



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
&
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»**

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Διερεύνηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 15 στο ωοθυλακικό υγρό και της
επίδρασης αυτών στην ωρίμαση των ωαρίων»

Όνομα μεταπτυχιακής φοιτήτριας : Σπανού Σοφία
Ιδιότητα : Βιολόγος
Α.Μ. : 20120234

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Μαστοράκος Γεώργιος
2. Σφοντούρης Ιωάννης
3. Γαζούλη Μαρία

Αθήνα, 2017

Ευχαριστίες

Πριν ξεκινήσω, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω πολύ, όσους με βοήθησαν στη διεκπεραίωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου, Καθηγητή Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μαστοράκο Γεώργιο, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου. Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου, την κα Γαζούλη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών και τον Δρ. Σφοντούρη Ιωάννη, Κλινικό Εμβρυολόγο, για την όλη τους βοήθεια.

Τον Χημικό – Κλινικό Εμβρυολόγο κο Δημήτρη Καλογιάννη για την όλη καθοδήγησή του, την Κλινική Εμβρυολόγο κα Τσανγκάλοβα Γκάλια και τον Γυναικολόγο – Μαιευτήρα κο Μερύδη Ελευθέριο για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τους φίλους μου Τσατά Βάνια, Πούλου Δήμητρα, Ευαγγέλου Θωμά και τις αδερφές μου Μαρία και Σταματία για την ηθική υποστήριξη και ενθάρρυνσή τους καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να τιμήσω τον εκλιπόντα κύριο Ευθύμιο Ιππικόγλου για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου.

Περίληψη

Η μελέτη αυτή διεξήχθη για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό (FF) και να διερευνηθεί η συσχέτισή τους με την ωριμότητα των ωαρίων, το μέγεθος των ωοθυλακίων, το δείκτη σωματικής μάζας (BMI) και την ηλικία των ασθενών. Δείγματα ωοθυλακικού υγρού ελήφθησαν κατά την ωοληψία από 56 υπογόνιμες γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI). Οι συγκεντρώσεις της IL-15 μετρήθηκαν με την ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA. Η δοκιμασία Wilcoxon και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση των συγκεντρώσεων της IL-15 στο FF με το στάδιο ωρίμανσης των ωαρίων, το μέγεθος των ωοθυλακίων, το BMI και την ηλικία των ασθενών. Οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο FF των ωοθυλακίων με ανώριμα ωοκύτταρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές των ωοθυλακίων με ώριμα (διάμεσος: 5.333 pg / ml έναντι 3.250 pg / ml, αντίστοιχα, $p < 0.001$). Υπήρξε επίσης μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της IL-15 και του μεγέθους των ωοθυλακίων ($r = -0,333$, $p = 0,003$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της IL-15 και του BMI των ασθενών και την ηλικία τους. Συμπερασματικά, οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται αρνητικά με το μέγεθος των ωοθυλακίων και την ωριμότητα των αντίστοιχων ανακτώμενων ωοκυττάρων μετά από ICSI. Οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό πρέπει να διερευνηθούν ως πιθανός παράγοντας πρόβλεψης για την επάρκεια των ωαρίων.

«Interleukin 15 levels in follicular fluid and their effect on oocyte maturation»

Abstract

This study was undertaken to determine the levels of IL-15 in follicular fluid (FF) and investigate their relation with oocyte maturity and secondarily with follicle size, as well as patients' BMI and age. Follicular fluid specimens were obtained from 56 subfertile women undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) during oocyte retrieval and IL-15 concentrations were calculated with ELISA. Wilcoxon's test and Pearson's correlation coefficient were used to correlate FF concentrations of IL-15 with follicular size and stage of oocyte maturation, along with patients' BMI (Body Mass Index) and age. IL-15 concentrations in FF of follicles with immature oocytes were significantly higher than those from follicles with mature ones (median: 5,333 pg/ml vs. 3,250 pg/ml, respectively, $p < 0,001$). There was also a significant negative correlation between IL-15 concentration and follicle size ($r = -0,333$, $p = 0,003$). No correlation was observed between IL-15 concentrations and patients' BMI and age. In conclusion, IL-15 follicular concentrations are adversely related with the maturity and size of the retrieved oocytes after ICSI. Follicular fluid IL-15 concentrations appear to be a promising predictive factor for oocyte competence.

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ	6
1.1 Δομή γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος	6
1.1.1 Μήτρα	6
1.1.2 Σάλπιγγες	7
1.1.3 Ωothήκες	7
1.2 Ωογένεση – Ωοθυλακιογένεση – Ωοθυλακικός κύκλος	8
1.2.1 Ωογένεση	8
1.2.2 Ωοθυλακιογένεση – Ωοθυλακικός κύκλος	9
1.2.2.1 Γενικά	9
1.2.2.2 Αρχέγονο ωοθυλάκιο	11
1.2.2.3 Πρωτογενές ωοθυλάκιο	13
1.2.2.4 Δευτερογενές ωοθυλάκιο	14
1.2.2.5 Πρωοθυλακιορρηκτικό (γραφιανό) ωοθυλάκιο	15
1.2.2.6 Ωοθυλακιορρηξία	18
1.2.2.7 Ωχρο σωματίο	19
1.3 Ωρίμαση ωοκυττάρου	19
1.3.1 Γενικά	19
1.3.2 Στάδια ωρίμασης	22
1.4 Ωοθυλακικό υγρό	26
2. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	29
2.1 Γενικά	29
2.2 Ενδείξεις ART	29
2.3 Ωοθηκική διέγερση	30
2.4 Ωοληψία	30
3. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΕΣ	32
3.1 Κυτοκίνες	32
3.1.1 Λειτουργίες κυτοκινών	32
3.2 Ιντερλευκίνες	35
3.3 Ιντερλευκίνη 15 (IL-15)	36
3.3.1 Γενικά	36
3.3.2 Έκφραση	38
3.3.3 Γονίδιο	38
3.3.4 Λειτουργία	40

3.3.5 Ρόλος της IL-15 στο ενδομήτριο	43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	45
5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	46
5.1 Αρχή μεθόδου ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	46
5.1.1 ELISA τύπου Sandwich	48
5.2 Υλικό	49
5.3 Πρωτόκολλο ωοληψίας	49
5.4 Συλλογή ωοθυλακικού υγρού	50
5.5 Αξιολόγηση της ωριμότητας των ωαρίων	50
5.6 Μέτρηση της συγκέντρωσης της IL-15	50
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	55
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	59
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ

1.1 Δομή γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τα εσωτερικά και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα και είναι σχεδιασμένο για να επιτελεί πολλές και διαφορετικές λειτουργίες της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι ανώριμο κατά τη γέννηση και ωριμάζει κατά την εφηβεία για να είναι σε θέση να παράγει τους θηλυκούς γαμέτες και να κυοφορήσει το έμβρυο μέχρι το τελικό στάδιο.

Τα εσωτερικά γεννητικά όργανα βρίσκονται στην πύελο και περιλαμβάνουν τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες, τον τράχηλο, τη μήτρα και τον κόλπο. Η μήτρα φιλοξενεί το έμβρυο μέχρι το τελικό στάδιο. Η μήτρα παράγει επίσης κολπικές εκκρίσεις που βοηθούν στη διέλευση του σπέρματος προς τις σάλπιγγες. Οι ωοθήκες παράγουν τα ωάρια. Σε ορισμένα χρονικά διαστήματα οι ωοθήκες απελευθερώνουν ένα ωάριο το οποίο περνά μέσα από τη σάλπιγγα στη μήτρα. Η γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζωάριο συνήθως συμβαίνει στις σάλπιγγες και συγκεκριμένα στη λήκυθο των σαλπίγγων και σηματοδοτεί την έναρξη της εμβρυογένεσης. Το ζυγωτό τότε θα διαιρεθεί πολλές φορές ώσπου να σχηματιστεί η βλαστοκύστη, η οποία εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας. Αυτό το γεγονός ξεκινάει την περίοδο της κύησης. Όταν το κύημα έχει αναπτυχθεί αρκετά για να επιβιώσει εκτός της μήτρας, ο τράχηλος διαστέλλεται και με συστολές της μήτρας το κύημα ωθείται προς τον κόλπο.

Εάν η γονιμοποίηση δεν επιτευχθεί, το σύστημα είναι σχεδιασμένο για τη διαδικασία της εμμηνορρυσίας, τη μηνιαία δηλαδή αποβολή του ενδομητρίου. Επιπλέον το γυναικείο γεννητικό σύστημα παράγει τις ορμόνες οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση του αναπαραγωγικού κύκλου.

1.1.1 Μήτρα

Η μήτρα είναι ένα κοίλο όργανο σε σχήμα αχλαδιού. Η θέση της στη κοιλιακή χώρα είναι μέσα στην πύελο, μεταξύ της ουροδόχου κύστεως και του ορθού. Αποτελείται από τρία μέρη, αναφορικά από πάνω προς τα κάτω είναι: ο πυθμένας της μήτρας, το σώμα και ο τράχηλος.

Μεταξύ του πυθμένα και του σώματος της μήτρας ξεκινούν δεξιά και αριστερά οι δύο σάλπιγγες. Ο τράχηλος της μήτρας προβάλλει μέσα στον κόλπο. Φυσιολογικά η μήτρα έχει κλίση προς τα εμπρός (πρόσθια κλίση). Παρατηρείται όμως σε κάποιες γυναίκες να έχει κλίση προς τα πίσω (οπίσθια κλίση) ή σε άλλες να έχει ευθύ σχήμα, χωρίς κλίση (ευθυορία), χωρίς όμως αυτό να δηλώνει την παρουσία παθολογίας. Στο εσωτερικό της μήτρας υπάρχει μια κοιλότητα που ονομάζεται ενδομήτριο. Το πάχος του ενδομητρίου αλλάζει κατά τη διάρκεια του κύκλου, λόγω της επίδρασης των ορμονών και μπορεί να είναι από 1mm (στην αρχή του κύκλου) έως και 12-13mm (στο τέλος του κύκλου, λίγο πριν την έναρξη της περιόδου). Το ενδομήτριο είναι η κοιλότητα που εμφυτεύεται και στη συνέχεια αναπτύσσεται το έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης.

1.1.2 Σάλπιγγες

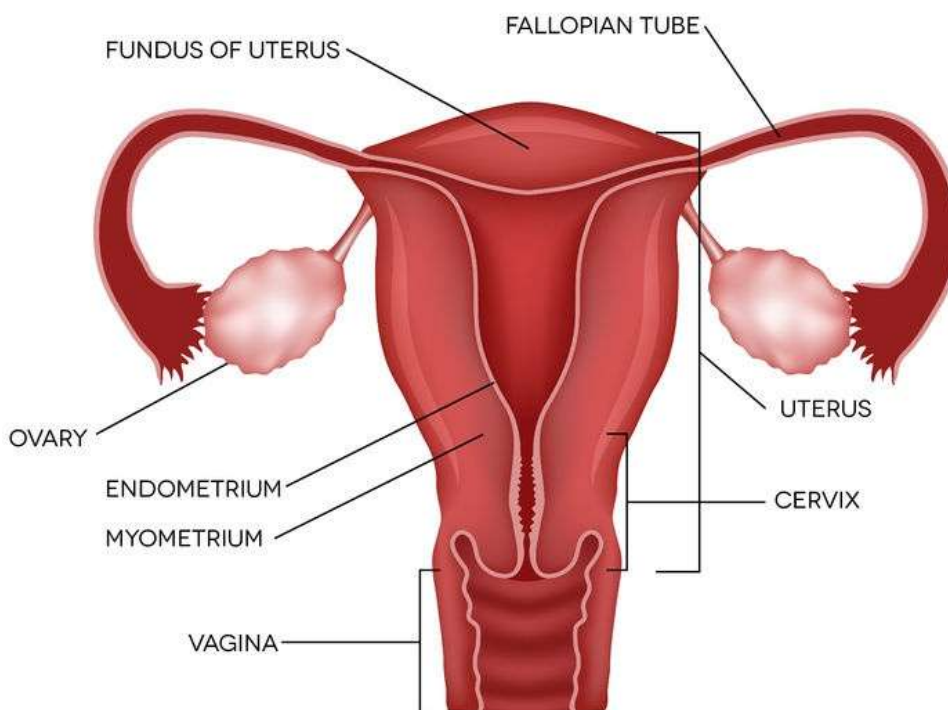
Οι σάλπιγγες είναι δυο λεπτεπίλεπτοι αγωγοί μήκους 10-12 εκ. περίπου η κάθε μία. Ξεκινούν δεξιά και αριστερά από τον πυθμένα της μήτρας (κέρας της μήτρας) και εκβάλουν μέσα στην κοιλιά σε επαφή με τις ωοθήκες. Η σάλπιγγα είναι το σημείο συνάντησης του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.

1.1.3 Ωοθήκες

Οι ωοθήκες είναι μέρος των έσω γεννητικών οργάνων της γυναίκας οι οποίες βρίσκονται στην ελάσσονα πύελο, μεταξύ του πυελικού τοιχώματος και της μήτρας και αποτελούν τους γεννητικούς αδένες. Αντιστοιχούν στους όρχεις του άνδρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή. Έχουν σχήμα αμυγδαλοειδές και οι διαστάσεις ποικίλουν σημαντικά σύμφωνα με την ηλικία και τη φάση του κύκλου. Η θέση τους είναι δεξιά και αριστερά της μήτρας και ενώνονται με την άκρη των σαλπίγγων. Οι ωοθήκες περιέχουν περίπου 400.000 ωοθυλάκια, από τα οποία τελικά λίγα θα καταφέρουν να ωριμάσουν και να απελευθερώσουν ένα ωάριο κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας και ονομάζονται γραφιανά. Οι τρεις κυριότερες λειτουργίες των ωοθηκών είναι η ανάπτυξη των ωαρίων μέσα στα ωοθυλάκια, η στήριξη των ωοθυλακίων με ειδικά κύτταρα και η παραγωγή στεροειδών ορμονών.

Σε διατομή, η ωοθήκη εμφανίζει από έξω προς τα μέσα μια στιβάδα αποπλατυσμένου κυβοειδούς έως χαμηλού κυλινδρικού επιθηλίου, φλοιώδη μοίρα και μυελώδη μοίρα.

Η φλοιώδης μοίρα αποτελείται από εξειδικευμένο στρώμα και ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης ή ατρησίας. Εσωτερικά της φλοιώδους μοίρας ο συνδετικός ιστός σχηματίζει το ονομαζόμενο στρώμα της ωοθήκης, όπου υπάρχουν τα κοκκώδη κύτταρα. Η μυελώδης μοίρα καταλαμβάνει ένα μικρό τμήμα της ωοθήκης. Αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία που εισέρχονται εκεί από τον κρεμαστήρα σύνδεσμο, ο οποίος καταφύεται στο πάνω μέρος της ωοθήκης.



Εικόνα 1: Αναπαράσταση γυναικείου εσωτερικού αναπαραγωγικού συστήματος

1.2 Ωογένεση - Ωοθυλακιογένεση – Ωοθυλακικός κύκλος

1.2.1 Ωογένεση

Στα θηλυκά έμβρυα, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα που περιέχουν δύο X χρωμοσώματα μεταναστεύουν από τη γοναδική ακρολοφία στην αρχέγονη γονάδα και αποτελούν τα ωογόνια (Briggs *et al.*, 1999). Οι φυλετικές χορδές συμπυκνώνονται σε μικρές συστάδες γύρω από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και αυτές οι συστάδες κυττάρων ξεκινούν το σχηματισμό των αρχέγονων ωοθυλακίων.

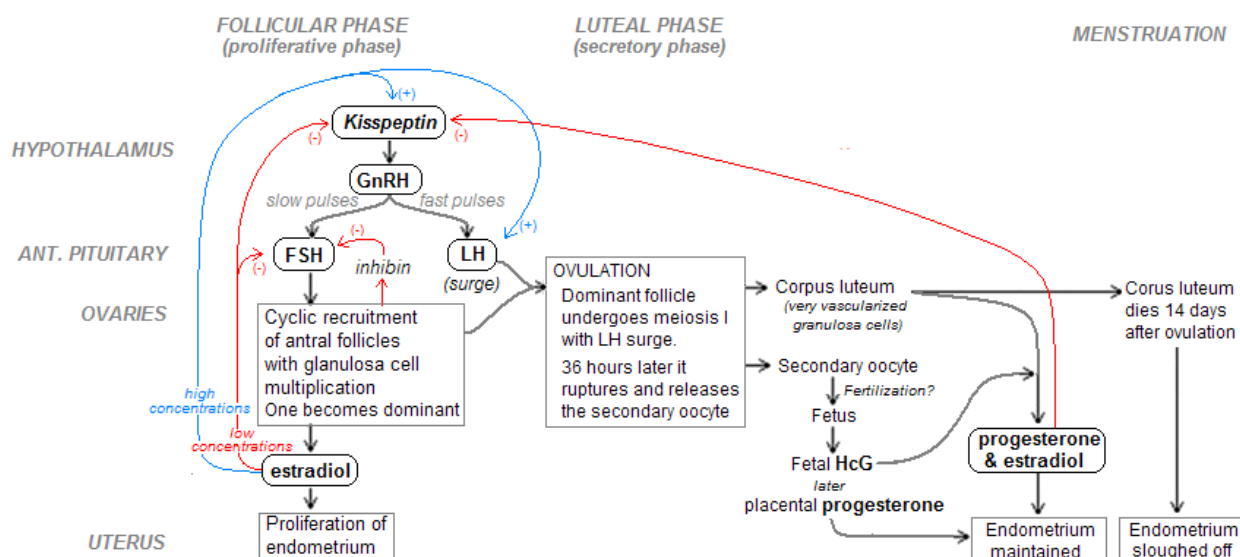
Κύτταρα των φλοιακών γεννητικών χορδών θα σχηματίσουν τα σωματικά συστατικά του ωοθυλακίου: κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα θήκης, ενδοθηλιακά κύτταρα και υποστηρικτικό συνδετικό ιστό. Όταν φθάσουν τη γοναδική ακρολοφία, περίπου την 25η με 30η μέρα, τα ωογόνια αρχίζουν να αναπαράγονται με μίτωση για περιορισμένη περίοδο. Κύτταρα από το μεσόνεφρο εισβάλουν για να σχηματίσουν το μυελό της ωοθήκης, πιέζοντας τα γεννητικά κύτταρα προς το φλοιό των ωοθηκών. Τα ωογόνια ξεκινούν να μπαίνουν στην πρώτη μειωτική διαίρεση περί τη δωδέκατη εβδομάδα της κύησης, κατά το τέλος του πρώτου τριμήνου. Στους ανθρώπους ο αριθμός των ωογονίων εκτιμάται ότι θα αυξηθεί από ένα σύνολο περίπου 600.000 στις 8 εβδομάδες σε ένα μέγιστο 6-8 εκατομμύρια στις 16-20 εβδομάδες (Baker και Sum, 1976). Στο στάδιο αυτό γίνονται πρωτογενή ωοκύτταρα και δεν αναπαράγονται περαιτέρω με μίτωση (Makabe *et al.*, 1991; Motta *et al.*, 1995, 1997a,b; Guraya, 2008). Τα ωοκύτταρα που δεν ενσωματώνονται σε ωοθυλάκια εκφυλίζονται και έτσι ο αριθμός των ωοκυττάρων μειώνεται τότε σε περίπου 1-2 εκατομμύρια κατά τη γέννηση (Baker TG, 1982; Netter, 1993; Suganuma *et al.*, 1993), οπότε η ωοθήκη κατέχει το σύνολο των ωοκυττάρων της. Αφού τα ωογόνια εισέλθουν στη μείωση I, ηρεμούν στο στάδιο της διπλοταινίας, το τελευταίο στάδιο της πρόφασης I, αφού η ανταλλαγή των χρωματίδων και η διακίνηση έχουν λάβει χώρα (Guraya, 2008). Τα χρωμοσώματα διασκορπίζονται και εμφανίζονται ως ορατά χρωμοσωμικά νήματα συσκευασμένα μέσε σε ένα μεγάλο πυρήνα, το βλαστικό κυστίδιο (GV). Το στάδιο της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης εμφανίζεται περίπου στις 9-10 εβδομάδες και τα χρωμοσώματα στο στάδιο της διπλοταινίας εμφανίζονται περίπου στις 16 εβδομάδες, κατά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Motta *et al.*, 1995, 1997a,b; Fauser *et al.*, 1999). Τα ωάρια παραμένουν σε στάδιο ηρεμίας μέχρι την έναρξη των ωοθυλακιορρηκτικών κύκλων κατά την εφηβεία.

1.2.2 Ωοθυλακιογένεση – Ωοθυλακικός κύκλος

1.2.2.1 Γενικά

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι μια διαρκής διαδικασία που ξεκινά κατά την ενδομήτρια ζωή μέχρι και μετά την εμμηνόπαυση. Η φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας εξαρτάται από τις ορμόνες του άξονα «Υποθάλαμος - Υπόφυση - Ωοθήκες», οι οποίες διαμορφώνουν ένα κυκλικό ρυθμό. Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις: την

ωοθυλακική ή παραγωγική και την ωχρινική ή εκκριτική. Οι δύο αυτές φάσεις χωρίζονται από την ωοθυλακιορρηξία περίπου στο μέσο του κύκλου. Η ωοθυλακική φάση χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη και ωρίμαση του επικρατούντος ωοθυλακίου, ενώ η ωχρινική από το σχηματισμό του ωχρού σωματίου.



Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής του ορμονικού ελέγχου του ωοθυλακικού κύκλου.

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος ρυθμίζεται από μια ορμόνη που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, την GnRH. Αυτή η ορμόνη εκκρίνεται κατά ώσεις και ρυθμίζει τη σύνθεση των γοναδοτροπινών FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη) και LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Οι γοναδοτροπίνες συμβάλλουν στην ωρίμαση του επικρατούντος ωοθυλακίου, προκαλούν την ωοθυλακιορρηξία και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των μεταβολών είναι η απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου, που είναι έτοιμο για γονιμοποίηση και η παραγωγή των ωοθηκικών στεροειδών οιστραδιόλη και προγεστερόνη.

Η ωοθυλακιόγνεση αποτελείται από μία πολύπλοκη σειρά αλληλένδετων, ιδιαίτερα συντονισμένων εκδηλώσεων, συμπεριλαμβανομένων της επιστράτευσης του αρχέγονου ωοθυλακίου, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης, της ωρίμασης του ωοκυττάρου, της στεροειδογένεσης και της ωορρηξίας (Richards *et al.*, 1987; Richards and Hedin, 1988; McLaughlin and McIver, 2009). Κάθε ένα από αυτά τα στάδια περιλαμβάνει μια παρακρινή αλληλεπίδραση μεταξύ του ωοκυττάρου και των στρωμάτων των κοκκωδών και των

κυττάρων της θήκης, που επιτυγχάνονται κυρίως από μια εκτενή παράταξη των ορμονών και των κυτοκινών (Eppig, 1985, 2001; Richards and Hedin, 1988; Buccione *et al.*, 1990; Oktay *et al.*, 2000; Skinner, 2005; Su *et al.*, 2008; Wigglesworth *et al.*, 2013). Η ωχρινοποίηση ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής των ωοθυλακίων, παρέχοντας ορμονική στήριξη για την μετέπειτα εμφύτευση και τα πρώιμα στάδια της κύησης (Devoto *et al.*, 2009; Öktem and Urman, 2010).

Υπάρχουν δύο τύποι κυττάρων στο ωοθυλάκιο τα οποία ειδικεύονται στην παραγωγή ορμονών, τα κύτταρα της θήκης και τα κοκκώδη κύτταρα. Αν και διαχωρίζονται μέσω μιας βασικής μεμβράνης, σχηματίζουν μία λειτουργική μονάδα στο ωοθυλάκιο. Οι ορμόνες που παράγονται στα ωοθυλάκια ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες. Ξεκινώντας με τη χοληστερόλη αυτές σχηματίζονται μέσω ενός καταρράκτη χημικών βημάτων (τα κύτταρα της θήκης και τα κοκκώδη κύτταρα έχουν υποδοχείς χοληστερόλης). Η μετατροπή από τη χοληστερόλη μέσω της προγεστερόνης σε ανδροστενδιόλη λαμβάνει χώρα στα κύτταρα της θήκης και διεγείρεται από την LH. Εφόσον η προγεστερόνη ως ενδιάμεσο βήμα δεν μεταβολίζεται πλήρως σε ανδροστενδιόλη, τα κύτταρα της θήκης δίνουν επίσης ποικίλες ποσότητες προγεστερόνης. Ακολουθεί η μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη στα κοκκώδη κύτταρα. Η ανδροστενδιόνη που έχει σχηματιστεί στα κύτταρα της θήκης διαχέεται διαμέσου της βασικής μεμβράνης στα κοκκώδη κύτταρα. Μέσω υποδοχέων στα κοκκώδη κύτταρα η FSH διεγείρει το ένζυμο αρωματάση, που υπάρχει σε αυτά, για να αρχίσει μια χημική αντίδραση που μετατρέπει την ανδροστενδιόλη σε οιστραδιόλη. Έτσι η σύνθεση της οιστραδιόλης βρίσκεται κάτω από τον διπλό έλεγχο των FSH και LH. Στα ωοθυλακικά κύτταρα η LH επηρεάζει τα πρώτα βήματα και η FSH τα τελευταία.

Η αλληλουχία σύνθεσης της οιστραδιόλης είναι:

Χοληστερόλη → (δράση της LH) → προγεστερόνη → ανδροστενδιόνη / τεστοστερόνη → (δράση της FSH) → οιστραδιόλη

1.2.2.2 Αρχέγονο ωοθυλάκιο

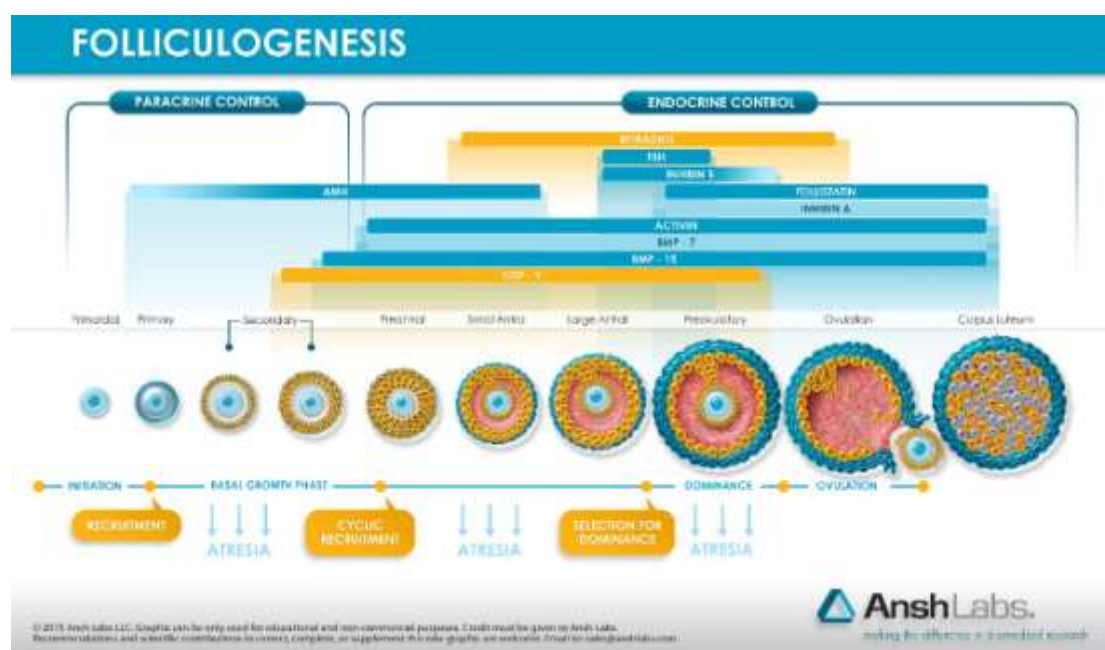
Στους ανθρώπους, τα πρώτα αρχέγονα ωοθυλάκια εμφανίζονται κατά τον τέταρτο μήνα της κύησης και ξεκινούν να αναπτύσσονται περίπου στις 20 εβδομάδες του κύματος, κάτω υπό την επίδραση των γοναδοτροπινών. Σε αυτό το στάδιο τα

ωογόνια είναι ακόμα μιτωτικά ενεργά, πριν σταματήσουν την ανάπτυξη τους στο στάδιο της πρόφασης Ι. Τα προκοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου μπαίνουν σε μια κατάσταση ηρεμίας και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός δεν θα συνεχιστεί ωσότου το αρχέγονο ωοθυλάκιο αρχίσει να αναπτύσσεται, συχνά μήνες ή χρόνια αφότου σχηματίστηκε. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια αρχικά είναι εγκατεστημένα στη μυελώδη μοίρα της ωοθήκης και συνεχίζουν την ανάπτυξή τους στα πιο περιφερειακά τμήματα, στη φλοιώδη μοίρα. Κατά την ανάπτυξη, το ωοθυλάκιο αναπτύσσεται μορφολογικά, αποκτώντας μια εσωτερική θήκη που περιέχει στερεοειδογόνα κύτταρα και μια εξωτερική κυττάρων συνδετικού ιστού που σχηματίζουν τα εξωτερικά στρώματα του. Η βασική μεμβράνη που το περιβάλλει πρέπει είτε να διασταλεί ή να αναδιαμορφωθεί για να προσαρμοστεί στο αυξανόμενο μέγεθός του και γίνεται ένα δυναμικό σύστημα που τρέφει το ωοκύτταρο, ανταποκρινόμενο σε ενδογενείς και εξωγενείς επιδράσεις αυτοκρινείς ή παρακρινείς. Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου ρυθμίζεται από το ίδιο το ωάριο σε συνδυασμό με αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του ωοθυλακίου.

Τα αρχέγονα κύτταρα παραμένουν στο στάδιο ηρεμίας για πάνω από 40 χρόνια (Blandau, 1973), περιμένοντας ένα σήμα για να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους. Μετά την εφηβεία μερικά αρχέγονα ωοθυλάκια στρατολογούνται στη φάση ανάπτυξης κάθε μέρα και αυτά στη συνέχεια περνάνε από τρεις φάσεις ανάπτυξης: πρωτογενές ή προκοιλωτικό, δευτερογενές ή κοιλωτικό, αλλιώς γραφιανό και τέλος προωοθυλακιορρηκτικό. Τα ωοθυλακικά κύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες και επιπλέον προσφέρουν στο ωοκύτταρο φυσική υποστήριξη, θρεπτικά συστατικά, όπως πυροσταφυλικό, μεταβολικές πρόδρομες ουσίες, όπως αμινοξέα και νουκλεοτίδια και άλλα μικρά μόρια.

Η επιστράτευση ωοθυλακίων από την αρχέγονη δεξαμενή είναι μια διαδικασία η οποία θεωρείται ότι οδηγείται από ένα σύμπλεγμα κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων με διαμεσολαβούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ του ωοκυττάρου, των κυττάρων προ-θήκης και των προ-κοκκωδών κυττάρων (Gougeon, 1996; McLaughlin and McIver, 2009). Το προ-κοκκώδη κύτταρο, τα οποία περιβάλλουν τα ωοκύτταρα στα αρχέγονα ωοθυλάκια, εκφράζουν μια σειρά κυτοκινών, όπως ο παράγοντας αρχέγονων κυττάρων (SCF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF-2), και ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF), τα οποία φαίνεται να προωθούν τη μετάβαση από το αρχέγονο στο πρωταρχικό ωοθυλάκιο *in vitro* σε κατσίκες, χάμστερ, ποντίκια, και αρουραίους (Parrott and Skinner, 1999; Nilsson *et al.*, 2002;

Nilsson and Skinner, 2003, 2004; Wang and Roy, 2004; Gougeon *et al.*, 2010; Da Nobrega *et al.*, 2012). FGF-7, που παράγεται από τα κύτταρα προ-θήκης και το ωοκύτταρο, και ο LIF ασκούν θετική ρύθμιση στην έκφραση SCF από τα προ-κοκκώδη κύτταρα και την προώθηση της μετάβασης από τη αρχέγονα ωοθυλάκια στα πρωτογενή στο ποντίκι (Nilsson *et al.*, 2002; Kezele *et al.*, 2005), αν και υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα είδη με βάση συγκριτικές μελέτες. Για παράδειγμα, ο SCF ευνοεί την επιστράτευση από την αρχέγονη δεξαμενή των ωοθυλακίων στους ποντικούς αλλά όχι στα κουνέλια (Packer *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1997; Hutt *et al.*, 2006), ενώ οι χοίροι εκφράζουν SCF καθ' όλη την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Brankin *et al.*, 2004).



Εικόνα 3: Παρακρινικός και ενδοκρινικός έλεγχος της ανάπτυξης του ωοκυττάρου κατά την ωοθυλακιογένεση.

1.2.2.3 Πρωτογενές ωοθυλάκιο

Στην αρχή του κύκλου η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), εκκρινόμενη από την υπόφυση, αυξάνεται και οδηγεί στη διέγερση και επιστράτευση μιας ομάδας ωοθυλακίων. Στους ανθρώπους ο αριθμός των ωοθυλακίων που επιστρατεύονται σε μια δεδομένη στιγμή κυμαίνεται μεταξύ 2 και 30, ανάλογα με την ηλικία. Τα αρχέγονα αυτά ωοθυλάκια αρχίζουν να ωριμάζουν σε αμφότερες τις ωοθήκες και παράγουν σταδιακά αυξανόμενες ποσότητες οιστραδιόλης που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Ως απάντηση, τα επίπεδα της FSH αρχίζουν να μειώνονται. Μεταξύ των FSH και οιστραδιόλης υπάρχει μια πολύ συντονισμένη ρύθμιση. Κάθε

ελάχιστη αύξηση της οιστραδιόλης προκαλεί την άμεση μείωση της έκκρισης της FSH.

Έχουν προταθεί δυο δυνατοί μηχανισμοί για τον τρόπο ρύθμισης της έναρξης της ανάπτυξης του αρχέγονου ωοθυλακίου: α) Η είσοδος στη φάση ανάπτυξης είναι μια προκαθορισμένη διεργασία της ωοθήκης. Τα πρώτα αρχέγονα κύτταρα που εισέρχονται στη φάση ανάπτυξης είναι αυτά που περιέχονται τα πρώτα ωοκύτταρα που εισέρχονται στη μείωση στην ανθρώπινη εμβρυική ωοθήκη, β) Η έναρξη της ανάπτυξης ρυθμίζεται από συγκεκριμένους αυξητικούς παράγοντες ή πεπτίδια.

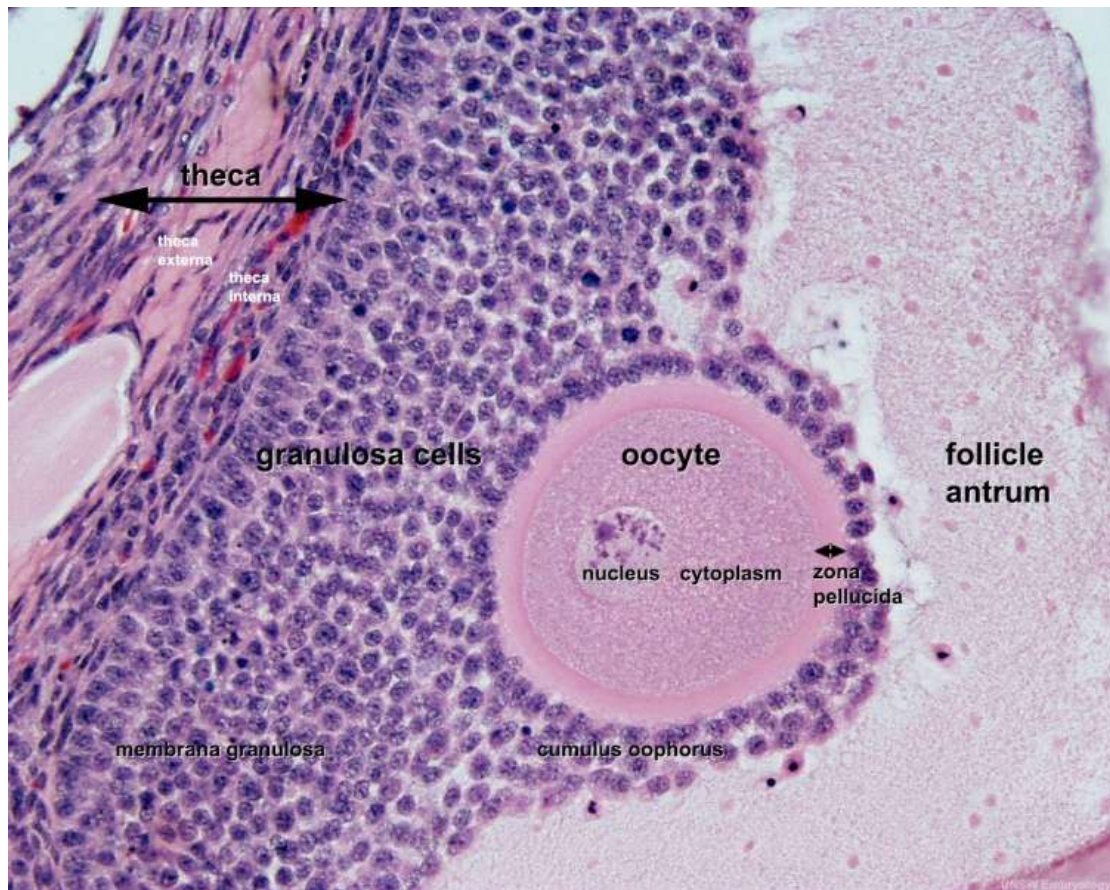
Τα αρχέγονα κύτταρα που εισέρχονται στη φάση ανάπτυξης εμφανίζουν δύο σαφείς μορφολογικές αλλαγές:

1. Το ωοκύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος.
2. Τα πεπλατυσμένα κοκκώδη κύτταρα γίνονται κυβοειδή στην εμφάνιση.

Ωστόσο, περισσότερο λεπτές βιοχημικές, φυσιολογικές και μοριακές αλλαγές λαμβάνουν χώρα πριν από αυτά τα γεγονότα, π.χ., αυξημένη έκφραση πυρηνικού αντιγόνου των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA) έχει συσχετισθεί με τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου (Oktay *et al.*, 1995). Ένας αριθμός άλλων γονιδίων τα οποία εκφράζονται στο ωοκύτταρο ή στη βλαστική σειρά έχουν επίσης προσδιοριστεί, συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα GDF-9 και του Oct-4 (γνωστός και ως Oct-3) (Rosner *et al.*, 1990).

1.2.2.4 Δευτερογενές ωοθυλάκιο

Το ωοκύτταρο συνεχίζει να αναπτύσσεται σε μέγεθος και τα κοκκώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται, όταν μια στις δυο στιβάδες κοκκωδών κυττάρων περικλείουν το ωοκύτταρο, το ωοθυλάκιο φτάνει σε ένα μεταβατικό στάδιο. Η περαιτέρω ανάπτυξη δημιουργεί το δευτερογενές ωοθυλάκιο με πολλαπλές στιβάδες κοκκωδών κυττάρων. Τα ωοθυλάκια συνδέονται μεταξύ τους με μικρά αιμοφόρα αγγεία κάτι το οποίο είναι σημαντικό εφόσον η ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων εξαρτάται από την τοπική δράση παραγόντων και τα την επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων, ανεξάρτητα από τις γοναδοτροπίνες που φτάνουν εκεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Στους ανθρώπους το στρώμα της θήκης δεν σχηματίζεται ωσότου το ωοθυλάκιο περιέχει μεταξύ τριών και έξι στιβάδες κοκκωδών κυττάρων.



Εικόνα 4: Ιστολογική εικόνα ενός δευτερογενούς ωοθυλακίου στην ωοθήκη.

1.2.2.5 Προωοθυλακιορρηκτικό (γραφιανό) ωοθυλάκιο

Αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες προκαλούν περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου, τα στρώματα της θήκης και των κοκκωδών κυττάρων πολλαπλασιάζονται και το ωοκύτταρο αυξάνει σε μέγεθος συσσωρεύοντας νερό, ιόντα, λιπίδια, RNA και πρωτεΐνες. Η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) απαιτείται για το σχηματισμό του ωοθυλακικού υγρού και διάφορες εστίες αυτού του υγρού, πρόδρομοι θέσεων της κοιλότητας του άντρου, σχηματίζονται μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων. Το υγρό προέρχεται από την κυκλοφορία του αίματος, με προσθήκη γλυκοπρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Όταν πέντε έως οχτώ στρώματα κοκκωδών κυττάρων περιβάλλουν το ωοκύτταρο, αυτές οι εστίες του υγρού συγχωνεύονται για να σχηματίσουν την κοιλότητα του άντρου (άντρο των ωοθυλακίων). Όσο η κοιλότητα του άντρου εκτείνεται, το ωοκύτταρο καταλαμβάνει μια έκκεντρη θέση στο ωοθυλάκιο και περικλείεται από δυο ή περισσότερα στρώματα κοκκωδών κυττάρων.

Υπό την επίδραση της FSH η οποία παράγεται από το βλεννογόνο, τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς:

1. Το ωοκύτταρο και τα γύρω θυλακιώδη κύτταρα σχηματίζουν ένα δίκτυο ή συγκύτιο, μια στενή συνεργασία η οποία είναι απαραίτητη για τη συνέχιση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Τα κοκκώδη κύτταρα περιστοιχίζουν το ωοκύτταρο. Αυτά τα κύτταρα είναι μιτωτικά ανενεργά και δεν διαιρούνται περαιτέρω. Οι εσωτερικές στρώσεις των κυττάρων μετατρέπονται σε κιονοειδείς σχηματίζοντας την ακτινωτή στεφάνη και αυτά τα κύτταρα επικοινωνούν με το ωοκύτταρο μέσω χασμοσυνδέσμων.

2. Τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα καλύπτουν εσωτερικά το τοίχωμα του ωοθυλακίου. Αυτά τα κύτταρα σταματάνε να διαιρούνται και επιπλέον μετατρέπονται σε κιονοειδή. Κάτω από την επίδραση της FSH, εκφράζουν υποδοχείς για την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) και στερεοειδογονικά ενζυμικά μονοπάτια ενεργοποιούνται εντός των κυττάρων.

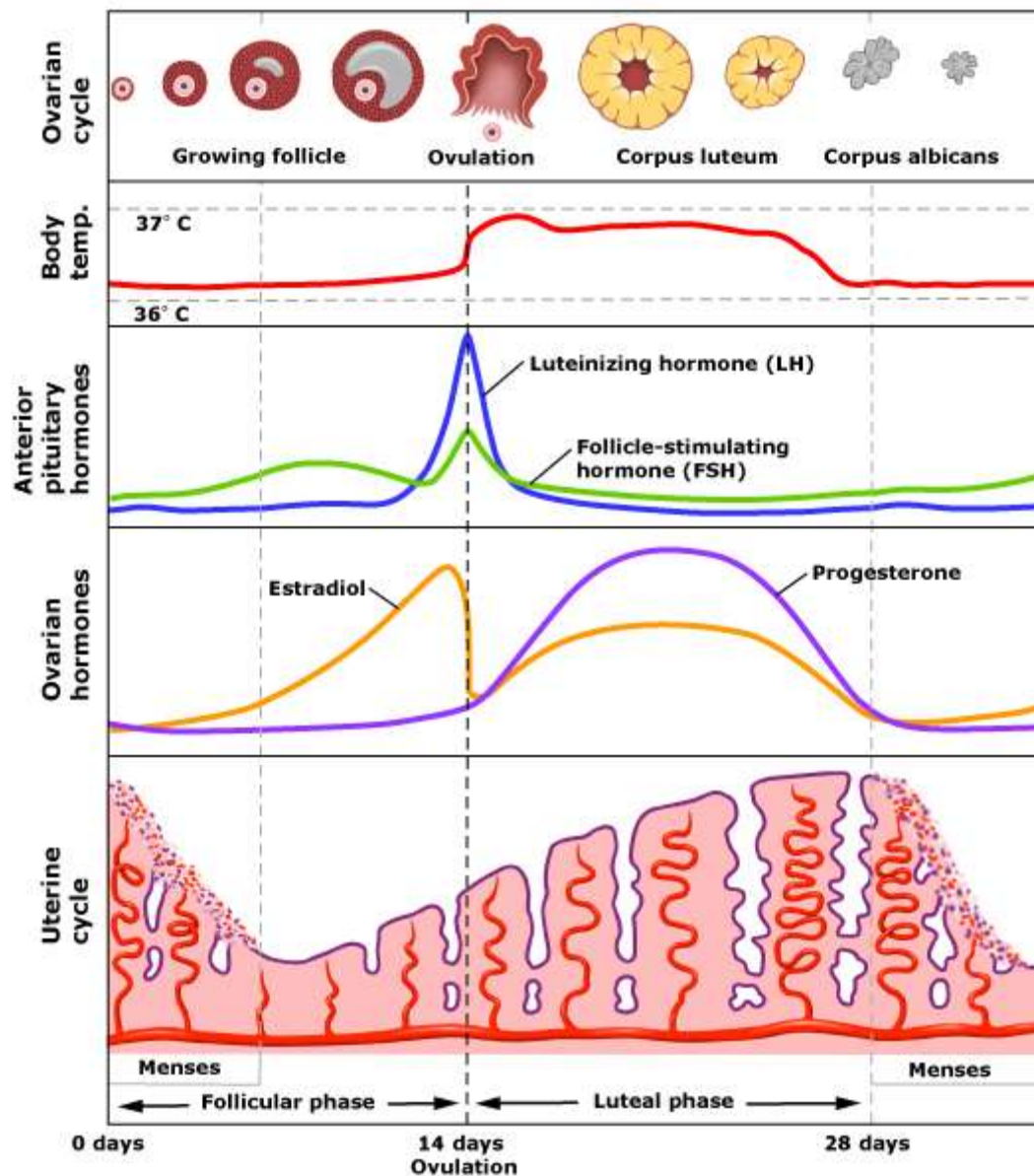
Τα κοκκώδη κύτταρα, διεγερμένα από την FSH, ξεκινούν με τη σύνθεση και έκκριση της οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη στο ωοθυλακικό υγρό έχει μια διεγερτική επίδραση επι των κοκκωδών κυττάρων. Αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και με αυτό τον τρόπο να εκκρίνουν ακόμα μεγαλύτερα ποσά οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό καθώς και μέσω της διάχυσης στην κυκλοφορία του αίματος.

Μια ιδιαίτερη ιδιότητα του κυρίαρχου ωοθυλακίου είναι ότι είναι σε θέση να παρέχει επαρκή ποσότητα οιστρογόνων, η οποία χρειάζεται για την περαιτέρω ανάπτυξη. Χάρη στον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, νέα κοκκώδη κύτταρα δημιουργούνται τα οποία είναι εξοπλισμένα με πολλούς υποδοχείς για την FSH, έτσι ώστε παρά τη μείωση των επιπέδων της FSH, αρκετή FSH μπορεί να συνδεθεί σε αυτούς.

Στους ανθρώπους το μέγεθος του ωοκυττάρου είναι περί τα 120 μm κατά το σχηματισμό της κοιλότητας του άντρου. Το ωοκύτταρο είναι τώρα ικανό να ξαναρχίσει τη μείωση, μα μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ωοκυττάρων προχωράει πέρα από το στάδιο του άντρου προς την ωορρηξία. Περίπου 20 ωοθυλάκια με κοιλότητα – άντρο, αλλιώς καλούμενα ως καταβολές, επιστρατεύονται κάθε μήνα από το συνολικό διαθέσιμο αριθμό και ακόμα λιγότερα επιλέγονται κατά την ωορρηξία. Τα επιστρατευμένα ωοθυλάκια συνεχίζουν να αναπτύσσονται και ένα ωοθυλάκιο από αυτά επιλέγεται να γίνει το κυρίαρχο. Στη συνέχεια αυτό το προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο αναπτύσσεται ραγδαία. Στους ανθρώπους το μέγεθος αυξάνεται από 6.9mm (± 0.5) στα 18.8mm (± 0.5) σε μια περίοδο 10 έως 20 ημερών. Η βασική μεμβράνη του ωοθυλακίου πρέπει να επεκταθεί κατά περίπου 400

φορές του αρχικού της μεγέθους για να ακολουθήσει την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων αυξάνεται από περίπου 2-5 εκατομμύρια σε 50 εκατομμύρια και τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται ακόμα περισσότερο.

Οι ιντερλευκίνες συμμετέχουν στην απόφαση επιβίωσης / απόπτωσης του επικρατέστερου ωοθυλακίου. Η σημασία της σηματοδότησης της IL-6 έχει παρατηρηθεί σε χοίρους, όπου οι IL-6 υποδοχείς μπορούν να προάγουν την επιβίωση των κοκκωδών κυττάρων (Maeda *et al.*, 2007). Ο μηχανισμός αυτός, με τη συμμετοχή της IL-6 και του διαλυτού υποδοχέα της IL-6 (sR), έχει προταθεί να είναι ένας βασικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της ατρησίας σε ανθρώπους (Kawasaki *et al.*, 2003). Η IL-8 ανήκει στην υπερικογένεια των CXC χημειοκινών. Είναι ένα ισχυρό χημειοελκτικό λευκοκυττάρων, ιδιαίτερα για τα ουδετερόφιλα και ένας αγγειογενετικός παράγοντας (Koch *et al.*, 1992; Hebert and Baker, 1993; Mukaida *et al.*, 1994). Έχει αποδειχθεί ότι η IL-8 ρυθμίζει την ωρίμαση των ωοθυλακίων μέσω χημειοταξίας και ενεργοποίησης των κοκκιοκυττάρων, και ότι η παραγωγή του ρυθμίζεται θετικά με τις οικογένειες των παραγόντων EGF και TGF- α σε ανθρώπους (Belayet *et al.*, 2000; Kawano *et al.*, 2012). Η IL-8 που παράγεται λόγω υποξίας, δυνητικά επηρεάζει την αγγειογένεση, δεδομένου ότι τα ωοθυλάκια μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα υποξικό περιβάλλον (Yoshino *et al.*, 2003). Σύμφωνα με αυτήν την παρατήρηση, μοντέλα αρουραίων έχουν δείξει ότι η IL-8 μπορεί να δράσει ως ένας αγγειογόνος παράγοντας προς το τέλος της ωοθυλακιογένεσης (Arici *et al.*, 1996; Goto *et al.*, 2002; Yoshino *et al.*, 2003; Hickey and Simon, 2006). Η IL-8 διεγείρεται από τον VEGF στα κύτταρα της θήκης των βοοειδών, προωθεί την αγγειογένεση και τη βελτίωση της περι-θυλακιδούς ροής του αίματος, και συμβάλλει έτσι ενδεχομένως στη βιωσιμότητα του ωοκυττάρου (Murayama *et al.*, 2010; Pancarci *et al.*, 2012).



Εικόνα 5: Ωοθυλακικός κύκλος. Βασικός μηχανισμός ενδοκρινικών ορμονών.

1.2.2.6 Ωοθυλακιορρηξία

Κατά τη 14η περίπου μέρα του κύκλου πραγματοποιείται η ωοθυλακιορρηξία. Μέσα σε λίγες ώρες από την αιχμή της LH (Guraya, 2008; Heikinheimo and Gibbons, 1998; Driscoll *et al.* 2000), αυξάνει η αγγείωση του ωοθυλακίου και η επέκταση της μάζας των κοκκωδών κυττάρων προκαλεί μεγέθυνση του ωοθυλακίου με αποτέλεσμα αυτό να σχηματίζει μια ορατή διόγκωση στην επιφάνεια της ωοθήκης. Το προεκτεινόμενο τοίχωμα του ωοθυλακίου γίνεται λεπτό, σχηματίζοντας το στίγμα.

Ο συνδυασμός της έντασης και της δράσης μιας κολλαγενάσης αναγκάζει το τοίχωμα του ωοθυλακίου να διαρρηχθεί και το σύμπλεγμα κοκκωδών – ωοκυττάρου (COC) ελευθερώνεται από την κοιλότητα του άντρου.

Το κροσσωτό στόμιο της σάλπιγγας λαμβάνει την κολλώδη μάζα του περιστοιχισμένου από κοκκώδη κύτταρα ωοκυττάρου από την επιφάνεια της ωοθήκης, συγχρονισμένες κινήσεις των βλεφαρίδων μετακινούν το COC κατά μήκος της σάλπιγγας. Το ωοκύτταρο παραμένει βιώσιμο στη σάλπιγγα για χρονικό διάστημα 24 ωρών.

1.2.2.7 Ωχρό σωματίο

Μετά την ωορρηξία, η βασική μεμβράνη του ωοθυλακίου εκφυλίζεται και αιμοφόρα αγγεία καταλαμβάνουν την εναπομείνουσα δομή του ωοθυλακίου για να σχηματιστεί το ωχρό σωματίο. Αυτή η δομή περιέχει μεγάλα ωχρινικά κύτταρα που προέρχονται από ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα και μικρότερα ωχρινικά κύτταρα που προέρχονται από το εσωτερικό της θήκης. Και οι δυο πληθυσμοί κυττάρων παράγουν προγεστερόνη. Εάν δεν επιτευχθεί εγκυμοσύνη, το ωχρό σωματίο παραμένει στην ωοθήκη για 2-14 μέρες και στη συνέχεια εκφυλίζεται με τη δράση των προσταγλανδινών.

1.3 Ωρίμαση ωοκυττάρου

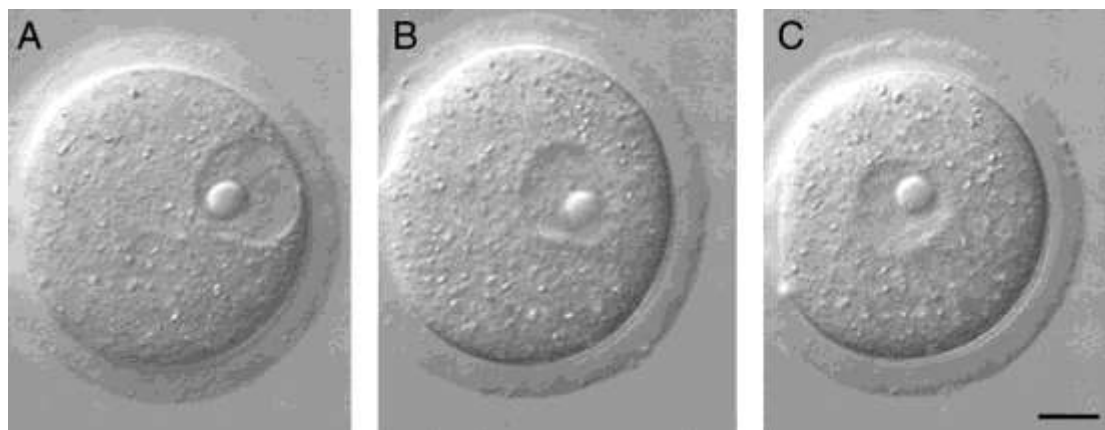
1.3.1 Γενικά

Η παραγωγή των ώριμων, αναπτυξιακά ικανών ωοκυττάρων είναι το αποκορύφωμα μιας εξαιρετικά οργανωμένης διαδικασίας που διαρκεί περίπου 120 ημέρες στις γυναίκες (Gougeon, 1986).

Η διαφοροποίηση του θηλυκού γαμέτη σε ένα αναπτυξιακά ικανό ωοκύτταρο στηρίζεται στο προστατευόμενο περιβάλλον του ωοθυλακίου. Το ωοκύτταρο παίζει έναν ρόλο κλειδί στη θέσπιση αυτού του μικροπεριβάλλοντος με την έκκριση παρακρινικών παραγόντων που ελέγχουν τις λειτουργίες των περιβαλλόντων σωματικών κυττάρων. Ο αυξητικός παράγοντας 9 (GDF9) και η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 15 (BMP15) εκκρίνονται κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και παίζουν κεντρικούς ρόλους σε αυτή την τοπική ρύθμιση. Η επανείσοδος του ωαρίου στον κύκλο της μειωτικής διαίρεσης σχετίζεται με αλλαγή στο πρότυπο της

έκκρισης μιας σειράς βιοδραστικών μορίων που συντίθενται πριν από την ωορρηξία (Cakmak *et al.*, 2016).

Τα ωάρια παραμένουν αδρανή στη πρόφαση I της μειωτικής διαίρεσης, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και η χρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Προς το τέλος της ωοθυλακιογένεσης, όταν το ωάριο έχει αναπτυχθεί πλήρως, η μεταγραφική δραστηριότητα παύει και η χρωματίνη στο βλαστικό κυστίδιο (GV) συμπυκνώνεται (De La Fuente *et al.*, 2004). Μετά τη διέγερση της ωορρηξίας, η μείωση επανεκινείται και ο πυρήνας του ωαρίου υφίσταται τις αλλαγές που απαιτούνται για την ορθή πλοειδία του γαμέτη. Αυτά τα τελικά στάδια της ωρίμασης του ωαρίου όσο και η γονιμοποίηση και η πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου συμβαίνουν εν απουσία μεταγραφής (Susor *et al.*, 2016). Η εξέλιξη του κύκλου του κυττάρου και ο επαναπρογραμματισμός του γονιδιώματος βασίζονται στη μετάφραση των αποθηκευμένων μητρικών mRNAs μέχρι την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος στο πρώιμο στάδιο μεταξύ των τεσσάρων και των οχτώ κυττάρων (Susor *et al.*, 2016). Η μετάφραση των αποθηκευμένων mRNAs είναι πολύ καλά ρυθμισμένη και οι αναπτυξιακές αρμοδιότητες του ωαρίου εξαρτώνται σχεδόν αποκλειστικά σε μετα-μεταγραφικά γεγονότα.



Εικόνα 6: Ωοκύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV). Το βλαστικό κυστίδιο είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγραφεί ο πυρήνας του ωοκυττάρου.



Εικόνα 7: Ωοκύτταρο που βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης I (MI). Το βλαστικό κυστίδιο έχει διασπαστεί.



Εικόνα 8: Ωοκύτταρο που βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης II (MII). Παρατηρείται η απουσία πυρήνα και η παρουσία ενός πολικού σωματίου στην περιφέρεια του κυττάρου, ώρα 12. Το πολικό σωματίο έχει ωθήσει την πλασματική μεμβράνη του ωοκυττάρου μακριά από την άμεση επαφή με τη διαφανή ζώνη.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η κύρια εκκριτική δραστηριότητα των ωοκυττάρων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Η

μετάφραση και η έκκριση ωοκυτταρικών παραγόντων κατά την ωρίμαση του ωαρίου είναι στην πραγματικότητα πολύ δυναμική και συγχρονισμένη με τον μειωτικό κύκλο του κυττάρου (Cakmak *et al.*, 2016).

Η ωρίμαση του ωοκυττάρου και η ωορρηξία ρυθμίζονται από έναν αριθμό τοπικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα σωματικά κύτταρα. Αύξηση της ωχρινότροπου ορμόνης (LH) προκαλεί επαναπρογραμματισμό των τοιχωματικών κοκκωδών κυττάρων του ωοθυλακίου και την έκφραση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EFG) (Conti *et al.*, 2012).

Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των ωαρίων και των ωοθυλακιακών σωματικών κυττάρων για την απόκτηση αναπτυξιακών ικανοτήτων του ωαρίου είναι καθοριστικής σημασίας (Gilchrist *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009). Μειωμένος πολλαπλασιασμός και αυξημένη απόπτωση στα κοκκώδη κύτταρα έχουν συνδεθεί με την ανωριμότητα των ωαρίων, διαταραγμένη γονιμοποίηση (Høst *et al.*, 2002), μη βέλτιστη ανάπτυξη της βλαστοκύστης και φτωχότερα αποτελέσματα κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση (Cohn *et al.*, 2005). Η IL-7 έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την απόπτωση κοκκωδών κυττάρων σε καλλιέργεια μέσω της ενεργοποίησης του PI3K/AKT μονοπατιού (Cheng *et al.*, 2011) και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Η έγκαιρη έκκριση του ωαρίου ρυθμίζει τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων και στη συνέχεια βελτιώνει την ίδια του τη διαδικασία ανάπτυξης (Cakmak *et al.*, 2016). Χαμηλότερα επίπεδα IL-7 στα δείγματα ωοθυλακικού υγρού σχετίζεται με χαμηλότερη ποιότητα ωαρίου και εμβρύου και χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Ostanin *et al.*, 2007). Τα φυσιολογικά γονιμοποιημένα ωάρια έχουν σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα IL-7 σε σύγκριση με εκείνα χωρίς ή με μη φυσιολογική γονιμοποίηση σε δανεικά ωάρια (Cakmak *et al.*, 2016). Φαίνεται ότι το ωάριο καθορίζει μόνο του τη μοίρα του ρυθμίζοντας το μικροπεριβάλλον του με εκκρινόμενους παράγοντες.

1.3.2 Στάδια ωρίμασης

Το αρχέγονο ανθρώπινο ωοθυλάκιο περιέχει ένα κυρίαρχο ωοκύτταρο περίπου 35μm σε μέγεθος και αυξάνεται στο τελικό του μέγεθος των 120μm. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου πρέπει να αποκτήσει την ικανότητα να γονιμοποιηθεί επιτυχώς και στη συνέχεια να αναπτυχθεί φυσιολογικά ως έμβρυο. Κατά τη διαδικασία της ωρίμασης του ωαρίου ο πυρήνας υφίσταται κατάρρευση του βλαστικού κυστιδίου, επανέναρξη της μείωσης και ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Η

κυτταροπλασματική ωρίμαση απαιτεί μετατόπιση των κυτταροπλασματικών οργανιδίων και καθιέρωση της πολικότητας του ωοκυττάρου, με αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων και των ριβοσωμάτων. Υπάρχουν αλλαγές στα συστήματα μεταφοράς των μεμβρανών και το αναπτυσσόμενο σύστημα Golgi διαστέλλεται και μεταναστεύει στην περιφέρεια. Οργανίδια εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα που έχουν να κάνουν με την αποθήκευση ουσιών και την εξαγωγή αυτών: κυστίδια, πολυκυψελιδωτά και κρυσταλλικά σωμάτια, σταγονίδια λίπους και κόκκοι γλυκογόνου.

Κατά τη φάση ανάπτυξης του το ωοκύτταρο παρασκευάζει και αποθηκεύει αποθέματα τα οποία θα χρειαστούν για τα πρώτα στάδια της γονιμοποίησης και της ανάπτυξης του εμβρύου: νερό, λιπίδια, υδατάνθρακες και ιόντα συσσωρεύονται και RNA και πρωτεΐνες συντίθενται και αποθηκεύονται. Καθώς το ωοθυλάκιο προχωρά από το αρχέγονο στο πρωτογενές στάδιο, η διάμετρος του ωοκυττάρου αυξάνεται. Αν και η διανομή των οργανιδίων και η αποθήκευση ουσιών δεν δείχνουν μια σαφή και προφανή πολικότητα, το χωρικό μοτίβο δεν αποκλείεται στα αυγά των θηλαστικών (Gardner R, 1999). Ένας αριθμός χαρακτηριστικών μπορούν να περιγραφούν κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων:

1. Τα μιτοχόνδρια αυξάνουν σε αριθμό περίπου στα 10^5 και γίνονται πιο σφαιρικά, με λιγότερες ομόκεντρες δακτυλοειδείς πτυχώσεις, υποδεικνύοντας ότι είναι λιγότερα ενεργά.
2. Υπό τον έλεγχο του γονιδίου FIGalpha, γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της διαφανούς ζώνης (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) εκφράζονται συντονισμένα και ειδικά. Οι πρωτεΐνες που θα δομήσουν τη διάφανη ζώνη (ZP) εκκρίνονται και σχηματίζεται ένα στρώμα 5-10 μm γύρω από το ωοκύτταρο. Σε αυτό το στάδιο, η διαφανής ζώνη διατηρεί την επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων, το ZP3 είναι ο βασικός υποδοχέας του σπέρματος.
3. Τα κυτταροπλασματικά οργανίδια γίνονται περισσότερο άφθονα, με την αξιοσημείωτη εξαίρεση των κεντριλίων τα οποία εξαφανίζονται και δεν εμφανίζονται μέχρι τη γονιμοποίηση. Ο αριθμός των ριβοσωμάτων τετραπλασιάζεται σε περίπου 10^8 στο ώριμο ωοκύτταρο.
4. Μεγάλες ποσότητες RNA συντίθενται και αποθηκεύονται: το ανθρώπινο ωοκύτταρο έχει εκτιμηθεί ότι έχει 1500 pg συνολικού RNA, σε αντίθεση με τα 14 fg στο σπερματοζώαριο (1 femtogram = 0.001 picogram).

Κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα αυξάνουν τη σύνθεση των οιστρογόνων και τα επίπεδα των οιστρογόνων στον ορό αυξάνονται σημαντικά. Αυτό ασκεί μια θετική παλίνδρομη ρύθμιση στην υπόφυση και αυξάνει την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών, ιδίως της LH, με αποτέλεσμα την προωοθυλακιορρηκτική αιχμή της LH. Η πρόσδεση της LH στους υποδοχείς της στα τοιχωματικά κοκκώδη ενισχύεται και αυτό ενεργοποιεί τα μονοπάτια που προάγουν την ωρίμαση του ωαρίου. Η αυξημένη πρόσδεση τελικά ρυθμίζει αρνητικά το στεροειδογόνο μονοπάτι που οδηγεί στη σύνθεση της οιστραδιόλης και τα κύτταρα αλλάζουν τη στεροειδική σύνθεση στην παραγωγή της προγεστερόνης για την ωχρινική φάση. Υπό την επίδραση της LH, το πρωτογενές ωοκύτταρο ωριμάζει μέσω μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των ωοθυλακικών κυττάρων και του ωοκυττάρου, με τη συμμετοχή πολλών μεταβολικών μονοπατιών. Τα τελικά στάδια που οδηγούν στην ωορρηξία περιλαμβάνουν:

1. Την πυρηνική ωρίμαση. Η πυρηνική ωρίμαση είναι απαραίτητη για να επιτραπεί η συνέχιση της μείωσης πέρα από την ηρεμία στην πρόφαση Ι. Η αιχμή στα μέσα του κύκλου της LH ξεκινάει μια σύνθετη αλληλουχία γεγονότων.
2. Την κυτταροπλασματική ωρίμαση. Κατά την ανάπτυξη του ωαρίου, το σύστημα Golgi διευρύνεται και αναπτύσσεται σε ξεχωριστές μονάδες στο φλοιό. Αυτές εξάγουν γλυκοπρωτεΐνες στη διαφανή ζώνη και σχηματίζουν περίπου 5×10^3 φλοιώδη κυστίδια που συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του ωοκυττάρου. Τα φλοιώδη κυστίδια περιέχουν ένζυμα που στη συνέχεια απελευθερώνονται για να τροποποιήσουν τη διάφανη ζώνη. Ένα λεπτό δίκτυο ενδοπλασματικού δικτύου εκτείνεται σε ολόκληρο το κυτταρόπλασμα, με πυκνά σημεία μεμβράνης που προσανατολίζονται πιο κοντά στην περιφέρεια του φλοιού, όπου μπορεί να εμπλέκονται στην απελευθέρωση ασβεστίου για εξωκύτωση φλοιωδών κυστιδίων. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ωρίμασης του κυτταροπλάσματος είναι η μετάφραση κάποιων ειδών mRNA που έχουν συσσωρευτεί σε μια σταθερή και αδρανή δομή κατά την ωογένεση.
3. Τη διεύρυνση των κοκκωδών κυττάρων. Το προωορρηκτικό κύμα ορμονών οδηγεί σε αλλαγές στη μορφολογία των κοκκωδών κυττάρων και εκείνα παράγουν υαλουρονικό οξύ στους μεσοκυττάρους χώρους. Τα ωοκύτταρα επίσης παράγουν ένα διαλυτό παράγοντα που προωθεί την παραγωγή του υαλουρονικού οξέος από τα

κοκκώδη κύτταρα και η σχηματισμένη μήτρα μετατρέπει τα κοκκώδη κύτταρα από μια σφιχτά πακεταρισμένη κυτταρική δομή σε μια πιο διάχυτη και διάσπαρτη μάζα. Η συγκυτιακή σχέση μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου χάνεται, η ενδοκυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου τερματίζεται και μεταβολίτες και πληροφοριακά μόρια δεν μπορούν πλέον να περάσουν. Αυτά τα γεγονότα μπορούν να λειτουργήσουν ως το έναυσμα για την επανέναρξη της μείωσης.

Σε ανταπόκριση της πρωοθυλακιορρηκτικής αιχμής των γοναδοτροπινών, η συγκέντρωση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) εσωτερικά του ωοκυττάρου πέφτει. Τα επίπεδα της cAMP διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη μειωτική διαίρεση και ωρίμαση, αφού φαρμακολογικός χειρισμός για αύξηση των επιπέδων στα αρμόδια ωοκύτταρα των θηλαστικών έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μείωσης (Conti *et al.* 1998).

Τα μιτοχόνδρια αυξάνονται σε όγκο, μειώνονται σε αριθμό και μετακινούνται στην περιπυρηνική περιφέρεια, μια περιοχή που απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις ATP κατά τη διάρκεια σχηματισμού της πρώτης μειωτικής ατράκτου.

Η χρωματίνη σχηματίζει ένα πυκνό δακτύλιο γύρω από τον πυρήνα, τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC) συναθροίζονται σαν μικροσωληνίσκοι στο κυτταρόπλασμα και αναδιοργανώνονται για να σχηματίσουν μια λειτουργική μιτωτική άτρακτο.

Τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, η βλαστική μεμβράνη καταστρέφεται και συγκροτείται η πρώτη μειωτική άτρακτος.

Η άτρακτος μεταναστεύει στο ζωικό πόλο του ωοκυττάρου και αλλάζει προσανατολισμό.

Η πρώτη μειωτική διαίρεση προχωράει στη μετάφαση I και στη συνέχεια στην τελόφαση I. Ασύμμετρη διαίρεση του κυττάρου δίνει γένεση στο μεγάλο λειτουργικό ωοκύτταρο και στο μικρότερο πρώτο πολικό σωματίο.

Μόλις η μείωση I ολοκληρωθεί, το ωοκύτταρο μπαίνει στη δεύτερη μειωτική διαίρεση και αυτό το δευτερογενές ωοκύτταρο παραμένει ξανά σε ηρεμία στη μετάφαση II, έτοιμο για γονιμοποίηση.

Το έναυσμα για τη συνέχιση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης παρέχεται από το σπερματοζωάριο που θα το γονιμοποιήσει και η μείωση ολοκληρώνεται με τη δημιουργία του δεύτερου πολικού σωματίου.

Συνοψίζοντας, η παραγωγή ενός βιώσιμου ωοκυττάρου εξαρτάται από τρεις βασικές διαδικασίες:

1. Το πλήρως αναπτυγμένο ωάριο πρέπει να αναγνωρίζει ρυθμιστικά σήματα που παράγονται από τα ωοθυλακικά κύτταρα.
2. Εκτεταμένος επαναπρογραμματισμός μέσα στο ωάριο πρέπει να επάγεται, αυτό περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κατάλληλων μηχανισμών μεταγωγής σήματος.
3. Ξεχωριστές μοριακές αλλαγές πρέπει να ολοκληρωθούν για να οδηγήσουν τις δύο παράλληλες αλλά διαφορετικές διαδικασίες που εμπλέκονται στη μειωτική εξέλιξη και στην απόκτηση των αναπτυξιακών ικανοτήτων.

Το ωοκύτταρο εξαρτάται από τη διαμερισματοποίηση του ωοθυλακίου για άμεση θρεπτική υποστήριξη και για τη λήψη ρυθμιστικών σημάτων. Μετά την αιχμή της LH, νέα στεροειδικά, πεπτιδικά και πρωτεϊνικά σήματα παράγονται και μεταβολές στο προωοθυλακιόρρηκτο στεροειδικό προφίλ μπορούν να διαταράξουν επιλεκτικά τον πρωτεϊνικό επαναπρογραμματισμό και τα επιμέρους συστατικά της διαδικασίας γονιμοποίησης.

Εντοπισμένα μικρής και μακράς διάρκειας ζωής μητρικά mRNAs ρυθμίζουν τα αρχικά στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης τόσο στο ωοκύτταρο όσο και στο πρώιμο έμβρυο.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η διαδικασία της ωρίμασης και ανάπτυξης του ωαρίου είναι μία εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, που περιλαμβάνει μια τριών διαστάσεων σειρά και συχνότητα ρυθμιστικών στοιχείων σε διάφορα μοριακά επίπεδα. Η τελική εξέλιξη ενός ώριμου ωαρίου που έχει την προοπτική γονιμοποίησης και περαιτέρω ανάπτυξης εξαρτάται από την ορθή αποπεράτωση και το συγχρονισμό όλων των διαδικασιών που εμπλέκονται. Έτσι είναι αδύνατο να αξιολογηθούν και να μετρηθούν οι συνέπειες των μικροχειρισμών κατά τη διάρκεια πρακτικής των διαδικασιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και είναι σημαντικό να διατηρηθεί μια επίγνωση της πολυπλοκότητας και ευαισθησίας αυτού του λεπτού και υψηλά κομψού βιολογικού συστήματος.

1.4 Ωοθυλακικό υγρό

Το ωοθυλακικό υγρό έχει διαπιστωθεί ότι σε κάποιο βαθμό βρίσκεται σε ισορροπία με το κυκλοφορικό σύστημα (Rodgers *et al.*, 2010). Είναι ένα προϊόν τόσο της μεταφοράς των συστατικών του πλάσματος που διασχίζουν το φράγμα του αίματος των ωοθυλακίων όσο και της εκκριτικής δραστηριότητας των κοκκωδών κυττάρων

και των κυττάρων θήκης (Fortune JE, 1994). Πιθανόν προέρχεται από τη ροή του αίματος μέσω των τριχοειδών αγγείων της θήκης. Τα τριχοειδή αγγεία είναι σπάνια στην περιοχή του φλοιού της ωοθήκης που περιλαμβάνει αρχέγονα ωοθυλάκια (Van Wezel IL *et al.*, 1996; Herrmann G *et al.*, 1998) και στα περισσότερα είδη γενικά αναπτύσσονται σαν ένα απλό δίκτυο γύρω από τα ωοθυλάκια στα πρώτα στάδια σχηματισμού του άντρου (Jiang *et al.*, 2002). Τα δίκτυα της θήκης δεν είναι ομοιόμορφα γύρω από τα ωοθυλάκια, με λιγότερα τριχοειδή στην κορυφή του ωοθυλακίου σε σχέση με τις πλευρικές ή τις βασικές περιοχές (Jiang *et al.*, 2002), οδηγώντας σε αντίστοιχες διαφορές στην περιφερειακή ροή αίματος. Τα τριχοειδή δίκτυα συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να επεκτείνονται καθώς τα ωοθυλάκια μεγαλώνουν και η αγγείωση του αίματος ή η ροή του αίματος δεν περιορίζονται. Ωστόσο αυτό κυμαίνεται μεταξύ των επικρατών και των υποδεέστερων ωοθυλακίων (Acosta *et al.*, 2007; Berisha *et al.*, 2005), μεταξύ των ωοθυλακίων με ωάρια διαφορετικής ποιότητας (Huey S *et al.*, 1999) ή μπορεί να ελαττώνεται κατά την ατρησία των ωοθυλακίων (Jiang *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004).

Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει μια ποικιλία αυτοκρινών και παρακρινών παραγόντων υπεύθυνων για τη ρύθμιση της ανάπτυξης του ωαρίου, την ωοθυλακιογένεση και την ωορρηξία. Η πολύπλοκη σύνθεση των ρυθμιστικών παραγόντων (ορμόνες, κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες) και η συγκέντρωσή τους στο σε αυτό έχει μια επιρροή είτε άμεσα είτε έμμεσα στη βιωσιμότητα του ωαρίου και στη δυνατότητα ανάπτυξης (Mendoza *et al.*, 1999, 2002).

Η επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος σε διάφορες πτυχές της αναπαραγωγής, ιδιαιτέρως στο αναπαραγωγικό αποτέλεσμα, έχει μελετηθεί εκτενώς. Υπάρχουν αποδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος μπορούν να επηρεάσουν τη ωοθηκική λειτουργία. Συνεπώς η σύσταση των ρυθμιστικών παραγόντων στο ωοθυλακικό υγρό είναι έμμεσα συνδεδεμένη με τη γονιμοποίηση και την πρόωμη εμβρυική ανάπτυξη (Mendoza *et al.*, 2002; Hammadeh *et al.*, 2003a, 2004).

Το ωοθυλακικό υγρό παρέχει ένα πολύ σημαντικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Κάποια βιοχημικά συστατικά του που περιβάλλουν το ωοκύτταρο μπορεί να παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό της ποιότητας των ωαρίων και στο μετέπειτα δυναμικό για την επίτευξη γονιμοποίησης και ανάπτυξης του εμβρύου.

Διαμένοντα αλλά και διηθητικά λευκοκύτταρα είναι οι κύριες πηγές σύνθεσης των κυτοκινών στο ωοθυλακικό υγρό και στον περιβάλλοντα ιστό. Επιπροσθέτως, ωοθηκικά σωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων ωχρινικών, στρωματικών, κυττάρων θήκης και κοκκωδών κυττάρων είναι μια σημαντική πηγή κυτοκινών. Οι κυτοκίνες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της ωοθήκης, την έκκριση γοναδικών στεροειδών, τη λειτουργία του ωχρού σωματίου, την εμβρυική ανάπτυξη και την εμφύτευση.

Το ωοθυλακικό υγρό είναι εύκολα διαθέσιμο καθώς αναρροφάται μαζί με το ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της ωοληψίας. Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί μελέτη του περιεχομένου του ωοθυλακικού υγρού με σκοπό τον προσδιορισμό μιας ή περισσότερων ουσιών που προέρχονται από διαφορετικά ωοθυλάκια και που συνδέονται με την τύχη των ωοκυττάρων αυτών.

Δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο εάν η συγκέντρωση μιας δεδομένης ουσίας στο ωοθυλακικό υγρό είναι μια μεταβλητή που σχετίζεται με την ποιότητα του ωοθυλακίου και κατ' επέκταση με την ποιότητα του ωαρίου ή με τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς όπως η ηλικία, η συνήθεια του καπνίσματος ή ο τύπος της διέγερσης των ωοθηκών γι' αυτό είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών για τη διασαφήνιση αυτής της συσχέτισης.

2. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

2.1 Γενικά

Κατά τις τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) το ωάριο γονιμοποιείται έξω από το σώμα από το σπερματοζωάριο, *in vitro*. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι ωοθήκες διεγείρονται με κατάλληλα φάρμακα για την ωρίμαση πολλών ωαρίων. Η διαδικασία περιλαμβάνει υπερηχογραφική παρακολούθηση και διέγερση της διαδικασίας της ωορρηξίας, συλλογή του ωαρίου ή των ωαρίων από τις ωοθήκες της γυναίκας και γονιμοποίησής τους από τα σπερματοζωάρια μέσα σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό σε ένα τρυβλίο στο εργαστήριο. Τα γονιμοποιημένα ωάρια καλλιεργούνται για 2 έως 6 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρονται στη μήτρα της γυναίκας.

Οι τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής εφαρμόστηκαν κατ' αρχήν σε ασθενείς με σαλπιγγικό παράγοντα με σκοπό την παράκαμψη των σαλπίγγων για τη διαδικασία της γονιμοποίησης. Από τότε μέχρι και σήμερα η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή γνώρισε αλματώδη ανάπτυξη καλύπτοντας πλέον μια μεγάλη γκάμα παθήσεων, διαταραχών και ηλικιών.

2.2 Ενδείξεις ART

Οι σημαντικότερες ενδείξεις είναι:

1. σαλπιγγική βλάβη
2. ανεξήγητη στειρότητα
3. ενδομητρίωση
4. αποτυχία άλλων μεθόδων, όπως πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας ή σπερματέγχυση
5. τραχηλικός παράγοντας
6. πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, η οποία θα πρέπει να συνδυαστεί με δωρεά ωαρίων
7. ανδρικός παράγοντας
8. προβλήματα συνουσίας/ανικανότητα

2.3 Ωοθηκική διέγερση

Η ωοθηκική διέγερση επιτυγχάνεται μετά από φαρμακολογική παρέμβαση και έχει σκοπό την πολλαπλή ανάπτυξη ωοθυλακίων με επακόλουθο τη λήψη αυξημένου αριθμού ωαρίων, γονιμοποιημένων ωαρίων και την επιλογή των καλύτερων εξ' αυτών για εμβρυομεταφορά. Ο σκοπός είναι να επιτευχθεί μια ικανοποιητική ανάπτυξη ώριμων ωοθυλακίων, χωρίς να προκληθεί ωοθηκική υπερδιέγερση. Τα διάφορα θεραπευτικά σχήματα που εφαρμόζονται είναι πάρα πολλά και οι προσπάθειες για την ανεύρεση του πιο κατάλληλου συνεχίζονται.

Ωοθηκική διέγερση έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (hMG) ή ανασυνδυασμένη FSH. Υποφυσιακή καταστολή, χρησιμοποιώντας GnRH ανάλογα, είναι συχνά χρησιμοποιούμενη πριν και κατά τη διάρκεια ωοθηκικής διέγερσης, έτσι ώστε να καταστείλει την ενδογενή LH και να ελαχιστοποιήσει τον κίνδυνο της πρόωπης αιχμής της. Αυξάνει τα ποσοστά των κλινικών κυήσεων στις ART και έχει πρακτικά πλεονεκτήματα λόγω της μεγαλύτερης ελαστικότητας στο σχεδιασμό και στο χρόνο των θεραπευτικών κύκλων. Όταν τα ωοθυλάκια φθάνουν σε ένα ορισμένο βαθμό ανάπτυξης, η επαγωγή της τελικής ωρίμασης των ωοκυττάρων εκτελείται με μία ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Η hCG ενεργεί ως ανάλογη της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και η ωορρηξία λαμβάνει χώρα μεταξύ 38 και 40 ωρών μετά από την ένεση αλλά η ωοληψία εκτελείται μεταξύ 34 και 36 ωρών μετά την ένεση, ακριβώς πριν από την ωορρηξία. Αυτό οδηγεί στη λήψη ωοκυττάρων τα οποία έχουν ωριμάσει πλήρως.

Η ανταπόκριση των ωοθηκών στη διέγερση μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορες μεθόδους. Ο αριθμός, το μέγεθος και η θέση των ωοθυλακίων μπορεί να προσδιοριστεί με την υπερηχογραφία, όπως επίσης και η κατάσταση και τυχόν μεταβολές του ενδομητρίου. Ο προσδιορισμός των οιστρογόνων στο αίμα και στα ούρα συμπληρώνει την εικόνα των ωοθυλακίων. Τα επίπεδα των οιστρογόνων καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη δοσολογία των γοναδοτροπινών που θα χορηγηθεί και σχετίζονται με τον αριθμό των ωοθυλακίων.

2.4 Ωοληψία

Η ωοθυλακική ωοληψία πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ενδοκολπικό υπερηχογράφο για την καθοδήγηση της βελόνας αναρρόφησης. Αυτό

πραγματοποιείται με ελαφριά νάρκωση και αναλγησία. Συνδυασμοί βενζοδιαζεπινών και οπιοειδών χορηγούνται είτε ενδοαγγειακά είτε ενδομυϊκά.

Μετά την αναρρόφηση ή και έκπλυση των ωοθυλακίων, το ωοθυλακικό υγρό εξετάζεται κάτω από το μικροσκόπιο για τον εντοπισμό των ωαρίων. Στη συνέχεια εξετάζεται το στάδιο ωρίμασης των ωαρίων, που σε αυτή τη φάση μπορεί να είναι α) ανώριμα, στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου ή στη μετάφαση I και β) ώριμα ή στη μετάφαση II. Συνήθως, μετά από σωστή διέγερση των ωοθηκών, τα ωάρια είναι ώριμα, βρίσκονται δηλαδή στη μετάφαση II, όταν έχουν αποβάλλει το πρώτο πολικό σωματίο έξω από το κυτταρόπλασμα.

3. INTERLEUKINES

3.1 Κυτοκίνες

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επικοινωνούν μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης, εκκρίνοντας διάφορους διαβιβαστές πρωτεϊνικής ή γλυκοπρωτεϊνικής φύσης, που ονομάζονται κυτοκίνες.

Χαρακτηριστικά των κυτοκινών είναι το ευρύ φάσμα δράσεων και η αποτελεσματικότητά τους σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Οι περισσότερες δρουν μόνο τοπικά, σε γειτονικούς ιστούς (παρακρινής δράση), υπάρχουν όμως και μερικές που μπορούν να δράσουν σε απομακρυσμένους στόχους, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

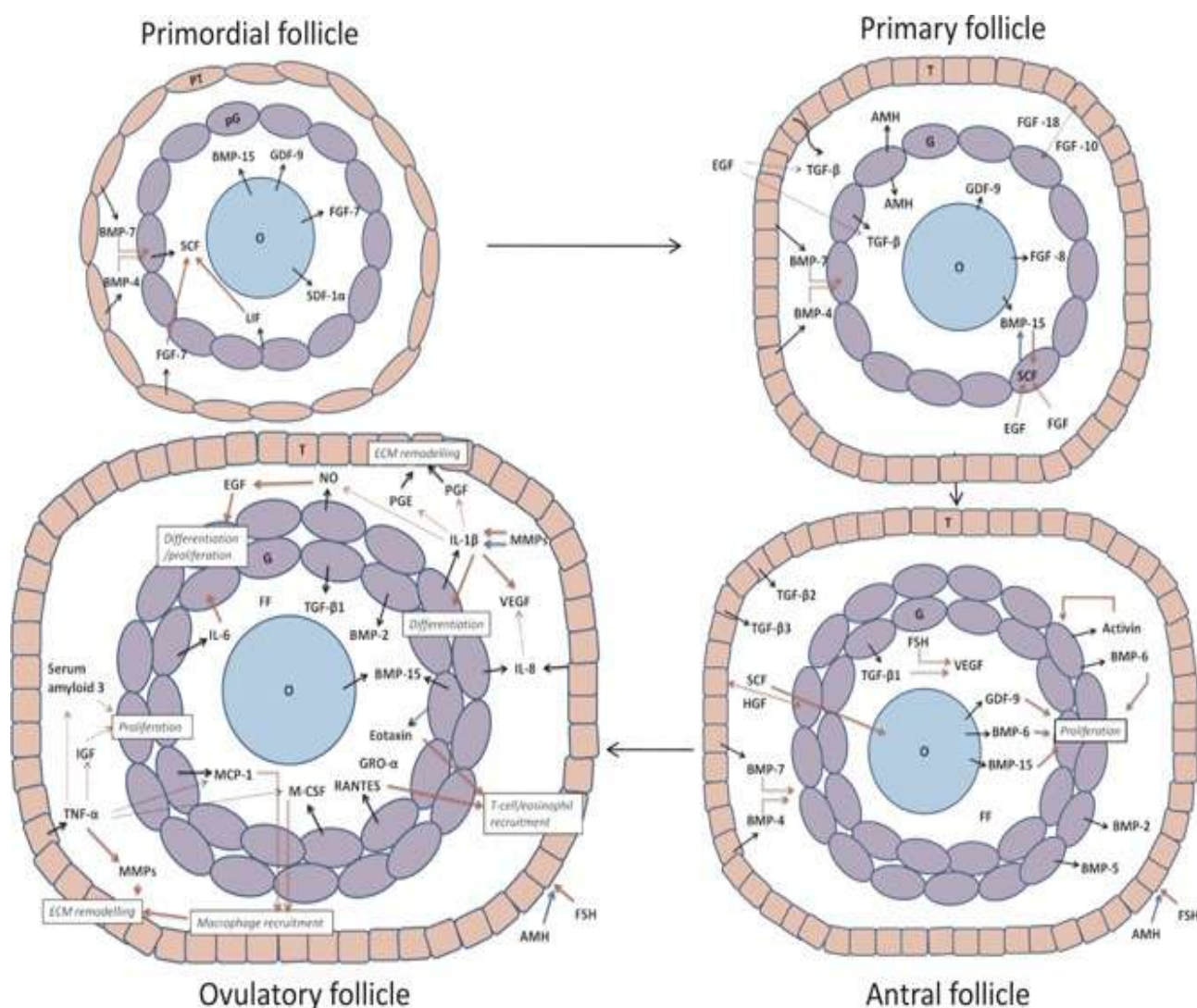
3.1.1 Λειτουργίες κυτοκινών

Οι κυτοκίνες παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις πτυχές της φλεγμονής και της ανοσίας. Είναι μικρές διαλυτές πρωτεΐνες σηματοδότησης καλύτερα γνωστές για τις ανοσορυθμιστικές τους ιδιότητες, αλλά όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται ως αυξητικοί παράγοντες που διέπουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση, τη λειτουργία, και τη μοίρα αυτών (Orsi, 2008; Orsi and Tribe, 2008). Περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες (ILS), παράγοντες διέγερσης των αποικιών (CSFs), παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNFs), αυξητικούς παράγοντες μετασχηματισμού (TGFs), και διάφορες άλλες πεπτιδικές ορμόνες (όπως η προλακτίνη), οι οποίες παράγονται από ένα εκτεταμένο φάσμα κυτταρικών τύπων. Οι κυτοκίνες είναι το κλειδί για την αναπαραγωγική επιτυχία, δημιουργώντας μια ανεκτικότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα και στο εμβρυϊκό περιβάλλον που υποστηρίζει τη γαμετογένεση, τη γονιμοποίηση, την πρόιμη ανάπτυξη του εμβρύου, την εμφύτευση της βλαστοκύστης και την ανάπτυξη του εμβρύου (Knight and Glister, 2006; Pangas *et al.*, 2007; Orsi and Tribe, 2008; Forbes *et al.*, 2010; Arsenescu *et al.*, 2011; Witkin *et al.*, 2011).

Η διήθηση των φλεγμονωδών και των ανοσοποιητικών κυττάρων εντός του ενδομητρικού ιστού είναι ένα ολοκληρωμένο γεγονός και κεντρικής σημασίας για τις διάφορες δραστηριότητες του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η στρατολόγηση αυτών των κυττάρων στο ενδομήτριο εξαρτάται από το στάδιο του κύκλου, και η παραμονή τους και η ενεργοποίησή τους πιθανότατα ρυθμίζονται από την τοπική έκφραση διαφόρων κυτοκινών και χημειοκινών με την

ικανότητα να κατευθύνουν την έκταση και τη διάρκεια της φλεγμονώδους και της ανοσολογικής αντίδρασης στο ενδομήτριο. Η έκφραση πολλών από αυτές τις κυτοκίνες και χημειοκίνες έχει αποδειχθεί στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και οι αυτοκρινείς ή παρακρινείς δράσεις τους σε μικρότερο βαθμό έχουν συσχετισθεί με διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες του ενδομητρίου (Chegini and Williams, 2000; Critchley *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2001). Αλλαγή στην έκφραση μερικών από αυτές τις κυτοκίνες/χημειοκίνες έχει συσχετισθεί με διάφορες διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της αποτυχίας εμφύτευσης του εμβρύου, επαναλαμβανόμενες αποβολές, δυσλειτουργική αιμορραγία της μήτρας και ενδομητρίωση (Salamonsen and Lathbury, 2000; Critchley *et al.*, 2001; Kharfi *et al.*, 2003; Laird *et al.*, 2003; Rhoton-Vlasak *et al.*, 2005).

Οι κυτοκίνες είναι επίσης σημαντικοί ρυθμιστές της λειτουργίας των ωοθηκών ιδίως όσον αφορά στην ωοθυλακιογένεση και την ωορρηξία, εφόσον συμβάλλουν στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος για την επιλογή ωοθυλακίων και την ανάπτυξη τους. Οι πολλαπλές λειτουργίες τους περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, την επιβίωση των ωοθυλακίων και την ατρησία και την ωρίμαση των ωαρίων. Αρκετές κυτοκίνες εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της ωοθυλακιογένεσης ενώ η παραγωγή άλλων, είναι στάδιο-εξαρτώμενη. Με δεδομένο αυτό τον καθοριστικό ρόλο και την ευκολία στην ανίχνευση στο ωοθυλακικό υγρό, οι κυτοκίνες έχουν θεωρηθεί ως ελκυστικοί βιοδείκτες της κατάστασης ωρίμασης των ωοκυττάρων και την έκβαση των επιτυχημένων τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Παρ' όλα αυτά, η κατανόηση των κυτοκινών και των αλληλεπιδράσεών τους παραμένει ατελής, και εξακολουθεί να είναι περιορισμένη η περιγραφή των μεταξύ τους σχέσεων.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της συμμετοχής των κυτοκινών καθ' όλη τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Αλληλεπιδράσεις και εντοπίσεις που βασίζονται στην ανθρώπινη ωοθυλακιογένεση, με τεκμήρια από ζωικά μοντέλα. Ο: ωάριο, PG: προκοκκώδη κύτταρα, T: κύτταρα θήκης. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν θέσεις παραγωγής των κυτοκινών, τα συμπαγή κόκκινα βέλη δείχνουν θετικές αλληλεπιδράσεις ενώ τα συμπαγή μπλε βέλη αρνητικές αλληλεπιδράσεις. Οι κυτοκίνες ρυθμίζουν την ωοθυλακιογένεση σε όλα τα στάδια, με τον αριθμό των γνωστών κυτοκινών να αυξάνονται προς την ωορρηξία.

Ειδικές οδοί σηματοδότησης / παρακρινείς διάλογοι έχουν ταυτοποιηθεί για έναν αριθμό κυτοκινών (Sharkey, 1998), αν και πολλά από τα στοιχεία είναι αποσπασματικά και αφορούν επιμέρους πτυχές της λειτουργίας των ωοθηκών. Ιντερλευκίνες και κυτοκίνες της TGF- β οικογένειας, για παράδειγμα, συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των γύρω σωματικών κυττάρων, όπως επίσης και στη ρύθμιση της επιβίωσης και της απόπτωσης του ωοθυλακίου (Kaipia and Hsueh, 1997; Drummond *et al.*, 2003; Shimasaki *et al.*, 2003; Bornstein *et al.*, 2004; Bristol *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2005; Knight and Glister,

2006). Τα ανοσοδραστικά κύτταρα της ωοθήκης, όπως τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, εκκρίνουν επίσης κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης γ (IFN- γ), του TNF- α , του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (G-CSF), την IL-1, την IL-6, την IL-8, τη χημειοελκτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων 1 (MCP-1) και των μακροφάγων κοκκιοκυττάρων (GM-CSF) τα οποία έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου, την ωορρηξία και την παραγωγή προγεστερόνης (Vinatier *et al.*, 1995; Bukulmez and Arici, 2000; Brännström and Enskog, 2002; Wu *et al.*, 2004). Οι κυτοκίνες εντός του ωοθυλακίου παράγονται, ως επί το πλείστον, σε τοπικό επίπεδο και εφόσον εκκριθούν διαχέονται για να δημιουργήσουν χημειοτακτικές διαβαθμίσεις ή δρουν τοπικά με παρακρινή / αυτοκρινή τρόπο, συχνά σε χαμηλές συγκεντρώσεις και με σύντομη ημιζωή έτσι ώστε ακόμη και μεγάλες τοπικές διαταραχές να μην μπορούν να επηρεάσουν το κυκλοφορικό προφίλ. Με την εξαίρεση των αναπαραγωγικών διαταραχών όπως η ενδομητρίωση και η φλεγμονώδης νόσος της πύελου, η φυσιολογική συγκέντρωση των ενδο-ωοθυλακικών κυτοκινών τυπικά υπερβαίνει αυτής στην κυκλοφορία (Best and Hill, 2000; Asimakopoulos *et al.*, 2006, 2009, 2010; Tarrant, 2010). Η σημασία των κυτοκινών στη φυσιολογία των ωοθηκών ολοένα και αναγνωρίζεται, αν και η κατανόηση του ακριβούς τους ρόλου και των αλληλεπιδράσεων αυτών παραμένει περιορισμένη.

3.2 Ιντερλευκίνες

Οι ιντερλευκίνες είναι ένας τύπος κυτοκινών που αρχικά είχε προταθεί ότι εκφράζεται από λευκοκύτταρα. Ο όρος ιντερλευκίνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1979 για να περιγράψει μια σειρά από εκκρίνοντα μόρια που παράγονται από τα λευκοκύτταρα, μια ποικιλία πολυπεπτιδίων που δρουν ειδικά ως διαμεσολαβητές μεταξύ των λευκοκυττάρων. Ωστόσο, ο όρος ιντερλευκίνη είναι κάτι σαν κατάλοιπο, αφού έχει βρεθεί ότι οι ιντερλευκίνες παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων του σώματος. Περιγράφουν μια ομάδα κυτοκινών που προκαλούν μια μεγάλη ποικιλία από αποκρίσεις σε κύτταρα και ιστούς και έχουν πολύπλοκες ανοσοτροποποιητικές λειτουργίες - συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ωρίμαση, τη μετανάστευση και την προσκόλληση. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική κυτταρική διαφοροποίηση και ενεργοποίηση. Μπορούν επίσης να έχουν προ- και αντί-φλεγμονώδη δράση, περιπλέκοντας περαιτέρω το χαρακτηρισμό τους. Περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό των γνωστών

ανοσολογικών μορίων «δεύτερου αγγελιαφόρου» στα θηλαστικά. Οι ιντερλευκίνες ξεκινούν μια απόκριση με σύνδεση σε υποδοχείς υψηλής συγγένειας που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Λειτουργούν κυρίως με παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο παρά με ενδοκρινή. Η απόκριση ενός συγκεκριμένου κυττάρου σε αυτές εξαρτάται από τα προσδέματα που εμπλέκονται, τους ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και τους ιδιαίτερους καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούνται. Οι ιντερλευκίνες ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των κυττάρων κατά την διάρκεια μίας ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό τις διακρίνει από τις χημειοκίνες, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι να κατευθύνουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο της φλεγμονής μέσω χημειοταξίας και τις ιντερφερόνες, οι οποίες μεσολαβούν κυρίως στην κυτταρική απόκριση σε ιογενή λοίμωξη.

Μεταξύ των κυτοκινών, οι ιντερλευκίνες (ILs) αντιπροσωπεύουν μια ομάδα από πολυλειτουργικά μόρια, αναγνωρισμένα για την ικανότητά τους να ρυθμίζουν φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις στο πλαίσιο φυσιολογικών αλλά και παθολογικών καταστάσεων. Πολλά μέλη της οικογένειας των ιντερλευκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-13 και IL-15, εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο (Kitaya *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2001; Chegini *et al.*, 2002, 2003; Okada *et al.*, 2000, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003).

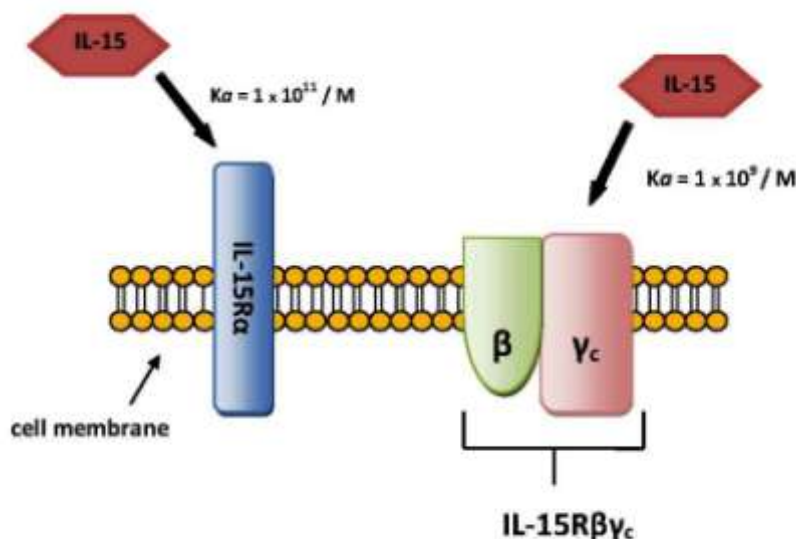
3.3 Ιντερλευκίνη 15 (IL-15)

3.3.1. Γενικά

Η ιντερλευκίνη 15 (IL-15) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των δεσμευτικών πρωτεϊνών με τέσσερις α-έλικες συμπεριλαμβανομένων των GH, IL-12, IL-3, IL-6, IL-7, G-CSF και GM-CSF (Bazan, 1990). Ανακαλύφθηκε το 1994 από δύο διαφορετικά εργαστήρια, και χαρακτηρίζεται ως αυξητικός παράγοντας των κυττάρων T (Kantoff *et al.*, 2010) μαζί με τις ιντερλευκίνη 2 (IL-2), ιντερλευκίνη 4 (IL-4), ιντερλευκίνη 7 (IL-7), ιντερλευκίνη 9 (IL-9), τον παράγοντα διέγερσης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων (G-CSF), και τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF).

Παρουσιάζει δομική ομοιότητα με την IL-2. Όπως η IL-2, έτσι και η IL-15 συνδέεται και δίνει σήματα μέσω ενός συμπλόκου αποτελούμενου από τη β αλυσίδα του IL-2 / IL-15 υποδοχέα (CD122) και την κοινή γ αλυσίδα (gamma-C, CD132). Έχει

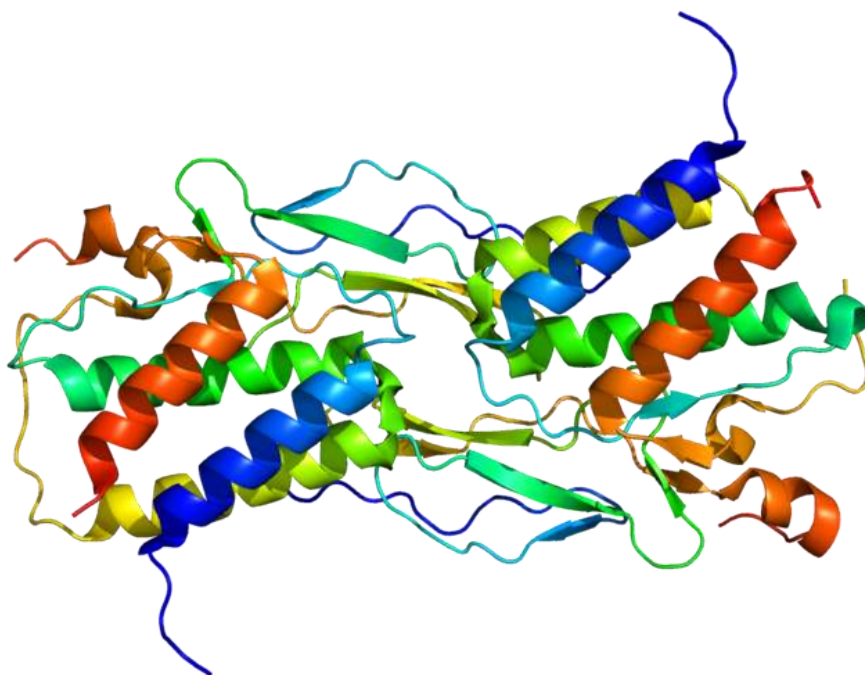
αποδειχθεί ότι συνδέεται με δύο διακριτά σύμπλοκα υποδοχέα σε διαφορετικά κύτταρα (Tagaya, Burton *et al.*, 1996; Tagaya, Bamford *et al.*, 1996; Waldman *et al.*, 1999). Παρά το γεγονός ότι η IL-15 έχει κοινές δραστηριότητες με την IL-2 και χρησιμοποιεί τις κοινές β και γ υπομονάδες του IL-2R, κατέστη προφανές ότι αυτές οι κυτοκίνες εξασκούν διαφορετικά αποτελέσματα στους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς.



Εικόνα 10: Η IL-15 δεσμεύεται στον υποδοχέα IL-15Rα με συγγένεια ($K_a=1,1011/M$). Μπορεί επίσης να συνδεθεί στο σύμπλεγμα σηματοδότησης IL-15Rβγc με χαμηλότερη συγγένεια ($K_a=1,109/M$).

Η IL-15 δρα σε διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των T και B λεμφοκυττάρων, κυττάρων NK, μονοκυττάρων, ηωσινόφιλων, και κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων. Διεγείρει τα NK, T και B κύτταρα να πολλαπλασιαστούν, να εκκρίνουν κυτοκίνες και να εμφανίζουν αυξημένη κυτταρολυτική δραστηριότητα ή να παράγουν αντισώματα. Ενισχύει επίσης τα φαγοκύτταρα, διατηρεί τα ιστιοκύτταρα, και ρυθμίζει τη μετανάστευση των ενεργοποιημένων T κυττάρων μνήμης. Εμπλέκεται στην προστασία έναντι διαφορετικών ιικών και βακτηριακών μολύνσεων που ρυθμίζουν όχι μόνο την έμφυτη ανοσία, αλλά και την επίκτητη. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η IL-15 παίζει ένα κεντρικό ρόλο στις προστατευτικές ανοσοαποκρίσεις, την απόρριψη αλλομοσχεύματος, και την παθογένεση διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων και χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών (Shurin *et al.*, 2003). Η IL-15 είναι επίσης ένας ισχυρός αναστολέας αρκετών αποπτωτικών οδών: καθυστερεί την απόπτωση των ουδετερόφιλων πιο αποτελεσματικά από την IL-2 (Girard *et al.*, 1996) και αναστέλλει

την από στέρηση κυτοκινών επαγόμενη απόπτωση των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η IL-15 προστατεύει τα δενδριτικά κύτταρα από την επαγόμενη από όγκο απόπτωση (Pirtskhalaishvili *et al.*, 2000).



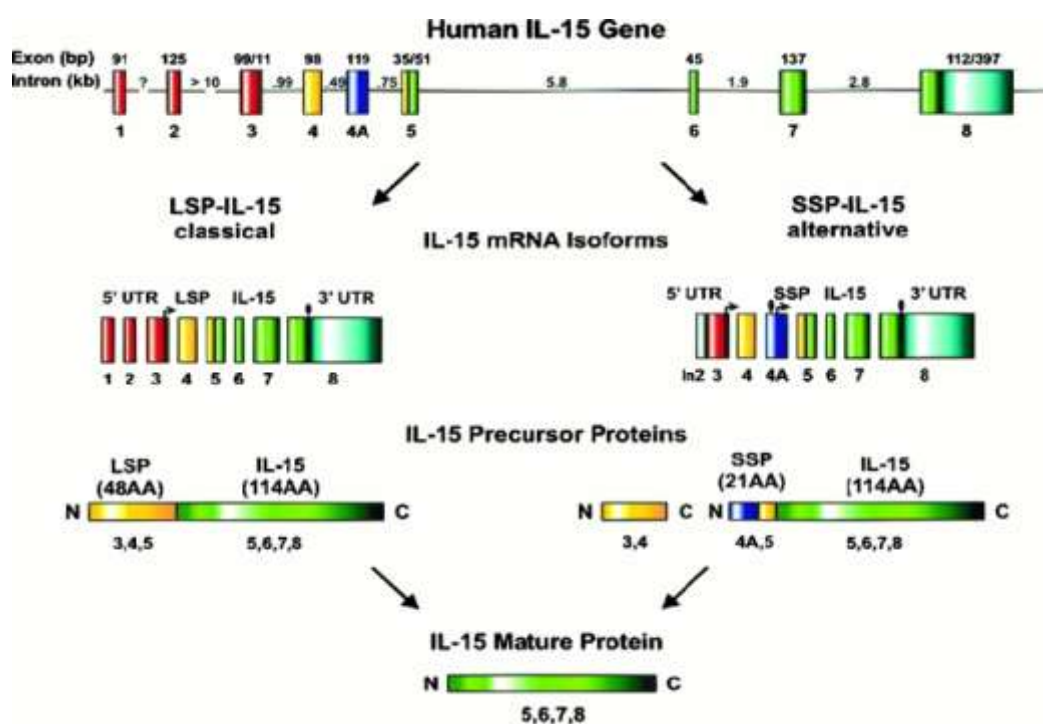
Εικόνα 11: Δομή της πρωτεΐνης IL-15.

3.3.2 Έκφραση

Η IL-15 εκφράζεται ιδιοσυστατικά από ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων και ιστών, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων, κερατινοκυττάρων, ινοβλαστών και των νευρικών κυττάρων (Mocellin *et al.*, 2010) αλλά υπάρχει παραγωγή και στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο (Kitaya *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2001; Chegini *et al.*, 2002, 2003; Okada *et al.*, 2000, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003). Ως πλειοτροπική κυτοκίνη, διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία.

3.3.3 Γονίδιο

Η IL -15 είναι μια 14-15 kDa γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από την 4q31 περιοχή του χρωμοσώματος 4 (Kennedy *et al*, 2000; Anderson *et al*, 1995). Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-15 περιλαμβάνει εννέα εξόνια (1 - 8 και 4A), τέσσερα από τα οποία (εξόνια 5 έως 8) κωδικοποιούν για την ώριμη πρωτεΐνη (Anderson *et al*, 1995; Krause *et al*, 1996), και οκτώ εσώνια. Έχουν αναφερθεί δύο παραλλαγές εναλλακτικού ματίσματος του μετάγραφου αυτού του γονιδίου που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Η αρχικά προσδιοριζόμενη ισομορφή, έχει ένα μεγάλο πεπτίδιο σήματος 48 αμινοξέων (IL-15 LSP) και αποτελείται από μια 5'-αμετάφραστη περιοχή 316 bp (UTR), μια 486 bp κωδικοποιούσα αλληλουχία και ένα C-τελικό άκρο 400 bp στην 3'-UTR περιοχή. Η άλλη ισομορφή (IL-15 SSP) έχει ένα βραχύ πεπτίδιο σήματος 21 αμινοξέων που κωδικοποιείται από τα εξόνια 4A και 5. Αμφότερες οι ισομορφές μοιράζονται 11 αμινοξέα μεταξύ των αλληλουχιών σήματος του N-τελικού άκρου. Αν και οι δύο ισομορφές παράγουν την ίδια ώριμη πρωτεΐνη, διαφέρουν στην κυτταρική διακίνηση τους. Η IL-15 LSP ισομορφή ταυτοποιήθηκε στο σύμπλεγμα Golgi (GC), στα πρώιμα ενδοσώματα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Υπάρχει σε δύο μορφές, την εκκρινόμενη και τη δεσμευμένη στη μεμβράνη ιδιαίτερα στα δενδριτικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά η IL-15 SSP ισομορφή δεν εκκρίνεται και φαίνεται να περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, όπου παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

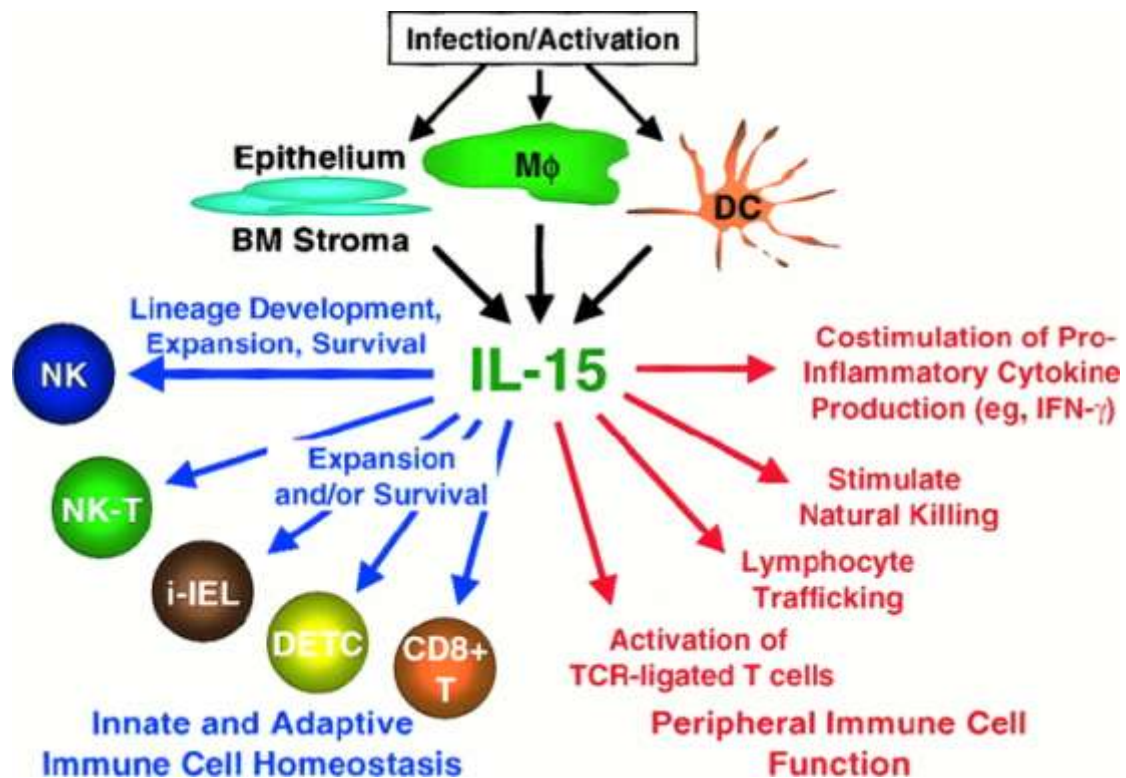


Εικόνα 12: Το γονίδιο της ανθρώπινης IL-15 περιλαμβάνει εννέα εξόνια (1-8 και 4A), τέσσερα από τα οποία κωδικοποιούν για την ώριμη πρωτεΐνη και οκτώ εσώνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4q31. Δυο ισομορφές της IL-15 έχουν περιγραφεί. Η κλασική με το μακρύ πεπτίδιο IL-15LSP και η εναλλακτική με το βραχύ πεπτίδιο IL-15SSP.

Παρά το γεγονός ότι το mRNA της IL-15 μπορεί να βρεθεί σε πολλά κύτταρα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των μαστοκυττάρων, των καρκινικών κυττάρων ή ινοβλαστών, αυτή η κυτοκίνη παράγεται ως μία ώριμη πρωτεΐνη κυρίως από δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα. Αυτή η ασυμφωνία μεταξύ της ευρείας εμφάνισης του mRNA της IL-15 και της περιορισμένης παραγωγής της πρωτεΐνης μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία των δώδεκα σε ανθρώπους και πέντε στα ποντίκια ανάντη κωδικονίων έναρξης, τα οποία μπορούν να καταστείλουν τη μετάφραση του mRNA. Το μεταγραφικά αδρανές mRNA αποθηκεύεται εντός του κυττάρου και μπορεί να επαχθεί μετά από συγκεκριμένο σήμα. Η έκφραση της IL-15 μπορεί να διεγερθεί από κυτοκίνες, όπως ο GM-CSF, από μη μεθυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια CpG, λιποπολυσακχαρίτη (LPS) μέσω TLR υποδοχέων, ιντερφερόνης γάμμα (IFN-γ) ή μετά από μόλυνση των μονοκυττάρων από τον ιό του έρπητα, από το μυκοβακτήριο της φυματίωσης και από τον μύκητα κάντιτα η λευκάζουσα.

3.3.4 Λειτουργία

Η ιντερλευκίνη 15 (IL-15) ρυθμίζει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων (NK). Όπως η IL-2, έτσι και η IL-15 έχειδειχθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων CD4-CD8-, CD4 + CD8 +, CD4 + και CD8 + T κύτταρων, καθώς και τη διευκόλυνση της επαγωγής κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, και την παραγωγή, τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων (Waldmann *et al.*, 1999). Σήματα επιβίωσης που διατηρούν τη μνήμη των T κύτταρων απουσία αντιγόνου παρέχονται από την IL-15.



Εικόνα 13: Δράσεις της πλειοτροπικής κυτοκίνης IL-15.

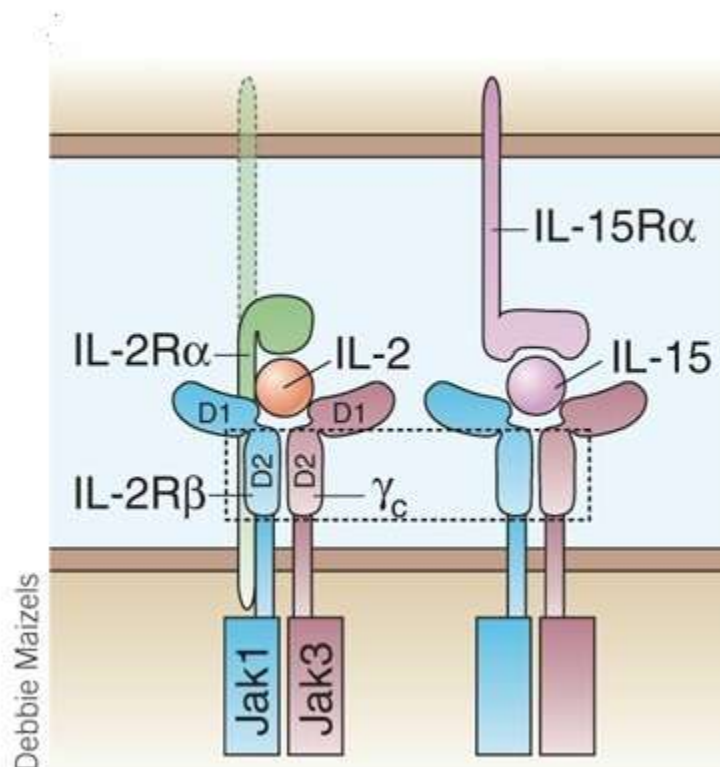
Η IL-15 είναι ένας αντι-αποπτωτικός παράγοντας για τα T κύτταρα (Marks-Konczalik J *et al.*, 2000). Προστατεύει τα ουδετερόφιλα από απόπτωση, διαμορφώνει τη φαγοκυττάρωση και διεγείρει την έκκριση της IL-8 και του IL-1 R ανταγωνιστή. Λειτουργεί μέσω της ενεργοποίησης των JAK2, p38 και ERK1 / 2 MAPK, Syk κινάσης και του NF-kB μεταγραφικού παράγοντα (Pelletier *et al.*, 2002). Σε μαστοκύτταρα, η IL-15 μπορεί να δράσει ως αυξητικός παράγοντας και ως αναστολέας της απόπτωσης. Σε αυτά τα κύτταρα ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK2 / STAT5 (Tagaya *et al.*, 1996). Η IL-15 επάγει επίσης πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων και διαφοροποίηση, και την αύξηση έκκρισης ανοσοσφαιρινών (Armitage *et al.*, 1995). Εμποδίζει επίσης την Fas επαγόμενη απόπτωση και επιτρέπει την επαγωγή της απόκρισης των αντισωμάτων μερικώς ανεξάρτητη από τη CD4-βοήθεια (Demirci *et al.*, 2004; Steel *et al.*, 2010). Τα μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα αποτελεσματικά μεταγράφουν και μεταφράζουν IL-15. Αυτά επίσης ανταποκρίνονται σε διέγερση επαγόμενη από την IL-15. Τα μακροφάγα ανταποκρίνονται αυξάνοντας την φαγοκυττάρωση, προκαλώντας IL-8, IL-12 και MCP-1 έκφραση και έκκριση των IL-6, IL-8 και TNF α (Budagian *et al.*, 2006). Δενδριτικά κύτταρα που επώαστηκαν με IL-15 καταδεικνύουν ωρίμαση με αυξημένη

CD83, CD86, CD40, και MHC τάξης II έκφραση, είναι επίσης ανθεκτικά σε απόπτωση, και δείχνουν αυξημένη έκκριση ιντερφερόνης- γ (Anguille *et al.*, 2009).

Η IL-15 έχει επίσηςδειχθεί ότι έχει αποτελέσματα και επί μη αιματολογικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων μυοκυττάρων, λιποκυττάρων, των ενδοθηλιακών και νευρικών κυττάρων. Έχει μια αναβολική δράση στα μυϊκά και επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων των μυών (Quinn *et al.*, 1995). Διεγείρει μυοκύτταρα και μυϊκές ίνες να συσσωρεύονται μέσω συσταλτικής πρωτεΐνης και είναι σε θέση να επιβραδύνει μυϊκή φθορά σε αρουραίους με καρκίνο που σχετίζεται καχεξία (Figueras *et al.*, 2004). IL-15 έχει επίσης αποδειχθεί ότι διεγείρει την αγγειογένεση (Angiolillo *et al.*, 1997) και επάγει την ανάπτυξη και την επιβίωση (Hanisch *et al.*, 1997).

Στα λεμφοκύτταρα των τρωκτικών η IL-15 παρεμποδίζει την απόπτωση μέσω επαγωγής ενός αναστολέα απόπτωσης, BCL2L1 / BCL-x(L). Σε ανθρώπους με κοιλιοκάκη η IL-15 καταστέλλει παρομοίως την απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων επάγοντας την Bcl-2 και / ή την Bcl-xL (Malamut *et al.*, 2010).

Ένας υποδοχέας αιμοποιητίνης, ο υποδοχέας της IL-15, που δεσμεύει την IL-15 πολλαπλασιάζει τη λειτουργία της. Ορισμένες υπομονάδες του υποδοχέα της IL-15 είναι κοινές με τον υποδοχέα της δομικά συναφούς κυτοκίνης IL-2 επιτρέποντας αμφότερες στις κυτοκίνες να ανταγωνίζονται και να ρυθμίζουν αρνητικά ή μια τη δραστηριότητα της άλλης. Ο αριθμός των CD8⁺ T κυττάρων μνήμης ελέγχεται από την ισορροπία μεταξύ της IL-15 και της IL-2. Όταν η IL-15 συνδέεται με τον υποδοχέα της, η JAK κινάση, οι STAT3, STAT5, και STAT6 μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται για να προκαλέσουν καθοδικά συμβάντα σηματοδότησης.



Εικόνα 14: Σύμπλοκα σηματοδότησης που σχηματίζονται από τις IL-2 και IL-15. Η διακεκομμένη πράσινη γραμμή υποδεικνύει την πιθανή trans παρουσίαση της IL-2. Το ορθογώνιο υποδεικνύει τις περιοχές της σχεδόν πλήρους ταύτισης τόσο στη δομή όσο και στην οργάνωση των D2 περιοχών των υπομονάδων σηματοδότησης, όπου βρίσκονται οι Jak1 και Jak3.

3.3.5 Ρόλος της IL-15 στο ενδομήτριο

Πολλά μέλη της οικογένειας των ιντερλευκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-13 και IL-15, εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο (Kitaya *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2001; Chegini *et al.*, 2002, 2003; Okada *et al.*, 2000, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003). Οι IL-13 και IL-15 εκφράζονται από μια ποικιλία κυττάρων, με τα φλεγμονώδη και ανοσο-σχετιζόμενα κύτταρα να είναι η κύρια πηγή παραγωγής τους, όμως, πολλά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα IL-15, με εξαίρεση κάποιων τύπων κυττάρων όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα σε απόκριση της φλεγμονής (Chomarat and Bannchereau, 1998; Brombacher, 2000; Kurys *et al.*, 2000; Fehniger and Caligiuri, 2001; Lodolce *et al.*, 2002; Waldmann, 2002; McInnes and Gracie, 2004). Η IL-15 είναι βασικός ρυθμιστής της τοπικής διήθησης της φλεγμονής του ιστού και της προσαρμοστικής ανοσίας και περισσότερο συγκεκριμένα του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των φυσικών φονικών κυττάρων και της παραγωγής της ιντερφερόνης γ και του TNF- α

(Fehniger and Caligiuri, 2001; Lodolce *et al.*, 2002; McInnes and Gracie, 2004; Nishimura *et al.*, 2005). Πολλές βιολογικές λειτουργίες της IL-15 είναι πανομοιότυπες με εκείνες της IL-2 εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων τους με κοινά συστατικά του υποδοχέα που εκφράζονται σε διάφορους τύπους κυττάρων (Fehniger and Caligiuri, 2001).

Στο ενδομήτριο, η χωρική και χρονική έκφραση των IL-13 και IL-15 χαρακτηρίζεται με αυξημένα επίπεδα πριν και κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως και κατά τις φάσεις πολλαπλασιασμού και έκκρισης του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου (Chegini *et al.*, 2002, 2003). Περαιτέρω αυξήσεις στην ενδομητρική έκφραση των IL-13 και IL-15 έχουν παρατηρηθεί σε γυναίκες με ενδομητρίωση, γυναίκες που βιώνουν επαναλαμβανόμενες αποβολές και σε δυσλειτουργική αιμορραγία της μήτρας εξαιτίας της προγεστερόνης, σε σύγκριση με το ενδομήτριο γυναικών με φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο (Chegini *et al.*, 2002, 2003; Rhoton-Vlasak *et al.*, 2005). Η προγεστερόνη (P_4), καθώς και τα PGE2 και IL-1 β ρυθμίζουν την έκφραση της IL-15 στα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου, του φθαρτού και των κυττάρων NK του φθαρτού (Dunn *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002, 2004). Εκτός από την IL-1 β , η ενδομητρική έκφραση των TNF- α TNF- β και των υποδοχέων τους κατά το φυσιολογικό έμμηνο κύκλο εμφανίζει μια σημαντική επικάλυψη στην κορυφή της έκφρασής τους με τις IL-13 και IL-15, υποδηλώνοντας εν δυνάμει ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των κυτοκινών (Chegini *et al.*, 1994, 1999a,b; Tabibzadeh *et al.*, 1999; Von Wolff *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2004).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων και έχουν δώσει ένα προφίλ μιας επιλεκτικής κατηγορίας μεταβολιτών. Από τα αποτελέσματα έχει προκύψει ότι διάφορες κυτοκίνες μπορεί να είναι προγνωστικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες της φυσικής ικανότητάς του ωαρίου να αναπτυχθεί μετά τη γονιμοποίηση σε ένα έμβρυο που μπορεί να εμφυτευθεί και να δώσει μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να εκτιμηθεί εάν συγκεκριμένες κυτοκίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα εργαλείο για την επιλογή των πιο ανταγωνιστικών ωαρίων στις τεχνολογίες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Σκοπός της μελέτης ήταν ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης 15 (IL-15) στο ωοθυλακικό υγρό και η αξιολόγηση της συσχέτισης αυτών με την ωριμότητα των ωοκυττάρων και δευτερευόντως με το μέγεθος των ωοθυλακίων, το BMI και την ηλικία γυναικών που υπόκεινται σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Αρχή μεθόδου ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματα της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι κυρίως η υψηλότερη ευαισθησία της και η επαναληψιμότητάς της και η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, όπως σε μεθόδους RIA (Radioimmunoassay). Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου – αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα προσαρμοσμένη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent), η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου – αντισώματος.

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

A. Πρόσδεση/Ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση)

Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω χημικού δεσμού (προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αγαρόζης, πολυακρυλαμίδιου) ή μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Η πρακτική απλότητα χειρισμού των πλαστικών σκευών και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας πλάκες μικροτιτλοδότησης καθιστά τον δεύτερο τρόπο προσρόφησης ευρύτερα χρησιμοποιούμενο στις ανοσοδοκιμασίες ELISA. Μειονέκτημά του αποτελεί η διαφορά προσρόφησης του αντιγόνου ή αντισώματος

που μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πλαστικά σκεύη ή διαφορετικά φρεάτια του ίδιου πλαστικού σκεύους. Ωστόσο, η χρήση πρωτεϊνών για τον αποκλεισμό της μη ειδικής προσρόφησης και απορρυπαντικών κατά τις επωάσεις και τις εκπλύσεις καθιστούν το προαναφερόμενο πρόβλημα αμελητέο.

Β. Χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος

Η χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA, σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιενέργεια για την ανίχνευση των προϊόντων. Η σύζευξη ενζύμων στα αντισώματα προβλέπει το σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει το αντιγόνο αλλά ούτε την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η ραφανική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal), και διακρίνονται σε άμεσα δραστικά στο υπόστρωμα (αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση) και αυτά που δρουν έμμεσα (ραφανική υπεροξειδάση). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου.

Γ. Χρήση χρωμογόνου υποστρώματος

Η ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος που αντιδρά με το ένζυμο παράγοντας έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμό). Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή ενζύμου-υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι: (α) η ταχύτατη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκειμένου να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, (β) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και (γ) η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος.

Δ. Ανίχνευση προϊόντος

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση το προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό, γεγονός που αποτελεί

ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Μολονότι, η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Ο λόγος της ευρύτατης χρήσης τους είναι ότι παρέχουν γρήγορη οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων, σταθερότητα του έγχρωμου προϊόντος για αρκετό χρόνο μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης και απλή και οικονομική μέτρηση μέσω φωτομέτρησης. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (*Optical Density, OD*) των δειγμάτων.

* Πειραματικά, η σύζευξη μπορεί να επιτευχθεί με πολλές μεθόδους, με ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τη μέθοδο του υπεριοδικού νατρίου (NaIO_4) και της γλουταραλδεϋδης. Εντούτοις, σπάνια σήμερα η σύζευξη ενζύμου - αντισώματος γίνεται στο εργαστήριο καθώς τα ενζυμο-συζευγμένα αντισώματα είναι ευρύτατα διαθέσιμα εμπορικά.

5.1.1 ELISA τύπου Sandwich

Για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich

Η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια, στη συνέχεια προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Μετά την αντίδραση του πρώτου αντισώματος με το εξεταζόμενο αντιγόνο, ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δευτέρου αντισώματος. Η ποσότητα του δευτέρου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου, δηλαδή διαλύματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του αντιγόνου, και τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε διεθνή μονάδα συγκέντρωσης (g/l ή υποδιαίρεσεις, π.χ. ng/ml , pg/ml).

Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργειών.

5.2 Υλικό

Πενήντα έξι καυκάσιες γυναίκες (ηλικίας 20-45 ετών, μέσος όρος $\pm$ SD, $36,3 \pm 6,7$) με δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεταξύ 16,5 και 37,5 ($23,4 \pm 4,1$) που υποβλήθηκαν σε ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) τους συστήθηκε λόγω απόφραξης ή έλλειψης σαλπίγγων, παρουσίας πολυπόδων, ινομυωμάτων ή κύστεων, σοβαρών συμφύσεων και ανεξήγητης στειρότητας. Οι γυναίκες ήταν είτε σε φυσικό κύκλο ($n = 7$) είτε σε τροποποιημένο φυσιολογικός υποστηριζόμενο κύκλο ($n = 4$) ή σε σύντομο πρωτόκολλο διέγερσης ($n = 16$) ή σε ήπιο πρωτόκολλο διέγερσης ($n = 29$). Κατά τη διάρκεια του φυσικού κύκλου δεν χορηγήθηκαν φάρμακα διέγερσης των ωοθηκών εκτός από την ένεση hCG για την ωρίμαση των ωοκυττάρων, στον τροποποιημένο φυσικό κύκλο ένας ανταγωνιστής GnRH και μια ελάχιστη δόση γοναδοτροπίνης προστέθηκαν τις τελευταίες ημέρες του κύκλου (από την ημέρα 11 έως την ημέρα χορήγησης της hCG), στο σύντομο πρωτόκολλο χορηγήθηκαν γοναδοτροπίνες από τη δεύτερη ημέρα του κύκλου και ακολουθήθηκαν από καταστολή χρησιμοποιώντας ανταγωνιστή GnRH όταν το μέγεθος του κυρίαρχου ωοθυλακίου ήταν περίπου 14 mm, στο ήπιο πρωτόκολλο διέγερσης δόθηκαν χαμηλότερες δόσεις γοναδοτροπινών σε ένα πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH από τη δεύτερη ή την τρίτη ημέρα του κύκλου. Εννέα γυναίκες έλαβαν ART για πρώτη φορά ενώ σαράντα επτά είχαν υποβληθεί σε έναν έως τρεις κύκλους ART προηγουμένως. Από τη μελέτη αυτή εξαιρέθηκαν γυναίκες με παρουσία φλεγμονωδών ή μολυσματικών καταστάσεων, αυτοάνοσων και νεοπλασματικών ασθενειών ή που είχαν πάρει φάρμακα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε διάστημα τεσσάρων εβδομάδων πριν την ωοθυλακιορρηξία.

5.3 Πρωτόκολλο ωοληψίας

Όλες οι γυναίκες παρακολουθήθηκαν υπερηχογραφικά καθημερινά μετά την 6η ημέρα του κύκλου και με μέτρηση των επιπέδων της οιστραδιόλης καθημερινά μεταξύ της 8ης και της 10ης ημέρας του κύκλου. Περίπου την 11η ημέρα του κύκλου (όταν το μέγεθος του ωοθυλακίου, όπως μετρήθηκε μέσω υπερήχου, ήταν $\geq 18\text{mm}$ και

οι συγκεντρώσεις οιστραδιόλης αυξάνονταν κατάλληλα ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων), χορηγήθηκε ενδομυϊκά 10000 IU hCG. Τριάντα έξι ώρες αργότερα, τα ωοκύτταρα και το αντίστοιχο FF ανακτήθηκαν με διακολπική αναρρόφηση.

5.4 Συλλογή ωοθυλακικού υγρού

Το ωοθυλακικό υγρό από το πρώτο τυχαία αναρροφόμενο (χωρίς έκπλυση) ωοθυλάκιο που περιείχε ωοκύτταρο, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της IL-15. Το περιεχόμενο κάθε ωοθυλακίου αναρροφήθηκε με βελόνα συλλογής μονού αυλού, το ωοκύτταρο συλλέχθηκε σε ένα τρυβλίο με το κατάλληλο μέσο καλλιέργειας και ο συνολικός όγκος του ωοθυλακικού υγρού τοποθετήθηκε σε ένα 15 ml αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα Falcon. Ο όγκος του αναρροφόμενου ωοθυλακικού υγρού καταγράφηκε και ακολούθως συσχετίστηκε με τη διάμετρο του αντίστοιχου ωοθυλακίου όπως αυτή μετρήθηκε πριν από την ανάκτηση του ωοκυττάρου μέσω υπερήχου. Τα κυτταρικά συστατικά του ωοθυλακικού υγρού απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά στις 2.800 στροφές και το υπερκείμενο καταψύχθηκε στους -20 ° C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.

5.5 Αξιολόγηση της ωριμότητας των ωαρίων

Τα ωάρια επωάζονταν σε κλίβανο (6% CO₂, 37°C), σε ειδικό καλλιεργητικό μέσο μέχρι τη στιγμή της μικρογονιμοποίησης.. Αμέσως πριν από τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης (ICSI), με τη χρήση υαλουρονιδάσης, εκτελέστηκε μηχανική αφαίρεση των κοκκωδών κυττάρων της διαφανούς ζώνης με επανειλημμένη αναρρόφηση με ειδική πιπέτα Pasteur και η ωριμότητα του ωοκυττάρου αξιολογήθηκε με στερεοσκόπιο. Τα ωοκύτταρα που βρίσκονταν στο στάδιο GV (πυρήνας βλαστικού κυστιδίου) ή στο στάδιο MI (μετάφαση ωοκυττάρων I, χωρίς πολικό σωματίο) χαρακτηρίστηκαν ανώριμα, ενώ τα ωάρια στο στάδιο MII (ωοκύτταρα μεταφάσης II, 1ο πολικό σώμα) ώριμα.

5.6 Μέτρηση της συγκέντρωσης της IL-15

Οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ELISA τύπου sandwich με τη βοήθεια ειδικού kit (R&D SYSTEMS, D1500, Minneapolis, MN, USA) για την ανίχνευση της συγκεκριμένης ιντερλευκίνης, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του κατασκευαστή. Η ευαισθησία της

μεθόδου ήταν μικρότερη από 2,0pg/ml και ο συντελεστής μεταβλητότητας ενδο- και δι-εργαστηριακά ήταν 4,8% και 6,6% αντίστοιχα.

Μέθοδος

Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιεί την ποσοτική ενζυμική ανοσοδοκιμασία τύπου sandwich. Ένα μονοκλωνικό, ειδικό για το ανθρώπινο IL-15, αντίσωμα έχει προ-επικαλυφθεί πάνω σε μία μικροπλάκα. Τα πρότυπα διαλύματα – standards και τα δείγματα προστίθενται εντός των φρεατίων και οποιαδήποτε παρούσα IL-15 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά την έκπλυση των μη δεσμευμένων ουσιών, ένα μονοκλωνικό συνδεδεμένο με ένζυμο ειδικό για την ανθρώπινη IL-15 αντίσωμα προστίθεται στα φρεάτια. Μετά από μία πλύση για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου αντιδραστήριου αντισώματος-ενζύμου, ένα διάλυμα υποστρώματος προστίθεται στα φρέατα και αναπτύσσεται χρώμα σε αναλογία με την ποσότητα της IL-15 που είχε συνδεθεί στο αρχικό στάδιο. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται και η ένταση του χρώματος μετριέται.

Υλικά

Το kit φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8 ° C.

Ανθρώπινη IL-15

-1 πλάκα 96 φρεατίων από πολυστυρόλιο (12 λωρίδες από 8 φρεάτια) επικαλυμμένων με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη IL-15.

-1 φιαλίδιο: 21 ml ενός μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για την ανθρώπινη IL-15 συζευγμένο με υπεροξειδάση κρένου με συντηρητικά.

-1 φιαλίδιο: 2,5 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-15 σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης με συντηρητικά, λυοφιλοποιημένο.

-1 φιαλίδιο: 11 ml διαλύτης RD1-19.

-1 φιαλίδιο: 21 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης RD5-5 για δείγματα υπερκειμένου κυτταρικής καλλιέργειας.

-1 φιαλίδιο: 21 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης RD6-10 για δείγματα ορού / πλάσματος.

-1 φιαλίδιο: 21 ml 25 φορές συμπυκνωμένο διάλυμα ρυθμιστικού επιφανειοδραστικού (Wash Buffer).

-1 φιαλίδιο: 12 ml Χρωμογόνο Αντιδραστήριο A, σταθεροποιημένο υπεροξείδιο του υδρογόνου.

-1 φιαλίδιο: 12 ml Χρωμογόνο Αντιδραστήριο B, σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλοβενζιδίνη).

-1 φιαλίδιο: 6 ml 2 N θειικό οξύ (Stop solution).

- 24 λωρίδες αυτοκόλλητες ταινίες.

Όργανα

- φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5702
- ειδικό φωτόμετρο για την ανάγνωση πλακών ELISA mindray MR-96A με δυνατότητα μέτρησης της απορρόφησης στα 450 nm, με τη διόρθωση μήκους κύματος ρυθμισμένη στα 540 nm ή 570 nm
- Vortex
- Χρονόμετρα
- 500ml βαθμονομημένος ογκομετρικός κύλινδρος
- Gilson αυτόματες πιπέτες (10-100μl, 100-1000μl)

Αναλώσιμα

- Απιονισμένο νερό
- Δοκιμαστικοί σωλήνες για αραίωση των προτύπων
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Γάντια αποστειρωμένα

Παρασκευή αντιδραστηρίων

Όλα τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Wash Buffer: Εάν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι στο συμπύκνωμα, τότε αυτό θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναμιγνύεται απαλά μέχρι οι κρύσταλλοι να διαλυθούν πλήρως. Απαιτείται προσθήκη 20 ml του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε 480 ml απιονισμένο νερό για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

Διάλυμα Υποστρώματος: Τα χρωμογόνα A και B πρέπει να αναμειχθούν μεταξύ τους σε ίσους όγκους μέσα σε 15 λεπτά χρήσης. Τα προστατεύουμε από το φως. 200 μL του προκύπτοντος μίγματος απαιτούνται ανά φρεάτιο.

Πρότυπα διαλύματα ανθρώπινης IL-15: Η ανθρώπινη πρότυπη IL-15 αναμειγνύεται με 1.0 ml απιονισμένου νερού. Αυτή η ανασύσταση παράγει ένα αρχικό διάλυμα 2500

pg/ml. Αφήνεται για τουλάχιστον 15 λεπτά με ήπια ανάδευση πριν τη δημιουργία των αραιώσεων.

Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 µl ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης RD5-5 (για δείγματα υπερκειμένου καλλιέργειας κυττάρων) στο διάλυμα 250pg/ml. Μεταφέρουμε με πιπέτα 500 µl της κατάλληλης ποσότητας διαλύτη στους υπόλοιπους σωλήνες. Χρησιμοποιούμε το αρχικό διάλυμα για να παράγουμε μία σειρά αραιώσεων. Αναμειγνύουμε κάθε σωληνάριο επιμελώς πριν από την επόμενη μεταφορά. Το 250 pg/ml πρότυπο χρησιμεύει ως υψηλού επιπέδου. Το κατάλληλο αραιωτικό χρησιμεύει ως το πρότυπο με συγκέντρωση μηδέν (0 pg / ml).

Διαδικασία ανάλυσης

Φέρνουμε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

1. Ετοιμάζουμε όλα τα αντιδραστήρια, τα πρότυπα που χρειάζονται, και τα δείγματα σύμφωνα με τις οδηγίες στις προηγούμενες ενότητες.
2. Αφαιρούμε την απαραίτητη ποσότητα φρεατίων από το πλαίσιο πλάκας, και επιστρέφουμε τα υπόλοιπα στην αλουμινένια συσκευασία που περιέχει το αποξηραντικό πακέτο, και σφραγίζουμε πάλι.
3. Προσθέτουμε 100 µl του διαλύτη RD1-19 σε κάθε φρεάτιο.
4. Προσθέτουμε 50 µl προτύπου, δείγματος ή ελέγχου ανά φρεάτιο. Καλύπτουμε με την κολλητική ταινία που παρέχεται. Επωάζουμε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Αναρροφούμε κάθε φρεάτιο και ξεπλένουμε, επαναλαμβάνοντας την διαδικασία τρεις φορές για ένα σύνολο τεσσάρων πλύσεων.
Πλένουμε γεμίζοντας κάθε πηγαδάκι με διάλυμα πλύσης (400 µl), χρησιμοποιώντας ένα μπουκάλι squirt. Η πλήρης απομάκρυνση του υγρού σε κάθε στάδιο είναι απαραίτητη για την καλή εκτέλεση. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρούμε τυχόν υπολείμματα Wash Buffer με αναρρόφηση ή μετάγγιση. Αντιστρέφουμε την πλάκα και στεγνώνουμε ενάντια σε καθαρό χαρτί κουζίνας.
6. Προσθέτουμε 200 µl συζευγμένης IL-15 σε κάθε φρεάτιο. Καλύπτουμε με μια νέα αυτοκόλλητη ταινία. Επωάζουμε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Επαναλαμβάνουμε την πλύση όπως στο βήμα 5.

8. Προσθέτουμε 200 μl του διαλύματος υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο. Επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστατεύουμε από το φως.
9. Προσθέτουμε 50 μl διαλύματος παύσης (stop solution) σε κάθε πηγαδάκι. Το χρώμα στα πηγαδάκια πρέπει να αλλάξει από μπλε σε κίτρινο. Αν το χρώμα στις κοιλότητες είναι πράσινο ή η αλλαγή χρώματος δεν εμφανίζεται ομοιόμορφα, χτυπάμε απαλά την πλάκα για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη.
10. Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα κάθε φρεατίου εντός 30 λεπτών, χρησιμοποιώντας ειδικό φωτόμετρο για την ανάγνωση πλακών ELISA, ρυθμισμένο στα 450 nm. Η διόρθωση μήκος κύματος ρυθμίζεται στα 540 nm ή 570 nm.

Ευαισθησία

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση (MDD) της ανθρώπινης IL-15 είναι συνήθως μικρότερη από 2 pg / ml.

Επαναληψιμότητα

Ο συντελεστής μεταβλητότητας ενδο- και δι-εργαστηριακά είναι 4,8% και 6,6% αντίστοιχα.

6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS. Τα στοιχεία που προκύπτουν από τη μέτρηση της ιντερλευκίνης 15 του ωοθυλακικού υγρού, τόσο για τα ανώριμα όσο και για τα ώριμα ωάρια παρουσιάζουν κανονική κατανομή (σύμφωνα με τη δοκιμασία Kolmogorov – Smirnov). Στα στοιχεία αυτά χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία independent – samples t-test για να εντοπισθούν διαφοροποιήσεις μεταξύ της ομάδας των ώριμων ωαρίων και της ομάδας των ανώριμων όσον αφορά στη συγκέντρωση της ιντερλευκίνης. Στην περίπτωση που η δοκιμασία Kolmogorov – Smirnov δεν κατάφερε να απορρίψει την ύπαρξη κανονικής κατανομής στα δείγματα των ανώριμων ωαρίων λόγω χαμηλού αριθμού του δείγματος, εκτελέστηκε και η μη παραμετρική διαδικασία Mann – Whitney *U* test.

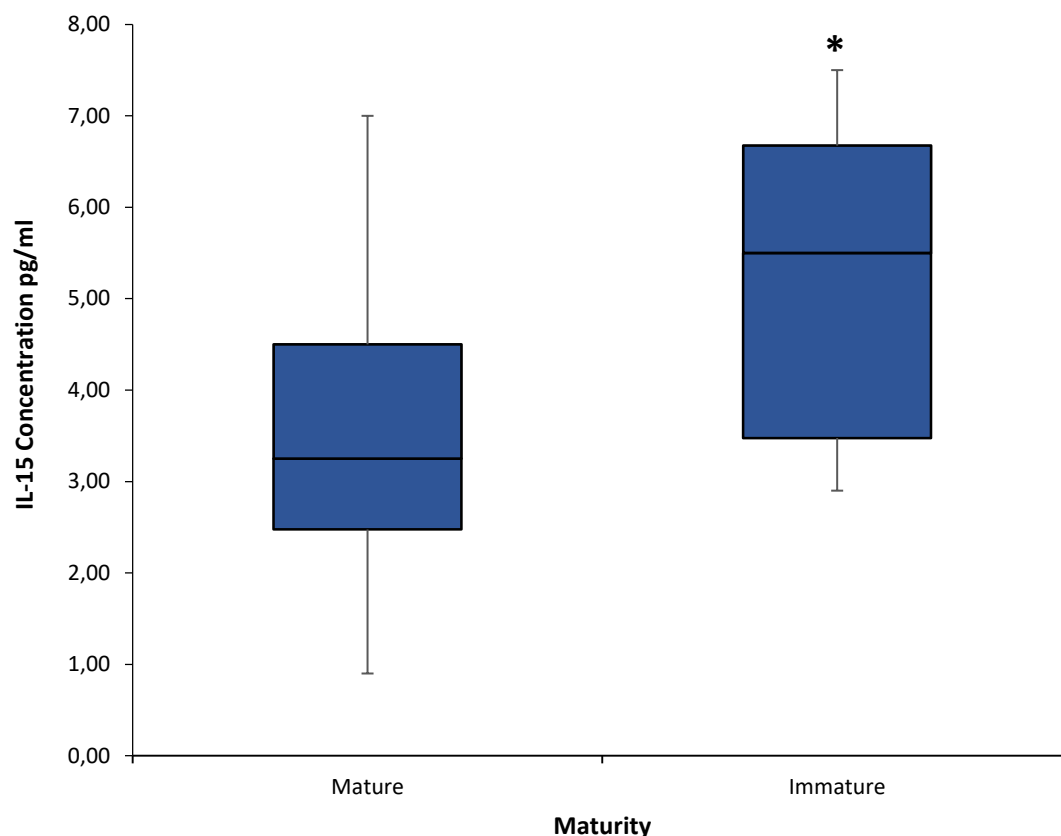
Δευτερευόντως, για να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση της συγκέντρωσης της εν λόγω ιντερλευκίνης με τις ποσοτικές μεταβλητές ηλικία, μέγεθος ωοθυλακίου και BMI, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης Pearson, εφόσον οι μεταβλητές ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τη μια μεταβλητή που βγήκε στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση πραγματοποιήθηκε και απλή γραμμική παλινδρόμηση. Το $p\text{-value} < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι όγκοι του ωοθυλακικού υγρού που αντιστοιχούσαν σε κάθε ωοθυλάκιο ανάλογα με το μέγεθος παπρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Όγκος ωοθυλακίου (ml)	Μέγεθος ωοθυλακίου (mm)
<0.5	<10
0.6-1.0	10-12
1.0-2.0	13-15
2.0-3.0	16-18
3.0-4.0	18-20
4.0-5.0	21-22
>5.0	>22

Η μέση συγκέντρωση IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό ώριμων και ανώριμων ωαρίων ήταν $3,450 \pm 1,489$ pg/ml (0,9-6,4 pg/ml, n=43) και $5,342 \pm 1,630$ pg/ml (3,1-7,5 pg/ml, n=13), αντίστοιχα. Η διάμεσος των τελευταίων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη (5.333 pg/ml) από τη διάμεσο των πρώτων (3.250 pg/ml) ($p < 0.001$, Εικόνα 15)



Εικόνα 15: Συγκέντρωση IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό ώριμων και ανώριμων ωαρίων. Ο άξονας χ δείχνει τις δύο κατηγορίες ωριμότητας (ώριμα-ανώριμα ωάρια) και ο άξονας y τη συγκέντρωση της IL-15 (pg/ml). Ο αστερίσκος υποδεικνύει τη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Παρατηρούμε (εικόνα 15) το κεντρικό διάστημα με το 50% των παρατηρήσεων και τη διάμεσο των δύο ομάδων (ώριμα-ανώριμα ωάρια) που μας δίνουν μια εικόνα για τη συμμετρικότητα της κατανομής. Φαίνεται κατά μέσο όρο ότι τα ωοθυλάκια από τα οποία συλλέχθηκαν ανώριμα ωάρια έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση IL-15 από αυτά από τα οποία συλλέχθηκαν ώριμα ωάρια.

T-TEST: ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ IL-15 ΚΑΙ ΤΗΣ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Η διαφορά της μέσης τιμής της συγκέντρωσης της IL-15 μεταξύ ώριμων και ανώριμων ωαρίων είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0.05$), με τη μέση τιμή των ανώριμων ωαρίων να είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ώριμων.

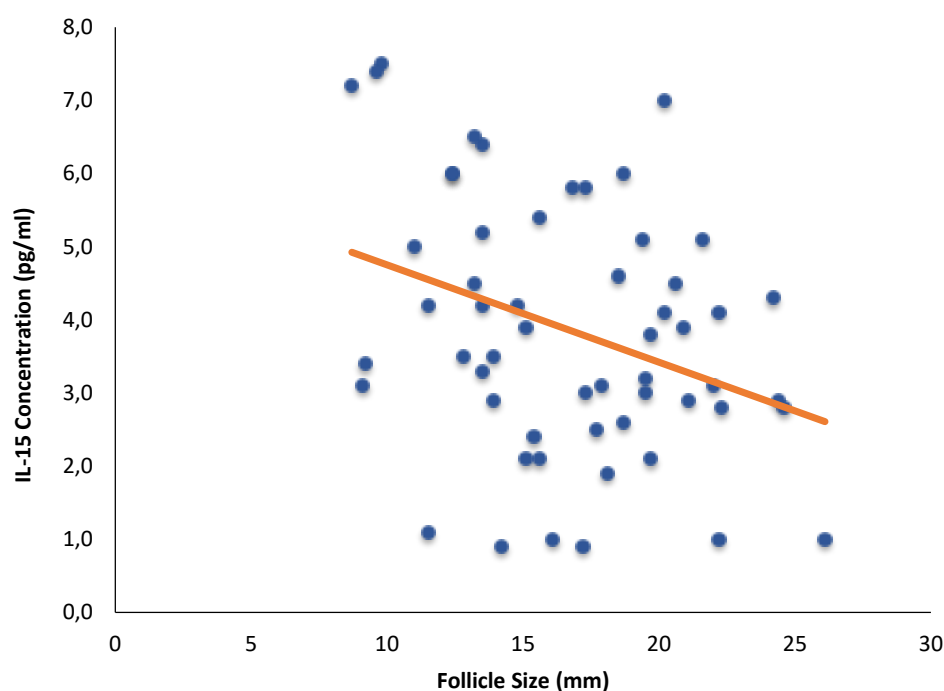
Είμαστε 95% σίγουροι ότι η διαφορά συγκέντρωσης της IL-15 μεταξύ ώριμων και ανώριμων ωαρίων είναι μεταξύ (-2,8836, -0,8997) στο γενικό πληθυσμό, με τη συγκέντρωση των ώριμων ωαρίων να είναι μικρότερη.

MANN-WHITNEY TEST: ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ IL-15 ΚΑΙ ΤΗΣ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Η διαφορά της διάμεσης τιμής της συγκέντρωσης της IL-15 μεταξύ ώριμων και ανώριμων ωαρίων είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0.001$).

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ PEARSON: ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ IL-15 ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Υπάρχει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση $r = -0,333$ ($p\text{-value} < 0,01$) μεταξύ συγκέντρωσης IL-15 και μεγέθους ωοθυλακίου. Όσο μεγαλύτερο είναι ένα ωοθυλάκιο τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης.



Εικόνα 16: Διάγραμμα διασποράς που δείχνει την αρνητική συσχέτιση μεταξύ μεγέθους ωοθυλακίων και συγκέντρωσης IL-15.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την cross-sectional μελέτη διαπιστώσαμε ότι οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό ήταν μεγαλύτερες στα ωοθυλάκια που περιείχαν ανώριμα από ότι σε εκείνα με ώριμα ωάρια, σε γυναίκες που υποβάλλονται σε τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Από όσο γνωρίζουμε, αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά.

Οι όγκοι που αντιστοιχούσαν σε κάθε μέγεθος ήταν παρόμοιοι με αυτούς που έχουν περιγραφεί από τους Wittmaack *et al.* (Wittmaack *et al.*, 1994).

Προηγούμενες μελέτες αποσκοπούσαν στη διερεύνηση συσχέτισης μεταξύ διαφόρων κυτοκινών του ωοθυλακικού υγρού και της ποιότητας των ωαρίων (2). Τα λευκοκύτταρα είναι οι κυριότερες πηγή σύνθεσης των κυτοκινών στο ωοθυλακικό ιστό και στον περιβάλλοντα ιστό. Επιπρόσθετως, τα σωματικά κύτταρα των ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένων των ωχρινικών, των στρωματικών κυττάρων, κυττάρων θήκης και κοκκωδών κυττάρων. Οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας, της γοναδικής έκκρισης στεροειδών, της λειτουργίας του ωχρού σωματίου, της ανάπτυξης του εμβρύου και της εμφύτευσης (Vujsic *et al.*, 2006; Ghizzoni *et al.*, 1997). Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των ωοθηκών. Συνεπώς, η παρουσία ρυθμιστικών παραγόντων στο ωοθυλακικό υγρό συνδέεται έμμεσα με τη γονιμοποίηση και την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Mendoza *et al.*, 2002; Hammadeh *et al.*, 2003; Hammadeh *et al.*, 2004). Από αυτούς τους παράγοντες τουλάχιστον ορισμένοι είναι πιθανό να επηρεάσουν, άμεσα ή έμμεσα τη βιωσιμότητα των ωαρίων και το αναπτυξιακό τους δυναμικό. Ορισμένες κυτοκίνες συμβάλλουν στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος για την επιλογή ωοθυλακίων και την ανάπτυξή τους, ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, την επιβίωση και την ατρησία των ωοθυλακίων και την ωρίμαση των ωοκυττάρων (Kaipia *et al.*, 1997; Drummond *et al.*, 2003; Shimasaki *et al.*, 2003; Bornstein *et al.*, 2004; Bristol *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2005; Knight *et al.*, 2006).

Πράγματι, έχει εξεταστεί η ύπαρξη των ιντερλευκινών IL-2, IL-15, IL-18 και της υπομονάδας p40 των IL-12/IL-23 στο ωοθυλακικό υγρό και έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης αυτών και του αποτελέσματος της εμβρυομεταφοράς κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Όσον αφορά στην IL-15, βρέθηκε

στατιστικά σημαντική υψηλότερη συγκέντρωση IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που απέτυχαν να φτάσουν σε μια κλινική εγκυμοσύνη. Αντίθετα, ασθενείς που πέτυχαν κλινική εγκυμοσύνη είχαν στατιστικά σημαντική μειωμένη συγκέντρωση IL-15 (διάμεση τιμή 0,8pg/ml) σε σύγκριση με εκείνες που δεν είχαν θετικό αποτέλεσμα μετά την εμβρυομεταφορά (διάμεση τιμή 1,4pg/ml). Επιπλέον, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις IL-15 ήταν προγνωστικές της αποτυχίας συλλογής ωαρίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρατίθενται παρακάτω (Vujisic *et al.*, 2006).

Συγκέντρωση κυτοκινών στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την παρουσία ωαρίου

Παρουσία ωαρίου	Συγκέντρωση κυτοκινών (pg/ml) (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)]		
	Κοινή p40 υπομονάδα των IL-12 και IL-23	IL-15	IL-18
Ναι (n = 28)	79.8* (58.3–113.3)	1.3 (0.7– 1.9)	38.2 (25.4– 56.1)
Όχι (n = 9)	44.5* (28.6–57.9)	1.5 (0.8– 2.0)	38.2 (25.1– 39.6)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.006$). Mann–Whitney *U*-test οι διαφορές μεταξύ των ομάδων των IL-15 και IL-18 δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Συγκέντρωση κυτοκινών στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε εμβρυομεταφορά κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση σε σχέση με την εγκυμοσύνη

Εγκυμοσύνη	Συγκέντρωση (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)]	κυτοκινών (pg/ml)	[διάμεσος
	Κοινή p40 υπομονάδα των IL-12 και IL-23		
		IL-15	IL-18
Ναι (n = 5)	112.9 (105.9–113.6)	0.8* (0.01– 1.7)	42.3 (37.9– 55.5)
Όχι (n = 13)	78.1 (59.1–91.2)	1.4* (0.9– 2.2)	36.6 (24.7– 50.3)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.047$). Mann–Whitney U-test οι διαφορές συγκεντρώσεις των p40 και IL-18 μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης εφόσον η συγκέντρωση της IL-15 βρέθηκε υψηλότερη σε ωοθυλάκια τα οποία έφεραν ανώριμα ωάρια. Έτσι θα μπορούσε πιθανόν να εξηγηθεί το γεγονός ότι γυναίκες με υψηλότερα ποσοστά IL-15 δεν κατάφεραν να πάρουν ένα θετικό αποτέλεσμα μετά από εμβρυομεταφορά, εφόσον η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραπέμπει σε ωάρια που δεν έχουν ολοκληρώσει σωστά τη διαδικασία ωρίμασης.

Επίσης, οι Nathalie Lédée *et al.* στη μελέτη που έκαναν το 2011 εξέτασαν τα επίπεδα των G-CSF και IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό ως μη επεμβατικούς βιοδείκτες της μετέπειτα επιτυχημένης γέννησης κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης σε ελεγχόμενους φυσικούς κύκλους. Και εδώ βρέθηκε ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις IL-15 ήταν προγνωστικές της αποτυχίας συλλογής ωαρίου. Παρατηρήθηκε επίσης κακή προγνωστική αξία της υψηλής συγκέντρωσης IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό στα ποσοστά εγκυμοσύνης. Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης.

Προγνωστική αξία των συνδυασμών των G-CSF και IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό σχετικά με τα ποσοστά γεννήσεων					
G-CSF και IL-15 συνδυασμός, pg/mL		Εγκυμοσύνη/ αρχόμενοι κύκλοι, %	Εγκυμοσύνη/ εμβρυομεταφορά, %	Γέννηση/ αρχόμενοι κύκλοι, %	Γέννηση/ εμβρυομεταφορά, %
G-CSF >12	IL-15 <7	51.5 (17/33)**	63 (17/27)*	48.48 (16/33)***	59.3 (16/27)***
	IL-15 >7	8.3 (1/12)	16.6 (1/6)	8.3 (1/12)	16.67 (1/6)
G-CSF <12	IL-15 <7	20.8 (5/24)	23 (3/13)	8.3 (2/24)	15.4 (2/13)
	IL-15 >7	14.3 (2/14)	25 (2/8)	0 (0/14)	0 (0/8)

Οι τιμές για τα σημεία διαχωρισμού (cut-off) προσδιορίστηκαν από την περιοχή κάτω από τη ROC καμπύλη. Τα p-value μεταξύ των ωοθυλακικών υγρών με G-CSF >12 pg/mL και IL-15 <7 pg/mL συγκρινόμενα με τους τρεις άλλους συνδυασμούς ήταν 0,001(***) για γέννηση/κύκλο και γέννηση/εμβρυομεταφορά, 0,005(**) για εγκυμοσύνη/κύκλο και 0,02(*) για εγκυμοσύνη/εμβρυομεταφορά με τη χρήση τεστ ANOVA.

Παρατηρούμε πως και εδώ υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών και της παρούσας μελέτης. Μεγαλύτερη συγκέντρωση IL-15 είχε σαν επακόλουθο τη μειωμένη πιθανότητα εγκυμοσύνης και τη μετέπειτα πιθανότητα ολοκλήρωσης αυτής και γέννησης ενός υγιούς παιδιού. Και στην παρούσα μελέτη βλέπουμε ότι τα ανώριμα ωάρια προέρχονταν από ωοθυλάκια με μεγαλύτερη συγκέντρωση IL-15.

Έχει αποδειχθεί (Luo *et al.* 2016) ότι η IL-15 μειώνει την επίδραση του Ca^{2+} σε ορισμένες κινάσες, όπως η ERK1/2 και η AKT, στα κερατινοκύτταρα (KCs), οι οποίες είναι κρίσιμες για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης τους. Η IL-15 αναστέλλει τη διαφοροποίηση των KCs που επάγονται από το Ca^{2+} μειώνοντας τη φωσφορυλίωση της AKT και αυξάνοντας την έκφραση του ERK1/2 σε KCs που διεγείρονται από Ca^{2+} . Η AKT είναι γνωστό ότι έχει ένα ρόλο στον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G1 και G2 (Ramaswamy *et al.* 1999; Kandel *et al.* 2002) και γενικά διάφορες κινάσες παίζουν βασικό ρόλο στην ωρίμαση των ωοκυττάρων. Δεδομένου ότι η αύξηση του ασβεστίου είναι ένα κρίσιμο γεγονός για την ενεργοποίηση του σύνθετου μηχανισμού που εμπλέκει την ωρίμαση και τη γονιμοποίηση των γαμετών (Boni *et al.* 2007; Ahmad *et al.* 1995), υπάρχει η

πιθανότητα η IL-15 να αναστέλλει τη δράση του στις κινάσες και αυτό είναι ένα ειδικό πεδίο που χρήζει περαιτέρω προσοχής και παραμένει να καθοριστεί.

Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό και του μεγέθους των ωοθυλακίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του ωοθυλακίου συσχετίζεται θετικά με την ωριμότητα του αντίστοιχου ωοκυττάρου.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αυξημένη συγκέντρωση IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό συνδέεται άμεσα και / ή έμμεσα με την αναστολή της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και τελικά με την ωριμότητα των ωοκυττάρων. Έτσι μπορεί να σχετίζεται αρνητικά με την έκβαση της διαδικασίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Εναλλακτικά, η IL-15 θα μπορούσε να είναι ένας απλός δείκτης της ανωριμότητας των ωαρίων. Τέλος, από τη στατιστική ανάλυση δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της IL-15 και της ηλικίας, ούτε και μεταξύ της συγκέντρωσης με το BMI των γυναικών.

Συμπερασματικά, προτείνεται ότι οι συγκεντρώσεις της IL-15 στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται αρνητικά με την ωριμότητα των ανακτηθέντων ωοκυττάρων μετά από τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Είναι πιθανό η IL-15 να αναστέλλει τη δράση του ασβεστίου στις κινάσες και επομένως να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της διαδικασίας της ωρίμασης των ωαρίων. Αυτή η υπόθεση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επιπρόσθετα οι συγκεντρώσεις της IL-15, που σχετίζονται με την ωρίμαση των ωαρίων, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης της δυνατότητας τους να αναπτυχθούν μετά τη γονιμοποίηση σε ένα υγιές βιώσιμο έμβρυο που μπορεί να εμφυτευθεί και να οδηγήσει σε επιτυχή κύηση, μαζί με τη μορφολογική αξιολόγηση. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί εάν η συγκέντρωσή της IL-15 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την επιλογή του πιο ανταγωνιστικού ωαρίου σε τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acosta TJ., 2007 Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev* 53:39–44.

Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, Tash JS., 1995 Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl* 35: 187-208.

Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Valentine V, Kirstein MN, Shapiro DN, Morris SW, et al., 1995 Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics* 25:701-706.

Angiolillo AL, Kanegane H, Sgadari C, Reaman GH, Tosato G., 1997 Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:231–237.

Anguille S, Smits EL, Cools N, Goossens H, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, 2009 Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *J. Transl. Med.* 7:109.

Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL, 1996 Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology* 137: 3762-3769.

Armitage RG, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH, 1995 IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 154:483–490.

Arsenescu R, Arsenescu V, de Villiers WJ., 2011 TNF-alpha and the development of the neonatal immune system: Implications for inhibitor use in pregnancy. *Am J Gastroenterol* 106:559-562.

Asimakopoulos B, Koster F, Felberbaum R, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N, 2006 Cytokine and hormonal profile in blood serum and follicular fluids during ovarian stimulation with the multidose antagonist or the long agonist protocol. *Hum Reprod* 21:3091-3095.

Asimakopoulos B, Koster F, Felberbaum R, Tripsiannis G, Caglar GS, Nikolettos N, Al-Hasani S, Diedrich K, 2009 Intrafollicular and circulating concentrations of leptin do not predict the outcome in IVF-ICSI cycles. *Reprod Sci* 16:113-119.

Asimakopoulos B, Demirel C, Felberbaum R, Waczek S, Nikolettos N, Koster F, Al-Hasani S, Diedrich K, 2010 Concentrations of inflammatory cytokines and the outcome in ICSI cycles. *In Vivo* 24:495-500.

Baker TG, 1982 Oogenesis and ovulation. In Austin CR, Short RV, eds. *Reproduction in Mammals*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge 17–45.

Baker TG, Sum W, 1976 Development of the ovary and oogenesis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 3(1):3-26.

Bazan, J. F., 1990 Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6934–6938.

Belayet HM, Kanayama N, Khatun S, Asahina T, Okada Y, Kitamura K, Kobayashi T, Terao T, 2000 Pharmacologic doses of interleukin 8 suppositories induce follicular maturation in rabbits. *Cytokine* 12:361-367.

Berisha B, Schams D, 2005 Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 29:305–317.

Best CL, Hill JA, 2000 Cytokines in ovarian function. In: Hill JA, editor. *Cytokines in human reproduction*. New York: Wiley-Liss. pp 43-77.

Blandau R.J., 1973 Aging Gametes: Their Biology and Pathology. *International Symposium on Aging Gametes*, Seattle, pp. 179-200.

Boni R, Gualtieri R, Talevi R, Tosti E, 2007 Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology* 68:156-164.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I, 2004 Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:135-141.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I, 2004 Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:135-141.

Brankin V, Hunter MG, Horan TL, Armstrong DG, Webb R, 2004 The expression patterns of mRNA-encoding stem cell factor, internal stem cell factor and c-kit in the prepubertal and adult porcine ovary. *J Anat* 205:393-403.

Brännström M, Enskog A, 2002 Leukocyte networks and ovulation. *J Reprod Immunol* 57:47-60.

Brännström M, Zackrisson U, Hagstrom HG, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S, Collins WP, Bourne T, 1998 Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril* 69:435–442.

Briggs D , Miller D , Gosden R, 1999 Molecular biology of female gametogenesis. *Molecular Biology in Reproductive Medicine* . Parthenon Press, New York, pp. 251–267.

Bristol SK, Woodruff TK, 2004 Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biol Reprod* 70:846-859.

Brombacher F, 2000 The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays* 22:646–656.

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ, 1990 Interactions between somatic cells and germcells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43:543-547.

Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S, 2006 IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(4):259–280.

Bukulmez O, Arici A. 2000. Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update* 6:1-15.

Byskov, A.G. and Hoyer, P.E., 1994 *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 487-540.

Cakmak Hakan, Franciosi Federica, Zamah AM, Cedars MI, and Conti Marco, 2016 Dynamic secretion during meiotic reentry integrates the function of the oocyte and cumulus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;113(9):2424-9.

Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK, 1991 Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 55: 109–13.

Chegini N and Williams RS, 2000 Cytokines in Human Reproduction. Chapter 5: Cytokines and growth factor networks in human endometrium from menstruation to embryo implantation. In Hill JA (ed.). Wiley & Sons Publisher, New York, NY, pp. 93–132.

Chegini N, Ma C, Roberts M, Williams RS and Ripps BA, 2002 Differential expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in endometrium of normal fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 56:93–110.

Chegini N, Roberts M and Ripps B, 2003 Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *Am J Reprod Immunol* 49:75–83.

Chegini N, Tang XM and Dou Q, 1999b The expression, activity and regulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5:459–466.

Chegini N, Zhao Y, Williams RS and Flanders KC, 1994 Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1), TGF- β 2, TGF- β 3, and TGF- β type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF- β 1-binding sites. *Endocrinology* 135:439–449.

Chegini, N., Dou, Q., Williams, R.S., 1999a An inverse relation between the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF- α receptor in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:297–302.

Cheng Y, Yata A, Klein C, Cho JH, Deguchi M, Hsueh AJ, 2011 Oocyte-expressed interleukin 7 suppresses granulosa cell apoptosis and promotes oocyte maturation in rats. *Biol Reprod* 84(4):707–714.

Chomarat P and Banchereau J, 1998 Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 17:1–52.

Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmarajan AM, Rodgers RJ, 2004 Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod* 71:1071–1078.

Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiriri A, 1998 Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 145:9–14.

Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS, 2012 Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 356(1-2):65–73.

Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner T, 2005 Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertil Steril* 84(3):627–633.

Critchley HO, Kelly RW, Brenner RM and Baird DT, 2001 The endocrinology of menstruation – a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:701–710.

Da Nobrega JE, Jr., Goncalves PB, Chaves RN, Magalhaes Dde M, Rossetto R, Lima-Verde IB, Pereira GR, Campello CC, Figueiredo JR, de Oliveira JF, 2012 Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro. *Zygote* 20:73-78.

De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ, 2004 Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* 275(2):447–458.

Demirci G, Li XC, 2004 IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cell Mol. Immunol.* 1(2):123–128.

Devoto L, Kohen P, Munoz A, Strauss JF III, 2009 Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 18:19-24.

Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB, 2005 Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146(6):2798–2806.

Driscoll, O.L., Tyler, J.P., Hangan, J.T., Fisher, P.R., Birdsall, M.A., and Knight, D.C., 2000 A prospective, randomized, controlled, double-blind, double-dummy comparison of recombinant and urinary HCG for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Hum. Reprod.* 15:1305-1310.

Drummond AE, Dyson M, Le MT, Ethier JF, Findlay JK, 2003 Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 202:53-57.

Dunn CL, Critchley HO and Kelly RW, 2002 IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1898–1901.

Edwards RG, 1965 Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 286: 926–9.

Edwards RG, 1965 Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349–51.

Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC, 1969 Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 221:632–5.

Eppig JJ, 1985 Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. *Dev Biol* 1:313-347.

Eppig JJ, 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.

Fauser BC, Devroey P, Yen SS, Gosden R, Crowley WF Jr, Baird DT, Bouchard P, 1999 Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Hum Reprod.* 14(11):2681-6.

Fehniger TA and Caligiuri MA, 2001 Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14–32.

Fehniger TA and Caligiuri MA, 2001 Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14–32

Figueras M, Busquets S, Carbó N, Barreiro E, Almendro V, Argilés JM, López-Soriano FJ, 2004 Interleukin-15 is able to suppress the increased DNA fragmentation associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 569(13):201–206.

Forbes K, Westwood M, 2010 Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol* 207:1-16.

Fortune JE, 1994 Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232.

Gardner R, 1999 Polarity in early mammalian development. *Curr Opin Genet Dev.* 9(4):417-21.

Ghizzoni L, Mastorakos G, Vottero A, Barreca A, Furlini M, Cesarone A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S., 1997 Corticotropin-releasing hormone (CRH) inhibits steroid biosynthesis by cultured human granulosa-lutein cells in a CRH and interleukin-1 receptor-mediated fashion, *Endocrinology* 138(11):4806-11.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG, 2008 Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14(2):159-177.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, Ritvos O, Mottershead DG, 2006 Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 119:3811-3821.

Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., Beaulieu, A. D., 1996 Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88:3176–3184.

Goto J, Suganuma N, Takata K, Kitamura K, Asahina T, Kobayashi H, Muranaka Y, Furuhashi M, Kanayama N, 2002 Morphological analyses of interleukin-8 effects on rat ovarian follicles at ovulation and luteinization in vivo. *Cytokine* 20:168-173.

Gougeon A, 1986 Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Hum Reprod* 1:81-87.

Gougeon A, 1996 Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:121-155.

Gougeon A, 2010 Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol (Paris)* 71:132-143.

Guraya SS, 2008 Cellular and Molecular Biology of Human Oogenesis, Ovulation and Early Embryogenesis. Fundamentals, Biomedical and Clinical Implications in Relation to Infant Disorders. New Age International Publishers.

Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W, 2003a Comparison between cytokine concentration in follicular fluid of poor and high responder patients and their influence of ICSI-outcome. *Am J Reprod Immunol* 50:131-136.

Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Hoffmeister H, Herrmann W, Rosenbaum P, Schmidt W, 2004 Relationship between cytokine concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in serum, follicular fluid and ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol* 51:81-85.

Hanisch UK, Lyons SA, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Kettenmann H, Kirchhoff F, 1997 Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272:28853–28860.

Hebert CA, Baker JB, 1993 Interleukin-8: A review. *Cancer Invest* 11:743-750.

Heikinheimo, O. and Gibbons, W.E., 1998 *Mol. Hum. Reprod.* 4:745.

Herrmann G, Spaniel-Borowski K, 1998 A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary. *Anat Histol Embryol* 27:143–146.

Hickey MM, Simon MC, 2006 Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* 76:217-257.

Høst E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S, 2002 Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 77(3):511–515.

Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S., 1999 Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 72:707–712.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB, 2005 Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118(Pt 22):5257–5268.

Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK, 2006 KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 75:421-433.

Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E, 2002 Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Res* 310:93–101.

Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E, 2003 Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 125:211–223.

Kaipia A, Hsueh AJ, 1997 Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363.

Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N, 2002 Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 22 (22):7831–41.

Kanegane H, Tosato G, 1996 Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 88(1):230–235.

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF, 2010 Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 363(5):411–422.

Kawano Y, Zeineh K, Furukawa Y, Utsunomiya Y, Okamoto M, Narahara H, 2012 The effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on secretion of interleukin-8 and growth-regulated oncogene- α in human granulosa-lutein cells. *Gynecol Obstet Invest* 73:189-194.

Kawasaki F, Kawano Y, Kosay Hasan Z, Narahara H, Miyakawa I, 2003 The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. *Clin Exp Med* 3:27-31.

Kelly RW, King AE and Critchley HO, 2001 Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 121:3–19.

Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ, 2000 Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in IL-15 deficient mice. *J Exp Med.* 191:771-780.

Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK, 2005 Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 73:967-973.

Kharfi A, Labelle Y, Mailloux J and Akoum A, 2003 Deficient expression of tumor necrosis factor receptor type 2 in the endometrium of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 50:33–40.

Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S and Honjo H, 2000 IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 63:683–687.

Knight PG, Glister C, 2006 TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132:191-206.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM, 1992 Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258:1798-1801.

Krause H, Jandrig B, Wernicke C, Bulfone-Paus S, Pohl T, Diamantstein T, 1996 Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine* 8:667-674.

Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, Hanover JA and Waldmannm TA, 2000 The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J Biol Chem* 275:30653–30659.

Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI and Li TC, 2003 A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 9:163–174.

Lédée N, Frydman R, Osipova A, Taieb J, Gallot V, Lombardelli L, Logiodice F, Petitbarat M, Fanchin R, Chaouat G, Achour-Frydman N, Piccinni MP, 2011 Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 95(1):94-8.

Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, Boone DL and Ma A, 2002 Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:429–439.

Luo X, Ding L, Chegini N, 2004 Gonadotropin-releasing hormone and TGF-beta activate MAP kinase and differentially regulate fibronectin expression in endometrial epithelial and stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E991–E1001.

Luo Xin, Jin Rui, Wang Fang, Jia Bo, Luan Kang, Cheng Feng-Wei, Li Lei, Sun Liang-Dan, Yang Sen, Zhang Sheng-Quan, Zhang Xue-Jun, 2016 Interleukin-15 inhibits the expression of differentiation markers induced by Ca²⁺ in keratinocytes. *Experimental Dermatology* 25(7):544-547.

Maeda A, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Cheng Y, Inoue N, Manabe N, 2007 Changes in expression of interleukin-6 receptors in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* 53:727-736.

Makabe, S., Nagur, T., Nattola, S. A., Boreda, J., and Motto, P. M., 1991 *Ultrastructure of Ovary*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-28.

Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, Mention JJ, Rahmi G, Kiyono H, Butz EA, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Meresse B, 2010 IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 120(6):2131–43.

Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, Waldmann TA, Tagaya Y, 2000 IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11445–11450.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ, 2002 Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science* 296(5576):2178–2180.

McInnes IB and Gracie JA, 2004 Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 4:392–397.

McLaughlin EA, McIver SC, 2009 Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. *Reproduction* 137:1-11.

McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL, 2005 Oocyteexpressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol* 234:57-66.

Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, Tesarik J, 1999 Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod* 93:863-868.

Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J, 2002 Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 17:1017-1022.

Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D, 2010 Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 102(7):493–501.

Motta PM, Nottola SA, Familiari G., Macchikelli G, Vizza E, and Correr S, 1995 Ultrastructure of human reproduction from folliculogenesis to early embryo development. A review. *Ital. J. Anat. Embryol.* 100(4):9-72.

Motta PM., Makabe S and Nottola SA., 1997b Natural History of the Female Germ Cell From Its Origin to Full Maturation Through Prenatal Ovarian Development *J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 75(1):5-10.

Motta PM., Makabe S., and Nottola SA, 1997a The Ultrastructure of Human Reproduction. I. The Natural History of the Female Germ Cell: Origin, Migration and Differentiation Inside the Developing Ovary. *Human Reprod. Update* 3(3):281-295.

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K, 1994 Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56:554-558.

MurayamaC, Kaji A, Miyauchi K,Matsui M, Miyamoto A, ShimizuT, 2010 Effect of VEGF (vascular endothelial growth factor) on expression of IL-8 (interleukin-8), IL-1beta and their receptors in bovine theca cells. *Cell Biol Int* 34:531-536.

Netter, A., 1993 *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, Paris pp. 627-642.

Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK, 2002 Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188:65-73.

Nilsson EE, Skinner MK, 2003 Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 69:1265-1272.

Nishimura H, Fujimoto A, Tamura N, Yajima T, Wajjwalku W and Yoshikai Y, 2005 A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J* 19:19–28.

Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K and Kanzaki H, 2002 Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4765–4770.

Okada H, Nakajima T, Yasuda K and Kanzaki H, 2004 Interleukin-1 inhibits interleukin-15 production by progesterone during in vitro decidualization in human. *J Reprod Immunol* 61:3–12.

Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K and Kanzaki H, 2000 Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod* 6:75–80.

Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M, 2000 Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 63:457-461.

Oktay K, Schenken RS, Nelson JF, 1995 Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod.* 53(2):295-301.

Öktem O, Urman B, 2010 Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 25:2944-2954.

Orsi NM, 2008 Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil (Camb)* 11:222-230.

Orsi NM, Tribe RM, 2008 Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 20:462-469.

Ostanin AA, Aizikovich BI, Aizikovich IV, Kozhin AY, Chernykh ER, 2007 Role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Bull Exp Biol Med* 143(1):75–79.

Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF, 1994 The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 161:194-205.

Pancarci SM, Ari UC, Atakisi O, Gungor O, Cigremis Y, Bollwein H, 2012 Nitric oxide concentrations, estradiol-17beta progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perfollicular blood flow in cows. *Anim Reprod Sci* 130:9-15.

Pangas SA, 2007 Growth factors in ovarian development. *Semin Reprod Med* 25:225-234.

Parrott JA, Skinner MK, 1999 Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140:4262-4271.

Pelletier M, Rathé C, Girard D, 2002 Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 532(12):164–170.

Pirtskhalaishvili G, Shurin GV, Gambotto A, Esche C, Wahl M, Yurkovetsky ZR, Robbins PD, Shurin MR, 2000 Transduction of dendritic cells with Bcl-Xl increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J Immunol.* 165(4):1956-64.

Quinn LS, Haugk KL, Grabstein KH, 1995 Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 136:3669–3672.

Rabinovici, J. and Jaffe, R.B., 1990 Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr. Reviews* 11(4):532-57.

Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR, 1999 Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(5):2110–5.

Rhoton-Vlasak A, Chegini N, Hardt N and Williams RS, 2005 Histological characteristics and altered expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 in endometria of levonorgestrel users with different uterine bleeding patterns. *Fertil Steril* 83:659–665.

Richards JS, Hedin L, 1988 Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* 50:441-463.

Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB, 1987 Ovarian follicular development: From physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 43:231-276.

Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S and Simon C, 2003 Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 9:253–264.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, 2010 The morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction* 139:309–318.

Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM, 1990 A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 21;345(6277):686-92.

Salamonsen LA and Lathbury LJ, 2000 Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 6, 16–27.

Sharkey A, 1998 Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 3:52-61.

Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F, 2003 The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl* 61:323-337.

Shurin, MR, Tourkova IL, Hackstein H, Shurin GV, 2003 Interleukin-15 and interleukin-21. Thompson AW, Lotze MJ (eds). *The cytokine handbook*. Academic Press, Amsterdam, pp 431–464

Skinner MK, 2005 Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11:461-471.

Steel JC, Ramlogan CA, Yu P, Sakai Y, Forni G, Waldmann TA, Morris JC, 2010 Interleukin-15 and its receptor augment dendritic cell vaccination against the neu oncogene through the induction of antibodies partially independent of CD4 help. *Cancer Res.* 70(3):1072–1081.

Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ, 2009 Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* 27(1):32–42.

Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ, 2008 Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135:111-121.

Suganuma N, Kitagawa T, Nawa A, Tomoda Y, 1993 Human ovarian aging and mitochondrial DNA deletion. *Horm Res* 39(1):16–21.

Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ, 2005 Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Dev Biol* 279(1):20-30.

Susor A, Jansova D, Anger M, Kubelka M, 2016 Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell Tissue Res* 363(1):69–84.

Tabibzadeh S, Satyaswaroop PG, von Wolff M and Strowitzki T, 1999 Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF- α and by oestrogen withdrawal. *Mol Hum Reprod* 5:1141–1149.

Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA, 1996 IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4:329–336.

Tagaya Y, Burton JD, Miyamoto Y, Waldmann TA, 1996 Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J.* 15:4928–4939.

Tarrant JM, 2010 Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: Considerations for their use. *Toxicol Sci* 117:4-16.

Trounson A, Wood C, Kausche A, 1994 In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62:353–62.

Van Wezel IL, Rodgers RJ, 1996 Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod* 55:1003–1011.

Verma S, Hiby SE, Loke YW and King A, 2000 Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 62:959–968.

Verma S, Hiby SE, Loke YW and King A, 2000 Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 62:959–968.

Vinatier D, Dufour P, Tordjeman-Rizzi N, Prolongeau JF, Depret- Moser S, Monnier JC, 1995 Immunological aspects of ovarian function: Role of the cytokines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 63:155-168.

Von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C and Beier HM, 1999 Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semi-quantitative RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 5:146–152.

Vujisic S, Lepej SZ, Emedi I, Bauman R, Remenar A, Tiljak MK, 2006 Ovarian follicular concentration of IL 12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23. *Human Reproduction* 21(10):2650–2655.

Waldmann T, 2002 The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases. *Arthritis Res* 4:S161–S167.

Waldmann TA, Tagaya Y, 1999 The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 17:19–49.

Wang J, Roy SK, 2004 Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: Modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 70:577-585.

Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ, 2013 Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(39):E3723-9.

Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D, 2011 Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. *BJOG* 118:145-153.

Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L, Lessey BA, 1994 Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil Steril.* 62:1205-1210.

Wu G, Bersinger NA, Mueller MD, von Wolff M, 2017 Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 34(3):357-364.

Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL, 2004 Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* 10:119-133.

Xin Luo, Rui Jin, Fang Wang, Bo Jia, Kang Luan, Feng-Wei Cheng, Lei Li, Liang-Dan Sun, Sen Yang, Sheng-Quan Zhang and Xue-Jun Zhang, 2016 Interleukin-15 inhibits the expression of differentiation markers induced by Ca²⁺ in keratinocytes. *Experimental Dermatology* 25(7):544-547.

Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI, 1997 Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184: 122-137.

Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y, 2003 Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *AmJ Reprod Immunol* 50:286-290.

