



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

**ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α
στον ορό γυναικών με καθ'έξιν αποβολές στον
ελληνικό χώρο και συσχέτισή τους με
πολυμορφισμούς του γονιδίου έκφρασής του**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δήμητρα Ι. Χαρατσή
Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής: Π.Δρακάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α
στον ορό γυναικών με καθ'έξιν αποβολές στον
ελληνικό χώρο και συσχέτισή τους με
πολυμορφισμούς του γονιδίου έκφρασής του**

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια: Χαρατσή Ι. Δήμητρα, AM: 20130580

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρακάκης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

- **Λουτράδης Δημήτριος**, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Δρακάκης Πέτρος**, Επιβλέπων Καθηγητής, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Καλλιανίδης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους τους διακεκριμένους επιστήμονες που συμμετείχαν σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής διατριβής. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δρακάκη Πέτρο, επιβλέποντα Καθηγητή μου και Αναπληρωτή Καθηγητή της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κύριο Καλλιανίδη Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις εύστοχες επισημάνσεις και διορθώσεις, καθώς επίσης τον Καθηγητή και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κύριο Λουτράδη Δημήτριο, που συνιστούν την τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπό τους καθώς μου ανέθεσαν, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα έρευνα αναφορικά με το φλέγον πρόβλημα των επανειλημμένων αυτόματων αποβολών. Καθοριστική ήταν η καθοδήγηση και η αμέριστη υποστήριξη της κυρίας Μαυρογιάννη Δέσποινας, Βιολόγου και επιστημονικά υπεύθυνης των εργαστηρίων του τμήματος IVF της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, την οποία οφείλω να ευχαριστήσω. Υπήρξε ο πιο αξιόλογος άνθρωπος που θα μπορούσε να με διδάξει και να με καθοδηγήσει τόσο στην έρευνα όσο και στη συγγραφή της διπλωματικής μου διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, Ιωάννη και Βάσω, και τον αδερφό μου, Χρήστο, για την ανεκτίμητη συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους καθώς και την υπομονή τους.

*Στους γονείς μου, Ιωάννη και Βάσω,
και στον αδερφό μου, Χρήστο*

Περίληψη

Καθ'έξιν ή επανειλημμένες αυτόματες αποβολές (ΕΑΑ) αποκαλούνται οι εμβρυικές απώλειες τριών ή περισσότερων διαδοχικών κυήσεων μικρότερων των 20 εβδομάδων. Ταξινομούνται σε πρωτοπαθείς, δευτεροπαθείς και τριτοπαθείς. Οι πρωτοπαθείς αφορούν γυναίκες που έχουν τρεις ή περισσότερες αυτόματες αποβολές με τον ίδιο σύντροφο και καμία κύηση μετά την 20ή εβδομάδα. Οι καθ'έξιν αποβολές είναι δευτεροπαθείς όταν εμφανίζονται μετά από μία τουλάχιστον επιτυχή κύηση ή ενδομήτριο θάνατο ενώ χαρακτηρίζονται ως τριτοπαθείς μετά από επιτυχή εγκυμοσύνη της οποίας όμως προηγήθηκαν αποβολές.

Πρόκειται για μία δυσάρεστη κατάσταση, με σωματικές και ψυχολογικές επιπτώσεις, που απαιτεί διερεύνηση των αιτιών, τα οποία μπορεί να είναι γενετικά, ανατομικά της μήτρας, ενδοκρινικά, λοιμώδη, ανοσολογικά ή θρομβοφιλικά.

Αναφορικά με τις επανειλημμένες αυτόματες αποβολές ανοσολογικής αιτιολογίας, αυτές διακρίνονται σε αλλοάνοσες και αυτοάνοσες. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, στις αλλοάνοσες αποβολές το ανοσιακό σύστημα της μητέρας αναγνωρίζει το κύημα ως "ημιαλλομόσχευμα" και εγείρει αντίδραση απόρριψης του κυήματος τύπου Th-1. Κατά την Th-1 ανοσιακή απάντηση εκκρίνονται κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α, η ιντερλευκίνη IL-2, η ιντερφερόνη IFN-γ, ενώ η αδυναμία μεταστροφής της Th-1 σε Th-2 τύπου απάντηση έχει ως συνέπεια την απώλεια του κυήματος.

Δεδομένου ότι η Th-1 ανοσιακή απάντηση πυροδοτείται επίσης από το στρες, τις λοιμώξεις και τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο TNF-α ως κυτταροκίνη-διαμεσολαβητής της Th-1 απάντησης, θα μπορούσε να εμπλέκεται όχι μόνο στις αλλοάνοσες καθ'έξιν αποβολές αλλά και σε εκείνες που προκαλούνται από λοιμογόνο παράγοντα, στρες ή αυτοάνοσο νόσημα. Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα είναι πολύ λίγες οι μελέτες που καταδεικνύουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα TNF-α στον

ορό, συγκεκριμένους πολυμορφισμούς του TNF-α γονιδίου και την εμφάνιση επανειλημμένων αποβολών. Επιπρόσθετα, οι συγκεκριμένες μελέτες είχαν κάποιους περιορισμούς όπως το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος, αποδυναμώνοντας τη στατιστική τους ισχύ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό του αίματος γυναικών με καθ'έξιν αυτόματες αποβολές, καθώς επίσης και η συσχέτισή των επιπέδων αυτών με τον πολυμορφισμό -238G/A του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του TNF-α.

Υλικό της μελέτης είναι 90 γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές με ομάδα ελέγχου 95 γυναίκες χωρίς ιστορικό καθ'έξιν αποβολών. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του TNF-α χρησιμοποιήθηκε μία ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του TNF-α μεταξύ των γυναικών με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές και των γόνιμων γυναικών, καθώς επίσης ότι τα συγκεκριμένα επίπεδα είναι ανεξάρτητα από την παρουσία του πολυμορφισμού -238G/A του TNF-α γονιδίου. Ωστόσο, είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη ότι η συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι δυνατό να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα εξαιτίας περιορισμών κατά τον σχεδιασμό της μελέτης όπως είναι το μικρό μέγεθος του δείγματος, η ετερογένεια ασθενών και μαρτύρων ως προς την ηλικία και το κάπνισμα, η μέτρηση του TNF-α μόνο σε γυναίκες που δεν κυοφορούσαν κατά τη διάρκεια συμμετοχής τους στην παρούσα έρευνα.

Λέξεις – κλειδιά: κυτταροκίνες, TNF-α, επανειλημμένες αυτόματες αποβολές, πολυμορφισμός

Abstract

Recurrent spontaneous miscarriage/abortion (RSM, RM, RSA) or repeated pregnancy loss (RPL) is defined as three or more consecutive spontaneous abortions before the 20th week of gestation. Recurrent spontaneous miscarriages are classified into primary, secondary and tertiary ones. The primary RSM refers to women undergoing three or more spontaneous abortions in the same partner and no pregnancy after 20 gestational weeks. Recurrent pregnancy loss is considered secondary when it occurs at least after a successful pregnancy or an intrauterine death while a tertiary RSM takes place after a pregnancy with live birth following miscarriages.

It comes to a distressing complication of early pregnancy, which displays both physical and psychological ramifications. It is essential that it should be performed further investigation of several causes such as genetic, anatomic, infectious, endocrine, immune and thrombophilic factors.

As regards RSMs of immunological etiology, they may be subdivided into alloimmune and autoimmune recurrent spontaneous miscarriages. According to more recent data concerning alloimmune abortions, mother's immune system recognizes the fetus as a "semi-allograft" bringing about a Th-1 type rejection of the fetus. In the profile of Th-1 immune response, certain cytokines are produced such as tumor necrosis factor TNF- α , interleukin IL-2, interferon IFN- γ , while a failure of the shift from Th-1 to Th-2 response results in fetal loss.

Given that Th-1 immune response is triggered by stress, infections, autoimmune diseases, TNF- α is regarded as a cytokine-mediator of Th-1 response that could be involved in RSA caused by infection, stress, and autoimmune factors, apart from taking part in alloimmune RSA. However, currently there are few studies showing

statistical significance of the correlation of serum TNF- α levels and TNF- α polymorphisms with the occurrence of repeated spontaneous abortions. Besides, the certain studies are restricted by the relatively small sample sizes, weakening the statistical power.

The aim of the present case-control study is to evaluate serum TNF- α levels in women with RSM and detect any association between serum TNF- α levels and TNF- α -238G/A polymorphism (SNP) in women with RSM.

A total of 90 women with a medical history of recurrent spontaneous miscarriage comprised the study group (cases), while the control group was recruited from 95 fertile women (controls).

The results of this study report that there is no significant difference in serum TNF- α levels between women with and without a history of recurrent miscarriages.. Moreover, serum TNF- α levels in women with RSA are independent of the presence of TNF- α -238G/A polymorphism. However, it should be taken into consideration that our study does not lead to safe conclusions owing to several limitations of the study design such as the small sample size, the heterogeneity between cases and controls as regards age and smoking, the measurement of serum TNF- α levels in non-pregnant women (the venous sampling time).

Keywords: cytokines, TNF- α , recurrent spontaneous miscarriages, polymorphism

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	σελ.5
Περίληψη.....	σελ.7
Abstract.....	σελ.9

Γενικό μέρος

Κεφ.1: ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ

ΓΥΝΑΙΚΑΣ.....	σελ.16
---------------	--------

1.1. Έσω γεννητικά όργανα.....	σελ.16
1.1.1. Κόλπος ή κολεός.....	σελ.16
1.1.2. Μήτρα ή υστέρα.....	σελ.18
1.1.3. Σάλπιγγες ή ωαγωγοί ή φαλλοπιανοί πόροι.....	σελ.18
1.1.4. Ωοθήκες.....	σελ.19
1.2. Έξω γεννητικά όργανα.....	σελ.20
1.3. Το πυελικό έδαφος ή περίνεο.....	σελ.22

Κεφ.2: ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ

ΓΥΝΑΙΚΑΣ.....	σελ.24
---------------	--------

2.1. Διαφοροποίηση των ωοθηκών.....	σελ.25
2.2. Διαφοροποίηση των γεννητικών πόρων.....	σελ.27
2.3. Διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων.....	σελ.29

Κεφ.3: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ

ΓΥΝΑΙΚΑΣ.....	σελ.31
---------------	--------

3.1. Υποθάλαμος.....	σελ.32
3.2. Υπόφυση.....	σελ.33
3.3. Ωοθήκες – Ο κύκλος των ωοθηκών.....	σελ.36
3.3.1. Ωοθυλακιογένεση.....	σελ.36
3.3.2. Ωοθυλακιόρρηξη – Ωχρο Σωμάτιο.....	σελ.37
3.3.3. Στεροειδογένεση.....	σελ.38
3.4. Ορμονικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου.....	σελ.42
3.5. Μεταβολές στη μήτρα κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου.....	σελ.44

Κεφ.4: ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ,

ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	σελ.46
----------------------	--------

4.1. Γονιμοποίηση.....	σελ.46
4.1.2. Στάδια γονιμοποίησης.....	σελ.47
4.2. Εμφύτευση.....	σελ.49

4.2.1. Στάδια εμφύτευσης.....σελ.51	σελ.51
4.2.2. Υποδεκτικότητα του ενδομητρίου.....σελ.54	σελ.54
4.2.3. Ρυθμιστικοί παράγοντες της εμφύτευσης.....σελ.55	σελ.55
4.3. Πλακουντοποίηση.....σελ.57	σελ.57
4.3.1. Εμβρυική μοίρα του πλακούντα.....σελ.58	σελ.58
4.3.2. Μητρική ή μητρογενής μοίρα του πλακούντα.....σελ.59	σελ.59
Κεφ.5: ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ –	
ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ.....σελ.61	σελ.61
5.1. Ανάπτυξη του προ-εμβρύου.....σελ.61	σελ.61
5.2. Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη.....σελ.62	σελ.62
5.3. Όψιμη εμβρυική ανάπτυξη.....σελ.63	σελ.63
Κεφ.6: ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΗΜΙΣΥ ΤΗΣ	
ΚΥΗΣΗΣ.....σελ.64	σελ.64
6.1. Έκτοπη κύηση.....σελ.64	σελ.64
6.2. Τροφοβλαστική νόσος της κύησης ή Μύλη κύηση.....σελ.65	σελ.65
6.3. Αποβολές.....σελ.66	σελ.66
Κεφ.7: ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....σελ.67	
7.1. Είδη αυτόματων αποβολών.....σελ.68	σελ.68
7.2. Επανειλημμένες αυτόματες αποβολές.....σελ.70	σελ.70
7.3. Αιτιολογία αυτόματων αποβολών και επανειλημμένων αποβολών.....σελ.72	σελ.72
A. Εμβρυικά ή Γενετικά αίτια.....σελ.74	σελ.74
B. Μητρικά ή Περιβαλλοντικά αίτια.....σελ.76	σελ.76
1). Ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου.....σελ.77	σελ.77
2). Λοιμώξεις.....σελ.79	σελ.79
3). Χρόνια νοσήματα.....σελ.79	σελ.79
4). Ενδοκρινοπάθειες.....σελ.80	σελ.80
5). Διαταραχές πήκτικότητας ή Θρομβοφιλίες.....σελ.80	σελ.80
6). Ανοσολογικοί παράγοντες.....σελ.81	σελ.81
7). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, Διατροφή, Χρήση φαρμάκων.....σελ.81	σελ.81
8). Χειρουργικές επεμβάσεις, Τραυματισμοί.....σελ.82	σελ.82
9). Ψυχολογικοί παράγοντες.....σελ.82	σελ.82
Κεφ.8: ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΙΛΗΜΜΕΝΕΣ	
ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....σελ.84	σελ.84
8.1. Βασικές γνώσεις ανοσολογίας.....σελ.84	σελ.84
8.1.1. Φυσική ανοσία.....σελ.85	σελ.85
8.1.2. Επίκτητη ανοσία.....σελ.85	σελ.85
8.1.3. Τα λεμφοκύτταρα του ανοσιακού συστήματος.....σελ.87	σελ.87

Α). Τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK (Natural Killer cells).....σελ.87	σελ.87
Β). Τα Β-λεμφοκύτταρα.....σελ.90	σελ.90
Γ). Τα Τ-λεμφοκύτταρα.....σελ.91	σελ.91
8.1.4. Τα αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας MHC ή των Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων HLA.....σελ.97	σελ.97
8.2. Ανοσολογία της φυσιολογικής κύησης.....σελ.98	σελ.98
8.2.1. Μόρια HLA τάξης I και τάξης II στη φυσιολογική κύηση.....σελ.99	σελ.99
8.2.2. Ρυθμιστική σχέση Th1/Th2 τύπου ανοσιακής απάντησης στη φυσιολογική κύηση.....σελ.101	σελ.101
8.2.3. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK στη φυσιολογική κύηση.....σελ.102	σελ.102
8.2.4. Άλλοι μηχανισμοί μητρικής ανοσοανοχής προς το έμβρυο.....σελ.104	σελ.104
8.3. Αυτοάνοσες επανειλημμένες αποβολές.....σελ.106	σελ.106
8.3.1. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και επανειλημμένες αποβολές.....σελ.106	σελ.106
8.3.2. Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα και επανειλημμένες αποβολές.....σελ.108	σελ.108
8.4. Αλλοάνοσες επανειλημμένες αποβολές.....σελ.109	σελ.109
8.4.1. Διαταραχή της Th1/Th2 ανοσιακής ισορροπίας – Ο ρόλος των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων Tregs.....σελ.110	σελ.110
8.4.2. Ο ρόλος των κυττάρων φυσικών φονέων «NK cells».....σελ.112	σελ.112
8.4.3. Ο ρόλος του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας MHC.....σελ.113	σελ.113
8.4.4. Ο ρόλος των αντιπατρικών και των δεσμευτικών αντισωμάτων.....σελ.115	σελ.115
8.4.5. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης αλλοάνοσων επανειλημμένων αποβολών.....σελ.116	σελ.116
Κεφ.9: Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ- άλφα (Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF-α).....σελ.118	σελ.118
9.1. TNF-α και Φυσιολογική Κύηση.....σελ.120	σελ.120
9.2. TNF-α και Επανειλημμένες Αυτόματες Αποβολές (ΕΑΑ).....σελ.122	σελ.122
9.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου TNF-α και ΕΑΑ.....σελ.125	σελ.125
Κεφ.10: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....σελ.127	σελ.127
Ειδικό μέρος	
Κεφ.11: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....σελ.128	σελ.128
11.1. Δείγματα – Δημογραφικά στοιχεία.....σελ.128	σελ.128
11.2. Ενζυμική Ανοσοπροσοφητική μέθοδος ELISA.....σελ.131	σελ.131
11.2.1. Αρχή της μεθόδου ELISA.....σελ.131	σελ.131
11.2.2. Είδη τεχνικών ELISA.....σελ.135	σελ.135
Α. Άμεση (Direct ELISA).....σελ.136	σελ.136
Β. Έμμεση (Indirect ELISA).....σελ.136	σελ.136
Γ. Sandwich ELISA.....σελ.137	σελ.137
Δ. Συναγωνιστικές ή Ανασταλτικές (competitive or inhibition ELISAs).....σελ.138	σελ.138

11.3. Πρωτόκολλο ποσ/κού προσδ/σμού των επιπέδων του TNF-α ορού.....σελ.139	σελ.139
11.4. Στατιστική Ανάλυση.....σελ.142	σελ.142
Κεφ.12: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ.143	σελ.143
12.1. Αποτελέσματα ELISA.....σελ.143	σελ.143
12.2. Αποτελέσματα σύγκρισης κλινικών-δημογραφικών δεδομένων στις δύο ομάδες.....σελ.145	σελ.145
12.3. Αποτελέσματα των επιπέδων του TNF-α στην ομάδα μελέτης (study group).....σελ.148	σελ.148
12.4. Αποτελέσματα των επιπέδων του TNF-α στην ομάδα ελέγχου (control group).....σελ.149	σελ.149
12.5. Σύγκριση αποτελεσμάτων των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες.....σελ.150	σελ.150
12.6. Σύγκριση αποτελεσμάτων των επιπέδων του TNF-α σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό TNF-α -238G/A.....σελ.153	σελ.153
ΚΕΦ.13: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.156	σελ.156
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ Εικόνων, Πινάκων, Γραφημάτων.....σελ.166	σελ.166
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.169	σελ.169

I. ΓΕΝΙΚΟ μέρος

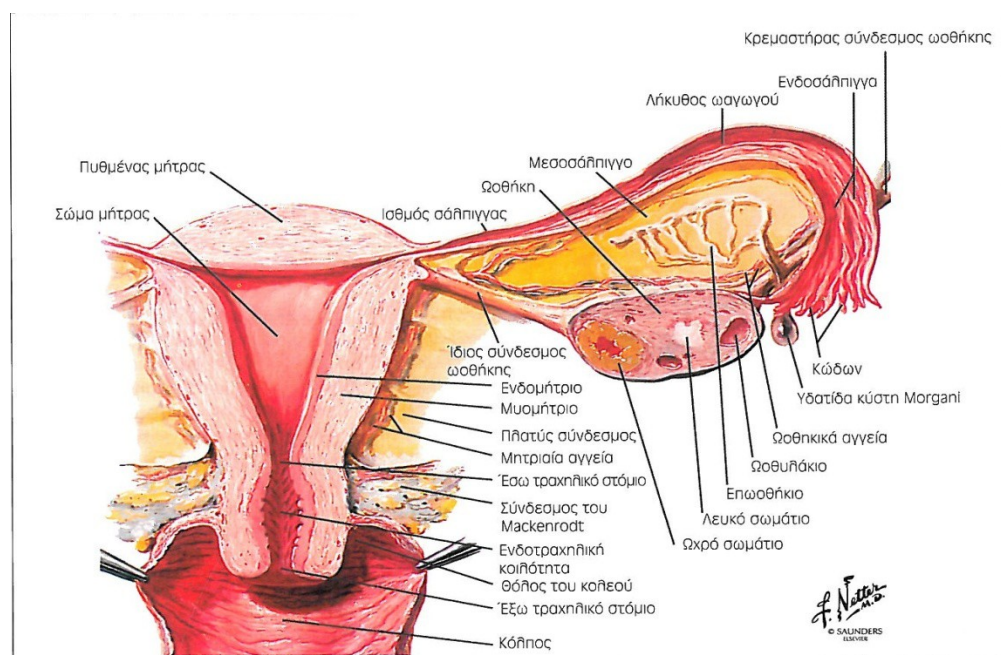
κεφάλαιο 1

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ

Το γεννητικό σύστημα της γυναίκας εξασφαλίζει την αναπαραγωγή για ορισμένη περίοδο της ζωής της, από την ήβη έως την εμμηνόπαυση. Τα γεννητικά όργανα της γυναίκας διακρίνονται στα έσω και τα έξω γεννητικά όργανα. Το ανατομικό όριο μεταξύ έσω και έξω γεννητικών οργάνων είναι ο παρθενικός υμένας και τα μύρτα του

1.1. Έσω γεννητικά όργανα

Στα έσω γεννητικά όργανα της γυναίκας ανήκουν ο κόλπος ή κολεός, η μήτρα, οι σάλπιγγες ή ωαγωγοί και οι ωothήκες. Η σάλπιγγα ή ωαγωγός και η σύστοιχη ωothήκη αποτελούν το εξάρτημα (Εικ.1-1). Τα έσω γεννητικά όργανα βρίσκονται εντός της ελάσσονος πυέλου μεταξύ ουροδόχου κύστης και εντέρου (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας).



Εικ.1-1: Το έσω γεννητικό σύστημα θήλεος σε διατομή (Netter, 1988).

1.1.1. Κόλπος ή κολεός

Ο κόλπος ή κολεός είναι ινομυώδης, ελαστικός σωλήνας ο οποίος εκτείνεται μεταξύ τραχήλου μήτρας και αιδοίου. Ο ρόλος του αφορά την σεξουαλική επαφή, την υποδοχή των σπερματοζωαρίων μετά την ενδοκολπική εκσπερμάτιση και τη διέλευση του εμβρύου κατά τον τοκετό. Το άνω άκρο του κόλπου περιβάλλει τον τράχηλο της μήτρας, περικλείοντας την ενδοκολπική μοίρα του τραχήλου και σχηματίζοντας τους θόλους του κόλπου οι οποίοι διακρίνονται σε: πρόσθιο, οπίσθιο και δύο πλάγιους. Ο οπίσθιος κολπικός θόλος είναι ο βαθύτερος ενώ έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς σε αυτόν εναποτίθεται το σπέρμα μετά την εκσπερμάτιση.

Το τοίχωμα του κόλπου αποτελείται, από έσω προς τα έξω, από: τον ινώδη χιτώνα, τον μυϊκό χιτώνα και τον βλεννογόνο χιτώνα. Ο τελευταίος καλύπτεται από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο, στερείται αδένων και απαρτίζεται από τέσσερις στοιβάδες συνιστώντας το έσω τοίχωμα του κόλπου. Οι στοιβάδες του βλεννογόνου του κόλπου από έσω προς τα έξω είναι: η εν τω βάθει ή βασική, η έξω βασική ή παραβασική, η διάμεση και η επιφανειακή ή επιπολής.

Η αιμάτωση του κόλπου επιτελείται μέσω κλάδων της μητριάας αρτηρίας, της της κάτω κυστικής και της μέσης αιμορροϊδικής αρτηρίας. Οι φλέβες σχηματίζουν φλεβικό πλέγμα στα πλάγια τοιχώματα του κόλπου το οποίο, μετά την αναστόμωσή του με τις φλέβες των έξω γεννητικών οργάνων και της πυέλου, εκβάλλει στις έσω λαγόνιες φλέβες (Εικ.1-2). Το λεμφικό δίκτυο του κόλπου εκβάλλει στα έξω και τα έσω λαγόνια λεμφογάγγλια καθώς και στα επιπολής βουβωνικά λεμφογάγγλια.

Η αυτόνομη νεύρωση του κόλπου επιτυγχάνεται από το μητροκολεϊκό πλέγμα, πνευλικά σπλαγχνικά νεύρα και από το αιδοϊκό νεύρο (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

χιτώννα ή μυομήτριο- που συνίσταται από τρεις στοιβάδες λείων μυικών ινών, και ο βλεννογόνος χιτώννας ή ενδομήτριο- που αποτελείται από μονόστοιβο κυλινδρικό επιθήλιο και το στρώμα ή χόριο που περιέχει αδένες, αγγεία και λεμφαγγεία.

Η αιμάτωση της μήτρας επιτυγχάνεται με την μητρίαία αρτηρία, η οποία στο ύψος του ισθμού διαχωρίζεται σε ανιόντες και κατιόντες κλάδους. Οι φλέβες ακολουθούν την αρτηριακή πορεία σχηματίζοντας ένα πυκνό δίκτυο ππου εκβάλλει στην έσω λαγόνια φλέβα και μερικώς στην έσω σπερματική φλέβα (Εικ.1-2).

Τα λεμφαγγεία της μήτρας αναλόγως της θέσης τους εκβάλλουν στα παρακάτω λεμφογάγγλια: προ και παρα-αορτικά, έξω λαγόνια, έσω λαγόνια, αιμορροϊδικά, προϊερά, γλουτιαία και βουβωνικής χώρας λεμφογάγγλια.

Η νεύρωση της μήτρας επιτελείται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, κυρίως μέσω του μητροκολεϊκού πλέγματος (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).

1.1.3. Σάλπιγγες ή ωαγωγοί ή φαλλοπιανοί πόροι

Οι σάλπιγγες είναι δύο λεπτοί μυικοί σωλήνες μήκους 8-14 cm, οι οποίοι εξορμώνται εκατέρωθεν της μήτρας και φθάνουν μέχρι τις ωοθήκες. Σκοπός τους είναι η παραλαβή του ωοκυττάρου από τις ωοθήκες και η μεταφορά του γονομοποιημένου ωαρίου στην κοιλότητα της μήτρας.

Αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα: το ενδομητρικό ή ενδοτοιχικό ή μητρίαίο ή έσω τμήμα, τον ισθμό, τη λήκυθο και τον κώδωνα ή έξω τμήμα με τους κροσσούς (Εικ.1-1). Το πλέον επίμηκες τμήμα της σάλπιγγας είναι η λήκυθος, με ελικοειδή πορεία, όπου γίνεται η συνάντηση των δύο γαμετών. Ο κώδωνας είναι το τελευταίο τμήμα της σάλπιγγας, επικοινωνεί με την ελεύθερη περιτοναϊκή κοιλότητα και φέρει 10-15 κροσσούς, οι οποίοι επικαλύπτουν τη σύστοιχη ωοθήκη και εκ των οποίων ο

μεγαλύτερος κροσσός ονομάζεται ωθηκικός. Ρόλος του ωθηκικού κροσσού είναι η σύλληψη του ωκυττάρου και η μεταφορά του στη λήκυθο της ίδιας σάλπιγγας.

Το τοίχωμα κάθε σάλπιγγας αποτελείται, από έξω προς τα έσω, από τους εξής τρεις χιτώνες: ορογόνος ή έξω χιτώνας, μυικός ή ενδιάμεσος χιτώνας και βλεννογόνος ή έσω χιτώνας, ο οποίος στερείται αδένων και διακρίνεται σε δύο στοιβάδες: το χόριο που είναι η λεπτός βασκός υμένας και το επιθήλιο που είναι μονόστοιβο κυλινδρικό κροσσωτό.

Η αιμάτωση της σάλπιγγας επιτυγχάνεται μέσω της σαλπιγγικής αρτηρίας (κλάδος της μητριάας αρτηρίας), της ωθηκικής αρτηρίας (κλάδος της κοιλιακής αορτής) και των ομώνυμων φλεβών (Εικ.1-2). Τα λεμφαγγεία της σάλπιγγας εκβάλλουν στα προαορτικά λεμφογάγγλια ενώ κάποια από εκβάλλουν στα επιτολής λεμφογάγγλια της βουβωνικής χώρας. Η νέρωση της σάλπιγγας επιτελείται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα μέσω του μητροκοιλιακού και του ωθηκικού πλέγματος (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

1.1.4. Ωοθήκες

Οι ωοθήκες αποτελούν τους γεννητικούς αδένες ή γονάδες της γυναίκας, είναι δύο, σχήματος αμυγδαλοειδούς, ενώ ρόλος τους είναι η φιλοξενία και η ωρίμανση των αρχέγονων ωκυττάρων. Κάθε ωοθήκη ευρίσκεται εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας. Η θέση της ωοθήκης δεν είναι σταθερή αλλά γενικά εντοπίζεται στον ωθηκικό βόθρο, μια κοιλότητα στα πλάγια του πυελικού τοιχώματος στο ύψος του έσω θυροειδούς μυός.

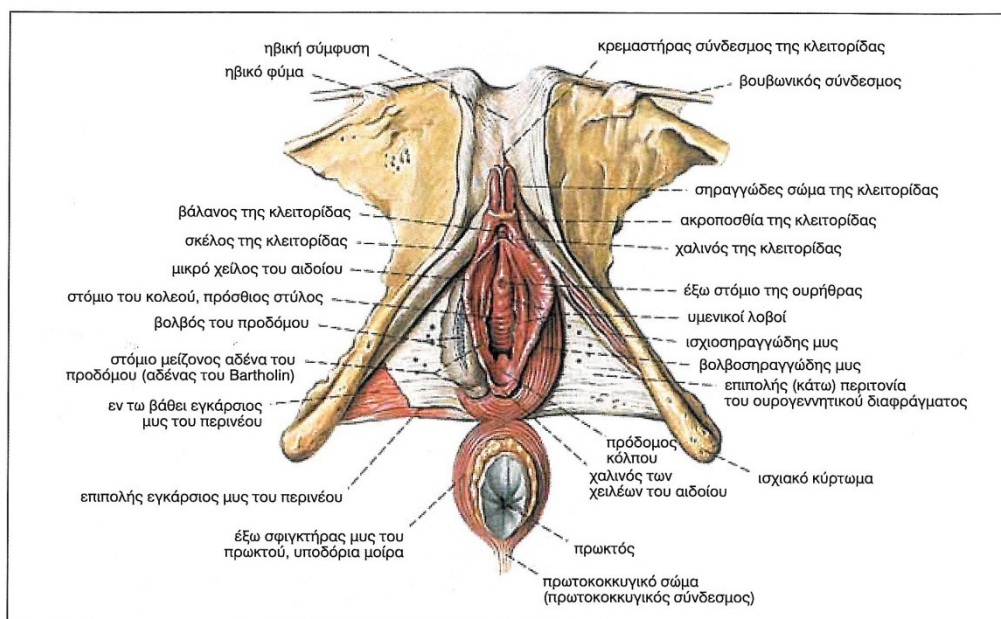
Κάθε ωοθήκη διαθέτει δύο πόλους: τον άνω ή σαλπιγγικό πόλο- βρίσκεται σε επαφή με τον ωθηκικό κροσσό της σάλπιγγας και περιέχει τα ωθηκικά αγγεία και νεύρα και τον κάτω ή μητρικό πόλο- συνδέεται με το σύστοιχο κέρα της μήτρας μέσω του μητροωθηκικού συνδέσμου.

Το τοίχωμα της ωοθήκης αποτελείται από δύο μοίρες: την έξω μοίρα ή φλοιό και την έσω μοίρα ή μυελό της ωοθήκης. Η στήριξη των ωοθηκών στη θέση τους επιτελείται με τον κρεμαστήρα σύνδεσμο, ο οποίος είναι τμήμα του πλατέος συνδέσμου της μήτρας, περιλαμβάνει τα ωοθηκικά αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα ενώ συνδέεται με τον άνω πόλο της ωοθήκης, και τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης ή μητροωοθηκικό, ο οποίος συνδέεται με τον κάτω πόλο της ωοθήκης.

Τα αιμοφόρα αγγεία της ωοθήκης είναι οι ωοθηκικές αρτηρίες και φλέβες. Οι ωοθηκικές αρτηρίες εκφύονται απευθείας από την κοιλιακή αορτή. Οι ωοθηκικές φλέβες εκβάλλουν δεξιά στην κάτω κοίλη φλέβα και αριστερά στη σύστοιχη νεφρική φλέβα. Στην αιμάτωση της ωοθήκης συμβάλλει και ο ωοθηκικός κλάδος της μητριάας αρτηρίας ο οποίος αναστομώνεται με κλάδους της ωοθηκικής αρτηρίας (Εικ.1-2). Τα λεμφαγγεία ακολουθούν την πορεία των ωοθηκικών αγγείων διά του κρεμαστήρα συνδέσμου και εκβάλλουν στα προαορτικά και τα παρααορτικά λεμφογάγγλια. Η νεύρωση της ωοθήκης επιτελείται με το ωοθηκικό ή έσω σπερματικό πλέγμα, κλάδο του αορτικού πλέγματος (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Α.Η. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

1.2. Έξω γεννητικά όργανα

Τα έξω γεννητικά όργανα ή αιδοίο ανευρίσκονται μπροστά και κάτω από την ηβική σύμφυση. Αποτελούνται από το εφήβαιο ή όρος της Αφροδίτης, τα μεγάλα και τα μικρά χείλη του αιδοίου, την κλειτορίδα, τον πρόδομο του κόλπου, τους βολβούς του πρόδομου, τους παραουρηθρικούς ή αδένες του Skene και τους βαρθολίνειους αδένες(Εικ.1-3).



Εικ.1-

3: Δομή του αιδείου (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

Το εφήβαιο ή όρος της Αφροδίτης είναι ένα τριγωνικό έπαρμα του δέρματος με λιπώδες υπόστρωμα. Το δέρμα καλύπτεται, μετά την ήβη, από πλούσια τριχοφυΐα. Τα μεγάλα χείλη του αιδείου είναι δύο πτυχές του δέρματος που εξορμώνται από το εφήβαιο που ευρίσκονται επί τα εκτός των μικρών χειλέων και καταλήγουν όπισθεν στη ραφή του περινέου. Στα μεγάλα χείλη του αιδείου, καταλήγουν οι στρογγύλοι σύνδεσμοι της μήτρας, διά των βουβωνικών πόρων. Τα μικρά χείλη του αιδείου είναι λεπτές δερματικές πτυχές, χωρίς τριχοφυΐα, με σύσταση βλεννογόνου και περιέχει άφθονους σμηγματογόνους αδένες. Η κλειτορίδα είναι στυτικό όργανο, που προσομοιάζει με το ανδρικό πέος και έχει μήκος 2,5-4 cm. Ανευρίσκεται μεταξύ των μεγάλων χειλέων, μπροστά από την ηβική σύμφυση και αποτελείται από δύο σκέλη, το σώμα και τη βάλανο, η οποία περιβάλλεται από την πόσθη. Ο πρόδομος του κόλπου είναι ο χώρος που περικλείεται από τα μικρά χείλη, τη βάλανο της κλειτορίδας και τον χαλινό των μικρών χειλέων. Ευρίσκεται έμπροσθεν του παρθενικού υμένα και σε αυτόν εκβάλλουν οι παραουρηθρικοί και οι βαρθολίνειοι αδένες. Οι βολβοί του προδόμου είναι το υπόθεμα των μεγάλων χειλέων και περιέχουν πυκνά φλεβικά δίκτυα που προκαλούν διόγκωση των βολβών κατά τη συνουσία.

Η αιμάτωση των έξω γεννητικών οργάνων επιτελείται από την έσω αιδοϊκή αρτηρία και από τις έξω αιδοϊκές αρτηρίες. Η απαγωγή του αίματος επιτυγχάνεται από την έσω αιδοϊκή φλέβα. Το λεμφικό δίκτυο των έξω γεννητικών οργάνων εκβάλλει κυρίως στα βουβωνικά και τα άνω μηριαία λεμφογάγγλια. Η νεύρωση της περιοχής επιτελείται κυρίως από το έσω αιδοϊκό νεύρο του ιερού πλέγματος και από το οσφυϊκό πλέγμα (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία ,Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

1.3. Το πυελικό έδαφος ή περίνεο

Η πυελική κοιλότητα είναι ο χώρος που περικλείεται από την οστέινη πύελο της γυναίκας, δηλαδή τα δύο ανώνυμα οστά –συνοστέωση ηβικού, λαγόνιου και ισχιακού οστού, το ιερό οστό και τον κόκκυγα. Η πυελική κοιλότητα διαχωρίζεται νοητά με την ανώνυμη ή πυελική γραμμή σε ένα ανώτερο μέρος που ονομάζεται μείζονα ή μεγάλη πύελος και σε ένα κατώτερο τμήμα, την ελάσσονα ή μικρή πύελο.

Το πυελικό έδαφος ή περίνεο φράσσει την έξοδο της ελάσσονος πυέλου αφήνοντας μόνο οπές από όπου διέρχονται η ουρήθρα, ο κόλπος και το ορθό. Αποτελείται από πλήθος αποπλατυσμένων μυικών ινών και περιτονιών και διαδραματίζει στηρικτικό ρόλο ιδίως στην εγκυμοσύνη, τον τοκετό και σε καταστάσεις αυξημένης ενδοκοιλιακής πίεσης.

Η αιμάτωση των μυών του πυελικού εδάφους επιτελείται από την έσω αιδοϊκή αρτηρία, την έξω αιδοϊκή αρτηρία και των λοιπών στοιχείων του περινέου από την περινεϊκή αρτηρία και την κάτω αιμορροϊδική αρτηρία, που είναι κλάδοι της έσω αιδοϊκής αρτηρίας. Η απαγωγή του αίματος επιτελείται μέσω της αιμορροϊδικής φλέβας στην έσω αιδοϊκή φλέβα. Η νεύρωση της περιοχής είναι όμοια με αυτή των έξω γεννητικών οργάνων, από νευρικούς κλάδους του οσφυϊκού και του ιερού πλέγματος (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία ,Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις

Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική,
A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology,
F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).

κεφάλαιο 2

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ

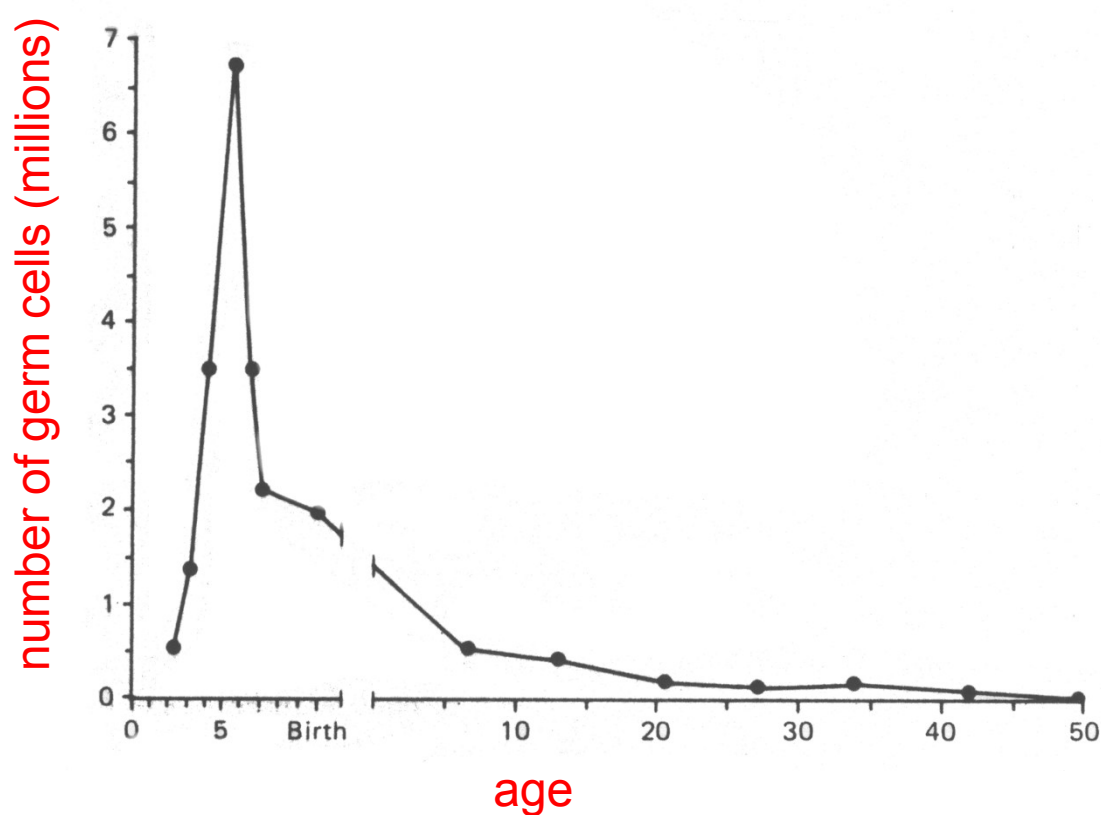
Το γεννητικό σύστημα αναπτύσσεται σε στενή συσχέτιση με το ουροποιητικό και το γαστρεντερικό σύστημα. Συγκεκριμένα, το διάμεσο μεσόδερμα και το ενδόδερμα της επιβλάστης της έσω κυτταρικής μάζας (3/στοιβος βλαστικός δίσκος) αποτελούν την κοινή εμβρυολογική προέλευση των παραπάνω συστημάτων. Η ανάπτυξη της αρχέγονης γεννητικής οδού είναι κοινή στα δύο φύλα μέχρι το τέλος της 6^{ης} εβδομάδας της κύησης, κατά την οποία έχει ολοκληρωθεί η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (germ cells) από το ενδόδερμα του οπίσθιου τοιχώματος του λεκιθικού ασκού στη γεννητική ακρολοφία (genital ridge). Η γεννητική ακρολοφία ή γοναδική πτυχή προέρχεται από την ουρογεννητική πτυχή του διαμέσου μεσοδέρματος του 3/στοιβου βλαστικού δίσκου (A.H. Decherney et al. Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας).

2.1. Διαφοροποίηση των ωοθηκών

Το γονίδιο SRY (Sex-determining Region of the Y chromosome) στο βραχύ σκέλος του Y χρωμοσώματος των φυσιολογικών αρρένων, θεωρείται ότι κωδικοποιεί τον ορχεοκαθοριστικό παράγοντα TDF (Testis Determining Factor).

Στο θήλυ έμβρυο απουσιάζει το Y χρωμόσωμα, επομένως το γονίδιο SRY που καθορίζει τον παράγοντα TDF επίσης απουσιάζει και δεν παρατηρείται διαφοροποίηση της γονάδας σε όρχι, συνεπώς δεν υπάρχει και παραγωγή της AMH.

Η διαφοροποίηση της ωοθήκης επιτελείται μεταξύ 8^{ης} και 10^{ης} εβδομάδας εμβρυικής ανάπτυξης και περιλαμβάνει την ανάπτυξη του φλοιού και του μυελού, την περίοδο πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων ή ωογονίων και την ωοθυλακιογένεση. Τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται μιτωτικά ώστε να φθάνουν στο μέγιστο αριθμό τους, περίπου 6.000.000- 7.000.000, κατά την 16^η – 20^η εβδομάδα ενδομήτριας ζωής (Εικ. 2-1) ενώ η μιτωτική τους αυτή διαίρεση σταματά περί την 28^η εβδομάδα ενδομήτριας ζωής και κύησης.



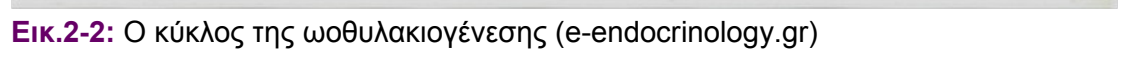
Εικ. 2-1: Γραφική παράσταση του αριθμού των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε συνάρτηση με την ηλικία της γυναίκας (how-treat.com).

Ταυτόχρονα με τη μίτωση, την 14^η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης, αρχίζει η ατρησία δηλαδή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, κατά τον οποίο πολλά ωογόνια εκφυλίζονται. Η ατρησία των ωογονίων παύει τον 7ο μήνα της κύησης, οπότε όλα τα ωογόνια, υφιστάμενα τη μειωτική διαίρεση, μετατρέπονται σε αρχέγονα (primordial)

ωοθυλάκια. Κάθε αρχέγονο ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα ωοκύτταρο σταματημένο στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και από μία σειρά αποπλατυσμένων κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο και λέγονται προκοκκώδη κύτταρα. Μία βασική μεμβράνη περιβάλλει το σύμπλεγμα ωοκυττάρου-προκοκκωδών κυττάρων. Σε αυτή τη φάση η ατρησία των ωοθυλακίων αντικαθιστά την ατρησία των ωογονίων και κατά τη γέννηση η ωοθήκη διαθέτει περίπου 1.000.000 -2.000.000 γεννητικά κύτταρα. Ο αριθμός αυτός μειώνεται με την ηλικία και στην ήβη απομένουν περίπου 300.000 -400.000 γεννητικά κύτταρα. Ο σχηματισμός των αρχέγονων ωοθυλακίων συνεχίζεται έως και λίγο μετά τη γέννηση.

Το πρωτογενές χαρακτηρίζεται από τη διαφοροποίηση των προκοκκωδών κυττάρων σε κυβοειδή. Για την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου απαιτούνται περίπου 150 ημέρες. Το δευτερογενές ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Αποτελείται από το ωάριο που είναι σταματημένο στην πρόφαση I, ενώ οι στιβάδες των κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν είναι περισσότερες από δύο, και το ωάριο αρχίζει να παράγει τη διαφανή ζώνη. Η διαφανής ζώνη αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνη και βρίσκεται μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων. Στο στάδιο αυτό παρουσιάζονται τα πρώτα κυττάρα θήκης, που είναι μεσεγγυματικής προέλευσης. Τότε το ωοθυλάκιο εκτίθεται για πρώτη φορά στο ορμονικό περιβάλλον της συστηματικής κυκλοφορίας και παράλληλα εμφανίζονται υποδοχείς της LH.

Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή ωοθυλάκια ονομάζονται ωοθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου (preantral), ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ο σχηματισμός του άντρου. Το ωοθυλάκιο σε αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση τόσο των κοκκωδών όσο και των κυττάρων της θήκης και από την εμφάνιση άντρου. Το ώριμο ωοθυλάκιο με άντρο προκύπτει κάτω από συνθήκες έντονων πολλαπλασιαστικών και διαφοροποιητικών διεργασιών που οδηγούν γρήγορα σε περισσότερο ώριμες μορφές, με μεγαλύτερο άντρο. Αυτό το στάδιο βρίσκεται υπό την



σάλπιγγες ή ωαγωγούς και το άνω τμήμα του κόλπου. Επίσης, η διαφοροποίηση των γεννητικών πόρων δεν προϋποθέτει την παρουσία των ωοθηκών καθώς η απουσία και μόνο της αντιμυλλέριας ορμόνης AMH επιτρέπει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των παραμεσονεφρικών πόρων ή πόρων του Müller.

Στην αρχή της πρώιμης εμβρυικής περιόδου, οι δύο πόροι του Müller ενώνονται στο ουραίο άκρο τους στο ύψος της μέσης γραμμής και σχηματίζουν μία νέα δομή σχήματος «Υ» που αποτελεί τον πρόδομο της μήτρας και του ανώτερου τμήματος του κόλπου και καλείται μητροκολεϊκός σωλήνας. Τα μη συμφυόμενα άκρα κάθε πόρου του Müller θα σχηματίσουν τις σάλπιγγες ενώ το απώτερα τμήματα αυτών θα παραμείνουν ανοιχτά σχηματίζοντας τους κώδωνες των σαλπίγγων. Κατά τη συνένωση των πόρων του Müller δημιουργείται στο κέντρο το μητριαίο διάφραγμα, το οποίο επαναροφάται την 9^η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης. Τα συνενωμένα τμήματα των πόρων σχηματίζουν τον πυθμένα, το σώμα, τον ισθμό και τον τράχηλο της μήτρας, με την ανάπτυξη των διάφορων αυτών τμημάτων της μήτρας να καλύπτει και τα τρία τρίμηνα της κύησης.

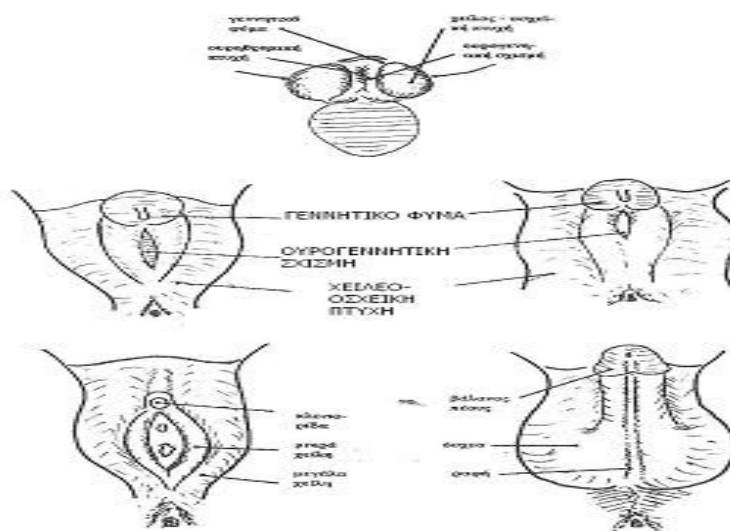
Αναφορικά με την ανάπτυξη του κόλπου ή κολεού, αυτός δεν έχει διασαφηνισθεί πλήρως. Σύμφωνα με την πιο αποδεκτή θεωρία, το ανώτερο 1/3 έως 4/5 του κολπικού επιθηλίου προέρχεται από τον μητροκολεϊκό σωλήνα ενώ τα κατώτερα 2/3 έως 1/5 προέρχονται από τα κολποκολεϊκά επάρματα. Τελικά ο κόλπος είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του μητροκολεϊκού σωλήνα και του πυελικού τμήματος του ουρογεννητικού κόλπου (A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Γ.Κ. Κρεατσάς. Γυναικολογία και Μαιευτική της Νεαρής Ηλικίας).

2.3. Διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων

Μέχρι την 9^η -10^η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης, η όψη των έξω γεννητικών οργάνων είναι όμοια στα δύο φύλα. Όπως συμβαίνει και με τις γονάδες και τους

γεννητικούς πόρους, τα έξω γεννητικά όργανα προέρχονται από κοινές καταβολές στα δύο φύλα: το γεννητικό φύμα, τις ουρογεννητικές ή αμαρικές ή ουρηθραίες πτυχές και τα γεννητικά ή χειλεοσχαιικά ογκώματα.

Το γεννητικό φύμα κάμπτεται ουραία και αποτελεί την κλειτορίδα. Τα μεγάλα χείλη του αιδοίου προέρχονται από τα γεννητικά ογκώματα, τα οποία δε συνενώνονται κατά τη μέση γραμμή όπως αυτό συμβαίνει στο αρρεν έμβρυο. Οι ουρογεννητικές πτυχές δεν ενώνονται αλλά παραμένουν ως τα μικρά χείλη του αιδοίου. Ο ουρογεννητικός κόλπος παραμένει ανοιχτός προς την επιφάνεια ως μία σχισμή, που αποτελεί τον πρόδομο του κόλπου και της ουρήθρας (Εικ.2-5) (Γ.Κ. Κρεατσάς. Γυναικολογία και Μαιευτική της Νεαρής Ηλικίας, Α.Η. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας).



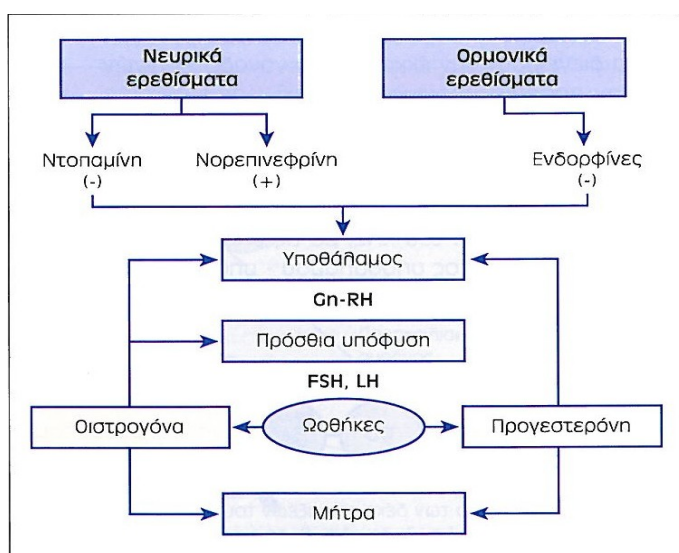
Εικ.2-5: Διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων (panacea.med.uoa.gr).

κεφάλαιο 3

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ

Το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας υφίσταται περιοδικές κυκλικές μεταβολές, ο έλεγχος των οποίων βασίζεται στην κατά ώσεις έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών GnRH από τον υποθάλαμο. Οι μεταβολές αυτές που παρουσιάζουν τα όργανα του γεννητικού συστήματος της γυναίκας ερμηνεύονται ως περιοδική προετοιμασία με τελικό στόχο τη γονιμοποίηση και την κύηση.

Ο κύκλος αναπαραγωγής είναι δυνατό να συνοψιστεί στον άξονα «Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες-Μήτρα». Τα προαναφερθέντα όργανα αλληλεπιδρούν συνεχώς, μέσω της δράσης διαμεσολαβητών, με μηχανισμούς θετικής και αρνητικής παλίνδρομης αλληλορύθμισης (positive feedback and negative feedback). Τον ρόλο των διαμεσολαβητών κατέχουν ορμόνες και νευροδιαβιβαστές (Εικ.3-1). (Α.Η. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ. Αντσακλής. Μαιευτική και Γυναικολογία).



Εικ.3-1: Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική)

3.1. ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ

Οι νευρώνες του υποθαλάμου παράγουν και εκκρίνουν ορμόνες ή νευροδιαβιβαστές, ουσίες οι οποίες εισέρχονται στην υποφυσιακή πυλαία κυκλοφορία. Το πυλαίο υποφυσιακό δίκτυο είναι ένα ειδικό σύστημα αγγείων μέσω του οποίου μεταφέρονται άμεσα στην πρόσθια υπόφυση, οι ουσίες που παράγονται από τον υποθάλαμο.

Οι νευρώνες του υποθαλάμου είναι οργανωμένοι σε δομές που λέγονται πυρήνες του υποθαλάμου. Μέσω ενός πολύπλοκου νευρικού δικτύου οι πυρήνες του υποθαλάμου διασυνδέονται με μεταξύ τους αλλά και με ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου.

Οι ορμόνες που παράγονται από τους υποθαλαμικούς πυρήνες ρυθμίζουν την απελευθέρωση των ορμονών της πρόσθιας υπόφυσης. Πρόκειται για τις ακόλουθες υποθαλαμικές ορμόνες: εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών GnRH, εκλυτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης TRH, εκλυτική ορμόνη της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης CRH, εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης GHRH, η σωματοστατίνη SS και η ντοπαμίνη ή ανασταλτικός παράγοντας έκκρισης της προλακτίνης PIF. Ειδικότερα, ο υπεροπτικός και ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου παράγουν και εκκρίνουν δύο ορμόνες, οι οποίες μεταφέρονται και αποθηκεύονται στην οπίσθια υπόφυση. Οι συγκεκριμένες ορμόνες είναι η αντιδιουρητική ορμόνη ADH ή βασοπρεσσίνη VP και η ωκυτοκίνη OXT.

Αναφορικά με τον ρόλο του υποθαλάμου στο αναπαραγωγικό σύστημα, κύρια θέση κατέχει η παλμική έκκριση της GnRH από τον τοξοειδή πυρήνα και την προοπτική περιοχή του υποθαλάμου, κάθε 30-60min. Η GnRH ορμόνη είναι ένα δεκαπεπτίδιο που διεγείρει την έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH και της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH από την πρόσθια υπόφυση (Εικ.3-2).

ΤΟΞΟΕΙΔΗΣ ΠΥΡΗΝΑΣ
ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ

**ΚΑΤΑ ΩΣΕΙΣ ΕΚΚΡΙΣΗ
GnRH**

ΠΡΟΣΘΙΟΣ ΛΟΒΟΣ
ΥΠΟΦΥΣΗΣ

**ΚΑΤΑ ΩΣΕΙΣ ΕΚΚΡΙΣΗ FSH
ΚΑΙ LH**

Εικ.3-2: Η κατά ώσεις έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο οδηγεί στην κατά ώσεις έκκριση της FSH και της LH από την πρόσθια υπόφυση.

Η παλμικότητα έκκρισης της GnRH ρυθμίζεται από ορμόνες του συστήματος «Υποθάλαμος-Υπόφυση», του άξονα «Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια», του άξονα «Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωθήκες» καθώς και από νευροδιαβιβαστές των ανώτερων κέντρων του εγκεφάλου. Η αλληλεπίδραση των ορμονών στους προαναφερθέντες άξονες επιτελείται μέσω μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης (feedback), θετικού ή αρνητικού (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία, Α.Η. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

3.2. ΥΠΟΦΥΣΗ

Η υπόφυση εντοπίζεται στη βάση του εγκεφάλου, εκτός της σκληράς μήνιγγας, σε μία περιοχή του σφηνοειδούς οστού που ονομάζεται τουρκικό εφίππιο, ακριβώς κάτω από το οπτικό χίασμα. Το τουρκικό εφίππιο ή βόθρος της υπόφυσης είναι το ανατομικό όριο μεταξύ πρόσθιου και οπίσθιου κρανιακού βόθρου.

Πρόκειται για έναν ενδοκρινή αδένά που συνδέεται και επικοινωνεί με τον υποθάλαμο μέσω του μίσχου της υπόφυσης που διαπερνά τη σκληρά μήνιγγα. Η υπόφυση αποτελείται από δύο διακριτά μέρη, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την εμβρυολογική τους προέλευση, την ανατομία και το λειτουργικό τους ρόλο: η πρόσθια υπόφυση ή πρόσθιος λοβός της υπόφυσης ή αδενούπόφυση και η οπίσθια υπόφυση ή οπίσθιος λοβός της υπόφυσης ή νευροϋπόφυση.

Η πρόσθια υπόφυση παράγει και εκκρίνει τις παρακάτω έξι ορμόνες από έξι διαφορετικούς τύπους κυττάρων: ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSH (Follicular Stimulating Hormone), ωχρινοτρόπος ορμόνη LH (Luteinizing Hormone), θυρεοειδοτρόπος ορμόνη TSH, φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ή αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη ή κορτικοτροπίνη ACTH, αυξητική ορμόνη GH και προλακτίνη PRL.

Η οπίσθια υπόφυση απελευθερώνει την ωκυτοκίνη OXT και τη βασοπρεσσίνη VP, οι οποίες αποθηκεύονται εδώ αλλά παράγονται από τον υποθάλαμο. Μία μικρή ομάδα κυττάρων της υπόφυσης, που αναφέρεται και ως μέσος λοβός της υπόφυσης, παράγει τη μελανοτρόπο ορμόνη MSH (Melanine Stimulating Hormone) της οποίας ρόλος είναι να διεγείρει τα μελανοκύτταρα του δέρματος για την παραγωγή μελανίνης.

Σχετικά με τη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, η κύρια θέση της υπόφυσης είναι η έκκριση των γοναδοτροπινών FSH και LH υπό την επίδραση της GnRH του υποθαλάμου. Οι γοναδοτροπίνες παράγονται από εξειδικευμένα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης, που ονομάζονται γοναδοτρόπα κύτταρα και έχουν την ιδιότητα, τα περισσότερα από αυτά, να παράγουν και τα δύο είδη γοναδοτροπινών.

Οι γοναδοτροπίνες έχουν γλυκοπρωτεϊνική σύσταση και αποτελούνται από α και β υποομάδες, με την α υποομάδα να είναι κοινή στις δύο ορμόνες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της FSH είναι περίπου 3-4 ώρες ενώ της LH είναι περίπου 20min. Η παραγωγή των ορμονών (οιστογόνα, προγεστερόνη) από την ωοθήκη εξαρτάται από τη δράση

των γοναδοτροπινών που απελευθερώνονται από την πρόσθια υπόφυση, υπό τη δράση της GnRH του υποθαλάμου –άξονας «Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκη» και «Υπόφυση-Ωοθήκη». Πρωτεύοντα ρόλο έχουν οι μηχανισμοί παλινδρόμης αλληλορύθμισης.

Επιπλέον, η έκκριση των γοναδοτροπινών επηρεάζεται από μία σειρά αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών με αυτοκρινή και παρακρινή δράση στη υπόφυση. Από τους παραπάνω παράγοντες, ιδιαίτερης σημασίας είναι η ακτιβίνη, η ινχιμπίνη ή ανασταλίνη A, η ινχιμπίνη ή ανασταλίνη B και η φολλιστατίνη, πεπτίδια που ανήκουν στην οικογένεια του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα TGF- β (Transforming Growth Factor- β).

Η πρόσθια υπόφυση διαθέτει δύο δεξαμενές γοναδοτρόπων κυττάρων: την πρώτη δεξαμενή, που είναι άμεσα διαθέσιμη καθώς περιέχει γοναδοτροπίνες έτοιμες για άμεση απελευθέρωση υπό τη δράση της GnRH, και τη δεύτερη δεξαμενή, η οποία είναι εφεδρική και απαιτεί παρατεταμένη δράση της GnRH για παραγωγή γοναδοτροπινών και στη συνέχεια απελευθέρωσή τους από τη δεύτερη δεξαμενή. Επίσης, η GnRH του υποθαλάμου, εκτός από παραγωγή, αποθήκευση και κατά ώσεις έκκριση των FSH και LH, είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά τους από τη δεύτερη στην πρώτη δεξαμενή.

Αξιοσημείωτα είναι το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο (self priming effect) και το φαινόμενο της «προς τα πάνω» ρύθμισης των υποδοχέων της GnRH στην υπόφυση (up regulation). Συγκεκριμένα, το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο αναφέρεται στο γεγονός ότι σε επαναλαμβανόμενες παλμικές εκκρίσεις της GnRH η απόκριση της πρόσθιας υπόφυσης είναι εντονότερη σε σύγκριση με την πρώτη ώση της GnRH. Κάτι τέτοιο εξηγείται ως εξής: Όταν η GnRH συνδεθεί με τους υποδοχείς της στην πρόσθια υπόφυση, πυροδοτούνται όχι μόνο η βασική απόκριση της έκκρισης των

γοναδοτροπινών από τα γοναδοτρόπα κύτταρα αλλά και δευτερεύουσες αποκρίσεις των γοναδοτρόπων κυττάρων.

Το φαινόμενο αυτό είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την «προς τα πάνω» ρύθμιση του αριθμού των υποδοχέων της GnRH στην υπόφυση. Η οιστραδιόλη, η ινχιμπίνη Β και η ακτιβίνη προκαλούν αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων GnRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, με αποτέλεσμα σε κάθε επόμενη ώση GnRH να απελευθερώνονται ολοένα και μεγαλύτερες ποσότητες FSH και LH σε σχέση με την προηγούμενη ώση GnRH. Κατά το μέσο του εμμηνορρυσιακού κύκλου, η αιχμή έκκρισης των FSH και LH οφείλεται σε αυτό το φαινόμενο (up regulation). (Γ.Κ.Κρεατσάς, Σύγχρονη Γυναικολογία, A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ.Αντσακλής, Μαιευτική και Γυναικολογία).

3.3. ΩΟΘΗΚΕΣ- Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο ρόλος της ωοθήκης είναι διττός: η ωοθυλακιογένεση με στόχο την ωοθυλακιορρηξία και η παραγωγή φυλετικών στεροειδών ορμονών.

3.3.1. Ωοθυλακιογένεση

Η βασική λειτουργική μονάδα της ωοθήκης είναι το ωοθυλάκιο, το οποίο περιέχει το ωοκύτταρο. Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια: Α). αρχική στρατολόγηση των ωοθυλακίων -εμφανίζεται στην ενδομήτριο ζωή και στα πρώτα χρόνια ζωής και διαρκεί περίπου 150 ημέρες η μετάβαση από το αρχέγονο ωοθυλάκιο στο πρωτογενές και 120 ημέρες περίπου από το πρωτογενές στο δευτερογενές, Β). κυκλική στρατολόγηση -αποτελεί τη βασική ωοθυλακική ανάπτυξη και αύξηση, κατά την οποία τα δευτερογενή ωοθυλάκια της Βαθμίδας 2 αναπτύσσονται μέχρι και τη Βαθμίδα 4, και Γ). επιλογή-ωρίμανση, η οποία περιλαμβάνει δευτερογενή ωοθυλάκια από τη Βαθμίδα 5 μέχρι και τη Βαθμίδα 8 του

προ-ωοθυλακιωρρηκτικού ωοθυλακίου. Συγχρόνως με την ωοθυλακιογένεση παρατηρείται η ατρησία, ώστε κάποια ωοθυλάκια διάφορων Βαθμίδων ανάπτυξης ακολουθούν τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Κεφ.2, Εικ.2-2).

Η ωοθυλακιογένεση επιτελείται κάτω από την επίδραση των γοναδοτροπινών FSH και LH που παράγονται από την πρόσθια υπόφυση, αλλά και των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλη και προγεστερόνη που παράγονται από την ίδια την ωοθήκη. Συγκεκριμένα η FSH προάγει την ωοθυλακική ανάπτυξη και ο συνδυασμός της FSH και της LH οδηγεί στην τελική ωρίμανση του ωοθυλακίου. Τελικά μία υψηλή εκκριτική ώση στο μέσο του καταμήνιου κύκλου πυροδοτεί την ωοθυλακιωρρηξία και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Είναι αξιοσημείωτο ότι το πρώτο στάδιο της ωοθυλακιογένεσης -η αρχική στρατολόγηση- είναι ανεξάρτητο των γοναδοτροπινών και ρυθμίζεται από παράγοντες όπως η ακτιβίνη, η αντιμυλλέριος ορμόνη AMH, μορφονενετικές πρωτεΐνες των οστών BMP-4/15/7 (Bone Morphogenic Proteins 4, 15, 7), ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9), το σύστημα Kit-R/Kit-L (A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

3.3.2. Ωοθυλακιωρρηξία-Ωχρο Σωμάτιο

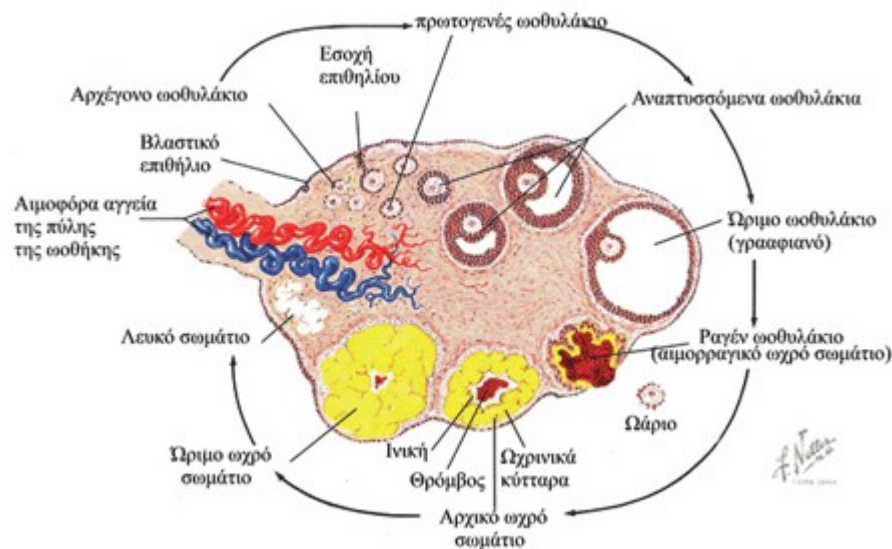
Κατά τη μεσότητα περίπου του κύκλου (περί την 14^η ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου), το διατεταμένο γραφιανό ωοθυλάκιο ρήγνυται και το δευτερογενές ωοκύτταρο με τον ωοφόρο δίσκο που το περιβάλλει, απελευθερώνεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Το φαινόμενο της ωοθυλακιωρρηξίας ελέγχεται από τη δράση των γοναδοτροπινών. Στο μέσον του κύκλου, παρατηρείται αύξηση της κυκλοφορούσας στο αίμα οιστραδιόλης E₂, η οποία οδηγεί σε μία εκκριτική αιχμή της LH και λιγότερο της FSH. Το κύμα της LH διαρκεί 48-50 ώρες και 36 περίπου ώρες μετά την έναρξη του

κύματος γίνεται η ωοθυλακιορρηξία. Σε σχέση με την αιχμή του κύματος της LH, η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει 10-12 ώρες μετά, ενώ συγκριτικά με την αιχμή της E_2 συμβαίνει 24-36 ώρες μετά.

Τα προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια αποτελούνται από 2 ομάδες κοκκωδών κυττάρων: τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα που βρίσκονται κοντά στον βασικό υμένα και τα εσωτερικά κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells) που περιβάλλουν το ωάριο. Είναι χαρακτηριστικό ότι η απάντηση στο κύμα της LH είναι πιο έντονη στα τοιχωματικά κοκκώδη (υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων-έκφραση). Τα εσωτερικά κοκκώδη κύτταρα κατά την ωοθυλακιορρηξία παράγουν προσταγλανδίνες μέσω της κυκλοοξυγενλάση COX-2 και άλλων ενζύμων. Οι προσταγλανδίνες προάγουν αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση των εσωτερικών κοκκωδών κυττάρων σημαντικές για την απομάκρυνση των κυττάρων και την ωοθυλακιορρηξία.

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ραγέν ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε ωχρο σωματίο υπό την επίδραση της LH. Τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης υφίστανται μία σειρά μορφολογικών αλλαγών που αποτελούν την ωχρινόλυση, ενώ ταυτόχρονα τα τριχοειδή αγγεία και οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και διαπερνούν τον βασικό υμένα. Το ωχρο σωματίο διατηρείται για 12-16 ημέρες περίπου και στη συνέχεια υποστρέφει και αντικαθίσταται από μία ανάγγεια ουλή που λέγεται λευκό σωματίο. Σε περίπτωση κύησης, η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου είναι 6-8 εβδομάδες, οπότε αναλαμβάνει ο πλακούντας την παραγωγή προγεστερόνης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διατήρηση του ωχρού σωματίου είναι: η LH, η β -HCG, η αγγείωσή του και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικ.3-3) (A.H. Decherney et al. Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).



Εικ.3-3: Το ωχρό σωματίο (eugonia.com).

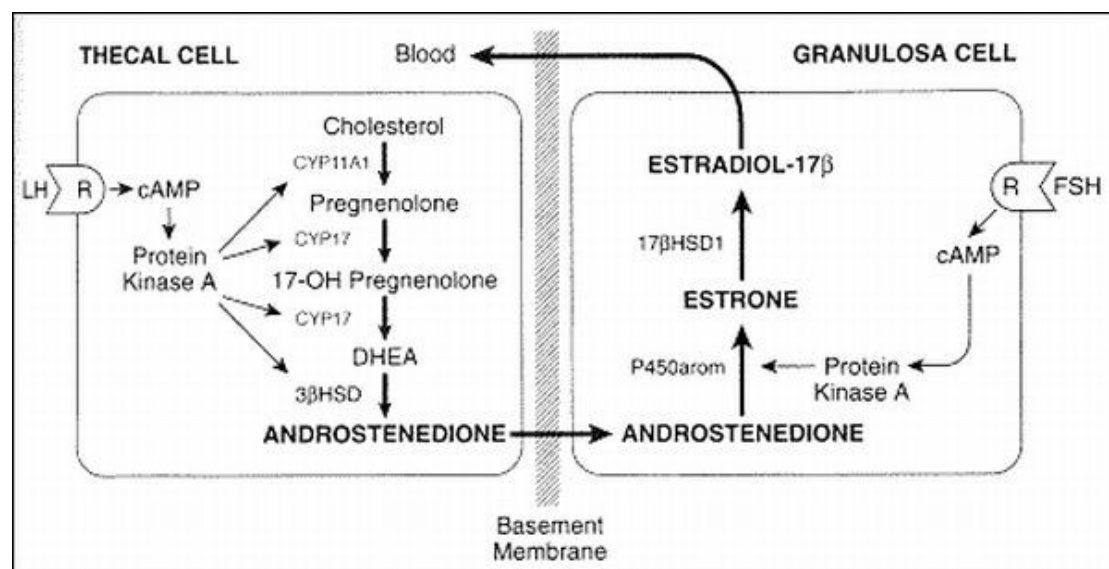
3.3.3. Στεροειδογένεση

Η βασική λειτουργική μονάδα της παραγωγής στεροειδών ορμονών από τις ωοθήκες, είναι το ωοθυλάκιο. Οι ορμόνες που εκκρίνονται από τα ωοθυλάκια είναι τα οιστρογόνα, τα προγεσταγόνα και τα ανδρογόνα. Οι βιολογικά δραστικές ορμόνες των ωοθηκών είναι η 17β-οιστραδιόλη ή οιστραδιόλη E2 και η προγεστερόνη. Πρωτεύοντα ρόλο στην ωοθηκική στεροειδογένεση, διαδραματίζουν οι υποφυσιακές ορμόνες FSH και LH.

Τα ενδοωοθυλακικά στεροειδή κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή του ωοθυλακίου που θα συνεχίζει να ωριμάζει και σε αυτά που θα υποστούν ατρησία. Στο ώριμο προωοθυλακιόρρηκτο ωοθυλάκιο, η LH δρα στους υποδοχείς LH των κυττάρων της έσω θήκης, μέσω ενεργοποίησης της κυκλικής 3', 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης AMP. Η δράση αυτή της LH οδηγεί στη μετατροπή της χοληστερόλης σε Δ4-ανδροστενδιόνη. Τα κύτταρα της έσω θήκης προμηθεύουν τα κοκκώδη κύτταρα με Δ4-ανδροστενδιόνη.

Τα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπουν, μέσω αρωματοποίησης, την Δ4-ανδροστενδιόνη σε οιστρόνη E1, μέρος της οποίας μετατρέπεται σε οιστραδιόλη E2. Η δράση αυτή

των κοκκωδών κυττάρων τελείται υπό την επίδραση της FSH στους υποδοχείς FSH με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της παραγωγής του κυκλικού AMP. Η επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης και της δράσης του ενδοκυττάριου κυκλικού AMP επάγει τη δραστηριότητα της αρωματάσης των κοκκωδών κυττάρων, ενζύμου απαραίτητου για την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Πρόκειται για τη θεωρία, γνωστή ως θεωρία των δύο γοναδοτροπινών-δύο κυττάρων, η οποία εξηγεί ότι η ωοθηκική παραγωγή οιστρογόνων είναι προϊόν συνεργασίας των κυττάρων της έσω θήκης και των κοκκωδών κυττάρων, υπό την επίδραση των FSH και LH στους αντίστοιχους υποδοχείς τους (Εικ.3-4).



Εικ.3-4: Η θεωρία των δύο κυττάρων-δύο γοναδοτροπινών, για την παραγωγή των οιστρογόνων στις ωοθήκες (just.edu.jo). theca cell= κύτταρο έσω θήκης, granulosa cell=κοκκώδες κύτταρο, basement membrane= βασικός υμένας, blood= αίμα, cholesterol= χοληστερόλη, pregnenolone= πρεγνενολόνη, DHEA= δεϋδροεπιανδροστερόνη, androstendione= ανδροστενδιόνη, estrone= οιστρόνη, estradiol-17β= 17β-οιστραδιόλη.

Η FSH επάγει την παραγωγή υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα, οι οποίοι είναι απαραίτητοι ώστε η μεσοκυκλική αιχμή της LH να οδηγήσει στην τελική ωρίμανση, την ωοθυλακιορρηξία και τελικά στην παραγωγή προγεστερόνης κατά την ωχρινική φάση του κύκλου. Τα ωχρινικά κύτταρα της θήκης αλλά και τα ωχρινικά κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου παράγουν προγεστερόνη υπό την επίδραση της LH στους υποδοχείς LH, οι οποίοι παραμένουν στο ωχρό σωματίο καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής του.

Αναφορικά με τη δράση των οιστρογόνων στα γυναικεία γεννητικά όργανα, τα οιστρογόνα έχουν σημαντικό ρόλο στις μεταβολές που υφίστανται το ενδομήτριο, ο τράχηλος της μήτρας και ο κόλπος στις διάφορες φάσεις του εμμηνορυσιακού κύκλου. Άλλωστε, τα οιστρογόνα ευθύνονται για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την κινητικότητα των σαλπίγγων. Επίσης, κάποιες από τις περαιτέρω δράσεις τους αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα, τους μαστούς, τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου.

Οι δράσεις της προγεστερόνης αφορούν τη μήτρα, τους μαστούς και τον εγκέφαλο. Η προγεστερόνη είναι υπεύθυνη για τις μεταβολές του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου καθώς και για τις κυκλικές μεταβολές του τραχήλου και του κόλπου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η διατήρηση των πρώτων εβδομάδων της κύησης κατά κύριο λόγο εξαρτάται από τη διεγερτική επίδραση της προγεστερόνης στην ανάπτυξη του ενδομητρίου και την ανασταλτική δράση της στη συσταλτικότητα του

μυομητρίου (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία, Α.Η. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

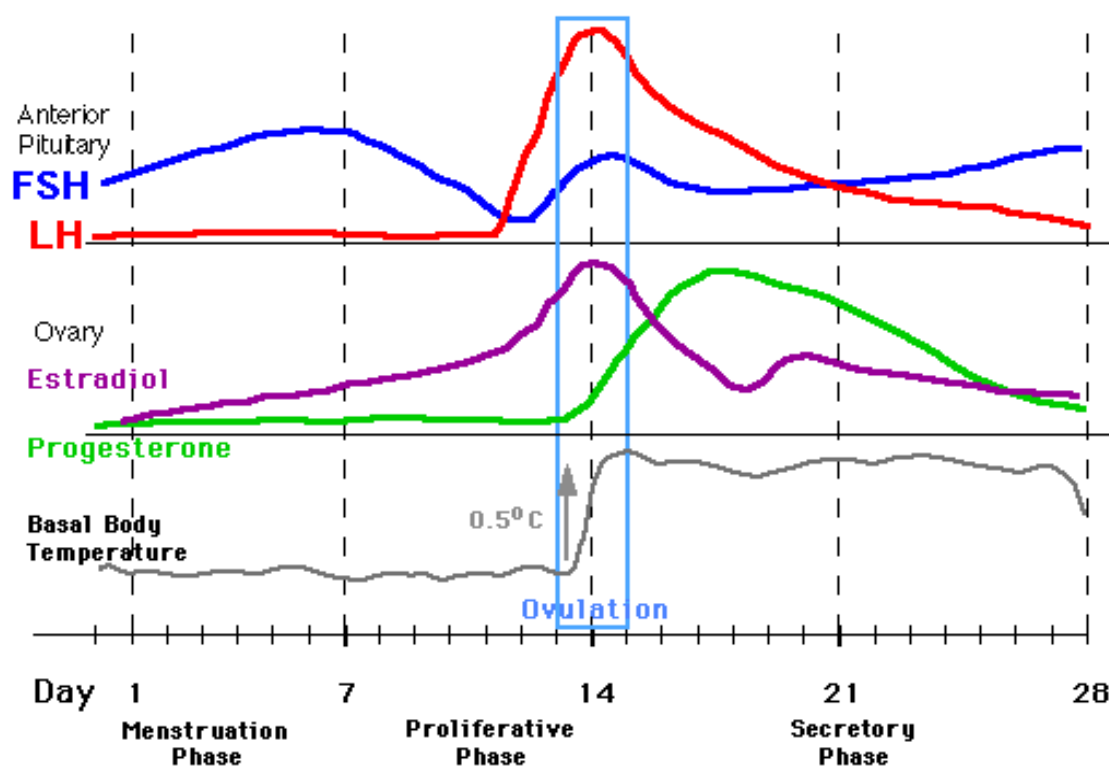
3.4. ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Ο εμμηνορυσιακός ή καταμήνιος κύκλος της γυναίκας διακρίνεται σε δύο κύριες φάσεις: την ωοθυλακική ή παραγωγική και την ωχρινική ή εκκριτική φάση- ενώ οι πρώτες 3-4 ημέρες της ωοθυλακικής φάσης αποτελούν την αιμορροϊκή φάση. Η πρώτη ημέρα της εμμηνορυσίας θεωρείται ως η πρώτη μέρα του κύκλου. Ωοθυλακική ή παραγωγική φάση λέγεται η φάση από την 1^η ημέρα του κύκλου έως την ωοθυλακιόρρηξια και είναι ασταθής αναφορικά με τη χρονική της διάρκεια. Σε κύκλο 28 ημερών, η ωοθυλακική φάση διαρκεί 14 ημέρες ενώ σε κύκλο μεγαλύτερο ή μικρότερο των 28 ημερών, η ωοθυλακική φάση αυξομειώνεται αναλόγως δεδομένου ότι η ωχρινική φάση του κύκλου διαρκεί πάντα 14 ημέρες. Έτσι, η ωχρινική ή παραγωγική φάση του κύκλου είναι σταθερή αναφορικά με τη διάρκειά της και αρχίζει την ημέρα της ωοθυλακορρηξίας. Οι ονομασίες των φάσεων του κύκλου παραπέμπουν στις αντίστοιχες κυκλικές μεταβολές που υφίστανται τα ωοθυλάκια και το ενδομήτριο, κατά τη διάρκεια των φάσεων του κύκλου (Εικ.3-6).

Οι ορμονικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου, αφορούν τις γοναδοτροπίνες της πρόσθιας υπόφυσης FSH και LH και τα κύρια ωοθηκικά στεροειδή, δηλαδή τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη (Εικ.3-5). Σημαίνοντα ρόλο διαδραματίζουν οι παλίνδρομοι μηχανισμοί αλληλορύθμισης του

άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες. Αξιοσημείωτες είναι και οι κυκλικές αλλαγές που αφορούν τα επίπεδα της ινχιμπίνης Α και της ινχιμπίνης Β.

Λίγο πριν την ωοθυλακιωρρηξία, η οιστραδιόλη φθάνει στη μέγιστη τιμή της οπότε μέσω θετικής παλίνδρομης αλληλορύθμισης στον υποθάλαμο και στην υπόφυση, αυξάνεται η FSH αλλά κυρίως αυξάνεται η LH. Κατ'αυτόν τον τρόπο παρατηρείται η μεσοκυκλικό κύμα και η μεσοκυκλική αιχμή της LH. Υπό την επίδραση της LH ολοκληρώνεται η πρώτη μειωτική διαίρεση του ωοκυττάρου του επικρατούντος ωοθυλακίου και αυξάνονται τα επίπεδα ορμονών που θα προκαλέσουν την ωοθυλακιωρρηξία. Περίπου 34 με 36 ώρες μετά την αιχμή της LH, επιτελείται ωοθυλακιωρρηξία (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία, A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).



Εικ.3-5: Ορμονικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (just.edu.jo). anterior pituitary= πρόσθια υπόφυση, ovary= ωοθήκη, estradiol= οιστραδιόλη,

progesterone= προγεστερόνη, basal body temperature= βασική θερμοκρασία σώματος, ovulation= ωοθυλακιορρηξία, menstruation phase= εμμηνορυσιακή φάση, proliferative phase= παραγωγική φάση, secretory phase= εκκριτική φάση

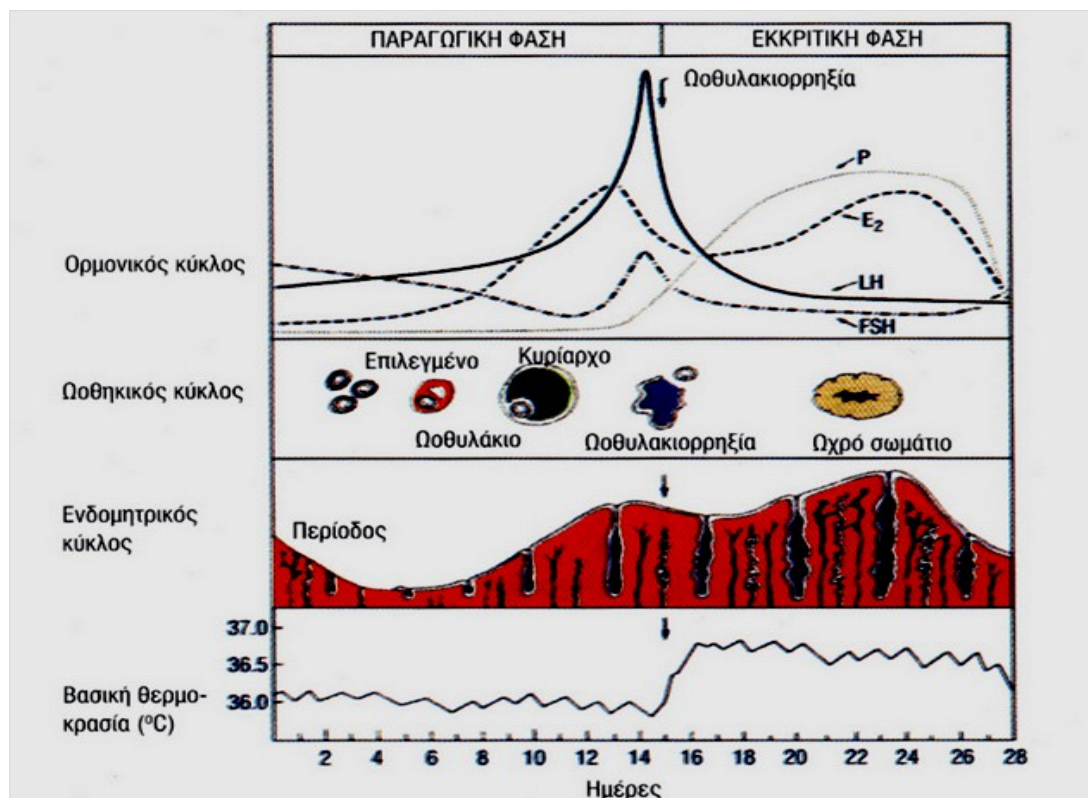
3.4. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΜΗΤΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Το ενδομήτριο, δηλαδή ο βλεννογόνος χιτώνας της μήτρας, κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου υφίσταται μορφολογικές-λειτουργικές αλλαγές, οι οποίες ολοκληρώνονται με την εμμηνορυσία οπότε αποπίπτει η λειτουργική στιβάδα του ενδομητρίου.

Κατά την παραγωγική ή ωοθυλακική φάση του καταμήνιου κύκλου, παρατηρείται αναγέννηση του ενδομητρίου κατά την οποία αποκαθίσταται το ενδομήτριο μετά την τελευταία εμμηνορυσία, υπό την επίδραση των οιστρογόνων που παράγονται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Εικ.3-6).

Κατά την εκκριτική ή ωχρινική φάση του κύκλου, υπό την επίδραση της προγεστερόνης κυρίως αλλά και της οιστραδιόλης που παράγεται από το ωχρό σώμα, το ενδομήτριο προετοιμάζεται για να υποδεχθεί το ενδεχόμενο γονιμοποιημένο ωάριο. Παρατηρείται διαφοροποίηση των στρωματικών και των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου, τα οποία αυξάνουν σε μέγεθος (ψευδοφθαρτοποίηση). Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση πινοποδίων στα επιθηλιακά κύτταρα προκειμένου να συμβάλουν σε ενδεχόμενη εμφύτευση. Παράλληλα, αυξάνεται η αγγείωση με αποτέλεσμα ήπιο οίδημα του ενδομητρίου ενώ οι ενδομητρικοί αδένες αποκτούν πολυέλικτη, σπειροειδή μορφή και αρχίζουν την εκκριτική τους δραστηριότητα παράγοντας ένα διαυγές υγρό πλούσιο σε γλυκογόνο

(Εικ.3-6). Αν δεν επισυμβεί γονιμοποίηση, ακολουθεί υποστροφή του ωχρού σωματίου, οπότε αποσύρεται η ορμονική υποστήριξη του ενδομητρίου και αυτό γίνεται λεπτότερο με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση όλου του ενδομητρίου εκτός από τη βασική στιβάδα του, κατά την έμμηνο ρύση (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία, Α.Η. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).



Εικ.3-6: Μορφολογικές μεταβολές του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, σε συνδυασμό με τις κυκλικές μεταβολές των ορμονών και των ωοθηκών (eugonia.com).

κεφάλαιο4

ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ, ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ

4.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η γονιμοποίηση είναι μία συντονισμένη αλληλοδιαδοχή κυτταρικών, μοριακών και βιοχημικών γεγονότων μεταξύ του σπερματοζωαρίου, του ωοκυττάρου και των περιβλημάτων τους, με τελικό αποτέλεσμα την ανάμειξη των πατρικών και των μητρικών χρωμοσωμάτων στην μετάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του ζυγώτη. Τα σπερματοζωάρια, μετά την εκσπερμάτιση, βρίσκονται στον οπίσθιο θόλο του κόλπου της γυναίκας όπου και ενεργοποιούνται ξεκινώντας το ταξίδι τους προς την ανεύρεση του ωαρίου (Εικ.4-1).



Εικ.4-1: Γονιμοποίηση. Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (education-portal.com).

Τα διάφορα μέρη του γεννητικού συστήματος ασκούν διάφορες επιδράσεις στα σπερματοζωάρια, άλλοτε ευνοϊκές για τη μετανάστευσή τους και άλλοτε όχι. Αποτέλεσμα όλων αυτών των επιδράσεων είναι το γεγονός ότι από τα 350.000.000-450.000.000 σπερματοζωάρια κάθε εκσπερμάτισης, ένας μικρός αριθμός μόνο ανευρίσκεται στις γυναικείες σάλπιγγες. Τα σπερματοζωάρια μόλις φτάσουν στο γεννητικό σύστημα του θήλεος για να είναι ικανά να γονιμοποιήσουν το ωάριο θα πρέπει πρώτα να υποστούν δυο διαδικασίες την ενεργοποίηση και την ακροσωμιακή αντίδραση (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

4.1.2. Στάδια γονιμοποίησης

Η διαδικασία της γονιμοποίησης ολοκληρώνεται εντός 24 ωρών από την ωοθυλακιορρηξία, δεδομένου ότι η διάρκεια ζωής του ωοκυττάρου είναι 24 ώρες, ενώ του σπερματοζωαρίου είναι 48 ώρες. Η γονιμοποίηση διακρίνεται στα παρακάτω επιμέρους στάδια: διάβαση του ακτινωτού στεφάνου, διάτρηση της διαφανούς ζώνης, σύνδεση της εσωτερικής ακροσωμιακής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου με την κυτταρική μεμβράνη του ωοκυττάρου και σύντηξη των μεμβρανών των δύο γαμετών στον υποζωνιαίο χώρο, είσοδος του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου και συνένωση των δύο προπυρήνων με σχηματισμό του ζυγώτη (Εικ.4-2)

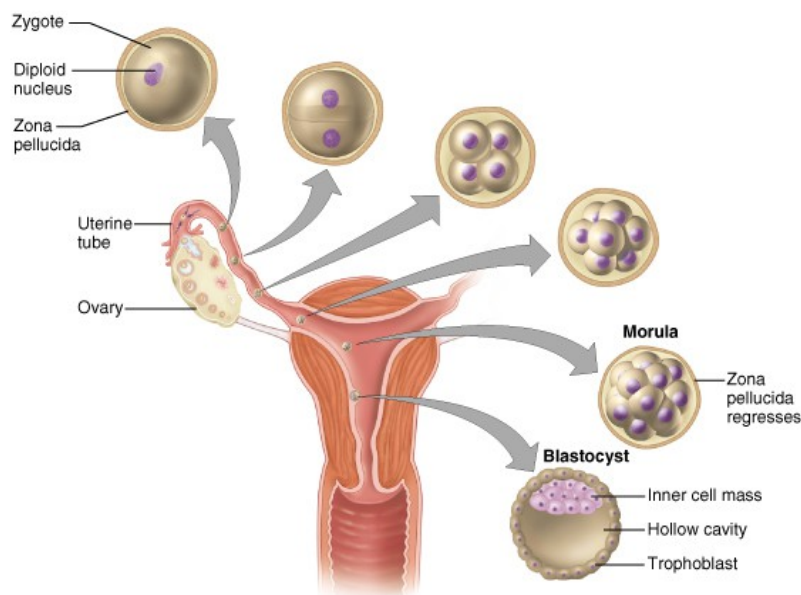


Εικ.4-2: Στάδια γονιμοποίησης. Δομή σπερματοζωαρίου (nursingcrib.com). fertilization=γονιμοποίηση, head=κεφαλή, middle piece=ενδιάμεσο τμήμα, tail=ουρά, acrosome=ακρόσωμα, nucleus=πυρήνας, plasma membrane=κυτταρική μεμβράνη, corona radiata=ακτινωτός στέφανος, zona pellucida=διαφανής ζώνη, fusion of sperm and egg nuclei=σύντηξη των πυρήνων του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου

Μετά την είσοδο στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου, ακολουθούν οι παρακάτω αντιδράσεις: αντίδραση του φλοιού, κατά την οποία απελευθερώνονται στον υποζωνιαίο χώρο χιλιάδες μικρά κοκκία που αλληλεπιδρούν με τη διαφανή ζώνη καθιστώντας την μη διαπερατή για τα υπόλοιπα σπερματοζωάρια, ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, από την οποία προκύπτει το ώριμο ωάριο με 22X χρωμοσώματα στον θηλυκό προπυρήνα και το δεύτερο πολικό σωματίο με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, και μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου, απαραίτητη για την έναρξη της πρώιμης εμβρυογένεσης.

Μετά τη συνένωση των δύο προπυρήνων, σχηματίζεται ο ζυγώτης με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, όπου τα 23 χρωμοσώματα είναι πατρικής προέλευσης και τα άλλα 23 είναι μητρικής προέλευσης. Εμφανίζεται στη συνέχεια μία αύλακα η οποία διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα σε δύο μέρη.

Ο ζυγώτης παραμένει στη σάλπιγγα όπου έγινε η γονιμοποίηση, για 4-5 περίπου ημέρες, όπου αυξάνεται με πολλαπλές αλληλοδιάδοχες μιτωτικές διαιρέσεις (αυλάκωση του ζυγώτη ή cleavage) και μετατρέπεται σε ζυγωτό 4 κυττάρων ή βλαστομεριδίων, ζυγωτό 6 κυττάρων, 8 κυττάρων, 12-16 κυττάρων (μορίδιο), βλαστίδιο, βλαστοκύστη (Εικ.4-3). Έτσι, σχηματίζονται η τροφοβλάστη ή τροφοεκτόδερμα ή έξω κυτταρική μάζα και η εμβρυοβλάστη ή έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και στο στάδιο αυτό παρατηρείται η εγκατάσταση στη μήτρα (εμφύτευση). Από την εμβρυοβλάστη θα δημιουργηθούν το έμβρυο, ο λεκιθικός ασκός και η αμνιακή κοιλότητα και από την τροφοβλάστη θα προκύψουν ο πλακούντας, το χόριο και το μεσόδερμα (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Εικ.4-3: Αυλάκωση του ζυγώτη και σχηματισμός της βλαστοκύστης (bioserv.fiu.edu). zygote=ζυγωτό, diploid nucleus=διπλοειδής πυρήνας, zona pellucida=διαφανής ζώνη, uterine tube=ωαγωγός, ovary=ωοθήκη, morula=μορίδιο, regress=οπισθοχωρώ, inner cell mass=έσω κυτταρική μάζα, trophoblast=τροφοβλάστη, hollow cavity=κοιλότητα βλαστοκύστης

4.2. ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ

Εμφύτευση ονομάζεται το σύνολο των φαινομένων που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία εξειδικευμένης στενής κυτταρικής επαφής μεταξύ της τροφοβλάστης και του ενδομητρίου, ενώ η βλαστοκύστη και το ενδομήτριο υφίστανται συγχρονισμένες κυτταρικές μεταβολές. Η διαδικασία της εμφύτευσης λαμβάνει χώρα 5-6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση μέχρι την 9^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και ξεκινάει 2-3 ημέρες μετά την είσοδο του μοριδίου στην κοιλότητα της μήτρας –περίπου την 20^η-24^η ημέρα του κύκλου, σε κύκλο 28 ημερών. Η βλαστοκύστη προέρχεται από το μορίδιο (στάδιο 16 κυττάρων) και πριν από την εμφύτευση περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη (zona pellucida). Η θέση της μήτρας όπου γίνεται η εμφύτευση είναι συνήθως το άνω οπίσθιο τοίχωμα του πυθμένα της μήτρας, ανάμεσα στα δύο σαλπινγικά στόμια.

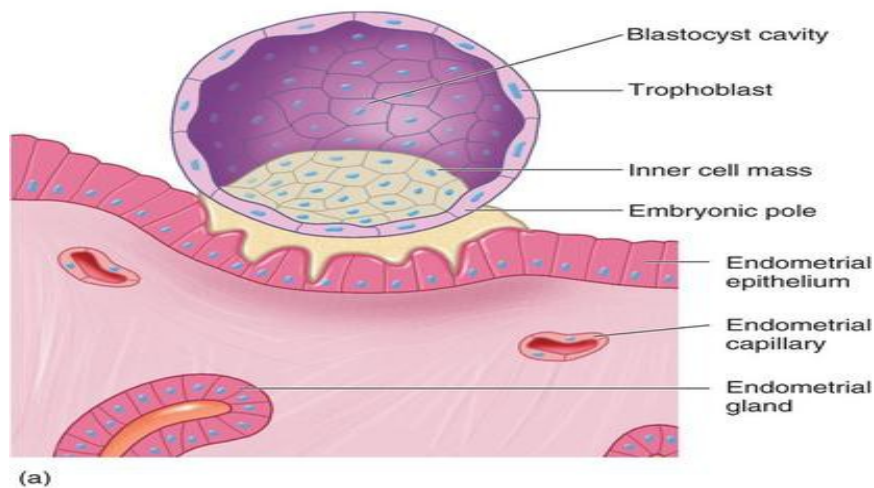
Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της εμφύτευσης είναι η απώλεια της διαφανούς ζώνης της βλαστοκύστης (hatching), ενώ για να είναι επιτυχής η εμφύτευση απαιτείται υποδεκτικό ενδομήτριο. Συγκεκριμένα, η επιτυχής εμφύτευση προϋποθέτει τις παρακάτω συνθήκες: απόλυτο συγχρονισμό μεταξύ της ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου σε βλαστοκύστη και της διαφοροποίησης μίας περιοχής του ενδομητρίου κατάλληλης για εμφύτευση, ορμονική προετοιμασία της μήτρας και εκκριτική δραστηριότητα του ενδομητρίου και του εμβρύου, αυξημένη αγγειογένεση και αιμάτωση της περιοχής εμφύτευσης, αυστηρά ρυθμιζόμενη διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης στο ενδοθήλιο του ενδομητρίου και τέλος τοπική αναστολή των ανοσολογικών μηχανισμών έναντι του ημιαλλογενούς εμβρύου.

Η διεργασία της εμφύτευσης διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην ομαλή πορεία της κύησης, ενώ το 75% των αποτυχημένων κυήσεων προκαλείται από ανεπιτυχή εμφύτευση. Η εμφύτευση παραμένει το δυσκολότερο στάδιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς από τα μεταφερόμενα έμβρυα, μόνο το 10%-20% καταλήγει σε επιτυχή εμφύτευση. Ωστόσο, ο τομέας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει συντελέσει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την πολύπλοκη διαδικασία της εμφύτευσης (F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ρ.Αγγελοπούλου.Εμβρυολογία, Ε.Σαλαμαλέκης.Ειδικά Θέματα Εμβρυομητρικής Ιατρικής).

4.2.1. Στάδια εμφύτευσης

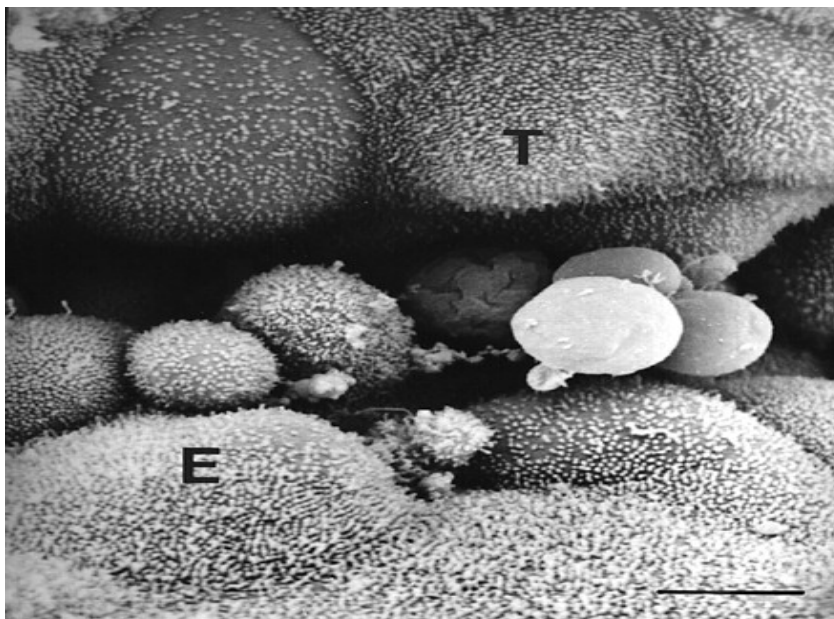
Η διεργασία της εμφύτευσης μπορεί να διαχωριστεί σε τρία στενά αλληλένδετα επιμέρους στάδια: προσανατολισμός-εναπόθεση (apposition), προσκόλληση-σταθερή σύνδεση-εγκατάσταση (adhesion), διείσδυση (invasion). Προ της έναρξης της εμφύτευσης, επιτελείται απώλεια της διαφανούς ζώνης της βλαστοκύστης (hatching) η οποία οφείλεται στη δράση πρωτεασών μητρικής και τροφοβλαστικής προέλευσης και οδηγεί σε απελευθέρωση της συγκυτιοτροφοβλάστης, που είναι η εξωτερική επιφάνεια της βλαστοκύστης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μέγεθος της βλαστοκύστης των 107 κυττάρων (βλαστοκύστη τελικού σταδίου) το οποίο είναι παρόμοιο με το μέγεθος του ζυγωτού σε πρωιμότερα στάδια αυλάκωσης, παρά το γεγονός ότι περιέχεται το βλαστικό υγρό στη βλαστοκυστική κοιλότητα. Η ανακάλυψη αυτή απορρίπτει την υπόθεση ότι η διόγκωση της βλαστοκύστης είναι αυτή που προκαλεί τον αποχωρισμό της διαφανούς ζώνης (F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).

Το πρώτο στάδιο της εμφύτευσης λέγεται προσανατολισμός-εναπόθεση (apposition) και χαρακτηρίζεται από χαλαρή σύνδεση της βλαστοκύστης με το τοίχωμα της μήτρας, με εναπόθεση της βλαστοκύστης στην περιοχή του ενδομητρίου με τη μεγαλύτερη αιμάτωση. Η βλαστοκύστη προσανατολίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε η έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη να εντοπίζεται προς την πλευρά του ενδομητρίου (Εικ.4-4).



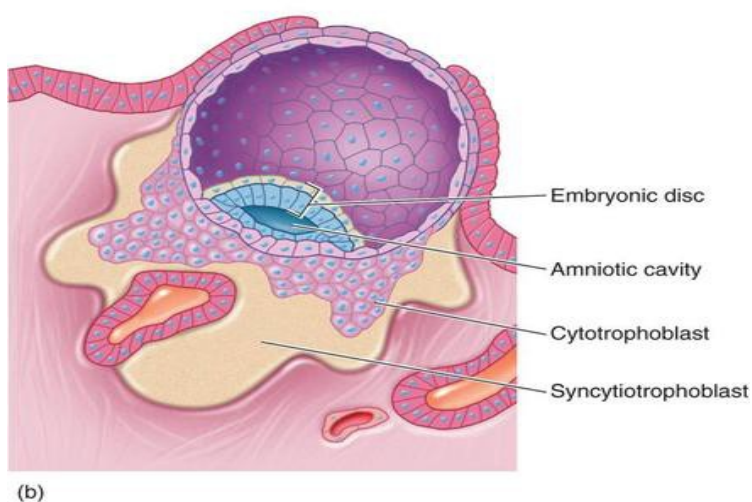
Εικ.4-4: Προσανατολισμός και εναπόθεση της βλαστοκύστης (humanphysiology.wikispaces). blastocyst cavity=βλαστοκυστική κοιλότητα, trophoblast=τροφοβλάστη, inner cell mass=έσω κυτταρική μάζα, embryonic pole=εμβρυικός πόλος, endometrial epithelium=ενδομητρικό επιθήλιο, endometrial capillary=ενδομητρικό τριχοειδές, endometrial gland=ενδομητρικός αδένας

Οι μικρολάχνες της επιφάνειας των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης της βλαστοκύστης έρχονται σε επαφή με προεξοχές της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου, που λέγονται πινοπόδια (Εικ.4-5).



Εικ.4-5: Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Πινοπόδια (humrep.oxfordjournals.org). T=κύτταρα τροφοβλάστης, E=επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου

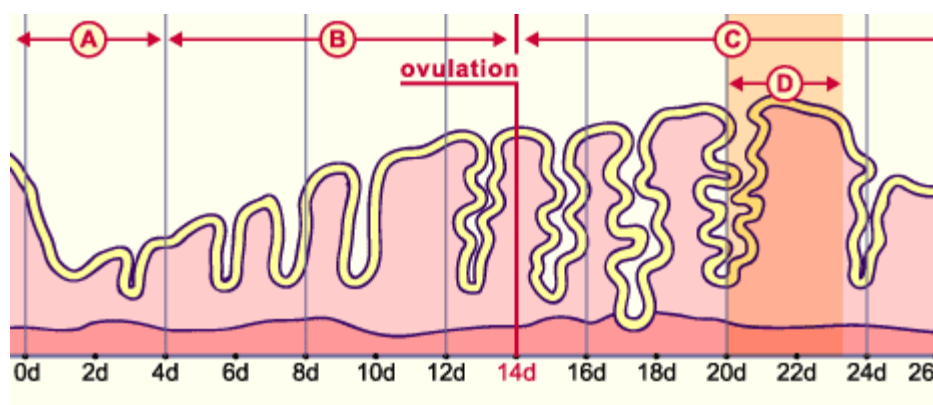
Το δεύτερο στάδιο της εμφύτευσης είναι η προσκόλληση-σταθερή σύνδεση (adhesion) της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και χαρακτηρίζεται από στενή πρόσφυση μεταξύ των μεμβρανών των τροφοβλαστικών κυττάρων και αυτών του ενδομητρίου. Στο στάδιο αυτό αρχίζει η αλληλοδιείσδυση μεταξύ των μικρολαχνών των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου και των μικρολαχνών της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων της τροφοβλάστη (Εικ.4-6). Το τρίτο στάδιο είναι η διείσδυση (invasion) της βλαστοκύστης, κατά την οποία παρατηρείται διείσδυση των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης μέσα στο στρώμα του ενδομητρίου διαπερνώντας το επιθήλιο και τον βασικό υμένα, φθάνοντας μέχρι το τοίχωμα των αγγείων του ενδομητρίου. Το αποτέλεσμα της διείσδυσης είναι στο τέλος της 9^{ης} περίπου ημέρας μετά τη γονιμοποίηση, η βλαστοκύστη να έχει διαπεράσει πλήρως στο ενδομήτριο και το έσω 1/3 του μυομητρίου με το επιθήλιο του ενδομητρίου να έχει καλύψει την περιοχή στην οποία έγινε η εμφύτευση. Μετά τη διείσδυση ακολουθεί η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου- υπερτροφία και υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου- και η πλακουντοποίηση.



Εικ.4-6: Προσκόλληση (adhesion) και διείσδυση (invasion) της βλαστοκύστης (humanphysiology.wikispaces.com). embryonic disc= εμβρυϊκός δίσκος, amniotic cavity= αμνιακή κοιλότητα, cytotrophoblast= κυτταροτροφοβλάστη, syncytiotrophoblast= συγκυτιοτροφοβλάστη

4.2.2. Υποδεκτικότητα του ενδομητρίου

Απαραίτητη προϋπόθεση της επιτυχούς εμφύτευσης του εμβρύου είναι ο συγχρονισμός της ορμονικά προετοιμασμένης μήτρας και της ώριμης βλαστοκύστης. Ως υποδεκτικότητα του ενδομητρίου ορίζεται η ικανότητα του ενδομητρίου να εξασφαλίσει επιτυχή εμφύτευση. Το ενδομήτριο είναι υποδεκτικό για ένα πολύ σύντομο και ακριβές χρονικό διάστημα κατά την εκκριτική ή ωχρινική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η χρονική αυτή περίοδος κατά την οποία η μήτρα επιτρέπει την εμφύτευση του εμβρύου ονομάζεται «παραθύρο υποδεκτικότητας του ενδομητρίου ή εμφύτευσης» και κυμαίνεται μεταξύ 20^{ης} και 24^{ης} ημέρας σε κύκλο 28 ημερών (Εικ.4-7). Κατά τη διάρκεια του «παραθύρου υποδεκτικότητας», το ενδομήτριο υπόκειται σε πολλές μεταβολές, ιστολογικές, μορφολογικές και βιοχημικές: γίνεται οιδηματώδες, λόγω της αυξημένης αγγείωσης, αυξάνεται η εκκριτική δραστηριότητα των ενδομητρικών αδένων, ενώ η σημαντικότερη μορφολογική αλλαγή είναι η εμφάνιση πινοποδίων στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Εικ.4-5) (F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Αρ.Αντσακλής,Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης,Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας).



Εικ.4-7: Παράθυρο εμφύτευσης (embryology.ch). **A:**έμμηνος ρύση, **B:**παραγωγική φάση ενδομητρίου, **C:**εκκριτική φάση ενδομητρίου, **D:**παράθυρο εμφύτευσης, ovulation=ωοθυλακιορρηξία

4.2.3. Ρυθμιστικοί παράγοντες της εμφύτευσης

Η υποδεκτικότητα του ενδομητρίου, ο συντονισμός των αλλαγών της βλαστοκύστης με το υποδεκτικό ενδομήτριο και η συνομιλία της ενεργοποιημένης βλαστοκύστης με το υποδεκτικό ενδομήτριο εξαρτώνται από τη δράση των στεροειδών ορμονών και κυρίως της προγεστερόνης, εμβρυικών και μητρικών παραγόντων, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.

Το ωχρό σωματίο, υπό την επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH, εκκρίνει προγεστερόνη, 17-β οιστραδιόλη E_2 αλλά και ανασταλτίνη ή ινχιμπίνη η οποία, μέσω αρνητικού συστήματος ανατροφοδότησης (αρνητικό feedback), προκαλεί ελάττωση στην έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH από την υπόφυση. Τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης E_2 πριν από την ωοθυλακιορρηξία ευοδώνουν τη διαίρεση και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου, ενώ η συνεχής παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο επάγει τη διαίρεση των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου ώστε αυτό να μετατραπεί σε εκκριτικό και κατ'επέκταση υποδεκτικό.

Τα κατεχολοιστρογόνα, τα οποία είναι μεταβολίτες των οιστρογόνων, έχουν ευοδωτικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης, ενώ η χοριακή γοναδοτροπίνη βhCG που εκκρίνεται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα της ώριμης βλαστοκύστης συμβάλλει στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου καθώς διεγείρει την στεροειδογένεση και επακολούθως διατηρεί την παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο σε υψηλά επίπεδα· διευκολύνει τη διείσδυση της βλαστοκύστης και αναστέλλει την LH, η οποία παραμένει σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της κύησης. Μέσω διέγερσης της έκκρισης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (vascular

endothelial growth factor), η βhCG επάγει την αγγειογένεση στην περιοχή της εμφύτευσης και την πλακουντοποίηση.

Τα μόρια προσκόλλησης (cellular adhesion molecules, CAMs), κυρίως οι ιντεγκρίνες και η τροφινίνη, συμβάλλουν στην αρχική προσκόλληση της βλαστοκύστης και την πλακουντοποίηση, ενώ οι βλεννίνες ή μουκίνες αποτελούν φραγμό στην προσκόλληση της βλαστοκύστης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πινοπόδια είναι ελεύθερα μουκινών.

Οι κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες φαίνεται επίσης να παίζουν σημαντικό ρόλο στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου αλλά και στα στάδια της εμφύτευσης. Πρόκειται γενικά για πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες που συνδέονται με υποδοχείς τους στην επιφάνεια των κυττάρων και ασκούν αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή δράση, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Το ενδομήτριο παράγει τόσο κυτοκίνες όσο και τους υποδοχείς τους, ενώ οι κυτοκίνες αυτές μαζί με αυτές που παράγονται από το έμβρυο αυξάνουν την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου ελέγχοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης. Ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας LIF (leukemia inhibiting factor) αυξάνεται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου, ενώ τα ελαττωμένα επίπεδα του LIF έχουν συσχετισθεί με την πρόκληση αυτόματων αποβολών. Ακόμη ο παράγοντας LIF είναι σημαντικός για την φθαρτοποίηση του ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Πριν από την εμφύτευση παράγεται από τα αδενικά κύτταρα του ενδομητρικού στρώματος ενώ κατά τη στιγμή της εμφύτευσης παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα της βλαστοκύστης. Ο εμβρυικός ενεργοποιητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων PAF (platelet activated factor) ασκεί τοπική αγγειοδιασταλτική δράση κατά την εμφύτευση, ενώ τα επίπεδα του συνδεόμενου με την ηπαρίνη επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HB-EGF (heparin binding- epidermal growth factor) αυξάνονται κατά την εκκριτική φάση του κύκλου με την αιχμή της έκκρισής του να παρατηρείται λίγο πριν το «παράθυρο εμφύτευσης». Άλλοι αυξητικοί

παράγοντες σημαντικό για τη διείσδυση της βλαστοκύστης είναι οι ομοιάζοντες με την ινσουλίνη αυξητικοί παράγοντες IGF-1 και IGF-2 (insulin like growth factors).

Η κυκλοοξυγενάση COX είναι ένα ένζυμο απαραίτητο για τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες και έχει δύο ισομορφές, την COX-1 και την COX-2. Η παραγωγή της COX-2, σε αντίθεση με αυτή της COX-1, δεν εξαρτάται από τις στεροειδείς ορμόνες αλλά από την παρουσία της βλαστοκύστης που είναι έτοιμη να εμφυτευθεί. Συγκεκριμένα, η COX-2 φαίνεται να προετοιμάζει το ενδομήτριο για την εμφύτευση, μέσω ρύθμισης της παραγωγής των προσταγλανδινών, οι οποίες δημιουργούν μία ήπια φλεγμονώδη αντίδραση στο ενδομήτριο αυξάνοντας τη διαπερατότητα των αγγείων με αποτέλεσμα την είσοδο ουσιών που ευνοούν την αγγειογένεση του ενδομητρίου.

Η IL-1 (ιντερλευκίνη-1) βρέθηκε ότι προάγει την έκφραση των γονιδίων της COX-2 στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου καθώς και της μεταλλοπρωτεάσης-9. Η μεταλλοπρωτεάση-9 και η μεταλλοπρωτεάση-3 συμβάλλουν στη διείσδυση της βλαστοκύστης με την τελευταία να αναστέλει συγχρόνως τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης, ώστε να μην εισχωρήσει βαθιά στο μυομήτριο με συνέπεια την αιμορραγία κατά την αποκόλληση του πλακούντα. Η διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των υποδοχέων των μορίων προσκόλλησης, ενώ αυξάνει η έκφραση των υποδοχέων εκείνων που χαρακτηρίζουν τα αγγειακά κύτταρα. Έτσι, τα κύτταρα της βλαστοκύστης που έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του ενδομητρίου μετατρέπονται σε αγγειακά κύτταρα, ευνοώντας με τον τρόπο αυτό τη διεργασία της διείσδυσης στη μήτρα. Ακόμη, τα γονίδια Hox και Wnt αποτελούν αναπτυξιακούς παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).

4.3. ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ

Ο πλακούντας είναι εμβρυομητρικό όργανο που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της κύησης στην κοιλότητα της μήτρας και αποβάλλεται κατά τον τοκετό. Είναι προσωρινό όργανο και προορίζεται να θρέψει και να οξυγονώσει το έμβρυο κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής, καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ αυτού και της μητέρας. Ο πλακούντας εξασφαλίζει την αμφίδρομη επικοινωνία μητέρας και εμβρύου, ώστε οι όροι εμβρυομητρική επικοινωνία και εμβρυομητροπλακουντιακή μονάδα να αποκτούν ιδιαίτερη σημασία. Πρόκειται για ένα δυναμικό όργανο που μεταβάλλει το ρυθμό αύξησης, τη δομή και την κυτταρική του σύνθεση. Επιτελεί λειτουργίες πνευμόνων, ήπατος, ενδοκρινών αδένων, πεπτικού συστήματος και νεφρών. Ο πλακούντας αποτελείται από στοιχεία εμβρυικής και μητρικής προέλευσης.

4.3.1. Εμβρυική μοίρα του πλακούντα

Ο σχηματισμός της εμβρυικής μοίρας του πλακούντα διακρίνεται στα παρακάτω στάδια: Α). προλαχνιαίο στάδιο, από την 6^η ημέρα μέχρι την 13^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και Β). το στάδιο σχηματισμού των λαχνών που παρατηρείται από την 13^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση μέχρι το τέλος της κύησης.

Α). Κατά το προλαχνιαίο στάδιο, το γονιμοποιημένο ωάριο προσκολλάται στο ενδομήτριο την 5^η-6^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, υπό τη μορφή βλαστοκύστης. Το τοίχωμα της βλαστοκύστης αποτελείται από έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη.

Η τροφοβλάστη αποτελείται από διάφορους κυτταρικούς τύπους με ξεχωριστή λειτουργικότητα και ανατομική κατανομή, ενώ στο προλαχνιαίο στάδιο διακρίνονται δυο τύποι τροφοβλάστης, οι οποίοι από έσω προς τα έξω είναι η κυτταροτροφοβλάστη ή στοιβάδα των κυττάρων του Langhans και η συγκυτιοτροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη ή στοιβάδα των κυττάρων του Langhans αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα.

Οι κύριες λειτουργίες της τροφοβλάστης είναι η υποβοήθηση της εμφύτευσης του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο, η ανάπτυξη της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας καθώς και η σύνθεση ορμονών.

Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί τον δραστικότερο στεροειδογενετικά κυτταρικό τύπο του πλακούντα μετατρέποντας τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη και κάνοντας την αρωματοποίηση των ανδρογόνων. Στην κυτταροτροφοβλάστη παράγονται οι ορμόνες GnRH, σωματοστατίνη, ανασταλτίνη ή ινχιμπίνη και ενεργοποιητίνη ή ακτιβίνη.

B). Το στάδιο σχηματισμού των λαχνών περιλαμβάνει δύο περιόδους: την περίοδο της δημιουργίας του πλακούντα από την 13^η ημέρα μέχρι το τέλος του 4^{ου} μήνα της κύησης και την περίοδο από τον 5^ο μήνα μέχρι το τέλος της κύησης. Ο σχηματισμός των λαχνών περιλαμβάνει τα στάδια σχηματισμού της πρωτογενούς λάχνης (13^η-15^η ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης), της δευτερογενούς λάχνης (18^η-20^η ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης) και της τριτογενούς λάχνης (21^η ημέρα μέχρι το τέλος της κύησης). Η τροφοβλάστη που έρχεται σε επαφή με το βασικό φθαρτό σταδιακά θα αναπτυχθεί και θα σχηματίσει την πλακουντιακή λάχνη και θα ονομαστεί λαχνωτό χόριο. (K.Bernirschke.Pathology of the Human Placenta.5th edition, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

4.3.2. Μητρική ή μητρογενής μοίρα του πλακούντα

Τα επιφανειακά τμήματα του ενδομητρίου μετά την εμφύτευση του κυήματος μετατρέπονται στον φθαρτό υμένα της κύησης. Φθαρτοποίηση ή φθαρτοειδής αντίδραση είναι η σειρά των μεταβολών του ενδομητρίου που συμβαίνουν ως απόκριση στη βλαστοκύστη. Η φθαρτοποίηση, η οποία βρίσκεται υπό την επιρροή

της προγεστερόνης, αρχίζει προς το τέλος της ωχρινικής ή εκκριτικής φάσης και διαρκεί αρκετές ημέρες.

Ο φθαρτός χαρακτηρίζεται από αγγειοβρίθεια και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Ανάλογα με την εντόπισή του, ο φθαρτός διακρίνεται στις παρακάτω τρεις μοίρες: τον βασικό φθαρτό- βρίσκεται στον εν τω βάθει πόλο του κύηματος, αφορίζει το κύημα από το υποκείμενο μυομήτριο και θα σχηματίσει τελικά τη μητρογενή μοίρα του πλακούντα, τον θυλακοειδή φθαρτό- περιβάλλει το υπόλοιπο του χοριακού σάκου καλύπτει δηλαδή το προέχον, προς την ενδομητρική κοιλότητα, τμήμα του εμβρύου, και τον τοιχωματικό φθαρτό- επενδύει την κοιλότητα της μήτρας, εκτός από την θέση εμφύτευσης, καλύπτει επομένως το υπόλοιπο τμήμα της ενδομητρικής κοιλότητας (K.Bernirschke.Pathology of the Human Placenta, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics).

κεφάλαιο 5

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Εμβρυολογία καλείται ο κλάδος της αναπτυξιακής βιολογίας που μελετά την ανάπτυξη του οργανισμού από το ζυγωτό μέχρι τη φάση που ο οργανισμός γίνεται αυτόνομος. Εώς την 14^η -18^η ημέρα της εμβρυικής ανάπτυξης παρατηρείται ανάπτυξη των εξωεμβρυικών ιστών, ώστε ο καταλληλότερος όρος για να περιγραφεί ο αναπτυσσόμενος οργανισμός στον χρόνο αυτό να είναι «προ-έμβρυο». Η ανάπτυξη του εμβρύου στον άνθρωπο διακρίνεται σε πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη και σε όψιμη εμβρυική ανάπτυξη (A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ. Αντσακλής. Μαιευτική και Γυναικολογία).

5.1. Ανάπτυξη του προ-εμβρύου

Κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη, το γονιμοποιημένο ωάριο ή ζυγωτό παραμένοντας στη σάλπιγγα ακολουθεί μία σειρά κυτταρικών διαιρέσεων. Όπως περιγράφεται διεξοδικά στο Κεφάλαιο 4, η διαδικασία αυτή ονομάζεται αυλάκωση του ζυγωτού (cleavage) κατά την οποία το διακρίνουμε τα παρακάτω στάδια: στάδιο 2 κυττάρων ή βλαστομεριδίων, στάδιο 4 κυττάρων, στάδιο 8 κυττάρων, στάδιο 12-16 κυττάρων ή μορίδιο, βλαστοκύστη.

Η βλαστοκύστη αποτελείται από την τροφοβλάστη ή τροφοεκτόδερμα ή έξω κυτταρική μάζα και από την εμβρυοβλάστη ή έσω κυτταρική μάζα, η οποία περικλείεται από το βλαστικό υγρό -που περιέχεται στην κοιλότητα της

βλαστοκύστης- και σε ένα τμήμα της είναι σε επαφή με το τοίχωμα της τροφοβλάστης. Το τροφοεκτόδερμα αποτελεί τον πρώτο εξωεμβρυικό ιστό, από τον οποίο θα προκύψουν και άλλες εξωεμβρυικές δομές: το χόριο, ο πλακούντας, το μεσόδερμα. Κατά το στάδιο του μοριδίου, το προ-έμβρυο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας, περίπου την 6^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, ενώ τελικά η εμφύτευση επιτελείται στο στάδιο της βλαστοκύστης και ολοκληρώνεται περίπου την 12^η ημέρα.

Κατά την μεταεμφυτευτική περίοδο, όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4, η έσω κυτταρική μάζα θα οδηγήσει στην ανάπτυξη των στιβάδων του 3/στιβου βλαστικού δίσκου: του εξωδέρματος ή επιβλάστης, του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος ή υποβλάστης. Οι άκρες του ενδοδέρματος συναντώνται σχηματίζοντας τον λεκιθικό ασκό. Στους ιστούς του μεσοδέρματος και του εξωδέρματος διακρίνονται δύο ξεχωριστές κοιλότητες: η εξωεμβρυική σπλαγχνική κοιλότητα και η προαμνιακή κοιλότητα. Η εξωεμβρυική σπλαγχνική κοιλότητα, η προαμνιακή κοιλότητα και η κοιλότητα του λεκιθικού ασκού μεγαλώνουν σε μέγεθος και μεταβάλλουν το σχήμα τους.

Από τις τρεις στιβάδες του εμβρυικού δίσκου θα προκύψουν στη συνέχεια οι ιστοί του εμβρύου. Αναφορικά με τους εξωεμβρυικούς ιστούς, το άμνιο αποτελείται από μια στιβάδα εξωεμβρυικού εξωδέρματος, ο λεκιθικός ασκός αποτελείται από μία στιβάδα εξωεμβρυικού ενδοδέρματος ενώ το χόριο αποτελείται από μία στιβάδα τροφοβλαστικών κυττάρων (A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ. Αντσακλής. Μαιευτική και Γυναικολογία).

5.2. Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη

Ως πρώιμη εμβρυική περίοδος ορίζεται η ανάπτυξη του εμβρύου από την 3^η έως και την 8^η εβδομάδα ανάπτυξης. Την 20^ή ημέρα της κύησης, δηλαδή με την έναρξη της 3^{ης} εβδομάδας κύησης, ξεκινάει η οργανογένεση και η μορφογένεση του ανθρώπινου σώματος οπότε ο αναπτυσσόμενος οργανισμός καλείται πλέον «έμβρυο».

Από το ενδόδεσμα του προεμβρύου σχηματίζεται το αρχέγονο έντερο, το οποίο στη συνέχεια θα σχηματίσει το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο. Την 4^η εβδομάδα ανάπτυξης, η συνένωση των νευρικών σχηματίζει το νευρικό σωλήνα, που αποτελεί την καταβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Κατά την 5^η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης, παρατηρείται ταχεία ανάπτυξη του εγκεφάλου ώστε η αύξηση της κεφαλής να είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την αύξηση άλλων περιοχών του σώματος. Η 6^η εβδομάδα ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη των επιμέρους τμημάτων των άκρων, ενώ αυτά υφίστανται σημαντικές αλλαγές κατά την 7^η εβδομάδα ανάπτυξης του εμβρύου. Κατά την 8^η εβδομάδα ανάπτυξης, αναγνωρίζονται οι οφθαλμοί, τα ώτα, η μύτη και το στόμα. Αρχίζει η οστεοποίηση από το ινίο, την κάτω γνάθο και τη διάφυση του βραχιόνιου οστού, ενώ παρατηρείται προχωρημένη ανάπτυξη των γονάδων χωρίς όμως διαφοροποίηση (A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ. Αντσακλής. Μαιευτική και Γυναικολογία).

5.3. Όψιμη εμβρυική ανάπτυξη

Ως όψιμη εμβρυική ανάπτυξη ορίζεται η ανάπτυξη του εμβρύου από την 9^η έως την 38^η εβδομάδα κύησης. Τα κύρια γεγονότα αυτής της περιόδου είναι η διαφοροποίηση των οργάνων που άρχισαν να αναπτύσσονται κατά την πρώιμη εμβρυική περίοδο καθώς και η ταχεία αύξηση του σώματος. Η ανάπτυξη του εγκεφάλου ολοκληρώνεται κατά τον 7ο μήνα κύησης, ενώ τα έξω γεννητικά όργανα είναι ευδιάκριτα στο τέλος του 3^{ου} μήνα της κύησης. Τελειόμηνο έμβρυο θεωρείται αυτό που έχει συμπληρώσει τις 37 εβδομάδες κύησης (A.H. Decherney et al. Current: Diagnosis and Treatment. Obstetrics and Gynecology, Αρ. Αντσακλής. Μαιευτική και Γυναικολογία).

κεφάλαιο 6

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΗΜΙΣΥ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Η κύηση είναι μία φυσιολογική κατάσταση κατά τη διάρκεια της οποίας αναπτύσσονται αντιρροπιστικοί μηχανισμοί για την επιτυχή έκβασή της. Ωστόσο, σε ποσοστό 5%-20% είναι δυνατό να εμφανισθούν επιπλοκές από την μητέρα, το έμβρυο και τον πλακούντα. Οι επιπλοκές στο πρώτο ήμισυ της κύησης, και ειδικότερα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, είναι συχνές. Οι μισές συλλήψεις αποβάλλονται πριν την 12^η εβδομάδα κύησης, οι περισσότερες εκ των οποίων πριν γίνουν κλινικά εμφανείς (βιοχημικές κυήσεις). Στις επιπλοκές κατά το πρώτο ήμισυ της κύησης περιλαμβάνονται οι αυτόματες αποβολές, η έκτοπη κύηση και η τροφοβλαστική νόσος της κύησης.

6.1. Έκτοπη κύηση

Έκτοπη κύηση ονομάζεται η εγκυμοσύνη που εξελίσσεται εκτός της κοιλότητας της μήτρας καθώς η εμφύτευση της βλαστοκύστης πραγματοποιήθηκε σε θέση εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας, με συνηθέστερη θέση τις σάλπιγγες ή ωαγωγούς. Οι θέσεις που μπορεί να γίνει η εμφύτευση είναι: οι σάλπιγγες ή ωαγωγοί στο 99% των περιπτώσεων, οι ωοθήκες με συχνότητα 0.5%, η περιτοναϊκή κοιλότητα με συχνότητα 0,03% (κοιλιακή έκτοπη κύηση) και ο τράχηλος με συχνότητα περίπου 0,1% (τραχηλική κύηση). Σπανίως, σε συχνότητα 1:30.000 κυήσεις, συνυπάρχει ενδομήτρια και έκτοπη κύηση και η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως ετερότοπη κύηση. Ωστόσο, λόγω των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η συχνότητα

των ετερότοπων κυήσεων έχει ανέλθει στο σύνολο σε 1:7.000 κυήσεις ενώ μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας είναι 1:900 κυήσεις. Αναφορικά με την σαλπιγγική κύηση, αυτή στο 93% των περιπτώσεων αφορά τη λήκυθο της σάλπιγγας, στο 4% τον ισθμό και το 2,5% το ενδιάμεσο τμήμα της σάλπιγγας ή το ενδοτοιχικό τμήμα αυτής στο σύστοιχο κέρας της μήτρας. Προδιαθεσικοί παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη έκτοπης κύησης είναι: ιστορικό χειρουργικής επέμβασης στις σάλπιγγες ή άλλης κοιλιακής επέμβασης, ιστορικό φλεγμονώδους νόσου πυέλου, χρήση ενδομήτριου σπειράματος ως μεθόδου αντισύλληψης, αντισυλληπτικά δισκία προγεσταγόνου ή έκθεση σε διαιθυλβεστρόλη (DES) κατά την ενδομήτριο ζωή της γυναίκας, ιστορικό τεχνητής έκτρωσης ή προηγούμενης έκτοπης κύησης, εξωσωματική γονιμοποίηση, κάπνισμα.

Η κλινική εικόνα της έκτοπης κύησης χαρακτηρίζεται από την τριάδα: κοιλιακό άλγος, κολπική αιμόρροια και ιστορικό αμηνόρροιας. Η διάγνωση τίθεται με εργαστηριακές εξετάσεις –μέτρηση επιπέδων βhCG και προγεστερόνης στον ορό του αίματος, διακολπικό και διακοιλιακό υπερηχογράφημα των έσω γεννητικών οργάνων και λαπαροσκόπηση. Η θεραπεία είναι χειρουργική με θεραπεία εκλογής την επεμβατική λαπαροσκόπηση ενώ υπό ορισμένες προϋποθέσεις είναι δυνατόν η έκτοπη κύηση να αντιμετωπιστεί φαρμακευτικά με την χορήγηση μεθοτρεξάτης (ενδομυικά ή τοπικά υπό λαπαροσκοπικό ή υπερηχογραφικό έλεγχο) (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Ν.Δ.Βραχνής.Εγχειρίδιο ALSO, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics. 23rd edition).

6.2. Τροφοβλαστική νόσος της κύησης ή Μύλη κύηση

Με τον όρο τροφοβλαστική νόσος της κύησης αναφερόμαστε στις καλοήθειες μορφές της νόσου, οι οποίες είναι: η πλήρης μύλη ή υδατιδώδης κύηση και η μερική μύλη κύηση, ενώ με τον όρο τροφοβλαστική νεοπλασία της κύησης αναφερόμαστε στις

μορφές που χαρακτηρίζονται από τάση για υποτροπές και μεταστάσεις, οι οποίες είναι: η διεισδυτική μύλη, το χοριοκαρκίνωμα αλλά και ο τροφοβλαστικός όγκος της θέσης εμφύτευσης του πλακούντα και ο επιθηλιοειδής τροφοβλαστικός όγκος. Η τροφοβλαστική νόσος της κύησης εμφανίζεται με ποικιλία συμπτωμάτων και κλινικών σημείων: κολπική αιμόρροια, υπερέμεση κύησης, αρτηριακή υπέρταση κύησης, θυρεοτοξίκωση. Μέθοδος εκλογής για την πρώιμη διάγνωση της μύλης κύησης είναι ο υπερηχογραφικός έλεγχος της μήτρας κατά τον οποίο διαπιστώνεται η συνήθως παθολογική εικόνα δίκην χιονοθύελλας που αντιστοιχεί στις κυστικά εκφυλισμένες χοριακές λάχνες. Θεραπεία εκλογής είναι η εκκενωτική απόξεση της μήτρας με αναρροφητικό ξέστρο ενώ είναι αμφιλεγόμενη η χορήγηση χημειοθεραπείας μετά την εκκενωτική απόξεση σε μύλη κύηση. Η μύλη κύηση επιβάλλει, μετά την χειρουργική αντιμετώπιση, στενή παρακολούθηση με μετρήσεις της βhCG στον ορό του αίματος καθώς και αντισύλληψη για ένα έτος λόγω του κινδύνου υποτροπής και εξαλλαγής σε χοριοκαρκίνωμα (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Ν.Δ.Βραχνής.Εγχειρίδιο ALSO, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics. 23rd edition).

6.3. Αποβολές

Αυτόματη αποβολή ή αυτόματη έκτρωση ονομάζεται η αυτόματη διακοπή της κύησης πριν το έμβρυο καταστεί βιώσιμο. Οι αυτόματες αποβολές είναι δυνατό να είναι σποραδικές ή να εμφανίζονται διαδοχικά οπότε καλούνται επανειλημμένες ή καθ'έξιν αποβολές. Η πλειονότητα των αυτόματων αποβολών είναι σποραδικές και οφείλεται σε γενετικά αίτια που επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία της μητέρας.

κεφάλαιο 7

ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας WHO (World Health Organization), ως αυτόματη αποβολή ορίζεται ο αυτόματος τερματισμός της κύησης πριν από τις 20 εβδομάδες κύησης ή με βάρος εμβρύου μικρότερο των 500 g.

Ωστόσο, ο ορισμός της αυτόματης αποβολής ποικίλλει μεταξύ των χωρών σύμφωνα με το νομικό πλαίσιο που διέπει κάθε κράτος. Στην Ευρώπη, δεδομένου ότι το έμβρυο θεωρείται βιώσιμο μετά τη συμπλήρωση της 24ης εβδομάδας κύησης, ως αυτόματη αποβολή χαρακτηρίζεται η απώλεια του κύηματος πριν από τις 24 εβδομάδες κύησης (F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία,Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE) και το Βρετανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (RCOG), κάποιοι από τους όρους που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό και την περιγραφή της αυτόματης αποβολής είναι: βιοχημική απώλεια κύησης, κενός εμβρυικός σάκος, πρώιμη εμβρυική απώλεια, όψιμη εμβρυική απώλεια. Βιοχημική εμβρυική απώλεια ονομάζεται η αποβολή που συμβαίνει μετά από θετικό τεστ παρουσίας χοριακής γοναδοτροπίνης hCG στα ούρα ή αυξημένα επίπεδα β-hCG στον ορό του αίματος αλλά χωρίς υπερηχογραφική ή ιστολογική επιβεβαίωση της απώλειας (ESHRE 2009, RCOG 2006).

Το ποσοστό των αυτόματων αποβολών κυμαίνεται στο 15%-20% των κλινικά επιβεβαιωμένων κυήσεων. Το πραγματικό ποσοστό, όμως, των αυτόματων αποβολών είναι μεγαλύτερο, περίπου 40% των συλλήψεων, καθώς πολλές εμβρυικές απώλειες επισυμβαίνουν σε βιοχημικές κυήσεις δηλαδή αρκετά νωρίς, πριν από ή κατά τη χρονική στιγμή της επόμενης εμμήνου ρύσης και παραμένουν αδιάγνωστες (Carrington B et al.2005).

Συγκεκριμένα, σε ποσοστό 15% δε γίνεται διαίρεση του γονιμοποιημένου ωαρίου, σε ποσοστό 15% υπάρχει απώλεια πριν από την εμφύτευση και σε ποσοστό 25% κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική). Αναφερόμενοι στις κλινικά διαγνωσμένες κυήσεις, το ποσοστό των κυήσεων που επιπλέκονται με αυτόματη αποβολή στο πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι 15%-40%, με μεγαλύτερη συχνότητα αυτόματων αποβολών σε κυήσεις μεταξύ 8^{ης} και 12^{ης} εβδομάδας κύησης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι περισσότερο από το 80% των αυτόματων αποβολών λαμβάνει χώρα τις πρώτες 12 εβδομάδες της κύησης και αναφέρεται ως πρώιμη αποβολή, ενώ μετά το πρώτο τρίμηνο της κύησης το ποσοστό των αποβολών μειώνεται στο 1%-4% και αναφέρεται ως όψιμη αποβολή (Π.Δρακάκης.Αποβολές.Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Bottomley C et al.2009). Περίπου το ¼ όλων των γυναικών βιώνει τουλάχιστον μία αυτόματη αποβολή κατά τη διάρκεια της ζωής του (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Μ.Μαμόπουλος.Εμβρυομητρική Ιατρική, Merel M.J. van den Berg et al.2012).

7.1. Είδη αυτόματων αποβολών

Τα συνήθη συμπτώματα και κλινικά σημεία των αυτόματων αποβολών είναι η κοιλιακή αιμόρροια, υπογάστριο κοιλιακό άλγος και σε κάποιες περιπτώσεις έλλειψη των

τυπικών συμπτωμάτων της κύησης (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

Ανάλογα με την κλινική τους εικόνα, οι αυτόματες αποβολές διακρίνονται στα παρακάτω είδη: (επ)απειλούμενη αποβολή, αναπόφευκτη αποβολή, ατελής αποβολή, τελεία αποβολή, παλίνδρομη κύηση, σηπτική αποβολή και επανειλημμένες ή καθ'έξιν αυτόματες αποβολές. Επίσης, αναφέρεται η ανεμβρυϊκή ή ανεμβρυονική κύηση ή σύνδρομο κενού εμβρυϊκού σάκου κατά την οποία δεν έχει αναπτυχθεί έμβρυο ενώ υπάρχει σάκος κύησης και πρώιμος πλακουντιακός ιστός. Δεν είναι είδος αποβολής αλλά οδηγεί σε αποβολή. Η διάγνωση συνήθως τίθεται την 5^η εβδομάδα κύησης υπερηχογραφικά.

Στην (επ)απειλούμενη αποβολή το πρώτο και χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η εμφάνιση κοιλιακής αιμόρροιας. Το τραχηλικό στόμιο παραμένει κλειστό και δεν έχουν διέλθει προϊόντα σύλληψης.

Η αναπόφευκτη αποβολή αποτελεί τη δυσάρεστη έκβαση της (επ)απειλούμενης αποβολής, εκδηλώνεται με έντονο κοιλιακό άλγος, κοιλιακή αιμόρροια και διαστολή με εξάλειψη του τραχήλου με ή χωρίς ρήξη των εμβρυϊκών υμένων.

Η ατελής αποβολή εμφανίζεται με κύρια συμπτώματα το έντονο κοιλιακό άλγος και την κοιλιακή αιμόρροια, με προϊόντα σύλληψης. Υπάρχει διαστολή του έξω τραχηλικού στομίου με πρήγματα και εμβρυϊκά στοιχεία να προβάλλουν από αυτό.

Στην τελεία αποβολή, το κύριο χαρακτηριστικό είναι η πλήρης εκκένωση της μήτρας από τα προϊόντα σύλληψης. Σε αυτό το είδος αποβολής είναι έντονα τα συμπτώματα του κοιλιακού άλγους και της κοιλιακής αιμόρροιας, τα οποία όμως υποχωρούν με την πλήρη έξοδο του κυήματος από τον τράχηλο.

Ως παλίνδρομη κύηση ορίζεται η κατακράτηση του νεκρού εμβρύου και των εμβρυϊκών υμένων ή του πλακούντα εντός της κοιλότητας της μήτρας, για ημέρες ή

εβδομάδες. Το τραχηλικό στόμιο είναι κλειστό και τα τυπικά κλινικά συμπτώματα της κύησης υποχωρούν. Σπάνια αλλά σοβαρή επιπλοκή της παλίνδρομης κύησης είναι η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη.

Ως σηπτική χαρακτηρίζεται κάθε είδος αποβολής που επιπλέκεται με λοίμωξη και συναντάται σε ποσοστό 1%-2% του συνόλου των αυτόματων αποβολών. Συνήθως προκαλείται από επιμόλυνση των εναπομείναντων στοιχείων του κυήματος μετά από ατελή αποβολή. Η ενδομητρίτιδα είναι η πιο συχνή εκδήλωση της λοίμωξης μετά από αποβολή, ενώ κατά περίπτωση είναι δυνατό να αναπτυχθεί παραμητρίτιδα, περιτονίτιδα, σηψαιμία ή ακόμη και ενδοκαρδίτιδα. Τα συμπτώματα και τα κλινικά σημεία με τα οποία εκδηλώνεται η σηπτική αποβολή είναι πυρετός, ταχυκαρδία, ταχύπνοια, υπόταση, κοιλιακό άλγος και ευαισθησία κατά την ψηλάφηση ειδικά στην υπερηβική περιοχή, προβολή δύσοσμων εμβρυικών ιστών και πηγμάτων αίματος και σε βαρύτερες περιπτώσεις σημεία σηπτικού shock. Οι συχνότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που απομονώνονται είναι το κολοβακτηρίδιο *Escherichia coli* και άλλα αερόβια Gram αρνητικά μικρόβια, ο β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος και αναερόβια βακτήρια.

Σε όλες τις Rh αρνητικές γυναίκες με αποβολή χορηγείται αντι-D γ-σφαιρίνη, ώστε να αποφευχθεί η Rh ευαισθητοποίηση. Ωστόσο, στις Rh αρνητικές γυναίκες με (επ)απειλούμενη αποβολή δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτή την πρακτική.

7.2. Επανειλημμένες αυτόματες αποβολές

Ως επανειλημμένες αυτόματες αποβολές ή καθ'έξιν αποβολές ορίζεται η εμφάνιση τριών ή περισσότερων διαδοχικών αυτόματων αποβολών πριν από την 20ή εβδομάδα κύησης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας- Ομάδα Ειδικού Ενδιαφέροντος για την Αρχόμενη Κύηση και το

Βρετανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ESHRE-SIGEP 2006, RCOG 2003, Gharezi-Fard B et al.2008). Ωστόσο, δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία σχετικά με τον ορισμό των καθ'έξιν αποβολών καθώς σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM) και το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG), η εμφάνιση δύο ή περισσότερων διαδοχικών αυτόματων αποβολών ορίζεται ως καθ'έξιν αποβολές. Επιπλέον, το ACOG προτείνει τη διερεύνηση της αιτιολογίας των αποβολών, μετά τη δεύτερη αυτόματη αποβολή κυρίως σε γυναίκες άνω των 35 ετών.

Είναι αξιοσημείωτο ότι πολλοί ερευνητές έχουν αναθεωρήσει τον ορισμό των καθ'έξιν αποβολών στις δύο ή περισσότερες διαδοχικές απώλειες κύησης, δεδομένης της αύξησης τα τελευταία χρόνια του επιπολασμού των άτεκνων ζευγαριών (Sugiura-Ogasawara M et al.2014). Σύμφωνα με μία μεγάλη προοπτική μελέτη στην Ιαπωνία, που δημοσιεύθηκε το 2013, οι συχνότητες των επανειλημμένων αποβολών ως τριών και ως δύο ή περισσότερων διαδοχικών αποβολών είναι αντίστοιχα 0,9% και 4,2% (Sugiura-Ogasawara M et al.2013).

Οι επανειλημμένες αυτόματες αποβολές ταξινομούνται σε πρωτοπαθείς, δευτεροπαθείς και τριτοπαθείς. Οι πρωτοπαθείς επανειλημμένες αποβολές αναφέρονται στις γυναίκες με τρεις ή περισσότερες διαδοχικές αυτόματες αποβολές με τον ίδιο σύντροφο και καμία κύηση διάρκειας μεγαλύτερης των 20 εβδομάδων. Οι δευτεροπαθείς επανειλημμένες αποβολές αφορούν τις γυναίκες με τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες αποβολές με τον ίδιο σύντροφο και ενώ έχει προηγηθεί η γέννηση ενός ζώντος παιδιού ή ένας ενδομήτριος θάνατος. Στην περίπτωση που προ της γέννησης ζώντος παιδιού προηγήθηκαν αυτόματες αποβολές, οι επανειλημμένες αποβολές λέγονται τριτοπαθείς (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Toth B et al.2010).

Οι καθ'έξιν αποβολές αποτελούν μία κατάσταση η οποία αφορά περίπου το 1%-3% των ζευγαριών, ενώ περίπου για το 40% με 50% των περιπτώσεων των καθ'έξιν αποβολών δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένη αιτιολογία. Αυτές οι επανειλημμένες αποβολές ονομάζονται ιδιοπαθείς ή ανεξήγητες, με κάποιες από αυτές να ερμηνεύονται ίσως μέσω κάποιου μηχανισμού ανοσολογικής αιτιολογίας. Επιπλέον, στις ιδιοπαθείς επανειλημμένες αποβολές συμπεριλαμβάνονται και εκείνες με παθολογικό καρυότυπο εμβρύου παρά την παραδοχή ότι δεν πρόκειται για πραγματικά ανεξήγητες αποβολές (Saito S et al.2011, Wong LF et al.2014, Kwiatek M et al.2015).

7.3. Αιτιολογία σποραδικών και επανειλημμένων αυτόματων αποβολών

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν ανευρίσκεται συγκεκριμένη αιτία, ενώ υπολογίζεται ότι για το 50%-60% των σποραδικών αυτόματων αποβολών ευθύνονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου, οι οποίες αφορούν σε μεγαλύτερο ποσοστό το πρώτο τρίμηνο της κύησης (πρώιμες αποβολές). Μετά το πρώτο τρίμηνο της κύησης η επίπτωση τόσο των αποβολών όσο και των ανωμαλιών στον καρυότυπο του εμβρύου, μειώνεται σημαντικά.

Ανεξάρτητοι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των αυτόματων αποβολών είναι η ηλικία της μητέρας, η ηλικία του πατέρα και το μαιευτικό ιστορικό της γυναίκας. Είναι αξιοσημείωτο ότι το ποσοστό των αυτόματων αποβολών ανέρχεται στο 40% για γυναίκες άνω των 40 ετών (Marquard K et al.2010) και το 20% για άνδρες της ίδιας ηλικιακής ομάδας, ενώ υψηλό ποσοστό αποβολών παρατηρείται σε γυναίκες που συνέλαβαν στο πρώτο τρίμηνο μετά τον τοκετό τους.

Γυναίκες με επιτυχή προηγούμενη κύηση εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά αποβολών, περίπου 5%, καθώς επίσης πρωτοτόκες γυναίκες χωρίς ιστορικό αποβολών έχουν χαμηλά ποσοστά αποβολών, περίπου 6%, σε σύγκριση με εκείνες που έχουν

ιστορικό δύο ή περισσότερων εμβρυικών απωλειών των οποίων το ποσοστό αποβολών κυμαίνεται στο 24%-32%. Τέλος, σε γυναίκες με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές παρατηρείται η τάση για αποβολή στην ίδια περίπου ηλικία κύησης (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Ι.Ν.Μπόντης.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

Τα αίτια και οι παράγοντες κινδύνου των αυτόματων αποβολών, σποραδικών και επανειλημμένων, κατατάσσονται κυρίως σε δύο κατηγορίες: αυτά που αποδίδονται στο έμβρυο και σε εκείνα που προέρχονται από τη μητέρα. Επιπλέον, ανδρικοί παράγοντες από τον πατέρα ίσως να εμπλέκονται στις αυτόματες αποβολές (The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine.2012) (Πίνακας 7-1).

Αναφορικά με τις αιτίες αποκλειστικά των επανειλημμένων αποβολών, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (Antiphospholipid antibody Syndrome APS), οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον άνδρα ή στη γυναίκα είναι οι μόνες αποδεδειγμένες αιτίες των καθ'έξιν αποβολών (Sagiura-Ogasawara M et al.2014).

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΧΟΥΝ
ΕΝΟΧΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΑΙΤΙΑ
ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΠΟΒΟΛΩΝ**

- 1. Γενετικοί παράγοντες**
Χρωμοσωμικοί
Μονογονιδιακά νοσήματα
- 2. Ανατομικές ανωμαλίες μήτρας**
Συγγενείς
Επίκτητες
- 3. Λοιμώδεις παράγοντες**
Βακτήρια
Ιοί
Παράσιτα
Μυκόπλασμα-ουρεόπλασμα
Χλαμύδια
- 4. Ενδοκρινικοί παράγοντες**
Ανεπάρκεια ωχρού σωματίου
Διαταραχές LH, ανδρογόνων-PCOS
Διαταραχές θυρεοειδούς αδένος
Σακχαρώδης Διαβήτης
- 5. Διαταραχές πηκτικότητας**
- 6. Ανοσολογικοί παράγοντες**
Αυτοάνοσοι-ενδομητρίωση
Αλλοάνοσοι
- 7. Ψυχολογικοί παράγοντες**
Στρες
- 8. Άλλοι παράγοντες**
Έντονη άσκηση
Μη συγχρονισμένη γονιμοποίηση
Ανδρικοί παράγοντες

Πίνακας 7-1: Παράγοντες σχετιζόμενοι με αυτόματες αποβολές-επανελημμένες αποβολές (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία)

A. Εμβρυικά ή Γενετικά αίτια

Οι περισσότερες αυτόματες αποβολές σχετίζονται με ανωμαλίες στην ανάπτυξη του ζυγωτού, του εμβρύου και του πλακούντα. Οι ανωμαλίες ανάπτυξης του εμβρύου αφορούν εκείνες με παθολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων (ανεϋπλοειδία) και εκείνες με φυσιολογικό αριθμό (εϋπλοειδία) αλλά με σφάλματα στη δομή των χρωμοσωμάτων. Από αυτές τις ανωμαλίες, το 95% περίπου οφείλεται σε σφάλματα κατά τη γαμετογένεση στη μητέρα, ενώ μόνο το 5% οφείλεται σε σφάλματα πατρικής προέλευσης (F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

Υπολογίζεται ότι το 50%-60% των αυτόματων αποβολών οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου. Από αυτές τις ανωμαλίες, το 50% οφείλεται σε ανεϋπλοειδίες με συχνότερη την τρισωμία 16. Οι αυτοσωμικές τρισωμίες είναι η συχνότερη κατηγορία χρωμοσωμικών ανωμαλιών ευρισκόμενη σε υλικό αποβολής πρώτου τριμήνου, ενώ οι αυτοσωμικές τρισωμίες όλων των χρωμοσωμάτων έχουν ανευρεθεί εκτός από το χρωμόσωμα 1. Μετά την τρισωμία 16 ως αιτία αυτόματων αποβολών ακολουθεί η τρισωμία 22 με τις τρισωμίες 13 ή σύνδρομο Patau, 18 ή σύνδρομο Edwards και 21 ή σύνδρομο Down να ακολουθούν. Οι περισσότερες κυήσεις εμβρύων με τρισωμία καταλήγουν σε αυτόματη αποβολή με εξαίρεση τις προαναφερθείσες τρισωμίες 21, 18 και 13, στις οποίες παρατηρούνται ποσοστά γεννήσεων 22%, 5% και 3% αντίστοιχα (A.H.Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία)

Η μονοσωμία X ή σύνδρομο Turner (45,X0) είναι η δεύτερη σε συχνότητα χρωμοσωμική ανωμαλία που οδηγεί σε αποβολή ενώ λιγότερο συχνά οδηγεί στη γέννηση ενός θήλεος ζώντος νεογνού με σύνδρομο Turner. Οι αυτοσωμικές μονοσωμίες είναι σπάνιες και ασύμβατες με τη ζωή. Η μονοσωμία X ευθύνεται περίπου για το 18% των αποβολών που προκαλούνται από ανεϋπλοειδίες.

Η πολυπλοειδής, συχνότερα με τη μορφή της τριπλοειδίας, βρίσκονται σε ποσοστό περίπου 20% όλων των αποβολών. Οι πολυπλοειδείς συνήθως απολήγουν σε ανεμβρυονική κύηση και κάποιες φορές σε μερική μύλη κύηση (A.H.Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σπάνια προκαλούν αυτόματη αποβολή, σε ποσοστό 2% των αποβολών λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ενώ σχετίζονται κυρίως με τις επανειλημμένες αυτόματες αποβολές. Σε ποσοστό 3%-6% των ζευγαριών με καθ'έξιν αποβολές, εντοπίζεται μία δομική χρωμοσωμική ανωμαλία σε έναν από τους δύο. Οι πιο συχνές ανωμαλίες είναι οι ισόρροπες μεταθέσεις και από αυτές τα 2/3 είναι αμοιβαίες μεταθέσεις και το 1/3 είναι μεταθέσεις Robertson (Larsen et al.2013, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Evaluation and Treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion.2012).

Το 30%-50% των αποβολών πρώτου τριμήνου αφορά έμβρυα ευπλοειδικά, δηλαδή με φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Οι αποβολές ευπλοειδικών εμβρύων εμφανίζονται σε πιο προχωρημένη ηλικία κύησης, με ηλικία αιχμής περίπου τις 13 εβδομάδες, ενώ η συχνότητά τους αυξάνεται σε γυναίκες άνω των 35 ετών. Για τις αποβολές ευπλοειδικών εμβρύων ενοχοποιούνται γονιδιακές μεταλλάξεις και διάφοροι πολυγονιδιακοί παράγοντες.

B. Μητρικά ή Περιβαλλοντικά αίτια

Τα αίτια που προέρχονται από τη μητέρα είναι σπανιότερα και λιγότερο κατανοητά από τα γενετικά αίτια των αυτόματων αποβολών. Τα μητρικά αίτια ευθύνονται κυρίως για τις αυτόματες αποβολές του δεύτερου τριμήνου κύησης και διακρίνονται σε ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου, σε συστηματικά νοσήματα της μητέρας (χρόνια νοσήματα, ενδοκρινοπάθειες, ανοσολογικοί παράγοντες, θρομβοφιλία), περιβαλλοντικούς παράγοντες και χρήση φαρμάκων, διατροφικές συνήθειες,

τραυματισμούς, χειρουργικές επεμβάσεις (Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Cecilia Bottomley, Tom Bourne.2009).

1). Ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου

Οι ανωμαλίες της μήτρας διακρίνονται σε συγγενείς ανατομικές ανωμαλίες και σε επίκτητες ανατομικές ανωμαλίες που αφορούν τη μήτρα. Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας προέρχονται από ανώμαλη συνένωση των παραμεσονεφρικών πόρων ή πόρων του Müller κατά την εμβρυογένεση ή από ενδομήτρια έκθεση στην διαιθυλστοιλβεστρόλη DES. Αυτές οι ανατομικές ανωμαλίες παραμορφώνουν ή ελαττώνουν το μέγεθος της κοιλότητας της μήτρας συσχετίζονται με αποβολές αλλά και με πρόωρο τοκετό, πρόωρη αποκόλληση πλακούντα και ενδομήτρια καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR).

Στις συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας που σχετίζονται με αυτόματες αποβολές, σποραδικές και καθ'έξιν, περιλαμβάνονται η μονόκερη, η δίκερη, η διαφραγματοφόρος ή διθάλαμη μήτρα και η διδελφη μήτρα. Η επίπτωση των συγγενών ανατομικών ανωμαλιών είναι μεγαλύτερη στις αποβολές του δευτέρου τριμήνου σε σύγκριση με αυτές του πρώτου τριμήνου. Η πιο συχνή ανωμαλία διάπλασης της μήτρας είναι η διαφραγματοφόρος ή διθάλαμη μήτρα και σχετίζεται με το υψηλότερο ποσοστό αποβολών, περίπου 65%, σε σύγκριση με αυτά των υπόλοιπων συγγενών ανωμαλιών της μήτρας. Η διθάλαμη μήτρα σχετίζεται κυρίως με αποβολές πρώτου τριμήνου, ενώ διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με την πρόκληση αυτόματων αποβολών. Κάποιοι από τους πιθανούς μηχανισμούς είναι το γεγονός ότι το διάφραγμα είναι ανάγγειο και περιορίζει την ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα, καθώς επίσης η ανάπτυξη ελαττωματικού ενδομητρίου στο

διάφραγμα με μειωμένη ευαισθησία στις στεροειδείς ορμόνες και η μειωμένη χωρητικότητα της ενδομητρικής κοιλότητας.

Η δεύτερη σε συχνότητα εκ γενετής ανατομική ανωμαλία της μήτρας, που συσχετίζεται με αυτόματες αποβολές είναι η μονόκερη μήτρα, με ποσοστό αποβολών περίπου 47% το οποίο όμως ελαττώνεται με την αύξηση του αριθμού των κυήσεων. Μείωση του ποσοστού αυτόματων όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυήσεων εμφανίζεται επίσης στη δίκερη και τη δίδελφου μήτρα. Οι ανωμαλίες αυτές αφορούν κυρίως τις όψιμες αποβολές και πρόωρο τοκετό σε αντίθεση με την υποπλασία της μήτρας που ανευρίσκεται κυρίως σε πρώιμες αποβολές.

Αξιοσημείωτες είναι οι περιπτώσεις γυναικών που κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας περιόδου εκτέθηκαν στη διαιθυλοστοιλβεστρόλη DES. Πρόκειται για ένα ενεργό συνθετικό οιστρογόνο που χρησιμοποιούνταν από έγκυες γυναίκες με ιστορικό αποβολών κυρίως στη δεκαετία του '50 και του '60 και απαγορεύτηκε η κυκλοφορία του από το 1971 και μετά, λόγω συσχέτισής του με αποβολές αλλά και με πρόωρο τοκετό και έκτοπη κύηση στα θήλεα τέκνα αυτών των γυναικών. Καθώς οι γυναίκες που εκτέθηκαν στη DES κατά την ενδομήτριο ζωή τους είναι τώρα 40 ετών και άνω, οι αποβολές και εν γένει η υπογονιμότητα από ανωμαλίες της μήτρας λόγω DES σιγά σιγά εκλείπουν.

Στις επίκτητες ανωμαλίες της μήτρας ως αιτία αυτόματων αποβολών περιλαμβάνονται τα ινομυώματα, ειδικά τα υποβλεννογόνια, οι ενδομητρικοί πολύποδες και οι ενδομητρικές συμφύσεις ή σύνδρομο Asherman. Το σύνδρομο Asherman συνήθως προκαλείται από καταστροφή μεγάλων περιοχών του ενδομητρίου μετά από απόξεση του ενδομητρίου ή μεγάλο αριθμό αποξέσεων. Προκαλεί κυρίως υπογονιμότητα, ενώ σε περίπτωση κύησης η πιθανότητα αποβολής φθάνει έως και το 80%. Αναφορικά με τις ανωμαλίες του τραχήλου που σχετίζονται με αυτόματες αποβολές, η ανεπάρκεια του έσω τραχηλικού στομίου ή του τραχήλου

εμφανίζεται με υψηλά ποσοστά αποβολών. Χαρακτηρίζεται από ασυμπτωματική διαστολή του τραχήλου στο δεύτερο τρίμηνο ή στις αρχές του τρίτου τριμήνου της κύησης, πάνω από 28 εβδομάδες, με αποτέλεσμα αυτόματη αποβολή ή πρόωρο τοκετό. Συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας που σχετίζονται με ανεπάρκεια τραχήλου είναι η διθάλαμη και η δίκερη μήτρα. Η κωνοειδής εκτομή του τραχήλου φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο για ανεπάρκεια τραχήλου, ενώ αυτή μπορεί να προκληθεί και από ενδομήτρια έκθεση σε DES (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, A.H.Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

2). Λοιμώξεις

Οι λοιμώξεις αποτελούν ένα σπάνιο σχετικά αίτιο αυτόματων αποβολών σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG, 2001). Κάποιοι από τους συνηθέστερους μικροβιακούς παράγοντες που ενοχοποιούνται για τις αυτόματες αποβολές είναι: η βρουκέλλα *Brucella abortus*, τα χλαμύδια (*chlamydia trachomatis*), το τοξόπλασμα (*toxoplasma gondii*), το μυκόπλασμα (*mycoplasma hominis*), το ουρεόπλασμα (*ureaplasma urealyticum*), η λιστέρια (*listeria monocytogenes*), το μικρόβιο της σύφιλης (τρεπόννημα το ωχρό, *treponema pallidum*), ο κυτταρομεγαλοϊός CMV, ο απλός έρπης HSV . Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί για να ερμηνεύσουν τη σχέση των λοιμογόνων παραγόντων με τις αποβολές, ενώ τα αποτελέσματα των σχετικών μελετών είναι αντικρουόμενα (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology, F.G.Cunningham et al.Williams Obstetrics, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

3). Χρόνια νοσήματα

Χρόνια νοσήματα της μητέρας που έχουν συσχετισθεί με αυτόματες αποβολές είναι: η φυματίωση, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η αρτηριακή υπέρταση, ο μη ελεγχόμενος ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος του Wilson, η υπερομοκυστεϊναιμία. Επίσης, η ενδομητρίωση έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση επανειλημμένων αποβολών αλλά κυρίως για υπογονιμότητα. Πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ενδομητρίωση είναι η ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης, ανοσολογικοί παράγοντες στο περιτοναϊκό υγρό και κακή ποιότητα ωαρίων-εμβρύων (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία, Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

4). Ενδοκρινοπάθειες

Ορισμένες ενδοκρινολογικές παθήσεις, επίσης, αποτελούν αιτία αυτόματων αποβολών, σποραδικών και επανειλημμένων. Ο υποθυρεοειδισμός, ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, η ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης, η υπερέκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH- το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών PCOS, η υπερπρολακτιναιμία αποτελούν ενδοκρινολογικές διαταραχές που έχουν συσχετισθεί με σποραδικές και επανειλημμένες αυτόματες αποβολές.

5). Διαταραχές πήκτικότητας ή Θρομβοφιλίες

Η συσχέτιση των επίκτητων θρομβοφιλιών (αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα) με τις αυτόματες αποβολές είναι σαφώς επιβεβαιωμένη, ενώ πολλές μελέτες συσχετίζουν κληρονομούμενες θρομβοφιλίες με τις επανειλημμένες αυτόματες αποβολές.

Αναφορικά με την κληρονομική θρομβοφιλία και τη συσχέτισή της με τις καθ'έξιν αποβολές, αίτια επανειλημμένων αποβολών είναι δυνατό να αποτελέσουν συγγενείς θρομβοφιλίες όπως ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης, μετάλλαξη του γονιδίου του παράγοντα V Leiden (Sergi C et al.2015), μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S,

ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, μετάλλαξη του γονιδίου της ομοκυστεΐνης MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase =αναγωγή του μεθυλενο-τετραϋδροφυλλικού οξέος).

6). Ανοσολογικοί παράγοντες

Κατά τη διάρκεια της κύησης ανοσολογικοί παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτοάνοσους και σε αλλοάνοσους μηχανισμούς είναι δυνατό να οδηγήσουν σε αυτόματη αποβολή. Οι ανοσολογικοί παράγοντες- αυτοάνοσοι και αλλοάνοσοι- ως αιτία αποβολής συσχετίζονται κυρίως με τις επανειλημμένες ή καθ'έξιν αποβολές. Παραδείγματα αυτοάνοσων παθήσεων που επιπλέκονται με αυτόματες αποβολές είναι το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο ΑΦΣ ή APS, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος ΣΕΛ ή SLE, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ενώ στις αλλοάνοσες επανειλημμένες αποβολές το έμβρυο απορρίπτεται ως ημιαλλογενές μόσχευμα.

Η διάκριση των αποβολών ανοσολογικής αιτιολογίας σε αυτοάνοσες και σε αλλοάνοσες αποβολές είναι μόνο θεωρητική καθώς στην πράξη αυτοάνοσοι μηχανισμοί εμπλέκονται με αλλοάνοσους παράγοντες ώστε να προκαλούν καθ'έξιν αποβολές. Είναι χαρακτηριστικό ότι αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα που ευθύνονται για αυτοάνοσες αποβολές μπορεί να οδηγήσουν σε Th1 ανοσιακή απάντηση που χαρακτηρίζει τις αλλοάνοσες αποβολές, ενώ κυτταροτοξικές κυτταροκίνες ή κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) που παίζουν ρόλο στις αλλοάνοσες αποβολές, μπορεί να μεσολαβούν σε αυτοάνοσες αποβολές όπως είναι εκείνες που σχετίζονται με αντιθυρεοειδικά αντισώματα ATA. Συμπερασματικά, θα ήταν ακριβέστερο οι αυτόματες αποβολές ανοσιακής αιτιολογίας να ορίζονται ευρύτερα ως το αποτέλεσμα μίας ανώμαλης ανοσιακής απάντησης RIFS - Reproductive Immune Failure Syndrome (Gleicher N.2002).

7). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, Διατροφή, Χρήση φαρμάκων

Έχει αναφερθεί η συσχέτιση με τις αποβολές, διάφορων χημικών ουσιών όπως είναι ο καπνός, το αλκοόλ και η καφεΐνη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, αναισθητικά αέρια, τον μόλυβδο, τον υδράργυρο, το αρσενικό, οργανικοί διαλύτες και κυτταροτοξικά φάρμακα, αυξάνει την πιθανότητα αυτόματης αποβολής.

Αναφορικά με τη διατροφή, ο υποσιτισμός προδιαθέτει στην πρόκληση αυτόματων αποβολών. Ωστόσο, ακόμη και η υπερέμεση κύησης με σημαντική απώλεια βάρους, σπάνια μπορεί να προκαλέσει αυτόματη αποβολή (F.G.Cunningham et al.Williams.Obstetrics, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία,Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική). Η παχυσαρκία έχει επίσης συσχετισθεί αιτιολογικά με τις αυτόματες αποβολές , σποραδικές και επανειλημμένες (Saugiura-Ogasawara M.2015).

8). Χειρουργικές επεμβάσεις, Τραυματισμοί

Κοιλιακές ή πυελικές επεμβάσεις κατά τη διάρκεια της κύησης, δε φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο για αυτόματη αποβολή. Σημαντική εξαίρεση αποτελεί η χειρουργική αφαίρεση του ωχρού σωματίου ή της ωοθήκης που περιέχει το ωχρό σωματίο, οπότε πριν τις 10 εβδομάδες κύησης ενδείκνυται η χορήγηση προγεστερόνης (F.G.Cunningham et al.Williams. Obstetrics). Γενικά, σοβαρός τραυματισμός στην κοιλιακή χώρα είναι δυνατό να συντελέσει στην εμφάνιση αποβολής, ωστόσο, αυτό είναι σπάνιο.

9). Ψυχολογικοί παράγοντες

Η απώλεια μίας επιθυμητής κύησης λόγω αυτόματης αποβολής αποτελεί για το ζευγάρι –κυρίως για τη γυναίκα- ένα ιδιαίτερα δυσάρεστο γεγονός που προκαλεί θρήνο αντίστοιχο με αυτόν μετά από ενδομήτριο ή περιγεννητικό θάνατο.

Τα ζευγάρια με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές πάσχουν από κατάθλιψη, έντονη ανησυχία, άγχος και υποφέρουν από θυμό και ενοχές. Περίπου το 50% των γυναικών με καθ'έξιν αποβολές υποφέρει από κάποια μορφή ψυχολογικής επίδρασης των αποβολών, η οποία είναι δυνατό να διαρκέσει από 6 μέχρι 12 μήνες μετά από το ατυχές γεγονός. Είναι χαρακτηριστικό ότι η διαταραχή της μείζονος κατάθλιψης αφορά το 10% με 50% των γυναικών με επανειλημμένες αποβολές.

Το έντονο άγχος (stress) ίσως να έχει αιτιολογική σχέση με τις ανεξήγητες επανειλημμένες αποβολές, σε συνδυασμό με κάποιο αλλοόανοσο μηχανισμό δεδομένου ότι συνθήκες stress επάγουν την Th1 ανοσιακή απάντηση του οργανισμού, ωστόσο τα δεδομένα είναι ασαφή αναφορικά με τον ψυχολογικό παράγοντα ως αιτία αυτόματων αποβολών. Εντούτοις, είναι επιθυμητό να παρέχεται ψυχολογική υποστήριξη και στενή μαιευτική παρακολούθηση από ειδικούς στις γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές.

Συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια έχει υιοθετηθεί η *tender-loving care* αντιμετώπιση αυτών των γυναικών, που ορίζεται ως ψυχολογική στήριξη με εβδομαδιαία κλινική και υπερηχογραφική εξέταση κατά τη διάρκεια της κύησης καθώς και οδηγίες για αποφυγή βαριάς εργασίας, ταξιδιών και σεξουαλικής δραστηριότητας. Δύο μη τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει σημαντική βελτίωση στην έκβαση της κύησης με στενή παρακολούθηση της κύησης και υποστήριξη σε κλινική καθ'έξιν αποβολών (Clifford K et al.1997, Toth B et al.2010, Evaluation and Treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion.2012, Bottomley et al.2009, Kolte AM et al.2015).

κεφάλαιο 8

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΙΛΗΜΜΕΝΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Η δυσλειτουργία ορισμένων διεργασιών και παραγόντων του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας όπως είναι η υπεροχή της Th1 ανοσοαπάντησης, ο ελαττωμένος αριθμός των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (Tregs cells), τα ενεργοποιημένα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells), η φλεγμονώδης ανοσιακή απάντηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανειλημμένες αποβολές.

Ωστόσο, για την κατανόηση των ανοσολογικών διαδικασιών που είναι πιθανό να υπεισέρχονται στον πολύπλοκο μηχανισμό πρόκλησης των καθ'έξιν αποβολών, θα ήταν σκόπιμο να λάβει κανείς υπόψη το ανοσολογικό προφίλ της φυσιολογικής κύησης.

8.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ

(Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, panacea.uoa.gr, medscape.com, Aagaard-Tillery KM et al.2006)

Το ανοσολογικό σύστημα του ανθρώπου διακρίνεται σε δύο μηχανισμούς άμυνας: τη φυσική ή εγγενή ανοσία και την επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία. Η φυσική ανοσιακή απάντηση αποτελεί μη-ειδική αντίδραση σε περιορισμένο αριθμό παθογόνων αντιγόνων, ενώ η επίκτητη ανοσία συνιστά απόκριση του οργανισμού έναντι ειδικών αντιγόνων.

8.1.1. Φυσική ανοσία

Αναφορικά με τη φυσική ανοσία, πρόκειται για την πρώτη γραμμή άμυνα του οργανισμού καθώς συνεπάγεται ενδογενή αντίσταση και όχι επίκτητη που αποκτήθηκε μέσω επαφής με το αντιγόνο. Η φυσική ανοσία περιλαμβάνει φυσικά εμπόδια αλλά και μη-ειδικούς ανοσολογικούς παράγοντες που αναστέλλουν την είσοδο ξένου υλικού. Στα στοιχεία της φυσικής ανοσίας συγκαταλέγονται το δέρμα, οι βλεννογόνοι χιτώνες, το κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού, ενδοθηλιακά κύτταρα όπως αυτά του ενδοτραχήλου, της μήτρας και των αγωγών, αντιμικροβιακοί παράγοντες των εκκρίσεων όπως είναι οι λυσοζύμη και οι β-ντεφενσίνες, το σύστημα του συμπληρώματος (Cruvinel W de Melo et al.2010).

Τα κύρια κύτταρα που μεσολαβούν στο συγκεκριμένο είδος ανοσίας είναι τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα DCs (dendritic cells) και τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK (Natural Killer cells). Στα μακροφάγα περιλαμβάνονται τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, κυρίως ουδετερόφιλα αλλά επίσης βασεόφιλα και ηωσινόφιλα, τα κυκλοφορούντα φαγοκύτταρα μονοκύτταρα PBMC (peripheral blood mononuclear cells) και τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος ΔΕΣ. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα προαναφερθέντα κύτταρα δρουν έναντι του ξένου αντιγόνου είναι: η φαγοκυττάρωση, η φλεγμονή και η απόπτωση ή νέκρωση (Walsh PN et al.2011).

8.1.2. Επίκτητη ανοσία

Η επίκτητη ανοσία είναι πιο εξελιγμένη μορφή ανοσιακής απάντησης συγκριτικά με τη φυσική ανοσία και συναντάται μόνο στα σπονδυλωτά. Βασικές ιδιότητες της επίκτητης ανοσιακής απάντησης, εκτός από την αντιγονική εξειδίκευση, είναι οι παρακάτω: α). η ανοσολογική μνήμη, ώστε να ενισχύεται και να επιταχύνεται η

ανοσιακή απόκριση σε επανάληψη της επαφής με το ίδιο αντιγονικό ερέθισμα, β). η ποικιλομορφία, δηλαδή η αναγνώριση άπειρων μορίων προς εξειδίκευση της δράσης τους απέναντι σε άπειρα αντιγόνα, γ). η ανοσολογική ανοχή, δηλαδή η διάκριση του ίδιου από το μη ίδιο και η ικανότητα αυτοπροστασίας και δημιουργίας ανοχής προς ίδια αντιγόνα, δ). η προσαρμοστικότητα, δηλαδή η ικανότητα απάντησης σε ένα καινούριο αντιγόνο. (Bonilla AF, Oettgen CH.2010, Vivier E et al.2011).

Ειδικότερα, η επίκτητη ανοσιακή απάντηση περιλαμβάνει τη χυμική ανοσία, η οποία αναφέρεται στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, και την κυτταρική ανοσία η οποία αφορά ειδική κυτταρική απάντηση του ανοσιακού συστήματος. Απαραίτητη προϋπόθεση της χυμικής και της κυτταρικής ανοσιακής απόκρισης είναι η επαφή με λοιμογόνο παράγοντα φυσικά ή μέσω εμβολιασμού, οπότε η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε ενεργητική και σε παθητική (Walsh PN et al.2011).

Τα κύτταρα που μεσολαβούν στην επίκτητη ανοσία είναι: τα Β-λεμφοκύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα, με κεντρικό καθοριστικό ρόλο να κατέχουν τα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα, όπως και τα κύτταρα φυσικοί φονείς, προέρχονται από το ίδιο αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο που λέγεται CLP (common lymphocyte progenitor). Η διαφοροποίηση των Β και των Τ λεμφοκυττάρων στον ενήλικα λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών με την ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων να τελείται στον θύμο αδένα (Lindstrom MT, Robinson HW.2010).

Ένα άλλο είδος κυττάρων που συμμετέχει στην επίκτητη ανοσία είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα APCs (Antigen-Presenting Cells). Πρόκειται για κύτταρα εξειδικευμένα να εκθέτουν το αντιγόνο Ag (Antigen) σε συνδυασμό με μόρια της τάξης II του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex) στα λεμφοκύτταρα, αλλά επίσης να παρέχουν μια σειρά συν-διεγερτικών σημάτων με τελικό σκοπό μια ειδική ανοσολογική απόκριση (Rocca B, FitzGerald AG.2002). Τον ρόλο του APC κυττάρου κατέχουν τα μακροφάγα αλλά και άλλα

κύτταρα όπως είναι τα δένδριτικά κύτταρα DCs και τα ηπατοκύτταρα.

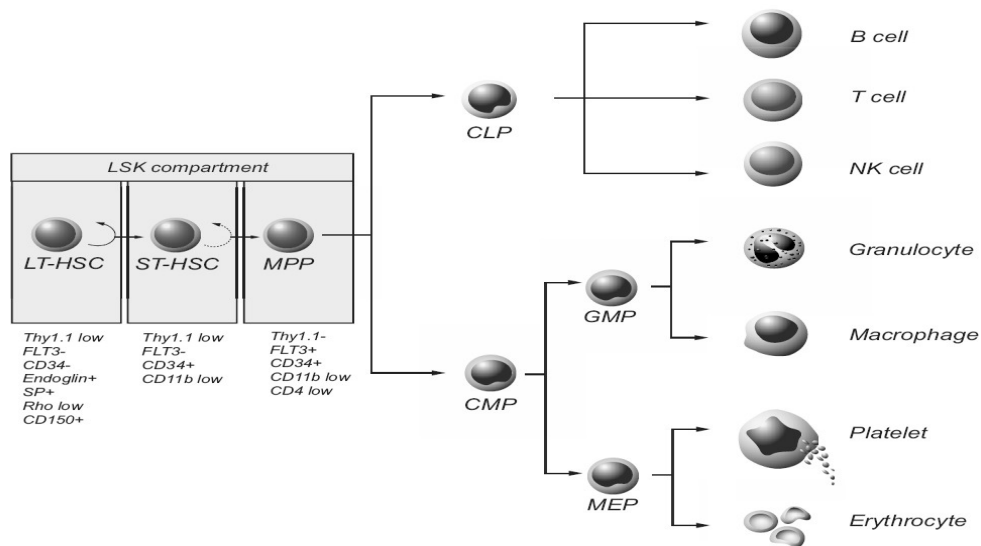
8.1.3. Τα λεμφοκύτταρα του ανοσιακού συστήματος

A). Τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK (Natural Killer cells)

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (large granular lymphocytes) που συμμετέχουν στο μηχανισμό της φυσικής ανοσίας και χαρακτηρίζονται από την παρουσία, στην επιφάνειά τους, των μορίων CD56 και CD16 και την απουσία του μορίου CD3 (Malhotra A, Shanker A.2011, Vivier E et al.2011).

Αποτελούνται από δύο κυτταρικά υποσύνολα με τους παρακάτω φαινότυπους: τα κύτταρα με φαινότυπο $CD56^{bright}CD16^{-}$, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτταροκινών και άλλων διακυτταρικών μεσολαβητών, και τα κύτταρα με φαινότυπο $CD56^{dim}CD16^{+}$ που εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση και για αυτόν τον λόγο λέγονται ενεργοποιημένα NK κύτταρα (Lunemann A et al.2009).

Εκτός από τις ιντερφερόνες IFNs και την IL-2, άλλες κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων είναι η IL-12, η IL-15 και η IL-18. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς προέρχονται (Εικ.8-1), όπως τα B-λεμφοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα, από το κοινό λεμφοειδές αρχέγονο κύτταρο CLP (common lymphoid progenitor).



Εικ.8-1: Προέλευση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος (Blank et al.2008)

Τα ενεργοποιημένα κύτταρα φυσικοί φονείς δρουν εναντίον κυττάρων μολυσμένων από ιό και καρκινικών κυττάρων, μέσω παραγωγής περφορινών και κοκκιοενζύμων ή απόπτωσης των κυττάρων-στόχων, ενώ αξιοσημείωτη είναι η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) των NK κυττάρων που έχουν υποδοχείς για το Fc τμήμα ορισμένων IgG αντισωμάτων που βρίσκονται στην επιφάνεια κυττάρων μολυσμένων από ιό. Η δράση τους είναι μη-ειδική, δηλαδή δεν είναι ειδική για τον ιό ή τα καρκινικά κύτταρα και δεν εξαρτάται από την παρουσίαση αντιγόνου με πρωτεϊνικά μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex) τάξης I ή II (Geller AM, Miller SJ.2011).

Επίσης, τα NK κύτταρα έχουν ρυθμιστική δράση. Συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα και η παραγωγή κυτταροκινών από τα NK κύτταρα επηρεάζουν τα δενδριτικά κύτταρα DCs, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα ώστε τα NK κύτταρα να επηρεάζουν τις επακόλουθες ειδικές για το αντιγόνο αποκρίσεις των T και B λεμφοκυττάρων.

Επιπλέον, τα NK κύτταρα αναφέρονται ως οι μεγαλύτεροι παραγωγοί κυτταροκινών, όπως είναι η ιντερφερόνης IFN- γ , σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές

καταστάσεις. Τα NK κύτταρα παράγουν επίσης μια σειρά άλλων κυτταροκινών όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α, που αποτελεί προφλεγμονώδη κυτταροκίνη, και η ιντερλευκίνη IL-10, που είναι ανοσοκατασταλτική κυτταροκίνη, και αυξητικούς παράγοντες όπως είναι ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων GM-CSF, ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) και η ιντερλευκίνη IL-3. Τα NK κύτταρα εκκρίνουν επίσης πολλές χημειοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1-α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), XCL1 (λεμφοτακτίνη) και CXCL8 (IL-8).

Αναφορικά με την ενεργοποίηση των NK κυττάρων, αυτή είναι δυνατό να συμβεί άμεσα ή έμμεσα, με τους παρακάτω μηχανισμούς: (α). αλληλεπίδραση των NKκυττάρων με τα δενδριτικά κύτταρα DCs μέσω παρουσίασης ή έκκρισης κυτταροκινών, (β). ενεργοποίηση από κυτταροκίνες κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων μιας ιικής μόλυνσης και (γ). άμεση ενεργοποίηση από υποδοχείς που εντοπίζονται στην επιφάνεια των NK κυττάρων (Krzewski K, Strominger LJ.2008).

Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων ελέγχεται από την ισορροπία των σημάτων που μεταδίδονται από υποδοχείς αναστολής και ενεργοποίησης, που εντοπίζονται στην επιφάνειά τους (Joncker TN and Raulet HD.2008).

Οι κύριοι υποδοχείς ενεργοποίησης των NK κυττάρων είναι οι υποδοχείς φυσικής κυτταροτοξικότητας NCR (Natural Cytotoxicity Receptors), ο Fc υποδοχέας CD16, ο NKG2D και οι υποδοχείς ενεργοποίησης KIR. Ωστόσο, οι ανασταλτικοί υποδοχείς ίσως να έχουν βαρύτερο ρόλο στην ενεργοποίηση των κυττάρων φυσικών φονέων (Shegarfi H et al.2012). Στους υποδοχείς αναστολής περιλαμβάνονται υποδοχείς ειδικοί για μόρια του MHC τάξης I (KIR, CD94/NKG2, LILR) και υποδοχείς που δεσμεύουν προσδέματα που δεν ανήκουν στο σύστημα MHC τάξης I όπως οι NKR-P1, LAIR-1 (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor 1), Siglec-7/9 και

CEACAM1.

Οι υποδοχείς KIRs (Killer Immunoglobulin-like Receptors) ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων χαρακτηρίζονται δομικά από δύο ή τρεις ομοιάζουσες με ανοσοσφαιρίνη, εξωκυτταρικές περιοχές. Οι KIRs αναγνωρίζουν μόρια του MHC τάξης I, συμπεριλαμβανομένων των ομάδων HLA-A, HLA-B και HLA-C. Υπάρχουν δύο λειτουργικά διακριτά σύνολα KIRs: αναστολής και ενεργοποίησης (Farag SS et al.2002, Hallett HD et al.2004).

B). Τα Β-λεμφοκύτταρα

Τα Β-λεμφοκύτταρα προέρχονται από το κοινό αρχέγονο λεμφοειδές κύτταρο (Εικ.8-1), αναπτύσσονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν κυρίως στον μυελό των οστών. Τα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα ή πλασματοκύτταρα έχουν ως ρόλο την παραγωγή του κατάλληλου αντισώματος μετά από αναγνώριση του αντίστοιχου αντιγόνου μέσω ειδικών υποδοχέων που εντοπίζονται στην επιφάνειά τους (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Tarlinton D et al.1994).

Ειδικότερα, όταν το Β-λεμφοκύτταρο έρθει σε επαφή με το αντίστοιχο αντιγόνο Ag, δίνεται το έναυσμα για πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και διαφοροποιείται προς πλασματοκύτταρα αλλά και προς κύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα είναι ικανά να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρίνης Ig (Immunoglobulin) ή αντισωμάτων ειδικών για το αντιγόνο που προκάλεσε την απόκριση. Η πρόσδεση της ανοσοσφαιρίνης στο αντιγόνο-στόχο οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου, ενώ στα υγρά του σώματος κυκλοφορούν τόσο ελεύθερες ανοσοσφαιρίνες όσο και σύμπλοκα με αντισώματα. Αναφορικά με τα κύτταρα μνήμης, αυτά έχουν την ιδιότητα να αποκρίνονται πιο γρήγορα και αποτελεσματικά στη δεύτερη φορά επαφής με το ίδιο αντιγόνο.

Η παραγωγή αντισωμάτων απαιτεί τη συνεργασία μακροφάγων, Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και Β-λεμφοκυττάρων. Το μακροφάγο επεξεργάζεται το αντιγόνο και θραύσματά του αντιγόνου εμφανίζονται στην επιφάνεια των μακροφάγων σε συνδυασμό με πρωτεΐνες MHC τάξης II. Το σύμπλεγμα αντιγόνο-MHC τάξης II πρωτεΐνη συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς TCR (T-cell receptor) στην επιφάνεια των Τ βοηθητικών κυττάρων, τα οποία παράγουν στη συνέχεια ιντερλευκίνες όπως είναι οι παρακάτω: ιντερλευκίνη IL-2 (αυξητικός παράγοντας των Τ-λεμφοκυττάρων), ιντερλευκίνη IL-4 (αυξητικός παράγοντας των Β-λεμφοκυττάρων), ιντερλευκίνη IL-5 (παράγοντας διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων). Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν τα Β-λεμφοκύτταρα που είναι ικανά να παράγουν αντισώματα για το συγκεκριμένο αντιγόνο (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Tarlinton D et al.1994).

Γ). Τα Τ-λεμφοκύτταρα

Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται στον ενήλικα στον μυελό των οστών και στη συνέχεια μεταναστεύουν στο θύμο αδένα όπου λαμβάνει χώρα η ωρίμανσή τους. Προέρχονται από το πολυδύναμο λεμφοειδές αρχέγονο κύτταρο (Εικ.8-1), ενώ κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην επίκτητη ανοσιακή απάντηση (Bonilla AF, Oettgen CH.2010).

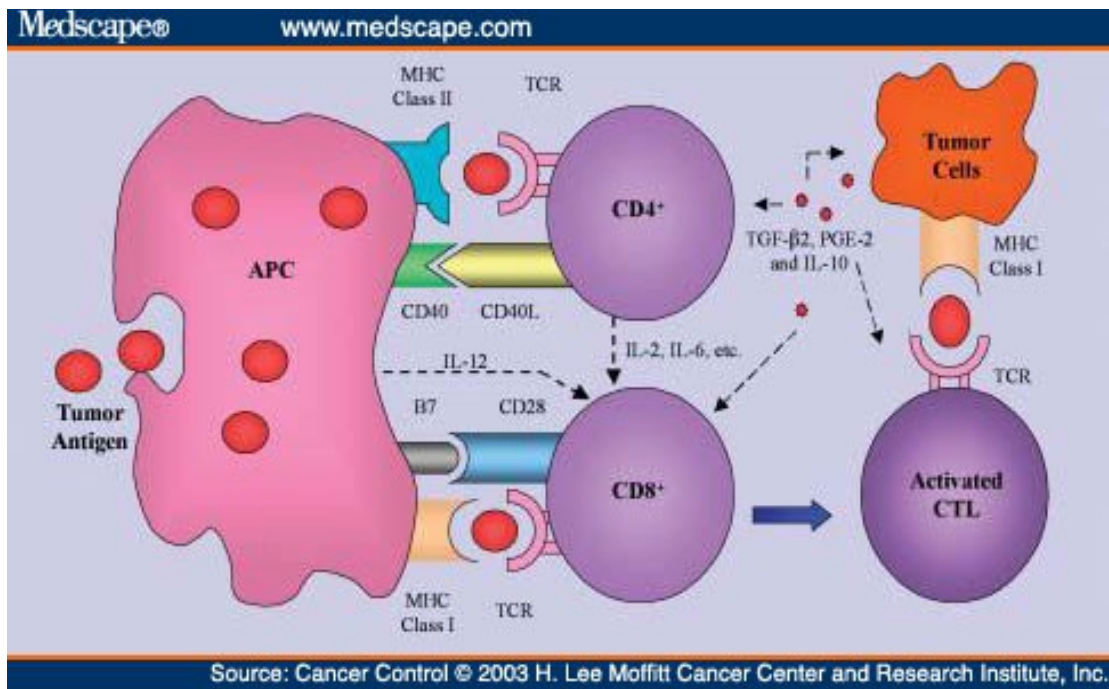
Στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων εντοπίζεται ένας υποδοχέας TCR (T-cell receptor), ο οποίος είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεϊνικές αλυσίδες α και β (TCR α/β) στο 90% περίπου των Τ-λεμφοκυττάρων και γ και δ (TCR γ/δ) στο 10% περίπου των Τ-λεμφοκυττάρων (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Robey E et al.2003, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

Αναφορικά με τα Τ-λεμφοκύτταρα που φέρουν TCRγ/δ υποδοχέα φαίνεται να σχετίζονται με τη φυσική και την επίκτητη ανοσία, με ρόλο που περιλαμβάνει

κυτταροτοξική δράση και παραγωγή Th1 και Th2 κυτοκινών χωρίς να υπόκεινται πάντα σε MHC περιορισμό (Aagaard-Tillery KM et al.2006).

Οι κύριοι υποπληθυσμοί στους οποίους διαφοροποιούνται τα T-λεμφοκύτταρα με TCRα/β υποδοχέα είναι: τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα), τα T-κυτταροτοξικά ή κατασταλτικά λεμφοκύτταρα (CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα), τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα Tregs (T-regulatory cells ή CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-λεμφοκύτταρα) και τα T-λεμφοζιδιακά λεμφοκύτταρα TFh (T-follicular helper cells). Τα T-λεμφοκύτταρα μνήμης, όπως και τα B-λεμφοκύτταρα μνήμης, έχουν την ιδιότητα της ταχύτερης και δραστικότερης απάντησης μετά από δεύτερη επαφή με το ίδιο αντιγόνο.

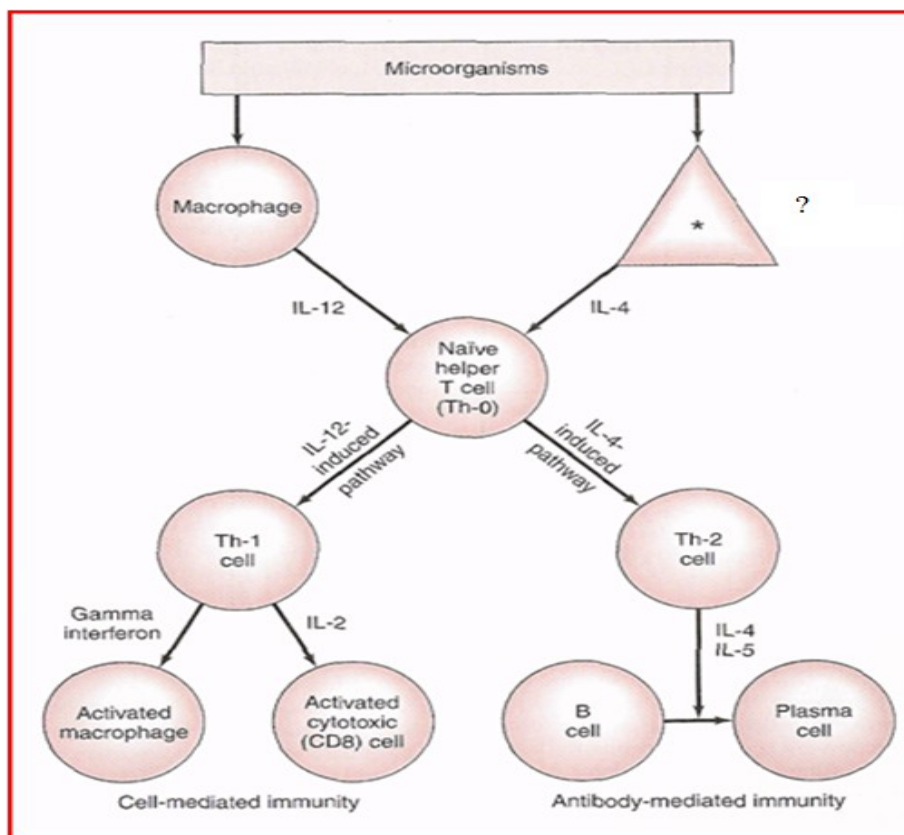
Τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα) διαχωρίζονται κυρίως σε T1 βοηθητικά λεμφοκύτταρα Th1 (T1-helper ή Th1 cells) και σε T2 βοηθητικά λεμφοκύτταρα Th2 (T2-helper ή Th2 cells) ανάλογα με το είδος των κυτοκινών που παράγουν, ενώ στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα ανήκουν επίσης τα T17 βοηθητικά λεμφοκύτταρα Th17 (T17-helper cells). Τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, μέσω των TCRα/β υποδοχέων, αναγνωρίζουν αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξης II της επιφάνειας των αντιγονοπαρουσιαστικών APC κυττάρων (Εικ.8-2).



Εικ.8-2: Τα T-λεμφοκύτταρα ($CD4^+$ ή $CD8^+$) υπόκεινται σε MHC περιορισμό (medscape.com).

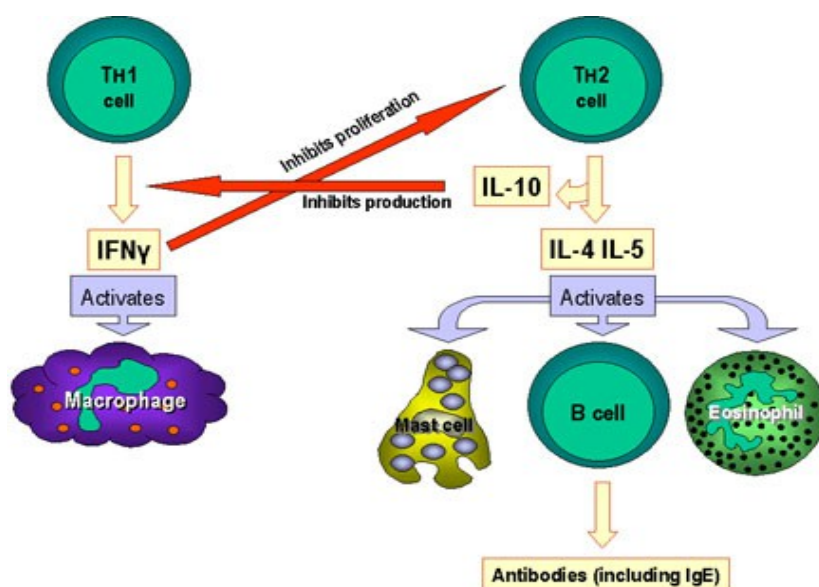
Ειδικότερα, τα Th1-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη $IFN-\gamma$, η ιντερελευκίνη IL-2, η ιντερλευκίνη IL-1, η ιντερλευκίνη IL-12, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF- α . Τα συγκεκριμένα κύτταρα συνδέονται με το σύμπλοκο αντιγονικού πεπτιδίου-μορίου MHC τάξης II στην επιφάνεια του APC κυττάρου, που είναι ένα μακροφάγο. Στη συνέχεια, είναι δυνατό να ακολουθηθούν οι παρακάτω οδοί: το ενεργοποιημένο μακροφάγο είναι ένα ενεργοποιημένο NK κύτταρο (LAK κύτταρο) ή ένα ενεργοποιημένο T-κυτταροτοξικό λεμφοκύτταρο ($CD8^+$ T-λεμφοκύτταρο) που εξουδετερώνει το αντιγόνο που παρουσίασε στα Th1-λεμφοκύτταρα. Κατ'αυτόν τον τρόπο τα Th1-λεμφοκύτταρα μεσολαβούν προκειμένου να εξοντωθεί το αντιγόνο Ag από το APC κύτταρο που παρουσίασε το αντιγόνο ή από το T-κυτταροτοξικό/NK λεμφοκύτταρο που ενεργοποιήθηκε μέσω Th1 κυτοκινών (Εικ.8-3) (Bonilla AF, Oettgen CH.2010).

Αναφορικά με τα Th2-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες όπως είναι οι ιντερλευκίνες IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ενώ συνδέονται με το σύμπλοκο Ag-MHC τάξης II μορίου, με το B-λεμφοκύτταρο να έχει το ρόλο APC κυττάρου. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του B-λεμφοκυττάρου σε πλασματοκύτταρο ώστε να παράγει αντισώματα Abs έναντι του αντιγόνου Ag που παρουσίασε στα Th2-λεμφοκύτταρα (Εικ.8-3). Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη, φαίνεται ότι τα Th1-λεμφοκύτταρα και οι Th1 κυτοκίνες εμπλέκονται στην ανοσία μέσω κυττάρων όπως είναι τα μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK και τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα, δηλαδή στην κυτταρικού τύπου ανοσία. Από την άλλη πλευρά, τα Th2-λεμφοκύτταρα και οι Th2 κυτοκίνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα, δηλαδή στη χυμική ανοσία (Εικ.8-3).



Εικ.8-3: Th1 και Th2 ανοσιακή απόκριση – κυτταρική και χυμική ανοσία (eugonia.com).

Η Th1/Th2 κυτταρική ρύθμιση είναι καθοριστική για την έκβαση των λοιμώξεων ιδιαίτερα των ενδοκυττάρων, καθώς και για την παθογένεση αλλεργικών νοσημάτων, αυτοάνοσων νοσημάτων και επανειλημμένων αυτόματων αποβολών (Romagnani P et al.2000). Συγκεκριμένα, νοσήματα με υπεροχή της Th1-τύπου ανοσοαπάντησης είναι οι περισσότερες ιογενείς λοιμώξεις και τα νοσήματα υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου ενώ υπεροχή της Th2-τύπου ανοσιακής απάντησης διαπιστώνεται στα νοσήματα άμεσης υπερευαισθησίας τύπου I, στα αλλεργικά νοσήματα και σε λοιμώξεις από παράσιτα. Ενδεικτικό της αλληλορύθμισης μεταξύ Th1 και Th2 ανοσιακής απάντησης είναι το γεγονός ότι η IFN- γ , που παράγεται από τα Th1-λεμφοκύτταρα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Th2-λεμφοκυττάρων ενώ η ιντερλευκίνη IL-10 που συντίθενται στα Th2-λεμφοκύτταρα, αναστέλλει την ανάπτυξη των Th1-λεμφοκυττάρων (Εικ.8-4).



Εικ.8-4: Th1 και Th2 αλληλορύθμιση (medscape.com).

Το υποσύνολο των Th17-λεμφοκύτταρα είναι τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺ λεμφοκύτταρα) που ειδικεύονται στην απάντηση σε λοιμώξεις με εξωκυττάρια βακτήρια και μύκητες. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία της ιντερλευκίνης IL-6 που παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα και του μετατρεπτικού

παράγοντα ανάπτυξης TGF- β (transforming growth factor) και απουσία της ιντερλευκίνης IL-4 και της ιντερλευκίνης IL-12, ενώ τα ίδια τα Th17-λεμφοκύτταρα παράγουν κυττοκίνες όπως είναι η ιντερλευκίνη IL-17 και η ιντερλευκίνη IL-25 προάγοντας τη διαδικασία της φλεγμονής.

Τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα Tregs έχουν φαινότυπο CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ και αποτελούν περίπου το 10% με 15% του συνόλου των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Τα Tregs κύτταρα έχουν αντίθετη δράση από τα Th17 κύτταρα που προάγουν τη φλεγμονή, καθώς τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα αναστέλλουν τις ανοσιακές απαντήσεις της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας. Κατ'αυτόν τον τρόπο αυτά τα κύτταρα συμμετέχουν στη δημιουργία ανοσοανοχής έναντι δικών μας αντιγόνων και προλαμβάνουν απαντήσεις που σχετίζονται με την αυτοανοσία (Chaplin DD.2010).

Η ρύθμιση μεταξύ των Th17-λεμφοκυττάρων και των Tregs λεμφοκυττάρων είναι βασικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας των λεμφοκυττάρων στους ιστούς και κυρίως στο βλεννογόνο του εντέρου και τους πνεύμονες, όπου χρειάζεται άμεση απάντηση.

Τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (T-κυτταροτοξικά κύτταρα) αποτελούν περίπου το 35% των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων, ενώ παρουσιάζουν κυτταροτοξική δραστηριότητα δηλαδή καταστρέφουν κύτταρα μολυσμένα με ιούς, καρκινικά κύτταρα καθώς επίσης κύτταρα αλλομοσχεύματος. Τα κύτταρα αυτά προκαλούν λύση του κυττάρου-στόχου μέσω έκκρισης περφορινών και κοκκιοενζύμων ή μέσω επαγωγής της διαδικασίας απόπτωσης.

Ειδικότερα, τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν, μέσω των TCR α/β υποδοχέων τους, αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξης I πάνω στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών APC κυττάρων ώστε να ενεργοποιούνται από αυτά (Εικ.8-2). Αντιγονοπαρουσιαστικό APC κύτταρο είναι δυνατό να αποτελεί

οποιοδήποτε εμπύρνηνο κύτταρο, το οποίο συνήθως έχει προσβληθεί από ιό. Τα πεπτιδία του ιού λειτουργούν ως αντιγόνα που θα αναγνωριστούν από τους υποδοχείς των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων ώστε τα τελευταία να δράσουν εναντίον των ίδιων των APC κυττάρων που τα ενεργοποίησαν (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Robey E et al.2003, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

8.1.4. Τα αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας MHC ή των Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων HLA

Το σύμπλεγμα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex) ή αντιγόνα των ανθρώπινων λευκοκυττάρων HLA (Human Leucocyte Antigens) είναι μόρια που εντοπίζονται στη επιφάνεια των εμπύρνηνων κυττάρων κάθε ανθρώπινου οργανισμού. Η ανοσολογική απόκριση κάθε ατόμου είναι διαφορετική, με τη γενετική ποικιλομορφία των HLA μορίων να κατέχει καθοριστικό ρόλο στην εξατομίκευση της ανοσολογικής απάντησης (Makrigiannakis A et al.2011, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

Τα HLA αντιγόνα ορολογικά διαχωρίζονται περαιτέρω στα παρακάτω είδη: (α). τα μόρια HLA-A, HLA-B, HLA-C τα οποία ανήκουν στα κλασικά τάξης I MHC μόρια και κωδικοποιούνται από τα γονίδια των αντίστοιχων υποπεριοχών (κλασικά τάξης I MHC γονίδια), (β). τα μόρια HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR τα οποία ανήκουν στα τάξης II MHC μόρια, με τα αντίστοιχα γονίδια των τριών υποπεριοχών HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, (γ). τα μόρια HLA-E, HLA-F, HLA-G τα οποία ανήκουν στα μη-κλασικά MHC μόρια και αναφέρονται ως τάξης Ib MHC μόρια (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Aagaard-Tillery KM et al.2006).

Τα μόρια HLA τάξης I έχουν ως ρόλο να παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτιδία, συνήθως ιούς, στα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα) και στα κύτταρα φυσικοί φονείς NK.

Τα μόρια HLA τάξης II παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα CD4⁺ T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και απαντώνται στην επιφάνεια B-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων που λειτουργούν ως APC κύτταρα.

Η διαδικασία της επιλογής του υποδοχέα TCR και η ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων εξαρτώνται από το αντιγόνο και συγχρόνως υπόκεινται MHC-περιορισμό. Σε αντίθεση με την ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων, το ρεπερτόριο των T-λεμφοκυττάρων καταδεικνύει την ιδιαιτερότητά τους να αναγνωρίζουν αντιγονικά πεπτίδια εφόσον αυτά είναι συνδεδεμένα με μόρια HLA τάξης I ή II (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Makrigiannakis A et al.2011, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

8.2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Στη φυσιολογική κύηση το ανοσολογικό παράδοξο είναι ότι γενετικά διαφορετικοί ιστοί εντοπίζονται ο ένας δίπλα στον άλλο σε απόλυτη αρμονία. Ειδικότερα, το έμβρυο αποτελεί ένα ημιαλλογενές μόσχευμα το οποίο πρέπει να παραμείνει ανεκτό από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας καθ'όλη τη διάρκεια της κύησης. Ο πλακούντας αποτελείται από εμβρυικές και μητρικές δομές και είναι συγχρόνως εμπόδιο και μέσο συναλλαγών μεταξύ μητέρας-εμβρύου απαραίτητων για τη διατροφή του εμβρύου. Από τη άλλη πλευρά, λόγω των πατρικών αντιγόνων που φέρει το έμβρυο, το μητρικό ανοσολογικό σύστημα θα μπορούσε να προκαλέσει απόρριψη του εμβρύου.

Για τη εξασφάλιση διατήρησης της κύησης, έχουν αναπτυχθεί ποικίλοι μηχανισμοί εμβρυομητρικής ανοσοανοχής, οι οποίοι τροποποιούν την ανοσιακή απάντηση της μητέρας στο ημιαλλογενές κύημα.

8.2.1. Μόρια HLA τάξης I και τάξης II στη φυσιολογική κύηση

Η μη τυπική έκφραση των MHC μορίων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμβρυομητρική ανοσοανοχή. Σύμφωνα με τις έως σήμερα έρευνες, η τροφοβλάστη αποτελεί έναν ανοσολογικά μη απορριπτέο ιστό ανάμεσα στη μητέρα και το έμβρυο, καθώς χαρακτηρίζεται από τη έλλειψη έκφρασης των κλασικών μορίων MHC τάξης I και των μορίων MHC τάξης II. Ωστόσο, φαίνεται ότι στα κύτταρα της εξωχοριακής τροφοβλάστης εκφράζονται τα μη κλασικά μόρια MHC τάξης I των υποπεριοχών HLA-G, HLA-E, HLA-F καθώς και τα κλασικά μόρια MHC τάξης I της HLA-C υποπεριοχής.

Ειδικότερα, μέσω αποσιώπησης της έκφρασης των μορίων MHC τάξης II στην τροφοβλάστη επιτυγχάνονται τα παρακάτω: (α). αποφυγή παρουσίασης αντιγονικών πεπτιδίων εμβρυικής προέλευσης στα μητρικά T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, από τροφοβλαστικά APC κύτταρα φέροντα μόρια MHC τάξης II, (β). αποφυγή αλλογενούς αντίδρασης κατά αντιγόνων MHC τάξης II πατρικής προέλευσης.

Η μη έκφραση των κλασικών μορίων MHC τάξης I στα τροφοβλαστικά κύτταρα αναστέλλει την αναγνώριση αλλογενών πεπτιδίων από τα μητρικά T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, τίθεται το πρόβλημα της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων φυσικών φονέων NK καθώς αυτή δεν υπόκειται σε MHC περιορισμό.

Αναφορικά με τον έλεγχο της δράσης των NK κυττάρων του ενδομητρίου προκειμένου να επιτευχθεί και να διατηρηθεί η κύηση, έρευνες υποστηρίζουν ότι τα μόρια HLA-C, HLA-E, HLA-F και κυρίως τα μόρια HLA-G φαίνεται να κατέχουν ζωτική θέση.

Τα HLA-C μόρια διαφέρουν από τα άλλα κλασικά μόρια MHC τάξης II καθώς τα αντίστοιχα γονίδια HLA-C δεν εμφανίζουν τον υψηλό πολυμορφισμό που χαρακτηρίζει τα κλασικά MHC τάξης I γονίδια HLA-A, HLA-B. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών, είναι σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ των KIRs

υποδοχέων των NK κυττάρων του φθαρτού (uNK κύτταρα) και των HLA-C αντιγόνων ώστε να υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην ενεργοποίηση και την αναστολή της λειτουργίας των NK κυττάρων και να επιτευχθεί επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου (Makrigiannakis A et al.2011).

Τα HLA-G γονίδια ανήκουν στα μη κλασικά μόρια MHC τάξης Ib και εκφράζονται κυρίως στην εξωχοριακή κυτταροτροφοβλάστη του πλακουντιακού ιστού. Χαρακτηρίζονται από πολύ μικρό πολυμορφισμό, καθώς υπάρχουν έξι ισομορφές- από τις οποίες οι πέντε φαίνεται να αντιστοιχούν σε λειτουργικά διαφορετικές πρωτεΐνες. Άλλα χαρακτηριστικά των HLA-G γονιδίων είναι το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA καθώς και το γεγονός ότι τα HLA-G μόρια έχουν συγκεκριμένη ιστική κατανομή, κυρίως πλακουντιακή (μεμβρανοσυνδεδεμένα HLA-G μόρια).

Οι διαλυτές μορφές του HLA-G μορίου (soluble HLA-G ή sHLA-G) στο αμνιακό υγρό και στο περιφερικό αίμα φαίνεται να εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση της μητρικής αλλοαντίδρασης, ενεργοποιώντας την απόπτωση των μητρικών T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα) στον πλακούντα (Le Boutiellier P and Solier C.2001). Αναφορικά με το μεμβρανοσυνδεδεμένο HLA-G μόριο- ή/και το διαλυτό sHLA-G- ίσως να κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της κύησης, περιορίζοντας τα αλλοαντιδραστικά αντιπατρικά T-λεμφοκύτταρα (Contini P et al.2003). Σύμφωνα με έρευνες, το διαλυτό sHLA-G διεγείρει την επιφανειακή έκφραση του συνδέτη Fas οδηγώντας στην απόπτωση των ενεργοποιημένων από πατρικά αντιγόνα CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, μέσω της οδού Fas/FasL. (Contini P et al.2003, Solier C et al.2002).

Επιπλέον υποστηρίζεται η άποψη ότι τα HLA-G μόρια συμβάλλουν στην καταστολή της τοξικότητας των κυττάρων φυσικών φονέων NK στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα σχετικών ερευνών, φαίνεται ότι τα HLA-G αντιγόνα μπορεί να αλληλεπιδρούν με ποικίλους ανασταλτικούς υποδοχείς

των λευκοκυττάρων του φθαρού- συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων KIRs, ILT, CD94/NKG2- προκειμένου να κατασταλεί η δραστηριότητα των NK κυττάρων στο ενδομήτριο (Makrigiannakis A et al.2011, King A et al.2000).

Επίσης, τα μόρια HLA-E και HLA-F εκφράζονται στην τροφοβλάστη, με κάποιες μελέτες να υποστηρίζουν ότι η αλληλεπίδραση των μορίων HLA-E με τους υποδοχείς CD94/NKG2 μπορεί να αναστείλει τη δράση των NK κυττάρων ενώ μέσω των TCRα/β υποδοχέων τα εν λόγω μόρια είναι δυνατό να επάγουν την κυτταροτοξικότητα των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες σχετικά με τη λειτουργία των HLA-E αλλά και των HLA-F μορίων. (Makrigiannakis A et al.2011, Borrego F et al.1998, Pietra G et al.2001).

8.2.2. Ρυθμιστική σχέση Th1/Th2 τύπου ανοσιακής απάντησης στη φυσιολογική κύηση

Στα πλαίσια των μηχανισμών μητρικής ανοσοανοχής στην εμβρυομητρική επιφάνεια, παρατηρείται στροφή της Th1/Th2 ισορροπίας υπέρ της Th2 ανοσιακής απάντησης. Συγκεκριμένα, προκειμένου να επιτευχθεί η εμφύτευση και η διατήρηση της κύησης χωρίς να απορριφθεί το προϊόν σύλληψης, υπερισχύει η δράση των T2-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και των κυττοκινών που αυτά εκκρίνουν, σε βάρος των T1-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και των Th1 κυττοκινών.

Όπως είναι γνωστό, η Th2 ανοσιακή απάντηση προωθεί τη χυμικού τύπου ανοσία η οποία θεωρείται πιο ήπια συγκριτικά με την κυτταρικού τύπου ανοσία που προκαλείται από τις Th1 κυττοκίνες, ώστε με την Th2 στροφή να αμβλύνεται η άμυνα στην εμβρυομητρική επιφάνεια εναντίον του εμβρύου. Συγκεκριμένα, οι Th2 κυττοκίνες υπερισχύουν των Th1 κυττοκινών με αποτέλεσμα κυττοκίνες όπως είναι οι ιντερλευκίνες IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, και ο μετατρεπτικός παράγοντας των όγκων TGFβ, να ελαττώνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων -ιντερλευκίνες IL-2, IL-18, η ιντερφερόνη IFNγ, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNFα- που είναι

δυνατό να θέσουν σε κίνδυνο την επιβίωση του εμβρύου (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Thellin O et al.2003, Clark DA et al.1999). Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα στην στροφή προς την Th2 απάντηση συμμετέχει η Th17/Tregs ισορροπία με στροφή υπέρ των T-ρυθμιστικών κυττάρων Tregs του φθαρού και των κυττοκινών που αυτά παράγουν (Saito S et al.2011).

8.2.3. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK στη φυσιολογική κύηση

Ο αριθμός των ενδομήτριων uNK κυττάρων παρουσιάζει διακυμάνσεις στις διάφορες φάσεις του έμμηνου κύκλου και στα μέσα του τρίτου τριμήνου κύησης ενώ στην αρχόμενη κύηση τα NK κύτταρα αποτελούν το 50% με 90% των λευκοκυττάρων του φθαρού, με τα B και τα T λεμφοκύτταρα να είναι σπάνια στον ιστό του φθαρού. (Makrigiannakis A et al.2011, Aagaard-Tillery KM et al.2006).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής είναι η παρουσία ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων NK που διαφέρουν από τα κύτταρα NK του περιφερικού αίματος ως προς τον φαινότυπο και την κυτταροτοξικότητά τους. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός των NK κυττάρων του ενδομητρίου ανήκει στο υποσύνολο των κυττάρων φυσικών φονέων με φαινότυπο $CD56^{bright}CD16^{-}$, τα οποία όπως είναι γνωστό στρέφονται προς την παραγωγή κυττοκινών.

Τα κύτταρα αυτά αναφέρονται επίσης ως κύτταρα ομοιάζοντα τα κύτταρα φυσικούς φονείς NK-like cells ή ρυθμιστικά NK κύτταρα καθώς στερούνται κυτταροτοξικής δράσης. Σε αντιπαράθεση με τα NK-like cells ή ρυθμιστικά NK κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς με φαινότυπο $CD56^{dim}CD16^{+}$ έχουν κυτταροτοξική δράση και ονομάζονται συμβατικά, δραστικά ή ενεργοποιημένα NK κύτταρα (Saito S et al. 2011, Saito S et al.2008).

Ο ελαττωμένος αριθμός των δραστικών κυτταροτοξικών NK κυττάρων στο φθαρτό κατά τη διάρκεια της κύησης και ειδικότερα στην αρχόμενη κύηση, φαίνεται να συντελεί στην ανοχή του ανοσιακού συστήματος της μητέρας στα πατρικά αντιγόνα του κυήματος. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση των ρυθμιστικών κυττάρων uNK (CD56^{bright}CD16⁻ NK κύτταρα) στο ενδομήτριο κατά την αρχόμενη κύηση καταδεικνύει ότι ίσως ο συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων να έχει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης και την επακόλουθη πλακουντοποίηση (Makrigiannakis A et al. 2011).

Ειδικότερα, στη διαδικασία της εμφύτευσης είναι πιθανό να έχει βαρύνουσα σημασία η αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων -κυρίως των KIRs- των uNK κυττάρων και των μορίων HLA-C, HLA-G, HLA-E που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων της τροφοβλάστης, ώστε μεταξύ άλλων να καταστέλλεται η κυτταροτοξική δράση των uNK κυττάρων (Makrigiannakis A et al.2011, Verma S et al.1997).

Αναφορικά με την έκκριση κυττοκινών από τα ενδομήτρια CD56^{dim}CD16⁺ uNK κύτταρα, οι κυτταρικοί αυτοί διαμεσολαβητές –όπως είναι η ιντερφερόνη γ IFN-γ- φαίνεται να διαφοροποιούν και να ρυθμίζουν το βάθος διείσδυσης της τροφοβλάστης στον φθαρτό συμβάλλοντας στην εμφύτευση του εμβρύου (Thellin O et al. 2003, Ashkar AA et al.1999, Makrigiannakis A et al.2011, Moffet A et al.2004).

Επιπλέον, νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα CD56^{dim}CD16⁺ uNK κύτταρα γύρω από τις σπειροειδείς αρτηρίες και οι αυξητικοί παράγοντες που παράγουν συμμετέχουν στη διαδικασία της αγγειογένεσης η οποία είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση φυσιολογικής κύησης. Τέτοιοι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα NK-like κύτταρα είναι: οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (vascular endothelial growth factors) VEGF-A, VEGF-C, ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (placenta growth factor) PlGF και οι αγγειοποιητίνες Ang1, Ang2. (Makrigiannakis A et al, Bulmer JN and Lash GE.2005, Li XF et al.2001).

8.2.4. Άλλοι μηχανισμοί μητρικής ανοσοανοχής προς το έμβρυο

Τοπικά, στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής αναπτύσσονται σε συνεργασία με τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, διεργασίες όπως οι παρακάτω προκειμένου να επιτευχθεί εμφύτευση και να διατηρηθεί η κύηση.

Καθοριστικός είναι ο ρόλος της προγεστερόνης καθώς, εκτός από τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου την οποία προκαλεί, φαίνεται να επιδρά στα T-λεμφοκύτταρα (CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα) του ενδομητρίου οδηγώντας τα τελευταία στην παραγωγή του παράγοντα PIBF (progesterone inhibiting blocking factor). Ο παράγοντας PIBF με τη σειρά του δεσμεύει τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις και συμβάλλει στην Th2 στροφή, διαδικασίες απαραίτητες για την εμβρυομητρική ανοσοανοχή. Επιπλέον, φαίνεται ότι η υποθαλαμική ορμόνη η εκλύουσα την κορτικοτροπίνη CRH (corticotrophin-releasing hormone) κατέχει ζωτικό ρόλο στην εμφύτευση αφού ενισχύει την προγεστερόνη στη διαδικασία της φθαρτοποίησης, και ίσως να συμμετέχει σε τοπικά φαινόμενα φλεγμονής στη θέση εμφύτευσης που καθιστούν την ενδομητρική επιφάνεια κατάλληλη για την πρόσφυση της βλαστοκύστης (Makrigiannakis A et al.2011, Makrigiannakis A et al.1999).

Ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας LIF (leukemia inhibitory factor) του ενδομητρίου και ο υποδοχέας του στη βλαστοκύστη είναι απαραίτητοι για την εμφύτευση, ενώ μετά την εμφύτευση οι παράγοντες αυτοί ίσως να επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης (Thellin O et al.2003, Sentruk LM and Arici A.1998;39:144-151).

Επιπρόσθετα, αναστολή των πρωτεϊνών συμπληρώματος από μόρια όπως είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη συμπληρώματος MCP (membrane complement protein) και ο επιταχυντικός παράγοντας αποσύνθεσης DAF (decay accelerating factor) είναι

πιθανό να συμμετέχει στην ανοσοανοχή της μητέρας στα πατρικής προέλευσης αντιγόνα του εμβρύου (Thellin O et al.2003, Johnson PM et al.1990).

Η ινδολαμίνη 2,3-δυσυγενάση IDO (indoleamine dioxygenase) παράγεται από τη συγκυτιοτροφοβλάστη και καταβολίζει την τρυπτοφάνη, που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Κατ'αυτόν τον τρόπο, είναι πιθανό η IDO να αναστέλλει αλληλοαντιδράσεις των μητρικών ανοσοποιητικών κυττάρων στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής (Thellin O et al.2003, Munn DH et al.1998, Christiansen OB et al.2006).

Το σύστημα Fas/FasL (CD95/CD95L) ίσως να ελέγχει την ανάπτυξη της τροφοβλάστης, προκαλώντας απόπτωση των ενεργοποιημένων μητρικών T-λεμφοκυττάρων του ενδομητρίου στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής. Επίσης, η αννεξίνη II που παράγεται από τον πλακούντα είναι δυνατό να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την έκκριση των μητρικών ανοσοσφαιρινών (Thellin O et al.2003, Aarli A et al.1998).

Η συνδεδεμένη με τη μαννόζη λεκτίνη MBL (mannose-binding lectin) συνιστά αναπόσπαστο τμήμα της φυσικής ανοσίας και του συστήματος συμπληρώματος παρέχοντας την τρίτη οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Ωστόσο, η λεκτίνη φαίνεται να εμπλέκεται επίσης στις διεργασίες της μητρικής ανοσοανοχής, καθώς ίσως να έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τροποποιώντας την έκκριση κυτοκινών από τα μονοκύτταρα (Christiansen OB et al.2006).

Τέλος, υποδοχείς της λεπτίνης έχουν αναγνωριστεί στη χοριακή και στην εξωχοριακή τροφοβλάστη και είναι πιθανό η λεπτίνη να συμμετέχει -μέσω της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι οι ιντερλευκίνες IL-1, IL-6 και ο παράγοντας TNFα- στη διείσδυση της τροφοβλάστης και την εμφύτευση (Toth B et al.2010, Fournier T et al.2007, Tarrade A et al.2001).

8.3. ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΕΠΑΝΕΙΛΗΜΜΕΝΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Αυτοάνοσες αποβολές ονομάζονται οι επανειλημμένες αποβολές που θεωρείται ότι προκαλούνται από την αύξηση ήδη υπαρχόντων αυτοαντισωμάτων έναντι των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων ή και αυτοαντισωμάτων έναντι άλλων κυτταρικών οργανιδίων και ιστών. Επιπλέον, οι αυτοάνοσες αποβολές είναι συνήθως δευτεροπαθείς, με τις πάσχουσες να συνεχίζουν να αποβάλουν και μετά από αλλαγή συντρόφου γεγονός που ερμηνεύεται από την παραδοχή ότι η αιτία των αυτοάνοσων αποβολών προέρχεται από την ίδια την ασθενή και όχι από τον σύντροφο ή από το έμβρυο (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

Από τις επανειλημμένες αποβολές ανοσολογικής αιτιολογίας, εκείνες που εντάσσονται στα πλαίσια του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου είναι οι πλέον αποδεκτές ως ανοσολογικής αιτιολογίας αποβολές και ανήκουν στην κατηγορία των αυτοάνοσων αποβολών.

8.3.1. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και επανειλημμένες αποβολές

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο αποτελεί καλά γνωστό παράγοντα κινδύνου για καθ'έξιν αποβολές και αφορά περίπου το 15% των γυναικών με καθ'έξιν αποβολές. Πρόκειται για ένα αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από επίκτητη θρομβοφιλία η οποία αφορά τόσο το φλεβικό όσο και το αρτηριακό δίκτυο. Για τη διάγνυσή του δεν αρκεί η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων αλλά η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα δύο κλινικά κριτήρια και τουλάχιστον ενός από τα τρία εργαστηριακά κριτήρια του APS (Πίνακας 8-1) (The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine.2012, Miyakis S et al.2006, Sugiura-Ogasawara M et al.2014).

International Consensus Classification criteria for the antiphospholipid syndrome (APS) (23, 24).

APS is present if one of the following clinical criteria and one of the laboratory criteria are met.

Clinical criteria

1. Vascular thrombosis
2. Pregnancy morbidity
 - a. One or more unexplained deaths of morphologically normal fetuses after the 10th week of gestation by ultrasound or direct examination of the fetus.
 - b. One or more premature births of a morphologically normal neonate before the 34th week of gestation because of eclampsia or severe pre-eclampsia or recognized features of placental insufficiency.
 - c. Three or more unexplained consecutive spontaneous abortions before the 10th week of gestation with maternal anatomic or hormonal abnormalities and paternal and maternal chromosomal causes excluded.

Laboratory criteria

1. Lupus anticoagulant present in plasma on two or more occasions at least 12 weeks apart, or
2. Anticardiolipin antibody of IgG or IgM isotype in serum or plasma present in medium or high titer (>40 GPL or MPL or > 99th percentile), on two or more occasions at least 12 weeks apart, or
3. Anti- β_2 glycoprotein-I antibody of IgG and/or IgM isotype in serum or plasma (in titer greater than the 99th percentile), present on two or more occasions at least 12 weeks apart.

Practice Committee. Recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2012.

Πίνακας 8-1: Κριτήρια διάγνωσης του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου (The Practice Committee of the Am Soc of Reprod Med.2012).

Είναι αξιοσημείωτο ότι έγκυες γυναίκες με μέτρια ή αυξημένα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα έχουν υψηλό ποσοστό εμβρυικών απωλειών μετά τη 10^η εβδομάδα κύησης. Κάποια αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα είναι δυνατό να εντοπίζονται δυσανάλογα πιο συχνά σε γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές συγκριτικά με γυναίκες με φυσιολογικές κυήσεις. Επιπλέον, στις μαιευτικές επιπλοκές του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου συμπεριλαμβάνονται ο πρόωρος τοκετός, η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης του εμβρύου IUGR (intrauterine growth restriction), η προεκλαμψία, η πρόωρη αποκόλληση πλακούντα.

Τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα που συνήθως εμφανίζονται αυξημένα στις καθ'έξιν αποβολές είναι το αντιπηκτικό του λύκου LA (lupus anticoagulant), οι

αντικαρδιολιπίνες aCL (anticardiolipin antibodies) και τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (β2-GPI). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα με αδιευκρίνιστη έως τώρα κλινική σημασία, όπως είναι τα αυτοαντισώματα έναντι της φωσφατιδυλσερίνης, της φωσφατιδυλχολίνης, της φωσφατιδυλινωσιτόλης, της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Σε κάποιες γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές και αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο έχουν ανευρεθεί και άλλα αντισώματα όπως είναι τα αντιπυρηνικά και τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα.

Στο μηχανισμό πρόκλησης των καθ'έξιν αποβολών και άλλων μαιευτικών επιπλοκών σε γυναίκες με APS, ενέχεται η υπερπηκτικότητα και ο σχηματισμός θρόμβων στη συγγυτιοτροφοβλάστη και στον πλακούντα. Ωστόσο, τα αυτοαντισώματα είναι δυνατό να οδηγήσουν σε Th1- απάντηση που χαρακτηρίζει τις αλλοάνοσες αποβολές, υπενθυμίζοντας ότι στην πραγματικότητα δεν υπάρχει διακριτός ανοσολογικός διαχωρισμός μεταξύ αυτοάνοσων και αλλοάνοσων αποβολών (The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion.2012, Sugiura-Ogasawara M et al.2014, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

8.3.2. Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα και επανειλημμένες αποβολές

Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα που σχετίζονται με επανειλημμένες αποβολές είναι ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος SLE, αυτοάνοσες θυρεοειδοπάθειες όπως είναι η νόσος Graves και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, το σκληρόδερμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το σύνδρομο Sjogren, η οζώδης πολυαρτηρίτιδα και η λευκοκυτταροκλαστική αγγειίτιδα.

8.4. ΑΛΛΟΑΝΟΣΕΣ ΕΠΑΝΕΙΛΗΜΜΕΝΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Στις αλλοάνοσες επανειλημμένες αποβολές περιλαμβάνονται οι καθ'έξιν αποβολές που προκαλούνται από διαταραχή της μητρικής ανοσοανοχής ως προς το έμβρυο, ώστε τελικά αυτό να αναγνωρίζεται ως ημιαλλογενές μόσχευμα και να απορρίπτεται. Πιστεύεται ότι στην πυροδότηση αυτής της ανοσολογικής αυτής διαταραχής της μητέρας, εμπλέκονται παράγοντες που προέρχονται από τον πατέρα. Επιπρόσθετα, οι αλλοάνοσες αποβολές είναι πρωτοπαθείς και όταν η γυναίκα αλλάξει σύντροφο συνήθως δεν έχει αυτόματη αποβολή, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της παραπάνω παραδοχής (Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

Η πλειονότητα των πραγματικά ανεξήγητων επανειλημμένων αποβολών πιστεύεται ότι προκαλείται από μηχανισμούς αλλοανοσολογικής απάντησης με ή χωρίς την εμπλοκή και άλλων παραγόντων κινδύνου όπως είναι το έντονο άγχος, οι λοιμώξεις, περιβαλλοντικοί παράγοντες (The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion.2012, Shigeru Saito et al.2011).

Στην περίπτωση των αλλοάνοσων αποβολών ένας ή περισσότεροι από τους μηχανισμούς τοπικής μητρικής ανοσοανοχής προς το έμβρυο διαταράσσονται. Πρωταρχικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν ο αυξημένος αριθμός των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων φυσικών φονέων (NK cells) στο ενδομήτριο της θέσης εμφύτευσης της βλαστοκύστης καθώς και η μεταστροφή της ισορροπίας μεταξύ της Th1 και της Th2 ανοσιακής απάντησης υπέρ της Th1 απάντησης (Makrigiannakis A et al.2011, Saito S et al.2011, Π.Δρακάκης.Αποβολές. Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).

8.4.1. Διαταραχή της Th1/Th2 ανοσιακής ισορροπίας- Ο ρόλος των T-ρυθμιστικών κυττάρων Tregs

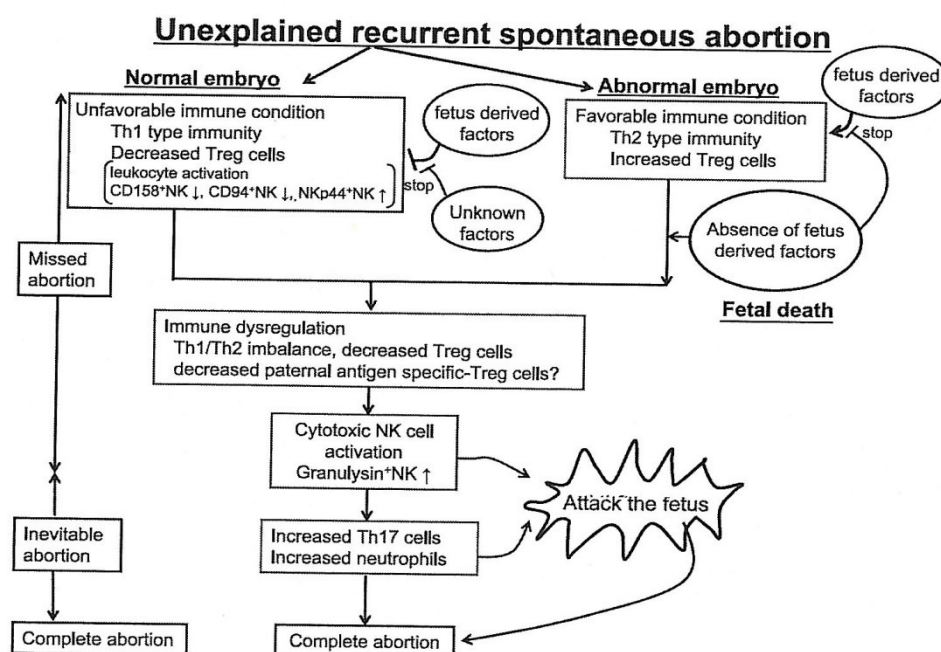
Στις αλλοάνοσες αποβολές ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς του ανοσοτροφισμού που διαταράσσεται είναι η παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών τοπικά. Άμεση συνέπεια αυτής της διαταραχής είναι η υπερβολική ανοσοδιέγερση της μητέρας με υπερπαραγωγή κυτταροκινών καταστροφικών για το έμβρυο, που είναι οι κυτταροκίνες της Th1 απάντησης, σε βάρος της παραγωγής κυτταροκινών προστατευτικών για το έμβρυο, που είναι οι κυτταροκίνες της Th2 απάντησης. Όπως έχει αναφερθεί (8.2.1: Ανοσολογία της κύησης), στις Th1 κυτταροκίνες περιλαμβάνονται κυτταρικοί διαμεσολαβητές όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), η ιντερλευκίνη IL-2, η ιντερφερόνη IFN- γ , η ιντερλευκίνη IL-18. Οι Th2 κυτταροκίνες περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα TGF- β .

Ειδικότερα, στον φθαρτό της θέσης εμφύτευσης οι Th1 κυτταροκίνες ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) σε κύτταρα φονείς που ενεργοποιούνται από τη λεμφοκίνη LAK (Lymphokine-Activated Killer cells), μακροφάγα καθώς και κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα) ώστε τα κύτταρα αυτά να παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση έναντι της τροφοβλάστης και της εμβρυοβλάστης στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής (Εικ.8-4).

Επιπρόσθετα, οι Th1 κυτταροκίνες είναι δυνατό να δράσουν απευθείας στα τροφοβλαστικά κύτταρα μειώνοντας την παραγωγή της OX-2 γλυκοπρωτεΐνης και αυξάνοντας την παραγωγή της fg12 προθρομβινάσης. Κατ'αυτόν τον τρόπο, εγείρεται ακόμη περισσότερο η Th1 στροφή καθώς ελαττώνεται η συγκέντρωση της OX-2 που φυσιολογικά δρα υπέρ της Th2 στροφής, ενώ η fg12 αναστέλλει την έκφραση της OX-2 και μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη προάγοντας τη θρόμβωση στην μητροπλακουντιακή κυκλοφορία και την επακόλουθη αποβολή. Επίσης, η αυξημένη

παραγωγή της IL-18 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιούμενη από τη θρομβίνη προσελκύει ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια οδηγώντας σε φλεγμονώδη απάντηση με ταυτόχρονη ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος (Thellin et al.2003).

Σύμφωνα με τις έως σήμερα μελέτες, είναι αξιοσημείωτο ότι η υπεροχή της Th1 απάντησης του φθαρού της θέσης εμφύτευσης δεν παρατηρείται στις ανεξήγητες επανειλημμένες αποβολές εμβρύων με παθολογικό καρυότυπο (Saito S et al.2011, Makrigiannakis A et al.2011).



Εικ.8-4: Η αλληλουχία πρόκλησης επανειλημμένων αποβολών πιθανής αλλοάνοσης αιτιολογίας (Saito S et al.2011;90:91-95).

Επιπλέον, ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να κατέχουν τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα Tregs (T-regulatory cells ή CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells) στον πολύπλοκο μηχανισμό των αλλοάνοσων αποβολών. Σύμφωνα με κάποιες κλινικές αναφορές, ο αριθμός των Tregs κυττάρων είναι ελαττωμένος στον φθαρό των περιστατικών επανειλημμένων

αποβολών, χωρίς όμως να γνωρίζουμε αν υπάρχει διαφορά στον πληθυσμό των Tregs κυττάρων αυτόματης αποβολής εμβρύου με φυσιολογικό καρυότυπο και εμβρύου με παθολογικό καρυότυπο. Επιπρόσθετα, έχει γίνει αναφορά για αυξημένα επίπεδα των Th17 κυττάρων του φθαρτού με σύγχρονη εμφάνιση ελαττωμένων επιπέδων των Tregs κυττάρων του φθαρτού σε ανεξήγητες επανειλημμένες αποβολές, ώστε να υπονοείται διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ Tregs και Th17 κυττάρων (Saito S et al. 2011, Wang WJ et al.2010;84:164-170, Guerin LR et al. 2009, Kwiatak M et al. 2015).

8.4.2. Ο ρόλος των κυττάρων φυσικών φονέων «NK cells»

Η διαφοροποίηση στον αριθμό, στον φαινότυπο και στη λειτουργία των κυττάρων φυσικών φονέων του ενδομητρίου είναι πιθανό να εμπλέκεται στον μηχανισμό των επανειλημμένων αποβολών ανοσολογικής αιτιολογίας, αλλοάνοσων και αυτοάνοσων (Saito S et al.2011).

Η πλειοψηφία των μελετών έχει δείξει ότι ο συνολικός αριθμός των κυττάρων φυσικών φονέων του ενδομητρίου uNK (uterine NK cells) αλλά και ο αριθμός των δραστικών uNK ($CD56^{dim}CD16^{+}$) σε γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές είναι αυξημένος σε σύγκριση με αυτούς σε γυναίκες με φυσιολογικές κυήσεις (Kamoi M et al.2015, Lee SK et al.2013;70:398-411). Ωστόσο, κάποιες μελέτες δεν έδειξαν διαφορά στον αριθμό των κυττάρων φυσικών φονέων του ενδομητρίου μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου, καθώς σε κάθε μελέτη ποικίλουν τα κριτήρια επιλογής των ασθενών, η χρονική στιγμή λήψης του ενδομητρικού δείγματος, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε (Makrigiannakis A et al.2011).

Η παρουσία των ενεργοποιημένων uNK κυττάρων σε μεγάλο ποσοστό σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων φυσικών φονέων του ενδομητρίου, φαίνεται να έχει σημαντικές λειτουργικές επιπτώσεις. Ειδικότερα, τα ενεργοποιημένα κύτταρα φυσικοί

φονείς του ενδομητρίου έχουν φαινότυπο $CD56^{dim}CD16^{+}$ και άμεση δράση στις χοριακές λάχνες στον μεσολάχνιο χώρο. Το $CD16$ μόριο είναι υπεύθυνο για την κυτταρική κυτταροτοξικότητα που είναι εξαρτώμενη από τα αντισώματα ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) αλλά και για τη δραστικότητα των LAK κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων.

Τα ενεργοποιημένα uNK κύτταρα παράγουν χαμηλά επίπεδα κυταροκινών αλλά έχουν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από τα NK κύτταρα του ενδομητρίου με φαινότυπο $CD56^{bright}CD16^{-}$, ώστε ο αυξημένος αριθμός των $CD56^{dim}CD16^{+}$ uNK κυττάρων να αποτελεί πιθανή αιτία αυτόματης αποβολής. Επιπλέον, η ελάττωση του αριθμού των $CD56^{bright}CD16^{-}$ uNK κυττάρων είναι πιθανό να δημιουργεί εχθρικό περιβάλλον για το έμβρυο, καθώς τα κύτταρα αυτά παράγουν μεταξύ άλλων αυξητικούς παράγοντες απαραίτητους για την πλακουντοποίηση όπως είναι ο VEGF και ο PlGF (Makrigiannakis A et al.2011).

8.4.3. Ο ρόλος του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας MHC

Αναφορικά με τις επανειλημμένες αποβολές, έχουν μελετηθεί δύο ιδιαίτερες περιοχές των γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC ή αντιγόνων των ανθρώπινων λευκοκυττάρων HLA: η υποπεριοχή HLA-G και η υποπεριοχή HLA-DR. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 8.2. της ανοσολογίας της κύησης, τα μόρια HLA-G ανήκουν στα μη κλασικά μόρια HLA τάξης Ib, ενώ τα μόρια HLA-DR περιλαμβάνονται στα μόρια HLA τάξης II.

Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ ανεπαρκούς HLA-G έκφρασης στην τροφοβλάστη και καθ'έξιν αποβολών. Δεδομένου ότι στη φυσιολογική κύηση, τα μόρια HLA-G της συγκυτιοτροφοβλάστης και της εξωχοριακής κυτταροτροφοβλάστης προκαλούν απόπτωση των κατασταλτικών T-κυττάρων και αναστέλλουν τη δράση των λεμφοκυττάρων φυσικών φονέων, στην περίπτωση της

ελαττωμένης έκφρασης αυτών των μορίων στην τροφοβλάστη αίρεται η ανοσοκατασταλτική τους λειτουργία. Το αποτέλεσμα είναι η υπερπαραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και η υπέρμετρη φλεγμονώδης απάντηση του φθαρτού στην τροφοβλάστη της εμβρυομητρικής επιφάνειας επαφής. Ωστόσο, εξακολουθεί να υφίσταται το επαναλαμβανόμενο πρόβλημα των μελετών αυτών σχετικά με ποια είναι η αιτία και ποιο είναι το αποτέλεσμα της εμβρυικής απώλειας (Christiansen OB et al.2006).

Επιπλέον, η έκφραση των HLA-DR μορίων φαίνεται να σχετίζεται αιτιολογικά με τις επανειλημμένες αποβολές καθώς η παρουσία των μορίων αυτών στην τροφοβλάστη είναι πιο συχνή σε γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές από ό,τι είναι σε γυναίκες με φυσιολογικές κυήσεις. Πιθανή λειτουργία των HLA-DR μορίων είναι η διέγερση για παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α (Christiansen OB et al. 2006, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).

Ήδη από τη δεκαετία του '60, ορισμένες έρευνες ισχυρίζονταν ότι έμβρυα με HLA αντιγόνα πατρικής προέλευσης που διαφέρουν από τα μητρικά HLA αντιγόνα ίσως να έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης συγκριτικά με τα έμβρυα εκείνα των οποίων τα πατρικά HLA αντιγόνα δε διαφέρουν από τα μητρικά (Makrigiannakis A et al.2011, Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική). Σύμφωνα με μελέτες, η HLA συμβατότητα μεταξύ των γονέων είναι δυνατό να προκαλέσει σε ανοσολογική απάντηση της μητέρας η οποία να οδηγήσει σε προβλήματα αναπαραγωγής. Η αυξημένη ομοιότητα των HLA αντιγόνων μεταξύ του πατέρα και της μητέρας μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για αλλοάνοσες επανειλημμένες αποβολές, ωστόσο το θέμα αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Makrigiannakis A et al.2011, Beydoun H et al. 2005, Varla-Leutherioti M et al. 2007).

8.4.4. Ο ρόλος των αντιπατρικών και των δεσμευτικών αντισωμάτων

Κατά τη διάρκεια της κύησης, το ανοσιακό σύστημα της μητέρας παράγει αντισώματα έναντι πατρικών αντιγόνων των ανθρώπινων λευκοκυττάρων HLA του ημιαλλογενούς εμβρύου. Η παρουσία και τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων στον ορό γυναικών αναφέρεται στις έως σήμερα μελέτες, είτε ως αυξημένη είτε ως ελαττωμένη σχετικά με διάφορες επιπλοκές της κύησης (Lanshley E ELO et al.2013, A.H. Decherney et al.Current:Diagnosis and Treatment.Obstetrics and Gynecology).

Η απουσία αντιπατρικών αντισωμάτων APCA (antipaternal cytotoxic antibodies) αλλά κυρίως των δεσμευτικών αντισωμάτων στον ορό της μητέρας έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αλλοάνοσων επανειλημμένων αποβολών. Τα αντιπατρικά αντισώματα είναι αντισώματα της μητέρας κυτταροτοξικά για τα λεμφοκύτταρα του πατέρα και μέχρι πριν μερικά χρόνια οι ειδικοί πίστευαν ότι η σύνδεσή τους με εμβρυικά HLA αντιγόνα πατρικής προέλευσης ήταν απαραίτητη για την επιτυχή έκβαση της κύησης.

Ωστόσο, σύμφωνα με νεότερες μελέτες, γυναίκες που δεν αναπτύσσουν αντιπατρικά αντισώματα είναι δυνατό να έχουν μία φυσιολογική κύηση (Lanshley E ELO et al. 2013). Άλλωστε, τα αντιπατρικά αντισώματα ανιχνεύονται μόνο στο 20% των γυναικών με επιτυχείς κυήσεις ώστε η παρουσία τους να μη θεωρείται αναγκαία συνθήκη για φυσιολογική κύηση και η απουσία τους να μη συνεπάγεται αυτόματη αποβολή (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική). Επιπλέον, τίθεται το ερώτημα του κατά πόσο η απουσία των αντιπατρικών αντισωμάτων κατά το χρόνο ελέγχου αντιπροσωπεύει την απουσία τους κατά την αποβολή, δεδομένου ότι η παρουσία τους στον ορό είναι συνήθως παροδική.

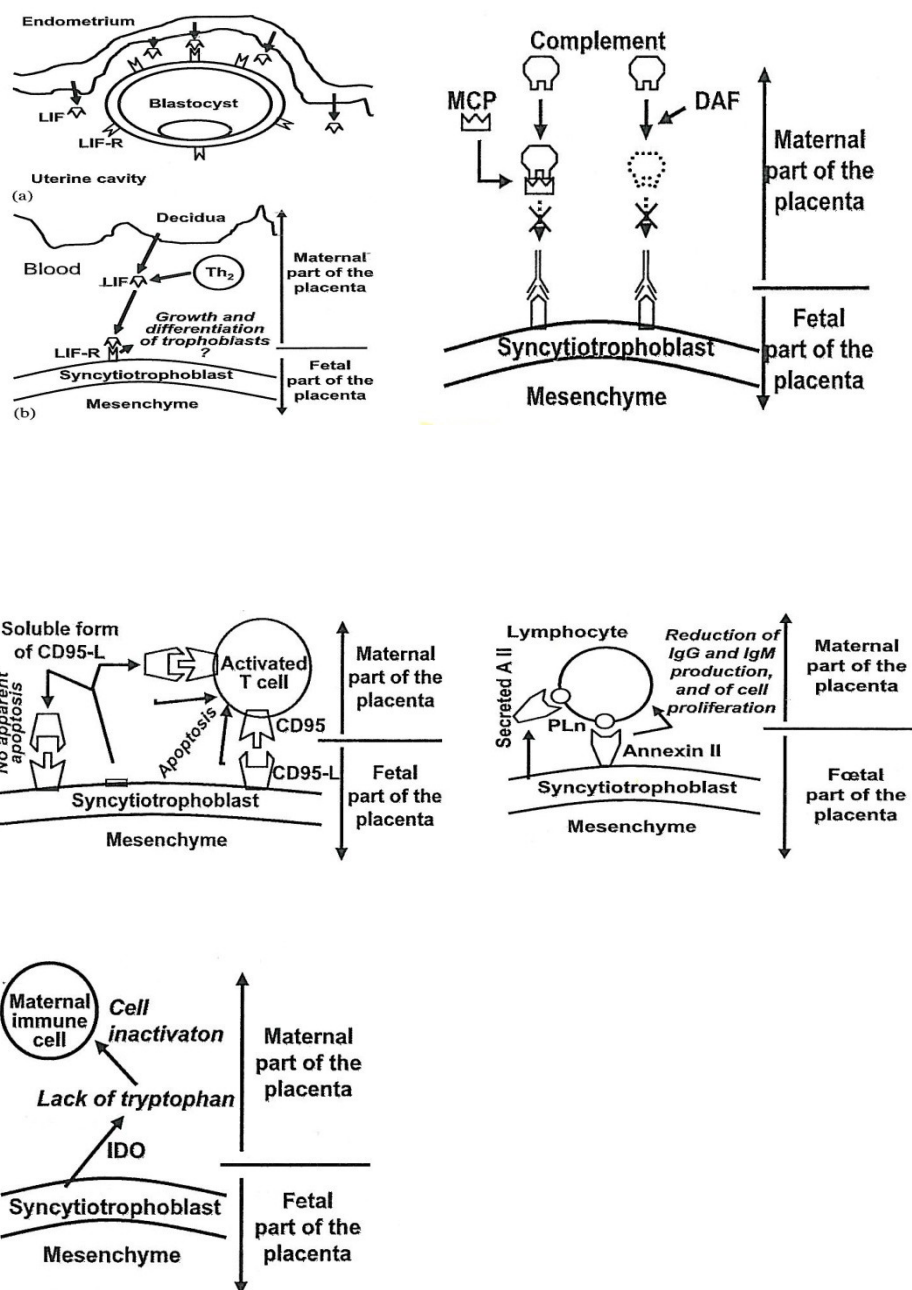
Αναφορικά με τα δεσμευτικά αντισώματα, πρόκειται για αντισώματα της μητέρας που δεσμεύουν κυτταροτοξικές αντιδράσεις έναντι του εμβρύου, που φέρει κατάτο ήμισυ γενετικό υλικό πατρικής προέλευσης. Τα δεσμευτικά αντισώματα στον ορό της

μητέρας φαίνεται να αποτελούν πιο αξιόπιστο δείκτη αλλοάνοσων διαταραχών συγκριτικά με τα αντιπατρικά αντισώματα.

8.4.5. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης αλλοάνοσων επανειλημμένων αποβολών

Η ανεπάρκεια μεσολαβητών της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης και κυττάρων του φθαρτού στη θέση εμφύτευσης της βλαστοκύστης φαίνεται να συμμετέχει στο μηχανισμό των επανειλημμένων αποβολών αλλοάνοσης αιτιολογίας (Εικ.8-5). Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στις επανειλημμένες αποβολές η ανεπάρκεια του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας LIF (leukemia inhibitory factor), της αννεξίνης II και της ινδολαμίνης 2,3-δυσυγενάσης IDO - indoleamine dioxygenase (Thellin O et al.2003, Christiansen OB et al.2006).

Επιπλέον, στους πιθανούς παράγοντες κινδύνου για επανειλημμένες αποβολές περιλαμβάνονται η ανεπάρκεια πρωτεϊνών του συστήματος συμπληρώματος, της λεπτίνης, της προγεστερόνης και του PIBF (progesterone inhibiting blocking factor), ελαττωμένα επίπεδα της λεκτίνης MBL (mannose-binding lectin) καθώς και διαταραχή της, εξαρτώμενης από το σύστημα Fas/FasL (ή CD95/CD95L), απόπτωσης των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων στην τροφοβλάστη (Aagaard-Tillery KM et al.2006, Christiansen OB et al.2006, Toth B et al.2010, Thellin O et al. 2003, Jauniaux E et al.2006).



Εικ.8-5: Πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης αλλοάνοσων αποβολών με εμπλοκή των LIF, πρωτεΐνες συμπληρώματος, IDO, Fas/FasL, Annexin II (Thellin O et al.2003;185:179-184).

Κεφάλαιο 9

Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ- άλφα (Tumor Necrosis Factor- alpha, TNF-α)

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α ή καχεξίνη ανήκει στην κατηγορία των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών με πλειότροπη δράση επηρεάζοντας λειτουργίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, ο μηχανισμός της πήξης, η αντίσταση στην ινσουλίνη όπως επίσης ενδοθηλιακές διεργασίες και φλεγμονώδεις διαδικασίες. Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη φαίνεται να εμπλέκεται σε μεγάλο εύρος ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer, το σηπτικό shock. Αναφορικά με την κύηση, ο TNF-α μαζί με άλλες κυτταροκίνες είναι πιθανό να έχει καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση επιπλοκών της κύησης όπως είναι οι αυτόματες αποβολές, η πρώιμη ρήξη εμβρυικών υμένων, η προεκλαμψία (Gupta R et al.2012).

Ο TNF-α, όπως επίσης οι ιντερλευκίνες IL-1 και IL-6, ασκούν πυρετογόνο δράση και αποτελούν μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης συμμετέχοντας σε ποικίλες διεργασίες της φλεγμονής μεταξύ των οποίων είναι η αύξηση της σύνθεσης πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ. Στην υπεροικογένεια TNF, εκτός του TNF-α, συμπεριλαμβάνεται ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων β TNF-β ή λεμφοτοξίνη ο οποίος παράγεται κυρίως από τα λεμφοκύτταρα και έχει κυτταροτοξική δράση, όπως και ο TNF-α, συμβάλλοντας στην νέκρωση και συρρίκνωση των όγκων (panacea.med.uoa.gr).

Ο TNF-α παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, ως απάντηση προς ένα ευρύ φάσμα ερεθισμάτων, μεταξύ των οποίων είναι προϊόντα βακτηρίων, ιοί και παράσιτα. Ένα από τα ισχυρότερα αντιγονικά ερεθίσματα για την πρόκληση παραγωγής του TNF-α είναι ο λιποπολυσακχαρίτης LPS (lipopolysaccharide), ο οποίος είναι μία ενδοτοξίνη στο κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά gram βακτηρίων (Daher S et al.1999). Άλλα κύτταρα που παράγουν τον TNF-α είναι τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK, τα μαστοκύτταρα, τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα αλλά και νευρώνες, οπότε ο κυτταρικός αυτός διαμεσολαβητής έχει τον ρόλο νευροδιαβιβαστή.

Ειδικότερα, η συγκεκριμένη πολυλειτουργική κυτταροκίνη κατέχει ζωτική θέση στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Ο TNF-α αποτελεί στοιχείο της φυσικής ανοσίας καθώς, μεταξύ άλλων, παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς NK και συμμετέχει στη διαδικασία φλεγμονής-φαγοκύττωσης ή απόπτωσης λοιμογόνων παραγόντων. Άλλωστε, καθώς στην πραγματικότητα η φυσική και η επίκτητη ανοσία δε συνιστούν σαφώς διαχωρισμένους τύπους ανοσίας, αναπόσπαστο τμήμα της επίκτητης κυτταρικής ανοσίας αποτελεί ο TNF-α.

Όπως έχει αναφερθεί στην Ενότητα 8.1.3., ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α παράγεται επίσης από τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα Th1 ώστε να μεσολαβεί προκειμένου να εξοντωθεί το αντιγόνο Ag από το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο APC που παρουσίασε το αντιγόνο ή από το T-κυτταροτοξικό/NK λεμφοκύτταρο που ενεργοποιήθηκε μέσω του TNF-α και άλλων Th1 κυτοκινών.

9.1. TNF-α και Φυσιολογική Κύηση

Ο TNF-α έχει ταυτοποιηθεί στις ωοθήκες, τους ωαγωγούς, τη μήτρα και τον πλακούντα ενώ εκφράζεται στους εμβρυονικούς ιστούς σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου (Toder V et al.2003, Terranova PF et al.1995, Kohchi C et al.1994).

Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη θεωρείται ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τη στεροειδογένεση, τις κυκλικές μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία της μήτρας, την αρχιτεκτονική του πλακούντα, την πλακουντοποίηση, την εμβρυονική ανάπτυξη αλλά επίσης τη διαδικασία του τοκετού (Azizieh FY et al.2015, Haider S et al.2009).

Είναι αποδεκτό ότι για τη φυσιολογική εμφύτευση στην ανθρώπινη κύηση, είναι απαραίτητες φλεγμονώδεις διεργασίες στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής (Calleja-Agius J et al.2012, Challis JR et al.2009, Christiansen OB et al. 2006). Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α ως Th1 κυτταροκίνη αλλά επίσης ως κυτταροκίνη παραγόμενη από τα δραστικά κύτταρα φυσικοί φονείς του ενδομητρίου, είναι πιθανό να έχει ρυθμιστικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου. Συγκεκριμένα, ο TNF-α ελέγχει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης, αναστέλοντας τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων και ασκώντας περιοριστική δράση στην διείσδυση της τροφοβλάστης στον φθαρτό στη θέση εμφύτευσης (Daher S et al.1999, Azizieh FY et al.2015). Ωστόσο, δεν είναι καλά καθορισμένη η ακριβής αλληλεπίδραση του TNF-α και άλλων κυττοκινών με τη διεισδυόμενη τροφοβλάστη (Calleja-Agius J et al.2012, Jauniaux E et al.2006).

Στην κυτταροτοξική δράση του TNF-α στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής φαίνεται εν μέρει να συμμετέχει η αύξηση ελεύθερων ριζών στα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με απώλεια της λειτουργίας των ενζύμων στα πλαίσια της απόπτωσης των κυττάρων των πρωτογενών χοριακών λαχνών της τροφοβλάστης (Calleja-Agius J et al.2012, Schulze-Osthoff K et al.1992, Raghupathy R et al.2000).

Άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης του TNF-α στην τροφοβλάστη, είναι η πρόκληση θρομβωτικών φαινομένων στα μητρικά αγγεία της εμβρυομητρικής επιφάνειας προκαλώντας δυσλειτουργία του ενδοθηλίου τους (Liu C et al.2010, Clark DA et al. 1998, Azizieh FY et al.2015).

Επιπρόσθετα, εκτός από τη δράση του στη διαδικασία της διείσδυσης κατά την εμφύτευση, ο TNF-α θεωρείται παράγοντας που επάγει την έναρξη του τοκετού. Η συγκεκριμένη δράση του TNF-α συνάδει με την παρατήρηση ότι διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση προσταγλανδινών από τους ιστούς της κύησης, οι οποίοι συμμετέχουν στην έναρξη των ωδίνων του τοκετού (Daher S et al.1999).

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης η παραγωγή των κυτταροκινών μεταβάλλεται, ώστε η συγκέντρωση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α στον ορό να αυξομειώνεται. Κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης και στην έναρξη του τοκετού παρατηρούνται τα μεγαλύτερα επίπεδα του TNF-α με τις υψηλότερες τιμές να σημειώνονται κατά τον τοκετό.

Σύμφωνα με τους Daher S et al. σε κυήσεις πρώτου τριμήνου και σε μη έγκυες γυναίκες, ανεξαρτήτως ιστορικού φυσιολογικών κύσεων ή επανειλημμένων αποβολών, δεν παρουσιάζονται ανιχνεύσιμα επίπεδα του TNF-α στον ορό. Αυτό το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης συνάδει με την υπόθεση των Voight και Steib ότι η καταστολή της παραγωγής του TNF-α κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης θα μπορούσε να λειτουργήσει υπέρ της φυσιολογικής έκβασης της κύησης.

Επιπλέον, η ίδια μελέτη υποστηρίζει ότι ο TNF- α ανιχνεύεται στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης και σταδιακά αυξάνεται στο τρίτο τρίμηνο, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται με τη έναρξη του τοκετού (Daher S et al.1999, Voigt HJ and Steib L.1989).

9.2. Ο TNF- α και Επανειλημμένες Αυτόματες Αποβολές (ΕΑΑ)

Από τις έως σήμερα μελέτες, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της μητρικής Th2 ανοσιακής απάντησης και ομαλής έκβασης της κύησης καθώς επίσης ανάμεσα στην Th1 ανοσιακή απάντηση της μητέρας και την αυτόματη αποβολή.

Στην περίπτωση άρσης της τοπικής ανοσολογικής ανοχής της μητέρας στην εμβρυομητρική επιφάνεια και στροφής υπέρ της Th1 απάντησης, παρατηρείται μεταξύ άλλων αυξημένη παραγωγή και δράση του TNF- α στη θέση εμφύτευσης του εμβρύου. Το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι η ανεπαρκής διείσδυση της τροφοβλάστης με την ελαττωματική εμφύτευση, λόγω της υπέρμετρης κυτταροτοξικής δράσης του TNF- α στα τροφοβλαστικά κύτταρα και θρομβωτικών φαινομένων στα σπείροειδή αγγεία στην περιοχή εμφύτευσης (Daher S et al.2012, Gupta R et al. 2012).

Οι Clark et al. το 1998 παρατήρησαν στα ποντίκια ότι ο TNF- α , μαζί με την IFN- γ , προκαλούν θρομβωτικά και φλεγμονώδη φαινόμενα στα μητρικά αγγεία του φθαρτού και του πλακούντα που έχουν ως συνέπεια την αυτόματη αποβολή (Gücer F et al.2001, Clark DA et al.1998). Ειδικότερα, από κάποιες μελέτες υποστηρίζεται ότι πιθανός μηχανισμός πρόκλησης αυτόματων αποβολών από τις Th1 κυτταροκίνες είναι η αύξηση της διαδικασίας της πήξης μέσω ρύθμισης προς τα άνω (upregulation) της ομοιάζουσας με το ινωδογόνο πρωτεΐνης 2 ή προθρομβινάσης Fgl2 (fibrinogen-like protein 2) στην τροφοβλάστη αλλά και στον φθαρτό (Palmirotta R et al.2010).

Αναφορικά με τα επίπεδα του TNF-α, ως Th1 κυτταροκίνης, στον ορό γυναικών με επανειλημμένες αποβολές, σύμφωνα με τους Hill JA et al.(1995), τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος PBMC (peripheral blood mononuclear cells) γυναικών με καθ'έξιν αποβολές παράγουν υψηλότερα επίπεδα Th1 κυτταροκινών με εμβρυοτοξική δραστηριότητα- συμπεριλαμβανομένου του TNF-α- όταν διεγερθούν από ένα εκχύλισμα τροφοβλαστικού αντιγόνου, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα γυναικών με φυσιολογικές κυήσεις (Makrigiannakis A et al.2011, Hill JA et al.1995).

Περαιτέρω, αυξημένα επίπεδα του TNF-α σε γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές έχουν παρατηρηθεί από τους Raghupathy R et al., Mallmann P et al., Makhseed M et al. (Gücer F et al.2001) και τους Arslan E et al.(2004) αλλά και από νεότερες μελέτες όπως είναι αυτή των El-Far M et al που δημοσιεύθηκε το 2009.

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι προαναφερθείσες μελέτες των Arslan E et al.(2004) και των El-Far M et al.(2009) συμπεριλαμβάνονται στη μετα-ανάλυση των Zhang C et al που δημοσιεύθηκε τον Φεβρουάριο του 2016 και υποστηρίζει ότι τα επίπεδα του TNF-α ορού είναι αυξημένα στις γυναίκες με ΕΑΑ. Στη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση αναλύθηκαν έντεκα μελέτες ασθενών-μαρτύρων εκ των οποίων οι επτά αφορούσαν τον κινεζικό πληθυσμό ενώ μόνο δύο αναφέρονταν σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Επιπλέον, οι Palmirotta R et al υποστηρίζουν ότι ελαττωμένα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών, προκαλούμενα από το TNF-α -238G/G αλληλίο και τον απλότυπο TNF-α -376G/ -308A/ -238G, ίσως να συσχετίζονται με ελαττωμένο κίνδυνο για επανειλημμένες αυτόματες αποβολές (Palmirotta R et al.2010).

Ωστόσο, το εύρημα αυτό των αυξημένων επιπέδων φλεγμονωδών διαμεσολαβητών όπως είναι ο TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό καθ'έξιν αποβολών, δεν είναι οικουμενικό (Christiansen OB et al.2006, Bates MD et al.2002). Οι Liu RX et al. (2015) δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντική διαφορά του TNF-α στον ορό γυναικών με καθ'έξιν αποβολές και στον ορό γυναικών με ιστορικό φυσιολογικών

κυήσεων. Αναφορικά με τις μη έγκυες γυναίκες, οι Daher et al.(1999) παρατήρησαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό φυσιολογικών κυήσεων και σε εκείνα γυναικών με ιστορικό αυτόματων επανειλημμένων αποβολών.

Ειδικότερα, κάποιες μελέτες όχι μόνο δεν υποστηρίζουν την αύξηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό γυναικών με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές, αλλά αντίθετα δείχνουν ότι τα επίπεδα του TNF-α είναι ελαττωμένα σε σύγκριση με εκείνα γυναικών με φυσιολογικές κυήσεις. Ειδικότερα, οι Bates MD et al.(2002) παρατήρησαν χαμηλά επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης εγκύων γυναικών με ιστορικό ιδιοπαθών καθ'έξιν αποβολών που εν τέλει απέβαλαν συγκριτικά με τα επίπεδα σε έγκυες γυναίκες με φυσιολογικές κυήσεις αλλά και με γυναίκες που δεν κυοφορούσαν.

Αναφορικά με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης σε γυναίκες με ιστορικό επανειλημμένων αποβολών και λαμβάνοντας υπόψη τον καρυότυπο του αποβαλλόμενου εμβρύου, οι Yamada H et al.(2004) παρατήρησαν σε εκείνες που τελικά απέβαλαν ότι ο TNF-α βρισκόταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση στις γυναίκες με αποβολή εμβρύου με φυσιολογικό καρυότυπο συγκριτικά με τη συγκέντρωσή του στις γυναίκες με αποβολή εμβρύου παθολογικού καρυοτύπου.

Επίσης, μεταξύ εγκύων γυναικών με ιστορικό πρωτοπαθών και εκείνων με ιστορικό δευτεροπαθών επανειλημμένων αποβολών φαίνεται να υπάρχει διαφορά στα επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά τη διάρκεια της 6^{ης} με 9^{ης} εβδομάδας κύησης. Οι Piosik ZM et al.(2013) παρατήρησαν υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση των δευτεροπαθών επανειλημμένων αποβολών σε σύγκριση με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό εγκύων με ιστορικό πρωτοπαθών καθ'έξιν αποβολών, ανεξάρτητα από την έκβαση της κύησης, γεγονός το οποίο ίσως εν μέρει να καθορίζεται γενετικά.

Είναι αξιοσημείωτο ότι σύμφωνα με τις έως σήμερα μελέτες, αυξημένα επίπεδα του TNF-α φαίνεται να εμπλέκονται και σε άλλες επιπλοκές της κύησης, εκτός από τις αποβολές, όπως είναι η πρόωμη ρήξη εμβρυικών υμένων, ο πρόωρος τοκετός (Romero R et al.1989), η προεκλαμψία, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η καθυστερημένη ενδομήτρια εμβρυική ανάπτυξη IUGR - Intrauterine Growth Restriction (Daher S et al.1999, Piosik ZM et al.2013, Azizieh FY et al.2015).

9.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου TNF-α και Επανελημμένες Αυτόματες Αποβολές (ΕΑΑ)

Αναφορικά με το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α, αυτό χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6p21.3, στη περιοχή αντιγόνων των ανθρώπινων λευκοκυττάρων HLA τάξης III. (Stonek F et al.2007, Bazzoni F et al.1996, Liu C et al.2010, Bo EL et al. 2012).

Πρόκειται για ένα γονίδιο που παρουσιάζει υψηλό πολυμορφισμό. Ο όρος πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου SNP (Single Nucleotide Polymorphism) αναφέρεται σε μία παραλλαγή σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA η οποία συμβαίνει όταν ένα νουκλεοτίδιο- που περιέχει μία από τις βάσεις: αδερίνη Α, θυμίνη Τ, γουανίνη G ή κυτοσίνη C- διαφέρει μεταξύ των ατόμων αναφερόμενοι στο ανθρώπινο είδος ή διαφέρει σε δύο ομόλογα χρωμοσώματα.

Ειδικότερα, ένας γενετικός πολυμορφισμός SNP προκαλείται συνήθως από αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο, σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Το αποτέλεσμα των πολυμορφισμών μεταξύ των ατόμων σε ένα γονιδιακό τόπο είναι να προκύπτουν διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την φαινοτυπική ποικιλομορφία στο ανθρώπινο είδος (Hodgkinson A, Eyre-Walker A.2009). Σχετικά με τις καθ'έξιν αποβολές, έχουν μελετηθεί επτά πολυμορφισμοί του εκκινητή του γονιδίου του TNF-α σε γυναίκες με επανελημμένες αυτόματες αποβολές (Finan RR et al.2010, Daher S et al.2012).

κεφάλαιο 10

Σκοπός της εργασίας

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφοροι παράγοντες ως εμπλεκόμενοι στην παθογένεση των ανεξήγητων επανειλημμένων αυτόματων αποβολών (Unexplained Recurrent Spontaneous Miscarriage, URSM).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση των επιπέδων στον ορό του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF- α , κυτοκίνης που εμπλέκεται κυρίως στην Th1 ανοσιακή απάντηση της μητέρας στο έμβρυο, σε μη έγκυες γυναίκες με ιστορικό επανειλημμένων αυτόματων αποβολών (EAA), η σύγκρισή τους με εκείνα μη εγκύων, υγιών γυναικών καθώς επίσης η συσχέτιση των επιπέδων αυτών με την παρουσία του πολυμορφισμού -238 G/A του TNF- α γονιδίου. Συγκεκριμένα, ο ποσοτικός προσδιορισμός του TNF- α στον ορό πραγματοποιήθηκε σε 90 μη έγκυες γυναίκες με ιστορικό EAA (αριθμός EAA ≥ 2) και σε 95 μη έγκυες γόνιμες γυναίκες του ελληνικού χώρου (καυκάσια φυλή). Μεταξύ των γυναικών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, είχαμε στοιχεία για την παρουσία ή όχι του προαναφερόμενου πολυμορφισμού για τις 47 γυναίκες από την ομάδα μελέτης και για τις 85 γυναίκες από την ομάδα ελέγχου.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της συγκεκριμένης κυτοκίνης στον ορό γυναικών με ιστορικό EAA είναι δυνατό να οδηγήσει στη δημιουργία νέων πρωτοκόλλων διάγνωσης των EAA με την εισαγωγή εξετάσεων του TNF- α σε συγκεκριμένες ομάδες γυναικών με EAA άγνωστης αιτιολογίας. Επίσης, η συσχέτιση του TNF- α στον ορό αίματος με πολυμορφισμούς του TNF- α γονιδίου και τον κίνδυνο εμφάνισης EAA μπορεί να επιτρέψει στην εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων καθώς και την ορθή επιλογή των γυναικών με EAA που θα μπορούσαν να ευεργετηθούν από στοχευμένες θεραπείες.

II. ΕΙΔΙΚΟ μέρος

11.1. Δείγματα - Δημογραφικά στοιχεία

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλαμβάνονται 90 γυναίκες Καυκάσιας φυλής, Ευρωπαϊκής καταγωγής με ιστορικό επανειλημμένων αυτόματων αποβολών - μέση τιμή ηλικίας (Mean) $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής SEM (Standard Error Mean): 33,56 έτη $\pm$ 0,47, μέση τιμή BMI $\pm$ SEM: 24,99 kg/m² $\pm$ 0,53, μέση τιμή αριθμού αποβολών $\pm$ τυπική απόκλιση SEM (Standard Error Mean): 2,29 $\pm$ 0,145 - και 95 γόνιμες γυναίκες (μέση τιμή ηλικίας $\pm$ SEM: 43,71 έτη $\pm$ 1,55, μέση τιμή BMI $\pm$ SEM: 25,25 kg/m² $\pm$ 0,45, μέση τιμή αριθμού τοκετών $\pm$ SEM: 2,42 $\pm$ 0,126.

Στα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα των γυναικών που λάβαμε υπόψη κατά τη μελέτη περιλαμβάνονται επίσης τα παρακάτω χαρακτηριστικά: κάπνισμα, άθροισμα διαδοχικών αποβολών α' τριμήνου, β' τριμήνου και βιοχημικών κυήσεων, άθροισμα διαδοχικών αποβολών α' τριμήνου και βιοχημικών κυήσεων, άθροισμα διαδοχικών αποβολών α' τριμήνου, σύνολο μη διαδοχικών αποβολών α' τριμήνου, παρουσία καρδιακής λειτουργίας σε τουλάχιστον μία κύηση που κατέληξε σε αυτόματη αποβολή, σύνολο μη διαδοχικών αποβολών β' τριμήνου, βιοχημικές κυήσεις, αριθμός σπερματεγχύσεων IUI, κύκλων ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίου ICSI, αριθμός κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης IVF, αριθμός γέννησης ζώντων εμβρύων (Parity), αριθμός φυσιολογικών τοκετών και καισαρικών τομών, σύνολο τεχνητών εκτρώσεων, έκτοπες κυήσεις, μύλη κύηση. Επιπλέον, συμπεριλάβαμε την παρουσία του πολυμορφισμού TNF- α -238G/A στα χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη παρούσα μελέτη (Πίνακας 11-1).

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς (n=90)	Μάρτυρες (n=95)
Φυλή Καυκάσια		
Εθνικότητα	Ελλάδα(90)	Ελλάδα(72) Αλβανία(16), Γεωργία(2), Ρουμανία(1), Ουκρανία(1), Ολλανδία(1), Πολωνία(2)
Ηλικία (μέση τιμή)	33,56	43,71
BMI (μέση τιμή)	24,99	25,55
Κάπνισμα (# γυναικών)	24	16
Τόκος (# γυναικών)	16	όλες
Φυσιολογικός Τοκετός (# γυναικών)	7	90
Καισαρικές Τομές (# γυναικών)	9	14
Τεχνητή Έκτρωση (# γυναικών)	7	3
Έκτοπη Κύηση (# γυναικών)	8	0
Μύλη Κύηση (# γυναικών)	0	0
Άθροισμα διαδ/κών αποβολών α', β' τριμήνου κ βιοχημικών κυήσεων (μέση τιμή)		0
Άθροισμα διαδ/κών αποβολών α' τριμήνου και βιοχημικών κυήσεων (μέση τιμή)		0
Άθροισμα διαδ/κών αποβολών α' τριμήνου (μέση τιμή)		0
Αποβολές α' τριμήνου (# γυναικών)	όλες	0
Αποβολές β' τριμήνου (# γυναικών)	5	0
Καρδιακή λειτ/γία σε τουλ/στον μία κύηση που κατέληξε σε αποβολή (# γυναικών)	48	0
Βιοχημικές κυήσεις (# γυναικών)	26	0
IUI (# γυναικών)	4	0
IVF (# γυναικών)	11	0
ICSI (# γυναικών)	1	0
-238G/A TNF-α (ναι)	4	3

Πίνακας 11-1: Δημογραφικά-κλινικά-εργαστηριακά δεδομένα ασθενών – μαρτύρων.

Αναφορικά τόσο με την ομάδα μελέτης όσο και με την ομάδα ελέγχου, οι γυναίκες δεν ήταν έγκυες κατά τη λήψη των δειγμάτων περιφερικού αίματος προκειμένου να διεξαχθεί η μελέτη.

Οι ασθενείς αντιπροσωπεύουν γυναίκες με ιστορικό τουλάχιστον δύο διαδοχικών αυτόματων αποβολών πριν τις 20 εβδομάδες κύησης, οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα των Επανειλημμένων Αποβολών της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα». Η διάγνωση των ασθενών με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές τέθηκε μέσω του ιστορικού, μετρήσεων των επιπέδων της β-χοριακής γοναδοτροπίνης β-hCG στον ορό των γυναικών, υπερηχογραφικής εξέτασης ή/και φυσικής εξέτασης.

Από την ομάδα μελέτης (study group) εξαιρέθηκαν οι ασθενείς με επανειλημμένες αποβολές λόγω ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας, ορμονικών διαταραχών, χρωμοσωμικών ανωμαλιών, λομώξεων, αυτοάνοσων νοσημάτων και θρομβωτικών αιτιών. Για τη εξαίρεση των προαναφερθέντων αιτιών επανειλημμένων αποβολών χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξετάσεις: υστεροσκόπηση ή υστεροσαλπιγγογραφία, διακολπικό υπερηχογράφημα, καρυοτυπικός έλεγχος γονέων, ορμονικές εξετάσεις (TSH, PRL, Glu νηστείας), εξετάσεις για λοιμώξεις (τοξόπλασμα, κυτταρομεγαλοϊός, ιός ερυθράς, ιός ηπατίτιδας B, ιός ηπατίτιδας C, ιός HIV), εξετάσεις για αυτοαντισώματα όπως το αντιπηκτικό του λύκου LA και τα αντικαρδιολιπιδικά αντισώματα. Για τη διερεύνηση θρομβοφιλίας ως αίτιο καθ'έξιν αποβολών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται στο Τμήμα των Επανειλημμένων Αποβολών του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», ελέγχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: μετάλλαξη των γονιδίων για τον παράγοντα V Leiden, την

προθρομβίνη ή παράγοντα II, την αναγωγή του τετραϋδροφυλλικού μεθυλενίου MTHFR καθώς επίσης η δραστικότητα στο αίμα του παράγοντα XII ή Hagemann.

Η ομάδα ελέγχου (control group) αποτελείται από υγιείς, γόνιμες γυναίκες που είναι εγγεγραμμένες στα μητρώα του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» και πληρούν τα παρακάτω κριτήρια: τακτική έμμηνος ρύση, ιστορικό τουλάχιστον μίας ολοκληρωμένης εγκυμοσύνης μετά από φυσική σύλληψη και με έκβαση τη γέννηση ζώντος εμβρύου, χωρίς να περιλαμβάνεται καμία απώλεια κύησης στο ατομικό τους μαιευτικό αναμνηστικό.

Συλλέχθηκαν 10ml περιφερικού αίματος από κάθε γυναίκα που συμμετείχε στην παρούσα μελέτη. Τα δείγματα περιφερικού αίματος τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλαστικά σωληνάρια που δεν περιείχαν αντιπηκτικό. Προκειμένου να λάβουμε τον ορό, τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 3.000 στροφές για 15 min. Εν συνεχεία, τα δείγματα ορού φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι να αναλυθούν για τη μέτρηση του TNF- α . Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα».

Η παρούσα ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση όλων των συμμετεχόντων ασθενών καθώς και έγκρισής της από την Επιτροπή Ερευνητικής Δεοντολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σύμφωνα με τις αρχές ηθικής και δεοντολογίας που περιέχονται στη Συνθήκη του Ελσίνκι (Declaration of Helsinki).

11.2. Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική μέθοδος ELISA

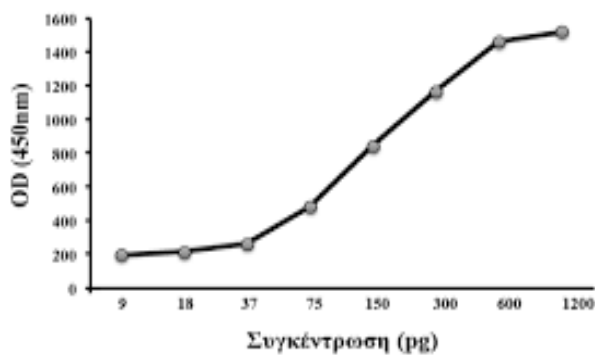
11.2.1. Αρχή της μεθόδου ELISA

Ο όρος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) αναφέρεται σε βιοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται κυρίως στη Διαγνωστική Βιολογία και την Ανοσολογία

για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η ονομασία ELISA συνοψίζει μόνο την αρχική μορφή της μεθόδου. Πρακτικά, η ELISA δεν αναφέρεται σε μία συγκεκριμένη τεχνική, καθώς υπάρχει μία ποικιλία τεχνικών που χαρακτηρίζονται με αυτό το όνομα, αλλά στην αρχή που βασίζονται όλες αυτές οι τεχνικές (Crowther JR.2008).

Οι τεχνικές ELISA περιλαμβάνονται στην ευρύτερη κατηγορία των ενζυμο-ανοσο-προσδιοριστικών μεθόδων EIA (Enzyme ImmunoAssays) και συγκεκριμένα ανήκουν στις ετερογενείς EIA με διατήρηση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά την ανοσοχημική αντίδραση.

Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν είτε για ποιοτική είτε για ποσοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλώς ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας OD (Optical Density) του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα. Στην πρότυπη καμπύλη, στον άξονα y αναπαρίστανται οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στον άξονα x η συγκέντρωσή τους. Ενώνοντας τα σημεία προκύπτει η πρότυπη καμπύλη. Από την τιμή απορρόφησης του κάθε δείγματος που λαμβάνουμε στο τέλος της ELISA, μέσω της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος (Moatsou G, Anifantakis E.2003, Crowther JR.2008) (Εικ.11-1).

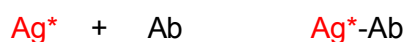


Εικ.11-1: Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος (bat.uoi.gr)

Ειδικότερα, η ELISA βασίζεται στη δέσμευση αντιγόνου Ag από ειδικό αντίσωμα Ab. Αρχή της μεθόδου είναι ότι το αντιγόνο και το αντίσωμα συνδέονται μεταξύ τους με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο, σχηματίζοντας ένα ειδικό σύμπλοκο το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια που περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα (Schuurs AHWM, van Weemen BK.1980). Η αντίδραση ακολουθεί το νόμο της δράσης των μαζών:



Μία ανάλογη ισορροπία αποκαθίσταται και μεταξύ ενός επισημασμένου Ag^* και αντισώματος Ab:



+

Ag

Ag-Ab

Στην ELISA η επισημάνση πραγματοποιείται με τη σύνδεση ενός ενζύμου στο προς ιχνηθέτηση-ανίχνευση αντιγόνο ή αντίσωμα. Τα αντισώματα είναι δυνατό να είναι

μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά (Asensio et al.2008). Συχνά ως αντίσωμα δέσμευσης του αντιγόνου (capture antibody) χρησιμοποιείται ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ώστε να προσδεθεί όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα αντιγόνου σε αυτό. Ο προσδιορισμός του ομοιοπολικά συνδεδεμένου ενζύμου με το αντίσωμα ή το αντιγόνο απαιτεί την προσθήκη υποστρώματος και τη μέτρηση μίας καταλυτικής αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος. Ειδικότερα, το ιδανικό υπόστρωμα του ενζύμου πρέπει να είναι σταθερό, ασφαλές και οικονομικό. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στην ELISA είναι τα παρακάτω: το υπόστρωμα ABTS (3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid), το OPD (ortho-pnenyl-diamine) και το TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine base). Μία σχετικά μικρή ενζύμου είναι δυνατό σε σύντομο χρονικό διάστημα να προκαλέσει τη μετατροπή μεγάλης ποσότητας υποστρώματος σε συγκεκριμένο προϊόν διάσπασης, το οποίο είναι διαλυτό και παράγει χρωμογόνο ή φθορίζον σήμα (Lequin R.2005).

Η παραγωγή του έγχρωμου σήματος τερματίζεται με την προσθήκη συγκεκριμένου αντιδραστηρίου (stop solution) που συνήθως είναι οξύ. Εν συνεχεία μετράται η απορρόφηση του χρωμογόνου προϊόντος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος του ορατού φάσματος, με τη βοήθεια ειδικού φασματοφωτόμετρου τύπου ELISA (Εικ.11-3). Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση των προϊόντων διάσπασης των προαναφερθέντων υποστρωμάτων ABTS, OPD και TMB μετράται στα 405nm, 490nm και 450nm αντίστοιχα. Κατ'αυτόν τον τρόπο, η ποσότητα του εξεταζόμενου αντιγόνου μετράται εκτιμώντας την ποσότητα του έγχρωμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας OD (Optical Density). Η απορρόφηση του φωτός είναι ανάλογη της τελικής συγκέντρωσης του έγχρωμου προϊόντος διάσπασης του υποστρώματος και ανάλογη ή αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα του προς εξέταση αντιγόνου (Moatsou G, Anifantakis E. 2003, Crowther JR. 2008).



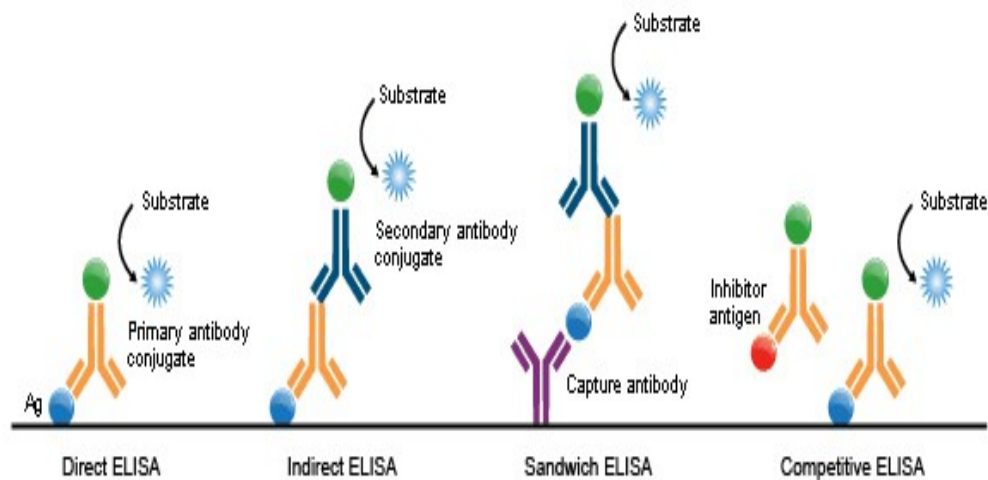
Εικ.11-2: Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (molecular devices.com)

Εν γένει, τα στάδια που ακολουθούνται στις τεχνικές ELISA είναι τα ακόλουθα (Crowther JR.2008):

- 1). Απορρόφηση αντιγόνου ή αντισώματος σε πλαστική επιφάνεια στερεάς φάσης
- 2). Προσθήκη των προς εξέταση δειγμάτων και άλλων αντιδραστηρίων
- 3). Επώαση όλων των αντιδραστηρίων
- 4). Διαχωρισμός των προσδεσμένων από τα ελεύθερα αντιδραστήρια μέσω πλύσεων με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα
- 5). Προσθήκη του αντισώματος που είναι συζευγμένο με ένζυμο
- 6). Προσθήκη συστήματος ανίχνευσης του ενζύμου (υπόστρωμα)
- 7). Ανάγνωση του οπτικοποιημένου αποτελέσματος της δοκιμασίας

11.2.2. Είδη τεχνικών ELISA

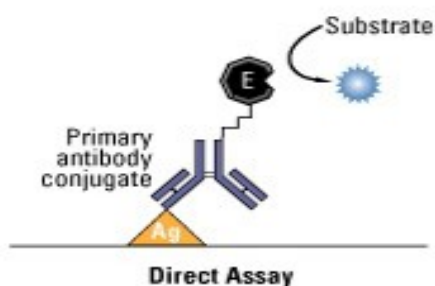
Οι κυριότερες μέθοδοι ELISA είναι τρεις: (α). η άμεση (direct), (β). η έμμεση (indirect), (γ). η sandwich. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι αποτελούν τη βάση μίας κατηγορίας δοκιμασιών που λέγονται συναγωνιστικές ή ανασταλτικές τεχνικές ELISA (competitive or inhibition or blocking) (Crowther JR.2008) (Εικ.11-3).



Εικ.11-3: Τεχνικές ELISA. (direct=άμεση, indirect=έμμεση, competitive=συναγωνιστική, primary antibody conjugate=συζευγμένο πρωτογενές αντίσωμα, substrate=υπόστρωμα, secondary antibody conjugate= συζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα, Ag=αντίγονο, capture antibody=αντίσωμα δέσμευσης, E=ένζυμο, inhibitor antigen=αντιγόνο αναστολέας). (abnova.com).

A. Άμεση (Direct ELISA)

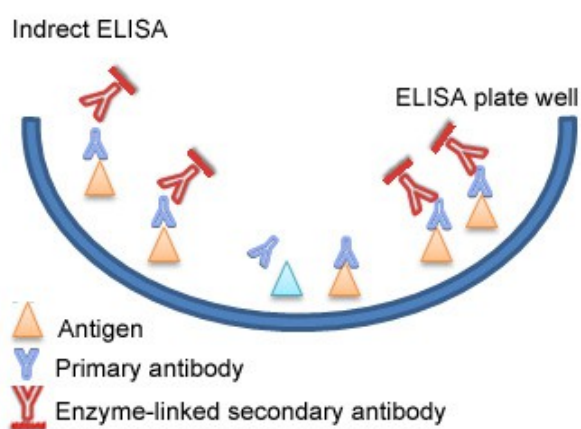
Η άμεση τεχνική ELISA αποτελεί τη πιο απλή μορφή της μεθόδου. Το αντιγόνο ή το αντίσωμα έρχεται σε επαφή με μία στερεά φάση και αντιδρά άμεσα με ένα αντίσωμα ή αντιγόνο αντίστοιχα, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο (Moatsou G, Anifantakis E. 2003, Lequin R.2005) (Εικ.11-4).



Εικ.11-4: Άμεση τεχνική ELISA (Ag=αντιγόνο, E=ένζυμο, primary antibody conjugate=πρωτογενές αντίσωμα δέσμευσης, substrate=υπόστρωμα). (thermofisher.com)

Β. Έμμεση (Indirect ELISA)

Στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιούνται διαδοχικά δύο αντισώματα. Το αντιγόνο Ag είναι συνδεδεμένο στη στερεά και το πρωτογενές αντίσωμα Ab συνδέεται με αυτό. Το συνδεδεμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα Ab* δρώντας ως αντι-αντίσωμα συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα Ab δημιουργώντας το τελικό σύμπλοκο Ag-Ab-Ab* (Crowther JR.2008) (Εικ.11-5).



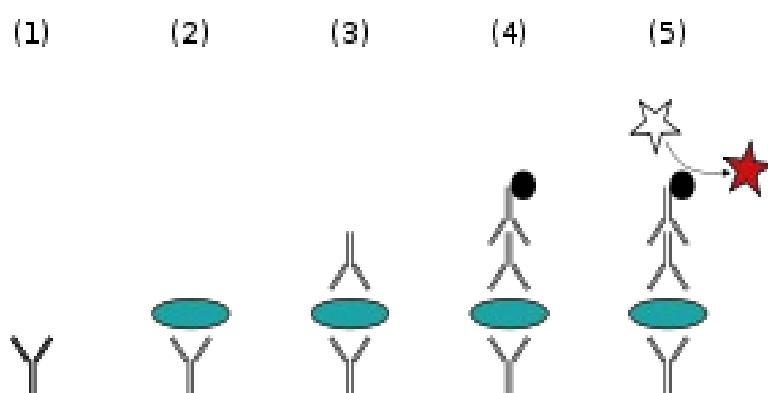
Εικ.11-5: Έμμεση τεχνική ELISA (antigen=αντιγόνο, primary antibody=πρωτογενές αντίσωμα, enzyme-linked secondary antibody=συνδεδεμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα, plate well=βοθρίο μικροπλάκας). (elisa-antibody.com)

Γ. Sandwich ELISA

Πρόκειται για την πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ELISA κατά την οποία το αντιγόνο συνδέεται με δύο αντισώματα: το αντίσωμα δέσμευσης (capture antibody) και το αντίσωμα ανίχνευσης (detection antibody) (Lequin R.2005). Το αντίσωμα δέσμευσης ή πρωτογενές αντίσωμα Ab συνδέεται με το αντιγόνο Ag και δημιουργείται σύμπλοκο Ag-Ab, ενώ στη συνέχεια το αντίσωμα ανίχνευσης Ab* συνδέεται με το Ag συμπληρώνοντας έτσι το τελικό σύμπλοκο Ab-Ag-Ab* (Εικ.11-6).

Τα δύο αντισώματα συνδέονται με επιτόπους του αντιγόνου που δεν αλληλοεπικαλύπτονται, καθώς μπορεί να είναι δύο μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές ή μία καθαρή σειρά πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Η τεχνική sandwich ELISA διακρίνεται σε δύο επιμέρους μορφές: (α). την άμεση και (β). την έμμεση. Στην άμεση sandwich ELISA το αντίσωμα ανίχνευσης είναι συζευγμένο με ένζυμο, ενώ στην έμμεση μορφή ένα τρίτο αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένζυμο και συνδέεται με το αντίσωμα ανίχνευσης (Chu FS.2003).



Εικ.11-6: Μέθοδος sandwich ELISA (έμμεση). **(1).** Επικάλυψη πλάκας με αντίσωμα δέσμευσης, **(2).** Προσθήκη δείγματος, κάθε αντιγόνο του δείγματος συνδέεται με αντίσωμα δέσμευσης, **(3).** Προσθήκη αντισώματος ανίχνευσης και σύνδεση στο αντιγόνο, **(4).** Προσθήκη τρίτου αντισώματος, συνδεδεμένου με ένζυμο, και σύνδεσή του με το αντίσωμα ανίχνευσης, **(5).** Προσθήκη υποστρώματος και τροποποίησή του, από το ένζυμο, σε ανιχνεύσιμη μορφή. (elisa-antibody.com)

Η ευαισθησία της τεχνικής sandwich ELISA εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες: (α). τον αριθμό των μορίων του αντισώματος δέσμευσης (πρωτογενές αντισωμα) που προσδένονται στη στερεή επιφάνεια, (β). τη συγγένεια του αντισώματος δέσμευσης με το αντιγόνο, (γ). τη συγγένεια του αντισώματος ανίχνευσης (δευτερογενές αντίσωμα) με το αντιγόνο, (δ). την ειδική αντίδραση του ενζύμου- που είναι συνδεδεμένο με το δευτερογενές ή το τρίτο αντίσωμα- με το υπόστρωμα (Crowther JR.2008, Lequin R.2005, Chu FS.2003).

Δ. Συναγωνιστικές ή Ανασταλτικές (competitive or inhibition ELISAs)

Μία συναγωνιστική τεχνική ELISA μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση, αντιγόνου ή αντισώματος. Δύο αντιδρώντα (αντιγόνα ή αντισώματα) ανταγωνίζονται τη σύνδεσή τους με ένα τρίτο, με ταυτόχρονη προσθήκη των δύο ανταγωνιστών.

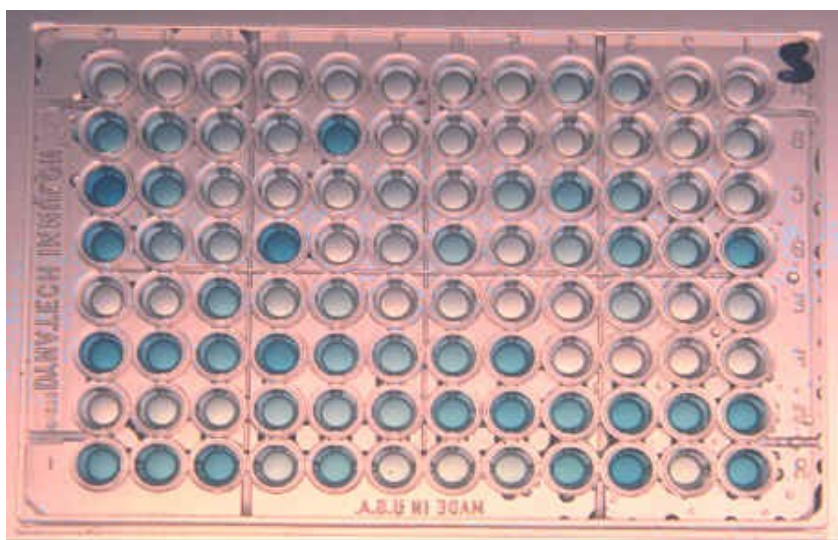
Οι συγκεκριμένες τεχνικές ELISA, όπως προαναφέρθηκε, βασίζονται στις κύριες μεθόδους ELISA που είναι η άμεση, η έμμεση και η sandwich. Πρόκειται για δοκιμασίες στις οποίες η ποσοτικοποίηση μίας ουσίας επιτυγχάνεται μέσω της ικανότητάς της να παρεμβαίνει σε ένα καθορισμένο προτιτλοποιημένο σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά της άμεσης, της έμμεσης ή της sandwich ELISA (Crowther JR.2008, Asensio L et al.2008, Lequin R.2005).

11.3. Πρωτόκολλο ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων του TNF-α στον ορό

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α στα δείγματα ορού πραγματοποιήθηκε εις διπλούν, μέσω μίας συμβατικής ανοσοενζυμικής δοκιμασίας τεχνικής ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Για τη μέτρηση του TNF-α χρησιμοποιήθηκαν μικροπλάκες TNF-α ELISA Kits CSB-E0470h της εταιρίας Cusabio, οι οποίες είναι σχεδιασμένες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της συγκεκριμένης κυτταροκίνης στον ορό χρησιμοποιώντας την τεχνική sandwich ELISA.

Ειδικότερα, κάθε μικροπλάκα ή πλάκα μικροτιτλοδότησης (kit) αποτελείται από 96 βοθρία-υποδοχές (8 βοθρία / σειρά, 12 σειρές) και επικαλύπτεται με αντίσωμα δέσμευσης (capture antibody) ειδικό για τον TNF-α (Εικ.11-7). Τα προς εξέταση δείγματα και οι μάρτυρες τοποθετούνται στις υποδοχές των μικροπλακών οπότε ο TNF-α που περιέχεται στα δείγματα και τους μάρτυρες δεσμεύεται από το καθηλωμένο αντίσωμα (capture antibody). Μετά από απομάκρυνση κάθε ουσίας που δε δεσμεύτηκε από το καθηλωμένο αντίσωμα, προστίθεται στα βοθρία αντίσωμα συζευγμένο με βιοτίνη, ειδικό για την ανίχνευση του TNF (detection antibody). Μετά

από έκπλυση με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετείται ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με το ένζυμο αβιδίνη (HRP-avidin). Ακολουθεί έκπλυση για απομάκρυνση κάθε ελεύθερου HRP-avidin αντισώματος και προσθήκη υποστρώματος (TNB), οπότε σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος τερματισμού (stop solution) και η οπτική πυκνότητα OD (Optical Density) μετράται στα 450 nm. Η οπτική πυκνότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του TNF-α στο κάθε δείγμα.

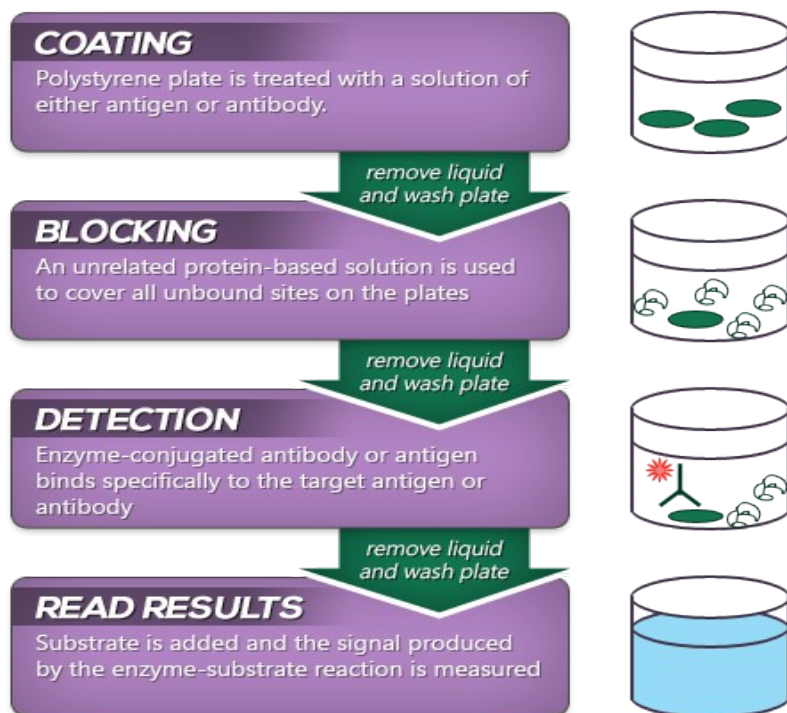


Εικ.11-7: Πλάκα μικροπιτλοδότησης (kit) για ποσοτικό προσδιορισμό του TNF-α με τη μέθοδο ELISA (www.rasayanika.com).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για τη μέτρηση του TNF-α αποτελείται από τα παρακάτω στάδια (Εικ.11-8):

1. Προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων, μαρτύρων και δειγμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας των ELISA kits που χρησιμοποιήσαμε.
2. Προσθήκη 100μl πρότυπου μάρτυρα ή αραιωμένου δείγματος ανά βοθρίο της μικροπλάκας. Κάλυψη με ειδική αυτοκόλλητη ταινία. Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.
3. Απομάκρυνση του υγρού από κάθε βοθρίο, χωρίς πλύση.
4. Προσθήκη 100μl του **Biotin-antibody (1x)** σε κάθε βοθρίο και κάλυψη με νέα αυτοκόλλητη ταινία. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C.

5. Αναρρόφηση και πλύση του περιεχομένου κάθε βοθρίου και επανάληψη της διαδικασίας 2 φορές με σύνολο 3 πλύσεων κάθε φορά. Η πλύση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε κάθε βοθρίο ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (Wash Buffer 200μl), με τη χρήση πιπέτας πολλαπλών καναλιών, το οποίο αφήσαμε να δράσει για 2min. Μετά από την τελευταία πλύση, απομακρύνουμε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που απέμεινε μέσω αναρρόφησης. Εν συνεχεία, αναποδογυρίσαμε τις μικροπλάκες και τις στεγνώσαμε σε καθαρό χαρτί.
6. Προσθήκη 100μl **HRP-avidin (1x)** σε κάθε βοθρίο και κάλυψη της μικροπλάκας με νέα αυτοκόλλητη ταινία. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
7. Επανάληψη της διαδικασίας αναρρόφησης-πλύσης 5 φορές όπως στο στάδιο 4.
8. Προσθήκη 90μl **TMB Υπόστρωμα** σε κάθε βοθρίο. Επώαση για 15-30min στους 37°C. Προστασία από το φως.
9. Προσθήκη 50μl διαλύματος τερματισμού (**Stop Solution**) σε κάθε βοθρίο. Εν συνεχεία χτυπήσαμε απαλά την μικροπλάκα προκειμένου να εξασφαλίσουμε πλήρη ανάμιξη των αντιδραστηρίων.
10. Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας του περιεχομένου κάθε βοθρίου εντός 5min μέσω φασματοφωτόμετρου στα 450nm και στα 540nm. Εν συνεχεία, αφαιρέσαμε τα αποτελέσματα στα 540nm από τα αποτελέσματα στα 450nm, ώστε να διορθώσουμε ενδεχόμενα σφάλματα σχετικά με τις οπτικές πυκνότητες.



Εικ.11-8: Στάδια μέτρησης του TNF-α στον ορό αίματος, με μία τεχνική ELISA. (bosterbio.com)

11.4. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης «Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)», version 17. Ως κριτήριο στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το όριο του 5% ($p\text{-value} < 0.05$).

Στο σύνολο των μεταβλητών εκτιμήθηκαν αντίστοιχα μέτρα θέσης και μέτρα διασποράς των τιμών. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση (Std.Deviation) και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Std. Error Mean).

Ο έλεγχος ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ της ομάδας μελέτης (cases: γυναίκες με ιστορικό ΕΑΑ) και της ομάδας ελέγχου (controls: γυναίκες γόνιμες) ως προς τις επιμέρους ποσοτικές μεταβλητές (επίπεδα TNF-α και δημογραφικά- κλινικά δεδομένα

όπως ηλικία, BMI) έγινε με το παραμετρικό τεστ σύγκρισης μέσων τιμών δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (two samples independent T-test). Επίσης, ο έλεγχος της συσχέτισης μεταξύ των δύο ομάδων (cases-controls) και της ποιοτικής μεταβλητής (κάπνισμα) έγινε μέσω του ακριβούς τεστ κατά Fisher (Fisher's exact test).

Παραπέρα, χρησιμοποιήθηκε ένα Γενικευμένο Γραμμικό μοντέλο (Generalised Linear Model GLM) με εξαρτημένη μεταβλητή τα επίπεδα TNF-α και ερμηνευτικές μεταβλητές αυτές της ηλικίας, του καπνίσματος, του group (cases-controls) και του BMI προκειμένου να διερευνηθεί η ενδεχόμενη επίδραση αυτών στα επίπεδα TNF-α.

Τέλος, προκειμένου να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες (cases-controls) με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού -238 G/A του TNF-α γονιδίου ως ποιοτικής μεταβλητής, πραγματοποιήθηκε το τεστ Mann-Whitney U (Mann-Whitney U test).

κεφάλαιο 12

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

12.1. Αποτελέσματα ELISA

Σύμφωνα με την τεχνική ELISA που εφαρμόσαμε, τα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών (ομάδα μελέτης) και γόνιμων γυναικών (ομάδα ελέγχου) περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11-1). Σύμφωνα με το εργαστήριο IVF του νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», όπου εκτελέστηκε το πειραματικό μέρος της μελέτης μας, ως κατώτερο και ανώτερο φυσιολογικό όριο της

συγκέντρωσης του TNF-α στον ορό θεωρούμε τα 0.3pg/ml και 8.1pg/ml αντίστοιχα.

TNF-α ≤ 8.1 pg/ml (normal)	TNF-α > 8.1 pg/ml	Στην παρούσα
-----------------------------------	-----------------------------	-----------------

μελέτη, τα επίπεδα του TNF-α όλων των δειγμάτων είχαν τιμή μεγαλύτερη του κατώτερου φυσιολογικού ορίου, ώστε να θεωρούμε φυσιολογικές τις συγκεντρώσεις του TNF-α που είναι μικρότερες ή ίσες με 8.1pg/ml (TNF-α ≤ 8.1pg/ml) και παθολογικές ή αυξημένες τις συγκεντρώσεις που είναι μεγαλύτερες από 8.1pg/ml (TNF-α > 8.1pg/ml).

Πίνακας 12-1: Συγκέντρωση του TNF-α ορού με βάση τα αποτελέσματα της ELISA.

A/A study group	TNF-α (pg/ml)	A/A control group	TNF-α (pg/ml)	A/A study group	TNF-α (pg/ml)	A/A control group	TNF-α (pg/ml)
10	2.8	2	6.1	1	8.8	13	9.8
33	5.4	3	4.6	5	66.2	16	9.8
37	3.7	4	8.1	9	34.7	21	9.6
44	3.9	5	5.8	23	8.5	22	14.6
45	3.8	6	3.9	26	10.9	33	9.5
46	3.7	7	5.4	28	8.2	38	19.8
49	3.8	8	3.9	64	9.8	43	9.0
53	4.2	9	7.0	66	9.4	49	9.6
54	3.8	10	6.0	70	8.7	51	8.2
58	4.1	11	5.4	72	8.6	59	8.2
60	5.8	12	5.0	87	8.2	60	8.7
61	6.7	14	5.5	91	8.9	61	9.4

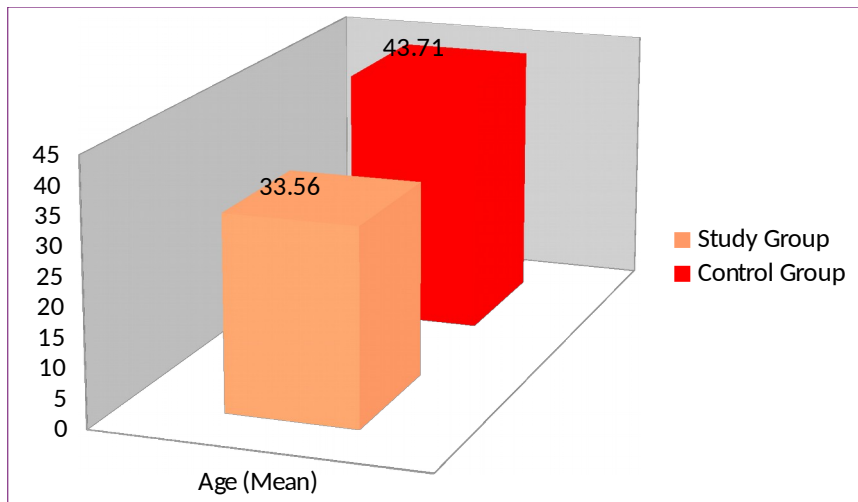
62	4.0	15	7.9	92	8.2	62	14.0
63	3.7	17	5.2	99	8.5	67	9.1
65	3.3	18	7.1	100	8.3	71	8.3
67	4.2	19	6.0	117	13.8	72	8.5
68	4.7	20	5.9	120	13.9	75	9.5
69	5.5	23	5.4	121	12.6	76	10.0
76	6.2	24	3.3	126	13.5	77	9.8
77	3.3	25	7.4	134	11.6	78	27.8
78	4.6	26	4.8	150	13.2	81	10.7
80	4.9	27	5.5	226	8.8	82	8.3
82	3.9	28	6.3			83	8.3
83	4.2	30	4.7			85	8.4
90	3.6	31	3.6			86	14.2
93	7.9	32	7.8			89	19.9
95	7.8	34	6.8			90	10.9
96	5.65	35	4.6			91	18.7
98	4.0	36	7.8			92	10.1
113	4.6	37	5.8			95	24.5
114	3.0	39	4.7			96	17.5
118	3.0	40	4.0			98	12.6
119	5.8	41	5.4				
123	6.1	44	4.7				
128	5.9	45	7.8				
129	7.5	46	7.3				
130	5.4	47	3.6				
131	7.8	48	3.8				
133	6.7	50	6.4				
137	6.5	52	5.7				
139	6.3	53	6.1				
141	6.1	55	6.2				
143	4.1	56	5.1				
144	6.9	57	4.9				
151	5.4	58	4.2				
152	3.8	63	6.1				
153	4.2	64	5.6				
154	3.0	65	6.2				
159	4.0	66	6.6				
163	3.5	68	3.4				
164	3.4	69	6.0				
167	3.1	70	5.4				
218	2.9	73	5.5				
225	4.2	74	4.9				
228	5.9	79	5.1				
235	2.9	80	4.1				
242	7.8	84	4.1				
246	3.7	88	7.4				

248	3.9	93	6.3
250	3.1	94	6.9
252	5.7	97	6.9
253	5.7	99	4.1
255	5.1	100	4.7
266	7.1		
269	4.6		

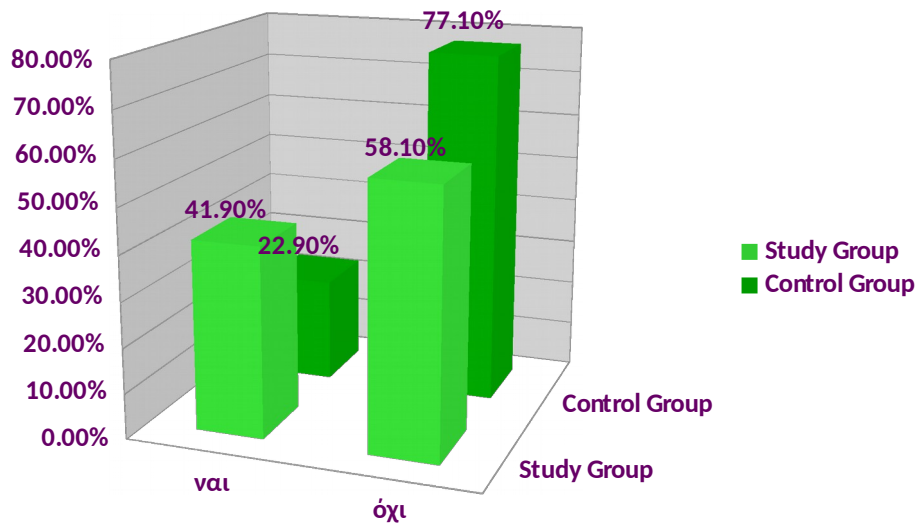
12.2. Αποτελέσματα σύγκρισης κλινικών-δημογραφικών δεδομένων στις δύο ομάδες

Αναφορικά με τα κλινικά δεδομένα των γυναικών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη όπως είναι το άθροισμα αποβολών, ο αριθμός φυσιολογικών τοκετών και καισαρικών τομών, οι κύκλοι IVF, υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p\text{-value} < 0.05$) μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου (cases-controls). Το συγκεκριμένο στατιστικό αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο εξ ορισμού των γυναικών που επιλέξαμε να αποτελέσουν τις δύο ομάδες (σχεδιασμός μελέτης). Επιπλέον, ένα τέτοιο αποτέλεσμα συνιστά τρόπο ελέγχου και επιβεβαίωσης της ποιότητας των δεδομένων και του σχεδιασμού της μελέτης.

Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε- μεταξύ των δύο ομάδων- σχετικά με την ηλικία και το κάπνισμα ώστε τα συγκεκριμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά να αποτελούν δυνητικούς συγχυτικούς παράγοντες (confounders). Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της ηλικίας στην ομάδα μελέτης είναι $\text{Mean} \pm \text{SEM}$: $33,56 \pm 0,471$, ενώ στην ομάδα ελέγχου είναι $\text{Mean} \pm \text{SEM}$: $43,71 \pm 1,555$ με $p\text{-value} = 0$ (Γράφημα 12-1). Αναφορικά με το κάπνισμα, το ποσοστό των καπνιστριών στην ομάδα μελέτης είναι 41,9%, ενώ το ποσοστό των γόνιμων-καπνιστριών είναι 22,9% με $p\text{-value} = 0,025$ (Γράφημα 12-2).



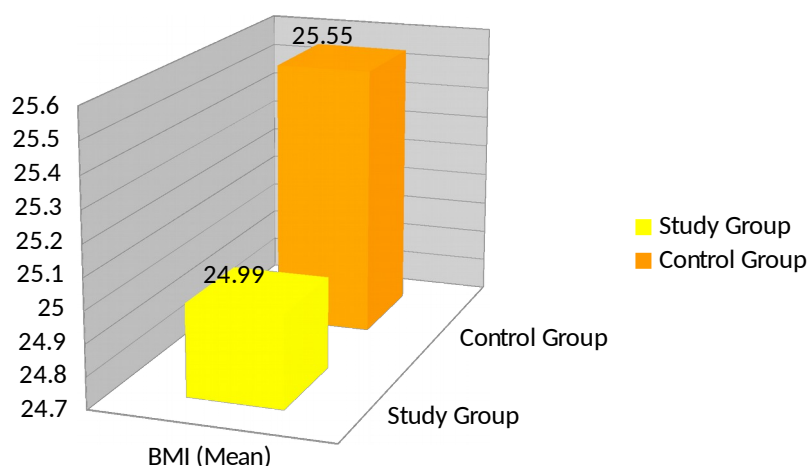
Γράφημα 12-1: Ραβδόγραμμα (bar chart) μέσων τιμών ηλικίας στις δύο ομάδες (γυναίκες με ΕΑΑ και γόνιμες γυναίκες).



Γράφημα 12-2: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων του καπνίσματος στις δύο ομάδες.

Αντίθετα, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο BMI των γυναικών στις δύο ομάδες ($p\text{-value}=0,424$). Ειδικότερα, η μέση τιμή του BMI στις γυναίκες με ΕΑΑ και στις γόνιμες γυναίκες είναι αντίστοιχα $\text{Mean} \pm \text{SEM}$: $24,99 \pm 0,53$ και $25,55 \pm 0,45$ (Γράφημα 12-3). Επομένως, οι δύο ομάδες ήταν ομοιογενείς ως προς τον Δείκτη

Μάζας Σώματος BMI ώστε αυτός να μην αποτελεί συγχυτικό παράγοντα κατά την στατιστικά ανάλυση των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες.



Γράφημα 12-3: Ραβδόγραμμα (bar chart) μέσων τιμών του BMI στις δύο ομάδες.

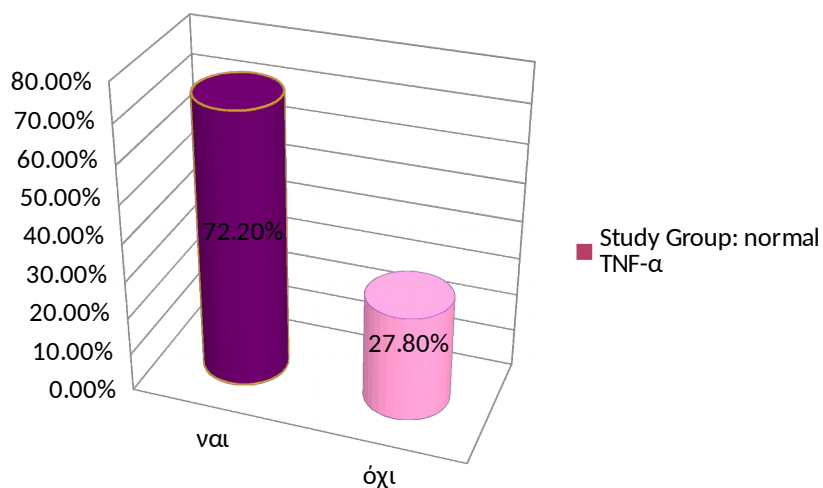
12.3. Αποτελέσματα επιπέδων του TNF-α στην ομάδα μελέτης (study group)

Η μικρότερη συγκέντρωση του TNF-α που μετρήθηκε στα δείγματα της ομάδας μελέτης είναι 2,8pg/ml ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι 66,2pg/ml. Η μέση τιμή των συγκεντρώσεων του TNF-α είναι Mean: 7,205 και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής είναι SEM: 0,7944 (Πίνακας 12-2).

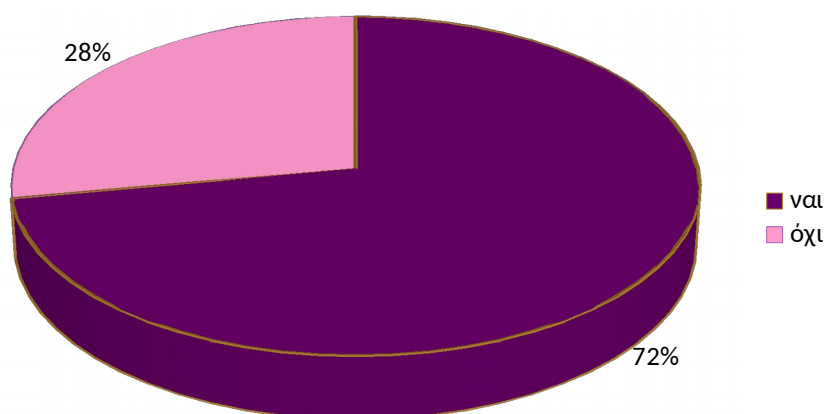
Study Group	Μικρότερη συγκέντρωση	Μεγαλύτερη συγκέντρωση	Μέση τιμή συγκεντρώσεων (Mean)	Τυπικό Σφάλμα Μέσης Τιμής (SEM)
TNF-α (pg/ml)	2,8	66,2	7,205	0,7944

Πίνακας 12-2: Επίπεδα TNF-α ορού στις γυναίκες με ιστορικό ΕΑΑ (ομάδα μελέτης).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των γυναικών της ομάδας μελέτης με φυσιολογικά επίπεδα του TNF-α στον ορό είναι 72,2% και το αντίστοιχο ποσοστό εκείνων με αυξημένη συγκέντρωση του TNF-α είναι 27,8% (Γραφήματα 12-4, 12-5).



Γράφημα 12-4: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων για τα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με ΕΑΑ (study group).



Γράφημα 12-5: Κυκλικό διάγραμμα (pie-chart) των επιπέδων του TNF-α στον ορό γυναικών με ΕΑΑ (study group).

12.4. Αποτελέσματα των επιπέδων του TNF-α στην ομάδα ελέγχου (control group)

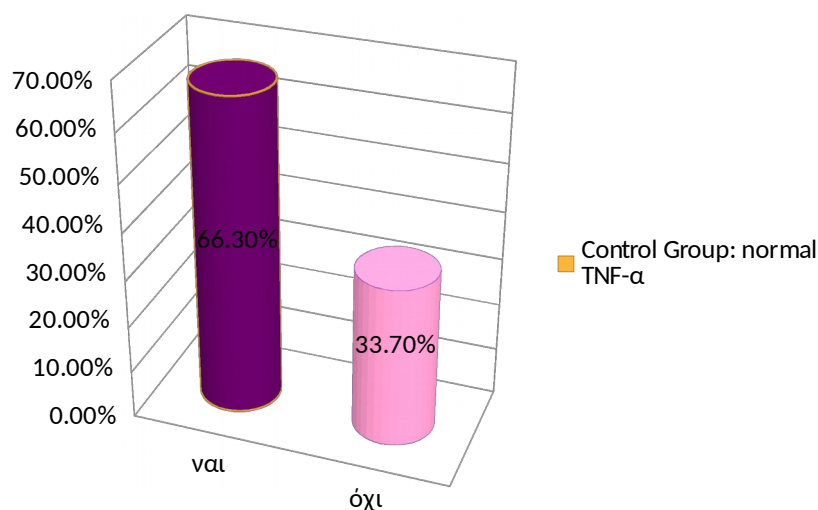
Η μικρότερη συγκέντρωση του TNF-α που μετρήθηκε στα δείγματα της ομάδας ελέγχου είναι 3.3pg/ml ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι 27.8pg/ml. Η μέση τιμή

των συγκεντρώσεων του TNF-α είναι Mean: 7,769 και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής είναι SEM: 0,4482 (Πίνακας 12-3).

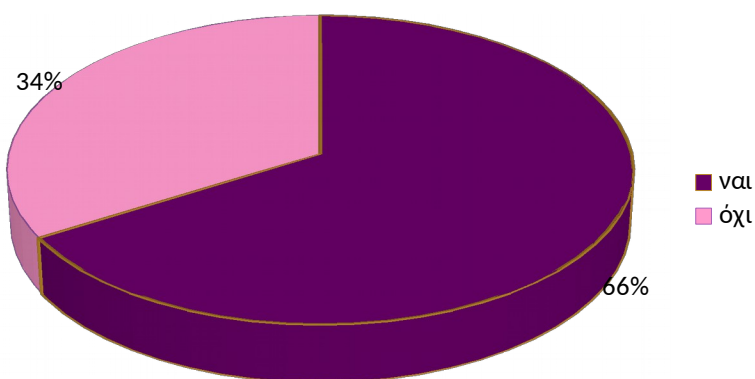
Control Group	Μικρότερη συγκέντρωση	Μεγαλύτερη συγκέντρωση	Μέση τιμή συγκεντρώσεων (Mean)	Τυπικό Σφάλμα Μέσης Τιμής (SEM)
TNF-α (pg/ml)	3.3	27.8	7,769	0,4482

Πίνακας 12-3: Επίπεδα TNF-α ορού στις γόνιμες γυναίκες (ομάδα ελέγχου).

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται σε ποσοστά, ο αριθμός των γυναικών της ομάδας ελέγχου με φυσιολογικά επίπεδα του TNF-α στον ορό (66.3%) και ο αντίστοιχος αριθμός εκείνων με αυξημένες τιμές (33.7%) (Γραφήματα 12-6, 12-7).



Γράφημα 12-6: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων για τα επίπεδα του TNF-α στον ορό γόνιμων γυναικών.



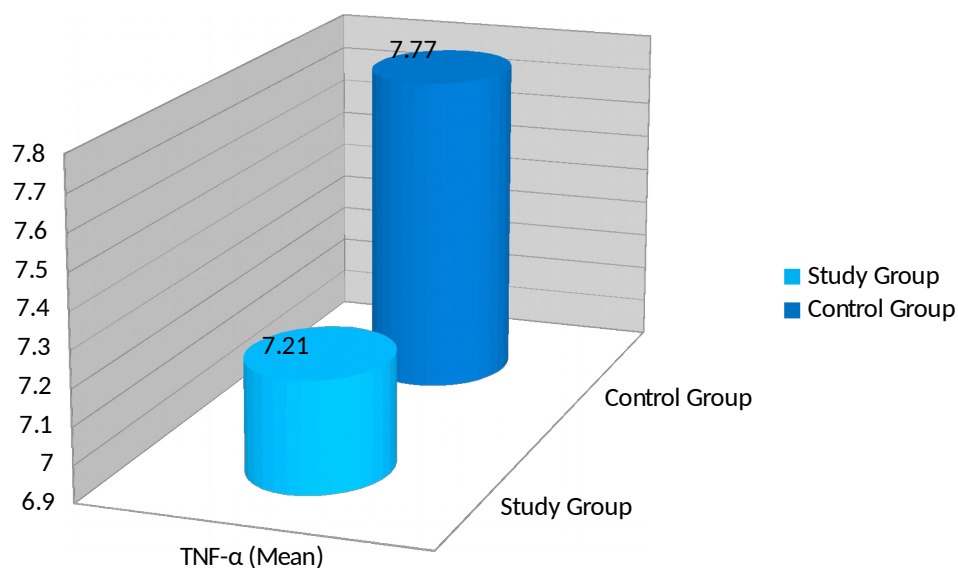
Γράφημα 12-7: Κυκλικό διάγραμμα (pie chart) των επιπέδων του TNF-α στον ορό γόνιμων γυναικών.

12.5. Σύγκριση αποτελεσμάτων των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες

Σύμφωνα με το t-test, η μέση τιμή των επιπέδων του TNF-α στις γυναίκες με ιστορικό επανειλημμένων αποβολών (Study group ή cases) είναι $\text{Mean} \pm \text{SEM}: 7,205 \pm 0,7944$ και στις υγιείς γυναίκες (Control group ή controls) είναι $\text{Mean} \pm \text{SEM}: 7,769 \pm 0,4482$, με $p\text{-value} = 0,531$ δηλαδή μη στατιστικά σημαντικό (Πίνακας 12-4, Γράφημα 12-8).

TNF-α	N	Mean	Std. Deviation (SD)	Std.Error Mean (SEM)	p-value
Study group	90	7,205	7,536	0,7944	0,531
Control group	95	7,769	4,368	0,4482	

Πίνακας 12-4: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στις γυναίκες με ΕΑΑ (study group) και στις γόνιμες γυναίκες (control group), σύμφωνα με το t-test.



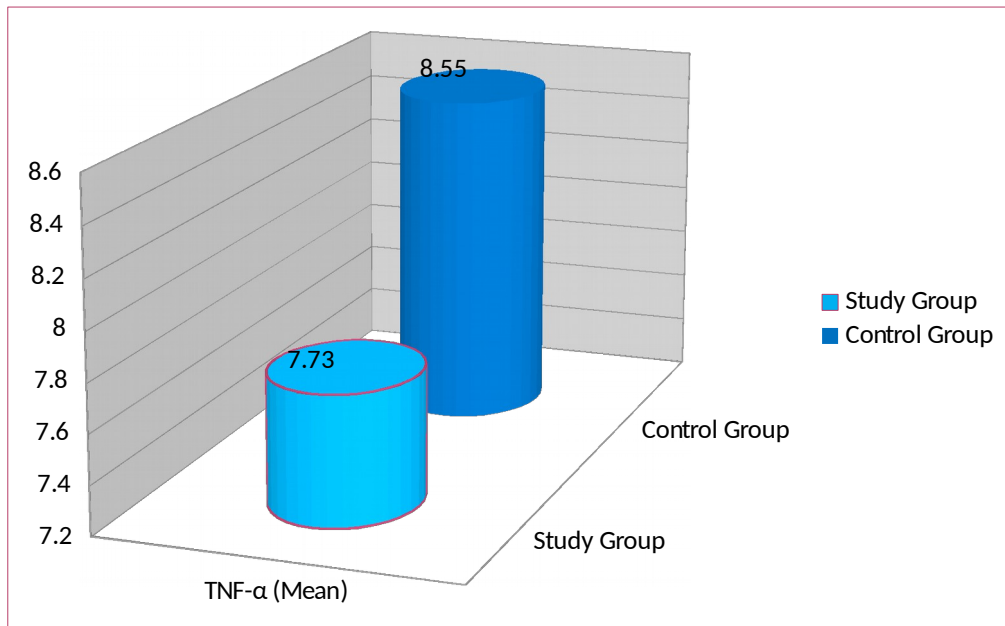
Γράφημα

α 12-8: Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις γυναίκες με EAA (study group) και στις γόνιμες γυναίκες (control group), σύμφωνα με το t-test.

Σύμφωνα με το GLM test, που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συσχετίσουμε τα επίπεδα του TNF-α με την ομάδα (μελέτης ή ελέγχου) διατηρούμενης σταθερής της επίδρασης της ηλικίας, του BMI και του καπνίσματος, η μέση τιμή των επιπέδων του TNF-α στην ομάδα μελέτης (γυναίκες με EAA) και στην ομάδα ελέγχου (γόνιμες γυναίκες) είναι αντίστοιχα $\text{Mean} \pm \text{SEM}$: $7,730 \pm 0,958$ και $\text{Mean} \pm \text{SEM}$: $8,546 \pm 1,003$ με μη στατιστικά σημαντικό $p\text{-value} = 0,559$ (Πίνακας 12-5, Γράφημα 12-9).

TNF-α	Mean	Std.Error Mean (SEM)	95% Interval Bound-Bound	Confidence (Lower Upper)	p-value
Study group	7,730	0,958	5,832	9,627	0,559
Control group	8,546	1,003	6,560	10,531	

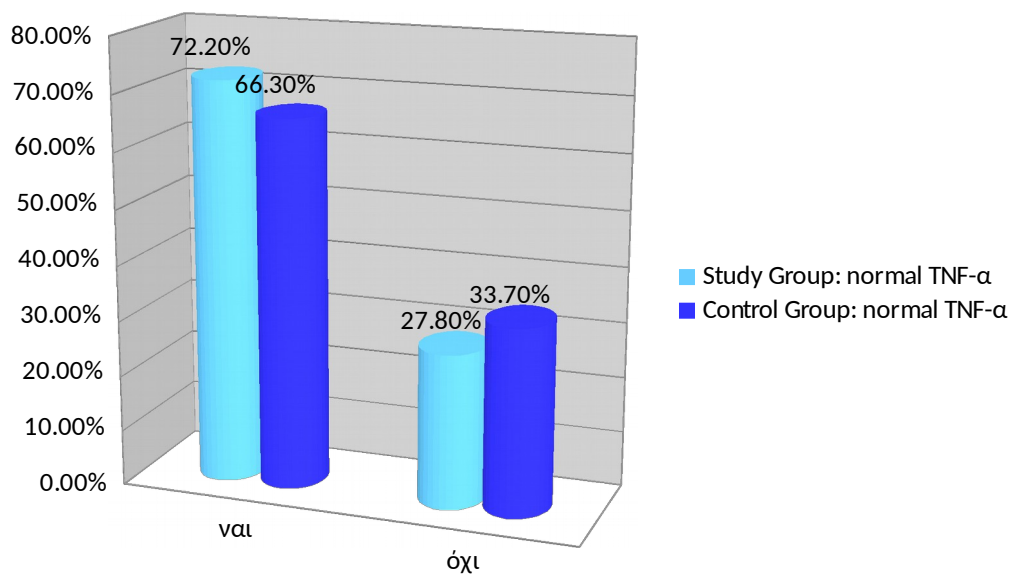
Πίνακας 12-5: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες, χρησιμοποιώντας το GLM test, με προσαρμογή ως προς την ηλικία, το BMI και το κάπνισμα (με Mean age: 37,98 και Mean BMI: 25,1251).



Γράφημα 12-9:

Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις γυναίκες με ΕΑΑ (study group) και στις γόνιμες γυναίκες (control group), σύμφωνα με το GLM test.

Με βάση το Fisher's exact test, τα ποσοστά των γυναικών με φυσιολογικά επίπεδα TNF-α στην ομάδα μελέτης (72,2%) και στην ομάδα ελέγχου (66,3%) και εκείνων με αυξημένες τιμές (27,8% και 33,7% αντίστοιχα) δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στις δύο ομάδες εμφανίζοντας $p\text{-value}=0,428$ (Γράφημα 12-10).



Γράφημα 12-10:

Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων των επιπέδων του

TNF-α στην ομάδα μελέτης (γυναίκες με ΕΑΑ) και στην ομάδα ελέγχου (γυναίκες γόνιμες), σύμφωνα με το Fisher's exact test.

12.6. Σύγκριση αποτελεσμάτων των επιπέδων του TNF-α σε συνάρτηση με τον πολυμορφισμό TNF-α -238G/A

Επίσης, σύμφωνα με το τεστ Mann-Whitney U που πραγματοποιήθηκε για να ανιχνεύσουμε πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού του γονιδίου TNF-α στη θέση -238 G/A με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό στις δύο ομάδες, η μέση τιμή της συγκέντρωσης του TNF-α στις γυναίκες με ΕΑΑ και τον πολυμορφισμό είναι Mean±SEM: 7,733±2,5314 ενώ στις γυναίκες με ΕΑΑ χωρίς τον πολυμορφισμό είναι Mean±SEM: 7,499±1,4125 με μη στατιστικά σημαντικό p-value=0,679. Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές στην ομάδα των γόνιμων γυναικών είναι Mean±SEM: 5,950±0,8703 και Mean±SEM: 8,177±0,5089 με p-value=0,361 το οποίο δε θεωρείται στατιστικά σημαντικό (Πίνακας 12-6, Γράφημα 12-11).

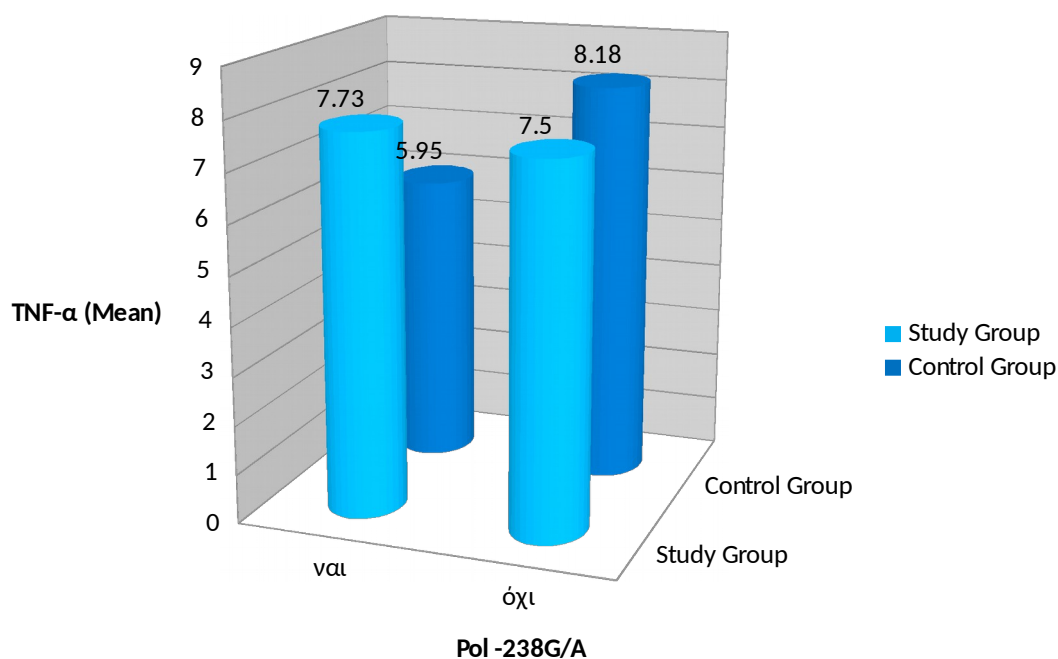
Group	Polym -238G/A	N	Mean TNF-α	Std.Deviation (SD)	St.Error Mean (SEM)	p-value
Study group	όχι	44	7,499	9,3694	1,4125	0,679
	ναι	3	7,733	4,3844	2,5314	
Control group	όχι	81	8,177	4,5804	0,5089	0,361
	ναι	4	5,950	1,7407	0,8703	

Πίνακας 12-6: Επίπεδα του TNF-α στον ορό σε συσχέτιση με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού -238G/A σε κάθε ομάδα χωριστά.

Συγκρίνοντας τα επίπεδα του TNF-α της ομάδας ελέγχου με αυτά της ομάδας μελέτης σε συσχέτιση με την παρουσία του πολυμορφισμού -238G/A, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά καθώς το p-value είναι 0,480. (Πίνακας 12-7, Γράφημα 12-11).

Polym -238G/A	Group	N	Mean TNF-α	Std.Deviation (SD)	St.Error Mean (SEM)	p-value
όχι	Study group	44	7,499	9,3694	1,4125	0,012
	Control group	81	8 ,177	4,3844	2,5314	
ναι	Study group	3	7,733	4,5804	0,5089	0,480
	Control group	4	5,950	1,7407	0,8703	

Πίνακας 12-7: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις δύο ομάδες σε συσχέτιση με την παρουσία του πολυμορφισμού -238G/A .



Γράφημα 12-11: Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών του TNF-α (pg/ml) στις δύο ομάδες σε συσχέτιση με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού -238G/A.

Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι όταν συγκρίναμε με το ίδιο τεστ (Mann-Whitney U) τα επίπεδα του TNF-α μεταξύ των δύο ομάδων στις γυναίκες με απουσία του πολυμορφισμού υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του TNF-α (p -value=0,012) και μάλιστα με μέση τιμή μεγαλύτερη στην ομάδα ελέγχου. Το παράδοξο αυτό στατιστικό αποτέλεσμα είναι δυνατό να αιτιολογηθεί από το μικρό μέγεθος και την ετερογένεια του δείγματος των γυναικών χωρίς τον υπό μελέτη πολυμορφισμό, που συμμετείχαν στις δύο ομάδες (cases-controls).

κεφάλαιο 13

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μία επιτυχημένη κύηση εξαρτάται από τη διατήρηση των μηχανισμών μητρικής ανοσοανοχής στην εμβρυομητρική επιφάνεια επαφής, μεταξύ των οποίων είναι η στροφή της Th1/Th2 ισορροπίας υπέρ της Th2 ανοσιακής απάντησης (Chaouat G et al.2002, Liu RX et al.2015, Zhang C et al.2016).

Η παρούσα μελέτη είναι μία αναδρομική, περιγραφική, επιδημιολογική μελέτη παρατήρησης ασθενών-μαρτύρων (case-control, retrospective, observational study) στην οποία επιχειρήσαμε να ερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF-α στον ορό και των επανειλημμένων αυτόματων αποβολών (EAA). Επιπρόσθετα, αναζητήσαμε πιθανούς

συσχετισμούς ανάμεσα στις τιμές του TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό ΕΑΑ και παρουσία του πολυμορφισμού -238 G/A του TNF-α γονιδίου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι γυναίκες με ιστορικό ΕΑΑ δεν έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης υψηλών τιμών του TNF-α σε σχέση με τις γόνιμες γυναίκες ή/και το αντίστροφο, δηλαδή οι γυναίκες με υψηλά επίπεδα TNF-α δεν έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο επανειλημμένων αυτόματων αποβολών.

Επιπλέον, η συγκέντρωση του TNF-α ορού είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του πολυμορφισμού -238G/A του TNF-α γονιδίου, επομένως οι γυναίκες με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, τόσο εκείνες με ιστορικό ΕΑΑ όσο και οι γόνιμες, έχουν την ίδια πιθανότητα εμφάνισης υψηλών τιμών του TNF-α με τις γυναίκες χωρίς τον πολυμορφισμό.

Η μελέτη μας είχε κάποιους περιορισμούς όπως είναι το μέγεθος του δείγματος, η ετερογένεια ασθενών και μαρτύρων, η μέτρηση του TNF-α στον ορό μόνο σε κατάσταση μη εγκυμοσύνης, η μέθοδος μέτρησης των επιπέδων του TNF-α στον ορό αίματος (ELISA).

Αναφορικά με τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) και το κάπνισμα ως πιθανών συγχυτικών παραγόντων (confounders), το δείγμα της μελέτης μας ήταν ομοιογενές ως προς το BMI, ενώ αντίθετα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (cases-controls) ως προς το κάπνισμα. Ειδικότερα, οι Lashen H et al.(2004) παρατήρησαν ότι η παχυσαρκία ($BMI > 30\text{kg/m}^2$) συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ΕΑΑ, με τη μελέτη τους να περιλαμβάνει 1644 παχύσαρκες γυναίκες ($BMI > 30\text{kg/m}^2$) και 3288 αντίστοιχης ηλικίας γυναίκες με φυσιολογικό BMI ($19-24.9\text{kg/m}^2$) (Lashen H et al.2004, Sugiura-Ogasawara M.2015). Σε αντίθεση με τον BMI, τα έως σήμερα δεδομένα σχετικά με το κάπνισμα και τις αυτόματες αποβολές είναι αντικρουόμενα. Σύμφωνα με την ανασκόπηση των Saravelos SH,

Regan L.(2011) το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο αυτόματων αποβολών, ενώ η μεγάλη προοπτική μελέτη 24.608 κυήσεων των Wisborg K et al.(2003) δεν κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και αποβολών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με καθ'έξιν αποβολές και τα αντίστοιχα επίπεδα υγιών γυναικών, γεγονός που υποστηρίζεται επίσης από τις μελέτες των Liu RX et al.(2015), Daher S et al.(2012) και Pietrowski D et al.(2004) σε γυναίκες μη έγκυες με και χωρίς ιστορικό ΕΑΑ (αντιστοιχία δειγμάτων των μελετών ως προς τη χρονική στιγμή μέτρησης της κυτοκίνης στον ορό). Επίσης, δεν βρέθηκε στη μελέτη μας στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του TNF-α στον ορό γυναικών με εμφάνιση του πολυμορφισμού -238G/A του TNF-α γονιδίου και των αντίστοιχων επιπέδων στον ορό γυναικών χωρίς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, ενώ δεν έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα μελέτες που να συγκρίνουν τα επίπεδα του TNF-α ορού μεταξύ γυναικών με παρουσία κάποιου πολυμορφισμού και γυναικών χωρίς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

Ειδικότερα, η μελέτη των Liu RX et al.(2015) υποστηρίζει, μεταξύ άλλων, ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του TNF-α ορού μεταξύ γυναικών με ΕΑΑ και υγιών γυναικών. Επιπλέον σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, ενδεχόμενη επίδραση του πολυμορφισμού TNF-α -308 στα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με επανειλημμένες αποβολές ίσως να αντισταθμίζεται από τη επίδραση άλλου πολυμορφισμού. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν οι Pietrowski D et al.(2004) καθώς στη μελέτη τους δε βρέθηκε κάποια συσχέτιση των επιπέδων του TNF-α ορού και των πολυμορφισμών στις θέσεις -308 και -863 με τις ΕΑΑ.

Σύμφωνα με τους Daher S et al.(2012), τα υψηλότερα επίπεδα του TNF-α στον ορό παρατηρούνται κατά την έναρξη του τοκετού και την έναρξη αυτόματης αποβολής,

ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία διαφορά στην παραγωγή TNF-α από κύτταρα του περιφερικού αίματος σε μη έγκυες γυναίκες με ή χωρίς ιστορικό καθ'έξιν αποβολών.

Ωστόσο, μία σειρά μελετών φαίνεται να υποστηρίζει ότι αυξημένα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών ίσως να συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο επανειλημμένων αυτόματων αποβολών. Ειδικότερα, μία πρόσφατα δημοσιευμένη μετα-ανάλυση από τους Zhang C et al.(2016) υποστηρίζει ότι τα επίπεδα του TNF-α ορού είναι αυξημένα στις γυναίκες με ΕΑΑ. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μετα- ανάλυση, η διαφορά των επιπέδων του TNF-α στον ορό μεταξύ των ομάδων μελέτης (cases) των ομάδων ελέγχου (controls) είναι στατιστικά σημαντική, παρά την υψηλή ετερογένεια μεταξύ των επιμέρους μελετών.

Οι Zhang C et al.(2016) ισχυρίζονται ότι κάποιοι από τους παράγοντες που συνέβαλαν σε σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων μελετών ήταν η μέθοδος μέτρησης του TNF-α (ELISA), η ηλικία κύησης κατά τις καθ'έξιν αποβολές, η χρονική στιγμή λήψης του αίματος για μέτρηση των επιπέδων του TNF-α. Συγκεκριμένα, τρεις -από τις συνολικά έντεκα μελέτες ασθενών-μαρτύρων που αναλύθηκαν- δεν αναφέρουν τη χρονική στιγμή λήψης του δείγματος αίματος και δύο μελέτες δεν δίνουν στοιχεία σχετικά με την ηλικία κύησης των καθ'έξιν αποβολών.

Επιπλέον, είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη τα σφάλματα δημοσίευσης (publication bias) καθώς αρνητικά αποτελέσματα ως προς τη συσχέτιση του TNF-α με τις ΕΑΑ συχνά δε δημοσιεύονται ώστε να μην είναι δυνατή η πρόσβαση σε αυτές και κάτι τέτοιο να οδηγήσει σε πιθανή υπερεκτίμηση της επίδρασης του TNF-α στην κύηση και τις αποβολές. Επίσης, σημαντικός περιορισμός της συγκεκριμένης μετα-ανάλυσης είναι ότι οι εννέα από τις συνολικά έντεκα μελέτες αφορούν ασιατικό πληθυσμό με τις επτά να αναφέρονται στον κινεζικό πληθυσμό.

Αναφορικά με παλαιότερες μελέτες, οι Shaarawy M et Nagui AR.(1997) κατέδειξαν υψηλότερα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό ΕΑΑ συγκριτικά με εκείνα στον ορό γυναικών με αποβολή λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Οι Hill JA et al.(1995) παρατήρησαν ότι όταν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος γυναικών με ΕΑΑ διεγερθούν από ένα εκχύλισμα τροφοβλαστικού αντιγόνου, παράγουν υψηλότερα επίπεδα TNF-α και άλλων Th1 κυτοκινών με εμβρυοτοξική δραστηριότητα συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα υγιών γυναικών.

Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα του TNF-α σε γυναίκες με επανειλημμένες αποβολές έχουν παρατηρηθεί από τους Raghupathy R et al.(1997), Mallmann P et al.(1991), Makhseed M et al.(2000), Gücer F et al.(2001) και τους Arslan E et al.(2004), αλλά και από νεότερες μελέτες όπως είναι αυτή των El-Far M et al. που δημοσιεύθηκε το 2009. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τις ομάδες μελέτης αποτέλεσαν 16 γυναίκες με τουλάχιστον τρεις και το μέγιστο πέντε ΕΑΑ (αριθμός ΕΑΑ= 3-5) και 24 γυναίκες με περισσότερες από πέντε ΕΑΑ (αριθμός ΕΑΑ> 5), ενώ οι ομάδες ελέγχου περιελάμβαναν 20 υγιείς γυναίκες στο α' τρίμηνο κύησης και 20 μη έγκυες υγιείς γυναίκες. Υψηλότερα επίπεδα του TNF-Α στον ορό παρατηρήθηκαν και στις δύο ομάδες μελέτης συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μελέτη των El-Far M et al.(2009) και αυτή των Arslan E et al.(2004) συμπεριλαμβάνονται στη μετα-ανάλυση των Zhang C et al.(2016), με την μελέτη των Arslan E et al.(2004) από την Τουρκία και μία ακόμη μελέτη από το Βέλγιο να αποτελούν τις μοναδικές μελέτες της μετα-ανάλυσης που αφορούν ευρωπαϊκό πληθυσμό.

Κάποιες μελέτες όχι μόνο δεν υποστηρίζουν την αύξηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό γυναικών με επανειλημμένες αυτόματες αποβολές, αλλά αντίθετα δείχνουν ότι τα επίπεδα του TNF-α είναι ελαττωμένα σε σύγκριση με εκείνα γυναικών με φυσιολογικές κυήσεις. Ειδικότερα, οι Bates MD et al.(2002) παρατήρησαν χαμηλά

επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης εγκύων γυναικών με ιστορικό ιδιοπαθών καθ'έξιν αποβολών που εν τέλει απέβαλαν συγκριτικά με τα επίπεδα σε έγκυες γυναίκες πρώτου τριμήνου με επιτυχή έκβαση κύησης αλλά και με εκείνα γυναικών που δεν κυοφορούσαν.

Αναφορικά με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης σε γυναίκες με ιστορικό ΕΑΑ και λαμβάνοντας υπόψη τον καρυότυπο του αποβαλλόμενου εμβρύου, οι Yamada H et al.(2004) παρατήρησαν σε εκείνες που τελικά απέβαλαν ότι ο TNF-α βρισκόταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση στις γυναίκες με αποβολή εμβρύου με φυσιολογικό καρυότυπο συγκριτικά με τη συγκέντρωσή του στις γυναίκες με αποβολή εμβρύου παθολογικού καρυοτύπου.

Επίσης, μεταξύ εγκύων γυναικών με ιστορικό πρωτοπαθών και εκείνων με ιστορικό δευτεροπαθών επανειλημμένων αποβολών φαίνεται να υπάρχει διαφορά στα επίπεδα του TNF-α στον ορό κατά τη διάρκεια της 6^{ης} με 9^{ης} εβδομάδας κύησης. Οι Piosik ZM et al.(2013) παρατήρησαν υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση των δευτεροπαθών επανειλημμένων αποβολών σε σύγκριση με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό εγκύων με ιστορικό πρωτοπαθών καθ'έξιν αποβολών, ανεξάρτητα από την έκβαση της κύησης, γεγονός το οποίο ίσως εν μέρει να καθορίζεται γενετικά.

Είναι αξιοσημείωτο ότι σύμφωνα με τις έως σήμερα μελέτες, αυξημένα επίπεδα του TNF-α φαίνεται να εμπλέκονται και σε άλλες επιπλοκές της κύησης, εκτός από τις αποβολές, όπως είναι η πρόωμη ρήξη εμβρυικών υμένων, ο πρόωρος τοκετός, η προεκλαμψία, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η καθυστερημένη ενδομήτρια εμβρυική ανάπτυξη IUGR - intrauterine growth restriction (Daher S et al.1999, Piosik ZM et al.2013, Azizieh FY et al.2015).

Αναφορικά με τη συσχέτιση πολυμορφισμών του TNF-α με τον κίνδυνο ΕΑΑ, η ανασκόπηση των Daher S et al.(2012) αποκαλύπτει ότι στον μεγαλύτερο αριθμό των

μελετών που αφορούν πολυμορφισμούς του TNF-α σε γυναίκες με ΕΑΑ δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ αυτών των SNPs και των καθ'έξιν αποβολών. Ειδικότερα, παρά τη θετική συσχέτιση των συγκεκριμένων παραμέτρων σε κάποιες μελέτες, αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες. Επιπλέον, οι Daher S et al.(2012) υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη συσχέτιση συχνά εξαφανίζεται όταν εφαρμόζεται κάποια μέθοδος διόρθωσης (correction factor) στην περίπτωση πολλαπλών συγκρίσεων (multiple testing). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποστηρίζουν τη διεξαγωγή εξετάσεων ρουτίνας για έλεγχο της εμφάνισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε όλες τις γυναίκες με ΕΑΑ ανεξήγητης αιτιολογίας.

Περαιτέρω, η μετα-ανάλυση των Zhang B et al.(2012) υποστηρίζει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των πολυμορφισμών TNF-α -308G/A και -238G/A με τις ΕΑΑ. Ο περισσότερος μελετημένος πολυμορφισμός σε περιπτώσεις καθ'έξιν αποβολών εντοπίζεται στη θέση -308 και φαίνεται να μη συσχετίζεται με τις επανειλημμένες αποβολές από τους Liu C et al.(2010) και από τους Kamali-Sarvestani E et al.(2005). Επιπρόσθετα, με βάση τη μετα-ανάλυση από τους Zhang B et al.(2012) δεν παρατηρείται κάποιο αποδεικτικό στοιχείο ότι ο πολυμορφισμός -308G/A ή ο πολυμορφισμός -238G/A έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στον κίνδυνο για επανειλημμένες αποβολές στο συνολικό πληθυσμό.

Επιπλέον, η μελέτη των Finan RR et al.(2010) υποστηρίζει ότι ακόμη και αν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό στη θέση -308 και στις επανειλημμένες αυτόματες αποβολές, αυτή φαίνεται να είναι πολύ αδύναμη (Finan RR et al.2010, Daher S et al.2012).

Αναφορικά όχι μόνο με τον πολυμορφισμό TNF-α -308G/A, αλλά και με τον πολυμορφισμό -863, οι Pietrowski D et al.(2004) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές και τα επίπεδα του TNF-α στον ορό δε

συσχετίζονται με την πιθανότητα επανειλημμένων αποβολών στις γυναίκες Καυκάσιας φυλής.

Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες μελέτες δεν εντόπισαν σημαντική σχέση μεταξύ κάποιου από τους περιγραφόμενους πολυμορφισμούς του TNF-α και των επανειλημμένων αποβολών, ορισμένες μελέτες αναφέρουν συσχέτιση πολυμορφισμών του TNF-α με τις καθ'έξιν αποβολές.

Σύμφωνα με τη μετα-ανάλυση των Li HH et al.(2016), υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού -308G/A και των ΕΑΑ ενώ, σε συμφωνία με τη μετα-ανάλυση των Zhang B et al(2012), δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού -238G/A.

Ειδικότερα, οι Liu RX et al.(2015) μελέτησαν πολυμορφισμούς των κυτοκινών TNF-α, TNF-β, IL-6 και IL-10 και τα επίπεδά τους στον ορό γυναικών με καθ'έξιν αποβολές. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, ο πολυμορφισμός TNF-α -308 ίσως να συσχετίζεται με την πιθανότητα επανειλημμένων αποβολών.

Οι Finan RR et al.(2010) διεξήγαγαν μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων προκειμένου να ερευνήσουν αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του TNF-α και επιβεβαιωμένων πρώτου τριμήνου κύησης επανειλημμένων αποβολών αγνώστου αιτιολογίας. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, οι πολυμορφισμοί του TNF-α εκκινητή -1031T/C, -376G/A και -238G/A, εντοπιζόμενοι ανεξάρτητα, αυξάνουν τον κίνδυνο επανειλημμένων αυτόματων αποβολών πρώτου τριμήνου, ώστε τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης να συνάδουν με αυτά προηγούμενων μελετών σε πληθυσμούς της Καυκάσιας φυλής (Baxter MD et al.2001, Prigoshin N et al. 2004) και Ιρανών γυναικών (Kamali-Sarvestani E et al.2005). Επίσης, η μελέτη των Bo EL et al υποστηρίζει ότι οι πολυμορφισμοί του TNF-α -1031T>C και -238G>A αυξάνουν την επιρρέπεια προς καθ'έξιν αποβολές (Bo EL et al.2012).

Η μελέτη των Palmirotta R et al.(2010) σε ιταλικό πληθυσμό υποστηρίζει ότι ο απλότυπος TNF-α -376G/ -308A/ -238G και το αλληλόμορφο TNF-α -238GG είναι

πιθανό να δρουν προστατευτικά έναντι της αυτόματης αποβολής, μέσω ελαττωμένης παραγωγής του TNF-α και των επακόλουθων χαμηλών επιπέδων του στον ορό των γυναικών που εμφανίζουν αυτούς τους πολυμορφισμούς.

Αναφορικά με τη συσχέτιση πολυμορφισμών του TNF-α, επιπέδων του TNF-α στον ορό και καθ'έξιν αποβολών, είναι απαραίτητο να διενεργηθούν μελέτες οι οποίες να συνδυάζουν τη μέτρηση του TNF-α στον ορό με τη μελέτη της παρουσίας πολυμορφισμών του TNF-α γονιδίου σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές.

Λαμβάνοντας υπόψη τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί έως τώρα σχετικά με τον TNF-α στον ορό αλλά και με πολυμορφισμούς του TNF-α σε γυναίκες με ΕΑΑ, είναι εμφανές ότι τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και είναι αδύνατο να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Ορισμένοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τις αποκλίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των μελετών είναι οι παρακάτω: α). ο σχεδιασμός της μελέτης (μελέτη παρατήρησης ασθενών-μαρτύρων, συστηματική ανασκόπηση μελετών παρατήρησης, μετα-ανάλυση), β). η κλινική ετερογένεια χαρακτηριστικών των γυναικών όπως είναι η φυλή-εθνικότητα (καυκάσια, ασιατική φυλή), ο BMI, το κάπνισμα, η ηλικία, η χρονική στιγμή μέτρησης των επιπέδων της κυττοκίνης στον ορό (αρχόμενη κύηση, τελειόμηνη κύηση, αυτόματη αποβολή, μη κύηση) είναι δυνατό να αποτελέσουν συγχυτικούς παράγοντες (confounders) ή να προκαλέσουν συστηματικά σφάλματα (bias), γ). η στατιστική ετερογένεια - μεθοδολογικές διαφορές των επιμέρους μελετών (τεχνικές ELISA, PCR) μπορεί να οδηγήσουν σε συστηματικά σφάλματα (bias), δ). μικρό μέγεθος δείγματος-τυχαίο σφάλμα (random error) λόγω της μεταβλητότητας της δειγματοληψίας.

Στο μέλλον, απαιτούνται μελέτες μεγαλύτερες ως προς το δείγμα των γυναικών, πολυκεντρικές, τυχαιοποιημένες, με προσεκτική επιλογή και αξιολόγηση των βιομετρικών και άλλων χαρακτηριστικών των ασθενών και των μαρτύρων και

εφαρμογή μεθόδων και τεχνικών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να ελαττωθούν τυχαία και συστηματικά σφάλματα (bias and random errors) καθώς και συγχυτικοί παράγοντες (confounders) όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, ο τρόπος ζωής. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιλογή της χρονικής στιγμής ελέγχου του TNF-α (αρχόμενη κύηση, τέλος κύησης, μη κύηση) καθώς και στα κριτήρια διάγνωσης των καθ'έξιν αποβολών με βάση τα οποία θα επιλεγθούν οι γυναίκες της ομάδας μελέτης (διαδοχικές αυτόματες αποβολές ≥ 3 ή ≥ 2).

Επιπλέον, καθώς η πλειοψηφία των μέχρι σήμερα ερευνών- σχετικά με τους πολυμορφισμούς του TNF-α και τις καθ'έξιν αποβολές- δε συνδυάζεται με σύστοιχη μέτρηση των επιπέδων του TNF-α, περισσότερες μελέτες στο μέλλον πρέπει να συμπεριλάβουν τη συσχέτιση πολυμορφισμών του TNF-α με τη συγκέντρωση του TNF-α στον ορό γυναικών με ιστορικό καθ'έξιν αποβολών και υγιών γυναικών.

Εάν οι μελλοντικές μελέτες ταυτοποιήσουν συγκεκριμένο, αιτιολογικό ρόλο του TNF-α στις καθ'έξιν αποβολές, θα συμβάλουν στην επιτυχή πρόβλεψη και διάγνωση των επανειλημμένων αυτόματων αποβολών μέσω μέτρησης των επιπέδων του συγκεκριμένου βιολογικού δείκτη στον ορό και περαιτέρω στην εύστοχη επιλογή των γυναικών εκείνων που πραγματικά θα ωφεληθούν από μία αντίστοιχη στοχευμένη θεραπεία.

Αναφορικά με την προοπτική της παρούσας μελέτης, ο προσδιορισμός των επιπέδων της συγκεκριμένης κυτοκίνης στον ορό γυναικών με ιστορικό ΕΑΑ είναι δυνατό να οδηγήσει στη δημιουργία νέων πρωτοκόλλων διάγνωσης των ΕΑΑ με την εισαγωγή εξετάσεων του TNF-α σε συγκεκριμένες ομάδες γυναικών με ΕΑΑ άγνωστης αιτιολογίας. Επίσης, η συσχέτιση του TNF-α στον ορό αίματος με πολυμορφισμούς του TNF-α γονιδίου και τον κίνδυνο εμφάνισης ΕΑΑ μπορεί να επιτρέψει στην εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων καθώς και την ορθή επιλογή των γυναικών με ΕΑΑ που θα μπορούσαν να ευεργετηθούν από θεραπείες

όπως είναι η λεμφοκυτταρική ανοσοθεραπεία. Εάν τα αποτελέσματα μελλοντικών μελετών διαψεύσουν τα αποτελέσματα της μελέτης μας, τότε θα μπορούσε η λεμφοκυτταρική ανοσοθεραπεία να αποτελέσει θεραπεία ρουτίνας των γυναικών με καθ'έξιν αποβολές και αυξημένα επίπεδα TNF-α, μεταβάλλοντας το ποσοστό των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και οδηγώντας σε επίπεδα TNF-α ευοδωτικά μίας επιτυχούς κύησης.

Ευρετήριο Εικόνων, Πινάκων, Γραφημάτων

Εικόνες

ΕΙΚΟΝΑ 1-1: Το έσω γεννητικό σύστημα θήλεος σε διατομή (Netter, 1988).....σελ.16	
ΕΙΚΟΝΑ 1-2: Αγγείωση κόλπου και έσω γεννητικών οργάνων (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).....σελ.18	
ΕΙΚΟΝΑ 1-3: Δομή του αιδοίου (Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).....σελ.22	
ΕΙΚΟΝΑ 2-1: Γραφική παράσταση του αριθμού των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε συνάρτηση με την ηλικία της γυναίκας (how-treat.com).....σελ.26	
ΕΙΚΟΝΑ 2-2: Ο κύκλος της ωοθυλακιογένεσης (e.endocrinology.gr).....σελ.28	
ΕΙΚΟΝΑ 2-5: Διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων (panacea.med.uoa.gr)...σελ.30	
ΕΙΚΟΝΑ 3-1: Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών (Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική).....σελ.31	

EIKONA 3-2: Η κατά ώσεις έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο οδηγεί στην κατά ώσεις έκκριση της FSH και της LH από την πρόσθια υπόφυση.....σελ.33	
EIKONA 3-3: Το ωχρό σωμάτιο (eugonia.com).....σελ.39	
EIKONA 3-4: Η θεωρία των δύο κυττάρων-δύο γοναδοτροπινών, για την παραγωγή των οιστρογόνων στις ωθήκες (just.edu.jo).....σελ.40	
EIKONA 3-5: Ορμονικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου (just.edu.jo).....σελ.43	
EIKONA 3-6: Μορφολογικές μεταβολές του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου, σε συνδυασμό με τις κυκλικές μεταβολές των ορμονών και των ωθηκών (eugonia.com).....σελ.45	
EIKONA 4-1: Γονιμοποίηση. Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (education-portal.com).....σελ.46	
EIKONA 4-2: Στάδια γονιμοποίησης. Δομή σπερματοζωαρίου (nursingcrib.com).....σελ.47	
EIKONA 4-3: Αυτάκωση του ζυγώτη και σχηματισμός της βλαστοκύστης (bioserv.fiu.edu).....σελ.49	
EIKONA 4-4: Προσανατολισμός και εναπόθεση της βλαστοκύστης (humanphysiology.wikispaces).....σελ.52	
EIKONA 4-5: Μικροφωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Πινιπόδια (humrep.oxfordjournals.org).....σελ.52	
EIKONA 4-6: Προσκόλληση (adhesion) και διείσδυση (invasion) της βλαστοκύστης.....σελ.53	
EIKONA 4-7: Παράθυρο εμφύτευσης (embryology.ch).....σελ.54	
EIKONA 8-1: Προέλευση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος (Blank et al.2008).....σελ.88	
EIKONA 8-2: Τα Τα-λεμφοκύτταρα (CD4 ⁺ ή CD8 ⁺) υπόκεινται σε MHC περιορισμό (medscape.com).....σελ.93	
EIKONA 8-3: Th1 και Th2 ανοσιακή απόκριση – κυτταρική και χυμική ανοσία (eugonia.com).....σελ.94	
EIKONA 8-4: Th1 και Th2 αλληλορύθμιση (medscape.com).....σελ.95	
EIKONA 8-5: Η αλληλουχία πρόκλησης εοανειλημμένων αποβολών πιθανής αλλοάνοσης αιτιολογίας (Saito S et al.2011).....σελ.111	
EIKONA 8-6: Πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης αλλοάνοσων αποβολών με εμπλοκή των LIF, πρωτεΐνες συμπληρώματος, IDO, Fas/FasL, Annexin II (Thellin O et al.2003).....σελ.117	
EIKONA 11-1: Πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος (bat.uoi.gr).....σελ.132	
EIKONA 11-2: Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (molecular devices.com).....σελ.134	
EIKONA 11-3: Τεχνικές ELISA (abnova.com).....σελ.135	

EIKONA 11-4: Άμεση τεχνική ELISA (thermofisher.com).....σελ.136
EIKONA 11-5: Έμμεση τεχνική ELISA (elisa-antibody.com).....σελ.137
EIKONA 11-6: Μέθοδος sandwich ELISA (έμμεση) (elisa-antibody.com).....σελ.138
EIKONA 11-7: Πλάκα μικροπιτλοδότησης (kit) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του TNF-α με τη μέθοδο ELISA (rasayanika.com).....σελ.140
EIKONA 11-8: Στάδια μέτρησης του TNF-α στον ορό αίματος, με μία τεχνική ELISA (bosterbio.com).....σελ.141

Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ 8-1: Κριτήρια διάγνωσης του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου (The Practice Committee of the Am Soc of Reprod Med.2012).....σελ.107
ΠΙΝΑΚΑΣ 7-1: Παράγοντες σχετιζόμενοι με αυτόματες αποβολές-επανελημμένες αποβολές Γ.Κ.Κρεατσάς.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική Αρ.Αντσακλής.Μαιευτική και Γυναικολογία).....σελ.74
ΠΙΝΑΚΑΣ 11-1: Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών-μαρτύρων.....σελ.129
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-1: Συγκέντρωση του TNF-α ορού με βάση τα αποτελέσματα της ELISA.....σελ.144
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-2: Επίπεδα TNF-α ορού στις γυναίκες με ιστορικό ΕΑΑ (study group)σελ.148
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-3: Επίπεδα TNF-α ορού στις γόνιμες γυναίκες (ομάδα ελέγχου).....σελ.149
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-4: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις γυναίκες με ΕΑΑ και στις γόνιμες γυναίκες, σύμφωνα με το t-test.....σελ.151
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-5: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στις δύο ομάδες χρησιμοποιώντας το GLM test.....σελ.152
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-6: Επίπεδα του TNF-α στον ορό, σε συσχέτιση με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού -238G/A σε κάθε ομάδα χωριστά.....σελ.154
ΠΙΝΑΚΑΣ 12-7: Σύγκριση των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις δύο ομάδες σε συσχέτιση με την παρουσία του πολυμορφισμού -238G/A.....σελ.154

Γραφήματα

ΓΡΑΦΗΜΑ 12-1: Ραβδόγραμμα (bar chart) μέσων τιμών ηλικίας στις δύο ομάδες (γυναίκες με ΕΑΑ και γόνιμες γυναίκες).....σελ.146
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-2: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων του καπνίσματος στις δύο ομάδες.....σελ.147
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-3: Ραβδόγραμμα (bar chart) μέσων τιμών του BMI στις δύο ομάδες.....σελ.147

ΓΡΑΦΗΜΑ 12-4: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων για τα επίπεδα του TNF-α στον ορό γυναικών με ΕΑΑ (study group).....σελ.148
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-5: Κυκλικό διάγραμμα των επιπέδων του TNF-α στον ορό γυναικών με ΕΑΑ (study group).....σελ.149
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-6: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων για τα επίπεδα του TNF-α στον ορό γόνιμων γυναικών.....σελ.150
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-7: Κυκλικό διάγραμμα (pie chart) των επιπέδων του TNF-α στον ορό γόνιμων γυναικών.....σελ.150
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-8: Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις γυναίκες με ΕΑΑ και στις γόνιμες γυναίκες, σύμφωνα με το t-test.....σελ.151
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-9: Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών των επιπέδων του TNF-α στον ορό στις γυναίκες με ΕΑΑ και στις γόνιμες γυναίκες, σύμφωνα με το GLM test....σελ.152
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-10: Ραβδόγραμμα (bar chart) σχετικών συχνοτήτων των επιπέδων του TNF-α στην ομάδα μελέτης και στην ομάδα ελέγχου, σύμφωνα με το Fisher's exact test.....σελ.153
ΓΡΑΦΗΜΑ 12-11: Ραβδόγραμμα (bar chart) των μέσων τιμών του TNF-α (pg/ml) στις δύο ομάδες σε συσχέτιση με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού -238G/A.....σελ.155

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αντσακλής Αρ.Μαιευτική και Γυναικολογία, εκδ.Παρισιάνου ΑΕ 2008.

Βραχνής ΝΔ.Μαιευτικά Επείγοντα, εκδ. Λίτσας 2014.

Κρεατσάς ΓΚ.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Τόμος Ι: Γυναικολογία, 2η έκδοση, εκδ.ΠΧ Πασχαλίδης ΕΠΕ 2009.

Κρεατσάς ΓΚ.Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, Τόμος ΙΙ: Μαιευτική, 2η έκδοση, εκδ.ΠΧ Πασχαλίδης ΕΠΕ 2009.

Μαρόπουλος Μ, Φαρμακίδης Γ.Εμβρυομητρική Ιατρική, εκδ.University Studio Press 1996

Μπόντης ΙΝ.Βασικές Γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας, εκδ.University Studio Press 2007

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fet & Neon Med* 2006;11:279-295.

Aarli A, Matre R. Suppression of immunoglobulin secretion by soluble annexin II. *Scand J Immunol* 1998;48:522-526.

Arslan E, Çolakoğlu M, Çelic Ç, Gezginç K, Acar A, Çapar M, Aköz M, Akyürek C. Serum TNF- α , IL-6, lupus anticoagulant and anticardiolipin antibody in women with and without a past history of recurrent miscarriage. *Arch Gynecol Obstet* 2004;270:227-229.

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, Martin R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 2008;19:1-8.

Ashkar AA, Croy BA. Interferon gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 1999;61:493-502.

Azizieh FY, Raghupathy RG. Tumor Necrosis Factor- α and Pregnancy Complications: A Prospective study. *Med Princ Pract* 2015;24:165-170.

Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Hum Reprod* 2002;17:2439-2444.

Baxter N, Sumiya M, Cheng S, Erlich H, Regan L, Simons A, Summerfield JA. Recurrent miscarriage and variant alleles of mannose binding lectin, tumour necrosis factor and lymphotoxin- α genes. *Clin Exp Immunol* 2001;126:529-534.

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-1725.

Benirschke K, Kaufmann P, Baergen NR. *Pathology of the Human Placenta*. 5th edition, publ. Springer 2006.

Beydoun H, Safflas AF. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2005;65:123-135.

Billington WD. Influence of immunological dissimilarity of mother and foetus on size of placenta in mice. *Nature* 1964;202:317-318.

Bo EL, Young JJ, Ji ES, Ji HK, Dong HC, Yong WJ, Sung HS, Woo SL, Nam KK. Tumor Necrosis Factor- α Gene Polymorphisms in Korean Patients With Recurrent Spontaneous Abortion. *Reprod Sci* 2012;20:408-413.

Bonilla AF, Oettgen CH. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clin Immunol* 2010;125:33-40.

Bottomley C, Bourne T. Diagnosing miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2009;23:463-477.

Bulmer JN and Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005;42:511-521.

Calleja-Agius J, Jauniaux E, Muttukrishna S. Placental Villous Expression of TNF α and IL-10 and Effect of Oxygen Tension in Euploid Early Pregnancy Failure. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:515-525.

Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:591-597.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss III JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009;16:206-215.

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expression at the materno-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002;53:241-256.

Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy and Clin Immunol* 2010;125:3-23.

Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Inflammation and miscarriage. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:302-308.

Chu FS. Immunoassays / Radioimmunoassay and Enzyme Immunoassay. *Encycl Food Sc Nutr* 2003;3248-3255.

Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. Cutting edge: cytokine dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase. *J Immunol* 1998;160:545-549.

Clark DA, Arck PC, Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:5-22.

Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997;12:387-389.

Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, Puppo F. Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8-cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003;33:125-134.

Crowther JR. The ELISA Guidebook. New Jersey. Humana Press Inc. 2008.

Cruvinel W de Melo, Mesquita DJ, Pereira AJA, Takao CTT, Silva de Souza AW, Pereira da Silva N, Coelho ALE. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Brazil J Rheum* 2010;50: 434-461.

Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. Williams Obstetrics, 23rd edition, publ. McGraw Hill Companies 2010.

Daher S, Fonseca F, Ribeiro OG, Musatti CC, Gerbase-Delima M. Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. *Eur J Obst & Gyn and Reprod Biol* 1999;83:77-79.

Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic Polymorphisms and Recurrent Spontaneous Abortions: An Overview of Current Knowledge. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:341-347.

Decherney AH, Nathan L, Laufer N, Roman AS. *Current Diagnosis and Treatment: Obstetrics and Gynecology*, 11th edition, publ. McGraw-Hill Companies 2007.

El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally AE, Hashem IA, Bakry N. Serum levels of TNF-alpha and antioxidant enzymes and placental TNF-alpha expression in unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *J Physiol Biochem* 2009;65:175-181.

Farag SS, Fehniger AT, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri AM. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-1947.

Ghares-Fard B, Zolghadri J, Kamali-Sarvestani E. Effect of Leucocyte Therapy on Tumor Necrosis-Alpha and Interferon –Gamma Production in Patients with Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:242-250.

Geller AM, Miller SJ. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:1445-1459.

Gleicher N. Some thoughts on the reproductive autoimmune failure syndrome (RAFS) and Th-1 versus Th-2 immune responses. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:252-254.

Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?. *Hum Reprod Update* 2009;15:517-535.

Hallett HDW, Murphy JW. *Natural Killer Cells: Biology and Clinical Use in Cancer Therapy*. *Cellul and Mol Immun* 2004;1:12-21.

Hodgkinson Alan, Eyre-Walker Adam. "Human Triallelic Sites: Evidence for a New Mutational Mechanism?". *Genetics* 2009;1.

Finan RR, Al-Irhayim Z, Mustafa FE, Al-Zaman I, Mohammed FA, Al-Khateeb GM, Madan S, Issa AA, Almawi WY. Tumor necrosis factor- α polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2010;84:186-192.

Gücer F et al. Maternal serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-2 receptor in threatened abortion: a comparison with normal and pathologic pregnancies. *Fert Ster* 2001;76:707-711.

Haider S, Knofler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009;30:111-123.

Hill JA et al. T-helper 1-type immunity trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J Am Med Assoc* 1995;273:1933-1936.

Hodgkinson Alan, Eyre-Walker Adam. Human Triallelic Sites: Evidence for a New Mutational Mechanism?. *Genetics* 2009;1.

Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006;12:747-755.

Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21:2216-2222.

Joncker TN, Raulet HD. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunol Reviews* 2008;224:85-97.

Johnson PM, Risk JM, Mwenda JM. Human trophoblast expression of retroviral like activity and CD46 (membrane cofactor protein, Hu Ly-m5 and H316 TLX antigen). In Metler L, Billington WD (Eds), *Reproductive Immunology*. Elsevier, Amsterdam 1990, pp 125-131.

Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Ghareesi-Fard B, Sarvari J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Reprod Immunol* 2005;65:171-178.

Kamoi M, Fukui A, Joanne KK, Kohei F, Funamizu A, Chiba H, Yokota M, Fukuhara R, Mizunuma H. NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *Am J Reprod Immunol* 2015;73:557-567.

Kjersti MAT, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fet & Neon Med* 2006;11:279-295.

King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, Burrows TD, Loke YW. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cells receptors – a review. *Placenta* 2000;21:S81-85.

Kirby DR. The egg and immunology. *Proc R Soc Med* 1970;63:59-61.

Kohchi C, Noguchi K, Tanabe Y, Mizuno DJ, Soma GI. Constitutive expression of TNF- α and - β genes in mouse embryo: Roles of cytokines as regulator and effector on development. *Int J Biochem* 1994;26:111-119.

Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2015;30:777-782.

Krzewski K, Strominger LJ. The Killer's Kiss: The many functions of NK cell immunological synapses. *Current Opinion in Cell Biology* 2008;20:597-605.

Kwiatek M, Gęca T, Krzyzanowski A, Malec A, Kwasniewska A. Peripheral Dendritic and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the First Trimester of Normal Pregnancy and in Women with Recurrent Miscarriage. *PLoS ONE* 2015;10(5):e0124747.

Lanshley E ELO, Meuleman T, Claas FHJ. Beneficial or harmful effect of antipaternal Human Leucocyte Antibodies on pregnancy outcome. A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 2013;70:87-103.

Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod* 2004;19:1644-1646.

Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Medicine*. 2013;11:154-163.

Le Bouteillerr P, Solier C. Is antigen presentation the primary function of HLA-G? *Microbes Infect* 2001;3:323-332.

Lee SK, Na BJ, Kim JY, Hur SE, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2013;70:398-411.

Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005;51: 2415-2418.

Li HH, Xu XH, Tong J, Zhang KY, Zhang C, Chen ZJ. Association of TNF- α genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2016;14(6).

Li XF, Charnosk-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K. et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1823-1834.

Liu RX, Wang Y, Wen LH. Relationship between cytokine gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Int J Exp Med* 2015;8:9786-9792.

Lindstrom MT, Robinson HW. Rheumatoid Arthritis: A Role for Immunosenescence? *Am J Geriatr Soc* 2010; 58:1565-1575.

Liu C, Wang J, Zhou S, Wang B, Ma X. Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. *Reprod Biol & Endocrin* 2010;8:114.

Lunemann A, Lunemann DJ, Munz C. Regulatory NK-Cell Functions in Inflammation and Autoimmunity. *Mol Med* 2009;15:352-358.

Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2000;15:2011-2017.

Makrigiannakis A, Margioris AN, Zoumakis E, Stournaras C, Gravanis A. The transcription of corticotropin-releasing hormone in human endometrial cells is regulated by cytokines. *Neuroendocrin* 1999b;70:451-459.

Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, Relakis K, Jeschke U. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011;90:96-104.

- Malhotra A, Shanker A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy* 2011;3:1143-1166.
- Mallmann P, Mallmann R, Krebs D. Determination of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 2 (IL 2) in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Arch Gynecol Obstet* 1991;249:73-78.
- Marquard K, Wetpal LM, Milki AA, Lathi RB. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertil Steril* 2010;94:1473-1477.
- Merel MJ van den Berg, Merel C, Madelon van Wely, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1822:1951-1959.
- Moatsou G, Anifantakis E. Recent developments in antibody based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *Int J Dairy Technol* 2003;56:133-138. Moffett A, Regan L, Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ* 2004;329:1283-1285.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-1193.
- Palmirotta R, La Farina F, Ferroni P, Ludovici G, Nigro C, Savonarola A, Raparelli V, Riondino S, Rampini MR, Guadagni F, Basili S. TNFA Gene Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Recurrent Pregnancy Loss in Italian Women. *Reprod Scienc* 2010;17:659-666.
- Pietrowski D, Bettendorf H, Keck C, Bürkle B, Unfried G, Riener EK, Hefler LA, Tempfer C. Lack of association of TNFalpha gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Caucasian women. *J Reprod Immunol* 2004;61:51-58.
- Piosik ZM, Goegebeur Y, Klitkou L, Steffensen R, Christiansen OB. Plasma TNF- α Levels are Higher in Early Pregnancy in Patients with Secondary Compared with Primary Recurrent Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2013;70:347-358.
- Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:36-41.
- Raghupathy R. TH1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-482.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15:713-718.
- Robey E, Schlissel M. Lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 2003;15:155-157.
- Rocca B, FitzGerald AG. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharm* 2002;2:603-630.
- Romagnani P, Annunziato F, Piccinni M, Maggi E, Romagnani S. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:510-511.

Romero R, Manogue KH, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A. Infection and labor. IV Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:336-341.

Saugiura-Ogasawara M. Recurrent pregnancy loss and obesity. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2015;29:489-497.

Saito S, Nakashima A, Shima T. Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies. *J Reprod Immunol* 2011;90:91-95. .

Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2008;77:14-22.

Saravelos SH, Regan L. The importance of preconception counseling and early pregnancy monitoring. *Semin Reprod Med* 2011;29:557-568.

Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Betaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992;267:5317-5323.

Schuurs AHW, van Weemen BK. Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool [Review]. *J Immunoassay* 1980;1:229-249.

Seaman EW. Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthr and Rheum* 2000;43:1204-1217.

Sentruk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Reprod Immunol* 1998;39:144-151.

Sergi C, Jishi TAI, Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Arch Gynecol Obstet* 2015;291:671-679.

Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;152:4903-4911.

Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend orFoe? *Scien World Journal* 2012;1 – 10.

Solier C, Aguerre-Girr M, Lenfant F, Campan A, Berrebi A, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Le Bouteiller P. Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* 2002;32:3576-3586.

Speroff L, Fritz M. *Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility*, 7th ed, publ.Lippincott-Williams & Wilkins 2005.

Stonek F, Bentz EK, Hafner E, Metzenbauer M, Philipp K, Hefler LA, Tempfer CB. A Tumor Necrosis Factor- α Promoter Polymorphism and Pregnancy Complications: Results of a Prospective Cohort Study in 1652 Pregnant Women. *Reprod Scien* 2007;14:425-429.

Sugiura-Ogasawara M. Recurrent pregnancy loss and obesity. *Best Pract & Res Clin Obs and Gynaecol* 2015;29:489-497.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Management of recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:1174-1179.

Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T. Frequency of recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: the Okazaki Cohort Study in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:126-131.

Tarlinton D. B-cell differentiation in the bone marrow and the periphery. *Immunol Rev* 1994;137:203-229.

Terranova PF, Hunter VJ, Roby KF, Hunt JS. Tumor necrosis factor- α in the female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;209:325-342.

Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicol* 2003;185:179-184.

The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1103-1111.

Toder V, Fein A, Carp H, Torchinsky A. TNF- α in Pregnancy Loss and Embryo Maldevelopment: A Mediator of Detrimental Stimuli or a Protector of the Fetoplacental Unit?. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:73-81.

Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, Makrigiannakis A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 2010;85:25-32.

Varla-Leutherioti M, Keramitsoglou T, Spyropoulou-Vlachou M, Papadimitropoulos M, Kontopoulpou-Antonopoulou V, Tsekoura C et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report from the reproductive immunology component. *Tissue Antigens* 2007;69:297-303.

Verma S, King A, Loke YW. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural cells. *Eur J Immunol* 1997;27:979-983.

Vivier E, Raulet HD, Moretta A, Caligiuri AM, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama MW, Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 2011;331:44-49.

Voigt HJ, Steib L. Tumor necrosis factor and pregnancy – a contribution to the immunology of reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 1989;246:223-226).

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H. Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion: decreased TNF- α levels in abortion with normal chromosome karyotype. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2004;79:237-241.

Walsh PN, Gleeson M, Shephard JR, Gleeson M, Woods AJ, Bishop CN, Fleshner M, Green C, Pedersen KB, Hoffman-Goetz L, Rogers JC, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position statement Part one: Immune function and exercise. *Exercise Immun Rev* 2011;17:6-63.

Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol* 2010;84:164-170.

Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB, Hedegaard M, Secher NJ. A prospective study of maternal smoking and spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:936-941.

Wong LF, Porter TF, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD0001112.

Zhang B, Liu T, Wang Z. Association of tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphisms (-308G/A, -238G/A) with recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2012;73:574-579.

Zhang C, Deng X, Zhang X, Pan Z, Zhao W, Zhang Y, Xiao F, Li F, Wu H, Tan H, Guo P, Yang X. Association between Serum TNF- α Levels and Recurrent Spontaneous Miscarriage: A Meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 2016;75:86-93.

Ηλεκτρονικές Πηγές

www.asrm.com

www.eshre.com

www.rcog.com

www.who.com

www.medscape.com

www.pubmed.com

www.cochranelibrary.com

www.scopus.com

www.panacea.med.uoa.gr

www.e-endocrinology.gr

www.bat.uoi.gr

www.just.edu.gov

www.education-portal.com

www.how-treat.com

www.humanphysiology.wikispaces.com

www.eugonia.com

www.bosterbio.com

www.rasayanika.com

www.elisa-antibody.com

www.thermofisher.com

www.molecular-devices.com

www.abnova.com