρύου – μήτρας»**

.....

.....

Τουρνά Ιωάννα  
Μοριακός Βιολόγος και Γενετιστής

ΛΑΡΙΣΑ  
Σεπτέμβριος 2016

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής  
Μέλος: Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής  
Μέλος: Γεώργιος – Σπυρίδων Ανυφαντής, Λέκτορας

**Περιεχόμενα:**

Εισαγωγή.....	σελ. 5 έως 24
Πρόλογος.....	σελ. 5
1. Δημιουργία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.....	σελ. 6 έως 12
2. Εμμηνορρυσιακός κύκλος.....	σελ. 12 έως 14

3. Διαδικασία της αναπαραγωγής.....	σελ. 15	εώς 18
4. Μεταφορά εμβρύου από ωαγωγό στη μήτρα.....	σελ. 19	εώς 24
4.1 Φυσιολογία της σαλπγγικής μεταφοράς: κινητικότητα βλεφαρίδων, μυική συσταλτικότητα και σαλπγγικό υγρό.....	σελ. 19	
4.2 Κινητικότητα βλεφαρίδων.....	σελ. 20	εώς 22
4.3 Μυική συσταλτικότητα.....	σελ. 23	
4.4 Σαλπγγικό υγρό.....	σελ. 23	εώς 24
Κύριο Μέρος.....	σελ. 24	εώς 84
Πρόλογος.....	σελ. 24	εώς 25
1. “Παράθυρο Εμφύτευσης”.....	σελ. 25	εώς 29
1.1 “Παράθυρο” δεκτικότητας ενδομητρίου.....	σελ. 25	εώς 26
1.2 Η λειτουργικότητα της βλαστοκύστης και η δεκτικότητα της μήτρας καθορίζουν το “παράθυρο” εμφύτευσης.....	σελ. 27	
1.3 Αναπτυξιακές αλλαγές στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια “παραθύρου” της εμφύτευσης.....	σελ. 27	εώς 29
1.3.1 Δομικοί μάρτυρες.....	σελ. 27	
1.3.2 Στρώμα γλυκοκαλίξης (glycocalyx) και MUC-1 πρωτεΐνη στην επιθηλιακή επιφάνεια.....	σελ. 27	εώς 28
1.3.3 Ιντεγκρίνες.....	σελ. 28	
1.3.4 Προσκόλληση βλαστοκύστης.....	σελ. 28	
2. Προσαρμογή Μήτρας.....	σελ. 28	εώς 29
3. Πινοπόδια.....	σελ. 29	εώς 30
4. Μηχανισμοί Εμφύτευσης.....	σελ. 31	εώς 84
4.1 Προεμφυτευτική εμβρυική ανάπτυξη και η παράθεση (apposition) της βλαστοκύστης στη μήτρα.....	σελ. 31	εώς 45
4.1.1 Εμβρυικά σήματα και υποδοχείς.....	σελ. 31	εώς 42
4.1.2 Υποδοχείς κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων.....	σελ. 42	εώς 43
4.1.3 Ενδομητρικοί παράγοντες.....	σελ. 43	εώς 44
4.1.4 Γονιδιωματική προσέγγιση.....	σελ. 44	εώς 45
4.2 Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM).....	σελ. 45	εώς 55
4.2.1 Ιντεγκρίνες.....	σελ. 45	εώς 47
4.2.2 Σελεκτίνες.....	σελ. 47	εώς 48
4.2.3 Καδερίνες.....	σελ. 48	εώς 49
4.2.4 Ανοσογλοβουλίνες.....	σελ. 49	εώς 50
4.2.5 Βλεννίνες (Mucins).....	σελ. 50	εώς 52
4.2.6 Προσταγλανδίνες.....	σελ. 52	εώς 55
4.3 Παράγοντες που εμπλέκονται στην τροφοβλαστική εισχώρηση και ο έλεγχος τους.....	σελ. 56	εώς 66
4.3.1 Η διαδικασία της εισχώρησης και η διαφοροποίηση τροφοβλάστης.....	σελ. 56	εώς 57
4.3.2 Ο “διακόπτης” ιντεγκρινών στην κυτταροτροφοβλάστη.....	σελ. 57	εώς 58
4.3.3 Μεσολαβητές της εισχώρησης.....	σελ. 58	εώς 59
4.3.4 Παράγοντες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό και την εισχώρηση της τροφοβλάστης.....	σελ. 60	εώς 61
4.3.5 Περιοριστικοί παράγοντες διείσδυσης.....	σελ. 61	εώς 62
4.3.6 Παράγοντες που εμπλέκονται σε φλεγμονώδες αντιδράσεις.....	σελ. 62	εώς 64
4.3.7 Κυτοκίνες και ανοσοποιητική αντίδραση.....	σελ. 64	εώς 66
4.4 Ιοντικά κανάλια στο ενδομήτριο και η συμμετοχή τους στην διαδικασία της εμφύτευσης.....	σελ. 67	εώς 77
4.4.1 Κρίσιμα γεγονότα και παράγοντες που επηρεάζουν την ενδομητρική δεκτικότητα.....	σελ. 67	εώς 69

4.4.2 Ιοντικά κανάλια στο ενδομήτριο.....σελ. 67 έως 77	
4.5 Τοπικοί και συστημικοί παράγοντες.....σελ. 77 έως 82	
4.5.1 Δυσλειτουργία θυροειδούς.....σελ. 77 έως 78	
4.5.2 Έλλειψη βιταμίνης D.....σελ. 78	
4.5.3 Προλακτίνη.....σελ. 78 έως 79	
4.5.4 Φλεγμονώδης νόσος εντέρου.....σελ. 79	
4.5.5 Παχυσαρκία.....σελ. 79	
4.5.6 Κάπνισμα.....σελ. 79 έως 80	
4.5.7 Αυτοανοσία.....σελ. 80 έως 81	
4.6 Η δράση της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης στον συγχρονισμό της δημιουργίας και ανάπτυξης διεπαφής εμβρύου-ενδομητρίου.....σελ. 82 έως 84	
4.6.1 Ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση.....σελ. 82 έως 83	
4.6.2 Η αντίστοιχη ενδομητρική λειτουργία ως αποτέλεσμα της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης.....σελ. 83 έως 84	
4.6.3 Πρόωρη ωχρινοποίηση κατά τη διάρκεια IVF κύκλων.....σελ.84	
Συμπεράσματα/ Συζητήσεις.....σελ. 85 έως 88	
Βιβλιογραφία.....σελ. 89 έως 91	

## Εισαγωγή:

### Πρόλογος:

Η Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή αποτελεί τομέα της Μαιευτικής και Γυναικολογίας που γνώρισε τη μεγαλύτερη και ταχύτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Η εξωσωματική γονιμοποίηση ήταν η γόνιμη σπορά για την εν συνεχεία αλματώδη ανάπτυξη της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής σε μία προσπάθεια να γίνει η θεραπεία της υπογονιμότητας πιο αποτελεσματική και πιο προσιτή για τα περισσότερα ζευγάρια.

Η σύγχρονη αντίληψη πως η υπογονιμότητα είναι πρόβλημα «των ημερών μας» είναι αβάσιμη, όπως υποστηρίζουν οι επιστήμονες αφού στηρίζεται μόνο σε ενδείξεις. «Δεν υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι υπάρχει αύξηση. Το μόνο που φαίνεται να ισχύει, σύμφωνα με διεθνή αλλά και ελληνικά στοιχεία, είναι πως το 15% -20% των νιόπαντρων ζευγαριών δυσκολεύονται να αποκτήσουν παιδί» υπογραμμίζει ο κ. Μεσήνης.

Πολλά ζευγάρια, εσφαλμένα, νομίζουν πως η μόνη λύση για το πρόβλημα της υπογονιμότητας είναι η τεχνητή γονιμοποίηση. Αυτό όμως, σύμφωνα πάντα με τους ειδικούς, είναι η ύστατη και η πιο δαπανηρή λύση, η οποία πρέπει να επιλέγεται άμεσα μόνο εάν η γυναίκα έχει ξεπεράσει το 35ο έτος της ηλικίας της καθώς η πιθανότητα να μείνει έγκυος μειώνεται πολύ υπό φυσιολογικούς λόγους όπως π.χ. η ποιότητα των ωαρίων. Τριάντα χρόνια πέρασαν από την ημέρα που οι Βρετανοί επιστήμονες Robert Edward και Patrick Steptoe κατάφεραν να φέρουν στο κόσμο το πρώτο παιδί του σωλήνα, το 1978, τη Louise Brown. Η επιτυχημένη αυτή διαδικασία αποτέλεσε το ορόσημο, γιατί έδωσε άμεση πρόσβαση στους ανθρώπινους γαμέτες, τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια και κατ' επέκταση στο γενετικό υλικό που φέρουν μέσα τους. Έτσι έγινε δυνατό να μελετηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί που διέπουν την ωοθυλακική ανάπτυξη, την ωρίμανση των ωοθυλακίων /ωαρίων και των σπερματοζωαρίων, τη διαδικασία της γονιμοποίησης, την πρόωμη εμβρυική ανάπτυξη, καθώς και την εμφύτευση. Επιπλέον, έδωσε τη δυνατότητα σε χιλιάδες άτεκνα ζευγάρια να αποκτήσουν ένα παιδί, αλλά και σε πολλά ζευγάρια βεβαρημένα με κάποιο γενετικό νόσημα να αποκτήσουν ένα υγιές παιδί.

Παγκόσμιες επιστημονικές κοινότητες όπως European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), η American Society of Reproductive Medicine (ASRM) και η Society of Gynaecologic Investigation (SGI), αντιμετωπίζουν την ανθρώπινη υπογονιμότητα υποστηρίζοντας πειραματικές και πρακτικές έρευνες και αποφασίζουν τις οδηγίες για κλινική πρακτική στον τομέα του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος και την θεραπεία της υπογονιμότητας εφαρμόζοντας την τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART).

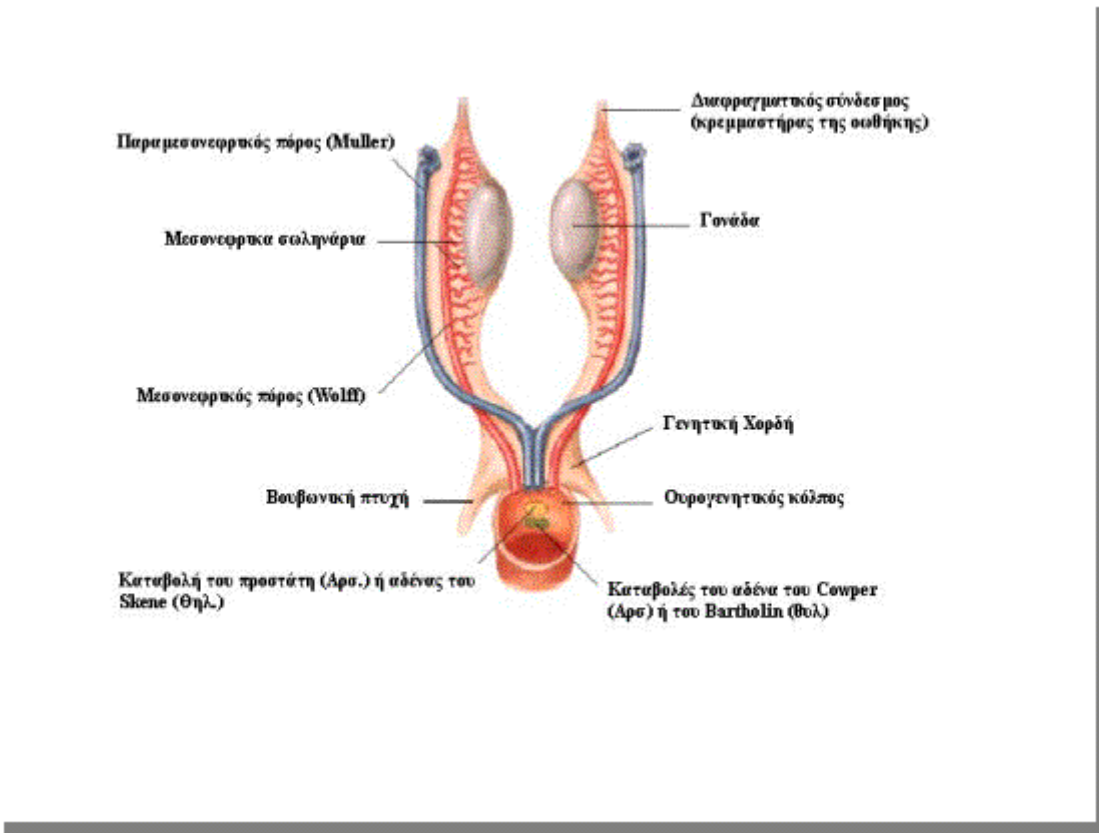
Επομένως η αναπαραγωγή είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ζωής και δυστυχώς παρόλη την εργαστηριακή και ιατρική πρόοδο που υπήρξε στην διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης, πρέπει να παραδεχτούμε πως πολλά “μονοπάτια” παραμένουν δύσβατα. Μέχρι σήμερα, η μοριακή βάση της εμβρυικής προεμφυτευτικής ανάπτυξης, η μετάβαση μέσω του ωαγωγού κατευθείαν στην μήτρα και η επακόλουθη εμφύτευση σε ένα δεκτικό μητρικό ενδομήτριο για να εξασφαλιστεί επιτυχώς εγκυμοσύνη, δεν είναι καλά διεκρινισμένα.

Ένα από αυτά που επικαλούμαι να καλύψω σ' αυτήν την εργασία, αποτελεί η περίοδος της μεταφοράς εμβρύων/βλαστοκύστεων στην μήτρα και φυσικά η επικοινωνία ανάμεσα τους προκειμένου να αντιληφθούμε μερικούς από τους λόγους που δεν επιτυγχάνεται η εμφύτευση και κατ'επέκταση η κύηση.

Στην παρακάτω εργασία είναι άκρως αναγκαίο να αναφερθούν συνοπτικά η εμβρυική ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, οι διαδικασίες και οι ορμονικές μεταβολές που υφίσταται ο γυναικείος οργανισμός για την διαδικασία της αναπαραγωγής (εμμηνορυσιακός/γεννητικός κύκλος, γονιμοποίηση και εμφύτευση).

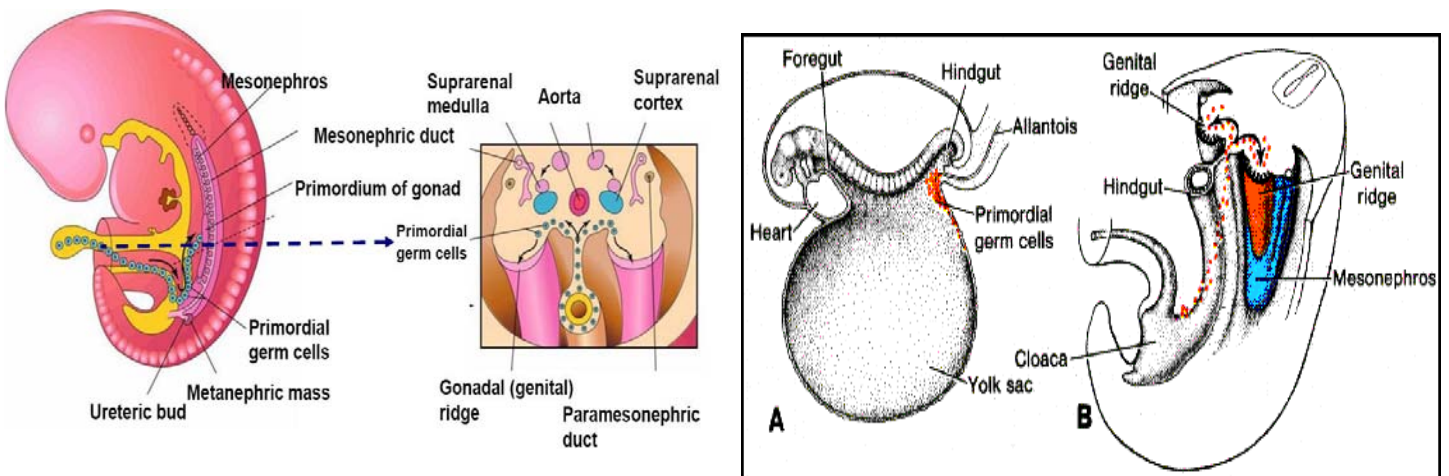
**1) Δημιουργία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος:**

Στον άνθρωπο, η σεξουαλική ανάπτυξη αρχίζει την 6η εβδομάδα της κύησης. Οι σάλπιγγες, η μήτρα και ο κόλπος είναι παραμεσονεφρικής προέλευσης (πόροι του mueller). Οι μεσονεφρικοί πόροι (πόροι του wolffius) επίσης συμμετέχουν στην ανάπτυξη του κόλπου. Τα άνω μέρη των πόρων του mueller διαφοροποιούν τους σαλπινγικούς σωλήνες.



Εικόνα 1: Οι μεσονεφρικοί και παραμεσονεφρικοί πόροι κατά τη δημιουργία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος

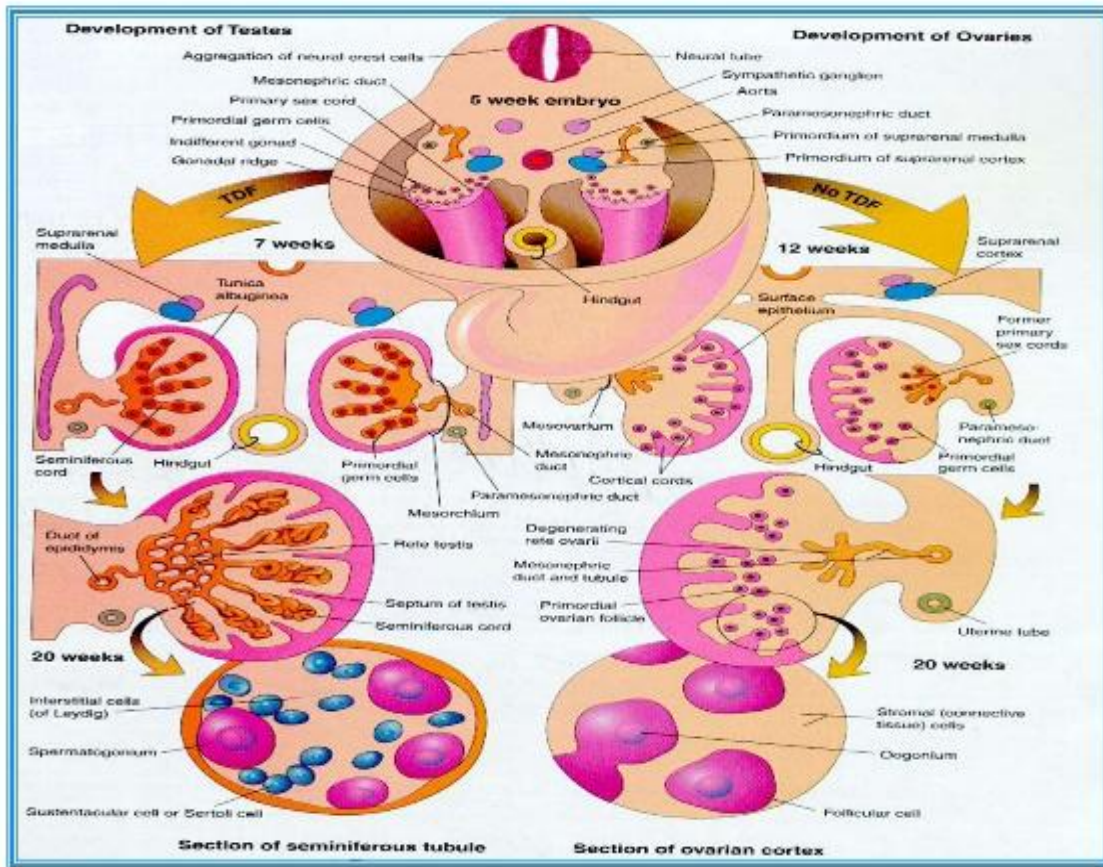
Οι ωθήκες προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα (από την κοιλωματική επιφάνεια της γεννητικής ακρολοφίας) και από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Μεταξύ της 5ης και 6ης εβδομάδας κύησης, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν εντός των αδιαφοροποίητων γεννητικών γονάδων όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Μετανάστευση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων

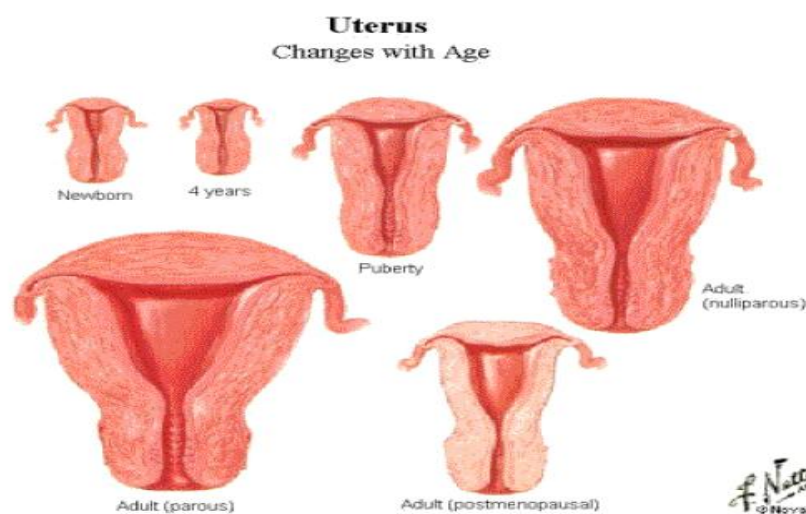
Τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στην 1η μειωτική τους διαίρεση και ματατρέπονται πλέον σε

γαμετοκύτταρα/ωοκύτταρα (έχοντας περίπου  $6 \times 10^6$  γαμετοκύτταρα την 12η εβδομάδα κύησης). Αυτά τα πρώιμα ωοκύτταρα παραμένουν στο στάδιο μεταξύ μιτωτικής προ- και μετάφασης μέχρι την ενηλικίωση.



Εικόνα 3: Η επακόλουθη μειωτική διαίρεση των ωοκυττάρων

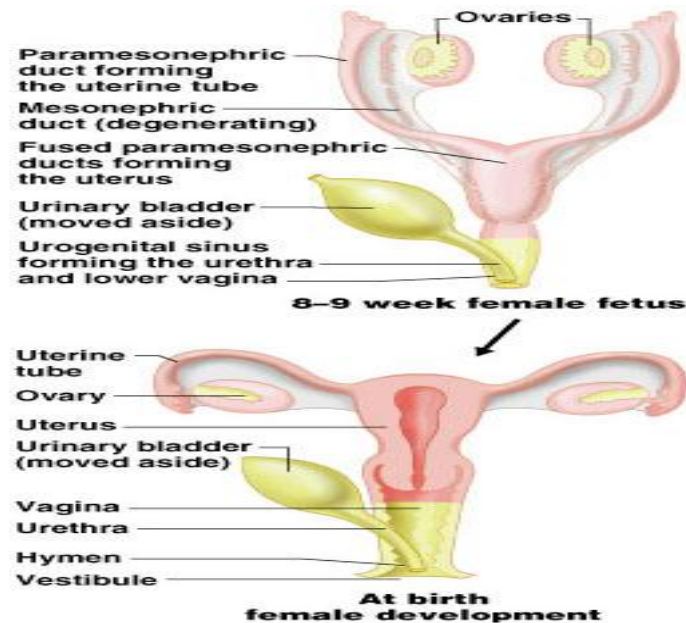
Στην διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, η μήτρα αλλάζει σχήμα και μέγεθος καθώς οι παραμεσονεφρικοί πόροι συγχωνεύονται από κάτω προς τα άνω και τα εραπτόμενα τμήματα διαλύονται για να σχηματισθεί μία και μόνη κοιλότητα.



Εικόνα 4: Αλλαγές σχήματος και μεγέθους μήτρας με την πάροδο των χρόνων

Το κάτω τμήμα του μητροκολπικού σωλήνα παραμένει συμπαγές μετά το σχηματισμό της κοιλότητας της μήτρας και ονομάζεται μητροκολπική χορδή. Στη συνέχεια κατέρχεται και

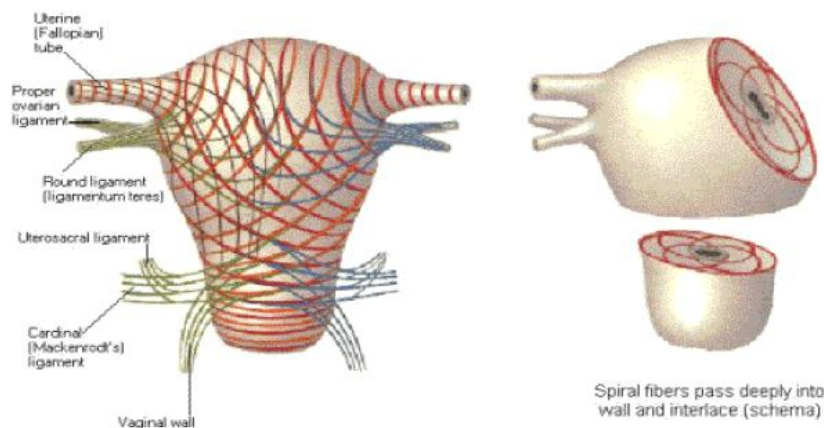
προβάλλει στο ραχιαίο τοίχωμα του ουρογεννητικού κόλπου για να σχηματισθεί το μυλλέριο φύμα όπου και θα εντοπισθεί τελικά ο παρθενικός υμένας. Το μυλλέριο φύμα σχηματίζεται από το μητροκολπικό σωλήνα μαζί με το επιθήλιο του έσω βλαστικού δέρματος του ουρογεννητικού κόλπου. Ο παρθενικός υμένας προέρχεται από το επιθήλιο του ουρογεννητικού κόλπου. Η μητροκολπική χορδή κοιλάνεται με αυτόλυση της κεντρικής της περιοχής για να σχηματισθεί ο κόλπος. Το άνω τμήμα (ένα τρίτο) του κόλπου προέρχεται από το μητροκολπικό σωλήνα ενώ το περιφερικό τμήμα (κατώτερα δύο τρίτα) προέρχεται από το επιθήλιο του έσω βλαστικού δέρματος (ενδόδερμα) του ουρογεννητικού κόλπου, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Ο σχηματισμός κόλπου, τραχήλου και μήτρας

Σ'αυτή τη φάση είναι ανιχνεύσιμη η δημιουργία στρωμάτων και στην 20η εβδομάδα κύησης αναπτύσσονται λεία μυικά κύτταρα στο μυικό στρώμα (μυομήτριο), αυξάνοντας κατά τη διάρκεια του δεύτερου ήμισυ της κύησης έχοντας ως αποτέλεσμα το σχήμα αχλαδιού της μήτρας που παρατηρείται στις ενήλικες γυναίκες.

### Uterus Schema of Musculature

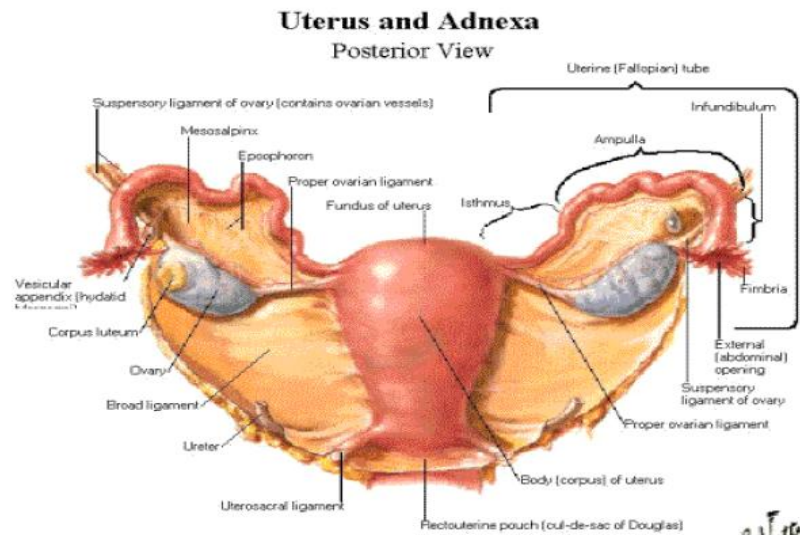


Εικόνα 6: Οι πτυχές του μυομητρίου

Πριν την 20η εβδομάδα κύησης, η μητρική κοιλότητα του ανθρώπινου εμβρύου είναι ευθυγραμμισμένη με ένα επιθηλιακό στρώμα δίχως αδένες. Στα μέσα της κύησης, το επιθηλιακό



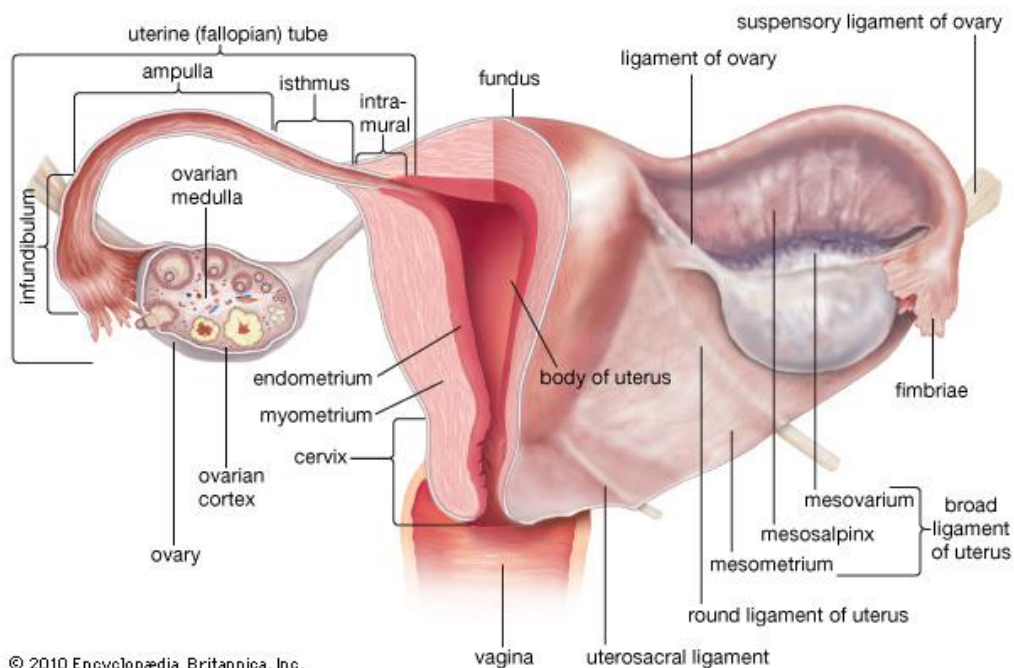
στρώμα της κοιλότητας σχηματίζει “σακούλες” από κύτταρα που αναπτύσσονται σε βαθύτερο μεσέγγυμα, το οποίο μετατρέπεται σε αδένες την 7η εβδομάδα κύησης. Σ'αυτή τη περίοδο, το ενδομήτριο ανταποκρίνεται σε υψηλά επίπεδα στεροειδών ορμονών από τον πλακούντα. Τον 9ο μήνα της κύησης, το εμβρυικό ενδομήτριο είναι υπερτροφικό με οίδηματώδη στρώμα, αιμοφόρα αγγεία και ενεργώς εκκρινόμενους συσπειρωμένου αδένες. Στο νεογέννητο πλέον συναντάται ένα πολλαπλασιαστικό και εκκρινόμενο ενδομήτριο. Κατά την παιδική ηλικία, η μήτρα μεγαλώνει κυρίως στο σώμα και οι επιμηκισμένοι αδένες πλησιάζουν στην βασική μεμβράνη του ενδομητρίου. Μετά την εφηβεία, η μητρική ανάπτυξη (ενδομητρική και μυομητρική) υποκινείται από την κυκλοφορία της οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (P4), έτσι ώστε το σώμα να γίνει μεγαλύτερο από τον τράχηλο, όπως υφίσταται στις ενήλικες.



Εικόνα 7: Ενήλικη δομή μήτρας

Στις ενήλικες, κάθε ωαγωγός είναι περίπου 13cm μακρής και αποτελείται από 4 περιοχές:

1. Διάμεσο. Είναι το στενότερο τμήμα της σάλπιγγας, βρίσκεται εντός του τοιχώματος της μήτρας και σχηματίζει τα στόμια των σαλπίγγων στην ενδομητρική κοιλότητα.
2. Ισθμός. Το στενό τμήμα της σάλπιγγας εγγύς του τοιχώματος της μήτρας.
3. Λύκηθος. Το ευρύτερο τμήμα της σάλπιγγας μετά τον ισθμό.
4. Κώδωνας. Το χοανοειδές κοιλιακό στόμιο των σαλπίγγων που επικοινωνεί με την περιτοναϊκή κοιλότητα. Αποτελείται στην περιφέρεια του από κροσσούς ( fimbriae) που αυξάνουν την επιφάνεια για την λήψη του ωαρίου. Ο ωθητικός κροσσός είναι μία σύνδεση μεταξύ του άκρου της σάλπιγγας και της ωθήκης, φέρνοντας με αυτόν τον τρόπο σε πιο στενή επαφή τις δύο αυτές δομές.



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

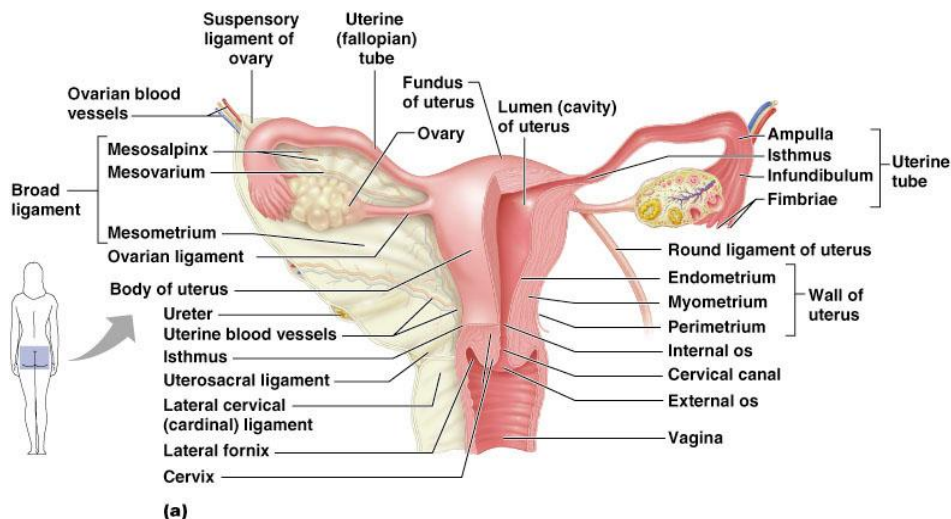
Εικόνα 8: Ανατομία σάλπιγγας

Ο βλεννογόνος της σάλπιγγας αποτελείται από κροσσωτό κυλινδρικό επιθήλιο. Το μυϊκό τοίχωμα αποτελείται από μία έσω κυκλοτερή και μία έξω επιμήκη στοιβάδα λείων μυϊκών ινών και συνδετικού ιστού. Η σάλπιγγα καλύπτεται με περιτόναιο και με το μεσοσαλπίγγιο συνδέεται με το άνω όριο του πλατέος συνδέσμου. Το βλεννογόνο σχηματίζει ένα περίπλοκο σύστημα από υψηλά διακλαδιζόμενες, ενδοσυνδεδεμένες, διαμήκεις αναδιπλώσεις στη λύκηθο, ομοιάζοντας με έναν λαμβύρινθο, με λιγότερου βαθμού διακλαδώσεις και αναδιπλώσεις κατά μήκος του σωλήνα μέχρι τον ισθμό. Ένα μοναδικό επιθηλιακό στρώμα ευθυγραμμίζει τον βλεννογόνο και αποτελείται από τριχοειδή και μη-τριχοειδή εκκρινόμενα κύτταρα. Τέλος, ο βλεννογόνος υποστηρίζεται από λεπτό αγγειακό στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού που ονομάζεται lamina propria (στρωματικό διαμέρισμα).

Η μήτρα διακρίνεται σε 3 ανατομικά μέρη:

1. σώμα (μητρική κοιλότητα/cavum uteri)
2. πυθμένας (η περιοχή της μήτρας πάνω από τα κέρατα)
3. ισθμός ( η περιοχή όπου ο ενδοτραχηλικός αυλός επικοινωνεί με την ενδομητρική κοιλότητα)

Το σώμα της μήτρας αποτελείται από τρία ιστολογικά στρώματα: το εσωτερικό ενδομήτριο, το μυϊκό μυομήτριο και το εξωτερικό περιτόναιο (ορογόνο). Το ενδομήτριο είναι βαθιά επηρεασμένο από αλλαγές στην κυκλοφορία των στεροειδών ορμονών (E2 και P4).



(a)

Εικόνα 9: Ανατομία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος

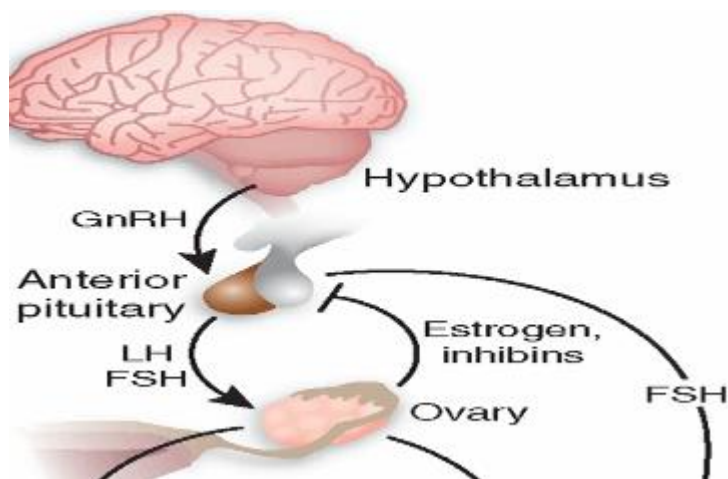
Το ενδομήτριο κατέχει μία περίπλοκη κυτταρική σύνθεση, συμπεριλαμβανομένων ενός επιθηλιακού στρώματος (glandular/αδενικό και luminal/κορυφαίο) από εκκρινόμενα και τριχοειδή κύτταρα, στρωματικούς ινοβλάστες, αγγειακό ενδοθήλιο και λείο μυϊκό ιστό, και ανοσοποιητικά κύτταρα. Το στρώμα του “luminal” (κορυφαίου) επιθηλίου βρίσκεται ανάμεσα στην μητρική κοιλότητα και στο βλεννογόνο του ενδομητρίου. Το “glandular” (αδενικό) επιθήλιο καλύπτει ελικοειδείς ή διακλαδιζόμενους αδένες όπου μπορούν να επεκταθούν τόσο βαθιά όσο οι συνδέσεις ενδομητρίου-μυομητρίου. Το στρωματικό διαμέρισμα (lamina propria) αποτελείται από στενά κυτταρικούς συνδετικούς ιστούς με μία εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που περιέχει μερικές συνδετικές ίνες και αναπαριστά το εμβρυικό μεσέγγυμα. Οι συνδέσεις ενδομητρίου-μυομητρίου είναι δυσδιάκριτες δίχως την παρέμβαση μίας υποβλεννογονίας μεμβράνης. Τμήματα του βασικού ενδομητρίου εκτείνονται στις εγγύς περιοχές του παρακείμενου μυομητρίου.

Το ενδομήτριο αποτελείται από 4 ιστολογικά διευκρινισμένες ζώνες:

1. 1η ζώνη όπου περιέχει luminal επιθήλιο και τα υπο-παρακείμενα του και είναι ένα πυκνά πακεταρισμένο στρώμα
2. 2η ζώνη αφορά το ανώτατο ενδομήτριο στο σημείο της περιοχής όπου οι αδένες είναι ευρέως αποκομμένοι από το στρώμα
3. 3η ζώνη είναι η μέση περιοχή των αδένων, απομμένοι από το στρώμα
4. 4η ζώνη, το βαθύτερο μέρος των αδένων στο ινωματώδες στρώμα, παρακείμενο στις συνδέσεις ενδομητρίου-μυομητρίου

Οι ζώνες 1 και 2 αποτελούν την επιφανειακή ή λειτουργική στιβάδα, ενώ οι ζώνες 3 και 4 σχηματίζουν την βασική ή εν τω βάθει στιβάδα. Στους ανθρώπους, η λειτουργική στιβάδα ανταποκρίνεται κλινικά στις ωοθηκικές στεροειδείς ορμόνες, είναι το σημείο όπου πραγματοποιείται η εμβρυική εμφύτευση και “κατεδαφίζεται” με την έμμηνο ρύση στην απουσία εμφύτευσης. Κύτταρα της βασικής στιβάδας συμπεριλαμβανομένων και των βλαστικών κυττάρων συμμετέχουν στην αναγέννηση του ιστού στο τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Η αρχή της εφηβείας συνδέεται με την υψηλή συγκέντρωση της υποθαλαμικής γοναδοτροφικής ορμόνης GnRH, ο παλμός απελευθέρωσης της οποίας ευθύνεται για την περαιτέρω απελευθέρωση της ωοθυλακικής ορμόνης FSH και ωχρινικής ορμόνης LH από τον πρόσθιο υποφυσιακό αδέντα καταλήγοντας στην ωοθυλακική ενεργοποίηση. Η λεπτίνη (leptin) είναι μία πρωτεϊνική ορμόνη υπεύθυνη για την θρέψη και τον μεταβολισμό όπως επίσης συσχετίζεται και με την αρχική δημιουργία του GnRH παλμού. Η δραστηριότητα του GnRH παλμού είναι κριτική για μία επιτυχής αναπαραγωγική λειτουργία μέχρι την εμμηνόπαυση.



Εικόνα 10: Σχηματισμός GnRH παλμού και μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης

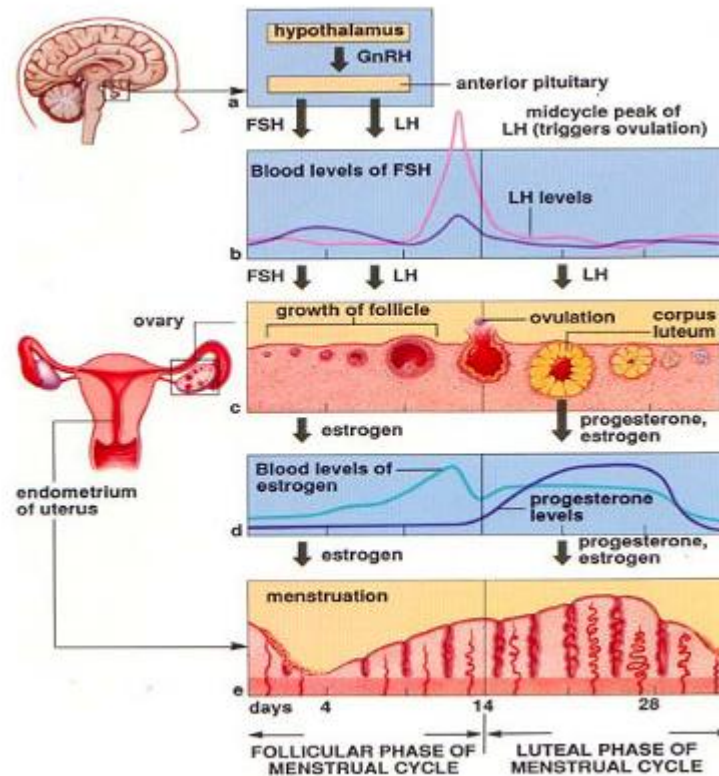
Οι σάλπιγγες και το ενδομήτριο είναι άκρως ευαίσθητα στις αλλαγές της κυκλοφορίας στεροειδών ορμονών E2 και P4, οι οποίες προέρχονται από τις ωθήκες και τον επινεφριδιακό φλοιό, καθορίζοντας τον εμμηνορυσιακό κύκλο. <sup>(3)</sup>

## 2) Εμμηνορυσιακός κύκλος:

Ο γεννητικός κύκλος δηλώνει ένα σύνολο ορμονικών μεταβολών κυκλικά επαναλαμβανόμενων. Οι μεταβολές αυτές είναι το αποτέλεσμα της αρμονικής συνεργασίας του υποθαλάμου, της υποφύσεως και των ωθηκών μέσω των μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορύθμισης. Ονομάζεται εμμηνορυσιακός κύκλος, αφού το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η έμμηνος ρύσις. Η διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου είναι 28 ημέρες (22-35 ημέρες). Ο γεννητικός κύκλος διαιρείται σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, που ονομάζεται ωοθυλακική, πραγματοποιείται η ωρίμανση του ωοθυλακίου από το μέγεθος των 5mm στο μέγεθος των 20mm (ώριμο γρααφιανό) μέσα σε διάστημα 14 ημερών περίπου. Το ώριμο γρααφιανό ωοθυλάκιο στη συνέχεια θα υποστεί ρήξη, διαδικασία η οποία ονομάζεται ωοθυλακιόρρηξη. Η ωοθυλακιόρρηξη σε κύκλο 28 ημερών συμβαίνει περίπου την 14η ημέρα. Από το χρονικό αυτό σημείο, αρχίζει η δεύτερη φάση του κύκλου που ονομάζεται ωχρινική, στη διάρκεια της οποίας το ωχρό σωματίο, που σχηματίστηκε από το ωοθυλάκιο, εμφανίζει μεταβολές στη λειτουργία του, δηλαδή ακμή και γήρανση με επακόλουθο την έμμηνιν ρύσιν. Η πρώτη φάση του γεννητικού κύκλου λέγεται και οιστρογονική φάση, λόγω της έκκρισης οιστρογόνων από το ωριμάζον ωοθυλάκιο, η δε δεύτερη φάση λέγεται και οιστρογόνο-προγεστερονική, λόγω της έκκρισης προγεστερόνης μαζί με τα οιστρογόνα από το ωχρό σωματίο.

Τόσο οι υποφυσιακές γοναδοτροφίνες όσο και τα ωθηκικά στεροειδή εμφανίζουν σημαντικές διακυμάνσεις της στάθμης τους στο αίμα κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μικρή αύξηση της στάθμης της FSH στο αίμα αρχίζει κατά την ωχρινική φάση και συγκεκριμένα περίπου 2-3 ημέρες πριν από την αναμενόμενη έμμηνον ρύσιν και συνεχίζεται κατά τις πρώτες 5-6 ημέρες ωοθυλακικής φάσης του επόμενου κύκλου. Η αύξηση της FSH λέγεται διακυκλική ή όπως αλλιώς χαρακτηρίζεται ως <<παράθυρο της FSH>> και είναι υπεύθυνο για την επιλογή και ωρίμανση ωοθυλακίου. Οι μεταβολές των υποφυσιακών και ωθηκικών ορμονών στο αίμα παρίσταται στην εικόνα 11. Στο πρώτο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης, παρατηρείται σταδιακή αύξηση των οιστρογόνων (κυρίως της οιστραδιόλης) στο αίμα, τα οποία με αρνητική επίδραση προκαλούν ελάττωση της FSH, δηλαδή διακόπτουν τη διακυκλική της αύξηση. Η FSH στη συνέχεια διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της πρώτης φάσης του κύκλου. Παρά τη χαμηλή στάθμη της FSH στο αίμα, η έκκριση των οιστρογόνων από το ωριμάζον ωοθυλάκιο συνεχίζεται αυξανόμενη και έτσι η στάθμη της οιστραδιόλης στο αίμα ανέρχεται αρχικά μεν βραδέως, αλλά στη συνέχεια ταχύτερα φθάνοντας σε αιχμή (peak) δύο περίπου ημέρες πριν από την ωοθυλακιόρρηξη, οπότε η στάθμη της ελαττώνεται απότομα.

Η στάθμη της LH στο αίμα εμφανίζει επίσης αύξηση λίγο πριν την αναμενόμενη έμμηνον ρύσιν, η οποία όμως είναι μικρότερη από την αύξηση της FSH. Η στάθμη της LH στο πρώτο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης είναι χαμηλή, ανερχόμενη στη συνέχεια σταθερά αλλά πολύ βραδέως, ώστε με τη σύγχρονη μείωση της FSH ο λόγος FSH/LH αντιστρέφεται. Η προοδευτικά αυξανόμενη LH εμφανίζει στη συνέχεια απότομη αύξηση (αιχμή-peak) μία περίπου ημέρα μετά την αιχμή των οιστρογόνων. Σύγχρονη αλλά μικρότερου μεγέθους αιχμή με την LH εμφανίζει και η FSH. Η εκκριτική αυτή αιχμή των γοναδοτροφινών, που συμβαίνει στο μέσον περίπου του κύκλου, λέγεται μεσοκύκλιο κύμα της LH ή των γοναδοτροφινών (LH surge). Η διάρκεια του κύματος αυτού στο φυσιολογικό κύκλο είναι 48-72 ώρες. Και οι δύο γοναδοτροφίνες, μετά τη μεσοκύκλια εκκριτική τους αιχμή, ελαττώνονται και διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα καθ'όλη τη δεύτερη φάση του κύκλου, για να ακολουθήσει η διακυκλική αύξηση της FSH.



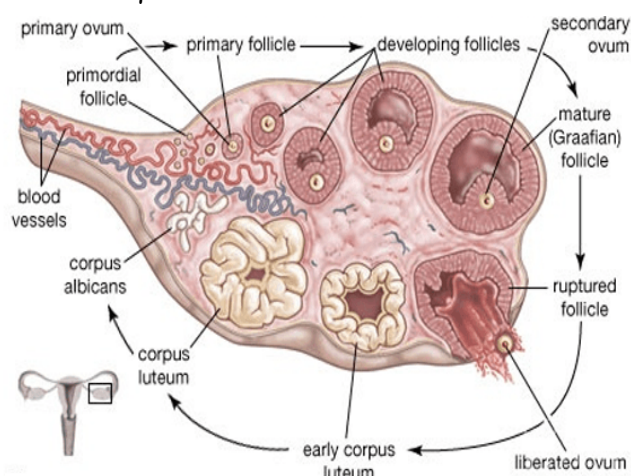
Εικόνα 11: Απεικόνιση εμμηνορρυσιακού κύκλου. α) υποθαλαμική απελευθέρωση της GnRH β) επακόλουθα επίπεδα FSH και LH στο περιφερειακό αίμα γ) ανάπτυξη ωοθυλακίων και ωοθυλακιορρηξία, δ) τα επίπεδα της E2 και P4 προερχόμενα από την ωοθήκη (και αδρενεργικό φλοιό) στο αίμα καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου και ε) ενδομητρικά στρώματα

Η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει τουλάχιστον 36 ώρες μετά από την έναρξη της εκκριτικής αιχμής της LH, ο δε μηχανισμός δεν είναι απόλυτα γνωστός. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η LH ενεργοποιεί πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία διαλύουν το τοίχωμα του ωοθυλακίου κυρίως στην περιοχή εκείνη, η οποία προβάλλει στην επιφάνεια της ωοθήκης. Με την εκφύλιση των κυττάρων στην περιοχή αυτή, σχηματίζεται το στίγμα, οπότε η βασική μεμβράνη του ωοθυλακίου προβάλλει μέσω του στίγματος. Ακολουθεί τότε η ρήξη, οπότε εξέρχεται το ωοκύτταρο μαζί με τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας, που το περιβάλλουν, τα οποία επειδή έχουν διάταξη ακτινωτή λέγονται ακτινωτός στέφανος. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μέρος μιας μεγαλύτερης ομάδας κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας, που προβάλλει ως ένας σχηματισμός στη κοιλότητα του ωοθυλακίου και λέγεται ωοφόρος δίσκος. Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ πως μετά την ωοθυλακιορρηξία και υπό την επίδραση της LH, τα κύτταρα του ραγέντος ωοθυλακίου (κοκκώδη και τα κύτταρα έσω και έξω θήκης που τα περιβάλλουν), ωχρινοποιούνται. Τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μαζί με τα κύτταρα της έσω θήκης, που τα περιβάλλουν, τριχοειδή αγγεία και συνδετικό ιστό σχηματίζουν το ωχρο σωμάτιο, το οποίο παράγει άφθονες ποσότητες προγεστερόνης και σε μικρότερο βαθμό

οιστραδιόλης. Η διάρκεια της ζωής του ωχρού σωματίου είναι περίπου 14 ημέρες. Ήδη από την 7η-8η ημέρα από το σχηματισμό του, το ωχρό σωματίο, εάν δεν προκύψει κύηση, υποστρέφει και προοδευτικά αντικαθίσταται από ουλή χωρίς αγγεία, οπότε ονομάζεται λευκό σωματίο. Στην περίπτωση που συμβεί σύλληψη και εμφύτευση της βλαστοκύστης, παράγεται hCG από την τροφοβλάστη και επομένως το ωχρό σωματίο δεν υποστρέφει. Εκτός από την εξω-ωθηκική ρύθμιση της λειτουργίας του ωχρού σωματίου (LH και hCG), διάφοροι τοπικοί παράγοντες φαίνεται να ασκούν παρακρινείς δράσεις στο ωχρό σωματίο. Τέτοιοι παράγοντες είναι η προγεστερόνη και τα ανδρογόνα καθώς και το σύστημα των αυξητικών παραγόντων, που μοιάζουν με την ινσουλίνη (IGF). Οι αυξητικοί παράγοντες IGF-1 και IGF-2 και οι ειδικές πρωτεΐνες, που τους δεσμεύουν, φαίνεται ότι καθορίζουν σημαντικά τη λειτουργία του ωχρού σωματίου. Ειδικότερα, ο IGF-2 επάγει τη δράση της LH σε ό,τι αφορά στη λειτουργία των ωχρινικών κυττάρων. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες είναι ο EGF, ο TGF- $\alpha$ , ο TGF- $\beta$ , ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια και άλλοι.

Εκτός από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη, το ωχρό σωματίο παράγει επίσης τη ρηλαξίνη, της οποίας ο ρόλος δεν είναι γνωστός, πιθανώς όμως να συμμετέχει στη διαδικασία της προετοιμασίας για την κύηση. Τα επίπεδα της ρηλαξίνης στο αίμα αρχίζουν να αυξάνουν κατά τη χρονική περίοδο της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και η αύξηση συνεχίζεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της κύησης. Πάντως, ο ακριβής ρόλος της ρηλαξίνης, η οποία μπορεί να έχει κατασταλτικές επιδράσεις στη συστατικότητα του μυομητρίου, για την επίτευξη της κύησης κατά την ωχρινική φάση, δεν είναι διευκρινισμένος.

Εκτός από τις παραπάνω ουσίες, το ωχρό σωματίο παράγει και μη στεροειδείς ορμόνες, που ανήκουν στην κατηγορία της ανασταλτίνης. Η ανασταλτίνη A είναι η κύρια μορφή, η οποία παράγεται από το ωχρό σωματίο, σε αντίθεση με την ανασταλτίνη B, που παράγεται από το ωοθυλάκιο. Οι ουσίες αυτές πιθανώς συμμετέχουν στην ομαλή λειτουργία του υποθαλάμου-υπόφυση-ωθηκικού άξονα όχι μόνο κατά την ωοθυλακική αλλά και κατά την ωχρινική φάση μέσω του μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης. Η παραγωγή των στεροειδών και μη ορμονών στο ωχρό σωματίο γίνεται κατά κύριο λόγο από τα λεγόμενα μεγάλα ωχρινικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν εξέλιξη των κοκκωδών κυττάρων του ωοθυλακίου. Η διάκριση γίνεται από τα λεγόμενα μικρά ωχρινικά, τα οποία προέρχονται από τα κύτταρα της έσω θήκης. Εκτός από τα δύο είδη κυττάρων, στο ωχρό σωματίο υπάρχουν και άλλοι τύποι κυττάρων, η σημασία των οποίων για την ανάπτυξη, τη λειτουργία και την υποστροφή του ωχρού σωματίου δεν είναι γνωστή. Επίσης, το ωχρό σωματίο περιέχει αρκετά ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων, τα οποία πιθανώς εκκρίνουν διάφορους παράγοντες, οι οποίοι ασκούν παρακρινική δράση, όπως ο TGF- $\beta$ , οι προσταγλανδίνες και η ενδοθηλίνη-1. Το ωχρό σωματίο περιέχει επίσης σημαντικό αριθμό κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ωχρινικών κυττάρων και των υπολοίπων κυττάρων πιθανολογούνται. <sup>(1)</sup>



Εικόνα 12: Η εξέλιξη του ωοθυλακίου, ο σχηματισμός ωοφόρου δίσκου, η ρήξη και ο σχηματισμός ωχρού σωματίου.

### **3) Διαδικασία της αναπαραγωγής:**

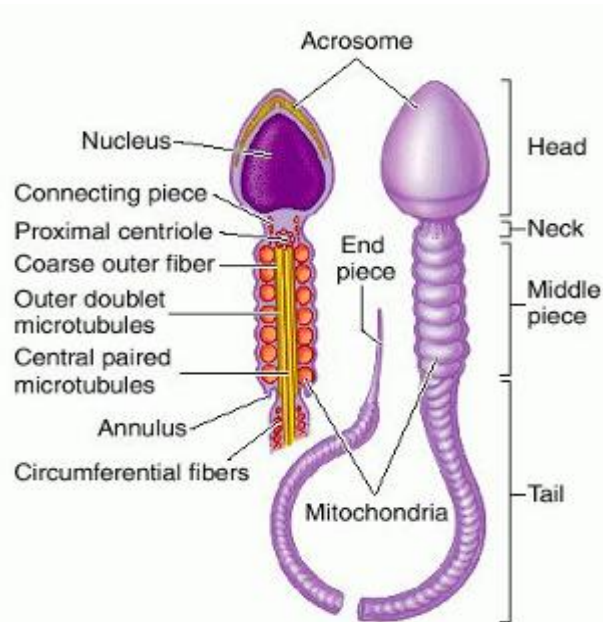
Παράλληλα με τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου, κατά την ωορρηξία, το ωάριο εξωθείται στην επιφάνεια της ωοθήκης και η πρώτη του αποστολή είναι να εισέλθει εντός του ωαγωγού. Η δράση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στις σάλπιγγες αφορά κυρίως στην κινητικότητα και εκκριτική λειτουργία των κυττάρων του σαλπινγικού βλεννογόνου. Τα κροσσωτά και εκκριτικά κύτταρα του βλεννογόνου των σαλπίγγων υφίστανται μεταβολές αναλόγως της ορμονικής επίδρασης. Κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, υπό την επίδραση των οιστρογόνων παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός και αύξηση του ύψους των κυττάρων αυτών, ενώ η προγεστερόνη κατά την ωχρινική φάση ασκεί αντίθετες επιδράσεις και καταστέλλει τη δραστηριότητα αυτή. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρούνται και στα εκκριτικά κύτταρα. Οι μεταβολές αυτές ακολουθούν αντίστοιχες μεταβολές του αριθμού των υποδοχέων των οιστρογόνων στις σάλπιγγες, ο οποίος αυξάνεται σημαντικά κατά την ωοθυλακική φάση και ελαττώνεται κατά την ωχρινική. Η προγεστερόνη ανταγωνίζεται τις επιδράσεις των οιστρογόνων στις σάλπιγγες, με το να ελαττώνει τον αριθμό των οιστρογονικών υποδοχέων. Οι ορμονικές αυτές επιδράσεις ασκούνται κατά κύριο λόγο μέσω των κυττάρων του στρώματος, που περιέχουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, οι οποίοι δεν υπάρχουν στα κροσσωτά κύτταρα. Είναι πιθανόν επίσης η δράση των ορμονών αυτών να ασκείται και μέσω παρακρινικής επίδρασης των κυττάρων στρώματος με την παραγωγή διαφόρων αυξητικών παραγόντων.<sup>(1)</sup>

Η μεταφορά ωαρίου από την ωοθήκη στον ωαγωγό επιτυγχάνεται μέσω των κροσσών του που είναι καλυμμένοι με βλεφαροειδές επιθήλιο. Κατά την ωορρηξία, οι ίδιοι οι λείοι μύες των κροσσών τους υποχρεώνουν να διαπεράσουν την ωοθήκη ενώ οι βλεφαροειδείς προεκβολές τους μαστιγώνουν κατά κύματα το εσωτερικό των ωαγωγών. Αυτές οι μαστιγιοκροσσωτές κινήσεις αναρροφούν το ωάριο εντός του ωαγωγού καθώς αυτό αναδύεται στην επιφάνεια της ωοθήκης.

Από τη στιγμή που θα βρεθεί στον ωαγωγό, το ωάριο κινείται τάχιστα για αρκετά λεπτά, προωθούμενο από κροσσούς και από συστολές της λείας μυικής επικάλυψης των αγωγών. Οι μυικές συστολές σύντομα ελαττώνονται και η κίνηση ωαρίου, καθοδηγούμενο μόνο από τις κινήσεις των κροσσών, καθίσταται τόσο αργή ώστε παίρνει περίπου 4 ημέρες στο ωάριο να φθάσει στη μήτρα. Συνεπώς, εάν πρόκειται να επιτελεσθεί γονιμοποίηση, τούτο πρέπει να συμβεί στον ωαγωγό λόγω της σύντομης διάρκειας ζωής του αγονιμοποίητου ωαρίου.

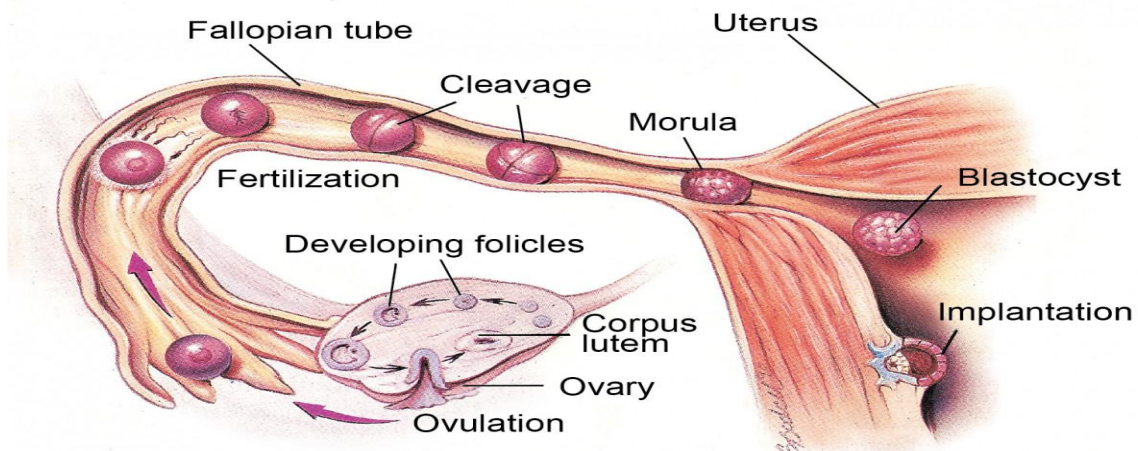
Όπως είναι αντιληπτό, η φυσιολογία των σαλπίγγων έχει τρομερό αντίκτυπο στην μεταφορά σπερματοζωαρίων προς το ώριμο ωοκύτταρο και αντίστροφα στην μεταφορά εμβρύου 3-4ων ημερών από τις λύκηθο/ισθμό περιοχές του σωλήνα, όπου πραγματοποιείται η γονιμοποίηση, εντός του δεκτικού ενδομητρίου της μήτρας.

Αρχικά, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που πλησιάζει το σημείο γονιμοποίησης είναι τεράστιος με το μεγαλύτερο να είναι πάνω από  $5 \times 10^6$  / ml και το λιγότερο να είναι 1000 σπερματοζωάρια στη λύκηθο. Ο υψηλός αριθμός μη – γονιμοποιητικών σπερματοζωαρίων υποτίθεται πως επηρεάζει την αναπαραγωγική διαδικασία. Τα σπερματοζωάρια πρέπει να καταστηθούν ικανά για να γονιμοποιήσουν, καθώς διαπερνούν την μητρική κοιλότητα μέσω ενεργοποίησης (capacitation) τους, η οποία επηρεάζεται από τον ιστό του ωαγωγού. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, η ακροσωμική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων αποσταθεροποιείται μέσω τροποποίησης από στεροειδή και γλυκοπρωτείνες καταλήγοντας σε μία ρευστή μεμβράνη με αυξημένη διεισδυτικότητα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ). Η εισροή ασβεστίου αυξάνει την κινητικότητα σπερματοζωαρίων. Ένα τριπεπτιδίο (FPP) που παράγεται στον προστάτη του άντρα και απελευθερώνεται στο σπερματικό υγρό, υποστηρίζει την ενεργοποίηση. Προσδένεται στον υποδοχέα του (T-complex protein 11), ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση και προκαλώντας την σύνθεση του κυκλικού AMP.<sup>(3)</sup>



Εικόνα 13: Δομή σπερματοζωαρίου υπογραμμίζοντας τις σημαντικές δομές για εισβολή ωαρίου μέσω του κεφαλιού, λαιμού και μεσαίου τμήματος

Επομένως, στο τέλος της σεξουαλικής επαφής με την εκσπερμάτιση, μπορεί να ανιχνευθεί κάποια ποσότητα εντός ενός λεπτού διάρκειας και να καταλήξουν μετέπειτα αρκετά σπερματοζώαρια μέσω της χημειοταξίας κινούμενα ανάμεσα στον ωοφόρο δίσκο των κοκκωδών κυττάρων τα οποία εξακολουθούν να περιβάλλουν το ωάριο και προσδένονται στη διάφανη ζώνη. Η γονιμοποίηση ορίζεται ως η τήξη (σύζευξη) ενός σπερματοζωαρίου και ωαρίου μέσω της αντίδρασης ακροσώματος και αποκλεισμού πολυσπερμίας. Με την διείσδυση το ωάριο ονομάζεται ενεργό και ολοκληρώνει την δεύτερη μειωτική του διαίρεση οδηγώντας στην δημιουργία του απλοειδούς φαινοτύπου. Οι απλοειδείς πυρήνες του σπερματοζωαρίου και ωαρίου αντίστοιχα μπορούν να συζευχθούν και να σχηματίσουν τον ζυγότη. Η τρέχουσα διεύλωση του ζυγότη ως ένας “σβόλος” μέσω της περιοχής του ισθμού του σαλπινγικού σωλήνα χαρακτηρίζεται από ισχυρή συσταλτικότητα του μυοσαλπγγίου. Ο παλμός των βλεφαρίδων εντός του αγωγού βρέθηκε πως επηρεάζεται από προσταγλανδίνες, ATP και ενεργοποιητή αιμοπεταλίων σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις *in vitro*. Ο χρόνος μεταφοράς τόσο του εμβρύου όσο και του ζυγότου είναι συγκεκριμένος για κάθε είδος, υποδηλώνοντας πως η χρονικά ρυθμιζόμενη μεταφορά σχετίζεται με τροποποιήσεις σε μοριακό επίπεδο στο αναπαραγωγικό κομμάτι και η αλληλεπίδραση με το έμβρυο υποστηρίζει μία ακριβής ρυθμιζόμενη εμβρυική εμφύτευση σε ένα δεκτικό φθαρτοποιημένο ενδομήτριο.



Εικόνα 14: Απεικόνιση της ανάκτησης ωαρίου, της γονιμοποίησης, της μεταφοράς εμβρύου κατά μήκος της σάλπιγγας και η εμφύτευση

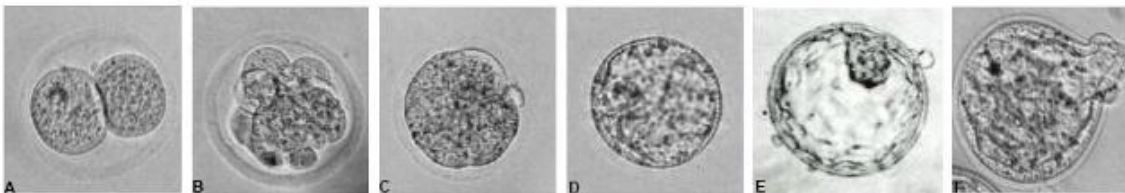


βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.

Η εμβρυογένεση ξεκινάει με την γονιμοποίηση του ωαρίου και συμπεριλαμβάνει επακόλουθες διαιρέσεις (cleavages), ωρίμανση, εμφύτευση και οργανογένεση και διαρκεί περίπου 9 εβδομάδες μέχρι το στάδιο του εμβρύου. Πριν την σύζευξη μητρικού και πατρικού γονιδιώματος, το στάδιο των προπυρήνων εμφανίζεται όπως είναι γνωστό από τις IVF τεχνικές, 18 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Μετά από την τήξη των γονεϊκών γονιδιωμάτων, ο ζυγώτης υποβάλλεται σε διαιρέσεις (μιτωτικές) και διαφοροποιήσεις κατά την μεταφορά του μέσω του ωαγωγού χωρίς να αυξηθεί σε μέγεθος και περιβάλλεται από την διάφανη ζώνη. Τα εμβρυικά κύτταρα είναι ολοδύναμα μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων. Ένα ολοδύναμο κύτταρο έχει τη δυνατότητα να διαμορφώσει έναν ολόκληρο οργανισμό με εξωεμβρυικό ιστό (πλακούντα). Μετά από αυτό το στάδιο, η κυτταρική μοίρα είναι καθορισμένη. Ακόμη και ο ζυγώτης είναι μορφολογικά ασύμμετρος αποτελούμενος από το ζωικό πόλο – το μελλοντικό εξώδερμα και μεσόδερμα από τα γεννητικά στρώματα- και τον φυτικό πόλο που θα σχηματίσει το μελλοντικό ενδόδερμα. Η πρώτη διαίρεση πάντα γίνεται παράλληλα με τον φυτικό – ζωικό άξονα του ζυγώτη. Η δεύτερη διαίρεση είναι κάθετη της πρώτης. Οι επόμενες διαιρέσεις γίνονται σφαιρικά. Ο σχηματισμός του κεφαλαιουριαίου άξονα ελέγχεται από το μητρικό γονιδίωμα.

Μία δυσλειτουργία στον κεφαλοουριαίο σχηματισμό δείχθηκε σε zebrafish έμβρυα όπου υπήρχε έλλειψη μητρικών και ζυγωτικού POU περιοχών και POU2 μεταφραστικό παράγοντα – το ορθόλογο του οποίου στα θηλαστικά είναι Oct4 μεταφραστικός παράγοντας/ POU5f1. Ο Oct4 λειτουργεί ως μάρτυρας για αδιαφοροποιημένα και πολυδύναμα κύτταρα. Επομένως, πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν σε ανθρώπινες καρκινικές γαμετικές σειρές. Τα κύτταρα του εμβρύου ονομάζονται βλαστομερίδια μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Μέχρι και πάνω από 4 κύτταρα, το μητρικό γονιδίωμα καθορίζει την εμβρυική ανάπτυξη και μεταξύ σταδίων 4ων και 8 κυττάρων ενεργοποιείται το εμβρυικό γονιδίωμα.

Κατά την 3ήμερη ή 4ήμερη παραμονή στον ωαγωγό και 4 μιτωτικές διαιρέσεις αργότερα εμφανίζονται 16 έως 32 κυτταροκύματα (μορίδιο), τα οποία φθάνουν στην μήτρα έχοντας βασικά το ίδιο μέγεθος με το αρχικά γονιμοποιημένο ωάριο.

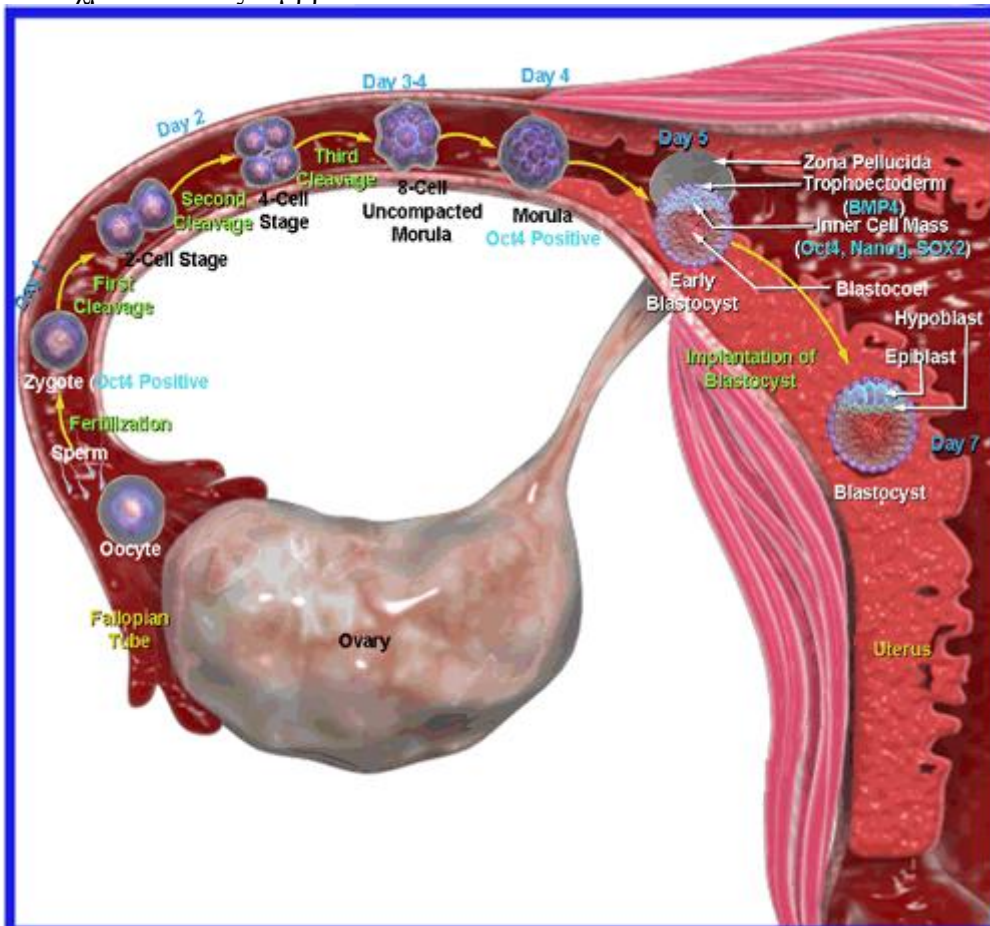


Εικόνα 15: Εμβρυική ανάπτυξη θηλαστικών από το a) στάδιο 2 κυττάρων, b) 8 κυττάρων, c) συμπτηγμένο μορίδιο, d) πρώτη βλαστοκύστη, e) εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη και f) τροποποιημένη βλαστοκύστη ύστερα από επεξεργασία (Krussel et. al.)

Με την άφιξη του στη μήτρα, το κύημα επιπλέει ελεύθερο στο ενδομήτριο υγρό από το οποίο διατρέφεται για περίπου 3 ημέρες ενώ υπόκειται σε παραπέρα διαιρέσεις. Σύντομα το κύημα θα φθάσει σε ένα στάδιο κατά το οποίο μετατρέπεται σε βλαστοκύστη, όπου τα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα να αναπτύσσονται προς κάθε κατεύθυνση και έχουν αρχίσει να διαφοροποιούνται. Συλλέγεται υγρό μεταξύ της τροφοβλάστης και της έσω κυτταρικής μάζας σχηματίζοντας το βλαστόκοιλο.

Η βλαστοκύστη αποτελείται από μία έξω στιβάδα, την τροφοβλάστη, μία έσω κυτταρική μάζα και μία κεντρική κοιλότητα πλήρης υγρού. Κατά τη διάρκεια της επακόλουθης ανάπτυξης, η έσω κυτταρική μάζα θα εξελιχθεί σε ένα αναπτυσσόμενο ον ονομαζόμενο κανονικό έμβρυο. Η τροφοβλάστη θα περιβάλλει το έμβρυο σχηματίζοντας τον πλακούντα καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του και θα συμμετέχει στη διατροφή του, όπως επίσης και στην έκκριση σημαντικών ορμονών. Πριν την γαστριδίωση, τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταροτροφοβλάστη ως εσωτερικό κυτταρικό στρώμα και σε συγκυτιοτροφοβλάστη ως παχύ κυτταρικό στρώμα. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στερούνται κυτταρικών ορίων, εισβάλλουν και αναπτύσσονται στη φθαρτοποιημένη μήτρα κατά την εμφύτευση. Έχει αναφερθεί πως η ιστόνη H3 Lys 9 μεθυλοτρανσφεράση (Eset) είναι ένας επιγενετικός παράγοντας κρίσιμος

για την ανάπτυξη της έσω κυτταρικής μάζας αλληλεπιδρώντας με τον Oct4 στο στάδιο του μοριδίου. Έχει προταθεί πως η Eset περιορίζει τα εξωεμβρυικά τροφοβλαστικά κύτταρα να είναι πολυδύναμα. Η διαφοροποίηση σε έσω κυτταρική μάζα και τροφοεκτοδέρματος ολοκληρώνεται στο στάδιο της βλαστοκύστης εντός της μήτρας δηλαδή 5η ημέρα μετά την γονιμοποίηση. Πολυδύναμα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από την έσω κυτταρική μάζα και το τροφοεκτόδερμα χρησιμοποιούνται ως κύρια πηγή βλαστικών κυττάρων. Πρόσφατα, αναφέρθηκε πως οι παράγοντες που εκφράζονται από την έσω κυτταρική μάζα και το τροφοεκτόδερμα αλληλορυθμίζονται. Ο υποδοχέας 2α του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών μεσολαβεί στην σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα 4 και ενεργοποιεί τον καταρράκτη σηματοδότησης της ERK (Extracellular regulated kinase) κινάσης των τροφοβλαστικών κυττάρων και ενισχύει την έκφραση της Cdx2 homeobox πρωτεΐνης, η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του πλακούντα. Η Cdx2 προσδέεται στην περιοχή του ενισχυτή της Bmp4 (bone morphogenetic protein) πρωτεΐνης, που είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας για την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Τελευταία, η υπερέκφραση των συνδυασμών των καθορισμένων μεταφραστικών παραγόντων της έσω κυτταρικής μάζας όπως ονομαστικά είναι ο Oct4, sex determining region Y-box 2 (SOX2) και η homeobox Nanog πρωτεΐνη, είχε ως κατάληξη σε επαγωγή σωματικά βλαστικά κύτταρα που βελτίωσαν τις ιατρικές τεχνικές αναγέννησης. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν έναν νέο οργανισμό αλλά στερούνται την δυνατότητα να σχηματίσουν εξωεμβρυικό ιστό. (3)



Εικόνα 16: Απεικόνιση της εμβρυικής ανάπτυξης από την γονιμοποίηση, πρώτες διαιρέσεις και ωρίμανση, μεταφορά μέσω του σαλπγγικού σωλήνα στο δεκτικό ενδομήτριο και περαιτέρω ανάπτυξη μέχρι το στάδιο γαστριδίου την 15η ημέρα. Η έκφραση του δείκτη Oct4 των βλαστικών κυττάρων ξεκινά στο στάδιο του ζυγώτη. Οι BMP4, Nanog και SOX2 παράγοντες βρέθηκαν να εκφράζονται στην εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης.

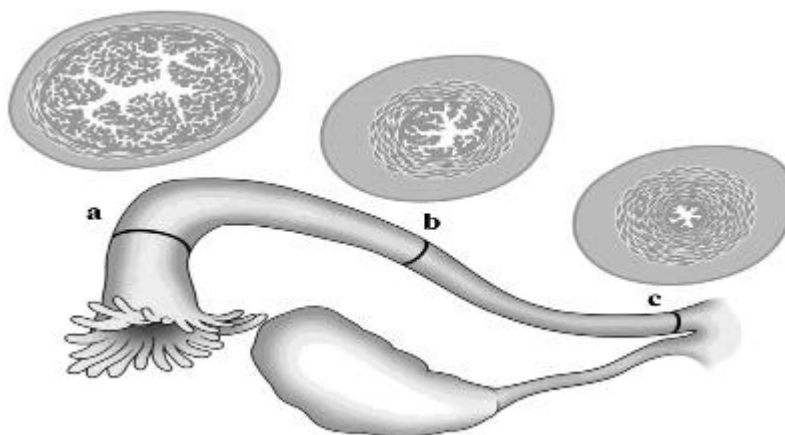
#### 4) Μεταφορά εμβρύου από ωαγωγό στη μήτρα:

Με την είσοδο στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οι σάλπιγγες παρουσιάζονται ως μία εγκατελειμμένη ανατομική δομή που προσπερνάται με την διαδικασία της IVF. Ωστόσο, ως γνωστόν, στην προεμφυτευτική περίοδο καθώς το έμβρυο διαπερνάει από τον ωαγωγό στην μήτρα έχει ήδη αναπτυχθεί ένας διάλογος μεταξύ εμβρύου – μήτρας μέσω εβρυακών secretomes, σαλπγγικού επιθηλίου και φυσικά εκκρινόμενων παραγόντων φθαρτοποίησης. Επομένως, για να επιτευχθεί μία αυθόρμητη εγκυμοσύνη, ένα περίπλοκο σύστημα σαλπγγικής μεταφοράς πρέπει να είναι λειτουργικό, επιτρέποντας τόσο την αλληλεπίδραση μεταξύ των γαμετών και παρέχοντας έναν αγωγό για την ανάπτυξη και μεταφορά εμβρύου προς την μήτρα. Τρία διαφορετικά στοιχεία, η κίνηση βλεφαρίδων, η μυική συσταλτικότητα και το σαλπγγικό υγρό, συμβάλλουν σε ποικίλους βαθμούς στην αποτελεσματική σαλπγγική μεταφορά.

Ο σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι να επεξεργαστεί τους πιο πρόσφατα αναγνωρισμένους ρυθμιστικούς μηχανισμούς καθώς και τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την διαδικασία μεταφοράς, διακινδυνεύοντας τις πιθανότητες επιτυχούς εγκυμοσύνης. Η ανατομία σαλπγγων αναφέρθηκε εκτενέστερα στο πρώτο κεφάλαιο και γι'αυτό παρακάτω θα δοθεί έμφαση κυρίως στην φυσιολογία ρυθμιστικών μηχανισμών και στις παθολογικές καταστάσεις που μπορούν να τροποποιήσουν ή να καταστρέψουν την λειτουργικότητα των βλεφαρίδων.

##### *4.1) Φυσιολογία σαλπγγικής μεταφοράς: κινητικότητα βλεφαρίδων, μυική συσταλτικότητα και σαλπγγικό υγρό*

Η σάλπιγγα δεν είναι απλώς ένας ωαγωγός για τα σπερματοζωάρια, το ωάριο και το έμβρυο. Εκτός από την καλύτερα γνωστή μηχανική μεταφορά της, μερικές άλλες λειτουργίες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση (capacitation) και αποθήκευση σπερματοζωαρίων, την σύλληψη ωαρίου κατά την ωοθυλακιορρηξία, καθώς και την διατήρηση και τον έλεγχο μετανάστευσης σπερματοζωαρίων στο σημείο της γονιμοποίησης. Επιπλέον, παραχωρεί το βέλτιστο περιβάλλον για γονιμοποίηση, θρέφοντας το έμβρυο καθώς μετακινείται προς την μήτρα και ενισχύει τα σήματα εμβρύου προς την μητέρα, συνεισφέροντας στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του. Με την παρουσία ηθικών και τεχνικών περιοριστικών θεμάτων, η έρευνα λεπτομερειών πάνω στην μεταφορά γαμετών και εμβρύων στον άνθρωπο είναι άκρως προκλητικά. Ωστόσο, ερευνητές που ασχολήθηκαν με έκφυτες σάλπιγγες που προήλθαν από σαλπγγεκτομή ή/και υστερεκτομή για διάφορους λόγους, κατάφεραν να φωτίσουν ελάχιστα την παραπάνω διαδικασία. Ένα πλήθος παραγόντων συμπεριλαμβανόμενων ενδοκρινή σήματα, η δύναμη του αυτόνομου νευρικού συστήματος και στοιχεία από το έμβρυο, συνεισφέρουν στον ακριβή συντονισμό αυτής της ευαίσθητης διαδικασίας που αυτομάτως εκτελείται μέσω της συνεισφοράς κινητικότητας βλεφαρίδων, μυικής συσταλτικότητας και σαλπγγικού υγρού, που θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.

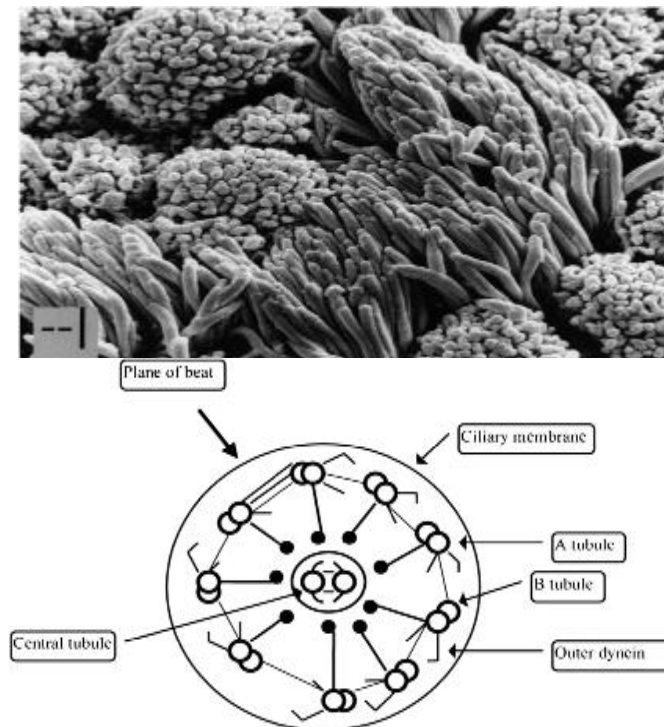


Εικόνα 17: Απεικόνιση των διαμήκεις πτυχώσεων των τμημάτων του σαλπγγικού σωλήνα σε διατομή του α) κώδωνα, β) λυκήθου και γ) ισθμού.

#### 4.2) Κινητικότητα βλεφαρίδων:

##### α) Δομή βλεφαρίδων:

Στον πυρήνα των βλεφαρίδων κείται μία διαμήκη δέσμη μικροσωληνίσκων, γνωστοί ως αξόνια (axoneme). Στον σαλπγγικό σωλήνα, αυτοί οι μικροσωληνίσκοι έχουν διάταξη 9 + 2 μοτίβου όπου 9 έξω / περιφερειακά ζεύγη μικροσωληνίσκων περικυκλώνουν τον πυρήνα από 2 εσωτερικούς / κεντρικούς μονούς μικροσωληνίσκους. Κάθε ζεύγος μικροσωληνίσκων αποτελείται από έναν Α και έναν Β όπου από κάθε Α εκτείνεται στον Β μικροσωληνίσκο του ζεύγους, ένα “χέρι” δυνείνης, το οποίο αναλογώς εάν αγκυροβολεί στο εσωτερικό ή εξωτερικό τμήμα του Α μικροσωληνίσκου, ονομάζεται IDA (inner dynein arm) και ODA (outer dynein arm), αντίστοιχα. Οι δυνείνες είναι μεγάλες πολυμερές πρωτεΐνες αποτελούμενες από ποικίλο αριθμό βαριών, μεσαίων και ελαφρών αλυσίδων. Μορφολογικά αυτές οι πρωτεΐνες εμφανίζονται με ένα σφαιρικό κεφάλι ακολουθούμενο από ένα “κοτσάνι” που συγκρατεί τον κορμό και την ουρά (ή τη βάση). Η ενέργεια που απαιτείται για την κινητικότητα των βλεφαρίδων προέρχεται από την υδρόλυση του ATP μέσω της ATPase δραστηριότητα από την ODA. Πιο συγκεκριμένα, η υδρόλυση του ATP έχει ως αποτέλεσμα την προσαρμοστική αλλαγή της κινητικής περιοχής της πρωτεΐνης και με την επακόλουθη βοήθεια των δομικών μοτίβων, η χημική ενέργεια από την ATP υδρόλυση μετατρέπεται σε μηχανική κίνηση. Αυτή η μηχανική κίνηση προωθεί το σημείο σύζευξης του ODA στον παρακείμενο Β μικροσωληνίσκο προς την βάση του αξόνιου. Όταν επιστρέψει στην αρχική του μορφή ο ODA, ο Β μικροσωληνίσκος (μαζί με το σύστημα του ζεύγους στο οποίο βρίσκεται) μετακινείται προς την κορυφή του αξόνιου. Αυτές οι κινήσεις ολίσθησης μεταξύ των περιφερειακών ζευγών μεταδίδονται σε μία καινούργια δομή, που ονομάζονται radial spokes (ακτίνες), όπου βρίσκονται στο κεντρικό μέρος του αξόνιου, προκαλώντας την κάμψη της βλεφαρίδας. Ύστερα από έρευνες ανακαλύφθηκε πως πέρα από την υδρόλυση της ATP, είναι απαραίτητο και το ασβέστιο για να επιτευχθεί η παραπάνω κίνηση. Ωστόσο δεν έχει εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός που καθορίζει το μοτίβο κάμψης και την κατεύθυνση των βλεφαρίδων, παρόλο που ισχυρίζεται πως η συγκεκριμένη αρχιτεκτονική διανομή του ODA κατά μήκος του αξόνιου εγκαθιστά των προσανατολισμό της κάμψης.



Εικόνα 18: Στην πάνω εικόνα απεικονίζονται τα λαχνωτά και εκκριτικά κύτταρα του επιθηλίου των ανθρώπινων σαλπγγων και η κάτω εικόνα είναι

## β) Ρύθμιση συχνότητας βλεφαριδικού παλμού (ciliary beat frequency/ CBF):

Έχειδειχθεί πως ποικίλοι ορμονικοί και νευρολογικοί παράγοντες ρυθμίζουν την λειτουργικότητα βλεφαρίδων προκαλώντας αλλαγές στην CBF συχνότητα εντός των σαλπίνγων και θα αναφερθούν παρακάτω.

### 1. Αδρενεργική και χολινεργική διέγερση:

Τόσο το συμπαθητικό όσο και το παρασυμπαθητικό σύστημα νευρώνουν τις σάλπιγγες. Έχει αποδειχθεί σε βλεφαροειδείς επιθηλιακά κύτταρα τραχείας λαγού πως η β-αδρενεργική διέγερση αυξάνει την CBF συχνότητα. Όσο για την χολινεργική νεύρωση των σαλπίνγων είναι ελάχιστη αλλά έχει προταθεί πως αυτή προκαλεί την έκφραση ενός συστατικού παράγοντα στον ισθμό μέσω του μουσκαρινικού υποδοχέα 3 (M3). Η σημασία του M3 πρέπει να εγκατασταθεί μέσω της επίδειξης εισροής ασβεστίου διαμέσου ACh.

### 2. Σύστημα αγγειοτενσίνης:

Η παρουσία του υποδοχέα αγγειοτενσίνης 2 στο σαλπινγικό επιθήλιο έχειδειχθεί μέσω της βοήθειας ανοσοιστοχημείας. Η ένταση του είναι κυρίαρχη κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου και είναι περισσότερο εμφανής στην περιοχή της λυκήθου. Το σύστημα αγγειοτενσίνης έχειδειχθεί πως διεγείρει την CBF συχνότητα καθώς μπορεί να μπλοκαριστεί από losartan, που είναι ανταγωνιστής υποδοχέα αγγειοτενσίνης 2. Κοιτάζοντας από άλλη προοπτική, η παρουσία αγγειοτενσίνης 2 και άλλα συστατικά του συστήματος αγγειοτενσίνης – ρενίνης σε διάφορα μέρη του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος όπως όρχεις, σπασματικού πόρου, προστάτη και σπερματικό υγρό προκαλεί εύλογες απορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ αρσενικώς παραγόμενη αγγειοτενσίνη 2 με τους αντίστοιχους υποδοχείς στο γυναικείο σαλπινγικό επιθήλιο, η βιολογική σημασία της οποίας δεν έχει διευκρινιστεί και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

### 3. Προσταγλανδίνες, ενεργοποιητής αιμοπεταλίων (platelet activation factor / PAF) και ιξώδες σαλπινγικού υγρού:

Μελέτες του 1980 έδειξαν πως οι PGE2 και PGF2α παράγοντες αυξάνουν την CBF συχνότητα των κροσσών στις σάλπιγγες κουνελιών. Αυτή η ενέργεια προκαλείται μέσω αύξησης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου. Περαιτέρω έρευνες υπέδειξαν όλους διαμεσολαβητές όπως ο PAF που διεγείρει την έκφραση του PEG2. Αλλαγές στο ιξώδες του σαλπινγικού υγρού συνδέεται με την CBF συχνότητα διατηρώντας την σταθερή μέσω του TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) καναλιού όπου μεταδίδονται τα εξωκυττάρια σήματα στο ενδοκυττάριο διαμέρισμα των βλεφαρίδων.

### 4. Στεροειδείς ορμόνες:

Συγκεκριμένα ενδοκρινή προφίλ σε διαφορετικά στάδια εμμηνορρυσιακού κύκλου επιδρούν διαφορετικά στην CBF συχνότητα στους σαλπινγικούς σωλήνες. Μέσω της παρουσίας συστήματος ανταλλαγής μεταξύ ωοθηκικού και σαλπινγικού αγγειακού συστήματος, ο ωαγωγός εκτείθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ωοθηκικών στεροειδών ορμονών σε σύγκριση με την συστηματική κυκλοφορία.

Επιπλέον, ακολουθώντας το γραφιανό ωοθυλάκιο μετά την ωοθυλακιόρρηξη, το σαλπινγικό υγρό που είναι πλούσιο σε ωοθηκικά στεροειδή και άλλες βιοενεργές ουσίες έρχεται σε απευθείας σύνδεση με το σαλπινγικό επιθήλιο.

In vitro έρευνες φέρουν αντιφατικά αποτελέσματα καθώς μία απ'αυτές υποστηρίζει πως χαμηλές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης δεν επιφέρουν καμία αλλαγή στην CBF συχνότητα ενώ άλλη θεωρεί πως η οιστραδιόλη επιφέρει μικρή αύξηση και προοδεύει κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης.

Όμως στην περίοδο μετέπειτα της ωοθυλακιόρρηξης παρατηρείται μία μεγάλη αύξηση της συχνότητας και αυτό προσδίδεται στις επιδράσεις της προγεστερόνης σε ένα πλούσιο οιστρογονικό

περιβάλλον. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζονται από πειράματα με προωθηλακκιωρηκτικό σαλπγγικό υγρό, το οποίο συλλέχθηκε από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF θεραπεία κατά τη διάρκεια της ωοληψίας, προκαλώντας μία σημαντική αύξηση της CBF συχνότητας. Ωστόσο, έχει δειχθεί σε *in vitro* μελέτες πως υψηλές συγκεντρώσεις προγεστερόνης αναστέλλουν την CBF συχνότητα. Μία λογική εξήγηση για την παραπάνω επίδραση της προγεστερόνης στην εκκριτική φάση μπορεί να οφείλονται από κυρίαρχες επιδράσεις άλλων παραγόντων του σαλπγγικού υγρού όπως είναι οι προσταγλανδίνες.

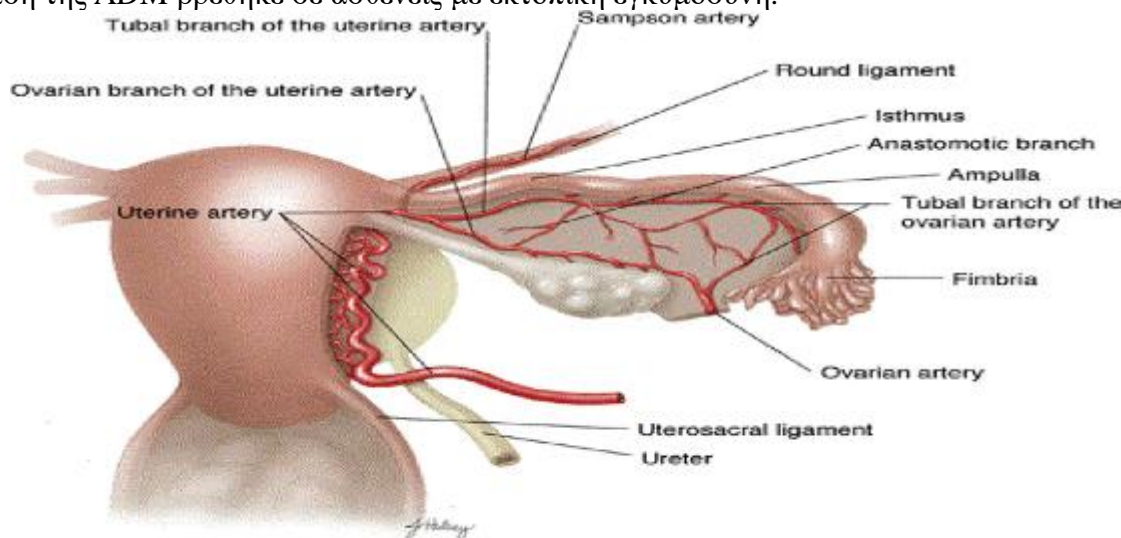
Παρόμοιες ανταγωνιστικές δράσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης μεταξύ τους σε επίπεδο ενδομητρίου μπορούν να παρατηρηθούν και στις σάλπιγγες ακυρώνοντας η μία την επίδραση της άλλης στην CBF συχνότητα. Λαμβάνοντας υπόψιν πως οι δράσεις της προγεστερόνης στα βλεφαροειδή κύτταρα είναι ταχείες, υποστηρίζεται πως είναι μέρη από μη – γενομικές λειτουργίες της προγεστερόνης.

Τέλος, αποδείχθηκε πως τόσο οι κλασσικοί (κυτταροπλασματικοί) υποδοχείς προγεστερόνης όσο και οι μεμβρανικοί υποδοχείς προγεστερόνης γ συμβαλλούν στην σηματοδότηση των βλεφαροειδών κυττάρων.

### 5. Adrenomedullin

(ADM):

Η ADM είναι μία πεπτιδική ορμόνη και ανήκει στην οικογένεια CGRP καλσιτονίνης (calcitonin/calcitonin-gene-related peptide) και παράγεται στους ωαγωγούς τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού. Η έκφραση του είναι πιο διαδεδομένη στην περιοχή του ισθμού και φαίνεται να αυξάνει την CBF συχνότητα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η τοπική έκφραση της ADM έχει συνδεθεί με το στεροειδικό περιβάλλον όπου βρίσκεται σε μία ουδό (peak) στην πρώιμη ωχρινική φάση. Η επαφή με το σπερματοζώαριο είναι ένας ακόμη λόγος που ενισχύει την έκφραση της ADM. Τέλος, έχει παρατηρηθεί σε μελέτες πως στο πλάσμα και στις σάλπιγγες η μειωμένη έκφραση της ADM βρέθηκε σε ασθενείς με εκτοπική εγκυμοσύνη.



Sources: Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Spong CY. Williams Obstetrics, 23rd Edition. <http://www.accessmedicine.com>. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 19: Το δίκτυο αγγείωσης των σαλπίγγων και ο τρόπος επικοινωνίας και ανταλλαγής παραγόντων με το περιφερειακό αίμα.

γ) Ρόλος της CBF συχνότητας στην μεταφορά γαμετών και εμβρύου:

Ως γνωστόν και με βάσει αρκετές αποδείξεις, η λειτουργικότητα βλεφαρίδων παίζει σημαντικό ρόλο στην σαλπγγική μεταφορά και μάλιστα μέσω μίας μελέτης όπου απουσίαζε πλήρως η μυϊκή συσταλτικότητα των σαλπίγγων βρέθηκε πως οι βλεφαρίδες ήταν αρκετές για την μεταφορά. Πολλές πληροφορίες αποκτήθηκαν μελετώντας και γυναίκες που έπασχαν από το σύνδρομο δυσκινησίας βλεφαρίδων (Immotile Cilia Syndrome).

#### 4.3) Μυική συστατικότητα:

Στο μυοσαλπγγιο έχουν αναγνωρισθεί 2 βασικοί τύποι συσπάσεων: συνεχές τονωτικές συσπάσεις και συχνές (μικρής διάρκειας) περιοδικές συσπάσεις. Οι συνεχείς συσπάσεις λειτουργούν ως πύλες για το κέρασ (uterotubal junction/UTJ) και για την περιοχή λυκήθου-ισθμού (ampullary-isthmic junctio/ AIJ) και επιτρέπει μόνο την διάβαση των γαμετών και εμβρύων εφόσον υπάρχουν άριστες συνθήκες στην θέση παράδοσης όπως δεκτικό ενδομήτριο για το αναπτυσσόμενο έμβρυο και σωστές συνθήκες γονιμοποίησης για τα σπερματοζωάρια. Το παροδικό έμβρυο σταματά πίσω από AIJ και θα προχωρήσει εφόσον η δράση της προγεστερόνης είναι μέγιστη στην μέση ωχρινική φάση αναστέλλοντας τον α αδρενεργικό υποδοχέα προκαλώντας χαλάρωση μυικού τόνου στον ισθμό. Όσον αφορά την μεταφορά σπερματοζωαρίων έχει δείχθει πως εάν παραμείνουν ελεύθερα στην περιοχή της λυκήθου, αυξάνονται οι πιθανότητες πολυσπερμίας. Ο ισθμός και ο AIJ αποτρέπουν την πολυσπερμία περιορίζοντας τον ρυθμό απελευθέρωσης σπερματοζωαρίων από την λύκηθο. Αντιθέτως, οι σύντομες περιοδικές συσπάσεις δεν παίζουν κανέναν ρόλο στην μεταφορά των σαλπγγικών συστατικών αλλά πιστεύεται πως προσφέρουν ένα επαρκώς αναμειγμένο μέσο των σαλπγγικών εκκρίσεων στους γαμέτες και στα έμβρυα. Ένας επιπλέον ρόλος της μυικής συστατικότητας αφορά την σύλληψη ωαρίου από την ωθήκη μέσω του κροσσωτού άκρου του ωαγωγού και την μυική δραστηριότητα του μεσοσαλπγγίου.

#### 4.4) Σαλπγγικό υγρό:

Το εκκριτικό σαλπγγικό επιθήλιο ευθύνεται για την έκκριση ποικίλων βιοενεργών ουσιών. Συγκριτικά με το πλάσμα, το ανθρώπινο σαλπγγικό υγρό είναι πλούσιο σε κάλιο και διττανθρακικό και έχει υψηλές συγκεντρώσεις σε αργινίνη, αλανίνη και γλουταμινικό. Η συγκέντρωση της γλυκόζης ποικίλλει αναλόγως το στάδιο του εμμηνορρυσιακού κύκλου και μειώνεται απότομα κατά την περίοδο της ωοθυλακιωρρηξίας. Μέγιστη παραγωγή σαλπγγικού υγρού παρουσιάζεται στη μέση του κύκλου και υποστηρίζεται πως τα συστατικά του, κυρίως οι προσταγλανδίνες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην μυοσαλπγγική συστατικότητα προκειμένου να συλληφθεί το ωάριο και να μεταφερθεί το έμβρυο. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του σαλπγγικού υγρού είναι οι ειδικές γλυκοπρωτεΐνες όπου συναντώνται σε υψηλά επίπεδα μετά την ωοθυλακιωρρηξία. Τέλος, έχουν αναγνωρισθεί και απομονωθεί δύο πρωτεΐνες TEP-1 και TEP-2 (Tubal Epithelial Protein) που υπάρχουν σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αλλά όχι σε μετεμμηνοπαυσιακές. Δεν έχει ταυτοποιηθεί ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών αλλά προτείνεται πως η παραγωγή και η έκκριση τους ανταποκρίνεται στην οιστρογονική διέγερση. Στη μέση του κύκλου, αμέσως μετά την ωοθυλακιωρρηξία, το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό του σαλπγγικού υγρού και επηρεάζει τόσο την CBF συχνότητα όσο και την μυική συστατικότητα αλλά αποτελεί και το σαλπγγικό μέσο που βοηθάει την σύλληψη του ωαρίου από την ωθήκη και την διαδικασία μεταφοράς του εμβρύου. <sup>(4)</sup>

Ως γνωστών, οι σάλπιγγες αποτελούν το μέρος γονιμοποίησης και ταυτόχρονα παρέχουν ένα θρεπτικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του εμβρύου τις πρώτες 5 ημέρες. Το προεμφυτευτικό έμβρυο παράγει αρκετούς παράγοντες κατά την ανάπτυξη του και σηματοδοτεί την παρουσία του στον μητρικό οργανισμό. Η αξιοπρεπής αλληλεπίδραση μεταξύ προεμφυτευτικού εμβρύου και μητρικού συστήματος είναι μερικώς ελεγχόμενη από παρακρινής κυτοκίνες.

Το σύστημα ιντερλευκίνης 1 αποτελείται από δύο ανταγωνιστές, IL-1α και IL-1β, έναν υποδοχέα ανταγωνιστή IL-1Ra και δύο μεμβρανικούς υποδοχείς, IL-1R1 και IL-1R2. Η ένωση ενός από τους 2 ανταγωνιστές, IL-1α και IL-1β, στον IL-1R1 προκαλεί σηματοδότηση. Το σύστημα της ιντερλευκίνης 1 είναι άμεσα συνδεδεμένο με την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη και εμφύτευση. Η ποικίλη έκφραση των παραπάνω ανταγωνιστών σε πρωτεϊνικό επίπεδο στους σαλπγγικούς σωλήνες ελέγχουν ορμονικές αλλαγές που τροποποιούν τον χρόνο και το χώρο της εμφύτευσης.

Όσον αφορά την ιντερλευκίνη β (IL-1β) και τον υποδοχέα της IL-R1, ανιχνεύθηκαν

ανοσοιστοχημικά σε δείγματα σαλπίνγων τόσο στην πολλαπλασιαστική όσο και στην εκκριτική φάση, σε σχέση με τον ανταγωνιστή IL-1α που βρέθηκε μόνο στην εκκριτική φάση. Αυτό ίσως να υποδηλώνει πως ο IL-R1 υποδοχέας συμβάλλει στον πρώιμο διάλογο εμβρύου-μήτρας. Επιπλέον, εξετάστηκε η έκφραση του συστήματος ιντερλευκίνης 1 στο ανθρώπινο ενδομήτριο καθόλη τη διάρκεια εμμηνορυσιακού κύκλου και βρέθηκε πως ο IL-R1 εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα και η IL-1β εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των σπειροειδών αρτηριών και στρωματικών κυττάρων με παρατηρούμενη αύξηση από την πολλαπλασιαστική στην εκκριτική φάση. “Πρόσωπο με πρόσωπο” με το ενδομήτριο, μετρήθηκε το mRNA IL-1β σε 12 βλαστομερίδια και βρέθηκε πως το 75% των εμβρύων έκφράζει την ιντερλευκίνη β και μόνο 17% εκφράζει τον ανταγωνιστή IL-1α. Αυτά που εκφράζουν τον ανταγωνιστή διαπιστώθηκε πως σταματούν την ανάπτυξη τους πριν το στάδιο της βλαστοκύστης. Επομένως το σύστημα της ιντερλευκίνης 1 συνδέει την εμβρυική ανάπτυξη, την δεκτικότητα ενδομητρίου και το ανοσοποιητικό σύστημα, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της εμφύτευσης. <sup>(5)</sup>

Με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για την σημασία των σαλπίνγων που παραβλέπεται τα τελευταία χρόνια λόγω των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, γίνεται μία προσπάθεια παρακίνησης για περαιτέρω ενημέρωση και ανακάλυψη των στοιχείων που συμβάλλουν στην προετοιμασία εμβρύου πριν την είσοδο στην μήτρα για να αντιληφθούμε λεπτομέρειες που διαφεύγουν έως τώρα και μπορούν να βελτιώσουν την ασαφή ακόμη εικόνα που υπάρχει για την διαδικασία της εμφύτευσης όπως θα διαπιστωθεί παρακάτω.

## **Κύριο Μέρος:**

### **Πρόλογος:**

Η ανθρώπινη εμβρυική εμφύτευση αντιπροσωπεύει το πιο κρίσιμο βήμα της αναπαραγωγικής διαδικασίας σε πολλά είδη. Αποτελείται από ένα μοναδικό βιολογικό φαινόμενο, όπου η βλαστοκύστη συνδέεται στενά με την μητρική ενδομητρική επιφάνεια για να σχηματιστεί ο πλακούντας, ο οποίος είναι ο διαμεσολαβητής ανάμεσα στο αναπτυσσόμενο κύημα και την μητρική κυκλοφορία. Μία επιτυχής εμφύτευση απαιτεί ένα δεκτικό ενδομήτριο, ένα φυσιολογικό και λειτουργικό έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης και έναν συγχρονισμένο διάλογο ανάμεσα στους μητρικούς και εμβρυικούς ιστούς.

Η διαδικασία της εμφύτευσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρία στάδια: παράθεση (apposition), προσκόλληση (adhesion) και εισβολή/εισχώρηση (invasion). Κατά την παράθεση της βλαστοκύστης, τα τροφοβλαστικά κύτταρα εμμένουν στο δεκτικό επιθήλιο του ενδομητρίου. Η βλαστοκύστη θα “αγκυροβολήσει” επακόλουθα στην ενδομητρική βασική μεμβράνη (basal lamina) και στην στρωματική εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM). Σ'αυτό το σημείο, ο δεσμός εμβρύου-ενδομητρίου που κατορθώθηκε δεν μπορεί να μετατοπιστεί από την μητρική έκπλυση. Στη συνέχεια ακολουθεί η εισβολή βλαστοκύστης εντός του επιθηλίου (luminal epithelium).

Παρόλο που η βλαστοκύστη μπορεί να εμφυτευτεί σε διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς, απροσδόκητα στο ενδομήτριο, συμβαίνει μόνο κατά τη αυτό-περιοριζόμενη περίοδο που εκτείνεται από την 20η έως 24η ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου (LH+7 μέχρι LH+11 ημέρα). Η συγκεκριμένη περίοδος ονομάζεται “παράθυρο” της εμφύτευσης, και το ενδομήτριο είναι έτοιμο και αρκετά “ώριμο” για την προσκόλληση της βλαστοκύστης, δεδομένου πως απαιτείται μία ακριβής μορφολογικά και λειτουργικά διεγερμένη κατάσταση από ωθητικές στεροειδείς ορμόνες.

Η εμφύτευση περιλαμβάνει ένα περίπλοκο σύστημα σηματοδοτικών γεγονότων που είναι κρίσιμα για την εγκατάσταση της εγκυμοσύνης. Ένα μεγάλο νούμερο από αναγνωρισμένους μοριακούς μεσολαβητές, υπό την επιρροή ωθητικών ορμονών, έχουν αξιωθεί να συμμετάσχουν στην πρώιμη εμβryo-μητρική αλληλεπίδραση. Αυτοί οι μεσολαβητές περιπτύσσουν μία τεράστια ποικιλία από



ενδοκυτταρικά μόρια συμπεριλαμβανομένων μόρια παράθεσης, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, λιπίδια και άλλα. Η δεκτικότητα του ενδομητρίου δημιουργείται από την απόκτηση συνδεδετών παράθεσης και την ταυτόχρονη απώλεια ανασταλτικών παραγόντων που λειτουργούν ως φραγμός για την προσκόλληση εμβρύου.

Η σχετική αναποτελεσματικότητα της εμφυτευτικής διαδικασίας είναι παράδοξη σχετικά με το γεγονός πως η αναπαραγωγή είναι κρίσιμη για την επιβίωση του είδους. Η αποτυχία εμφύτευσης παραμένει ένα άλυτο πρόβλημα στην αναπαραγωγική ιατρική και θεωρείται η μεγαλύτερη αιτία υπογονιμότητας σε κατα τ'άλλα φυσιολογικές υγιείς γυναίκες. Όντως, ο μέσος εμφυτευτικός ρυθμός στην IVF διαδικασία κυμαίνεται στα 25%. Ανεπαρκής δεκτικότητα ενδομητρίου ευθύνεται για περίπου τα 2/3 των εμφυτευτικών αποτυχιών, ενώ το ίδιο το έμβρυο κατέχει μόνο το 1/3 αυτών. Επομένως, ίσως χρησιμοποιώντας δείγματα ενδομητρίου μέσω βιοψίας να αναγνωρισθούν οι διαφορετικοί παράγοντες που αναδεικνύουν την κατάλληλη δεκτικότητα ενδομητρίου και οι αλληλεπιδράσεις αυτών στην διαδικασία επικοινωνίας εμβρύου-μήτρας. <sup>(6)</sup>

Το κύριο μέρος αυτής της εργασίας αποτελείται από 4 κεφάλαια, τα οποία είναι το “παράθυρο” εμφύτευσης, η προετοιμασία μήτρας, τα πινοπόδια και οι μηχανισμοί εμφύτευσης (τόσο μηχανικοί όσο και μοριακοί), προκειμένου να καλυφθεί η διαδικασία της εμφύτευσης σφαιρικά.

## **1) “Παράθυρο εμφύτευσης” (Implantation window):**

### *1.1) “Παράθυρο” δεκτικότητας ενδομητρίου:*

Στα ποντίκια, η ευαισθησία της μήτρας με βάσει τις απαιτήσεις των στεροειδών ορμονών και την εμφύτευση, διακρίνεται σε προ-δεκτική, δεκτική και μη-δεκτική (refractory), όπως ορίστηκε σε πειράματα εμβρυικής μεταφοράς σε ψευδο-εγκυμονούσα ποντίκια. Κατά τη διάρκεια μίας φυσιολογικής κύησης, η παρουσία ενεργής βλαστοκύστης στην μήτρα αποτελεί ερέθισμα για εμφύτευση. Παρόλο που ποικίλα μη ειδικά ερεθίσματα, όπως ενδοαυλική έγχυση λαδιού, αέρος, ή μηχανικό ερέθισμα, μπορούν επίσης να πυροδοτήσουν συγκεκριμένες πτυχές από την κυτταρική φθαρτοποίηση σε ψευδο-εγκυμονούσα ή ορμονικά προετοιμασμένη μήτρα.

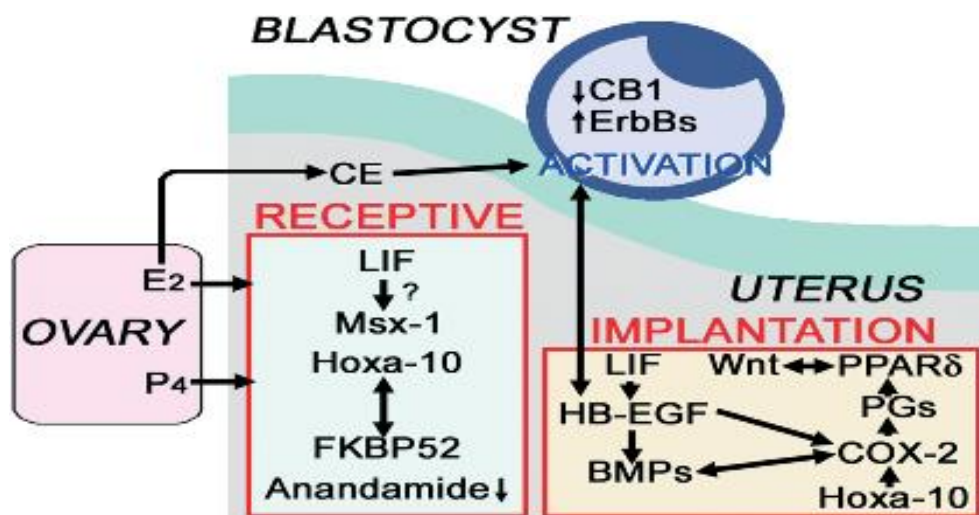
Η δεκτικότητα της μήτρας εκτείνεται μόνο σε μία περιορισμένη περίοδο τόσο σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες όσο και σε ψευδοκύσεις. Σε φυσιολογικά εγκυμονούσα ή ψευδοεγκυμονούσα ποντίκια, η προ-δεκτική μήτρα αντιστοιχεί στις ημέρες 1-3 και γίνεται πλήρως δεκτική την 4η ημέρα (την ημέρα της εμφύτευσης), ενώ στο τέλος της 5ης, η μήτρα φαίνεται μη-δεκτική και αποτυγχάνει να ξεκινήσει την εμφυτευτική διαδικασία. Είναι καλά αποδεκτό πως η συγκέντρωση της οιστραδιόλης σε μία στενή εμβέλεια καθορίζει την διάρκεια του παραθύρου δεκτικότητας. Η μήτρα καθίσταται δεκτική στην εμφύτευση βλαστοκύστης μόνο εάν εκτεθεί σε μικρή ποσότητα οιστραδιόλης, 24-48 ώρες μετά από την κορύφωση της προγεστερόνης.

Καθυστερημένη εμφύτευση είναι μία διαδικασία όπου η εμφύτευση αναβάλλεται για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο και παρουσιάζεται φυσιολογικά στα διάφορα είδη. Η μήτρα παραμένει σε ήρεμη κατάσταση και τα έμβρυα στο στάδιο βλαστοκύστης βρίσκονται σε καταστολή. Στα ποντίκια και στους αρουραίους, η αφαίρεση ωθηκών πριν την αναμενόμενη έκκριση οιστρογόνων το πρωί της 4ης ημέρας της εγκυμοσύνης έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία εμφύτευσης και ξεκινά η κατάσταση καταστολής της βλαστοκύστης εντός του μητρικού αυλού. Αυτή η συνθήκη ονομάζεται καθυστερημένη εμφύτευση και μπορεί να διατηρηθεί για πολλές ημέρες εφόσον συνεχιστεί η θεραπεία χορήγησης προγεστερόνης. Η διαδικασία της εμφύτευσης με την ενεργοποίηση της βλαστοκύστης μπορεί να πυροδοτηθεί ταχέως με μία απλή ένεση οιστραδιόλης στην προγεστερονική μήτρα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η οιστραδιόλη μεσολαβεί στις παραπάνω διαδικασίες είναι φτωχώς κατανοητοί. Καθυστερημένη εμφύτευση επίσης συμβαίνει φυσιολογικά (facultative) κατά τη διάρκεια της γαλουχίας μετά τον τοκετό, στην ωορρηξία και στην γονιμοποίηση ωαρίων στα ποντίκια και στους αρουραίους. Δεν έχει αποδειχθεί ακόμη εάν αυτό το φαινόμενο αντιστοιχεί και στους ανθρώπους. Αυτά τα μοντέλα καθυστερημένης εμφύτευσης στα ποντίκια και σε άλλα είδη χρησιμοποιούνται για την καλύτερη κατανόηση μοριακής σηματοδότησης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης.

Η ωοθηκική προγεστερόνη και τα οιστρογόνα δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες στην μήτρα για εμφύτευση και ειδικά η προγεστερόνη απαιτείται για την διατήρηση της εγκυμοσύνης. Οι δράσεις της προγεστερόνης συμπεριλαμβάνουν την διατήρηση των πολλαπλασιαστικών επιδράσεων των οιστρογόνων υπό έλεγχο και την καταστολή ήπιων μυικών συσπάσεων της μήτρας μέχρι τον τοκετό. Η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη δρουν μέσω των πυρηνικών υποδοχέων τους, PR και Era, αντίστοιχα, για να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην δεκτικότητα ενδομητρίου και στην φθαρτοποίηση. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται μέσω αυτών των υποδοχέων είναι μεταγραφικοί παράγοντες homeobox, κυτοκίνες, και μία ποικιλία από σηματοδοτικά μόρια. Οριστικά αποδεικτικά στοιχεία για τους ρόλους αυτών των γονιδίων στην εμφύτευση και φθαρτοποίηση έχουν προέλθει από μία παράταξη μοντέλων knockout γονιδίων σε ποντίκια.

Πρόσφατες αποδείξεις υποστηρίζουν πως μία σύντομη καθυστέρηση στην αντίδραση προσκόλλησης παράγει δυσμενή πολλαπλασιαστικές επιπτώσεις καθόλη τη διάρκεια εγκυμοσύνης, με απόκλιση ως προς την κατανομή εμβρύων, ελαττωματική τοποθέτηση, επαναρρόφηση, και καθυστερημένη ανάπτυξη εμβρύων, δίνοντας αυτομάτως ένα πτωχό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης. Η έννοια του συγχρονισμού ως κρίσιμο συστατικό για φυσιολογική εμβryo-πλακουντιακή ανάπτυξη και καθοριστή της έκβασης εγκυμοσύνης περιλαμβάνει ένα θέμα σχετικά με την κατεύθυνση του προγράμματος ανάπτυξης για το υπόλοιπο της εγκυμοσύνης μέσω της πρώιμης αλληλεπίδρασης εμβρύου-μήτρας.

Η εμφύτευση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένα περίπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει χωροχρονική ρύθμιση ενδοκρινικών, παρακρινικών, αυτοκρινών και παραμεμβρανικών μεσολαβητών που συνδέουν κύτταρα μεταξύ τους και κύτταρα με μητρικές ουσίες. Το έμβryo επίσης λειτουργεί ως ενεργή μονάδα με το δικό του μοριακό πρόγραμμα για κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Επομένως, ελλείψεις στην δεκτικότητα ενδομητρίου, εμβρυικής ανάπτυξης και διαλόγου μεταξύ εμβρύου-μήτρας διακινδυνεύουν την γονιμότητα. Ωστόσο, η ακριβής συχνότητα και λεπτομέρειες των μοριακών αλληλεπιδράσεων δεν έχουν οριστεί και γι'αυτό η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει σε πρόσφατα αναγνωρισμένα σηματοδοτικά δίκτυα που περιλαμβάνουν λιπιδιακά σήματα, αυξητικούς παράγοντες, Wnt πρωτείνες, ομοιοτικούς (homeotic) μεταγραφικούς παράγοντες, ανοσοφιλινών και άλλα. Καθένα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυική εμφύτευση και στον διάλογο μεταξύ εμβρύου-μήτρας, καθώς οποιαδήποτε αλλαγή προκαλεί δραματικές επιπτώσεις και μειώνει τις πιθανότητες επιτυχούς εγκυμοσύνης. <sup>(7)</sup>



Εικόνα 20: Πτυχές μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών που συμβάλλουν στην ενδομητρική δεκτικότητα και εμφύτευση στο ποντίκι. CE (κατεχολοιστρογόνα) , HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor), PGs (προσταγλανδίνες) , BMPs (bone morphogenetic proteins) LIF

### *1.2) Η λειτουργικότητα της βλαστοκύστης και η δεκτικότητα μήτρας καθορίζουν το “παράθυρο” της εμφύτευσης:*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δεκτικότητα ενδομητρίου για την βλαστοκύστη διαρκεί μόνο μία περιορισμένη χρονική περίοδο, ακολουθούμενη από μία αφθόρμητη μη-δεκτική φάση όπου το μητρικό περιβάλλον καθίσταται εχθρικό για την επιβίωση της βλαστοκύστης. Στους αρουραίους και στα ποντίκια, η δεκτικότητα ενδομητρίου διαρκεί 24-36 ώρες, ενώ αυτό το παράθυρο διαρκεί περισσότερο στα πρωτεύοντα. Στο παρελθόν θεωρούνταν πως κυρίως η δεκτικότητα ενδομητρίου καθόριζε την επιτυχία της εμφύτευσης ανεξαρτήτως την κατάσταση της βλαστοκύστης. Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες όπου μεταφέρθηκαν βλαστοκύστες σε καθυστερημένες εμφυτεύσεις ποντικών, υπέδειξαν πως η λειτουργικότητα της βλαστοκύστης είναι ένας επιπλέον καθοριστικός παράγοντας του παραθύρου. Για παράδειγμα, αδρανή βλαστοκύστη μεταφέρθηκε εντός καθυστερημένων προγεστερονικών μητρών μέσα σε μία ώρα μετά την έγχυση οιστρογόνων. Σε αντίθεση, φυσιολογικά έμβρυα 4 ημερών ή βλαστοκύστες που αναπτύχθηκαν εντός μήτρας σε οιστρογονικό περιβάλλον, εμφυτεύθηκαν επιτυχώς ακόμη και όταν μεταφέρθηκαν 16 ώρες μετά την οιστρογονική θεραπεία στους ίδιους δέκτες. Αντιθέτως, η μεταφορά αδρανών βλαστοκύστεων ή *in vitro* καλλιεργούμενες “μεταβολικώς ικανές” αδρανείς βλαστοκύστες, απέτυχαν να εμφυτευθούν ακόμη και στη διάρκεια της μίας ώρας από την οιστρογονική θεραπεία σε προγεστερονικά έτοιμους δέκτες. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν μία ξεκάθαρη διαφορά μεταξύ *in vitro* ενεργοποιημένων βλαστοκύστεων και αυτών που ενεργοποιήθηκαν από οιστρογόνα εντός μήτρας (*in utero*) και πως η εμφύτεση συμβαίνει όταν το παράθυρο δεκτικότητας ενδομητρίου συμπίπτει με την λειτουργική κατάσταση της βλαστοκύστης. Παρόμοια πειράματα μεταφοράς έδειξαν πως η προγεστερονική μήτρα υπό την παρουσία οιστρογόνων παράγει ραγδαία αλλά και παροδικά έναν παράγοντα που ενεργοποιεί τις αδρανείς βλαστοκύστες για εμφύτεση. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν για μία ακόμη φορά, πως η οιστρογονικά επαγόμενη δεκτικότητα ενδομητρίου και η ενεργοποίηση βλαστοκύστης είναι δύο ξεχωριστά γεγονότα, δίχως να είναι ακόμη γνωστό εάν επιτελούνται από τους ίδιους ή διαφορετικούς παράγοντες. <sup>(8)</sup>

### *1.3) Αναπτυξιακές αλλαγές στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του “παραθύρου” εμφύτευσης:*

Κατά την ωχρινική φάση του εμμηνορυσιακού κύκλου, μία σειρά αλλαγών συμβαίνει σε διαφορετικά ενδομητρικά συστατικά, ονομαστικά σε αδενικό και επιφανειακό επιθήλιο, στρωματικά κύτταρα, στρωματικά αγγεία και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Αυτές οι αλλαγές συγκλίνουν για να γίνει δεκτικό το ενδομήτριο ως προς το έμβρυο. Μερικές από αυτές τις αλλαγές προκαλούν πρόωρες εγκυμοσύνες και άλλες έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Η στιγμή της μέγιστης δεκτικότητας ορίζεται από μορφολογικές και βιοχημικές μελέτες καθώς και από κλινικές αναζητήσεις κατά τη διάρκεια IVF διαδικασίας ή δοκιμές εμβρυομεταφοράς:

#### *1.3.1) Δομικοί μάρτυρες:*

Κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο, η παρουσία των πινοποδίων στον κορυφαίο πόλο (apical pole) την μητρικών επιθηλιακών κυττάρων έχει περιγραφεί ως μάρτυρας της δομής για την επίδειξη δεκτικότητας. Η παρουσία πλήρως αναπτυγμένων πινοποδίων, τα οποία δεν υπερβαίνουν την περίοδο των 48 ωρών, ποικίλει από ασθενή σε ασθενή και επηρεάζεται από την ορμονική θεραπεία.

#### *1.3.2) Στρώμα γλυκοκάλιξης (glycocalyx) και MUC-1 πρωτεΐνη στην επιθηλιακή επιφάνεια:*

Η μη -προσκολλητική φύση του μητρικού επιθηλίου μπορεί μερικώς να αποδοθεί στο στρώμα γλυκοκάλιξης που καλύπτει την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Κατά την δεκτική περίοδο, μία μείωση του πάχους της ενδομητρικής γλυκοκάλιξης, καλύπτοντας την πλασματική μεμβράνη

της επιφάνειας επιθηλιακών κυττάρων έχει περιγραφεί στον ποντικό.

Όσο για την MUC-1 γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται στην επιφάνεια του επιθηλίου και η έκφραση της κορυφώνεται κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Έχουν προταθεί διαφορετικά μοντέλα κατανομής της πρωτεΐνης και πολλές αλληλεπιδράσεις για κυτταρικές συνδέσεις, δίχως να έχει αναγνωρισθεί ακόμη ο ακριβής ρόλος της.

### *1.3.3) Ιντεγκρίνες:*

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μία οικογένεια ετεροδιμερών επιφανειακών υποδοχέων, οι οποίοι διακρίνονται σε 2 υπομονάδες (α- και β- αλυσίδα). Κατηγοριοποιούνται σε 8 υπο-οικογένειες με βάση την β υπομονάδα τους. Τρεις υπομονάδες α1, α4 και β3 εκφράζονται συγκεκριμένα στο αδενικό επιθήλιο κατά την 4η ημέρα του διαστήματος από την 20η στην 24η ημέρα του κύκλου ανταποκρίνοντας στο θεωρούμενο παράθυρο της εμφύτευσης. Ο υποδοχέας βιτρονεκτίνης, ανβ3, εμφανίζεται απότομα την 20η ημέρα, στην αρχή του παραθύρου, ενώ ο υποδοχέας φιμπρονεκτίνης, α4β1, είναι παρών από την ωορρηξία μέχρι την 24η ημέρα, δηλαδή στο τέλος του παραθύρου. Και οι δύο αυτοί υποδοχείς συμμετέχουν στην ενδομητρική – τροφοβλαστική αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της εμφύτευσης.

Μη φυσιολογική έκφραση ιντεγκρινών έχει παρατηρηθεί στο ενδομήτριο γυναικών με αδυναμία αναπαραγωγής. Η απουσία της α4β1 ιντεγκρίνης που αναγνωρίζει την φιμπρονεκτίνη στην εμβρυϊκή τροφοβλάστη μπορεί να παρεμποδίσει την αναγνώριση εμβρύου από την μητέρα. Τέλος, έλλειψη της ανβ3 ιντεγκρίνης παρατηρήθηκε σε γυναίκες με καθυστερημένη ενδομητρική ανάπτυξη ή ενδομητρίωση.

### *1.3.4) Προσκόλληση βλαστοκύστης:*

Η εμφύτευση αποτελείται από την παράθεση, προσκόλληση και εισβολή της βλαστοκύστης αφού η ίδια απελευθερωθεί από την διάφανη ζώνη της. Η φαινομενική παράθεση των τροφοβλαστικών και μητρικών επιθηλίων αντιπροσωπεύει ένα βιολογικό παράδοξο. Στο σημείο της εμφύτευσης, δύο γενετικώς διαφορετικά επιθήλια, το επιθήλιο της βλαστοκύστης και η μη-παραταξική επιφάνεια του ενδομητρικού επιθηλίου, φαίνεται πως προσκολλούν στους κορυφαίους πόλους τους. Πρόωρες αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται στην πρόσδεση πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ογκοεμβρυϊκής φιμπρονεκτίνης), οι οποίες εκφράζονται στην εξωκυτταρική επιφάνεια των τροφοβλαστών, με ιντεγκρίνες που βρίσκονται στα κορυφαία-πλευρικά σύνορα των μητρικών επιθηλιακών κυττάρων. Αυτή η συσχέτιση μπορεί να συνεισφέρει στην απώλεια της πολικότητας των επιθηλίων και στην χαλάρωση των πλευρικών συνόρων. <sup>(9)</sup>

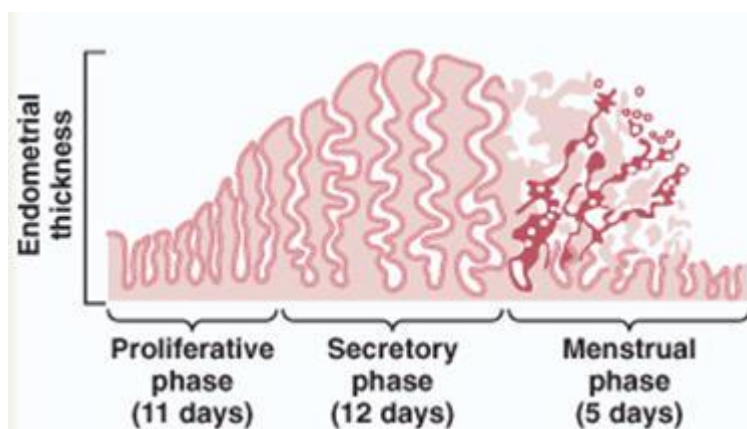
## **2) Προσαρμογής μήτρας:**

Η περίοδος κατά την οποία αναπτύσσεται ο ζυγώτης σε βλαστοκύστη αντιστοιχεί στη χρονική περίοδο από την 14η έως την 21η ημέρα ενός τυπικού καταμήνιου κύκλου. <sup>(2)</sup> Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου το ενδομήτριο υφίσταται μεταβολές μέσω της επίδρασης οιστρογόνων και προγεστερόνης. Οι μεταβολές αυτές αφορούν τόσο τους αδένες και τα αγγεία όσο και το στρώμα του ενδομητρίου. Γενικώς, τα οιστρογόνα προκαλούν υπερπλασία των κυττάρων των αδένων του ενδομητρίου με επιμήκυνση και ελίκωση των πόρων τους καθώς και αύξηση της αγγείωσης με τη δημιουργία σπειροειδών αρτηριδίων. Όταν η στάθμη των κυκλοφορούντων οιστρογόνων είναι χαμηλή, το πάχος του ενδομητρίου είναι μικρό και το ενδομήτριο αποτελείται κυρίως από τη βασική στιβάδα. Τα οιστρογόνα στο γεννητικό κύκλο προκαλούν την ανάπτυξη μίας νέας λειτουργικής στιβάδας που λέγεται λειτουργική. Η λειτουργική στιβάδα αποπίπτει με την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, οπότε απομένει η βασική στιβάδα, που αποτελείται από στρώμα και πυθμενικά τμήματα αδενίων καθώς και αραιό δίκτυο σπειροειδών αρτηριδίων.

Πιο συγκεκριμένα κατά την παραγωγική φάση, το επιθήλιο που καλύπτει στην αρχή του κύκλου

την επιφάνεια και τους αδένες είναι χαμηλό κυβοειδές και το πάχος του ενδομητρίου είναι 1-2mm. Με την επίδραση οιστρογόνων αρχίζουν να δημιουργούνται νέοι αδένες από τα πυθμενικά τμήματα των παλαιών, το στρώμα του ενδομητρίου αυξάνει και περιβάλλει τους αδένες, ενώ τα αγγεία διακλαδίζονται και φθάνουν μέχρι το μέσον περίπου του πάχους του νεοσχηματιζόμενου ενδομητρίου. Προς το τέλος της πρώτης φάσης του κύκλου, το πάχος του ενδομητρίου έχει φθάσει τα 3-5mm, οι αδένες έχουν γίνει ευμεγέθεις και ελικοειδείς, όπως ελικοειδή έχουν γίνει και τα αγγεία, τα οποία σταδιακά φθάνουν μέχρι την επιφάνεια του ενδομητρίου. Λόγω της παραγωγής της νέας αυτής στιβάδας, δηλαδή της λειτουργικής, η πρώτη φάση του κύκλου ονομάζεται και παραγωγική.

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ενδομήτριο δέχεται την επίδραση τόσο των οιστρογόνων όσο και της προγεστερόνης, που εκκρίνονται από το ωχρού σωματίου. Το χαρακτηριστικό της φάσης αυτής είναι η έκκριση γλυκογόνου μέσα στους αδένες του ενδομητρίου υπό την επίδραση της προγεστερόνης και γι'αυτό η φάση αυτή λέγεται εκκριτική. Στη φάση αυτή, οι αδένες γίνονται περισσότερο ελικοειδείς και τα αγγεία φθάνουν μέχρι την επιφάνεια του ενδομητρίου, ενώ τα κύτταρα του στρώματος μεταβάλλονται σε ευμεγέθη πολυγωνικά. Το στρώμα γίνεται οιδηματώδες και γενικώς το ενδομήτριο έχει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του περίπου την 21η ημέρα του κύκλου σε κύκλο 28 ημερών. <sup>(1)</sup> Κατά την 21η ημέρα περίπου, δηλαδή 7 ημέρες μετά την ωορρηξία, αρχίζει η εμφύτευση, δηλαδή η ένθεση της βλαστοκύστεως μέσα στο ενδομήτριο.



Εικόνα 21: Οι αλλαγές στην λειτουργική στοιβάδα ενδομητρίου

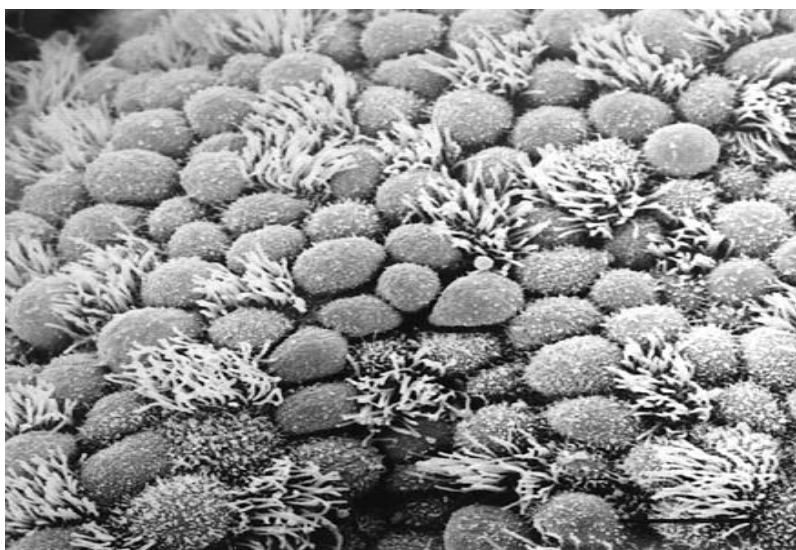
### **3) Πινοπόδια:**

Τα πινοπόδια είναι κυστικές προεξοχές που βρίσκονται στην κορυφαία επιφάνεια του ενδομητρικού επιθηλίου. Αυτές οι δομές είναι μερικών μικρομέτρων ευρείες και προεκβάλλουν στον μητρικό αυλό στο μικρολαχνικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκαν πρώτα στα ποντίκια και πολύ αργότερα στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Ο όρος των πινοποδίων προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “πόδια που πίνουν”, υποδηλώνοντας την λειτουργία της πινοκύττωσης στα ποντίκια. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί ακόμη καμία ενέργεια πινοκυττώσης στον άνθρωπο. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι το κύριο εργαλείο για την παρατήρηση αυτών των δομών, ενώ έχει προταθεί παράλληλα η χρήση του οπτικού μικροσκοπίου διευκολύνοντας την ανίχνευση αυτών.

Η έκφραση των πινοποδίων είναι περιορισμένη για ένα συγκεκριμένο διάστημα, με το μέγιστο αυτού να αφορά 2 ημέρες, του εμμηνορρυσιακού κύκλου, ανταποκρίνοντας στο θεωρούμενο “παράθυρο” της εμφύτευσης. Μερικοί έχουν ανιχνεύσει την έκφραση των πινοποδίων καθόλη τη διάρκεια της μέσης και όψιμης εκκριτικής φάσης, υποδεικνύοντας τις από τον κύκλο εξαρτώμενες μορφολογικές αλλαγές. Αυτό και μόνο προτείνει πως η μορφολογία, παρά η παρουσία ή απουσία των πινοποδίων, είναι μεγάλης σημασίας. Το ρυθμιζόμενο μοτίβο έκφρασης των πινοποδίων καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου υποστηρίζει την χρήση τους ως μάρτυρες της εμφύτευσης.

Τα πινοπόδια εξαρτώνται από την έκφραση της προγεστερόνης. Έχει σημειωθεί μία συσχέτιση μεταξύ της αύξησης του επιπέδου προγεστερόνης στη μέση ωχρινική φάση και την πρώτη

εμφάνιση των πινοποδίων στη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Ακόμη, το HOXA-10, ένα homeobox γονίδιο, του οποίου η έκφραση είναι απαραίτητη για την ενδομητρική δεκτικότητα για την εμφύτευση της βλαστοκύστης, έχει έναν ουσιώδη ρόλο στην ανάπτυξη των πινοποδίων. Όντως, μπλοκάροντας την έκφραση του HOXA-10 μειώνεται δραματικά ο αριθμός των πινοποδίων. Η HOXA-10 πρωτεΐνη κατέχει διπλό ρόλο στο ενδομήτριο ρυθμίζοντας και τον πολλαπλασιασμό των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου (ESC) και την μορφογένεση των επιθηλιακών κυττάρων. Παρόλο που ο ρόλος των πινοποδίων παραμένει άγνωστος, φαίνεται να αποτελούν το επιθυμητό σημείο της αλληλεπίδρασης μεταξύ εμβρύου και ενδομητρίου. Η προσκόλληση της βλαστοκύστης έχειδειχθεί πως συμβαίνει πάνω στην κορυφή των ενδομητρικών πινοποδίων. Υποθετικά, οι υποδοχείς που απαιτούνται για την παράθεση της βλαστοκύστης βρίσκονται στην επιφάνεια των πινοποδίων. Η ανάπτυξη των ενδομητρικών πινοποδίων σχετίζονται με την αυξανόμενη έκφραση του ανασταλτικού παράγοντα λευχεμίας (LIF) και των υποδοχέων του καθώς και την αύξηση της προγεστερόνης κατά τη μέση ωχρινική φάση. <sup>(6)</sup> Επίσης έχει φανερωθεί αύξηση της έκφρασης της ανβ3 ιντεγκρίνης και οστεοποντίνης σε in vitro συστήματα πινοποδίων. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες συμμετέχουν και προκαλούν το ενδομήτριο να γίνει δεκτικό για την εμφύτευση. <sup>(11)</sup> Η ανίχνευση των πινοποδίων κατά τη μέση εκκριντική φάση, παρόλες τις τεχνικές δυσκολίες όπως η κλινική χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, η σύντομη διάρκεια έκφρασης τους και η υποκειμένη φύση βαθμολόγησής τους, μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη για την αξιολόγηση της ενδομητρικής δεκτικότητας προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι αναλογίες εμφύτευσης. <sup>(6)</sup>



Εικόνα 22: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM) μίας ενδομητρικής βιοψίας την ημέρα LH+6. Η ενδομητρική επιφάνεια καλύπτεται από πινοπόδια δηλαδή κύτταρα που διαχωρίζονται μεταξύ τους με μονοβλεφαροειδή κύτταρα. Τα πινοπόδια βρίσκονται στο αναπτυξιακό στάδιο και μερικά φέρουν λείες επιφάνειες ενώ άλλα έχουν ακόμη μικρολάχνες στην επιφάνεια τους.

#### **4) Μηχανισμοί εμφύτευσης:**

*4.1) Προεμφυτευτική εμβρυική ανάπτυξη και η παράθεση (apposition) της βλαστοκύστης στην μήτρα:*

Η επιτυχής εμβρυική ανάπτυξη κατά την προεμφυτευτική περίοδο σε πολλά είδη, εξαρτάται από έγκαιρες ενεργοποιήσεις και διαστηματικό έλεγχο μητρικών και εμβρυικών γονιδίων. Τα μητρικά mRNAs στο ωάριο είναι μεταφραστικά ενεργά, ενώ η μεταγραφή τους είναι σιωπηλή κατά την ωρίμανση αυτού. Η ενεργοποίηση των γονιδίων του ζυγώτη (ZGA) αναφέρεται στην πρώτη ενεργοποίηση της έκφρασης τους σε αρκετά μικρό χρονικά διάστημα (διαφορετικό από κάθε είδος) μετά τη γονιμοποίηση. Μέχρι την ZGA ενεργοποίηση, οι μητρικές πρωτείνες και μετάγραφα που είναι αποθηκευμένα στο ωάριο, ελέγχουν την εμβρυική ανάπτυξη, υποδεικνύοντας την σημασία των μητρικών παραγόντων στα πρώιμα αναπαραγωγικά γεγονότα. Η μεταγραφή από το νεοσχηματιζόμενο γονιδίωμα του ζυγώτη εγκαθιδρύει ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης που απαιτούνται για την επακόλουθη εξέλιξη. Στο στάδιο του μοριδίου (12 με 16 βλαστομερίδια), 3η με 4η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο αναδιοργανώνεται σε κυτταρικό επίπεδο καθώς εισχωρεί από την σάλπιγγα στην μήτρα και αυτό ονομάζεται σύμπτυξη (compaction). Αυτό είναι το στάδιο έναρξης μορφολογικών αλλαγών που μπορούν να παρατηρηθούν. Η εμφάνιση της εσωτερικής κοιλότητας ανάμεσα στην κυτταρική μάζα αντιστοιχεί στην κατήχηση μορφοποίησης βλαστοκύστης, όπου εμφανίζονται 2 διακριτικοί τύποι κυττάρων: η εξωτερική κυτταρική μάζα ή τροφοεξώδερμα (TE) και η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM). Από το TE προέρχονται οι τροφοβλάστες και οι εξωεμβρυικές δομές όπως ο πλακούντας ενώ η ICM δημιουργεί το έμβρυο. Διάφορα γονίδια έχουν αναγνωρισθεί στον ποντικό που είναι κρίσιμα για αυτόν τον διαχωρισμό κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των Oct4, Sox2, Nanog, Cdx2 και Eomesodermin (Eomes) γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, η σύμπτυξη του μοριδίου στα ποντίκια συνοδεύεται από περιορισμό στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων όπως αυτών για τον CSF-1 (colony-stimulating factor-1) υποδοχέα, το ένζυμο Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase και μορίων προσκόλλησης κυττάρων (CAM), E-καδερίνη και τροφοβλαστικών mural κυττάρων. Ομόζυγα έμβρυα ποντικών που καταστήθηκαν γενετικά ανεπαρκή για το γονίδιο της E-καδερίνης, απέτυχαν να σχηματίσουν επιθήλιο του τροφοεξωδέρματος ή βλαστόκοιλο. <sup>(9)</sup>

Κατά τα πρώιμα στάδια διαμόρφωσης της βλαστοκύστης, ένα ειδικό για την έσω κυτταρική μάζα γονίδιο, ονομαζόμενο Lefty-1, έχει περιγραφεί σε έμβρυα ποντικών. Παραδόξως, η έκφραση του lefty περιορίζεται σε ένα υποσύνολο κυττάρων στην ICM της πρώιμης βλαστοκύστης και η έκφραση μετατοπίζεται σε μία περιοχή του αρχέγονου ενδοδέρματος (PE) στην προχωρημένου σταδίου βλαστοκύστη. Η ICM είναι αρχικά μωσαική από επιβλαστικών (EPI) και PE κυττάρων, υποστηρίζοντας πως η κίνηση του εμβρυικού άξονα εμφανίζεται από το στάδιο της βλαστοκύστης. Οι ασυμμετρίες της βλαστοκύστης και οι αρχόμενοι άξονες του εμβρύου προτείνουν πως οι πρώτες ασυμμετρίες μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών στην βλαστοκύστη θα παίξουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση του επακόλουθου εμβρυικού προτύπου. Στο στάδιο της βλαστοκύστης, το TE αρχίζει την εκκόλαψη (hatching) του από το γλυκοπρωτεϊνικό κάλυμα της διάφανης ζώνης και αποκτά την ικανότητα προσκόλλησης στο ενδομήτριο. <sup>(11)</sup> Η εκκόλαψη φαίνεται να ρυθμίζεται από το κυτταρικό δυναμικό, για παράδειγμα από τις τροφοεξωδερματικές προεκβολές ακτίνης, και αυτοκρινή όπως και παρακρινή μόρια, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και πρωτεϊνάσες. Επίσης, έχει αναφερθεί πως η σηματοδότηση από καθεψίνες (cathepsins), προσταγλανδίνες και πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) που προέρχεται από έμβρυα (ποντικών), εμπλέκονται στην διαδικασία της εκκόλαψης. <sup>(3)</sup> Παράλληλα με την εξαφάνιση της διάφανης ζώνης καθώς η βλαστοκύστη φτάνει στο σημείο της εμφύτευσης, πιθανώς προσανατολίζεται προκειμένου ο εμβρυικός πόλος να είναι σε επαφή με το μητρικό επιθήλιο, όπως έχει δειχθεί σε διάφορα πρωτεύοντα. Ο λανθασμένος προσανατολισμός της βλαστοκύστης μπορεί να εξηγήσει μερικές

πρώιμες αποτυχίες εμφύτευσης.<sup>(9)</sup> Την ίδια στιγμή της εκκόλαψης της διάφανης ζώνης και τον προσανατολισμό της βλαστοκύστης, το μητρικό περιβάλλον είναι ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη βλαστοκύστης, προσκόλληση της και τα επακόλουθα γεγονότα της εμφύτευσης. Επομένως, μία επιτυχής εμφύτευση εξαρτάται τόσο από την ικανότητα της βλαστοκύστης όσο και από την δεκτικότητα μήτρας. Αυτά μαζί είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση και εισβολή της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.

Πρόσφατες έρευνες στα ποντίκια αναγνώρισαν αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση τροφοβλαστικών κυτταρικών υποτύπων. Οι Hand1, Stra13 και Imfa είναι συναλασσόμενοι παράγοντες που εκφράζονται τόσο στα μεγάλα τροφοβλαστικά κύτταρα, ο κύριος κυτταρικός τύπος εισχώρησης, μεσολαβήτης στην εμφύτευση στα ποντίκια, όσο και στα κύρια ενδοκρινή κύτταρα του πλακούντα. Αυτά τα κύτταρα παράγουν αρκετές ορμόνες που ρυθμίζουν τα μητρικά ενδοκρινή και ανοσοποιητικά συστήματα και προωθούν την μητρική αιματική ροή στο σημείο της εμφύτευσης. Η έκφραση του γονιδίου της προλακτίνης A (Prlra) μειώνεται στην φθαρτοποιημένη μήτρα πλησίον σε Hand1- και Ets2- ελλειπή έμβρυα, προτείνοντας πως τα φυσιολογικά μεγάλα τροφοβλαστικά κύτταρα στον πλακούντα απαιτούνται για τα εξαρτώμενα από την έκφραση της Prlra γεγονότα στους ενδιάμεσους φθαρτοποιημένους ιστούς (mesometrial decidua). Επιπλέον, αυτά τα κύτταρα εκφράζουν και πλακουντιακό λακτογόνο 1 και 2 και μόριο ιντερφερόνης τύπου 1 που έχει την ικανότητα να προκαλεί την έκφραση της Glp2 στα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως η μοριακή σηματοδότηση των εμβρύων έχει τοπικές επιδράσεις στην μητρική έκφραση γονιδίων κατά την φθαρτοποίηση. Μέσω πολλών σχολαστικών μελετών έχει διερευνηθεί ένας μεγάλος αριθμός ορμονικών όπως hCG και μη – ορμονικών παραγόντων όπως PGE2 και PAF, αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες που παράγονται τόσο στο προεμφυτευτικό έμβρυο και στο μητρικό ενδομήτριο και αξίζει να αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

#### 4.1.1) Εμβρυικά σήματα και υποδοχείς:

Τα εμβρυικά σήματα περιλαμβάνουν αρκετούς παράγοντες:

Early pregnancy factor (EPF). Η παρουσία του από το ωάριο στον μητρικό οργανισμό είναι αισθητή πολύ νωρίς. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η τσαπερόνη 10 (cprn 10), ένα μέλος των μοριακών τσαπερονών, οι περισσότερες των οποίων όπως και η cprn 10 είναι heat-shock ή stress πρωτεΐνες.

1) Προεμφυτευτικός παράγοντας (PIF). Χρησιμοποιώντας λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια σε μία εργασία, αποδείχθηκε πως ο παράγοντας αυτός ανιχνεύεται στον μητρικό ορό 4 ημέρες μετά την γονιμοποίηση και πριν την εμφύτευση ενός βιώσιμου εμβρύου. Είναι μία χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη που έχει βρεθεί σε καλλιεργητικά μέσα από βιώσιμα προεμφυτευτικά έμβρυα, προτείνοντας την εμβρυική προέλευση.

2) Αυξητικοί παράγοντες: Μεταξύ του σταδίου των 8 κυττάρων και της πρώιμης βλαστοκύστης, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο transforming αυξητικός παράγοντας -α (TGF-α) αποδείχθηκε πως συνεκφράζονται μαζί με τους EGF-R υποδοχείς τους, προτείνοντας μία αυτοκρινή διέγερση της ανθρώπινης ανάπτυξης. Μετάγραφα από αυξητικούς παράγοντες αιμοπεταλίων -A (PDGF) και 2 υπομονάδες υποδοχέων, α και β, παρατηρήθηκαν στο έμβρυο από το στάδιο των 8 κυττάρων και μετέπειτα, ενώ το μορίδιο και η βλαστοκύστη βρέθηκαν να εκκρίνουν insulin-like αυξητικός παράγοντας 2 (IGF-2).<sup>(9)</sup> Πιο συγκεκριμένα:

##### i. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας:

Μέλη της EGF οικογένειας υποτίθεται πως συμμετέχουν σε πολλαπλές αναπτυξιακές, φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τον ίδιο τον EGF, TGF-α, τον HB-EGF την amphiregulin, την β-cellulin, την epiregulin και τις neuregulins. Οι EGF-like αυξητικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με υποτύπους υποδοχέων που ανήκουν στην ErbB οικογένεια γονιδίων των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης: ErbB1 (EGF-R), ErbB2, ErbB3 και ErbB4. Αυτοί μοιράζονται



κοινά δομικά χαρακτηριστικά αλλά διαφέρουν στην ειδικότητα προσδετών και στην ενεργότητα κινάσης.

Ο EGF εντοπίζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο καθόλη τη διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου, στο φθαρτοποιημένο κύημα (gestational decidua) και στο πρώτο-, δεύτερο-, τρίτο- τριμήνου πλακούντα. Στην πολλαπλασιαστική φάση ενδομητρίου, η ανοσοανίχνευση του EGF φανερώνεται στο κυτταρόπλασμα των στρωματικών κυττάρων, ενώ στο εκκριτικό ενδομήτριο η ανοσοανίχνευση είναι εντονότερη και εντοπίζεται κυρίως στα στρωματικά κύτταρα. Η έκφραση συμβαίνει επίσης τόσο στα φθαρτοποιήμενα όσο και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν πως ο EGF συμμετέχει στην εισχώρηση της τροφοβλάστης, στην διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό, τονίζοντας την σημαντική επιρροή του ως ρυθμιστής της εμφυτευτικής διαδικασίας.

Μελέτες σε ποντίκια ανέδειξαν πως η έλλειψη EGF κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης προκαλεί ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ή αποβολή. Αντικαθιστώντας τα οιστρογόνα, ο EGF μπορεί να επάγει την έναρξη της εμφύτευσης στους αρουραίους. Πραγματοποιώντας knockout γονιδίου του EGF υποδοχέα (EGFR ή ERBB1) στα ποντίκια οδηγεί σε προεμφυτευτικό θάνατο των εμβρύων. Επιπλέον, πολλές μελέτες έδειξαν πως ο EGF επηρεάζει την εμβρυική ανάπτυξη εμβρύων *in vitro* και προωθεί την διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων σε τύπο εισβολής/εισχώρησης, κρίσιμος κυτταρικός τύπος για την εμφύτευση. Οι υποδοχείς του EGF εκφράζονται σε πρώιμα στάδια εμβρύου και στην προ-εμφυτεύσιμη μήτρα. Το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης της EGF οικογένειας γονιδίων και των ErbBs στην μήτρα κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο προτείνει τις διαμερισματικές λειτουργίες των EGF-like αυξητικών παραγόντων στην εμφύτευση.

#### ii. Heparin binding EGF-like αυξητικός παράγοντας:

Ο HB-EGF μοιράζεται έναν κοινό υποδοχέα με τον EGF και τον TGF- $\alpha$ . Εκφράζεται στο ενδομητρικό στρώμα και στα επιθηλιακά κύτταρα και έχει δείχθει πως ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδομητρικών κυττάρων, την έκκριση των αδενικών επιθηλίων, και την μετατροπή σε φθαρτοποιημένα. Η έκφραση του φθάνει στην κορυφή κατά την μέση εκκριτική φάση στα μητρικά επιθηλιακά κύτταρα, δηλώνοντας τον ρόλο του ως ρυθμιστής της εμφύτευσης βλαστοκύστης. Οι δύο διαλυτές και διαμεμβρανικές μορφές του HB-EGF ανακαλύφθηκαν πρωτύτερα ως μοριακοί δείκτες της τοπικής ενδομητρικής δεκτικότητας στην μήτρα ποντικών, αποκλειστικά εκφραζόμενες στην θέση της ενεργής βλαστοκύστης πριν την προσκόλληση της. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν παρακρινή και/ή παραμεμβρανικές αλληλεπιδράσεις με τα εμβρυικά ErbBs όπως και παρακρινή, αυτοκρινή και/ή παραμεμβρανικές αλληλεπιδράσεις με τα μητρικά ErbBs που εκφράζονται με χωροχρονικό τρόπο κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο. Αυτό το συμπέρασμα ακολουθείται από την έκφραση της  $\beta$ -cellulin, της epiregulin, της neuregulin-1 και του COX-2 περίπου τη στιγμή της προσκόλλησης. Ισχυρή έκφραση της amphiregulin στο κορυφαίο επιθήλιο βρέθηκε μόνο γύρω από την εμφυτευτική βλαστοκύστη, και η έκφραση αυτή απουσιάζει από την 5η ημέρα εγκυμοσύνης. Σε ποντίκια με στοχευμένες διαταραχές των EGF/TGF- $\alpha$ /amphiregulin παραγόντων δεν επιδεικνύεται ελαττωματική εμφύτευση επειδή οι HB-EGF, betacellulin, neuregulin και amphiregulin παράγοντες έχουν επικαλυπτόμενα μητρικά πρότυπα έκφρασης γύρω από την εμφυτευτική βλαστοκύστη την στιγμή της προσκόλλησης.

Στους ανθρώπους, ο HB-EGF φαίνεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση και εμβρυική ανάπτυξη. Η έκφραση του είναι μέγιστη κατά την περίοδο δεκτικότητας. Η ομάδα Martin et al έδειξε πως η διαλυτή μορφή του παράγοντα αυξάνει το ρυθμό εκκόλαψης της βλαστοκύστης και η ομάδα Chobotova et al ανέφερε πως τα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζοντας την διαμεμβρανική μορφή του HB-EGF, προσκολλούν το τροφοεξώδερμα της ανθρώπινης βλαστοκύστης παρουσιάζοντας στην κυτταρική επιφάνεια των ErbB4 παράγοντα.

### iii. Transforming αυξητικός παράγοντας β:

Η TGF-β οικογένεια αυξητικών παραγόντων περιέχει 3 ισομορφές. Ο TGF-β έχει πλειοτροπικές δράσεις, παίζοντας πρωταγωνιστικούς ρόλους στην μορφογένεση και ανάπτυξη ιστών. Η ανίχνευση των ισομορφών του TGF-β στην μητρική-εμβρυική διεπαφή συνδυαστικά με τους γνωστούς ρόλους του παράγοντα στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην μετάσταση, ξεκάθαρα ενοχοποιείται για τα κυτταρικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την εμφύτευση.

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο, η TGF-β πρωτεΐνη και το mRNA του εντοπίζονται στα ενδομητρικά στρωματικά, επιθηλιακά και φθαρτοποιημένα κύτταρα. Προηγουμένως είχε δειχθεί πως η έκφραση του TGF-β2 είναι πιο έντονη στα στρωματικά κύτταρα, ενώ η έκφραση του TGF-β1 και TGF-β3 είναι ίσης έντασης. Μόνο η έκφραση της β3 ποικίλλει κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου, γίνοντας μέγιστη κατά τη τελική εκκριτική φάση. Ο TGF-β1 αυξάνει την ογκοεμβρυική φμπρονεκτίνη στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και διεγείρει την προσκόλληση της τροφοβλάστης στην ECM κατά την εμφύτευση. Οι TGF-β1, -β2 και -β3 όπως και οι υποδοχείς τους έχουν επίσης ανιχθευθεί στην εμβρυική-μητρική διεπαφή κατά τη διάρκεια πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης. Οι TGF-βς ελέγχουν την ανοσοανοχή κατά την εμφύτευση και ρυθμίζουν *in vitro* πολλά μόρια που εμπλέκονται στην εμφύτευση όπως VEGF, MMP-9, IGFBP-1 και LIF. Όταν έγινε TGF-β1 knockout σε ποντίκια παρατηρήθηκε είτε θάνατος εμβρύων εντός της μήτρας είτε πολύ νωρίς μετά την γέννα, προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο στην εμφύτευση. Μία μελέτη των TGF-β υποδοχέων τύπου 1 και 2 και των επαγωγέων σηματοδότησης τους, Smad2 και Smad4, στο ενδομήτριο αρουραίων κατά τον οίστρο και στην αρχή της κύησης, προτείνει πως η λειτουργική TGF-β σηματοδότηση είναι χωροχρονικά συσχετιζόμενη με την έναρξη της μητρική δεκτικότητας και με την προσκόλληση εμβρύου, ενώ μειώνεται κατά την εισβολή της βλαστοκύστης. Εναλλακτικά, ο TGF-β επίσης καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την εισχώρηση της βλαστοκύστης διεγείροντας την έκκριση της TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) και ελαττώνοντας την ενεργοποίηση της MMP (matrix metalloproteinase) μέσω της καταστολής ενεργοποιητών πλασμινογόνου. Αυξημένη TGF-β δραστηριότητα έχει αναφερθεί στο πλάσμα προεκλαμψιακών μητέρων υποδεικνύοντας την συσχέτιση διαταραγμένης εμφύτευσης με την εμφάνιση προεκλαμψίας. Επομένως, ο TGF παράγοντας μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ενδομητρικό σήμα που είναι ικανό να ρυθμίζει την τροφοβλαστική εισβολή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και της δημιουργίας του πλακούντα.

### iv. Insulin-like growth factor binding protein και insulin-like growth factor-1:

Η IGFBP-1 είναι μία από τις 6 ομόλογες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ειδικά τις μιτογονικές και μεταβολικές δράσεις των IGF-1 και IGF-2 αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι έχουν σημαντικές θέσεις στις διαδικασίες της ανάπτυξης, απόπτωσης, μεταβολισμού και εξέλιξης. Η IGFBP-1 πρωτεΐνη εκφράζεται πρωταρχικά στο συκώτι, νεφρό, φθαρτοποιημένο ενδομήτριο και ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Τόσο η πρωτεΐνη όσο και το mRNA της εντοπίζονται σε προφθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα στην τελική εκκριτική φάση ενδομητρίου και στα φθαρτοποιημένα κύτταρα κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης. Η πρωτεΐνη αυτή αυξάνει την ζελατινολυτική δραστηριότητα της t3 και καταστέλλει την τροφοβλαστική μετάσταση εντός των πολλαπλών φθαρτοποιημένων στρωμάτων. Τα πρότυπα έκφρασης προτείνουν πως η IGFBP-1 είναι η επικρατέστερη IGFBP που συνθέτεται στα φθαρτοποιημένα κύτταρα και αλληλεπιδρά με τον IGF2 που συντίθεται στην τροφοβλάστη, αντίστοιχα, ρυθμίζοντας την εισχώρηση της. Οι IGF-II και IL-1β παράγοντες είναι ανασταλτικοί της IGFBP1 πρωτεΐνης, με την IL-1β να καταστέλλει την φθαρτοποίηση, ενώ άλλοι αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF-β, ο SCF(stem cell factor), ο CSF-1(colony-stimulating factor-1) και ο LIF δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της IGFBP1. Σε *in vitro* μελέτες που έγιναν σε έμβρυα ποντικών, αποδείχθηκε πως προσθέτοντας IGF1 πρωτεΐνη

στο καλλιεργητικό του μέσο είχε τρομερή μείωση του αριθμού αποπτωτικών κυττάρων ανά έμβρυο, κυρίως σε κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας, ενώ η συμπλήρωση με αυξητικές ορμόνες έχουν παρόμοιες επιδράσεις στα τροφοεξωδερματικά κύτταρα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στους ανθρώπους. Η ομάδα Spanos et al βρήκε πως το ποσοστό των αποπτωτικών πυρηνίσκων στις ανθρώπινες βλαστοκύστες μειώθηκαν κατά ~50% μετά από προσθήκη IGF1 στο καλλιεργητικό μέσο.

#### v. Vascular endothelial growth factors:

Ο VEGF είναι ένα κυτταρικά-ειδικό ενδοθηλιακό μιτογόνο in vitro και ο βασικός παράγοντας υπεύθυνος για de novo μορφοποίηση αιμοφόρων αγγείων και αγγειογένεσης σε μία ποικιλία in vivo μοντέλων. Ο VEGF (ή όπως αλλιώς αναφέρεται ως VEGF-A) είναι μέλος μίας οικογένειας αυξητικών παραγόντων που περιλαμβάνει τον PlGF (placenta growth factor), τον VEGF-B, τον VEGF-C και τον VEGF-D. Ο παράγοντας αυτός προσδέεται αμέσως στους επιφανειακούς υποδοχείς του, VEGFR-1(Flt-1) και VEGFR-2 (Flk-1/KDR) που είναι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης τύπου 3. Ο VEGFR-1 υποδοχέας προσδέει επίσης την PlGF πρωτεΐνη, κοντά σχετιζόμενη με τον VEGF, και εκφράζεται μόνο σε περιορισμένα κομμάτια ιστών όπως ο πλακούντας.

Είναι ευρέως γνωστό πως η εμφύτευση συμβαίνει κάτω από υποτοξικές συνθήκες. Η μεταγραφή του VEGF-A γονιδίου διεγείρεται από υποτοξικές συνθήκες. Ο VEGF παράγοντας εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μητέρας και εμβρύου ρυθμίζοντας την αυξημένη ενδομητρική αγγειακή διαπερατότητα και τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της εμφύτευσης στους αρουραίους. Επιπλέον, η έκφραση της VEGF-A πρωτεΐνης στο ανθρώπινο ενδομήτριο εξαρτάται από τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και ανιχνεύεται πιο συγκεκριμένα στο ενδομητρικά στρωματικά, αδενικά και ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη μέση εκκριτική φάση στον άνθρωπο, παρόλο που η μέγιστη έκφραση της φανερώνεται στη μέση και τελική πολλαπλασιαστική φάση. Και οι δύο υποδοχείς, VEGFR-1(Flt-1) και VEGFR-2 (Flk-1/KDR), είναι παρών σε μικροαγγεία κατά τη μέση εκκριτική περίοδο, τονίζοντας την σχέση μεταξύ αυξανόμενης αγγειακής πυκνότητας και αγγειακής διαπερατότητας που παρατηρείται εκείνη τη στιγμή. Επίσης, η έκκριση του VEGF στον αυλό των ενδομητρικών αδένων σε καλλιέργειες ανθρώπινων πολωμένων ενδοθηλιακών κυττάρων προτείνει πως η ριζική έκκριση του VEGF μπορεί να λειτουργεί ως ενδομητρικό σήμα για την ανάπτυξη της βλαστοκύστης, την εμφύτευση ή και τα δύο μαζί. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα και το ενδομητρικό επιθήλιο σε rhesus μαιμούδες επίσης εκφράζουν VEGF κατά τον πρώιμο χνοώδες στάδιο της εμφύτευσης και της δημιουργίας πλακούντα. Επιπλέον, χορηγώντας mifepristone κατά τη πρώιμη εκκριτική φάση προκαλεί αποτυχία εγκυμοσύνης, διαταραχή συγχρονισμού ενδομητρίου και καταστολή της έκφρασης και έκκρισης του VEGF σε rhesus μαιμούδες. Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως χορηγώντας ένα ανοσοεξουδετερωτικό μονοκλωνικό αντίσωμα VEGF στα 10mg από την 5η έως 10η ημέρα μετά την ωορρηξία καταστέλλει σημαντικά την εγκαθίδρυση εγκυμοσύνης. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν 2 βασικούς ρόλους του VEGF στον ενδομητρικό ιστό: πρώτον, ο παράγοντας αυτό ρυθμίζει την ενδομητρική αγγείωση και την αγγειακή διαπερατότητα και δεύτερον, εγκαθιδρύει ένα δεκτικό ενδομήτριο για να υποστηρίξει την εμφύτευση της βλαστοκύστης και την εισχώρηση της τροφοβλάστης. <sup>(11)</sup>

#### 3)Κυτοκίνες:

Οι κυτοκίνες είναι μία οικογένεια διαλυτών πρωτεϊνών, που πιστεύονταν πως παράγονται μόνο στον μυελό των οστών, στο ανοσοποιητικό σύστημα και στα κυκλοφοριακά αιμοπετάλια όπου και ανακαλύφθηκαν αρχικά. Αργότερα, αποδείχθηκε πως αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται σε πολλούς ακόμη ιστούς συμπεριλαμβανομένων των αναπαραγωγικών και εμβρυικών ιστών. Ο όρος αυξητικός παράγοντας συγγέεται μερικές φορές εναλλακτικά με τον όρο κυτοκίνες. Ενώ ο αυξητικός παράγοντας επιφέρει μία θετική επίδραση στην διαίρεση του κυττάρου, η κυτοκίνη είναι ένας ουδέτερος παράγοντας σε σχέση με ένα μόριο που επιδρά στον πολλαπλασιασμό. Υπό αυτήν

την έννοια, μπορεί μερικές κυτοκίνες να είναι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο granulocyte colony-stimulating παράγοντας και ο granulocyte-macrophage colony stimulating παράγοντας που ανιχνεύθηκαν από το στάδιο των 2 έως το στάδιο των 8 κυττάρων έμβρυα. Ωστόσο, μερικές κυτοκίνες παρουσιάζουν ανασταλτικό χαχαρκτήρα στην κυτταρική ανάπτυξη ή πολλαπλασιασμό. Ενώ άλλες όπως ο Fas προσδέτης, χρησιμοποιούνται ως σήματα θανάτου γιατί υποβάλλουν σε στοχευμένα κύτταρα να υποπέσουν σε απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο. Παρακάτω θα αναφερθούν οι κύριες κυτοκίνες που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της εμφύτευσης:

i. Leukemia inhibitory effect:

Η LIF είναι μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη και περιγράφεται ως ο παράγοντας που προκαλεί μακροφαγική διαφοροποίηση στην μυελοειδή λευχαιμική κυτταρική σειρά M1. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα μέλος της IL-6 οικογένειας κυτοκινών και ποικίλει στις λειτουργίες της όπως διέγερση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίηση και επιβίωση- όλες απαραίτητες λειτουργίες για την ανάπτυξη της βλαστοκύστης και την εμφύτευση. Οι πλειοτροπικές επιδράσεις της LIF πραγματοποιούνται μέσω της πρόσδεσης της με τον ετεροδιμερή υποδοχέα της LIFR, ο οποίος αποτελείται από 2 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, LIFR και gp130. Ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων το Jak/STAT, το MAPK και το PI3-kinase (PIPK) μονοπατιών. Στο ενδομήτριο μίας γόνιμης γυναίκας, τόσο η πρωτεΐνη όσο και το mRNA της εκφράζονται καθ'όλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου με σημαντική αύξηση κατά τη μέση και όψιμη εκκριτική φάση καθώς και στην αρχή της κύησης. Το mRNA της LIF καθώς και η ίδια η πρωτεΐνη εντοπίζονται κυρίως στο αδενικό και βασικό επιθήλιο και στο στρώμα. Έντονη έκφραση του mRNA της έχει επίσης ανιχνευθεί στα ανθρώπινα φθαρτοποιημένα λευκοκύτταρα, που είναι άφθονα στο σημείο της εμφύτευσης, προτείνοντας πως αυτή η πρωτεΐνη μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μητρικών φθαρτοποιημένων λευκοκυττάρων με τα εισχωρητικά κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Στους ανθρώπους, η προγεστερόνη είναι ένας ρυθμιστής της έκφρασης της LIF, παρόλο που τοπικά παραγόμενοι παράγοντες, όπως ο HB-EGF και ο TGF-β1, ρυθμίζουν την έκκριση της σε καλλιεργούμενα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα *in vitro* με τρόπο εξαρτώμενο από τις συγκεντρώσεις και τον χρόνο, αντιστοιχώντας κάτι παρόμοιο *in vivo*. Η ομάδα Song et al έδειξε πως η έκφραση αρκετών μελών της EGF οικογένειας μειώνεται σε μία μήτρα που είναι LIF-ελλειπής κατά την εμφύτευση, παρόλο που οι υποδοχείς (erbBs) αυτών εκφράζονται επαρκώς.

Η LIF πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε ανθρώπινες μητρικές εκπλύσεις κατά την στιγμή αναμενόμενης εμφύτευσης σε γόνιμες γυναίκες, με παροδική αύξηση των συγκεντρώσεων από την LH+7 μέχρι την LH+12 ημέρα. Κάτι ενδιαφέρον φανερωθήκε από εκπλύσεις γυναικών με ανεξήγητη υπογονιμότητα πως έφεραν χαμηλές συγκεντρώσεις της LIF από εκπλύσεις γόνιμων γυναικών που πάρηκαν την ίδια ακριβώς στιγμή. Επιπλέον, μεταλλάξεις του γονιδίου της LIF μπορούν να μειώσουν την βιολογική δραστηριότητα της αντίστοιχης πρωτεΐνης στο ενδομήτριο προκαλώντας αποτυχημένη εμφύτευση. Ωστόσο, ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα και σε γυναίκες που απέτυχε η εμφύτευση μετά από IVF θεραπεία, δεν αποκάλυψαν καμία κρίσιμη αιτιολογία των προβλημάτων.

Το μητρικό μέσο σε LIF μεταλλαγμένα ποντίκια απέτυχε να προκαλέσει την εμφύτευση ανεξάρτητα από το γονότυπο της βλαστοκύστης γιατί LIF<sup>(-/-)</sup> βλαστοκύστες μπορούν να εμφυτευτούν σε άγριου τύπου ψευδοεγκυμονούσες δέκτες. Αυτά τα αμοιβαία πειράματα εμβρυικής μεταφοράς προτείνουν πως η μητρική LIF είναι απαραίτητη για την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της κυτοκίνης στις εμβρυικές λειτουργίες δεν μπορεί να παρεβλεφθεί γιατί οι υποδοχείς της (LIFR/gp130) εκφράζονται στο στάδιο της βλαστοκύστης, και η εξωγενής χορήγηση της LIF βελτιώνει την βιωσιμότητα εμβρύου καθώς και την εκκόλαψη σε διάφορα είδη. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, σημαντικές δράσεις της LIF συμβαίνουν τόσο στο προεμφυτευτικό έμβryo όσο και στην μήτρα. Ωστόσο, έβρυα στα οποία υπάρχει έλλειψη υποδοχέων μπορούν να εμφυτευτούν φυσιολογικά αλλά πεθαίνουν κατά την περιγεννητική περίοδο. Επομένως η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να σηματοδοτεί τόσο εμβρυικά όσο και μητρικά κύτταρα κατά την διάρκεια της εμφύτευσης. Η έλλειψη της gp130 πρωτεΐνης στα ποντίκια επιφέρει

εμβρυική θνησιμότητα. Το mRNA της gp130 εντοπίζεται κυρίως στο αδενικό και κορυφαίο επιθήλιο στο ανθρώπινο ενδομήτριο και έχει παρατηρηθεί επίσης στο έμβρυο σταδίου 3ων κυττάρων και στα επακόλουθα του. Η διαλυτή μορφή της που εκκρίθηκε από ενδομητρικούς ιστούς γυναικών από την 20η έως την 26η ημέρα του κύκλου βρέθηκε σε 20-πλάσια υψηλότερη συγκέντρωση από την πολλαπλασιαστική φάση. Σημαντικότερα, η έκκριση αυτής της διαλυτής πρωτεΐνης στους ενδομητρικούς ιστούς μεταξύ των LH+6 και LH+13 ημερών είναι μειωμένη σε υπογόνιμες γυναίκες σε σχέση με τις γόνιμες. Αυτά τα δεδομένα αθροιστικά φανερώνουν πως η παρουσία της διαλυτής μορφής του υποδοχέα στο ενδομήτριο υπαινίσσεται σπουδαίο ρόλο στις δράσεις της κυτοκίνης.

#### ii. Interleukin-6:

Η IL-6 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικούς ρόλους στην άμυνα του ξενιστή, η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού, αντίδραση οξείας φάσης και στην αιμοτοποίηση. Η IL-6 πρωτεΐνη έχει έναν λειτουργικό πλεονασμό μαζί με την IL-11 και LIF πρωτεΐνη. Η δραστηριότητα της ασκείται μέσω της πρόσδεσης της ένα σύμπλεγμα υψηλής συγγένειας υποδοχέα που αποτελείται από 2 μεμβρανικές πρωτεΐνες (IL-6R και gp130). Ποντίκια με IL-6 έλλειψη εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα και ελάττωση βιώσιμων σημείων εμφύτευσης.

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο, η IL-6 εκφράζεται αδύναμα κατά την πολλαπλασιαστική φάση αλλά ισχυρή επιθηλιακή ανοσοδραστικότητα παρουσιάζεται κατά τη μέση έκκριτική φάση όταν υφίσταται το παράθυρο της εμφύτευσης. Επίσης, η έκκριση της από τα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα ενισχύεται από την ιντερφερόνη-γ. Στο πρώτο τρίμηνο τροφοβλαστών, τόσο η πρωτεΐνη όσο και το mRNA της παρουσιάζονται και στα κυτταροτροφοβλαστικά και στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Η έκφραση των κυτοκινών μειώνεται σημαντικά κατά τη διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστικών σε συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων και η συγκεντρωση της IL-6 συναντάται υψηλότερη στο φθαρτοποιημένο ιστό παρά στο πλακουντιακό ιστό. Επιπλέον, ο υποδοχέας της βρίσκεται κυρίως στο αδενικό επιθήλιο και σε λιγότερη έκταση στο στρώμα καθ'όλη τη διάρκεια γεννητικού κύκλου. Επομένως, και αυτή η κυτοκίνη συμμετέχει στην ανθρώπινη εμφύτευση. Όταν τα επίπεδα της έκκρισης της μετρήθηκαν από βιοψίες ενδομητρίου μεταξύ των LH+6 και LH+14 ημερών τόσο γόνιμων όσο και υπογόνιμων γυναικών, δεν βρέθηκε καμία διαφορά. Ωστόσο μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η ενδομητρική έκφραση των IL-6 και IL-1 πρωτεϊνών μειώθηκε σε μία ομάδα γυναικών που υπέστησαν ανεξήγητες επαναλαμβανόμενες αποβολές σε σχέση με γόνιμες γυναίκες.

#### iii. Interleukin-11:

Η IL-11 αρχικά είχε περιγραφεί ως αυξητικός παράγοντας λειτουργώντας σε πολλαπλά στάδια κατά την αιματοποίηση, συνεργαστικά με άλλους παράγοντες. Η πρωτεΐνη αυτή έχει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες όσο και πλειοτροπικές δράσεις σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ποντίκια στα οποία έγινε IL-11 knockout γονιμοποιητικά ελαττώματα εξαιτίας της προεμφυτευτικής ανταπόκρισης στις βλαστοκύστες. Όλο και περισσότερες αποδείξεις υποδηλώνουν πως η λειτουργία της LIF-11 εμπλέκεται στην ανθρώπινη εμβρυική εμφύτευση. Η IL-11 πρωτεΐνη και ο υποδοχέας της IL-11Ra έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Παρόλο που όλοι οι βασικοί κυτταρικοί τύποι του ενδομητρίου εκφράζουν αυτήν την πρωτεΐνη σε κυκλική διακύμανση, η επικρατέστερη ανοσοδραστικότητα και έκφραση του mRNA συναντάται στα φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα όψιμα του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Δεν υπάρχει κυκλική διακύμανση στην έκφραση του υποδοχέα, καθιστώντας τον προσδέτη κρίσιμο για την λειτουργία της IL-11 στο ενδομήτριο. Επιπλέον, εισχωρητικά τροφοβλαστικά κύτταρα είναι πηγή των IL-11 και IL-11Ra κατά την πρώιμη εγκυμοσύνη στα πρωτεύοντα, προτείνοντας μία περιπλοκή στην δημιουργία του πλακούντα. Η IL-11 πρωτεΐνη εμπλέκεται τόσο στην in vivo όσο και στην in vitro φθαρτοποίηση. Βρέθηκε αύξηση στην ρύθμιση του mRNA της πρωτεΐνης κατά

την προγεστερονικά- ή cAMP- επαγόμενη *in vitro* φθαρτοποίηση ενδομητρικών στρωματικών φιμπροβλαστών. Ακόμη πιο ενδιαφέρουσα ήταν η έρευνα σε ποντίκια πως η IL-11 σηματοδότηση απαιτείται για την ειδικά-φθαρτοποιημένη ωρίμανση των φυσικών φονικών κυττάρων (NK), αποδεικνύοντας την σημασία της στην εγκαθίδρυση βιώσιμων κυήσεων. Υπάρχουν γνώσεις σχετικές για την λειτουργία της πρωτεΐνης που αφορούν μόνο τα πρώτα στάδια εμφύτευσης. Μελλοντικές μελέτες πρέπει να επικυρώσουν και να ερευνήσουν περαιτέρω την σημασία των κυτοκινών στην ανθρώπινη εμφύτευση.

#### iv) Interleukin- 15

Η IL-15 είναι ένα 14-15 kDa μέλος της οικογένειας των 4 ελικοειδών κυτοκινών που περιλαμβάνει την IL-2 και ενισχυτές ενεργοποίησης ουδετερόφιλων, μακροφάγα, και T κύτταρα αλλά πιο σημαντικά αποτελεί τον πυρήνα χημειοκινών που ελέγχουν την λειτουργία και διατήρηση των λευκοκυττάρων. Η IL-15 πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη των NK στον μυελό των οστών και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, την παραγωγή κυτοκινών και την κυτταροτοξικότητα των ενεργών αιμοποιητικών NK κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή αναφέρεται να είναι σημαντική για την παραγωγή κυτοκίνης τύπου 2 από τα uNK κύτταρα. Αντίθετα από τις δράσεις της στα αιμοποιητικά NK κύτταρα, δεν μετατρέπει τα uNK κύτταρα σε ισχυρά κυτταρολυτικά κύτταρα. Αυτό είναι άκρως σημαντικό για ένα κύτταρο που είναι παρών στην διεπαφή εμβρύου μήτρας όπου η κυτταρολυτική δραστηριότητα καταστρέφει την τροφοβλάστη. Είναι απολύτως κατανοητό να θεωρείται πως στην ανθρώπινη μήτρα, η IL-15 πρωτεΐνη προωθεί την επέκταση και επιβίωση των uNK κυττάρων. Το mRNA της καθώς και η ίδια η πρωτεΐνη έχουν παρατηρηθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο μη εγκύων γυναικών, στον φθαρτό και στον πλακούντα με την πρωτεΐνη να εντοπίζεται περιαγγειακά στους στρωματικούς ινοβλάστες την εκκριτικής φάσης, στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα κατά την πολλαπλασιαστική φάση και στον φθαρτό στο πρώτο τρίμηνο εγκυμοσύνης. Ποντίκια που υπέστησαν knockout της IL-15 είναι γόνιμα αλλά παρουσιάζουν διαταραχές στην ακεραιότητα του φθαρτού, μη τροποποιημένες σπειροειδείς αρτηρίες και έλλειψη uNK κυττάρων στο σημείο της εμφύτευσης.

Οι ανθρώπινοι ενδομητρικοί στρωματικοί ινοβλάστες που φθαρτοποιούνται χρησιμοποιώντας είτε cAMP είτε προγεστερόνη έδειξαν ενισχυμένη έκφραση mRNA της IL-15 και έκκριση πρωτεΐνης που ενισχύεται περαιτέρω από την παρουσία της ιντερφερόνης  $\gamma$ , παρόλο που η τελευταία κυτοκίνη από μόνη της δεν μπορεί να διεγείρει την παραγωγή της IL-15. Η προφανής πηγή της ιντερφερόνης  $\gamma$  στο ενδομήτριο είναι τα uNK κύτταρα καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως η ενίσχυση παραγωγής της πρωτεΐνης στα φθαρτοποιημένα κύτταρα σχετίζεται από τα μητρικά NK κύτταρα. Η IL-1 $\beta$  πρωτεΐνη παίζει έναν αντίθετο ρόλο γιατί δρα ως αρνητικός ρυθμιστής τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης κατά την *in vitro* φθαρτοποίηση.

#### v. Interleukin-1:

Η IL-1 είναι μία προφλεγμονώδης κυτοκίνη με πολλαπλές λειτουργίες σε ένα εύρος ιστών. Το σύστημα της IL-1 αποτελείται από 2 προσδέτες, τον IL-1 $\alpha$  και τον IL-1 $\beta$ , τους επιφανειακούς υποδοχείς, τον IL-1R1 και τον IL-1R2, μία μη προσδεδεμένη στον υποδοχέα συνεργαστική πρωτεΐνη, IL-1RAcP και τον φυσικό ανταγωνιστή υποδοχέα, IL-1 $\alpha$ , που ανταγωνίζεται την IL-1 για την πρόσδεση στον υποδοχέα. Όλα τα συστατικά του συστήματος έχουν εξεταστεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στην μητρική – τροφοβλαστική διεπαφή κατά την εμφύτευση. Η πρωτεΐνη είναι παρούσα στην επιφάνει εμβρύου-μήτρας, όπου τα τροφοβλαστικά και φθαρτοποιημένα κύτταρα παράγουν την πρωτεΐνη ενώ ο υποδοχέας της βρίσκεται στα μητρικά επιθηλιακά κύτταρα όσο και στην τροφοβλάστη. Η πρωτεΐνη ίσως είναι το πρώτο σήμα της βλαστοκύστης που επιδρά στο ενδομήτριο γιατί *in vitro* η IL-1 αυξάνει την ενδομητρική έκκριση της προσταγλινδίνης E2, LIF και την έκφραση της υπομονάδας  $\beta 3$  ιντεγκρίνης. Επιπλέον, χορηγώντας τον ανταγωνιστή λίγο πριν την εμφύτευση μειώνει σημαντικά τον αριθμό των βλαστοκύστεων που εμφυτεύθηκαν στα ποντίκια, υποδεικνύοντας τον ρόλο της IL-1 στη διαδικασία της εμφύτευσης. <sup>(11)</sup>

#### 4) Προσταγλανδίνη E2 και PAF:

Δύο κυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, ένα προστανοειδές PGE2 και ένα φωσφολιπίδιο, τον PAF (platelet activating factor), απελευθερώνονται από το περιεμφυτευτικά κμήματα. Η έκκριση του PAF από το ανθρώπινο έμβρυο και αναφέρθηκε πως σχετίζεται με την βιωσιμότητα εμβρύου και την πρόβλεψη επιτυχούς εμφύτευσης ακολουθούμενης της εμβρυομεταφοράς. Είναι υπεύθυνος για παροδική θρομβοπενία στην μητέρα. Παρόλα αυτά, άλλοι ερευνητές απέτυχαν να επιβεβαιώσουν την εμβρυική παραγωγή του PAF ή την συσχέτιση του με την βιωσιμότητα εμβρύου. <sup>(9)</sup>

#### 5) Sex steroids, hCG και INF-τ:

##### i. hCG και INF-τ:

Μερικά σήματα ορμονικού χαρακτήρα είναι ειδικά για την τροφοβλάστη όπως η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη στους ανθρώπους και η ιντερφερόνη τ στα μυρμηκαστικά. Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη ανήκει στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών που συμπεριλαμβάνει την FSH, LH και TSH ορμόνη. Παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της εμφύτευσης και παράγεται κυρίως από την συγκυτιοτροφοβλάστη και μερικούς όγκους. Αυτά τα 2 σήματα, hCG και INF-τ, είναι υπεύθυνα για την διατήρηση του ωχρού σωματίου και την επακόλουθη παραγωγή προγεστερόνης από αυτό. Δρουν είτε άμεσα, όπως στην περίπτωση της ωχρινοποιητικής ορμόνης hCG, όπου διεγείρει την παραγωγή της προγεστερόνης μέσω του LH υποδοχέα, είτε έμμεσα, όπως στην περίπτωση της ιντερφερόνης τ, η οποία παρεμβαίνει στο μονοπάτι μητρικής παλμικής απελευθέρωσης της προσταγλανδίνης F2α (PGF2α), μία ωχρινολυτική προσταγλανδίνη. Η παραγωγή της χοριακής γοναδοτροφίνης είναι κρίσιμη για την εγκαθίδρυση και την διατήρηση της εγκυμοσύνης κατά τις πρώτες 7 με 9 εβδομάδες, όπου ο πλακούντας γίνεται η πρωταρχική πηγή της προγεστερόνης. Ενέσεις anti-hCG έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο της γονιμότητας. Ένα από αυτά, στοχεύει το καρβοξυτελικό άκρο της β υπομονάδας, και βρίσκεται σε δοκιμές κάτω από την προστασία του WOΙ οργανισμού. Αυτές οι ενέσεις δρουν πριν την εμφύτευση στα γονιμοποιημένα ωάρια και θεωρούνται ουσίες κατά της κήσεως. Ωστόσο, η χοριακή γοναδοτροφίνη επηρεάζει αρκετές ακόμη διαδικασίες κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, εκτός από την γνωστή διατήρηση του ωχρού σωματίου, και σ'αυτές περιλαμβάνεται η κυτταρική αύξηση, η διαφοροποίηση και η ανοσοκαταστολή. Οι τροφοβλάστες εκφράζουν ένα κολοβό και ανενεργό υποδοχέα της χοριακής γοναδοτροφίνης μέχρι την 9η εβδομάδα της κύησης, και εκφράζουν όλο το μήκος του υποδοχέα, επιτρέποντας την hCG αυτοκρινή ρύθμιση των ποικίλων λειτουργιών της όπως την κυτταρική διαφοροποίηση των τροφοβλαστών. Οι λειτουργικοί hCG/LH υποδοχείς εκφράζονται τόσο στην συγκυτιοτροφοβλάστη και κυτταροτροφοβλάστη και διεγείρουν την διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη ως ανταπόκριση στην hCG. In vitro, η hCG αυξάνει την ικανότητα εισβολής των τροφοβλαστικών χοριοκαρκινικών κυτταρικών σειρών ενώ οι αντίθετες δράσεις της φανερώθηκαν σε in vitro μελέτες πάνω σε πρώιμους τροφοβλάστες. Επομένως παραμένει ασαφής η επιρροή της hCG στην εισβολή τροφοβλαστών in vivo. Όσον αφορά τις δράσεις της στην φθαρτοποίηση, η χορήγηση χοριακής γοναδοτροφίνης ρυθμίζει την έκκριση των ενδομητρικών παρακρινικών παραγόντων, του LIF, του M-SCF (macrophage colony stimulating factor) και του IGFBP-1. Η έκφραση του VEGF (vascular endothelial growth factor) διεγείρεται σημαντικά από την hCG, προτείνοντας πως αυτή η ορμόνη ελέγχει την ενδομητρική αγγείωση και την δημιουργία του πλακούντα. Συμπερασματικά, η hCG φαίνεται να έχει μία ποικιλία τοπικών και συστηματικών λειτουργιών τόσο εντός όσο και εκτός του μικροπεριβάλλοντος εμβρύου-ενδομητρίου.

##### ii. Sex steroids:

Η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη έχουν σημαντικούς συγγενικούς ρόλους σε πολλά συστήματα

και διαδικασίες που απαιτούνται στην αναπαραγωγή των θηλαστικών. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου και της μήτρας, των ωθηκών όπως και των θηλαστικών αδένων, είναι στόχος τόσο της δράσης οιστραδιόλης όσο και της προγεστερόνης. Η προγεστερόνη είναι απαραίτητη για την εμφύτευση και για την διατήρηση της εγκυμοσύνης στα θηλαστικά, ενώ η απαίτηση της οιστραδιόλης είναι συγκεκριμένη για κάθε είδος. Η οιστραδιόλη είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του μητρικού επιθηλίου και ενισχύει την δράση της προγεστερόνης μέσω επαγωγής γονιδίου προγεστερονικού υποδοχέα (PR). Η προγεστερόνη συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση και στην διατήρηση του ενδομητρικού στρώματος, αδενικών κυττάρων και μυομητρικών κυττάρων.

Οι μητρικές δράσεις της στεροειδών κυρίως εκτελούνται μέσω του πυρηνικού οιστρογονικού και προγεστερονικού υποδοχέα (ER και PR). Η ανακάλυψη των ER (ERα και ERβ) και των PR (PR-A PR-B) ισομορφών και μελέτες σχετικές με τις επιδράσεις της επιλεκτικής απώλειας αυτών αποτελούν αποδείξεις των λειτουργιών συγκεκριμένων για κάθε ισομορφή στην μητρική βιολογία και εμφύτευση. Η μήτρα του ERα knockout ποντικού (αERKO) αναπτύσσεται φυσιολογικά αλλά παραμένει ανώριμη, υποπλαστική και είναι ανίκανη να υποστηρίξει την εμφύτευση. Ο φαινότυπος μίας αERKO μήτρας υποδηλώνει πως αυτή η ισομορφή του υποδοχέα ERα δεν έχει καμία επίδραση πάνω στην φυσιολογία μήτρας. Μελέτες χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο ιστό έδειξαν πως η ERα χρειάζεται στο στρωματικό διαμέρισμα του επιθηλίου για να πραγματοποιηθεί η μιτογένεση γιατί τα στρωματικά κύτταρα από άγριου τύπου καλλιεργούμενα ποντίκια μαζί με επιθηλιακά κύτταρα από αERKO μήτρες είναι ικανά για την οιστρογονοεξαρτώμενη επαγωγή σύνθεσης DNA στα επιθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση, οι ERβ-/- μήτρες ποντικών διατηρούν τις βιολογικές λειτουργίες που επιτρέπουν μία φυσιολογική εμφύτευση.

Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η προγεστερόνη είναι επαρκής για την φθαρτοποίηση σε ERα-/- ποντίκια μετά από τεχνητό ερέθισμα, που σημαίνει πως η ERα ισομορφή ίσως είναι απαραίτητη για την προσκόλληση της βλαστοκύστης αλλά είναι περιττή για την επακόλουθη φθαρτοποίηση. Η ανάλυση αναπαραγωγικών φαινοτύπων των PR knockout ποντικών (PRAKO και PRBKO) δείχνει πως οι PR-A και PR-B ισομορφές μεσολαβούν ευδιάκριτα αλλά επικαλύπτουν εν μέρει αναπαραγωγικές ανταποκρίσεις. Η επιλεκτική εκτομή της PR-A πρωτεΐνης (PRAKO) φανερώνει μία φυσιολογική ανταπόκριση των θηλαστικών αδένων ως προς την προγεστερόνη όσο και σοβαρή μητρική υπερπλασία και ωθηκικές ανωμαλίες οδηγώντας σε υπογονιμότητα. Σε αντίθεση, η πλήρης έλλειψη της PR-B πρωτεΐνης (PRBKO) σε ποντίκια δεν έδειξε να επηρεάζει τις βιολογικές απαντήσεις τόσο της ωθήκης όσο και της μήτρας στην προγεστερόνη, αλλά καταλήγει σε μειωμένη αδενική μορφογένεση σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη. Αυτές οι ιστοειδικές δραστηριότητες της PRB πρωτεΐνης δηλώνουν την ικανότητα της να ρυθμίζει ένα υποσύνολο προγεστεροεξαρτώμενων στοχευμένων γονιδίων σε αναπαραγωγικούς ιστούς, κάνοντας αισθητές τις διαφορές στην χωροχρονική έκφραση της PR-A ισομορφής.

Οι αυξητικοί παράγοντες, συγκεκριμένα ο EGF και ο TGFα, αποτελούν μεσολαβητές της οιστρογονικής μιτογόνο δράσης. Σε in vivo πειράματα έδειξαν μία μιτογόνο δράση του EGF στο αναπαραγωγικό κομμάτι από οιστρογονο-στερούμενα ποντίκια. Επακόλουθες μελέτες ανέδειξαν πως ένα αντιοιστρογονικό στοιχείο μπλοκάρει την μιτογόνο δράση του παράγοντα στο αναπαραγωγικό σύστημα των ποντικών, υποστηρίζοντας πως ο EGF λειτουργεί μέσω τον ER υποδοχέα. Η ομάδα Johnson και Chatterjee έδειξαν πως ο EGF ξεκινάει την εμφύτευση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Παρόλο που είναι ατελέσφορο σε καθυστερημένη εμφύτευση, αρουραίοι που υπέστησαν ωθηκεκτομή ή υποφυσεκτομή και ακολουθούσαν προγεστερονική θεραπεία, τους χορηγήθηκε ενδοφλέβια δόση του EGF και προκλήθηκε η έναρξη της εμφύτευσης βλαστοκύστεων. Ο μητρικός EGF και ο υποδοχέας του είναι σημαντικοί παράγοντες για την έναρξη της εμφύτευσης και αυξάνονται ως ανταπόκριση στα οιστρογόνα. Παρόλο που πολλοί φυσιολογικοί ρόλοι της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης έχουν περιγραφεί, τα μοριακά δίκτυα που μεσολαβούν για τις δράσεις του και η γενομική ενεργοποίηση μέσω υποδοχέων τους είναι κατά ένα μεγάλο ποσοστό άγνωστα. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ αυξητικών παραγόντων και ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών καταρρακτών μέσω κυτοκινών καθώς και τα οιστρογονικά και προγεστερονικά μονοπάτια που καταλήγουν σε μία επιτυχημένη



εμφύτευση.

## 6) Μεταγραφικοί παράγοντες:

Όλα τα γονίδια ρυθμίζονται μεταγραφικά. Όλες οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες. Όσον αφορά τους ER και PR υποδοχείς, μερικοί από τους καλά χαρακτηριζόμενους μεταγραφικούς ρυθμιστές της εμφύτευσης περιγράφονται παρακάτω:

### i. Homeobox genes:

Τα Hox γονίδια κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και κατευθύνουν την εμβρυική ανάπτυξη και ρυθμίζουν την διαφορική γονιδιακή έκφραση μέσα στο ενδομήτριο σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο. Τα Hox γονίδια είναι διατεταγμένα σε σύμπλεγμα σε έναν χρωμοσωμικό τόπο. Αυτά τα 39 γονίδια καταναμένονται σε 4 παράλληλα συμπλέγματα (ομάδες A, B, C και D), και τοποθετούνται σε 4 ξεχωριστά χρωμοσώματα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που κωδικοποιούνται από τα συγκεκριμένα γονίδια είτε ενεργοποιούν είτε καταστέλλουν επακόλουθους στόχους, καθορίζοντας την ταυτότητα του κάθε τμήματος στο σώμα. Οι επικράτειες τους για το DNA περιλαμβάνουν 60 αμινοξέα με μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα που θεωρείται εξελικτικό, προτείνοντας έναν κοινό πρόγονο ως προς την εξελικτική συντήρηση και γενετική σημασία.

Παρόλο που τα είδη ζώων διαφέρουν ευρέως στην εμφάνιση, όλα χρησιμοποιούν Hox γονίδια για την εγκαθίδρυση των σωματικών σχεδίων τους. Υπάρχουν 2 τέτοια γονίδια Hoxa10 και Hoxa11 που πιστεύεται πως είναι απαραίτητα για την εμφύτευση στα ποντίκια επειδή ομόζυγες μεταλλάξεις αυτών προκαλούν υπογονιμότητα μέσω της απώλειας ενδομητρικής απώλειας. Τα δύο αυτά γονίδια εκφράζονται στους ενδομητρικούς αδένες και στο στρώμα της μήτρας καθόλη τη διάρκεια γεννητικού κύκλου, και τα επίπεδα έκφρασης τους αυξάνονται δραματικά κατά τη μέση εκκριτική φάση την στιγμή της εμφύτευσης, και παραμένουν υψηλά στο υπόλοιπο του κύκλου όπως και στον φθαρό της εγκυμοσύνης στους ανθρώπους. Η ομάδα Taylor et al έδειξε πως οι ωοθηκικές ορμόνες ρυθμίζουν την έκφραση τόσο του Hoxa10 όσο και του Hoxa11 γονιδίου στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Η κορυφαία έκφραση τους παρατηρείται αρχικά στο παράθυρο ενδομητρικής δεκτικότητας. Επιπλέον, υπάρχει μία προβλέψιμη, εξαρτώμενη από την συγκέντρωση, ανταπόκριση της έκφρασης HOX γονιδίων στην προγεστερόνη, όπου αυξάνεται στο φυσιολογικό εύρος. Αυτά τα δεδομένα φανερώνουν πως η προγεστερόνη ρυθμίζει την περιεμφυτευτική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών.

Αυτό το πρότυπο έκφρασης στους ενήλικες προτείνει πως τα Hox γονίδια παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη εμφύτευση όπως φανερώνεται στα ποντίκια. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην εμφύτευση δεν είναι πλήρως χαρακτηριζόμενα, αλλά ομόζυγη έλλειψη Hoxa10 γονιδίου στα ποντίκια έδειξε μετατροπή σαλπίνγων από το εγγύς τρίτο μέρος της μήτρας, ελαττωματική εμφύτευση και εμβρυική επαναρρόφηση σε πρώιμη προεμφυτευτική περίοδο, προτείνοντας πως αυτό το γονίδιο είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης ενός κατάλληλου αναπαραγωγικού συστήματος και για επαρκή εμφυτευτικά γεγονότα στο ενδομήτριο των ενηλίκων. Επιπρόσθετα των δράσεων του στην εμβρυική ανάπτυξη, η HOXA10 πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για μία φυσιολογική ενδομητρική ανάπτυξη σε κάθε κύκλο οίστρου. Μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας siRNA οδηγεί σε μειωμένη πιθανότητα εμφύτευσης στα ποντίκια και σε ανθρώπινα εμφυτευτικά ελαττώματα συμπεριλαμβανομένων αυτών που προκαλούνται από ενδομητρίωση, ινομώματα και σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών όπου έχει ελαττωθεί πολύ η έκφραση της HOXA10. Η έλλειψη HOXA10 σε μητρικά στρωματικά κύτταρα σε θηλυκά ποντίκια έδειξαν μειωμένο πολλαπλασιασμό ως απάντηση στην προγεστερόνη, οδηγώντας σε ατελής φθαρτοποίηση. Επιπλέον, αρκετά γονίδια που ανταποκρίνονται στην προγεστερόνη απορυθμίζονται στο μητρικό στρώμα των HOXA10 μεταλλαγμένων ποντικών και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να μεταβιβάσει την προγεστερονική ανταπόκριση στο μητρικό στρώμα μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η πρωτεΐνη αυτή έχει δειχθεί πως ρυθμίζει την έκφραση της β3 ιντεγκρίνης όπως επίσης και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην ενδομητρική

δεκτικότητα. Παρομοίως, ποντίκια με έλλειψη της HOXA11 είναι υπογόνιμα λόγω ενδομητρικών εμφυτευτικών ελαττωμάτων. Τα HOXA11-/- ποντίκια έχουν μειωμένη έκφραση του LIF. Μία προσέγγιση γονιδιακής θεραπείας που επιτρέπει την χειραγώγηση της έκφρασης Hox γονιδίων μπορεί να συμβάλλει στην ενίσχυση της ενδομητρικής δεκτικότητας και εμφύτευσης.

## ii. Forkhead box o transcription factor:

Οι FOXO μεταγραφικοί παράγοντες μεσολαβούν στις αποφάσεις κυτταρικής μοίρας ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες, ορμονικά και περιβαλλοντικά στοιχεία. Ο FOXO εμπλέκεται στον έλεγχο παύσης κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης. Η έκφραση της FOXO1 είναι δραματικά διεγερμένη κατά την φθαρτοποίηση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και εμπλέκεται στην ρύθμιση έκφρασης γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως μάρτυρες φθαρτοποίησης, όπως PRL και IGFBP-1. Οι ενισχυτές και των δύο αυτών γονιδίων ενεργοποιούνται από συμπλέγματα πολυμερικών μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβάνοντας τον FOXO1, τα οποία συναρθροίζονται ως ανταπόκριση στα cAMP- και προγεστερονικά- εξαρτώμενα σήματα. Ένα γνωστό FOXO γονίδιο στόχος είναι το BIM (BCL2L11), το οποίο κωδικοποιεί την προαποπτωτική Bcl-2 πρωτεΐνη ομολόγη της επικράτειας 3 της Bim πρωτεΐνης. Η έκφραση της Bim αυξάνεται στο ενδομήτριο πριν την περίοδο και μετά την ενεργοποίηση του cAMP μονοπατιού με FOXO1 εξαρτώμενο τρόπο σε καλλιέργεια. Ένα άλλο FOXO γονίδιο στόχος είναι ο Fas προσδέτης (FASLG), που έχει βρεθεί στην αποπτωτική ρύθμιση των ενδομητρικών στρωματικών κυττάρων. Όλα τα παραπάνω προτείνουν έναν κρίσιμο ρόλο της FOXO1 πρωτεΐνης στην μεσολάβηση προαποπτωτικού μονοπατιού, το οποίο ξεκινάει με την απόσυρση της προγεστερόνης στο τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

## iii. JAK/STAT ενδοκυτταρική σηματοδότηση:

Η σημασία του σηματοδοτικού JAK/STAT μονοπατιού στην εμβρυική εμφύτευση έχει αποδειχθεί από την εμβρυική θνησιμότητα σε STAT3 ελλειπή ποντίκια. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι πως τα ελλειπή σε STAT3 έμβρυα ποντικών εμφυτεύονται αλλά πεθαίνουν ραγδαία λόγω πλακουντιακών διαταραχών.

Οι LIF και IL-11 παράγοντες ενεργοποιούν την οικογένεια των σηματοδοτικών μεταγωγέων Stat μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού. Στην μήτρα των ποντικών, ο LIF παράγοντας δρά κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της STAT3 πρωτεΐνης. Παρομοίως στα ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα, ο IL-11 δρά μέσω της ενεργοποιημένης STAT3 πρωτεΐνης. Παραμένει να διευκρινιστεί πότε μπορεί να ανιχνευθεί η φωσφορυλιωμένη STAT3 στο ανθρώπινο ενδομήτριο προκειμένου να αναγνωρισθεί η χρονική στιγμή που ενεργοποιείται το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι πως η παραγωγή της STAT3 πρωτεΐνης διεγείρεται από την προγεστερόνη και ενεργοποιείται μέσω της IL-11 στα ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα *in vitro*. Τέλος, έχει προταθεί και ο ρόλος της STAT3 δραστηριότητας στην τροφοβλαστική εισχώρηση. <sup>(11)</sup>

### 4.1.2) Υποδοχείς κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που εκφράζονται στο έμβρυο:

#### 1) c-fms:

Στα ποντίκια, τα μετάγραφα του CSF-1 υποδοχέα κωδικοποιούνται από τα c-fms πρωτοογκογονίδια και εκφράζονται στο προεμφυτευτικά έμβρυα από το στάδιο των 2 κυττάρων και μετέπειτα, και περιορίζονται στην τροφοβλαστική κυτταρική σειρά μετά το στάδιο της βλαστοκύστης. Στα περιεμφυτευτικά ανθρώπινα έμβρυα η έκφραση των c-fms γονιδίων

παράλληλίζει με το πρότυπο του ποντικού.

## 2) EGF και LIF υποδοχείς:

Μόλις σχηματιστεί το τροφοεξώδερμα του ποντικού εκφράζει έναν επιθηλιακό δείκτη (κυτοκερατίνη) και υποδοχείς για τους EGF και LIF παράγοντες. Στους ανθρώπους ο υποδοχέας του LIF (LIF-R) ανιχνεύεται στο χοριακό ιστό πρώτου τριμήνου και στα BeWo χοριοκαρκινικά κύτταρα, προτείνοντας την έκφραση τους στην ανθρώπινη τροφοβλάστη. Μετάγραφα και των δύο υποδοχέων επίσης εντοπίζονται σε περιεμφυτευτικά έμβρυα και έτσι μπορεί να υπαινιχθεί πως το ανθρώπινο έμβryo αποτελεί στόχο των αυξητικών παραγόντων και των κυτοκινών.

### 4.1.3) Ενδομητρικοί παράγοντες:

Η προετοιμασία του ενδομητρίου για εμφύτευση είναι βέβαιη μέσω ενός ακριβούς μηχανισμού που εμπλέκονται κυκλικές επακόλουθες εκκρίσεις 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Στους ανθρώπους, η εκκριτική δραστηριότητα των αδενικών επιθηλίων είναι μέγιστη στις ημέρες 5-7 μετά την ωορρηξία, ενώ η διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων, γνωστά ως προφθαρτοποιημένες αλλαγές, είναι αυθόρμητη και ξεκινάει αργότερα κατά την 9η με 10η ημέρα. Κατά τις προ- και περι- εμφυτευτικές περιόδους, η οιστραδιόλη και/ή η προγεστερόνη ρυθμίζουν την έκφραση μερικών αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών στην μήτρα. Αυτοί οι ενδομητρικοί παράγοντες (EGF-receptor ligand, LIF, κ.α) μπορεί να λειτουργούν ως μεσολαβητές των στεροειδικών δράσεων και επιδρούν στην βλαστοκύστη μέσω παρακρινής δράσης τους:

#### 1) Προσδέτες EGF υποδοχέα:

Έχει αποδειχθεί στα ποντίκια πως τα ωοθηκικά στεροειδή επάγουν την έκφραση των αυξητικών παραγόντων, και πιο συγκεκριμένα αυτών της EGF οικογένειας όπως TGF-  $\alpha$ , heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF) και amphiregulin. Οι τελευταίοι δύο παράγοντες εκφράζονται στο μητρικό επιθήλιο ποντικού αποκλειστικά στο σημείο της εμφύτευσης. Ο HB-EGF επάγεται από την βλαστοκύστη και αλληλεπιδρά με τον EGF υποδοχέα που εκφράζεται στην τροφοβλάστη, ενώ η έκφραση της amphiregulin σχετίζεται πρώτα με τα αυξανόμενα επίπεδα της προγεστερόνης και μετά με την αντίδραση της προσκόλλησης. Συνδέεται με την κυτταρική διαφοροποίηση και είναι ένα σημάδι της μητρικής δεκτικότητας.

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά την εκκριτική φάση, ο TGF- $\alpha$  έχει ανιχνευθεί ανοσοιστοχημικά στο αδενικό και επιφανειακό επιθήλιο, ενώ ο EGF κυριαρχούσε στα στρωματικά κύτταρα. Το mRNA της HB-EGF βρέθηκε με RT-PCR στο ανθρώπινο αδενικό και στρωματικό ενδομήτριο καθόλη τη διάρκεια και του εμμηνορρυσιακού κύκλου και της εγκυμοσύνης. Η έντονη ανοσοδραστικότητα των EGF υποδοχέων στα στρωματικά κύτταρα προτείνουν έναν αυτοκρινή/παρακρινή ρόλο στην διαφοροποίηση του στρώματος.

#### 2) Παραγωγή της LIF:

Το ενδομήτριο επίσης εκκρίνει κυτοκίνες, μία από τις οποίες είναι η LIF και φαίνεται να συμβάλλει στα αρχικά στάδια της εμφύτευσης. Στο ποντίκι, η έκφραση της LIF είναι κάτω από τον μητρικό έλεγχο και δεν εξαρτάται από την παρουσία της βλαστοκύστης. Το υψηλό επίπεδο της γλυκοπρωτεΐνης από τους ενδομητρικούς αδένες, ειδικά την 4η ημέρα εγκυμοσύνης, προηγείται της εμφύτευσης και είναι σημαντική για την πραγματοποίηση αυτής. Έτσι η ομάδα Stewart et al έδειξε πως τα φυσιολογικά έμβρυα ποντικών δεν μπορούν να εμφυτευτούν σε διαγονιδιακά ομόζυγα ποντίκια λόγω μίας γονιδιακής μετάλλαξης που καθιστά την LIF πρωτεΐνη μη λειτουργική. Εάν εξωγενής LIF πρωτεΐνη χορηγείται μέσω μίας περιτονικής μικροαντλίας, μία φθαρτοποιημένη ανταπόκριση μπορεί να επιτρέψει την επανεγκαθίδρυση της εμβρυικής εμφύτευσης. Επιπλέον, στα

ποντίκια η ομάδα Harvey et al πρότεινε πως ο LIF, όπως και ο EGF, ρυθμίζει θετικά την δραστηριότητα πρωτεασών που παράγονται από την βλαστοκύστη και δρά με παρακρινή τρόπο, λαμβάνοντας υπόψη πως οι υποδοχείς του LIF, όπως και του EGF εκφράζονται στο τροφοεξώδερμα. Αυτοί οι ερευνητές έδειξαν πως ο LIF αργότερα ρυθμίζει αρνητικά την δραστηριότητα πρωτεασών στην βλαστοκύστη μετά από 9 με 10 ημέρες καλλιέργεια.

Παρομοίως, η LIF εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο, όπου παράγεται κατά προτίμηση από τα μητρικά αδενικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία στην καλλιέργεια παράγουν περισσότερη πρωτεΐνη από τα στρωματικά κύτταρα. Η χρονική έκφραση της LIF ανταποκρίνεται στην προβλεπόμενη στιγμή της εμφύτευσης, στη μέση της ωχρινικής φάσης.

### 3)CSF-1:

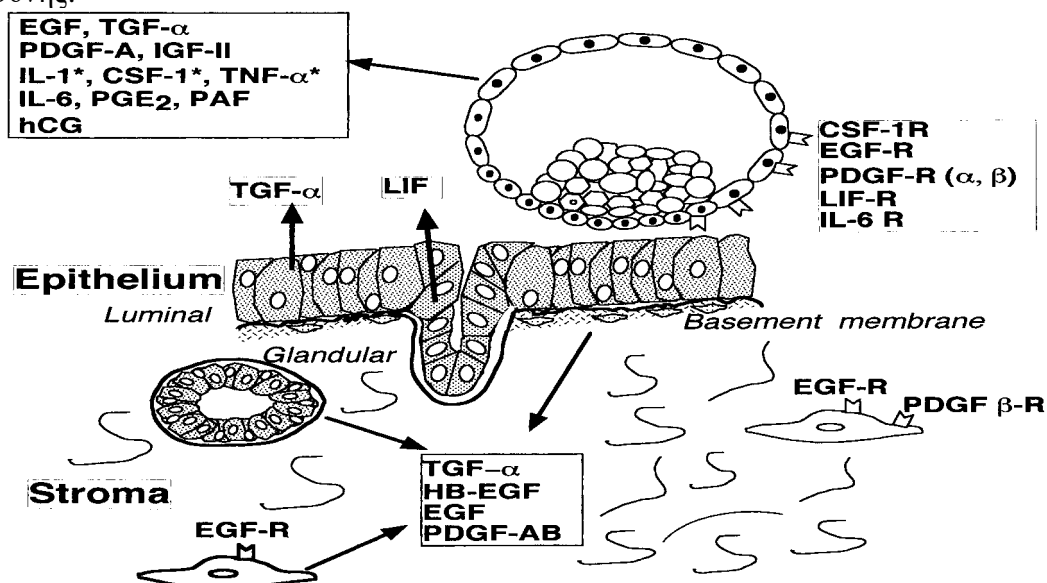
Αυτό ο παράγοντας κυρίως εκφράζεται στο μητρικό επιθήλιο και αυξάνεται από την πολλαπλασιαστική στην εκκριτική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Επίσης εκφράζεται στην κυτταροτροφοβλάστη πρώτου τριμήνου.

### 4)Placenta protein 4:

Η πλακουντιακή πρωτεΐνη 4 είναι μία προγεστερονικά εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη, είναι το κύριο εκκριτικό προϊόν του αδενικού επιθηλίου και εμφανίζεται στην μέση ωχρινική φάση.

### 5) Decidual prolactin (PRL):

Είναι μία ορμόνη εντελώς ίδια με την αρχέγονη υποφυσιακή PRL και εκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα πριν την εμφύτευση όπου η έκφραση της συνεχίζεται καθόλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης:



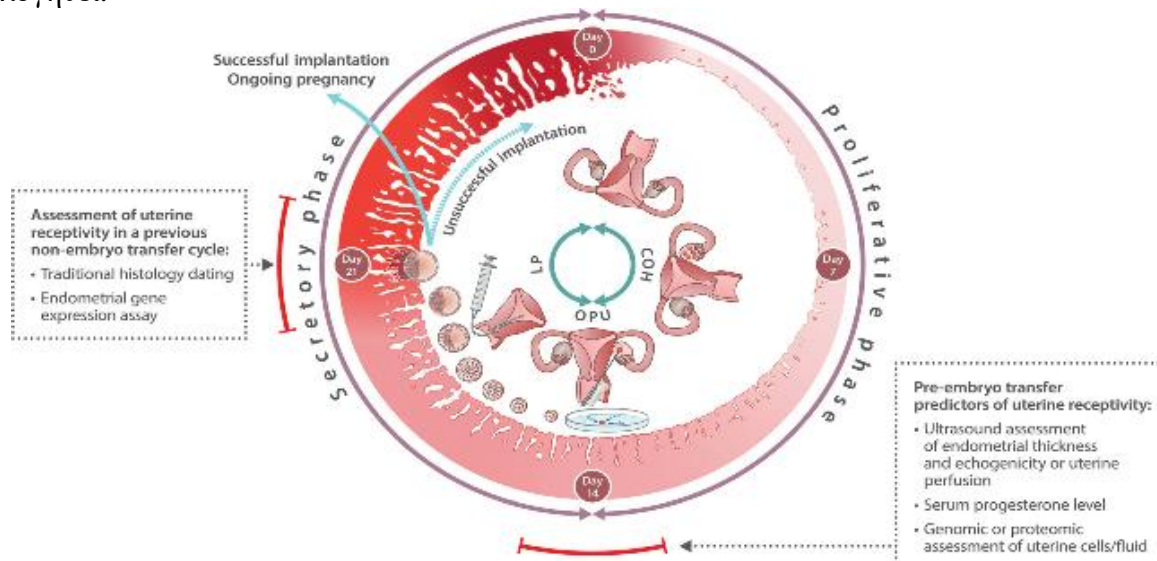
Εικόνα 23: Αλληλεπιδράσεις εμβρύου – ενδομητρίου πριν την εμφύτευση. Μία ποικιλία αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων εκφράζονται από το ανθρώπινο έμβρυο. Οι παράγοντες που ανιχνεύονται στο έμβρυο 2-8 κυττάρων σημειώνονται με αστερίσκο στην εικόνα. Οι προσδέτες του EGF-υποδοχέα και LIF εκφράζονται από το ανθρώπινο ενδομήτριο στην εκκριτική φάση: τα μητρικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν TGF- $\alpha$  και LIF, ενώ τα στρωματικά κύτταρα εκφράζουν κυρίως EGF και EGF υποδοχείς.

#### 4.1.4) Γονιδιωματική προσέγγιση:

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως είναι δυνατόν να χαρακτηριστούν οι διαφορετικές φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου προσεγγίζοντας γονιδιωματικά το ανθρώπινο ενδομήτριο. Τα αναγνωρισμένα γονίδια που κωδικοποιούν όλους τους παραπάνω ενδομητρικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν να εμπλέκονται στην εμφύτευση έχουν ευρέως μελετηθεί. Ένα παγκόσμιο

μεταγραφικό προφίλ του ανθρώπινου ενδομητρίου παρέχει σημαντική επίγνωση στις βιολογικές διαδικασίες και στους μοριακούς μηχανισμούς που συμβαίνουν στο ενδομήτριο ως ανταπόκριση στις ορμονικές επιδράσεις καθ'όλη τη διάρκεια γεννητικού κύκλου. Με το μεταγραφικό προφίλ του ενδομητρίου που παρείχαν αυτές οι μελέτες κατέστησαν δυνατό έναν περισσότερο ακριβή κατάλογο ενδομητρίου σε διαφορετικές φάσεις.

Μία δοκιμή αναγνώρισης ενδομητρικής δεκτικότητας (endometrial receptivity array/ ERA) βασιζόμενη στο μεταγραφικό προφίλ του ενδομητρίου είναι πλέον διαθέσιμη για ταυτοποίηση της μητρικής δεκτικότητας και προσαρμογής χρόνου μεταφοράς εμβρύου. Έχει αναφερθεί υψηλή δεκτικότητα και ευαισθησία για το ERA τεστ, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ανώτερη συμφωνία με την κορυφή της LH συγκριτικά με την ιστολογική χρονολόγηση. Η επαναληψιμότητα του ERA τεστ φάνηκε να φθάνει το 100%. Ωστόσο, η κλινική σημασία του ERA τεστ δεν έχει ακόμη πλήρως αξιολογηθεί. (14)



Εικόνα 24: Πιθανοί μηχανισμοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της μητρικής δεκτικότητας πριν την εμβρυομεταφορά περιλαμβάνουν την παραδοσιακή ιστολογική χρονολόγηση, την υπερηχογραφική αξιολόγηση ενδομητρίου, την μέτρηση επιπέδων προγεστερόνης ορού και γονιδιωματική ή πρωτεομική διεκρίνιση μητρικών κυττάρων ή/και υγρού.

#### 4.2) Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM):

Η οικογένεια των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης αποτελείται από 4 μέλη γνωστά ως ιντεγκρίνες, καδερίνες, σελεκτίνες και ανοσογλοβουλίνες. Αυτοί οι επιφανειακοί προσδέτες, συνήθως είναι γλυκοπρωτείνες, μεσολαβούν στην προσκόλληση μεταξύ κυττάρων. Οι κλασσικές λειτουργίες τους συμπεριλαμβάνουν την διατήρηση της ακεραιότητας ιστού, την επούλωση πληγών, την μορφογενετική κίνηση, την κυτταρική μετανάστευση και την μετάσταση καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα:

##### 4.2.1) Ιντεγκρίνες:

Οι ιντεγκρίνες είναι μία οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που σχηματίζονται από την σύνδεση δυο διαφορετικών, μη -ομοιοπολικά συνδεδεμένων, α και β υπομονάδων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 18 α και 8 β αλυσίδες στα θηλαστικά. Όταν ζευγαρώνουν αυτές οι αλυσίδες μπορούν να σχηματίσουν 24 διακριτά ετεροδιμερή ιντεγκρινών τα οποία διαφέρουν στην λειτουργία τους. Αυτές οι υπομονάδες περιέχουν εξωκυτταρικές, διαμεμβρανικές και ενδοκυτταρικές επικράτειες. Η εξωκυτταρική επικράτεια επιτρέπει να δράσει η ιντεγκρίνη ως υποδοχέας στα στοιχεία της ECM (όπως είναι η φιμπρονεκτίνη (FN), λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου IV) όσο και για την μεταγωγή σημάτων από διαλυτούς προσδέτες (όπως είναι η οστεοποντίνη), να ανταποκριθεί σε διάφορα συμπληρώματα και φυσικά σε άλλα κύτταρα. Η ενδοκυτταρική επικράτεια, ωστόσο, είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τον κυτταροσκελετό. Οι ιντεγκρίνες συμμετέχουν στην σύνδεση κυττάρου-μέσου και κυττάρου-κυττάρου σε πολλές φυσιολογικές

σημαντικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της εμβρυικής ανάπτυξης, ομοίωσης, θρόμβωσης, επούλωσης πληγών, ανοσοποιητικοί και μη-ανοσοποιητικοί αμυντικοί μηχανισμοί και διαμόρφωση όγκων. Ως ανταπόκριση στην σύνδεση του προσδέτη, οι ιντεγκρίνες συναρθροίζονται σε διακριτά συγκροτήματα γνωστά ως “κεντρικά σημεία προσκόλλησης” (focal adhesion sites). Αυτή η συναρθρωση οδηγεί στην στρατολόγηση ενός δικτύου κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (όπως είναι η α-ακτινίνη, ταλίνη, βινκλουλίνη που δρά ως άγκυρα για την F-ακτινίνη) και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά συμπλέγματα, κυρίως κινάσες (όπως για παράδειγμα είναι η FAK (focal adhesion kinase), η ILK (integrin-linked kinase), μόρια του μονοπατιού κινάσης MAP (mitogen-activated protein) και λιπιδιακές κινάσες. Το δίκτυο των κυτταροσκελετικών και σηματοδοτικών συμπλεγμάτων μέσα στα κεντρικά σημεία προσκόλλησης επιτρέπουν διπλή τροποποίηση της δράσης των ιντεγκρινών. Όντως, η σύνδεση του προσδέτη στην ιντεγκρίνη ενεργοποιεί κλασικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ωθεί διάφορα κυτταρικά γεγονότα (σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα). Επιπλέον, ο αριθμός και η συγγένεια των ιντεγκρινών που είναι παρών στην κυτταρική επιφάνεια ρυθμίζονται ως απάντηση στην σύνδεση του προσδέτη (σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω).

Μία μεγάλη ποικιλία των ιντεγκρινών έχει περιγραφεί μέσα στο κορυφαίο και αδενικό ενδομητρικό επιθήλιο. Ενώ η πλειοψηφία των ιντεγκρινών εκφράζονται αυθαίρετα καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, ενώ άλλες εκθέτουν ένα ενδιαφέρον ρυθμιζόμενο μοτίβο έκφρασης μέσα στον κύκλο. Οι ιντεγκρίνες των οποίων η έκφραση αυξάνεται στη μέση ωχρινική φάση προτάθηκαν ως δείκτες για το πλαίσιο παραθύρου εμφύτευσης. Τρεις κυκλο-ειδικές ιντεγκρίνες συν-εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο και χαρακτηρίζονται ιστολογικά τις ημέρες 20 έως 24 του γεννητικού κύκλου ως α1β1, α4β1 και αVβ3, αλλά μόνο η έκφραση του mRNA της β3 υπομονάδας φαίνεται να αυξάνεται μετά την 19η ημέρα και δεν ανιχνεύεται εκ των προτέρων. Επίσης, η αVβ3 ιντεγκρίνη όπως και ο προσδέτης της, η οστεοποντίνη, ανιχνεύθηκαν θετικά ανοσοιστοχημικά στην ενδομητρική κορυφαία επιθηλιακή επιφάνεια, που αλληλεπιδρά πρώτα με την τροφοβλάστη. Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης της μαζί με την επιθηλιακή τοποθεσία της, η αVβ3 ιντεγκρίνη έχει προταθεί ως πιθανός υποδοχέας για την εμβρυονική προσκόλληση.

Οι ιντεγκρίνες επίσης εκφράζονται από την ανθρώπινη τροφοβλάστη την στιγμή της εμφύτευσης. Οι τροφοβλαστικοί υποδοχείς για την ECM και πιο συγκεκριμένα οι α1β1 και α5β1 ιντεγκρίνες, αυξάνονται κατά την διαφοροποίηση των ανθρώπινων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων σε εισχωρητικό εξωλαχνωτό φαινότυπο. Υποτίθεται πως οι ιντεγκρίνες που είναι παρούσες και στην μητρική επιθηλιακή επιφάνεια και στην τροφοβλάστη, συνδέονται σε ειδικά στοιχεία της ECM ουσίας. Σε αυτούς τους προσδέτες τυπικά συμπεριλαμβάνονται ογκοεμβρυικά FN που εκκρίνονται από την τροφοβλάστη και εκκρινόμενη οστεοποντίνη από το μητρικό επιθήλιο. Αυτό παρέχει την δυνατότητα μοντέλου sandwich της εμβρυικής προσκόλλησης. <sup>(9)</sup>

Οι κυτταροτροφοβλάστες επίσης εκθέτουν χρονική και χωρική ρύθμιση της έκφρασης ιντεγκρινών. Σε φυσιολογικές γόνιμες γυναίκες, η α4 υπομονάδα ρυθμίζεται θετικά στο αδενικό επιθήλιο την στιγμή της ωορρηξίας και εξαφανίζεται περίπου την 24η ημέρα του κύκλου. Σε αντίθεση, η β3 εκφράζεται τόσο στο αδενικό όσο και στο κορυφαίο επιθήλιο και ρυθμίζεται θετικά την 19η ή 20η ημέρα του κύκλου. Επειδή η θετική ρύθμιση της β3 και η αρνητική ρύθμιση της α4 συμπίπτουν με το παράθυρο δεκτικότητας, αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως αυτές οι ιντεγκρίνες χρησιμεύουν ως δείκτες του λειτουργικού δεκτικού ενδομητρίου. Στην προεμφυτευτική φάση, η ανθρώπινη βλαστοκύστη εκφράζει αρκετές υπομονάδες ιντεγκρινών συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αναφέρθηκαν όπως αν, α3, β1, β3, β4 και β5. Η κυκλο-ειδική έκφραση των ιντεγκρινών φαίνεται να ρυθμίζεται από της ωθητικές ορμόνες και τους αυξητικούς παράγοντες. Η έκφραση της αVβ3 στο ανθρώπινο ενδομήτριο ρυθμίζεται θετικά τόσο από τον EGF και τον HB-EGF και αρνητικά από τα οιστρογόνα. Κατά την πολλαπλασιαστική φάση, τα υψηλά οιστρογονικά επίπεδα δρουν μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (Erg) για να καταστείλουν την έκφραση των ιντεγκρινών. Η ωχρινική προγεστερονική αύξηση ρυθμίζει επακόλουθα αρνητικά τον αριθμό αυτών των υποδοχέων, καταστέλλοντας έμμεσα την δράση της E2 στις ιντεγκρίνες και αυτές αυξάνονται. Η προγεστερόνη επίσης δρά θετικά αυξάνοντας την έκφραση των EGF, HB-EGF και HOXA10 για να

προκαλέσει την επιθηλιακή έκφραση της β3 ιντεγκρίνης που υπηρετεί το περιοριστικό στάδιο λόγω ταχύτητας διαμόρφωσης της αVβ3 ιντεγκρίνης. Η προγεστερόνη έχει επίσης μία άμεση δράση στην σύνθεση της οστεοποντίνης, διεγείροντας την έκφραση γονιδίων. Επιπρόσθετα αυτών των παραγόντων, το homeobox HOXA10 γονίδιο εμπλέκεται στην ρύθμιση της β3 έκφρασης. Όντως η θεραπεία με HOXA10 σε καλλιεργούμενα ενδομητρικά κύτταρα, τροποποίησε την έκφραση της β3 ιντεγκρίνης. Το ίδιο το έμβρυο φαίνεται να συμμετέχει στην διαδικασία της ρύθμισης. Ανθρώπινες βλαστοκύστες έδειξαν θετική ρύθμιση της β3 ιντεγκρίνης σε ανθρώπινα καλλιεργούμενα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα (EECs). Σε αυτήν την δράση φαίνεται να μεσολαβεί μερικώς το σύστημα της εμβρυικής IL-1.<sup>(9)</sup> Παρομοίως, οι IL-1α και -1β που προέρχονται από την βλαστοκύστη ρυθμίζουν θετικά την ενδομητρική επιθηλιακή έκφραση της β3 υπομονάδας, προτείνοντας έναν παρακρινή μηχανισμό του συστήματος της IL-1 στην εμφύτευση.<sup>(11)</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν έντονα τον ενεργό ρόλο της βλαστοκύστης στην εγκαθίδρυση ενός δεκτικού ενδομητρίου.

Ανώμαλο πρότυπο έκφρασης της αVβ3 ιντεγκρίνης έχει συσχετιστεί με ανεξήγητη υπογονιμότητα, ενδομητρίωση, υδροσάλπιγγες, ανεπαρκής ωχρινική υποστήριξη (LPD) και πρόσφατα, με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Μερικοί ερευνητές ωστόσο δεν κατόρθωσαν να αναδείξουν ένα διαφορετικό πρότυπο ιντεγκρινών στην ενδομητρίωση.

Έχει ανακαλυφθεί πως το επίπεδο του mRNA ιντεγκρινών την 21η ημέρα του κύκλου μπορεί να προβλέψει τον επιτυχή ρυθμό της IVF θεραπείας. Ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα ιντεγκρινών έχουν διπλό ρυθμό εγκυμοσύνης σε σύγκριση με ασθενείς που έχουν χαμηλά επίπεδα. Η μέτρηση της β3 έκφρασης μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο πρόβλεψης επιτυχίας του IVF προγράμματος. Λαμβάνοντας υπόψη την βιβλιογραφία για την έκφραση και ρύθμιση της αVβ3 ιντεγκρίνης, η πρωτεΐνη αυτή αντιπροσωπεύει έναν πολλά υποσχόμενο κλινικό και ερευνητικό δείκτη για την διαδικασία της ανθρώπινης εμφύτευσης.

#### 4.2.2) Σελεκτίνες:

Οι σελεκτίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια CAM μορίων και συμπεριλαμβάνουν την P-, την L- και την E- σελεκτίνη. Η ανθρώπινη L- σελεκτίνη, που έχει σημασία για την διαδικασία της εμφύτευσης, αποτελείται από μία μεγάλη, υψηλά γκλυκοσυλιωμένη εξωκυτταρική επικράτεια, μία μόνο εκτεινόμενη διαμεμβρανική επικράτεια και μία μικρή κυτταροπλασματική ουρά. Οι σελεκτίνες είναι επίσης γνωστές να συμμετέχουν στην ενδοθηλιακή κυκλοφορία λευκοκυττάρων. Όντως, οι L-σελεκτίνες εκφράζονται στα λευκοκύτταρα και αλληλεπιδρούν με τους δικούς τους υδατανθρακικούς προσδέτες τους στο ενδοθήλιο. Αυτή η αλληλεπίδραση, που ονομάζεται tethering (δέσμη), επιτρέπει την κύλιση των λευκοκυττάρων στο φλεγμονώδες αγγειακό ενδοθήλιο πριν την έντονη προσκόλληση και μετανάστευση τους. Η διακεκομμένη πίεση που εξέρχεται με την αιματική ροή είναι απαραίτητη για την άριστη μέσω L-σελεκτίνης αλληλεπίδραση λευκοκυττάρων με την αγγείωση. Ένα παράλληλο φαινόμενο μπορεί να ισχύει μεταξύ της "κύλισης" λευκοκυττάρων και την παράθεση της βλαστοκύστης στο ενδομητρικό επιθήλιο.

Το σύστημα προσκόλλησης της σελεκτίνης είναι καλά καθιερωμένο στην μητρική-εμβρυική διεπαφή. Στην πλευρά της βλαστοκύστης, έχει παρατηρηθεί μία ισχυρή ανίχνευση της L-σελεκτίνης σε ολόκληρη την εμβρυική επιφάνεια. Στην πλευρά της μήτρας, η έκφραση των ολιγοσακχαριτών προσδετών σελεκτίνης, όπως είναι ο MECA-79 και ο HECA-452, ρυθμίζονται θετικά κατά το παράθυρο της εμφύτευσης. Όντως, ο L- σελεκτίνης προσδέτης, MECA-79 είναι ανοσοεντοπισμένος στο κορυφαίο και αδενικό ενδομητρικό επιθήλιο καθόλη τη διάρκεια του κύκλου, παρόλο που η ανίχνευση του ενισχύεται αρκετά κατά τη μέση εκκριτική φάση. Επιπλέον, η ανοσοδραστικότητα εμφανίζεται να είναι πιο δυνατή στο κορυφαίο επιθήλιο σε σύγκριση με το αδενικό επιθήλιο. Η φυσιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ L- σελεκτίνης και των ολιγοσακχαριτών προσδετών τους έχει ερευνηθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Έχει δείχθει πως η επικάλυψη σφαιρίδιων με συγκεκριμένους προσδέτες σελεκτίνης απλήστως δεσμεύονται με τροφοβλαστικά κύτταρα στο πλακουντιακό τριχοειδικό ιστό κάτω από συνθήκες διακεκομμένης

πίεσης που μιμούνται αυτών της μήτρας. Σε ένα αντίστροφο πείραμα, απομονωμένοι τροφοβλάστες προσκολλούνται κατά προτίμηση στα επιθηλιακά κύτταρα ενός δεκτικού ενδομητρίου. Οι προσδέτες της L-σελεκτίνης ρυθμίζεται μεταξύ άλλων και από τον μηχανισμό θείωσης. Οι σουλφατάσες είναι ικανές να απομακρύνουν μία θεική ρίζα από φυσικούς σουλφατιδικούς ολιγοσακχαρίτες, αποτρέποντας την πρόσδεση των σελεκτινών στους υποδοχείς τους. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν πως η αλληλεπίδραση μεταξύ L-σελεκτίνης, που εκφράζεται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα, και των ολιγοσακχαριτών προσδετών της, που εκφράζονται στο ενδομήτριο, μπορεί να απαρτίζει το αρχικό βήμα στην διαδικασία της εμφύτευσης. Όπως και τα περισσότερα μόρια προσκόλλησης, η λειτουργία της L-σελεκτίνης ρυθμίζεται από μία ποικιλία μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφής γονιδίων, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και συσχέτιση με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Άλλος ρυθμιστικός μηχανισμός αποτελείται από τροποποιήσεις της τοπογραφικής κατανομής της L-σελεκτίνης, αυξάνοντας ή μειώνοντας την διαθεσιμότητα στην κυτταρική επιφάνεια. Μία από τις διαδικασίες αρνητικής ρύθμισης εμπλέκει την πρωτεολυτική διάσπαση, που επίσης επικαλείται ως ectodomain shedding (καταστροφή εξωτερικής επικράτειας). “Καταστροφείς” όπως ο TACE [tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )-converting enzyme]/ADAM 17 είναι ικανά για την πρωτεολυτική διάσπαση της εσωτερικής επικράτειας της L-σελεκτίνης στην ενδοθηλιακή επιφάνεια. Αυτή η διαδικασία της “καταστροφής της εσωτερικής επικράτειας” έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των περισσότερων τμημάτων της σελεκτίνης από την κυτταρική επιφάνεια ενώ διατηρείται η κυτταροπλασματική, η διαμεμβρανική και ένα μικρό τμήμα εξωκυτταρικής επικράτειας στο κύτταρο. Καταστρέφοντας την L-σελεκτίνη από την επιφάνεια λευκοκυττάρων φαίνεται να απαιτείται για την αποτελεσματική μετανάστευση τους δια μέσου του ενδομητρίου. Όντως, μπλοκάροντας την διάσπαση της L-σελεκτίνης σε διεγερμένα από αντιγόνο λεμφοκύτταρα, μέσω γονιδιακής στόχευσης, επιτρέπει την επακόλουθη συνέχεια της μετανάστευσης στους περιφερειακούς λεμφαδένες αλλά καταστέλλεται η βραχυπρόθεσμη ανακατεύθυνση σε αντιφλεγμονώδη σημεία. Το ερώτημα εάν η “καταστροφή” της L-σελεκτίνης σχετίζεται με την εμβρυική εμφύτευση παραμένει να διευκρινιστεί.

Συμπερασματικά, πολύ λίγα είναι γνωστά για την εμπλοκή των σελεκτινών στην εμβρυική εμφύτευση. Ωστόσο φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα μεγάλο στάδιο της αλληλεπίδρασης βλαστοκύστης με τον μητρικό τοίχο. Παραμοίως για την παύση των λεμφοκυττάρων σε ένα συγκεκριμένο σημείο στο ενδοθήλιο, η βλαστοκύστη αναμένεται να βρεθεί στην καλύτερη τοποθεσία εντός της μητρικής κοιλότητας για να εξασφαλίσει μία επιτυχής εμφύτευση.

#### 4.2.3) Καδερίνες:

Οι καδερίνες αποτελούν μία ομάδα γλυκοπρωτεϊνών υπεύθυνες για τους εξαρτώμενους από ασβέστιο μηχανισμούς κυτταρικής προσκόλλησης. Χωρίζονται σε υποκατηγορίες E-, P-, και N-καδερίνες που είναι διακριτές σε ανοσολογικές ειδικότητες και ιστική κατανομή. Αυτές προωθούν την κυτταρική προσκόλληση μέσω ομοφιλικών μηχανισμών. Σε σχέση με την εμφύτευση, η E-καδερίνη παρουσιάζεται ως η πιο καλά μελετημένη υποκατηγορία.

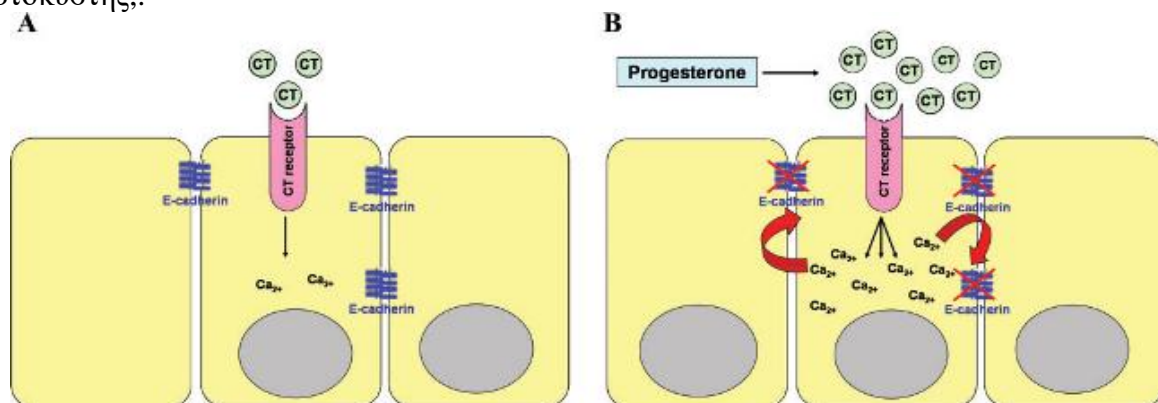
Η E-καδερίνη είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας, η οποία ανήκει στην οικογένεια των εξαρτώμενων από ασβέστιο CAMs μορίων, που μεσολαβούν στην κυτταρική προσκόλληση μέσω ομοτυπικών δεσμών. Η E-καδερίνη εντοπίζεται στις συνδέσεις προσκόλλησης που είναι εξειδικευμένες περιοχές στην πλευρική πλευρά της επιθηλιακής πλασματικής μεμβράνης και πιστεύεται να είναι κρίσιμη για την εγκαθίδρυση και διατήρηση αυτών των συνδέσεων στα επιθηλιακά κύτταρα. Η E-καδερίνη εκφράζεται από μία ποικιλία ιστών και παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση εμβρυογένεσης κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης, νευριδίωσης και οργανογένεσης. Καταστολή της έκφρασης της E-καδερίνης σχετίζεται με ένα από τα βασικά μοριακά γεγονότα υπεύθυνα για την δυσλειτουργία κυτταρικής προσκόλλησης. Με βάση αυτό, η E-καδερίνη μπορεί να συμβάλλει στην κακοήγη κυτταρική μετατροπή και τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην πρόοδο όγκου.

Μελέτες στην εμβρυική εμφύτευση ποντικών έδειξαν πως στοχευμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο της E-καδερίνης οδηγεί σε ελαττωματική προεμφυτευτική ανάπτυξη. Ο ρόλος της E-καδερίνης στην



ανθρώπινη εμβρυική εμφύτευση είναι ακόμη άγνωστος, αλλά βασιζόμενοι στο πρότυπο έκφρασης της, υποψιάζονται την σημασία της σε αυτήν την διαδικασία. Τα επίπεδα του mRNA της E-καδερίνης φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλά κατά την διάρκεια της ωχρινικής φάσης. Ωστόσο, αυτές οι διαφοροποιήσεις στον εμμηνορρυσιακό κύκλο δεν εντοπίστηκαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο από ανοσοιστοχημικές μελέτες.

Η ρύθμιση της διαθεσιμότητας της E-καδερίνης στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων επιτρέπει τον έλεγχο της κυτταρικής προσκόλλησης. Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της συσχετίζεται με την απόκτηση μεταστατικής δυνατότητας καρκινικών κυττάρων. Επακόλουθα, η ιστική αρχιτεκτονική χάνεται, οδηγώντας στον κυτταρικό αποχωρισμό και στην διασπορά. Το ενδοκυτταρικό ασβέστιο είναι απαραίτητο για την ρύθμιση της E-καδερίνης. Όντως, η αύξηση στην συγκέντρωση του ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια – κλειδιά που μεσολαβούν στην κυτταροσκελετική ανοδιοργάνωση και στην αποσυναρμολόγηση της E-καδερίνης στις συνδέσεις προσκόλλησης. Οι αλλαγές στην συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου επηρεάζει την ικανότητα προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων και την πολικότητα τους θέτοντας εν ενεργεία την ανακατανομή των CAMs μορίων. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι σημαντικό στα EECs που εκφράζουν E-καδερίνη. Σε *in vitro* πειράματα σε καλλιεργούμενα Ishikawa κύτταρα αποδείχθηκε πως μία παροδική αύξηση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο, διεγέρθηκε από την καλσιτονίνη, καταστέλλοντας την έκφραση της E-καδερίνης στα κυτταρικά σημεία επαφής. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι πως η έκφραση της καλσιτονίνης επάγεται από την προγεστερόνη στο ανθρώπινο ενδομητρικό επιθήλιο και πιο συγκεκριμένα κατά την μέση εκκριτική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Όντως, η καλσιτονίνη είναι γνωστή ως πιθανός ρυθμιστής της εμφύτευσης. Η προγεστερόνη πιθανόν μέσω της επαγωγής ενδομητρική καλσιτονίνης οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου, μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση της E-καδερίνης. Επομένως, είναι δυνατόν η E-καδερίνη να κατέχει μία διπλή λειτουργία. Στην προκαταρκτική φάση να απαιτείται η έκφραση της στην κυτταρική επιφάνεια για να εξασφαλίσει την δυνατότητα προσκόλλησης. Σε αντίθεση, η E-καδερίνη μπορεί επακόλουθα να ρυθμίζεται αρνητικά για να επιτρέψει την διάσπαση επιθηλιακών κυττάρων και την εισχώρηση της βλαστοκύστης.



Εικόνα 25: Α) Η προσκόλληση επιθηλιακών κυττάρων μέσω E-καδερίνης ελέγχεται από το ενδοκυτταρικό ασβέστιο και Β) Υψηλά επίπεδα προγεστερόνης επάγουν έκφραση καλσιτονίνης, αυξάνοντας την συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, το οποίο καταστέλλει την έκφραση της E-καδερίνης στα σημεία κυτταρικής σύζευξης.

#### 4.2.4) Ανοσογλοβουλίνες:

Μεταξύ της οικογένειας των CAMs μορίων, η υπεροικογένεια των ανοσογλοβουλινών είναι η πιο επεκταμένη. Η ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) ή CD54 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει σε αυτήν την υπεροικογένεια και εκφράζεται αυθαίρετα στην κυτταρική επιφάνεια πολλών κυτταρικών τύπων, όπως είναι οι ινοβλάστες, λευκοκύτταρα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό το μόριο ρυθμίζεται θετικά σε μεταφραστικό επίπεδο από τόσο φλεγμονώδεις όσο και από μη – φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η ICAM-1 μεσολαβεί στην κυτταρική προσκόλληση αφού κατέχει ως προδέτες μόρια της β2 ιντεγκρίνης που εκφράζονται σε

πολλούς κυτταρικούς τύπους. Οι ICAM-1 αλληλεπιδράσεις προσκόλλησης είναι απαραίτητες για την διαενδοθηλιακή μετανάστευση λευκοκυττάρων και για ποικίλες ανοσολογικές λειτουργίες. Είναι καλά καθιερωμένο πως το ενδομήτριο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, περιέχει ένα ευρύ πληθυσμό λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων τα μακροφάγα, Τ λευμοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα, τα οποία είναι σημαντικά για πολλούς ανοσολογικούς μηχανισμούς όπως είναι η φθαρτοποίηση, η περίοδος και ο τοκετός. Ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων εκφράζει ICAM-1 μέσα στο ενδομήτριο. Ωστόσο, έχει φανερωθεί πως αυτό το μόριο προσκόλλησης επίσης εκφράζεται από άλλους ενδοκυτταρικούς κυτταρικούς τύπους. Όντως, η ICAM-1 ανοσοεντοπίζεται καθόλη τη διάρκεια του κύκλου, στην βασική επιφάνεια των αδενικών και κορυφαίων EECs όσο και στο στρώμα. Η έκφραση της ICAM-1 στα στρωματικά κύτταρα ρυθμίζεται θετικά την στιγμή της περιόδου. Μία διαλυτή κυκλοφοριακή μορφή της, sICAM-1, έχει επίσης ανιχνευθεί στον ανθρώπινο ορό και στο υγρό περιτοναίου. Αυτή η διαλυτή μορφή είναι πρωτεολυτικά απελευθερωμένη στην κυτταρική επιφάνεια από την διάσπαση διαμεμβρανικά προσδεδεμένης ICAM-1. Έχει δειχθεί πρόσφατα πως ενδομητρικά κύτταρα σε καλλιέργεια είναι ικανά να εκφράζουν αφθαιρέτα το mRNA και την πρωτεΐνη ICAM-1 χωρίς ορμονική υποστήριξη. Καθαρὰ EECs είναι ωστόσο ικανά να παράγουν περισσότερη ανοσογλοβουλίνη 1 από τα ESCs. Με βάση το γεγονός πως η ICAM-1 εκφράζεται έντονα τόσο στα στρωματικά όσο και στα επιθηλιακά ενδομητρικά κύτταρα, προτάθηκε πως η ICAM-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ενδομητρίου.

Σε καλλιιεργούμενα ESCs, η έκφραση της ICAM-1 ρυθμίζεται θετικά από την ιντερφερόνη γ (IFN-γ). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε ανακαλύπτοντας πως η έκφραση της sICAM-1 ρυθμίστηκε θετικά μετά την διέγερση με IFN-γ σε ευτοπικά ESCs κύτταρα γυναικών με ενδομητρίωση. Η ιντερφερόνη γ επιτρέπει την συσσώρευση της διαλυτής μορφής της ICAM-1 δρώντας στην διάσπαση της στην κυτταρική επιφάνεια των ESCs.

Η ICAM-1 φαίνεται να συμμετέχει στην παθογένεση της ενδομητρίωσης δρώντας σε δύο διαφορετικά επίπεδα. Από την μία μεριά, είχε προταθεί πως μία έκτροπη υψηλή έκφραση της που βρέθηκε στα περιτοναϊκά κύτταρα των ασθενών με ενδομητρίωση, παρέχουν μία δυνατότητα προσκόλλησης στα ενδομητρικά κύτταρα και ενισχύουν την αλληλεπίδραση τους με το επικαλυπτόμενο περιτόναιο. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγήσει τον υψηλο επαναληπτικό ρυθμό αυτής της ασθένειας. Από την άλλη μεριά, έχει δειχθεί πως η sICAM-1 εμπλέκεται σε ανοσολογικές λειτουργίες και η “καταστροφή” της μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς παθογένεσης της ενδομητρίωσης, όπου ενδομητρικά κύτταρα που ανέρρευσαν διαφεύγουν την ανοσοπαρακολούθηση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως ο γενετικός πολυμορφισμός σε μία επικράτεια του ICAM-1 γονιδίου μπορεί να συσχετισθεί με την ευαισθησία της ενδομητρίωσης. Πριν ακόμη προκύψουν αυτά τα αποτελέσματα, η sICAM-1 είχε προταθεί ως πιθανός δείκτης στην ανίχνευση της ενδομητρίωσης.

Η σχέση μεταξύ της ICAM-1 έκφρασης και της επαναλαμβανόμενης απώλειας κυήσεως (RPL) έχει ερευνηθεί. Βρέθηκε πως η μεμβρανικά προσδεδεμένη ICAM-1 εκφραζόταν παρομοίως στα ενδομητρικά κύτταρα ωχρινικής φάσης ασθενών με ή χωρίς ανεξήγητη RPL. Ωστόσο, η ενδομητρική απελευθέρωση της sICAM-1 ήταν χαμηλότερη σε RPL ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα αναφοράς. Επειδή η sICAM-1 είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με αρκετές ανοσολογικές απαντήσεις, τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα που παρατηρήθηκαν σε αυτούς τους ασθενείς τονίζουν ένα πάρα πολύ ενεργητικά ανοσολογικά περιβάλλον κατά τις πρώτες φάσεις της εγκυμοσύνης.

Παρόλο που η ICAM-1 δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη στα πρώτα βήματα αλληλεπίδρασης βλαστοκύστης με το ενδομήτριο, μπορεί να συμμετέχει έμμεσα στην διαδικασία αλληλεπιδρώντας με το ανοσοποιητικό σύστημα. Μία πιο καθαρή εικόνα για τις ανθρώπινες ενδομητρικές παθοφυσιολογίες απαιτείται μέσω επιπλέον έρευνας για την έκφραση και την λειτουργία της ICAM-1.

#### 4.2.5) Βλεννίνες (*mucins*):

Οι βλεννίνες είναι υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτείνες και περιλαμβάνουν τουλάχιστον 50% υδατανθρακικές ενώσεις οξυγόνου με έναν πεπτιδικό πυρήνα πλούσιο σε θρεονίνη και σερίνη. Μεταξύ των 14 κλωνοποιημένων ανθρώπινων βλεννινών, μόνο η MUC1 (mucin-1) και σε λιγότερη έκταση η MUC6 έχουν βρεθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Η MUC1 είναι μία μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη (MB>250kDa), η οποία αποκωδικοποιείται από ένα γονίδιο 7 εξώνων που καλύπτουν περίπου 4-7kb. Το ποικίλο μήκος αυτού του γονιδίου εξαρτάται από τον αριθμό των 60bp διαδοχικών επαναλήψεων που εντοπίζονται στο εξώνιο 2, και αυτό οδηγεί σε έναν πολυμορφισμό στο εκφραζόμενο γονιδιακό προϊόν. Η MUC1 γλυκοπρωτεΐνη αποτελείται από μία ενδοκυτταρική κυτταροπλασματική ουρά και ένα μακρύ εξωκυτταρικό τμήμα (εξωτερική επικράτεια) που περιέχει έναν παράλληλο ποικίλο αριθμό με όμοιες διαδοχικές επαναλήψεις (VNTR) επικρατειών 20 αμινοξέων. Καθεμία από αυτές τις επικράτειες επίσης περιέχει 5 πιθανές οξυγόνο-γλυκοσυλιωμένες περιοχές. Όταν εκφράζονται έντονα στην κυτταρική επιφάνεια, η MUC1 εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση μέσω μίας στερεοχημικής παρεμπόδισης. Η προσκόλληση μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου-μέσου καταστέλλεται σε άμεση συσχέτιση με το μήκος της εξωτερικής της επικράτειας.

Η κορυφαία επιφάνεια των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων προστατεύεται από ένα παχύ γλυκοκαλυμμένο στρώμα αποτελούμενο κυρίως από βλεννίνες που πιστεύεται πως προστατεύει την κυτταρική επιφάνεια από παθολογικές διαδικασίες. Στο ενδομήτριο, η MUC1 εκτείνεται πέρα από το στρώμα και πιθανώς είναι το πρώτο μόριο που το έμβryo συναντά στην διαδικασία της πρόσδεσης του. Μπορεί να θεωρηθεί η πιθανότητα πως η ενδομητρική MUC1 απωθεί την βλαστοκύστη μέχρι να βρεθεί η σωστή στιγμή και το σωστό σημείο της εμφύτευσης. Η κατανομή και η ρύθμιση της MUC1 ποικίλλει καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και μεταξύ των ειδών. Η MUC-1 ρυθμίζεται αρνητικά πριν την εμφύτευση στο δεκτικό ενδομήτριο των ποντικών, αρουραίων και γουρουνιών. Τα υψηλά επίπεδα της προγεστερόνης πιθανώς μειώνουν την έκφραση της MUC1, διευκολύνοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις εμβρύου-επιθηλίου φανερώνοντας τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης στην ενδομητρική επιφάνεια. Επομένως, η MUC1 καταστέλλει την εμφύτευση και η αρνητική της ρύθμιση μπορεί να συμβάλλει στην επίτευξη της ενδομητρικής δεκτικότητας. Προς δική μας έκπληξη, η ανθρώπινη ενδομητρική MUC1 βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά κατά την περιεμφυτευτική περίοδο. Όντως, τόσο η πρωτεΐνη όσο και το mRNA της δείχνουν μία πολλαπλάσια αύξηση από την πολλαπλασιαστική φάση στην μέση εκκριτική φάση. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν ένα παράδοξο καθώς αναμένεται οι ανασταλτικοί παράγοντες να μειώνονται κατά την εμφύτευση όπως περιγράφηκε σε άλλα είδη. Προτείνεται πως στους ανθρώπους απαιτείται ένας τοπικός μηχανισμός δράσης για την απομάκρυνση του MUC1 φραγμού στον εμφυτευτικό έμβryo.

Η ανοσοιστοχημεία στο ανθρώπινο ενδομήτριο, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα για την εσωτερική επικράτεια της MUC1, δεν μπορεί να ανιχνεύσει αξιοσημείωτες τροποποιήσεις στην τοποθεσία της στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Παρόλα αυτά, η ανίχνευση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συνδυαστικά με ανοσοιστοχημεία έχει επιτευχθεί σε ακριβείς αποσταλμένους MUC1 επιτόπους μόνο στα κροσσωτά κύτταρα. Αντιθέτως, η MUC1 έλλειπε από την επιφάνεια μη-κροσσωτών κυττάρων και από τα μητρικά πινοπόδια. Προτείνεται πως η σημασία των πινοποδίων είναι να προμηθεύσει σε μία περιοχή, ελεύθερη από την διαδεδομένη καταστολή της MUC1 για την εμβρυική-ενδομητρική αλληλεπίδραση. Όντως, σε ανθρώπινα μοντέλα εμφύτευσης *in vitro* υποδηλώνουν πως η MUC1 χάνεται στο σημείο της προσκόλλησης εμβρύου. Στο μοντέλο αυτό, ανθρώπινα έμβρυα που συν-καλλιιεργήθηκαν στο στάδιο βλαστοκύστης πάνω σε ένα μονό στρώμα EECs κυττάρων, μεταφέρθηκαν σε ένα τρισδιάστατο σύστημα που περιλαμβάνει EECs και ECM τζέλ. Αυτά τα έμβρυα παρατηρήθηκε πως προσκολλούν στο υποκείμενο επιθήλιο. Η ανίχνευση της MUC1 ήταν ανύπαρκτη από τα επιθηλιακά κύτταρα κάτω και μέσα από την ενδιάμεση γειτνίαση των προσκολλημένων εμβρύων, ενώ ήταν ανεπηρεάστη σε σημαντική απόσταση από το σημείο της εμφύτευσης. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν πως οι παράγοντες που εκφράζονται στην επιφάνεια των βλαστοκυττάρων ή εκκρίνονται από την ίδια την βλαστοκύστη προκαλεί την τοπική απώλεια της MUC1. Η “καταστροφή” της εσωτερικής επικράτειας έχει μία σημαντική επίπτωση στην βιολογική δραστηριότητα των ενσωματωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών

και επομένως, ρυθμίζει τους ενδοκυτταρικούς σηματοδοτικούς καταρράκτες. Ένας τρόπος για να προκληθεί η απώλεια της MUC1 και επακολούθως της μη-προσκολλητικής λειτουργίας της, είναι να απομακρυνθεί η εξωτερική της επικράτεια από την κυτταρική επιφάνεια. Η οικογένεια των πρωτεολυτικών ενζύμων, γνωστά ως “sheddas” (καταστροφείς), έδειξε πως είναι ικανή να πρωτεολύσει αυτήν την εξωτερική επικράτεια. Η TNFα, μία προφλεγμονώδης κυτοκίνη, εκκρίνεται τόσο από το ενδομήτριο όσο και από την ανθρώπινη βλαστοκύστη και παίζει σημαντικό ρόλο στην τοπική απομάκρυνση καθώς απωθεί την MUC1. Η TNFα έχει διπλή επίδραση. Από την μία μεριά, αυξάνει την έκφραση της MUC1. Αυτό το ερέθισμα φαίνεται να μεσολαβείται από την πρόσδεση του πυρηνικού παράγοντα κB στο σημείο του ενισχυτή στο γονίδιο της MUC1. Από την άλλη μεριά, η TNFα κυτοκίνη έχει δείχθει πως διεγείρει σημαντικά την “καταστροφή” της MUC1 στο ανθρώπινο μητρικό επιθήλιο. Όντως, στην ανθρώπινη μητρική επιθηλιακή κυτταρική σειρά (HES), ο TNFα ενισχύει την έκφραση ενός μέλους της οικογένειας καταστροφών, το ένζυμο μετατροπής της TNFα, TACE/ADAM17. Άλλοι καταστροφείς, συγκεκριμένα, μεσολαβούν στην απελευθέρωση της εξωτερικής επικράτειας της MUC1 in vitro. Ακόμη πιο ενδιαφέρον, η in vivo έκφραση της MT1-MMP έχει δείχθει πως αυξάνεται κατά την δεκτική φάση σε ανθρώπινες ενδομητρικές βιοψίες. Επιπλέον, ανοσοιστοχημικές ανιχνεύσεις έχουν αποδείξει πως οι MUC1 και MT1-MMP εντοπίζονται μαζί στο ανθρώπινο μητρικό επιθήλιο την στιγμή της εμφύτευσης. Εφόσον αυτό το ένζυμο δεν επηρεάζεται από την TNFα κυτοκίνη, υποτίθεται πως άλλοι παράγοντες επιδρούν στην σταθερότητα της MUC1.

Γυναίκες με RPL δείχθηκε πως εκφράζουν μειωμένη ενδομητρική MUC1 σε σύγκριση με φυσιολογική ομάδα ασθενών. Όντως, χρησιμοποιώντας ημι-ποσοτική ανοσοιστοχημεία, έχει αποδειχθεί πως τα επίπεδα της πυρηνικής MUC1 πρωτεΐνης και των βλεννινο-σχετιζόμενων γλυκανών κατά τη μέση εκκριτική φάση μειώνονται σε PRL γυναίκες. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε μητρικές εκπλύσεις PRL ασθενών μετά την LH+7 ημέρα, συγκριτικά με γόνιμες ομάδες. Η αποκρουστική επίδραση της MUC-1 μπορεί να είναι σημαντική στην κατεύθυνση της βλαστοκύστης στην ακριβής περιοχής που είναι ισχυρότερη για εμφύτευση. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, η ανθρώπινη γονιδιακή συχνότητα της MUC1 περιέχει έναν ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλαμβανόμενων περιοχών. Αυτός ο πολυμορφισμός, χαρακτηριστικός για το ανθρώπινο MUC1 γονίδιο, σχετίζεται με την φυσιολογική εμφύτευση. Μία μελέτη σύγκρισε τον πολυμορφισμό αυτόν σε γόνιμους και ασθενείς με επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (RIF) και έδειξε πως η υπογόνιμη ομάδα έχει υψηλότερη συχνότητα στα μικρά αλληλόμορφα της MUC1. Επομένως, η πρωταρχική υπογονομότητα λόγω αποτυχίας εμφύτευσης μπορεί να σχετίζεται με τους πολυμορφισμούς στα VNTR της MUC1, οδηγώντας στην δημιουργία μίας πρωτεΐνης με ουσιαστική μείωση στον αριθμό οξυγονό-γλυκοσυλιωμένων σημείων.

Συμπερασματικά, η MUC1 φανερώνεται ως αρνητικός παράγοντας για την εμβρυική εμφύτευση. Όντως, στην περιοχή όπου λαμβάνει χώρα η εμφύτευση, η MUC1 εξαφανίζεται. Αυτό το φαινόμενο δείχθηκε πως ελέγχεται in vitro κυρίως από την οικογένεια των “καταστροφών” ενζύμων που ρυθμίζονται από την βλαστοκύστη και τους ενδομητρικά παραγόμενους παράγοντες. Επειδή η ενδομητρική MUC1 αυξάνεται την στιγμή της εμφύτευσης, υποθέτουμε πως αυτός ο παράγοντας συμμετέχει στην καθοδήγηση του εμβρύου χρονικά και χωρικά σε μία αποτελεσματική εμφύτευση. Αυτή η θεωρία είναι συνεπής με τα ευρήματα πως η MUC1 εκτείνεται πέρα από το κάλυμμα γλυκοκαλίξης στο ενδομήτριο και είναι το πρώτο μόριο που συναντά την βλαστοκύστη καθώς εισέρχεται στην μητρική κοιλότητα. Περαιτέρω έρευνα θα καθορίσει καλύτερα τον ακριβή ρόλο της στην ανθρώπινη εμβρυική εμφύτευση.

#### 4.2.6) Προσταγλανδίνες:

Η διαδικασία της εμφύτευσης μπορεί να θεωρηθεί ως μία προφλεγμονώδης αντίδραση, αφού η προσκόλληση και εισχώρηση του εμβρύου εντός του ενδομητρίου απαιτεί σύνδεση με το μητρικό αγγειακό σύστημα. Σε πολλά είδη, αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στο σημείο εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Υπάρχει εδώ και αρκετό καιρό η υποψία πως οι προσταγλανδίνες (PGs), ως αγγειοενεργοί παράγοντες, παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην

ωορρηξία, γονιμοποίηση και στις τελικές διαδικασίες εγκυμοσύνης οδηγώντας στον τοκετό. Επιπλέον, οι PGs πρόσφατα αποδείχθηκαν να είναι κρίσιμες στην επιτυχή εμβρυική εμφύτευση.

Οι προσταγλανδίνες είναι μέλη της οικογένειας εικοσανοειδών, που επίσης περιέχει τα λευκοτριένια (Lts) και τις θρομβοξάνες (TXa). Αυτές αποτελούνται από 4 μέλη, ονομαστικά είναι PGD2, PGE2, PGF2α και προστακυκλίνη (PGI2), τα οποία παράγονται από μεμβρανικά φωσφολιπίδια μέσω της συνεχούς δράσης δύο ενζύμων, την κυτοσολική φωσφολιπάση A2 (cPLA2) και κυκλοοξυγονάση (COX). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 3 ισομορφές του COX, COX-1, COX-2 και COX-3. Παρόλο που η έκφραση της COX-1 είναι αυθαίρετη και μεσολαβεί σε φυσιολογικές λειτουργίες, η αντίστοιχη έκφραση της COX-2 ισομορφής επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ογκογονίδια και φλεγμονώδη ερεθίσματα. Η cPLA2 δρά ως μεμβρανικό φωσφολιπίδιο για να απελευθερώσει αραχιδονικό οξύ (AA), το οποίο θα οξυγονωθεί και μειωθεί από τα COX ένζυμα, σε μεσολαβητής προσταγλανδίνης H2 (PGH2). Αυτός ο μεσολαβητής επακολουθώς υπηρετεί ως υπόστρωμα για την PG συνθάση (PGS) στην γενιά των τεσσάρων προσταγλανδινών, PGD2, PGE2, PGF2α και PGI2. Τα PGS ένζυμα καθορίζονται σύμφωνα με την προσταγλανδίνη από όπου παράγονται, δηλαδή η η συνθάση προσταγλανδίνης D (PGDS) παράγει την PGD2, η συνθάση της προσταγλανδίνης E (PGES) παράγει την PGE2, η συνθάση της προσταγλανδίνης F (PGFS) παράγει την PGF2 και η συνθάση της προσταγλανδίνης I (PGIS) παράγει την PGI2.

Μελέτες σε θηλυκά ποντίκια που έχουν έλλειψη της cPLA2 ή των COX ενζύμων εγκαθιδρύουν έναν κεντρικό ρόλο των προσταγλανδινών στην εμφύτευση. Η έλλειψη ενός εκ των δύο ενζύμων οδηγεί απουσία σύνθεσης προσταγλανδινών, προκαλώντας αρκετά ελαττώματα στην διαδικασία της εμφύτευσης. Πιο συγκεκριμένα, σε cPLA2 knockout ποντίκια εκδηλώνεται αποτυχία εγκυμοσύνης και μικρότερου βάρους γεννημένα έμβρυα, όπου και τα δύο προέρχονται δευτερευόντως από την καθυστερημένη εμφύτευση. Στα ποντίκια με ανεπαρκή υποδοχέα λυσοφωσφατιδικού οξέως 3 (LPA-3) αποδείχθηκαν παρόμοια προβλήματα με αυτά των ανεπαρκή σε cPLA2 ποντίκια. Η εξωγενής χορήγηση προσταγλανδινών μπορεί να αποκαταστήσει την εμβρυική εμφύτευση την κατάλληλη στιγμή.

Η έκφραση των προσταγλανδινών και των ενζύμων που εμπλέκονται στην σύνθεση τους έχει αποδειχθεί καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Όντως, η έκφραση της PGES και η σύνθεση της PGE2 ανιχνεύθηκε στο ανθρώπινο ενδομήτριο σε όλα τα στάδια του κύκλου με προφανή μειωμένη έκφραση στην όψιμη εκκριτική φάση. Άλλες προσταγλανδίνες όπως η PGF2 και η PGI2, εμπλέκονται στην αγγειακή λειτουργία, όπου συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και στον εμμηνορρυσιακό κύκλο. Η έκφραση των COX είναι μέγιστη κατά τη διάρκεια του κύκλου και κυρίως στην πολλαπλασιαστική φάση, και εντοπίζεται στα επιθηλιακά και περιαγγειακά κύτταρα. Δεν υπάρχει καμία απόδειξη πως η ελαττωματική έκφραση των προσταγλανδινών αποτρέπουν την ανθρώπινη γονιμότητα. Επειδή ποντίκια που είναι ελλιπή ως προς τις προσταγλανδίνες είναι γόνιμα αλλά εμφανίζουν προβλήματα συντονισμού, υποψιάζονται πως ένας παρόμοιος ρόλος που αφορά το παράθυρο της εμφύτευσης μπορεί να βρεθεί στους ανθρώπους. Όντως, καθυστερημένη ανθρώπινη εμβρυική εμφύτευση έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρώιμη απώλεια εγκυμοσύνης. Περαιτέρω έρευνα στο ρόλο των προσταγλανδινών την στιγμή της εμφύτευσης μπορεί να φωτίσει τις πολλαπλασιαστικές επιπτώσεις που οδηγούν σε όψιμες ανωμαλίες εγκυμοσύνης.

Ακολουθώντας την σύνθεση τους, οι προσταγλανδίνες μεταφέρονται ραγδαία στα κύτταρα μέσω ενός ειδικού μεταφορέα, PGT. Αυτός ο μεταφορέας ανήκει στην οικογένεια 12 διαμεμβρανικών οργανικών ανιο-μεταφορικών πεπτιδίων. Η έκφραση του μεταφορέα έχει αξιολογηθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο καθόλη τη διάρκεια του κύκλου και αυξάνεται κατά την πολλαπλασιαστική φάση και στην πρώιμη εκκριτική φάση ενώ μειώνεται στην μέση και όψιμη εκκριτική φάση, όπως δείχθηκε με την τεχνική της RT-PCR. Επιπλέον, αυτός ο μεταφορέας έχει ανοσοανιχνευθεί στο κορυφαίο και αδενικό επιθήλιο καθώς και στα στρωματικά κύτταρα. Η ρύθμιση του PGT στα επιθηλιακά κύτταρα κατά την διάρκεια του κύκλου προτείνει έναν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δράσης προσταγλανδινών στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Αυτό μπορεί να αφορά την ρύθμιση της τοπικής διαθεσιμότητας προσταγλανδινών παρόλο που ο συγκεκριμένος ρόλος τους στην

ανθρώπινη εμφύτευση δεν είναι ακόμη πλήρως καθορισμένος.

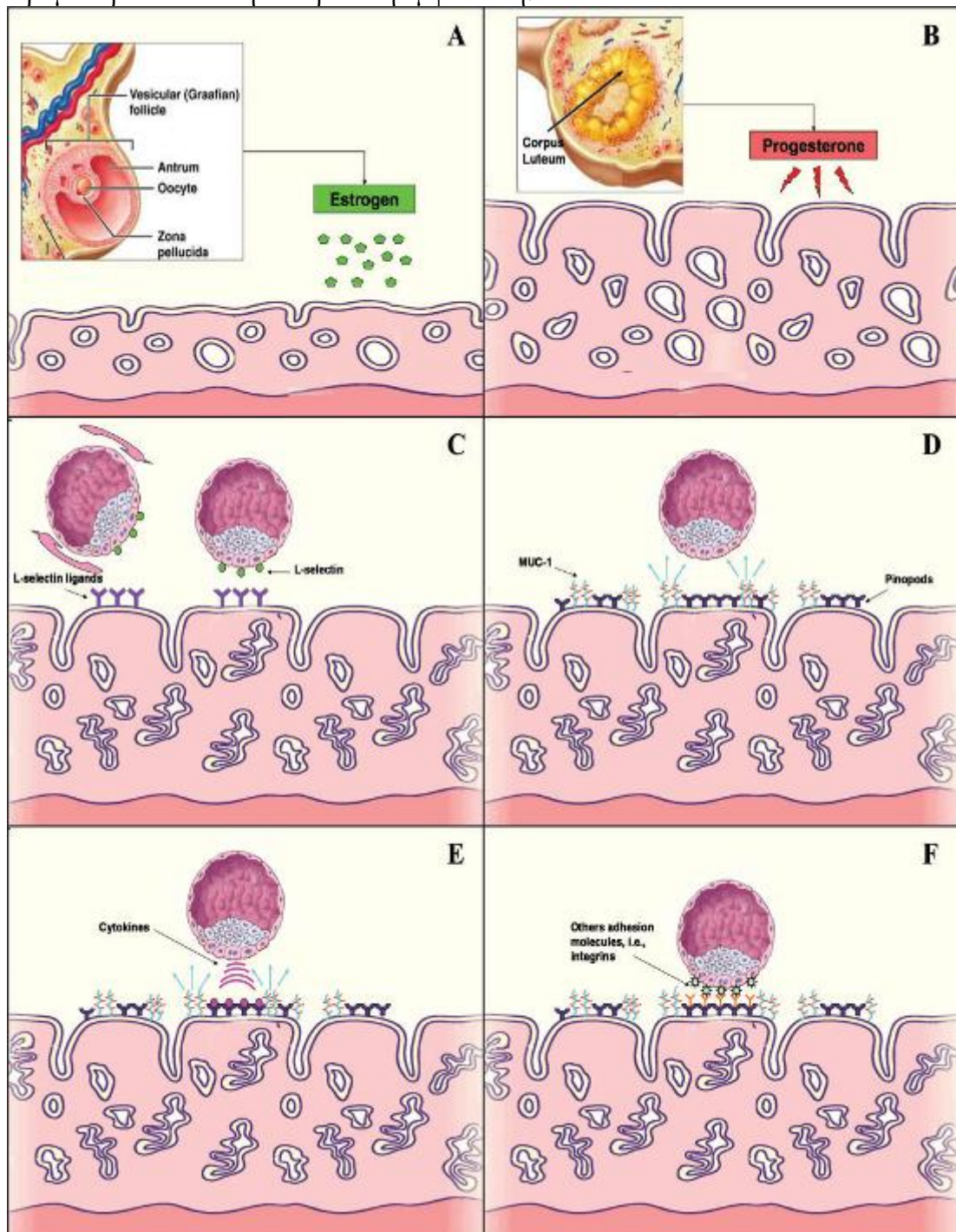
Μόλις απελευθερωθούν από τα κύτταρα, οι προσταγλανδίνες εκθέτουν τις αυτοκρινή και παρακρινή δράσεις τους δεσμεύοντας στους υποδοχείς G- πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια γειτονικά των σημείων παραγωγής τους. Εφτά διαφορετικοί υποδοχείς, που κωδικοποιούνται από 4 γονίδια, καθορίζονται ως DP, EP1-4, FP και IP. Οι EP2 και EP4 είναι δύο υποδοχείς της PGE και έχουν μελετηθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Η έκφραση του EP2 mRNA δεν αλλάζει κατά την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Ωστόσο, η έκφραση του EP4 mRNA είναι σημαντικά υψηλότερη κατά την όψιμη πολλαπλασιαστική φάση. Επιπλέον, οι εκφράσεις των E2 και E4 εντοπίστηκαν μέσω *in situ* υβριδοποίησης (ISH) στα επιθηλιακά και αγγειακά κύτταρα σε όλα τα στάδια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν αποδειχθεί να είναι λειτουργικοί στο ανθρώπινο ενδομήτριο, επειδή η cAMP αυξάνεται *in vitro* ως ανταπόκριση στο ερέθισμα της PGE2. Αυτή η επίδραση είναι πιο σαφής στην πολλαπλασιαστική φάση ενδομητρίου. Ο FP υποδοχέας εκφράζεται επικρατέστερα στα ανθρώπινα EECs καθόλη τη διάρκεια του κύκλου και ρυθίζεται θετικά κατά τη μέση και όψιμη πολλαπλασιαστική φάση. Αυτός ο υποδοχέας έχει αποδειχθεί να είναι λειτουργικός *in vitro* στο ανθρώπινο ενδομήτριο, επειδή η εξωγενής θεραπεία με PGF2α ενεργοποιεί το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (PLC) και απελευθερώνει την φωσφατάση ινοσιτόλης. Η έκφραση του IP mRNA ανιχνεύθηκε στα ανθρώπινα αδενικά επιθηλιακά και στρωματικά ενδομητρικά κύτταρα κατά την διάρκεια του κύκλου με μία σημαντική αύξηση κατά την διάρκεια της περιόδου. Η λειτουργικότητα του IP υποδοχέα αξιολογήθηκε μετρώντας την παραγωγή του cAMP ακολουθούμενη από την θεραπεία με εξωγενής χορήγηση αναλόγου της PGI2, iloprost (ιλοπρόστης). Η παραγωγή της cAMP αυξήθηκε σημαντικά στους ενδομητρικούς ιστούς κατά την πολλαπλασιαστική φάση συγκριτικά με την εκκριτική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυξημένη έκφραση και σηματοδότηση του IP υποδοχέα κατά την εμμηνορρυσιακή περίοδο υπονοεί έναν ρόλο της PGI2 σε φυσιολογικούς και δυσλειτουργικούς κύκλους παρά κατά την διάρκεια εμφύτευσης. Συλλογικά, φαίνεται πως περαιτέρω έρευνα θα καθορίσει καλύτερα το ρόλο των προσταγλανδινών στον συντονισμό κατά την εμβρυική εμφύτευση και πρέπει να εστιάσει στους υποδοχείς, καθώς εμφανίζουν ένα ρυθμιζόμενο πρότυπο έκφρασης και εκφράζονται προτιμότερα πριν την μέση εκκριτική φάση ανταποκρίνοντας στο υποτιθέμενο παράθυρο εμφύτευσης.

Η παραγωγή των προσταγλανδινών στο ανθρώπινο ενδομήτριο αναφέρεται πως ρυθμίζεται θετικά από την οξυτοκίνη. Επιπλέον, η προγεστερόνη επιδρά στην επαγόμενη από την οξυτοκίνη παραγωγή της PGE2 *in vitro*. Όντως, η παραγωγή της PGE2 στα Ishikawa κύτταρα αυξήθηκε ελάχιστα από την οξυτοκίνη και αυξήθηκε σημαντικά από την προγεστερόνη. Επιπλέον, η έκφραση της COX-2 επάγεται από την IL-1β στα ανθρώπινα φυσιολογικά ESCs κύτταρα και στην ενδομητρίωση. Έχει περιγραφθεί προηγουμένως πως ο βασικός ρόλος της IL-1 είναι η εγκαθίδρυση της ενδομητρικής δεκτικότητας. Πέρα από την δράση της στην έκφραση της αVβ3 ιντεγκρίνης, η IL-1 ενισχύει επίσης της έκφραση των προσταγλανδινών αυξάνοντας το COX-2 ένζυμο. Οι κυτοκίνες όπως η IL-1 παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην σύνθεση μορίων προσκόλλησης απαραίτητα για την προσκόλληση της βλαστοκύστης αλλά ελέγχουν επίσης και την έναρξη του παραθύρου εμφύτευσης.

Η παθολογία της ενδομητρίωσης σχετίζεται με ανώμαλη βιοσύνθεση των COX και PG. Ανοσοιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει πως το COX-2 ρυθμίζεται θετικά στο ενδομήτριο που πάσχει από ενδομητρίωση. Η αύξηση της έκφρασης του COX-2 στο ενδομητρικό ιστό μπορεί να προέρχεται από την αυξημένη ευαισθησία του εκτοπικού ενδομητρίου σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1β, που είναι συνεχώς παρούσες στο PF ασθενών ενδομητρίωσης. Η ρύθμιση του COX-2 γονιδίου από την IL-1β μπορεί να παίζει κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση των PG έχει αναφερθεί σε PF υπογόνιμων γυναικών με ενδομητρίωση, προτείνοντας πως το εκτοπικό ενδομήτριο συνθέτει άμεσα και απελευθερώνει προστανοειδή στο PF.

Οι προσταγλανδίνες έχουν δείχθει σημαντικές για την εμφύτευση εμβρύου. Ο ρόλος τους αφορά τον συγχρονισμό στο παράθυρο της εμφύτευσης. Καθυστερημένος συντονισμός κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης φέρει μία σειρά πολλαπλασιαστικών επιπτώσεων που είναι παρών

στα ποντίκια, όπως το έμβryo να συνοστίζεται κοντά στον τράχηλο της μήτρας, πλακουντιακές ανωμαλίες και επαναρόφηση εμβρύου. Τα συμπληρώματα προσταγλανδινών μπορούν μερικώς να αποκαταστήσουν τον φυσιολογικό φαινότυπο. Θα πρέπει να ερευνηθεί εάν οι προσταγλανδίνες έχουν παρόμοιο ρόλο και στην ανθρώπινη εμφύτευση. <sup>(6)</sup>



Εικόνα 26: Απεικόνιση ανθρώπινης εμβρυικής εμφύτευσης. Α) Το ενδομήτριο πολλαπλασιάζεται κάτω από οιστρογονική ενίσχυση, Β) Η προγεστερόνη από ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια οδηγεί σε ενδομητρική διαφοροποίηση, Γ) Η βλαστοκύστη εισέρχεται στον αυλό της μήτρας και κυλάει ελεύθερα πάνω από το ενδομήτριο καθοδηγούμενη από τα σήματα της L-σελεκτίνης, Δ) Η Muc-1 απωθεί την βλαστοκύστη και αποτρέπει την προσκόλληση της σε ενδομητρικές περιοχές με χαμηλές πιθανότητες εμφύτευσης, Ε) Οι χημειοκίνες και κυτοκίνες προσελκύουν την βλαστοκύστη στο άριστο σημείο εμφύτευσης και F) Μόρια προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες συγκρατούν σφιχτά την βλαστοκύστη στα ενδομητρικά πινοπόδια προκειμένου να εξασφαλίσουν μία επιτυχημένη εμφύτευση.

#### 4.3) Παράγοντες που εμπλέκονται στην τροφοβλαστική εισχώρηση και ο έλεγχος τους:

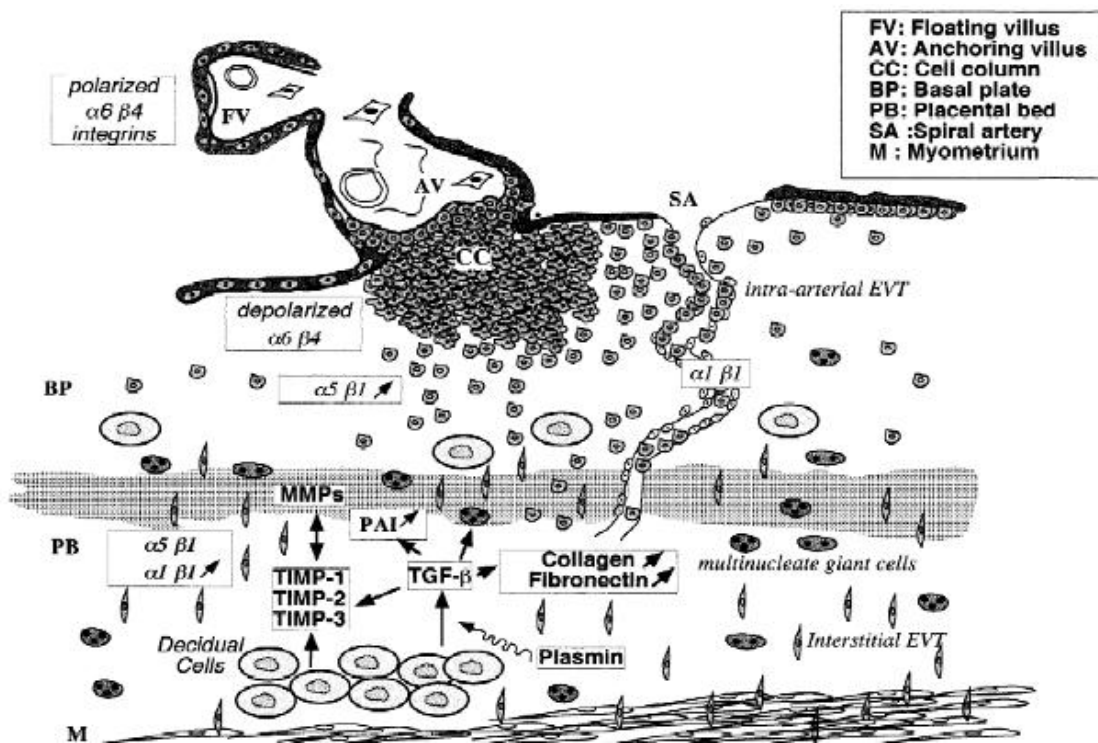
##### 4.3.1) Η διαδικασία της εισχώρησης και η διαφοροποίηση τροφοβλάστης:

Η διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο θεωρείται παρόμοια της εισχώρησης καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, ενώ οι όγκοι τείνουν να εισβάλλουν ως μεμονωμένα μεταστευτικά κύτταρα, η εμφυτευτική βλαστοκύστη εισβάλλει μαζικά. Στα πρωτεύοντα, ινδικά χοιρίδια και σαρκοφάγα, αυτή η επιθετική μετανάστευση εντός του ενδομητρίου αναφέρεται ως “παρεμβατική εμφύτευση” (intrusive implantation) και μπορεί επίσης να αναφερθεί ως “ενδοεπιθηλιακή εμφύτευση” (inter-epithelial implantation”), εφόσον δεν υπάρχει καμία βλάβη στο μητρικό επιθήλιο. Από παρατηρήσεις που διενεργήθηκαν στα πρωτεύοντα και σε *in vitro* μοντέλα, είχε αποφασιστεί πως η συγκυτιακή μεταμόρφωση μπορεί να επαχθεί στην τροφοβλάστη μέσω επαφής με την επιφάνεια του επιθηλίου και πως η διείσδυση της ανθρώπινης βλαστοκύστης εντός του ενδομητρίου συμβαίνει μέσω της εξώθησης κυτταροπλασματικών διαδικασιών από την συγκυτιοτροφοβλάστη. Η εισχώρηση αυτών των εκτάσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων φτάνει μέχρι την βασική μεμβράνη. Τότε, η τροφοβλάστη διεισδύει στο ενδομήτριο μέσω πρωτεύουσα της υποκείμενης βασικής μεμβράνης και της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (ECM) του στρώματος. Ενώ οι κυτταροτροφοβλάστες, το κλασικό μονοκυτταρικό στρώμα, δρουν ως πολλαπλασιαστικά βλαστικά κύτταρα σε συνεχή επέκταση της τροφοβλάστης, η αρχέγονη συγκυτιοτροφοβλάστη, που σχηματίζεται μέσω κυτταρικής σύμπτυξης, αποτελεί ένα μεγάλο συνεχές ακυτταρικό εξωτερικό στρώμα που είναι αντικριστά με μητρικό ιστό. Γύρω στην 9η ημέρα, η συγκυτιοτροφοβλάστη εμφανίζει κενές κοιλότητες εξωτερικά, trophoblastic lacunae, τα οποία θα συγχωνευτούν με νεοσχηματιζόμενα μητρικές κοιλότητες και τα μητρικά τριχοειδή αραιώνουν γύρω στην 12η ημέρα. Τα 2 μονοπάτια διαφοροποίησης της τροφοβλαστικής κυτταρικής σειράς:

Η δημιουργία του πλακούντα προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης, μετανάστευση και εισχώρηση εντός του ενδομητρίου και της αγγείωσης του. Διακριτοί τροφοβλαστικοί πληθυσμοί προκύπτουν από 2 βασικά μονοπάτια διαφοροποίησης: λαχνωτών και εξωλαχνωτών.

Οι κυτταροτροφοβλάστες (CTBs) πολλαπλασιάζονται μεταξύ ακτινικά κατανεμημένων κοιλοτήτων και εντός πλευρικών διακλαδώσεων, οι οποίες εισχωρούν εντός των κοιλοτήτων, οδηγώντας στην διαμόρφωση ενός αρχέγονου τροφοβλαστικού λαχνωτού. Σε αυτό το λαχνωτό, οι CTBs συγχωνεύονται για να σχηματίσουν μία ορμονικά ενεργή λαχνωτή συγκυτιοτροφοβλάστη που αντιπροσωπεύει το τελικό στάδιο διαφοροποίησης της ανθρώπινης εσωτερικά λαχνωτής τροφοβλάστης και κατέχει σημαντικές ενδοκρινείς και μεταφορικές ιδιότητες, που είναι πέρα από τον σκοπό αυτής της εργασίας.





Εικόνα 27: Ένα διάγραμμα που απεικονίζει το εξωλαχνωτά κύτταρα (FV) να “βαφτίζονται” στο μητρικό ενδολαχνωτό αίμα (AV) προσκολλώντας στην μητρική φθαρτοποιημένη βάση και στον μητρικό τοίχο από εξωλαχνωτή τροφοβλάστη κυτταρικών στήλων (CCs). Η ειδική οργάνωση της ζώνης σύνδεσης ανακεφαλαιώνει την διαφοροποίηση των EVTs και αλλάζει την έκφραση των ιντεγκρινών κατά το εισχωρητικό μονοπάτι. Η εισχώρηση ελέγχεται από ιστικούς καταστολείς μεταλλοπρωτεασών (TIMP-1, TIMP-2 και TIMP-3) και παράγοντες όπως TGF-β, που εκκρίνονται κυρίως από τα φθαρτοποιημένα κύτταρα.

Στα σημεία όπου το λαχνωτό έρχεται σε επαφή με τον μητρικό τοίχο, αναπτύσσονται αγκυλωτές λάχνες κατά την 2η και 3η εβδομάδα. Κοντά στις κορυφές αυτών των λαχνών, μερικές CTBs πολλαπλασιάζονται προς την βασική πλάκα. Αυτά τα τροφοβλαστικά κύτταρα, που είναι εξωλαχνωτές τροφοβλάστες (EVT), σχηματίζουν στήλες πολλαπλών στρωμάτων των μη-πολικά πολλαπλασιαζόμενων CTBs που συνδέουν τις αγκυρωτές λάχνες με το πλακουντιακό κρεβάτι. Ανερχόμενα από αυτές τις στήλες, μερικά EVT κύτταρα απαιτούν έναν παροδικά διεισδυτικό φαινότυπο. Έτσι σταματούν πλέον να πολλαπλασιάζονται και ξεκινούν να μεταναστεύουν βαθιά μέσα στον φθαρτό και στο εσωτερικό τρίτο του μυομητρίου, όπου διηθούν στα τείχη και στον αυλό των σπειροειδών αρτηριών. Αυτή η εισχωρητική δραστηριότητα κορυφώνεται κατά τη διάρκεια της 12ης εβδομάδας της εγκυμοσύνης και μειώνεται δραστικά αμέσως μετά. Επιπλέον, η εγκαθίδρυση της αιματικής ροής των εσωτερικών λαχνών, καθορίζεται μέσω Doppler απεικόνιση, και συμβαίνει περίπου κατά την 11,7 εβδομάδων ηλικία κύησης και σχετίζεται με την κορυφή και την επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης κυκλοφοριακής hCG

#### 4.3.2) Ο “διακόπτης” ιντεγκρίνης στην κυτταροτροφοβλάστη:

Με βάση την τοποθεσία τους, οι CTBs είναι περικυκλομένες από διαφορετικά στοιχεία της ECM τα οποία ρυθμίζουν συγκεκριμένα την κολλαγονολυτική δραστηριότητα και κυτταρική συμπεριφορά πιθανώς μέσω των ιντεγκρινών, οι οποίες μεσολαβούν στην προσκόλληση με το εξωκυτταρικό μέσο. Κατά την μετανάστευση τροφοβλάστης από την ζώνη των λαχνών εντός του φθαρτού, οι CTBs ρυθμίζουν το ρεπερτόριο των ιντεγκρινών (ο γνωστός “διακόπτης” των ιντεγκρινών), φανερώνοντας μία μείωση της αββ4, ενός υποδοχέα λαμινίνης, και μία αύξηση των α5β1 και α1β1 ετεροδιμερών, ένας υποδοχέας φιμπρονεκτίνης και ένας υποδοχέας κολλαγόνου/λαμινίνης, αντίστοιχα. Η εκπόλωση της αββ4 ιντεγκρίνης των CTBs, που βρίσκονται στις εγγύς τροφοβλαστικές στήλες σηματοδοτεί την απόκτηση της εισχωρητικής ικανότητας μέσω των EVT κυττάρων. Ταυτόχρονα, αυτά τα κύτταρα εκφράζουν ιστοσυμβατά συνδεδεμένη με το

αντιγόνο G πρωτεΐνη (HLA-G) και θεωρείται ένα μη-κλασσικό ιστοσυμβατό σύμπλεγμα κλάσης I αντιγόνο, το οποίο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην μητρική ανοχή του εμβρύου. Τα κύτταρα που είναι HLA-G θετικά επίσης εκκρίνουν σημαντικά περισσότερες τζελατινάσες και λιγότερη φιμπρονεκτίνη από HLA-G αρνητικά κύτταρα. Στις άπω στήλες, τα EVT κύτταρα εκφράζουν τα α5β1 ετεροδιμερή, τον βασικό υποδοχέα φιμπρονεκτίνης και επίσης παράγουν φιμπρονεκτίνη.

Εφόσον τα EVT κύτταρα αποχωρήσουν από τις κυτταρικές στήλες και εισβάλλουν στο πλακουντιακό κρεβάτι, συνεχίζουν να εκφράζουν τον α5β1 υποδοχέα φιμπρονεκτίνης και ρυθμίζουν θετικά την έκφραση του α1β1 υποδοχέα κολλαγόνου/λαμινίνης, που είναι σχετικά δυνατοί στα EVTs που έχουν εισχωρήσει στα μητρικά αιμοφόρα αγγεία. Ανοσοκυτταροχημικά δεδομένα και πειράματα διαταραχής αντισωμάτων προτείνουν πως η θετική ρύθμιση της α1β1 ιντεγκρίνης είναι κρίσιμη για την απόκτηση του διεισδυτικού φαινοτύπου των κυτταροτροφοβλαστών. Ο ανώμαλος “διακόπτης” μορίων προσκόλλησης που προκύπτει από τις εισχωρητικές κυτταροτροφοβλάστες συναντάται στην προεκλαμψία. Στο πλακουντιακό κρεβάτι προεκλαμπτικών ασθενών, τα EVT κύτταρα παρουσιάζουν την α5β1 ιντεγκρίνη αλλά αποτυγχάνουν να εκφράσουν το σύμπλεγμα της α1β1 ιντεγκρίνης. Σε δυσλειτουργική εγκυμοσύνη, η εισχώρηση κυτταροτροφοβλάστης περιορίζεται στον επιφανειακό φθαρτό και δεν προωθείται στα μητρικά αιμοφόρα αγγεία.

#### 4.3.3) Μεσολαβητές της εισχώρησης:

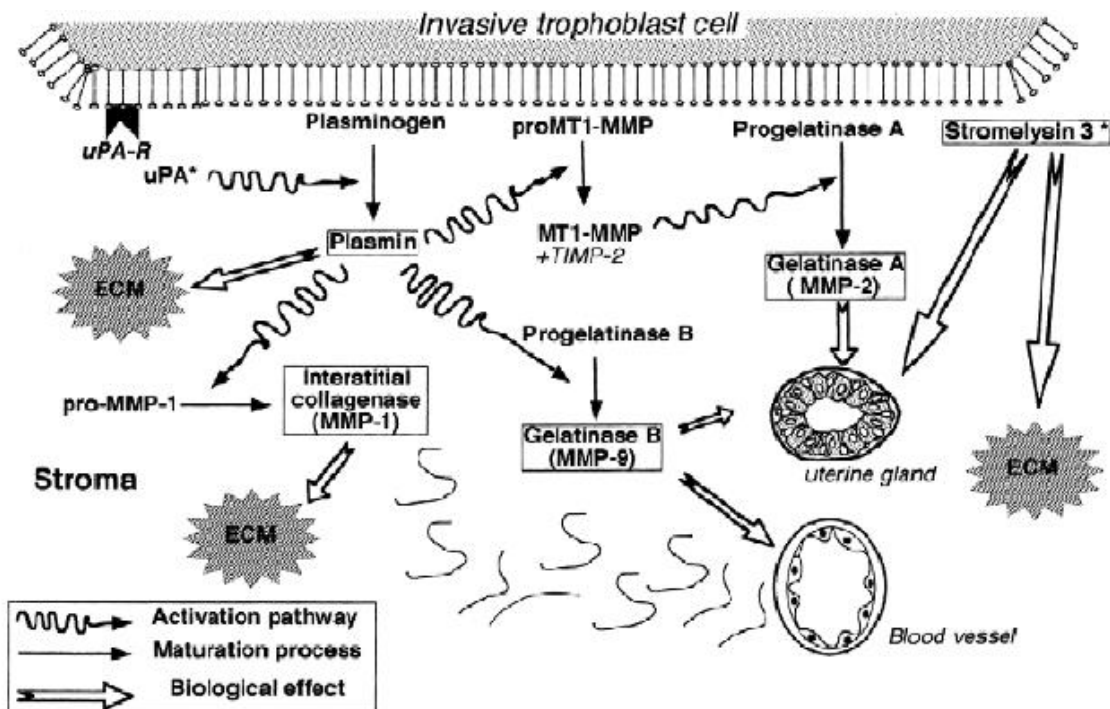
Η εισχώρηση μέσα στο επιθήλιο και στο στρώμα του ενδομητρίου μεσολαβείται από πρωτεϊνάσες που βρίσκονται στην επιφάνεια των τροφοβλαστικών κυττάρων ή στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Αυτές οι πρωτεϊνάσες συμπεριλαμβάνουν μέλη της οικογένειας μεταλλοπρωτεϊνών μέσου, ενεργοποιητές πλασμινογόνου που ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών σερίνης και την πλασμίνη.

##### 1) Matrix metalloproteinases (MMPs):

Οι MMPs είναι μία πολυγονιδιακή οικογένεια ψευδαργυρο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών που είναι ικανές να διασπών στοιχεία της ECM. Οι περισσότερες εκκρίνονται ως ανενεργά προένζυμα και ενεργοποιούνται εντός της ECM. Κατηγοριοποιούνται σε 3 υποοικογένειες (κολλαγενάσες, στρωμελυσίνες και τζελατινάσες) με βάση την ειδικότητα του υποστρώματος τους. Το ανθρώπινο προεμφυτευτικό έμβρυο παράγει μεταλλοπρωτεϊνάσες ικανές να διασπάσουν το κολλαγόνο τύπου IV των βασικών ενδομητρικών μεμβρανών, και αυτή η δραστηριότητα πρωτεϊνάσης αυξάνεται με τον καιρό στην καλλιέργεια. Τα διεισδυτικά ανθρώπινα CTBs του πρώτου τριμήνου συνθέτουν έναν αριθμό MMPs δείχνοντας την δραστηριότητα διάσπασης της ECM in vitro. Μόνο μερικές από αυτές τις μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν βρεθεί σε μη-εισχωρητικά κύτταρα στα τέλη της κύησης. Μεταξύ της κολλαγενάσης τύπου IV, η 72000 τζελατινάση (gelatinase A ή MMP-2) παράγεται από μη-διεισδυτικούς ινοβλάστες, ενώ η 92000 τζελατινάση (gelatinase B ή MMP-9) είναι μοναδική στα CTBs και κρίσιμη για την εισχώρηση. Μερικά δεδομένα φανερώνουν πως οι MMP-2 και MMP-9, των οποίων mRNAs εκφράζονται και τα δύο από τα EVT κύτταρα in situ, είναι σημαντικοί μεσολαβητές για την τροφοβλαστική εισχώρηση. Η ενεργοποίηση της προMMP-2 συμβαίνει στην επιφάνεια των τροφοβλαστών και απαιτούν την συμμετοχή μίας ενεργά μεμβρανικού τύπου (MT)-MMP, την MT1-MMP. Η MT1-MMP και η διάμεση κολλαγενάση, MMP-1, εκφράζονται επίσης από τα ανθρώπινα τροφοβλαστικά κύτταρα. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας μεταλλοπρωτεϊνών, η στρωμελυσίνη-3 εκφράζεται στις συγκυτιοτροφοβλάστες των λαχνών που επιπλέουν και στα ανθρώπινα EVT κύτταρα που διεισδύουν της άπω περιοχές του φθαρτού και εκφράζουν α1β1 ιντεγκρίνες.

## 2)Ενεργοποιητές πλασμινογόνου:

Οι ανθρώπινες καλλιεργούμενες κυτταροτροφοβλάστες είναι ικανές να εκκρίνουν μία πρωτεάση σερίνης, ουροκινάσης τύπου ενεργοποιητή πλασμινογόνου (uPA), το οποίο μπορεί να συνεισφέρει άμεσα στην διάλυση της στρωματικής ECM ή μπορεί να δρά ως μέρος ενός καταρράκτη πρωτεασών. Όντως, μόλις ενεργοποιηθεί από την uPA, η πλασμίνη που προέρχεται από το κυτταρικά συνδεδεμένο πλασμινογόνο, μετατρέπεται σε δραστική πρωτεάση. Ακολούθως η πλασμίνη μπορεί να ενεργοποιήσει την διάμεση προκολλαγενάση (προ-MMP1), την προτζελατινάση Β (προ-MMP9) και την προMT1-MMP. Στη συνέχεια, η MT-MMP επάγει την ειδική ενεργοποίηση της προτζελατινάσης Α. Τα ανθρώπινα καλλιεργούμενα τροφοβλαστικά κύτταρα επίσης εκφράζουν υποδοχείς uPA, οι οποίοι δεσμεύοντας uPA, προκαλούν την δραστηριότητα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου στην επιφάνεια των τροφοβλαστικών κυττάρων. Πολωμένη έκφραση των uPA υποδοχέων έχει εντοπισθεί στο άκρο κατεύθυνσης των ματαναστευτικών EVT κυττάρων όπου οι υποδοχείς μπορεί να κατευθύνουν την τροφοβλαστική μετανάστευση. Οι υποδοχείς ουροκινάσης εκφράζονται επίσης στην κορυφαία επιφάνεια των λαχνωτών τροφοβλαστών όπου μπορεί να διευκολύνουν την παραγωγή της πλασμίνης και περιορίζει την κατάθεση της φιβρίνης στις εσωτερικά λαχνωτές κοιλότητες. Επιπλέον, ανοσοενεργό uPA και καταστολείς του PA συστήματος, καταστολείς του ενεργοποιητή πλασμινογόνου PAI-1 και -2, εμφανίζονται στα πρώιμα σημεία ανθρώπινης εμφύτευσης, και πιο συγκεκριμένα στα διεισδυτικά EVT κύτταρα και στις συγκυτιοτροφοβλάστες. Στην πρόσληψη και στην διάσπαση των συμπλεγμάτων uPA/PAI-1 μπορεί να μεσολαβεί η πρωτεΐνη που σχετίζεται με υποδοχείς LDL (low density lipoproteins), η οποία αφαιρεί τα συμπλέγματα ανενεργών πρωτεϊνών από την επιφάνεια τροφοβλάστης και επιτρέπει στην τροφοβλάστη να συνεχίσει την εισχώρηση.



Εικόνα 28: Ο καταρράκτης πρωτεϊνών που εμπλέκεται στην εισχώρηση τροφοβλάστης. Το uPA της τροφοβλάστης ενεργοποιεί την πλασμίνη η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί απευθείας τις MMP-1, MMP-9 και MT1-MMP. Ακολούθως η MT1-MMP ενεργοποιεί την MMP2. Η \*στρωμελυσίνη 3 και ο uPA επίσης εκφράζονται στην συγκυτιοτροφοβλάστη.

#### 4.3.4) Παράγοντες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό και την εισχώρηση της τροφοβλάστης:

Οι αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και τα πεπτίδια είναι πιθανόν να παίζουν έναν σημαντικό ρόλο επιδρώντας στον πολλαπλασιασμό/διαφοροποίηση τροφοβλάστης και/ή στην απόκτηση διεισδυτικού φαινοτύπου, μέσω των υποδοχέων τους και/ή των πρωτεϊνών που προσδένουν. Ο πολλαπλασιασμός της τροφοβλάστης διεγείρεται από αρκετούς αυξητικούς παράγοντες:

##### 1) Προδέτες του EGF-υποδοχέα:

Οι EGF, TGF- $\alpha$  και η amphiregulin έχουν βρεθεί να προωθούν τον πολλαπλασιασμό των EVT κυττάρων σε καλλιέργεια δίχως να επηρεάζουν την διεισδυτικότητα των EVT in vitro. Βασικά, αυτοί ρυθμίζουν θετικά τα mRNAs σε παρόμοια επίπεδα και της τζελατινάσης A (MMP-2) και του ιστικού καταστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMP-1. Πρέπει να σημειωθεί πως χρησιμοποιώντας φρέσκα απομονωμένα CTBs πρώτου τριμήνου, παρατηρείται μία διαφορετική ανταπόκριση του EGF, με μορφολογικές αλλαγές και μία σημαντική αύξηση σε Matrigel διείσδυση. Η ομάδα Morrish et. al., χρησιμοποιώντας CTBs, ανέφερε την EGF επαγωγή της διαφοροποίησης εντός της συγκυτιοτροφοβλάστης με μία ταυτόχρονη αύξηση της hCG και της hPL (human placental lactogen).

##### 2) CSF-1:

Όπως οι EGF και TGF- $\alpha$ , έτσι και ο CSF-1 προωθεί τον πολλαπλασιασμό και διεγείρει μία ισορροπημένη αύξηση στην παραγωγή των mRNAs της τζελατινάσης A (MMP-2) και του TIMP-1 από τα EVT κύτταρα σε καλλιέργεια. Η έκφραση του CSF-1 υποδοχέα (c-fms) in situ έχει εντοπισθεί σε στήλες EVT κυττάρων.

##### 3) VEGF:

Πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν πως ο VEGF παράγοντας που συνθέτεται από τα φθαρτοποιημένα μακροφάγα προωθεί τον πολλαπλασιασμό των EVT κυττάρων που εκφράζουν τόσο το mRNA όσο και την πρωτεΐνη του υποδοχέα, VEGF-R (flt).

##### 4) IGF-1:

Ο IGF-1 έχει να αναφερθεί για τις προωθούμενες δράσεις αύξησης του στις πρώιμες λαχνωτές τροφοβλάστες.

Η διείσδυση διεγείρεται από άλλους παράγοντες:

##### 1) IGF-II και IGFBP-1:

Η θεραπεία με IGF-II δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των EVT κυττάρων σε καλλιέργεια, αλλά ενισχύει την τροφοβλαστική διεισδυτικότητα. Ο IGF-II εκφράζεται κυρίως από ότι ο IGF-I στον ανθρώπινο πλακούντα και έχει βρεθεί μόνο στα κύτταρα εμβρυϊκής προέλευσης. Τα επίπεδα μεταγραφής του IGF-II είναι υψηλότερα στο μπροστινό διεισδυτικό άκρο της τροφοβλαστικής στήλης. Ο IGF-II προσδένεται σε συγκεκριμένους επιφανειακούς υποδοχείς (τύπου 1 και 2) των τροφοβλαστικών μεμβρανών και επίσης σε μία οικογένεια προσδετικών πρωτεϊνών (Bps). Ο IGFBP-1 φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος των IGFBP και συνθέτεται από τον μητρικό φθαρτό. Η  $\alpha 5\beta 1$  ιντεγκρίνη εμπλέκται στην δράση του IGFBP-1, ο οποίος μαζί με τον IGF-II, διεγείρει την μετανάστευση και εισχώρηση των EVT κυττάρων του πρώτου τριμήνου.

## 2) Ιντερλευκίνη 1β:

Η IL-1 επίσης ρυθμίζει την δραστικότητα και διείσδυση της ανθρώπινης τροφοβλάστης *in vitro*. Διεγείρει την παραγωγή της MMP-9 από τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, ενώ τα γλυκοκορτικοειδή την αναστέλλουν.

## 3) Ενδοθηλίνη-1:

Ένα πεπτίδιο, ET-1, παρακινεί την διείσδυση της τροφοβλάστης πρώτου τριμήνου ειδικά μέσω του Β-τύπου υποδοχέα. Η δράση του στον πολλαπλασιασμό μεσολαβείται τόσο από τον ETα όσο και από τον ETβ υπότυπο του υποδοχέα.

### 4.3.5) Περιοριστικοί παράγοντες της διείσδυσης:

Η διείσδυση ρυθμίζεται στενά μέσα στο μικροπεριβάλλον από ουσίες προερχόμενες από τα φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα, την ίδια την τροφοβλάστη και συστατικά της ECM. Όσον αφορά τους φθαρτοποιημένους παράγοντες, δεδομένα αποδεικνύουν πως το ενδομήτριο ελέγχει την υπερβολική διείσδυση της τροφοβλάστης μέσω της αντίδρασης φθαρτοποίησης. Όντως, στις ανθρώπινες παθολογίες όπως προσκόλληση πλακούντα στο μυομήτριο (placenta accreta) και έκτοπες κύσεις, η φτωχή φθαρτοποίηση σχετίζεται με ένα υψηλό βαθμό τροφοβλαστικής διείσδυσης. Στα είδη όπου δεν υπάρχει ρήξη μητρικού επιθηλίου, δεν υπάρχει φθαρτοποίηση ενδομητρίου. Στους ανθρώπους, η φθαρτοποίηση είναι εκτενής, συμβαίνοντας σε ολόκληρο το στρώμα, ενώ στους αρουραίους, στα ποντίκια και σε μερικά μη-ανθρωποειδή πρωτεύοντα, εντοπίζεται περισσότερο στην περιοχή του εμφυτευμένου εμβρύου. Επιπλέον, στους αρουραίους και στα ποντίκια, όπου η φθαρτοποίηση συμβαίνει νωρίς στην εμφύτευση, η τροφοβλαστική διείσδυση είναι λιγότερο εκτενής από ότι στους ανθρώπους, όπου η φθαρτοποίηση γίνεται αισθητή αργότερα. Ο φθαρτός εκκρίνει παράγοντες όπως TIMPs, TGF-β και LIF που εμπλέκονται στον έλεγχο της εισχώρησης.

## 1) TIMPs:

Δύο φυσικοί καταστολείς πρωτεϊνών, ο TIMP-1 και ο -2, έχουν βρεθεί να καταστέλλουν πλήρως την διείσδυση *in vitro* σχηματίζοντας συμπλέγματα με τις ενεργές μορφές των κολλαγονάσων. Και οι δύο αυτοί καταστολείς εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Επίσης, η έκφραση του mRNA του TIMP-3 παρατηρήθηκε σε *in vitro* καλλιεργούμενα ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα υπό την παρουσία προγεστερόνης και στα μητρικά φθαρτοποιημένα κύτταρα *in situ*.

## 2) TGF-β:

Αυτός ο πολυλειτουργικός αυξητικός παράγοντας εκφράζεται μέσω του φθαρτού στην εμβρύου-μήτρας διεπαφή από το πρώτο τρίμηνο μέχρι το τέλος της κύησης. Ο φθαρτοποιήμενος TGF-β παράγοντας φαίνεται να απελευθερώνεται κυρίως με την λανθάνουσα μορφή του και μπορεί να εωεργοποιηθεί μέσω της πλασμίνης ή της καθεψίνης D. Ο TGF-β μπλοκάρει τόσο τον πολλαπλασιασμό τροφοβλάστης όσο και την διείσδυση της : α) καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων EVT κυττάρων του πρώτου τριμήνου σε καλλιέργεια και επάγει την διαφοροποίηση τους σε μη-διεισδυτικά πολυπύρρηνα κύτταρα που πιθανώς είναι τα αντίστοιχα των μεγάλων κυττάρων (giant cells) του πλακουντιακού κρεβατιού των ποντικών. β) ο TGF-β παρεμποδίζει την τροφοβλαστική διείσδυση μέσω αρκετών μηχανισμών: i) καταστέλλει την παραγωγή της πρωτεϊνάσης σερίνης, uPA και επάγει την έκφραση του PAI-1 καταστολέα. Επίσης επάγει την έκφραση του TIMP-1 τόσο στον φθαρτό όσο και στην τροφοβλάστη, καταστέλλοντας τις μεταλλοπρωτεϊνάσες τους. ii) μειώνει την μετανάστευση των EVT. Αυτή η μείωση συνδέεται με την υπερέκφραση της α5β1 ιντεγκρίνης (ένας υποδοχέας φιβρονεκτίνης) που καθιστά την

τροφοβλάστη πιο προσκολλητική στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και έτσι μπλοκάρει την πρόοδο της τροφοβλάστης και iii) ενισχύει τον σχηματισμό των συστατικών της ECM, και πιο συγκεκριμένα του κολλαγόνου και της φιβρονεκτίνης και διεγείρει την τροφοβλαστική ογκοεμβρυική φιβρονεκτίνη *in vitro*, η οποία προωθεί την αγκυροβόληση της τροφοβλάστης στον μητρικό τοίχο.

### 3) LIF:

Αυτή η κυτοκίνη έχει επίσης αναφερθεί να μειώνει την δραστικότητα πρωτεϊνάσης της τροφοβλάστης.

Όσον αφορά τους τροφοβλαστικούς παράγοντες, γνωρίζουμε πως οι τροφοβλάστες μπορούν να αυτορυθμίζουν την διεισδυτικότητα τους εκφράζοντας αρκετούς καταστολείς πρωτεασών:

#### 1) TIMP-3:

Συναντάται η έκφραση του mRNA του TIMP-3 στα EVT κύτταρα που έχουν εισχωρήσει στον μητρικό φθαρτό, όπου αυτός ο καταστολέας μεταλλοπρωτεασών περιορίζει την διάσπαση της ECM.

#### 2) TGF-β :

Ο TGF-β επίσης παράγεται σε μικρότερη έκταση, από τα EVT κύτταρα και απελευθερώνεται στην ενεργή μορφή του. Είναι παρών καθόλη τη διάρκεια της κύησης στην λαχνωτή συγκυτιοτροφοβλάστη και στα EVT κύτταρα του κυτταροτροφοβλαστικού κελύφους, όπου μπορεί να παίζει έναν αυτοκρινή ρόλο στην παρεμπόδιση της διείσδυσης.

#### 3) hCG:

Μέσω της κατασταλτικής δράσης στην δραστικότητα των κολλαγενασών, η hCG μπορεί να καθυστερεί την εισχώρηση των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Όσον αφορά τα συστατικά της ECM παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης. Οι λειτουργίες των τροφοβλαστικών κυττάρων μπορούν να τροποποιούνται από τις αλληλεπιδράσεις τους με την ECM. Δεσμεύοντας την λαμινίνη έχει αναφερθεί πως διεγείρεται η δραστικότητα της κολλαγενάσης τύπου IV της τροφοβλάστης, ενώ η δέσμευση της φιβρονεκτίνης από την α5β1 ιντεγκρίνη διευκολύνει την μετανάστευση των EVT κυττάρων. Μερικά συστατικά της ECM μπορούν και προσδέονται και/ή αποθηκεύουν έναν αριθμό ρυθμιστικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η ντεκορίνη, μία πρωτεογλυκάνη της ECM, μπορεί να προσδέσει και να ενεργοποιήσει τον TGF-β. Η ντεκορίνη επίσης μπορεί να αποθηκεύσει και να παρουσιάσει αυτόν τον ρυθμιστικό παράγοντα στο uPA για ενεργοποίηση.

#### 4.3.6) Παράγοντες που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις:

Σε μελέτες με ζώα έχει δείχθει πως στο σημείο της εμφύτευσης, οίδημα και μία αύξηση στην αγγειακή διαπερατότητα είναι σημάδια τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης που προετοιμάζει το μέρος του ενδομητρίου για εμφύτευση. Στους ανθρώπους, δεν υπάρχει καμία φλεγμονώδης ανταπόκριση στο σπερματικό υγρό και αξιοσημείωτα μικρή ιστική καταστροφή και νέκρωση που συνοδεύουν τα πρώιμα στάδια της εμφύτευσης. Ωστόσο, η αγγειογένεση και η μεγέθυνση των φθαρτοποιημένων αιμοφόρων αγγείων έχουν παρατηρηθεί, κυρίως γύρω στο σημείο της εμφύτευσης. Επίσης, φλεγμονώδεις μεσολαβητές με δραστικές αγγειοενεργές ιδιότητες, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, MMPs και στρατολόγηση λευκοκυττάρων έχουν βρεθεί στο πρώιμο φθαρτό και μπορεί να εμπλέκονται στην φλεγμονώδη αντίδραση.

### 1)Φλεγμονώδεις μεσολαβητές: PAF και προσταγλανδίνη E2:

Στους ανθρώπους, ο PAF που προέρχεται από το έμβρυο ή τα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα φαίνεται να συνεισφέρει στην φλεγμονώδη διαδικασία στο ενδομήτριο είτε άμεσα μέσω ισχυρής αγγειοδιασταλτικής δραστηριότητας είτε έμμεσα αυξάνοντας την τοπική απελευθέρωση της PGE2 από το εκκριτικό ενδομήτριο. Η PGE2 μπορεί να προκαλέσει αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στο σημείο αυτό και φαίνεται να παίζει ένα κρίσιμο ρόλο. Όντως, η καταστολή μέσω ινδομεθακίνης του μονοπατιού της κυκλοοξυγενάσης εμπλέκεται στην σύνθεση των προστανοειδών (προσταγλανδινών και θρομβοξανών) μειώνοντας τον ρυθμό εμφύτευσης στα ποντίκια.

### 2)Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες:

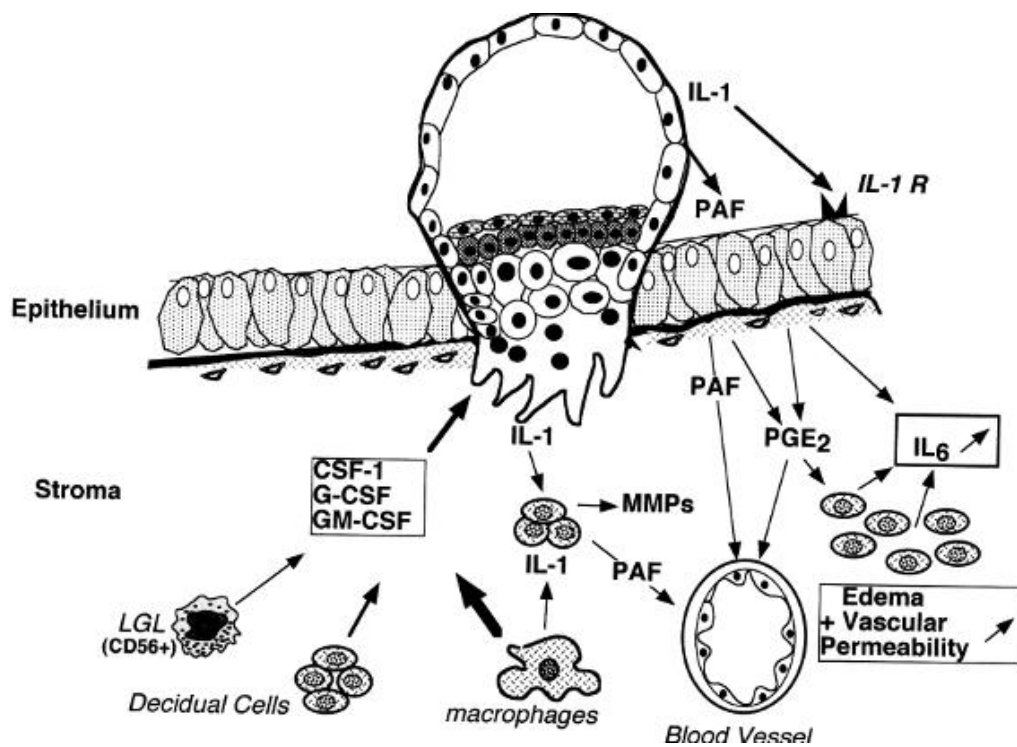
Οι κυτοκίνες και πιο συγκεκριμένα οι IL-1 και IL-6, εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Στο ποντίκι, η εμφύτευση προκαλεί μία οξεία φλεγμονώδη αντίδραση με μητρική παραγωγή των IL-1, IL-6 και TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) παραγόντων. Η μέγιστη παραγωγή της IL-1 συμπίπτει με την κορυφή της οιστραδιόλης που συμβαίνει την στιγμή της εμφύτευσης την 5η με 6η ημέρα. Η δραστηριότητα της IL-6 είναι υψηλότερη την 5η και 6η ημέρα ενώ η αντίστοιχη του TNF- $\alpha$  αφορά την 8η ημέρα. Στο ποντίκι, το μπλοκάρισμα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 με έναν ανταγωνιστή αποτρέπει την εμφύτευση της βλαστοκύστης παρεμβαίνοντας στην διαδικασία της προσκόλλησης. Στους ανθρώπους, η IL-1 εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με τα ενδομητρικά αδενικά επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα τύπου I της IL-1 στην ωχρινική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Τα ενδομητρικά επιθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται in vitro στην ανασυνδυασμένη IL-1 αυξάνοντας την παραγωγή της PGE2 και στην έκφραση ενός αντιγόνου κλάσης II MHC, HLA-DR. Η IL-1 έχει επίσης δειχθεί να διεγείρει την έκφραση της IL-6 στα ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα.

### 3)Matrix metalloproteinases:

Οι MMPs επίσης εκκρίνονται από τα ενδομητρικά κύτταρα και εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ενδομητρικών ιστών. Τα ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα σε πρώιμες καλλιέργειες εκκρίνουν MMP-1, MMP-3 και δύο τζελατινάσες (MMP-2 και -9). Η παραγωγή των MMP-1, -3 και -9 (αλλά όχι της MMP-2) διεγείρεται τόσο από την IL-1 $\alpha$  όσο και από τον TNF- $\alpha$ .

### 4)Στρατολόγηση λευκοκυττάρων:

Η φάση έναρξης της εμφύτευσης συνοδεύεται από διείσδυση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών, στον φθαρτό. Υπάρχει μία συσσώρευση από τελεστές έμφυτων ανοσοποιητικών απαντήσεων όπως τα μητρικά NK κύτταρα και τα μακροφάγα στην διεπαφή εμβρύου-μήτρας, ενώ υπάρχει ένας μικρός αριθμός από T κύτταρα και ουσιαστικά καθόλου B κύτταρα ή κοκκιοκύτταρα. Στην όψιμη εκκριτική φάση και στην πρώιμη εγκυμοσύνη, μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα (LGLs) με χαρακτηριστικό CD56+ CD16+ φαινότυπο που παρουσιάζεται σε μεγάλες ποσότητες στον φθαρτό που παραθέτεται κοντά στην διεισδυτική τροφοβλάστη που εκφράζει την μη-συμβατική τάξη I του HLA-G αντιγόνου. Το HLA-G αντιγόνο μπορεί να αλληλεπιδρά με τα μητρικά CD65+ NK κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς για το HLA-G αντιγόνο και μπορούν να προστατεύσουν τις κυτταροτροφοβλάστες από την κυτταρόλυση μέσω των φυσικών φονικών κυττάρων.



Εικόνα 29: Απεικόνιση των φλεγμονώδεις και ανοσοποιητικών αντιδράσεων στο σημείο της εμφύτευσης. Το οίδημα και η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας προκαλούνται από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), προσταγλανδίνη E2 (PGE2) και προ-φλεγμονώδεις IL-1 και IL-6. Οι colony-stimulating παράγοντες (CSF-1, G-CSF και GM-CSF) εκφράζονται κυρίως από φθαρτοποιημένα κύτταρα, μακροφάγα και LGLs.

#### 4.3.7) Κυτοκίνες και η ανοσοποιητική αντίδραση:

Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, η επιβίωση των ημι-αλλογενών εμβρύων συμβαίνει σε ένα ανοσολογικά ρυθμιζόμενο σημείο, την μήτρα. Σύμφωνα με την υπόθεση του Wegman, μία κατάλληλη ανοσοποιητική απάντηση μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας μέσω τοπικής παραγωγής κυτοκινών, όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας μακροφάγων γνωστός ως CSF-1, ο GM-CSF (ο αυξητικός παράγοντας τόσο των μακροφάγων όσο και των κοκκιοκυττάρων) και η IL-3 (στο ποντίκι), οι οποίες προωθούν την αύξηση ή/και την διαφοροποίηση της τροφοβλάστης.

##### 1) Colony- stimulating factors:

Οι CSF-1, GM-CSF και G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) παράγοντες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στην επαφή μεταξύ εμβρύου-μήτρας, κυρίως από τα φθαρτοποιημένα κύτταρα, τα μακροφάγα και τα φθαρτοποιημένα LGLs:

α) CSF-1: Η έκφραση του CSF-1 στον ανθρώπινο φθαρτό και πλακούντα είναι υψηλή το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης από ότι στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο. Έχει εντοπισθεί ανοσοιστοχημικά στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των ενδομητρικών αιμοφόρων αγγείων και στις λάχνες και κυτταρικές στήλες των CTBs. Η ανάλυση των πλακουντιακών και φθαρτοποιημένων κυτταρικών πληθυσμών του πρώτου τριμήνου έδειξε πως ο περισσότερος CSF-1 που βρίσκεται στην μητρική πλακουντιακή επιφάνεια εμφανίζεται να παράγεται από τα φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα και τα φθαρτοποιημένα LGLs. Η σύνθεση του CSF-1 μπορεί να ρυθμίζεται από ωοθηκικά στεροειδή (όπως και στα ποντίκια) και από την IL-2. Η έκφραση του CSF-1 υποδοχέα (c-fms) από τοποθετημένα σε κυτταρικές στήλες EVT κύτταρα, από εμβρυικά (Hofbauer cells) κύτταρα και από φθαρτοποιημένα μακροφάγα είναι συνεπής με τον ρόλο του CSF-1 στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση αυτών των EVT κυττάρων όπως και στις λειτουργίες τόσο των εμβρυικών όσο και των φθαρτοποιημένων μακροφάγων.



β) GM-CSF: Μία διαφορετική κυτταρική σειρά είναι γνωστό πως παράγει GM-CSF. Στο ποντίκι, το επιθήλιο είναι η κύρια πηγή των GM-CSF, η παραγωγή του οποίου διεγείρεται από σπερματικούς παράγοντες και ρυθμίζεται από οιστρογόνα, βακτηριακά LPS (lipopolysaccharide) και IFN- $\gamma$ . In vivo, ο GM-CSF αποκαταστά φυσιολογική κύηση στα CBA/JxDBA/2 ζευγαρωμένα ποντίκια που επιδεικνύουν ένα υψηλό ποσοστό αυθόρμητων αμβλώσεων. In vitro, ο GM-CSF είναι ικανός να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό εκτοπλακουντιακού κώνου.

Στους ανθρώπους στο πρώτο τρίμηνο κύησης, φθαρτοποιημένα LGLs είναι βασική πηγή αυτής της κυτοκίνης. Η συν-καλλιέργεια με φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα ή η διέγερση με κυτοκίνες (IL-1 ή κυρίως IL-2) αυξάνει την έκκριση της GM-CSF από LGLs. Η GM-CSF επίσης ανιχνεύεται σε τροφοβλαστικές καλλιέργειες πρώτου τριμήνου. Επομένως, δεδομένου πως ο υποδοχέας της εκφράζεται από όλους τους τροφοβλαστικούς πληθυσμούς, η GM-CSF μπορεί να δρά στην πλακουντιακή αύξηση και ανάπτυξη τόσο με παρακρινή όσο και με αυτοκρινή τρόπο. Τόσο τα μητρικά όσο και τα εμβρυικά μακροφάγα είναι πιθανοί στόχοι της GM-CSF όπως και της CSF-1. Οι GM-CSF και CSF-1 μπορεί να δρουν συνεργικά.

γ) G-CSF: Στην ανθρώπινη μήτρα, η G-CSF έχει δειχθεί να παράγεται από τα μητρικά φθαρτοποιημένα LGLs και μακροφάγα.

δ) Stem cell factor (γνωστός και ως kit ligand ή KL): Ο KL παράγεται από τα EVT και οι στόχοι του είναι τα φθαρτοποιημένα μακροφάγα, τα εμβρυικά Hofbauer κύτταρα και ένα υποσύνολο φθαρτοποιημένων NK κυττάρων.

## 2) Έκκριση T-βοηθητικού τύπου 2 κυτοκινών:

Στον φθαρτό ποντικού, η παραγωγή των T-βοηθητικών τύπου 2 (Th2) κυτοκινών (IL-4, IL-5 και IL-10) προτιμάται από την παραγωγή των Th1 κυτοκινών (IL-2, IFN- $\gamma$  και λεμφοτοξίνης). Η επιτυχής εγυμωσύνη στα ποντίκια συνδέεται με την αλλαγή από την κυρίαρχη Th1- καθοδηγούμενη κυτταρική ανοσία στην κυρίαρχη Th2-κατευθυνόμενη χυμική ανοσία. Στους ανθρώπους, ένα κυρίαρχο προφίλ της Th1 κυτοκίνης έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αυθόρμητων αμβλώσεων.

## 3) Ρύθμιση της έκκρισης της hCG από κυτοκίνες:

Η παραγωγή και απελευθέρωση της πλακουντιακής χοριακής γοναδοτροφίνης έχει αναφερθεί πως ρυθμίζεται από ορμόνες (γοναδοτρόπος ορμόνη/GnRH και γοναδικά στεροειδή) όπως και από τροφοβλαστικά-προερχόμενες κυτοκίνες όπως είναι η IL-6, η LIF και η IFN- $\alpha$ . Η IL-1 ρυθμίζει την απελευθέρωση της hCG ενεργοποιώντας την παραγωγή της IL-6 και του σηματοδοτικού μεταγωγικού μονοπατιού που μεσολαβείται ο IL-6 υποδοχέας, έτσι όπως έχει αποδειχθεί στις ανθρώπινες τροφοβλάστες πρώτου τριμήνου. Ο φθαρτοποιημένος ιστός σε καλλιέργεια παράγει την LIF η οποία παίζει παρόμοιο ρόλο με αυτόν της IL-6, διεγείροντας την παραγωγή της hCG από του πρώτου τριμήνου τροφοβλάστες. Η IFN- $\alpha$  είναι επίσης ικανή να επάγει την παραγωγή της hCG in vitro.

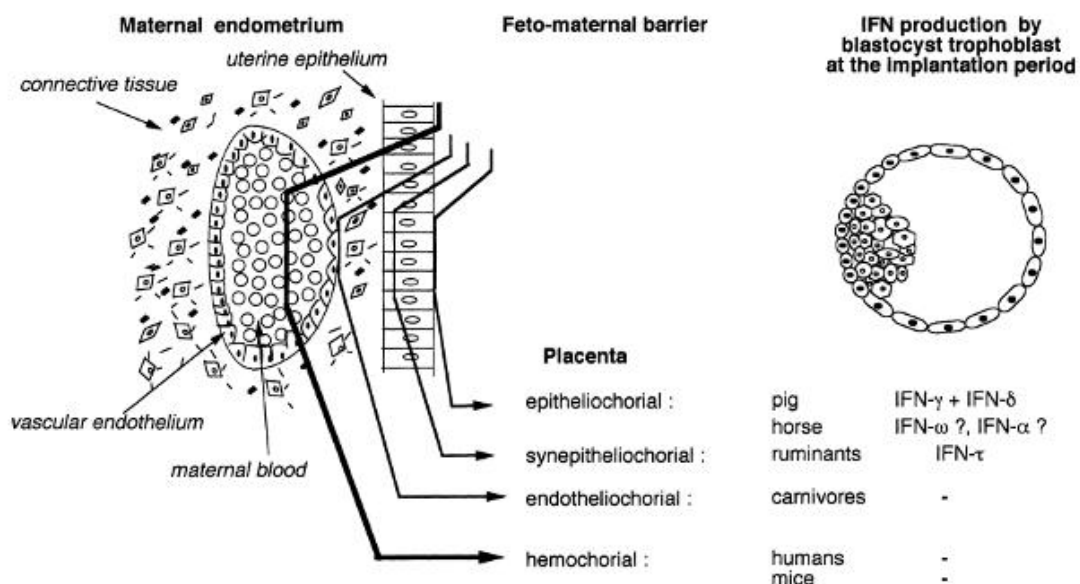
## 4) Ιντερφερόνες:

Κατά την διάρκεια περιόδου μετά την εμφύτευση, έχει αποδειχθεί μία αυθαίρετη έκφραση της IFN στην τροφοβλάστη, αλλά μόνο σε είδη που παρουσιάζουν μη διεισδυτικού πλακούντα. Ωστόσο, η φύση και ο συγχρονισμός της έκφρασης της IFN διαφέρει ελαφρώς αναλόγως τα είδη. Μετά την φάση επιμήκυνσης, κατά την περιεμφυτευτική περίοδο, η τροφοβλάστη γουρουνιού παράγει INF- $\gamma$  σε μεγάλες ποσότητες όπως και INF τύπου I μίας καινούργιας οικογένειας, γνωστή ως INF- $\delta$ . Στο γουρούνι, η τροφοβλάστη δεν εισχωρεί μέσα στο μητρικό επιθήλιο και ο πλακούντας είναι επιθηλιακοχοριακός. Στο άλογο, ο πλακούντας είναι επίσης επιθηλιακοχοριακός, με ενδομητρικές κοιλότητες. Στα ιππικά είδη, μία μη ακόμη αναγνωρισμένη IFN που παράγεται από το αναπτυσσόμενο έμβρυο στο προεμφυτευτικό στάδιο ακολουθείται από την παραγωγή του TGF- $\beta$

στο ενδομήτριο την στιγμή της εμφύτευσης γύρω στην 33η ημέρα. Στα μηρυκαστικά, όπου υπάρχει μία τήξη μεταξύ μητρικής και χοριακού επιθηλίου στους πλακούντες, η INF-τ εκφράζεται κατά την επέκταση και επιμήκυνση της βλαστοκύστης. Τότε η έκφραση της INF-τ μειώνεται με την προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και εμφανίζεται η έκκριση του TGF-β. Επιπρόσθετα των γνωστών αντιωχρινολυτικών ιδιοτήτων, η INF-τ είναι επίσης ικανή να καταστείλλει την έκφραση της προMMP-1 και προMMP-3 σε καλλιεργούμενα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα προβάτου.

Δεν υπάρχει καμία πρόσφατη απόδειξη για την σημασία της IFN παραγωγής από την βλαστοκύστη πριν την εμφύτευση στους ανθρώπους ή στα ποντίκια, δηλαδή σε είδη που η εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη εισβάλλει ραγδαία στο ενδομήτριο.

Ωστόσο, από το πρώτο τρίμηνο της κύησης μέχρι τα τέλη, έχουν βρεθεί οι IFNs τύπου 1 στους ανθρώπους και στα ποντίκια. Στον ανθρώπινο πλακούντα, έχουν δείχθει τα IFN-α like μετάγραφα που σχετίζονται με τις λειτουργικές IFN-α πρωτείνες. Επιπλέον, το mRNA της IFN-α, βρέθηκε 70% και 89% ομολογία με την IFN-α και IFN-ω προβάτου, αντίστοιχα, αλλά με μόνο 62% ομολογία με την ανθρώπινη IFN-ω που εκφράζεται κυρίως από τα CTBs και την συγκυτιοτροφοβλάστη κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου εγκυμοσύνης. Αυτές οι IFNs φαίνεται να εκφράζονται στην απουσία οποιασδήποτε φαινομενικής επαγωγής. Υποθέτουμε πως μπορούν να επαχθούν από ενδογενείς ρετροϊούς που εκφράζονται επιλεκτικά στο βασικό σύνορο της συγκυτιοτροφοβλάστης. Στην παρούσα φάση, ο ρόλος των IFNs κατά την διάρκεια της κύησης δεν είναι ακόμη γνωστός. Αυτές οι πρωτείνες είναι δυνητικά ανοσοκατασταλτικές, δεδομένου πως η INF-α καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων ως απάντηση στην δράση της IL-2. Ο ρόλος της INF τύπου I στην αντική άμυνα είναι απαραίτητη, αφού μπορεί να παρατηρηθεί σε υψηλή ευαισθησία σε ιικές μολύνσεις σε ομόζυγα ποντίκια που έχουν έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα της IFN τύπου I. Επιπλέον, η έκφραση της IFN-α φαίνεται να σχετίζεται με διαδικασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης εφόσον η INF-α έχει αποδειχθεί να παράγεται αυθαιρέτα σε ποικίλα εμβρυικά επιθήλια κατά την ανάπτυξη ποντικών. <sup>(9)</sup>



Εικόνα 30: Απλοποιημένη αναπαράσταση του εμβρύου – μητέρας φραγμού σε διαφορετικά είδη και συγκριτική παραγωγή της IFN στην περιεμφυτευτική περίοδο. Ο τύπος I των IFNs περιλαμβάνει την IFN-α, IFN-ω, IFN-τ και IFN-δ. Ο τύπος II της IFN αναπαριστάται από την IFN-γ.

#### *4.4) Ιοντικά κανάλια στο ενδομήτριο και η συμμετοχή τους στην διαδικασία της εμφύτευσης:*

Τα ιοντικά κανάλια είναι μία ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που επιτρέπουν ιόντα να εισέλθουν εντός κυτταρικών μεμβρανών ή μεμβρανών οργανιδίων. Τα ιόντα που ρέουν μέσω ιοντικών καναλιών μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές ή οργανικές αλλαγές στην μεμβρανική δυναμική, στις ιοντικές κλίσεις, στο pH και σε δευτερεύοντα μηνύματα σηματοδότησης. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα ιοντικά κανάλια απαραίτητα για πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως μετάδοση νευρωνικών σημάτων, μυική σύσπαση, ρύθμιση κυτταρικού όγκου, οξεοβασική ομοιόσταση και επιθηλιακή έκκριση/επαναρρόφηση, όπως και κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απόπτωση και μετανάστευση, που σχετίζονται συγκεκριμένα με την ανάπτυξη καρκίνου. Η περιπλοκή των ιοντικών καναλιών σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες αντανακλάται από την στενή ρύθμιση τους από ένα ευρύ φάσμα ορμονών, συμπεριλαμβανομένων ωθηθικών ορμονών, προγεστερόνη και οιστραδιόλη, και αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, η πύλη των ιοντικών καναλιών είναι δυναμική και υποτάσσεται σε μία ποικιλία ερεθισμάτων όπως εκπολώσεις μεμβρανών, μηχανικές πιέσεις, θερμοκρασία και χημικά στοιχεία, που επιτρέπουν στα ιοντικά κανάλια να ανιχνεύσουν μία ποικιλία εξωκυτταρικών ή ενδοκυτταρικών σημάτων, και μεταγόνται σε ποικίλες κυτταρικές απαντήσεις. Δεδομένου των πολύπλευρων ρόλων και την μεμβρανική τοποθεσία τους, τα ιοντικά κανάλια συχνά θεωρούνται ιδανικοί φαρμακευτικοί στόχοι.

Ένας αριθμός ιοντικών καναλιών έχει ανακαλυφθεί στο ενδομήτριο τόσο στο επιθήλιο όσο και στο στρώμα. Ενώ οι μελέτες για τα ενδομητρικά ιοντικά κανάλια είναι ακόμη περιορισμένα, οι αποδείξεις που έχουν συλλεχθεί μέχρι σήμερα, αποκαλύπτουν σημαντικούς ρόλους των ιοντικών καναλιών, κυρίως αυτών στο ενδομητρικό επιθήλιο που ρυθμίζουν την ενδομητρική δεκτικότητα και την εμβρυική εμφύτευση. Παρακάτω περιγράφονται αυτά τα δεδομένα και γίνεται μία προσπάθεια να συζητηθεί η σημασία των ιοντικών καναλιών στις παραπάνω διαδικασίες, ενώ άλλοι ιοντικοί μεταφορείς όπως μέλη της οικογένειας ανιοντικών μεταφορέων/εναλλακτών, SLC2 και SLC26, έχουν δείχθει στην διαδικασία της εμφύτευσης αλλά δεν θεωρούνται τυπικά ιοντικά κανάλια και θα αποκλειστούν από το παρακάτω κεφάλαιο.

##### *4.4.1) Κρίσιμα γεγονότα και παράγοντες που επηρεάζουν την ενδομητρική δεκτικότητα και εμβρυική εμφύτευση:*

Η εμφύτευση είναι μία διαδικασία που εγκαθιδρύεται από την πολύ στενή σύνδεση μεταξύ της βλαστοκύστης και του ενδομητρίου, που αρχίζει όταν η βλαστοκύστη παραθέτεται κοντά στο κορυφαίο επιθήλιο και ακολουθείται η προσκόλληση της σε αυτό. Στα είδη όπως στους ανθρώπους και στους αρουραίους, η βλαστοκύστη εισβάλλει αρκετά για να διαπεράσει το επιθήλιο μετά την προσκόλληση. Μία ποικιλία παραγόντων, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, μορφογόνα, κυτοκίνες μόρια προσκόλλησης, αυξητικούς παράγοντες και μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν δείχθει να παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της εμφύτευσης και έχουν περιγραφεί σε άλλα κεφάλαια. Εδώ συζητώνται τα κύρια γεγονότα και παράγοντες κατά την περίοδο μετά την εμφύτευση που έχουν αποδειχθεί ή πιθανώς σχετίζονται με τα ιοντικά κανάλια.

Μία προεμφυτευτική βλαστοκύστη είναι μικροσκοπική (<0.2mm σε διάμετρο στους ανθρώπους) συγκριτικά με την μητρική κοιλότητα. Σταθεροποιώντας την βλαστοκύστη στον μητρικό αυλό εγκαθιδρύοντας μία στενή επαφή με το ενδομήτριο θεωρείται αναγκαία προϋπόθεση για την εμφύτευση. Ο μητρικός αυλός περιέχει ηλεκτρολύτες/υγρό έχοντας ως βάση το νερό, ο όγκος του οποίου φαίνεται να διακυμαίνεται καθόλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου κάτω από την επιρροή ωθηθικών ορμονών. Στους ανθρώπους, έχει παρατηρηθεί μία σημαντική μείωση του μητρικού υγρού στην μέση εκκριτική φάση του κύκλου όταν το ενδομήτριο είναι δεκτικό για εμφύτευση. Παρομοίως στα τρωκτικά, ολόκληρος ο μητρικός αυλός εξαφανίζεται στην έναρξη της εμφύτευσης έχοντας ως αποτέλεσμα την παντελή παράθεση των αντικρουόμενων επιθηλιακών σειρών, γνωστή ως "lumen closure". Η μείωση του υγρού θεωρείται πως ελαχιστοποιεί την κίνηση της βλαστοκύστης και είναι ένα γεγονός-κλειδί για την εμφύτευση. Η σημασία του υγρού στον αυλό της μήτρας στον έλεγχο της εμφύτευσης στους ανθρώπους αποδεικνύεται από το γεγονός πως

στις ART κλινικές, ο όγκος του υγρού που μεταφέρεται μαζί με το έμβρυο στην μήτρα είναι περιορισμένο (20-40μL) για να εξασφαλιστεί μία επιτυχής εμφύτευση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως η συσσώρευση μητρικού υγρού χωρίς υδροσάλπιγγες ορατές με υπέρηχο κατά την διάρκεια κύκλων ART στους ανθρώπους μειώνει σημαντικό τον ρυθμό εγκυμοσύνης, προτείνοντας πως η εκκαθάριση από υπερβολικό μητρικό υγρό είναι απαραίτητο για την εμφύτευση.

Το μητρικό υγρό μπορεί να προέρχεται από περιτοναϊκό υγρό που ρέει εσωτερικά μέσω των σαλπίνγων εφόσον η απολίνωση των σαλπίνγων έδειξε να προκαλεί μία μείωση μητρικού υγρού από 113-180 σε 83-127μL στην μέση του κύκλου στους ανθρώπους. Ωστόσο, αυτό το ποσό ( 83-127μL) του υγρού που βρέθηκε στην μέση του κύκλου (την στιγμή της ωορρηξίας) μετά την απολίνωση σαλπίνγων ακόμη θεωρείται υψηλό από το μέσο επίπεδο (5-35μL) που φυσιολογικά υπάρχει στην μέση εκκριτική φάση (δεκτικό για εμφύτευση), προτείνοντας πως η μήτρα παίζει έναν ενεργό ρόλο στην δυναμική αλλαγή του όγκου μητρικού υγρού κατά τη διάρκεια του κύκλου. Όντως, στα τρωκτικά, κάτω από ορμονική επιρροή, μία κυρίαρχη επαναρρόφιση υγρού σε σχέση με την έκκριση από το ενδομητρικό επιθήλιο επάγει μία σημαντική μείωση του υγρού κατά την περιεμφυτευτική περίοδο. Όπως είναι ήδη γνωστό, η εκκριτική φάση του κύκλου στους ανθρώπους είναι η δεκτική φάση της εμφύτευσης, και αναφέρεται στην φάση όταν οι ενδομητρικοί αδένες εκκρίνουν γλυκογόνο, γλυκοπρωτεΐνες ή λιπίδια, ωστόσο το μητρικό υγρό μειώνεται από 113-180μL σε 5-35μL, προτείνοντας ένα δίκτυο απορρόφησης υγρού πέραν του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου στους ανθρώπους.

Ένας αριθμός ιοντικών καναλιών έχει αναγνωριστεί στο ενδομητρικό επιθήλιο, τα οποία μεταφέρουν ιόντα, δημιουργώντας διάφορες κλίσεις ηλεκτρολυτών για να κατευθύνουν την κίνηση του νερού, είτε έκκριση είτε επαναρρόφιση, πέραν του ενδοθηλίου. Δυσλειτουργία των ιοντικών καναλιών ή λανθασμένη ρύθμιση της έκφρασης τους έχει δείχθει πως καταλήγουν σε διαταραχές μεταφοράς υγρού και αποτυχημένες εμφυτεύσεις.

Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των ενδομητρικών στρωματικών κυττάρων (ESCs) σε μεγάλα, στρόγγυλα φθαρτοποιημένα κύτταρα που εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, η γνωστή φθαρτοποίηση, είναι απαραίτητη για μία επιτυχημένη εμφύτευση και εγκυμοσύνη. Η ανώμαλη φθαρτοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς συνέπειες όπως πρόωρο τοκετό ή εμβρυικό θάνατο. Η φθαρτοποίηση είναι ορμονικά ελεγχόμενη, εφόσον στους ανθρώπους συμβαίνει στην ωχρινική φάση κατά τη διάρκεια ενός τακτικού εμμηνορρυσιακού κύκλου. Επίσης, η φθαρτοποίηση επηρεάζεται και από την βλαστοκύστη. Στους ανθρώπους, η φθαρτοποίηση ενισχύεται σημαντικά σε κύκλους εμφύτευσης βλαστοκύστεων συγκριτικά με κύκλους μη σύλληψης. Στα ποντίκια, η παρουσία της βλαστοκύστης προκαλεί την έναρξη της φθαρτοποίησης. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι πως η φθαρτοποίηση σε ψευδοεγκυμονούσα ποντίκια ενεργοποιείται από τεχνητό ερέθισμα όπως είναι το “ξύσιμο” (scratching) του ενδομητρίου. Παρομοίως στους ανθρώπους, η εμφύτευση προωθείται από ενδομητρικά μηχανικά ερεθίσματα όπως οι ενδομητρικές βιοψίες. Η τεχνητά επαγόμενη φθαρτοποίηση αποκλείεται όταν το ενδομητρικό επιθήλιο καταστρέφεται. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν πως κατά την έναρξη της φυσιολογικής εμφύτευσης, η προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομητρικό επιθήλιο μπορεί να αποτελεί ένα φυσικό σήμα πρόωθησης της φθαρτοποίησης. Επιπλέον, η εισχωρητική εμφυτευτική βλαστοκύστη απελευθερώνει διαφορετικούς τύπους πρωτεασών που απαιτούνται για μία επιτυχή εμφύτευση και φθαρτοποίηση. Επίσης, συγκεκριμένα επιθηλιακά ιοντικά κανάλια είναι ευαίσθητα σε μηχανικές πιέσεις ή ενεργοποιούνται από διαίρεση μεσολαβούμενη από πρωτεάσες, τα οποία υποδεικνύουν την δυνατότητα των ιοντικών καναλιών στο ενδομητρικό επιθήλιο να ανταποκριθεί στους προερχόμενους από την βλαστοκύστη παράγοντες, και επομένως έναν πιθανό ρόλο τους στην ρύθμιση της φθαρτοποίησης.

Τέλος, η εμβρυική εμφύτευση είναι μία περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση μιάς σειράς γονιδίων όπως του LIF, Ihh (Indian hedgehog), Bmp2 (bone morphogenic protein 2), Hoxa10 και 11. Οι προσταγλανδίνες (Pgs) που συνθέτονται μέσω των κυκλοοξυγενασών (COXs) από το αραχιδονικό οξύ που προέρχεται από την φωσφολιπάση A (PLA), θεωρούνται τα πιο σημαντικά μόρια της φθαρτοποίησης και εμφύτευσης. Η έλλειψη των Pla-2 και Cox-2 γονιδίων προκαλεί υπογονιμότητα στα ποντίκια. Ωστόσο, παραμένει αρκετά ασαφής πως ρυθμίζεται ένα

τόσο περίπλοκο σύμπλεγμα γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφύτευση. Οι αποδείξεις αυξάνονται σχετικά με την ικανότητα των ιοντικών καναλιών να ρυθμίζουν έμμεσα την έκφραση γονιδίων, μέσω της δυνατότητας τους να ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγώντας στην ενεργοποίηση/απενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων.

#### 4.4.2) Ιοντικά κανάλια στο ενδομήτριο:

##### 1) CFTR στο ενδομήτριο:

Το CFTR είναι ένα από cAMP ενεργοποιημένα κανάλια ανιόντων που ανήκει στην ATP-δευσμενόμενη οικογένεια. Στον CFTR γίνεται εκροή  $Cl^-$ , οδηγώντας το νερό εντός του αυλού, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιθηλιακή έκκριση υγρού. Στους ανθρώπους, μεταλλάξεις στο CFTR γονίδιο προκαλεί κυστική ίνωση (CF), μία κοινή ασθένεια στους Καυκάσιους, η οποία χαρακτηρίζεται από ελαττωματική μεταφορά ηλεκτρολυτών και υγρού σε μία ποικιλία επιθηλίων και έχει συσχετισθεί με προβλήματα γονιμότητας τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες. Παρόλο που ο CFTR παρατηρείται στο ενδομητρικό επιθήλιο διαφορετικών ειδών και αποδείχθηκε πως συμβάλλει στην ενδομητρική έκκριση υγρού και  $Cl^-$ , φαίνεται να παίζει έναν περιορισμένο ρόλο στην εμφύτευση εφόσον πολλές γυναίκες με κυστική ίνωση κατόρθωσαν μία φυσική σύλληψη. Ωστόσο, συσσωρευμένες αποδείξεις έδειξαν πως ο CFTR συμμετέχει στην ρύθμιση αποπτωτικής δραστηριότητας ενδομητρικών επιθηλιακών κυττάρων (EECs) και πως η αλληλεπίδραση μεταξύ CFTR με το επιθηλιακό κανάλι νατρίου (ENaC) ρυθμίζει δυναμικά τον όγκο του μητρικού υγρού, που έχει σημαντική σχέση με την εμβρυική εμφύτευση.

Η έκφραση του CFTR στην μήτρα αλλάζει με την δυναμική των ωοθηκικών ορμονών κατά τη διάρκεια του κύκλου. Στα ποντίκια, το μέγιστο επίπεδο του μητρικού CFTR παρατηρήθηκε στον οίστρο όπου κυριαρχούσε η E2. Στις περιόδους εκτός του οίστρου, όπου η προγεστερόνη ξεπερνούσε την E2, το κανάλι ήταν μη ανιχνεύσιμο στην μήτρα. Επίσης, στα καλιεργούμενα EEC κύτταρα τρωκτικών, η E2 προωθεί ενώ η προγεστερόνη καταστέλλει την έκφραση ή την δραστηριότητα του CFTR. Στους ανθρώπους, αυτό το κανάλι στο ενδομήτριο αναφέρθηκε να είναι σημαντικά υψηλό κατά την τελική πολλαπλασιαστική φάση συγκριτικά με άλλες φάσεις. Η θετική ρύθμιση του CFTR που επάγεται από την E2 μπορεί να ευθύνεται για τον αυξημένο όγκο εκκρινόμενου μητρικού υγρού στον αυλό, όπως βρέθηκε στα ποντίκια κατά την διάρκεια του οίστρου και στους ανθρώπους στην πολλαπλασιαστική φάση εμφύτευσης. Αυτή η κίνηση επιβεβαιώνεται επίσης από μία άλλη μελέτη που έδειξε πως σε ποντίκια με ωοθηκεκτομή αφού ακολούθησαν μία θεραπεία με E2 ενισχύθηκαν τα επίπεδα του mRNA του CFTR στην μήτρα και η συσσώρευση μητρικού υγρού. Επιπλέον, στην περιεμφυτευτική περίοδο ποντικών, όπου η προγεστερόνη κυριαρχεί της E2, ο CFTR δεν ανιχνεύθηκε στο επιθήλιο ανοσοϊστοχημικά και τα επίπεδα του mRNA του ήταν χαμηλά. Στην δεκτική φάση ανθρώπων, το επίπεδο του μητρικού CFTR είχε επίσης μειωθεί. Η αρνητική ρύθμιση του CFTR μπορεί να συνεισφέρει στην συμπίκνωση του όγκου μητρικού υγρού κατά την εμφύτευση μειώνοντας την έκκριση υγρού. Ο CFTR είναι επίσης γνωστό πως αλληλεπιδρά με άλλο ιοντικό κανάλι, ENaC, και φυσιολογικά καταστέλλει την ENaC- μεσολαβούμενη ενδομητρική επαναρρόφηση. Η αρνητική ρύθμιση του CFTR στην εμφύτευση μπορεί να απομακρύνει την κατασταλτική επίδραση του στο ENaC, ενισχύοντας την επαναρροφητική δραστηριότητα του ενδομητρικού επιθηλίου. Συνολικά, η μειωμένη έκκριση υγρού και η αυξημένη επαναρρόφηση που είναι αποτελέσματα της αρνητικής ρύθμισης του CFTR στην περιεμφυτευτική περίοδο εμφανίζεται να συνεισφέρουν στην μείωση του όγκου μητρικού υγρού που απαιτείται για την εμφύτευση.

Η σημασία της αρνητικής ρύθμισης του καναλιού στην περιεμφυτευτική περίοδο υπογραμμίζεται από τις παρατηρούμενες αποτυχίες εμφύτευσης που προκαλούνται από τις ανώμαλες θετικές ρυθμίσεις του CFTR. Η μόλυνση από χλαμύδια (*chlamydia trachomatis*), η πιο κοινή φλεγμονή τραχήλου, είναι γνωστό πως σχετίζεται με τις βλάβες σαλπίνγων και αποτελεί μία βασική αιτία υπογονιμότητας στους ανθρώπους. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει έναν ακόμη πιθανό λόγο αποτυχίας της εμφύτευσης λόγω των χλαμυδίων σε μοντέλο ποντικού. Ενδομητρική ένεση με

λιποπολυσακχαρίδια γλαμυδίων στα ποντίκια προκάλεσε μία σημαντική μείωση του ρυθμού εμφύτευσης συνοδευόμενου από μία αύξηση μητρικού CFTR, CFTR-μεσολαβούμενη έκκριση ανιόντων και μητρικό βάρος υγρού. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως ανώμαλη θετική ρύθμιση της έκφρασης του CFTR προκαλεί συσσώρευση μητρικού υγρού και επομένως αποτυχία εμφύτευσης. Ωστόσο, αυτή η πιθανότητα παραμένει να επιβεβαιωθεί στους ανθρώπους. Μία πρόσφατη μελέτη που έδειξε μείωση παρά αύξηση της ενδομητρική έκφρασης του CFTR σε υπογόνιμους ασθενείς με υδροσάλπιγγες. Η διαφορά στα ευρήματα αυτά μεταξύ της μόλυνσης από γλαμύδια και υπογόνιμους ασθενείς μπορεί να εξηγηθεί, πέρα από τις προφανείς διαφορές μεταξύ των ειδών, μέσω τις διαφορές στις φλεγμονώδεις καταστάσεις, που ανήκει στην οξεία φάση στο ένα είδος και στην χρόνια φάση στο άλλο. Επιπλέον έρευνα απαιτείται για την διευκρίνιση αυτού.

Ακόμη πιο ενδιαφέρον αποτελεί ο ρυθμός της εμφύτευσης που μειώνεται σε κύκλους ART με ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση (COH). Η ομάδα Yang et. al. ανέφερε πως τα ενδομητρικά κύτταρα από εγκυμονούσα ποντίκια μετά από COH εμφάνισαν μεγαλύτερη αποπτωτική δραστηριότητα και αυξημένη CFTR έκφραση συγκριτικά με ποντίκια που συνέλαβαν δίχως COH. Στην ίδια μελέτη, θεραπεύοντας ενδομητρικά κύτταρα ποντικών με E2 in vitro αύξησε τόσο την έκφραση του CFTR όσο και την απόπτωση αυτών των κυττάρων, που μπορούσε να αποφευχθεί με την χορήγηση ενός εκλεκτού καταστολέα του CFTR, προτείνοντας την επιλεκτική του CFTR στην ρύθμιση αποπτωτικής δραστηριότητας των ενδομητρικών κυττάρων. Επίσης, ο CFTR βρέθηκε να συμμετέχει στην κυτταρική απόπτωση σε άλλους τύπους ιστών. Παρόλο που η απόπτωση των EECs είναι γνωστό πως συμβαίνει πριν την φθαρτοποίηση/εμφύτευση, εκτεταμένη απόπτωση μπορεί να είναι επιβλαβής και να σχετίζεται με αποτυχημένες εγκυμοσύνες στους ανθρώπους. Δεδομένου πως η COH είναι απαραίτητη διαδικασία για να αυξήσει την πιθανότητα ωορρηξίας στην IVF, η COH-επαγόμενη ανώμαλα υψηλή έκφραση του CFTR και η επακόλουθη απόπτωση μπορεί να είναι ένας παράγοντας που συνεισφέρει στον χαμηλό ρυθμό εμφύτευσης που παρατηρείται στις ART κλινικές.

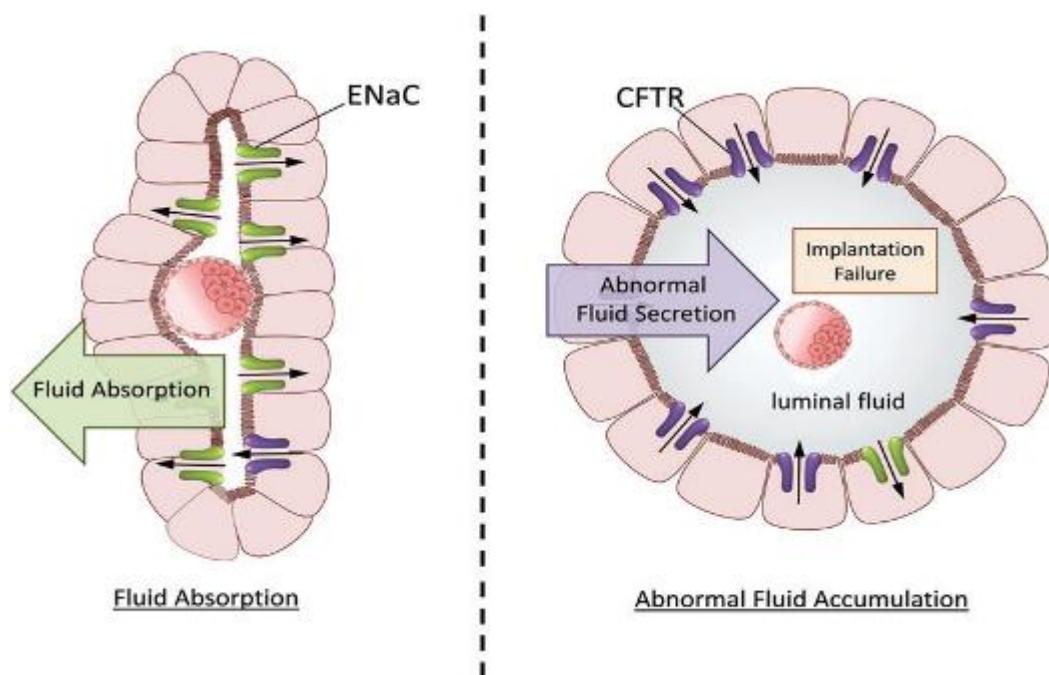
Λαμβάνοντας συνολικά τις αποδείξεις, προτείνεται πως η αρνητική ρύθμιση του CFTR την στιγμή της εμφύτευσης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της επιτυχίας. Ανώμαλη θετική ρύθμιση του CFTR κατά τη περιεμφυτευτική περίοδο, είτε από βακτηριακή μόλυνση είτε από ορμονικές διαταράξεις, μπορεί να οδηγήσει στην ανώμαλη συσσώρευση μητρικού υγρού ή αυξημένη απόπτωση των EECs, καταλήγοντας σε αποτυχία εμφύτευσης στα ποντίκια. Ωστόσο, εάν ισχύει το ίδιο στους ανθρώπους απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Πρέπει να σημειωθεί πως παρόλο πολλές γυναίκες με κυστική ίνωση φαίνεται πως συλλαμβάνουν φυσιολογικά, τείνουν να έχουν έναν αυξημένο ρυθμό πρόωρου τοκετού, μία κατάσταση που μπορεί να προέκυψε λόγω ελαττωματικής εμφύτευσης. Λεπτομερείς μελέτες του ρόλου του CFTR σε πλήρες φάσμα στην διαδικασία της εμφύτευσης, μπορεί να παρέχουν την απάντηση.

## 2)ENaC:

Ο ENaC γνωστός και ως ASSC (amiloride-sensitive sodium channel) ή SCNN1 (sodium channel non-neuronal I) αποτελείται από 3 υπομονάδες (α, β και γ). Ο ENaC είναι ευρέως γνωστός για τον ρόλο του στην απορρόφηση επιθηλιακού υγρού ειδικά στους πνεύμονες και στο νεφρό. Στο ενδομήτριο η λειτουργία αυτού του καναλιού έχει παρατηρηθεί τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια και στα γουρούνια. Πιο πρόσφατα, μία ανοσοιστολογική μελέτη έδειξε την έκφραση του ENaC στην βασική μεμβράνη του ανθρώπινου ενδομητρικού επιθηλίου. Μαζί με την αναγνώριση της δραστηριότητας Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPάσης στο ενδομήτριο, είναι γενικά αποδεκτό, όπως και στους πνεύμονες και στο νεφρό, πως το Na<sup>+</sup> στον μητρικό αυλό απορροφάται από τα EECs μέσω βασικά τοποθετημένου ENaC και μεταφέρεται στο αίμα μέσω βασικοπλευρικής Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την βαθμίδωση Na<sup>+</sup> πέραν του ενδομητρικού επιθηλίου που παρέχει την κατευθυνόμενη δύναμη για την επαναρρόφηση νερού από τον αυλό στο αίμα.

Τα αποτελέσματα in situ υβριδοποίησης δείχνουν την έκφραση των α-, β- και γ- ENaC γονιδίων στην μήτρα ποντικών, τα οποία επιδεικνύουν κυκλικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του οίστρου. Ωστόσο, σε αντίθεση με το CFTR, και οι τρεις υπομονάδες του ENaC έδειξαν μέγιστα επίπεδα σε

όλες τις περιόδους εκτός του οίστρου και τα χαμηλότερα στον οίστρο, δηλώνοντας πως το ENaC ρυθμίζεται θετικά από την προγεστερόνη και αρνητικά από την E2. Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του μητρικού mRNA της  $\alpha$ -ENaC παρατηρήθηκε με παράλληλη θετική ρύθμιση του CFTR και συσσώρευση μητρικού υγρού μετά την θεραπεία με E2 ποντικών με ωοθηκεκτομή. Επίσης, σε αρουραίους με ωοθηκεκτομή, η θεραπεία με E2 προκάλεσε έκκριση υγρού πέραν του ενδομητρίου, ενώ η προγεστερόνη κατέληξε στην ευαίσθητη σε αμιλοριδία απορρόφηση υγρού. Στην εμφύτευση, όταν κυριαρχεί η προγεστερόνη, αυξημένη έκφραση μητρικού ENaC και μειωμένη έκφραση του CFTR βρέθηκε στα ποντίκια. Έτσι προτάθηκε πως η συμπίκνωση μητρικού υγρού που είναι απαραίτητη για την εμβρυική εμφύτευση είναι αποτέλεσμα της μέγιστης απορρόφησης και ελάχιστης έκκρισης υγρού.



Εικόνα 31: Απεικόνιση της επιπλοκής του CFTR ρυθμιστή και του ENaC καναλιού στην ρύθμιση του μητρικού όγκου υγρού στην εμφύτευση. Η θετική ρύθμιση του ENaC και η αρνητική ρύθμιση του CFTR καταλήγουν στην μέγιστη απορρόφηση υγρού και ελάχιστη έκκριση υγρού οδηγώντας στην ελάττωση του μητρικού υγρού κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Η ανώμαλη θετική ρύθμιση του CFTR προκαλεί ανώμαλη αύξηση στην έκκριση υγρού και αυλική συσσώρευση αποτυγχάνοντας η διαδικασία της εμφύτευσης.

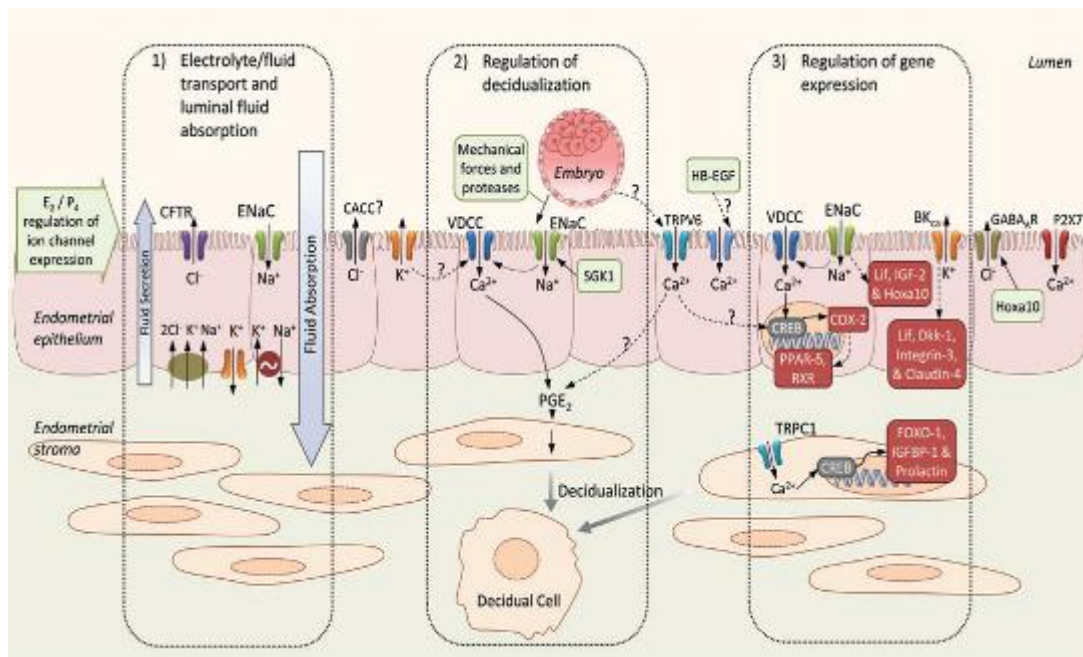
Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, η φθαρτοποίηση προωθείται από μηχανικά ερεθίσματα. Οι πρωτεάσες σερίνης εκφράζονται άφθονα στην διεπαφή βλαστοκύστης-ενδομητρίου. Τόσο η μηχανική δύναμη και η πρωτεάση σερίνης μπορούν να ενεργοποιήσουν το ENaC. Αυτές οι ιδιότητες της πύλης του καναλιού μαζί με την βασική τοποθεσία του στο κορυφαίο επιθήλιο και η μέγιστη έκφραση της εμφύτευσης, κάνουν το ENaC έναν ισχυρό υποψήφιο στην ανταπόκριση φθαρτοποιημένων σημάτων από το εμφυτευτικό έμβρυο και εξαγωγή επακόλουθων γεγονότων οδηγώντας στην φθαρτοποίηση. Αφού πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων για να ελέγξουν αυτήν την πιθανότητα, δείχθηκε πως τα υψηλά επίπεδα του ENaC και η χαρακτηριστική υπογραφή για την επαγόμενη από πρωτεάσες ενεργοποίηση του ENaC, παρατηρήθηκαν κατά την εμφύτευση στην μήτρα ποντικών. Σε απομονωμένα EECs κύτταρα ποντικών, η τρυψίνη, μία πρωτεάση που απελευθερώνεται από το εμβρύο, επάγει ευαίσθητα στην αμιλοριδία κυτταρικά ρεύματα και πιθανή μεμβρανική εκπόλωση, που ακυρώνεται από την αμιλοριδία ή απροτίνη, καταστολείς πρωτεασών, προτείνοντας πως η ενεργοποίηση του ENaC οδηγεί σε εισροή νατρίου μέσω διέγερσης πρωτεασών. Η τρυψίνη επίσης επάγει εισροή νατρίου στα EECs, που καταργείται από την αμιλοριδία ή νιφεδιπίνη, καταστολείς ηλεκτρονικά ενεργοποιημένων καναλιών ασβεστίου, προτείνοντας πως η ENaC-μεσολαβούμενη μεμβρανική εκπόλωση οδηγεί στην ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου. Η αύξηση του ασβεστίου που επάγεται από την ενεργοποίηση του ENaC έχει βρεθεί να προκαλεί την απελευθέρωση της PGE<sub>2</sub>, το γνωστό μόριο φθαρτοποίησης, από τα EECs

κύτταρα. Η θεραπεία των EECs με τρυψίνη επίσης προκάλεσε την αύξηση του mRNA επιπέδου του COX-2 και την φωσφορυλίωση από cAMP/Ca<sup>2+</sup> της CREB πρωτεΐνης (response element binding protein), τον μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει τον COX-2. Και οι δύο δράσεις μπορούν να μπλοκαριστούν από την αμιλορίδη ή νιφεδιπίνη, προτείνοντας πως η ενεργοποίηση του ENaC και η επακόλουθη αύξηση του ασβεστίου μπορεί να ενεργοποιήσει την κατευθυνόμενη από την CREB μεταγραφή του COX-2 καταλήγοντας σε πιο παρατεταμένη παραγωγή των προσταγλανδινών από τα EECs για την φθαρτοποίηση. Σε μία συν-καλλιέργεια EECs και ESCs κυττάρων ποντικού, η επαγόμενη από τρυψίνη ενεργοποίηση του ENaC έδειξε να προκαλεί μορφολογική αλλαγή των ESCs σε πολυγονιδιακά και πολυπύρνα κύτταρα, την καλά περιγραφόμενη φθαρτοποιημένη κυτταρική μορφολογία in vitro. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν πως η ενεργοποίηση του ENaC και η επακόλουθη απελευθέρωση PGE<sub>2</sub> από τα EECs οδηγεί στην φθαρτοποίηση των συνκαλλιεργούμενων ESCs κυττάρων. Επίσης, η ενδομητρική έγχυση αμιλορίδης καταστέλλει την επαγόμενη από λάδι φθαρτοποίηση σε ψευδοεγκυμονούσα ποντίκια, επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό ρόλο του ENaC στην φθαρτοποίηση. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως το ENaC παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταβίβαση του σήματος από το εμφυτευτικό έμβryo, της πρωτεύουσας σερίνης σε αυτήν την περίπτωση, σε επακόλουθες κυτταρικές ανταποκρίσεις οδηγώντας στην φθαρτοποίηση του στρώματος.

Η υψηλή έκφραση του ENaC που παρατηρείται κατά την περιεμφυτευτική περίοδο, μαζί με τους αποδεδειγμένους ρόλους του στην απορρόφηση μητρικού υγρού και μεταγωγή σήματος για φθαρτοποίηση, προτείνουν πως το ENaC κανάλι απαιτείται για την εμφύτευση. Όντως, η μητρική έγχυση της αμιλορίδης ή το si-RNA που στοχεύει την α- ENaC υπομονάδα προκαλούν σημαντική μείωση του εμφυτευτικού ρυθμού στα ποντίκια με τροποποιημένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την εμφύτευση. Στους ανθρώπους, συλλέχθηκαν ενδομητρικά δείγματα πριν την εμφυτευτική διαδικασία κατά την IVF διαδικασία και έδειξαν σημαντικώς χαμηλά επίπεδα της α- και γ- ENaC πρωτεΐνης σε γυναίκες με αποτυχημένη εγκυμοσύνη μετά από IVF συγκριτικά με επιτυχημένες εγκυμονούσες, υποδηλώνοντας την κρίσιμη εμπλοκή του ENaC στην εμφύτευση. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί πως ο κύριος ρυθμιστής του ENaC, η SGK1 (serum- and glucocorticoid-inducible kinase I) απαιτείται για την εμβρυική εμφύτευση, υποστηρίζοντας έναν βασικό ρόλο του ENaC σε αυτήν την διαδικασία. Εφόσον το ENaC είναι επίσης γνωστό πως ενεργοποιείται από μηχανικές πιέσεις, ο αποδεδειγμένος ρόλος του ENaC στην φθαρτοποίηση μπορεί επίσης να παρέχει μία εξήγηση για την μηχανικά διεγερμένη φθαρτοποίηση στα τρωκτικά και τον αυξημένο ρυθμό εγκυμοσύνης σε IVF ασθενείς μετά από ενδομητρικό “ξύσιμο”.

Λαμβάνοντας συνολικά, πως το ENaC έχει δειχθεί να εμπλέκεται στην i) απορρόφηση μητρικού υγρού και ii) προώθηση φθαρτοποίησης συνειδητοποιούμε την σημασία του στην διαδικασία της εμφύτευσης. Δεδομένου την δυνατότητας του να ενεργοποιεί την CREB και COX-2 που ρυθμίζουν έναν αριθμό επακόλουθων γονιδίων σχετιζόμενων με την εμφύτευση, όπως PPAR-δ (peroxisome proliferators-activating receptor δ) και PXR (retinoid X receptor). Το ENaC φαίνεται να παίζει ένα πολύπλευρο ρόλο στην εμφύτευση, πέρα της απορρόφησης υγρού και φθαρτοποίησης. Περαιτέρω έρευνα ως προς τους ρόλους του σε διαφορετικές διαδικασίες της εμφύτευσης μπορεί να αποκαλύψουν σπουδαίες αιτίες που υποβόσκουν στις διαταραχές εμφύτευσης ή/και εγκυμοσύνης και σχετιζόμενες με το αναπαραγωγικό σύστημα ασθένειες.





Εικόνα 32: Συνοπτική απεικόνιση των ιοντικών καναλιών που βρέθηκαν στο ενδομήτριο και οι πιθανοί τους ρόλοι στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την ενδομητρική δεκτικότητα και εμβρυϊκή εμφύτευση. Οι τρεις αναπαραριστόμενοι ρόλοι των ιοντικών καναλιών τονίζονται στα κουτιά όπου οι γνωστοί ρόλοι τους φαίνονται ακολουθώντας τα φυσιολογικά βέλη. Οι δράσεις των καναλιών με άγνωστα μονοπάτια σημειώνονται με διακεκομμένα βέλη ενώ οι υποψιαζόμενες δράσεις έχουν ένα ερωτηματικό. Οι παράγοντες – κλειδιά που είναι γνωστό να εμπλέκονται στην εμφύτευση και φαίνεται πως ρυθμίζουν την έκφραση/λειτουργία ιοντικών καναλιών, φανερώνονται στα πράσινα βέλη. Οι μεταγραφικοί παράγοντες/γονίδια που σχετίζονται με την εμφύτευση τονίζονται στα κόκκινα κουτιά.

### 3)Κανάλια ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>):

Έχει αναγνωριστεί εδώ και καιρό πως το ενδοκυτταρικό ασβέστιο είναι απαραίτητο για την εμφύτευση. Οι αυξήσεις του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ή οι κινητοποιήσεις του έχουν εμπλακεί σε μία ποικιλία διαδικασιών σκόπιμες για την εφύτευση, συμπεριλαμβανομένων την ρύθμιση της προκόλλησης βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, σηματοδότηση του HB-EGF, επιθηλιακές στενές συνδέσεις, δραστηριότητα πρωτεασών, επιθηλιακή μεταφορά και ενδομητρική παραγωγή προσταγλανδινών. Επίσης, οι προσδεδεμένες σε Ca<sup>2+</sup> πρωτεΐνες CaBP-9k, -28k και S100P έχουν αναφερθεί να ρυθμίζουν την ενδομητρική δεκτικότητα. Είναι καλά καθιερωμένο πως το ενδοκυτταρικό Ca<sup>2+</sup> απαιτείται από έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων για την ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης.

Η εισροή Ca<sup>2+</sup> μέσω καναλιών Ca<sup>2+</sup> συνεισφέρει αισθητά στην κινητοποίηση ασβεστίου. Μία πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινες καλλιέργειες EECs κυττάρων έδειξε πως το ενδομητρικό επιθήλιο ίσως έχει έναν ενεργό μηχανισμό απορρόφησης ασβεστίου. Μία σημαντική εισροή ασβεστίου εντός της φθαρτοποιημένης περιοχής από τον μητρικό αυλό συγκριτικά με την μη φθαρτοποιημένη περιοχή έχει αναφερθεί στα ποντίκια, προτείνοντας μία πιθανή συμμετοχή των καναλιών ασβεστίου στην φθαρτοποίηση. Μέχρι σήμερα, δύο κατηγορίες καναλιών ασβεστίου έχουν βρεθεί στο ενδομήτριο συμπεριλαμβανομένων των VDCCs (voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels) και TRP (transient receptor potential) καναλιών.

#### 3.1) VDCCs:

Είναι μία ομάδα καναλιών ασβεστίου που ενεργοποιούνται από την εκπόλωση της μεμβράνης και κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικούς τύπους με βάση τις κινητικές ενεργοποίησης και απενεργοποίησης τους. Για παράδειγμα, τα VDCCs τύπου L κανάλια μεσολαβούν στην μακρά διαρκόμενη εισροή ασβεστίου. Εάν εφαρμοσθούν ενδοαυλικά καταστολείς των VDCCs (όπως είναι η νιφεδιπίνη, βεραπαμίλη, νικαρδίνη και διλτιαζέμη) μειώνεται η απάντηση φθαρτοποίησης

σε ψευδοεγκυμονούσα ποντίκια. Σε ενδομητρικά μοσχεύματα βοδιού, η ενεργοποίηση των VDCCs τύπου L καναλιών έδειξε να μειώνει την σύνθεση των προσταγλανδινών. Επιπλέον, στην ανθρώπινη RL95-2 ενδομητρική καρκινική σειρά η ευαίσθητη στην διλτιαζέμη εισροή ασβεστίου διεγείρει την προσκολλητική ικανότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων. Ανιχνεύθηκε το mRNA των VDCCs τύπου L γονιδίων, *Cacna1c* και *Cacna1d*, στα EECs κύτταρα ποντικών. Μελέτες patch-clamp έδειξαν πως τα EECs κύτταρα ποντικού εκθέτουν ευαισθησία στην νιφεδιπίνη και εξαρτώνται από την εισροή ηλεκτρονίων, προτείνοντας μία λειτουργική δραστικότητα των VDCCs τύπου L στο ενδομητρικό επιθήλιο. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, αποδείχθηκε επίσης πως τα VDCCs τύπου L κανάλια ενεργοποιούνται από την εκπόλωση της μεμβράνης που επάγεται από την ενεργοποίηση των ENaC καναλιών και πως η VDCC-μεσολαβούμενη εισροή ασβεστίου οδηγεί στην φωσφορυλίωση της CREB, την θετική ρύθμιση της έκφρασης του COX-2 και την απελευθέρωση του PGE2 από τα EECs κύτταρα, καταλήγοντας στην φθαρτοποίηση των συνκαλλιεργούμενων στρωματικών κυττάρων. Η χορήγηση καταστολέα του VDCC, νιφεδιπίνη, καταργεί τις εξαρτώμενες από ENaC κυτταρικές αποκρίσεις και την φθαρτοποίηση. Αυτά τα αποτελέσματα προφανώς υποδεικνύουν την περιπλοκή των VDCCs τύπου L καναλιών στην φθαρτοποίηση και εμφύτευση. Η εμπλοκή των VDCCs στην διαδικασία της φθαρτοποίησης επίσης παρέχει μία πιθανή εξήγηση για την μακρά παρατηρούμενη φθαρτοποιημένη ανταπόκριση που επάγεται από ηλεκτρικό ερέθισμα σε ψευδοεγκυμονούσα τρωκτικά.

### 3.2) TRP κανάλια:

Αυτή η υπερικογένεια μη ηλεκτρονικά εξαρτώμενων διαπερατών σε κατίοντα κανάλια ασβεστίου έχει επίσης αναφερθεί να εκφράζεται στο ενδομήτριο. Τα TRP κανάλια είναι ευαίσθητα σε πολλαπλά ερεθίσματα, όπως θερμοκρασία και μηχανικές πιέσεις. Η TRPC (TRP canonical) οικογένεια η οποία πιστεύεται πως είναι μία μοριακή οντότητα υπεύθυνη για την εισροή ασβεστίου επάγεται από εξάντληση αποθηκευμένων ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ασβεστίου, η αποκαλούμενη SOX (“store-operated influx”) εισροή ασβεστίου ή “capacitative Ca<sup>2+</sup> entry”. Η παρουσία των TRP καναλιών στο ενδομήτριο προτάθηκε από την παρατηρούμενη ευαισθησία της δραστικότητας εισροής ασβεστίου της SKF-96365, ένας καταστολέας αυτών των καναλιών στα RL95-2 κύτταρα. Επίσης, η παροδική εισροή ασβεστίου προκαλούμενη από την E2 στα RL95-2 κύτταρα ήταν σημαντικά αυξημένη από την εξάντληση αποθηκευμένου ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ως συνέπεια της επιπλοκής TRP καναλιών στην μεσολαβούμενη SOC στο ενδομήτριο.

Η TRPC1 είναι ένα μέλος της οικογένειας αυτής και έχει αναφερθεί πως εκφράζεται στα ESCs κύτταρα. Η ομάδα Kawarabayashi et. al απέδειξε πως η επαγόμενη από E2/προγεστερόνη φθαρτοποίηση *in vitro* συνοδεύεται από την θετική ρύθμιση του TRPC1 και αυξάνει την TRPC1-μεσολαβούμενη SOC δραστικότητα των ανθρώπινων ESCs κυττάρων (hESCs). Οι επαγόμενες φθαρτοποιημένες αποκρίσεις στα hESCs, συμπεριλαμβανομένων την αύξηση του μεγέθους των hESCs και την θετική ρύθμιση της IGF-προσδεδεμένης πρωτεΐνης 1 και προλακτίνης, καταστάθηκαν από την στόχευση του TRPC1 με siRNA, καταστολείς του TRP καναλιού ή ένα αντίσωμα ενάντια στον TRPC1. Η μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης CREB και η ενισχυμένη έκφραση της forkhead box πρωτεΐνης I βρέθηκαν παράλληλα στην φθαρτοποίηση των hESCs, που μπορεί να αλληλεπιδρούν μέσω siRNA στόχευσης του TRPC1. Τα ποντίκια με έλλειψη του TRPC1 είναι γόνιμα, και προτείνεται ένας περιττός ρόλος του TRPC1 στην εμφύτευση. Επομένως, ο ακριβής ρόλος του TRPC1 στο ενδομήτριο και η πιθανή εμπλοκή του στην εμφύτευση παραμένει αδιευκρίνιστη.

Ένα άλλο TRP μέλος, το TRPV6 εκφράζεται στο κορυφαίο και αδενικό ενδομητρικό επιθήλιο των ανθρώπων, ποντικών, αρουραίων και γουρουνιών. Το TRPV6 υποβάλλεται σε κυκλικές αλλαγές και φαίνεται να είναι υποκείμενο της ρύθμισης E2 ή προγεστερόνης. Στους ανθρώπους και στα ποντίκια, το μέγιστο επίπεδο mRNA του TRPV6 ανιχνεύθηκε στην πολλαπλασιαστική φάση ή στον οίστρο, όταν κυριαρχούσε η E2. Επίσης, η χορήγηση της E2 σε ανώριμα ποντίκια ενισχύει την έκφραση του TRPV6 στο ενδομήτριο, όπου μπορεί να εξαφανιστεί μέσω ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα β της E2. Η επαγόμενη από E2 έκφραση του TRPV6 παρατηρήθηκε ακόμη και σε

ανθρώπινη ενδομητρική κυτταρική σειρά, Ishikawa (ISK). Ωστόσο, σε αντίθεση με τον άνθρωπο και τον ποντικό, το ενδομήτριο του αρουραίου έδειξε υψηλή έκφραση του mRNA του TRPV6 σε περιόδους εκτός του οίστρου. Το TRPV6 είναι υψηλά εκφραζόμενο στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Στα ποντίκια, το mRNA του TRPV6 ανιχνεύθηκε από την 7η ημέρα εγκυμοσύνης και κορυφώθηκε στην μέση της κύησης. Στα ποντίκια και στα γουρούνια, το μέγιστο επίπεδο του mRNA του TRPV6 ανιχνεύθηκε κατά την εμφύτευση. Παρόλο που δεν υπάρχει άμεση απόδειξη για την εμπλοκή του TRPV6 στην εμφύτευση, τα θηλυκά TRPV6 knockout ποντίκια είναι υπογόνιμα, χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να τεκνοποιήσουν και έχουν μικρότερο μέγεθος γέννας σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Καθίσταται εύλογο μία ελαττωματική εμφύτευση μπορεί να είναι η αιτία για την υπογονιμότητα στα knockout ποντίκια, οι λεπτομέρειες του οποίου χρειάζονται περισσότερη έρευνα.

Λαμβάνοντας συνολικά, παρόλη την σημασία του ενδοκυτταρικού ασβεστίου στην εμφύτευση που έχει αναγνωριστεί, ο ακριβής ρόλος πολλών ενδομητρικών καναλιών ασβεστίου στην διαδικασία της εμφύτευσης παραμένει αρκετά ασαφής εκτός από τα VDCC τύπου L κανάλια, που αποδείχθηκε πως είναι βασικά για το σηματοδοτικό μονοπάτι όπου εμπλέκονται και τα ENaC κανάλια και οδηγεί στην στρωματική φθαρτοποίηση. Παραμένει επίσης ασαφής πως όλοι οι διαφορετικοί τύποι καναλιών ασβεστίου συγχρονίζονται κατά την εμφύτευση.

#### 4) Κανάλια καλίου (K<sup>+</sup>):

Τα κανάλια καλίου έχουν βρεθεί στο ενδομητρικό επιθήλιο και αποδείχθηκε πως εμπλέκονται στην μητρική μεταφορά ηλεκτρονίων. Η ομάδα Vetter et al βρήκε ένα cAMP-ενεργοποιημένο και ευαίσθητο στο βάριο κανάλι εισροής καλίου στην βασοπλευρική μεμβράνη του ενδομητρικού επιθηλίου χοίρου, η ενεργοποίηση του οποίου διεγείρεται από την απορρόφηση νατρίου πέραν του επιθηλίου. Η ομάδα Fong et al βρήκε πως η ενεργοποιημένη από αδρεναλίνη έκκριση χλωρίου πέραν του ενδομητρίου επίσης εξαρτάται από βασοπλευρικά κανάλια καλίου. Αυτές οι μελέτες προτείνουν πως τόσο η απορρόφηση νατρίου όσο και η έκκριση χλωρίου εξαρτώνται από την δραστηριότητα βασοπλευρικών καναλιών καλίου, εφόσον η εκροή καλίου από τα κανάλια παρέχει ένα μονοπάτι ανακύκλωσης για το κάλιο που ωθείται μέσα στα κύτταρα μέσω της Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ATPάσης. Τα κανάλια καλίου έχουν επίσης βρεθεί στην κορυφαία μεμβράνη του ενδομητρικού επιθηλίου. Η ομάδα Palmer et al έδειξε πως η κορυφαία μεμβράνη σε καλλιέργειες ενδομητρικών αδενικών επιθηλίων χοίρου ανέπτυξε ένα διεπιθηλιακό ρεύμα επαγόμενο από UTP, το οποίο ήταν εξαρτώμενο από το κάλιο και ευαίσθητο σε έναν καταστολέα των μικρά-επαγόμενων από ασβέστιο ενεργοποιημένων καναλιών καλίου (SK). Η γονιδιακή έκφραση των δύο SK υποτύπων, SK1 και SK3, ανιχνεύθηκε μέσω της RT-PCR και ανακαλύφθηκε πως ρυθμίζονται θετικά από την E2 σε ενδομητρικές καλλιέργειες χοίρου. Μία πρόσφατη μελέτη σε ανθρώπινες καλλιέργειες ενδομητρικών μονοστρωματικών επιθηλίων έδειξε πως το κάλιο είναι παθητικά εκκρινόμενο εντός του κορυφαίου διαμερίσματος. Αυτό συνεπάγεται με τα ευρήματα πως τα επίπεδα καλίου στον μητρικό αυλό είναι υψηλότερα από αυτά του ορού και πως τα κορυφαία κανάλια καλίου μπορεί να ευθύνονται για την έκκριση καλίου.

Το ενδομήτριο υπόκειται σε μία σειρά προγραμματισμένων μορφολογικών αλλαγών ή επαναδιαμόρφωσης προκειμένου να διευκολύνει την εμφύτευση εμβρύου. Η φθαρτοποίηση ξεκινά με πολλαπλασιασμό των ESCs. Ταυτόχρονα, τα επιθηλιακά κύτταρα αυλού περικυκλώνουν το εμφυτευτικό έμβρυο και υποβάλλονται σε απόπτωση πριν ή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης στα ποντίκια, στους αρουραίους και στα χάμστερς. Η ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης είναι κρίσιμη για μία επιτυχημένη εμφύτευση εμβρύου εφόσον αυξημένα επίπεδα απόπτωσης έχουν αναφερθεί να σχετίζονται με αποτυχία εγκυμοσύνης στους ανθρώπους.

Τα κανάλια καλίου είναι καλά τεκμηριωμένα για τον ρόλο τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους ή κάτω από παθολογικές συνθήκες όπως είναι ο καρκίνος. Αρκετά κανάλια καλίου, συμπεριλαμβανομένων των HERG (human eag-related gene), K2P (two pore potassium channels) και ενδιάμεσα-αγώγιμα από το Ca<sup>2+</sup> ενεργοποιημένα κανάλια

καλίου, έχουν βρεθεί στα ανθρώπινα ενδομητρικά καρκινικά κύτταρα, και φαρμακολογικές μελέτες προτείνουν τον ρόλο τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην πρόοδο καρκίνου. Παρόλο που αυτά τα αποτελέσματα περιορίζονται σε καρκινικές συνθήκες, πρέπει να σημειωθεί πως η εμφύτευση εμβρύου θεωρείται μία επεμβατική και προοδευτική διαδικασία, παρόμοια με αυτήν του καρκίνου, μοιράζοντας κοινά μονοπάτια και παράγοντες. Η παρατηρούμενη περιπλοκή των καναλιών καλίου στον πολλαπλασιασμό των ενδομητρικών καρκινικών κυττάρων μπορεί επίσης να προτείνει την πιθανή εμπλοκή των καναλιών καλίου στην διαδικασία της εμβρυικής εμφύτευσης. Τα κανάλια καλίου επίσης συμμετέχουν στην κυτταρική απόπτωση σε έναν αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Παρόλο που καμία μελέτη δεν έχει αναφέρει παρόμοιο ρόλο των καναλιών καλίου στα ενδομητρικά κύτταρα, είτε επιθηλιακά είτε στρωματικά, είναι πιθανό αυτά τα κανάλια να ρυθμίζουν επίσης την αποπτωτική διαδικασία πριν ή κατά τη διάρκεια της εμβρυικής εμφύτευσης, ενώ αναμένεται περαιτέρω έρευνα.

Σε μία πρόσφατη μελέτη, τα μεγάλα-αγώγιμα από ασβέστιο ενεργοποιημένα κανάλια καλίου ( $BK_{Ca}$ ) έχουν αναγνωρισθεί στα ανθρώπινα EECs με υψηλότερη έκφραση στην μέση εκκριτική φάση συγκριτικά με την πολλαπλασιαστική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Επίσης, ενδομητρικά δείγματα που έχουν συλλεχθεί από γυναίκες που υπέστησαν την IVF διαδικασία έδειξαν χαμηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα των  $BK_{Ca}$  σε αυτές με αποτυχημένες εγκυμώσεις συγκριτικά με αυτές που κατόρθωσαν να τεκνοποιήσουν. Επιπλέον, ο ρυθμός εμφύτευσης στα ποντίκια μειώθηκε μετά από ένεση με siRNA στοχεύοντας τα  $BK_{Ca}$ . Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως τα  $BK_{Ca}$  ίσως είναι σημαντικά για την εμφύτευση εμβρύου. Παρόλο που η ίδια μελέτη έδειξε πως η καταστολή ή knockdown του  $BK_{Ca}$  προκάλεσε μείωση στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την εμφύτευση στα ISK κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων της Lif, της Claudin-4 και της Dkk-1, παραμένει ακόμη ασαφής η συνεισφορά του  $BK_{Ca}$  στην εμφύτευση και οι υποκείμενοι μηχανισμοί του.

Η κατανόηση του ρόλου των ενδομητρικών καναλιών καλίου στην εμφύτευση απέχει πολύ από την ολοκλήρωση της. Γενικά, τα κανάλια καλίου είναι καλά τεκμηριωμένα για τον καθορισμό δυναμικής κυτταρικών μεμβρανών. Θα ήταν ενδιαφέρον να φανεί εάν τα ενδομητρικά κανάλια καλίου μπορούν να τροποποιήσουν την μεμβρανική δυναμική και να ρυθμίσουν τα VDCCs στα EECs κύτταρα επάγοντας την φθαρτοποίηση όπως έχει αποδειχθεί για τα ENaC κανάλια. Τα επιθηλιακά κανάλια καλίου λειτουργώντας με άλλα επιθηλιακά ιοντικά κανάλια/μεταφορείς, είναι γνωστό πως παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην επιθηλιακή μεταφορά υγρού στους αεραγωγούς και στα νεφρά. Ένας παρόμοιος ρόλος των καναλιών καλίου στην ενδομητρική έκκριση χλωρίου έχει παρατηρηθεί. Ωστόσο, η ακριβής μοριακή οντότητα για τα πιθανά κανάλια καλίου δεν έχει ακόμη αναγνωρισθεί. Τα  $BK_{Ca}$  ή άλλα κανάλια καλίου μπορεί επίσης να εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κατά τη διάρκεια εμφύτευσης εμβρύου, χωρίς να έχουν εξακριβωθεί οι απαιτούμενοι μηχανισμοί. Πρέπει να γίνει μία μελλοντική προσπάθεια για την ενίσχυση της κατανόησης μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν αυτές τις διαδικασίες και είναι θεμελιώδεις για την επιτυχία εμβρυικής εμφύτευσης.

##### 5) Άλλα κανάλια:

Επιπρόσθετα των ιοντικών καναλιών που συζητήθηκαν παραπάνω, ένας αριθμός άλλων ιοντικών καναλιών έχουν αποδειχθεί ή προταθεί να είναι παρών στο ενδομήτριο. Για παράδειγμα, το εφαπτόμενο στο ασβέστιο κανάλι χλωρίου ( $CaCC$ ) έχει λειτουργικώς αναγνωρισθεί μέσω Ussing chamber και patch-clamp πειράματα στα EECs κύτταρα ποντικών, επιδεικνύοντας μία ευαισθησία στην εξωκυτταρική ATP ή UTP. Ωστόσο, η μοριακή οντότητα της  $CaCC$  δεν έχει αναγνωρισθεί και ο ακριβής του ρόλος στην εμφύτευση παραμένει ασαφής.

Επίσης, ο υποδοχέας προσδετών που είναι ιοντικό κανάλι έχει αναγνωρισθεί στο ενδομήτριο και παρεμβαίνει στην εμφύτευση. Ο P2X (purinergic receptor subtype X) είναι μία οικογένεια ATP-ενεργοποιημένων μη επιλεκτικών κατιοντικών καναλιών συμπεριλαμβανομένων των P2X(1-7). Ο P2X7 υποδοχέας βρέθηκε στο ενδομητρικό επιθήλιο αρουραίου και ρυθμίζεται θετικά την στιγμή της εμφύτευσης, που λαμβάνεται υπόψη για την πιθανή περιπλοκή του στην εμφύτευση παρόλο

που δεν έχει αποκαλυφθεί κανένας μηχανισμός.

Ο υποδοχέας GABA<sub>A</sub>R (γ- aminobutyric acid receptor type A) είναι μία οικογένεια καναλιών χλωρίου που “ανοίγουν” με την αλληλεπίδραση προσδέτη. Η υπομονάδα π του GABA<sub>A</sub>R έχει ανιχνευθεί στα ανθρώπινα ESCs και EECs κύτταρα καθόλη τη διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου αλλά αυξάνεται σημαντικά στο παράθυρο της εμφύτευσης. Στα ISK κύτταρα, η GABA<sub>A</sub>R -π φαίνεται να ρυθμίζεται από την προγεστερόνη μέσω του HOXA10 μονοπατιού, το οποίο είναι γνωστό πως είναι απαραίτητο για την ενδομητρική δεκτικότητα και φθαρτοποίηση. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να εξακριβωθεί πως συμμετέχει ο GABA<sub>A</sub>R στην διαδικασία της εμφύτευσης. <sup>(12)</sup>

#### 4.5) Τοπικοί και συστημικοί παράγοντες:

Παρόλη την πρόοδο που έχει γίνει στην διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης, ένα σημαντικό μέρος ασθενών αποτυγχάνουν να τεκνοποιήσουν, ακόμη και σε γυναίκες που έχουν μεταφερθεί ευπλοειδή έμβρυα σε ένα φαινομενικά δεκτικό ενδομήτριο. Ένα ποσοστό αυτών των αποτυχιών αντανάκλα αναμφισβήτητα τον περιορισμό διαγνωστικών εργαλείων που χρειάζονται για την συλλογή των πιο ικανών εμβρύων. Ωστόσο, πολλές αποτυχίες βασίζονται σε τοπικούς και συστημικούς παράγοντες που επηρεάζουν το περιβάλλον της μήτρας και επιδρούν αρνητικά στην ικανότητα του εμβρύου να εμφυτευθούν. Παρόλο που η έρευνα γι'αυτούς τους συστημικούς παράγοντες έλαβε λιγότερη προσοχή σε σχέση με το προεμφυτευτικό έμβρυο και το ενδομήτριο, πολλοί από αυτούς έχουν αποδειχθεί καθαρά να επηρεάζουν την επιτυχία της IVF. Είναι απαραίτητο να αναγνωρίζονται και να αποκλείονται όλοι οι επιβλαβείς τοπικοί και συστημικοί παράγοντες και φυσικά ο συνδυασμός τους για κάθε ασθενή εξατομικευμένα, προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχίας. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι πιο γνωστοί και συχνοί τοπικοί και συστημικοί παράγοντες που καλούνται να αντιμετωπισθούν πριν την διαδικασία της IVF:

##### 4.5.1) Δυσλειτουργία θυροειδούς:

Οι θυροειδικές ορμόνες επηρεάζουν την επαφή εμβρύου – μήτρας μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέων θυροειδικών ορμονών και TSH υποδοχέων στο ενδομήτριο με την τροφοβλάστη κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Αυτή η αλληλεπίδραση ακολουθείται από μία ποικιλία γεγονότων συμπεριλαμβανομένων την τροποποιημένη μεταγραφή και μετάφραση απαραίτητων κυτταρικών πρωτεϊνών στην εμφύτευση. Η θυροειδική δυσλειτουργία έχει κυρίως μελετηθεί στο πλαίσιο της ART, για την σχέση του με την επιτυχία εγκυμοσύνης καθώς και τις αποβολές. Ωστόσο, οι οριακές τιμές της TSH που προειδοάζουν τους ασθενείς είτε για δυσμενή είτε για επιθυμητά αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν και πρέπει να μελετώνται σε ικανοποιητικό βαθμό στην προσπάθεια να απομονωθεί η επίδραση του θυροειδούς.

Το ανώτατο όριο για το εύρος αναφοράς των TSH επιπέδων έχει εγκαταστηθεί από το National Health and Nutritional Examination Survey να είναι 4,5-5mIU/L. Επομένως, ο κλασσικός ορισμός του κλινικού υποθυροειδισμού (SCH) υφίστανται όταν το επίπεδο της TSH είναι μεγαλύτερο από 4,5mIU/L, με φυσιολογικά επίπεδα ελεύθερης θυροξίνης. Χρησιμοποιώντας αυτόν τον ορισμό, η ομάδα Kim. et. al πραγματοποίησε μία τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή με 64 ασθενείς για να αξιολογήσει την επίδραση της λεβοθυροξίνης σε IVF ασθενείς που πάσχουν από SCH. Σε αυτήν την μελέτη δημιουργήθηκαν δύο ομάδες όπου στην μία ομάδα χορηγήθηκαν σε ασθενείς 50μg λεβοθυροξίνης ενώ δεν υπήρχε καμία θεραπεία για την άλλη ομάδα. Ο ρυθμός της εμφύτευσης ήταν σημαντικά υψηλότερος στην ομάδα που έλαβαν θεραπεία σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (P=.044). Σε μία παρόμοια μελέτη όπου θεωρήθηκε ως οριακή τιμή της TSH να είναι 4,2mIU/L για την διάγνωση του SCH, τυχαίοποιήθηκαν 70 ασθενείς που έλαβαν λεβοθυροξίνη (50-100μg καθημερινά) ή placebo. Και σε αυτήν την μελέτη, ο ρυθμός κλινικής εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερος στην ομάδα θεραπείας (P=.02). Επομένως, υπάρχουν άριστης ποιότητας δεδομένα που αποδεικνύουν πως ο κλινικός υποθυροειδισμός που δεν αντιμετωπίζεται επιδρά αρνητικά στον

ρυθμό της εμφύτευσης μετά από ART.

Επιπλέον, πολλαπλές μελέτες αξιολόγησαν την επίδραση της θυροειδικής αυτοανοσίας (είτε με αντι-θυροπεροξειδάσης είτε με αντι-θυρογλοβουλίνης αντισώματα) στην επιτυχία της IVF. Μία μετά-ανάλυση 7 μελετών που περιελάμβαναν 330 θετικούς σε θυροειδικά αντισώματα ασθενείς και 1,430 ασθενείς ελέγχου, απέδειξαν πως δεν υπάρχει καμία διαφορά στον ρυθμό κλινικής εγκυμοσύνης μετά από IVF ( $P=.67$ ). Οι διαθέσιμες ενδείξεις δεν υποστηρίζουν πως η θυροειδική αυτοανοσία επιδρά σημαντικά στην εμφύτευση, αλλά μία συστηματική έρευνα και μία τυχαιοποιημένη μελέτη για την θεραπεία με λεβοθυροξίνη προτείνουν πως η θυροειδική αυτοανοσία αυξάνει την πιθανότητα αποβολής και πρόωρου τοκετού, που μπορούν να αποφευχθούν με μία θεραπεία αποκατάστασης. Εφόσον υποστηρίζεται η απόφαση να μην θεραπευτούν οι γυναίκες με επίπεδα της TSH μεταξύ 2,5 και 5mIU/L, θεωρείται συνετό να μετρηθούν τα αντισώματα θυροειδικής περοξειδάσης σε αυτές τις γυναίκες και να αντιμετωπισθούν εάν τα αποτελέσματα είναι θετικά.

#### 4.5.2) Έλλειψη βιταμίνης D:

Η πρόσφατη επιδημία έλλειψης βιταμίνης D (250HD) στον αναπτυσσόμενο κόσμο προκάλεσε το αυξημένο ενδιαφέρον που υπάρχει για τον ρόλο της 250HD στην ART διαδικασία. Αυτό το ενδιαφέρον αποδίδεται στο γεγονός πως η καλσιτριόλη, η ενεργή μορφή της 250HD, εκκρίνεται από το ενδομήτριο και ρυθμίζει την έκφραση στοχευμένων γονιδίων απαραίτητων για την εμφύτευση. Στην προσπάθεια να ελεγχθεί η δράση της 250HD στο ωάριο και επακόλουθο έμβρυο, πολλαπλές μελέτες εξέτασαν την συσχέτιση των επιπέδων της 250HD σε λήπτες δανεικών ωαρίων και την ποιότητα εμβρύων, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ομάδα του Rudick et. al αξιολόγησε μία αναδρομική ομάδα μελέτης 99 ληπτών και βρήκε πως ο ρυθμός κλινικής εγκυμοσύνης ήταν χαμηλότερος σε ασθενείς με έλλειψη βιταμίνης D σε σχέση με τους λήπτες που είχαν φυσιολογική ποσότητα της ( $P=.004$ ). Μία μεταγενέστερη μελέτη, από την ομάδα Fabris et. al, εξέτασε αναδρομικά 267 κύκλους δωρεάς ωαρίων και δεν βρέθηκε καμία διαφορά στον ρυθμό της εμφύτευσης μεταξύ των πλήρης, ελλειπής ή ανεπαρκής 250HD ασθενείς ( $P=.894$ ).

Η μεγαλύτερη ανάλυση επιτεύχθηκε από την ομάδα του Franasiak et. al με παράλληλο έλεγχο χρωμοσωμικού προφίλ των εμβρύων. Σε αυτήν την μελέτη το μέσο επίπεδο της 250HD στον ορό δεν διέφερε μεταξύ γυναικών με ή χωρίς εξελισσόμενες εγκυμοσύνες. Μία πολυποίκιλη ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης απέδειξε πως δεν υπάρχει συσχετισμός με τα επίπεδα της 250HD και τον ρυθμό κύησης. Επομένως, παρόλη την προσοχή που δίνεται στην επιδημία της έλλειψης βιταμίνης D καθώς εγγυημένα επηρεάζει την γενική υγεία γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία, δεν φαίνεται να αποτελεί σημαντικός καθοριστής της επιτυχίας μετά από την IVF διαδικασία.

#### 4.5.3) Προλακτίνη:

Τα επίπεδα της κυκλοφορούσας προλακτίνης είναι αυξημένα κατά την διάρκεια κύκλων ωοθηκικής διέγερσης σε μερικές γυναίκες. Περιορισμένες ερευνήσεις σχετικά με τα επίπεδα της PRL και τα αποτελέσματα της IVF έχουν αναφέρει συσχετισμούς για αυξημένα επίπεδα PRL με βελτιωμένη ωοθηκική απάντηση και εγκυμοσύνη, ενώ άλλες απέτυχαν να αποδείξουν αυτούς τους ισχυρισμούς. Η ερευνητική ομάδα του Doldi et al χορήγησε σε μία ομάδα γυναικών ανταγωνιστή ντοπαμίνης και παρατήρησε μία υψηλότερη ωοθηκική ανταπόκριση, μία καλύτερη μορφολογία ωαρίου και γονιμοποίηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε καμία θεραπεία, προτείνοντας την ωφέλιμη δράση της PRL στην ωοθήκη. Η ομάδα του Jinno et al εφάρμοσε ένα σύμπλεγμα βρομοκρυπτίνης για να αυξήσει τα επίπεδα της PRL και παρατήρησε μία αύξηση στα ωοθυλάκια, στα γονιμοποιημένα ωάρια, στην ποιότητα ωαρίων, στην κλινική εγκυμοσύνη και στην γέννηση υγιών παιδιών. Αυτές οι έρευνες είναι σημαντικές με βάση την ένδειξη φθαρτοποιημένης παραγωγής PRL και έτσι προτείνεται η μεσολάβηση της σε γεγονότα που σχετίζονται με την εμφύτευση. Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν επιδίωξαν να απομονώσουν την δράση των διαφορετικών επιπέδων της PRL στον ρυθμό εμφύτευσης. Μελλοντικές μελέτες μπορεί να

ωφελήσουν μετρώντας τα επίπεδα της RPL του εκκριτικού ενδομητρίου, επειδή οι τοπικές δράσεις της παραγωγής της PRL μπορεί να σχετίζονται περισσότερο με τον καθορισμό επιτυχούς εμφύτευσης από ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσας ορμόνης.

#### 4.5.4) Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου:

Η IBD (inflammatory bowel disease) νόσος έχει συδεθεί τόσο με την ενδομητρίωση όσο και με την υπογονιμότητα. Είναι ασαφής εάν η δράση της εκδηλώνεται ως μειωμένη ωθητική εφεδρεία ή αυξημένο ρίσκο εμφυτευτικής αποτυχίας. Για να χαρακτηριστεί καλύτερα αυτός ο συσχετισμός, η ομάδα του Oza et al δημοσίευσε μία αναδρομική ομάδα μελέτης συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της IVF σε 120 ασθενείς με IBD με 470 ίδιας ηλικίας άτομα ελέγχου. Παρόλο που δεν μετρήθηκε ο ρυθμός εμφύτευσης, ο μέσος αριθμός μεταφερόμενων εμβρύων (2) ήταν ίδιος για κάθε ομάδα. Δεν υπήρχε καμία διαφορά στον ρυθμό κλινικής εγκυμοσύνης στον πρώτο κύκλο για κάθε ασθενή ( $P=.18$ ). Επιπλέον, ο συσσωρευτικός ρυθμός γέννησης υγιών παιδιών μετά από 6 κύκλους IVF ήταν ισότιμος μεταξύ των δύο ομάδων ( $P=.13$ ). Επομένως, παρόλο που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα αυτό το θέμα, δεν υπάρχει τωρινά δεδομένα που να προτείνουν πως η IBD νόσος επιδρά αρνητικά στην εμφύτευση.

#### 4.5.5) Παχυσαρκία:

Η επίπτωση της παχυσαρκίας στις Ηνωμένες πολιτείες έχει αυξηθεί ουσιαστικά από την αρχή της ART 35 χρόνια πριν. Σήμερα περισσότερο από το 35% των γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία είναι παχύσαρκες ( $BMI \geq 30 \text{kg/m}^2$ ). Οι παχύσαρκες γυναίκες είναι πιο πιθανό να είναι υπογόνιμες και έχουν φτωχή μαιευτική έκβαση. Επομένως, η παχυσαρκία είναι κοινός και τροποποιητικός παράγοντας κινδύνου για χαμηλούς ρυθμούς εγκυμοσύνης και τόσο μητρική όσο και νεογνική νοσηρότητα μετά από IVF.

Η συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και IVF αποτελέσματα έχει ευρέως μελετηθεί. Η πιο αποτελεσματική μελέτη σχεδιάστηκε να απομονώσει την επίδραση της παχυσαρκίας από τον ρυθμό εμφύτευσης μετά από IVF εξετάζοντας τους λήπτες από δωρεά ωαρίων. Δύο μεγάλες ανασκοπικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν για τον παραπάνω σχεδιασμό. Η μεγαλύτερη έρευνα εξέτασε την 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology Registry και περιελάμβανε 22,317 κύκλους δωρεάς ωαρίων. Οι λήπτες με BMIs μεταξύ 30 και  $34.9 \text{kg/m}^2$  είχαν χαμηλότερο ρυθμό εμφύτευσης από τους φυσιολογικούς ασθενείς με  $BMI 18.5-24.9 \text{kg/m}^2$  ( $P<.001$ ). Ωστόσο αυτή η μελέτη δεν παρείχε πληροφορίες για το BMI δωτών ωαρίων, περιορίζοντας την ικανότητα να απομονωθεί η επίπτωση της παχυσαρκίας στην εμφύτευση. Αντιθέτως, η ομάδα του Bellver et al εξέτασε την επίδραση των αυξημένων σε BMI ληπτών στα IVF αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας μόνο δώτες ωαρίων με  $BMI < 25 \text{kg/m}^2$ . Σε αυτήν την μελέτη ο ρυθμός της εμφύτευσης για τους λήπτες με  $BMI \geq 30 \text{kg/m}^2$  ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτούς με  $BMI < 30 \text{kg/m}^2$  ( $P<.001$ ). Επομένως, παρόλο που οι αναδρομικές μελέτες χρειάζεται να χαρακτηρίσουν σαφέστερα αυτό το φαινόμενο, οι διαθέσιμες ενδείξεις προτείνουν πως η παχυσαρκία επιδρά αρνητικά στην πιθανότητα καλής πρόγνωσης εμφύτευσης εμβρύου.

#### 4.5.6) Κάπνισμα:

Το κάπνισμα παρίσταται ως ένας ακόμη τροποποιητικός παράγοντας που επιδρά ουσιαστικά στην αναπαραγωγική επιτυχία. Παρόλο που η επίπτωση του καπνίσματος έχει μειωθεί σημαντικά, 1 στους 5 ενήλικες είναι ακόμη ενεργητικοί καπνιστές. Η αρνητική επίπτωση του καπνίσματος στην ωθητική λειτουργία είναι πολύ καλά καθιερωμένη. Ένας αριθμός από μελέτες έχει επίσης κατευθυνθεί στην επίδραση του καπνίσματος στην εμφύτευση μετά από την IVF θεραπεία.

Οι περισσότερες μελέτες που εξετάζουν την επίπτωση της χρήσης του τσιγάρου στα IVF αποτελέσματα συγχέονται με την θετική συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και μητρικής ηλικίας. Ωστόσο, σε μία μετά-ανάλυση, η ομάδα του Waylen et al αναγνώρισε 9 μελέτες στις οποίες

ελέγχονταν και η μητρική ηλικία. Αυτή η ανάλυση 1,480 ασθενών απέδειξε πως οι πιθανότητες για κλινική εγκυμοσύνη μετά από IVF ήταν σημαντικά χαμηλά για καπνιστές παρά για μη-καπνιστές ( $P < .0001$ ). Για να απομονωθεί η επίδραση του καπνίσματος στην ενδομητρική δεκτικότητα, η ομάδα του Soares et al χρησιμοποίησε το μοντέλο ληπτών δωρεάς ωαρίων. Σε αυτήν την αναδρομική μελέτη των 785 ληπτών, οι συγγραφείς σύγκριναν τους βαριά καπνιστές λήπτες (>10 τσιγάρα ανά μέρα) με τους ελαφρά καπνιστές και μη καπνιστές, αφού ελέγχθηκε η χρήση καπνού από τους δώτες ωαρίων. Ο ρυθμός κλινικής εγκυμοσύνης ήταν σημαντικά χαμηλότερος για τους βαριά καπνιστές λήπτες ( $P = .02$ ).

Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι πως η αρνητική επίπτωση του καπνίσματος εκτείνεται και στους μη καπνιστές που εκτίθονται στον καπνό από δεύτερο χέρι. Η ομάδα του Benedict et al βρήκε πως η κοτινίνη, ένας μεταβολίτης της νικοτίνης, είναι παρούσα στο ωοθυλακικό υγρό σε 1,909 μη καπνίστριες γυναίκες κατά τη διάρκεια της IVF θεραπείας. Αυτοί οι ασθενείς είχαν 52% αυξημένο κίνδυνο αποτυχημένης εμφύτευσης σε σχέση με μη καπνίστριες αρνητικές στην κοτινίνη. Επομένως, η χρόνια έκθεση παθητικών καπνιστών καταλήγει επίσης σε μειωμένη ανεπάρκεια εμφύτευσης και πρέπει να συμβουλευούνται οι ασθενείς για την αποφυγή οποιασδήποτε έκθεσης.

#### 4.5.7) Αυτοανοσία:

1) Ο πιθανός ρόλος των αυτοάνοσων διαταραχών στα περιορισμένα αποτελέσματα της ART θεραπείας έχουν εκτενώς ερευνηθεί. Η καθιερωμένη σχέση μεταξύ απώλειας δεύτερου τριμήνου κύησης και των αντιφωσφολιπιδιακών αντισωμάτων (APLAs), οδήγησε μερικούς ερευνητές να αξιολογήσουν τον ρόλο αυτών των αντισωμάτων στην αποτυχημένη εμφύτευση και στις πρόωρες κλινικές αποβολές. Μία μετα-ανάλυση πολλαπλών μελετών απέδειξαν πως η παρουσία των APLAs δεν επηρεάζει τον ρυθμό εγκυμοσύνης. Επομένως, η κλινική ανίχνευση των APLAs σε ασθενείς οι οποίοι θεωρούνται κλινικά υπογόνιμοι, δεν υποδεικνύεται.

Τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) είναι διακεκριμένα στο εμφυτευτικό και μεταεμφυτευτικό ενδομήτριο. Είναι σχεδόν ενστικτώδης πως οι ανωμαλίες στην δραστικότητα των NK κυττάρων μπορεί να επιδρά στα κλινικά αποτελέσματα. Δυστυχώς, η βιβλιογραφία έχει μπερδευτεί από τις προσπάθειες που έγιναν για να μετρηθούν τα NK κύτταρα στην περιφερειακή κυκλοφορία ως ένας προγνωστικός τρόπος της πυκνότητας των NK κυττάρων ή λειτουργίας τους στο ενδομήτριο. Δεν υπάρχει κανένας φυσιολογικός λόγος για την υπόθεση πως οποιαδήποτε τέτοια σχέση υπάρχει. Μάλιστα ο αριθμός των NK κυττάρων στην περιφερειακή κυκλοφορία και στο ενδομήτριο δεν συσχετίζονται. Υποψήφιες κλινικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν σημαντικές σχέσεις μεταξύ ART αποτελεσμάτων και κλινικών ανιχνεύσεων των NK κυττάρων (είτε περιφερειακά είτε ενδομητρικά).

Παρόλο που απλές μελέτες της συγκέντρωσης των NK κυττάρων δεν είναι κλινικά χρήσιμες, οι μελέτες που αξιολογούν την ποικιλία στην λειτουργία κινούν περισσότερο την περιέργεια. Τα NK κύτταρα εμπλέκονται στην πρόιμη αναδιαμόρφωση των μητρικών στρωματικών και αγγειακών διαμερισμάτων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην μορφοποίηση των λαχνών. Τα NK κύτταρα ενεργοποιούνται από το ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρων – C (HLA-C), το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των εισχωρητικών τροφοβλαστών. Ο συνδυασμός των τύπων υποδοχέα φονικής ανοσογλοβίνης με την φυσική έκφραση του HLA-C έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο απώλειας κλινικής εγκυμοσύνης και με πλακουντιακή ανεπάρκεια στο τρίτο τρίμηνο.

Πρόσφατα δεδομένα επεκτείνουν αυτά τα ευρήματα προτείνοντας τους δυσμενείς συνδυασμούς του γονότυπου υποδοχέα μητρικής φονικής ανοσογλοβίνης και γονότυπους εμβρυικού HLA-C που προμηνύουν μειωμένα αποτελέσματα σε κύκλους δωρεάς ωαρίων. Η κλινική ανίχνευση δεν υποδεικνύεται για την ώρα αλλά παραμένει μία περιοχή ενεργής έρευνας.

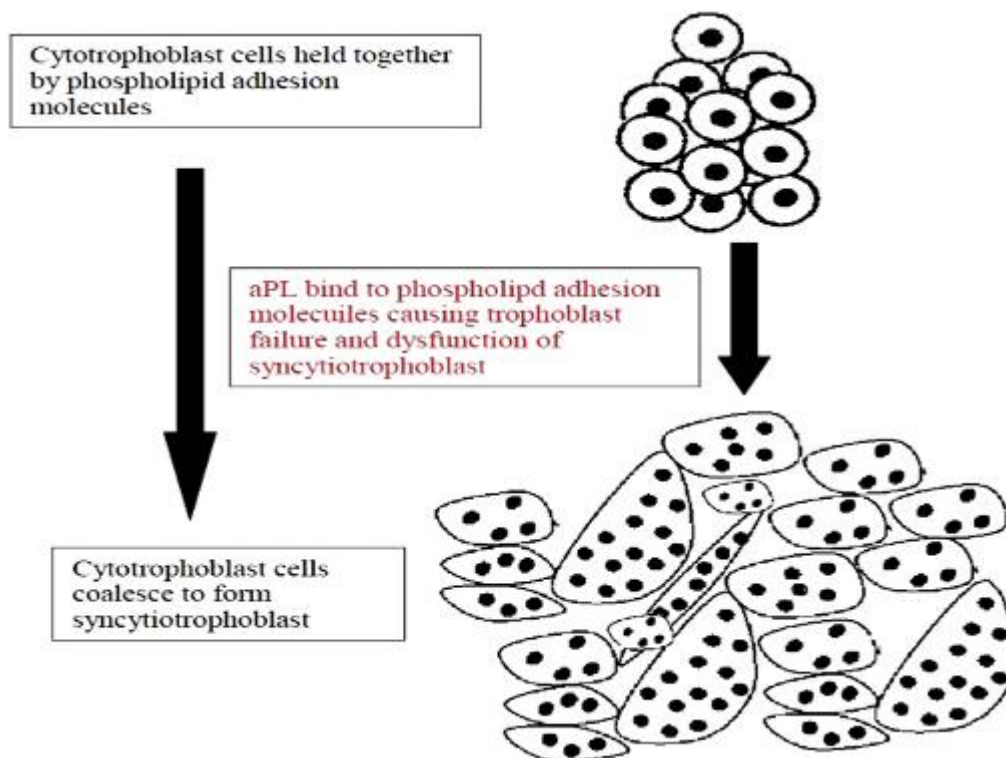
Κανένας αξιολογημένος δείκτης αυτοάνοσης δυσλειτουργίας δεν έχει αποδείξει μέχρι σήμερα καμία κλινική αξία. Ωστόσο, μερικοί ερευνητές παραμένουν ανήσυχοι πως μία διαταραγμένη ανοσοποιητική λειτουργία επιδρά δυσμενώς στα κλινικά αποτελέσματα. Δοκιμές εμπειρικών θεραπειών χρησιμοποιώντας αντιπηκτικά, ενδολιπίδια ή ενδοφλέβια ανοσογλοβουλίνη παράγει μεικτά αλλά γενικώς αρνητικά αποτελέσματα. Οι εμπειρικές θεραπείες δεν υποδεικνύονται για την



ώρα. <sup>(10)</sup>

2) Η ενδομητρίωση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδομητρικού ιστού στις ωοθήκες, στη θήκη του Douglas και σε άλλες έκτοπες θέσεις, συναντάται στο 10-15% γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία και στο 20-50% υπογόνιμων γυναικών. Η ενδομητρίωση έχει αναφερθεί πως επηρεάζει πολλά στάδια της αναπαραγωγής, από την ωοθυλακιογένεση στην ωοθυλακιορρηξία, την στεροειδογένεση κοκκωδών κυττάρων, την γονιμοποίηση και τα αποτελέσματα της IVF, ενώ υπάρχει περιορισμένη ένδειξη για την απώλεια κύησης. Η αυτοανοσία μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ενδομητρίωση σε ένα σημαντικό αριθμό περιπτώσεων με τόσο οργανο-ειδικά ή μη-ειδικά αντισώματα ορού που συχνά αναφέρονται και πιο συγκεκριμένα σε καταστάσεις όπου στοχεύονται ενδομητρικά αντιγόνα με IgG και IgM ισότοπα, τα οποία βρίσκονται στο 60% των ασθενών. Αντι-ενδοθηλιακά, αντι-ωοθηκικά και αντι-θυροειδικά αυτοαντισώματα έχουν επίσης βρεθεί κοινώς υπό την παρουσία της ενδομητρίωσης, καθώς το IgG που κατευθύνεται στην λαμινίνη-1 συναντάται σε καταστάσεις σχετιζόμενες με ενδομητρίωση υπογονιμότητας. Οι λαμινίνες είναι κρίσιμες για την κυτταρική διαφοροποίηση, σχήμα, κίνηση, συντήρηση ιστικού φαινοτύπου και προώθηση ιστικής επιβίωσης, και έτσι θεωρούνται απαραίτητες τόσο για την πρόιμη εμβρυική προεμφυτευτική διαδικασία όσο και για την επακόλουθη οργανογένεση. Η κωδικοποίηση του mRNA των αλυσίδων α1, β1 και γ1 της λαμινίνης βρέθηκε να πραγματοποιείται στο 90% ενδομητρικών αλλοιώσεων. Επιπλέον, δύο πρωτείνες μοριακού βάρους 30 και 45kDa αντίστοιχα, περιγράφηκαν ως ανοσοκυρίαρχα τόσο για τα IgG όσο και για τα IgM αυτοαντισώματα σε μία μεγάλη σειρά ασθενών και η δραστηρότητα τους μέσω ανοσοιστοχημείας τόσο στα κορυφαία και αδενικά επιθήλια όσο και στο στρώμα. Τέλος, η απόπτωση μειώνεται στο μητρικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση και περαιτέρω μείωση στις ενδομητρικές καταβολές, πιθανότατα ενισχύοντας την κατάρρευση της ανοχής όπως συμβαίνει και στις υπόλοιπες αυτοάνοσες ασθένειες.

3) Είναι καλά καθιερωμένο πως τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL) επιδρούν στα μόρια προσκόλλησης μεταξύ των στοιχείων της συγκυτιοτροφοβλάστης καθώς τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν φωσφολιπίδια, και τα aPL μπορεί να καταστρέψουν την ανεξάρτητη τροφοβλάστη υπό την παρουσία θρομβώσεων, όπως παρατηρήθηκε *in vitro*. Παρομοίως, γυναίκες με aPL εκδηλώνουν ιστολογικά μειωμένες αγγειοσυγκυτιακές μεμβράνες, αυξημένους συγκυτιακούς κόμβους και πρόωρη γήρανση των λαχνών με νέκρωση, όπως αναπαριστάται στην εικόνα. Τα aPL απαιτούν έναν συμπαράγοντα (β2GP1) και την προσδεδεμένη μορφή δισθενών IgG-β2GP1 συμπλεγμάτων που έχουν αυξημένη συγγένεια για μεμβρανικά φωσφολιπίδια, καταλήγοντας στην τροφοβλαστική βλάβη μέσω της δράσης κυτοκινών. Επίσης, αυτό το σύμπλεγμα μπορεί να διαλύσει τα μόρια προσκόλλησης της τροφοβλάστης και να καταλήξει σε μειωμένη γονιμότητα όπως δείχθηκε σε μοντέλα ποντικών, μέσω ανωμαλιών στα NK κύτταρα. Ενώ υπάρχει σημαντική συσχέτιση αυτών των αντισωμάτων με την απώλεια κύησης, την κυτταρική διαίρεση και την φυσιολογική λειτουργία της τροφοβλάστης, είναι απαραίτητο να ερευνηθεί εκτενέστερα για τις επιδράσεις τους στην εμφυτευτική διαδικασία. <sup>(13)</sup>



Εικόνα 33: Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα που δρουν στην τροφοβλάστη

4.6) Η δράση της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης στον συγχρονισμό της δημιουργίας και ανάπτυξης διεπαφής εμβρύου – ενδομητρίου:

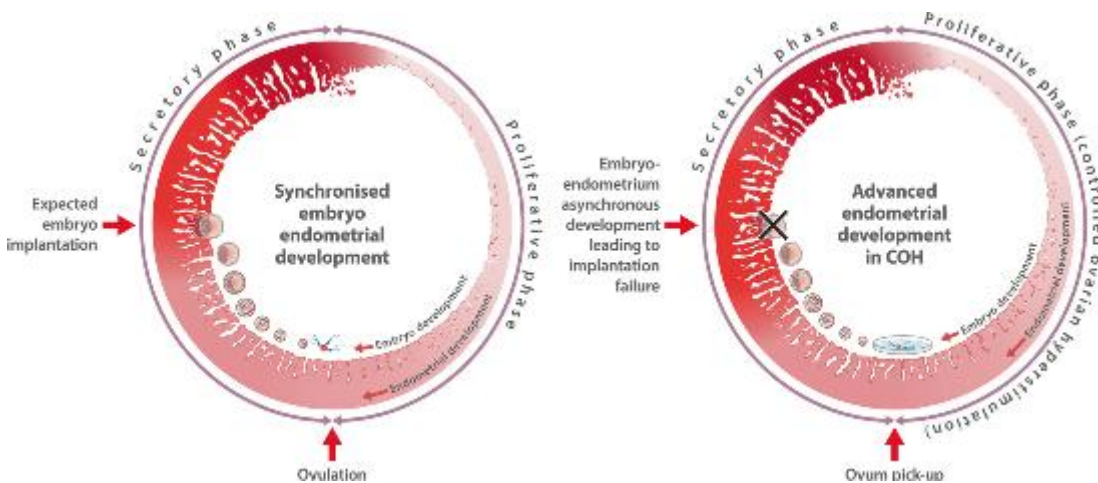
#### 4.6.1) *Controlled ovarian stimulation* (ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση):

Η ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση χρησιμοποιείται συνεχώς σε IVF κύκλους για να εξασφαλίσει πολλαπλή ωοθυλακική ανάπτυξη. Η σχετιζόμενη ανώτερη από την φυσιολογική συγκέντρωση ορμονών στον ορό μπορεί να καταστρέψει μία άριστη ενδομητρική δεκτικότητα και την εμβρυική εμφύτευση, διαταράσσοντας τον συγχρονισμό εμβρύου – ενδομητρίου και/ή προωθώντας μία παθολογική ενδομητρική ανάπτυξη.

Υπάρχουν αποδείξεις από ιστολογικές παρατηρήσεις πως η ωοθυλακική υπερδιέγερση για IVF αλλάζει κατά βάθος την ενδομητρική ανάπτυξη. Σε κύκλους διέγερσης, η προχωρημένη ενδομητρική ανάπτυξη με πρόωρες εκκριτικές αλλαγές παρατηρούνται κοινώς την ημέρα ανάκτησης του ωαρίου. Ανώμαλη ενδομητρική ανάπτυξη με σημαντικά ασύμφωνη στρωματική ωρίμανση παρατηρήθηκε 2 ημέρες μετά την ανάκτηση ωαρίου σε πάνω από το 91% γυναικών που υποβλήθηκαν σε ωοθηκική υπερδιέγερση για IVF. Η ασύγχρονη αδενική και στρωματική διαφοροποίηση είχε επίσης κοινώς παρατηρηθεί στο ενδομήτριο μέσης ωχρινικής φάσης μετά από ωοθηκική υπερδιέγερση. Μία πρόσφατη μελέτη που σύγκρινε ιστολογικά το ενδομήτριο γόνιμων γυναικών, γόνιμων γυναικών που υποβλήθηκαν σε ορμονική διέγερση για δωρεά ωαρίων και υπογόνιμων γυναικών που υποβλήθηκαν μεταφορά φρέσκων ωαρίων σε έναν ART κύκλο, με περαιτέρω συγκρίσεις μεταξύ γυναικών που κυοφόρησαν και αυτών που δεν επιτεύχθηκε κύηση, αποδείχθηκε πως η ενδομητρική ιστολογία άλλαξε δραματικά λόγω της διέγερσης για ART. Ωστόσο, οι γυναίκες που κατάφεραν να εγκυμονήσουν παρουσίασαν σημαντικά λιγότερες ιστολογικά ενδομητρικές αλλαγές.

Αντιθέτως με τον φυσικό κύκλο, η έκφραση των υποδοχέων οιστραδιόλης και προγεστερόνης απορυθμίστηκε στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε IVF κύκλους με ωοθηκική υπερδιέγερση. Ένα διαφορετικό μοτίβο γονιδιακής έκφρασης παρατηρήθηκε μετά από ωοθηκική υπερδιέγερση τόσο στο ενδομήτριο μετά την ωοθυλακιορρηξία όσο και στο ενδομήτριο μετά από την εμφύτευση. Τα

υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης στον ορό από την ωθητική υπερδιέγερση επηρεάζουν το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης ενδομητρίου και τροποποιεί την έκφραση υποδοχέων στεροειδών. Αυτά οδηγούν σε μία προχωρημένη απάντηση του ενδομητρίου στα στεροειδή κατά την διάρκεια ωχρινικής φάσης, με επακόλουθη ραγδαία ή πρόωμη εκκριτική διαμόρφωση και/ή ανώμαλη ενδομητρική ανάπτυξη.



Εικόνα 34: Η ελεγχόμενη ωθητική υπερδιέγερση σε IVF κύκλους οδηγεί σε αναντίστοιχες λειτουργίες του ενδομητρίου. Οι αυξημένες σε σχέση με τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις στεροειδών ορμονών του ορού κατά την ωθητική υπερδιέγερση μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την δεκτικότητα της μήτρας διαταράσσοντας τον συγχρονισμό εμβρύου – ενδομητρίου. Αυτή η εικόνα αποδεικνύει την ιδέα της προχωρημένης ενδομητρικής ανάπτυξης, καταλήγοντας σε αυξημένη εμβρύου – ενδομητρίου ασυμφωνία στην ωθητική υπερδιέγερση και φυσικά σε αποτυχημένη εμφύτευση.

#### 4.6.2) Η αντίστοιχη ενδομητρική λειτουργία ως αποτέλεσμα της ελεγχόμενης ωθητικής διέγερσης:

Φτωχά μαιευτικά και περιγεννητικά αποτελέσματα έχουν συχετιστεί με εγκυμοσύνες μέσω της ART διαδικασίας. Μία αναδρομική ομάδα μελέτης με 6730 μονήρεις γεννήσεων μετά από ART στην Βικτόρια, Αυστραλίας έχει αποδείξει πως όλες οι μαιευτικές αιμορραγίες ήταν πιο συχνές σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF/ICSI διαδικασίες από ότι στον γενικό πληθυσμό. Μία διερευνητική ανάλυση των παραγόντων στην IVF/ICSI ομάδα πρότεινε πως τα γεγονότα από την στιγμή της εμφύτευσης και τα ακόλουθα, είναι υπεύθυνα για την αύξηση μεταγενέστερων μαιευτικών αιμορραγιών. Αυξημένη προγεννητική αιμορραγία συνδέεται με μεταφορά φρέσκων ωαρίων και με έναν υψηλό αριθμό ωαρίων που συλλέχτηκαν, προτείνοντας μία άμεση συσχέτιση με την ελεγχόμενη ωθητική υπερδιέγερση. Αυτό υποστηρίζει την ιδέα πως η αντίστοιχη ενδομητρική λειτουργία είναι κρίσιμη την στιγμή της εμφύτευσης.

Μία πρόσφατη μελέτη ανέφερε πως το βάρος γέννησης ήταν χαμηλότερος στην μεταφορά γαμετών εντός σαλπίνγων (GIFT) και στην μεταφορά φρέσκων εμβρύων από ότι μετά την μεταφορά κατεψυγμένων εμβρύων (FET). Τα αποτελέσματα για την FET διαδικασία ήταν παρόμοια και στις συλλήψεις δίχως ART παρέμβασης, αποδεικνύοντας πως οι εργαστηριακές διαδικασίες IVF/ICSI δεν επηρέζαν τα έμβρυα. Το λογικό συμπέρασμα από αυτήν την μελέτη είναι πως η ωθητική διέγερση που χρησιμοποιείται σε κύκλους με φρέσκα έμβρυα προκαλεί το πρόβλημα είτε καταστρέφοντας τον συγχρονισμό εμβρύου – ενδομητρίου είτε παράγοντας μία παθολογική ενδομητρική ανάπτυξη, οδηγώντας στην αντίστοιχη εμφύτευση και αυτομάτως προκαλώντας την γέννηση χαμηλού βάρους νεογνών με ART.

Μία πρόσφατη συστηματική έρευνα και μέτα-ανάλυση από 11 παρατηρούμενες μελέτες ανέφεραν πως μονήρεις κήσεις από FETs συσχετίζονται με χαμηλότερο ρίσκο περιγεννητικής θνησιμότητας, μικρής ηλικίας κήσης νεογνά, πρόωρου τοκετού, χαμηλού βάρους παιδιά και προγεννητικές αιμορραγίες συγκριτικά με αυτές από φρέσκα ETs. Οι συγγραφείς με βάση αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν την συσχέτιση ενός περισσότερο φυσικού μητρικού περιβάλλοντος σε FET κύκλους, το οποίο είναι πιο ευνοϊκό για την δημιουργία πλακούντα και την εμβρυογένεση. Αυτό το συμπέρασμα

υποστηρίζεται από τα ευρήματα προηγούμενων μελετών.

Μερικά IVF προγράμματα πλέον προωθούν την στρατηγική κατάψυξης όλων των εμβρύων για να βελτιώσουν τα αποτελέσματα από IVF εγκυμοσύνες. Η ευρέως αποδεκτή υπόθεση του Barker υποστηρίζει πως άνθρωποι με χαμηλός βάρος γέννησης βρίσκονται σε μεγαλύτερο ρίσκο ανάπτυξης χρόνιων ασθενειών αργότερα στην ζωή τους. Ως προς την σημασία πιθανών μακροπρόθεσμων επιπτώσεων από χαμηλό βάρος γέννησης παιδιών, απαιτούνται περαιτέρω αποδείξεις σχετικά με τις επιδράσεις της ωοθηκικής υπερδιέγερσης στην εμφύτευση και στην επακόλουθη εγκυμοσύνη. Η τρέχουσα πρακτική μεταφοράς φρέσκων εμβρύων ίσως πρέπει να περιοριστεί ή εξαφανιστεί, εάν προκύψει περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με την αρνητική επίδραση της ωοθηκικής υπερδιέγερσης στον συγχρονισμό εμβρύου – ενδομητρίου και το επακόλουθο αποτέλεσμα κύησης. Η κατάληξη αυτού είναι η πραγματοποίηση της μεταφοράς εμβρύου μόνο όταν το ενδομήτριο δεν έχει εκτεθεί σε ωοθηκική διέγερση και βρίσκεται σε αναπτυξιακό συγχρονισμό με το έμβρυο. Μία συμβιβαστική προσέγγιση σε αυτό το πρόβλημα, είναι η χαμηλών δόσεων διέγερση που έχει αναπτυχθεί στην προσπάθεια να ελαττώσει τις επιβλαβείς επιδράσεις μίας επιθετικής παραδοσιακής ελεγχόμενης ωοθηκικής υπερδιέγερσης.

#### *4.6.3) Πρόωρη ωχρινοποίηση κατά τη διάρκεια IVF κύκλων:*

Στην πολλαπλασιαστική φάση ενός φυσικού κύκλου, τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι συνήθως <0,5ng/ml. Τα επίπεδα της προγεστερόνης στον ορό αρχίζουν να ανεβαίνουν στην όψιμη ωοθυλακική φάση πριν το κύμα της LH, με τα επίπεδα των >5ng/ml να ανιχνεύονται μετά την ωοθυλακιορρηξία. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν πως σε IVF κύκλους με ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση, μία ταπεινή αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης στον ορό πριν την χορήγηση της hCG για την επαγωγή της τελικής ωρίμανσης ωαρίων, σχετίζεται με χαμηλούς ρυθμούς εγκυμοσύνης και υψηλούς ρυθμούς απώλειας κύησης.

Η συσχέτιση μεταξύ αυξημένης προγεστερόνης και χαμηλού ρυθμού εγκυμοσύνης μπορεί να εξηγηθεί μέσω της έννοιας συγχρονισμού εμβρύου – ενδομητρίου. Σε έναν φυσικό κύκλο, η έκθεση της μήτρας σε αυξημένα επίπεδα προγεστερόνης μετά την ωορρηξία ωθεί την έναρξη της διαμόρφωσης ενδομητρίου στην εκκριτική φάση και την επίτευξη δεκτικότητας για την εμφύτευση. Μία πρόωρη αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης σε φρέσκους IVF κύκλους ως συνέπειες της ωοθηκικής υπερδιέγερσης ωθεί την πρόωμη διαμόρφωση του ενδομητρίου, οδηγώντας σε προχωρημένη ενδομητρική ανάπτυξη και επακόλουθη αύξηση ασυμφωνία εμβρύου – ενδομητρίου και φυσικά χαμηλότερους ρυθμούς εγκυμοσύνης.<sup>(14)</sup>

## Συμπεράσματα/ Συζητήσεις:

Η εμφύτευση εμβρύου είναι το αποτέλεσμα μίας άριστα ενορχηστρωμένης συχνότητας γεγονότων συμπεριλαμβανομένων την σηματοδότηση, την αναγνώριση, την κυτταρική προσκόλληση, την εισχώρηση και μηχανισμούς ανοσοποιητικής ρύθμισης, μερικά από τα οποία ελέγχονται μέσω γενετικών διαδικασιών από τις ωοθηκικές ορμόνες. Έχει προταθεί πως η εμβρυική εμφύτευση είναι μία καλά καθορισμένη και ακριβής διαδικασία, στην οποία ποικίλοι παράγοντες μπαίνουν στο παιχνίδι ο ένας μετά τον άλλο, παραμένοντας ωστόσο σε μία στενή συνεργασία. Είναι μάλλον τρομερή έκπληξη πως τις περισσότερες μέρες του εμμηνορρυσιακού κύκλου, το ενδομήτριο είναι αισθητά εχθρικό απέναντι στο έμβρυο. Επομένως, μία τεράστια φυσιολογική προσπάθεια από το ενδομήτριο χρειάζεται για να αντιστραφεί αυτή η παράδοση συνθήκη προκειμένου να γίνει δεκτικό για την εμφύτευση εμβρύου.

Τα αυξανόμενα επίπεδα οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του πρώτου μέρους εμμηνορρυσιακού κύκλου, ενισχύουν τον ενδομητρικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επακολούθως την ωοθυλακιωρρηξία, τα επίπεδα προγεστερόνης που εκκρίνονται από τα ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια οδηγούν στην διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων. Σε αυτό το σημείο, το ενδομήτριο είναι ώριμο και έτοιμο για την εμβρυική εμφύτευση. Αυτή η διαδικασία είναι αυστηρά ελεγχόμενη τόσο χρονικά όσο και χωρικά. Ο άριστος συγχρονισμός της διάρκειας του “παραθύρου” εμφύτευσης είναι κρίσιμος και φαίνεται να είναι μερικώς κάτω από την επιρροή των προσταγλανδινών. Επομένως, γίνεται πλήρως κατανοητό πως μία επιτυχημένη εμφύτευση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία απαιτώντας ένα δεκτικό ενδομήτριο, ένα βιώσιμο έμβρυο και έναν συγχρονισμένο διάλογο ανάμεσα στις μητρικούς και εμβρυικούς ιστούς. Υπάρχει αυξημένη επίγνωση πως η ρουτίνα των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται στην IVF διαδικασία μπορούν να διαταράξουν την ενδομητρική ανάπτυξη, άρα και την συμφωνία ενδομητρίου – εμβρύου. Η IVF και οι τεχνικές εμβρυικής καλλιέργειας, συγκεκριμένα το εμβρυοσκόπιο (embryoscope), επιτρέπει την ακριβή αξιολόγηση της εμβρυικής ωρίμανσης. Αντιστρόφως, οι εκτιμήσεις για την ανάπτυξη του ενδομητρίου βασίζονται με την μέτρηση έκθεσης στην προγεστερόνη, που μπορεί να είναι ανακριβής. Επίσης, υπάρχει η ιστολογική αξιολόγηση που απαιτεί βιοψία ενδομητρίου και δεν είναι εφικτό να γίνει στον ίδιο κύκλο που η γυναίκα υπέστη εμβρυομεταφορά. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μία μη επεμβατική τεχνική για την φανέρωση ενδομητρικής εμφάνισης και είναι η υπερηχογραφική αξιολόγηση, όπου το το μοτίβο τριών στιβάδων μετά την χορήγηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) συσχετίζεται με υψηλότερους ρυθμούς εμφύτευσης. Παρόλο που το ενδομητρικό πάχος είναι η πιο καλά μελετημένη υπερηχογραφική παράμετρος, δεν μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια την ιστολογική χρονολόγηση. Δηλώνεται με σιγουριά πως ένας βελτιωμένος συγχρονισμός ανάπτυξης εμβρύου – ενδομητρίου βασίζεται σε μία καλύτερη αξιολόγηση ενδομητρικής ανάπτυξης, χρησιμοποιώντας προτιμότερα μία μη επεμβατική προσέγγιση στον κύκλο της μεταφοράς εμβρύου.

Κατά την διάρκεια του “παραθύρου” εμφύτευσης και την προεμφυτευτική περίοδο, το έμβρυο διαπερνά τον σαλπγγικό σωλήνα, ο οποίος του παρέχει για τις πρώτες μέρες ανάπτυξης του το απαραίτητο θρεπτικό περιβάλλον και το μέσο επικοινωνίας με την μήτρα. Αυτή πραγματοποιείται μέσω συνεργασίας εμβρυικών secretome, σαλπγγικών επιθηλίων και φθαρτοποιημένων εκκρινικών παραγόντων. Επομένως, ο σαλπγγικός σωλήνας δεν αποτελεί μόνο τον κινητικό μεταφορέα του εμβρύου αλλά προετοιμάζει το έδαφος στέλνοντας και λαμβάνοντας σήματα (όπως είναι τα σήματα της IL-3, IL-1 και IL-8) μεταξύ εμβρύου – μήτρας για να επιτευχθεί η μετέπειτα εμφύτευση.

Όταν η βλαστοκύστη εισέλθει εντός της μήτρας μέσω ενός σαλπγγικού σωλήνα, 4 ημέρες μετά την ωοθυλακιωρρηξία, φαίνεται να κινείται ελεύθερα στην μητρική κοιλότητα. Οι σελεκτίνες έχουν προταθεί να παίζουν έναν σημαντικό ρόλο σε αυτήν την φάση εξασφαλίζοντας μία αρμόδια “κύλιση” (rolling) της βλαστοκύστης. Επειδή το ανθρώπινο έμβρυο απαιτείται για να προσκολληθεί στο ενδομήτριο με ένα πολωμένο τρόπο και επειδή το έμβρυο ψάχνει την καλύτερη περιοχή του ενδομητρίου για εμφύτευση, το φαινόμενο της “κύλισης” είναι αυστηρώς ρυθμιζόμενο

προκειμένου να εξασφαλίσει πως η βλαστοκύστη θα εγκατασταθεί τελικώς στο κατάλληλο σημείο και με τον σωστό προσανατολισμό. Για να αποφευχθεί η περίπτωση προσκόλλησης της βλαστοκύστης στην περιοχή με λιγότερες πιθανότητες εμφύτευσης, ένας σημαντικός ρόλος παίζεται από την απωθητική ενέργεια της MUC-1. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η MUC-1 είναι ευρέως εκφραζόμενη σε όλο το μήκος του ενδομητρίου και αυξάνεται εντυπωσιακά πριν την εμφύτευση. Αυτό το φαινόμενο φαίνεται πως είναι κρίσιμο καθώς αποφεύγεται η προσκόλληση του εμβρύου σε λάθος τοποθεσία.

Σε συγκεκριμένες ενδομητρικές περιοχές, η έκκριση των χημειοκινών και των αυξητικών παραγόντων ελκύει την βλαστοκύστη να προσγειωθεί σε γνωστές πλατφόρμες που ονομάζονται πινοπόδια. Αυτά τα πινοπόδια είναι πλήρως αναπτυγμένα για μία με δύο ημέρες και εκτείνονται στην κορυφή των μικρολαχνών, εκφράζοντας την απωθητική MUC-1. Σε αυτό το στάδιο, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως είναι οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες παρεμβαίνουν για να εξασφαλίσουν την σύνδεση μεταξύ εμβρύου και ενδομητρίου. Παρόλο που αυτή η προοπτική της σειράς γεγονότων που περιγράφηκαν μπορεί να παρουσιάζεται απλοϊκή, αντιθέτως βοηθάει στην συνειδητοποίηση πως διαφορετικοί δείκτες της ενδομητρικής δεκτικότητας είναι κρίσιμοι σε διαφορετικές στιγμές.

Μία ποικιλία μοριακών μεσολαβητών, πιο συγκεκριμένα αυτοί που εκφράζονται στο ενδομήτριο κατά την περίοδο της εμβρυικής εμφύτευσης, έχουν αναγνωριστεί ως πιθανοί δείκτες της ενδομητρικής δεκτικότητας. Οι πιθανοί δείκτες περιλαμβάνουν τα μητρικά φυσικά φονικά κύτταρα, τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, τις κυτοκίνες, τους αυξητικούς παράγοντες και άλλοι, όπως είναι η καλσιτονίνη και homeobox γονίδια. Τα μητρικά φυσικά φονικά κύτταρα (uNK) είναι αδενικά λεμφοκύτταρα και προέρχονται από αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα στον μυελό των οστών, παίζοντας έναν ρόλο στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα uNK κύτταρα πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου και αποτελούν το 70% των ενδομητρικών λευκοκυττάρων την στιγμή της εμβρυικής εμφύτευσης. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν μία ποικιλία αγγειογενετικών και χημειοελκτικών παραγόντων που διευκολύνουν την αγγειακή αναδιαμόρφωση και την τροφοβλαστική εισχώρηση κατά την διάρκεια πλακουντιακής ανάπτυξης. Έχει προταθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγική αποτυχία, ενώ τα αποτελέσματα από βιβλιογραφίες παραμένουν αμφιλεγόμενα. Υπάρχει επίσης μία ομοφωνία στην βιβλιογραφία σχετικά με την μέθοδο συγχρονισμού και εύρους αναφοράς του αριθμού των uNK κυττάρων ως διαγνωστικά τεστ.

Η ανβ3 ιντεγκρίνη είναι ένα μόριο προσκόλλησης. Η μέτρηση της ενδομητρικής ανβ3 ιντεγκρίνης προσφάτως προσφέρθηκε ως κλινικό τεστ για την αξιολόγηση της ενδομητρικής δεκτικότητας. Ωστόσο, η ένδειξη είναι αμφιλεγόμενη, καθώς επακόλουθες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων γυναικών. Η ενδομητρική έκφραση της ανβ3 ιντεγκρίνης επίσης έχει φτωχή επαναληψιμότητα και υψηλή μεταβλητότητα από κύκλο σε κύκλο. Ο ανασταλτικός παράγοντας λευχεμίας (LIF) είναι μία ιντερλευκίνη-6 (IL-6) κυτοκίνη που εμπλέκεται τόσο στην προσκολλητική όσο και στην εισχωρητική φάση της εμφύτευσης. Ενδείξεις προτείνουν πως η δυσλειτουργία έκφρασης της LIF μπορεί να συνεισφέρει στην αποτυχημένη εμφύτευση. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη LIF (r-hLIF) έχει προταθεί ως θεραπεία για την βελτίωση της ενδομητρικής δεκτικότητας σε ασθενείς με πρόσφατες επαναλαμβανόμενες αποτυχίες (RIF). Ωστόσο, μία μεγάλη πολυκεντρική τυχαίοποιημένη μελέτη απέτυχε να αποδείξει μία βελτίωση στον ρυθμό εμφύτευσης και εγκυμοσύνης μετά από θεραπεία με r-hLIF όταν συγκρίθηκε με γυναίκες που πήραν placebo και είχαν ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποτυχιών. Πολλά άλλα μόρια έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχημένη εμβρυική εμφύτευση. Αυτοί οι δείκτες περιλαμβάνουν προσταγλανδίνες και κυκλοοξυγενάσες, η MUC-1 γλυκοπρωτεΐνη, ορού- και γλυκοκορτικοειδή-επαγόμενες κινάσες, πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας και άλλοι. Φαίνεται απίθανο πως ένας μοναδικός μοριακός βιοδείκτης να είναι ικανός για την πρόβλεψη της μητρικής δεκτικότητας. Δεδομένου πως η διαδικασία της εμφύτευσης είναι ένα συνεχές γεγονός, η μητρική δεκτικότητα πρέπει καλύτερα να καθοριστεί από ένα συνδυασμό δεικτών – κλειδιών που υφίσταται στην περίοδο της εμφύτευσης.

Παρόλο τον πλούτο της γνώσης για τους ρόλους αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών, ομοιοτικών

γονιδίων, μεταγραφικών παραγόντων, ιοντικών καναλιών και λιπιδιακών μεσολαβητών στην αλληλεπίδραση μεταξύ εμβρύου – μήτρας, που έχει αποκτηθεί, το ιεραρχικό τους προσχέδιο στην κατεύθυνση μητρικής και εμβρυικής λειτουργίας κατά την εμφύτευση, παραμένει να κρυπτογραφηθεί. Η έννοια των πολλαπλασιαστικών επιπτώσεων ισχυρίζεται πως η ποιότητα της εμφύτευσης καθορίζει την ποιότητα της εγκυμοσύνης καθώς και την νεογνική ευεξία. Επομένως, η αποτυχία στην επίτευξη χρονικά ακριβής εμφύτευση είναι ένας παράγοντας κινδύνου για φυσιολογικό αποτέλεσμα κύησης. Αυτό σχετίζεται και κλινικά καθώς εάν η εμφύτευση δεν πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο “παράθυρο” ανθρώπων, οδηγεί σε αυθόρμητες απώλειες εγκυμοσύνης. Ένα επίπονο έργο που κείται μπροστά μας είναι να εκτυλίξουμε την πολύπλοκη φύση των σηματοδοτικών μονοπατιών στην εμφύτευση. Πρέπει να καταλάβουμε εάν αυτά τα μονοπάτια λειτουργούν ανεξάρτητα, παράλληλα ή συγκλίνουν σε ένα κοινό μονοπάτι για να εγκαθιδρύσουν ένα δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ εμβρύου και μήτρας που είναι απαραίτητο για εμφύτευση. Τα πειράματα στοχευμένων γονιδίων στα ποντίκια έχουν αναγνωρίσει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που είναι απαραίτητα για την θηλυκή γονιμότητα. Ωστόσο, αυτή η λίστα δεν είναι εξαντλητική και είναι πολύ πιθανό να επεκταθεί πάρα πολύ με τις αναδυόμενες και ραγδαία εξελικτικά νέες τεχνικές.

Παρόλο που πολυάριθμα μόρια εμπλέκονται στην διαδικασία της εμφύτευσης και έχουν ταυτοποιηθεί, η κατανόηση της ίδιας της διαδικασίας απέχει αρκετά από την ολοκλήρωση. Για παράδειγμα, πολλά από τα γονίδια που εκφράζονται με ένα εμφυτευτικό-ειδικό τρόπο και φαίνονται να είναι σημαντικά για την εμφύτευση δεν μπορούν να μελετηθούν σε βάθος γιατί η αφαίρεση αυτών των γονιδίων οδηγεί στην εμβρυική θνησιμότητα. Η μητρική- ή εμβρυική-ειδικά, εξαρτώμενη υπό όρους, εξάλειψη (knockout) γονιδίων που ενδιαφέρουν, χρειάζεται επείγοντως για να κατανοηθούν καλύτερα οι καθοριστικοί ρόλοι αυτών των γονιδίων στην μητρική βιολογία και εμφύτευση. Η αποτυχία μας να αναγνωρίσουμε κατάλληλους ενισχυτές ειδικοί για μητρικά κύτταρα, παρεμποδίζει την επίτευξη αυτού του σκοπού. Μία επιπρόσθετη δυσκολία στην ταυτοποίηση κρίσιμων ρόλων των σηματοδοτικών μορίων μέσα σε μία οικογένεια γονιδίων είναι οι περιττές ή οι ικανοποιητικές λειτουργίες των προϊόντων του γονιδίου μέσα στην οικογένεια.

Στρατηγικές που συγκρίνουν παγκόσμια προφίλ έκφρασης γονιδίων μεταξύ εμφυτευτικών και διαεμφυτευτικών σημείων, έχουν εντοπίσει νέα γονίδια στην διαδικασία της εμφύτευσης. Επομένως, μία προσέγγιση γονιδιακού εύρους ανίχνευσης συνδυαστικά με λειτουργικές εργασίες θα βοηθήσει να διευκρινιστούν αυτά τα περίπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια. Πρόσφατα, μία ανάλυση μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε για να εξερευνηθεί τις διαφορές μεταξύ ενεργών και αδρανών βλαστοκύστεων κάτω από καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Αυτή η ανάλυση συγκριτικά με τα προφίλ έκφρασης γονιδίων, ανάδειξε διακρίσεις στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, προτείνοντας πως συγκεκριμένοι μοριακοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην διατήρηση αδράνειας της βλαστοκύστης και στην ενεργοποίηση βλαστοκύστεων για εμφύτευση. Αυτή η επίγνωση της μοριακής βάσης των αδρανών βλαστοκύστεων παρέχει πληροφορίες για τα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου, του μεταβολισμού ενέργειας και σηματοδότηση  $Ca^{2+}$ , όπου όλα αυτά συμμετέχουν στην ανάλυση της βλαστοκύστης από την αδρανή κατάσταση, ενώ η αναδιαμόρφωση χρωματίνης, η σηματοδότηση προσκόλλησης και ο HB-EGF παράγοντας, συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις εμβρύου – μήτρας που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της βλαστοκύστης και την επακόλουθη εμφύτευση. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων μπορεί να βοηθήσουν στην αποκάλυψη νέων σηματοδοτικών μορίων και μονοπατιών που δεν έχουν προηγουμένως αναγνωρισθεί, παρέχοντας ένα τοπίο γονιδιακών αλληλεπιδράσεων κατά την πρώιμη εγκυμοσύνη. Η εφαρμογή των proteomics πιθανώς παρέχει επίσης πληροφορίες για την αλληλεπίδραση μεταξύ ποικίλων μοριακών μονοπατιών, προσδιορίζοντας έναν μοριακό χάρτη με προορισμό την επιτυχημένη εμφύτευση.

Τέλος, θα πρέπει να υπογραμμιστεί πως πλέον η ενδομητρική δεκτικότητα αποτελεί το κώλυμα της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Βασική και κλινική έρευνα θα βοηθήσει να κατανοηθούν τα γεγονότα της μητρικής προετοιμασίας για την εμβρυική εμφύτευση. Αυτή η γνώση μπορεί σημαντικά να βελτιώσει την θεραπεία της γυναικείας υπογονιμότητας. Νέες in vivo προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν πρόσθετα στην εμβρυική καλλιέργεια ή ενδομητρικές πλύσεις με

υποτιθέμενους προωθητικούς παράγοντες προσκόλλησης, μπορούν πιθανώς να αυξήσουν τον ρυθμό εμφύτευσης, ειδικά σε επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης. Ως παράδειγμα, έχει δειχθεί η συμπλήρωση με ανασυνδυασμένη ηπαρίνη στο καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο εμβρύου πριν την μεταφορά μέσα στην μήτρα ποντικού, αυξάνοντας σημαντικά τους ρυθμούς εμφύτευσης. Η έρευνα για την εμβρυική εμφύτευση βασίζεται βαρέως σε πειράματα που διεξάγονται σε ζώα. Τα δεδομένα από ζώα, ωστόσο, δεν είναι πάντα μεταθέσιμα στο μοντέλο εμφύτευσης ανθρώπων. Επομένως, τα ενδομητρικά δείγματα βιοψίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναγνωρίσουν μόρια που σχετίζονται με την μητρική δεκτικότητα, προκειμένου να αποκτηθεί καλύτερη επίγνωση για την ανθρώπινη εμφύτευση. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη των λειτουργικών *in vitro* συστημάτων που μελετούν τις αλληλεπιδράσεις εμβρύου – μήτρας, θα οδηγήσει στον καθορισμό αλληλεπιδράσεων και συνεργασιών μεταξύ των μορίων που εμπλέκονται σε αυτήν την διαδικασία. Μέχρι σήμερα, μόνο μερικές τροποποιήσεις για να θεραπεύσουν την αποτυχία της σύλληψης έχουν εφαρμοστεί, παρά την συνεχιζόμενη μεταφορά φαινομενικά καλής ποιότητας εμβρύων. Τέτοιες τροποποιήσεις που αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι η συμπλήρωση καλλιεργητικού μέσου με υαλουρονικό οξύ, η συστηματική χορήγηση του LIF, προγεστερόνη, μη στεροειδικά αντιφλεγμονώδη φάρμακα ή ηπαρίνη και άλλες.

Με την εξαίρεση της υποστήριξης ωχρινικής φάσης χορηγώντας προγεστερόνη, καμία από αυτές τις θεραπείες που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν είναι ικανή να αυξήσει τους ρυθμούς εμφύτευσης ή κύησης. Επομένως, οι μελλοντικές έρευνες πρέπει να κατευθυνθούν στην αποκρυπτογράφηση λειτουργικών, παρά μορφολογικών, χαρακτηριστικών της ενδομητρικής δεκτικότητας. Η γνώση που αποκτάται από αυτήν την γραμμή έρευνας, σίγουρα θα βοηθήσει τους ερευνητές στην ανάπτυξη συγκεκριμένων θεραπευτικών μέτρων που θα βελτιστοποιήσουν την εμβρυική εμφύτευση, αλλά θα οδηγήσουν επίσης και την ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων μεθόδων αντισύλληψης.



## Βιβλιογραφία:

- 1)Μεσσήνης Ι., Επιτομή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, MD Communications, 2010
- 2)A. Vander, J. Sherman, D. Luciano, M. Τσακόπουλος, Φυσιολογία του Ανθρώπου ΙΙ (Μηχανισμοί της λειτουργίας του Οργανισμού), εκδόσεις Πασχαλίδης, 8η έκδοση, 2011
- 3)Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010
- 4)Mohammad Ezzati & Ovrang Djahanbakhch & Sara Arian & Bruce R. Carr Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology, J Assist Reprod Genet (2014) 31:1337–1347 DOI 10.1007/s10815-014-0309-x
- 5)AP Hess, DM Baston-Büst, A.Schanz, J.Hirchenhain, P. Bielfeld, JS Krüssel. “Interleukin-1 system in the human fallopian tube - No spatial but a temporal regulation of mRNA and protein expression.” *Mol Cell Endocrinol*. 2009 May 6;303(1-2):7-12, Epub 2009 Feb 2
- 6)Hanna Achache and Ariel Revell, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation, Human Reproduction Update, Vol.12, No.6 pp. 731–746, 2006, Advance Access publication September 18, 2006
- 7)S.Trangucha, b,T. Daikokua,Y.Guoa, H.Wanga and S. K. Deya-c,\* , Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation, Received 26 May 2005; accepted 22 June 2005, Online First 9 August 2005
- 8)BIBHASH C. PARIAS1,2, HAENGSEOK SONG2 and SUDHANSU K. DEY\*,2, Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue, Int. J. Dev. Biol. 45: 597-605 (2001)
- 9)P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 10)Chelsea Fox, M.D.,a Scott Morin, M.D.,b,c Jae-Wook Jeong, Ph.D.,d Richard T. Scott Jr., M.D.,b,c and Bruce A. Lessey, M.D., Ph.D.a, Local and systemic factors and implantation: what is the evidence?, Fertil Steril 2016;105:873–84. 2016 by American Society for Reproductive Medicine.
- 11) Ozlem Guzeloglu-Kayisli, Ph.D.1, Umit Ali Kayisli, Ph.D.1, and Hugh S. Taylor, M.D.1, The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions.,Published in final edited form as: Semin Reprod Med. 2009 January ; 27(1): 62–79.
- 12)Ye Chun Ruan1,2, Hui Chen1,2, and Hsiao Chang Chan1,2,\* Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation Human Reproduction Update, Vol.20, No.4 pp. 517–529, 2014, Advanced Access publication on March 2, 2014
- 13)Howard J.A. Carp a,\* , Carlo Selmi b,c, Yehuda Shoenfeld d The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss Article history: Received 12 November 2011, Received in revised form 28 November 2011, Accepted 28 November 2011
- 14)Wan-Tinn Teh1,2 & John McBain2 & Peter Rogers1, What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure?, Received: 30 April 2016 /Accepted: 7 July 2016
- 15)εικόνα 1: [http://www.geocities.ws/embryologia/anatomy\\_files/image002.gif](http://www.geocities.ws/embryologia/anatomy_files/image002.gif)
- 16)εικόνα 2:[https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESqAIJ8ItCT2Wz53QanAILEKjU2AQaAggKDAAsQsIynCBpiCmAIAxIo5QPqA\\_1MJzwmHCPUJzgmDFKIjHqjgM-Ez\\_1T\\_18P\\_1s8tzSSOps-kTrgPRow6c4UzqmG8j8prYWxvRWZ0K9iO\\_1ZKhPlhz6PIUj0CYFGG9kuSMG0qs9peUpa5wJstIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgTKJeh8DAsQne3BCRqJAQoYcgvvcmdhbtqliPYDCwoJL20vMDEzeTBqChYKA2phd9qliPYDCwoJL20vMDFrOWxqChkKBW1vdXR02qWI9gMMCgovbS8wMjgzZHQxCh4KCmh1bWFuIGJvZHnapYj2AwwKCi9tLzAycDB0azMKGG0HZGlhZ3JhbdqliPYDCwoJL20vMDJ2MG0yDA&q=migration+of+primordial+germ+cells&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewjS2cS23KLPahWkFRoKHW0HDHsQsw4IMQ&biw=1366&bih=634#imgrc=iGrGpJCxvh9hYM%3A](https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESqAIJ8ItCT2Wz53QanAILEKjU2AQaAggKDAAsQsIynCBpiCmAIAxIo5QPqA_1MJzwmHCPUJzgmDFKIjHqjgM-Ez_1T_18P_1s8tzSSOps-kTrgPRow6c4UzqmG8j8prYWxvRWZ0K9iO_1ZKhPlhz6PIUj0CYFGG9kuSMG0qs9peUpa5wJstIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgTKJeh8DAsQne3BCRqJAQoYcgvvcmdhbtqliPYDCwoJL20vMDEzeTBqChYKA2phd9qliPYDCwoJL20vMDFrOWxqChkKBW1vdXR02qWI9gMMCgovbS8wMjgzZHQxCh4KCmh1bWFuIGJvZHnapYj2AwwKCi9tLzAycDB0azMKGG0HZGlhZ3JhbdqliPYDCwoJL20vMDJ2MG0yDA&q=migration+of+primordial+germ+cells&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewjS2cS23KLPahWkFRoKHW0HDHsQsw4IMQ&biw=1366&bih=634#imgrc=iGrGpJCxvh9hYM%3A)

[https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESqAIJ8ItCT2Wz53QanAILEKjU2AQaAggKDasQsIynCBpiCmAIAxIo5QPqA\\_1MJzwmHCPUJzgmDFKIJhQjgM-Ez\\_1T\\_18P\\_1s8tzSSOps-kTrgPRow6c4UzqmG8j8prYWxvRWZ0K9iO\\_1ZKhPlhz6PIUj0CYFGG9kuSMG0qs9peUpa5wJstIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgTKJeh8DAsQne3BCRqJAQoYcgvcmdbhbtqliPYDCwoJL20vMDEzeTBqChYKA2phd9qliPYDCwoJL20vMDFrOWxqChkKBW1vdXR02qWI9gMMCgovbS8wMjgzZHQxCh4Kcmh1bWFuIGJvZHnapYj2AwwKCi9tLzAycDB0azMKGgoHZGhZ3JhbdqliPYDCwoJL20vMDJ2MG0yDA&q=migration+of+primordial+germ+cells&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjS2cS23KLPahWkfRoKHW0HDHsQsw4IMQ&biw=1366&bih=634#imgrc=W1poqVD-Cd7L0M%3A](https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESqAIJ8ItCT2Wz53QanAILEKjU2AQaAggKDasQsIynCBpiCmAIAxIo5QPqA_1MJzwmHCPUJzgmDFKIJhQjgM-Ez_1T_18P_1s8tzSSOps-kTrgPRow6c4UzqmG8j8prYWxvRWZ0K9iO_1ZKhPlhz6PIUj0CYFGG9kuSMG0qs9peUpa5wJstIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgTKJeh8DAsQne3BCRqJAQoYcgvcmdbhbtqliPYDCwoJL20vMDEzeTBqChYKA2phd9qliPYDCwoJL20vMDFrOWxqChkKBW1vdXR02qWI9gMMCgovbS8wMjgzZHQxCh4Kcmh1bWFuIGJvZHnapYj2AwwKCi9tLzAycDB0azMKGgoHZGhZ3JhbdqliPYDCwoJL20vMDJ2MG0yDA&q=migration+of+primordial+germ+cells&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjS2cS23KLPahWkfRoKHW0HDHsQsw4IMQ&biw=1366&bih=634#imgrc=W1poqVD-Cd7L0M%3A)

17)εικόνα 3: <http://image.slidesharecdn.com/pediatricandadolescentgynecologykocuniv-140505082631-phpapp02/95/pediatric-and-adolescent-gynecology-koc-univ-web-4-638.jpg?cb=1399278495>

18)εικόνα 4, 6:[https://www.google.gr/search?q=the+creation+of+reproductive+system+of+woman+image&client=firefox-b&biw=1366&bih=634&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi5uc\\_51qLPAhUBXBoKHUoFD20Q\\_AUIBigB#tbm=isch&q=uterus+changes+with+age&imgrc=1XmPXzDhCxVg0M%3A](https://www.google.gr/search?q=the+creation+of+reproductive+system+of+woman+image&client=firefox-b&biw=1366&bih=634&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi5uc_51qLPAhUBXBoKHUoFD20Q_AUIBigB#tbm=isch&q=uterus+changes+with+age&imgrc=1XmPXzDhCxVg0M%3A)

19)εικόνα 5: [https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESpAIJmPyWZr7oytsamAILEKjU2AQaAggKDasQsIynCBpiCmAIAxIohwi9E4UIg\\_wjbAqkTvBOoE88J1gLGm7c04D2bPuo9\\_1T-SOpw-6Df7PBowI5PMbJ8hI3idBXUdTlI92Z5icSQo-1phaq0CFzJiZY6h5UjSYLuHmsKnwwBnDFCbIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgQ4leaYDAsQne3BCRqFAQoXCgRoZWfK2qWI9gMLCgkvbS8wNGhndGsKGAoFb3JnYW7apYj2AwsKCS9tLzAxM3kwagoWCgRoYW5k2qWI9gMKCggbvS8wazY1cAoeCgpodW1hbiBib2R52qWI9gMMCgovbS8wMnAwdGszChgKBm1lc2NsZdqliPYDCgoIL20vMDRfZnMM&q=mullerian+duct&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY4ciI5qLPAhWDvxQKHaxjCY8Qsw4ILQ&biw=1366&bih=634#imgrc=IL46qoK-nBGxum%3A](https://www.google.gr/search?tbs=simg:CAESpAIJmPyWZr7oytsamAILEKjU2AQaAggKDasQsIynCBpiCmAIAxIohwi9E4UIg_wjbAqkTvBOoE88J1gLGm7c04D2bPuo9_1T-SOpw-6Df7PBowI5PMbJ8hI3idBXUdTlI92Z5icSQo-1phaq0CFzJiZY6h5UjSYLuHmsKnwwBnDFCbIAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgQ4leaYDAsQne3BCRqFAQoXCgRoZWfK2qWI9gMLCgkvbS8wNGhndGsKGAoFb3JnYW7apYj2AwsKCS9tLzAxM3kwagoWCgRoYW5k2qWI9gMKCggbvS8wazY1cAoeCgpodW1hbiBib2R52qWI9gMMCgovbS8wMnAwdGszChgKBm1lc2NsZdqliPYDCgoIL20vMDRfZnMM&q=mullerian+duct&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY4ciI5qLPAhWDvxQKHaxjCY8Qsw4ILQ&biw=1366&bih=634#imgrc=IL46qoK-nBGxum%3A)

20)εικόνα 7: <https://www.google.gr/search?q=uterus+anatomy&client=firefox-b&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwjR7cS15aLPAhWM6RQKHTqBCegQsAQIGw&biw=1366&bih=634#imgrc=3oyCNs0kBmyW8M%3A>

21)εικόνα 8:<https://media1.britannica.com/eb-media/05/55705-004-63F84BF3.jpg>

22)εικόνα 9: <https://www.google.gr/search?q=uterus+anatomy&client=firefox-b&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwjR7cS15aLPAhWM6RQKHTqBCegQsAQIGw&biw=1366&bih=634#imgrc=GYCS1DgyalPYNM%3A>

23)εικόνα 10: Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010

24)εικόνα 11: Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010

25)εικόνα 12:<http://www.conceiveeasy.com/uploads/what-happens-during-ovulation.png>

26)εικόνα 13: Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010

27)εικόνα 14:<https://online.science.psu.edu/sites/default/files/biol011/fig-10-24-Ovulation.jpg>

28)εικόνα 15: Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010

29)εικόνα 16: Dunja Maria Baston-Büst Aus Balve, Molecular basis of the embryo-maternal crosstalk in the female reproductive tract, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010

30)εικόνα 17: Mohammad Ezzati & Ovrang Djahanbakhch & Sara Arian & Bruce R. Carr Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology, J Assist Reprod Genet (2014) 31:1337–1347 DOI 10.1007/s10815-014-0309-x

31)εικόνα 18: Mohammad Ezzati & Ovrang Djahanbakhch & Sara Arian & Bruce R. Carr Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology, J Assist Reprod

- Genet (2014) 31:1337–1347 DOI 10.1007/s10815-014-0309-x
- 32)εικόνα 19: Mohammad Ezzati & Ovrang Djahanbakhch & Sara Arian & Bruce R. Carr Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology, J Assist Reprod Genet (2014) 31:1337–1347 DOI 10.1007/s10815-014-0309-x
- 33)εικόνα 20: S.Trangucha, b,T. Daikokua,Y.Guoa, H.Wanga and S. K. Deya–c,\*; Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation, Received 26 May 2005; accepted 22 June 2005, Online First 9 August 2005
- 34)εικόνα 22: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/14/2/515/F1.expansion.html>
- 35)εικόνα 21:<http://www.scicurious.org/basic-set-female-reproduction-part-2-get-out-your-ipads/>
- 36)εικόνα 23: P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 37)εικόνα 24: 14
- 38)εικόνα 25: Hanna Achache and Ariel Revel1, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation, Human Reproduction Update, Vol.12, No.6 pp. 731–746, 2006, Advance Access publication September 18, 2006
- 39)εικόνα 26: Hanna Achache and Ariel Revel1, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation, Human Reproduction Update, Vol.12, No.6 pp. 731–746, 2006, Advance Access publication September 18, 2006
- 40)εικόνα 27: P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 41)εικόνα 28: P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 42)εικόνα 29: P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 43)εικόνα 30: P. Duc-Goiran\*, T.M. Mignot, C. Bourgeois, F. Ferre, Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium, Received 10 July 1998; accepted 17 November 1998
- 44)εικόνα 31: Ye Chun Ruan1,2, Hui Chen1,2, and Hsiao Chang Chan1,2,\* Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation Human Reproduction Update, Vol.20, No.4 pp. 517–529, 2014, Advanced Access publication on March 2, 2014
- 45)εικόνα 32: Ye Chun Ruan1,2, Hui Chen1,2, and Hsiao Chang Chan1,2,\* Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation Human Reproduction Update, Vol.20, No.4 pp. 517–529, 2014, Advanced Access publication on March 2, 2014
- 46)εικόνα 33: Howard J.A. Carp a,\*; Carlo Selmi b,c, Yehuda Shoenfeld d The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss Article history: Received 12 November 2011, Received in revised form 28 November 2011, Accepted 28 November 2011
- 47)εικόνα 34: Wan-Tinn Teh1,2 & John McBain2 & Peter Rogers1, What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure?, Received: 30 April 2016 /Accepted: 7 July 2016

