

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Σοφία Καλανταρίδου

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ
ΣΟΚ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΕΜΦΥΤΕΥΣΗ
ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ Γ. ΜΑΚΡΗ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Σοφία Καλανταρίδου

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ

ΣΟΚ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΕΜΦΥΤΕΥΣΗ

ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της Κλινικής Διαιτολόγου

ΑΓΓΕΛΙΚΗΣ Γ. ΜΑΚΡΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ. Γ. Χρέλιας

Αναπληρωτής Καθηγητής Γυναικολογίας

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ

Ε. Ι. Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης

Καθηγητής Παθολογίας

Π. Παναγόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Γυναικολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σ. Καλανταρίδου

Καθηγήτρια Γυναικολογίας

Α. Αντωνιάδου

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Παθολογίας

Χ. Συριστατίδης

Αναπληρωτής καθηγητής Γυναικολογίας

Α. Παπαδόπουλος

Αναπληρωτής καθηγητής Παθολογίας

**Μονάχα εκείνος που,
παλεύει το σκοτάδι μέσα του,
θα έχει μεθαύριο,
μερτικό δικό του στον ήλιο,**

Οδυσσέας Ελύτης

Στην χαρά της ζωής

Στα παιδιά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I.	ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ 3
II.	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ 7
III.	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ 9
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ 11
2.	ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ – ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	σελ 15
3.	ΠΡΩΩΡΟΣ ΤΟΚΕΤΟΣ / ΑΠΟΒΟΛΗ.....	σελ 21
	3.1. Παράγοντες Κινδύνου για Αποβολή.....	σελ 24
	3.2. Στρες και Αποβολή.....	σελ 33
	3.3. Έμφυτη Ανοσία και Αποβολή.....	σελ 34
	3.4. Λοίμωξη και Αποβολή.....	σελ 34
4.	ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ.....	σελ 36
	4.1. Πρώιμη ενεργοποίηση του Υποθάλαμο-Υποφυσιακού άξονα της μητέρας ή του εμβρύου και της ανοσορύθμισης, σε καταστάσεις στρες.....	σελ 36
	4.2. Ενεργοποίηση του καταρράκτη της Φλεγμονής.....	σελ 38
5.	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΛΗΞΙΑΣ [Hsps].....	σελ 40
	5.1. Κατηγορίες των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας[Hsps].....	σελ 40
	5.2.Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70[Hsp70 και Hsp60].....	σελ 42
	5.3. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 [Hsp60 και Hsp70] στην Ανάπτυξη του Εμβρύου.....	σελ 45
	5.4. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 [Hsp70 και Hsp60] στην Αποβολή.....	σελ 49

5.5 Ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 [Hsp70 και Hsp60] στην έμφυτη ανοσία.....σελ 51	
IV. Ειδικό Μέρος.....σελ 55	
1. Ασθενείς και Μέθοδοι.....σελ 57	
1.1 Σχεδιασμός της κλινικής μελέτης.....σελ 57	
1.2 Μελέτη σε πειραματόζωα.....σελ 59	
1.3 Στατιστική ανάλυση.....σελ 63	
2. Αποτελέσματα.....σελ 65	
3. Συζήτηση.....σελ 82	
Βιβλιογραφία.....σελ 92	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένα ερώτημα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα σήμερα είναι εάν η πρόληψη μπορεί να είναι η ιδανική λύση για την αντιμετώπιση καταστάσεων όπως η παθολογία του πρόωρου τοκετού και ιδιαίτερα της παλίνδρομης κύησης. Κύριος στόχος λοιπόν της προσπάθειας αυτής είναι η κατανόηση της διαδικασίας της παλίνδρομης κύησης, δηλαδή του τοκετού που πραγματοποιείται πριν τη συμπλήρωση των 24 εβδομάδων της κύησης.

Η ενδελεχής γνώση επομένως της αιτιολογίας καθώς και της παθογένειας αυτών των αυτόματων αποβολών, που φτάνει στο 10% με 15%, και ιδιαίτερα των παλίνδρομων κυήσεων, καθίσταται εντελώς απαραίτητη. Τα τελευταία χρόνια οι παλίνδρομες κυήσεις, αποτελούν έναν αρκετά μεγάλο αριθμό περιστατικών στα επείγοντα των γυναικολογικών κλινικών.

Πολλές μελέτες επίσης έδειξαν, ότι η ηλικία της μητέρας και του πατέρα, συνδέεται άμεσα με αυξημένο κίνδυνο αποβολής όπως επίσης ότι και το στρες αποτελεί έναν από τους παράγοντες επικινδυνότητας για παλίνδρομη κύηση. Άλλοι παράγοντες που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο αυτόματης αποβολής είναι η παχυσαρκία, το πολύ χαμηλό βάρος σώματος, το κάπνισμα, η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης, καθώς επίσης και η κατανάλωση παράνομων ναρκωτικών.

Πάρα πολλές μελέτες θεωρούν ότι, τα ψυχο-νευρο ανοσολογικά μονοπάτια του στρες αποτελούν τους πυροδότες της αποβολής, ενώ υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στην περιφέρεια μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό της μη λαχνωτής μοίρας του χορίου.

Κατά το ξεκίνημα της μητρικής κυκλοφορίας, έχουμε μια έκρηξη οξειδωτικού στρες στον πλακούντα, η οποία φαίνεται επίσης, πως συμμετέχει στην διέγερση της φυσιολογικής διαφοροποίησής του. Αμέσως μετά την εμβρυοεμφύτευση ενδοαγγειακά κύτταρα του τροφοβλάστη μεταναστεύουν στον κάτω αυλό των σπειραματικών αρτηριών, φράσσουν τις αρτηρίες οι οποίες μετασχηματίζονται σε χαλαρούς διαύλους, περιορίζοντας έτσι τη ροή του μητρικού αίματος μέσα στον πλακούντα. Πολλές μελέτες αναφέρουν την πιθανότητα αποβολής, όταν η εισβολή του τροφοβλάστη γίνεται επώδυνα και τραυματικά, η απόφραξη των σπειραματικών αρτηριών είναι ατελής, η μητρική σπλαχνική κυκλοφορία αρχίζει πρόωρα και εκτεταμένα δια μέσου του πλακούντα, η συγκυτιοτροφοβλάστη έχει υποστεί οξειδωτική καταστροφή, ενώ υπάρχει εκτεταμένο οξειδωτικό στρες στον πλακούντα.

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) και κυρίως η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) αποτελούν επίσης ανοσοϊστοχημικούς δείκτες κυτταρικού στρες και καταστροφής και εμφανίζουν αυξημένη έκφραση σε ιστούς παλίνδρομων κυήσεων. Έχουν αναγνωρισθεί σε όλους τους προκαριωτικούς και ευκαριωτικούς οργανισμούς και εκφράζονται κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της εγκυμοσύνης. Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) είναι ευρύτερα γνώστες ως «μοριακοί συνοδοί», οι οποίοι αποτρέπουν πολλές πρωτεΐνες να πτυχωθούν λανθασμένα ή να δημιουργήσουν συσσωματώματα (μη ειδικές συναθροίσεις). Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στις κυήσεις χρονικής διάρκειας κάτω των 77 ημερών, όπου έχει επέλθει ο εμβρυϊκός θάνατος. Συνδέεται με αυξημένη απόπτωση και μειωμένο αριθμό μιτωτικών κυττάρων και αποδεικνύει ότι το οξειδωτικό στρες υπερβαίνει τα κυτταρικά αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα.

Έχει επίσης παρατηρηθεί, ότι κατά την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, έχουμε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 27 (Hsps 27) στις προεκβολές του επιθήλιου του ενδομητρίου, το οποίο πιθανώς να υποδηλώνει την συμμετοχή της πρωτεΐνης αυτής κατά την διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο της μήτρας.

Στις παλίνδρομες κύσεις επίσης, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsps 70) στις χωριακές λάχνες, σε σχέση με τους τελειόμηνους πλακούντες, η οποία φαίνεται πως ενοχοποιείται για την εκδήλωση παλίνδρομης κύησης. Έρευνες δείχνουν, ότι η παρουσία του εμβρύου στη μήτρα λειτουργεί ως σημαντικός διεγέρτης για την αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 105, 70, 60 (Hsps 105, 70, 60).

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν την εμπλοκή των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) σε κάθε στάδιο της αναπαραγωγικής διαδικασίας από το σχηματισμό των αρσενικών και θηλυκών γαμετών μέχρι την γονιμοποίηση και την ανάπτυξη μετά την γονιμοποίηση. Σε μυσ οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp 60 και 70) εμφανίζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη και είναι τα πρωτογενή προϊόντα του ζυγωτού. Η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) είναι παρούσα στο στάδιο της βλαστοκύστης κατά τη διαφοροποίηση της εμβρυϊκής εσωτερικής κυτταρικής μάζας.

Σε ποντικούς, βλαστοκύστες που καλλιεργήθηκαν σε χημικό περιβάλλον με αντισώματα anti- Hsp60 και anti- Hsp70 αντίστοιχα, ανέστειλαν σημαντικά περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου. Εάν λοιπόν οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) εμπλέκονται στη ρύθμιση της ενδομητριακής

διαφοροποίησης κατά την εμβρυοεμφύτευση, τότε η διαφοροποίηση της έκφρασης τους μπορεί να εμποδίσει σε σημαντικό βαθμό το σχηματισμό του ενδομητρίου με αποτέλεσμα την αποτυχία της εμφύτευσης.

Από τα παραπάνω προκύπτει η ανάγκη να διερευνηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp70 και Hsp60) στον ορό, κατά την διάρκεια της εμβρυοεμφύτευσης, σε εγκύους με φυσιολογική κύηση ή παθολογική (πρόωρος τοκετός – παλίνδρομη κύηση). Θα αναζητηθεί η ύπαρξη μιας θετικής συσχέτισης ανάμεσα στην διαφοροποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp70 και Hsp60) τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές κυήσεις.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στη Γ΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, σε συνεργασία με τη Δ΄ Παθολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω ολόψυχα τον καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας και πρώην Διευθυντή της Γ΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής κ. Δ. Π. Κασσάνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ασχοληθώ με αυτήν τη μελέτη. Του εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με το ζήτημα του ποιος είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) στην παθολογία της κύησης, δείχνοντας αμέριστη συμπαράσταση και δίνοντας χρήσιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Η παρούσα μελέτη δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την πολύπλευρη και συνεχή υποστήριξη, του Καθηγητή Παθολογίας κ. Ε. Ι. Γιαμαρέλλου – Μπουρμπούλη. Θα ήθελα από τα βάθη της καρδιάς μου να του εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση και ένα μεγάλο ευχαριστώ, για τις ανεκτίμητες ευκαιρίες που μου έδωσε, τις πολύτιμες συμβουλές του σε κάθε δύσκολη στιγμή, τις διαρκείς υποδείξεις του στο σχεδιασμό, εκτέλεση και συγγραφή της παρούσας διατριβής, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε και την υπομονή του στην παρακολούθηση όλων των σταδίων αυτής.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας και κ. Χ. Χρέλια, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο αποφασιστικά στην επιστημονική αξιοπιστία της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την αρωγή και την καθοδήγησή του, τον Επίκουρο Καθηγητή κ.κ. Περικλή Παναγόπουλο.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους εξάιρετους συνεργάτες της ερευνητικής ομάδας και ειδικότερα τους κ.κ., Γεωργία Δαμοράκη, Γιούλη Γκαβογιάννη, Διονυσία Δρογγίτη, για την καθοριστική συμβολή τους στην διεκπεραίωση των πειραμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Νικόλαο Ευαγγελινάκη για την πολύτιμη συνεργασία του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Χαρά Ευριπιώτη για την αρωγή της στην πραγματοποίηση του συνόλου των πειραμάτων, καθώς η αντιμετώπιση των ποικίλων δυσκολιών που ανέκυψαν χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της θα ήταν ανέφικτη. Ευχαριστώ επίσης θερμά την εξάριετη συνεργάτιδα της επιστημονικής ομάδας κ. Αικατερίνη Πιστική για την καθοριστική συμβολή της στην ανάλυση των εξαχθέντων αποτελεσμάτων, καθώς και για την συμπαράσταση και την ενθάρρυνση που μου έδωσε κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης.

Τέλος θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλες τις εγκυμονούσες γυναίκες που συμπεριελήφθησαν στο ερευνητικό τμήμα της μελέτης, για την προθυμία τους και τη συμμετοχή τους σ' αυτό.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παλίνδρομη κύηση είναι η πιο συχνή και επίπονη επιπλοκή μιας πρώιμης εγκυμοσύνης, ενώ οι επαναλαμβανόμενες αποβολές αποτελούν μια ξεχωριστή μορφή ασθένειας, η οποία επηρεάζει το 1% του πληθυσμού[1]. Σημαντικά δεδομένα για τις επιπτώσεις του πρόωρου τοκετού σε παγκόσμιο επίπεδο προκύπτουν από τη μελέτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) το 2005. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, το 2005 αναφέρθηκαν 12,9 εκατομμύρια πρόωρες γεννήσεις, 9,6% επί του συνόλου των ζώντων νεογνών. Υπάρχει θετική συσχέτιση του πρόωρου τοκετού με το επίπεδο ανάπτυξης της κάθε περιοχής, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η ιατρική παρέμβαση συμβάλλει σημαντικά στην πρόληψη του (ΠΙΝΑΚΑΣ 1). Τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στην Αφρική (11,9%) και την Νότιο Αμερική (10,6%), ενώ τα χαμηλότερα στην Ευρώπη(6,2%), [2].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Παγκόσμια επίπτωση του πρόωρου τοκετού, n-αριθμός, CI-διαστήματα αξιοπιστίας [3]

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΡΟΩΡΟΣ ΤΟΚΕΤΟΣ Ή σε χιλιάδες με 95% CI	ΠΟΣΟΣΤΟ % με 95% CI
ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ (Beck S et al) (Blencowe H et al)	12.870 (12.228 – 13.511)	9,6 (9,1 – 10,1)
	14.900 (12.300 – 18.100)	11,1 (9,1 – 13,4)
Ανεπτυγμένες χώρες	1.014 (982 – 1.046)	7,5 (7,3 – 7,8)
	Υψηλό κατά κεφαλήν εισόδημα	9,3
	Μέσο κατά κεφαλήν εισόδημα	9,4
Αναπτυσσόμενες χώρες	7.685 (7.109 – 8.261)	8,8 (8,1 – 9,4)
	Μικρομεσαίο κατά κεφαλήν εισόδημα	11,3
	Χαμηλό κατά κεφαλήν εισόδημα	11,8
Χώρες 3 ^{ου} κόσμου	4.171 (3.891 – 4.452)	12,5 (11,7 – 13,3)

Έρευνες δείχνουν ότι οι αποβολές του πρώτου τριμήνου αποτελούν συχνό φαινόμενο ανάμεσα σε πολύτοκες γυναίκες. Χαρακτηριστικά το 43% αυτών των γυναικών έχουν τουλάχιστον μία ή και περισσότερες αυτόματες αποβολές στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τους, με το ποσοστό να εκτινάσσεται στο 81% όταν οι τελειόμηνοι τοκετοί ξεπερνούσαν τους 11. Έρευνα αναφέρει ότι μεταξύ 17 γυναικών με πολυτοκία, η μία θα έχει βιώσει τρεις ή και περισσότερες αποβολές [3].

Η μεγάλη πλειοψηφία θα αποβάλλει πριν την 12η εβδομάδα της εγκυμοσύνης, ένα πολύ μικρό ποσοστό (5%) μετά το άκουσμα της εμβρυακής καρδιακής λειτουργίας, ενώ ο πολύ πρόωρος τοκετός, πριν δηλαδή την 32η εβδομάδα της κύησης είναι υπεύθυνος για την νεογνική θνητότητα και νοσηρότητα. Λιγότερο συχνές (ποσοστό 4%) είναι οι αποβολές που πραγματοποιούνται στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (12-24 εβδομάδες) [4]. Η πραγματική όμως εκτίμηση του ποσοστού των αποβολών είναι πιθανόν μεγαλύτερη, καθώς οι περισσότερες από αυτές εμφανίζονται προκλινικά, πριν την απώλεια ενός κύκλου περιόδου [5]. Στο Ηνωμένο Βασίλειο καταγράφονται ετήσια περίπου 125.000 αποβολές [6]. Πράγματι, η μέση μηνιαία γονιμότητα εκτιμάται σε ποσοστό 20%, με το ποσοστό ν' αυξάνεται κατά ένα τρίτο όταν συμπεριλάβουμε και τις αυτόματες αποβολές πριν την εμβρυοεμφύτευση [7].

Στις παλίνδρομες κυήσεις το έμβρυο αποβάλλεται από τον οργανισμό αυτόματα, χωρίς να χρειάζεται κάποια φαρμακευτική θεραπεία, και χωρίς να απειλείται η ζωή της μητέρας κατά τη διαδικασία αυτή. Παρόλα αυτά, αρκετά συχνά υπάρχει σημαντική οικονομική επιβάρυνση τόσο εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού των αποβολών όσο και του σημαντικού κόστους των διαγνωστικών εξετάσεων, της νοσοκομειακής περίθαλψης, της χειρουργικής

θεραπείας, καθώς και του επανελέγχου μετά την αποβολή, διαδικασίες που πολλές φορές είναι απαραίτητες. Η απώλεια μιας εγκυμοσύνης είναι τις περισσότερες φορές επίπονη τόσο για την έγκυο, όσο και για το σύντροφο της, με δυσμενείς επιπτώσεις τόσο στην ψυχολογία τους, όσο και στην κοινωνική τους ζωή. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, μεταξύ 1985 και 2008, η διακύμανση της μητρικής θνησιμότητας κυμάνθηκε από 00,5 – 0,22 ανά 100.000 κυήσεις [8]. Οι πιο κοινές αιτίες θανάτου ήταν η αιμορραγία και η σήψη, οι οποίες τείνουν να εμφανίζονται συχνότερα στις αποβολές του δεύτερου τριμήνου.

Για να καταχωρηθεί και να εκτιμηθεί κλινικά το ιστορικό του κάθε περιστατικού αυτόματης αποβολής, είναι απαραίτητη τόσο η διευκρίνιση του τύπου της αποβολής, όσο και η ακριβής ταξινόμηση. Παρόλο που πολλές έρευνες και επιδημιολογικές μελέτες έχουν ασχοληθεί τόσο με μεμονωμένους παράγοντες πρόκλησης αυτόματης αποβολής, όσο και με τους συνδιασμούς τους, όπως: χρωμοσωμικές ανωμαλίες των γονέων, θρομβοφιλικές διαταραχές της μητέρας, ανοσολογικές δυσλειτουργίες, ανωμαλίες της μήτρας, ανώριμους τράχηλους, βακτηριακές λοιμώξεις, περιβαλλοντικούς παράγοντες και ανωμαλίες εμβρύου. Εντούτις, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι καταστάσεις αυτές ενεργοποιούν την παθοφυσιολογία του πρόωρου τοκετού (PTD) παραμένουν αναπάντητες [5].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η πρόληψη των αποβολών εξακολουθεί να είναι σε μεγάλο βαθμό δύσκολο να επιτευχθεί. Επιπρόσθετα, αυτό το κλινικό πρόβλημα, επηρεάζεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι οι γυναίκες καθυστερούν όλο και περισσότερο την εγκυμοσύνη μέχρι την ηλικία των 30 ετών [9], ενώ ο κίνδυνος αποβολής αυξάνεται με την ηλικία της μητέρας.

Ο μηχανισμός της αυτόματης αποβολής στις γυναίκες παραμένει ακόμη ασαφής, ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί κάποια μέθοδος αξιολόγησης των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης και ιδιαίτερα για την ομάδα των γυναικών με χαμηλό δείκτη επικινδυνότητας για αποβολή.

Επίσης, ο συνδυασμός τόσο του αυξημένου οικονομικού κόστους των προληπτικών εξετάσεων για έλεγχο των παραγόντων κινδύνου αποβολής, όσο και η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αποβολών, φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα αυτόματης αποβολής κατά 40%, σε επόμενη εγκυμοσύνη [9]. Προκειμένου να επιτύχουμε αποτελεσματική διαχείριση των γυναικών με επαναλαμβανόμενες αποβολές θα πρέπει να έχουμε: 1) ολοκληρωμένα επιδημιολογικά δεδομένα, τόσο με τους κινδύνους επανάληψης της, όσο και με την συχνότητα επανεμφάνισης της, και 2) μια ολιστική προσέγγιση όσον αφορά τις αιτίες εκδήλωσης της και όχι το λανθασμένο τεκμήριο ότι όλες οι περιπτώσεις πρέπει να έχουν μια συστηματοποιημένη και αποδεδειγμένη υποκείμενη αιτία.

Τα τελευταία χρόνια η συσχέτιση του στρες με την αυτόματη αποβολή και τον πρόωρο τοκετό αποτελεί θέμα έντονης συζήτησης και αντικείμενο έρευνας από την επιστημονική κοινότητα, με αμφιλεγόμενα όμως αποτελέσματα [10, 11]. Η έλλειψη κατάλληλων εργαλείων για την αξιολόγηση της έννοιας του στρες αποτελεί έναν περιορισμό στις κλινικές μελέτες. Ταυτόχρονα, πάρα πολλές φορές, τα αποτελέσματα από τις διάφορες μελέτες είναι αντιφατικά, τόσο εξαιτίας της ποικιλότητας του σχεδιασμού των διαφόρων πειραμάτων, όσο και της δυσκολίας επαλήθευσης των συγκεκριμένων ερεθισμάτων στρες που εκδηλώθηκαν σε συγκεκριμένο

χρόνο, ή αναφέρθηκαν ως στρεσογόνοι παράγοντες το χρονικό διάστημα που εκδηλώθηκε η αυτόματη αποβολή.

Ο συνδυασμός των προσωπικών και των περιβαλλοντικών παραγόντων είναι αυτός που καθορίζει την έκταση κατά την οποία το άτομο θα βιώσει το χρόνιο (επαναλαμβανόμενο) στρες. Σε συνθήκες χρόνιου στρες, παρατηρείται αύξηση του αλλοστατικού φορτίου (AL) του οργανισμού [12], το οποίο λειτουργεί ως σύνθετη μέτρηση. Η αντίδραση του νευροενδοκρινικού συστήματος στο χρόνιο στρες μπορεί να οδηγήσει σε καρδιαγγειακές και ανοσολογικές μεταβολές, καταλήγοντας σε αυξημένο κίνδυνο παθολογικών καταστάσεων ή επιτάχυνση μιας ήδη υπάρχουσας παθολογίας. Αυτή η επιβάρυνση αποτελεί το AL, το οποίο ουσιαστικά περιγράφει τον βαθμό εκτροχιασμού του οργανισμού από τη βασική κατάσταση ηρεμίας και εκφράζει τόσο τις εμπειρίες της ζωής όσο και το γενετικό φορτίο [13, 14, 15]. Ωστόσο, κάτω από συνθήκες επαναλαμβανόμενου ή χρόνιου στρες, οι αλλαγές που προκαλεί μακροπρόθεσμα το AL, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απορύθμιση των ορμονών, τον επηρεασμό της γονιμότητας και η πορεία της εγκυμοσύνης να οδηγηθεί σε παλινδρόμηση [15].

2. Εγκυμοσύνη-Γονιμοποίηση

Η εγκυμοσύνη είναι η κατάσταση γονιμοποίησης και ανάπτυξης για ένα ή περισσότερα γονιμοποιημένα ωάρια ή αλλιώς ζυγωτές μέσα στη μήτρα μιας γυναίκας. Αρχίζει με τη γονιμοποίηση ενός δευτερογενούς ωοκυττάρου και συνεχίζει μέχρι τη γέννηση του ατόμου. Η περίοδος της εγκυμοσύνης διαφέρει ανάμεσα στα θηλαστικά, η ανθρώπινη εγκυμοσύνη είναι παρεμφερής

με αυτήν των ουρακοτάγκων και των χιμπατζήδων και διαρκεί 266 ημέρες. Αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία η οποία αναφέρεται στα διαφορετικά στάδια της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών γαμετών.

Το γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγωτής) παραμένει στην σάλπιγγα για τις επόμενες 5-6 ημέρες όπου και διαιρείται σε 2,4,8,16 κ.ο.κ. κύτταρα. Καθώς η κυτταρική διαίρεση εξελίσσεται, το έμβρυο είναι εν κινήσει. Η σάλπιγγα προωθεί το έμβρυο προς τη μήτρα, τόσο μέσω της κίνησης των κινητικών βλεφαρίδων των επιθηλιακών κυττάρων της, όσο και μέσω ήπιων μυϊκών συσπάσεων [16]. Τα κύτταρα του ακτινωτού στέμματος εξαφανίζονται περίπου δύο ημέρες μετά [17], ενώ η ύπαρξη της διαφανούς ζώνης λειτουργεί προστατευτικά στο έμβρυο, εμποδίζοντας την πρόωμη εμφύτευση του στην σάλπιγγα. Ο ζυγώτης ο οποίος είναι μονοκύτταρο έμβρυο και πάρα πολύ εξειδικευμένο κύτταρο διαιρείται αρχικά σε δύο κύτταρα και υφίσταται ταχεία αύξηση του αριθμού των κυττάρων.

Περίπου 3 1/2 έως 4 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, η σάλπιγγα χαλαρώνει υπό την επίδραση της προγεστερόνης, το έμβρυο ολοκληρώνει το ταξίδι του και εισέρχεται στη μήτρα [16], μέσω του μητριάιου στομίου της σάλπιγγας, ενώ η διαυγής ζώνη εκφυλλίζεται. Την έβδομη ημέρα, η τροφοβλάστη σχηματίζει μία περιφερική “πλάκα”, η οποία γρήγορα διαφοροποιείται σε δύο στρώματα, ένα εσωτερικό μεγάλων διαυγών μονοπύρηνων κυτταροτροφοβλάστης με καλώς ορισμένες κυτταρικές μεμβράνες και ένα εξωτερικό στρώμα από πολυπύρηννα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης.

Εκτιμάται ότι ο μισός πληθυσμός από το σύνολο των εμβρύων, αποτυγχάνουν να εμφυτευτούν με επιτυχία και πεθαίνουν, τις περισσότερες

φορές χωρίς να συνειδητοποιεί η μητέρα ότι είναι έγκυος. Πολλά από αυτά τα έμβρυα πιστεύεται ότι έχουν σοβαρές γενετικές ανωμαλίες ασυμβίβαστες με την επιβίωση [18]. Η πρόωρη απώλεια της εγκυμοσύνης αποτελεί πηγή μεγάλης ανησυχίας, καθώς εκτιμάται ότι το 15% των ζευγαριών είναι μη γόνιμα [19] και τουλάχιστον το 40% των κυήσεων αποβάλλονται πριν από την εμφύτευση [20].

Το έμβρυο των θηλαστικών σηματοδοτεί την παρουσία του στην μητέρα για να καθιερώσει την εγκυμοσύνη, μέσω της τροφοβλάστης. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι κρίσιμα για την εμφύτευση, αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον της μήτρας τοπικά, τόσο για να εξασφαλίσουν την επαρκή παροχέτευση αίματος στην θέση εμφύτευσης, όσο και για να αποτρέψουν την ανοσολογική απόρριψη του εμβρύου, το οποίο αποτελεί έναν ημιαλλογεννή οργανισμό, για τη μήτρα [21].

Επιπλέον, αυτά τα κύτταρα λειτουργούν ως ένα ενδοκρινικό όργανο που τροφοδοτεί την αιματική κυκλοφορία της μήτρας με ορμόνες και κυτταροκίνες, με σκοπό να επαναπρογραμματίσουν τη φυσιολογία της μήτρας προς όφελος του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Ως συνέπεια, η διαφοροποίηση της τροφοβλάστης μπορεί να επηρεάσει την ομαλή λειτουργία του πλακούντα, ενώ ταυτόχρονα συνδέεται και με ένα ευρύ φάσμα διαταραχών της εγκυμοσύνης, όπως: υπογονιμότητα, παλίνδρομη κύηση, πρόωρος τοκετός, προεκλαμσία, καθώς και περιορισμένη ανάπτυξη του εμβρύου [22]. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι η επιτυχής καθιέρωση της πρώιμης εγκυμοσύνης εξαρτάται απόλυτα από βιολογικά βιώσιμα βλαστοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να υποβληθούν σε (εκκόλαψη) και εμφύτευση στο ενδομήτριο της μήτρας [23]. Υπάρχει μια σύντομη περίοδος αλληλοεπικοινωνίας ανάμεσα στο

έμβρυο και στη μήτρα, γνώστη ως παράθυρο εμβρυοεμφύτευσης [24]. Εντούτοις παραμένει ασαφές πως η βλαστοκύστη καταφέρνει να μην αναγνωρισθεί ως ξένη από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, κατά την διάρκεια της εμβρυοεμφύτευσης.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυοεμφύτευσης, τα στρωματικά κύτταρα της μήτρας δημιουργούν ένα πλαίσιο στήριξης ώστε να ολοκληρωθεί η μετανάστευση της τροφοβλάστης, καθώς και το δίκτυο των σπειροειδών αρτηριών. Τα εξωτερικά στρώματα του ζυγωτού ή αλλιώς βλαστοκύστη, αναπτύσσονται στο ενδομήτριο πέπτοντας τα ενδομητριακά κύτταρα, ενώ το ενδομήτριο εγκολπώνει την βλαστοκύστη στον ιστό του, ώστε το έμβρυο να συνεχίσει την ανάπτυξή του.

Ένα άλλο στρώμα της βλαστοκύστης, το χορίο, αρχίζει να απελευθερώνει μια ορμόνη που ονομάζεται ανθρώπινη β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-HCG) η οποία διατηρεί ενεργό το ωχρό σωματίο. Αυτό εξασφαλίζει επαρκή επίπεδα προγεστερόνης για τη διατήρηση του ενδομητρίου και την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. Οι δοκιμασίες εγκυμοσύνης προσδιορίζουν το επίπεδο της β-HCG στα ούρα ή στον ορό. Εάν υπάρχει η ορμόνη, το τεστ είναι θετικό.

Η παρουσία φλεγμονών και λοιμώξεων στο αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών αποτελούν κοινές αιτίες υπογονιμότητας, απώλειας εμβρύων και πρόωρων τοκετών. Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφύτευση του εμβρύου. Στην περίπτωση της εγκυμοσύνης, η οποία αποτελεί ανοσολογική αντίφαση για τον ανθρώπινο οργανισμό, ένας ημιαλλογενής οργανισμός, το

έμβρυο, δεν απορρίπτεται από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, τουναντίον γίνεται δεκτός και θρέφεται από αυτόν. Αυτή η κατάσταση επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν την διαμόρφωση του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος από το προ-εμφυτευτικό έμβρυο [25]. Συνεπώς, οποιαδήποτε παρεμβολή μπορεί να διαταράξει την ισορροπία του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του εμβρύου ή υπογονιμότητα. Στην πραγματικότητα, πολλά προβλήματα υπογονιμότητας στις γυναίκες σχετίζονται με λοιμώξεις του ανώτερου αναπαραγωγικού συστήματος και των διαμερισμάτων του, δηλαδή το εσωτερικό του τραχήλου, των σαλπίγγων και της μήτρας [26].

Για να αναγνωριστούν οι πιθανοί παθογόνοι, προηγείται η έκφραση των PAMPs από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Μία από τις οικογένειες υποδοχέων που εμπλέκονται στην αναγνώριση των παθογόνων στο ανώτερο αναπαραγωγικό είναι και αυτή των TLR [27, 28]. Η σύνδεση του παθογόνου στον αντίστοιχο υποδοχέα TLR ενεργοποιεί κάτωθεν σηματοδοτικά μονοπάτια, με τελικούς στόχους τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-kB ή AP-1, οι οποίοι προωθούν την ενεργοποίηση των προφλεγμονώδων γονιδίων [29]. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα θέλουν τους TLRs να εμπλέκονται σε ένα σημαντικό αριθμό διαταραχών της κύησης, όπως πρόωρος τοκετός, πρώιμη απώλεια εγκυμοσύνης και προεκλαμψία [30]. Η έκφραση των προφλεγμονώδων γονιδίων ακολουθεί το μοτίβο των ορμονών του εμμηνορρησιακού κύκλου. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών εντοπίζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο, κατά την εκκριτική φάση, όταν δηλαδή λαμβάνει χώρα και η εμφύτευση του εμβρύου [31].

Η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών μπορεί να δείχνει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος της μήτρας είναι ευαίσθητα σε ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτοανοσίας μέσω της διέγερσης των TLRs, λειτουργώντας ως προστατευτικός μηχανισμός για τη μητέρα. Τα κύτταρα του στρώματος αποτελούν σημαντικό συστατικό για τη διαμεσολάβηση των ανοσολογικών αποκρίσεων που συμβαίνουν σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν υπόστρωμα για τα συνεχώς μετακινούμενα λευκοκύτταρα και ρυθμίζουν ένα μέρος των επίκτητων ανοσολογικών αποκρίσεων [32]. Δύο κύριοι παράγοντες εμπλέκονται στην επιτυχημένη εμφύτευση και αυτοί είναι 1) ένα καλής ποιότητας έμβρυο και 2) σωστή ενδομητρική δεκτικότητα, από την πλευρά της μητέρας. Οποιαδήποτε διαταραχή σε αυτήν την περίπλοκη αλληλορύθμιση ορμονών, κυττοκινών και παραγόντων προσκόλησης κατά την κρίσιμη αυτή περίοδο μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία εμφύτευσης [33].

Μερικοί από τους παράγοντες που μπορεί να απορυθμίσουν αυτήν την ισορροπία είναι τα Gram (-) βακτήρια, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν συστηματικές λοιμώξεις που τροποποιούν το ανοσοποιητικό της μητέρας, κυρίως μέσω της παρουσίας των LPS [34]. Η LPS-επαγόμενη απορρόφηση του εμβρύου έχει συσχετιστεί με την τροποποίηση των επιπέδων πολλών κυτταροκινών, όπως της IFN- γ [34], IL-2 [35] και IL-6 [36]. Οι προφλεγμονώδεις κυττοκίνες είναι διαμεσολαβητές στην επαγωγή της σηψαιμίας και οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) διαμεσολαβούν στην αποτροπή του σηψαιμικού σοκ στο ενδομήτριο [37], όπου μαζί με την αυξημένη τους έκφραση κατά την εκκριτική φάση και τη φάση της ωορηξίας – κρίσιμες περιόδους για τη δεκτικότητα του ενδομητρίου για την εμφύτευση ενός

εμβρύου στις γυναίκες [38] - προτείνουν ότι οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsps) έχουν διακριτό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυοεμφύτευσης [39].

Οι Jaiswal et al, 2013 [34], παρατήρησαν στη μελέτη τους ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) που ανιχνεύονται στην περίοδο της εμφύτευσης μπορεί να τροποποιηθούν παρουσία LPS σε ποντίκια. Η τροποποίηση που παρατηρήθηκε αφορά την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60), η οποία, παρουσία LPS εμφάνιζε σημαντικά χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με φυσιολογικά ενδομήτρια. Σε κυτταρικό επίπεδο, η χαμηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) εντοπίστηκε σε κύτταρα του στρώματος της μήτρας, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, προτείνοντας ότι με αυτή τη μείωση έκφρασης μπορεί να επηρεάζει αρνητικά τη δεκτικότητα της μήτρας και να οδηγεί σε αποτυχία εμφύτευσης και πρώιμη απώλεια της εγκυμοσύνης [34].

3.Πρόωρος τοκετός- αποβολή

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) ορίζει ως σποραδική αποβολή ή αποβολή, την κλινική απώλεια εγκυμοσύνης πριν την 20η εβδομάδα της κύησης [40, 41]. Η αποβολή αποτελεί απώλεια εγκυμοσύνης, η οποία συμβαίνει έπειτα από ανίχνευση του ενδομητρικού σάκου της εγκυμοσύνης με υπερηχογράφημα και εφόσον επιβεβαιωθούν τα αντίστοιχα ιστολογικά ευρήματα προϊόντων σύλληψης, μετά την αποβολή [42]. Η αποβολή διαιρείται στις πρώιμες κλινικές απώλειες εγκυμοσύνης (<12 εβδομάδων) και στις

προχωρημένες αποβολές (μεταξύ 12-21 εβδομάδων). Τα ποσοστά των πρώιμων αποβολών κυμαίνονται στο 10-15%, ενώ της προχωρημένης αποβολής υπολογίζονται περίπου στο 4%. Συγκριτικά με τις σποραδικές αποβολές, οι επαναλαμβανόμενες αποβολές αποτελούν το 0,8-1,4% των κύσεων στην περίπτωση που υπολογίζονται μόνο οι διαπιστωμένες εγκυμοσύνες και περίπου στο 2-3%, όταν συμπεριλαμβάνονται και οι περιπτώσεις εγκυμοσύνης οι οποίες πρόλαβαν να διαγνωσθούν μόνο με την χρήση διαγνωστικών δοκιμασιών [43]. Η ηλικία της μητέρας και ο αριθμός των προηγούμενων αποβολών αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για επιπλέον αποβολές.

Τα ποσοστά των πρώιμων αποβολών αυξήθηκαν με την αύξηση της ηλικίας που επιλέγουν οι γυναίκες να γίνουν μητέρες από 10-15% για γυναίκες μεταξύ 20 με 24 έτη σε 51% για γυναίκες μεταξύ 40 και 44 ετών [44]. Ο κίνδυνος της αποβολής είναι υψηλότερος σε γυναίκες με ιστορικό αποβολών. Ο κίνδυνος αποβολής μετά από δύο συνεχόμενες αποβολές κυμαίνεται στο 17-25% και αντίστοιχα, ο κίνδυνος μετά από τρεις συνεχόμενες αποβολές υπολογίζεται στα 25-46% [44, 45]. Η προχωρημένη ηλικία του πατέρα θεωρείται επίσης παράγοντας κινδύνου για αποβολές. Ο κίνδυνος αποβολής είναι μεγαλύτερος σε ζευγάρια όπου η γυναίκα είναι μεγαλύτερη των 35 ετών και ο άνδρας μεγαλύτερος των 40 ετών [46].

Αντίθετα, ως πρόωρος τοκετός θεωρείται οποιοσδήποτε τοκετός πριν συμπληρωθούν 37 εβδομάδες κύησης ή λιγότερες από 259 ημέρες από την πρώτη ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου μίας γυναίκας με σταθερό κύκλο [47]. Ο ορισμός μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω με βάση την ηλικία κατά την κυοφορία σε:

- Εξαιρετικά σοβαρή προωρότητα (<28 εβδομάδες)
- Σοβαρή προωρότητα (28 - <32 εβδομάδες)
- Μέτρια ή καθυστερημένη προωρότητα (32–<37) συμπληρωμένες εβδομάδες κύησης).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) αναφέρει επίσης ότι δεν υπάρχει σαφές όριο ανάμεσα στην αυτόματη αποβολή και τη βιώσιμη κύηση, θεωρώντας έτσι, δυσδιάκριτη την αξιολόγηση ανάμεσα στον πρόωρο τοκετό (πρόωρος τοκετός αναφέρεται στα μωρά που επιβιώνουν), και στον εξαιρετικά πρόωρο (μη βιώσιμα μωρά). Η σύγκριση για τις διάφορες χώρες και μεταξύ των χωρών γίνεται περίπλοκη, καθώς τα κατώτερα όρια βιωσιμότητας στην κύηση διαφέρουν χρονικά, αλλά και ανάλογα με τα ιδρύματα στα οποία μελετώνται. Ο καθορισμός του κατώτατου ορίου θεωρείται περίπλοκος καθώς ορίζεται με διαφορετικούς τρόπους, αλλά παραμένει απαραίτητος. Τις περισσότερες φορές περιγράφεται μέσα στα πλαίσια των παραγόντων κινδύνου και των αιτιών τους και έχει αναπτυχθεί - κατά κύριο λόγο- σύμφωνα με τη μετα- εμβρυική βιωσιμότητα και την ποιότητα των δεδομένων που παρέχονται από τα διάφορα νοσοκομεία και ερευνητικά κέντρα [48-50]. Τα αποτελέσματα μίας κύησης διαφέρουν ανάλογα τη χώρα, όπου το ανώτατο όριο για τα εθνικά και τοπικά κριτήρια καταγραφής των εμβρυικών θανάτων ποικίλουν από 16 μέχρι και 28 εβδομάδες, επιδρώντας στην αναλογία των πρώιμων γεννήσεων [51].

Περίπου το 15% όλων των γνωστών κυήσεων αποβάλλουν στο πρώτο τρίμηνο [52]. Ως αυτόματη αποβολή ορίζεται η απώλεια του κυήματος πριν να καταστεί βιώσιμο και ιδιαίτερα μεταξύ της 12ης και 28ης εβδομάδας της κύησης [40, 53]. Ο ΠΟΥ ορίζει την κατάσταση αυτή ως την αποβολή κυήματος

βάρους 500 gr ή μικρότερου. Η αποβολή κατά το πρώτο τρίμηνο (πχ στις πρώτες 12 εβδομάδες της κύησης, πρώιμη απώλεια κύησης) κατηγοριοποιείται ή ως απωλεσθείσα κύηση ή ως ατελής αποβολή. Η απωλεσθείσα κύηση διαγιγνώσκεται εάν το υπέρηχογράφημα δείχνει σάκο κύησης, στον οποίο δεν έχει αναπτυχθεί έμβρυο (ανεμβρυονικός σάκος ή όπως είναι γνωστό, κατεστραμμένο ωάριο) ή εάν ένα έμβρυο ή κύημα έχει αναπτυχθεί, αλλά είναι νεκρό και η κύηση πρόκειται να αποβληθεί σύντομα (γνωστή και ως απωλεσθείσα κύηση) [53]. Στην ατελή αποβολή, η γυναίκα εκδηλώνει συνήθως κοιλιακή αιμορραγία, η οποία λειτουργεί ως ένδειξη έναρξης της αποβολής των προϊόντων της κύησης.

3.1. Παράγοντες κινδύνου για αποβολή

Οι αποβολές του πρώτου τριμήνου προκαλούνται συνήθως από προβλήματα με τα χρωμοσώματα του κυήματος και μπορούν να συμβούν τυχαία. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος, ενώ υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν για να οδηγήσουν στη μετάβαση από την ηρεμία της μήτρας στην έναρξη του πρόωρου τοκετού ή της πρόωρης ρήξης των υμένων, όπως: λοίμωξη, φλεγμονή, καθώς και άλλες ανοσολογικές διαταραχές.

Σε πολλές περιπτώσεις πρόωρου τοκετού, δεν αναγνωρίζεται κανένας παράγοντας κινδύνου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά, τόσο μητρικής όσο και εμβρυικής προέλευσης που έχουν συσχετισθεί με τον πρόωρο τοκετό, συμπεριλαμβανομένων δημογραφικών χαρακτηριστικών,

θρεπτικών συνηθειών, μαιευτικού ιστορικού, χαρακτηριστικών της παρούσας κύησης, βιολογικών και γενετικών παραγόντων.

Αίτια αποβολών και πρόωρων κυήσεων

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ιδιαίτερα αυτοσωμικές τρισωμίες

Περίπου το 50-60% των πρώιμων, σποραδικών αποβολών σχετίζεται με την ύπαρξη ανευπλοειδίας στο έμβρυο, ιδιαίτερα με αυτοσωμικές τρισωμίες που δεν είναι βιώσιμες [54]. Σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές, η πιθανότητα παρουσίας χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή τρισωμιών στο έμβρυο, αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας. Μία μεγάλη μελέτη έδειξε ότι ζευγάρια με ιστορικό τουλάχιστον δύο αποβολών και παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών/ τρισωμιών στα έμβρυα, είχαν την ίδια συχνότητα γέννησης υγιούς παιδιού με ζευγάρια που δεν είχαν αποβολές (83% έναντι 84% αντίστοιχα) [55].

Ανοσολογικές αιτίες που σχετίζονται με αποτυχία των μηχανισμών που εμπλέκονται στην πρόληψη απόρριψης του κυήματος

Η αποτυχία της αναγνώρισης του κυήματος τόσο από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας όσο και από μηχανισμούς αναγνώρισης εμβρυικών αντιγόνων εμπλέκονται άμεσα στην απόρριψη του κυήματος και στην εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αποβολών. Υπάρχουν συγκεκριμένες κατηγορίες αυτοαντισωμάτων που χρησιμεύουν ως δείκτες ανοσολογικής δυσλειτουργίας, σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αποβολών. Τα αυτοαντισώματα αυτά περιλαμβάνουν τα αντι-φωσφολιπιδικά, αντι-θυρεοειδικά και αντι-πυρηνικά αντισώματα. Μελέτες αναφέρουν ότι αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών των T βοηθητικών κυττάρων ή των NK κυττάρων

ανιχνεύονται στο αίμα γυναικών με ευπλοειδική σποραδική αποβολή, καθώς και σε επαναλαμβανόμενες αποβολές [56].

Θρομβοφιλίες

Επίκτητη θρομβοφιλία (APS).

Το σύνδρομο APS αποτελεί μία αυτοάνοση κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και σχετίζεται με θρομβώσεις και θνητότητα κατά την κύηση [57]. Το σύνδρομο σχετίζεται με επαναλαμβανόμενες αποβολές [57]. Η συχνότητα ανίχνευσης των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στις ασθενείς με επαναλαμβανόμενες αποβολές κυμαίνεται στο 15-20% [57], ενώ η αιτιολογία παραμένει άγνωστη για το 50% των ζευγαριών [58].

Κληρονομούμενη θρομβοφιλία (παράγοντας VLeiden, μεταλλάξεις στο γονίδιο της προθρομβίνης, ανεπάρκειες πρωτεϊνών C και S).

Η κληρονομούμενη δυσλειτουργία της διαδικασίας πήξης έχει ως αποτέλεσμα την επίκρατηση μίας υπερθρομβωτικής κατάστασης κατά την εγκυμοσύνη [59]. Επιδρώντας στην ποσότητα και/ή τη λειτουργία συγκεκριμένων παραγόντων πήξης, οι κληρονομούμενες θρομβοφιλίες μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία της στο σύστημα πήξης [59]. Οι φορείς μεταλλάξεων του παράγοντα V Leiden απαντώνται σε συχνότητα 5-9% σε Ευρωπαίους Καυκάσιους, αλλά σε μικρότερο ποσοστό ή απουσιάζει στους υπόλοιπους πληθυσμούς [60, 61]. Στο σύστημα πήξης που απαντάται ο παράγοντας V, συμμετέχουν και η προθρομβίνη, που μετατρέπεται σε θρομβίνη από αυτόν, όπως και οι πρωτεΐνες C και S [59]. Μεταλλάξεις στο

γονίδιο του παράγοντα V, έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο επαναλαμβανόμενων αποβολών που ποικίλει από 2 φορές μέχρι και 7 φορές, σε σχέση με γυναίκες χωρίς μεταλλάξεις, για κυήσεις μετά τη 10η εβδομάδα [62, 63], ενώ υπάρχουν και δεδομένα για τον προστατευτικό του ρόλο για κυήσεις πρωιμότερες της 10ης εβδομάδας [64]. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου της προθρομβίνης δεν έχουν μελετηθεί αρκετά καλά και τα δεδομένα που υπάρχουν δεν είναι καλά τεκμηριωμένα, καθώς κάποιες σχετίζουν την ύπαρξη μεταλλάξεων με τον κίνδυνο αποβολής, ενώ άλλες δεν εντοπίζουν κάποια σημαντική συσχέτιση [62, 64].

Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, η οποία αντιστοιχεί σε περισσότερες από 160 διαφορετικές μεταλλάξεις είναι παρούσα κυρίως σε Ασιατικούς και Αφρικανικούς πληθυσμούς [64]. Εμφανίζονται δύο διαφορετικοί τύποι ανεπάρκειας, τύπου I και II χωρίς να υπάρχουν ξεκάθαρες ενδείξεις για τη σύνδεση των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης C με τον κίνδυνο αποβολών [62, 65].

Μεταλλάξεις του γονιδίου *MTHFR*

Το γονίδιο του *MTHFR* παράγει ένα ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος, ανάγοντας την ομοκυστεΐνη σε μεθειονίνη. Οι συχνότεροι πολυμορφισμοί του *MTHFR* C677T και A1298C απαντώνται στο 10-16% και 4-6% των Ευρωπαίων αντίστοιχα [59].

Η παρουσία ομοκυστεϊναιμίας προδιαθέτει για θρομβώσεις, αλλά οι πολυμορφισμοί του *MTHFR* δεν έχουν συσχετιστεί πλήρως με τον κίνδυνο αποβολών, καθώς τα ερευνητικά δεδομένα είναι ανεπαρκή, κυρίως επειδή οι συσχετίσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές, παρόλο που οι μελέτες

εντοπίζουν μία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και του κινδύνου αποβολής.[66, 67].

Ενδοκρινικά αίτια

Πολλές ενδοκρinoπάθειες όπως: ελαττωματική ωχρινική φάση, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCO), υπερινσουλιαιμία και διαβήτης καθώς και διαταραχές του θυρεοειδούς, έχουν αιτιολογικό ρόλο στην εκδήλωση επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), παρατηρείται συχνότερα στις γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές. Μελέτες δείχνουν ότι γυναίκες είτε με υπερέκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), είτε με υπερανδρογοναιμία, ενδοκρinoπαθειες που σχετίζονται με το PCOs, βρίσκονται σε αυξημένο ρίσκο αποβολής [67, 68]. Μελετη αναφέρει ότι, ανάμεσα σε 2000 γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές, το 40,7% είχε πολυκυστικές ωοθήκες, σε σχέση με το 22% των controls. [69]

Ελαττωματική ωχρινική φάση

Η μη φυσιολογική εμφύτευση του εμβρύου, που οφείλεται σε ένα ελαττωματικό ενδομήτριο, μπορεί να αποτελέσει την αιτία πολλαπλών αποβολών, ως αποτέλεσμα μιας ελαττωματικής ωχρινικής φάσης (LPD). Ως LPD ορίζεται η μη επαρκής παραγωγή προγεστερόνης, είτε σε ποσότητα είτε σε διάρκεια, που συνδέεται με την μη επαρκή ωρίμανση του ενδομητρίου, εξαιτίας ενός ελαττωματικού ωχρού σωματίου [70].

Υπερινσουλιναίμια και Διαβήτης

Πολλές έρευνες τονίζουν την σημασία του τακτικού γλυκαιμικού ελέγχου κατά την κύηση, και την σχέση των γλυκαιμικών δεικτών, που ορίζονται από τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης(HbA1c), με την αποβολή [71-73]. Σε εγκυμοσύνες τρωκτικών, ο διαβήτης της μητέρας επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του εμβρύου πριν την εμφύτευση. Αυτό αποδεικνύεται, από την αύξηση των καταστρεμμένων εμβρύων, καθώς και από τη μείωση του αριθμού των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης [74]. Υπεργλυκαιμικές συνθήκες σε *in vitro* και *in vivo* περιβάλλοντα, συνδέονται με μια υπερέκφραση του γονιδίου *Bax*, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Bc1-2, που προάγει τον θάνατο σε μη εμφυτευμένα έμβρυα τρωκτικών. Αυτή η υπερέκφραση του γονιδίου *Bax*, συσχετίζεται με την αύξηση των αποπτωτικών αλλαγών, η οποία αντιστρέφεται από την δράση της ινσουλίνης [75]

Διαταραχές θυρεοειδούς (υποκλινικός υποθυρεοειδισμός και αντισώματα θυροπεροξειδάσης (TPO-Ab)

Η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς έχει αναφερθεί ως αιτία για επαναλαμβανόμενες αποβολές [76] . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να υπάρχει όσον αφορά την σχέση θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων και αποβολής. Τα θυρεοειδικά αντισώματα, είναι συχνά ανεβασμένα σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές [77].

Κατακερματισμός σπερματικού DNA

Στην μελέτη των Zini et al (2008) σε δείγμα 640 κυήσεων και 122 αποβολών, βρέθηκε ότι ο κατακερματισμός του σπερματικού DNA συσχετίστηκε με κίνδυνο απώλειας εγκυμοσύνης κατά 2,48 φορές [78]. Αντίστοιχα, η μελέτη των Robinson et al (2012), σε 1252 εγκυμοσύνες και 225 αποβολές βρήκε ότι ο κίνδυνος αποβολής αυξάνεται κατά 2 φορές σε άνδρες με υψηλό βαθμό κατακερματισμένου DNA σε σχέση με άνδρες που είχαν χαμηλότερο βαθμό βλαβών [79].

Ανωμαλίες ανατομίας της μήτρας

Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας σχετίζονται με πρόωρο τοκετό της τάξεως του 12-30% [80], ενώ ο μεγαλύτερος κίνδυνος παρουσιάζεται σε γυναίκες με μονόκερο μήτρα [81]. Τέλος τα ινομυώματα, κυρίως τα υποβλεννογόνια και τα υποπλακουντιακά σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού [82]. Ινομυώματα με διάμετρο μεγαλύτερη των 6cm έχουν συσχετισθεί με πρόωρο τοκετό, καθώς μειώνουν τον όγκο της κοιλότητας της μήτρας [83].

Πολυμορφισμοί hCG

Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή των NK κυττάρων στην περιοχή της μήτρας. Η hCG συνδέεται με τον κίνδυνο αποβολής έμμεσα, καθώς συγκεκριμένα ώριμα μόρια hCG είναι αυτά που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων [84]. Η χοριακή γοναδοτροπίνη ανιχνεύεται στο αίμα της μητέρας 10 ημέρες μετά την γονιμοποίηση και η αύξηση επιπεδώνεται στην 10^η και 11^η εβδομάδα της

κύησης [85]. Η καμπύλη αύξησης και μείωσης της συγκέντρωσης της γοναδοτροπίνης συμπίπτει με τον κύκλο ζωής των NK κυττάρων, τον οποίο και ρυθμίζει, συνεπώς εμπλέκεται με αυτόν τον τρόπο στην έκβαση της εγκυμοσύνης κατά την 11^η εβδομάδα της κύησης [86].

Παράγοντες του τρόπου ζωής: αλκοόλ, καφές, κάπνισμα, προχωρημένη μητρική ηλικία και ΔΜΣ > 30 kg/m².

Μέχρι το 2000 οι μελέτες που είχαν γίνει για τη συσχέτιση του αλκοόλ με τον πρόωρο τοκετό είχαν μικρό δείγμα γυναικών. Το 2004, σε μια πιο σύγχρονη μελέτη, οι Albertsen και συνεργάτες μελέτησαν μεγάλο αριθμό γυναικών, 40.000 και διαπίστωσαν ότι όταν η κατανάλωση του αλκοόλ είναι πάνω από 7 ποτά εβδομαδιαίως, παρατηρείται σχετική αύξηση του κινδύνου για πολύ πρόωρο τοκετό (<32 εβδομάδες κύησης), ενώ γυναίκες που καταναλώναν λιγότερο από 4 ποτά εβδομαδιαίως, δεν είχαν αυξημένο κίνδυνο. Η μικρή κατανάλωση αλκοόλ, δεν επηρεάζει την τελική έκβαση της κύησης [87].

Το κάπνισμα σχετίζεται άμεσα με τον πρόωρο τοκετό, καθώς επίσης και με τη ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου. Από το 1976 οι Meyer και συνεργάτες παρατήρησαν αύξηση των πολύ πρόωρων τοκετών μεταξύ 24-34 εβδομάδων κυήσεως σε καπνίστριες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο κίνδυνος ήταν ανάλογος του συνόλου των τσιγάρων, με πολύ μεγάλη διαφορά όταν η γυναίκα καταναλώνει πάνω από 20 τσιγάρα ημερησίως [88]. Η καθημερινή κατανάλωση από τη μητέρα από ένα έως εννέα τσιγάρα ημερησίως έχει αυξημένο σχετικό κίνδυνο για πρόωρο τοκετό από 33 έως 36 εβδομάδες (OR 1.1) [89, 90], ενώ ο σχετικός κίνδυνος για πρόωρο τοκετό

πριν την 32η εβδομάδα κύησης είναι 1.3 [91]. Το κάπνισμα εκτός από το γεγονός ότι σχετίζεται με πρόωρο τοκετό, επιδρά και στην αύξηση του βάρους του εμβρύου και αυξάνει τον κίνδυνο αυτόματης αποβολής, θνησιγενούς εμβρύου και νεογνικού θανάτου [92].

Αυξημένος είναι ο κίνδυνος για πρόωρο τοκετό και στην περίπτωση του παθητικού καπνίσματος. Το 2008 οι Jaddoe και συνεργάτες μελέτησαν τη σχέση του παθητικού καπνίσματος με τον πρόωρο τοκετό, όπου διεπίστωσαν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για πρόωρο τοκετό στις γυναίκες που εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα, ενώ ο κίνδυνος αυξάνει καθώς αυξάνει ο αριθμός των ατόμων που καπνίζουν στο χώρο αυτό [93, 94].

Η συσχέτιση της κατανάλωσης του καφέ με τον πρόωρο τοκετό δεν είναι πιστοποιημένη. Σε παλαιότερες μελέτες υπήρχε μια συσχέτιση της κατανάλωσης καφεΐνης με τον πρόωρο τοκετό, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε στις ακόλουθες μελέτες. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, οι Bech και συνεργάτες δε διαπίστωσαν επίδραση της κατανάλωσης καφεΐνης στην τελική έκβαση της κύησης, αλλά ούτε και στο τελικό βάρος γέννησης του νεογνού [95].

Η διατροφή της μητέρας δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι παράγοντας που επηρεάζει τη διάρκεια της κύησης και την τελική έκβαση του τοκετού. Παρ'όλα αυτά, σε μια μελέτη στην Κίνα το 2002 από τους Ronnenberg και συνεργάτες διεπιστώθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα βιταμινών B6 και B12 αυξάνουν ελαφρώς τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό, ενώ τα επίπεδα του φυλλικού οξέος δεν επηρεάζουν [96]. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, διεπιστώθηκε ότι διατροφή

πλούσια σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να αυξήσει την διάρκεια της κύησης κατά 3-7 ημέρες και να προλάβει τον πρόωρο τοκετό.

Το χαμηλό σωματικό βάρος της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης, καθώς και η χαμηλή πρόσληψη βάρους σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι όταν ο δείκτης μάζας σώματος της γυναίκας κατά την έναρξη της κύησης είναι μικρότερος από 19.8 kg/m², ο κίνδυνος για πρόωρο τοκετό διπλασιάζεται [97, 98]. Επιπλέον, σε περιπτώσεις που η αύξηση του σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου είναι ανεπαρκής (<0,3kg/ εβδομάδα) ο κίνδυνος για πρόωρο τοκετό είναι και πάλι διπλάσιος [99]. Αν και η μητρική παχυσαρκία δε σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό, όταν το αρχικό βάρος έναρξης της μητέρας είναι πάνω από 75 κιλά, ο κίνδυνος για ιατρογενή πρόωρο τοκετό αυξάνει [100].

3.2 Στρες και αποβολή

Η συσχέτιση του stress με τον πρόωρο τοκετό ξεκίνησε με την μελέτη ως προς την ενδογενή έκκριση της επινεφρίνης, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την συστατικότητα της μήτρας [101, 102]. Η πρώτη κλινική έρευνα έγινε από τους Hedegaard και συνεργάτες, όπου σε εξέταση σχεδόν 9000 γυναικών διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά πρόωρου τοκετού κατά το τρίτο τρίμηνο συνδέθηκαν με αυξημένα επίπεδα ψυχολογικού στρες [103, 104].

Ο τρόπος με τον οποίο πιστεύεται ότι το στρες επιδρά στην κύηση είναι μέσω της παραγωγής προσταγλαδινών, οι οποίες μπορεί, είτε να επάγουν

άμεσα την έναρξη του πρόωρου τοκετού, είτε να αυξάνουν την προδιάθεση σε λοιμώξεις, προκαλώντας έτσι έμμεσα, πρόωρο τοκετό [105].

3.3 Έμφυτη ανοσία και αποβολή

Η έμφυτη ανοσία, εξαιτίας του γεγονότος ότι αναγνωρίζει συγκεκριμένα μοτίβα μικροοργανισμών που ομοιάζουν με μοριακά μοτίβα του ανθρώπινου οργανισμού, βρίσκεται σε μία εύθραυστη ισορροπία με το έμβρυο. Τα NK κύτταρα είναι λεμφοκύτταρα και αποτελούν μέρος της έμφυτης ανοσίας. Η εμπλοκή τους στην κύηση προέρχεται από την υπόθεση ότι συμβάλουν στην εισβολή της τροφοβλάστης. Στις γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές φαίνεται ότι τα NK κύτταρα της μήτρας συσχετίζονται με αυξημένα ποσοστά αποβολών.

3.4 Λοίμωξη και αποβολή

Τουλάχιστον 40% του συνόλου των πρόωρων τοκετών σχετίζεται με ενδομήτρια λοίμωξη. Σε πολλές περιπτώσεις είναι δύσκολο να διακριθεί αν η λοίμωξη είναι η αιτία ή η συνέπεια την διαδικασίας που οδηγεί στον πρόωρο τοκετό. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν αρκετά πλέον, δεδομένα που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η λοίμωξη και η φλεγμονή που κινητοποιείται από τη διαδικασία της λοίμωξης, οδηγεί σε πρόωρο τοκετό. Ως κλινική ένδειξη λειτουργεί η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων φλεγμονωδών κυτταροκινών στο αμνιακό υγρό γυναικών με πρόωρο τοκετό, σε σχέση με γυναίκες με φυσιολογική κύηση [106, 107]. Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο η

λοιμώξη προκαλεί πρόωρο τοκετό είναι η ενεργοποίηση του άξονα του εμβρύου. Τόσο τα επίπεδα κορτιζόλης, όσο και ανδρογόνων, είναι αυξημένα σε έμβρυα γυναικών με ενδομήτρια λοίμωξη [108].

Οι σημαντικότερες λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της κύησης είναι η βακτηριακή κόλπωση, η περιοδοντίτιδα της κύησης, οι συστηματικές λοιμώξεις και οι ενδομήτριες λοιμώξεις. Η βακτηριακή κολπίτιδα παρουσιάζεται στο 15-42% των κυήσεων και αυξάνει τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού κατά 2-4 φορές στις ασθενείς [109]. Ο μηχανισμός σύνδεσης της περιοδοντίτιδας με τον πρόωρο τοκετό θεωρεί ότι, τα μικρόβια εισδύουν στην κυκλοφορία του αίματος και συνεπώς στην μητροπλακουντιακή μονάδα μέσω ρωγμών των ούλων. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια της στοματικής κοιλότητας, αποτελούν μια συνεχή πηγή λιποπολυσακχαριτών [LPS], ο οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανοσιακή απόκριση του ξενιστή. Η περιοδοντίτιδα της κύησης που δεν έχει θετική απόκριση στην θεραπεία, αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για πρόωρο τοκετό [110]. Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού και ιδιαίτερα η πνευμονία, έχει συσχετιστεί άμεσα με τον πρόωρο τοκετό [111-113]. Στις επικίνδυνες συστηματικές λοιμώξεις μπορούν να προσμετρηθούν και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, χαμηλού βάρους νεογνό και περιγεννητική θνητότητα [114]. Τέλος, οι ενδομήτριες λοιμώξεις περιλαμβάνουν τις λοιμώξεις του χόριου, του άμνιου ή του πλακούντα και ευθύνονται για την πλειοψηφία των πρόωρων τοκετών πριν την 34η εβδομάδα της κύησης [115, 116].

4. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αποβολής

4.1. Πρώιμη ενεργοποίηση του Υποθάλαμο-Υποφυσιακού άξονα της μητέρας ή του εμβρύου και της Ανοσορρύθμισης, σε καταστάσεις στρες

Ο άξοναςυποθάλαμος, υποφύσης, επινεφριδίων (ΥΥΕ) της μητέρας επηρεάζεται σημαντικά στην εγκυμοσύνη. Το νευρο-ενδοκρινικό σύστημα συνδέει το stress με τον πρόωρο τοκετό, με ενδιάμεσο μεσολαβητή την πλακουντιακή CRH, γι' αυτό και το μητρικό στρες έχει αναφερθεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για πρόωρο τοκετό [117].

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια του στρες, διάφορες ενδοκρινικές αποκρίσεις ενεργοποιούνται. Η υπερκοτιζολαιμία που παρατηρείται κατά την εγκυμοσύνη, οφείλεται στην θετική επίδραση των οιστρογόνων πάνω στην έκφραση του γονιδίου της CRH, η παραγωγή της οποίας επιτελείται αποκλειστικά από τον πλακούντα και τους εμβρυικούς υμένες (χόριο και άμνιο). Κατά τα αρχικά στάδια της κύησης, στην οποία το κύημα από ανοσολογική άποψη μπορεί να χαρακτηριστεί ως ημι-αλλομόσχευμα, η τοπικά παραγόμενη στο ενδομήτριο CRH, διαδραματίζει ρόλο τόσο στην άσηπτη φλεγμονώδη διαδικασία της εμφύτευσης, όσο και στη διαδικασία που προστατεύει την απόρριψη του εμβρύου, από την ανοσολογική απάντηση της μητέρας.

Μελέτες σε επίμυς στα αρχικά στάδια κύησης δείχνουν 3.5 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση CRH στις θέσεις εμφύτευσης σε σχέση με το υπόλοιπο ενδομήτριο. Η συγκέντρωση της CRH στο πλάσμα της μητέρας αυξάνει στην κύηση, ήδη από την 8η με 10η εβδομάδα, φθάνοντας σε 100πλάσια επίπεδα κατά τον όγδοο και ένατο μήνα με μέγιστη τιμή περί τα

4000 pg/ml τη 40η βδομάδα. Κατά την κύηση παράγονται μεγάλες ποσότητες CRH στον πλακούντα. Η CRH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία της κύησης, από την εμφύτευση μέχρι τον τοκετό. Το κύριο ερέθισμα για την δραστηριότητα του άξονα υποθαλάμου, υπόφυσης, επινεφριδίων [ΥΥΕ] της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη, είναι η CRH του πλακούντα. Η διατήρηση και η φυσιολογική εξέλιξη της κύησης συναρτάται με τη δράση της CRH. Το στρες της μητέρας κατά την διάρκεια της κύησης ενεργοποιεί τον ΥΥΕ, με αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση της πλακουντιακής CRH. Το νευρο-ενδοκρινικό σύστημα συνδέει το stress με τον πρόωρο τοκετό, με ενδιάμεσο μεσολαβητή την πλακουντιακή CRH. Γυναίκες με ψυχολογικό ή σωματικό stress κατά την διάρκεια της κύησης, παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για αποβολή ή πρόωρο τοκετό [118].

Η βιολογική προσαρμογή στο θερμικό στρες συνοδεύεται από αλλαγές στις αναλογίες πρωτεϊνών, μεμβρανικών λιπιδίων και του γενικότερου μεταβολισμού. Η παραγωγή των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps), οι οποίες έχουν το ρόλο ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων διαμεσολαβητών, αποτελεί κυτταρική και ιστική απόκριση άμυνας στο θερμικό στρες. Η απόκριση στο θερμικό σοκ προκαλεί μεγάλες μεταβολές στην έκκριση και την ενεργότητα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps), οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το ενδοκρινικό και το ανοσολογικό σύστημα. Η εμπλοκή των εξωκυττάρων πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) περιλαμβάνει επίσης την προαγωγή της ενεργότητας των κυτταροκινών [119].

4.2 Ενεργοποίηση του καταρράκτη της φλεγμονής

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για την απόρριψη του κυήματος στον πρόωρο τοκετό ανήκουν στο ανοσολογικό σύστημα, όπως προαναφέρθηκε. Όπως και σε κάθε απόκριση του ανοσολογικού, έτσι και στην περίπτωση του πρόωρου τοκετού, το πρώτο βήμα της απόκρισης περιλαμβάνει την φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού της μητέρας.

Η έναρξη της φλεγμονώδους αυτής αντίδρασης συνδέεται με αυξημένα επίπεδα έκφρασης των κυτταροκινών TNF α και IL-1 β [119]. Κατά την ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού, οι IL-1 β και TNF- α αφενός προάγουν άμεσα την παραγωγή MMP (μεταλλοπρωτεάσες) από το φθαρτό και το άμνιο, και αφετέρου προάγουν τη δράση των προσταγλανδινών, επάγοντας την έκφραση του COX-2 αλλά και αναστέλλοντας το βασικό μεταβολίτη των προσταγλανδινών (την 15-υδροξυ-δεϋδρογενάση των προσταγλανδινών, PGDH), γεγονός που στηρίζεται από δεδομένα σε πειραματόζωα. Κατά την χορήγηση μολυσματικών παραγόντων, τα εγκυμονούντα πειραματόζωα οδηγήθηκαν σε πρόωρο τοκετό. Συνεπώς, στον ανθρώπινο οργανισμό, το ρόλο των μολυσματικών παραγόντων μπορούν να παίξουν οι συστηματικές λοιμώξεις της μητέρας, όπως και εντοπισμένες ενδομήτριες λοιμώξεις.

Οι λοιμώξεις ευθύνονται για την παραγωγή της φωσφολιπάσης A2, το κομβικό μόριο στην παραγωγή προσταγλαδινών. Η συστηματική λοίμωξη της μητέρας μπορεί να προκαλέσει πρόωρο τοκετό, είτε μετά από υψηλό πυρετό και αφυδάτωση (άρα παραγωγή οξυτοκίνης), είτε μετά από απελευθέρωση στη συστηματική κυκλοφορία προφλεγμονωδών παραγόντων, π.χ. TNF- α , IL-1 β που μπορούν να προκαλέσουν πρόωρη μυομητρική δραστηριότητα [120].

Μία άλλη υπόθεση θεωρεί ότι ο πρόωρος τοκετός είναι το τελικό αποτέλεσμα της φλεγμονώδους αντίδρασης που προκλήθηκε λόγω της παρουσίας μικροβίων στην ενδοαμνιακή κοιλότητα. Η παρουσία των μικροοργανισμών μπορεί να αιτιολογηθεί μέσω της ανιούσας οδού, προσβάλλοντας σταδιακά τα στοιχεία της κύησης και τέλος το έμβρυο. Εναλλακτικά, πιστεύεται ότι οι μικροοργανισμοί προϋπήρχαν και εκδηλώθηκαν κατά την κύηση.

Οι IL-1β και ο TNF-α φαίνεται να είναι οι πρώτες κυτταροκίνες που παράγονται ως αποτέλεσμα δράσης των LPS. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες παράγονται από τα μακροφάγα του φθαρτού, από κύτταρα του χορίου, αλλά και από τροφοβλαστικά κύτταρα. Οι δύο αυτές κυτταροκίνες προκαλούν την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 και F2α από τα ίδια κύτταρα αλλά και την παραγωγή ενδοθηλίνης. Η IL-1β φαίνεται να αυξάνει και την ευαισθησία του μυομητρίου στην οξυτοκίνη [120].

Η φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να θεωρηθεί ολοκληρωμένη, περιλαμβάνοντας τη δράση των IL-6 και IL-8. Η IL-6 παράγεται από τα μακροφάγα του φθαρτού και από τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα ως απόκριση στις πρώτες κυτταροκίνες IL-1β και TNF-α και τα επίπεδά της αυξάνονται στον πρόωρο τοκετό. Τέλος, η IL-8 παράγεται από όλα τα κύτταρα και ο ρόλος της είναι χημειοτακτικός και συγκεκριμένα, αυτός της προσέλκυσης ουδετερόφιλων στην περιοχή. Η απόκριση ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση κολλαγενάσης και ελαστάσης, που συμβάλλουν στην αλλαγή της δομής του τραχήλου και τελικά, στην απόρριψη του κυήματος [120].

5. Πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps)

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Heat shock proteins, Hsps) είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών με κύριο ρόλο την προστασία των κυττάρων από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα [121].

5.1 Κατηγορίες των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps)

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε έξι ομάδες. Στην πρώτη ομάδα βρίσκονται οι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 100-110 kDa και χαρακτηρίζονται ως πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 100 (Hsp100), η δεύτερη ομάδα, η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 90 (Hsp90) περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 83-90 kDa, η ομάδα πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) με μοριακό βάρος 66-78 kDa, οι ομάδες πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60, 40 και 27 (Hsp60, Hsp40 και Hsp27), με μοριακό βάρος 15-30 kDa [122-124]. Ο εντοπισμός τους και η λειτουργία τους απεικονίζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 2.

Πίνακας 2 . Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ Hsp [125]

<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Υποκυτταρική εντόπιση</i>	<i>Λειτουργία</i>
Hsp100	Πυρήνιο	Προστασία επί Stress Θερμοαντοχή
Hsp90	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορά και στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Δέσμευση υποδοχέων στεροειδών ορμονών και πρωτεϊνικών κινασών
Hsp70	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας Ενδοπλασματικό δίκτυο	Αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Σύνθεση ολιγομερών συμπλεγμάτων
Hsp60	Κυτταρόπλασμα	Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών
Hsp40	Κυτταρόπλασμα	Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Ρύθμιση λειτουργίας Hsp70
Hsp27	Κυτταρόπλασμα	Σύνθεση/αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Θερμοαντοχή Δέσμευση στεροειδών ορμονών Κυτταρικός κύκλος

Αρχικά, η κύρια λειτουργία που τους είχε αποδοθεί ήταν αυτή των πρωτεϊνών συνοδών, οι οποίες βοηθούν στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεϊνών, ώστε να αποκτήσουν την τρισδιάστατη δομή τους [126]. Παρόλα αυτά, εκτενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι δράσεις αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών είναι περισσότερες από ότι πιστεύονταν. Ενδεικτικά, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) βρέθηκε πώς παίζουν σημαντικό ρόλο σε νεοπλάσματα, όπως ο καρκίνος του μαστού και συγκεκριμένα, συνδέθηκε με την αυξημένη έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων [125, 126], στη φαρμακευτική αντίσταση που αναπτύσσουν συγκεκριμένοι τύποι νεοπλασμάτων, στην ισχαιμία του μυοκαρδίου [127,128] και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις [125], γι' αυτό και είναι παρούσες στις περιπτώσεις αποβολών/πρόωρου τοκετού.

5.2 Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70)

Πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60)

Η ομάδα πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) είναι εξελικτικά συντηρημένες, καθώς είναι παρούσες στους προκαρυώτες και τους ευκαρυώτες. Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsp60) εκφράζονται πυρηνικά, αλλά εξασκούν τις δράσεις τους σε διάφορα οργανίδια, στο κυτταρόπλασμα, στην επιφάνεια του κυττάρου, αλλά και εξωκυτάρια [129, 130]. Η κύρια δράση τους ως πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας είναι αυτή των μοριακών συνοδών. Συγκεκριμένα, η ομάδα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) αναγνωρίζουν πρωτεΐνες με εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα και δημιουργούν συσσωματώματα με τις ακατάλληλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες [121, 131, 132]. Η λειτουργία τους αυτή υποβοηθάται από τη δραστικότητα ATPάσης που διαθέτουν [133].

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών που εντοπίζονται και στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, όπου ασκούν τη δράση τους ως πρωτεΐνες βοηθοί, μαζί με την ομάδα πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 10 (Hsp10) [134]. Εκτός από τη δράση της ως πρωτεΐνη συνοδός, η ομάδα των Hsp60 εμπλέκεται άμεσα στην αντιγραφή [135] και τη μεταφορά του μιτοχονδριακού DNA [136].

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) εμπλέκονται στην ενδοκυτάρια διακίνηση πρωτεϊνών [137], στη σηματοδότηση ορμονοπεπτιδίων [138], σε προ-αποπτωτικά μονοπάτια και μονοπάτια προ-

επιβίωσης [139], αλλά και σε διάφορα είδη καρκίνου, όπου μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες [140].

Όταν εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) πιθανώς λειτουργούν ως διεγέρτες ανοσοαποκρίσεων [141, 142], καθώς αυξημένα επίπεδα τους στην επιφάνεια του κυττάρου λειτουργεί ως σήμα κινδύνου, ενεργοποιώντας τα δενδριτικά κύτταρα και επάγοντας ανοσολογικές αποκρίσεις με κυτταροτοξική δράση [141-144].

Εξωκυτάρια, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) προσδένονται σε πολλούς υποδοχείς επιφανείας, όπως CD14, CD40, TLR-2 και TLR-4 [141, 145-147]. Η πρόσδεση των Hsp60 στους υποδοχείς αυτούς διεγείρει την αντιγονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να παραχθούν οι προφλεγμονώδης IFN- γ , το οξείδιο του αζώτου (NO), IL-1, IL-6, IL-12 και IL-15, προάγοντας αποκρίσεις των Th1 βοηθητικών T λεμφοκυττάρων [147-149].

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsp60) διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία φαίνεται σε χρόνιες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και καρδιαγγειακές παθήσεις, όπου συνδέεται με την ύφεση της φλεγμονώδους αντίδρασης [141, 150]. Τέλος, όπως και οι υπόλοιπες ομάδες πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας, έτσι και οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsp60) έχουν σημαντική θέση στη φυσική ανοσία, καθώς δρουν ως διεγέρτες των αποκρίσεων της φυσικής ανοσίας, προσδένοντας αντιγονικά πεπτίδια, κατά την ενδοκυτταρική επεξεργασία των αντιγόνων [151].

Πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70)

Η ομάδα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) επιτελεί την λειτουργία της πρωτεΐνης βοηθού για ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών, άρα και κυτταρικών διαδικασιών, όπως των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, αναδίπλωση των πρωτεϊνών που δεν έχουν διπλωθεί σωστά, μεταφορά εκκριτικών πρωτεϊνών στα αντίστοιχα οργανίδια και έλεγχος της ενεργότητας των ρυθμιστικών πρωτεϊνών [150]. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) έχουν ρόλο πρωτεϊνών κυτταρικής οικονομίας. Η ενεργότητά τους αυτή – όπως και με τις Hsp60- προκύπτει από την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με υδρόφοβα πρωτεϊνικά κατάλοιπα, με ATP-εξαρτώμενο τρόπο.

Το εύρος των κυτταρικών τους λειτουργιών προκύπτει μέσω της ενίσχυσης και της διαφοροποίησης των γονιδίων από τα οποία προκύπτουν, κατά τη διάρκεια της εξελικτικής πορείας, την επιλεκτική επιστράτευση βοηθών πρωτεϊνών-συνοδών, ώστε να ολοκληρωθούν συγκεκριμένες λειτουργίες και τη συνεργασία τους με άλλες συνοδές πρωτεΐνες, ώστε να διευρυνθεί το εύρος της δραστηριότητάς τους [125]. Τα ομόλογα των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) αποτελούνται από μία αμινοτελική περιοχή ATPάσης, βάρους 45 kDa και μία καρβοξυτελική περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος, βάρους 25 kDa, η οποία μπορεί να υποδιαιρεθεί σε μία υποπεριοχή δομής β-σάντουιτς των 15 kDa και σε μία καρβοξυτελική υποδομή των 10 kDa α-έλικας [125].

Ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (Hsp70) στην αναδίπλωση ακατάλληλα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μπορεί να διαιρεθεί 1)

στις δραστηριότητες της πρόληψης συσσωματωμάτων, 2) προώθησης της αναδίπλωσης στην φυσιολογική μορφή και 3) στην διαλυτοποίηση και αναδίπλωση των συσσωματωμένων πρωτεϊνών [150]. Η διαλυτοποίηση των υποστρωμάτων τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 100 (Hsp100) [125].

Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που φαίνεται να ρυθμίζονται μετά την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70). Οι ομάδες των πρωτεϊνών αυτών περιλαμβάνουν πυρηνικούς υποδοχείς, κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες. Μέσα από τις αλληλεπιδράσεις αυτές, οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsp70) παίρνουν μέρος στην μετάδοση του σήματος, στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μέσα από τις λειτουργίες τους αυτές είναι κατανοητό ότι οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsp70) είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την ανάπτυξη και για άλλες διαδικασίες, όπως η ογκογένεση, οι νευροεκφυλιστικές και αυτοάνοσες ασθένειες, οι ιικές λοιμώξεις και το γήρας [152].

5.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) στην ανάπτυξη του εμβρύου

Εκτός του κύριου ρόλου των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps), ως μοριακών συνοδών έχει αναδυθεί και ο ρόλος τους στην εμβρυογένεση. Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) φαίνεται ότι συνδέονται άμεσα με την φυσιολογική και μη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη [153].

Κατά την εμβρυογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση είναι ιδιαίτερα ενεργές ως διαδικασίες, μαζί με τη γονιδιακή έκφραση και την πρωτεϊνοσύνθεση, συνεπώς, η λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (Hsps), όπως και η αλλαγή της μπορεί να παίξει πολύ σημαντικό ρόλο [154]. Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsps) θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσω της δράσης τους ως μοριακοί συνοδοί, κυρίως στην κυτταρική ανάπτυξη, συνδέοντάς τες με τη φυσιολογική και μη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου [155, 156]. Για τη μελέτη του ρόλου των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (Hsps) στην ανάπτυξη του εμβρύου, έχει αναπτυχθεί ένα μοντέλο πρόωρου τοκετού (PTD) σε ποντίκια, που προκαλείται από την ένεση χαμηλών δόσεων βακτηριδιακής λιποπολυσακχαρίδης (LPS) [157, 158]. Η LPS διεγείρει τον διαμεμβρανικό υποδοχέα τύπου Toll (TLR)-4 (Toll Like Receptor 4) και ρυθμίζει την σειρά των προ-φλεγμονωδών φαινομένων που σχετίζονται με αυτόν τον υποδοχέα. Στο μοντέλο μας, η διέγερση με LPS οδηγεί σε υπερπαραγωγή του παράγοντα νέκρωσης όγκων-άλφα (TNF α) τόσο στους μητρικούς όσο και στους εμβρυϊκούς ιστούς. Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης μετά από LPS μείωσε την παραγωγή TNF α και καθυστέρησε τον επαγόμενο από LPS πρόωρο τοκετό (PTD). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ της διέγερσης TLR-4 από LPS και PTD.

Ένας κοινός παρονομαστής των επιδημιολογικών καταστάσεων που συνδέονται με τον PTD είναι η υπερπαραγωγή των μοριακών προτύπων που σχετίζονται με τον κίνδυνο (DAMPs). Ως DAMPs ορίζονται και οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsps) που είναι εξαιρετικά διατηρημένα μόρια τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και προκαρυωτικούς οργανισμούς [159]. Δεδομένου ότι οι

πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας είναι αρχέτυπα μόρια που παράγονται υπό στρεσογόνες συνθήκες, όπως βλάβη ιστού ή φλεγμονή, αναφέρονται συχνά ως κύρια παραδείγματα των DAMP [160-162]. Η έκφρασή τους συνδέεται με μια σειρά λειτουργιών που κυμαίνονται από τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μέχρι την διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος [2, 5]. Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας ταξινομούνται παραδοσιακά σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε διαφορετικές οικογένειες των 105, 90, 70 και 60 kDa.

Από ανοσολογική άποψη, οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας έχουν προσελκύσει το έντονο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsps), ιδιαίτερα η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60), προσέλκυσε αρχικά την προσοχή ως ιδιαίτερα ανοσογόνο μόριο ικανή να ενεργοποιήσει έναν μεγάλο αριθμό T κυττάρων [163]. Στη συνέχεια, η αναγνώριση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) και πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) από αντισώματα και T κύτταρα τους εμπλέκει σε μια ποικιλία αυτοάνοσων και φλεγμονωδών καταστάσεων [164]. Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60, 70) συνδέονται με TLR4 ανοσοκυττάρων που διεγείρουν έμφυτες ανοσοαποκρίσεις. Με βάση τους ρόλους διαμόρφωσης των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας για τις έμφυτες ανοσοαποκρίσεις, ο στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε εάν η ισορροπία των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60, 70) στον ορό, μπορεί να συσχετιστεί με αυτόματη αποβολή.

Οι μέχρι στιγμής μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου 100 πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Hsps) σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη, από τις οποίες, η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) εμφανίζει την

μεγαλύτερη έκφραση. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα γονίδια των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) σχετίζονται με διαφορετικές αναπτυξιακές φάσεις, όπως και με το είδος του ιστού [169].

Παρόλο που δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένη η έκφραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) σε έμβρυα, έχειδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) εκφράζονται σε εμβρυονικούς ιστούς διάφορων ζώων [173]. Η μέχρι τώρα πεποίθηση είναι ότι οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) μπορούν να προστατεύσουν την εμβρυική ανάπτυξη, αλλά επίσης να παρεμβληθούν σε αυτή, οδηγώντας σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [170]. Ο λόγος για τον οποίο μπορεί να έχουν αυτό το διπλό ρόλο είναι διότι οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) λειτουργούν ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, διατηρώντας την ισορροπία των δύο διεργασιών, ώστε να επιβιώσει ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων [169].

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70), κατά την εμβρυονική ανάπτυξη ασκούν τη δράση τους μαζί με τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 47 (Hsp47) ώστε να προστατεύσουν το έμβρυο από στρες, υπερθερμία, βαρέα μέταλλα, οξειδωτικό στρες και άλλους στρεσογόνους παράγοντες [174]. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) δρουν μαζί με τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 10 (Hsp10), κυρίως για την σωστή αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, συμμετέχοντας στην απόκριση του εμβρύου στο στρες [169]. Στη μελέτη των Zhouetal (2010)δείχθηκε ότι τα μοτίβα έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) κατά την εμβρυονική ανάπτυξη μεταβάλλονται

με την παρουσία στρες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη και συνεπώς, σε μη βιώσιμο οργανισμό [169].

5.4 Ο ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) στην αποβολή

Η επίδραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) στην επιβίωση του εμβρύου δεν περιορίζεται μόνο στα αναπτυξιακά του μοτίβα, αλλά συνδέεται και με τις υπόλοιπες λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών.

Όντως, οι βακτηριακές πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) αποτελούν το ισχυρότερο ανοσογόνο για τον ανθρώπινο οργανισμό και οι επίτοποί τους αποτελούν τους κοινότερους βακτηριακούς επιτόπους για τον ανθρώπινο οργανισμό. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη ή επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ίδιο επίτοπο, βακτηριακής ή ανθρώπινης προέλευσης μπορεί να καταλήξει στην ανάπτυξη ανοσίας στις συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp 60) [167].

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) εκφράζονται επίσης και κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης στο έμβρυο και στον οργανισμό της μητέρας [167]. Ο τερματισμός της εγκυμοσύνης στα αρχικά στάδια μπορεί να περιλαμβάνει την έκθεση των συμπλόκων των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) και των πατρικών αντιγόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα την επαγωγή της αυτοανοσίας κατά των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60). Σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις από μικροοργανισμούς που περιείχαν

πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) παρατηρήθηκε ότι έπασχαν από υπογονιμότητα. Επίσης, η ανίχνευση επιπέδων πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) στην περιοχή της μήτρας συνδέονται με την εμπλοκή των πρωτεϊνών αυτών με προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού της μητέρας, οι οποίοι μπορεί να παρεμβληθούν στην ανάπτυξη του εμβρύου και να οδηγήσουν στην απόρριψή του [167].

Η επίδραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) στην πρώιμη απόρριψη του εμβρύου μελετήθηκε σε περιπτώσεις τεχνητής γονιμοποίησης. Το εύρημα που επιβεβαίωσε την υπόθεση της παρεμβολής των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) ήταν η επώαση του αναπτυσσόμενου εμβρύου παρουσία μητρικού ορού. Στις μητέρες που υπήρχαν αυτοαντισώματα ενάντια στις ανθρώπινες πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) παρατηρήθηκε διακοπή της ανάπτυξης του εμβρύου, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και ενάντια στις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) [167].

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) είναι από τις πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται κατά την εγκυμοσύνη και φαίνεται ότι τα επίπεδα στρες που παράγονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μπορεί να εξασφαλίζουν τη βέλτιστη δραστηριότητα των πρωτεϊνών αυτών [167]. Κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης, σημαντικό ρόλο παίζει και η διαδικασία της αυτοφαγίας, η οποία λειτουργεί ως μηχανισμός απόπτωσης για τα πλεονάζοντα κύτταρα και για τη δημιουργία των ομάδων κυττάρων, από τα οποία θα προκύψουν οι διάφοροι ιστοί. Ο ρυθμός της αυτοφαγίας μειώνεται με την ανάπτυξη του εμβρύου [168], ενώ κατά την ίδια περίοδο είναι αυξημένη η παραγωγή των πρωτεϊνών

Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70), γεγονός που τις συνδέει με τον περιορισμό της διαδικασίας.

Κάτω από συνθήκες αυξημένου στρες, η ισορροπία της αυτοφαγίας και της έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) διαταράσσεται. Κάτι τέτοιο παρατηρείται σε επιπλοκές όπως η προεκλαμψία, όπου τα υπερβολικά επίπεδα στρες οδηγούν σε συστηματική φλεγμονή, η οποία προκαλεί πλακουντιακές και ενδοθηλιακές βλάβες [169]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αυτοφαγία αυξάνεται στην περιοχή του πλακούντα, με στόχο την αύξηση της επιβίωσης του κυήματος στο αλλαγμένο περιβάλλον [170], το οποίο όμως μπορεί να οδηγήσει και στην αναστολή της ανάπτυξης του εμβρύου, καθώς μειώνεται η μεταφορά θρεπτικών από τη μητέρα προς το έμβρυο μέσω του πλακούντα [171]. Παράλληλα, αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) σε ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο επίπεδο, σε μία προσπάθεια καταστολής της αυτοφαγίας, η οποία όμως μπορεί να οδηγήσει σε παύση της εμβρυϊκής ανάπτυξης [167].

Η φλεγμονή που δημιουργείται στην περιοχή του πλακούντα συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70), από τις εμβρυϊκές μεμβράνες [172], την αμνιακή κοιλότητα [173], τον πλακουντιακό ιστό και την κυκλοφορία της μητέρας [174]. Η αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) σε τέτοιες περιπτώσεις οδηγεί στην αναστολή της αυτοφαγίας, η οποία έχει δείχθει ότι συνδέεται με πρόωρη γέννα στα ποντίκια [175], όπως έδειξε και μία πιο πρόσφατη μελέτη [176].

5.50 ρόλος των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) στην έμφυτη ανοσία

Η ομάδα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) ήταν και η πρώτη που αναγνωρίστηκε για την αντιγονοπαρουσιαστική της δράση. Συγκεκριμένα, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 70(Hsp70) μπορούν να προσδέσουν αντιγονικά πεπτίδια και να τα παρουσιάσουν στο σύμπλοκο MHC I, επεκτείνοντας τις λειτουργίες τους ως μόρια συνοδοί [177].

Οι δράσεις των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsps60 και 70) έναντι σε μικρόβια έχουν μελετηθεί καλύτερα σε ασθενείς με λοιμώξεις από *Escherichia Coli*, όπου έχει αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) χρησιμοποιούν τους TLR2 και 4 για τη μετάδοση σημάτων [178-182]. Παρόλα αυτά, οι δράσεις των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp 60 και 70) δεν τις τεκμηριώνουν ως καθαυτού μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με τον κίνδυνο, αλλά ως επικουρικά μόρια των DAMPs, όπως αναλύθηκε και σε προηγούμενη ενότητα. Η κυριότερη λειτουργία που έχει αποδοθεί στις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) είναι αυτή των εκκινήτων της έμφυτης ανοσίας, διεγείροντας την δράση διάφορων κυτταροκινών και αλληλεπιδρώντας με τα δενδριτικά κύτταρα και τα NK κύτταρα, για την ωρίμανσή τους.

Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η δράση αυτών των δύο ομάδων πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) ασκείται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα μόρια. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της

πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp 70), οι Bausinger et al [183] και Gao et al [184, 185] έδειξαν ότι η δράση αυτής της ομάδας πρωτεϊνών χρειάζεται την παρουσία LPS και ότι είναι ρυθμιζόμενη από τη θερμοκρασία αντίστοιχα. Το ίδιο έδειξαν και για τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) [185].

Παρόλα αυτά, η παρουσία των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) στην αιματική κυκλοφορία παρείχαν κάποια δεδομένα για την πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση των πρωτεϊνών αυτών [186]. Παρόλα αυτά, οι ενδείξεις για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) με τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και συνεπώς, τις προ-φλεγμονώδεις ιδιότητές τους παραμένουν, προσθέτοντας την πιθανότητα αντι-φλεγμονώδων ιδιοτήτων επίσης [186].

Τέλος, οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp 60 και 70) πιθανά να έχουν δράση κυτταροκινών, αν και δεν τεκμηριώνεται σαφώς από όλες τις διαθέσιμες μελέτες [187]. Παρόλα αυτά, οι ενδογενείς πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με τον TLR-4 και να μεταφερθούν τα σήματά τους μέσω του συμπλόκου CD14/TLR-4, ακολουθώντας το μονοπάτι του NF-κB και των MAPKs [178-181, 188].

Αυτή η ενεργοποίηση των μηχανισμών της έμφυτης ανοσίας από τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) θεωρείται ότι συμβάλει στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων και της χρόνιας φλεγμονής [189]. Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) είναι παρούσες σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους και η σύνδεσή τους με τον TLR-4

μπορεί να αποτελεί και την πρωτότυπη πρόσδεση των ενδογενών τους προσδετών, καθώς όλες οι ομάδες πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) διαθέτουν την ίδια ικανότητα πρόσδεσης στο σύμπλοκο CD14/TLR4 [187].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 . Ασθενείς και Μέθοδοι

1.1 Σχεδιασμός της κλινικής μελέτης

Η παρούσα έρευνα αποτελεί προοπτική μελέτη, η οποία διεξήχθη σε έγκυες γυναίκες υπό ιατρική παρακολούθηση στο 3^ο τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Αττικού Νοσοκομείου, κατά την περίοδο 2010-2012. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Αττικού νοσοκομείου (αριθμός έγκρισης: 4/10-3-2011). Για την συμμετοχή στη μελέτη, δόθηκε γραπτή φόρμα συναίνεσης και υπογράφηκε από όλες τις έγκυες γυναίκες. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, όλες οι έγκυες από τις οποίες απομονώθηκε περιφερικό αίμα κατά την 9^η-12^η εβδομάδα της κύησης όταν ελέγχθηκαν για προγεννητικές ανωμαλίες, συμπεριλήφθηκαν στην ιατρική παρακολούθηση. Το πρωτόκολλο και η φόρμα συναίνεσης επέτρεψε τη συλλογή κλινικών πληροφοριών και μετρήσεων πρωτεϊνικών μορίων και μεταβολιτών, για τη συσχέτισή τους με το αποτέλεσμα της κύησης. Δεν θεωρήθηκε σχετικό να αναλυθούν δείγματα πρωιμότερων χρονικών στιγμών, καθώς δεν αποτελεί μέρος της καθημερινής κλινικής πρακτικής.

Τα δείγματα αίματος αποκτήθηκαν με λήψη αίματος διά βελόνης σε ένα αντιβράχιο, κάτω από στείρες συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια ελεύθερα πυρετογόνων (BecktonDickinson). Ο ορός των συμμετεχόντων προετοιμάστηκε μετά από φυγοκέντρηση και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που συλλέχθηκαν για κάθε γυναίκα περιλαμβάνουν: αριθμό κυήσεων, Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), ιστορικό αποβολών, προεκλαμψία και εκλαμψία, χρόνιες ασθένειες ή

εκ γενετής λοιμώξεις, ύπαρξη ή απουσία προηγούμενης αποβολής και εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό.

Ο πρώτος στόχος της μελέτης ήταν η αναδρομική σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (HSP60 και HSP70) στον ορό γυναικών που απέβαλλαν έναντι σε αυτές που δεν απέβαλλαν. Για να λάβει η σύγκριση αυτή την τελική της μορφή, ακολούθησε επιλογή των συμμετεχόντων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, όλες οι γυναίκες που είχαν αποβολή επιλέχθηκαν για να συμμετέχουν στη μελέτη, αποτελώντας την ομάδα μελέτης. Οι αποβολές ορίστηκαν ως οι εγκυμοσύνες που τελείωσαν με αποβολή πριν τις πρώτες 20 εβδομάδες της κύησης [190]. Οι ακόλουθες περιπτώσεις αποβολής αποκλείστηκαν από περαιτέρω ανάλυση: α) ιστορικό λοίμωξης από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C και από τον ιό HIV, β) λοίμωξη από ερυθρά, CMV, *Toxoplasma gondii* και *Treponema pallidum*, γ) ιστορικό οποιαδήποτε αυτοάνοσης νόσου, δ) εγκυμοσύνη μετά από τεχνητή γονιμοποίηση, ε) προεκλαμψία και στ) οποιοσδήποτε ανωμαλίες της μήτρας που ανιχνεύθηκαν με υπερηχογράφημα την ημέρα που πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος αίματος.

Η ομάδα ελέγχου επιλέχθηκε με βάση τους φυσιολογικούς τοκετούς με μία προσέγγιση δύο βημάτων: αρχικά, όλες οι γυναίκες που ανήκαν στις κατηγορίες α-στ που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο αποκλείστηκαν. Έπειτα, επιλέχθηκε δείγμα αναλογίας 2:5:1 μεταξύ των συμμετεχόντων. Τα κριτήρια επιλογής περιλάμβαναν την ηλικία, τον Δείκτη Μάζας Σωματος (ΔΜΣ) της μητέρας κατά την σύλληψη, ιστορικό προηγούμενων αποβολών και αριθμό κυήσεων. Η αναλογία 2:5:1 επιλέχθηκε για ισχύ 90% σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, μετά τον προσδιορισμό της

υπόθεσης ότι θα πρέπει να βρεθεί ένα κατώτερο κατωφλικό επίπεδο για την αναλογία πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 προς 70 (Hsp60/Hsp70), το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με αναλογία πιθανοτήτων (oddsratio, OR) μεγαλύτερη του 6 για πρώιμες κυήσεις, υποθέτοντας ότι τα ποσοστά πρώιμων κυήσεων στο συνολικό πληθυσμό με τιμές μικρότερες των κατωφλικών θα ανέρχονταν στο 30% και ότι η μεταβλητή συσχέτισης της έκθεσης μεταξύ των ταιριασμένων περιστατικών θα ήταν 0,8.

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (HspP60 και Hsp70) μετρήθηκαν στον ορό δύο φορές με τη χρήση δοκιμασίας ανοσοαπορροφητικού ενζύμου, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Abcam, Cambridge, UK). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 0.2 ng/ml για την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) και 0.39 μg/ml για την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60).

1.2 Μελέτη σε πειραματόζωα

Για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση του λόγου πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60/70 (Hsp60/Hsp70) με τις πρώιμες κυήσεις, πραγματοποιήθηκε παράλληλα και μία μελέτη σε μυσ. Η μελέτη έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής για Πειραματική Χειρουργική της Κτηνιατρικής Διεύθυνσης της Περιφέρειας Αττικής, σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, σε συμφωνία με την απόφαση 63/2010 του Διευθυντικού Συμβουλίου της Ε.Ε. (αριθμός άδειας 1852/05-06-2015). Κατά την περίοδο αδειοδότησης, η ανάγκη για αρχικά πειράματα πρώιμων κυήσεων δεν εγκρίθηκε, καθώς θεωρήθηκε ότι αποτελούσε ένα καλομελετημένο και δημοσιευμένο μοντέλο [191-193]. Για την

ελαχιστοποίηση του άλγους των ζώων, τα πειράματα διεξήχθησαν κάτω από ελαφρά αναισθησία με αιθέρα, ενώ υπόθετα παρακεταμόλης χορηγήθηκαν κάθε 12 ώρες, για τις επόμενες 48 ώρες μετά τις ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις.

Αρσενικά και θηλυκά ποντίκια C57BL/6 ηλικίας 8 με 10 εβδομάδων αγοράστηκαν από το ινστιτούτο Παστέρ (Βάρη, Ελλάδα). Τα ποντίκια εγκλιματίστηκαν για 72 ώρες πριν την έναρξη των πειραμάτων. Μετά τον εγκλιματισμό, διέμνηναν σε κλουβιά με συνεχείς αλλαγές αέρα (70 αλλαγές την ώρα) για να εξασφαλιστεί η στείρωση των συνθηκών (IVC SYSTEM, Techniplast, Buguggiate, Italy). Η τροφή τους αποτελούνταν από βασικά θρεπτικά στοιχεία (τύπου 4f 18), ενώ είχαν πρόσβαση σε νερό *adlibitum*. Η θερμοκρασία δωματίου κυμαινόταν μεταξύ 18-22 °C, η σχετική υγρασία είχε εύρος μεταξύ 55% και 65% και τέλος πραγματοποιούνταν κύκλος εναλλαγής φωτός και σκότους των 12 ωρών.

Ζευγάρια ενός αρσενικού και ενός θηλυκού ποντικίου συστεγάζτηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά για 3 ημέρες. Τα θηλυκά ποντίκια με κοιλικά βύσματα μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά κλουβιά, με πρόσβαση σε φαγητό και νερό *adlibitum*. Σε αυτά τα θηλυκά, για τον προσδιορισμό της ηλικίας κύησης, η ημέρα 1,5 της συστέγασης θεωρήθηκε ως η ημέρα 0 της κύησης. Τα κυοφορούντα θηλυκά ποντίκια ζυγίζονταν σε καθημερινή βάση. Τα θηλυκά ποντίκια που δεν κυοφόρησαν μετά τη συστέγαση, δεν ξαναχρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα. Την ημέρα 14 της κύησης, τα κυοφορούντα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν ελαφρά με μεθοξυλφουράνιο (2,2-διχλωρο-1,1 διφλουορεθυλ μεθυλ-αιθέρα σε βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο 0,01% w/w) και χωρίστηκαν τυχαία στις ακόλουθες δύο ομάδες:

- Ομάδα Α (ψευδο-χειρουργημένη ομάδα ελέγχου, n=4), σε ποντίκια ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 200 ml αποστειρωμένο ύδωρ.
- Ομάδα Β (πρόωρος τοκετός, n=6) σε αυτά τα ποντίκια ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 2mg/kg LPS (O55:B5, SigmaChemicalCo., St. Louis, MO) διαλυμένη σε αποστειρωμένο ύδωρ, σε όγκο 200 ml

Δώδεκα ώρες έπειτα, συμπτώματα τοκετού εμφανίστηκαν στα ποντίκια της ομάδας Β, όπως διαστολή του τραχήλου και κοιλιακή αιμορραγία. Σε αυτό το σημείο, τα ποντίκια και των δύο ομάδων θυσιάστηκαν μετά από αναισθησία με μεθοφλουράνιο. Ακολουθώντας μία κεντρική κοιλιακή τομή σε άσηπτες συνθήκες, απομακρύνθηκαν τα σπλάχνα της αριστερής πλευράς και 2 ml αίματος απομονώθηκαν από την κοίλη φλέβα κάτω από άσηπτες συνθήκες. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε και ο ορός απομονώθηκε. Τμήματα ήπατος κόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά αποστειρωμένα δοχεία. Τότε, πραγματοποιήθηκε τομή διαμέσου της ωοθήκης για την απομάκρυνση όλων των εμβρύων και πλακούντων. Τα τμήματα ήπατος, τα έμβρυα και οι πλακούντες ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml 0.9% χλωριούχου νατρίου και φυγοκεντρήθηκαν, το εναιώρημα φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση του πειράματος.

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) μετρήθηκαν στον ορό και στα εναιωρήματα δύο φορές με τη χρήση δοκιμασίας ανοσοαπορροφητικού ενζύμου, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Abcam, Cambridge, UK). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 0.2 ng/ml για την Hsp70 και 5,1 pg/ml για την Hsp60.

Για την απομόνωση του ολικού RNA, οι απομονωμένοι ιστοί τοποθετήθηκαν στο kitRNAlater (Qiagen; Hilden, Germany). Το RNA απομονώθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο RNAeasyPlusminikit (QIAGEN), χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή ιστών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 1 µgRNA από κάθε δείγμα αντιγράφηκε αντίστροφα, με τη χρήση του iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Οι συνθήκες της αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνουν τις εξής επωάσεις: 5 min στους 25°C, 30 min στους 42°C και 5 min στους 85°C.

Ακολούθησε ενίσχυση των τμημάτων ενδιαφέροντος με δοκιμασία αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), χρησιμοποιώντας το iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) και τους εκκινητές που παρουσιάζονται κάτωθεν. Για την κανονικοποίηση της ποσότητας του ολικού RNAτης κάθε αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GADPH* ως γονίδιο εσωτερικού ελέγχου στο σύστηµα*iQ™ 5 Cycler*(BioRad). Όλοι οι εκκινητές αγοράστηκαν από την εταιρεία IDT (IDT, San Jose, California,USA) και είχαν τις ακόλουθες αλληλουχίες: για την αλληλουχία πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) πρόσθιος 5'- CGT TGC CAA TAACACAAACG-3' και ανάστροφος 5'-CTTCAGGGGTTGTCACAGGT-3', για την hsp70 πρόσθιος 5'-TGG TGC TGA CGA AGA TGA AG-3' και ανάστροφος 5'-AGG TCG AAGATG AGC ACG TT-3' και για την GAPD πρόσθιος 5'- AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3' και ανάστροφος 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'. Το πρόγραμμα ενίσχυσης συμπεριλάμβανε ένα αρχικό πρόγραμμα αποδιάταξης στους 95°C για 1 min, ακολουθήθηκε από 40 κύκλους αποδιάταξης για 30 δευτερόλεπτα στους 95°C, πρόσδεσης συμπλόκου στους 55°C και ενίσχυσης για 1 λεπτό στους

72°C. Η ενίσχυση ακολουθούνταν από μία καμπύλη αποδιάταξης από τους 55°C στους 95°C, αυξάνοντας της θερμοκρασία κατά 0,5°C κάθε φορά. Ένα τυφλό δείγμα εισήχθη στο πείραμα κάθε φορά. Δύο δείγματα μήτρας που προήλθαν από δύο θηλυκά ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Η ειδικότητα επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης σε 3% w/v πηκτή αγαρόζης, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Τα αντίγραφα των γονιδίων μετρήθηκαν μετά από προσαρμογή με τα αντίγραφα των αρνητικών κοντρόλ, χρησιμοποιώντας προσαρμογή ddCt.

1.3 Στατιστική ανάλυση

Σύγκριση των δημογραφικών παραμέτρων των γυναικών με αποβολή και φυσιολογικών κυήσεων πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία του Student για ποσοτικές μεταβλητές και με τη δοκιμασία ακριβείας του Fisher για ποιοτικές μεταβλητές. Σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60, Hsp70), (Hsp60/Hsp70) στον ορό της μητέρας πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Mann-WhitneyU. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με καμπύλες ROC (Receiver Operator Characteristics) για να ταυτοποιηθεί το κατωφλικό σημείο που θα χρησιμοποιούνταν για να διακρίνει μεταξύ των γυναικών με αποβολή και αυτών με φυσιολογική κύηση. Οι αναλογίες πιθανοτήτων (oddsratio, OR) και διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (confidence intervals, CI) για την αποβολή βασίστηκαν στο κατωφλικό σημείου που υπολογίστηκε και προσδιορίστηκαν με την στατιστική δοκιμασία κατά Mantel-Haenszel. Συγκριτική μελέτη του χρόνου μέχρι τον τοκετό σε

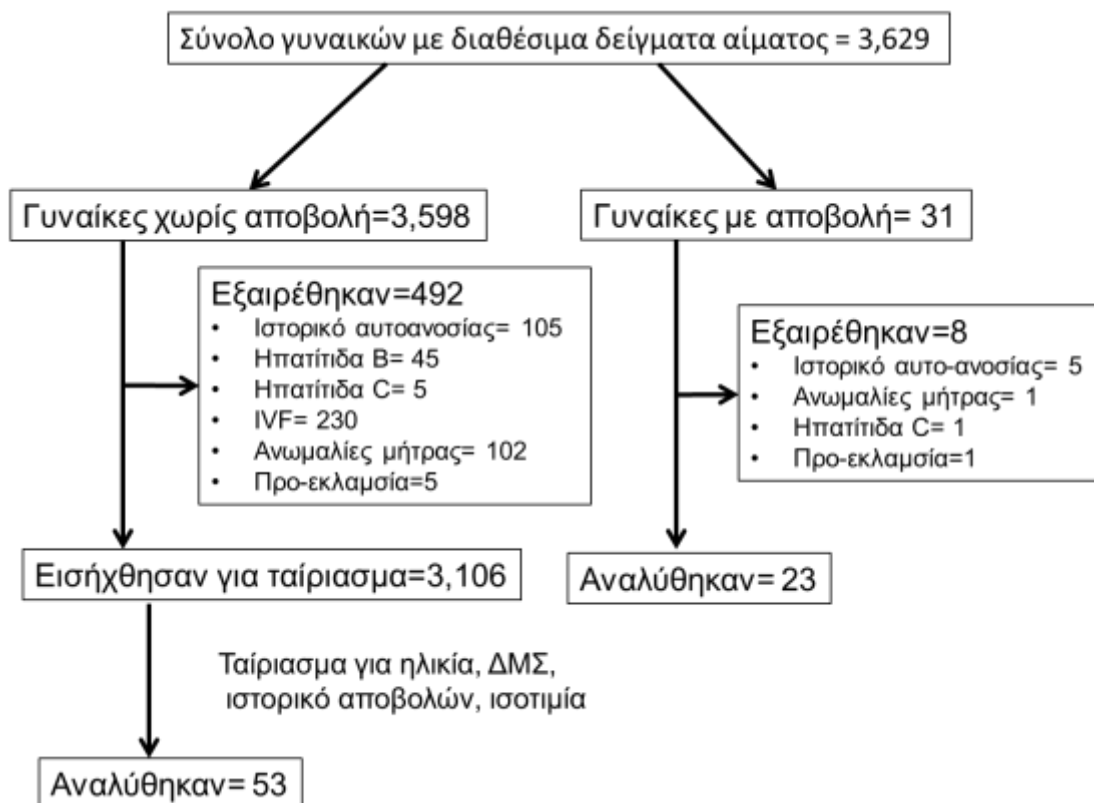
σχέση με το προσδιορισμένο κατωφλικό σημείο πραγματοποιήθηκε με τεστ λογαριθμικής κλίμακας (log-rank test).

Η δοκιμασία Mann-WhitneyU χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του λόγου πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp/Hsp70) στον πλακούντα, τα έμβρυα, τον ορό της μητέρας και του ήπατος μεταξύ των δύο ομάδων ποντικών. Τιμές του κριτηρίου p μικρότερες από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2. Αποτελέσματα

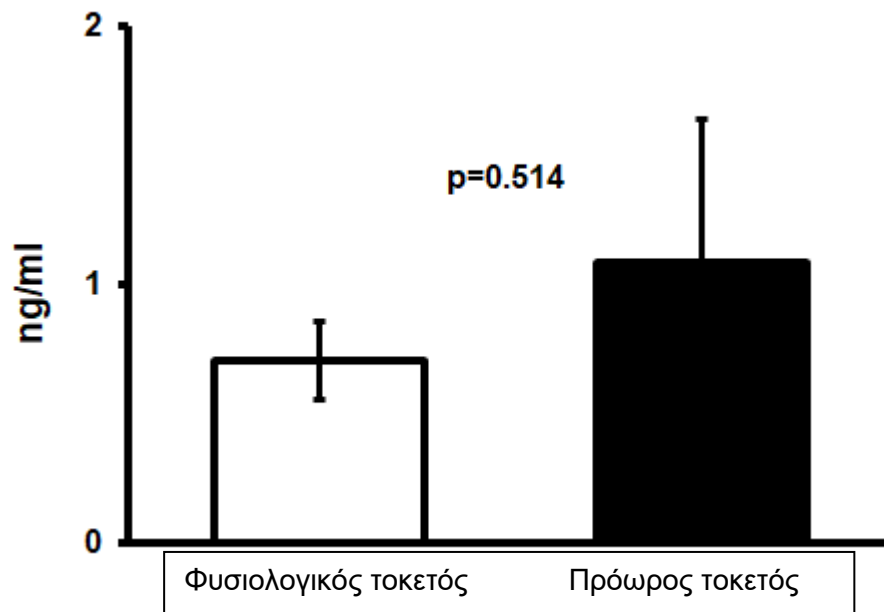
Το διάγραμμα ροής της κλινικής μελέτης φαίνεται στον Πίνακα 1. Από ένα σύνολο 3,629 γυναικών από τις οποίες ήταν διαθέσιμες, αναλύθηκαν 76.Είκοσι και τρεις γυναίκες κατηγοριοποιήθηκαν στην ομάδα των αποβολών και 53 στην ομάδα ελέγχου με φυσιολογικό τοκετό. Οι δύο ομάδες ήταν απόλυτα συγκρίσιμες πλήρως, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.

Σχήμα 1. Διάγραμμα της κλινικής μελέτης. Συντομογραφίες: BMI: Δείκτης Σωματικής Μάζας, IVF: Γονιμοποίηση in-vitro

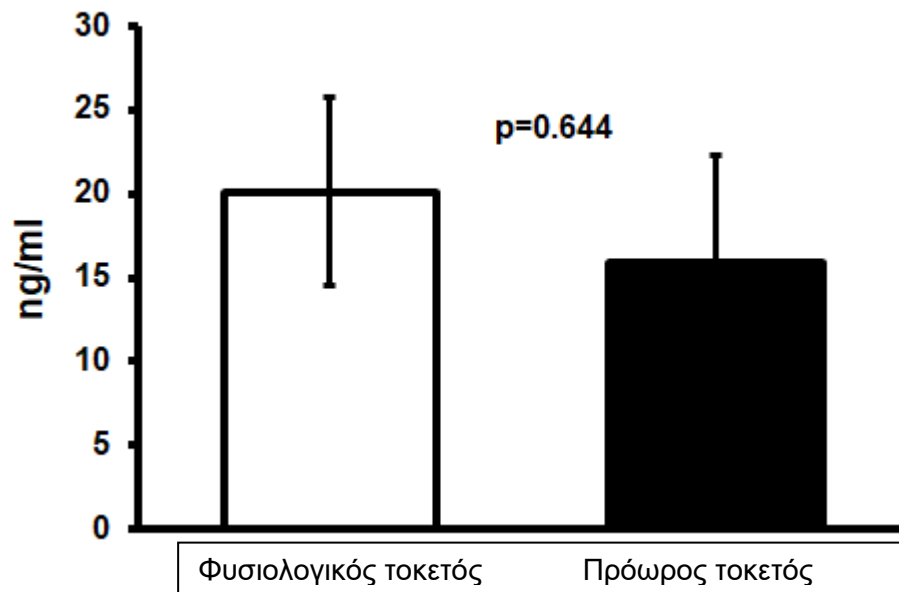


Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) στον ορό απεικονίζονται στις εικόνες 1 και 2. Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γυναικών με αποβολή και αυτών με φυσιολογικό τοκετό. Παρόλα αυτά, η αναλογία πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) ήταν υψηλότερη μεταξύ των γυναικών που είχαν αποβολή, σε σχέση με τους φυσιολογικούς τοκετούς ($p=0.035$, Εικόνα 3).

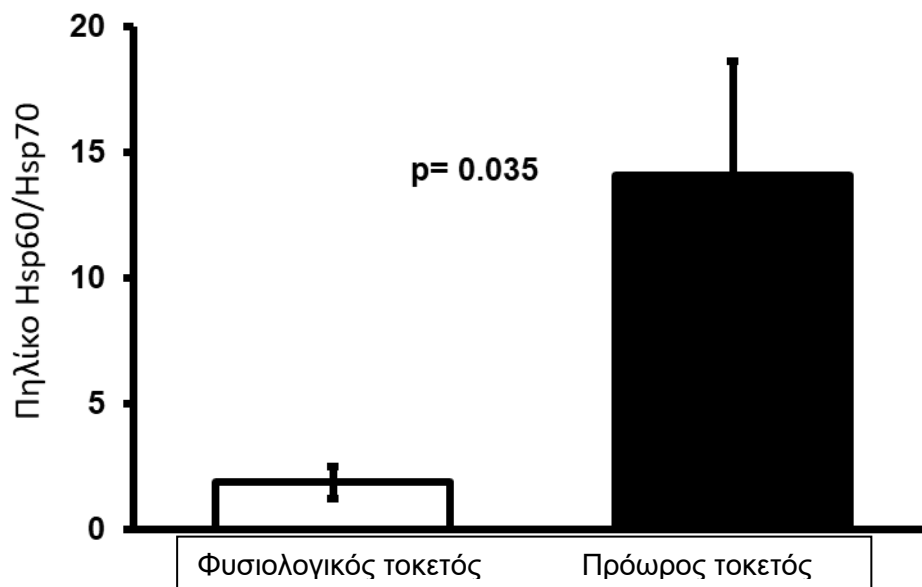
Σχεδιάστηκε καμπύλη ROC για να βρεθεί το κατωφλικό σημείο που θα μας επιτρέψει να διαχωρίσουμε μεταξύ των γυναικών που θα εμφανίσουν αποβολή και αυτών με φυσιολογική κύηση (Εικόνα 4). Η καμπύλη ROC παρείχε ένα σημαντικό τμήμα AUC (0.734, 95%CI: 0.516-0.953, $p=0.036$). Μία κατωφλική τιμή μεγαλύτερη ή ίση του 6 βρέθηκε ότι μπορεί να διακρίνει μεταξύ των γυναικών με αποβολή και αυτών με φυσιολογικό τοκετό με ευαισθησία 60%, ειδικότητα 81,8%, θετική προγνωστική αξία 81,8% και αρνητική προγνωστική αξία 60% (OR:6.750, 95% CI: 1.276-35.701, $p=0.025$). Η χρονική ανάλυση έδειξε ότι λόγος μεγαλύτερος του 6 συσχετίστηκε με σημαντικά πρωιμότερο τοκετό (Εικόνα 5).



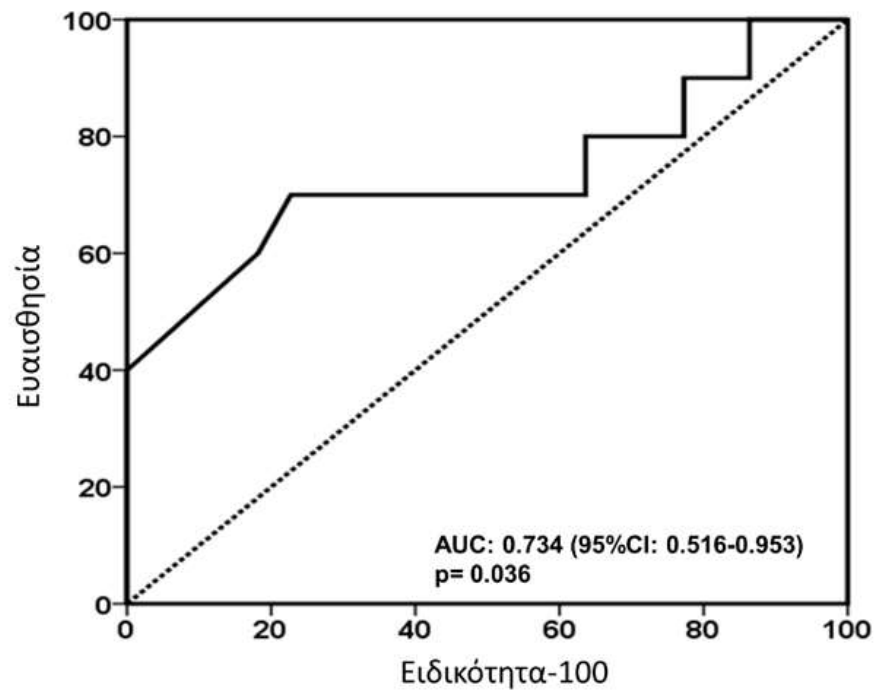
Εικόνα 1. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) στο μητρικό ορό



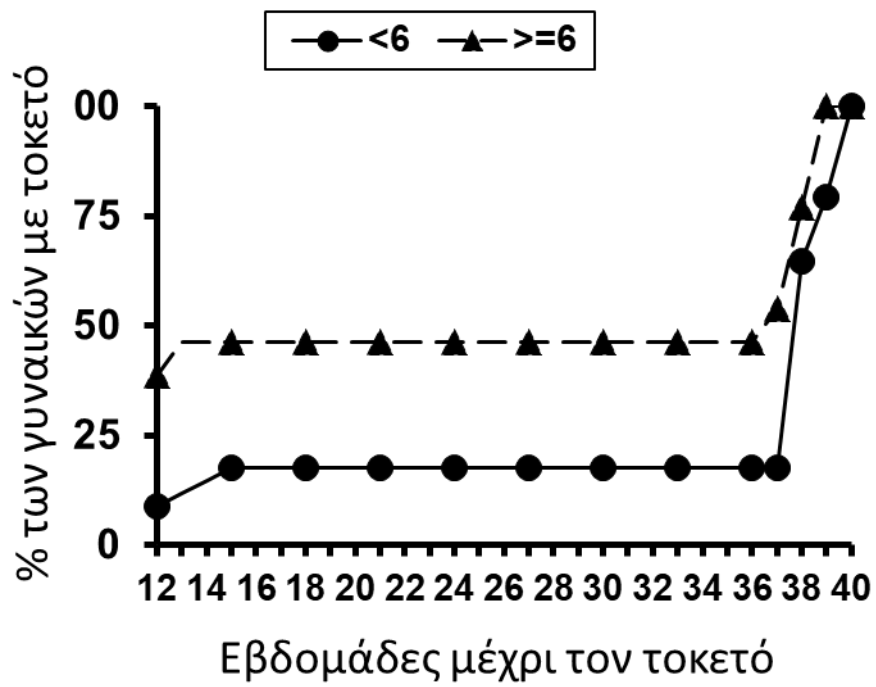
Εικόνα 2. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) στο μητρικό ορό



Εικόνα 3. Πηλίκιο πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στο μητρικό ορό

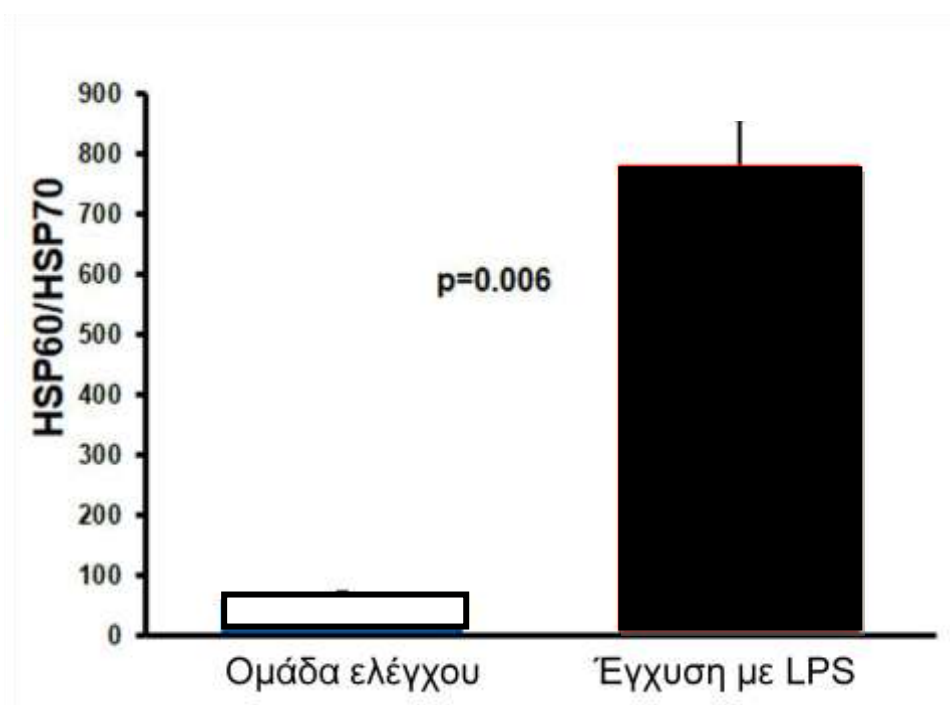


Εικόνα 4. Ανάλυση καμπύλης ROC του λόγου πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στο μητρικό ορό για την πρόβλεψη κινδύνου αποβολής

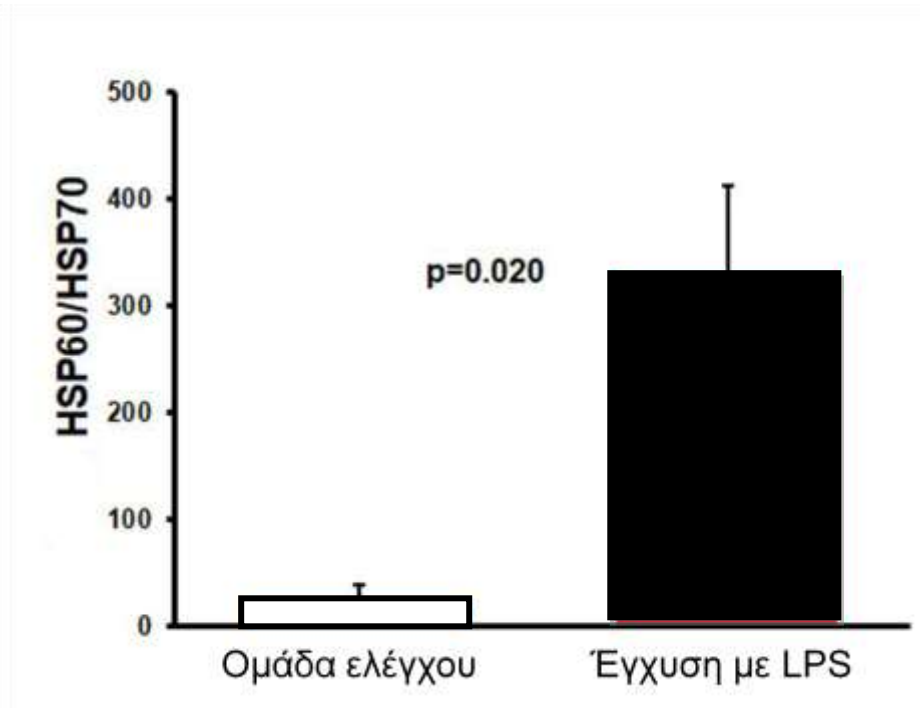


Εικόνα 5. Εβδομάδα τοκετού των συμμετεχόντων όταν διαχωρίστηκαν από την κατωφλική τιμή του λόγου των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70)

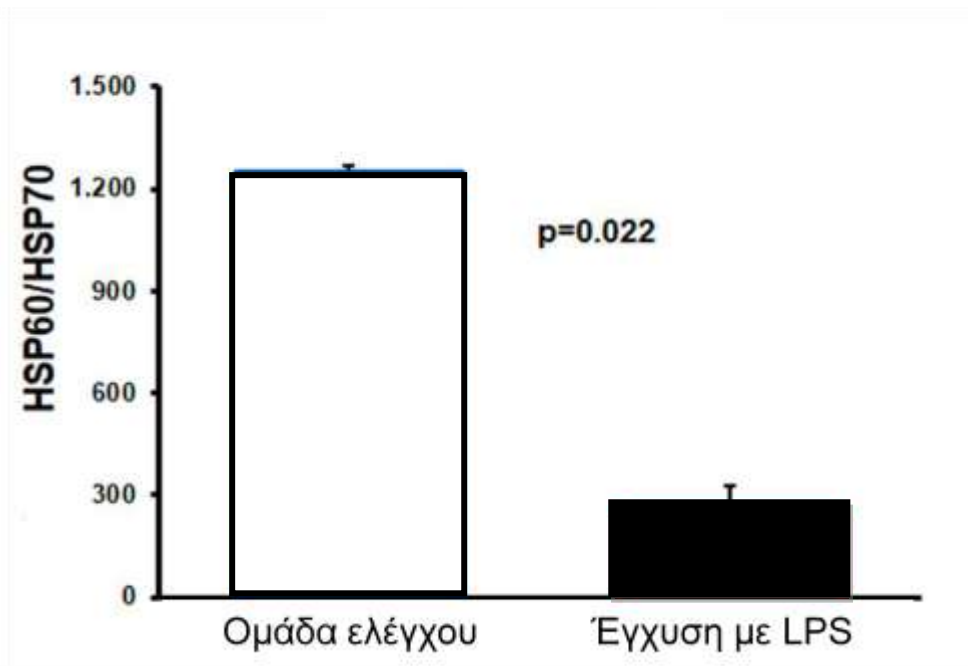
Βασιζόμενοι σε αυτά τα αποτελέσματα, σχεδιάστηκε ένα ζωικό μοντέλο για να ερευνηθεί ίνινο, κατά πόσο η ύπαρξη πρόωρου τοκετού σχετίζεται με αυξημένο λόγο πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα ποντίκια της ομάδας LPS, ο λόγος ήταν σημαντικά αυξημένος στον ορό της μητέρας, στους πλακούντες και στα έμβρυα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνες 6, 7, 9).



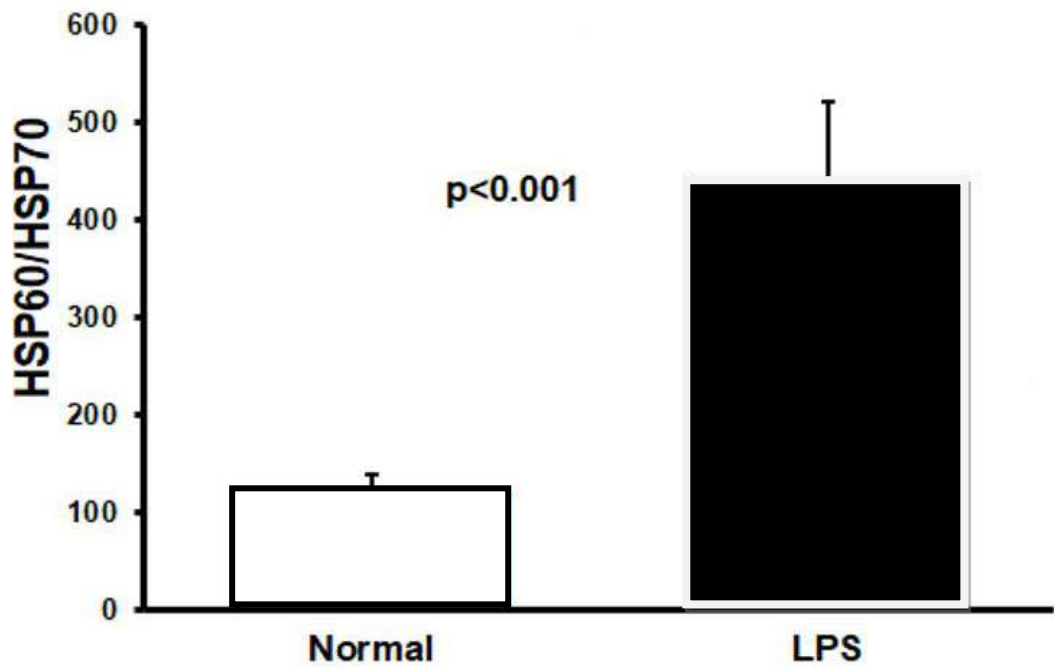
Εικόνα 6. Πηλίκο των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στους πλακούντες των μητέρων. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U



Εικόνα 7. Πηλίκιο των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στους εμβρυικούς ιστούς του ζωικού μοντέλου. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U

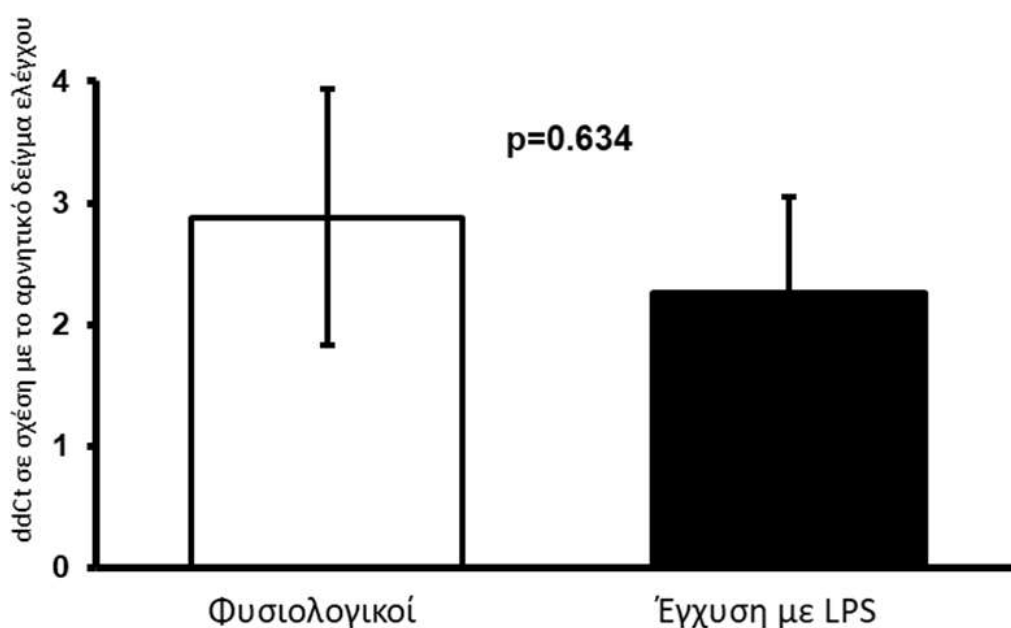


Εικόνα 8. Πηλίκιο των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στους ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από επαγωγή πρόωρου τοκετού με LPS (n=6) και στην ομάδα ελέγχου (n=4) στο ήπαρ. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U

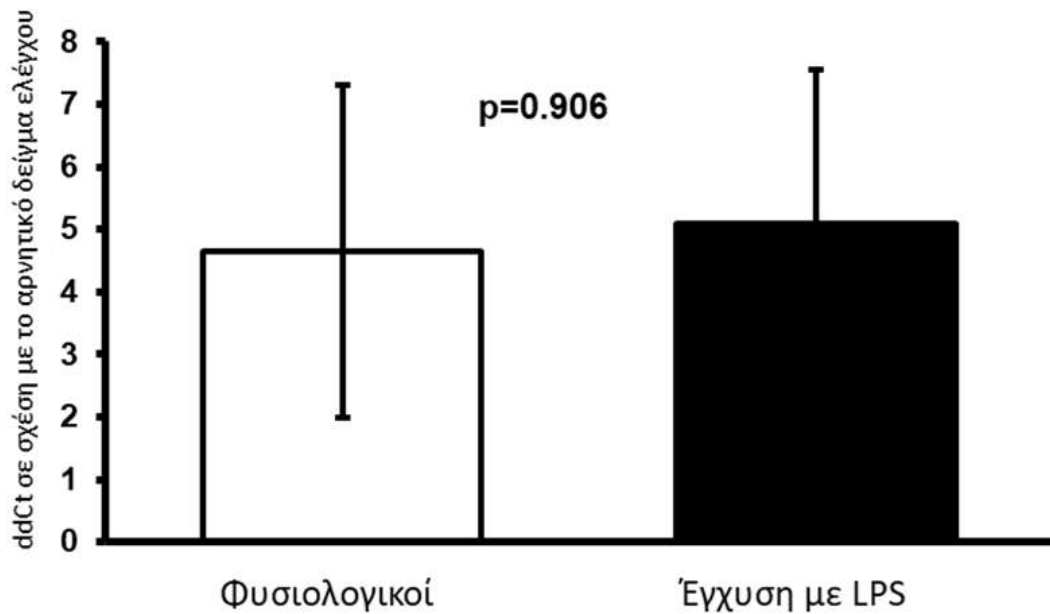


Εικόνα 9. Πηλίκιο των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) στο μητρικό ορό. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U

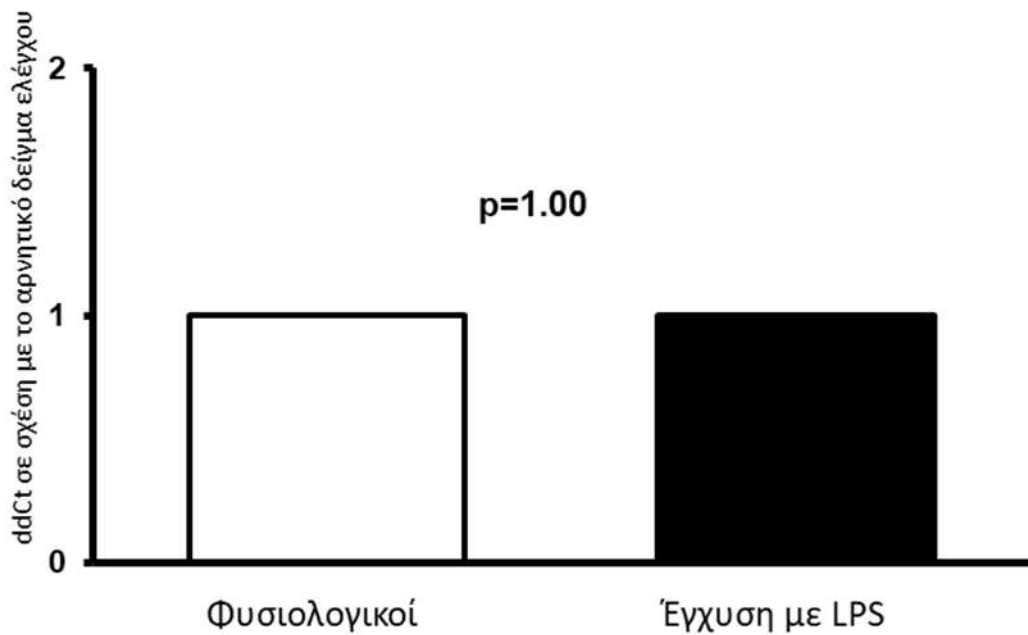
Οι μετρήσεις των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) σε ιστούς μας οδήγησαν να αναρωτηθούμε εάν τα ευρήματα οφείλονται στην αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) ή προέρχονται από απελευθέρωση από τον ιστό.



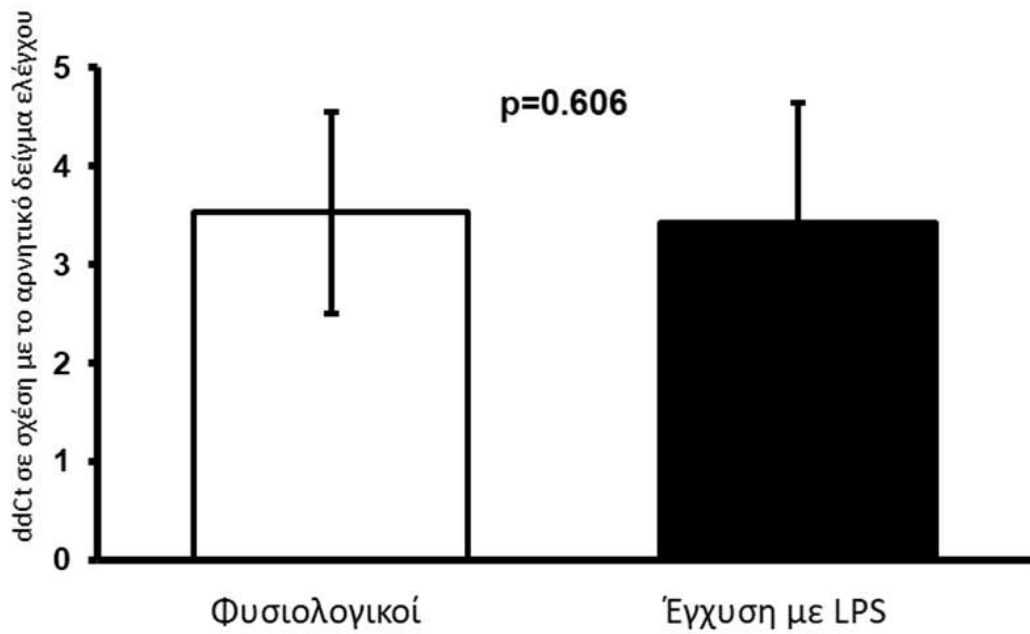
Εικόνα 10. Γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους εμβρυικούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συντομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης



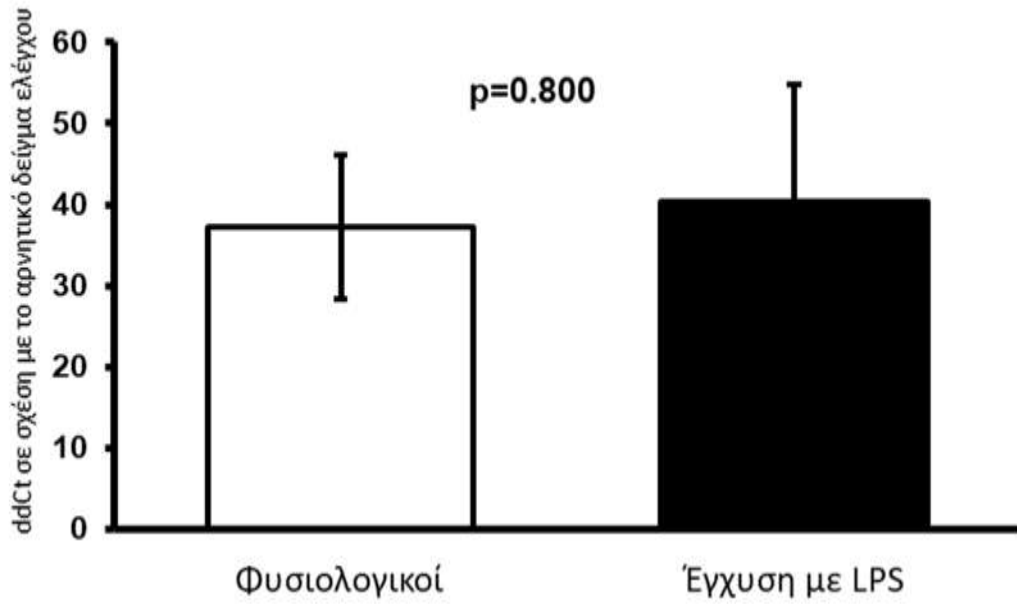
Εικόνα 11. Έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους εμβρυικούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συνομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης



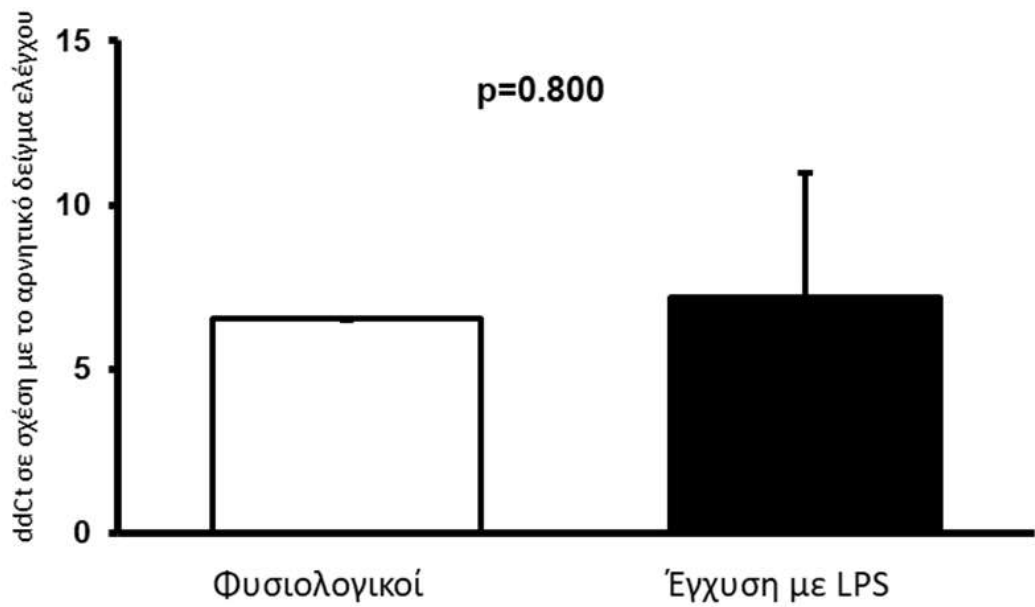
Εικόνα 12. Γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους πλακουντιακούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συντομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης



Εικόνα 13. Γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους πλακουντιακούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συντομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης



Εικόνα 14. Γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους ηπατικούς μητρικούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συντομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης



Εικόνα 15. Γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) σε ιστούς κυοφορούντων ποντικών μετά από LPS-επαγόμενο πρόωρο τοκετό (n=6) και της ομάδας ελέγχου (n=4) για τους ηπατικούς μητρικούς ιστούς. Οι τιμές σημαντικότητας P για τις αντίστοιχες συγκρίσεις παρέχονται από το τεστ Mann-Whitney U. Συντομογραφίες: Hsp: πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας, LPS: λιποσακχαρίτης

Η γονιδιακή έκφραση ήταν η ίδια για τις δύο ομάδες, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η ανισορροπία των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) δεν προέρχεται από de novo βιοσύνθεση, αλλά από ιστοική απελευθέρωση.

3. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, δείχνεται για πρώτη φορά ότι το πηλίκιο των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60, προς τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp60/Hsp70) στην κυκλοφορία τροποποιείται κατά την αποβολή. Αυτός ο λόγος αυξήθηκε πρώιμα, κατά την 9η ως 12η εβδομάδα της κύησης στον ορό των γυναικών που απέβαλλαν. Λόγος μεγαλύτερος ή ίσος του 6 ήταν ένδειξη για αποβολή και συσχετίστηκε με θετική προγνωστική αξία υψηλότερη του 80%. Τα ευρήματά μας από το ζωικό μοντέλο που μελετήθηκε για πρόωρο τοκετό προτείνουν ότι αυτή η μεταβολή του λόγου δεν προέρχεται από de novo παραγωγή των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) από τους ιστούς, αλλά από την απελευθέρωσή τους από τους ταχύτατα αναγεννόμενους εμβρυικούς και πλακουντιακούς ιστούς. Αυτό το εύρημα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του πηλίκου της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 προς την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp60/Hsp70) σχετίζεται με τον κίνδυνο αποβολής, και όχι ότι η υπερπαραγωγή είτε της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) ή της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) παράγει αυτή την συσχέτιση.

Για να ερευνήσουμε εάν η περιγραφόμενη μεταβολή του πηλίκου των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 προς τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp60/Hsp70) λαμβάνει χώρα, χρησιμοποιήσαμε ένα ζωικό μοντέλο ποντικών στα οποία προκλήθηκε πρόωρος τοκετός μετά από έγχυση LPS. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) αλληλεπιδρούν με τον TLR4, για τον οποίο η LPS λειτουργεί ως αγωνιστής [190, 194]. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν πλήρως τα ανθρώπινα ευρήματα. Διαφοροποίηση έχουμε στο ότι δεν ανιχνεύονται διαφορές όταν οι συγκρίσεις περιλαμβάνουν καθατές τις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70).

Ωστόσο, τα ευρήματα φανερώνουν μια συνεχή μεταβολή της αναλογίας της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 προς την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp60/Hsp70). Θα μπορούσε κάποιος να υποστηρίξει ότι το ζωικό μοντέλο που μελετήθηκε δεν είναι το κατάλληλο και ότι, ένα μοντέλο όπου η PTD προκαλείται από την έγχυση των HSP60 και HSP70 θα ήταν καταλληλότερο. Σε αυτό το σημείο, πρέπει να υπέρ τονίσουμε ότι στο συγκεκριμένο μοντέλο, η δόση της LPS που χορηγήθηκε για την επαγωγή του πρόωρου τοκετού ήταν μόλις 2 mg/kg. Αντίθετα απαιτείται δόση ίση με 30 mg/kg [195] για την επαγωγή προ-φλεγμονώδων φαινομένων. Παραδόξως, με αυτή την μικρή δόση LPS που χρησιμοποιείται σε αυτό το μοντέλο ανευρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις TNFα στους ιστούς.

Αυτό υποδηλώνει ότι τα ενδογενώς παραγόμενα DAMPs, όπως οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) χρειάζονται για να συμβεί αυτή η έντονη προφλεγμονώδης απόκριση. Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, μπορεί να υποθεθεί ότι η διαταραχή μεταξύ των πρωτεϊνών Θερμικής

καταπληξίας 60 (Hsp60) και πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) που συσχετίστηκε με πρόωρο τοκετό, μπορεί να εκκινηθεί από τα Gram-αρνητικά βακτήρια που φέρουν LPS στην εξώτατη μεμβράνη τους και να επικουρηθεί όταν οι μητρικοί ή οι εμβρυικοί ιστοί απελευθερώνουν πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps).

Παρόλο που η αναλογία των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 προς 70 (Hsp60/Hsp70) στην έναρξη της εγκυμοσύνης δεν είναι γνωστή, περιγράφηκε πρόσφατα ότι αύξηση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) κατά 1,3 φορές και της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) κατά 2,6 φορές εμφανίζεται μεταξύ της 34ης εβδομάδας κύησης και στο τέλος της κύησης [196]. Βασιζόμενοι σε αυτό το εύρημα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο λόγος πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 προς 70 (Hsp60/Hsp70) μπορεί να μεταβληθεί αργότερα, κατά τη διαδικασία του πρόωρου τοκετού. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που προτείνουν μία συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας (Hsps) στην κυκλοφορία κατά την εγκυμοσύνη, στον πρόωρο τοκετό και στην αποβολή. Διαθέσιμες ενδείξεις υπάρχουν περισσότερο για την περίπτωση της πρωτεΐνης Θερμικής καταπληξίας 70(Hsp70) [197].

Οι πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας (Hsps) συγκαταλέγονται στις πρώτες πρωτεΐνες που παράγονται από το ζυγωτό μετά τη γονιμοποίηση και συνεχίζουν να εκφράζονται στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης, στο έμβρυο και τις χοριακές λάχνες. Ο ρόλος τους είναι η διατήρηση της σταθερότητας των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) στην κυκλοφορία είναι σημαντικά μικρότερη σε υγιείς έγκυες γυναίκες σε σύγκριση με μη έγκυες. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης Θερμικής

καταπληξίας 70 (Hsp70) αρχίζει να αυξάνεται γρήγορα μετά την εγκυμοσύνη και καθώς η κύηση προχωρά. Φαίνεται ότι αυτή η αύξηση είναι ωφέλιμη για το έμβρυο σε κάποιο βαθμό, καθώς η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) διαμεσολαβεί μέρος των κατασταλμένων αποκρίσεων της ειδικής ανοσίας, η οποία αναπτύσσει ανοχή προς το έμβρυο. Μετά από συγκεκριμένο επίπεδο αύξησης, η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) μπορεί να γίνει επιβλαβής και οδηγεί σε αποβολή ή έκτρωση μέσω της αναστολής της διαδικασίας της αυτοφαγίας [198].

Η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις χοριακές λάχνες του πλακούντα γυναικών με αποβολή, σε σύγκριση με φυσιολογικές εγκυμοσύνες [199].

Η συσχέτιση της απορρύθμισης μεταξύ των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) με την αποβολή, προέρχεται από τρεις κλινικές μελέτες. Αντισώματα IgG στην κυκλοφορία έναντι των ανθρώπινων πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 [Hsp60 και Hsp70] μετρήθηκαν από 68 γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές και συγκρίθηκαν με 29 τελειόμηνες κυήσεις. Οι συγκεντρώσεις τους ήταν μεγαλύτερες στις γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές, σε σχέση με τις τελειόμηνες κυήσεις. Στη μελέτη των Ziegert et al (1999), έγινε η υπόθεση ότι οι επαναλαμβανόμενες αποβολές μπορεί να συσχετίζονται με δείκτες αγγειακής ανελαστικότητας όπως η ταχύτητα κύματος βρόγχου-αστραγάλου και του δείκτη καροτιδικής ενίσχυσης.

Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών αυτών και των αντισωμάτων IgG στην κυκλοφορία έναντι στις

πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) [200]. Πλακουντιακός ιστός που προήλθε από 10 φυσιολογικές κυήσεις, εξετάστηκε για την απόθεση αντι-Hsp60 και αντι-Hsp70 αντισωμάτων. Εναπόθεση αντι-Hsp60 και αντι-Hsp70 αντισωμάτων βρέθηκε στο 41,7% και στο 33,3% των πρόωρων τοκετών, το οποίο επίσης ανιχνεύθηκε στο 12,5% και στο 0% των ενδομητριάκων καθυστερήσεων ανάπτυξης αντίστοιχα. Επίσης απόθεση ανιχνεύθηκε στο 0% και το 0% των φυσιολογικών κυήσεων αντίστοιχα [201].

Η γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) μετρήθηκε στην κεντρική κοτηληδονική ζώνη του πλακούντα 50 φυσιολογικών κυήσεων, 80 πρόωρων ρήξεων των μεμβρανών προ τοκετού (PPROM) και 30 αυθόρμητων πρόωρων τοκετών με άθικτη μεμβράνη (PLIM). Τόσο η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) όσο και η πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) εκφράστηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στις PPR0M σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυήσεις [202]. Επιπλέον, η έκφραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) μετρήθηκε με ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, η έκφραση των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) ήταν παρούσα στις πρόωρες και φυσιολογικές κυήσεις, γεγονός που δε συνδέει την έκφρασή τους με τον πρόωρο τοκετό.

Παρόλα αυτά, αντισώματα ενάντια στις πρωτεΐνες Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και 70) ανιχνεύθηκαν σε σημαντικό αριθμό γυναικών με πρόωρο τοκετό, αλλά όχι στις φυσιολογικές κυήσεις [201]. Τέλος, ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι στις γυναίκες με πρόωρη κύηση που ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων πρωτεϊνών Θερμικής

καταπληξίας 60 (Hsp60), υπήρχε και ανάλογη έκφραση των αντισωμάτων πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) [201].

Στο ζωικό μας μοντέλο, ο λόγος πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) ήταν σημαντικά υψηλότερος στα έμβρυα, στον πλακούντα και τον ορό της μητέρας, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στο μητρικό ήπαρ, πιθανότατα προτείνοντας την ύπαρξη απόθεσης από τη μητέρα στον πλακούντα και το έμβρυο.

Οι κύριοι περιορισμοί της μελέτης είναι η αναδρομική της φύση και η έλλειψη επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) μέχρι και τον τοκετό. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η μελέτη ρίχνει φως για πρώτη φορά, χρησιμοποιώντας συνδυασμό ευρυμάτων σε ασθενείς και σε πειραματόζωα, στην ισορροπία των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60) και πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70), η οποία είναι σημαντική στον πρόωρο τοκετό, αλλά όχι στις καθαυτές συγκεντρώσεις κάθε πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας (Hsps) ξεχωριστά.

Το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να ερμηνευθεί υπό το φως της σημαντικότητας που περιγράφηκε για κάθε μόριο ξεχωριστά, όπως για την πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 60 (Hsp60), η οποία προωθεί τη σύνθεση προγεστερόνης σε εμβρυικά μιτοχόνδρια [203] ή στην πρόσδεση του παράγοντα προ-εμφύτευσης στην πρωτεΐνη Θερμικής καταπληξίας 70 (Hsp70) και τη συσχέτισή τους με την επιβίωση του εμβρύου [204]. Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι μέτρηση του λόγου πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60/Hsp70) ίση ή μεγαλύτερη του 6, μέχρι και τη

12η εβδομάδα της κύησης, συνοδεύεται από μεγαλύτερη πιθανότητα αποβολής.

Ένας παρόμοιος λόγος βρίσκει εφαρμογή σε ένα ζωικό μοντέλο πρόωρου τοκετού, επαγόμενο από χαμηλές δόσεις LPS. Τα αποτελέσματα απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση για την καλύτερη κατανόησή μας ως προς το μηχανισμό της αποβολής.

Αγγλική Περίληψη

Problem To study the balance of circulating Heat shock protein Hsp60 and Hsp70 in preterm delivery

Method of study A two-stage approach was used. At first stage we run retrospective analysis of prospective collected clinical data and at a second stage we studied an animal model of preterm delivery (PTD). Blood samples were collected for prenatal screening in 3,629 women. Samples from 23 women with miscarriage before gestational week 21 and 53 well-matched comparators for age, body mass index, parity and previous miscarriage with full-term pregnancy were depicted. Women with risk factors were excluded. Hsp60 and Hsp70 were measured by an enzyme immunosorbent assay. PTD was induced after injection of low dose of bacterial lipopolysaccharide; mice were sacrificed for the measurement of Hsp60 and Hsp70 in blood and tissues. The study endpoint was the association of the Hsp60 to Hsp70 ratio to miscarriage.

Results A ratio greater than 6 could distinguish between women who will miscarry from women with term pregnancies with sensitivity 60%, specificity 81.8%, positive predictive value 81.8% and negative predictive value 60% (OR: 6.750, $p= 0.025$). Mice of the LPS-group PTD had this ratio significantly increased in maternal serum, placentas and embryos compared to the sham-operation group. Gene expression of *Hsp60/70* remained in tissues unaltered.

Conclusions An Hsp60/Hsp70 ratio equal to or more than 6 until gestational week 12 is accompanied with great likelihood for miscarriage. A similar ratio applies in an animal model of PTD induced by low-dose LPS.

Keywords: Miscarriage, Heat shock protein 60, Heat shock protein 70

Ελληνική Περίληψη

Πρόβλημα: Η μελέτη της ισορροπίας των πρωτεϊνών Θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) στην κυκλοφορία του αίματος, κατά τον πρόωρο τοκετό

Μέθοδος της μελέτης: Χρησιμοποιήθηκε προσέγγιση δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήσαμε μία ανασκοπική ανάλυση κλινικών προοπτικών δεδομένων και στο δεύτερο στάδιο μελετήσαμε ένα ζωικό μοντέλο πρόωρου τοκετού. Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος για προγεννητικό έλεγχο από 3,629 γυναίκες. Δείγματα από 23 γυναίκες που απέβαλαν πριν την 21 εβδομάδα κύησης και από 53 γυναίκες με φυσιολογικό τοκετό, της ομάδας ελέγχου, επιλέχθηκαν σύμφωνα με την ηλικία, το ΔΜΣ, ισοτιμία και προηγούμενες αποβολές. Γυναίκες με παράγοντες κινδύνου αποκλείστηκαν. Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) μετρήθηκαν με δοκιμασία ενζύμου ανοσοαπορροφητικότητας. Προκλήθηκε πρόωρος τοκετός μετά από ένεση μικρής δόσης βακτηριακού λιποσακχαρίτη. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν για την μέτρηση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) στο αίμα και τους ιστούς. Το τελικό σημείο της μελέτης ήταν η συσχέτιση του πηλίκου των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (Hsp60 και Hsp70) με την αποβολή.

Αποτελέσματα: Πηλίκo μεγαλύτερο του 6 παρείχε τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των γυναικών που μπορεί να έχουν αποβολή από τις γυναίκες με φυσιολογικό τοκετό, με ευαισθησία 60%, ειδικότητα 81,8%, θετική προβλεπτική αξία 81,8% και αρνητική προβλεπτική αξία 60% (OR: 6.750, $p=0.025$). Ποντίκια της ομάδας πρόωρου τοκετού με έγχυση LPS εμφάνισαν

αυτό το πηλίκο σημαντικά αυξημένο στο μητρικό ορό, τους πλακούντες και τα έμβρυα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (*Hsp60/70*) στους ιστούς παρέμεινε απaráλλαχτη.

Συμπεράσματα: Πηλίκο των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας 60 και 70 (*Hsp60/Hsp70*) ίσο ή μεγαλύτερο του 6 μέχρι τη 12η εβδομάδα κύησης συνοδεύεται από μεγάλη πιθανότητα αποβολής. Ένα παρόμοιο πηλίκο βρίσκει εφαρμογή σε ζωικό μοντέλο πρόωρου τοκετού-επαγόμενου από μικρή δόση LPS.

Λέξεις-κλειδιά: Αποβολή, πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 60, πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 70

Βιβλιογραφία

1. A. Oliver, C. Overton, Diagnosis and management of miscarriage, *Practitioner*. vol. 258, n. 1. 1771, 2014, pp. 25-8, 3.
2. S. Beck, D. Wojdyla, L. Say, A. Pilar Betran, M. Merialdi, J. Harris Requejo, C. Rubens, R. Menor, P. Van Look. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*, vol. 88, n.1, 2010, pp. 1-80.
3. G. Beucher, T. Beillat, M. Dreyfus, Management of first trimester miscarriages. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. Vol. 32, n. 1., 2003, pp.5-21
4. G. Roy, G. Farquharson, E Jauniaux. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Human Reproduction*, vol. 20, n. 11, 2005, pp. 3008–301.
5. D. Jurkovic, C. Overton, R. Bender-Atik. Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ*, vol. 19, n. 1, 2013, pp.346-3676 doi: 10.1136/bmj.f3676
6. Z. Aitken, CC Garrett, B. Hewitt, L. Keogh, JS Hocking, AM Kavanagh, The maternal health outcomes of paid maternity leave: a systematic review, *Soc Sci Med*, vol. 130, n. 1, 2015, pp. 32-41
7. JL. Ever, Female subfertility. *Lancet* vol.360, n. 9327, 2002, pp.151-9.

8. Saving Mothers' Lives. The eighth report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. *BJOG*, v. 1, n.118 (suppl 1), 2011, pp.81-4.
9. S. Daya, Evaluation and management of recurrent spontaneous abortion. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* vol. 8, n.3, 1996, pp.188–192.
10. PP Smith, RK Dhillon-Smith, E. O'Toole, N. Cooper, A. Coomarasamy, TJ Clark, Outcomes in prevention and management of miscarriage trials: a systematic review, *BJOG*, vol. 126, n. 2, 2019, pp. 176- 189
11. S. Zafar et al. "Use of Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation to Combat Fake News: A Case Study of Influenza Vaccination in Pregnancy" *JMIR medical education*, vol. 4, n. 2, 2018, pp. e10347, doi: 10.2196/10347
12. BS. McEwen, E. Stellar, Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*, v. 153, n.18, 1993, pp.2093–2101.
13. VJ. Hux, JM. Catov, JM. Roberts, Allostatic load in women with a history of low birth weight infants: the national health and nutrition examination survey. *J Women's Health*, v.23, n.12, 2014, pp.1039–1045.
14. Hux, Vanessa J and James M Roberts. "A potential role for allostatic load in preeclampsia" *Maternal and child health journal* vol. 19, n. 3 2015, pp. 591-7

15. AN. Edes, DE. Crews, Allostatic load and biological anthropology. *Am J Phys Anthropol*, v.162, n.1, 2017, pp.44–70
16. DB. Nelson, JA. Grisso, MM. Joffe et al, Does stress influence early pregnancy loss? *Annals of Epidemiology*, vol.13, n. 4, 2003, pp. 223–229
17. PA. Nepomnaschy, E. Sheiner, G. Mastorakos et al., Stress, immune function and women’s reproduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* v. 1113, n. 1, 2007, pp.350–364.
18. S. Li, W. Winuthayanon, Oviduct: roles in fertilization and early embryo development, *J Endocrinol*, vol. 232, n. 1, 2017, pp.R1-R26
19. H. Wang, SK. Dey, Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* vol. 7, n. 3, 2006, pp.185-199
20. E. Jauniaux., G. J. Burton. Pathophysiology of Histological Changes in Early Pregnancy Loss. *Placenta* vol. 1, n. 2-3, 2005, 114e123 doi:10.1016/j.placenta.2004.05.011
21. J. Rossant, J.C. Cross, Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* Vol. 2, n. 7, 2001, pp.538-548.
22. E. Jauniaux., R.H. Van Oppenraaij, G.J. Burton, Obstetric outcome after early placental complications. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* Vol. 22, n. 6, 2010, pp.452-457.

23. S. Zhang, L. Haiyan, S. Kong, S. Wang, H. Wang, H. Wang, D.R. Armant, Physiological and molecular determinants of embryo implantation, *Mol Aspects Med*, vol. 34, n. 5, 2013, pp.939–980.
24. W.G. Ma, H. Song, S.K. Das, B.C. Paria, S.K. Dey, 2003. Estrogens is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100, n. 5, 2003, pp.2963-2968
25. CG. Walker, S. Meier, MD. Littlejohn, K. Lehnert, JR. Roche, MD. Mitchell, Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics*, vol. 11, n. 1, 2010, pp.474.
26. N. Dekel, Y. Gnainsky, I. Granot, G. Mor, Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol*, n. 72, n. 2, 2010, pp.17–21
27. DK. Hickey, MV. Patel, JV. Fahey, CR. Wira, Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*, v. 88, n. 2, 2011, pp.185–194.
28. T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, vol. 11, n. 5, 2010, pp.373–384
29. J. Brown, H. Wang, GN. Hajishengallis, M. Martin, TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk, *J Dent Res*, vol. 90, n. 4, 2011, pp.417–427.

- 30.K. Koga, G. Mor, Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders, *Am J Reprod Immunol*, vol. 63, n. 6, 2010, pp.587–600
- 31.R. Aflatoonian, E. Tuckerman, SL. Elliott, C. Bruce, A. Aflatoonian, TC. Li, A. Fazeli, Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod*, vol. 22, n. 2, 2007, pp.586–593.
- 32.A. Sato, A. Iwasaki, From the cover: induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, n. 46, 2004, pp.16274–16279.
- 33.M. Singh, P. Chaudhry, E. Asselin, Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*, v. 210, n. 1, 2011, pp.5–14.
- 34.M.K. Jaiswal, V. Agrawal, Y.K. Jaiswal, Lipopolysaccharide Drives Alternation of Heat Shock Proteins and Induces Failure of Blastocyst Implantation in Mouse, *Biology of Reproduction*, Vol. 88, n. 6, 2013, pp. 162, 1–12, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.108068>
- 35.EK. Haddad, AJ. Duclos, E. Anteck, WS. Lapp, MG. Baines, Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss, *Cell Immunol*, v.181, n. 1, 1997 pp.6875.

- 36.XH. Zhong, ZX. Zhou, TS.Li, EQ. Wang, WY. Shi, SM. Chu, Anti-abortive effect of Radix scutellariae and Rhizoma atractylodis in mice, *Am J Chin Med*, v. 30, n. 1, 2002, pp.109-117
- 37.R. Romero, C. Avila, U. Santhanam, PB. Sehgal, Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection, *J Clin Invest*, v. 85, n. 5, 1990, pp. 1392-1400.
- 38.S. Tabibzadeh, J. Broome, Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Infect Dis Obstet Gynecol*, vol. 1, n.59, 1999.
- 39.A. Neuer, SD. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks, SS. Witkin, The role of heat shock proteins in reproduction, *Hum Reprod Update*, vol. 6, n. 2, 2000, pp.149159.
- 40.L. Regan, R. Rai, Epidemiology and the medical causes of miscarriage, *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, vol. 14, n. 5, 2000, pp.839.
- 41.M. Goddijn, NJ. Leschot, Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. vol. 14, n. 5, 2000, pp.855.
- 42.RG. Farquharson, E. Jauniaux, N. Exalto, ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Updated and revised nomenclaturefor description of early pregnancy events. *Hum Reprod*, vol. 20, n.11., 2005, pp.3008- 11.doi:10.1093/humrep/dei167.

- 43.NS. Macklon, JP. Geraedts, BC. Fauser, Conception to ongoing pregnancy: the 'blackbox' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*, vol. 8, n. 4, 2002, pp.333–343. [PubMed]
- 44.AM. Nybo Anderson J. Wohlfahrt, P. Christens, J. Olsen, M. Melbye. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000; vol. 320, n. 7251, 2000, pp.1708–12. [PubMed]
- 45.E. Jauniaux, RG. Farquharson, OB. Christiansen, N. Exalto, Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. vol. 21, n. 9, 2006, pp.2216–2222. doi: 10.1093/humrep/del150. [PubMed]
- 46.E. De la Rochebrochard, P. Thonneau, Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre *European study*.*Hum Reprod*, vol. 17, n. 6, 2002, pp.1649–56.
- 47.B. Staude, et al. “The Microbiome and Preterm Birth: A Change in Paradigm with Profound Implications for Pathophysiologic Concepts and Novel Therapeutic Strategies” *BioMed research international*, vol. 2018, n. 1, 2018, pp. 7218187, doi:10.1155/2018/7218187
- 48.H. Blencowe, S. Cousens, MZ. Oestergaard, D. Chou, AB. Moller, R. Narwal, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*, vol. 379, n. 9832, 2012, pp.2162–72.

49. JF. Froen, J. Cacciatore, EM. McClure, O. Kuti, AH. Jokhio, M. Islam, et al. Stillbirths: why they matter. *Lancet*, vol. 377, n. 9774, 2011, pp.1353–66
50. MS Kramer, A. Papageorghiou, J. Culhane, Z. Bhutta, RL. Goldenberg, M. Gravett, et al. Challenges in defining and classifying the preterm birth syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, vol. 206, n. 2, 2012, pp.108–12
51. RL. Goldenberg, MG. Gravett, J. Iams, AT. Papageorghiou, SA. Waller, M. Kramer, et al. The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system, *Am J Obstet Gynecol*, vol. 206, n. 2, 2012, pp.113–8.
52. E. Hemminki E. Treatment of miscarriage: current practice and rationale. *Obstet Gynaecol*, vol. 91, n. 2, 1998, pp. 247–53.
53. MM. Van den Berg MM, MC. van Maarle, M. van Wely, M. Goddijn, Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1822, n. 12, 2012, pp.1951–9. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.001
54. MT. Franssen, JC. Korevaar, F. van der Veen, NJ. Leschot, PM. Bossuyt, M. Goddijn. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ*, vol. 332, n.7544, 2006, pp.759-63. doi: 10.1136/bmj.38735.459144.2F
55. J. Calleja-Agius, E. Jauniaux, AR. Pizzey, S. Muttukrishna, Investigation of systemic inflammatory response in first trimester

- pregnancy failure. *Hum Reprod*, vol. 27, n. 2, 2012, pp.349-57.doi:10.1093/humrep/der402
- 56.WH. Kutteh, CD. Hinote, Antiphospholipid antibody syndrome. *Obstet. Gynecol.Clin. North Am.* vol. 41, n. 1, 2014, pp.113–132.
- 57.D. Dluski, R. Mierzynksy, E. Poniedzialek-Czajkowska, Leszczynska-Gorzalak B., Adverse pregnancy outcomes and inherited thrombophilia, *J Perinatal Med*, vol. 46, n. 4, 2018, pp.411- 417
- 58.AM. Pritchard, PW. Hendrix, MJ. Paidas, Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, vol. 59, n. 3, 2016, pp.487-497
- 59.American Congress of Obstetrics & Gynecology. ACOG practice bulletin no. 138: inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol*, vol. 122, n. 3, 2013, pp.706–716.
- 60.M. Margaglione, E. Grandone, Population genetics of venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, vol. 105, n.2, 2011, pp.221–231.
- 61.E. Rey, SR Kahn, M. David, et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*, vol. 361, n. 9361, 2003, pp.901–908.
- 62.H. Roque, MJ. Paidas, FF. Funai, et al. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost*, vol. 91, n. 2, 2004, pp.290–295.
- 63.MA Rodger, MT Betancourt, P Clark, et al. The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated

- pregnancy complications: a systematic review and metaanalysis of prospective cohort studies. *PLoS Med*, vol. 7, n. 6, 2010, pp.728.
64. FE Preston, FR. Rosendaal, ID. Walker, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*, vol. 348, n. 9032, 1996, pp.913–916
65. MJ. Paidas, DH Ku, MJ Lee, et al. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. *Thromb Haemost*, vol. 3, n. 3, 2005, pp.497–501.
66. SE. Vollset, H. Refsum, LM. Irgens, et al, Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, vol. 71, n. 4, 2000, pp.962–968.
67. R. Homburg, NA. Armar, A. Eshel, et al, Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *British Medical Journal*, vol. 297, n. 6655, 1988, pp. 1024±1026
68. JD. Stanger, JL. Yovich, Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 92, n. 4, 1985, pp. 385±393.
69. R. Rai, M. Backos, F. Rushworth, L. Regan, Polycystic ovaries and recurrent miscarriage ± a reappraisal. *Human Reproduction*, vol. 15, n. 3, 2000, pp.612±615

- 70.M. Ogasawara, S. Kajiura, K. Katano et al. Are serum progesterone levels predictive of recurrent miscarriage in future pregnancies? *Fertility and Sterility*, vol. 68, n. 5, 1997, pp. 806±809.
- 71.JL. Mills, JL. Simpson, SG. Driscoll et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *New England Journal of Medicine*, vol. 319, n. 25, 1988, pp.1617±1623.
- 72.GL. Nielsen, HT. Sorensen, PH. Nielsen et al, Glycosylated hemoglobin as predictor of adverse fetal outcome in type 1 diabetic pregnancies. *Acta Diabetologica*, vol.34, n. 3, 1997, pp. 217±222.
- 73.L. Nordstrom, E. Spetz, K. Wallstrom, O. Walinder, Metabolic control and pregnancy outcome among women with insulin-dependent diabetes mellitus. A twelve-year follow-up in the county of Jamtland, Sweden. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Scandinavica*, vol.77, n. 1 1998, pp. 284±289.
- 74.RG. Lea, JE. McCracken, SS. McIntyre et al. Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic BB/E rat. *Diabetes*, vol. 45, n. 11, 1996, pp.1463±1470
- 75.KH. Moley, MM. Chi, CM. Knudson et al, Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine*, vol. 4, n. 12, 1998, pp.1421±1424
- 76.B. Stray-Pedersen, S. Stray-Pedersen, Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior

- history of habitual abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 148, n. 2, 1984, pp.140±146.
- 77.MS. Esplin, DW. Branch, R. Silver, A. Stagnaro-Green, Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 179, n. 6, 1998, pp. 1583±1586.
- 78.A. Zini, JM. Boman, E. Belzile, A. Ciampi, Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction*, vol. 23, n. 12, 2008, pp. 2663–2668, 2008.
- 79.L. Robinson, ID. Gallos, SJ. Conner, D. Rajhowa, Miller, S. Lewis, J. Kirkman-Bowl, A. Coomarasamy, The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction*, vol. 27, n. 10, 2012, pp.2908–2917
- 80.ML. McPheeters, WC. Miller, KE. Hartmann, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, n.192, n. 4, 2005, pp.1325
- 81.IB. Fuchs, W. Henrich, K. Osthues, JW. Dudenhausen, Sonographic cervical length in singleton pregnancies with intact membranes presenting with threatened preterm labor. *Ultrasound Obstet Gynecol*, vol. 24, n. 5, 2004, pp.554
- 82.A. Beverly, Von Der Pool. Preterm labour: Diagnosis and treatment *.American Family Physician*, vol.57, n. 10, 1998

83. T. Koike, H. Minakami, S. Kosuge, R. Usui, S. Matsubara, A. Izumi, I. Sato, Uterine leiomyoma in pregnancy: its influence on obstetric performance. *J Obstet Gynaecol Res*, vol. 25, n. 5, 1999, pp.309-13
84. S.D. Keay, M. Vatish, E. Karteris, E.W. Hillhouse, H.S. Randeva, The role of hCG in reproductive medicine. *BJOG :Int J Obstet Gynaecol*. vol. 111, n. 11, 2004, pp.1218–1228. doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00412.x.
85. N. Kane, R. Kelly, PTK. Saunders, HOD. Critchley, Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*, vol. 150, n. 6, 2009, pp.2882–2888. doi: 10.1210/en.2008-1309
86. H. Gong, Y. Chen, J. Xu, et al. The regulation of ovary and conceptus on the uterine natural killer cells during early pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 15, n. 1, 2017, pp.73. Published 2017 Sep 6. doi:10.1186/s12958-017-0290-1
87. C. Beijers, J. Ormel, J.L. Meijer, T. Verbeek, C.L. Bockting, H. Burger, Stressful Events and Continued Smoking and Continued Alcohol Consumption during Mid-Pregnancy. *PLoS One*, 2014 vol. 20, n. 9, e86359
88. S. Meyer, L. Gortner. Necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Parenter Enteral Nutr*, vol. 37, n. 1, 2013, pp.13

- 89.EK. Muechler, KE. Huang, Plasma estrogen and progesterone in quintuplet pregnancy induced with menotropins. *Am J Obstet Gynecol*, vol. 147, n. 1, 1983, pp.105
- 90.G. Weiss, LT. Goldsmith, R. Sachdev, et al. Elevated first-trimester serum relaxin concentrations in pregnant women following ovarian stimulation predict prematurity risk and preterm delivery. *Obstet Gynecol*, vol. 82, n. 5, 1993, pp.821
- 91.MA. Williams, R. Mittendorf, E. Lieberman, RR. Monson, Adverse infant outcomes associated with first-trimester vaginal bleeding. *Obstet Gynecol*, vol. 78, n. 14, 1991
- 92.JA. Martin, BE. Hamilton, SJ. Ventura, et al. Births: Final data for 2011. *Natl Vital Stat Rep*, vol. 62, n. 1, 2013
- 93.J. Gardosi, A. Francis, Early pregnancy predictors of preterm birth: the role of a prolonged menstruation-conception interval. *BJOG*, vol. 107, n. 2, 2000, p.228-37, 2000.
- 94.LM. McCowan, GA. Dekker, E. Chan, A. Stewart, LC. Chappell, M. Hunter, R. MossMorris, North RA; SCOPE consortium. Spontaneous preterm birth and small for gestational age infants in women who stop smoking early in pregnancy: prospective cohort study. *BMJ*, vol. 26, n. 1, 2009, pp.338:b1081
- 95.BH. Bech, C. Obel, TB. Henriksen, J. Olsen, Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. *BMJ*, vol. 334, n. 7590, 2007, pp.334:409

96. AG. Ronnenberg, MB. Goldman, D. Chen, IW. Aitken, WC. Willett, J. Selhub, X. Xu, Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr*, vol. 76, n. 6, 2002, pp.1385-1391, 2002
97. LA. Schieve, ME. Cogswell, KS. Scanlon, G. Perry, C. Ferre, C. Blackmore-Prince, SM. Yu, D. Rosenberg, Prepregnancy body mass index and pregnancy weight gain: associations with preterm delivery. The NMIHS Collaborative Study Group. *Obstet Gynecol*, vol. 96, n. 2, 2000, pp.194-200, 2000
98. A. Spinillo, E. Capuzzo, G. Piazzzi, A. Ferrari, V. Morales, M. Di Mario, Risk for spontaneous preterm delivery by combined body mass index and gestational weight gain patterns. *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 77, n. 1, 1998, pp.32-6
99. AM. Siega-Riz, LS. Adair, CJ. Hobel, Maternal underweight status and inadequate rate of weight gain during the third trimester of pregnancy increases the risk of preterm delivery. *J Nutr*, vol. 126, n. 1, 1996, pp.146-53
100. BL. Harlow, FD. Frigoletto, DW. Cramer, JK. Evans, ML. LeFevre, RP. Bain, D. McNellis,. Determinants of preterm delivery in low-risk pregnancies. The RADIUS Study Group. *J Clin Epidemiol*, vol. 49, n. 4, 1996, pp.441-448
101. CV. Ananth, KS. Joseph, Y. Oyelese, K. Demissie, AM. Vintzileos, Trends in preterm birth and perinatal mortality among

- singletons: United States, 1989 through 2000. *Obstet Gynecol*, vol. 105, n. 5, 2005, pp.1084-1091, 2005.
102. RA. Jackson, KA. Gibson, YW. Wu, MS. Croughan, Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, vol. 103, n. 3, 2004, pp.551-563, 2004.
103. M. Hedegaard, TB. Henriksen, NJ. Secher, MC. Hatch, S. Sabroe, Do stressful life events affect duration of gestation and risk of preterm delivery? *Epidemiology*, vol. 7, n. 4, 1996, pp.339-45
104. K. Demissie, GG. Rhoads, CV. Ananth, et al. Trends in preterm birth and neonatal mortality among blacks and whites in the United States from 1989 to 1997. *Am J Epidemiol*, vol. 154, n. 4, 2001, pp. 307-315
105. JM. Tucker, RL. Goldenberg, RO. Davis, RL. Copper, CL. Winkler, JC. Hauth. Etiologies of preterm birth in an indigent population: is prevention a logical expectation?. *Obstet Gynecol*, vol. 77, n. 3, 1991, pp.343-347
106. L. Krishnan, T. Nguyen, S. McComb. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy, *J Reprod Immunol*, vol. 97, n. 1, 2013, pp.62-73.
107. V. Agrawal, E. Hirsch, Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 17, n. 1, 2012, pp.12-19
108. MG. Gravet, J. Hitti, DL. Hess, DA. Eschenbach, Intrauterine infection and preterm delivery: Evidence for activation of the fetal

- hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. vol.182, n. 6, 2000, pp.1404-1413
109. AT. Dennis, CB. Solnordal, Acute pulmonary oedema in pregnant women. *Anaesthesia*, vol. 67, n. 6, 2012, pp.646
110. M. Jeffcoat, S. Parry, M. Sammel, B. Clothier, A. Cattlin, G. Macones,. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. *BJOG*, vol. 118, n. 2, 2011, pp.250-6
111. WS. Lim, JT. Macfarlane, CL. Colthorpe, Pneumonia and pregnancy. *Thorax*, vol. 56, n. 5, 2001, pp.398
112. ML. Feldkamp, RE. Meyer, S. Krikov, LD. Botto, Acetaminophen use in pregnancy and risk of birth defects: findings from the National Birth Defects Prevention Study. *Obstet Gynecol*, 2010; vol. 115, n. 1, 2010, pp.109
113. F. Smail, JC. Vazquez, Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 7, n. 8, 2007, CD000490
114. R. Galinsky, GR. Polglase, SB. Hooper, MJ. Black, TJ. Moss, The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development., *J Pregnancy*, vol. 10, n. 1, 2013, pp.1155 - 12831
115. MK. Mwaniki, M. Atieno, JE. Lawn, CR. Newton, Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet*, vol. 379, n. 9814, 2012, pp.445

116. L. Pourali et al, "A Case of Cushing's Syndrome in Pregnancy"
Iranian journal of medical sciences, vol. 42, n.6, 2017, pp.607-610.
117. T.K. Binsiya, V. Sejian, M. Bagath, G.Krishnan, IqbalHyder, A. Manimaran, A.M. Lees, J.B. GaughanandR. Bhatta. Significance of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis to adapt to Climate Change in Livestock. *International Research Journal of Agricultural and Food Sciences*: Vol. 2, n. 1, pp: (1-20), January 2017
118. Y. Amo, M. Masuzawa, Y. Hamada, K. Katsuoka, "Observations on angiopoietin 2 in patients with angiosarcoma". *Br. J. Dermatol*, vol. 150, n. 5, 2004, pp.1028–1029
119. E. Sheiner, E. Mazor-Drey, A. Levy, Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol. 22, n. 5, 2009, pp.423.
120. MF. Tsan.,B. Gao, Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* Vol. 89, n. 6, 2009, pp.905–910
121. S. Leppa, L. Sistonen, Heat shock response - Pathophysiological implications. *Ann Med*, vol. 29, n. 1, 1997, pp.73-78
122. DR. Ciocca, S. Oesterreich, GC. Chamness, WL. McGuire, SAW. Fuqua, Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst*, vol. 85, n. 19, 1993, pp.1558-1570
123. FU. Hartl, Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, vol. 381, n. 6583, 1996, pp.571-580

124. DR. Ciocca, AO. Stati, MM. Amprino De Castro, Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat*, vol. 16, n. 3, 1990, pp.243-251
125. B. Bukau, AL. Horwich, The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, vol.92, n. 3, 1998, pp.351-366
126. S. Love, RJB. King, A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer*, vol. 69, n. 4, 1994, pp.743-748
127. R. Mestril, SH. Chi, MR. Sayen, K. O' Reilly, WH. Dillmann, Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest*, vol. 93, n. 2, 1994, pp.759-767, 1994.
128. JCL. Plumier, BM. Ross, RW. Currie, et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest*, vol. 95, n. 4, 1995, pp.1854-1860
129. C. Amici, L. Sistonen, MG. Santoro, RI Morimoto, Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.89, n. 14, 1992, pp.6227-6231

130. L. Brocchieri, S. Karlin. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci.* vol.9, n. 3, 2000, pp.476-486
131. AM. Merendino et al. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *PLoS. ONE.* Vol. 5, n. 2, 2010, e9247
132. MP. Hinault, A. Ben-Zvi, P. Goloubinoff. Chaperones and proteases: cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging. *J. Mol. Neurosci.* Vol. 30, n. 3, 2006, pp.249-265
133. A. Natalello et al. Biophysical characterization of two different stable misfolded monomeric polypeptides that are chaperone-amenable substrates. *J. Mol. Biol.*, vol.425, n. 7, 2013, pp.1158-1171
134. S. Priya, SK. Sharma, P. Goloubinoff, Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. *FEBS Lett*, vol.587, n. 13, 2013, pp.1981-1987
135. BA. Kaufman et al, In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol.97, n. 14, 2000, pp.7772-7777
136. BA. Kaufman, JE. Kolesar, PS. Perlman, RA. Butow, A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*, vol.163, n. 3, 2003, pp.457-461

137. CC. Deocaris, SC. Kaul, R. Wadhwa, On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*, vol. 11, n. 2, 2006, pp.116-128
138. LH. Sigal, S. Williams, B. Soltys, R. Gupta, H9724, a monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi*'s flagellin, binds to heat shock protein 60 (HSP60) within live neuroblastoma cells: a potential role for HSP60 in peptide hormone signaling and in an autoimmune pathogenesis of the neuropathy of Lyme disease. *Cell Mol. Neurobiol.* Vol.21, n. 5, 2001, pp.477-495
139. D. Chandra, G. Choy, DG. Tang, Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J. Biol. Chem*, vol. 282, n. 43, 2007, pp.31289-31301
140. A. Pace et al. Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Curr. Pharm. Des*, vol.19, n. 15, 2013, pp.2757-2764
141. AG. Pockley, G. Multhoff, Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe? *Novartis Found. Symp.* Vol.291, n. 1, 2008, pp.86-95
142. AG. Pockley, M. Muthana, SK. Calderwood, The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem. Sci*, vol.33, n. 2, 2008, pp.71-79

143. H. Feng, Y. Zeng, MW. Graner, E. Katsanis, Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood*, vol.100, n. 12, 2002, pp.4108-4115
144. BK. Shin, et al, Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.* Vol.278, n. 9, 2003, pp.7607-7616
145. A. Kol, AH. Lichtman, RW. Finberg, P. Libby, EA. Kurt-Jones, Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.* Vol.164, n. 1, 2000, pp.13-17
146. K. Ohashi, V. Burkart, S. Flohe, H. Kolb, Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol*, vol. 164, n. 2, 2000, pp.558-561
147. RJ. Binder, R. Vatner, P. Srivastava, The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*, vol.64, n. 4, 2004, pp.442-451
148. C. Retzlaff, Y. Yamamoto, PS. Hoffman, H. Friedman, TW. Klein, Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect. Immun*, vol.62, n. 12, 1994, pp.5689-5693
149. W. Chen, U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart, H. Kolb, Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol*, vol.162, n. 6, 1999, pp.3212-3219

150. L. Wieten et al. Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators? *FEBS Let*, vol.581, n. 19, 2007, pp.3716-3722
151. PK. Srivastava, Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. *Curr. Oncol. Rep*, vol.7, n. 2, 2005, pp.104-108
152. MP. Mayer, Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, vol. 153, n. 1, 2004
153. Y. Zhu, J. Zhu, X. Wan, Y. Zhu, T. Zhang, Gene expression of sHsps, Hsp40 and Hsp60 families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs *Toxicology Letters*, vol. 193, n. 3, 2010, pp.242–251
154. A. Neuer, SD. Spandorfer, P. Giraldo, J. Jeremias, S. Dieterle, I. Korneeva, HC. Liu, Z. Rosenwaks, SS. Witkin, Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol*, vol. 7, n. (1–2), 1999, pp.10–16.
155. TG. Evans, Y. Yamamoto, WR. Jeffery, PH. Krone, Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones*, vol. 10, n. 1, 2005, pp.66–78.

156. DD. Brown, KS. Christine, C. Showell, FL. Conlon, Small heat shock protein Hsp27 is required for proper heart tube formation. *Genesis*, vol. 45, n. 11, 2007, pp.667–678.
157. R. Kiessling, et al., Role of hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation. *Immunol. Rev*, vol. 4, n. 121, 1991, pp.91–111
158. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The management of early pregnancy loss. Guideline vol. 1, n. 25. London: RCOG, 2006.
159. WG. Land WG, Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, vol.16, n. 4, 2005, pp.520– 539
160. W. van Eden, R. Spiering, F. Broere, R. van der Zee, A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs, *Cell Stress and Chaperones*, vol.17, n. 3, 2012, pp.281–292 DOI 10.1007/s12192-011-0311-5
161. F. Chalmin, S. Ladoire, G. Mignot, J. Vincent, M. Bruchard, JP. Remy-Martin, W. Boireau, A. Rouleau et al, Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*, vol.120, n. 2, 2010, pp.457–471
162. A. De Maio, Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a

controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*, vol.16, n. 3, 2011, pp.235–249

163. FU. Hartl, M. Hayer-Hartl, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, vol. 295, n. 5561, 2002, pp.1852–1858.
164. Z. Li, A. Menoret, P. Srivastava, Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol*, vol. 14, n. 1, 2002, pp.45–51
165. MC. Roccheri, M. Patti, M. Agnello, F. Gianguzza, E. Carra, AM. Rinaldi, Localization of mitochondrial Hsp56 chaperonin during sea urchin development. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 287, n. 5, 2001, pp.1093–1098.
166. DA. Hart, C. Reno, MP. Hellio Le Graverand, L. Hoffman, W. Kulyk, 2000. Expression of heat shock protein 47(Hsp47) mRNA levels in rabbit connective tissues during the response to injury and in pregnancy. *Biochem. Cell Biol*, vol. 78, n. 4, 2000, pp.511–518.
167. SS. Witkin, TT. Kanninen, G. Sisti, The Role of Hsp70 in the Regulation of Autophagy in Gametogenesis, Pregnancy, and Parturition. In: MacPhee D. (eds) *The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive System Development and Function. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol 222., n. 1, 2017
168. Z. Yue, S. Jin, C. Yang, AL. Levine, N. Heintz, Beckin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a

- haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.100, n. 25, 2003, pp.15077–15082
169. F. Wu, FJ. Tian, Y. Lin, Oxidative stress in placenta: health and diseases. *Biomed Res Int.*, vol. 1, n. 1, 2015, doi: 10.1155/2015/293271
170. TH Hung, TT. Hsieh, SF. Chen, MJ. Li, YL. Yeh, Autophagy in the human placenta throughout gestation. *PLoS One*, vol. 8, n. 12, 2013, pp.e83475
171. T. Jansson, IL. Aye, DC. Goberdhan, The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient- sensing. *Placenta*, vol.33, n. 2, 2012, :e23–9
172. R. Menon, S. Gerber, SJ. Fortunato, SS. Witkin, Lipopolysaccharide stimulation of 70 kilo dalton heat shock protein messenger ribonucleic acid production in cultured human fetal membrane cells. *J Perinatal Med*, vol.29, n. 2, 2001, pp.133–136
173. T. Chaiworapongsa, O. Erez, JP. Kusanovic et al, Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol. 21, n. 7, 2008, pp.449–461
174. A. Chang, Z. Zhang, L. Jia, L. Zhang, Y. Gao, L. Zhang, Alteration of heat shock protein 70 expression levels in term and preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol.26, n. 16, 2013, pp.1581–1585

175. Y. Hirota, J. Cha, M. Yoshie, T. Daikoku, SK. Dey, Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol.108, n. 44, 2011, pp.18073–18078
176. V. Agrawal, MK. Jaiswal, T. Mallers, GK. Katara, A. Gilman-Sachs, KD. Beaman et al, Altered autophagic flux enhances inflammatory responses during inflammation-induced preterm labor. *Sci Rep*, vol.5, n. 1, 2015, pp.9410
177. Z. Li, A. Menoret, P. Srivastava, Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol*, vol.14, n. 1, 2002, pp.45–51.
178. RM. Vabulas, S. Braedel, N. Hilf, H. Singh-Jasuja. S, S. Herter, et al, The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem*, vol. 277, n. 23, 2002, pp.20847–20853.
179. Y. Bulut, E. Faure, L. Thomas, H. Karahashi, KS. Michelsen, et al, Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol*, vol.168, n. 3, 2002, pp.1435–1440.
180. RM. Vabulas, P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, CJ. Kirschning, RD. Issels, H. Wagner, Hsp70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem*, vol. 277, n. 17, 2002, pp.15107–15112.

181. A. Asea, M. Rehli, E. Kabingu, JA. Boch, O. Bare, PE. Auron, et al, Novel signal transduction pathway utilized by extracellular hsp70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem*, vol.277, n. 17, 2002, pp.15028–15034.
182. B. Dybdahl, A. Wahba, E. Lien, T. Flo, A. Waage, et al, Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4. *Circulation*, vol. 105, n. 6, 2002, pp.685–690.
183. H. Bausinger, D. Lipsker, U. Ziylan, S. Manie, JP. Briand, et al, Endotoxin-free heat shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J. Immunol.* Vol.32, n. 12, 2002, pp.3708–3713.
184. B. Gao, MF. Tsan, Endotoxin contamination in recombinant human Hsp70 preparation is responsible for the induction of TNF release by murine macrophages. *J. Biol. Chem*, vol.278, n. 1, 2003, pp.174–179.
185. B. Gao, MF. Tsan, Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor from murine macrophages. *J. Biol. Chem*, vol.317, n. 4, 2003, pp.22523–22529.
186. AG. Pockley, B. Henderson, Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, vol. 373, n. 1738, 2017, pp. 20160522.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0522>

187. MF. Tsan, B. Gao, Cytokine function of heat shock proteins, *Am J Physiol Cell Physiol* vol. 286, n. 4, 2004, C739–C744, 10.1152/ajpcell.00364.2003
188. B. Dybdahl, A. Wahba, E. Lien, TH. Flo, A. Waage, et al, Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4. *Circulation*, vol. 105, n. 6, 2002, pp. 685–690
189. A. Płóciennikowska, A. Agnieszka et al. “Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling” *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 72, n. 3, 2014, pp. 557-581.
190. J. Li, Z. Wang, D. Wei, J. Liu, J. Zhang, J. Wang, Y. Shi, ZJ. Chen, Effect of preconceptional orlistat treatment on in-vitro fertilization outcome in overweight/obese women: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, vol. 19, n. 1, 2018, pp. 391
191. SF. Makrydima, A. Pistiki, CG. Chrelias, VD. Sioulas, CS. Siristatidis, EJ. Giamarellos- Bourboulis, DP. Kassanos, The immunomodulatory and anti-apoptotic effect of dexamethasone in imminent preterm labor: an experimental study. *Eur J Pharmacol*, vol. 730, n. 1, 2014, pp. 31-35.
192. NE. Evangelinakis, EN. Polyzou, GE. Salamalekis, A. Kotsaki, CG. Chrelias, EJ. Giamarellos-Bourboulis, DP. Kassanos. Alterations in the cellular component of the maternal immune system in a murine

- preterm delivery model. *J Maternal Fetal Neonatal Med*, vol. 26, n. 10, 2013, pp. 1024-1029.
193. E. Polyzou, NE. Evangelinakis, A. Pistiki, A. Kotsaki, CS. Siristatidis, CG. Chrelas, E. Salamalekis, DP. Kassanos, EJ. Giamarellos-Bourboulis, Angiotensin-2 primes infection-induced preterm delivery. *PLoS ONE*, vol. 9, n. 1, 2014, pp.e86523.
194. A. Gupta, ZA. Cooper, ME. Tulapurkar, R. Potla, T. Maity, JD. Hasday, IS. Singh, Tolllike receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. *J Biol Chem*, vol. 288, n. 4, 2012, pp.2756-2766.
195. K. Kopanakis, IM Tzepi, A. Pistiki, DP. Carrer, MG. Netea, M. Georgitsi, M. Lymperi, DI. Droggiti, T. Liakakos, A. Machairas, EJ. Giamarellos-Bourboulis, Pre-treatment with low dose endotoxin prolongs survival from experimental lethal endotoxic shock: benefit for lethal peritonitis by *Escherichia coli*. *Cytokine*, vol. 62, n. 3, 2013, pp.382-388.
196. MC. Álvarez-Cabrera, E. Barrientos-Galeana, A. Barrera-García, M. Osorio-Caballero, JF. Acevedo, O. Flores-Herrera, NF. Díaz, A. Molina-Hernández, G. García-López, H. Flores-Herrera, Secretion of heat shock -60, -70 kD protein, IL-1 β and TNF α levels in serum of a term normal pregnancy and patients with pre-eclampsia development. *J Cell Mol Med*, vol.22, n. 11, 2018, pp.5748-52.

197. A. Molvarec, L. Tamási, G. Losonczy, K. Madách, Z. Prohászka, J. Rigó. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaper*, vol.15, n. 3, 2009, pp. 237-27.
198. G. Sisti, TT. Kanninen, I. Ramer, SS. Witkin, Interaction between the inducible 70-kDa heat shock protein and autophagy: effects on fertility and pregnancy. *Cell Stress Chaper*, vol. 20, n. 5, 2015, pp. 753-758.
199. S. Sotiriou, K. Liatsos, I. Ladopoulos, DL. Arvanitis, A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages. *Clin Exp Obstet Gynecol*, vol.31, n. 3, 2004, pp. 185-190.
200. M. Matsuda, A. Sasaki, K. Shimizu, Y. Kamada, S. Noguchi, Y. Hiramatsu, M. Makatsuta, Increased anti-hsp60 and anti-hsp70 antibodies in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Acta Med Okayama*, vol. 71, n. 3, 2017, pp. 201-208.
201. M. Ziegert, SS. Witkin, I. Sziller, H. Alexander, E. Brylla, W. Härtig, Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol*, vol. 7, n. 4, 1999, pp. 180-185.
202. L. Dvorakona, K. Ivankova, L. Krofta, I. Hromadnikova, Expression profile of heat shock proteins in placental tissues of

patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol*, vol.78, n. 4, 2017, e12698.

203. J. Monreal-Flores, MT. Espinosa-García, A. García-Regalado, F. Arechavaleta-Velasco, F. Martínez, The heat shock protein 60 promotes progesterone synthesis in mitochondria of JEG-3 cells. *Reprod Biol*, vol.17, n. 17, 2017, pp.154-61.

204. ER. Barnea, DM. Lubman, YH. Liu, V. Absalon-Medina, S. Hayrabedian, et al, Insight into preimplantation factor (PIF*) mechanism for embryo protection and development: target oxidative stress and protein misfolding (PDI and HSP) through essential RIKP [corrected] binding sit, *PLoS One*, vol.9, n. 11, 2014, e100263.