

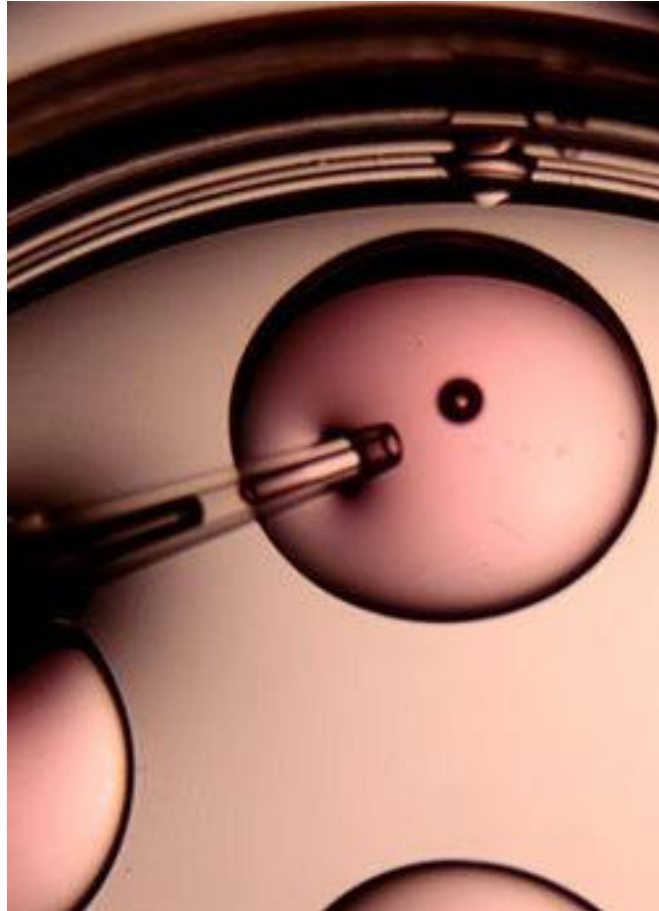


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ - ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ



**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟ
ΥΓΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΛΗΣ & ΚΑΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

Ελένη Τριανταφύλλου

ΑΜ. 20150596

Αθήνα

2018

ΘΕΜΑ

Σύγκριση των επιπέδων έκκρισης ωοκυτοκίνης στο καλλιεργητικό υγρό ανθρώπινων εμβρύων καλής και κακής ποιότητας

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λουτράδης Δημήτριος, Καθηγητής

Δρακάκης Πέτρος, Αν. καθηγητής

Ντόμαλη Αικατερίνη, Επ. καθηγήτρια

Επιβλέπουσα Διπλωματικής

Ντινοπούλου Βάλια, Εμβρυολόγος

Διπλωματική

για Δίπλωμα Ειδίκευσης - M.Sc.

στην «Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική»

Τριανταφύλλου Ελένη, Βιολόγος

Περιεχόμενα

	Πρόλογος	6
	Περίληψη	8
1.	Εισαγωγή	10
1.1	Γονιμοποίηση του ωαρίου	11
1.1.1	Πρόσδεση στη μεμβράνη του ωαρίου	12
1.1.2	Η φλοιώδης αντίδραση του ωαρίου	12
1.1.3	Σύντηξη και διείσδυση του σπερματοζωαρίου	12
1.1.4	Σχηματισμός προπυρήνων	12
1.1.5	Μετανάστευση προπυρήνων	13
1.1.6	Συγγαμία (Καρυογαμία)	13
1.2	Πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη	14
1.2.1	Εμβρυϊκή αυλάκωση	14
1.2.2	Εμβρυϊκή συμπίκνωση	17
1.2.3	Ενεργοποίηση εμβρυϊκού γονιδιώματος	17
1.2.4	Εκκόλαψη	18
1.2.5	Εμφύτευση εμβρύου	19
1.3	<i>In vitro</i> καλλιέργεια εμβρύων	22
1.3.1	Μορφολογική αξιολόγηση και επιλογή εμβρύων	22
1.3.2	Αναπτυξιακές δυνατότητες στις μεθόδους καλλιέργειας	24
1.3.3	Καλλιεργητικά μέσα	25
1.4	Εμβρυϊκή και Πρωτεωμική βιωσιμότητα	27
1.4.1	Πρωτεωμική	27
1.4.2	Βιοδείκτες	29
1.4.3	Επιλογή εμβρύου μέσω αξιολόγησης του καλλιεργητικού μέσου	29
1.5	Ωκυτοκίνη (Oxytocin - Oxt)	35
1.5.1	Δομή	35
1.5.2	Δομή γονιδίου	36
1.5.3	Γονιδιακή ρύθμιση	38
1.5.4	Φυσιολογική δράση	40
1.5.5	Κεντρικό σύστημα ωκυτοκίνης	41
1.5.6	Περιφερικό σύστημα ωκυτοκίνης	46
1.5.7	Εξελικτική σκοπιά	51
2.	Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί	53
2.1	Εισαγωγή	53
2.1.1	Η βασική αρχή των Ανοσοχημικών τεχνικών	53
2.1.2	Οι κατηγορίες των Ανοσοχημικών τεχνικών	55
2.1.3	Ανταγωνιστικές και μη Ανταγωνιστικές μέθοδοι	56
2.1.4	Διαφορές των Ανοσοχημικών τεχνικών ανάλογα με τον Ιχνηθέτη	57
2.1.5	Οι Ετερογενείς Ανοσοχημικές μέθοδοι, η ELISA	61
2.1.6	Υλικά και Εξοπλισμός που δεν παρέχονται με τα kits	63
2.1.7	Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς	64
2.1.8	Η αξιολόγηση των τιμών απορρόφησης	65
2.1.9	Άλλοι τρόποι υπολογισμού των εξισώσεων αναφοράς	66
2.1.10	Στοιχεία για τις άλλες Ανοσοχημικές μεθόδους	67
2.1.11	Παράγοντες που επηρεάζουν τις Ανοσοχημικές αναλύσεις	67
3.	Πειραματική διαδικασία	71
3.1	Υλικά και Μέθοδοι	71
3.1.1	Επιλογή πληθυσμού	
3.1.2	Προετοιμασία και κριτήρια επιλογής δειγμάτων	65
3.1.3	Στάδια καλλιέργειας	
3.1.4	Συλλογή καλλιεργητικού μέσου εμβρύων	66
3.2	Προσδιορισμός ωκυτοκίνης	
3.2.1	Μέθοδος προσδιορισμού (kit)	67
3.2.2	Προετοιμασία αντιδραστηρίων	68
3.2.3	Διαδικασία προσδιορισμού	69
3.2.4	Βαθμονόμηση	
3.2.5	Τυπική πρότυπη καμπύλη	71
4.	Αποτελέσματα πειράματος	78
5.	Συζήτηση - Συμπεράσματα	84
6.	Βιβλιογραφία	90

...πάντα ἐν σοφίᾳ ἐποίησας...

Αλήθεια, πόσο θαυμαστός είναι ο άνθρωπος, η κορωνίδα της Δημιουργίας! Από τη στιγμή της σύλληψής του, μέχρι την εξέλιξή του σε ολοκληρωμένο ενήλικο άτομο.

Αντίστοιχα και η έρευνα που γίνεται με βάση τον άνθρωπο, πάντα προκαλεί το ενδιαφέρον της Επιστήμης και συνάμα αποτελεί ένα συναρπαστικό αλλά και επίπονο ταξίδι στην προσπάθεια βελτίωσης της ποιότητας ζωής του.

Όσον αφορά την προσωπική μου διαδρομή, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον καθηγητή Λουτράδη Δημήτριο για τη δημιουργία του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική» καθώς και τον Αν. καθηγητή Δρακάκη Πέτρο, υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος. Συνεχίζοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην εμβρυολόγο Ντινοπούλου Βάλια, υπεύθυνη εκπόνησης της παρούσας Διπλωματικής εργασίας, όπου η αγάπη για τη δουλειά της αλλά και το mentoring που προσέφερε απλόχερα καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας, αποτέλεσαν επιπρόσθετο κίνητρο για την ολοκλήρωσή της. Επιπλέον ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους ανθρώπους από το φιλικό μου περιβάλλον για την υποστήριξή τους όλο αυτό το διάστημα..

Περίληψη

Με την αυξανόμενη επιθυμία υπογόνιμων ζευγαριών για απόκτηση απογόνων, η Τεχνολογία Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (**Assisted Reproductive Technology, ART**) προσφέρει ένα μέσο για να ξεπεραστεί αυτή η πρόκληση. Αρκετές μέθοδοι υπάρχουν διαθέσιμες, ανάλογα με το βαθμό της υπογονιμότητας. Περισσότερα από 4 εκατομμύρια μωρά έχουν γεννηθεί παγκοσμίως χρησιμοποιώντας τεχνικές ART. Ωστόσο, τα ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης και εγκυμοσύνης ανά μεταφερόμενο έμβρυο κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Σε αυτή τη Διπλωματική εργασία, παρουσιάζεται ότι η πρωτεωμική έχει τη δυνατότητα να βοηθήσει στην επιλογή του καλύτερου εμβρύου. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε το ενδεχόμενο σύνδεσης της παρουσίας της ορμόνης ωκυτοκίνης στο καλλιεργητικό υλικό των εμβρύων με την ποιότητά τους και κατέπεκταση την εγκαθίδρυση υγιούς εγκυμοσύνης. Κατά συνέπεια, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα κλειδί για την καθιέρωση ενός μη-επεμβατικού, αξιόπιστου, αναπαραγωγίμου και ειδικού τρόπου αξιολόγησης της εμβρυϊκής βιωσιμότητας, της ύπαρξης ανευπλοειδίας, της δεκτικότητας του ενδομητρίου, της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος κ.α. Αυτοί οι βιοδείκτες περιλαμβάνουν μια ποικιλία τόσο δομικών όσο και λειτουργικών πρωτεϊνών. Η εφαρμογή αυτών των δυνητικών βιοδεικτών στο μέλλον θα μπορούσε να συμβάλει στην ενίσχυση των αποτελεσμάτων της ART προσφέροντας μια εξατομικευμένη θεραπεία για τους ασθενείς με βάση τα εξατομικευμένα πρωτεϊνικά προφίλ τους.

1. Εισαγωγή

Η κατανόηση των σταδίων πρώιμης ανάπτυξης ανθρώπινων εμβρύων είναι ζωτικής σημασίας, ιδιαίτερα για τη βελτιστοποίηση των Τεχνικών Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Techniques, ART). Επίσης, θα βοηθούσε στη διερεύνηση των περιπτώσεων πρώιμης απώλειας εγκυμοσύνης, καθώς και στη βελτιστοποίηση του τρόπου καλλιέργειας βλαστοκυττάρων (Stem Cells, SCs) στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής^[1]. Ωστόσο, η μελέτη της πρώιμης ανάπτυξης ανθρώπινων εμβρύων αποτελεί πρόκληση. Αυτό οφείλεται στη μικρή διαθεσιμότητά τους και στο γεγονός ότι η έρευνα με χρήση ανθρώπινων εμβρύων υπόκειται σε μεγάλο βαθμό, σε ηθικούς και νομικούς περιορισμούς.

Σήμερα, η εξωσωματική γονιμοποίηση (*in vitro* Fertilization, IVF) αποτελεί τη μόνη ελπίδα για πολλά ζευγάρια με προβλήματα γονιμότητας. Η αξιολόγηση των εμβρύων έχει τεράστιο αντίκτυπο στην επιτυχή έκβαση της διαδικασίας και ιδιαίτερα τώρα που γίνονται προσπάθειες για τη μεταφορά ενός μόνο εμβρύου (Single Embryo Transfer, SET). Συνολικά, η βιωσιμότητα των εμβρύων συσχετίζεται έντονα με το βέλτιστο επίπεδο ωρίμανσης των ωοκυττάρων στις ωοθήκες, την επαρκή γονιμοποίηση, την προοδευτική ανάπτυξη σε όλα τα στάδια πριν από την εμφύτευση, καθώς και την επακόλουθη εμφύτευση στο ενδομήτριο. Η κυτταρογενετική ανάλυση σε συνδυασμό με την αξιολόγηση της μορφολογίας και του μεταβολισμού του εμβρύου κατά τη διάρκεια της προ-εμφυτευτικής ανάπτυξης, θα μπορούσε να βελτιώσει περαιτέρω την ικανότητα επιλογής του πιο κατάλληλου εμβρύου^[3,4]. Θα συνέβαλε δηλαδή στην επίτευξη του τελικού στόχου της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, που είναι η γέννηση ενός υγιούς παιδιού. Κατά συνέπεια, η αξιολόγηση της ποιότητας των εμβρύων είναι υψίστης σημασίας.

Έχουν σημειωθεί πάνω από 4 εκατομμύρια γεννήσεις παιδιών παγκοσμίως με χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στις Ηνωμένες Πολιτείες μόνο, το 1% του συνόλου των παιδιών που γεννιούνται ετησίως, έχουν συλληφθεί με τεχνικές ART. Από την άλλη πλευρά, παρατηρούνται πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης και εγκυμοσύνης ανά μεταφερόμενο έμβρυο, μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, 70% των μεταφερόμενων εμβρύων αποτυγχάνουν να εμφυτευθούν^[2]. Επίσης, υπάρχουν κλινικές που πραγματοποιούν μεταφορά μεγαλύτερου αριθμού εμβρύων αντί για μεταφορά ενός, γεγονός που εκθέτει τις ασθενείς σε διαφόρους κινδύνους.

Με την πρόσφατη επέκταση των σημερινών γνώσεων και εξελίξεων, είναι επίκαιρη η εμφάνιση του τομέα «omics» στην ανθρώπινη αναπαραγωγή^[5].

Σε αυτό το σημείο έρχεται να βοηθήσει η Πρωτεωμική (Proteomics) προσφέροντας τη δυνατότητα επιλογής του καλύτερου εμβρύου προς μεταφορά^[2].

1.1 Γονιμοποίηση του ωαρίου

Μια σειρά από δυναμικά και σύνθετα γεγονότα ενεργοποιούνται μετά από την αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίων-ωοκυττάρων, η οποία οδηγεί στη γονιμοποίηση και το σχηματισμό ενός ζυγώτη. Αυτά τα γεγονότα περιλαμβάνουν τη διείσδυση σπερματοζωαρίων, τη σύντηξη ωοκυττάρων-σπέρματος και την ενεργοποίηση του ωοκυττάρου, την ανάπτυξη αρσενικών και θηλυκών προπυρήνων και έπειτα τη σταδιακή μετανάστευση των προπυρήνων σε κεντρική θέση μέσα στο ωοκύτταρο^[6].

Η γονιμοποίηση συνήθως γίνεται στην λήκυθο της σάλπιγγας. Είναι το αποτέλεσμα της συνένωσης ενός ωαρίου με ένα σπερματοζωάριο, που είναι απλοειδή κύτταρα με 23 χρωμοσώματα το καθένα. Σαν αποτέλεσμα έχουμε τη δημιουργία ενός διπλοειδούς ζυγώτη με 46 χρωμοσώματα, δηλαδή όσα και τα χρωμοσώματα των ανθρώπινων σωματικών κυττάρων. Λίγο πριν τη γονιμοποίηση, το ωάριο και το σπερματοζωάριο υφίστανται αλλαγές που είναι απαραίτητες για τη συνένωσή τους.

Το ωάριο αρχίζει να ωριμάζει υπό την επίδραση της φυσικής αιχμής της LH και 25 ώρες αργότερα εξαφανίζεται ο πυρήνας του (βλαστικό κυστίδιο). Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται με την εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου. Τα φλοιώδη κοκκία μεταναστεύουν από το κυτταρόπλασμα προς την κυτταρική μεμβράνη. Τα κοκκώδη κύτταρα γύρω από το ωάριο γίνονται βλενώδη και δημιουργούν τον ακτινωτό στέφανο. Στον ίδιο χρόνο το ωοκύτταρο αρχίζει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, αλλά η διεργασία διακόπτεται για άλλη μία φορά, στην ανάφαση. Το ωάριο είναι πλέον ώριμο και στο κατάλληλο στάδιο για τη γονιμοποίηση. Ολόκληρη η διεργασία συμπληρώνεται 28-32 ώρες μετά το κύμα της LH.

Το ώριμο ανθρώπινο ωάριο έχει διάμετρο 110-120 μm , ενώ μαζί με τη διαφανή ζώνη η διάμετρος του φθάνει τα 140-150 μm . Οι μειωτικές διαιρέσεις είναι πολύ ασύμμετρες. Τα πολικά σωματίδια έχουν διάμετρο μόλις μερικά μm , ενώ το ώριμο ωάριο είναι το πιο μεγάλο κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού.

Το σπερματοζωάριο υφίσταται διεργασία ωρίμανσης στην επιδιδυμίδα αλλά δεν είναι ικανό να γονιμοποιήσει το ωάριο μετά την εκσπερμάτιση. Υφίσταται περαιτέρω ωρίμανση στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας (ενεργοποίηση). Με την ενεργοποίηση αφαιρείται το προστατευτικό κάλυμμα που περιβάλλει το σπερματοζωάριο για να ακολουθήσει η ακροσωματική αντίδραση.

Για να γονιμοποιήσει ένα ωάριο, το σπερματοζωάριο πρέπει να περάσει τρία κυρίως εμπόδια: τα κοκκώδη κύτταρα, τη διαφανή ζώνη, την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου.

1.1.1 Πρόσδεση στη μεμβράνη του ωαρίου

Το σπερματοζωάριο προσεγγίζει την επιφάνεια του ωαρίου υπό γωνία. Διάφοροι τρόποι προσέγγισης είναι πιθανοί και δεν είναι γνωστό ποιος διευκολύνει περισσότερο την επαφή. Επίσης είναι εξίσου σημαντικό το σχήμα της κεφαλής να είναι φυσιολογικό, έτσι ώστε οι υποδοχείς να μπορούν να κάνουν καλή επαφή με το ωάριο.

Η πρόσδεση αρχίζει ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου και στην περιοχή του ισημερινού της κεφαλής του σπερματοζωαρίου και στη συνέχεια ακολουθεί η συνένωσή τους.

1.1.2 Η φλοιώδης αντίδραση του ωαρίου

Η πρόσδεση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωάριο προκαλεί τοπικές μεταβολές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Αμέσως μετά την πρόσδεση, τα φλοιώδη κοκκία προσδένονται στη μεμβράνη και το περιεχόμενό τους εξωκυττάρωνεται στο περιλεκιθικό διάστημα, απελευθερώνοντας ένζυμα (πρωτεάσες) που τροποποιούν τη χημική δομή της διαφανούς ζώνης. Με τον τρόπο αυτό, μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, η διαφανής ζώνη καθίσταται αδιαπέραστη για τα υπόλοιπα σπερματοζωάρια. Αυτός είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αποτροπής της πολλαπλής γονιμοποίησης.

1.1.3 Σύντηξη και διείσδυση του σπερματοζωαρίου

Η πρώτη στενή επαφή λαμβάνει χώρα ανάμεσα στη μεμβράνη του ωαρίου και το τμήμα του ισημερινού της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Στη διεργασία αυτή εμπλέκονται ειδικά μόρια που επιτρέπουν τη σύντηξη των μεμβρανών. Επίσης απαραίτητες είναι και ορισμένες πρωτεΐνες, οι οποίες πιστεύεται πως εντοπίζονται στο ισημερινό τμήμα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου.

Μόλις ξεκινήσει η σύντηξη, ο φλοιός αντιδρά. Τα κοκκία του φλοιού απελευθερώνονται και ο κυτταρικός σκελετός ενεργοποιείται στην περιοχή του φλοιού, με αποτέλεσμα την εγκόλπωση της κεφαλής. Παράλληλα, η σύντηξη των μεμβρανών συνεχίζεται έως ότου η κεφαλή του σπερματοζωαρίου εισέλθει πλήρως στο ωάριο. Η όλη διεργασία έχει πολλές ομοιότητες με τη φαγοκυττάρωση.

1.1.4 Σχηματισμός προπυρήνων

Αμέσως μετά τη σύντηξη, η μεμβράνη που περικλείει τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου αρχίζει να ρήγνυται υπό την επίδραση κυτταροπλασματικών παραγόντων του ωαρίου. Παράλληλα ενεργοποιούνται και άλλα συστατικά του ωαρίου. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση, που είχε διακοπεί στην ανάφαση, ολοκληρώνεται και εκβάλλεται το δεύτερο πολικό σωματίο. Τα χρωμοσώματα του ωαρίου περιβάλλονται από μεμβράνη και σχηματίζουν τον θήλυ προπυρήνα. Η

χρωματίνη στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται και περιβάλλεται από μεμβράνη, σχηματίζοντας έτσι τον άρρενα προπυρήνα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των προπυρήνων λαμβάνει χώρα σύνθεση DNA.

1.1.5 Μετανάστευση προπυρήνων

Συνήθως οι προπυρήνες είναι αρχικά απομακρυσμένοι. Ο θήλυς βρίσκεται προς τη μεριά του δεύτερου πολικού σωματίου και ο άρρεν στην περιοχή του φλοιού όπου εισχώρησε η κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Στη συνέχεια και οι δυο προπυρήνες μετακινούνται προς το κέντρο του ωαρίου. Τελικά 20 περίπου ώρες μετά την επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, οι προπυρήνες φθάνουν στο κέντρο του ωαρίου και διατάσσονται δίπλα-δίπλα (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Ωκύτταρο με δύο προπυρήνες και δύο πολικά σωματίδια.

1.1.6 Συγγαμία (Καρυογαμία)

Λίγες ώρες αργότερα, οι μεμβράνες των προπυρήνων διαλύονται και το γενετικό υλικό τους συντήκεται, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται καρυογαμία ή συγγαμία. Έτσι ολοκληρώνεται η διεργασία της γονιμοποίησης. Η χρωματίνη οργανώνεται αμέσως σε χρωμοσώματα, τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν στην πρώτη κυτταρική διαίρεση.

1.2 Πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του εμβρύου αρχίζει μετά τη γονιμοποίηση και τη δημιουργία του ζυγώτη, που είναι το πρώτο κύτταρο του νέου οργανισμού. Ο ζυγώτης διαιρείται μιτωτικά και φθάνει στην κοιλότητα της μήτρας μετά από 4-5 ημέρες, οδηγούμενος από το κροσσωτό επιθήλιο της σάλπιγγας.

Η γονιμοποίηση, ως διεργασία, επιτρέπει την εξασφάλιση γενετικής ποικιλομορφίας στο κάθε βιολογικό είδος, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, δεδομένου ότι τα μισά χρωμοσώματα προέρχονται από τον πατέρα και τα μισά από τη μητέρα. Μέσα σε κάθε χρωμόσωμα εμπεριέχονται πολλοί κληρονομικοί παράγοντες που ονομάζονται γονίδια, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους και είναι υπεύθυνα για ένα ή περισσότερα κληρονομούμενα ανθρώπινα χαρακτηριστικά. Ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι και το φύλο του εμβρύου, το οποίο καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση, ανάλογα με το είδος σπερματοζωαρίου που γονιμοποιεί το ωάριο. Η γονιμοποίηση από σπερματοζωάριο που φέρει το χρωμόσωμα X θα δημιουργήσει ένα έμβρυο XX (θήλυ) ενώ η γονιμοποίηση από σπερματοζωάριο που φέρει χρωμόσωμα Y θα δημιουργήσει ένα έμβρυο XY (άρρεν)^[7].

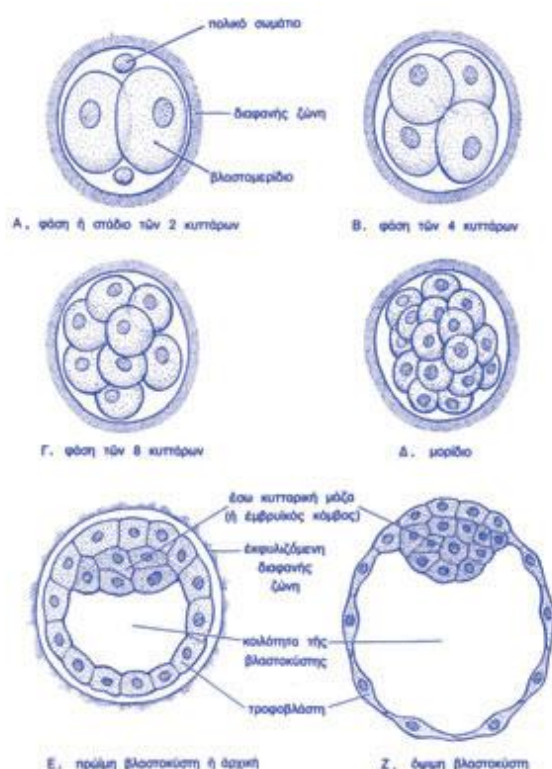
1.2.1 Εμβρυϊκή αυλάκωση

Η ανάπτυξη αρχίζει μερικές ώρες μετά τη δημιουργία του ζυγώτη. Ο ζυγώτης διαιρείται (μιτωτικά) σε δυο θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται βλαστομερίδια. Οι επόμενες διαιρέσεις ακολουθούν γρήγορα, σχηματίζοντας μικρότερα βλαστομερίδια: η διεργασία αυτή ονομάζεται αυλάκωση.

Την 2^η ημέρα, τα έμβρυα έχουν ήδη επιτελέσει δυο κυτταρικές διαιρέσεις. Κατά κανόνα, το ποσοστό αυλάκωσης του ζυγώτη υπερβαίνει το 95%. Τυπικά, η πρώτη διαίρεση επέρχεται περίπου 16 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και το έμβρυο απαρτίζεται πλέον από 2 κύτταρα (βλαστομερίδια). Η δεύτερη διαίρεση πραγματοποιείται περίπου 12 ώρες αργότερα (το έμβρυο αποτελείται από 4 βλαστομερίδια) και οι διαιρέσεις συνεχίζονται με αυξανόμενο ρυθμό.

Το στάδιο της αυλάκωσης ακολουθείται από το στάδιο του μοριδίου. Το μορίδιο είναι στάδιο της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το οποίο τα βλαστομερίδια σχηματίζουν μια συμπαγή μάζα που μοιάζει με μούρο. Στη συνέχεια εκβάλλεται υγρό στο διάστημα μεταξύ των κυττάρων και δημιουργείται μια κοιλότητα, που ονομάζεται βλαστοκλήλη και χαρακτηρίζει την πρώιμη βλαστοκύστη ή προβλαστοκύστη. Με τη δημιουργία της κοιλότητας αυτής το έμβρυο φθάνει στο στάδιο της βλαστοκύστης (Εικ. 2). Τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται και διατάσσονται σε δύο περιοχές. Στη μια εντοπίζεται ένα έκκεντρο άθροισμα κυττάρων, που ονομάζεται έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM), ή εμβρυοβλάστη, από την οποία θα εξελιχθεί το κυρίως έμβρυο και μέρος των εξωεμβρυϊκών ιστών όπως το χόριο. Στην άλλη περιοχή εντοπίζεται μια στοιβάδα

κυττάρων που περιβάλλει την κοιλότητα της βλαστοκύστης: έξω κυτταρική μάζα, ή τροφοβλάστη, από την οποία θα σχηματισθεί ο πλακούντας^[7].



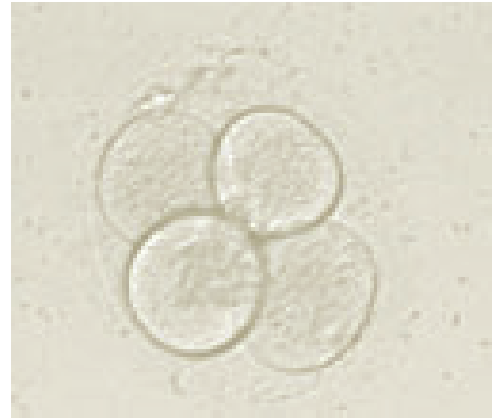
Εικόνα 2: Στάδια αυλάκωσης ζυγώτη μέχρι το σχηματισμό βλαστοκύστης.

Η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας μόλις πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση σε ποντικούς και επτά ημέρες μετά σε ανθρώπους. Σε αυτή την περίοδο, κύτταρα προερχόμενα από το τροφοεκτήδερμα (TE) αρχίζουν να αλληλεπιδρούν με τη μήτρα και το έμβρυο οδηγείται σε ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα στην ανάπτυξή του: τη γαστριδίωση. Σε αυτό το στάδιο, η κυτταρική μάζα προερχόμενη από την επιβλάστη, αποκαλούμενη πρωταρχική αυλάκωση (primitive streak) δημιουργεί τις τρεις βασικές κυτταρικές στοιβάδες από τις οποίες προέρχεται μετέπειτα, κάθε σωματική δομή^[1].

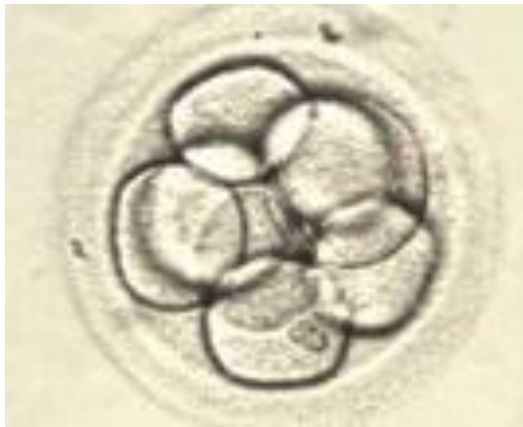
Η ορθή αυλάκωση αποτελεί θεμελιώδες κριτήριο της ποιότητας των εμβρύων. Υπάρχουν συγκεκριμένοι παράγοντες που είναι σημαντικοί για την αξιολόγηση των εμβρύων την ημέρα της εμβρυομεταφοράς (Εικ. 3 Α-Ζ). Οι παράγοντες αυτοί έχουν και άμεση σχέση με το στατιστικό αποτέλεσμα επιτυχίας κήσεως και είναι οι εξής: ο αριθμός και γενική μορφολογία βλαστομεριδίων, η ύπαρξη θρυμματισμού, η μορφολογία και ταχύτητα συγχώνευσης των προπυρήνων, καθώς και η συγχρονισμένη διαίρεση. Έμβρυα που έχουν διαιρεθεί με καθυστέρηση (π.χ. στάδιο 2 κυττάρων στις 48 ώρες καλλιέργειας) θεωρούνται λιγότερο «καλά» από έμβρυα που έχουν ήδη αρχίσει τη δεύτερη διαίρεση (στάδιο 4 κυττάρων) κατά την ίδια χρονική στιγμή. Αυτό ωστόσο, δεν σημαίνει ότι τα «αργοπορημένα» έμβρυα δεν έχουν μέλλον, ή ότι μόνο τα «πρωτοπόρα» έμβρυα είναι ικανά να εμφυτευθούν.



A. Στάδιο 2 κυττάρων



B. Στάδιο 4 κυττάρων



Γ. Στάδιο 8 κυττάρων



Δ. Μορίδιο



Ε. Πρώιμη βλαστοκύστη
(Προβλαστοκύστη)



Ζ. Όψιμη ή διογκωμένη
βλαστοκύστη

Εικόνα 3: Η αυλάκωση του ζυγώτη μέχρι το σχηματισμό βλαστοκύστης.

1.2.2 Εμβρυϊκή συμπύκνωση

Ενώ σε πρώιμα στάδια αυλάκωσης τα έμβρυα μοιάζουν με συστάδα βλαστομεριδίων, με στοιχειώδες επίπεδο βιοσύνθεσης, η φάση συμπύκνωσης (με σημείο έναρξης την 3^η ημέρα) χαρακτηρίζεται από αυξημένους βιοσυνθετικούς ρυθμούς και την ικανότητα πιο αποτελεσματικού μεταβολισμού της γλυκόζης. Επιπλέον, το έμβρυο σε στάδιο συμπύκνωσης είναι ικανό να ρυθμίζει ενεργά τη μετακίνηση ιόντων, ελέγχοντας έτσι το εσωτερικό του περιβάλλον^[8].

Η συμπύκνωση οφείλεται στο σχηματισμό αλλά και τον αριθμό των στενών διακυτταρικών συνδέσεων (π.χ. δεσμοσωμάτων, διακένων και στενών διακλαδώσεων) προκαλώντας την προσεκτική τοποθέτηση των βλαστομεριδίων το ένα δίπλα στο άλλο^[9,10]. Λόγω αυτής της εξαιρετικά διαδραστικής κυτταρικής μάζας, τα βλαστομερίδια χάνουν το χαρακτηριστικό της παντοδυναμίας τους (totipotency).

Στον άνθρωπο, η συμπύκνωση ξεκινά περίπου στο στάδιο των 8 κυττάρων, ακολουθώντας πιθανόν ένα εγγενές αναπτυξιακό ρολόι. Η πρόωρη συμπύκνωση τη 2^η ημέρα θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία τροφοβλαστικών κυστιδίων, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν προγενέστερα κύτταρα για το σχηματισμό της έσω κυτταρικής μάζας^[11]. Από την άλλη πλευρά, έμβρυα 16 κυττάρων χωρίς την παραμικρή ένδειξη συμπύκνωσης έχουν μειωμένη αναπτυξιακή ικανότητα και δύσκολα θα φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης^[10].

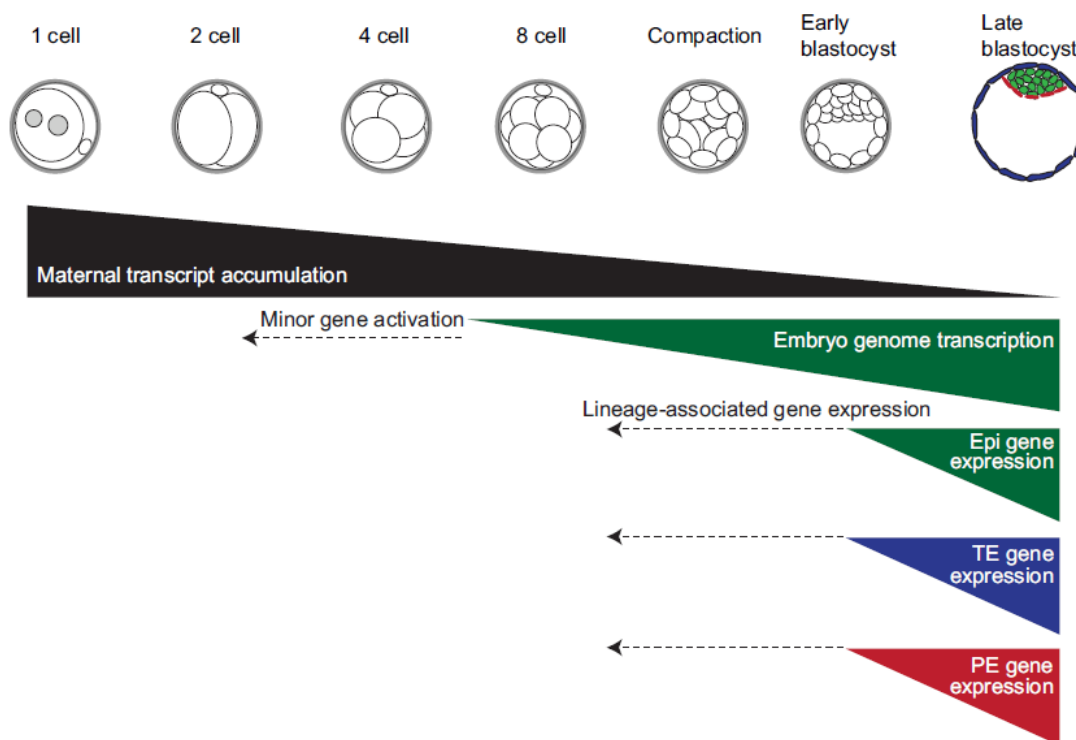
Ο Τάο και η ομάδα του^[12] προσπάθησαν με επιτυχία να προβλέψουν τα έμβρυα με αυξημένη ικανότητα εμφύτευσης, στο στάδιο συμπύκνωσης. Έδειξαν ότι η ικανότητα εμφύτευσης σχετίζεται θετικά με την αναλογία των βλαστομεριδίων που υφίστανται συμπύκνωση. Κατά συνέπεια, εάν συμμετέχουν λιγότερα από το ήμισυ των βλαστομεριδίων στη διαδικασία συμπύκνωσης, τότε τα έμβρυα παρουσιάζουν κακή πρόγνωση. Τα βλαστομερίδια και τα τμήματα που δεν μπορούν να σχηματίσουν τις κατάλληλες συνδέσεις, γενικά αποκλείονται από τη διαδικασία συμπύκνωσης και παραμένουν εντός της διαφανούς ζώνης μετά την εκκόλαψη^[10].

1.2.3 Ενεργοποίηση εμβρυϊκού γονιδιώματος

Στο στάδιο των 4 προς 8 κυττάρων ενεργοποιούνται τα γονίδια του εμβρύου και αρχίζουν να παράγονται οι ειδικές του πρωτεΐνες: θεωρείται ότι οι δυο πρώτες αυλακωτικές διαιρέσεις είναι παθητικές.

Μεταγραφήματα μητρικής προέλευσης, τα οποία έχουν κληρονομηθεί από το ωάριο αποικοδομούνται κατά τη διάρκεια των επακόλουθων κύκλων κυτταρικής διαίρεσης. Κατά κύριο λόγο, η ενεργοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος λαμβάνει χώρα ανάμεσα στα στάδια των 4 και 8 κυττάρων και, ίσως, το νωρίτερο από το στάδιο των 2 κυττάρων (Εικ. 4). Δεν είναι σαφής η χρονική στιγμή κατά την οποία τα γονίδια που σχετίζονται με την αναστολή της κυτταρικής σειράς του TE ή της ICM εκφράζονται στα ανθρώπινα έμβρυα. Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που

υποστηρίζουν ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται στα ανθρώπινα έμβρυα αργότερα από ότι στα ποντίκια, περίπου στο στάδιο της πρώιμης βλαστοκύστης. Τα ανθρώπινα έμβρυα δύναται να καλλιεργηθούν *in vitro* για 5-6 ημέρες έπειτα της γονιμοποίησης και, *in vivo*, τα ανθρώπινα έμβρυα εμφυτεύονται περίπου την 7^η ημέρα^[13].



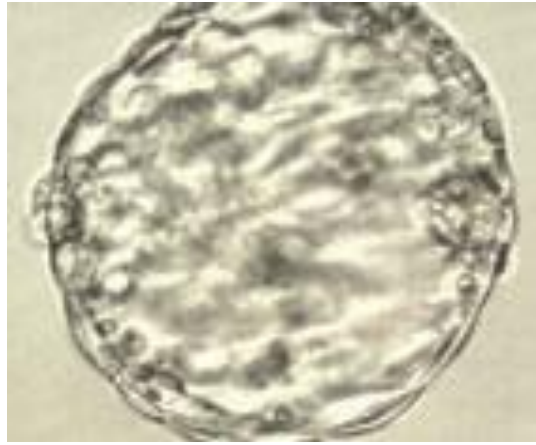
Εικόνα 4: Γενετικά δίκτυα ανθρώπινης προεμφυτευτικής ανάπτυξης. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν πιθανότητα μικρού βαθμού πρώιμης ενεργοποίησης και έκφρασης lineage-associated γονιδίων.
Επι, επιβλάστη; **TE**, τροφοβλάστη; **PE**, αρχέγονο ενδόδεσμα.

1.2.4 Εκκόλαψη

Η βλαστοκύστη περιβάλλεται ακόμη από τη διαφανή ζώνη και ο συνολικός όγκος του εμβρύου παραμένει σταθερός. Ωστόσο, καθώς η κοιλότητα της βλαστοκύστης αυξάνεται, με συνέπεια τη διόγκωσή της, η διαφανής ζώνη προοδευτικά εξασθενεί και λεπτύνεται (5^η ημέρα). Το φαινόμενο αυτό επιτείνεται και λόγω της έκκρισης ενζύμων από τα βλαστομερίδια της τροφοβλάστης, οπότε η διαφανής ζώνη τελικώς ρήγνυται: το έμβρυο εκκολάπτεται, αποσπάται δηλαδή εντελώς από τη διαφανή ζώνη (6^η ημέρα) και η τροφοβλάστη αποκαλύπτεται, επιτρέποντας έτσι την προσκόλληση του εμβρύου στην επιφάνεια του ενδομητρίου (Εικ. 5-6).



Εικόνα 5: Εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη.
Από τη διανοιγμένη διαφανή ζώνη
η βλαστοκύστη εκκολάπτεται.



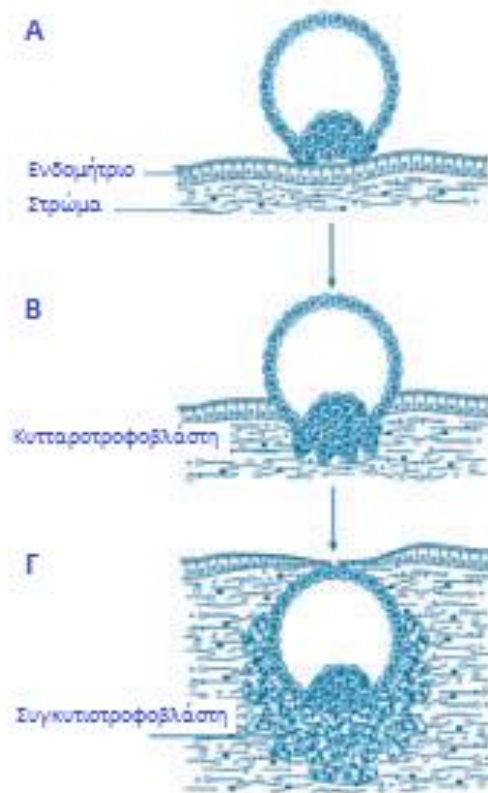
Εικόνα 6: Εκκολαφθείσα βλαστοκύστη.
Η διαφανής ζώνη έχει αποβληθεί.
Το έμβρυο είναι έτοιμο για την εμφύτευση.

1.2.5 Εμφύτευση εμβρύου

Όταν η βλαστοκύστη φθάσει στην κοιλότητα της μήτρας τα κύτταρά της έχουν ήδη διαφοροποιηθεί σε εμβρυοβλάστη και τροφοβλάστη και έχει επέλθει η εκκόλαψη. Ακολουθεί η εμφύτευση, δηλαδή η διεργασία προσκόλλησης και εγκατάστασης (ή εμφώλευσης) του εμβρύου στο ενδομήτριο.

Το έμβρυο επιλέγει το σημείο εμφύτευσης στην κοιλότητα της μήτρας, προσκολλώμενο στις αδενικές κρύπτες του ενδομητρίου. Η εμφύτευση συνήθως γίνεται στο πρόσθιο ή στο οπίσθιο τοίχωμα προς τον πυθμένα και σπανιότερα στο κατώτερο τμήμα της μήτρας. Μετά την προσκόλλησή του στο ενδομήτριο, το έμβρυο εμφυτεύεται με τη βοήθεια της τροφοβλάστης, η οποία εκκρίνει ένζυμα και διαβρώνει τα κύτταρα του επιθηλίου. Η διείδυση αυτή διαρκεί μέχρι 4 ημέρες και το έμβρυο τελικά καλύπτεται πλήρως από το ενδομήτριο (Εικ. 7).

Η διεργασία της εμφύτευσης αρχίζει 1-2 ημέρες μετά την είσοδο της βλαστοκύστης στην κοιλότητα της μήτρας, περίπου την 18^η - 19^η ημέρα του κύκλου. Μετά την είσοδό της, η βλαστοκύστη παραμένει αιωρούμενη για περίπου 1-2 ημέρες, αναμένοντας μηνύματα για την κατάλληλη θέση εμφύτευσης στο ενδομήτριο.



Εικόνα 7: Διεργασία της εμφύτευσης.

- A. Το έμβρυο προσκολλάται στην επιφάνεια του ενδομητρίου.
- B. Διεισδύει στο επιθήλιο καθοδηγούμενο από την κυτταροτροφολάστη.
- Γ. Εγκαθιστά ένα τροφοβλαστικό στρώμα στον φθαρτό.

Προηγείται η παραγωγή του πρώιμου γονιμοποιητικού παράγοντα, ο οποίος αρχικά παράγεται από την ωοθήκη. Μετά την εμφύτευση, ο παράγοντας αυτός παράγεται από το κύημα. Έχει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και στην ανάπτυξη των ενδομητρικών κυττάρων.

Οι ιδανικές συνθήκες εμφύτευσης που δημιουργούνται διατηρούνται για ορισμένο χρονικό διάστημα, αποτελώντας το λεγόμενο «παράθυρο εμφύτευσης». Κύριο ρόλο σ' αυτή τη διεργασία παίζουν τα στεροειδή της ωοθήκης και ιδιαίτερα τα οιστρογόνα.

Βασικό ρόλο παίζουν ακόμη ουσίες, όπως η ισταμίνη και οι προσταγλανδίνες, οι οποίες αυξάνουν τη διαπερατότητα των αγγείων, με αποτέλεσμα την είσοδο στην περιοχή του ενδομητρίου ουσιών που ευνοούν την αγγειογένεση. Σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζουν διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των ενδομητρικών κυττάρων. Τέλος, η παρουσία στην περιοχή της εμφύτευσης κυτταροκινών και της πλακουντιακής πρωτεΐνης 14 (PP14), παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή του ανοσολογικού μηχανισμού της μητέρας.

Μετά την εμφύτευση, η αγγείωση του ενδομητρίου αυξάνει ιδιαίτερα στη περιοχή της εμφυτευμένης βλαστοκύστης. Εάν οι συνθήκες του ενδομητρίου δεν είναι οι ιδανικές για την εμφύτευση, η βλαστοκύστη αποβάλλεται από τη μήτρα και η γυναίκα δε μαθαίνει ποτέ ότι συνέλαβε.

Η τροφοβλάστη συνεχίζει να εισβάλλει στο ενδομήτριο, με συνέπεια το έμβρυο να εμφυτεύεται ολοένα και βαθύτερα. Κατά τη διεργασία αυτή, τα κύτταρα της τροφοβλάστης πολλαπλασιάζονται και η ίδια χωρίζεται σε δύο τμήματα: την κυτταροτροφοβλάστη και τη συγκυτιοτροφοβλάστη, μέσα στην οποία εμφανίζονται μικρές κοιλότητες που γεμίζουν με αίμα προερχόμενο από τα μητρικά αγγεία και από εκκρίσεις των διαβρωμένων ενδομητρικών αδένων. Μικρές κοιλότητες αρχίζουν να σχηματίζονται επίσης, ανάμεσα στην έσω κυτταρική μάζα και την τροφοβλάστη. Στη συνέχεια, αυτές ενώνονται και δημιουργούν την αμνιακή κοιλότητα.

Τα σήματα της εμφύτευσης προκαλούν αυξημένη υποφυσιακή έκκριση LH, η οποία διεγείρει τα κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου. Επίσης η χοριακή γοναδοτροπίνη που εκκρίνεται από την τροφοβλάστη (τον υποτυπώδη πλακούντα) διεγείρει το ωχρό σωματίο και προκαλεί έκκριση προγεστερόνης, η οποία συνεχίζεται περίπου έως τη 10^η εβδομάδα κύησης. Η διεργασία της εμφύτευσης περιλαμβάνει σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του εμβρύου και των κυττάρων του ενδομητρίου.

Οι σημαντικότερες προϋποθέσεις για την επιτυχή διεργασία της εμφύτευσης είναι:

- Ο συγχρονισμός της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης και της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου.
- Η αποφυγή των ανοσολογικών αντιδράσεων της μήτρας προς το αλλοόνοσο έμβρυο.
- Η αύξηση της ροής αίματος στην περιοχή της εμφύτευσης σε συνδυασμό με την αυξημένη αγγειογένεση.
- Η ελεγχόμενη διείσδυση της τροφοβλάστης.

1.3 In vitro καλλιέργεια εμβρύων

Ως καλλιέργεια εμβρύου θεωρείται η καλλιέργεια ανθρώπινων γαμετών και εμβρύων κατά τη διάρκεια εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η έναρξη της διαδικασίας λαμβάνει χώρα όταν ωάρια έρχονται σ'επαφή με σπερματοζωάρια σε τρυβλίο καλλιέργειας και ολοκληρώνεται με τη μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα. Το χρονικό διάστημα της καλλιέργειας διαφέρει από 1 έως και 6 ημέρες. Η επεξεργασία της καλλιέργειας του εμβρύου είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση οποιασδήποτε διαδικασίας IVF ή ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίου (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI). Επίσης, το είδος του μέσου καλλιέργειας που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του εμβρύου και κατ'επέκταση την επιτυχία της διαδικασίας.

1.3.1 Μορφολογική αξιολόγηση και επιλογή εμβρύων

Η επίτευξη εγκυμοσύνης εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τον αριθμό και την ποιότητα των εμβρύων που θα μεταφερθούν στην κοιλότητα της μήτρας. Επομένως, χρειάζεται να κατατάξουμε τα έμβρυα καθώς αναπτύσσονται και να επιλέξουμε εκείνα που συγκεντρώνουν τα καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά, αμέσως πριν την εμβρυομεταφορά.

Η αξιολόγηση των εμβρύων πριν την εμβρυομεταφορά είναι απαραίτητη και γίνεται βάσει δυο παραμέτρων: την αυλάκωση (διαίρεση) και τη μορφολογική εμφάνιση των εμβρύων.

Διαίρεση

Τη 2^η ημέρα μετά την ωοληψία, τα έμβρυα θα πρέπει να έχουν διαιρεθεί σε 2-4 βλαστομερίδια. Καλύτερα θεωρούνται τα έμβρυα των 4 κυττάρων, ενώ αυτά 2 κυττάρων «αργά αναπτυσσόμενα» έμβρυα. Την 3^η ημέρα καλλιέργειας, τα έμβρυα πρέπει να έχουν διαιρεθεί σε 5-8 κύτταρα. Καλύτερα θεωρούνται τα έμβρυα με 8 βλαστομερίδια και οριακά των 5 κυττάρων.

Μορφολογία

Τα έμβρυα κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες (Grade **I - IV**) με βάση το σχήμα των βλαστομεριδίων και την έλλειψη ή παρουσία θρυμματισμού (Εικ. 8).

- Κατηγορία **I** (Grade **I**): έμβρυα χωρίς θρυμματισμό, κανονικό σχήμα (σφαιρικό ή ελλειψοειδές) και ομοιομορφία βλαστομεριδίων,
- Κατηγορίες **II** και **III**: έμβρυα που παρουσιάζουν μια ενδιάμεση κατάσταση,
- Κατηγορία **IV** (Grade **IV**): έμβρυα με έντονο θρυμματισμό, ανισομεγέθη και κατεστραμμένα βλαστομερίδια ή βλαστομερίδια με ανώμαλο σχήμα, πολλαπλούς πυρήνες κ.α.

Τα αργοπορούντα έμβρυα, όπως και εκείνα με πολύ μεγάλο ποσοστό θρυμματισμού έχουν μειωμένες πιθανότητες επιτυχίας κυήσεως. Ιδανικά έμβρυα για εμβρυομεταφορά στις 48 ώρες μετά την ωοληψία θεωρούνται τα έμβρυα με 4 κύτταρα κατηγορίας **I-II** (Εικ. 8 Α, Β, Γ). Αντίστοιχα στις 72 ώρες μετά την ωοληψία, ιδανικά θεωρούνται τα έμβρυα 8 κυττάρων κατηγορίας **I-II**.



Α. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade I



Β. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade I-II



Γ. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade II



Δ. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade II-III



Ε. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade III



Ζ. Έμβρυο 4 κυττάρων
Grade III-IV



Η. Έμβρυο με έντονο θρυμματισμό που
δεν επιτρέπει την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων
Grade IV

Εικόνα 8: Αξιολόγηση εμβρύων 4 κυττάρων. Στις εικόνες παρουσιάζονται έμβρυα Grade I έως IV, όπως τα αξιολογούν οι εμβρυολόγοι.

1.3.2 Αναπτυξιακές δυνατότητες στις μεθόδους καλλιέργειας

Αρχικά, το περιβάλλον ανάπτυξης θα πρέπει να πληρεί τις διατροφικές προϋποθέσεις που έχει ανάγκη το έμβρυο καθώς αναπτύσσεται. Καθώς το έμβρυο υπόκειται σε δραματικές αλλαγές στη φυσιολογία του και παρουσιάζει παράλληλα αλλαγές στις απαιτήσεις του σε θρεπτικά συστατικά, περισσότερα από ένα μέσα καλλιέργειας θα χρειαστούν προκειμένου να καλυφθούν οι εναλλασσόμενες ανάγκες του κατά τη διάρκεια της προεμφυτευτικής περιόδου. Αυτή η πρακτική είναι συμβατή τόσο με τη δυναμική της φυσιολογίας του εμβρύου αλλά, επίσης μιμείται το περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται το έμβρυο *in vivo*, όπως π.χ. τα υγρά της σάλπιγγας ή της μήτρας, τα οποία διαφέρουν ως προς τη θρεπτική σύστασή τους. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα για την ανάπτυξη του εμβρύου καθώς αυτά περνούν από το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, αντικατοπτρίζουν τις εναλλασσόμενες απαιτήσεις του.

Δεύτερον, στα συστατικά του μέσου καλλιέργειας είναι απαραίτητο να περιλαμβάνονται παράγοντες οι οποίοι θα περιορίζουν το κυτταρικό στρες που μπορεί να προκαλείται στο έμβρυο. Παραδείγματα στρεσογόνων καταστάσεων αποτελούν οι απότομες εναλλαγές του ενδοκυτταρικού pH, το ωσμωτικό σοκ, καθώς και οι ενεργειακές διαταραχές του μεταβολισμού.

Με βάση τα παραπάνω, έχει προταθεί ότι το ανθρώπινο έμβρυο και γενικότερα των θηλαστικών, είναι πιο επιρρεπές σε στρες που μπορεί να προκληθεί από τις συνθήκες καλλιέργειας, πριν το στάδιο της συμπύκνωσης, π.χ. πριν την εμφάνιση του πρώτου μεταφορικού επιθηλίου και επομένως προτού αποκτήσει την ικανότητα το έμβρυο να ρυθμίζει ενεργά το εσωτερικό του περιβάλλον. Η περίοδος πριν τη συμπύκνωση στον άνθρωπο σχετίζεται επίσης με την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος και είναι τότε που το έμβρυο φαίνεται να είναι πιο επιρρεπές σε στρες, όπως αυτό εκδηλώνεται από την χαρακτηριστική αναπτυξιακή παύση στο στάδιο των 8 κυττάρων *in vitro*. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης, το έμβρυο έχει αποκτήσει τη δυνατότητα να ρυθμίζει το εσωτερικό του περιβάλλον και δεν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από εξωτερικούς παράγοντες. Κατά συνέπεια, οι ανάγκες του εμβρύου σε παράγοντες εξωκυτταρικής ρύθμισης διαφέρουν προτού και έπειτα το στάδιο της συμπύκνωσης. Αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι για να διατηρηθεί η βιωσιμότητα του εμβρύου σε μια καλλιέργεια, χρειάζεται η παρασκευή περισσότερων του ενός καλλιεργητικών μέσων.

1.3.3 Καλλιεργητικά μέσα

Υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα εμπορικών υλικών, κατάλληλων για καλλιέργεια προ-εμφυτευτικών ανθρώπινων εμβρύων στους κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τα ανθρώπινα προ-εμφυτευτικά έμβρυα εκτίθενται στα καλλιεργητικά υλικά μέχρι και 6 ημέρες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, έπειτα από IVF ή ICSI. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμη μια μεγάλη ποικιλία καλλιεργητικών υλικών, διαφορετικής σύστασης και σύνθεσης, από απλά διαλύματα αλάτων μέχρι πολύπλοκα μέσα καλλιέργειας ιστών με συνθετικά παρασκευασμένα αμινοξέα καθώς και αυξητικούς παράγοντες.

Τα εμβρυϊκά μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για IVF στον άνθρωπο, έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς σε καλλιέργειες ζωικών εμβρύων. Το 1985, σχεδιάστηκε το «Ανθρώπινο Σαλπινγικό Υγρό» (Human Tubal Fluid, HTF), ένα εμβρυϊκό μέσο καλλιέργειας βασισμένο στην ανάλυση της σύστασης του υγρού προερχόμενο από ανθρώπινες σάλπιγγες. Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες τροποποιήσεις στη σύσταση καλλιεργητικών μέσων ανθρώπινων εμβρύων, μέσω προσθήκης διαφορετικών συστατικών όπως αμινοξέα, βιταμίνες, καθώς και πρόδρομες μορφές νουκλεϊκών οξέων.

Ο σχεδιασμός των μέσων για την καλλιέργεια των προ-εμφυτευτικών εμβρύων έχει επηρεαστεί από δύο θεμελιωδώς διαφορετικές φιλοσοφίες^[14,15]. Ωστόσο, η ανάπτυξη εμβρύων μέσω τεχνικών ART είναι κατώτερη από αυτή των *in vivo* εμβρύων, γεγονός που δείχνει ότι οι διαδικασίες ART επιφέρουν καταστάσεις κυτταρικού και μεταβολικού στρες και κατά συνέπεια το έμβρυο αναγκάζεται να δαπανήσει ενέργεια για να προσαρμοστεί σε αυτό το ξένο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, το μέσο καλλιέργειας είναι ένας σημαντικός παράγοντας για επιτυχείς αλληλεπιδράσεις *in vitro* μεταξύ των γαμετών και της επακόλουθης ανάπτυξης εμβρύων^[16]. Οι κατασκευαστές των μέσων καλλιέργειας ανθρώπινων εμβρύων ακολουθούν είτε τη φιλοσοφία «στροφή στη φύση» (διαδοχικά μέσα) είτε τη φιλοσοφία «το έμβρυο επιλέγει» (παγκόσμια μέσα)^[17].

Διαδοχικά μέσα καλλιέργειας

Η φιλοσοφία της «στροφής στη φύση» (back-to-nature) που προσπαθεί να μιμηθεί τις μεταβαλλόμενες ανάγκες του αναπτυσσόμενου ζυγώτη και του εμβρύου σε ένα μέσο θα πρέπει να προσεγγίσει τη συγκέντρωση στην οποία είναι εκ φύσεως εκτεθειμένο το έμβρυο^[16,17]. Το έμβρυο είναι ικανό να ελέγχει ενεργά τις μεταβολές των ιόντων κ.λπ. και είναι σε θέση να ρυθμίζει το εσωτερικό του περιβάλλον. Συνεπώς, όσον αφορά τη φυσιολογία του εμβρύου, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η περίοδος προ-εμφύτευσης σε τουλάχιστον δύο φάσεις: πριν και μετά τη συμύκνωση. Μια τέτοια διάσπαση της περιόδου προ-εμφύτευσης είναι σημαντική όταν λαμβάνονται υπόψη αλλαγές στη σύνθεση του μέσου. Άλλες υποθέσεις

περιλαμβάνουν το χρόνο κατά τον οποίο ενεργοποιείται το εμβρυονικό γονιδίωμα^[16].

Μονοκαλλιέργεια «το έμβρυο επιλέγει» (let-the-embryo-choose)

Ο σχεδιασμός ενός μέσου καλλιέργειας συνεπάγεται την ταυτόχρονη χρήση όλων των συγκεντρώσεων σε ένα μίγμα επειδή οι επιδράσεις κάθε συστατικού μπορεί να εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις των άλλων συστατικών^[17]. Όσο οι συγκεντρώσεις βρίσκονται μέσα σε «ανεκτές περιοχές», το ίδιο το έμβρυο θα προσαρμόζεται και θα χρησιμοποιεί ό,τι χρειάζεται^[14,17,18]. Αυτή η φιλοσοφία οδήγησε σε μια οικογένεια μέσων καλλιέργειας στην οποία παρέχονται όλες οι ουσίες που απαιτούνται για την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου και δεν υπάρχει ανάγκη για αλλαγή μέσου. Η σύνθεση του ενός σταδίου (one-step) εφαρμόζεται καθ' όλη την *in-vitro* ανάπτυξη, από τη γονιμοποίηση μέχρι τη βλαστοκύστη του εμβρύου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τέσσερα πρωτόκολλα για την καλλιέργεια από τη γονιμοποίηση έως το στάδιο βλαστοκύστης σε ένα εργαστήριο: Α. πρωτόκολλο διαδοχικών μέσων, με διακοπτόμενη καλλιέργεια όπου δύο μέσα διαφορετικής σύνθεσης χρησιμοποιούνται διαδοχικά, με την αλλαγή του μέσου να πραγματοποιείται την 3^η ημέρα της εμβρυϊκής καλλιέργειας, Β. πρωτόκολλο διαδοχικών μέσων με αλλαγή φρέσκου μέσου κάθε μέρα, Γ. μονοκαλλιέργεια, αδιάλειπτη καλλιέργεια με χρήση ενός μέσου καθ' όλη τη διάρκεια των 5 ημερών εμβρυϊκής καλλιέργειας, Δ. διακοπτόμενη καλλιέργεια όπου χρησιμοποιείται ένα μέσο μονοκαλλιέργειας, το οποίο όμως ανανεώνεται την 3^η ημέρα της εμβρυϊκής καλλιέργειας^[19].

1.4 Εμβρυϊκή και Πρωτεωμική βιωσιμότητα

Για να εξελιχθεί με επιτυχία μια τεχνική ART, θα πρέπει να μεταφερθούν βιώσιμα έμβρυα εντός της μήτρας. Επί του παρόντος, τα βιώσιμα έμβρυα με υψηλή δυνατότητα εμφύτευσης προσδιορίζονται με βάση εμβρυϊκά μορφολογικά κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά είναι περιορισμένα και συχνά παρέχουν ασαφή δεδομένα κατά την αξιολόγησή τους.

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι τα έμβρυα εκφράζουν και εκκρίνουν μοναδικές πρωτεΐνες - βιοδείκτες στο περιβάλλον μέσο καλλιέργειας. Κατά συνέπεια, μελέτες με χρήση Πρωτεωμικής θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη βελτίωση των μεθόδων αξιολόγησης της εμβρυϊκής βιωσιμότητας, μέσω εντοπισμού πιθανών βιοδεικτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βιοδείκτες που απελευθερώνονται στο χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας.

Η βελτίωση των μεθόδων αξιολόγησης της εμβρυϊκής βιωσιμότητας θα ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό τα ποσοστά επιτυχίας των τεχνικών ART. Επίσης, θα οδηγήσει και στην καθιέρωση μεταφοράς ενός εμβρύου, αποφεύγοντας την πιθανότητα πολύδυμων κυήσεων. Η μεταφορά πολλαπλών εμβρύων κατά τη διεξαγωγή μιας διαδικασίας ART, εκθέτει τις ασθενείς σε πολυάριθμους παράγοντες κινδύνου, μητρικής και εμβρυϊκής νοσηρότητας.

1.4.1 Πρωτεωμική

Η Πρωτεωμική είναι η μελέτη έκφρασης και εντοπισμού (localization) λειτουργιών, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Η Πρωτεωμική ταυτοποιεί πρωτεΐνες εκφραζόμενες σε διαφορετικά μοτίβα με χρήση ποικίλων τεχνικών, μηχανών αναζήτησης και βάσεων δεδομένων. Ποσοτικοποιεί την παρουσία τους και αναδεικνύει εκείνες που θα μπορούσαν να εξυπηρετήσουν ως πιθανές υποψήφιας για περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση.

Ως εκ τούτου, η Πρωτεωμική παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των κυττάρων, αφού οι πρωτεΐνες αποτελούν τις λειτουργικές μονάδες των κυττάρων^[20]. Καθοδηγούν κάθε κυτταρική διαδικασία εφόσον έχουν μεταγραφεί, μεταφραστεί και τροποποιηθεί, πέρα από τη γονιδιωματική τους προέλευση.

Στη συγκριτική Πρωτεωμική, με χρήση κατάλληλων τεχνικών επιτυγχάνεται η σύγκριση και η αντιπαραβολή του πρωτεώματος διαφορετικών κυττάρων, με σκοπό τον εντοπισμό των διαφορών τους. Αυτές οι διαφορές μπορεί να συνίστανται: παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ή διαφορετικά ποσοτικά χαρακτηριστικά^[21]. Για παράδειγμα, μέσω σύγκρισης πρωτεωμάτων ανάμεσα σε ένα φυσιολογικό και ένα παθολογικό κύτταρο (και κατ'επέκταση έμβρυο), οι διαφορές που θα προέκυπταν θα

μπορούσαν να εξυπηρετήσουν ως βιοδείκτες (biomarkers) της παθολογικής κατάστασης.

Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, η σωστή ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος και κατ' επέκταση του πρωτεώματος, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα του αναπτυξιακού δυναμικού του εμβρύου. Ως εκ τούτου, τα έμβρυα με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης θα διαθέτουν ένα μοναδικό γενετικό και πρωτεωμικό προφίλ. Κατά συνέπεια, κάποιες από αυτές τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες εκκρίνονται στο περιβάλλον καλλιεργητικό μέσο (secretome).

Η ανάλυση του πρωτεώματος ανεξάρτητων ανθρώπινων βλαστοκύστεων με χρήση μεθόδων Πρωτεωμικής έχει φέρει στο φως το γεγονός ότι, ακόμα και αν φαινομενικά έχουν παρόμοια μορφολογία, τα πρωτεϊνικά τους προφίλ είναι κάπως διαφορετικά^[22]. Επιπροσθέτως, τα έμβρυα που οδηγούνται προς αποικοδόμηση παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα πρωτεϊνικά τους προφίλ, συγκριτικά με τις αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες, με αυξητική ρύθμιση πολυάριθμων πρωτεϊνών ($P_{\text{value}} < 0.05$). Μια πρώτη προσπάθεια με χρήση βάσεων δεδομένων αποκάλυψε πιθανούς υποψήφιους πρωτεϊνικούς παράγοντες ταυτοποίησης. Οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται τόσο σε μονοπάτια απόπτωσης, όσο και αναστολής της ανάπτυξης. Τα δεδομένα που προέκυψαν έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση. Οι διαφορές αυτές σχετίζονται με τη μορφολογία ανεξάρτητων βλαστοκύστεων, καθώς και με το αναπτυξιακό δυναμικό κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Η Πρωτεωμική χρησιμοποιείται επιτυχώς στην ανάλυση του συνόλου των εκφραζόμενων πρωτεϊνών (secretome) εμβρύων θηλαστικών κατά τη διάρκεια της προεμφυτευτικής τους ανάπτυξης^[23]. Επίσης, χρησιμοποιείται και στη δημιουργία βάσης δεδομένων αντίστοιχων πρωτεϊνικών προφίλ που αντιπροσωπεύουν την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Μέσω αυτής της προσπάθειας έχει αποκαλυφθεί ότι έμβρυα σε κάθε 24ωρο αναπτυξιακό στάδιο παράγουν διακριτά πρωτεϊνικά μοτίβα. Αυτά με τη σειρά τους είναι χαρακτηριστικά του αναπτυξιακού σταδίου των εμβρύων, ανεξαρτήτως των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Περαιτέρω επεξεργασία αυτών των μοτίβων, επέδειξε την έκφραση συγκεκριμένων, διαφορετικών πρωτεϊνών μόνο σε συγκεκριμένα 24ωρα αναπτυξιακά χρονικά στάδια. Ωστόσο, κάποια άλλα παρατηρούνταν σε διάφορα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης και ιδιαίτερα έπειτα από την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος.

Οι προοπτικές που προσφέρονται και τα συμπεράσματα που προκύπτουν με τη χρήση μεθόδων Πρωτεωμικής στον τομέα της εμβρυολογίας επεκτείνουν τις γνώσεις μας πάνω στη φυσιολογία του εμβρύου των θηλαστικών. Η ταξινόμηση και η ταυτοποίηση του εμβρυϊκού πρωτεώματος/συνόλου εκφραζόμενων πρωτεϊνών (proteome/secretome) σε όλα τα στάδια της προεμφυτευτικής τους ανάπτυξης, θα διαφωτίσει κατά πολύ τις βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε κυτταρικό επίπεδο, συμπεριλαμβανομένου και του χρονικού σημείου εμφύτευσης.

Επίσης, αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το ωάριο και το πρώιμο έμβρυο, όπου οι βιολογικές λειτουργίες προτού την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος βασίζονται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Η Πρωτεωμική, σε συνδυασμό με τη Γενωμική (Genomics) αλλά και τη μελέτη του μεταβολισμού (Metabolomics) αποτελούν συμπληρωματικές προσεγγίσεις, παρέχοντας από κοινού διαφορετικές αλλά συγκρίσιμες προοπτικές της κυτταρικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της προεμφυτευτικής ανάπτυξης^[24].

1.4.2 Βιοδείκτες

«Ως βιοδείκτης μπορεί να χαρακτηριστεί ένα βιολογικό συστατικό όπως πρωτεΐνη, miRNA ή γονίδιο, των οποίων οι συγκεντρώσεις μπορούν να μεταβληθούν ανάλογα με την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης ασθένειας ή αποτελέσματος»^[25]

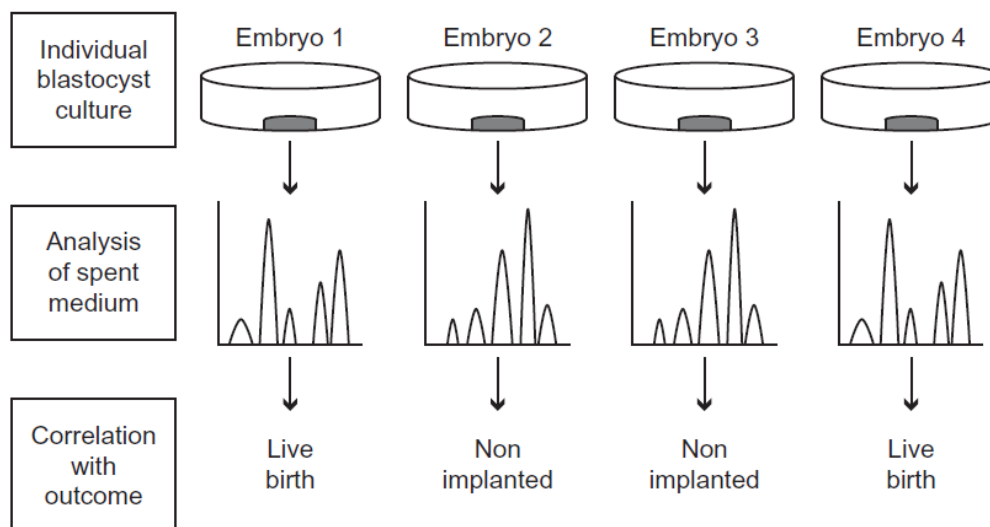
Ένας καλός βιοδείκτης θα πρέπει να διαθέτει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία και να είναι οικονομικά προσιτός. Επιπροσθέτως, είναι σημαντική η επίτευξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων, καθώς και ο εντοπισμός εκείνων των πρωτεϊνών που είναι κοινές ανάμεσα σε γυναίκες διαφορετικών ηλικιών, πληθυσμών και εθνικοτήτων. Ο ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να είναι ασφαλής και να ταυτοποιείται εύκολα και με ακρίβεια, μέσω οικονομικά αποδεκτού και ελάχιστης επεμβατικότητας τρόπου^[26].

Στις μεθόδους ART, οι βιοδείκτες θα πρέπει να έχουν σημαντική δυνατότητα πρόβλεψης της γονιμότητας, της πιθανότητας εμφύτευσης και της εμβρυϊκής βιωσιμότητας. Κατά συνέπεια, η Πρωτεωμική αποτελεί το κλειδί για τη βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας μέσω ταυτοποίησης, ποσοτικοποίησης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνικών προφίλ - ιδιαίτερα εκείνων των στοιχείων που καθορίζουν την επιτυχή έκβαση των τεχνικών ART. Αυτά περιλαμβάνουν τα σπερματοζώαρια, τα ωάρια, το ενδομήτριο, το μητριάιο υγρό και πρωτεΐνες εμβρυϊκής προέλευσης (secretome). Τα πρωτεωμικά προφίλ θα μπορούσαν να αποτελέσουν εξαιρετικά διαγνωστικά εργαλεία, παρέχοντας τη δυνατότητα πρόβλεψης της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος, της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου, της εμβρυϊκής βιωσιμότητας και την παρουσία τυχόν ανευπλοειδιών. Κατά συνέπεια, θα μπορούσαν να προσφέρουν εξατομικευμένη θεραπεία στους ασθενείς και να αντικαταστήσουν τη μεταφορά πολλαπλών εμβρύων με ένα έμβρυο ανά διαδικασία ART.

1.4.3 Επιλογή εμβρύου μέσω αξιολόγησης του καλλιεργητικού μέσου

Ως επιπρόσθετη μέθοδος αξιολόγησης της εμβρυϊκής βιωσιμότητας έχει προταθεί η ανάλυση του μέσου καλλιέργειας. Σκοπός είναι ο εντοπισμός και η ταυτοποίηση ανεξάρτητων βιοδεικτών ή συγκεκριμένων μοτίβων που να σχετίζονται με έμβρυα αυξημένου αναπτυξιακού δυναμικού (Εικ. 9). Αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην ενδεχόμενη ταυτοποίηση και μεταφορά εμβρύων με μεγαλύτερη πιθανότητα να εγκαθιδρύνουν εγκυμοσύνη, λόγω του υπερισχύοντος

μεταβολικού τους προφίλ. Αυτή η προσέγγιση φαίνεται πολλά υποσχόμενη. Ο λόγος είναι ότι αντιπροσωπεύει μια μη-επεμβατική μέθοδο, η οποία θα επέτρεπε στις κλινικές IVF να εξετάσουν την υποκείμενη φυσιολογία του εμβρύου, παρέχοντας επιπρόσθετες πληροφορίες πέρα από τη μορφολογική αξιολόγηση, αλλά και την εκτίμηση του αριθμού χρωμοσωμικών αντιγράφων.



Εικόνα 9: Εκτίμηση εμβρυϊκής βιωσιμότητας μέσω ανάλυσης του καλλιεργητικού μέσου

Έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμα μορφολογικά κριτήρια που ενισχύουν την προγνωστική ικανότητα για το αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρύων 3^{ης} ημέρας. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια τάση να αμφισβητείται η στενή συσχέτιση μεταξύ της συνολικής μορφολογίας της 3^{ης} ημέρας και του σχηματισμού βλαστοκύστης καθώς, και της ποιότητας του εμβρύου^[27,28].

Από την άποψη αυτή, υπάρχουν βιοχημικά κριτήρια που θα μπορούσαν να είναι κατάλληλα για τον εντοπισμό αυτών των εμβρύων, των οποίων η μεταβολική δραστηριότητα είναι εντός φυσιολογικού εύρους. Με αυτό τον τρόπο, θα διευκολυνόταν η αναγνώριση εκείνων των εμβρύων που θα προχωρήσουν σε βλαστοκύστη. Ωστόσο, οι απαιτούμενες τεχνικές (π.χ. υπερ-μικροφθορισμός, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κ.α.) συνήθως δεν είναι διαθέσιμες στο σύνολο των εργαστηρίων, περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή τους στην καθημερινή εργασία.

Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, το προφίλ των εμβρύων καθώς και η μεταβολική τους δραστηριότητα, μπορεί να παρουσιάζουν έντονες διαφοροποιήσεις. Αν και τα sequential μέσα καλλιέργειας προσπαθούν να μιμηθούν το περιβάλλον της μήτρας και κατά συνέπεια να ανταποκριθούν σε όλες τις απαιτήσεις του αναπτυσσόμενου εμβρύου, δεν μπορούν όλα τα έμβρυα να προσαρμοστούν σε αυτό το διαφορετικό περιβάλλον. Αυτή η αδυναμία προσαρμογής θα μπορούσε να εκφραστεί ως παρέκκλιση του μεταβολικού μοτίβου, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να υποδηλώνει μειωμένη βιωσιμότητα.

Τόσο η πρόσληψη γλυκόζης όσο και η παραγωγή γαλακτικού οξέος αποδείχθηκαν χρήσιμες στην ποσοτικοποίηση της γλυκολυτικής δραστηριότητας, η οποία

χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την επιλογή βλαστοκύστεων ποντικού προς μεταφορά^[29]. Από μια δεξαμενή βλαστοκύστεων παρόμοιου μεγέθους και μορφολογίας, εκείνες με γλυκολυτική δραστηριότητα πλησιέστερη προς αυτή που παρατηρήθηκε στις βλαστοκύστες που αναπτύχθηκαν *in vivo*, έδειξαν υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης (80%). Μη φυσιολογικός ρυθμός γλυκόλυσης - εκφράζεται με υπερβολική παραγωγή γαλακτικού οξέος - οδήγησε σε μειωμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη (6%).

Για την πρόγνωση σχηματισμού βλαστοκύστης στον άνθρωπο, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί η μελέτη του μεταβολισμού υδρογονανθράκων^[30]. Η παρουσία του πυροσταφυλικού, καθώς και η πρόσληψη γλυκόζης, ήταν σημαντικά υψηλότερα στα έμβρυα που συνέχιζαν στο στάδιο της βλαστοκύστης, από ότι στα έμβρυα που χαρακτηρίζονταν από παύση της ανάπτυξής τους (developmental arrest). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πρόσληψη γλυκόζης (αλλά όχι πυροσταφυλικού) ήταν υψηλότερη στις βλαστοκύστες που αναπτύσσονταν φυσιολογικά. Κατά συνέπεια, θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο προγνωστικό δείκτη, από άποψη μη-επεμβατικής επιλογής.

Παρόμοια προσέγγιση είναι η μη-επεμβατική μέθοδος ανάλυσης του ρυθμού κατανάλωσης αμινοξέων. Έχει αποδειχθεί ότι έμβρυα 2^{ης} ή 3^{ης} ημέρας, με μετέπειτα δυνατότητα σχηματισμού βλαστοκύστης, παρουσιάζουν μοτίβα μεταβολισμού αμινοξέων διαφορετικά από έμβρυα με συγκρίσιμη μορφολογία, αλλά που η ανάπτυξή τους έχει σταματήσει. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι στα έμβρυα που προχωρούν σε στάδιο βλαστοκύστης, η λευκίνη είναι το μόνο αμινοξύ του οποίου η συγκέντρωση παρουσιάζει σημαντική μείωση. Το γεγονός αυτό, ενισχύει την υπόθεση για το ρόλο που διαδραματίζει το απαραίτητο αυτό αμινοξύ ως διεγέρτης της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Επιπροσθέτως, εντοπίστηκε η παρουσία της αλανίνης, πιθανώς λόγω της συμμετοχής της στη απόρριψη των εμβρυοτοξικών ιόντων αμμωνίου^[31].

Μη βιώσιμα έμβρυα παρουσιάζουν 3.7 φορές μεγαλύτερο ρυθμό κατανάλωσης αμινοξέων από τα φυσιολογικά, αποδεικνύοντας εκφυλισμό του μεταβολισμού παρόμοιο με την αρνητική επίδραση της μάλλον υπερβολικής γλυκολυτικής δραστηριότητας^[29]. Περαιτέρω μελέτες πρότειναν ότι τα αμινοξέα που ο ρυθμός κατανάλωσής τους οδηγούσε το έμβρυο στο σχηματισμό βλαστοκύστης, είναι διαφορετικά από εκείνα που βοηθούν στην πρόγνωση επιτυχούς εγκαθίδρυσης εγκυμοσύνης και μετέπειτα γέννησης υγιούς παιδιού^[32]. Αυτό μπορεί να στηρίζεται στο γεγονός ότι δεν είναι όλες οι βλαστοκύστες που σχηματίζονται *in vitro* τόσο βιώσιμες, όσο αναμένονται με βάση τη μορφολογική τους εμφάνιση.

Επιπροσθέτως, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο του επωαστικού κλιβάνου που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια εμβρύων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει κατά πολύ το μεταβολισμό του εμβρύου. Συνήθως, η εμβρυϊκή καλλιέργεια πραγματοποιείται σε επίπεδα ατμοσφαιρικού οξυγόνου (περίπου 20%). Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο εντός της θηλυκής αναπαραγωγικής οδού είναι <10%

και η ανάπτυξη εμβρύου βελτιώνεται περιορίζοντας τη συγκέντρωση οξυγόνου σε πιο κατάλληλο εύρος για τη φυσιολογία του (5-7%). Ίσως να μην προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης οξυγόνου αλλάζει δραματικά τα ποσοστά της κατανάλωσης γλυκόζης και του μεταβολισμού των αμινοξέων των καλλιεργούμενων εμβρύων^[33].

Κάνοντας την κατάσταση λίγο πιο περίπλοκη, όσον αφορά στην αλληλεπίδραση του μεταβολισμού με το αναπτυξιακό δυναμικό ενός εμβρύου, έχει αποδειχθεί ότι το φύλο του εμβρύου επηρεάζει το μεταβολικό προφίλ: τα θηλυκά έμβρυα καταναλώνουν περισσότερη γλυκόζη και παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα χρήσης αμινοξέων, σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικά^[33].

Η ίσως πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη στο χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας είναι το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο-G (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen-G, **H**LA-G)^[34]. Το συγκεκριμένο μόριο, θα μπορούσε να εξυπηρετήσει ως πιθανός βιοδείκτης πρόβλεψης της βιωσιμότητας, σε συνδυασμό με παρατήρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί, παρατηρήθηκε ότι έμβρυα που στερούνταν τον παράγοντα HLA-G, εμφυτεύονταν κανονικά και εγκαθίδρυν εγκυμοσύνη. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες, οι οποίες δεν έχουν καταφέρει να εντοπίσουν σχέση ανάμεσα στο HLA-G και επίτευξη εγκυμοσύνης. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα θα μπορούσαν να οφείλονται στο γεγονός ότι τα εμβρυϊκά επίπεδα του HLA-G επηρεάζονται από ένα σύνολο παραγόντων. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται η ημέρα συλλογής του μέσου καλλιέργειας, καθώς επίσης και η σύστασή του.

Οι Katz-Jaffe et al.^[35] ήταν οι πρώτοι που παρουσίασαν ένα σύνολο εκκρινόμενων πρωτεϊνών (secretome) εμβρυϊκής προέλευσης. Η ομάδα τους ανακάλυψε υψηλά επίπεδα ουβικιτίνης σε αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας (**M**ass **S**pectrometry, **MS**) σε συνδυασμό με βάση δεδομένων πεπτιδικών αλληλουχιών. Η ουβικιτίνη εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαδικασία εμφύτευσης. Παράλληλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της βλαστοκύστης (Πίνακας 1).

Μελέτη (έτος)	Ταυτοποιημένοι Βιοδείκτες	Διαφορές που εντοπίζονται	Ρόλος Βιοδείκτη
Dominguez et al ^[15,36]	CXCL13, IL-6	Διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα σε βλαστοκύστες που κατάφεραν να εμφυτευθούν vs. εκείνων που απέτυχαν	Χημειο-ελκτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται από τις εμφυτευμένες βλαστοκύστες. Η IL-6 ευνοεί την εμφύτευση
González et al ^[17]	Λεπτίνη	Υψηλά επίπεδα σε βιώσιμες βλαστοκύστες vs. εμβρύων που έχει ανασταλεί η ανάπτυξή τους	Προσδένεται στους υποδοχείς Λεπτίνης με σκοπό την εγκαθίδρυση εμβρυϊκής/μητρικής επικοινωνίας.
Katz-Jaffe et al ^[35]	Ουβικιτίνη	Υψηλότερα επίπεδα σε αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες vs. εκείνων που απέτυχαν να εμφυτευθούν	Εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την εμφύτευση.
Cortezzi et al ^[16]	Jumonji	1/15 πρωτεΐνες αποκλειστικά παρούσες σε έμβρυα που οδηγούνται σε εμφύτευση	Συνθέτει τον παράγοντα PRCS2, ο οποίος αποσιωπεί τα γονίδια διαφοροποίησης και ανάπτυξης, μέσω μεθυλίωσης.
Cortezzi et al ^[16]	TSGA10	1/10 πρωτεΐνες αποκλειστικά παρούσες σε έμβρυα που δεν οδηγούνται σε εμφύτευση	Εμπλέκεται στην κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και μετανάστευση εμβρύων ποντικών.
Katz-Jaffe et al ^[14]	IL6, CXCL13	Παρόντες σε υψηλότερα επίπεδα σε εμφυτευμένες βλαστοκύστες vs. βλαστοκύστεων που απέτυχαν με συγκαλλιέργεια EEC	Εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εμφύτευση.
Cheong et al ^[37]	Λευκίνη	Αμινοξύ με το μεγαλύτερο ποσοστό - απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τις βλαστοκύστες	Απαραίτητο, διακλαδισμένο αμινοξύ που απαιτείται για την εμβρυϊκή θρέψη

Πίνακας 1: Υποψήφιοι βιοδείκτες εμβρυϊκής βιωσιμότητας

Η ομάδα των Cortezzi et al. ^[16] χρησιμοποίησε φασματομετρία μάζας, με σκοπό να αναλύσουν το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών εμβρυϊκής προέλευσης. Τα αποτελέσματά τους προέκυψαν μέσω σύγκρισης και αντιπαραβολής του πρωτεϊνικού συνόλου 8 εμβρύων που εμφυτεύθηκαν επιτυχώς και εγκαθιδρύθηκε εγκυμοσύνη - positive implantation group και 4 εμβρύων που δεν εμφυτεύθηκαν - negative implantation group (Πίνακας 1).

Η απολιποπρωτεΐνη A1 (**Apolipoprotein A1**, ApoA1) αποτελεί έναν πιθανό βιοδείκτη εμβρυϊκής βιωσιμότητας. Η ομάδα των Mains et al. ^[38] ήταν η πρώτη που ανέφερε ότι το έμβρυο συνθέτει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Σύμφωνα με τις έρευνές τους, έμβρυα διαφορετικής ποιότητας εξέφραζαν διαφορετικά επίπεδα ApoA1. Οι καλής ποιότητας βλαστοκύστες και τα μιτωτικά-αναστελλόμενα έμβρυα παρουσίαζαν έντονες διακυμάνσεις των επιπέδων της ApoA1. Επιπροσθέτως, οι καλής ποιότητας βλαστοκύστες σε σύγκριση με βλαστοκύστες που προέκυψαν από φτωχής ποιότητας έμβρυα, παρουσίαζαν σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασής της. Εν τούτοις, οι βλαστοκύστες που κατάφεραν να εμφυτευθούν και εκείνες που απέτυχαν, δεν σημείωσαν ιδιαίτερη διαφορά - έως καμία, στα επίπεδα ApoA1.

Αποτελέσματα άλλων μελετών δεν εντόπισαν συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ApoA1 και στα ποσοστά επιτυχίας τεχνικών IVF.

Επιπλέον, η ομάδα των Dominguez et al.^[15,36] ανακάλυψε μειωμένα επίπεδα του προσδέτη χημειοκίνης 13, C-X-C μοτίβου (chemokine, C-X-C motif, ligand 13, CXCL13) καθώς και του παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων κοκκιοκυττάρων (**G**ranulocyte **M**acrophage **C**olony **S**timulating **F**actor, GM-CSF) σε βλαστοκύστεις που κατάφεραν να εμφυτευθούν σε σύγκριση εκείνες που απέτυχαν.

1.5 Ωκυτοκίνη (Oxytocin - Oxt)

Η Ωκυτοκίνη είναι ορμόνη, νευροπεπτίδιο και φαρμακευτικό σκεύασμα^[39]. Η νευρο-υποφυσιακή ορμόνη Ωκυτοκίνη (Oxt) ήταν το πρώτο πεπτίδιο του οποίου καθορίστηκε η δομή και το πρώτο που συνθέθηκε χημικά, σε βιολογικά ενεργό μορφή. Η ονομασία έχει προέλθει από τις λέξεις *όξυς* + *τόκος*, λόγω της δράσης της. Η δομή του γονιδίου της ωκυτοκίνης αποσαφηνίστηκε το 1953 ενώ, για την αλληλουχία του υποδοχέα της έγινε αναφορά το 1992^[40].

Η ωκυτοκίνη φυσιολογικά παράγεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και απελευθερώνεται από την οπίσθια υπόφυση. Παίζει ρόλο στη δημιουργία κοινωνικών δεσμών (social bonding), στη σεξουαλική αναπαραγωγή και στα δυο φύλα, καθώς και κατά τη διάρκεια της γέννας αλλά, και έπειτα αυτής. Η ωκυτοκίνη απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος ως ορμόνη σε απάντηση στη διάταση του τραχήλου και της μήτρας κατά τη διάρκεια του τοκετού, καθώς και με διέγερση των θηλών κατά το θηλασμό. Αυτό βοηθά στη γέννηση, στο συναισθηματικό δέσιμο με το μωρό και την παραγωγή γάλακτος. Είναι στη λίστα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), η οποία περιλαμβάνει τα πιο σημαντικά φαρμακευτικά σκευάσματα, απαραίτητα για ένα βασικό σύστημα υγείας^[39].

Η ωκυτοκίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο που εντοπίζεται σε άφθονη ποσότητα. Το γεγονός αυτό έγινε προφανές από μια μελέτη στην οποία αναλύθηκαν τα πιο διαδεδομένα ειδικά-για-τον-υποθάλαμο mRNAs. Η ωκυτοκίνη βρέθηκε να είναι η πιο διαδεδομένη από τα 43 μεταγραφήματα που ταυτοποιήθηκαν^[41].

Σήμερα, αναγνωρίζουμε ότι η ωκυτοκίνη διαθέτει ένα ευρύ φάσμα τόσο κεντρικής, όσο και περιφερικής αποτελεσματικότητας. Οι δράσεις της ωκυτοκίνης ποικίλλουν, από την τροποποίηση των νευρο-ενδοκρινικών αντανακλαστικών μέχρι την εγκαθίδρυση πολύπλοκων κοινωνικών και συναισθηματικών συμπεριφορών, όσον αφορά στην αναπαραγωγή και τη φροντίδα των απογόνων.

Συνολικά, το κυκλικό εννεαπεπτίδιο ωκυτοκίνη και τα πεπτίδια δομικά-παρόμοια με αυτήν, διευκολύνουν την αναπαραγωγή σε όλα τα σπονδυλωτά, σε διάφορα επίπεδα.

1.5.1 Δομή

Η ωκυτοκίνη είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από εννέα αμινοξέα (εννεαπεπτίδιο). Η συστηματική του ονομασία είναι: αμίδιο κυστεΐνης–τυροσίνης–ισολευκίνης–γλουταμίνης–ασπαραγίνης–κυστεΐνης–προλίνης–λευκίνης–γλυκίνης (cys–tyr–ile–gln–asn–cys–pro–leu–gly–NH₂, ή αλλιώς CYIQNCPLG-NH₂). Έχει μοριακή μάζα 1007 daltons και μια παγκόσμια μονάδα (International Unit, IU) ωκυτοκίνης ισούται με περίπου 2 μικρογραμμάρια καθαρού πεπτιδίου.

Η βιολογικά ενεργός μορφή της ωκυτοκίνης, η οποία συνήθως μετράται με τεχνικές RIA και/ή HPLC, είναι επίσης γνωστή ως το οκταπεπτίδιο «δισουλφιδική ωκυτοκίνη»

(οξειδωμένη μορφή), αλλά η ωκυτοκίνη επίσης υπάρχει και ως μειωμένο διθειολικό εννεαπεπτίδιο, αποκαλούμενο ωκυτοκείνη (oxytocine)^[42]. Θεωρείται ότι η ανοιχτής αλυσίδας ωκυτοκείνη (η μειωμένη μορφή της ωκυτοκίνης) μπορεί να δράσει επιπρόσθετα με την απομάκρυνση ελευθέρων ριζών (δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα). Η ωκυτοκείνη μπορεί έπειτα να οξειδωθεί πίσω σε ωκυτοκίνη μέσω του οξειδο-αναγωγικού ζεύγους δεϋδροασκορβικό ↔ ασκορβικό^[43].

Η δομή της ωκυτοκίνης είναι πολύ παρόμοια με αυτή της βασοπρεσίνης (vasopressin: $\text{cys-tyr-phe-gln-asn-cys-pro-arg-gly-NH}_2$), επίσης ένα εννεαπεπτίδιο με γέφυρα θείου, του οποίου αλληλουχία διαφέρει από την ωκυτοκίνη σε δυο αμινοξέα. Η ωκυτοκίνη και η βασοπρεσίνη απομονώθηκαν και συνθέθηκαν από τον Vincent du Vigneaud το 1953, εργασία για την οποία έλαβε το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1955^[39] (Εικ. 10).

[CONTRIBUTION FROM THE DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, CORNELL UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE]

The Synthesis of Oxytocin¹

BY VINCENT DU VIGNEAUD,² CHARLOTTE RESSLER, JOHN M. SWAN,³ CARLETON W. ROBERTS AND PANAYOTIS G. KATSOYANNIS⁴

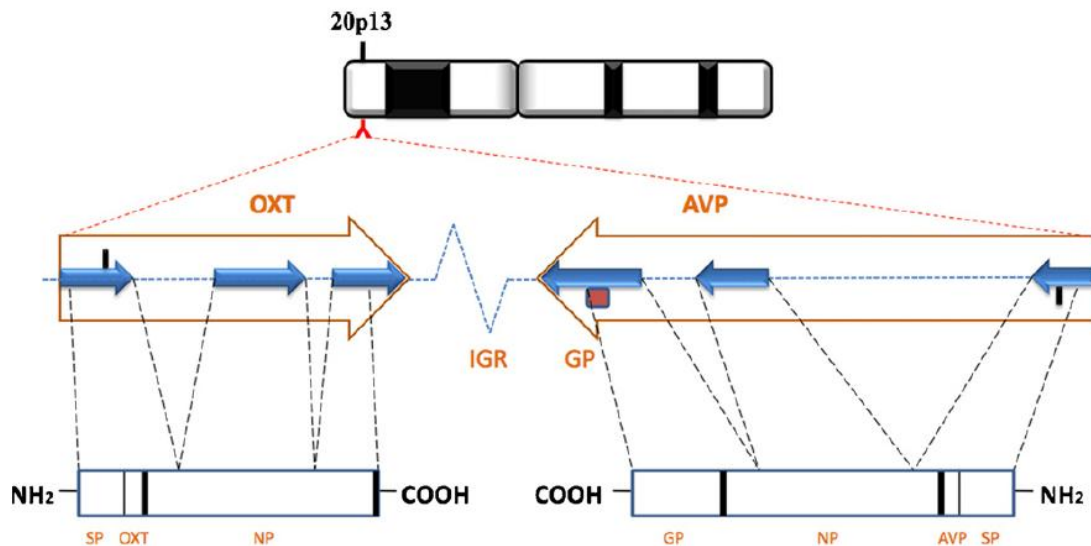
RECEIVED APRIL 28, 1954

A cyclic octapeptide amide (I) having the hormonal activity of oxytocin has been synthesized through the condensation of *N*-carbobenzoxy-*S*-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosine and the heptapeptide amide L-isoleucyl-L-glutamyl-L-asparaginyl-*S*-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucylglycinamide (IVa) to yield the protected nonapeptide amide VI followed by reduction with sodium in liquid ammonia and oxidation of the resulting sulfhydryl nonapeptide. IVa was prepared by the condensation of *S*-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucylglycinamide with tosyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-asparagine followed by removal of the tosyl group from the condensation product. The biologically active synthetic material thus obtained has been purified by countercurrent distribution and compared with natural oxytocin as to potency, specific rotation, partition coefficients, amino acid composition, electrophoretic mobility, infrared pattern, molecular weight, enzymatic and acid inactivation and chromatography on the resin IRC-50. The synthetic material and natural oxytocin were also compared with respect to milk ejection and induction of labor in the human as well as rat uterus contraction *in vitro*. The crystalline flavanates prepared from the synthetic material and from natural oxytocin were found to have the same crystalline form, melting point and mixed melting point. All of these comparisons afforded convincing evidence of the identity of the synthetic product with natural oxytocin. This synthesis thus constitutes the first synthesis of a polypeptide hormone.

Εικόνα 10: Εισαγωγή του σχετικού άρθρου για τη σύνθεση της Ωκυτοκίνης, 1954

1.5.2 Δομή γονιδίου

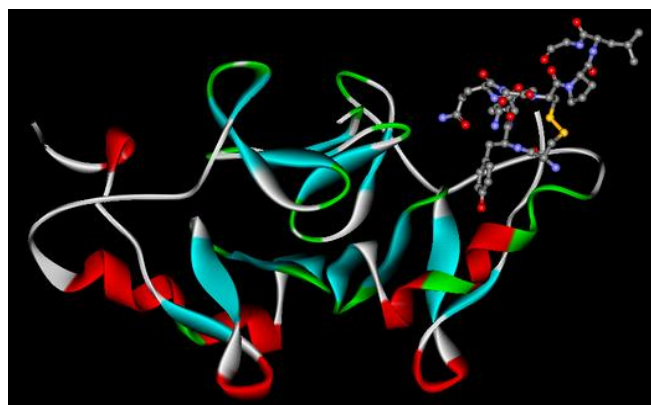
Σε όλα τα είδη, τα γονίδια της ωκυτοκίνης και βασοπρεσίνης εντοπίζονται στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή (locus) αλλά μεταγράφονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. (Εικ. 11). Η διαγονιδιακή απόσταση ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια κυμαίνεται από 3 μέχρι 12kb στο ποντίκι, στον άνθρωπο και τον αρουραίο. Αυτού του τύπου γονιδιακή κατανομή θα μπορούσε να έχει προκύψει από διπλασιασμό ενός κοινού προγονικού γονιδίου, ακολουθούμενο από αναστροφή ενός εκ των γονιδίων. Το ανθρώπινο γονίδιο για την ωκυτοκίνη-νευροφυσίνη I, το οποίο κωδικοποιεί το προ-προ-πεπτίδιο (preproreperptide) της ωκυτοκίνης χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 20p13 και αποτελείται από 3 εξώνια: το πρώτο εξώνιο κωδικοποιεί ένα σήμα μετάθεσης, την εννεαπεπτιδική ορμόνη, το τριπεπτιδικό σήμα επεξεργασίας (GKR) και τα πρώτα εννέα κατάλοιπα της νευροφυσίνης. Το δεύτερο εξώνιο κωδικοποιεί ένα κεντρικό τμήμα της νευροφυσίνης (κατάλοιπα 10 - 76) ενώ το τρίτο εξώνιο κωδικοποιεί την COOH-τελική περιοχή της νευροφυσίνης (κατάλοιπα 77 - 93/95).



Cys-Tyr-**Ile**-Gln-Asn-Cys-Pro-**Leu**-Gly-NH₂ Cys-Tyr-**Phe**-Gln-Asn-Cys-Pro-**Arg**-Gly-NH₂

Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα γονιδίων ωκυτοκίνης & βασοπρεσίνης (μεγάλα βέλη), προ-προορμόνες (παραλληλόγραμμα) και νευροπεπτίδια (από κάτω). Η χρωμοσωμική θέση τους στον άνθρωπο παρουσιάζεται στην κορυφή. Η σύνθεση και των δυο γονιδίων περιλαμβάνει **3 εξώνια** (μικρά μπλε βέλη) ανάμεσα από τα οποία παρεμβάλλονται **2 εσώνια** (διακεκομμένες γραμμές, ανάμεσα στα εξώνια). Τα γονίδια εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα αλλά, μεταγράφονται σε αντίθετες κατευθύνσεις και διαχωρίζονται από μια ενδογονιδιακή περιοχή (Intergenic Region - IGR). Το μήκος της IGR ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Κάθε προ-προορμόνη περιέχει ένα πεπτιδικό σήμα (signal peptide - SP), ένα νευροπεπτίδιο (Avp ή Oxt) και μια νευροφυσίνη (neurophysin - NP). Στην περίπτωση της Avp, έχουμε και ένα γλυκοπεπτίδιο (glycopeptide - GP). Τα σήματα πρωτεϊνικής επεξεργασίας απεικονίζονται με έντονες γραμμές. Κατάλοιπα κυστεΐνης σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό δημιουργώντας ένα δαχτυλίδι αμινοξέων και για τα δύο νευροπεπτίδια. Επτά από τα εννέα αμινοξέα είναι πανομοιότυπα στα νευροπεπτίδια και 2 μόνο διαφέρουν (κόκκινο). [Προσαρμογή και τροποποίηση από τους Caldwell *et al.* (2008)].

Το προ-προ-πεπτίδιο (preproreptide) της ωκυτοκίνης υπόκειται σε τομή και άλλες τροποποιήσεις, καθώς μεταφέρεται κατά μήκος του νευρικού άξονα σε τερματικά σημεία, τα οποία εντοπίζονται στην οπίσθια υπόφυση. Τα ώριμα πεπτιδικά προϊόντα, η ωκυτοκίνη και το μεταφορικό της μόριο, νευροφυσίνη (Εικ. 12), αποθηκεύονται στα τερματικά σημεία του νευρικού άξονα μέχρις ότου νευρικά ερεθίσματα προκαλέσουν την απελευθέρωσή τους.



Εικόνα 12: Ωκυτοκίνη (σφαίρες & ράβδοι) προσδεδεμένη με τη μεταφορική της πρωτεΐνη, νευροφυσίνη (λωρίδες).

Η κύρια λειτουργία της νευροφυσίνης, η οποία είναι μια μικρή (93 - 95 κατάλοιπα), πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς πρωτεΐνη, φαίνεται να σχετίζεται με τη σωστή στόχευση, πακετάρισμα και αποθήκευση της ωκυτοκίνης εντός κοκκίων πριν την απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος. Η ωκυτοκίνη εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (0.1 M) σε νευροεκκριτικά κοκκία της οπίσθιας υπόφυσης σε μορφή συμπλέγματος, με συχνότητα 1:1, με τη νευροφυσίνη. Σε τέτοιου είδους συμπλέγματα, τα διμερή ωκυτοκίνης-νευροφυσίνης είναι οι βασικές λειτουργικές μονάδες όπως προβλέπεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος. Cys-1 και Tyr-2 στο μόριο της ωκυτοκίνης είναι τα κύρια κατάλοιπα πρόσδεσης νευροφυσίνης. Συγκεκριμένα, η πρωτονιωμένη α-αμινομάδα (Cys-1) στην ωκυτοκίνη σχηματίζει ένα απαραίτητο σημείο επαφής με τη νευροφυσίνη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού πολλαπλών υδρογονικών δεσμών. Λόγω της εξάρτησης της πρωτονίωσης της αμινομάδας (pKa περίπου 6.4), η ισχύς του δεσμού ανάμεσα στην ωκυτοκίνη και τη νευροφυσίνη είναι πολύ μεγαλύτερη σε όξινο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα τα νευροεκκριτικά κοκκία (pH περίπου 5.5). Αντιστρόφως, η διάσπαση του συμπλόκου λαμβάνει χώρα καθώς απελευθερώνεται από τα νευροεκκριτικά κοκκία και εισέρχεται στο πλάσμα (pH 7.4).

1.5.3 Γονιδιακή ρύθμιση

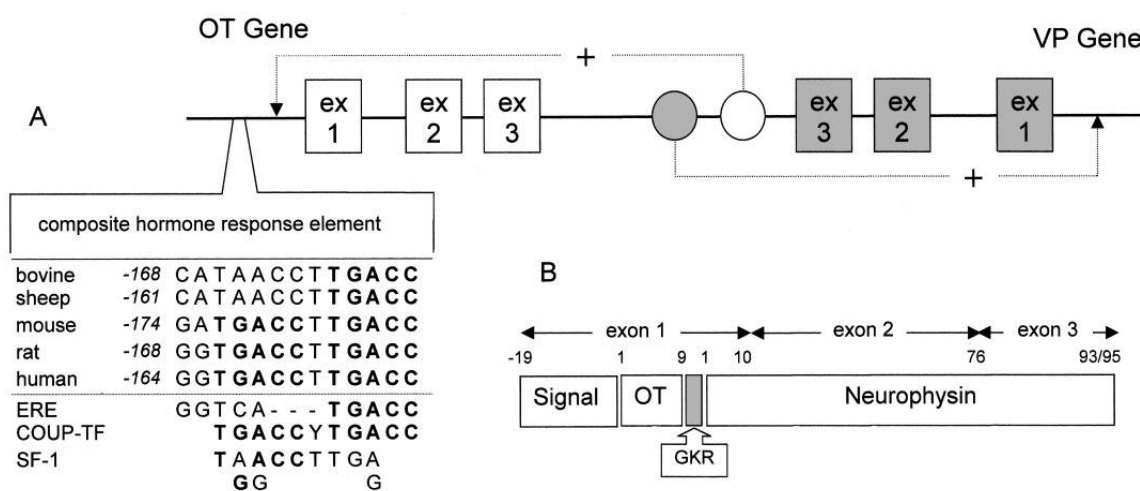
Το mRNA της ωκυτοκίνης στον αρουραίο δείχνει μια αύξηση στο μήκος της πολυαδενυλικής ουράς ως ανταπόκριση στην ενεργοποίηση του υποθαλαμο-νευρο-υποφυσιακού συστήματος, π.χ. κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, του θηλασμού και της αφυδάτωσης. Αυτό θα μπορούσε να αυξήσει τη σταθερότητα του mRNA και πιθανόν να είναι ένα επιπρόσθετο επίπεδο ελέγχου του γονιδίου της ωκυτοκίνης.

Εξανουκλεοτιδικά AGGTCA μοτίβα και παραλλαγές αυτών είναι ως εκ τούτου παρόντα στην εγγύς 59-πλευρική περιοχή κλωνοποιημένων γονιδίων ωκυτοκίνης. Το μοτίβο αυτό αποτελεί μέρος περιοχών πρόσδεσης για όλα τα μέλη της υπερ-οικογένειας πυρηνικών υποδοχέων, εκτός των γλυκοκορτικοειδών, μεταλλοκορτικοειδών, προγεστερόνης και του υποδοχέα ανδρογόνων. Υπάρχουν ποικίλοι συνδυασμοί αυτού του μοτίβου, κυμαινόμενοι από απλά εξανουκλεοτίδια μέχρι ευθείες ή ανεστραμμένες επαναλήψεις, με απόσταση από ένα έως τουλάχιστον έξι νουκλεοτίδια. Με αυτό τον τρόπο προσφέρεται η δυνατότητα σε διάφορα μέλη της οικογένειας πυρηνικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων και αρκετών ορφανών υποδοχέων, να αλληλεπιδράσουν με το γονίδιο της ωκυτοκίνης και να ρυθμίσουν τη λειτουργία του.

Ο εκκινητής του ανθρώπινου γονιδίου της ωκυτοκίνης, αλλά και ο αντίστοιχος στον αρουραίο, μπορούν να διεγερθούν από τους ενεργοποιημένους οιστρογονικούς υποδοχείς ERα (Estrogen Receptor alpha) και ERβ (Estrogen Receptor beta), τον υποδοχέα θυρεοειδικής ορμόνης THRα (Thyroid Hormone Receptor alpha) καθώς και τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος RARα (Retinoic Acid Receptor alpha) και RARβ

(Retinoic Acid Receptor beta) σε μια πληθώρα κυττάρων. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από πειράματα συνεπιμόλυνσης κυτταρικών σειρών, π.χ. κάτω από μη-φυσιολογικές συνθήκες. Υπάρχει ένα εξαιρετικά συντηρημένο στοιχείο DNA περίπου 160 νουκλεοτίδια προτού την περιοχή έναρξης της μετάφρασης (Εικόνα 13). Διαγραφή της περιοχής ανάμεσα στις θέσεις 2172 και 2148 είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια ανταπόκρισης της θυρεοειδικής ορμόνης και ιδιαίτερα στα οιστρογόνα και το ρετινοϊκό οξύ. Αυτό το ειδικό «σύνθετο» στοιχείο ορμονική απόκρισης αποτελείται από τρία TGACC μοτίβα. Δυο από αυτά σχηματίζουν μια ανάστροφη επανάληψη με απόσταση τριών νουκλεοτιδίων, τα οποία διαφέρουν σε ένα νουκλεοτίδιο από το παλίνδρομο στοιχείο κανονικής ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (ERE).

Διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στο ρόλο που έχουν οι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς στη ρύθμιση του γονιδίου της ωκυτοκίνης. Έχουν ταυτοποιηθεί ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς στα κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με το σύνθετο στοιχείο ορμονική απόκρισης (περίπου 160 bp, Εικ. 13): ο αντίθετης φοράς (upstream) εκκινητής του μεταφραστικού παράγοντα I ωλευκωματίνης όρνιθας (COUP-TF) και ο στεροειδογονικός παράγοντας-1 (SF-1). Τα επίπεδα αυτών των παραγόντων θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση του ενδογενούς γονιδίου ωκυτοκίνης σε αυτό τον ιστό.



Εικόνα 13: Οργάνωση γονιδιακής δομής ωκυτοκίνης (Oxt) και βασοπρεσίνης (VP) και σχηματική απεικόνιση (θεωρητικά) των κυτταρο-ειδικών ενισχυτών (άσπρος κύκλος: εκκινητής γονιδίου Oxt, γκρι κύκλος: εκκινητής γονιδίου VP). [Τροποποίηση από Gainer et al. (2000)]

A: λεπτομέρειες από την περίπου 2160-bp περιοχή (σύνθετο στοιχείο ορμονικής απόκρισης) αντίθετης φοράς εκκινητή του γονιδίου της Oxt, συντηρημένου ανάμεσα σε πέντε είδη, συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών του στοιχείου ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (ERE), αντίθετης φοράς εκκινητής του μεταφραστικού παράγοντα I ωλευκωματίνης όρνιθας (COUP-TF) και του στεροειδογονικού παράγοντα-1 (SF-1). [Τροποποίηση από Ivell et al. (273a)]

B: περιοχή οργάνωσης προ-προ-ωκυτοκίνης, συμπεριλαμβανομένων και των περιοχών επεξεργασίας. Το προγονικό μόριο χωρίζεται στα τμήματα που ενδείκνυνται μέσω ενζυματικών τομών, όπου η μια περιλαμβάνει μια γλυκυλ-λυσουλ-αργινική αλληλουχία (GKR), αφήνοντας μια καρβοξυαμιδική ομάδα στο COOH-τελικό άκρο του σηματοδοτικού πεπτιδίου της Oxt.

1.5.4 Φυσιολογική δράση

Η ωκυτοκίνη διαθέτει περιφερικές (ορμονικές) λειτουργίες όπως επίσης δρα και στον εγκέφαλο. Οι λειτουργίες της διαμεσολαβούνται από ειδικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια τύπου-ροδοψίνης (Κατηγορία I) υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Για τη δράση τους απαιτούν την παρουσία μαγνησίου και χοληστερόλης. Υποδοχείς ωκυτοκίνης εκφράζονται από νευρώνες σε πολλά σημεία του εγκεφάλου καθώς και της σπονδυλικής στήλης, συμπεριλαμβάνοντας την αμυγδαλή, τον μεσοκοιλιακό υποθάλαμο, το διάφραγμα, τον επικλινή πυρήνα και το στέλεχος.

Έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλλες μελέτες για το ρόλο που διαδραματίζει η ωκυτοκίνη στη συμπεριφορά, συμπεριλαμβάνοντας τον οργανισμό, την κοινωνική αναγνώριση, τη δέσμευση, το άγχος καθώς και τη μητρική αλληλεπίδραση με το νεογέννητο (Πίνακας 2).

Behavioral classes	Behaviors	Effects of Oxt in rodents	Effects of Oxt in humans
<i>Social behaviors</i>			
Social memory	Social recognition	-↑ odor processing in olfactory bulb -↑ social memory -↓ social recognition in Oxt KO mice - abnormal Bruce effect in female Oxt KO mice	-↓ amygdalar activation to social stimuli -↑ memory for faces
Affiliation	Sexual behavior	-↑ erections (with T) and ejaculation frequency in males -↑ receptivity (with E) in females	-↑ arousal in men and women -↑ uterine contractions at parturition
	Paternal behavior	-↓ parental behavior with concomitant Avp/Oxt antagonism -↓ adult paternal behavior with Oxt antagonist on PND1	no known effect
	Maternal behavior	- ↑ Oxt throughout the brain with onset of maternal behavior - necessary for lactation - induces full repertoire of maternal behaviors (in presence of E) - ↓ pup retrieval and pup survival in Oxt KO	no known effect
Aggression	Female aggression	-↑ Oxt levels in CeA correlated with aggression	no known effect
	Male aggression	- may have organizational effect during prenatal period	-↑ plasma Oxt levels in males with conduct disorder
<i>Non-social behaviors</i>			
Learning and memory	Non-spatial memory	-↓ memory in passive avoidance tasks	-↓ episodic memory in men and women -↓ verbal recall of certain categories of words
	Spatial memory	-↑ memory when injected into hippocampus - ↓ memory when injected into NBM	no known effect
Anxiety and depression	Anxiety	-↓ anxiety following Oxt administration -↑ anxiety in some Oxt KO mice; sexually dimorphic	-↓ amygdalar response to threatening stimuli -↓ anxiety to social stressors
	Depression	-↑ active/coping behaviors with i.p. Oxt administration	- ↓ plasma Oxt associated with major depression

Πίνακας 2: Περιληπτική παρουσίαση επίδρασης στη συμπεριφορά της Oxt και του Oxt-R.

1.5.5 Κεντρικό σύστημα ωκυτοκίνης

Προφίλ εντοπισμού της ωκυτοκίνης

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα - ΚΝΣ, το γονίδιο της ωκυτοκίνης εκφράζεται πρωτίστως στους μεγαλοκυτταρικούς νευρώνες (magnocellular neurons). Οι νευρώνες αυτοί εντοπίζονται στις υποθαλαμικές περιοχές PVN (Paraventricular nucleus) και SON (Supraoptic nucleus). Τα δυναμικά δράσης σε αυτά τα νευροεκκριτικά κύτταρα πυροδοτούν απελευθέρωση ωκυτοκίνης, από τα τερματικά σημεία του άξονά τους στην νευροϋπόφυση. Στην περιοχή PVN, έχουν ταυτοποιηθεί δύο τέτοιοι πληθυσμοί νευρώνων: μεγαλοκυτταρικοί νευρώνες που καταλήγουν στην νευροϋπόφυση και πλευροκυτταρικοί νευρώνες (parvocellular neurons) που καταλήγουν σε άλλο σημείο του ΚΝΣ. Έχει υπολογιστεί, ότι μόνο ένα μικρό κλάσμα (0,2%) των νευρώνων που αλληλεπιδρούν με την ωκυτοκίνη, κατέχουν διακλαδώσεις στον άξονά τους τόσο προς τη νευροϋπόφυση, όσο και προς τις εξω-υποθαλαμικές περιοχές. Επίσης έχουν παρατηρηθεί ίνες αλλά και απολήξεις που αλληλεπιδρούν με την ωκυτοκίνη σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου στον αρουραίο: ο μεσοραχιαίος υποθαλαμικός πυρήνας, διάφοροι θαλαμικοί πυρήνες, η ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του υπόκαμπου, το υπόθεμα (subiculum), ο ενδοθωρακικός φλοιός, μέσοι και πλευρικοί διαφραγματικοί πυρήνες, αμυγδαλές, οσφρητικοί βολβοί, κεντρικός γκρίζος πυρήνας του μεσεγκεφάλου, μέλανα ουσία (substantia nigra), locus coeruleus, πυρήνας της ραφής, πυρήνας της μονήρης δεσμίδας και ο ραχιαίος κινητικός πυρήνας του πνευμονογαστρικού νεύρου. Οι ίνες ωκυτοκίνης διατρέχουν επίσης προς την επίφυση και την παρεγκεφαλίδα, με τις περισσότερες από αυτές να συνεχίζουν προς το νωτιαίο μυελό. Μερικές ίνες ωκυτοκίνης καταλήγουν στα τριχοειδή αγγεία, στο μεσαίο ύψωμα του υποθαλάμου^[44-48].

Οι συγκεντρώσεις ωκυτοκίνης στο εξωκυττάριο υγρό του SON υπολογίστηκαν από 100 έως 1000 φορές υψηλότερες από τη βασική συγκέντρωση ωκυτοκίνης στο πλάσμα, δηλ. περισσότερο από 1-10nM. Κατά την παραγωγή ηλεκτρικών ώσεων υψηλής συχνότητας από τους νευρώνες ωκυτοκίνης π.χ. κατά τη διάρκεια του αντανάκλαστικού έκκρισης γάλακτος, μπορεί να απελευθερωθούν ακόμα υψηλότερες τοπικές συγκεντρώσεις ωκυτοκίνης^[49].

Η ωκυτοκίνη του πλάσματος δεν διασχίζει εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επίσης, δεν υπάρχει σχέση ανάμεσα στην απελευθέρωσή της στο αίμα από τη νευροϋπόφυση και τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό - ENY. Περιφερικές διεγέρσεις που προκαλούν μεγάλες αυξήσεις στην ωκυτοκίνη του πλάσματος όπως π.χ. το πιπίλισμα ή η κολπική διαστολή, μπορεί να αλλάξουν ή και όχι τη συγκέντρωση της ωκυτοκίνης στο ENY. Όπως έχει αποδειχθεί στους αρουραίους, η ηλεκτρική διέγερση της νευροϋπόφυσης προκαλεί μόνο την απελευθέρωση ωκυτοκίνης στο αίμα, ενώ η διέγερση του PVN προκαλεί απελευθέρωση ωκυτοκίνης στο αίμα και στο ENY^[50].

Η ωκυτοκίνη στο ENY πιθανότατα προέρχεται από νευρώνες οι οποίοι εκτείνονται στην τρίτη κοιλία, στο μεταιχμιακό σύστημα, στο στέλεχος του εγκεφάλου και στο νωτιαίο μυελό. Στο ENY, η ωκυτοκίνη είναι κανονικά παρούσα σε συγκεντρώσεις 10 - 50μΜ. Επιπλέον, ο χρόνος ημιζωής της είναι πολύ μεγαλύτερος (28 λεπτά) από ότι στο αίμα (1-2 λεπτά)^[51,52]. Στους ανθρώπους και στους πιθήκους, έχει βρεθεί ένας κικαδίου ρυθμός στις συγκεντρώσεις της ωκυτοκίνης στο ENY, με τις μέγιστες τιμές να παρατηρούνται κατά το μεσημέρι. Δεν έχουν παρατηρηθεί ωστόσο τέτοιοι κικαδίου ρυθμοί στο ENY από αρουραίους, γάτες, ινδικά χοιρίδια ή κασίκες. Επιπροσθέτως, δεν έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχοι κικαδίου ρυθμοί σε συγκεντρώσεις ωκυτοκίνης στο πλάσμα^[53].

Επιπλέον παράγοντες που μπορεί να περιπλέξουν την κατάσταση, είναι η παρουσία ενός πεπτιδίου-παρόμοιου-με-ωκυτοκίνη καθώς και η εμφάνιση προϊόντων μετατροπής της ωκυτοκίνης, που πιθανόν ασκούν τα αποτελέσματά τους αποκλειστικά στον εγκέφαλο: μπορεί π.χ. να επηρεάσουν τις διαδικασίες μάθησης και απομνημόνευσης. Επιπλέον, θραύσματα ωκυτοκίνης όπως τα Oxt-(106) ή Oxt-(709) θα μπορούσαν να διασχίσουν πιο εύκολα το φράγμα αίματος-εγκεφάλου. Ο **Πίνακας 3** δίδει μια επισκόπηση του προτύπου έκφρασης του συστήματος ωκυτοκίνης ανάμεσα σε διάφορα είδη.

Πίνακας 3: Έκφραση Ωκυτοκίνης και Υποδοχέων της στο περιφερικό σύστημα

Ιστός	Είδος	Γονίδιο Oxt	Δέσμευση Oxt	Oxt-R mRNA	
Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα	Μυομήτριο	Hum bov she		+	+
		Rat	MA	+	+
		Rab gp		+	
		Pig	+	+	
	Ενδομήτριο	Hum		+	+
		Rat	+	+	MA
		Bov she		+	+
		Rab		+	
	Άμνιο	Hum	+	+	+
		Rat	+	MA	
		Bov		+	MA
	Χόριο	Hum	+	+	+
		Rat	+	MA	
	Φθαρτό	Hum	+	+	+
Rat gp rab			+		
Ωοθήκη	Hum mar	+	+	+	
	Mou	+		+	
	Bov	+	+		
	Gp pos		+		
	Hum pig mac	+	+		
Ωχρο σωματίο	Bov	+	+	MA	
	She	+	+		
	Rat bab goa	+			
Αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα	Όρχις	Hum rat	+	+	
		Mar	+		+
		Mac	+	(+)	
		Mou	(+)		
		Bov she ban	+		
		Pig		+	

Επιδιδυμίδα	Hum	+	(+)	
	Mar	(+)		(+)
	Wal		+	+
	Pig		+	
	Rat	+		
Προστατικός αδένας	Hum	+	(+)	
	Mar	MA		(+)
	Mar mac		(+)	
	Wal		+	+
	Bov	MA		
	Rat gp dog		(+)	
Μαστικός αδένας	Hum		(+)	+
	Rat mar bovin pig		+	
Νεφρό	Rat		+	+
	Rab		(+)	
	Pos		+	
Καρδιά	Rat	+	+	+
Αγγειακό ενδοθήλιο	Hum		+	+
Θύμος αδένας	Hum		+	+
	Rat			+
	Mou	+		
	Rat		+	
Λιποκύτταρα	Hum	(+)		
Πάγκρεας	Rat	(+)	+	
	Hum rat ham	+		
Επινεφρίδια	Bov	+	+	
	Hum		+	+
Οστεοβλάστες	Hum		+	+

+ Ανιχνεύσιμο σήμα, (+) αδύναμο ή όχι ξεκάθαρο σήμα, **MA**: Μη ανιχνεύσιμο. Τα είδη που υποδεικνύονται είναι τα παρακάτω: **bab**: baboon, **ban**: bandicoot, **bov**: bovine; **goa**: goat, **gp**: guinea pig, **ham**: hamster, **hum**: human, **mac**: macaque monkey, **mar**: marmoset monkey, **mou**: mouse, **pos**: brushtail possum, **rab**: rabbit, **she**: sheep, **wal**: wallaby.

Εντοπισμός των υποδοχέων ωκυτοκίνης

Πειράματα με πρωταρχικές κυτταρικές καλλιέργειες έδειξαν ότι οι υποδοχείς ωκυτοκίνης εντοπίζονται τόσο σε υποθαλαμικούς νευρώνες όσο και σε αστροκύτταρα^[54]. Όσον αφορά την περιφερειακή κατανομή των θέσεων σύνδεσής της στον εγκέφαλο, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα είδη. Σε αρουραίους, οι υποδοχείς της ωκυτοκίνης εντοπίζονται σε αφθονία σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, π.χ. σε μερικές φλοιώδεις περιοχές, στο οσφρητικό σύστημα, στα βασικά γάγγλια, στο μεταιχμιακό σύστημα, στο θάλαμο, στον υποθάλαμο, στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό. Στον ενήλικα αρουραίο, παρατηρείται υψηλή πυκνότητα υποδοχέων ωκυτοκίνης στον ραχιαίο μισχοειδή φλοιό, στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στις νησίδες Calleja και στις κυτταρικές ομάδες της περιοχής ventral pallidum, στο μεταιχμιακό σύστημα (διάμεσος πυρήνας της stria terminalis, κεντρικός αμυγδαλοειδής πυρήνας, κοιλιακό υπόθεμα) και τον υποθαλαμικό κεντρικό πυρήνα^[55,56]. Το mRNA του υποδοχέα ωκυτοκίνης ανιχνεύθηκε στις περιοχές του εγκεφάλου που συμπίπτουν κατά κύριο λόγο με την εμφάνιση θέσεων δέσμευσης ωκυτοκίνης^[57]. Οι υποδοχείς ωκυτοκίνης ήταν ανιχνεύσιμοι σε όλα τα τμήματα της σπονδυλικής στήλης, αλλά σε μικρές ποσότητες και περιοριζόνταν στα επιφανειακά στρώματα του ραχιαίου κέρατος^[58]. Δεν

παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανομή υποδοχέων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών εγκεφάλων.

Η κατανομή και οι αριθμοί των θέσεων σύνδεσης ωκυτοκίνης υφίστανται σημαντικές αλλαγές κατά την ανάπτυξη. Όπως φαίνεται από τους Tribollet et al.^[56], μόνο ένα κλάσμα υποδοχέων είναι συνεχώς παρόν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Μερικοί υποδοχείς εκφράζονται παροδικά μόνο σε νευρώνες π.χ. κατά τη βρεφική ηλικία ή κατά την ωρίμανση (Πίνακας 4). Σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, αναγνωρίστηκαν δύο κρίσιμες περιόδους κατά την ανάπτυξη: η τρίτη εβδομάδα μετά τη γέννηση, η οποία προηγείται του απογαλακτισμού και η εφηβεία. Για παράδειγμα, στον εγκέφαλο του βρέφους, ο προσαγωγός και ο οπισθοσπληνοειδής φλοιός, καθώς και η πηκτωματώδη ουσία (substantia gelatinosa) του νωτιαίου μυελού περιείχαν τις υψηλότερες πυκνότητες των θέσεων σύνδεσης ωκυτοκίνης, ενώ σε αυτές τις περιοχές παρατηρήθηκαν χαμηλοί ή μη ανιχνεύσιμοι αριθμοί υποδοχέων ωκυτοκίνης στον εγκέφαλο ενήλικων αρουραίων. Αντιστρόφως, οι υποδοχείς ωκυτοκίνης ήταν άφθονοι σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου του ενήλικα, αλλά δεν ανιχνεύονται πριν την εφηβεία, π.χ. στον οσφρητικό σωλήνα (Calleja νησίδες και κυτταρικές ομάδες της περιοχής ventral pallidum) και στον υποθαλαμικό κεντρικό πυρήνα^[56]. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ο αριθμός των θέσεων σύνδεσης ωκυτοκίνης μειώθηκε και πάλι στις προαναφερθείσες περιοχές. Αυτό πιθανόν να προκαλείται από το αξιοσημείωτα χαμηλότερο επίπεδο τεστοστερόνης του πλάσματος σε ενήλικους αρουραίους. Στην πραγματικότητα, η έκφραση των υποδοχέων ωκυτοκίνης στον οσφρητικό σωλήνα και στον υποθαλαμικό κεντρικό πυρήνα, αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από τα στεροειδή των γονάδων και η θεραπεία με τεστοστερόνη ενηλίκων αρουραίων μπορεί να αποκαταστήσει τα φυσιολογικά επίπεδα υποδοχέων ωκυτοκίνης στις περιοχές αυτές^[59].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στην κατανομή των υποδοχέων ωκυτοκίνης ανάμεσα στα διάφορα είδη. Για παράδειγμα, το κοιλιακό υπόθεμα του ιππόκαμπου περιέχει μεγάλο αριθμό θέσεων δέσμωσης ωκυτοκίνης στον αρουραίο, ενώ στο ινδικό χοιρίδιο, το χάμστερ, το κουνέλι και τον σκιουροπίθηκο (marmoset) δεν ανιχνεύονται αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης ωκυτοκίνης σε αυτή την περιοχή. Στο κουνέλι, δεν βρέθηκαν υποδοχείς ωκυτοκίνης στον υποθαλαμικό κεντρικό πυρήνα. Σε μονογαμικούς έναντι πολυγαμικούς αρουραίους (voles), η κατανομή υποδοχέων ωκυτοκίνης απεδείχθη ότι αντικατοπτρίζει την κοινωνική οργάνωση^[60]. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, εντοπίζεται μεγάλος αριθμός θέσεων πρόσδεσης υποδοχέα ωκυτοκίνης στη συμπαγή μοίρα της μέλανας ουσίας (substantia nigra) σε αντίθεση με αρκετά άλλα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής. Κατά συνέπεια, στους ανθρώπους, οι μελανοραβδωτοί νευρώνες ντοπαμίνης θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για την ωκυτοκίνη, όπως επίσης και το ίδιο το σύστημα ωκυτοκίνης θα μπορούσε να εμπλέκεται σε κινητικές και άλλες συναφείς λειτουργίες βασικών γαγγλίων. Επίσης έχει παρατηρηθεί δυνατότητα σύνδεσης της ωκυτοκίνης στον βασικό πυρήνα του Meynert, ωστόσο οι

αντίστοιχες θέσεις δέσμησης έλειπαν στον υπόκαμπο, την αμυγδαλή, τον ενδορινικό φλοιό και τον οσφρητικό βολβό του ανθρώπινου εγκεφάλου^[61]. Σε μερικές περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο κοιλιακή μοίρα του υπόκαμπου και ο βασικός πυρήνας της stria terminalis (bed nucleus of the stria terminalis, BNST), η αντίδραση των νευρώνων στην ωκυτοκίνη θα μπορούσε να συσχετιστεί με τις απολήξεις του νευρικού άξονα καθώς και τους υποδοχείς της. Η κατανομή των θέσεων πρόσδεσης της ωκυτοκίνης στο νωτιαίο μυελό του αρουραίου έδειξε ότι συμπίπτει με εκείνη της εννεύρωσης της ωκυτοκίνης, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκεται σε αισθητικές και αυτόνομες λειτουργίες^[62]. Στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου, δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί μια σαφής σχέση μεταξύ της παρουσίας ολόκληρου του συστήματος ωκυτοκίνης και των φυσιολογικών δεδομένων. Έτσι, σε αρσενικούς αρουραίους, οι Hosono et al.^[63] εντόπισαν ένα λειτουργικό σύστημα υποδοχέα ωκυτοκίνης στο υποφυσικό όργανο (subfornical organ), όπου σε μελέτες δέσμησης η έκφραση σχεδόν δεν λήφθηκε υπόψιν. Παρατηρούνται σημαντικές αναντιστοιχίες μεταξύ υποδοχέων και πεπτιδίων σε μερικές περιοχές του εγκεφάλου, για παράδειγμα στην αμυγδαλή, όπου έχουν βρεθεί πολύ λίγοι προσαγωγοί νευρώνες ωκυτοκίνης αλλά υψηλότερες δραστηριότητες δέσμησης. Από την άλλη πλευρά, καλό θα ήταν να ληφθεί υπόψιν ότι οι θέσεις δέσμησης ωκυτοκίνης σε περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να ρυθμιστούν αρνητικά σε ένα επίπεδο που μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμο με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας, χρησιμοποιώντας ραδιενεργά συνδεδετικά μόρια.

Στον θηλάζοντα αρουραίο, οι θέσεις δέσμησης της ωκυτοκίνης έχουν βρεθεί ότι είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμες στις περιοχές PVN και SON. Μόλις 5-20min μετά την ενδοεγκεφαλοκοιλιακή ένεση ενός ανταγωνιστή ωκυτοκίνης, παρατηρήθηκε έντονη αύξηση των θέσεων δέσμησης Oxt στους μεγαλοκυτταρικούς πυρήνες. Σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία του ανταγωνιστή εμποδίζει την αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων που προκαλείται από τις υψηλές συγκεντρώσεις της ωκυτοκίνης που απελευθερώνονται στους μεγαλοκυτταρικούς πυρήνες κατά τη διάρκεια της γαλουχίας^[64].

Στον εγκέφαλο, τα οιστρογόνα έχουν μικρή επίδραση στη σύνθεση ωκυτοκίνης, ωστόσο έχουν έντονη επίδραση στη ρύθμιση του υποδοχέα της. Οι υποδοχείς ωκυτοκίνης ρυθμίζονται με πολύπλοκο τρόπο από γοναδικά στεροειδή στον εγκέφαλο αρουραίου^[65,66]. Έχει παρατηρηθεί στειρότητα καθώς και μείωση της ανασταλτικής δραστηριότητας της αρωματάσης, ενώ αντίθετα η οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη αυξάνουν τη δέσμηση ωκυτοκίνης, ιδιαίτερα σε περιοχές του εγκεφάλου που υποτίθεται ότι εμπλέκονται σε αναπαραγωγικές λειτουργίες, όπως το προσθιοπλάγιο τμήμα του υποθαλαμικού κοιλιακού πυρήνα (ventromedial nucleus, VMN), τις νησίδες Calleja καθώς και τις γειτονικές κυτταρικές ομάδες^[66]. Θεραπεία με οιστρογόνα αύξησε τη συγγένεια των υποδοχέων ωκυτοκίνης στον πρόσθιο υποθάλαμο^[67] και αύξησε τόσο την πυκνότητα όσο και την περιοχή δέσμησης ωκυτοκίνης στον υποθαλαμικό κοιλιακό πυρήνα (VMN) αρουραίου^[68]. Η προγεστερόνη προκάλεσε μια περαιτέρω αύξηση στην ικανότητα δέσμησης του

υποδοχέα και απαιτήθηκε για να επιτευχθεί μέγιστη επέκταση της περιοχής που καλύπτεται από υποδοχείς ωκυτοκίνης^[69]. Σε μια άλλη μελέτη, η χρόνια θεραπεία με προγεστερόνη αύξησε την πυκνότητα του βασικού υποδοχέα ωκυτοκίνης στις μεταιχμακές δομές, μείωσε στον μεσοκοιλιακό πυρήνα και απέτρεψε τις επαγόμενες-από-οιστρογόνα αυξήσεις στην ικανότητα δέσμευσης σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν, με εξαίρεση τη μεσημβρινή προοπτική περιοχή^[70]. Τα γλυκοκορτικοειδή^[71] έχουν επίσης αναφερθεί ότι ρυθμίζουν τους εγκεφαλικούς υποδοχείς ωκυτοκίνης^[70]. Ο εγκεφαλικός υποδοχέας ωκυτοκίνης ποικίλει ανάμεσα στα είδη όχι μόνο στην κατανομή του, αλλά και στην περιφερειακή ρύθμισή του από τα γοναδικά στεροειδή. Για παράδειγμα, χορήγηση οιστρογόνου αύξησε την ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα ωκυτοκίνης στον εγκέφαλο του αρουραίου αλλά μειώθηκε η αντίστοιχη ικανότητα του υποδοχέα στις ομόλογες περιοχές του εγκεφάλου ποντικού^[72].

1.5.6 Περιφερικό σύστημα ωκυτοκίνης

✓ Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα

Μήτρα

Η μήτρα της εγκύου είναι ένας από τους παραδοσιακούς στόχους της ωκυτοκίνης. Η ωκυτοκίνη είναι ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες που επηρεάζουν τις συσπάσεις της μήτρας και χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη με σκοπό την πρόκληση του τοκετού. Συνεπώς, η ανάπτυξη ιδιαίτερα εξειδικευμένων ανταγωνιστών της ωκυτοκίνης θα μπορούσε να έχει θεραπευτική αξία για την πρόληψη του πρόωρου τοκετού καθώς και τη ρύθμιση της δυσμηνόρροιας^[73,74]. Το γονίδιο της ωκυτοκίνης βρέθηκε να εκφράζεται στο επιθήλιο της μήτρας επίμυος. Η επαγόμενη από οιστρογόνο αύξηση των επιπέδων mRNA της ωκυτοκίνης περιορίστηκε μέσα σε 3 ημέρες και έφθασε τα μέγιστα επίπεδα, υπερβαίνοντας τα υποθαλαμικά επίπεδα mRNA ωκυτοκίνης κατά ένα συντελεστή 70^[75]. Στους αρουραίους, η έκφραση του γονιδίου της ωκυτοκίνης αποδείχθηκε ότι λάμβανε χώρα στον πλακούντα και το άμνιο^[76] και στους ανθρώπους στο άμνιο, το χόριο και το φθαρτό^[77]. Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες δεν έχει ανιχνευθεί σημαντική αύξηση της ωκυτοκίνης πριν από την έναρξη του τοκετού, ούτε στο μητρικό πλάσμα αλλά ούτε και στους ενδομήτριους ιστούς. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ευρήματα που υποδεικνύουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του μοτίβου έκκρισης της ωκυτοκίνης και της προόδου της εγκυμοσύνης. Στους πιθήκους rhesus, αποδείχθηκε ότι η μητρική και όχι η εμβρυϊκή συγκέντρωση ωκυτοκίνης συσχετιζόταν θετικά με τη νυκτερινή δραστηριότητα της μήτρας και αυξάνονταν προοδευτικά κατά τη διάρκεια της όψιμης εγκυμοσύνης και του τοκετού^[78].

Κοντά στο στάδιο έναρξης του τοκετού, η ευαισθησία της μήτρας σε ωκυτοκίνη αυξάνεται σημαντικά. Αυτό συσχετίζεται τόσο με αυξημένη ρύθμιση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα ωκυτοκίνης όσο και με την μεγάλη αύξηση της πυκνότητας των μωμητρικών υποδοχέων ωκυτοκίνης, φτάνοντας σε μια μέγιστη τιμή κατά τον

πρώιμο τοκετό^[79,80]. Αυτό έχει αποδειχθεί τόσο στον αρουραίο όσο και στον άνθρωπο, στον οποίο τα επίπεδα των υποδοχέων αυξάνονται κατά τη διάρκεια του πρόωρου τοκετού μέχρι 200 φορές^[81] από ότι σε κατάσταση μη-εγκυμοσύνης. Έτσι, κατά την έναρξη του τοκετού, η ωκυτοκίνη μπορεί να διεγείρει τις συστολές της μήτρας σε επίπεδα που είναι αναποτελεσματικά στην κατάσταση μη-εγκυμοσύνης. Μετά τον τοκετό, οι συγκεντρώσεις των υποδοχέων ωκυτοκίνης μειώνονται ραγδαία. Στους αρουραίους, τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα της ωκυτοκίνης μειώνονται περισσότερο από επτά φορές μέσα σε 24 ώρες^[82]. Ενδεχομένως, η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων ωκυτοκίνης μπορεί να είναι απαραίτητη για την αποφυγή ανεπιθύμητων συσταλτικών αποκρίσεων κατά τη διάρκεια της γαλουχίας όπου τα επίπεδα ωκυτοκίνης αυξάνονται.

Σάλπιγγα και ωχρό σωματίο

Σε πολλά είδη, η ωοθήκη έχει αποδειχθεί ότι περιέχει ωκυτοκίνη και μπορεί να αποτελεί περιοχή τοπικής παραγωγής ωκυτοκίνης^[83]. Στον πίθηκο *Callithrix jacchus*, μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι η ωκυτοκίνη είναι ένας παράγοντας ωχρικοποιητικής ωοθυλακιορρηξίας. Έπειτα από θεραπεία με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη, σχεδόν όλες οι στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων έδειξαν ανοσοδραστικότητα τόσο ως προς την ωκυτοκίνη όσο και τον υποδοχέα της. Η ωκυτοκίνη παρήχθη μόνο από κοκκώδη κύτταρα προερχόμενα από προωορρηκτικά ωοθυλάκια: μετά από χορήγηση ωκυτοκίνης μόνο τα κοκκώδη κύτταρα που καλλιεργήθηκαν από προωορρηκτικά ωοθυλάκια προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής προγεστερόνης^[84,85]. Λειτουργικοί υποδοχείς ωκυτοκίνης έχουν ανιχνευθεί σε κοκκώδη κύτταρα βοοειδών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ωκυτοκίνη μπορεί να είναι ένας αυτοκρινής παράγοντας κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων^[86]. Η ωκυτοκίνη αυξάνει επίσης το ρυθμό ανάπτυξης της βλαστοκύστης ποντικού και μπορεί επομένως να παίζει κάποιο ρόλο στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωοκυττάρων^[87]. Τόσο τα γονίδια ωκυτοκίνης όσο και του υποδοχέα της εκφράζονται στα ανθρώπινα κύτταρα θήκης που περιβάλλουν τα ωοκύτταρα. Έτσι, η τοπική ωκυτοκίνη μπορεί να συμμετέχει στη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη στους ανθρώπους^[88].

Έκκριση γάλακτος

Ένας από τους κλασσικούς ρόλους που διαδραματίζει η ωκυτοκίνη είναι η έκκριση γάλακτος από το μαστικό αδέν. Η εκκριτική ικανότητα των μαστικών αδένων ενεργοποιείται όταν το βρέφος αρχίσει να πιπιλίζει τη θηλή. Η διέγερση των υποδοχέων στην περιοχή δημιουργεί αισθητηριακές ώσεις που μεταδίδονται από τις θηλές στο νωτιαίο μυελό και στη συνέχεια στους εκκριτικούς ωκυτοκινεργικούς (oxytocinergic) νευρώνες στον υποθάλαμο. Αυτοί οι νευρώνες εμφανίζουν μια συγχρονισμένη, υψηλής συχνότητας δραστηριότητα έκκρισης, αποτελούμενη από μια σύντομη (3 - 4sec) εκφόρτιση υψηλής συχνότητας των δυναμικών δράσης που επαναλαμβάνονται κάθε 5 - 15min. Κάθε κύμα οδηγεί σε μαζική απελευθέρωση ωκυτοκίνης στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω του οποίου μεταφέρεται στα

θηλάζοντα στήθη. Εκεί προκαλεί συστολή των μυοεπιθηλιακών κυττάρων στα τοιχώματα των γαλακτοφόρων αγωγών, των ιγμορείων και των κυψελίδων του μαστικού ιστού. Στους ανθρώπους, μέσα σε 30sec έως 1min από τη στιγμή που ένα μωρό αρχίζει να θηλάζει το στήθος, το γάλα αρχίζει να ρέει. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται έκκριση γάλακτος ή αντανακλαστικό γάλακτος και συνεχίζει να λειτουργεί μέχρι τον απογαλακτισμό.

Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η κύρια αιτία θανάτου σε γυναίκες ηλικίας 35 έως 45 ετών, αλλά παρουσιάζεται συχνότερα σε γυναίκες άνω των 50 ετών. Δεν είναι γνωστό γιατί οι μητέρες που έχουν θηλάσει τα μωρά τους έχουν κατά 20% χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού μετά την εμμηνόπαυση, σε σύγκριση με μητέρες που δεν το έκαναν. Ο Murrell^[89] πρότεινε μια υπόθεση που συνδέει μερικώς τον καρκίνο του μαστού με την ενεργοποίηση του συστήματος ωκυτοκίνης. Σύμφωνα με αυτή, οι καρκινογόνοι παράγοντες στο μαστό μπορεί να διεγερθούν με τη δράση των ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου που απελευθερώνονται κατά η διάταση του αγγειακού αδένου προκαλώντας μικροαγγειακή ισχαιμία. Επιπλέον, η ανεπαρκής φροντίδα των θηλών στα χρόνια κατά τα οποία είναι περισσότερο εκτεθειμένα σε κίνδυνο θα μπορούσε να οδηγήσει σε απόφραξη των πόρων, αποτρέποντας την εξάλειψη των καρκινογόνων στοιχείων από το στήθος.

Νεφρό

Το νεφρό είναι ένας από τους περιφερικούς ιστούς-στόχους για τις νευροϋποφυσιακές ορμόνες που ασκούν τον έλεγχο της υδρομεταλλικής απέκκρισης. Οι ορμόνες απελευθερώνονται στο αίμα με διέγερση, όπως η υποογκαιμία ή η υπεροσμωτικότητα, που γενικά ενεργοποιούν τους νευρώνες ωκυτοκίνης. Η ωκυτοκίνη είναι ένας μη-υπερτασικός νατριουρητικός παράγοντας. Συμπεριλαμβάνεται στη φυσιολογική ωσμωτική ρύθμιση, η οποία πιθανότατα διαφέρει από τα ρυθμιστικά συστατικά όγκου της ομοιόστασης Na^+ . Απότομη χορήγηση ωκυτοκίνης σε αρουραίους παρήγαγε μέτρια αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και αποτελεσματικού κλάσματος διήθησης. Το νατριουρητικό αποτέλεσμα της ωκυτοκίνης οφείλεται κυρίως στη μείωση της σωληνοειδούς επαναρόφησης Na^+ , πιθανώς στο τερματικό άπω σωληνάριο ή στον αγωγό συλλογής^[90-92]. Η αυτοραδιογραφική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη και τον ακριβή εντοπισμό υποδοχέων ωκυτοκίνης στο νεφρό αρουραίων. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η κατανομή των θέσεων σύνδεσης ωκυτοκίνης υφίσταται ανασχηματισμό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μετά τη γέννηση. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στον εγκέφαλο αρουραίου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Συγκεκριμένες θέσεις σύνδεσης ωκυτοκίνης ανιχνεύονται πρώτη φορά κατά την εμβρυϊκή ημέρα 17 στο φλοιό. Στο μυελό, οι θέσεις πρόσδεσης της ωκυτοκίνης ανιχνεύονται αρχικά κατά την εμβρυϊκή ημέρα 19, όταν σχηματίζεται αυτή η περιοχή. Στον ενήλικα αρουραίο, οι θέσεις δέσμησης

ωκυτοκίνης εντοπίστηκαν αποκλειστικά στον φλοιό, κυρίως συγκεντρωμένες στην πυκνή κηλίδα (macula densa). Στον εσωτερικό μυελό, οι θέσεις πρόσδεσης της ωκυτοκίνης εντοπίστηκαν στους βρόχους Henle των παραμυελικών νεφρών. Είναι ενδιαφέρον ότι σε όλα τα στάδια που εξετάστηκαν, οι φλοιώδεις θέσεις σύνδεσης ωκυτοκίνης είχαν υψηλότερη εκλεκτικότητα ως προς την ωκυτοκίνη έναντι της βασοπρεσίνης σε σύγκριση με τις μυελικές θέσεις. Συνεπώς προτάθηκε ότι οι θέσεις πρόσδεσης ωκυτοκίνης της πυκνής κηλίδας και του λεπτού βρόχου Henle θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν δύο υποτύπους υποδοχέων ωκυτοκίνης^[93,94]. Το προφίλ θέσεων των υποδοχέων υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο για την ωκυτοκίνη στη ρύθμιση της σωληνοειδικής ανάδρασης και της μεταφοράς διαλυτών ουσιών.

Καρδιά και καρδιαγγειακό σύστημα

Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ωκυτοκίνης μειώνει τη μέση αρτηριακή πίεση σε αρουραίους^[95,96]. Παρόλο που απουσιάζει κεντρικός μηχανισμός ελέγχου, η ωκυτοκίνη είναι σε θέση να μειώσει τον καρδιακό ρυθμό και τη δύναμη των κολπικών συστολών σε απομονωμένα τμήματα καρδιακού κόλπου από αρουραίους^[97]. Χρήση ανταγωνιστή ωκυτοκίνης ανέτρεψε τη βραδυκαρδία που προκάλεσε η ωκυτοκίνη. Επιπλέον, χορήγηση ωκυτοκίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις (1mM) οδηγεί στη διέγερση της απελευθέρωσης ANP^[98]. Επιπλέον, το γονίδιο του υποδοχέα ωκυτοκίνης εκφράζεται σε όλους τους θαλάμους της καρδιάς αρουραίου και η ανάλυση προϊόντων RT-PCR (Real Time - Polymerase Chain Reaction) έδειξε την παρουσία υποδοχέων ωκυτοκίνης που μοιάζουν με εκείνους που εντοπίζονται στη μήτρα, στην καρδιά^[99]. Αν και τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα ωκυτοκίνης στον καρδιακό κόλπο βρέθηκαν να είναι υψηλότερα από ότι στις κοιλίες, συνολικά τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα ωκυτοκίνης υπολογίστηκαν να είναι τουλάχιστον 10 φορές χαμηλότερα από το αντίστοιχο επίπεδο mRNA υποδοχέα ωκυτοκίνης που υπάρχει στη μήτρα ενός μη-εγκυμονούντος αρουραίου. Η καρδιά του αρουραίου έχει επίσης αποδειχθεί ότι αποτελεί θέση σύνθεσης ωκυτοκίνης. Η ωκυτοκίνη ανιχνεύθηκε στην εκροή απομονωμένων καρδιακών διαχυμάτων καθώς και στο μέσο καλλιέργειας κολπικών μυοκυττάρων. Οι καρδιακές επιδράσεις επαγόμενες από ωκυτοκίνη αναφέρθηκαν επίσης και για ορισμένα άλλα είδη. Οι καρδιακές επιδράσεις που προκαλούν οι νευροϋποφυσιακές ορμόνες έχουν μελετηθεί στο βάτραχο *Rana tigrina* και στο φίδι *Ptyas mucosa*. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η ωκυτοκίνη ρυθμίζει τους ενδοθωρακικούς συμπαθητικούς γαγγλιονικούς νευρώνες που ρυθμίζουν την καρδιά του κυνός.

Θύμος αδένας

Τα νευροϋποφυσιακά πεπτίδια έχουν αποδειχθεί ότι πυροδοτούν πολλαπλασιασμό κυττάρων του θύμου αδένος και θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανοσολογική ανοχή αυτής της διατηρημένης νευροενδοκρινικής οικογένειας. Η ωκυτοκίνη έχει ταυτοποιηθεί στον ανθρώπινο θύμο αδένος με ανοσοαντιδραστικότητα και σε μεταγραφικό επίπεδο. Η ωκυτοκίνη υπήρχε στον θύμο αδένος σε εκπληκτικά μεγάλες ποσότητες και βρέθηκε ότι περιοριζόταν σε ορισμένους υποτύπους

θυμικών επιθηλιακών κυττάρων^[99,100]. Λόγω του υψηλού επιπέδου έκφρασής της στο θύμικο επιθήλιο, η ωκυτοκίνη προτάθηκε ως αυτοαντιγόνο της νευροϋποφυσιακής οικογένειας^[101]. Η ωκυτοκίνη εντοπίστηκε μαζί με το δίκτυο κυτοκερατίνης των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου και όχι εντός των εκκριτικών κοκκίων. Συνεπώς, το πεπτιδίο δεν εκκρίνεται, αλλά συμπεριφέρεται σαν ένα αντιγόνο που παρουσιάζεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Η θυμική ωκυτοκίνη συμπεριφέρεται επίσης ως κρυπτοκρινικό σήμα που στοχεύει στην επιθηλιακή μεμβράνη από όπου είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με νευροϋποφυσιακούς πεπτιδικούς υποδοχείς που εκφράζονται από προ-T κύτταρα. Σε προ-T κύτταρα, η ωκυτοκίνη βρέθηκε να επάγει τη φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης^[102]. Έτσι αποδείχθηκε ότι η ωκυτοκίνη παρεμβαίνει ενεργά στη διαδικασία διαφοροποίησης των T-κυττάρων τόσο ως νευροενδοκρινικό αυτοαντιγόνο όσο και ως προαγωγέας της εστιακής προσκόλλησης των T-κυττάρων ακολουθώντας μια κρυπτοκρινική οδό. Οι υποδοχείς ωκυτοκίνης που ανιχνεύθηκαν σε θυμικές μεμβράνες ή σε θυμοκύτταρα παρουσίασαν μια συνδεσμική επιλεκτικότητα παρόμοια με αυτή των υποδοχέων ωκυτοκίνης στη μήτρα^[103]. Οι Caldwell et al. ανέφεραν ότι η σεξουαλική δραστηριότητα οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του υποδοχέα ωκυτοκίνης στο θύμο αδένων των αρουραίων. Σε εκχυλίσματα θύμου ανθρώπου, το περιεχόμενο της ανοσοαντιδραστικότητας της ωκυτοκίνης παρουσίασε μείωση με την αύξηση της ηλικίας, ενώ στα θυμικά εκχυλίσματα αρουραίου, αναφέρθηκε ότι αυξάνεται με την ωρίμανση. Οι αλλαγές που εξαρτώνται από την ηλικία μπορεί να συνδέονται με τη θυμική ενσωμάτωση. Ορισμένες παθολογίες του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να εξηγηθούν από τη θυμική ωκυτοκίνη που εμπλέκεται στη θετική επιλογή και ενεργοποίηση των T-κυττάρων.

Λιποκύτταρα

Στα λιποκύτταρα, η ωκυτοκίνη έχει την αποκαλούμενη δραστηριότητα τύπου ινσουλίνης κατά το ότι διεγείρει την οξειδωση γλυκόζης και τη λιπογένεση. Επίσης, αυξάνει τη δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης^[104].

Πάγκρεας

Η ωκυτοκίνη έχει ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα παγκρέατος ανθρώπου και αρουραίου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που βρίσκονται στο περιφερικό πλάσμα^[105]. Ωστόσο, δεν έχει ακόμη καθιερωθεί τοπική σύνθεση εντός αυτού του οργάνου. Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες σε διάφορα είδη, οι νευροϋποφυσιακές ορμόνες επάγουν την απελευθέρωση γλυκαγόνης και, σε μικρότερο βαθμό, την ινσουλίνη από το πάγκρεας. Κατά τη διάρκεια της *in situ* έγχυσης παγκρέατος αρουραίου με ωκυτοκίνη, παρατηρήθηκε έντονη διέγερση απελευθέρωσης γλυκαγόνης και μέτρια διέγερση απελευθέρωσης ινσουλίνης^[106].

Επινεφρίδια

Οι Ang και Jenkins^[107] ταυτοποίησαν για πρώτη φορά ανοσοαντιδραστική ωκυτοκίνη σε επινεφρίδια ανθρώπων και αρουραίων. Η συγκέντρωση της ωκυτοκίνης που εμφανίστηκε ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή που βρέθηκε στο πλάσμα. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε επινεφρίδια από αρουραίους, αγελάδες, χάμστερ και ινδικά χοιρίδια έδειξαν ότι η ωκυτοκίνη εντοπίζεται τόσο στον φλοιό όσο και στο μυελό σε όλα αυτά τα είδη. Στο φλοιό, η ανοσοαντιδραστικότητα της ωκυτοκίνης ήταν πιο έντονη στην περιοχή της φλοιώδους μοίρας, ενώ στο μυελό η παρουσία της ωκυτοκίνης ήταν υψηλότερη, αλλά αποκάλυψε περισσότερες παραλλαγές ανάμεσα στα είδη^[108]. Οι μεμβράνες μυελού επινεφριδίων των βοοειδών αποκάλυψαν υψηλής συγγένειας θέσεις δέσμησης ωκυτοκίνης. Η σύνδεση ωκυτοκίνης ανιχνεύθηκε επίσης σε μονοστρωματικές καλλιέργειες κυττάρων βόειας επινεφριδιακής χρωματοφίνης. Ωστόσο, η ικανότητα πρόσδεσης αυτών των θέσεων ήταν κοντά στο όριο ανίχνευσης και οι συγκεντρώσεις της ωκυτοκίνης στην μικρογραμμομοριακή κλίμακα ήταν απαραίτητες για την διέγερση της οδού φωσφοϊνοσιτιδής^[109].

1.5.6 Εξελικτική σκοπιά

Όλες οι νευροϋποφυσιακές ορμόνες είναι εννεαπεπτίδια με μια δισουλφιδική γέφυρα ανάμεσα στα κυστεϊνικά κατάλοιπα 1 και 6. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα πεπτίδιο, αποτελούμενο από ένα εξαμινικό κυκλικό κομμάτι και μια COOH-τελική ουρά τριών α-αμιδικών καταλοίπων. Με βάση το αμινοξύ στη θέση 8, αυτά τα πεπτίδια κατηγοριοποιούνται σε οικογένεια βασοπρεσσίνης και ωκυτοκίνης: η οικογένεια βασοπρεσσίνης περιλαμβάνει ένα βασικό αμινοξύ (Lys, Arg) και η οικογένεια ωκυτοκίνης περιλαμβάνει ένα ουδέτερο αμινοξύ σε αυτή τη θέση (Πίνακας 4). Η ισολευκίνη στη θέση 3 είναι απαραίτητη για τη διέγερση των υποδοχέων της ωκυτοκίνης και Arg ή Lys στη θέση 8 για τη δράση επί των υποδοχέων βασοπρεσσίνης. Η διαφορά πολικότητας αυτών των αμινοξικών καταλοίπων πιστεύεται ότι δίνει τη δυνατότητα στα πεπτίδια βασοπρεσσίνης και ωκυτοκίνης να αλληλεπιδράσουν με τους αντίστοιχους υποδοχείς^[111]. Κατ' ουσίαν, όλα τα σπονδυλωτά είδη διαθέτουν ένα πεπτίδιο παρόμοιο-με-ωκυτοκίνη (Oxt-like) και ένα παρόμοιο-με-βασοπρεσσίνη (vasopressin-like). Τα ωστεϊνώδη ψάρια (Οστέϊχθες), προκάτοχοι των σπονδυλωτών της ξηράς, διαθέτουν ισοτοκίνη και βασοτοκίνη. Γι' αυτό το λόγο έχουν προταθεί δυο εξελικτικά μοριακές γενεαλογίες: μια ισοτοκίνης-μεσοτοκίνης-ωκυτοκίνης, που σχετίζεται με αναπαραγωγικές λειτουργίες και μια βασοτοκίνης-βασοπρεσσίνης, που σχετίζεται με την ομοιόσταση του νερού. Λόγω του ότι η βασοτοκίνη έχει βρεθεί στους πιο πρωτόγονους κυκλόστομους, τα γονίδια ωκυτοκίνης και βασοπρεσσίνης ίσως να έχουν προκύψει από διπλασιασμό ενός κοινού προγονικού γονιδίου, μετά την απόκλιση των κυκλόστομων. Βάση υπολογισμών από το νουκλεοτιδικό επίπεδο του γονιδίου της ωκυτοκίνης και της βασοπρεσσίνης, το προγονικό γονίδιο που κωδικοποιούσε την πρόδρομη πρωτεΐνη θα έπρεπε να χρονολογείται πάνω από 500 εκατ. χρόνια. Η

εξαιρετική δομική σταθερότητα των εννεαπεπτιδίων κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οδηγεί στο συμπέρασμα ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, π.χ. μέσω παράλληλης εξέλιξης με τους αντίστοιχους υποδοχείς και/ή με συγκεκριμένα ένζυμα επεξεργασίας.

Πίνακας 4: Ωκυτοκίνη και συγγενικά πεπτίδια.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ωκυτοκίνη	Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly(NH ₂)	Πλακούντας θηλαστικών, μερικών μαρσιποφόρων, γατόψαρα
Μεσοτοκίνη	*	*	*	*	*	*	*	Ile	*	Μαρσιποφόρα, μη θηλαστικά τετράποδα κ.α
Ισοτοκίνη	*	*	*	Ser	*	*	*	Ile	*	Οστεοϊχθύες
Γλουμιτοκίνη	*	*	*	Ser	*	*	*	Gln	*	Σαλάχια (Chondrichthyes)
Βλιτοκίνη	*	*	*	*	*	*	*	Val	*	Καρχαρίες (Chondrichthyes)
Ασπαρτοκίνη	*	*	*	Asn	*	*	*	*	*	Καρχαρίες (Chondrichthyes)
Ασβατοκίνη	*	*	*	Asn	*	*	*	Val	*	Καρχαρίες (Chondrichthyes)
Φασβατοκίνη	*	*	Phe	Asn	*	*	*	Val	*	Καρχαρίες (Chondrichthyes)
Κεφαλοτοκίνη	*	*	Phe	Arg	*	*	*	Ile	*	Χταπόδι το κοινό (Molluscs)
Ανετοκίνη	*	Phe	Val	Arg	*	*	*	Thr	*	Ανελίδες (<i>Eisenia foetida</i>)
Βασοτοκίνη	*	*	*	*	*	*	*	Arg	*	Μη θηλαστικά σπονδυλωτά (cyclostomes)
Βασοπρεσίνη	*	*	Phe	*	*	*	*	Arg	*	Θηλαστικά
Λυσιπρεσίνη	*	*	Phe	*	*	*	*	Lys	*	Χοίροι και κάποια μαρσιποφόρα
Φενυπρεσίνη	*	Phe	Phe	*	*	*	*	Arg	*	Μακρόποδα (Macrorodids)
Λοκουπρεσίνη	*	Leu	*	Thr	*	*	*	Arg	*	Έντομα (<i>Locusta migratoria</i>)
Arg-κονοπρεσίνη	*	Ile	*	Arg	*	*	*	Arg	*	Μαλάκια (<i>Conus geographicus</i>)
Lys-κονοπρεσίνη	*	Phe	*	Arg	*	*	*	Lys	*	Μαλάκια (<i>Lymnaea stagnalis</i>)

Οι αστερίσκοι (*) αντιστοιχούν σε κατάλοιπα αμινοξέων, πανομοιότυπα με τα αντίστοιχα κατάλοιπα στην αλληλουχία της ωκυτοκίνης [Τροποποίηση Acher et al.]

2. Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

✓ Βασικές τεχνικές ELISA

Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν οι σημαντικότερες ανοσοχημικές τεχνικές και συγκεκριμένα οι αρχές των ανοσοενζυμικών τεχνικών, των ραδιοανοσοενζυμικών τεχνικών και της χημειοφωταύγειας. Οι τεχνικές αυτές αποτελούν τους βασικούς τρόπους προσδιορισμού πρωτεϊνών, ποιοτικά ή ποσοτικά. Και στις τρεις χρησιμοποιούνται αντισώματα όπως επίσης ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και χημικές ενώσεις φωταύγειας.

Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στις ανοσοενζυμικές μεθόδους και ιδιαίτερα στην τεχνική ELISA. Η ELISA αποτελεί την πλέον διαδεδομένη ανοσοχημική μέθοδο λόγω της ευκολίας της χρήσης της από άποψη εξοπλισμού, τεχνικής, ασφάλειας αλλά και ποικιλίας των πρωτεϊνικών μορίων που μπορούν να προσδιοριστούν με αυτή.

2.1 Εισαγωγή

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, όπως υπονοεί και η ονομασία τους, αναφέρονται σε εκείνη την κατηγορία των αναλυτικών μεθόδων που συνδυάζουν τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας. Πρακτικά αναφέρονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τουλάχιστον μία φορά αντισώματα. Δεδομένου ότι τα αντισώματα συνδέονται μόνο με πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται μόνο για τον ποσοτικό ή ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και όχι άλλης οργανικής ή ανόργανης ένωσης.

Για το λόγο ότι η κάθε μια στηρίζεται σε διαφορετικές αρχές μεθόδων, απαιτούνται διαφορετικές τεχνολογίες για τις φωτομετρικές αναλύσεις: διαφορετικά όργανα, αντιδραστήρια και αναλυτές. Η σύγχρονη τεχνολογία όμως έχει οδηγήσει στην κατασκευή πολυ-αναλυτών, που συνδυάζουν φωτομετρικές και ανοσοχημικές τεχνικές στην ίδια πλατφόρμα. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται σημαντικά το κόστος σε υλικούς και ανθρώπινους πόρους.

2.1.1 Η βασική αρχή των Ανοσοχημικών τεχνικών

Οι ανοσοχημικοί αναλυτές μετρούν με ειδικό ανιχνευτή το σήμα που παράγεται από κάποια χημική αντίδραση. Αυτή η χημική αντίδραση πυροδοτείται από την ένωση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα και της δημιουργίας ενός ανοσοσυμπλέγματος^[112]. Επειδή, μέσα στον οργανισμό τα αντισώματα ενώνονται με αντιγόνα, οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται γενικά «αντιγόνα», αν και πολλές φορές απέχουν από την πραγματική έννοια του αντιγόνου της ανοσολογίας. Μπορεί δηλαδή να είναι πραγματικά αντιγόνα, υπό την ανοσολογική έννοια, αλλά μπορεί να είναι και αντισώματα (π.χ. αντισώματα έναντι ιών) καθώς και απτένια. Τα απτένια είναι πρωτεΐνες που διεγείρουν τον οργανισμό για την παραγωγή αντισωμάτων παρά μόνο ύστερα από τη σύνδεσή τους με μεγαλύτερες από αυτά πρωτεΐνες.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ανοσοχημικών τεχνικών (Πίνακας 5), ανάλογα με το σήμα που μετράται από αυτές, τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στις

χημικές αντιδράσεις, αλλά και στο διαχωρισμό των ανοσοσυμπλόκων (σύνδεση αντιγόνων–αντισωμάτων) από τα υπόλοιπα μέρη του διαλύματος. Στον Πίνακα 6 καταγράφονται οι σημαντικότερες κατηγορίες τους.

Πίνακας 5: Αυτοματοποιημένες ανοσοχημικές μέθοδοι

EIA	Ανοσοενζυμική μέθοδος
SFIA	Φθορισμο-ανοσοενζυμική μέθοδος
ELISA	Ανοσο-απορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου
RIA	Ραδιοανοσολογική μέθοδος
IRMA	Ραδιοανοσομετρική μέθοδος
RAST	Ραδιοαλλεργιοαπορροφητική μέθοδος
RIST	Ραδιοανοσοαπορροφητική μέθοδος
CIA	Ανοσοχημειοφωταύγεια
ICMA	Ανοσοχημειοφωταυγειομετρική μέθοδος
eCLIA/ECL	Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
FPIA	Ανάλυση πολωμένου φθορισμού
PACIA	Μικροσωματιδιακή ανοσοενζυμική ανάλυση
ICIA	Τεχνολογία δέσμευσης ιόντων
EMIT	Ανοσοενζυμική ενισχυμένη μέθοδος
LOCI	Ανοσοχημειοφωταύγεια καναλιού οξυγόνου
FETI	Μέθοδος μεταφοράς φθορισμομετρικής ενέργειας
TR-FIA	Μέθοδος χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού
SL-FIA	Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί με επισημασμένο υπόστρωμα
DELFLIA	Ανοσοφθορισμομετρική ενισχυμένη διάσταση λανθανιδών

Πίνακας 6 : βασικές κατηγορίες Ανοσοχημικών μεθόδων

Ανάλογα με το σήμα

Χρωματική αντίδραση	→	Ανοσοενζυμικές
Κρούσεις ραδιοϊσοτόπων	→	Ραδιοανοσολογικές
Ένταση παραγόμενου φωτός	→	Χημειοφωταύγεια

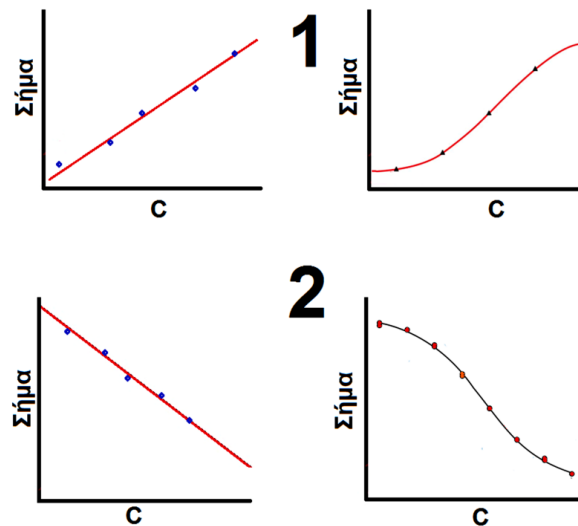
Ανάλογα με τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στην αντίδραση

Ένα αντίσωμα	→	Ανταγωνιστικές
Δύο αντισώματα	→	Μη ανταγωνιστικές

Ανάλογα με το διαχωρισμό ανοσοσυμπλόκων

Διαλυτό ανοσοσύμπλοκο	→	Ομογενείς
Ακίνητοποιημένο ανοσοσύμπλοκο	→	Ετερογενείς

Στις ανοσοχημικές μεθόδους η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση δεν είναι τόσο απλή όπως στις φωτομετρικές αναλύσεις. Σε αντίθεση με τις φωτομετρικές αναλύσεις, στις ανοσοχημικές αντιδράσεις οι καμπύλες βαθμονόμησης δεν είναι πάντα ευθείες γραμμές (Εικ. 13).



Εικόνα 13: Πιθανές καμπύλες αναφοράς σε ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές ανοσοχημικές μεθόδους. Οι κατασκευαστές αναλυτών και αντιδραστηρίων προσπαθούν σήμερα να προσαρμόσουν τις καμπύλες αναφοράς σε ευθεία γραμμή για να αυξήσουν την ευαισθησία τους.

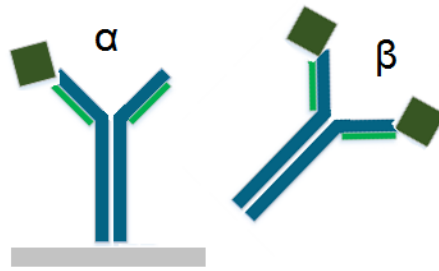
2.1.2 Οι κατηγορίες των Ανοσοχημικών τεχνικών

✓ Ομογενείς και Ετερογενείς Ανοσοχημικές μέθοδοι

Από τις δύο αυτές κατηγορίες συνηθέστερες είναι οι ετερογενείς μέθοδοι και από αυτές η ELISA (Enzyme Linked Immunoassay Antibody) είναι αυτή που χρησιμοποιείται πολύ στις δια χειρός μεθόδους (manual).

Στις ετερογενείς μεθόδους τα αντισώματα είναι προσκολλημένα πάνω σε στερεή επιφάνεια (Εικ. 14α). Τέτοιες συνηθισμένες επιφάνειες είναι ο πλαστικός πυθμένας των πηγαδιών (wells) μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης, ο πυθμένας γυάλινων ή συνηθέστερα πλαστικών σωληναρίων και η επιφάνεια σφαιριδίων latex ή μαγνητικών σφαιρών. Οι ετερογενείς μέθοδοι επιλέγονται για αντιγόνα που έχουν ίδια χημική συμπεριφορά, είτε είναι ενωμένα με αντιγόνα, είτε όχι.

Αντίθετα, στις ομογενείς ανοσοχημικές μεθόδους τα ανοσοσύμπλοκα παραμένουν σε διαλυτή μορφή μέσα στο διάλυμα αντίδρασης (Εικ. 14β). Στις ομογενείς μεθόδους τα ενωμένα με αντισώματα αντιγόνα έχουν διαφορετική συμπεριφορά από τα μη-συνδεδεμένα. Έτσι, είναι δυνατή η μέτρησή τους, χωρίς να χρειάζεται να απομακρυνθούν τα μη-συνδεδεμένα. Αυτή η ιδιότητα των αντιγόνων στις ομογενείς μεθόδους τις καθιστά εύκολα αυτοματοποιήσιμες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να αυτοματοποιηθούν και οι ετερογενείς μέθοδοι.



Εικόνα 14 : Η σύνδεση αντιγόνων και αντισωμάτων σε ετερογενείς και ομογενείς μεθόδους. Κάθε αντίσωμα (συμβολίζεται ως Y λόγω του σχήματος του) μπορεί να ενωθεί με ένα ή δύο ίδια αντιγόνα σε εξειδικευμένες θέσεις που ονομάζονται Fab1,2 καθώς και με μία σταθερή επιφάνεια με την τρίτη κενή θέση που ονομάζεται Fc.

2.1.3 Ανταγωνιστικές και μη Ανταγωνιστικές μέθοδοι

Μία σημαντική διαφοροποίηση των ανοσοχημικών μεθόδων είναι αυτή μεταξύ ανταγωνιστικών και μη ανταγωνιστικών μεθόδων. Η επιλογή μεταξύ των δύο αυτών μεθοδολογιών μεθόδων έχει να κάνει με τον αριθμό των «επιτόπων» πάνω στο αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί. Οι επίτοποι είναι θέσεις πάνω στα αντιγόνα στις οποίες ενώνονται τα αντισώματα. Όταν το αντιγόνο έχει δύο επιτόπους μπορεί να συνδεθεί με δύο αντισώματα ίδια ή διαφορετικά. Αυτά τα αντιγόνα μπορεί να είναι ορμόνες π.χ. TSH, δείκτες καρκίνου π.χ. CEA, Ferr, TSH, PSA, αλλά και αντιγόνα των ιών HBV, HIV, HCV. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται μη ανταγωνιστική ή αλλιώς Sandwich. Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο ακινητοποιείται μεταξύ δύο αντισωμάτων. Το πρώτο αντίσωμα είναι σταθερά ενωμένο πάνω σε στερεή φάση και το δεύτερο φέρει τη σήμανση. Σε αυτή την περίπτωση το σήμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου και αυξάνεται, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του.

Αντίθετα, όταν το αντιγόνο έχει ένα μόνο επίτοπο, χρησιμοποιούνται οι ανταγωνιστικές μέθοδοι. Στις ανταγωνιστικές μεθόδους το αντιγόνο είναι σε έλλειψη και καταλαμβάνει ένα μέρος μόνο από τις διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο του ασθενούς ανταγωνίζεται άλλο αντιγόνο που φέρει σήμανση. Κατά συνέπεια το παραγόμενο σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου δηλαδή αυξάνεται, όσο μειώνεται το παραγόμενο σήμα.

Γενικά, οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για αντιγόνα μεγαλύτερου μοριακού βάρους από αυτά των ανταγωνιστικών μεθόδων, αφού οι τελευταίες χρησιμοποιούνται ακόμα και για τον προσδιορισμό απτενίων, που έχουν πολύ μικρό σχετικά μοριακό βάρος. Επιπλέον, είναι ταχύτερες και με πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία. Η υψηλή τους ευαισθησία οφείλεται και στην καμπύλη αναφοράς τους, η οποία συνήθως είναι ευθεία γραμμή σε αντίθεση με τις ανταγωνιστικές που συνήθως είναι σιγμοειδής.

2.1.4 Διαφορές των Ανοσοχημικών μεθόδων ανάλογα με τον Ιχνηθέτη

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ποικιλία, αφού υπάρχουν ετερογενείς (η γνωστή ELISA) αλλά και πολλές ομογενείς μέθοδοι (Εικ. 15). Όπως και οι υπόλοιπες ανοσοχημικές μέθοδοι διαιρούνται σε ανταγωνιστικές (Εικ. 16) μη-ανταγωνιστικές μεθόδους (Εικ. 17).

Υπάρχουν πολλών ειδών ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στις ανοσοχημικές τεχνικές. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και μόρια χημειοφωταύγειας.

✓ Όταν ο Ιχνηθέτης είναι Ένζυμο – οι Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

Από τους τρεις διαφορετικούς ιχνηθέτες, αυτοί που προκαλούν μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της μεθόδου είναι τα ένζυμα, αφού απαιτείται η αντίδρασή τους με το υπόστρωμα και ο σχετικός επιπλέον χρόνος επώασης. Παρ' όλα αυτά οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι οι πλέον διαδιδόμενες λόγω του εύκολου και ασφαλούς χειρισμού τους.

Τριών ειδών ένζυμα χρησιμοποιούνται στις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Και τα τρία καταλύουν χρωμογόνα και φθορίζοντα υποστρώματα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Τα κυριότερα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σε ανοσοενζυμικές μεθόδους ^[113]

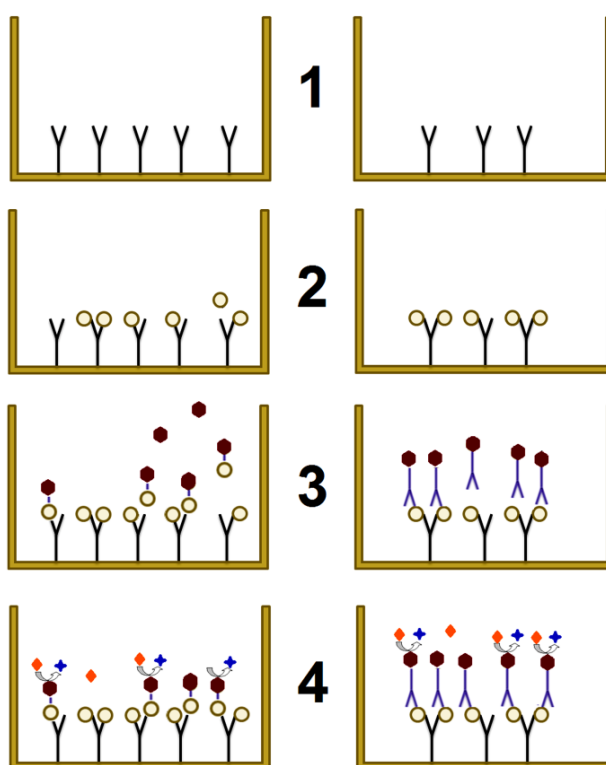
Ένζυμο → Υπεροξειδάση (HRP)	Είδος ενζύμου Οξειδάση	
Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)
2,2-άζινο δις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)	ABTS	415
3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη	TMB	450
Ορθο-φαινυλενοδιαμίνη	OPD	492
Φθορίζοντα υποστρώματα	Συντόμευση	
π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	HRPA	
3-(π-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ	HPPA	

→ Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	Υδρολάση	
Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)
π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405
Φθορίζοντα υποστρώματα	Συντόμευση	
4-μεθυλο φωσφορική ουμπελιφερόνη	MUP	

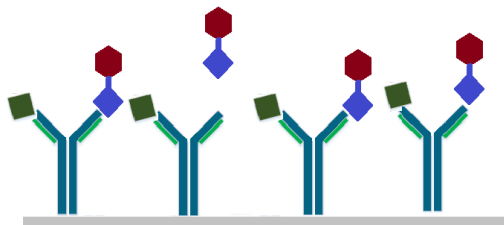
→ β-γαλακτοσιδάση (β-GAL)	Υδρολάση	
Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)
ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	oNPG	420
Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης	CPRG	571
Φθορίζοντα υποστρώματα	Συντόμευση	
4-μεθυλουμπελιφερολ-β-D γαλακτοπυρανοσίδη	MUG	

Τα χρωμογόνα υποστρώματα οδηγούν στη παραγωγή έγχρωμου διαφανούς διαλύματος, το οποίο μπορεί να απορροφήσει φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ό,τι ακριβώς γίνεται δηλαδή, και στις φωτομετρικές μεθόδους, όπου η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση βασίζεται στον γνωστό νόμο του Lambert-Beer: $A = \epsilon \times d \times C$. Η απορρόφηση του φωτός μετράται σε κατάλληλο φωτόμετρο που μετατρέπει την απορρόφηση σε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη καμπύλη αναφοράς.

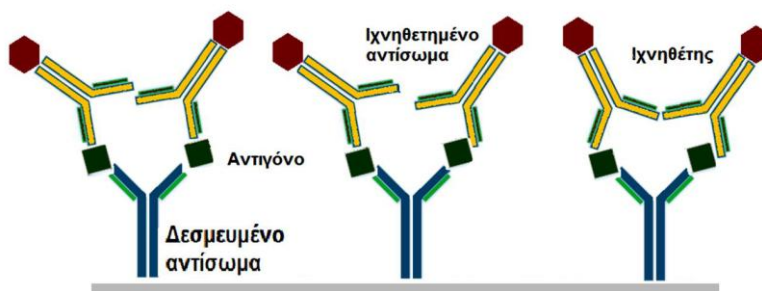
Αντίθετα, τα φθορίζοντα υποστρώματα παράγουν φθορισμό ύστερα από τη διέγερση τους με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η ένταση του φθορισμού μετατρέπεται σε συγκέντρωση, βάση καμπύλης αναφοράς, κατά κανόνα σε ειδικό αναλυτή. Γενικά, τα φθορίζοντα υποστρώματα αποτελούν τη βασική επιλογή στις αυτοματοποιημένες ανοσοενζυμικές μεθόδους.



Εικόνα 15: Τα τυπικά στάδια μιας μεθοδολογίας ELISA. Αριστερά φαίνεται μία ανταγωνιστική μεθοδολογία, όπου τα ακινητοποιημένα αντισώματα δέχονται τα αντιγόνα του δείγματος, καθώς και τα σημασμένα αντιγόνα με κατάλληλο ένζυμο. Δεξιά φαίνεται μία μη ανταγωνιστική μεθοδολογία, όπου τα αντιγόνα του ασθενούς καλύπτουν σχεδόν εξ'ολοκλήρου τα ακινητοποιημένα αντισώματα και δέχονται πάνω τους μία δεύτερη ομάδα σημασμένων αντισωμάτων με κατάλληλο ένζυμο. Και στις δύο περιπτώσεις το ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα και παράγει έγχρωμο σήμα.



Εικόνα 16: Η διάταξη αντισωμάτων και αντιγόνου στις ανταγωνιστικές μεθόδους. Το ελεύθερο αντιγόνο προέρχεται από τον ασθενή και δεσμεύει θέσεις σύνδεσης του σημασμένου αντιγόνου με κατάλληλο ιχνηθέτη.



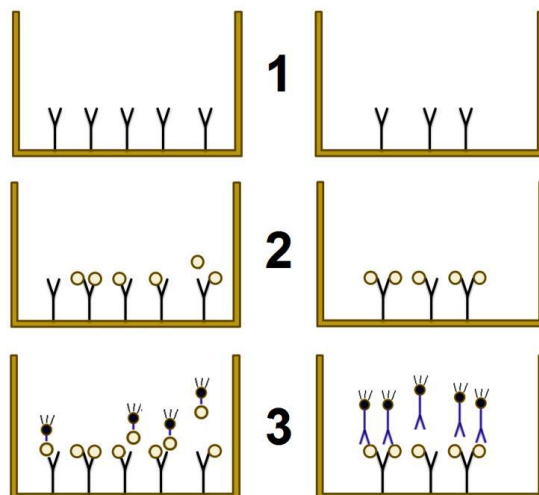
Εικόνα 17: Η διάταξη αντισωμάτων και αντιγόνου στις μη ανταγωνιστικές μεθόδους. Το ελεύθερο αντιγόνο ενώνεται με δύο αντισώματα εκ των οποίων το ένα (στις ετερογενείς μεθόδους) το ακινητοποιεί πάνω στη στερεή επιφάνεια και το δεύτερο φέρει τον ιχνηθέτη που θα παράγει το σήμα για τη μέτρηση.

✓ Όταν ο Ιχνηθέτης είναι Ραδιοϊσότοπο - οι Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι

Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA) (Εικ. 18) αποτελούν την παλαιότερη ανοσοχημική μέθοδο^[114]. Για την εφαρμογή τους έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορα ραδιοϊσότοπα, αλλά σήμερα αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το ¹²⁵I. Το ¹²⁵I έχει χρόνο ημίσειας ζωής 60 ημέρες, δηλαδή μέσα σε 60 ημέρες η ραδιενέργεια που εκπέμπει μειώνεται στο 50%. Αυτός ο χρόνος είναι ικανοποιητικός για διαγνωστική χρήση.

Σε αντίθεση με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους δεν είναι εύκολη η πλήρη αυτοματοποίηση τους, ενώ έχουν το μεγάλο πλεονέκτημα της πολύ υψηλής ευαισθησίας, της ικανοποιητικής ταχύτητας, του χαμηλού κόστους και της εύκολης σχετικά δημιουργίας των αντίστοιχων μεθόδων. Μειονέκτημα τους είναι η επικινδυνότητα των ραδιοισοτόπων.

Το σήμα που μετράται στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους είναι οι κρούσεις ανά λεπτό (cpm). Με την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς είναι δυνατή η μετατροπή των κρούσεων σε συγκέντρωση του αντιγόνου. Υπάρχουν ανταγωνιστικές (Εικ. 16, 18) και μη-ανταγωνιστικές ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (Εικ. 17, 18), όπου ανταγωνίζεται ή όχι το μετρούμενο αντιγόνο του ασθενούς (ψυχρό αντιγόνο), με το αντιγόνο του αντιδραστηρίου που περιέχει ραδιοϊσότοπο (θερμό αντιγόνο)^[115].



Εικόνα 18: Τα τρία βασικά στάδια στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους. Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (RIA), όπου το θερμό αντιγόνο (αυτό που φέρει το ραδιοϊσότοπο 125I) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς. Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (IRMA), όπου το ραδιοϊσότοπο είναι ενωμένο με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητο-ποιημένο αντίγόνο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.

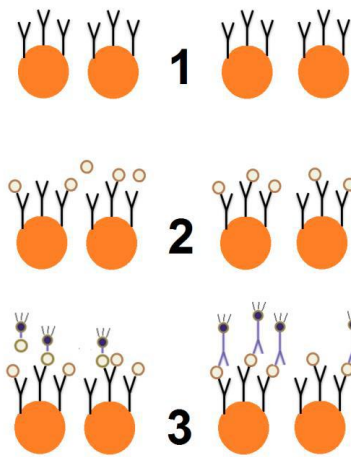
✓ Όταν ο Ιχνηθέτης είναι μόριο Φωταύγειας - η Χημειοφωταύγεια

Η χημειοφωταύγεια (CIA, ICMA) είναι το φυσικό φαινόμενο της παραγωγής φωτεινής ακτινοβολίας από μία εξώθερμη χημική αντίδραση (A+B). Η οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση παρέχει την ενέργεια σε προϊόν της, ώστε αυτό να διεγερθεί (C*). Καθώς αμέσως αποδιεγείρεται για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση (C), εκπέμπει χαρακτηριστική φωτεινή ακτινοβολία (hv). Η συνολική αντίδραση περιγράφεται απλο-ποιημένα από την εξίσωση: $A + B \rightarrow C^* \rightarrow C + hv$

Η απόδοση της αντίδρασης σε φωτεινή ακτινοβολία, δηλαδή ο αριθμός των φωτονίων ανά μόριο αντιδρώντος, εκφράζεται από τον «λόγο απόδοσης» που ισούνται με το κλάσμα: αριθμός εκπεμπόμενων φωτονίων / αριθμός μορίων A ή B. Η μέγιστη τιμή του λόγου είναι η μονάδα, προς την οποία πλησιάζει η εκπομπή του φωτός, που παράγει το έντομο της πυγολαμπίδας κατά την οξείδωση του μορίου της λουσιφερόλης. Στην εργαστηριακή πάντως τεχνολογία το σήμα της χημειοφωταύγειας ονομάζεται «σχετική μονάδα φωτός» (Relative Light Unit).

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα σήμερα μόρια παραγωγής φωταύγειας είναι οι κυκλικές υδραζίδες (λουμινόλη, ισολουμινόλη, αμινικά παράγωγα της ισολουμινόλης), οι εστέρες της ακριδίνης, τα διοξετάνια και τα άλατα του ρουθηνίου.

Η χημειοφωταύγεια αποτελεί τη νεώτερη ανοσοχημική μέθοδο και την πλέον αυτοματοποιημένη. Είναι ταχύτερη, προσεγγίζει την ευαισθησία των ραδιοανοσολογικών μεθόδων, αλλά παράλληλα είναι ασφαλέστερη από αυτές. Οι μέθοδοι της χημειοφωταύγειας έχουν όμως μεγάλο κόστος, δεδομένου ότι παρέχονται πλήρως αυτοματοποιημένες. Υπάρχουν ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι χημειοφωταύγειας (Εικ. 19).



Εικόνα 19: Τα τρία βασικά στάδια στις μεθόδους χημειοφωταύγειας. Το σχήμα αναπαριστάει μία άμεση ετερογενή μέθοδο, όπου τα αντισώματα είναι ακινητοποιημένα πάνω σε μεταλλικές μπίλιες. Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (CIA), όπου το σημασμένο αντιγόνο (φέρει εστέρα ακριδίνης) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς. Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (ICMA, όπου ο εστέρας ακριδίνης είναι ενωμένος με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητοποιημένο αντίγόνο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.

Πίνακας 8: Σύγκριση των τριών κατηγοριών ανοσοχημικών μεθόδων

Ανοσοχημικές μέθοδοι			
Παράμετροι απόδοσης	EIA - ELISA	RIA - IRMA	CIA, CLIA
Ευαισθησία	Πολύ καλή	Πολύ υψηλή	Υψηλή
Ακρίβεια	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
Σταθερότητα αντιδραστηρίου	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή
Τεχνικός εξοπλισμός	Φθορισμόμετρο Φωτόμετρο Γυμνό μάτι Αυτόματος αναλυτής	Μετρητής γ ή β ακτινοβολίας	Φωταυγείόμετρο Αυτόματος αναλυτής
Νομικές υποχρεώσεις	Όχι	Ναι	Όχι
Εξειδίκευση προσωπικού	Μέτρια	Υψηλή	Μέτρια
Χρόνος εξέτασης	*	**	*
Αυτοματισμός	Ναι	Ναι	Ναι

2.1.5 Οι Ετερογενείς Ανοσοχημικές μέθοδοι, η ELISA

Για να γίνουν κατανοητές οι ανοσοχημικές μέθοδοι θα περιγραφεί αναλυτικά η κυριότερη εκπρόσωπος αυτών η ELISA. Δεδομένου ότι η ELISA είναι ιδιαίτερα ασφαλής για την υγεία των χειριστών και δεν απαιτεί αυτόματο εξοπλισμό αποτελεί την καλύτερη επιλογή για τη διδασκαλία των ανοσοχημικών μεθόδων στο εργαστήριο κλινικής χημείας.

Στις ανοσοενζυμικές μεθόδους ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα HRP, ALP και β-GAL και τα υποστρώματα τους μπορεί να είναι χρωμογόνα ή φθορισμογόνα. Από αυτά, τα χρωμογόνα υποστρώματα

χρησιμοποιούνται τόσο σε αυτόματες, όσο και σε χειρονακτικές μεθόδους, ενώ αντίθετα τα φθορισμογόνα υποστρώματα χρησιμοποιούνται αποκλειστικά πλέον σε αυτόματους αναλυτές. Η επιλογή κάθε ενζύμου και υποστρώματος γίνεται με βάση την προσδοκώμενη ευαισθησία, επαναληψιμότητα, ταχύτητα αντίδρασης, τυχόν παρεμβολές στην αναλυτική μέθοδο κ.α.. Για παράδειγμα τα φθορισμογόνα υποστρώματα εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τα χρωμογόνα. Η υπεροξειδάση απαιτεί μικρότερη επώαση από τα άλλα δύο ένζυμα, ενώ η αλκαλική φωσφατάση και η β-γαλακτοσιδάση εξασφαλίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα, μετά από μεγάλο χρόνο επώασης.

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι μπορεί να είναι ανταγωνιστικές και μη-ανταγωνιστικές, ομογενείς ή ετερογενείς. Ειδικότερα εδώ θα αναφερθούμε στις ετερογενείς μεθόδους, σε αυτές δηλαδή που ένα από τα αντισώματα του αντιγόνου είναι κολλημένο πάνω σε στερεή επιφάνεια. Η προσκόλληση αυτή εξασφαλίζεται με τις παρακάτω μεθόδους^[116] :

1. Ένωση αντισώματος με πλαστική επιφάνεια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές και κυρίως υδρόφοβες δυνάμεις. Είναι η πιο συνηθισμένη περίπτωση, αφού χρησιμοποιείται στα «πηγαδάκια» των πλακών ELISA.
2. Ένωση αντισώματος με μαγνητικά σφαιρίδια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Χρησιμοποιείται σε αυτόματες μεθόδους χημειοφωταύγειας κ.α.
3. Ένωση αντισώματος με σφαιρίδια πολυακρυλαμίδης, κυτταρίνης, αγαρόζης. Γίνεται με χημικό δεσμό και χρησιμοποιείται σε αυτόματες μεθόδους.
4. Ένωση αντισώματος με γυάλινα σωληνάκια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, αλλά δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε αντιδραστήρια IVDs.

Η ένωση αντιγόνου–αντισώματος γίνεται εύκολα λόγω της χημικής συγγένειας των δύο μορίων. Αντίθετα, η ένωση ενζύμου–υποστρώματος απαιτεί συγκεκριμένες χημικές συζεύξεις, δηλαδή χημικές γέφυρες. Οι συζεύξεις αυτές άλλοτε εξασφαλίζουν απλά τη σταθερή ένωση ενζύμου και αντισώματος και άλλοτε ενισχύουν σημαντικά το παραγόμενο σήμα. Αυτές οι συζεύξεις γίνονται με^[117] :

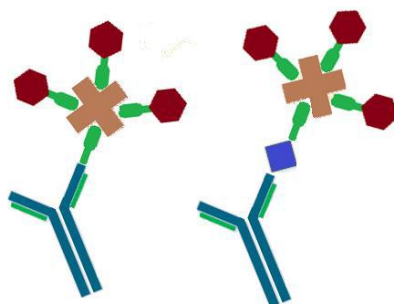
- Υπεριωδικό νάτριο: Χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη σύζευξη της υπεροξειδάσης με αντισώματα μέσω της υδατανθρακικής περιοχής του αντισώματος και της υπεροξειδάσης. Επειδή η υδατανθρακική περιοχή δεν συμμετέχει συνήθως στην ένωση ενζύμου και αντισώματος δεν επηρεάζεται η ενζυμική δραστηριότητα.
- Γλουταλδεύδη: Εξασφαλίζει τη διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και αντισώματος μέσω των ελεύθερων ε-αμινομάδων της λυσίνης.
- Σύμπλεγμα αβιδίνης–βιοτίνης και στρεπταβιδίνης–βιοτίνης.

Η βιοτίνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη (MB = 244D) που ανήκει στη κατηγορία των βιταμινών (βιταμίνες H, B7). Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο

σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Η βιοτίνη μπορεί να ενωθεί με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων ένζυμα και αντισώματα, δημιουργώντας μεταξύ τους μία γέφυρα ανάμεσα στο ένζυμο και το αντίσωμα. Λόγω μεγέθους όμως, μπορεί να ενωθεί είτε με το ένα, είτε με το άλλο. Για να επιτελέσει επομένως τον ρόλο της χρειάζεται ένα ακόμα ενδιάμεσο μόριο. Αυτό μπορεί να είναι είτε η αβιδίνη, είτε η στρεπταβιδίνη.

Η αβιδίνη είναι ένα μόριο με 4 ενεργά κέντρα (MB περίπου 65000D) με τα οποία μπορεί να αντιδράσει με τη βιοτίνη, αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες με μη-ειδικό τρόπο (Εικ. 20). Βρίσκεται σε πολλά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Στην εργαστηριακή τεχνολογία χρησιμοποιείται για την ένωσή της με το μόριο της βιοτίνης, όχι όμως με τόσο ισχυρή χημική συγγένεια, όπως συμβαίνει με το μόριο της στρεπταβιδίνης. Πλεονεκτεί από τη στρεπταβιδίνη στο ότι παράγεται εύκολα από αυγά κότας.

Η στρεπταβιδίνη παρόμοια με την αβιδίνη είναι ένα τετραμερές μόριο μοριακού βάρους 60.000D. Σε αντίθεση με την αβιδίνη επιτυγχάνει ειδική σύνδεση με τη βιοτίνη λόγω της διαφορετικής αμινοξικής της ακολουθίας. Η παραγωγή της όμως, είναι δυσκολότερη και μεγαλύτερου κόστους, αφού προέρχεται από τον *Streptomyces avidinii*.



Εικόνα 20: Αναπαράσταση της ένωσης των συμπλεγμάτων βιοτίνης–αβιδίνης και βιοτίνης–στρεπταβιδίνης. Τα δύο αυτά συμπλέγματα έχουν τη δυνατότητα να ενώνονται με πολλά ένζυμα αυξάνοντας έτσι σημαντικά το παραγόμενο σήμα.

2.1.6 Υλικά και Εξοπλισμός που δεν παρέχονται με τα kits

Το εργαστήριο που εκτελεί μεθόδους ELISA χρειάζεται εξοπλισμό αναλωσίμων και ηλεκτρονικών συσκευών (Πίνακας 9). Σήμερα στην αγορά κυκλοφορούν αυτόματοι αναλυτές ELISA, που μπορούν να εξυπηρετήσουν ταυτόχρονα από δύο έως πολύ περισσότερες πλάκες ELISA (Εικ. 21). Μπορούν να πραγματοποιήσουν όλα τα στάδια, όπως προαραίωση δειγμάτων, τοποθέτηση δειγμάτων και αντιδραστηρίων, πλυσίματα, φωτομέτρηση και αυτόματο υπολογισμό των συγκεντρώσεων. Απευθύνονται όμως σε εργαστήρια που έχουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων.



Εικόνα 21: Αυτόματοι αναλυτές ELISA διαφόρων εταιρειών (Human, Menarini, Biobase). Κάθε αναλυτής μπορεί να τρέχει τουλάχιστον δύο πλάκες ELISA ταυτόχρονα.

Η ELISA είναι μία μέθοδος που με λίγα σχετικά όργανα μπορεί να «τρέξει» σε μικρό διαγνωστικό εργαστήριο, ερευνητικό ίδρυμα, ακόμα και σε εκπαιδευτικό.

Πίνακας 9: Βασικός και προαιρετικός εξοπλισμός για την εκτέλεση της μεθόδου ELISA.

Απαραίτητα όργανα	Προαιρετικά όργανα
Μονή πιπέττα ενός ή ρυθμιζόμενου όγκου	Αυτόματη πλυστική συσκευή
Διηθητικό χαρτί για το τίναγμα των πλακών ELISA	Πιπέττα 8 ή 12 καναλιών
Φωτόμετρο ELISA	Θάλαμο υγρασίας (όπου χρειάζεται) Πλαστικό κάλυμμα για την αποφυγή εξάτμισης (όπου χρειάζεται)

Η ELISA δύο σταδίων, σε αντίθεση με την ταχύτερη ELISA ενός σταδίου, περιλαμβάνει στάδια επώασης και πλύσης πριν την τοποθέτηση του συνδέτη. Αυτό εξασφαλίζει την απομάκρυνση ουσιών, που μπορεί να προκαλέσουν παρεμβολές στις ανοσοχημικές μεθόδους. Το μειονέκτημα της είναι ότι απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο επώασης από την ELISA ενός σταδίου και για αυτό επιλέγεται όπου πραγματικά χρειάζεται καλό πλύσιμο και διαχωρισμός ουσιών.

2.1.7 Η κατασκευή της Καμπύλης Αναφοράς

Ανεξάρτητα από το αν το εργαστήριο θα «τρέξει» διπλά δείγματα ελέγχου ή ασθενών, οι βαθμονομητές «μπαίνουν» πάντα δύο φορές. Κατά συνέπεια, οι τιμές απορρόφησης που χρησιμοποιούνται στη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς είναι οι μέσες τιμές των δύο απορροφήσεων κάθε βαθμονομητή. Ο λόγος που «τρέχουν» διπλοί βαθμονομητές είναι για να μπορεί να ελεγχθεί η εγκυρότητα τους. Έτσι δεν θα πρέπει οι δύο τιμές να διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Το μέτρο της διαφοράς τους είναι ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) ο οποίος δεν πρέπει να υπερβεί ένα συγκεκριμένο ποσοστό π.χ. 10%. Εάν οι απορροφήσεις ενός βαθμονομητή

διαφέρουν πάνω από 10%, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί η απορρόφηση που είναι φανερό ότι δεν ταιριάζει με τις γειτονικές της. Η δυνατότητα αυτή υπάρχει σε όλα τα φωτόμετρα ELISA, πολύ δε περισσότερο αν χρησιμοποιηθεί λογιστικό φύλλο.

Στην περίπτωση που η καμπύλη αναφοράς έχει σχεδιαστεί σε λογιστικό φύλλο (Excel) χαρακτηρίζεται ως πολυωνυμική. Η εξίσωση βαθμονόμησης έχει υπολογιστεί αυτόματα και φαίνεται πάνω στο σχήμα της καμπύλης μαζί με τον συντελεστή συσχέτισης R^2 . Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 δείχνει τη συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών, της συγκέντρωσης και της απορρόφησης. Τιμές R^2 κοντά στη μονάδα ($R^2 \approx 1$) θεωρούνται ικανοποιητικές.

Οι πολυωνυμική εξίσωση επιλύεται όμως δύσκολα. Για τον λόγο αυτό προτιμάται η μετατροπή της σε γραμμική. Η μετατροπή γίνεται με τη λογαριθμοποίηση (δεκαδικός λογάριθμος) των συγκεντρώσεων. Η γραμμική εξίσωση είναι απλούστερη εξίσωση, στην οποία η συγκέντρωση υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$y = ax + b$$

2.1.8 Η αξιολόγηση των Τιμών Απορρόφησης

Οι τιμές απορρόφησης αξιολογούνται, με βάση τους παρακάτω κανόνες:

- ✓ Καμιά τιμή συγκέντρωσης ασθενούς δεν μπορεί να δοθεί, εάν οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου δεν βρίσκονται μέσα στα προβλεπόμενα όρια. Μειονέκτημα των αναλύσεων ELISA είναι ότι τα δείγματα ελέγχου «τρέχουν» μαζί μ'εκείνα των ασθενών και σε περίπτωση αστοχίας τους δεν υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν επιδιορθωτικές ενέργειες, πριν «τρέξουν» τα δείγματα.
- ✓ Δεν πρέπει οι τιμές των δύο απορροφήσεων να έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους, δηλαδή μεγάλη διασπορά. Συνήθως οι κατασκευαστές των kit αναφέρουν μέχρι πόσο επιτρέπεται να είναι αυτή η διαφορά π.χ. ο συντελεστής μεταβλητότητας των δύο τιμών να μην υπερβαίνει το 10%. Φυσικά για να γίνει αυτός ο έλεγχος θα πρέπει τα δείγματα να «μπαίνουν» διπλά. Αν αυτό γίνεται μόνο για τους βαθμολογητές, ο έλεγχος περιορίζεται σε αυτούς. Εάν οι απορροφήσεις ενός βαθμονομητή διαφέρουν υπερβολικά μεταξύ τους, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί η απορρόφηση που είναι φανερό ότι δεν ταιριάζει με τις γειτονικές της και η καμπύλη να ξανα-υπολογιστεί. Εάν αυτό όμως συμβεί σε δείγματα ελέγχου και ασθενών, τότε θα πρέπει να αξιολογηθεί η διαφορά με γνώμονα την κλινική σημασία του αποτελέσματος.
- ✓ Κάθε μεθοδολογία ELISA έχει ένα συγκεκριμένο εύρος μέτρησης, που ξεκινά από την τιμή ποσοτικοποίησης και φτάνει μέχρι το όριο γραμμικότητας. Τιμές συγκέντρωσης μικρότερες από την τιμή ποσοτικοποίησης δίνονται απλά μικρότερες από αυτήν και τιμές συγκέντρωσης μεγαλύτερες από το όριο γραμμικότητας δεν δίνονται καθόλου. Στη τελευταία περίπτωση γίνεται αραιώση του δείγματος και

νέα μέτρηση. Το τελικό αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί τον συντελεστή αραίωσης.

- ✓ Τιμές απορρόφησης μικρότερες από το όριο ποσοτικοποίησης ή μεγαλύτερες από το όριο γραμμικότητας δεν χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων των ασθενών. Όταν η συγκέντρωση ενός δείγματος υπολογίζεται μεγαλύτερη από το όριο γραμμικότητας, τότε θα πρέπει το δείγμα αυτό να αραιωθεί και να γίνει νέος προσδιορισμός.

Σύμφωνα με τα παραπάνω πριν την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να γίνει αξιολόγηση των απορροφήσεων για το αν η καμπύλη αναφοράς είναι έγκυρη. Φαίνεται λοιπόν, ότι η διασπορά των απορροφήσεων είναι αποδεκτή ($CV < 10\%$) αλλά και ότι μειώνονται με προβλεπόμενο τρόπο από την αρχική τους μέγιστη τιμή. Κατά συνέπεια, η ανάλυση μπορεί να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο, δηλαδή στον σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς και στον υπολογισμό της εξίσωσης αναφοράς.

Οι γραμμικές καμπύλες αναφοράς έχουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τις μη γραμμικές, αφού μετατρέπουν το παραγόμενο σήμα του ιχνηθέτη σε συγκέντρωση με αναλογικό τρόπο. Αυτός άλλωστε είναι ο λόγος που μετατρέπεται η πολυωνυμική καμπύλη σε γραμμική.

2.1.9 Άλλοι τρόποι υπολογισμού των Εξισώσεων Αναφοράς

Η εξίσωση βαθμονόμησης που παρουσιάστηκε είναι εξίσωση παλινδρόμησης ^[118]. Δεν αποτελεί όμως τον μοναδικό τρόπο υπολογισμού τους.

Ένας άλλος τρόπος που προσφέρεται στα φωτόμετρα ELISA είναι η μέθοδος «σημείο προς σημείο» (point to point). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο τα σημεία της καμπύλης αναφοράς ενώνονται μεταξύ τους με ευθύγραμμα τμήματα κάθε ένα από τα οποία ορίζεται με τη δική του εξίσωση της μορφής $y = ax + \beta$. Το φωτόμετρο ανάλογα με την απορρόφηση κάθε δείγματος επιλέγει την κατάλληλη εξίσωση $y = ax + \beta$. Προφανώς η μαθηματική αυτή μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις γραμμικές καμπύλες αναφοράς οι οποίες, ούτως ή άλλως, ορίζονται από μία εξίσωση $y = ax + \beta$.

Πολύ καλύτερες επιλογές από τις εξισώσεις regression και point to point είναι οι καμπύλες spline. Η επιλογή spline υπάρχει σε πολλά φωτόμετρα ELISA και πλεονεκτεί στο ότι με τη βοήθεια συνδυασμού εξισώσεων η καμπύλη αναφοράς περνά από τη συντομότερη απόσταση μεταξύ των σημείων των βαθμονομητών. Η μέθοδος spline μπορεί να εφαρμοστεί και σε γραμμικές και σε μη-γραμμικές καμπύλες αναφοράς.

Η κατασκευή των καμπύλων αναφοράς έχει σημαντικό οικονομικό κόστος, λόγω των πολλών βαθμονομητών και αναλύσεων που απαιτούνται στις περισσότερες ανοσοχημικές μεθόδους. Επιπλέον, οι πολλές αναλύσεις που απαιτούν, αυξάνουν την πιθανότητα σφάλματος που σημαίνει νέα καθυστέρηση και κόστος. Για τον λόγο

αυτό, πολλοί αυτόματοι ανοσοχημικοί αναλυτές επιλέγουν να ενωματούσουν μέσα στα λογισμικά τους τα αριθμητικά δεδομένα μιας πλήρους καμπύλης (master curve), έτσι ώστε κάθε φορά ο χρήστης του αναλυτή να χρειάζεται μόνο να την προσαρμόζει στις ιδιαιτερότητες της ανάλυσης. Έτσι, αντί της κατασκευής πολύπλοκων σιγμοειδών καμπυλών μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο δύο βαθμονομητές, όπως γίνεται στις γραμμικές καμπύλες αναφοράς. Από τους δύο βαθμονομητές θα παραχθεί ένας μαθηματικός συντελεστής με τον οποίο θα πολλαπλασιάζεται το παραγόμενο σήμα κάθε δείγματος ασθενούς για να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του.

2.1.10 Στοιχεία για τις άλλες Ανοσοχημικές μεθόδους

Οι υπόλοιπες ανοσοχημικές μέθοδοι, ραδιοανοσοενζυμικές, χημειοφωταύγειας, ετερογενείς και ομογενείς, αν και έχουν σημαντικές διαφορές από την ELISA, αυτές περιορίζονται στο αναλυτικό στάδιο. Αντίθετα, η δημιουργία των καμπυλών αναφοράς έχει σημαντικές ομοιότητες. Ο ένας άξονας είναι πάντα οι τιμές της συγκέντρωσης των βαθμονομητών και ο άλλος οι τιμές του σήματος (Abs, RLU, cpm). Σε όλες τις ανταγωνιστικές μεθόδους η καμπύλη βαθμονόμησης αυξάνεται σε σχέση με την τιμή του σήματος και σε όλες τις μη ανταγωνιστικές μεθόδους η καμπύλη μειώνεται. Μέθοδοι όπως regression, point-to-point και spline χρησιμοποιούνται εξίσου.

2.1.11 Παράγοντες που επηρεάζουν τις Ανοσοχημικές αναλύσεις

Είναι πολλοί οι παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν στις ανοσοχημικές αναλύσεις και να δώσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Άλλοι παράγοντες οφείλονται σε τεχνικά προβλήματα της ανάλυσης (Πίνακας 10) και άλλες φορές σε προβλήματα που σχετίζονται με τη συμπεριφορά των αντισωμάτων των αντιδραστηρίων^[119].

✓ Το φαινόμενο του Αγκίστρου

Το φαινόμενο του αγκίστρου (hook effect) εμφανίζεται σε δείγματα πολύ υψηλής συγκέντρωσης τα οποία ψευδώς φαίνονται με μηδενική συγκέντρωση. Σε αυτή τη περίπτωση, το αντιγόνο είναι σε τόσο υψηλή συγκέντρωση, που ο όγκος του δημιουργεί παρεμβολές στη σύνδεση γειτονικών αντιγόνων με τα αντισώματα της αντίδρασης. Η αντιμετώπιση του προβλήματος έγκειται στη προ-αραίωση του δείγματος από τον αναλυτή, αλλά και στη γνώση του ιατρικού ιστορικού του ασθενούς. Εάν ο αναλυτής δεν μπορεί να λύσει το πρόβλημα με προ-αραίωση, τότε από τη γνώση του ιατρικού ιστορικού θα πρέπει να εντοπιστεί έγκαιρα το πρόβλημα και να γίνει προ-αραίωση χειρονακτικά από τον χρήστη του αναλυτή.

✓ Τα Ετερόφιλα Αντισώματα

Πρόκειται για αντισώματα που αναπτύσσονται στον ορό ορισμένων ανθρώπων έναντι των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται στις ανοσοχημικές τεχνικές. Τα αντισώματα αυτά παράγονται από τον εμβολιασμό ζώων με ανθρώπινα αντιγόνα. Συνήθως τα ετερόφιλα αντισώματα εμφανίζονται στον ορό ατόμων, που πάσχουν

από κάποια φλεγμονή και το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι εξαιρετικά διεγερμένο. Η σύνδεση των ετερόφιλων αντισωμάτων με τα αντισώματα του αντιδραστηρίου δεσμεύει τα τελευταία, οπότε δεν αντιδρά ο ιχνηθέτης και το αποτέλεσμα βγαίνει αρνητικό.

✓ **Τα Αυτοαντισώματα**

Μια πολύ σπάνια περίπτωση αναφέρεται σε ανθρώπινα αντισώματα, που δεσμεύουν τα αντιγόνα του ανθρώπου που θέλουμε να μετρήσουμε. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται αυτοαντισώματα και σε αυτά περιλαμβάνεται π.χ. η παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων anti-TG. Τα αντισώματα αυτά συνδέονται με τη θυρεοσφαιρίνη του ασθενούς (TG) με αποτέλεσμα αυτή να μην μπορεί να ενωθεί με τα αντισώματα του αντιδραστηρίου.

✓ **Τα Θεραπευτικά Αντισώματα**

Σήμερα όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται αντισώματα σε θεραπείες, κυρίως του καρκίνου. Το αποτέλεσμα είναι να αναπτύσσουν ορισμένα άτομα αντισώματα έναντι των ποντικών (HAMA) από τα οποία παράγονται κυρίως τα μονοκλωνικά θεραπευτικά αντισώματα. Τα αντισώματα HAMA μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

✓ **Άλλοι ανοσολογικοί παράγοντες που παρεμβαίνουν στις μετρήσεις**

Εκτός από τις προηγούμενες ισχυρές ανοσολογικές παρεμβολές μπορούν να επιδράσουν και άλλες, έστω και με λιγότερο φανερά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι ρευματοειδείς παράγοντες (RF) μπορεί να επιδράσουν με το τμήμα Fc των αντισωμάτων που περιέχονται στα αντιδραστήρια των ανοσοχημικών μεθόδων, εμποδίζοντας έτσι τη σύνδεση του αντιγόνου. Παρόμοιες παρεμβολές μπορούν να κάνουν και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος προς αντισώματα κονίκλου, που χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια.

Πίνακας 10: Συνηθισμένα τεχνικά προβλήματα, αιτίες και λύσεις τους σε μεθόδους ELISA.

Προβλήματα	Αίτια	Πιθανές λύσεις
Χωρίς σήμα / Μη εμφάνιση χρώματος	• Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε λάθος σειρά ή κάποιο στάδιο δοκιμασίας παραλήφτηκε	→ Ελέγξτε το φύλλο οδηγιών και επαναλάβετε τη δοκιμασία
	• Δεν αραιώθηκαν τα δείγματα με τον κατάλληλο διαλύτη (εφόσον απαιτείται)	→ Ελέγξτε την αραιώση των δειγμάτων πριν την έναρξη της τεχνικής
	• Δεν παρασκευάστηκε σωστά ή δεν είχε αποθηκευτεί σωστά το αντιδραστήριο του συνδέτη (conjugate)	→ Όλα τα προϊόντα σύζευξης περιέχονται σε κάθε kit κάθε παρτίδας. Εάν απαιτείται η αραιώση του αρχικού διαλύματος, πρέπει συμπύκνωμα και διαλύτης να αναμιγνύονται σε σωστές ποσότητες
	• Προσθήκη μη επαρκούς ποσότητας αντισώματος ή παράληψη της προσθήκης του	→ Έλεγχος προσθήκης σωστής ποσότητας αντισώματος
	• Παράληψη προσθήκης διαλύματος υποστρώματος	→ Έλεγχος προσθήκης διαλύματος υποστρώματος κατάλληλης συγκέντρωσης
• Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης περιέχει αζωτούχο νάτριο	→ Παρασκευή φρέσκου διαλύματος έκπλυσης	
Χαμηλής έντασης σήμα	• Η θερμοκρασία του εργαστηρίου είναι πολύ χαμηλή	→ Η θερμοκρασία του δωματίου πρέπει να είναι 18 - 25°C. Αποφύγετε να εκτελείτε την τεχνική κάτω από αεραγωγούς κλιματισμού ή κοντά σε παράθυρα
	• Μη σωστή παρασκευή του διαλύματος έκπλυσης (wash)	→ Παρασκευάστε φρέσκο διάλυμα έκπλυσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του Kit
	• Χρησιμοποιήθηκε χρόνος επώασεων μικρότερος από το αναμενόμενο	→ Ακολουθείτε τους χρόνους επώασεων, που προτείνει ο κατασκευαστής
	• Τα αντιδραστήρια ήταν σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία	→ Βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια είναι σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση
	• Τα αντιδραστήρια έχουν λήξει	→ Βεβαιωθείτε για την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων, που αναγράφεται στη συσκευασία, τόσο με ανοιχτή, όσο και κλειστή συσκευασία
	• Το φωτόμετρο ή άλλη αυτόματη συσκευή ήταν ρυθμισμένη σε λάθος μήκος κύματος ή δεν είχε βαθμονομηθεί σωστά	→ Έλεγχος μήκους κύματος και βαθμονόμηση εκ νέου της συσκευής
	• Ανεπαρκής ποσότητα αντιγόνου ασθενούς	→ Χρήση της σωστής ποσότητας αντιγόνου, όπως προτείνει ο κατασκευαστής.
	• Ανεπαρκής ποσότητα αντισώματος	→ Χρήση της σωστής ποσότητας αντισώματος, όπως προτείνει ο κατασκευαστής
	• Το αντιδραστήριο του υποστρώματος ήταν πολύ αραιό	→ Χρησιμοποιήστε υψηλότερη συγκέντρωση αντιδραστηρίου ανίχνευσης

**Υψηλής
έντασης
υπόβαθρο
(high
background)**

- Χρησιμοποιήθηκε νερό κακής ποιότητας κατά την παρασκευή του διαλύματος πλύσης → Ελέγξτε την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται
- Το διάλυμα υποστρώματος έχει αλλοιωθεί → Βεβαιωθείτε ότι το υπόστρωμα είναι άχρωμο, πριν από την προσθήκη στην πλάκα
- Ανεπαρκές πλύσιμο ή κακή απόδοση πλύσης → Αυξήστε τον αριθμό των εκπλύσεων. Βεβαιωθείτε ότι παρέχονται τουλάχιστον 400 μL του διαλύματος εκπλύσης σε κάθε κυψελίδα ανά πλύση
- Μικροβιακή μόλυνση του συστήματος ύδρευσης → Απομακρύνετε τη μικροβιακή μόλυνση με έκπλυση του συστήματος με αραιό διάλυμα χλωρίνης (10% κατ' όγκο) που ακολουθείται από μεγάλη ποσότητα απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού.
- Η συσκευή ανάγνωσης των αποτελεσμάτων ήταν ρυθμισμένη σε λάθος μήκος κύματος ή δεν είχε βαθμονομηθεί σωστά → Ελέγξτε το μήκος κύματος του φωτομέτρου. Βαθμονομήστε σωστά το φωτόμετρο
- Η θερμοκρασία του εργαστηρίου ήταν πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή → Η αντίδραση γίνεται συνήθως θερμοκρασία δωματίου 18 - 25°C. Αποφύγετε την εργασία κάτω από αεραγωγούς κλιματισμού ή κοντά σε παράθυρα
- Τα αντιδραστήρια περιείχαν προσμίξεις ή δεν παρασκευάστηκαν σωστά → Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιήθηκαν τα σωστά αντιδραστήρια, και ότι δεν έχει γίνει επιμόλυνση
- Τα πηγαδάκια της πλάκας ήταν μολυσμένα → Χρησιμοποιήστε πολυκάναλες πιπέτες χωρίς να αγγίξετε την πλάκα

**Ανάπτυξη
χρώματος με
αργό ρυθμό**

- Οι πλάκες δεν είναι στη σωστή θερμοκρασία → Εξασφαλίστε ότι οι πλάκες και τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση
- Το ανοσοσύμπλεγμα είναι αδύναμο → Η παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος πρέπει να γίνεται αμέσως πριν από τη χρήση. Βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια δεν έχουν λήξει, έχουν αποθηκευτεί σωστά, και χρησιμοποιούνται στη σωστή συγκέντρωση
- Τα διαλύματα των αντιδραστηρίων έχουν επιμολυνθεί → Παρουσία προσμείξεων, όπως αζίδιο του νατρίου και το υπεροξείδιο μπορεί να επηρεάσουν την αντίδραση υποστρώματος. Αποφύγετε τη χρήση αντιδραστηρίων που περιέχουν αυτά τα συντηρητικά

3. Πειραματική Διαδικασία

3.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.1.1 Επιλογή πληθυσμού

Ο χώρος που έλαβε χώρα η πειραματική διαδικασία ήταν το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα». Όλοι οι ασθενείς που επισκέφθηκαν την κλινική τη χρονική περίοδο από το Σεπτέμβριο του 2016 έως τον Ιούλιο του 2017, συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη, ανεξάρτητα από το εύρος ηλικίας (26 - 48 ετών), αιτία υπογονιμότητας (γυναικείου ή ανδρικού παράγοντα), πρωτόκολλο διέγερσης ωοθηκών που χρησιμοποιήθηκε (GnRH αγωνιστή ή ανταγωνιστή) ή το αποτέλεσμα της IVF ή ICSI. Επιπλέον, λήφθηκαν υπόψιν μόνο κύκλοι στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν «φρέσκα» έμβρυα και όχι εκείνα που υπέστησαν διαδικασία κατάψυξης/ξεπαγώματος.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η εμβρυομεταφορά πραγματοποιήθηκε την 3^η ημέρα ανάπτυξης των εμβρύων (στάδιο αυλάκωσης).

3.1.2 Προετοιμασία και κριτήρια επιλογής δειγμάτων

Αμέσως μετά τη διαδικασία γονιμοποίησης (στάδιο προπυρήνων, 1^η ημέρα), τα έμβρυα τοποθετούνταν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο σε μικροσταγόνες συνολικού όγκου 50μl κάτω από την επιφάνεια ελαίου, στους 37° C σε κλίβανο με την απαιτούμενη υγρασία και περιεκτικότητα CO₂ 5%.

Τα έμβρυα κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες (Grade **I – IV**) με βάση το σχήμα των βλαστομεριδίων και την έλλειψη/παρουσία θρυμματισμού:

Κατηγορία εμβρύου	Περιγραφή
Grade I	Ομοιομορφία βλαστομεριδίων, κανονικό σχήμα (σφαιρικό ή ελλειψοειδές), απουσία θρυμματισμού
Grade II	Ομοιομορφία βλαστομεριδίων, μικρό ποσοστό θρυμματισμού (>10% – ≤20%)
Grade III	Ανισομεγέθη βλαστομερίδια, μέτριο ποσοστό θρυμματισμού (>20% – ≤50%)
Grade IV	Ανισομεγέθη και κατεστραμμένα βλαστομερίδια ή βλαστομερίδια με ανώμαλο σχήμα, πολλαπλούς πυρήνες, έντονος θρυμματισμός (>50%)

Ιδανικά έμβρυα για εμβρυομεταφορά στις 48 ώρες μετά την ωοληψία θεωρούνται τα έμβρυα με 4 κύτταρα Κατηγορίας **I – II**. Αντίστοιχα στις 72 ώρες μετά την ωοληψία, ιδανικά θεωρούνται τα έμβρυα 8 κυττάρων κατηγορίας **I – II**. Τα αργοπορούντα έμβρυα όπως και εκείνα με πολύ μεγάλο ποσοστό θρυμματισμού έχουν μειωμένες πιθανότητες επιτυχίας κύησης και κατά συνέπεια δεν επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος.

3.1.3 Στάδια και μέσο καλλιέργειας

Το μέσο καλλιέργειας είναι της εταιρείας “Cook Medical” και περιλαμβάνει τα εξής στάδια^[120] :

Μέσο καλλιέργειας για γονιμοποίηση: SYDNEY IVF FERTILIZATION MEDIUM

Αρχικά γίνεται ξέπλυμα του συμπλέγματος ωοκυττάρου/κοκκωδών κυττάρων. Έπειτα το ωοκύτταρο τοποθετείται στο Sydney IVF Fertilization Medium, όπου λαμβάνει χώρα η σπερματέγχυση. Το ωοκύτταρο μπορεί να παραμείνει σε αυτό το μέσο για 16 - 18 ώρες. Τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα ελέγχονται για προπυρήνες και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μέσο Sydney IVF Cleavage Medium. Αυτό είναι το 1^ο βήμα στο διαδοχικό σύστημα Cook Medical.

Μέσο καλλιέργειας για αυλάκωση του εμβρύου: SYDNEY IVF CLEAVAGE MEDIUM

Μετά την αναγνώριση των ωοκυττάρων που έχουν γονιμοποιηθεί επιτυχώς, μεταφέρονται σε μέσο Sydney IVF Cleavage Medium για καλλιέργεια από την ημέρα 1 έως την ημέρα 3 (έως το στάδιο των 8 κυττάρων). Το μέσο αυτό είναι σχεδιασμένο για να παρέχει στα πρώιμα έμβρυα τα απαραίτητα μεταβολικά υποστρώματα για την ανάπτυξή τους. Αυτό είναι το 2^ο βήμα στο διαδοχικό σύστημα Cook Medical. Στο μέσο αυτό μπορεί να εκτελεστεί και ICSI, επειδή η γλυκόζη που περιέχει, υποστηρίζει τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων καθώς και το μεταβολισμό των κοκκωδών κυττάρων.

Μέσο καλλιέργειας για υποστήριξη βλαστοκύστης: SYDNEY IVF BLASTOCYST MEDIUM

Μόλις το έμβρυο φτάσει στην 3^η μέρα (στάδιο 8 κυττάρων), μεταφέρεται σε μέσο Sydney IVF Blastocyst Medium, το οποίο είναι μεταβολικά εξισορροπημένο για να υποστηρίζει την ανάπτυξη βλαστοκύστεων. Αυτό είναι το 3^ο και τελευταίο βήμα του διαδοχικού συστήματος Cook Medical (Cook Medical sequential system).

3.1.4 Συλλογή καλλιεργητικού μέσου εμβρύων

Πραγματοποιήθηκε συλλογή της συνολικής ποσότητας του εναπομείναν καλλιεργητικού μέσου από κάθε έμβρυο, τόσο από την 2^η ημέρα ανάπτυξης, όσο και από την 3^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά. Αμέσως μετά τη λήψη του δείγματος, αυτό καταψυχόταν στους -80^ο C.

Προς χάριν ανίχνευσης της παρουσίας ωκυτοκίνης, δημιουργήθηκε ένα pool 20 εμβρύων, αποτελούμενο από 5 δείγματα ποιότητας **I**, 4 δείγματα ποιότητας **II** και 1 δείγμα ποιότητας **III**, με σκοπό να επιτευχθεί το όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης μεθόδου (kit) ELISA: εύρος 15.6 - 1,000 pg/ml.

3.2 Προσδιορισμός ωκυτοκίνης

3.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού (kit)

Η μέθοδος προσδιορισμού (kit) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της ωκυτοκίνης, παρουσιάζεται στη συνέχεια:

ENZO, Oxytocin ELISA kit, Cat.No: ADI-900-153A, 96 Well Kit

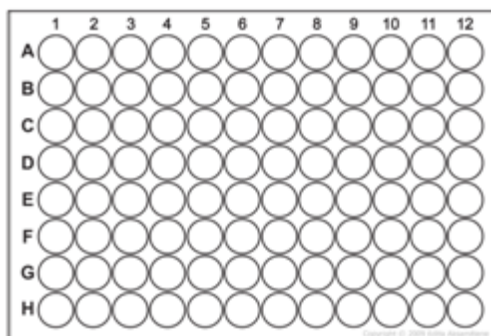
Το **Oxytocin EIA kit** είναι ένα χρωμομετρικό kit ανοσοπροσδιορισμού ενζυμικού ανταγωνισμού, με αποτελέσματα από βραδίες (overnight) + 1 ώρα. Η απορρόφηση μετράται στα 405nm. Η πολύ χαμηλή αντιδραστικότητα με τη βασσοπρεσίνη (vasopressin) παρέχει αξιοπιστία στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην ποσοτικοποίηση: 15 µg/ml ωκυτοκίνης. Επίσης, τα έτοιμα προς χρήση αντιδραστήρια σε υγρή μορφή, με κωδικούς διαφορετικού χρώματος, μειώνουν τα λάθη που θα μπορούσαν να προκύψουν στο εργαστήριο^[121].

3.2.1.α Προδιαγραφές προϊόντος

- ✓ **Ευαισθησία:**
15pg/ml (εύρος 15.6 - 1,000 pg/ml)
- ✓ **Χρόνος διαδικασίας:**
Από βραδίες + 1 ώρα
- ✓ **Εφαρμογή:**
ELISA, Χρωμομετρική ανίχνευση
- ✓ **Σημειώσεις εφαρμογής:**
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ωκυτοκίνης από υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας, γάλα, πλάσμα και ορό, από οποιοδήποτε είδος. Ως δείγμα προς ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σάλιο, τμήμα ιστού και ούρα.
- ✓ **Δραστικότητα ανά είδος:**
Ανεξάρτητη
- ✓ **Διασταυρούμενη δράση:**
Μεσοτοκίνη (7%), Ωκυτοκίνη (100%), Arg8-Βασσοτοκίνη (7.5%) και <0.02% για παρόμοια μόρια.
- ✓ **Χρήση/Σταθερότητα:**
Αποθήκευση όλων των συστατικών στους +4°C, εκτός του πρότυπου (standard) και του συζευγμένου διαλύματος (conjugate) στους -20°C.

3.2.1.β Υλικά

1. Πλάκα μικροτιτλοδότησης (Εικ. 22), κασίκας αντι-κουνελιού IgG, 96 πηγαδιών, Cat.No. 80-0060: πλάκα με λωρίδες διαχωρισμού, επικαλυμμένες με αντίσωμα κασίκας ειδικό για IgG κουνελιού.



Εικόνα 22 : Πλάκα μικροτιτλοδότησης της ELISA. Όλες οι πλάκες έχουν από 96 πηγαδάκια.

2. Διάλυμα συζευγμένης Ωκυτοκίνης (Oxytocin Conjugate), 5 ml, Cat.No. 80-0249: διάλυμα κυανού χρώματος αλκαλικής φωσφατάσης συζευγμένης με ωκυτοκίνη.
3. Αντίσωμα Ωκυτοκίνης, 5 ml, Cat.No. 80-2554: διάλυμα κίτρινου χρώματος, πολυκλωνικού αντισώματος, προερχόμενο από κουνέλι, έναντι της ωκυτοκίνης.
4. Πρότυπο διάλυμα αραιώσης (Assay Buffer), 27 ml, Cat.No. 80-1546: ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνες και αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
5. Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer), 27 ml, Cat.No. 80-1286: ρυθμισμένο με tris αλατούχο διάλυμα με απορρυπαντικούς παράγοντες.
6. Πρότυπο δείγμα Ωκυτοκίνης (Oxytocin Standard), 0.5 ml, Cat.No. 80-0251: διάλυμα 10,000 pg/ml ωκυτοκίνης.
7. Υπόστρωμα pNpp, 20 ml, Cat. No. 80-0075: π-φωσφορική νιτροφαινόλη (p-nitrophenylphosphate) σε ρυθμιστικό διάλυμα. Έτοιμο προς χρήση.
8. Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης (stop solution), 5 ml, Cat.No. 80-0247: διάλυμα φωσφορικού τρινατρίου (trisodium phosphate) σε νερό. Τα καλύμματα να είναι σφικτά κλεισμένα. Ένδειξη: καυστικό.
9. Καπάκι σφράγισης πλάκας, 1, Cat.No. 30-0012.
10. Φύλλο εργασίας πρωτοκόλλου Ωκυτοκίνης (Oxytocin Assay Layout Sheet): 1, Cat.No. 30-0312.

3.2.2 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Πρότυπο διάλυμα Ωκυτοκίνης (Oxytocin Standard)

Αφήνουμε το πρότυπο διάλυμα Ωκυτοκίνης 10,000 pg/ml να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αριθμούμε επτά (7) δοκιμαστικούς σωλήνες 12x75 mm. Μεταφέρουμε 1 ml από το Assay Buffer (ή το καλλιεργητικό μέσο) στο σωλήνα-1.

Προσθέτουμε 500 μl από το πρότυπο διάλυμα αραιώσης στους δοκιμαστικούς σωλήνες 2 έως 7. Αφαιρούμε 100 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα στο δοκιμαστικό σωλήνα-1. Προσθέτουμε 100 μl από το 10,000 pg/ml πρότυπο διάλυμα ωκυτοκίνης στο δοκιμαστικό σωλήνα-1. Ανακινούμε καλά (vortex). Προσθέτουμε 500 μl από το δοκιμαστικό σωλήνα-1 στο δοκιμαστικό σωλήνα-2 και ανακινούμε καλά. Προσθέτουμε 500 μl από το δοκιμαστικό σωλήνα-2 στο δοκιμαστικό σωλήνα-3 και ανακινούμε. Συνεχίζουμε την ίδια διαδικασία για τους δοκιμαστικούς σωλήνες 4 έως 7.



Η συγκέντρωση της ωκυτοκίνης στους δοκιμαστικούς σωλήνες 1 έως 7 θα είναι: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, και 15.6 pg/ml αντίστοιχα.

Τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα στα επόμενα 60 min της προετοιμασίας.

Μη-χρησιμοποιημένα ή αναρραίωτα πρότυπα δείγματα θα πρέπει να διαμοιραστούν σε διακριτά κλάσματα και να επανακαταψυχθούν στους (ή κάτω από) -20°C .

2. Συμπυκνωμένο διάλυμα Ωκυτοκίνης (Oxytocin conjugate)

Αφήνουμε το συμπυκνωμένο διάλυμα να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μη-χρησιμοποιημένο συμπυκνωμένο δείγμα θα πρέπει να διαμοιραστεί σε διακριτά κλάσματα και να επανακαταψυχθεί στους (ή κάτω από) -20°C .

3. Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer)

Προετοιμάζουμε το Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης μέσω αραιώσης 5 ml από το συμπύκνωμα που παρέχεται, με 95 ml απιονισμένο νερό. Μπορεί να αποθηκευθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit ή έως και τρεις μήνες.

3.2.3 Διαδικασία προσδιορισμού

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 30min προτού ανοιχτούν.

Όλα τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα προς μελέτη πρέπει να μετρηθούν εις διπλούν.

1. Καθορίζουμε τον αριθμό των πηγαδιών που θα χρησιμοποιήσουμε και τοποθετούμε τα εναπομείναντα με το ξηραντικό μέσο πίσω στη συσκευασία, την οποία σφραγίζουμε. Αποθηκεύουμε στους 4°C .

2. Τοποθετούμε 100μl από το πρότυπο διάλυμα αραιώσης (Assay Buffer ή καλλιεργητικό μέσο) στα πηγαδάκια NSB (non-specific binding) και B₀ (0 pg/ml).
3. Τοποθετούμε 100μl από τα πρότυπα διαλύματα 1 έως 7 στα αντίστοιχα πηγαδάκια.
4. Τοποθετούμε 100μl από τα δείγματα προς μελέτη στα αντίστοιχα πηγαδάκια.
5. Τοποθετούμε 50μl από το Assay Buffer στα πηγαδάκια NSB.
6. Προσθέτουμε 50μl από το συμπυκνωμένο διάλυμα (conjugate) κυανού χρώματος σε κάθε πηγαδάκι, εκτός των Total Activity (TA) και τυφλών πηγαδιών (Blank wells).
7. Προσθέτουμε 50μl από το Αντίσωμα κίτρινου χρώματος σε κάθε πηγαδάκι, εκτός από τα τυφλά, TA και NSB πηγαδάκια.

Σημείωση: κάθε πηγαδάκι που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει πράσινο χρώμα, εκτός από τα πηγαδάκια NSB, τα οποία θα πρέπει να έχουν κυανό χρώμα. Τα τυφλά και TA πηγαδάκια είναι κενά σε αυτό το σημείο, κατά συνέπεια δεν διαθέτουν χρωματισμό.

8. Ανακινούμε μαλακά την πλάκα για να αναδευτούν τα αντιδραστήρια. Την σφραγίζουμε και επωάζουμε στους 4°C για 18-24 ώρες.
9. Αδειάζουμε το περιεχόμενο των πηγαδιών και ξεπλένουμε προσθέτοντας 400μl από το διάλυμα πλύσης (wash solution) σε κάθε πηγαδάκι. Επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμη, ώστε να έχουμε στο σύνολο τρία πλυσίματα.
10. Έπειτα από το τελικό ξέπλυμα, αδειάζουμε ή πραγματοποιούμε αναρρόφηση στα πηγαδάκια και στεγνώνουμε την πλάκα με ένα σθεναρό χτύπημα σε χαρτί προσρόφησης χωρίς χνούδι, με σκοπό να απομακρύνουμε υπολείμματα από το διάλυμα πλύσης.
11. Προσθέτουμε 5μl από το συμπυκνωμένο διάλυμα (conjugate) κυανού χρώματος στα πηγαδάκια TA.
12. Προσθέτουμε 200μl από το rNpp διάλυμα υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι. Επωάζουμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα, χωρίς ανάδευση.
13. Προσθέτουμε 50μl από το διάλυμα τερματισμού αντίδρασης (Stop Solution) σε κάθε πηγαδάκι. Με αυτό τον τρόπο τερματίζεται η αντίδραση και η πλάκα πρέπει να «διαβαστεί» αμέσως.
14. Αφαιρούμε τη δυνατότητα του αναλυτή να «διαβάζει» τα κενά πηγαδάκια, μετρούμε την οπτική πυκνότητα στα 405nm, κατά προτίμηση με διόρθωση μεταξύ 570 και 590nm. Εάν δεν παρέχεται η δυνατότητα του αναλυτή να μην

«διαβάζει» τα κενά πηγαδάκια, τότε αφαιρούμε χειροκίνητα τη μέση οπτική πυκνότητα των κενών πηγαδιών από όλες τις μετρήσεις.

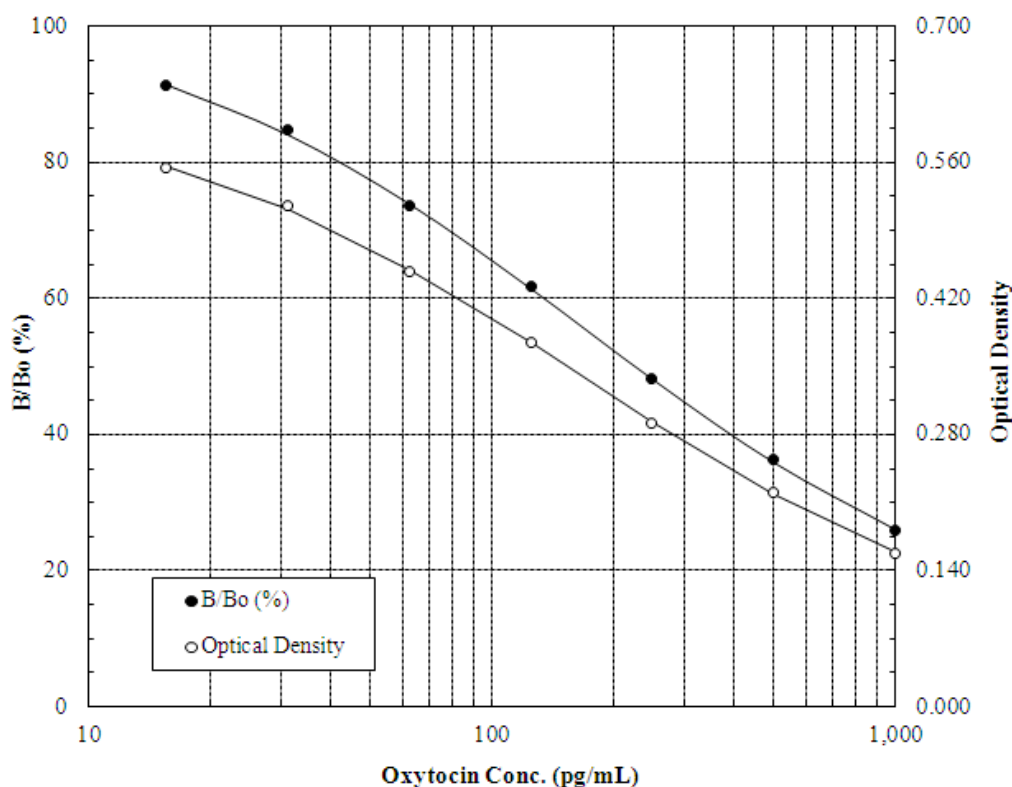
3.2.4 Βαθμονόμηση

Ο τρόπος βαθμονόμησης έχει καθιερωθεί από την οδηγία NIBSC/WHO Oxytocin 4th International Standard 76/575. Για να μετατρέψουμε τις τιμές που προέκυψαν από το Oxytocin ELISA Kit σε μορφή σύμφωνη με τα πρότυπα των NIBSC/WHO για την Ωκυτοκίνη, χρησιμοποιούμε την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{NIBSC/WHO 76/575 τιμή (pg/ml)} = \text{ληφθείσα τιμή ωκυτοκίνης (pg/ml)} \times 0.90$$

3.2.5 Τυπική πρότυπη καμπύλη

Παρακάτω παρουσιάζεται μια τυπική πρότυπη καμπύλη. Κάθε φορά που διεξάγεται το πείραμα είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός μιας νέας πρότυπης καμπύλης^[122].

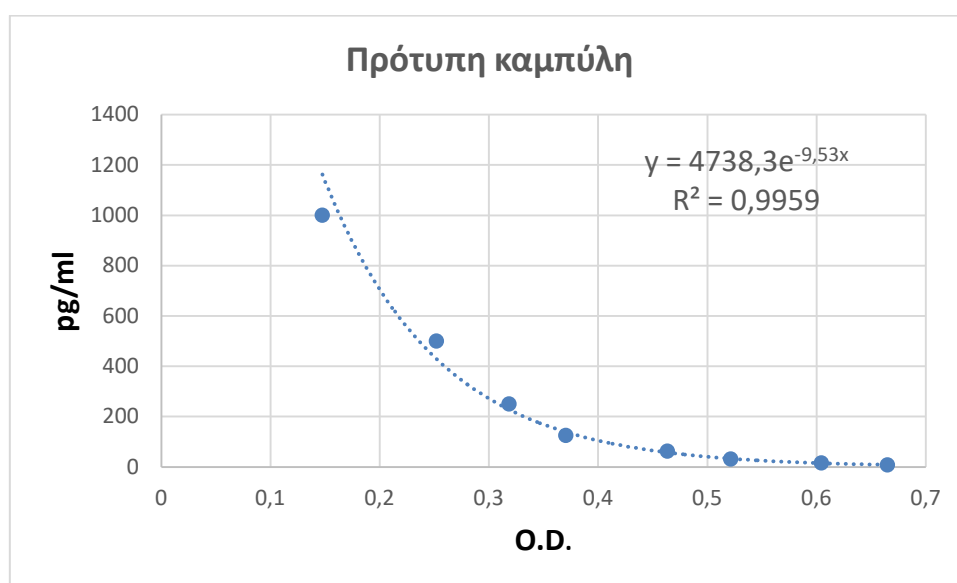


Εικόνα 23: Πρότυπη καμπύλη από πείραμα με χρήση Oxytocin ELISA Kit (ADI-900-153A)

4. Αποτελέσματα πειράματος

Αρχικά έχουμε την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, με βάση την απορρόφηση που μετρήθηκε από τα πρότυπα διαλύματα:

ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	OD	pg/ml
BLANK	-	-
S1	0,1475	1000
S2	0,252	500
S3	0,3185	250
S4	0,3705	125
S5	0,4635	62,5
S6	0,5215	31,2
S7	0,6045	15,6



Ακολουθούν οι μετρήσεις των δειγμάτων προς διερεύνηση:

		ΔΕΙΓΜΑ	ΟΚΥΤΟΚΙΝΗ (pg/ml)
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	I	1	44,84731411
		2	40,00096987
		3	40,77070059
		4	43,58328479
		5	44,00061894
	II	6	20,52828519
		7	19,57305158
		8	18,66226742
		9	21,12365918
	III	10	19,20352202

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη βοήθεια του προγράμματος υπολογιστικών φύλλων: Microsoft Excel Office και χρήση της μεθόδου Παλινδρόμησης (Regression).

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων και των μετρήσεων, με σκοπό να διαπιστώσουμε κατά πόσο υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία της κυτοκίνης και στην ποιότητα του εμβρύου, γενικά.

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,905022102
R Square	0,819065005
Adjusted R Square	0,796448131
Standard Error	5,472616585
Observations	10

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	1084,61556	1084,616	36,21477457	0,000317023
Residual	8	239,5962583	29,94953		
Total	9	1324,211819			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>
Intercept	56,35005712	4,518864421	12,46996	0,00000159893
Sample Category	-15,70043109	2,60896759	-6,01787	0,000317023

	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	45,92953708	66,770577	45,92953708	66,77057716
Sample Category	-21,71672114	-9,684141	-21,71672114	-9,684141042

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted OXYTOCIN</i>	<i>Residuals</i>
1	40,64962602	4,197688083
2	40,64962602	-0,648656154
3	40,64962602	0,121074563
4	40,64962602	2,933658771
5	40,64962602	3,350992913
6	24,94919493	-4,42090974
7	24,94919493	-5,376143356
8	24,94919493	-6,286927508
9	24,94919493	-3,825535749
10	9,24876384	9,954758177

Με βάση τα παραπάνω παρατηρούμε τα εξής:

Multiple R = 0,905022102 → Υψηλή συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της ωκυτοκίνης και της ποιότητας των εμβρύων.

R Square = 0,819065005 → Πάνω από το 80% των τιμών της ωκυτοκίνης συσχετίζονται με την κατηγορία των δειγμάτων.

$P_{\text{value}} = 0,00000159893 < 0,05$ → Υψηλή αξιοπιστία αποτελεσμάτων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις:

i. Κατηγορία I με II:

SAMPLE	SAMPLE CATEGORY	OXYTOCIN
SAMPLE 1	I	44,84731411
SAMPLE 2		40,00096987
SAMPLE 3		40,77070059
SAMPLE 4		43,58328479
SAMPLE 5		44,00061894
SAMPLE 6	II	20,52828519
SAMPLE 7		19,57305158
SAMPLE 8		18,66226742
SAMPLE 9		21,12365918

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,992173595
R Square	0,984408442
Adjusted R Square	0,981809849
Standard Error	0,072091511
Observations	8

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	1,968816884	1,96881688	378,8236387	0,0000011914
Residual	6	0,031183116	0,00519718		
Total	7	2			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value
Intercept	2,881129258	0,075399075	38,21173231	0,0000000215
Sample Category	-0,044508974	0,002286805	-19,46339227	0,0000011914

	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	2,696634369	3,065624148	2,696634369	3,065624148
Sample Category	-0,050104583	-0,038913365	-0,050104583	-0,038913365

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted OXYTOCIN</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard</i>
1	1,10072712	-0,10072712	-1,509161387
2	1,066467195	-0,066467195	-0,995856178
3	0,941281957	0,058718043	0,879753165
4	0,922706843	0,077293157	1,158058012
5	1,967436341	0,032563659	0,487890614
6	2,00995281	-0,00995281	-0,149119681
7	2,050490878	-0,050490878	-0,756488257
8	1,940936856	0,059063144	0,884923712

ii. Κατηγορία I με III:

SAMPLE	SAMPLE	OXYTOCIN
SAMPLE 1	I	44,84731411
SAMPLE 2		40,00096987
SAMPLE 3		40,77070059
SAMPLE 4		43,58328479
SAMPLE 5		44,00061894
SAMPLE 10	III	19,20352202

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,985997566
R Square	0,9721912
Adjusted R Square	0,9629216
Standard Error	0,172228685
Observations	5

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	3,11101184	3,111012	104,8795	0,001985
Residual	3	0,08898816	0,029663		
Total	4	3,2			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>
Intercept	4,587071751	0,32059486	14,308	0,00074
Sample Category	-0,084961802	0,008296184	-10,2411	0,001985

	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	3,566796	5,607348	3,566796	5,607348
Sample Category	-0,11136	-0,05856	-0,11136	-0,05856

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted OXYTOCIN</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard</i>
1	1,188517278	-0,18851728	-1,26391
2	1,123119569	-0,12311957	-0,82545
3	0,884157347	0,115842653	0,776663
4	0,848699886	0,151300114	1,014386
5	2,95550592	0,04449408	0,298309

iii. Κατηγορία II με III:

SAMPLE	SAMPLE CATEGORY	OXYTOCIN
SAMPLE 6	II	20,52828519
SAMPLE 7		19,57305158
SAMPLE 8		18,66226742
SAMPLE 9		21,12365918
SAMPLE 10	III	19,20352202

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,275669225
R Square	0,075993521
Adjusted R Square	-0,386009718
Standard Error	0,58864457
Observations	4

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0,056995141	0,056995	0,164487	0,724331
Residual	2	0,693004859	0,346502		
Total	3	0,75			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>
Intercept	4,810998461	6,321421993	0,761063	0,526111
Sample Category	-0,13039292	0,321505375	-0,40557	0,724331

	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-22,38788513	32,00988	-22,3879	32,00988
Sample Category	-1,513718901	1,252933	-1,51372	1,252933

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted OXYTOCIN</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard</i>
1	2,258811103	-0,258811103	-0,53849
2	2,377570908	-0,377570908	-0,78558
3	2,056622848	-0,056622848	-0,11781
4	2,306995141	0,693004859	1,441879

Συνοψίζοντας τις παραπάνω συγκρίσεις ανάμεσα στις κατηγορίες, έχουμε τα εξής:

Κατηγορία **I** με **II**: $P_{\text{value}} = 0,0000000215 < 0,05 \rightarrow$ Στατιστικά σημαντικό

Κατηγορία **I** με **III**: $P_{\text{value}} = 0,00074 < 0,05 \rightarrow$ Στατιστικά σημαντικό

Κατηγορία **II** με **III**: $P_{\text{value}} = 0,526111 > 0,05 \rightarrow$ Όχι στατιστικά σημαντικό

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η δυνατότητα επιλογής του ιδανικού εμβρύου με τη μεγαλύτερη αναπτυξιακή ικανότητα, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό βήμα προς τα εμπρός. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορούν όλα τα έμβρυα να εμφυτευθούν και να έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη γέννηση ενός υγιούς παιδιού. Σε τρεις RCT μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, στις οποίες αξιολογείται η μεταφορά εμβρύων μετά από πλήρη έλεγχο χρωμοσωμάτων (Comprehensive Chromosome Screening, CCS), το ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης κυμαινόταν από 60% έως 70%^[126-128]. Αυτό αφήνει σημαντικό περιθώριο για εφαρμογή νέων τεχνολογιών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διαφοροποίηση μεταξύ εμβρύων διαφορετικού αναπτυξιακού δυναμικού και πιθανότητας επίτευξης εγκυμοσύνης, με τελικό αποτέλεσμα τη γέννηση ενός υγιούς παιδιού.

Σήμερα, τα κριτήρια ποιότητας ενός εμβρύου είναι κυρίως μορφολογικά και αφορούν στο σχήμα και μέγεθος των βλαστομεριδίων, στην ταχύτητα των κυτταρικών αυλακώσεων και στο ποσοστό θραυσμάτων κατακερματισμού (fragmentation). Αυτή η προσέγγιση είναι τις περισσότερες φορές υποκειμενική και δίνει περιορισμένη γνώση για τον καθορισμό της εξέλιξης του εμβρύου.

Ως μια πρόσθετη μέθοδος για την πρόβλεψη της βιωσιμότητας του εμβρύου, έχει προταθεί η ανάλυση του χρησιμοποιούμενου μέσου καλλιέργειας για την ταυτοποίηση μεμονωμένων βιοδεικτών ή συνολικών μεταβολικών προφίλ, που θα μπορούσαν να σχετίζονται με έμβρυα υψηλού αναπτυξιακού δυναμικού^[129,130]. Αυτοί οι μεμονωμένοι βιοδείκτες θα επέτρεπαν τη μελλοντική ταυτοποίηση και μεταφορά εμβρύων που είναι πιθανότερο να οδηγήσουν σε εγκυμοσύνη λόγω της ανώτερης μεταβολικής τους υγείας. Αυτή η προσέγγιση είναι ιδιαίτερα ελκυστική επειδή αντιπροσωπεύει μια μη-επεμβατική μέθοδο που μπορεί να επιτρέψει στις κλινικές εξωσωματικής γονιμοποίησης να εξετάσουν την υποκείμενη φυσιολογία των εμβρύων, παρέχοντας έτσι επιπλέον πληροφορίες πέραν της μορφολογικής αξιολόγησης και της αξιολόγησης του αριθμού αντιγράφων χρωμοσωμάτων.

Για να προσδιοριστεί ποια έμβρυα έχουν το καλύτερο αναπτυξιακό δυναμικό, μια λογική προσέγγιση θα ήταν να επιλεγούν εκείνα τα έμβρυα με «φυσιολογικά» μεταβολικά προφίλ. Παρά τα περισσότερα από 50 χρόνια μελέτης, υπάρχουν ελάχιστες καθοριστικές οδηγίες σχετικά με το «σωστό» σύνολο μεταβολικών οδών που θα πρέπει να είναι ενεργές στο αναπτυσσόμενο έμβρυο^[129]. Η κυρίαρχη πρόκληση που αντιμετωπίζει ο τομέας είναι το γεγονός ότι ο μεταβολισμός του εμβρύου είναι σχετικά προσαρμόσιμος σε μια ευρεία ποικιλία συνθηκών καλλιέργειας^[131]. Ίσως ο σημαντικότερος καθοριστικός παράγοντας της μεταβολικής δραστηριότητας είναι η σύσταση του μέσου που χρησιμοποιείται για την υποστήριξη των εμβρύων σε καλλιέργεια, καθώς αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαφορές στο μέσο καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα πειραμάτων αξιολόγησης του μεταβολισμού του εμβρύου^[132-135].

Ως εναλλακτική πηγή γνώσης για τη φυσιολογία του αναπτυσσόμενου εμβρύου, η ανάλυση των εμβρυϊκών πρωτεϊνών που παράγονται και εκκρίνονται στο περιβάλλον μέσο καλλιέργειας μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο μη-επεμβατικό εργαλείο για την πρόβλεψη του αναπτυξιακού του δυναμικού^[136]. Προκαταρκτικές μελέτες έχουν εντοπίσει μεμονωμένες πρωτεΐνες με γνωστούς ρόλους στη διαμόρφωση της μητρικής-εμβρυϊκής αλληλεπίδρασης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και έχουν προτείνει περαιτέρω διερεύνηση αυτών των πρωτεϊνών ως πιθανών βιοδεικτών βιωσιμότητας του εμβρύου. Άλλοι υποψήφιοι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες που ταυτοποιήθηκαν σε χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας έχουν συσχετιστεί με δείκτες μειωμένου αναπτυξιακού δυναμικού, συμπεριλαμβανομένης της ανευπλοειδίας και αποτυχίας ανάπτυξης σε βλαστοκύστη.

Η καλύτερα ίσως χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη στο χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας, είναι το διαλυτό ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο G (soluble Human Leukocyte Antigen-G, sHLA-G) έχοντας αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο στην πρόβλεψη της βιωσιμότητας του εμβρύου σε πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη^[137]. Η διατήρηση της εγκυμοσύνης στις 10-12 εβδομάδες ήταν 2,5 φορές πιο πιθανή σε έμβρυα των οποίων το μέσο καλλιέργειας βρέθηκε θετικό σε έλεγχο για την παρουσία sHLA-G σε σχέση με έμβρυα με αρνητικό αποτέλεσμα. Άλλες μελέτες αμφισβητούν τη χρησιμότητα της μέτρησης του sHLA-G, καθώς έχουν τεκμηριωθεί επιτυχημένες εγκυμοσύνες μετά τη μεταφορά εμβρύων με μη ανιχνεύσιμο sHLA-G στο μέσο καλλιέργειας τους^[138]. Καθώς αυτές οι μελέτες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας σχετικά μη-ευαίσθητες ELISA, η ανάπτυξη αναλυτικών εργαλείων με αυξημένη ευαισθησία θα μπορούσε να βοηθήσει στην επίλυση αυτής της διαφοράς.

Η λεπτίνη, μια πρωτεΐνη που παίζει κεντρικό ρόλο στο ενεργειακό ισοζύγιο ρυθμίζοντας τα σήματα πείνας και κορεσμού, έχει επίσης ανακτηθεί από το χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας εμβρύου. Έχει υποτεθεί ότι η λεπτίνη που παράγεται από το έμβρυο μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους υποδοχείς λεπτίνης του ενδομητρίου^[139,140]. Προς υποστήριξη του ρόλου της λεπτίνης στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης ήταν υψηλότερες στο χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας από έμβρυα που αναπτύχθηκαν σε βλαστοκύστη σε σχέση με εκείνο από έμβρυα των οποίων η ανάπτυξη διακόπηκε^[140]. Η παρακολούθησή τους κατά τη διάρκεια παράλληλης καλλιέργειας παρουσίασε αντιφατικά αποτελέσματα, δείχνοντας ότι η σίγαση του υποδοχέα λεπτίνης του ενδομητρίου δεν επηρέασε σημαντικά το ρυθμό πρόσφυσης του εμβρύου^[141].

Η υπεργλυκοζυλιωμένη ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human Chorionic Gonadotropin, hCG-H) έχει επίσης ανιχνευθεί στο μέσο καλλιέργειας κατά τη διάρκεια αλλά και μετά την εκκόλαψη του εμβρύου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι αντιπροσωπεύει το κυρίαρχο μόριο hCG (μαζί με την άθικτη hCG) μετά την εκκόλαψη εμβρύου^[142]. Καθώς η hCG-H προάγει την ανάπτυξη των κυτταροτροφολαστών και της εμφύτευσης στον πλακούντα, οι συγκεντρώσεις της

σε χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικές του δυναμικού εμφύτευσης. Ωστόσο, δεν έχει επιβεβαιωθεί σε μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα^[143].

Η ουβικουΐτινη είναι γνωστή για το ρόλο της να στοχεύει πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, ρυθμίζει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και κατευθύνει πρωτεΐνες σε διαφορετικές κυτταρικές θέσεις. Η ουβικουΐτινη έχει ανιχνευθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο μέσο καλλιέργειας εμβρύων που προχωρούν στο στάδιο βλαστοκύστης, σε σχέση με εκείνο από τα έμβρυα που σταματούν να αναπτύσσονται και έπειτα εκφυλίζονται^[144]. Μέχρι σήμερα, καμία μελέτη δεν έχει αποδείξει τη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων ουβικιτίνης στο μέσο καλλιέργειας και των αποτελεσμάτων εγκυμοσύνης μετά τη μεταφορά εμβρύου.

Επίσης, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις λιποκαλίνης-1, μιας πρωτεΐνης που παράγεται σε απόκριση στο στρες, τη μόλυνση και τη φλεγμονή, σε μέσο καλλιέργειας από ανευπλοειδή έμβρυα σε σχέση με το μέσο ελέγχου (control medium) ή με μέσο από ευπλοειδικά έμβρυα^[145]. Με βάση αυτά τα ευρήματα, η λιποκαλίνη-1 έχει προταθεί ως μη-επεμβατική εναλλακτική λύση έναντι του CCS στην ταυτοποίηση ανευπλοειδικών εμβρύων, ωστόσο δεν έχουν διεξαχθεί προοπτικές μελέτες για την αξιολόγηση αυτής της πιθανότητας.

Τέλος, η ωκυτοκίνη, όπως και άλλες μορφές αγωνιστών της, έχει φανεί από τις παραπάνω κλινικές εφαρμογές που αναφέρθηκαν πως επηρεάζει θετικά την εμφύτευση επιδρώντας στους ιστούς της μήτρας, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης, καθώς και την ανάπτυξη του πλακούντα. Πειραματικές μελέτες καταδεικνύουν το ρόλο της στην ωοθυλακιογένεση και στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης.

Η ωκυτοκίνη ανακαλύφθηκε το 1909 από τον Henry Dale, ο οποίος και διαπίστωσε τη συστατική επίδραση που προκαλεί στα κύτταρα του ενδομητρίου ενώ έχει ευρέως μελετηθεί από τη δεκαετία του 1950. Είναι η πρώτη ορμόνη πεπτιδικής φύσεως, της οποίας η χημική δομή αποσαφηνίστηκε και αποδείχθηκε με ολική σύνθεση από τον Du Vigneaud και τους συνεργάτες του το 1953^[39].

Η ωκυτοκίνη (Oxt) έχει ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων. Αποτελεί ήδη ένα σημαντικό φάρμακο για την αποτελεσματικότερη έκβαση της διαδικασίας του τοκετού, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και στη διαδικασία της εμφύτευσης, πριν ή κατά τη διάρκεια της εμβρυομεταφοράς. Εκτός από τις μέχρι τώρα γνωστές δράσεις της, τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι επηρεάζει τη σεξουαλική, μητρική και κοινωνική συμπεριφορά^[123], ενώ προσφάτως βρέθηκε ότι προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του μαστού^[124,125].

Ο ρόλος της ωκυτοκίνης κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση της συστατικότητας της μήτρας. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η ωκυτοκίνη εμπλέκεται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων^[151], όπως επίσης και στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων ποντικών σε κύτταρα του μυοκαρδίου^[152].

Ο Fuyuga και η ομάδα του ανίχνευσαν το γονίδιο της ωκυτοκίνης στα κοκκώδη κύτταρα στο ποντίκι και στον άνθρωπο, ενώ η έκφραση του υποδοχέα της (OxtR) παρατηρήθηκε μόνο στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Αυτό κατέδειξε ότι τα κοκκώδη κύτταρα συνθέτουν τόσο την Oxt όσο και τον υποδοχέα της και μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη^[153].

Το 2009 η ομάδα της Roshangar μελέτησε την επίδραση της εξωγενούς χορήγησης ωκυτοκίνης στην ωοθυλακιόγνεση, στην ωοθυλακιόρρηξια και στην ανάπτυξη του ενδομητρίου στα ποντίκια. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η έγχυση ωκυτοκίνης δεν επηρέασε το μέγεθος ή τον αριθμό των ωοθυλακίων κατά την ωοθυλακική φάση. Όμως, κατά την ωχρινική φάση η έγχυση ωκυτοκίνης αύξησε σημαντικά τον όγκο των ωαρίων, καθώς και του ωχρού σωματίου με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση του πάχους του ενδομητρίου στα ποντίκια που είχαν δεχτεί έγχυση ωκυτοκίνης^[154].

Μια άλλη ομάδα από το Πανεπιστήμιο της Πολωνίας μελέτησε πως επηρεάζεται το σύστημα της ωκυτοκίνης (Oxt) και προγεστερόνης (P_4), καθώς και οι εκκρίσεις του ενδομητρίου και του μυομητρίου στην εγκυμοσύνη χοίρων. Αρχικά, παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA του OxtR υποδοχέα στο ενδομήτριο και μείωσή του στο μυομήτριο παρουσία εγκυμοσύνης, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται απουσία εγκυμοσύνης. Το αναπτυσσόμενο έμβρυο, κατά την περίοδο της εμφύτευσης, διεγείρει τον μεταβολισμό της προσταγλανδίνης PGF_{2a} , καθώς και την απόκριση του ενδομητρίου στην Oxt και P_4 . Η Oxt διεγείρει την έκκριση της PGF_{2a} και της PGFM μόνο στο ενδομήτριο των μη-κυοφορούντων χοίρων, ενώ διεγείρει την έκκριση PGE_2 κατά την εγκυμοσύνη. Η προσταγλανδίνη F_{2a} είναι υπεύθυνη για την ωχρινική παλινδρόμηση σε περίπτωση μη εγκυμοσύνης, ενώ η E_2 δρα σαν ωχρινοτροπικός και αντιωχρινολυτικός παράγοντας κατά την πρώιμη εγκυμοσύνη. Τα αποτελέσματα της έρευνας καταδεικνύουν την επίδραση της εγκυμοσύνης στην αποκριτική ικανότητα του ενδομητρίου στην Oxt και πιθανόν την τοπική επίδραση του προεμφυτευτικού εμβρύου στην καταστολή προγεστερόνης και στη διέγερση της έκκρισης E_2 ^[155].

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση της εκφραζόμενης ποσότητας ωκυτοκίνης στο μέσο καλλιέργειας εμβρύων που καλλιεργήθηκαν στα πλαίσια εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), για να αποδειχθεί η αξία της ως προγνωστικού βιοδείκτη για την επιλογή του καλύτερου εμβρύου με το μεγαλύτερο δυναμικό εμφύτευσης. Μικροσταγόνες μέσου καλλιέργειας εμβρύου από ασθενείς που βρίσκονται σε πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης (σε κλινικό επίπεδο),

συλλέχθηκαν και καταψύχθηκαν στους -80°C κατά την 3^η ημέρα της *in vitro* ανάπτυξης, πριν από την ανάλυση. Η ανίχνευση της ωκυτοκίνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA.

Σε πρώτο στάδιο, έγινε συλλογή του θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία καλλιέργειας εμβρύων διαφορετικής ποιότητας (Κατηγορία **I**, **II** και **III**), δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ένα pool αποτελούμενο από 20 δείγματα εμβρύων.

Στη συνέχεια, μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας και τη στατιστική ανάλυση που ακολούθησε, παρατηρήθηκε αρχικά ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία της ωκυτοκίνης και την ποιότητα του εμβρύου (Multiple R πλησιάζει το 1). Επίσης, προέκυψε ότι η διαφορά στη συγκέντρωση ωκυτοκίνης ανάλογα με την κατηγορία είναι στατιστικά σημαντική ($P_{\text{value}} < 0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύθηκε με την αναλυτική σύγκριση των κατηγοριών μεταξύ τους και συγκεκριμένα ανάμεσα στις Κατηγορίες **I** με **II** και **I** με **III**, όπου η διαφορά που παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση ωκυτοκίνης είναι στατιστικά σημαντική ($P_{\text{value}} < 0,05$ αντίστοιχα). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη διαφορά στη συγκέντρωση ωκυτοκίνης ανάμεσα στις Κατηγορίες **II** και **III**.

Κατά συνέπεια, θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε την ανίχνευση της ωκυτοκίνης στο καλλιεργητικό μέσο ενός εμβρύου προς εμφύτευση ως ένα μη-επεμβατικό δείκτη για την αξιολόγηση της ποιότητάς του. Με αυτό τον τρόπο θα επιτυγχάναμε αύξηση των ποσοστών επιτυχίας της έκβασης της συνολικής διαδικασίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επιπλέον, παρατηρούμε το εξής: από τη μια πλευρά έχουμε την παρουσία της ωκυτοκίνης ως ένδειξη της ποιότητας του εμβρύου και από την άλλη έχουμε έκφραση της ωκυτοκίνης και του υποδοχέα της (Oxt-OxtR) στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας. Η συσχέτιση του συστήματος Oxt-OxtR με διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός, θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη θετική ρύθμιση του υποδοχέα και την αύξηση της συγκέντρωσης της ωκυτοκίνης στο ενδομήτριο κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, τα οποία περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης, την ανάπτυξη του πλακούντα αλλά και των εμβρυϊκών αγγείων. Οπότε η μελέτη έκφρασης της ωκυτοκίνης θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε αλλά και να ενισχύσουμε αυτή την «επικοινωνία» μητέρας-εμβρύου στα τόσο κρίσιμα στάδια όπως αυτό της εμφύτευσης, αλλά και της πρωταρχικής εκδήλωσης του αναπτυξιακού δυναμικού του εμβρύου.

Ωστόσο, παρά τις θετικές ενδείξεις που προέκυψαν στη συγκεκριμένη εργασία, περιοριστικό παράγοντα στο να μεταφερθούμε από την πειραματική διαδικασία στην κλινική πράξη αποτελεί το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις ωκυτοκίνης που παρατηρήθηκαν, εντοπίζονται χαμηλότερα από το κατώτερο όριο ανίχνευσης που παρέχει το διαθέσιμο εμπορικό πακέτο αντιδραστηρίων (kit). Κατά συνέπεια, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την καθιέρωση επικυρωμένων κατώτατων ορίων ανίχνευσης για κλινική εφαρμογή.

Το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η πρωτεωμική έχει πολλά να προσφέρει στην Αναπαραγωγική Ιατρική και τις διαδικασίες ART. Ωστόσο, η εφαρμογή των μεθόδων πρωτεωμικής στις διαδικασίες αυτές εξακολουθεί να είναι ένα αναπτυσσόμενο πεδίο. Παρόλο δηλαδή, που ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχει προταθεί ως πιθανοί δείκτες βιωσιμότητας του εμβρύου, κανένας δεν έχει κάνει τη μετάβαση σε κλινική χρήση. Όπως στην περίπτωση μεταβολικών βιοδεικτών, το προφίλ των εκκρινόμενων εμβρυϊκών πρωτεϊνών εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας καθώς και από το φύλο του εμβρύου^[146-150]. Επιπροσθέτως, εργαλεία όπως η ELISA, παρόλο που είναι πιο προσιτά από οικονομικής πλευράς, σε αναλυτικό επίπεδο δεν προσφέρουν επαρκή ευαισθησία για να μετρήσουν (με ικανοποιητική επαναληψιμότητα) τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες σε επίπεδο pico-γραμμαρίων (picogram). Από την άλλη πλευρά, τα πιο ευαίσθητα εργαλεία φασματομετρίας μάζας (**Mass Spectrometry, MS**) είναι απαγορευτικά από οικονομικής πλευράς για πολλές κλινικές και ερευνητικά εργαστήρια. Μόλις ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, σε συνδυασμό με την υιοθέτηση καλώς προσδιορισμένων μέσων καλλιέργειας, τυποποιημένων συνθηκών καλλιέργειας και με την ανάπτυξη τεχνικών ανοσοανίχνευσης σε επίπεδο νανογραμμαρίων (ή άλλων προσιτών αλλά πολύ ευαίσθητων αναλυτικών εργαλείων), αναμένεται ότι θα είναι δυνατό να αποδειχθεί μια σαφής σύνδεση μεταξύ εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο μέσο καλλιέργειας και του αναπτυξιακού δυναμικού των εμβρύων.

Επίσης είναι απαραίτητο να γίνουν μελέτες που θα περιλαμβάνουν μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων τόσο για καλύτερη κατανόηση των πρωτεϊνικών προφίλ όσο και για την αναγνώριση των πιθανών πρωτεϊνικών βιοδεικτών: πρόβλεψη της εμβρυϊκής βιωσιμότητας, επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου, επιτυχή καθιέρωση εγκυμοσύνης και περιπτώσεις ανευπλοειδισμού. Αυτό θα βοηθήσει στην επιλογή του καλύτερου εμβρύου προς εμφύτευση και κατά συνέπεια θα ενισχύσει τα αποτελέσματα της IVF, επιλεκτικής μεταφοράς ενός μόνο εμβρύου (**elective Single Embryo Transfer, eSET**) και κατά συνέπεια αποφυγή πολύδυμων κυήσεων.

Βιβλιογραφία

1. Human embryology: Implantation barrier overcome, Janet Rossant, Nature 533, 182-183, 12 May 2016.
2. Predictive Roles of Proteomic Profiles in Assisted Reproduction-An Update, Sajal Gupta, Rakesh Sharma, Jasmine Eliwa and Ashok Agarwal, Gupta et al., J Proteomics Bioinform, March 17, 2015.
3. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. Hum Reprod Update 2003; 9:251–262.
4. Lane M, Gardner DK. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. Hum Reprod 1996; 11:1975–1978.
5. Contemporary genetic technologies and female reproduction: The Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2010*Human Reproduction Update, Vol.17, No.6 pp. 829–847, 2011.
6. L. Papale, A. Fiorentino, M. Montag, G. Tomasi: The zygote, Human Reproduction, Vol.27, No.S1 pp. i22–i49, 2012.
7. ΕΥΓΟΝΙΑ, Ανθρώπινη Αναπαραγωγή, Τόμος Α: ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ, Τρύφων Γ. Λαϊνάς.
8. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. Hum Reprod Update 1997; 3:367–382.
9. Suzuki H, Togashi M, Adachi J, et al. Developmental ability of zona-free mouse embryos is influenced by cell association at the 4-cell stage. Biol Reprod 1995; 53:78–83.
10. Veeck LL, Zaninovic N. Human morulae in vitro. In: Veeck LL, Zaninovic N, eds. An Atlas of Human Blastocysts. Boca Raton: Parthenon Publishing, 2003.
11. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update 2003; 9:237–249.
12. Tao J, Tamis R, Fink K, et al. The neglected morula/compact stage embryo transfer. Hum Reprod 2002; 17:1513–1518.
13. Kathy K. Niakan, Jinnuo Han, Roger A. Pedersen, Carlos Simon and Renee A. Reijo Pera, Human pre-implantation embryo development, Development 139, 829-841 (2012)
14. Bigger JD. Thoughts on embryo culture conditions. Reprod Biomed Online 2001; 4: 30-8.
15. Biggers JD. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. International Journal of Developmental Biology 1998; 42: 879-84.
16. Gardner DK and Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
17. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Hum Reprod Update 2003; 9: 557-82.
18. Biggers JD and Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. Fertil Steril 2008; 90: 473-83.
19. Irmhild Gruber, Matthias Klein, Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? J Turkish-German Gynecol Assoc 2011; 12: 110-7
20. Betteridge KJ (1981) A historical look at embryo transfer. J Reprod Fertil 62: 1-13
21. Dominguez DC, Lopes R, Torres ML (2007) Proteomics: clinical applications. Clin Lab Sci 20: 245-248.
22. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. Fertil Steril 2006;85:101–7.

23. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86:678–85.
24. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe MG, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007;67:64–72.
25. Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364: 1789-1799.
26. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ (2013) The use of genomics, proteomics and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril* 99: 998-1007.
27. Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:2869–2873.
28. Milki AA, Hinckley MD, Genhardt J, et al. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryo. *Fertil Steril* 2002; 77:1191–1195.
29. Lane M, Gardner DK. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 1996; 11:1975–1978.
30. Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76:1175–1180.
31. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002; 17:999–1005.
32. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004; 19:2319–2324.
33. In vitro fertilization: a practical approach/edited by David K. Gardner, Informa Healthcare USA, Inc.
34. Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK (1985) Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* 24: 4450-4455.
35. Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB (2009), The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod* 15: 271-277.
36. Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, et al. (2008) Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 23: 1993-2000.
37. Cheong Y, Boomsma C, Heijnen C, Macklon N (2013) Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. *Fertil Steril* 99: 1093-1099.
38. Mains LM, Christenson L, Yang B, Sparks AE, Mathur S, et al. (2011) Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertil Steril* 96: 422-427.
39. Wikipedia
40. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation, GERALD GIMPL AND FALK FAHRENHOLZ, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Germany, *Physiological Reviews* Vol. 81, No. 2, April 2001
41. GAUTVIK KM, DE LECEA L, GAUTVIK VT, DANIELSON PE, TRANQUE P, DOPAZO A, BLOOM FE, AND SUTCLIFFE JG. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8733–8738, 1996.
42. CASSONI P, SAPINO A, STELLA A, FORTUNATI N, AND BUSSOLATI G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Int J Cancer* 77: 695–700, 1998.
43. CENNI B AND PICARD D. Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *TEM* 10: 41–46, 1999.
44. POULAIN DA AND WAKERLEY JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7: 773–808, 1982.

45. BUIJS RM, DEVRIES GJ, AND VAN LEEUWEN FW. The distribution and synaptic release of oxytocin in the central nervous system. In: *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*, edited by Amico JA and Robinson AG. Amsterdam: Excerpta Med, 1985, p. 77–86.
46. KOZLOWSKI GP AND NILAVER G. Localization of neurohypophysial hormones in the mammalian brain. In: *Neuropeptides and Behavior. The Neurohypophysial Hormones*. Oxford, UK: Pergamon, 1986, p. 23–38.
47. RICHARD P, MOOS F, AND FREUND MM. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev* 71: 331–370, 1991.
48. SAWCHENKO PE AND SWANSON LW. Relationship of oxytocin pathways to the control of neuroendocrine and autonomic function. In: *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1985, p. 87–103. 509 SCHUMACHER M, COIRINI H, PFAFF DW, AND MCEWEN BS. Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of Oxytocin receptors. *Science* 250: 691–694, 1990.
49. SOFRONIEW MV. Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy: GABA and Neuropeptides in the CNS*. Amsterdam: Elsevier, 1985, vol. 4, p.93–165.
50. LANDGRAF R, NEUMANN I, RUSSELL JA, AND PITTMAN QJ. Push-pull perfusion and microdialysis studies of central oxytocin and vasopressin release in freely moving rats during pregnancy, parturition, and lactation. *Ann NY Acad Sci* 652: 326–339, 1992.
51. HARRIS MC, JONES PM, AND ROBINSON IC. Differences in the release of oxytocin into the blood and cerebrospinal fluid following hypothalamic and pituitary stimulation in rats. *J Physiol (Lond)* 320: 109–110, 1981.
52. JONES PM AND ROBINSON IC. Differential clearance of neurophysin and neurohypophysial peptides from the cerebrospinal fluid in conscious guinea pigs. *Neuroendocrinology* 34: 297–302, 1982.
53. MEYER C, FREUND MM, GUERNE Y, AND RICHARD P. Relationship between oxytocin release and amplitude of oxytocin cell neurosecretory bursts during suckling in the rat. *J Endocrinol* 114: 263–270, 1987.
54. AMICO JA, TENICELA R, JOHNSTON J, AND ROBINSON AG. A time-dependent peak of Oxytocin exists in cerebrospinal fluid but not in plasma of humans. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 947–951, 1983.
55. DI-SCALA GD AND STROSSER MT. Downregulation of the Oxytocin receptor on cultured astroglial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 268: C413–C418, 1995.
56. BARBERIS C AND TRIBOLLET E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 10: 119–154, 1996.
57. TRIBOLLET E, DUBOIS DM, DREIFUSS JJ, BARBERIS C, AND JARD S. Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann NY Acad Sci* 652: 29– 38, 1992.
58. YOSHIMURA R, KIYAMA H, KIMURA T, ARAKI T, MAENO H, TANIZAWA O, AND TOHYAMA M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 133: 1239–1246, 1993.
59. TRIBOLLET E, BARBERIS C, AND ARSENIJEVIC Y. Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 78: 499–509, 1997.
60. ARSENIJEVIC Y, DREIFUSS JJ, VALLET P, MARGUERAT A, AND TRIBOLLET E. Reduced binding of oxytocin in the rat brain during aging. *Brain Res* 698: 275–279, 1995.
61. INSEL TR AND SHAPIRO LE. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5981–5985, 1992.

62. LOUP F, TRIBOLLET E, DUBOIS DM, AND DREIFUSS JJ. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res* 555: 220–232, 1991.
63. REITER MK, KREMARK P, FREUND MM, STOECKEL ME, DESAULLES E, AND FELTZ P. Localization of oxytocin binding sites in the thoracic and upper lumbar spinal cord of the adult and postnatal rat: a histoautoradiographic study. *Eur J Neurosci* 6: 98–104, 1994.
64. HOSONO T, SCHMID HA, KANOSUE K, AND SIMON E. Neuronal actions of oxytocin on the subfornical organ of male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E1004–E1008, 1999.
65. FREUND MM AND STOECKEL ME. Somatodendritic autoreceptors on oxytocin neurones. *Adv Exp Med Biol* 395: 185–194, 1995.
66. MCCARTHY MM. Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior. *Adv Exp Med Biol* 395: 235–245, 1995.
67. TRIBOLLET E, AUDIGIER S, DUBOIS DM, AND DREIFUSS JJ. Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Res* 511: 129–140, 1990.
68. CALDWELL JD, WALKER CH, PEDERSEN CA, BARAKAT AS, AND MASONGA. Estrogen increases affinity of oxytocin receptors in the medial preoptic area-anterior hypothalamus. *Peptides* 15: 1079–1084, 1994.
69. COIRINI H, SCHUMACHER M, FLANAGAN LM, AND MCEWEN BS. Transport of estrogen-induced oxytocin receptors in the ventromedial hypothalamus. *J Neurosci* 11: 3317–3324, 1991.
70. PATCHEV VK, SCHLOSSER SF, HASSAN AH, AND ALMEIDA OF. Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience* 57: 537–543, 1993.
71. INSEL TR, YOUNG L, WITT DM, AND CREWS D. Gonadal steroids have paradoxical effects on brain oxytocin receptors. *J Neuroendocrinol* 5: 619–628, 1993.
72. LIBERZON I AND YOUNG EA. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrinology* 22:411–422, 1997.
73. MANNING M, CHENG LL, KLIS WA, STOEV S, PRZYBYLSKI J, BANKOWSKI K, SAWYER WH, BARBERIS C, AND CHAN WY. Advances in the design of selective antagonists, potential tocolytics, and radioiodinated ligands for oxytocin receptors. *Adv Exp Med Biol* 395: 559–583, 1995.
74. WILLIAMS PD, BOCK MG, EVANS BE, FREIDINGER RM, AND PETTIBONE DJ. Progress in the development of oxytocin antagonists for use in preterm labor. *Adv Exp Med Biol* 449: 473–479, 1998.
75. LEFEBVRE DL, GIAID A, BENNETT H, LARIVIERE R, AND ZINGG HH. Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 256: 1553–1555, 1992.
76. LEFEBVRE DL, LARIVIERE R, AND ZINGG HH. Rat amnion: a novel site of oxytocin production. *Biol Reprod* 48: 632–639, 1993.
77. CHIBBAR R, MILLER FD, AND MITCHELL BF. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. *J Clin Invest* 91: 185–192, 1993.
78. HIRST JJ, HALUSKA GJ, COOK MJ, AND NOVY MJ. Plasma oxytocin and nocturnal uterine activity: maternal but not fetal concentrations increase progressively during late pregnancy and delivery in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 169: 415–422, 1993.
79. FUCHS AR, FIELDS MJ, FREIDMAN S, SHEMESH M, AND IVELL R. Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F_{2a} and E₂ release. *Adv Exp Med Biol* 395: 405–420, 1995.
80. KIMURA T, TANIZAWA O, MORI K, BROWNSTEIN MJ, AND OKAYAMA H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356: 526–529, 1992.
81. FUCHS AR AND FUCHS F. Endocrinology of human parturition: a review. *Br J Obstet Gynecol* 91: 948–967, 1984.

82. ZINGG HH, ROZEN F, BRETON C, LARCHER A, NECULCEA J, CHU K, RUSSO C, AND ARSLAN A. Gonadal steroid regulation of oxytocin and Oxytocin receptor gene expression. *Adv Exp Med Biol* 395: 395–404, 1995.
83. IVELL R AND RICHTER D. Structure and comparison of the Oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2006–2010, 1984.
84. EINSPIANIER A, IVELL R, AND HODGES JK. Oxytocin: a follicular luteinisation factor in the marmoset monkey. *Adv Exp Med Biol* 395:517–522, 1995.
85. EINSPIANIER A, JURDZINSKI A, AND HODGES JK. A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod* 57: 16-26, 1997.
86. OKUDA K, UENOYAMA Y, FUJITA Y, IGA K, SAKAMOTO K, AND KIMURA T. Functional oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 625–631, 1997.
87. FURUYA K, MIZUMOTO Y, MAKIMURA N, MITSUI C, MURAKAMI M, TOKUOKA S, ISHIKAWA N, NAGATA I, KIMURA T, AND IVELL R. A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of Oxytocin and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes. *Adv Exp Med Biol* 395: 523–528, 1995.
88. FURUYA K, MIZUMOTO Y, MAKIMURA N, MITSUI C, MURAKAMI M, TOKUOKA S, ISHIKAWA N, IMAIZUMI E, KATAYAMA E, SEKI K, NAGATA I, AND IVELL R. Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. *Horm Res* 44 Suppl 2: 47–49, 1995.
89. MURRELL TG. The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* 35: 225–229, 1995.
90. CONRAD KP, GELLAI M, NORTH WG, AND VALTIN H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci* 689: 346–362, 1993.
91. HUANG W, LEE SL, ARNASON SS, AND SJOQUIST M. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 270: R427–R433, 1996.
92. OSTROWSKI NL AND LOLAIT SJ. Oxytocin receptor gene expression in female rat kidney. The effect of estrogen. *Adv Exp Med Biol* 395:329–340, 1995.
93. ARPIN BM, WALTISPERGER E, FREUND MM, AND STOECKEL ME. In the rat kidney the specific oxytocin binding sites have different selectivity for vasopressin in the cortex and the medulla. *Adv Exp Med Biol* 395: 351–352, 1995.
94. 34 ARPIN BM, WALTISPERGER E, FREUND MM, AND STOECKEL ME. Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *J Endocrinol* 153: 49–59, 1997.
95. PETERSSON M, ALSTER P, LUNDEBERG T, AND UVNAS MK. Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiol Behav* 60: 1311–1315, 1996.
96. 449 PETTY MA, LANG RE, UNGER T, AND GANTEN D. The cardiovascular effects of oxytocin in conscious male rats. *Eur J Pharmacol* 112: 203–210, 1985.
97. FAVARETTO AL, BALLEJO GO, ALBUQUERQUE AW, GUTKOWSKA J, ANTUNES RJ, AND MCCANN SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides* 18: 1377–1381, 1997.
98. GUTKOWSKA J, JANKOWSKI M, LAMBERT C, MUKADDAM DS, ZINGG HH, AND MCCANN SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11704–11709, 1997.
99. GEENEN V, LEGROS JJ, FRANCHIMONT P, BAUDRIHAYE M, DEFRESNE MP, AND BONIVER J. The neuroendocrine thymus: coexistence of Oxytocin and neurophysin in the human thymus. *Science* 232: 508–511, 1986.
100. MOLL UM, LANE BL, ROBERT F, GEENEN V, AND LEGROS JJ. The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin-, vasopressin-, and neurophysin-like peptides in epithelial cells. *Histochemistry* 89: 385–390, 1988.

101. GEENEN V, KECHA O, BRILOT F, CHARLET RC, AND MARTENS H. The thymic repertoire of neuroendocrine-related self antigens: biological role in T-cell selection and pharmacological implications. *Neuroimmunomodulation* 6: 115–125, 1999.
102. MARTENS H, KECHA O, CHARLET RC, DEFRESNE MP, AND GEENEN V. Neurohypophysial peptides stimulate the phosphorylation of pre-T cell focal adhesion kinases. *Neuroendocrinology* 67: 282–289, 1998.
103. ELANDS J, RESINK A, AND DE KLOET ER. Neurohypophysial hormone receptors in the rat thymus, spleen, and lymphocytes. *Endocrinology* 126: 2703–2710, 1990.
104. HANIF K, LEDERIS K, HOLLENBERG MD, AND GOREN HJ. Inability of oxytocin to activate pyruvate dehydrogenase in the Brattleboro rat. *Science* 216: 1010–1012, 1982.
105. AMICO JA, FINN FM, AND HALDAR J. Oxytocin and vasopressin are present in human and rat pancreas. *Am J Med Sci* 296:303–307, 1988.
106. DUNNING BE, MOLTZ JH, AND FAWCETT CP. Modulation of insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas by the neurohypophysial hormones and by desamino-D-arginine vasopressin (DDAVP). *Peptides* 5: 871–875, 1984b.
107. ANG VT AND JENKINS JS. Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 688–691, 1984.
108. HAWTHORN J, NUSSEY SS, HENDERSON JR, AND JENKINS JS. Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig. *Cell Tissue Res* 250: 1–6, 1987.
109. NUSSEY SS, PRYSOR JR, TAYLOR A, ANG VT, AND JENKINS JS. Arginine vasopressin and oxytocin in the bovine adrenal gland. *J Endocrinol* 115: 141–149, 1987.
110. TAYLOR AH, WHITLEY GS, AND NUSSEY SS. The interaction of arginine vasopressin and oxytocin with bovine adrenal medulla cells. *J Endocrinol* 121: 133–139, 1989.
111. BARBERIS C, MOUILLAC B, AND DURROUX T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 156: 223–229, 1998.
112. ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Φ., ΣΙΣΚΟΣ, Α., ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ-ΔΙΑΜΑΝΤΗ, Α. (1987) Μαθήματα κλινικής χημείας. Αθήνα: Εκδόσεις Λύχνος
113. ΡΙΖΟΣ, Δ. (1994) Ανοσοενζυμικές τεχνικές. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ
114. SOLOMON A. BERSON AND ROSALYN S. YALOW (1959) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. Radioisotope Service, Veterans Administration Hospital, Bronx, N. Y.
115. ΕΥΑΓΓΕΛΑΤΟΣ, Π. (1994) Ραδιοανοσοαναλύσεις. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
116. TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. (1988) Ανοσοενζυμικές τεχνικές. Αθήνα: Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur
117. ΛΙΒΑΝΙΟΥ, Ε. (1994) Ενίσχυση σήματος στις ανοσοαναλύσεις, Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ
118. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Μ. (1994) Χημειομετρία ανοσοχημικών προσδιορισμών. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ
119. ΔΕΣΥΠΡΗΣ, Α. (1994) Ενδογενείς παράγοντες που παρεμβαίνουν στις ανοσοαναλύσεις. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ
120. Cook Medical, Sequential Culture Media System
121. ENZO, Product Data Sheet, Oxytocin ELISA kit, Cat.No: ADI-900-153A, 96 Well Kit
122. ENZO, Product Manual, Oxytocin ELISA kit, Cat.No: ADI-900-153A, 96 Well Kit
123. Stewart, J.M. & Young, J.D., “Solid Phase Peptide Synthesis”, 2nd Edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984.
124. “Synthetic Peptides: A User’s Guide”, Grant, G.A. (Ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1992

125. Διδακτορική Διατριβή Ν. Ασημομούτη, Πάτρα, 1998.
126. Z. Yang, J. Liu, G.S. Collins, S.A. Salem, X. Liu, S.S. Lyle, et al., Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study, *Mol. Cytogenet.* 5 (2012) 24.
127. E.J. Forman, K.H. Hong, K.M. Ferry, X. Tao, D. Taylor, B. Levy, et al., In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial, *Fertil. Steril.* 100 (2013) 100–107. e101.
128. R.T. Scott Jr., K.M. Upham, E.J. Forman, K.H. Hong, K.L. Scott, D. Taylor, et al., Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial, *Fertil. Steril.* 100 (2013) 697–703.
129. H.J. Leese, History of oocyte and embryo metabolism. *Reprod. Fertil. Dev.* 27 (4) (2015) 567–571, <http://dx.doi.org/10.1071/RD14278>.
130. R.L. Krisher, A.L. Heuberger, M. Paczkowski, J. Stevens, C. Pospisil, R.S. Prather, et al., Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. *Reprod. Fertil. Dev.* 27 (4) (2015) 602–620, <http://dx.doi.org/10.1071/RD14359>.
131. Y. Takahashi, N.L. First, In vitro development of bovine one-cell embryos—influence of glucose, lactate, pyruvate, amino-acids and vitamins, *Theriogenology* 37 (1992) 963–978.
132. D.K. Gardner, H.J. Leese, Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro, *J. Reprod. Fertil.* 88 (1990) 361–368.
133. M. Lane, D.K. Gardner, Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions, *J. Reprod. Fertil.* 102 (1994) 305–312.
134. M. Lane, D.K. Gardner, Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 991–997.
135. A.P. Gandhi, M. Lane, D.K. Gardner, R.L. Krisher, Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media, *Mol. Reprod. Dev.* 58 (2001) 269–275.
136. M.G. Katz-Jaffe, S. McReynolds, D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft, The role of proteomics in defining the human embryonic secretome, *Mol. Hum. Reprod.* 15 (2009) 271–277.
137. D. Kotze, T.F. Kruger, C. Lombard, T. Padayachee, L. Keskinetepe, G. Sher, The effect of the biochemical marker soluble human leukocyte antigen G on pregnancy outcome in assisted reproductive technology—a multicenter study, *Fertil. Steril.* 100 (2013) 1303–1309.
138. J. Tabiasco, S. Perrier d’Hauterive, F. Thonon, J. Parinaud, R. Leandri, J.M. Foidart, et al., Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study, *Reprod. Biomed. Online* 18 (2009) 374–381.
139. R.R. Gonzalez, P. Caballero-Campo, M. Jasper, A. Mercader, L. Devoto, A. Pellicer, et al., Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 4883–4888.
140. A. Cervero, J.A. Horcajadas, F. Dominguez, A. Pellicer, C. Simon, Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function, *Reprod. Biomed. Online* 10 (2005) 217–223.
141. A. Cervero, F. Dominguez, J.A. Horcajadas, A. Quinonero, A. Pellicer, C. Simon, Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing, *Fertil. Steril.* 88 (2007) 1086–1092.
142. S.A. Butler, J. Luttoo, M.O. Freire, T.K. Abban, P.T. Borrelli, R.K. Iles, Human chorionic gonadotropin (hCG) in the secretome of cultured embryos: hyperglycosylated hCG and hCG-free

beta subunit are potential markers for infertility management and treatment, *Reprod. Sci.* 20 (2013) 1038–1045.

143. L.A. Cole, Hyperglycosylated hCG, a review, *Placenta* 31 (2010) 653–664.
144. M.G. Katz-Jaffe, W.B. Schoolcraft, D.K. Gardner, Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos, *Fertil. Steril.* 86 (2006) 678–685.
145. S. McReynolds, L. Vanderlinden, J. Stevens, K. Hansen, W.B. Schoolcraft, M.G. Katz-Jaffe, Lipocalin-1: a potential marker for noninvasive aneuploidy screening, *Fertil. Steril.* 95 (2011) 2631–2633.
146. C.J. Epstein, S. Smith, B. Travis, G. Tucker, Both X-chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos, *Nature* 274 (1978) 500–503.
147. R.L. Krisher, W.B. Schoolcraft, M.G. Katz-Jaffe, Omics as a window to view embryo viability, *Fertil. Steril.* 103 (2015) 333–341.
148. S. Kobayashi, A. Isotani, N. Mise, M. Yamamoto, Y. Fujihara, K. Kaseda, et al., Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages, *Curr. Biol.* 16 (2006) 166–172.
149. P. Bermejo-Alvarez, D. Rizos, P. Lonergan, A. Gutierrez-Adan, Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease, *Reproduction* 141 (2011) 563–570.
150. T.F. Dyrland, K. Kirkegaard, E.T. Poulsen, K.W. Sanggaard, J.J. Hindkjaer, J. Kjems, et al., Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis, *Hum. Reprod.* 29 (2014) 2421–2430.
151. *Oncogene*. 2003 Sep 4;22(38):6054-60 - Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains - Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M, Chini B.
152. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9550-5. Epub 2002 Jul 1 - Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes - Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J.
153. *Adv Exp Med Biol*. 1995;395:523-8: A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes - Furuya K, Mizumoto Y, Makimura N, Mitsui C, Murakami M, Tokuoka S, Ishikawa N, Nagata I, Kimura T, Ivell R.
154. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* Vol.7. No.2. pp: 91-95, Spring 2009: Effect of oxytocin injection on folliculogenesis, ovulation and endometrial growth in mice Leila Roshangar Ph.D., Jafar Soleimani Rad Ph.D., Parisa Nikpoo M.Sc. student, Manijeh Sayyah Melli M.D
155. *J Reprod Dev*. 2009 Jun;55(3):262-72. Epub 2009 Mar 16 - Local and systemic effects of embryos on uterine tissues during early pregnancy in pigs - Franczak A, Bogacki M.