



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

« ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ »

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**«Μελέτη έκφρασης της PRL-3 σε δείγματα
ενδομητρίωσης»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ ΒΑΪΤΣΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	3
1.1 Φυσιολογία της Αναπαραγωγής	3
1.2 Υπογονιμότητα	6
1.2.1 Ανδρική Υπογονιμότητα	7
1.2.2 Γυναικεία Υπογονιμότητα	9
1.3 Ενδομητρίωση	10
1.4 Φωσφατάσες της Αναγέννησης του Ήπατος (Phosphatase of regenerating liver, PRL)	15
1.4.1 Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις PRL.....	21
1.4.2 Ρύθμιση της έκφρασης των PRL και λειτουργία	22
1.5 Φωσφατάση της Αναγέννησης του Ήπατος-3 και Ενδομητρίωση.....	24
2. Σκοπός	28
3. Υλικά και Μέθοδοι	29
3.1 Συλλογή υλικού από χειρουργεία	29
3.2 Εξαγωγή RNA από τους ιστούς	31
3.3 Σύνθεση cDNA απο τα RNA των δειγμάτων.....	32
3.4 Real Time PCR για την έκφραση της PRL-3	33
4. Αποτελέσματα	34
5. Συζήτηση	37
Βιβλιογραφία	40

1. Εισαγωγή

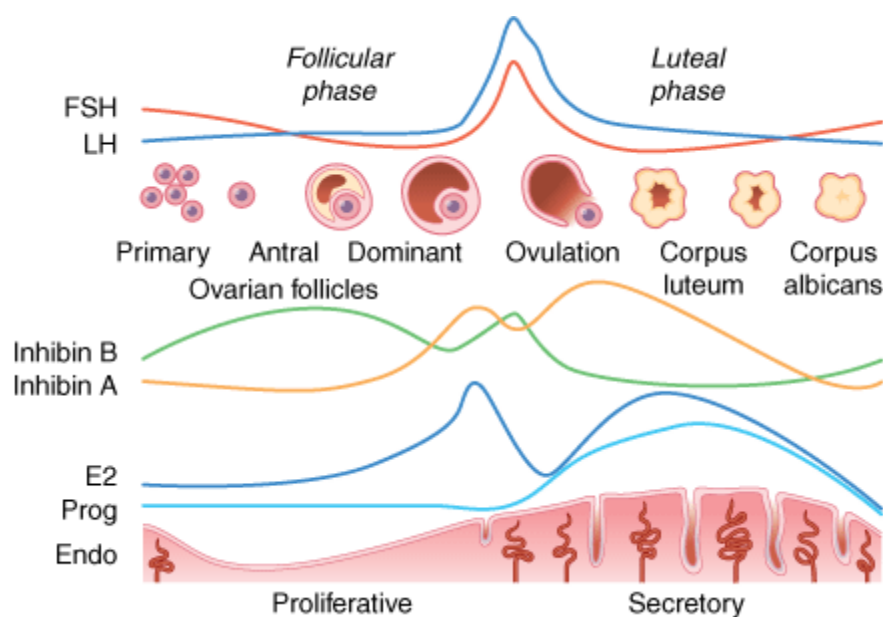
1.1 Φυσιολογία της Αναπαραγωγής

Η αναπαραγωγή ορίζεται ως τη διαδικασία που οι οργανισμοί συνεχίζουν το είδος τους. Η σεξουαλική αναπαραγωγή προϋποθέτει το ζευγάρωμα ενός θηλυκού και ενός αρσενικού ατόμου του ίδιου είδους συνεπώς τον συνδυασμό των γονιδίων τους και την δημιουργία ενός νέου ατόμου που είναι γενετικά διαφορετικό από τους δύο γονείς του. Αυτού του είδους η αναπαραγωγή βασίζεται στην μείωση, με την οποία προκύπτει «ανακάτεμα» των γονιδίων και νέοι συνδυασμοί αυτών σε κάθε γενιά, επιτρέποντας τους απογόνους να επιβιώσουν σε ένα περιβάλλον που αλλάζει. Η αναπαραγωγή χαρακτηρίζεται από δύο διαδικασίες: την μείωση και την γονιμοποίηση. Η μείωση αφορά τον υποδιπλασιασμό των 46 χρωμοσωμάτων και η γονιμοποίηση την ένωση των γαμετών και την αποκατάσταση του αριθμού των χρωμοσωμάτων (23 χρωμοσώματα πατρικής και 23 χρωμοσώματα μητρικής προέλευσης). Τα αναπαραγωγικά συστήματα των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων έχουν κάποιες βασικές ομοιότητες αλλά και κάποιες στοιχειώδεις διαφορές. Η ομοιότητα τους έγκειται στην ομολογία τους, στο γεγονός δηλαδή ότι προκύπτουν από τους ίδιους εμβρυονικούς ιστούς. Και τα δυο συστήματα διαθέτουν γονάδες και σεξουαλικά όργανα. Τέλος, και τα δύο συστήματα υφίστανται ωρίμανση των σεξουαλικών τους οργάνων τα οποία γίνονται λειτουργικά κατά τη διάρκεια της εφηβείας ως αποτέλεσμα της έκκρισης σεξουαλικών ορμονών. Οι διαφορές των δύο συστημάτων αφορούν την λειτουργία και τον ρόλο τους στον αναπαραγωγικό κύκλο. Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα παράγει, διατηρεί και επιτρέπει την μεταφορά των σπερματικών κυττάρων (σπερματοζωάρια) στην θηλυκή αναπαραγωγική οδό. Παράλληλα, το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα παράγει και διατηρεί ωοκύτταρα τα οποία επιτρέπει να γονιμοποιηθούν από τα σπερματοζωάρια. Επίσης υποστηρίζει την ανάπτυξη απογόνων (εμφύτευση) και την γέννηση νέου ατόμου. Στα θηλυκά άτομα γεννιούνται με συγκεκριμένο αριθμό ωαρίων και δεν μπορούν να παράγουν νέα σε αντίθεση με τα αρσενικά τα οποία παράγουν σπερματικά κύτταρα συνεχώς.

Κατά την εμβρυονική ανάπτυξη και γύρω στον πέμπτο μήνα, οι ωοθήκες περιέχουν περίπου έξι με επτά εκατομμύρια ωογόνια τα οποία ξεκινούν να υφίστανται μείωση. Τα ωογόνια παράγουν πρωτογενή ωκύτταρα τα οποία παραμένουν στο στάδιο της πρόφασης I της μείωσης από την γέννηση έως και την εφηβεία. Μετά την εφηβεία, σε κάθε ωοθυλακιορρηκτικό κύκλο, ένα ή και περισσότερα ωάρια ξαναρχίζουν την μείωση και υφίστανται την πρώτη τους μειωτική διαίρεση κατά την ωορρηξία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του δευτερογενούς ωαρίου και ενός πολικού σωματίου. Η μειωτική διαίρεση τότε σταματά στο στάδιο της μετάφασης II και η γονιμοποίηση παρέχει το κατάλληλο ερέθισμα για την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης που θα καταλήξει στην δημιουργία ενός ωαρίου και ενός επιπλέον πολικού σωματίου. Στις ωοθήκες των νεογέννητων κοριτσιών υπάρχουν περίπου ένα εκατομμύριο ωκύτταρα. Ο αριθμός αυτός μειώνεται σημαντικά και στην εφηβεία υπάρχουν περίπου 400,000 με 500,000 ωάρια. Κατά μέσο όρο, στη διάρκεια ζωής μιας γυναίκας περίπου 500 με 1000 ωάρια απελευθερώνονται με την ωορρηξία. Στην εφηβεία, περίπου στα 10 με 13 έτη απελευθερώνεται ένα ωάριο κάθε 28 περίπου μέρες και αυτό συνεχίζεται μέχρι η γυναίκα να φτάσει σε ηλικία εμμηνόπαυσης. Κατά την ωορρηξία ένα ή περισσότερα ωάρια απελευθερώνεται μέσα στη σάλπιγγα όπου και παραμένουν για τις επόμενες δύο με τρεις ημέρες. Σε περίπτωση που δεν θα συμβεί γονιμοποίηση, το ωάριο θα αποβληθεί από τον οργανισμό μέσω της εμμήνου ρύσεως δύο βδομάδες μετά την ωορρηξία. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται εμμηνόρροια και διαρκεί από τέσσερις έως και επτά μέρες κατά την διάρκεια των οποίων αποβάλλονται και τα τοιχώματα του ενδομητρίου, το οποίο μειώνεται σε πάχος και σε αγγείωση. Ο αναπαραγωγικός κύκλος στα θηλυκά άτομα αποτελείται από δύο φάσεις : στην ωοθυλακική και στην ωχρινική. Κατά την ωοθυλακική φάση η επίδραση των οιστρογόνων προκαλεί την πάχυνση του ενδομητρίου και την ωρίμανση ωοθυλακίων από τα οποία προκύπτει το ωάριο το οποίο θα απελευθερωθεί στην ωορρηξία. Μετά την ωορρηξία τα τοιχώματα του ενδομητρίου εισέρχονται σε μια εκκριτική φάση, την ωχρινική με την βοήθεια της ορμόνης προγεστερόνης η οποία τα προετοιμάζει για την εμφύτευση. Η προγεστερόνη παράγεται από το ωχρό σωματίο και βοηθά τα τοιχώματα του ενδομητρίου να παχυνθούν και να αποκτήσουν ισχυρότερη αγγείωση ώστε να μπορέσουν να υποστηρίξουν το έμβρυο που δυνητικά θα εμφυτευθεί. Εάν συμβεί η γονιμοποίηση, το έμβρυο παράγει την ορμόνη Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) η οποία « διατηρεί» το ωχρό σωματίο έως ότου σχηματιστεί ο πλακούντας, ο οποίος τότε θα αναλάβει την παραγωγή της προγεστερόνης.

Εάν δεν συμβεί γονιμοποίηση το ωχρό σωματίο αποίπτει και τα επίπεδα της προγεστερόνης μειώνονται με αποτέλεσμα τα παχιά τοιχώματα του ενδομητρίου που προέκυψαν με τη βοήθεια της τεστοστερόνης να μην μπορούν να διατηρηθούν και να αποπέσουν μέσω της εμμήνου ρύσεως από τον κόλπο. Η εμμηνουσία ορίζει ουσιαστικά την αρχή ενός νέου καταμήνιου κύκλου. Η εμμηνόπαυση είναι η φυσιολογική παύση των εμμηνουσιακών κύκλων της γυναίκας και συμβαίνει όταν παύουν οι ωοθήκες να παράγουν οιστρογόνα.

Η μέση ηλικία εμμηνόπαυσης είναι τα 50,5 έτη αλλά σε μερικές γυναίκες μπορεί να συμβεί νωρίτερα για λόγους όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος και οι χημειοθεραπείες, θυροειδιοπάθειες και ο σακχαρώδης διαβήτης. Συμπερασματικά, τα ωάρια που διαθέτει μια γυναίκα στην γέννηση της «γερνάνε» όσο «γερνά» και η ίδια.



Εικόνα 1: Οι δύο φάσεις του καταμήνιου κύκλος μιας γυναίκας, οι αυξομειώσεις στα επίπεδα των ορμονών και το πάχος του ενδομητρίου. (Fauci AS et al, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition)

Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα έχει ως κύριο όργανο τους όρχεις. Στους όρχεις παράγεται το σπέρμα με την διαδικασία της σπερματογένεσης καθώς και οι αρσενικές σεξουαλικές ορμόνες (τεστοστερόνη). Οι όρχεις δημιουργούνται στο έμβρυο κοντά στα νεφρά και μεταναστεύουν στη θέση τους δύο μήνες πριν την γέννηση.

1.2 Υπογονιμότητα

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία σύλληψης μετά την παρέλευση ενός έτους σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη ή χρήση αντισυλληπτικών μέσων και εμφανίζεται στο 15% των ζευγαριών σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) . Τα τελευταία χρόνια μάλιστα εμφανίζεται σε ένα μεγάλο και διαρκώς αυξανόμενο αριθμό ζευγαριών παίρνοντας διαστάσεις σοβαρού κοινωνικού προβλήματος.

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Ως πρωτοπαθής υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται η αδυναμία ενός άτεκνου ζευγαριού να κάνει παιδιά για πρώτη φορά, ενώ ζευγάρια που έχουν ήδη συλλάβει στο παρελθόν και έχουν τεκνοποιήσει ή έχουν κάνει άμβλωση και αντιμετωπίζουν μεγάλη δυσκολία στο να επιτύχουν επόμενη κύηση, θεωρείται ότι έχουν δευτεροπαθή υπογονιμότητα.

Ο αριθμός των ζευγαριών που ζητούν ιατρική βοήθεια για να συλλάβουν έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και υπολογίζεται πως πρόβλημα υπογονιμότητας αντιμετωπίζουν ένα στα τέσσερα νιόπαντρα ζευγάρια. Η επιτυχής αντιμετώπιση των προβλημάτων της γονιμότητας εξαρτάται από την ακριβή διάγνωση των αιτιών της υπογονιμότητας, η οποία επιτυγχάνεται με το λεπτομερές ιστορικό ,τη φυσική εξέταση του ζεύγους και τον κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αίτια της υπογονιμότητας οφείλονται τόσο στην γυναίκα όσο και στον άνδρα. Διεθνείς μελέτες έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό 40% των περιστατικών οφείλεται στον γυναικείο παράγοντα, 40% στον ανδρικό παράγοντα και 20% οφείλεται σε συνδυασμό και των δύο (γυναικείας και ανδρικής προέλευσης). Επίσης σε ένα ποσοστό 10% δεν ανευρίσκεται κανένα αίτιο που να θεωρείται υπεύθυνο για την υπογονιμότητα και τότε πρόκειται για ανεξήγητη υπογονιμότητα (όταν οι κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις είναι φυσιολογικές).

Στα συνήθη αίτια υπογονιμότητας περιλαμβάνονται:

- Διαταραχές στην ωοθυλακιορρηξία
- Πρόβλημα στις σάλπιγγες (απόφραξη, συμφύσεις)
- Αυξημένη ηλικία της γυναίκας
- Ενδομητρίωση
- Εχθρική συμπεριφορά της τραχηλικής βλέννας και παθήσεις του τραχήλου
- Παθήσεις της μήτρας
- Προβλήματα από το σπέρμα που αφορούν τον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων
- Παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση οινοπνεύματος, το εργασιακό περιβάλλον, το στρες [B]

1.2.1 Ανδρική Υπογονιμότητα

Στον παρελθόν υπήρχε η αντίληψη ότι όταν ένα ζευγάρι είχε πρόβλημα τεκνοποίησης, υπεύθυνη για αυτό ήταν μόνο η γυναίκα. Σήμερα με βάση διάφορες στατιστικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι ο άνδρας είναι τουλάχιστον κατά το ήμισυ υπεύθυνος για την υπογονιμότητα του ζευγαριού. Για αυτό και θα πρέπει η αξιολόγηση των αρσενικών γαμετών και γενικότερα του άνδρα να πραγματοποιείται στον ίδιο βαθμό που αντιμετωπίζεται και η γυναίκα.

Ποικίλα είναι τα αίτια που μπορεί να προκαλέσουν διαταραχή στην διαδικασία της φυσιολογικής σπερματογένεσης ή εμπόδια στην φυσιολογική έξοδο του παραγόμενου σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση. Η διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας όπως και της γυναικείας δεν είναι μια απλή διαδικασία. Αρχικά θα πρέπει να ληφθεί ένα λεπτομερές ιστορικό για τυχόν παθήσεις στα γεννητικά όργανα ή και σε άλλα συστήματα καθώς επίσης και χειρουργικές επεμβάσεις που μπορεί να έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν. Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η καταγραφή λήψης φαρμάκων, κατανάλωσης οινοπνεύματος, η επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες και σε υψηλές θερμοκρασίες διότι αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων. Την λήψη του ιστορικού ακολουθεί η φυσική εξέταση και η εξέταση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO).

Για την αρχική εκτίμηση του σπέρματος απαιτούνται δύο σπερμοδιαγράμματα σε χρονικό διάστημα μεταξύ αυτών από 7 ημέρες έως και 3 εβδομάδες. Αν τα αποτελέσματα των δύο εξετάσεων διαφέρουν σημαντικά, θα πρέπει να γίνει και τρίτο σπερμοδιάγραμμα. Εάν το σπερμοδιάγραμμα βρεθεί εντός φυσιολογικών ορίων η εξέταση του άνδρα δεν έχει καμία επιπρόσθετη αξία.

Η ανδρική υπογονιμότητα εκδηλώνεται με διαταραχές στον αριθμό, στην κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Παρακολουθώντας τις παραμέτρους τους σπέρματος από το 1980 μέχρι και σήμερα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι υπάρχει όλο και μεγαλύτερη μείωση των φυσιολογικών ορίων των παραμέτρων όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO).

Cut-off reference values for semen characteristics as published in consecutive WHO manuals

Semen characteristics	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010
Volume (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 1.5
Sperm count (10 ⁶ /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 15
Total sperm count (10 ⁶)	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 39
Total motility (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 40
Progressive motility	≥ 2	≥ 25%	≥ 25% (a)	≥ 25% (a)	≥ 32% (a+b)
Vitality (%)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	≥ 58
Morphology (%)	80.5	≥ 50	≥ 30	(14)*	≥ 4*
Leukocyte count (10 ⁶ /mL)	< 4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0

Πίνακας 1: Τα φυσιολογικά όρια των παραμέτρων του σπέρματος

1.2.2 Γυναικεία Υπογονιμότητα

Οι λόγοι που οδηγούν σε γυναικεία υπογονιμότητα μπορεί να είναι δύσκολο να διαγνωσθούν. Για να επιτευχθεί μια εγκυμοσύνη θα πρέπει να λειτουργούν όλες οι παρακάτω διαδικασίες: Αρχικά, θα πρέπει να υπάρχει ωορρηξία και ως αποτέλεσμα απελευθέρωση ενός ωαρίου σε μία από τις δύο σάλπιγγες. Στη συνέχεια, τα σπερματοζώαρια να εισέλθουν εντός της σάλπιγγας ταξιδεύοντας μέσω του κόλπου και της μήτρας. Επίσης, το γονιμοποιημένο ωάριο θα πρέπει να μεταναστεύσει με την βοήθεια των λαχνών των σαλπιγγών και χημειοτακτικών παραγόντων στο ενδομήτριο όπου θα πρέπει να είναι ικανό να εμφυτευθεί. Στις γυναίκες, ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων μπορεί να διαταράξει τη παραπάνω διαδικασία σε κάθε βήμα.

Αρχικά θα πρέπει να αναφερθούν οι διαταραχές στην ωοθυλακιορρηξία, δηλαδή η σπάνια ή η καθόλου ωορρηξία. Αυτό μπορεί να προκληθεί από προβλήματα στην ρύθμιση των αναπαραγωγικών ορμονών από τον υποθάλαμο ή πρόβλημα στις ωοθήκες. Παραδείγματα διαταραχών ωοθυλακιορρηξίας αποτελούν οι παρακάτω παθήσεις:

1. Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (Polycystic ovary syndrome, PCOS). Αποτελεί την πιο συχνή αιτία γυναικείας υπογονιμότητας και προκύπτει από ορμονική ανισορροπία που επηρεάζει την ωορρηξία. Το PCOS σχετίζεται με ανοχή στην ινσουλίνη, παχυσαρκία, τριχοφυΐα στο πρόσωπο και στο σώμα και ακμή.
2. Δυσλειτουργία του Υποθαλάμου. Η FSH και η LH είναι οι δύο ορμόνες που εκκρίνονται έπο τον υποθάλαμο και είναι υπεύθυνες για την πρόκληση της ωορρηξίας. Το υπερβολικό πνευματικό ή σωματικό στρες, το πολύ υψηλό ή χαμηλό σωματικό βάρος ή μια απότομη μεταβολή αυτού μπορεί να επηρεάσουν την παραγωγή αυτών των ορμονών και κατ' επέκταση την ωορρηξία.
3. Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια. Η διαταραχή αυτή προκύπτει είτε αυτοάνοσα είτε από πρόωμη απώλεια των ωαρίων στην ωοθήκη λόγω γενετικών παραγόντων ή χημειοθεραπείας.
4. Υπερπρολακτιναιμία. Η υπόφυση μπορεί να παράγει υπερβολικές ποσότητες προλακτίνης που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής των οιστρογόνων και την υπογονιμότητα. Η κατάσταση αυτή μπορεί να προκύψει εκτός λόγω προβλήματος στην υπόφυση και από την λήψη ορισμένων φαρμακευτικών ουσιών για κάποια άσχετη ασθένεια.

Εκτός από τις διαταραχές στην ωορρηξία, υπογονιμότητα μπορεί να προκύψει από βλάβη στις σάλπιγγες. Αυτές οι βλάβες αναφέρονται με τον όρο «σαλπιγγικός παράγοντας υπογονιμότητας». Κάποια βλάβη ή φραγή στις σάλπιγγες μπορεί να αποτρέψει την είσοδο του σπέρματος ή το πέρασμα του γονιμοποιημένου ωαρίου από τις σάλπιγγες προς τη μήτρα. Κάποιοι λόγοι που μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη ή φραγή των σαλπιγγών είναι :

1. Φλεγμονώδης Νόσος της Πυέλου. Η κατάσταση αυτή αφορά την φλεγμονή στην μήτρα ή στις σάλπιγγες λόγω μικροβίων όπως τα χλαμύδια, η γονόρροια ή άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νόσων.
2. Προηγούμενη Χειρουργική επέμβαση στη κοιλιακή χώρα συμπεριλαμβανομένου του χειρουργείου για την έκτοπη κύηση.
3. Πυελική Φυματίωση.

Μια επιπλέον κατάσταση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα είναι η ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση αφορά την έκτοπη ανάπτυξη ιστού του ενδομητρίου, κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε μη σωστή εμφύτευση αλλά ακόμα και με πιο έμμεσους τρόπους σε βλάβες στα ωάρια ή στα σπερματοζωάρια.

Το ενδομήτριο είναι η περιοχή που το έμβρυο εμφυτεύεται και μεγαλώνει. Για αυτό τον λόγο πολλοί ενδομητρικοί αλλά και τραχηλικοί παράγοντες εμπλέκονται στην υπογονιμότητα. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να επέμβουν στην εμφύτευση οδηγώντας σε αποβολές. Κάποιοι τέτοιοι παράγοντες είναι οι εξής:

1. Καλοήθης πολύποδες ή όγκοι στη μήτρα, επηρεάζουν την εμφύτευση του εμβρύου.
2. Φλεγμονή στην μήτρα
3. Ανωμαλίες εκ γενετής στην μήτρα, όπως ανωμαλίες στο σχήμα της.
4. Τραχηλική στένωση λόγω κληρονομικότητας ή κάκωσης
5. Τραχηλική βλέννη που αποτρέπει την μετακίνηση των σπερματοζωαρίων μέσα στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα.

Τέλος, σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί ότι υπάρχει και ανεξήγητη υπογονιμότητα. Σε αυτή τη περίπτωση ίσως να συνυπάρχουν κάποια μικρά προβλήματα ίσως και στους δύο συντρόφους, αλλά σε κάθε περίπτωση δεν θα πρέπει να αγνοηθεί η χρήσιμη βοήθεια των μεθόδων της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

1.3 Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση αποτελεί χρόνια πάθηση των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και επηρεάζει το 5-10% αυτών των γυναικών στις ΗΠΑ (Giudice LC, 2004). Το κυρίως χαρακτηριστικό της είναι η παρουσία ενδομητριωσικού ιστού σε περιοχές εκτός της κοιλότητας της μήτρας, κυρίως στο περιτόναιο και στις ωθήκες. Τα συμπτώματα αυτής αποτελούν η δυσμηνόρροια, δυσπαρευνία, δυσουρία, κοιλιακό άλγος και υπογονιμότητα. Αποτελεί την πιο κοινή καλοήγη γυναικολογική ασθένεια. Οι έκτοποι ενδομητριωσικοί ιστοί παρουσιάζουν σημεία φλεγμονής η οποία προκαλεί τον πόνο, αποτρέπει τη σωστή λειτουργία των σαλπίνγων, μειώνει την δεκτικότητα του ενδομητρίου και εμποδίζει την ανάπτυξη του εμβρύου (Berkley KJ et al, 2004; Barnhart K et al, 2002). Οι έκτοποι ενδομητριωσικοί ιστοί συνεχίζουν να έχουν λειτουργία κανονικού ενδομητρίου- παχαίνουν σε κάθε καταμήνιο κύκλο και στη συνέχεια αποδομούνται και ματώνουν. Επειδή όμως οι ιστοί αυτοί είναι έκτοποι το αίμα και τα κομμάτια των ιστών που αποδομούνται σε κάθε καταμήνιο κύκλο δεν έχουν διέξοδο από το σώμα όπως θα είχαν φυσιολογικά μέσω του κόλπου. Όταν η ενδομητρίωση αφορά τις ωθήκες σχηματίζονται κύστει που ονομάζονται ενδομητριώματα. Οι παράπλευροι ιστοί μπορεί να ερεθιστούν και εν τέλει να σχηματιστούν ουλώδεις ιστοί και προσκολλήσεις. Οι τρεις διακριτές μορφές της ενδομητρίωσης είναι τα εμφυτεύματα στην επιφάνεια του πυελικού περιτόναιου και των ωθηκών (περιτοναϊκή ενδομητρίωση), ωθηκικές κύστει επενδυμένες με βλεννογόνο ενδομητρίου (ενδομητριώματα) και οι στερεές μάζες μεταξύ κόλπου και πρωκτού που αποτελούνται από ενδομητριωσικό, λιπώδη και ινομυώδη ιστό (ορθοκολπικοί ενδομητριωσικοί όζοι). Αυτοί οι τρεις τύποι μπορεί να είναι παράγωγα της ίδιας παθολογικής διεργασίας ή να προκαλούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς (Garry et al, 2004; Brosens et al, 2004).

Τα πιθανά αίτια ποικίλουν από ανατομικές ιδιαιτερότητες της κάθε γυναίκας έως και βιοχημικές ανωμαλίες της μήτρας.

Παρόλο που τα ακριβή αίτια της ενδομητρίωσης παραμένουν άγνωστα, μερικές πιθανές εξηγήσεις είναι :

1. Παλίνδρομη εμμηνόρροια. Σε αυτή τη κατάσταση το αίμα και ιστοί του ενδομητρίου που αποπίπτουν με την περίοδο δεν αποβάλλονται από τον κόλπο αλλά παλινδρομούν πίσω στην πυελική κοιλότητα. Τα κύτταρα του ενδομητρίου που παρασύρονται εκεί προσκολλώνται στα πυελικά τοιχώματα και στις επιφάνειες των οργάνων της πυέλου όπου και αναπτύσσονται και σε κάθε καταμήνιο κύκλο υφίστανται πάχυνση και απόπτωση.
2. Μετασχηματισμός περιτοναϊκών κυττάρων. Η θεωρία αυτή ονομάζεται «θεωρία επαγωγής» όπου οι ειδικοί πιστεύουν πως υπό την επίδραση ορισμένων ορμονών ή ανοσολογικών παραγόντων τα περιτοναϊκά κύτταρα μετασχηματίζονται σε ενδομητρικά.
3. Μετασχηματισμός εμβρυονικών κυττάρων. Ορμόνες όπως τα οιστρογόνα μετασχηματίζουν εμβρυονικά κύτταρα σε κύτταρα ενδομητρίου κατά τη διάρκεια της εφηβείας.
4. Εμφύτευση σε χειρουργική ουλή. Μετά έπο ορισμένα χειρουργεία όπως η υστερεκτομή ή η καισαρική κύτταρα του ενδομητρίου μπορεί να προσκολληθούν πάνω σε χειρουργικές ουλές.
5. Μετανάστευση κυττάρων ενδομητρίου μέσω των αιμοφόρων αγγείων σε άλλα μέρη του σώματος.
6. Διαταραχή ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι πιθανό ότι εάν υπάρχει πρόβλημα στο ανοσοποιητικό τους σύστημα το σώμα να μην είναι ικανό να αναγνωρίσει και να καταστρέψει ενδομητριωσικούς ιστούς που βρίσκονται εκτός της μήτρας.

Παρά τις διάφορες θεωρίες που παραμένουν ανεπιβεβαίωτες υπάρχουν κάποιοι παράγοντες αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη ενδομητρίωσης σε μια γυναίκα. Τέτοιοι παράγοντες είναι η μη τεκνοποίηση, η έναρξη της εμμήνου ρύσεως σε πολύ νεαρή ηλικία, οι βραχείς καταμήνιοι κύκλοι (λιγότερες από 27 ημέρες), η αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων στο σώμα ή η έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα σε οιστρογόνα, το χαμηλό σωματικό βάρος, η κατανάλωση αλκοόλ, κληρονομικοί παράγοντες (μητέρα, αδερφή ή θεία με ενδομητρίωση)- η συχνότητα εμφάνισης ενδομητρίωσης είναι επτά φορές αυξημένη σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Simpson JL et al, 1980), οποιαδήποτε ιατρική κατάσταση που αποτρέπει την έξοδο της εμμήνου ρύσεως από το σώμα και ανωμαλίες στη μήτρα.

Τα κλινικά στοιχεία προτείνουν μια επιβλαβή επίδραση της αδιάλειπτης ωοθηκικής δράσης στην εξέλιξη και υποτροπή της ενδομητρίωσης (Olive DL et al, 1993; Olive DL et al., 2001). Τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης τυπικά ξεκινούν κατά την εμμηναρχή και εξαλείφονται μετά την εμμηνόπαυση (Missmer SA et al, 2004). Τα επίπεδα των πυρηνικών υποδοχέων για οιστρογόνα και προγεστερόνη είναι διαταραγμένα στους ενδομητριωσικούς ιστούς σε σχέση με το φυσιολογικό ενδομήτριο (Brandenberger AW et al, 1999; Attia GR et al , 2000; Xue Q et al, 2007). Τα οιστρογόνα ενεργοποιούν την άυξηση του ενδομητριωσικού ιστού ενώ οι αναστολείς της αρωματάσης που αποτρέπουν τον σχηματισμό των οιστρογόνων είναι ευεργετικά για ασθενείς με ενδομητρίωση (Attar E et al, 2006; Kettel LM et al , 1996; Murphy AA et al , 1994). Επιπλέον, παράγονται οιστρογόνα τοπικά σε ιστούς ενδομητρίωσης λόγω διαταραγμένης ενεργοποίησης του στερεοειδικού μονοπατιού που εμπεριέχει την αρωματάση (Bulun SE et al , 2005).

Η κύρια επιπλοκή που προκύπτει με την ενδομητρίωση είναι η δυσκολία επίτευξης εγκυμοσύνης. Περίπου το ένα τρίτο των γυναικών με ενδομητρίωση δυσκολεύονται να μείνουν έγκυες. Αυτή η υπογονιμότητα μπορεί να προκύψει και λόγω έμφραξης των σαλπίνγγων λόγω παρουσίας ενδομητριωσικού ιστού (Guzick DS et al , 1997; Stovall DW et al, 1997).

Μια άλλη σημαντική επιπλοκή σε ασθενείς με ενδομητρίωση είναι ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Παρόλο που ο γενικός κίνδυνος εμφάνισης αυτού του τύπου καρκίνου είναι μικρός, μελέτες συνιστούν πως είναι ελαφρώς αυξημένος σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Επιπλέον, παρότι και σπάνια, μια άλλη μορφή καρκίνου, το σχετιζόμενο με την ενδομητρίωση αδενοκαρκίνωμα μπορεί να αναπτυχθεί αργότερα στη ζωή γυναικών που είχαν ενδομητρίωση.

Η διάγνωση της ενδομητρίωσης μπορεί να γίνει με τις παρακάτω δοκιμασίες:

1. Πυελική Εξέταση. Ο γιατρός αναζητά με τα χέρια του ενδομητριωσικές κύστες εντός της πυέλου.
2. Υπέρηχος για την ανίχνευση ενδομητριωμάτων.
3. Λαπαροσκόπηση, δηλαδή ανίχνευση απο τον χειρουργό εστιών ενδομητρίωσης στη πύελο.

Η θεραπεία της ενδομητρίωσης αποτελείται από φαρμακευτική αγωγή ή χειρουργική επέμβαση. Η επιλογή κάποιας από τις δύο αφορά την σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ασθενούς αλλά και την επιθυμία της για επίτευξη εγκυμοσύνης. Η αγωγή με ορμόνες βοηθά στο να μειωθεί ο πόνος που προκύπτει λόγω της ενδομητρίωσης. Καθώς η αύξηση και η μείωση των επιπέδων των ορμονών κατά τον καταμήνιο κύκλο προκαλεί την πάχυνση και την απόπτωση του ενδομητρίου, η παροχή εξωγενώς ορμονών επιβραδύνει την ανάπτυξη αυτών των ιστών και αποτρέπει την δημιουργία νέων. Η θεραπεία με ορμόνες βελτιώνει τα συμπτώματα αλλά δεν αποτελεί μόνιμη θεραπεία για την ενδομητρίωση καθώς αυτά επανεμφανίζονται μόλις η αγωγή σταματήσει. Οι ορμονικές θεραπείες που προτείνονται στην ενδομητρίωση είναι :

1. Τα αντισυλληπτικά
2. Οι ανταγωνιστές και αγωνιστές της GnRH. Αυτά τα φάρμακα μπλοκάρουν την παραγωγή ορμονών που ενεργοποιούν τις ωοθήκες. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται τα επίπεδα των οιστρογόνων και αποτρέπεται η ωορρηξία με αποτέλεσμα την λέπτυνση των ενδομητριωσικών ιστών.
3. Θεραπεία προγεστίνης

Παρά το γεγονός ότι οι ορμονικές θεραπείες βοηθάνε στην μείωση των δυσάρεστων συμπτωμάτων της ενδομητρίωσης, σε γυναίκες που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν προτείνεται η χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερων ενδομητριωσικών ιστών. Παρόλα αυτά, ο κίνδυνος υποτροπής μετά από χειρουργική ή/ και ορμονική θεραπεία φθάνει το 50-80% (Mechsner et al, 2016).

1.4 Φωσφατάσες της Αναγέννησης του Ήπατος (Phosphatase of regenerating liver, PRL)

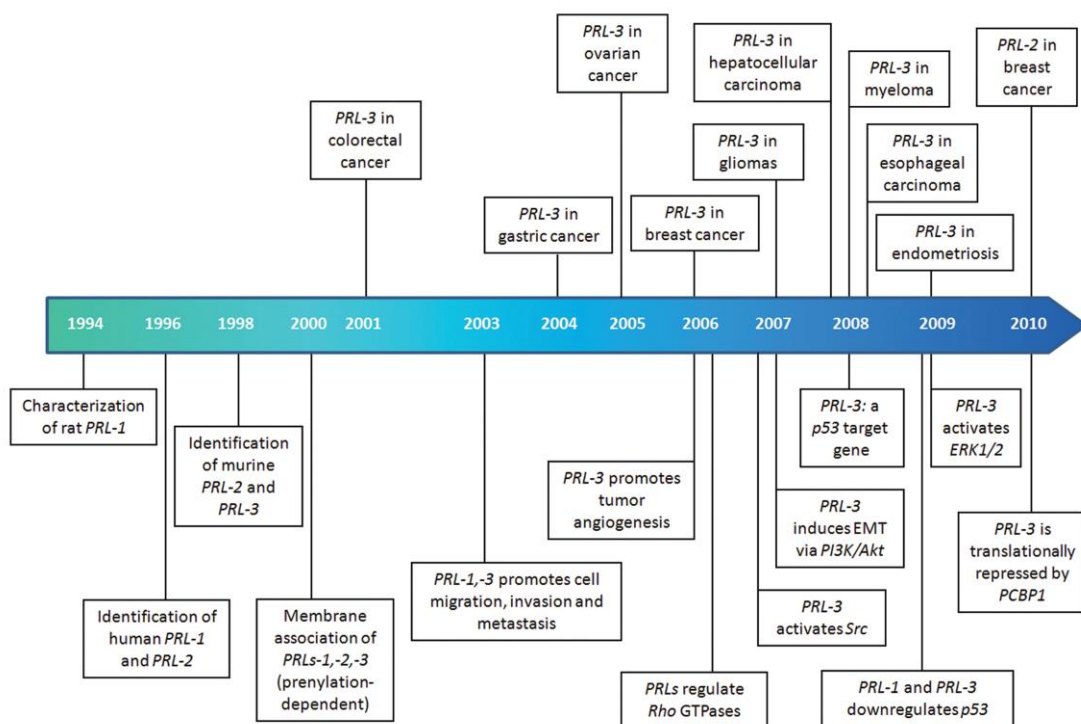
Μια από τις πολλές διάφορες μορφές φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης είναι και η «φωσφορυλίωση της τυροσίνης», η οποία αφορά την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στο αμινοξύ της τυροσίνης σε μια πρωτεΐνη. Η διαδικασία αυτή είναι ένα σημαντικό στάδιο στην μετάδοση του σήματος στα κύτταρα και στην ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης επιτελείται από την ισορροπημένη δράση των πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης (protein tyrosine kinases, PTKs) και των πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης (protein tyrosine phosphatases, PTPs). Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης αποτελούνται από μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων (>100 ένζυμα), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην θετική και αρνητική ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης καθώς και της επιβίωσης ή απόπτωσης των κυττάρων (Alonso et al, 2004). Η ανώμαλη φωσφορυλίωση της τυροσίνης που προκύπτει από απορρύθμιση της δραστηριότητας των PTP έχει δείχθει πως εμπλέκεται στην εξέλιξη διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Ostman et. Al, 2006).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών φωσφατασών που ονομάζονται PRL – φωσφατάσες της αναγέννησης του ήπατος (phosphatases of regenerating liver) εμπλέκονται σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο (Bessette et al, 2008). Η οικογένεια αυτών των φωσφατασών αποτελείται από τρία μέλη: την PRL-1, την PRL-2 και την PRL-3. Λόγω της διατηρημένης αλληλουχίας αμινοξέων στην καταλυτική περιοχή τους έχουν ταξινομηθεί ως μια μοναδική υπομονάδα πρωτεϊνικών φωσφατασών με διπλή ειδικότητα (Alonso et al ,2004). Στον πίνακα 2 φαίνεται μια σύνοψη των επιστημονικών ερευνών για τις PRL από το 1994 έως το 2010.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας, η PRL-1 αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ένα από τα γονίδια που παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση στο αναγεννητικό ήπαρ του αρουραίου και σε κύτταρα επεξεργασμένα με μιτογόνες ουσίες (Mohn et al, 1991 ; Diamond et al, 1994). Ακολούθως οι πρωτεΐνες PRL-2 και PRL-3 ανακαλύφθηκαν ύστερα από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για ομολογία με την PRL-1 σε ποντίκια (Zeng et al, 1998). Σε μια ανεξάρτητη μελέτη όπου εκτελέστηκε ένα screening πρενυλίωσης *in vitro* ανακαλύφθηκαν και οι ανθρώπινες PRL-1 και PRL-2 (Cates et al, 1996). Στους ανθρώπους, οι πρωτεΐνες PRL

κωδικοποιούνται από διαφορετικά χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα η PRL-1 βρίσκεται στο 6q12, η PRL-2 στο 1p35 και η PRL-3 στο 8q24. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών PRL μοιράζονται σημαντικές ομοιότητες σε αμινοξέα- 87% ομοιότητα μεταξύ της PRL-1 και PRL-2, 79% ομοιότητα μεταξύ της PRL-1 και PRL-3 και 76% ομοιότητα μεταξύ της PRL-2 και της PRL-3. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει έναν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη για αυτές τις φωσφατάσες. Παρόλα αυτά, στον *Caenorhabditis elegans* και στην *Drosophila melanogaster* υπάρχει μόνο ένα μέλος της οικογένειας PRL και όχι τρία όπως στον άνθρωπο. Επομένως, παρότι φαίνεται ότι οι PRL επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στα πολυκύτταρα μετόζωα, στα θηλαστικά ο ρόλος τους φαίνεται να είναι πιο σύνθετος.



Πίνακας 2 : Συνοπτικό χρονοδιάγραμμα ανακαλύψεων των επιστημονικών ερευνών για τις PRL από το 1994 έως το 2010. (Al Aidaroos et al,2010)

Οι πρωτεΐνες PRL έχουν μια διατηρημένη PTP περιοχή με μια C(X)5R- ενεργή περιοχή. Πιο σημαντικό είναι το γεγονός πως οι PRL είναι οι μόνες φωσφατάσες που είναι γνωστό πως φέρουν το μοτίβο πρενυλίωσης CAAX στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Cates et al, 1996). Το μοτίβο CAAX ακολουθεί μια συντηρημένη πολυβασική περιοχή που παρέχει θετικό φορτίο, που στην περίπτωση της PRL-1 έχει δειχθεί ότι παίζει ρόλο στην πρόσδεση με λιπίδια μέσω ηλεκτροστατικών επιδράσεων (Sun et al, 2007). Οι PRL έχει βρεθεί πως εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτοσόλιο σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και ορθού στον άνθρωπο και σε ιστούς ενδομητρίωσης (Wang et al, 2007b; Ruan et al, 2009). Επιπλέον για τις PRL-1 και PRL-3 έχει βρεθεί και πυρηνικός τους εντοπισμός (Diamond et al, 1994; Fagerli et al, 2008). Το αντίθετο αυτό αποτέλεσμα εξηγήθηκε εν μέρει από έρευνα σε μυελικά κύτταρα όπου βρέθηκε πως η PRL-3 αλλάζει εντοπισμό μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Fagerli et al, 2008). Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι πως με την διαγραφή του καρβοξυτελικού μοτίβου πρενυλίωσης στις PRL οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται στον πυρήνα γεγονός που προτείνει πως ο εντοπισμός τους στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα ελέγχεται από μηχανισμό αντίστροφης πρενυλίωσης.

Οι πρωτεΐνες PRL έχουν διακριτά προφίλ έκφρασης. Η PRL-1 σε αντίθεση με την PRL-2 που εκφράζεται σχεδόν παντού, έχει πιο συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης με συνολικά χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης από την PRL-2 στους ίδιους κυτταρικούς τύπους ή ιστούς (Zhao et al, 1996 ; Dumauval et al, 2006). Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες PRL-1 και PRL-2 η PRL-3 φαίνεται πως εκφράζεται στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες και στο πάγκρεας και σε μικρότερα ποσά και σε άλλα όργανα (Diamond et al, 1994; Zeng et al, 1998; Matter et al, 2001; Bardelli et al, 2003; Stephens et al, 2005). Πολύ σημαντικό εύρημα είναι πως η PRL-3 βρέθηκε να εκφράζεται στην εμβρυική καρδιά, στα αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία αλλά όχι στα αντίστοιχα ώριμα όργανα (Guo et al, 2006). Επομένως, η PRL-3 φαίνεται να εμπλέκεται στην πρώιμη ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος και στην αγγειογένεση.

Η πρώτη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας που βρέθηκε ότι εμπλέκεται στον καρκίνο ήταν η PRL-3. Με την χρήση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού η PRL-3 αποδείχθηκε ως το μόνο γονίδιο που εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα και στα 18 δείγματα μετάστασεων που εξετάστηκαν αλλά παράλληλα είχαν χαμηλή έκφραση σε πρωτοπαθείς όγκους και στο φυσιολογικό επιθήλιο (Saha et al, 2001). Έκτοτε έχουν γίνει διάφορες έρευνες οι οποίες αποδεικνύουν την εμπλοκή της PRL-3 με την μεταστατική ικανότητα πολλών ειδών καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του γαστρικού καρκίνου, καρκίνου των ωοθηκών, καρκίνου των μαστών, καρκίνου του τραχήλου και του

πνεύμονα (Bessette et al, 2008). Γι αυτόν τον λόγο η PRL-3 έχει προταθεί ως δείκτης της επιθετικότητας των όγκων.

Ως μετάσταση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα κακοήθη κύτταρα διασκορπίζονται από τον πρωταρχικό όγκο σε άλλα απομακρυσμένα από αυτόν όργανα. Για να συμβεί μια καρκινική μετάσταση προδιαθέτει ότι τα κύτταρα θα υποστούν διάφορες μεταβολές που θα τους δώσουν διάφορες ικανότητες. Κάποιες από αυτές είναι η ικανότητα να πολλαπλασιάζονται ασταμάτητα, η αντίσταση τους στην απόπτωση, η έλξη παροχής αίματος στο σημείο που βρίσκονται, η κυτταρική κινητικότητα και η διατήρηση ενός προγονικού φαινοτύπου (Hanahan and Weinberg, 2000). Επιπρόσθετα, τα μεταλλαγμένα αυτά κύτταρα αποκτούν και άλλες μεταλλάξεις που τους δίνουν την δυνατότητα να εισβάλουν σε αιμοφόρα αγγεία, να επιζούν στην κυκλοφορία του αίματος, να διεισδύουν σε άλλα όργανα και εν τέλει να αποικίζουν τα νέα μικροπεριβάλλοντα που συναντούν. Η PRL-1 ήταν η πρώτη από τις πρωτεΐνες PRL που βρέθηκε πως εμπλέκεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αφού παίζει ρόλο στην αναγέννηση του ήπατος (Mohr et al, 1991). Στην συνέχεια η υπερέκφραση των PRL-1 και PRL-2 βρέθηκε πως επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε επιθηλιακά κύτταρα (Diamond et al, 1994; Cates et al, 1996). Παρομοίως και για την PRL-3 υπάρχει βιβλιογραφία που να την σχετίζει με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Matter et al, 2001, Werner et al, 2003, Ming et al, 2009). Το p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί και καταστέλλει διάφορα γονίδια στόχους τα οποία συμμετέχουν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η PRL-3 βρέθηκε πως ενισχύει την ουβικιτινίωση και συνεπώς την αποδόμηση του p53 μέσω του πρωτεοσώματος. Επιπρόσθετα η PRL-3 εμπλέκεται και στο PI3K-AKT μονοπάτι επάγοντας το, ωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση (Wang et al, 2007a; Basak et al, 2008). Ένας πιθανός μηχανισμός είναι μέσω της καταστολής της έκφρασης του PTEN που προκαλεί η PRL-3, αφού η PTEN είναι ο πιο σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού PI3K- AKT. Παράλληλα με την ύπαρξη βιβλιογραφίας που εμπλέκει την έκφραση των πρωτεϊνών PRL με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, υπάρχουν και μελέτες που προτείνουν το αντίθετο (Qian et al, 2007; Fagerli et al, 2008; Zhou et al, 2009). Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της PRL-3 σε εμβρυονικές ινοβλάστες ποντικού βρέθηκε πως επάγει το σταματημό του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 (Basak et al, 2008). Οι ερευνητές παρατήρησαν διαφορές στα καρκινικά κύτταρα: στα RKO κύτταρα καρκίνου του ορθού η υπερέκφραση της PRL-3 δεν οδήγησε σε παύση του κυτταρικού κύκλου ενώ σε U2OS κύτταρα οστεοσαρκώματος ενίσχυσε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Basak et al, 2008).

Για την επίτευξη της μετάστασης και την είσοδο των μεταλλαγμένων κυττάρων στην κυκλοφορία και σε άλλα όργανα, τα κύτταρα πρέπει να αναπτύξουν κι άλλους μηχανισμούς εισβολής όπως είναι η κυτταρική κινητικότητα και η αποδιάταξη της βασικής μεμβράνης. Επιπροσθέτως, η ανώμαλη έκφραση αναπτυξιακών μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στην επιθηλιακή- μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial- mesenchymal transition, EMT) η οποία εμπλέκεται με την κυτταρική πλαστικότητα και την κυτταρική εισβολή (Yang and Weinberg 2008). Οι εστιακές συμφύσεις είναι δυναμικές δομές που ρυθμίζονται από πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια που προέρχονται από την συσσώρευση και τις αλληλεπιδράσεις ιντεγκρινών της κυτταρικής επιφάνειας με μια ποικιλία παραγόντων του εξωκυτταρικού στρώματος (Huvencers and Danen, 2009). Η εμπλοκή των ιντεγκρινών ρυθμίζει την δραστηριότητα πρωτεϊνών μελών της οικογένειας Rho GTPασων που είναι ρυθμιστές της ακτίνης συνεπώς της δυναμικής του κυτταροσκελετού που παίζει ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα και εισβολή (Sahai and Marshall, 2002). Μέλη της οικογένειας Src κινασών τυροσίνης (SFKs) επίσης ανευρίσκονται στις συμφύσεις κυττάρου- στρώματος δρώντας συνεργιστικά με τις κινάσες των εστιακών συμφύσεων (focal adhesion kinases, FAKs). Τα σύμπλοκα FAK- Src ελέγχουν τους παράγοντες GEF (guanine- exchange factors) και GAP (GTPase- activating proteins) που επιδρούν στις Rho- GTPασες. Έτσι, η σηματοδότηση ιντεγκρινών μέσω των συμπλόκων FAK-Src μπορεί να ρυθμίσει την τοποθεσία και την δραστηριότητα αυτών των GTPασων ώστε να συντονίσει τις προσκολλήσεις των κυττάρων και την κυτταρική κινητικότητα (Huvencers and Danen, 2009). Τόσο η PRL-1 όσο και η PRL-3 έχουν συσχετιστεί με την σηματοδότηση ιντεγκρινών/ Src. Στα A549 κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα η καταστολή της PRL-1 κατέληξε σε αυξημένη πρόσφυση των κυττάρων και χαμηλή ικανότητα εισβολής (Achiwa and Lazo, 2007). Στην κυτταρική σειρά SW480 καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού, η υπερέκφραση της PRL-1 και PRL-3 βρέθηκε πως αυξάνει την δραστηριότητα της RhoA και RhoC 4 με 7 φορές του φυσιολογικού (Fiordalisi et al, 2006). Η PRL-3 επίσης συνδέθηκε με την ρύθμιση διαφόρων παραγόντων συγκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες το Src και η παξιλίνη. Επιπλέον η PRL-3 βρέθηκε πως παίζει ρόλο και στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (MMPs) ώστε να αποδομηθεί η βασική μεμβράνη και να εισβάλουν τα καρκινικά κύτταρα στο μεσέγχυμα αλλά και να ενεργοποιηθεί η στρατολόγηση ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση (Chang and Werb, 2001). Η δραστηριότητα των MMP μπορεί να ρυθμιστεί μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των ιντεγκρινών/ Src και της ERK (Kuo et al, 2006).

Σε συμφωνία με αυτά, η PRL-3 βρέθηκε πως επάγει την κυτταρική εισβολή αυξάνοντας την δραστηριότητα της MMP2 και μειώνοντας την έκφραση του αναστολέα των MMP, TIMP2 (Peng et al, 2009). Εκτός από την πρωτεόλυση του εξωκυτταρικού πλάσματος τα κύτταρα υφίστανται και μια άλλη φαινοτυπική αλλαγή η οποία σχετίζεται με την κυτταρική πλαστικότητα, την εισβολή και την κινητικότητα (Yang and Weinberg, 2008). Στη κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού DLD-1, η υπερέκφραση της PRL-3 οδήγησε σε μείωση των επιθηλιακών δεικτών E-καδερίνη, πλακογλοβίνη και ιντεγκρίνη βητα-3, ενώ προκάλεσε αύξηση της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών φιβρονεκτίνης και snail (Wang et al, 2007). Ταυτόχρονα με την αύξηση της κυτταρικής εισβολής των καρκινικών κυττάρων, η PRL-3 επίσης προωθεί την αγγειογένεση. Η υποδόρια ένεση κυττάρων CHO που υπερεκφράζουν την PRL-3 σε ποντίκια οδήγησε σε αυξημένη πρόσληψη ενδοθηλιακών κυττάρων εντός της μάζας του καρκίνου (Guo et al, 2006). Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι ρυθμίζοντας την έκκριση προ- και αντιαγγειογόνων παραγόντων η PRL-3 διευκολύνει την μετέπειτα μεταστατική δραστηριότητα προωθώντας την προσέλκυση ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση στους όγκους.

Εκτός από την δημιουργία ενός τοπικού όγκου, την είσοδο στην κυκλοφορία και την διήθηση μακρινών οργάνων τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν στις νέες τους εστίες. Η PRL-3 μπορεί να διευκολύνει αυτά τα τελικά στάδια της μετάστασης του όγκου προωθώντας την εξαγγείωση, τον μικρο-μεταστατικό σχηματισμό του όγκου και τελικά την κυτταρική επιβίωση με αναστολή της απόπτωσης.

1.4.1 Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις PRL

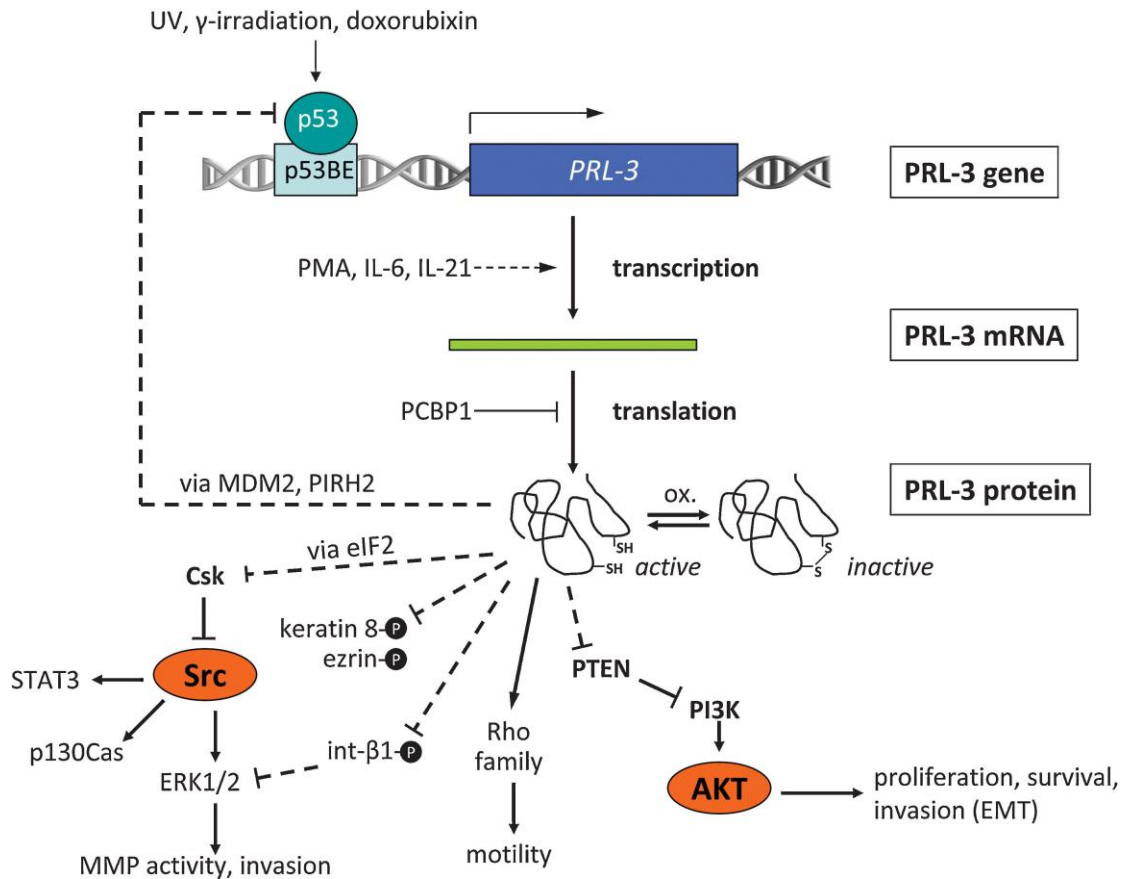
Παρά τις εξελίξεις στην αποσαφήνιση των ρόλων των PRL στον καρκίνο, μια σημαντική πρόκληση στη μελέτη του ακριβή σηματοδοτικού μηχανισμού των PRL είναι η έλλειψη υποστρωμάτων – λόγω της παροδικής φύσης της αλληλεπίδρασης φωσφατάσης-υποστρώματος. Παρόλα αυτά κάποιες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις PRL έχουν χαρακτηριστεί (Πίνακας 3). Εκτός από την λειτουργία τους ως ένζυμα οι πρωτεΐνες PRL μπορεί να δράσουν ως ανταγωνιστές ή πρωτεΐνες σκαλωσιάς στην σηματοδότηση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και με αυτό τον τρόπο να ρυθμίζουν επόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.

	Πρωτεΐνη Αλληλεπίδρασης	Αποτέλεσμα Αλληλεπίδρασης	References
PRL-1	ATF-7	Αποφωσφορυλίωση της ATF-7 in vitro	Peters et al, 2001
	PRL-1	Σχηματισμός τριμερούς in vitro και in vivo	Jeong et al, 2005; Sun et al, 2007
PRL-2	βGGT-II	Ανταγωνισμός πρόσδεσης με την αGGT-II in vivo	Si et al, 2001
PRL-3	Εζρίνη	Αποφωσφορυλίωση της εζρίνης in vitro και in vivo	Forte et al, 2008; Orsatti et al, 2009
	Κερατίνη 8	Αποφωσφορυλίωση της κερατίνης 8 in vivo	Mizuuchi et al, 2009
	PRL-3	Σχηματισμός ολιγομερούς in vitro	Sun et al, 2007; Pascaru et al, 2009
	Ιντεγκρίνη-α 1	άγνωστη	Peng et al, 2006

Πίνακας 3 : Οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν πως αλληλεπιδρούν με τα μέλη της οικογένειας PRL και το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης

1.4.2 Ρύθμιση της έκφρασης των PRL και λειτουργία

Λόγω της εμπλοκής τους στην μεταστατική εξέλιξη των όγκων οι πρωτεΐνες PRL προσέλκυσαν το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητικών ομάδων ώστε να μπορέσει να βρεθεί ο μηχανισμός που ρυθμίζει την έκφραση τους στα κύτταρα. Εφόσον η υπερβολική δραστικότητα φωσφατάσης είναι μια σημαντική τροποποίηση των κυττάρων που τους χαρίζει μεταστατική ικανότητα, το ενδιαφέρον μονοπώλησε κυρίως η PRL-3 (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Το ρυθμιστικό δίκτυο και τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η PRL-3 και παρέχει μεταστατική εξέλιξη (Al-Aidaros et al, 2010).

Η υπερέκφραση του γονιδίου των PRL μπορεί να συμβεί μέσω του πολλαπλασιασμού του γονιδίου στα γενετικά ασταθή καρκινικά κύτταρα, όπως στην περίπτωση της PRL-3 το γονίδιο της που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8q24.3 βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα στο 25% των περιπτώσεων μετάστασης του καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού (Saha et al, 2001). Ένα άλλο αποτέλεσμα που βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι η στατιστική διαφορά στα αντίτυπα του γονιδίου της PRL-3 μεταξύ μεταστάσεων του ήπατος και πρωτογενών αλλοιώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού (Bardelli et al, 2003). Αυξημένα αντίτυπα του γονιδίου της PRL-3 επίσης βρέθηκαν σε πρωτογενείς καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού που δώσανε ηπατικές μεταστάσεις σε

σύγκριση με αυτούς που δεν δώσανε (Buffart et al, 2005). Παρόλα αυτά, ο πολλαπλασιασμός των αντιτύπων του γονιδίου των πρωτεϊνών αυτών στα κύτταρα δεν αποτελεί επαρκή λόγο για την υπερέκφραση των PRL που παρατηρείται σε διάφορους όγκους. Σε κυτταρικές σειρές μυελώματος, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των αντιτύπων του γονιδίου της PRL-3 και της έκφρασης σε επίπεδο mRNA (Fagerli et al, 2008). Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι η έκφραση της PRL-3 πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά σε μεταγραφικό και/ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Saha et al, 2001; Polato et al, 2005; Fagerli et al, 2008).

Πέρα από την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων, η μετάφραση τους αποτελεί σημαντική διαδικασία που σχετίζει τα επίπεδα των μεταγράφων και την πρωτεϊνική έκφραση. Η έκφραση της PRL-3 μπορεί να ρυθμιστεί αρνητικά στο επίπεδο της μετάφρασης μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ της polyC-binding πρωτεΐνης 1 (PCBP1) και του μοτίβου GCCCAG της 5' αμετάφραστης περιοχής της PRL-3 (Wang et al, 2010). Η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση της PCBP1 οδήγησε σε καταστολή ή αύξηση αντίστοιχα των επιπέδων της πρωτεΐνης PRL-3 χωρίς να μεταβάλλει τα επίπεδα των μεταγράφων της. Ο μηχανισμός που εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία είναι η καθυστέρηση της ενσωμάτωσης της PRL-3 στα πολυριβοσώματα μέσω της επίδρασης της PCBP1. Πειράματα ανοσοκλιδωσης και ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της PRL-3 και της PCBP1 σε διάφορους τύπους όγκων.

Παρά τις σύγχρονες εξελίξεις στην θεραπεία του καρκίνου, οι μεταστάσεις παραμένουν πρωταρχικές αιτίες θανάτου και θνησιμότητας στον καρκίνο. Με την εμπλοκή των PRL σε διάφορα στάδια καρκινικής μετάστασης και τον χαρακτηρισμό των μοριακών χαρακτηριστικών τους, οι πρωτεΐνες PRL έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον ως φαρμακευτικοί στόχοι για την αποφυγή μεταστάσεων. Διάφορα φάρμακα που δρουν κατά των πρωτεϊνών PRL έχουν αναφερθεί (Pathak et al, 2002; Ahn et al, 2006; Daouti et al, 2008; Guo et al, 2008; Park et al, 2008; Wang et al, 2009) και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες:

1. Αναστολείς μικρών μορίων και
2. Αντιγονική Θεραπεία

1.5 Φωσφατάση της Αναγέννησης του Ήπατος-3 και Ενδομητρίωση

Παρά τις πολλές θεωρίες που έχουν προταθεί για να υποστηρίξουν την παθογένεση της ενδομητρίωσης πολλά ερωτηματικά παραμένουν. Πως μεταναστεύουν τα κύτταρα του ενδομητρίου από την κοιλότητα της μήτρας σε μια έκτοπη θέση μέσω μιας σειράς διεργασιών που εμπεριέχουν την συγκόλληση, πρόσφυση και την αγγειογένεση? Πως αυτά τα κύτταρα επεξεργάζονται τη σηματοδότηση που καταλήγει στην μετανάστευση? (Fei Ruan, 2010).

Η αποσιώπηση της PRL-3 με siRNA βρέθηκε ότι καταστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων της ωοθήκης (Polato et al, 2005). Για αυτόν τον λόγο η PRL-3 φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην μετάσταση του καρκίνου και να αποτελεί χρήσιμο δείκτη στην καρκινική θεραπεία (Bessette et al, 2008; Guo et al, 2008; Stephens et al, 2008). Η ενδομητρίωση μοιράζεται έναν κοινό βιολογικό φαινότυπο με τους κακοήθεις όγκους λόγω του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων και της ικανότητας τους να εισβάλλουν σε νέους ιστούς. Για αυτόν τον λόγο η PRL-3 μπορεί να εμπλέκεται και στην μετανάστευση, προσκόλληση και εισβολή των κυττάρων του ενδομητρίου στις εστίες ενδομητρίωσης.

Οι Ruan et al, 2010 εξέτασαν την έκφραση της PRL-3 σε ιστούς ενδομητρίωσης και την σχέση μεταξύ τους. Με αναλύσεις ανοσοιστοχημείας βρέθηκε ότι η PRL-3 εκφράζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στην μεμβράνη του αδενικού επιθηλίου, στις στρωματικές ινοβλάστες και στα κύτταρα του αγγειακού επιθηλίου. Η έκφραση της PRL-3 ανευρέθηκε σε 72,9% των δειγμάτων έκτοπων κυττάρων ενδομητρίου. Με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η έκφραση της PRL-3 ήταν υψηλότερη στα έκτοπα ενδομήτρια απ'ότι στα φυσιολογικά. Επιπλέον, ο ρυθμός έκφρασης της PRL-3 ήταν 53,3% και 87,5% για τα στάδια I/II και III/IV αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η PRL-3 εκφράζεται στις 18 από τις 20 γυναίκες που παρουσίασαν υποτροπή και για αυτό τον λόγο η έκφραση της φαίνεται να εμπλέκεται με την εμφάνιση, το κλινικό στάδιο και την υποτροπή της ενδομητρίωσης. Παρόλα αυτά, δεν ανευρέθηκε κάποια σχέση ανάμεσα της ενδομητρίωσης με την ηλικία, το χρονικό διάστημα που η γυναίκα παρουσιάζει στειρότητα ή την παρουσία ή μη πόνου. Στην συνέχεια οι ερευνητές συγκρίνανε ενδομήτρια ανάλογα με την φάση του καταμηνίου κύκλου στην οποία βρισκόντουσαν. Δεν ανευρέθηκε κάποια διαφορά στην έκφραση της PRL-3 σε σχέση με την φάση των ενδομητρίων που εξετάστηκαν. Η σχέση τους εξετάστηκε τόσο σε αδενικά επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου όσο και σε στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου και

βρέθηκαν υψηλότερα ποσοστά έκφρασης στα δεύτερα μόνο σε ασθενείς που παρουσίαζαν υποτροπή. Συμπερασματικά φαίνεται πως η PRL-3 έχει στενή σχέση με τα κλινικά στάδια της ενδομητρίωσης αλλά και με την υποτροπή της ασθένειας, γεγονός που τονίζει την κλινική σημασία της PRL-3 στην ενδομητρίωση (Ruan et al, 2010).

Οι Zhan et al, 2016 μελέτησαν την έκφραση της PRL-3 στα στρωματικά κύτταρα ιστών εύτοπου και έκτοπου ενδομητρίου από γυναίκες με ή χωρίς ωθητική ενδομητρίωση. Επιπλέον, έλεγξαν τον ρόλο της PRL-3 στη ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού, στην κυτταρική μετανάστευση και εισβολή των ενδομητρωσικών κυττάρων του στρώματος (endometrial stromal cells, ESCs) από εύτοπικά και έκτοπα ενδομήτρια. Οι ερευνητές απομόνωσαν ESCs από control ενδομήτρια (EuCo) και από ευτοπικά (EuEM) και έκτοπα (OnEM) ενδομήτρια σε ασθενείς με ενδομητρίωση. Τα ESCs από τα OnEM παρουσίασαν επιμηκυμένο μεσεγχυματικό φαινότυπο στην καλλιέργεια. Με σκοπό να επιβεβαιώσουν τα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων πραγματοποίησαν μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με την χρήση της Κυτοκερατίνης 7, ενός μάρτυρα επιθηλιακών κυττάρων και της Βιμεντίνης, μάρτυρα μεσεγχυματικών κυττάρων. Στα κύτταρα OnEM παρατηρήθηκε αρνητική χρώση για την Κυτοκερατίνη 7 και θετική για την Βιμεντίνη ενώ τα κύτταρα EuCo και EuEM παρουσίαζαν και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά. Με την χρήση Western Blot και PCR πραγματικού χρόνου μελετήθηκε η έκφραση της PRL-3 σε EuCo, EuEM και OnEM κύτταρα. Τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα όσο και τα επίπεδα του mRNA της PRL-3 ήταν υψηλότερα σε ESCs από OnEM σε σύγκριση με τα ESCs από EuCo και EuEM ενώ δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ESCs από EuCo και EuEM. Καθότι η ενδομητρίωση είναι μια ασθένεια που εξαρτάται από τα οιστρογόνα και αντιστέκεται στη προγεστερόνη (Bolun et al, 2009) οι Zhan et al, 2016 ερεύνησαν εάν η έκφραση της PRL-3 επηρεάζεται από τα μεταβαλλόμενα επίπεδα των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου. Για να μελετήσουν αυτή την σχέση απομόνωσαν ESCs από EuCo, EuEM και OnEM που βρισκόντουσαν τόσο στην ωθυλακική όσο και στην ωχρινική φάση. Ωστόσο, δεν βρέθηκε κάποια διαφορά μεταξύ τους στα επίπεδα της πρωτεΐνης αλλά ούτε και σε επίπεδο mRNA. Στη συνέχεια, με σκοπό να εξετάσουν τον ρόλο της PRL-3 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού στα ESCs πραγματοποίησαν αποσιώπηση της PRL-3 με την χρήση siRNA όπου παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA 72 και 48 ώρες μετά την μεταγωγή των κυττάρων αντίστοιχα. Μετά από χρώση με DAPI (μπλε), FITC (πράσινο) και αντι- α τουμπουλίνη (κόκκινο) βρέθηκαν λίγες περιοχές ακτίνης και α -τουμπουλίνης στα si-PRL-3 κύτταρα σε σχέση με τα κοντρόλ.

Το γεγονός αυτό προτείνει ότι μπορεί να υπήρξε αναδιοργάνωση των ινών ακτίνης και α-τουμπουλίνης σε αυτά τα κύτταρα. Επιπλέον, συγκρίθηκαν τα χρωματικά πίξελ της ακτίνης και της α-τουμπουλίνης σε αυτά τα κύτταρα και παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα τους στα si-PRL-3 κύτταρα σε σχέση με τα κοντρόλ. Είναι γνωστό ότι το μονοπάτι RhoA/RhoC/ROCK1 ρυθμίζει την κατανομή του κυτταροσκελετού (Ridley and Hall, 1992) για αυτό τον λόγο οι Zhan et al, 2016 εξέτασαν τον ρόλο της PRL-3 στην ρύθμιση αυτού του μονοπατιού σε OnESCs και σε EuESCs. Με την χρήση λεντιού αποσιώπησαν την έκφραση της PRL-3 σε OnESCs και παρατήρησαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα για την RhoA, RhoC και ROCK1 72 ώρες μετά την ιική διαμόλυνση. Παρομοίως και τα επίπεδα των mRNA των πρωτεϊνών αυτών φάνηκαν εξασθενημένα 48 ώρες μετά την ιική διαμόλυνση. Αντίστοιχα, η υπερέκφραση της PRL-3 με την χρήση πλασμιδίου σε EuESCs αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τα επίπεδα mRNA της RhoA, RhoC και ROCK1 72 ώρες μετά την μεταγωγή. Η αποσιώπηση της PRL-3 εξασθενεί την μετανάστευση των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου (Ruan et al, 2011). Η αποσιώπηση της PRL-3 δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα OnESCs σε συγκεκριμένα timepoints (0, 24, 48, 72 και 96 ώρες). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της MMP9 μειώθηκαν στις 72 ώρες ενώ της MMP2 δεν παρουσίασαν μεταβολές. Επιπλέον, το μεταναστευτικό δυναμικό των OnESCs μειώθηκε σημαντικά μετά την αποσιώπηση της PRL-3. Αντίστοιχα η ενίσχυση της έκφρασης της PRL-3 δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό σε EuESCs, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της MMP9 μειώθηκαν στις 72 ώρες ενώ της MMP2 δεν παρουσίασαν μεταβολές. Η μεταναστευτική ικανότητα των EuESCs στα οποία ενισχύθηκε η έκφραση της PRL-3 αυξήθηκε σημαντικά.

Τα ευρήματα που προέκυψαν από την μελέτη των Zhan et al, 2016 προτείνουν ότι η PRL-3, ένα μόριο το οποίο εμπλέκεται με διάφορες κακοήθειες παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε τριχώματα κυστέων από ασθενείς με ενδομητρίωμα. Η αυξημένη της έκφραση σε έκτοπες ενδομητριοειδείς βλάβες μπορεί να συσχετίζεται με την πρόοδο της νόσου.

Οι Ren et al, 2017 μελέτησαν τις επιδράσεις της 17β-οιστραδιόλης (E2), της προγεστερόνης (P) και της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στην έκφραση της PRL-3 στα ESCs από ασθενείς με ενδομητρίωση, στο μεταναστευτικό δυναμικό αυτών των κυττάρων και στο μονοπάτι PTEN-AKT. Αρχικά σύγκριναν την έκφραση της PRL-3 σε έκτοπο και εύτοπο ενδομήτριο με την χρήση ανοσοϊστοχημείας. Παρατήρησαν ότι η PRL-3 παρουσίαζε έντονη έκφραση στο κυτταρόπλασμα, στη κυτταρική μεμβράνη και στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα (Epithelial glandular cells, EGCs) και στα ESCs έκτοπου ενδομητρίου αλλά είχε ασθενή έκφραση στο αδενικό επιθήλιο και ακόμα πιο ασθενή στα ESCs ευτοπικού ενδομητρίου. Λόγω του γεγονότος ότι η ενδομητρίωση είναι μια ορμονοεξαρτώμενη ασθένεια οι Ren et al, 2017

θέλησαν να διαπιστώσουν εάν η υπερέκφραση της PRL-3 στο έκτοπο ενδομήτριο διαμεσολαβείται από τα επίπεδα των ορμονών. Παρατήρησαν ότι η PRL-3 παρουσίαζε αύξηση τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε επίπεδο mRNA μετά την έκθεση των κυττάρων σε E2 ή σε IL-6 αλλά η έκφραση της αποσιωπήθηκε μετά από έκθεση σε P. Η αύξηση σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA παρέμεινε και μετά από συνδυασμένη έκφραση των κυττάρων σε E2 και IL-6. Παράλληλα, η χρήση αντισώματος κατά της IL-6 μπλόκαρε σημαντικά την έκφραση (πρωτεΐνης και mRNA) της PRL-3 σε ESCs τα οποία είχαν εκτεθεί σε E2. Σε ειδική δοκιμασία που ελέγχεται η κυτταρική μετανάστευση η έκθεση των κυττάρων σε E2 φάνηκε να αυξάνει το μεταναστευτικό δυναμικό τους το ίδιο και η έκθεση τους σε E2 και IL-6 ταυτόχρονα. Η δυσλειτουργία του μονοπατιού PTEN-PI3L/AKT σχετίζεται με την ενδομητρίωση (Gonatati et al, 2014) και η οιστραδιόλη φαίνεται πως καταστέλλει την λειτουργία της PTEN αυξάνοντας την φωσφορυλίωση της (Guzeloglu- Kayisli et al, 2003). Επίσης η PRL-3 καταστέλλει την έκφραση της PTEN και προάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) μέσω του PI3K (Wang et al, 2007). Σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες, οι Ren et al, 2017 παρατήρησαν πως τα επίπεδα της PTEN ήταν χαμηλά σε ESCs που εκτέθηκαν σε E2 ενώ σε ESCs που εκτέθηκαν σε E2 και IL-6 ήταν ελαφρά αυξημένα σε σχέση με ESCs που εκτέθηκαν μόνο σε E2. Επιπλέον, η αποσιώπηση της PRL-3 με Son αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της PTEN στα E2 αλλά και στα IL-6+E2 ESCs. Καθότι η πρωτεΐνη PTEN είναι καταστολέας του μονοπατιού PI3K-AKT οι ερευνητές θέλησαν να διερευνήσουν την επίδραση της E2, της IL-6 και της PRL-3 στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης του AKT. Η ενεργοποίηση του AKT ήταν υψηλή σε E2 και E2+IL-6 ESCs ενώ η έκθεση σε Son κατέστειλε την ενεργοποίηση του στα ίδια κύτταρα. Συμπερασματικά, η έρευνα των Ren et al, 2017 επιδεικνύει το γεγονός πως η E2 και η IL-6 παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταναστευτικό δυναμικό των ESCs του έκτοπου ενδομητρίου μέσω της υπερέκφρασης της PRL-3 η οποία εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT.

2.Σκοπός

Η υπογονιμότητα είναι μια σύγχρονη μάστιγα που πλήττει ένα μεγάλο ποσοστό των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν. Οι λόγοι είναι πολλοί και μπορεί να οφείλονται είτε στον ανδρικό είτε στον γυναικείο παράγοντα. Ωστόσο, η ενδομητρίωση, μια πολύ κοινή καλοήθης πάθηση των γυναικών φαίνεται να εμπλέκεται άμεσα με την υπογονιμότητα. Στην ενδομητρίωση το κύριο χαρακτηριστικό είναι η παρουσία ενδομητριωσικού ιστού εκτός της κοιλότητας του ενδομητρίου, όπως στο περιτόναιο ή στις ωοθήκες. Το γεγονός αυτό προκαλεί κοιλιακό άλγος, δυσμηνόρροια, δυσπαρευνία και τις περισσότερες φορές υπογονιμότητα. Θέλοντας να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί πίσω από την εμφάνιση της ενδομητρίωσης αναζητήθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες να εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση. Μια από τις πρωτεΐνες αυτές που εμπλέκονται στην μετανάστευση, στη προσκόλληση και στην εισβολή κυττάρων από έναν ιστό σε έναν άλλο είναι η PRL-3 (φωσφατάση της αναγέννησης του ήπατος-3). Για αυτό τον λόγο μελετήθηκε και σε εστίες ενδομητρίωσης (Bessette et al, 2008).

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση της έκφρασης της PRL-3 σε δείγματα ασθενών με ενδομητρίωση και η σύγκριση των επιπέδων σε σχέση με το φυσιολογικό ενδομήτριο των ίδιων ασθενών.

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Συλλογή υλικού από χειρουργεία

Η συλλογή υλικού προς επεξεργασία πραγματοποιήθηκε από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε γυναικολογικά χειρουργεία για την αφαίρεση ενδομητριωσικού ιστού στο Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα. Από κάθε ασθενή συλλέχτηκε τόσο παθολογικός- ενδομητριωσικός ιστός όσο και δείγμα υγιούς ενδομητρίου ως ξέσμα για control.

Συνολικά συλλέχτηκαν δείγματα από 21 γυναίκες, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίστηκαν ως υγιές ενδομήτριο και ως εστία ενδομητρίωσης.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΔΕΙΓΜΑ Α	ΔΕΙΓΜΑ Β
Ασθενής 1	Κύστη ενδομητριώδης ωθήκης (AP)	ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 2	Κύστεις ενδομητριωσικές AP & ΔΕ ωθήκης	ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 3	Κύστη ΔΕ ωθήκης	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 4	Ενδομητριωσική κύστη AP ωθήκης	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 5	Ενδομητριωσική Κύστη ΔΕ	ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 6	Ενδομητριωσική κύστη ΔΕ ωθήκης	ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 7	Ενδομητριωσική κύστη	Pipelle
Ασθενής 8	Ενδομητριωσική κύστη	Pipelle
Ασθενής 9	Ενδομητριωσική Κύστη	Pipelle
Ασθενής 10	Ενδομητριωσική κύστη	Pipelle
Ασθενής 11	Τοίχωμα ενδομητριωσικής κύστης	Pipelle
Ασθενής 12	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 13	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 14	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου

Ασθενής 15	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 16	Ενδομητριωσική Κύστη ΔΕ ωοθήκης	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 17	Ενδομητριωσική Κύστη	Pipelle
Ασθενής 18	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 19	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 20	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου
Ασθενής 21	Ενδομητριωσική Κύστη	Ξέσματα ενδομητρίου

Πίνακας 4: Κατάλογος των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη και χαρακτηρισμός των δειγμάτων τους Α και Β.

3.2 Εξαγωγή RNA από τους ιστούς

Οι ιστοί συντηρήθηκαν σε δοχεία περισυλλογής (urobox) σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την ημέρα που ξεκίνησε η επεξεργασία τους.

Για την εξαγωγή του RNA από τους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Mini Kit της Qiagen (74106). Με λαβίδα κόψαμε περίπου 250 μl ιστού και τα προσθέσαμε σε erpendorf. Στην συνέχεια προσθέσαμε άλλα 250 μl RLT plus buffer χωρίς β- μερκαπτοαιθανόλη και άλλα 75 μl RLT plus buffer με β- μερκαπτοαιθανόλη. Ανακινήσαμε καλά το δείγμα με τα buffer με την βοήθεια vortex ώστε να διαλυθεί ο ιστός και να αρχίσει να απελευθερώνεται RNA στο διάλυμα. Το διάλυμα που προέκυψε το μεταφέραμε σε στήλη gRNA eliminator spin column και το φυγοκεντρήσαμε για 1 λεπτό στις 12.000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίψαμε τη στήλη και στο διάλυμα που παρέμεινε προσθέσαμε 350 μl 70% αιθανόλης και αναμείξαμε καλά με την πιπέτα. Στη συνέχεια μεταφέραμε σε στήλη RNeasy mini elute και φυγοκεντρήσαμε στις 12.000 rpm για 1 λεπτό. Απορρίψαμε το σωληνάκι συλλογής (erpendorf) και το αντικαταστήσαμε με καινούριο. Προσθέσαμε στη στήλη 700μl RW1 buffer και φυγοκεντρήσαμε στις 12.000 rpm για 1 λεπτό. Απορρίψαμε το σωληνάκι συλλογής, το αντικαταστήσαμε, προσθέσαμε 500 μl RPE buffer και φυγοκεντρήσαμε ξανά στις 12.000 rpm για 1 λεπτό. Έπειτα αντικαταστήσαμε το σωληνάκι συλλογής και προσθέσαμε 500 μl 80% αιθανόλης και φυγοκεντρήσαμε στις 12.000 rpm για 2 λεπτά. Στη συνέχεια θέλοντας να στεγνώσει η μεμβράνη της κολώνας από την αιθανόλη αλλάξαμε και πάλι σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρήσαμε τις κολώνες στις 14.000 rpm για 5 λεπτά με ανοικτό καπάκι. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης και για την συλλογή του RNA από την κολώνα προσθέσαμε 14 μl RNase free H_2O και επώασαμε στον πάγκο για 5 λεπτά. Τέλος, φυγοκεντρήσαμε τις κολώνες για 2 λεπτά στις 14.000 rpm. Το διάλυμα που συλλέχτηκε στα erpendorf περιέχει το RNA το οποίο και φυλάξαμε στους -80°C .

3.3 Σύνθεση cDNA απο τα RNA των δειγμάτων

Για την αντίστροφη μεταγραφή δηλαδή τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) από τα RNA των δειγμάτων που συλλέξαμε χρησιμοποιήσαμε το Superscript First - Strand Synthesis System for RT- PCR της Invitrogen (11904- 018).

Αφαιρέσαμε τα δείγματα RNA απο την κατάψυξη και σε πάγο προσθέσαμε 4 μl απο το καθένα σε ένα νέο σωληνάκι συλλογής.

Ξεκινήσαμε τη σύνθεση δημιουργώντας ένα διάλυμα από 10mM dnTPs και Random hexamers . Από αυτά προσθέσαμε σε erpendorf 1 μl για κάθε δείγμα που δουλέψαμε κι από το τελικό διάλυμα- μιξ που προέκυψε προσθέσαμε 2 μl σε κάθε RNA κι επωάσαμε στους 65° C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια δημιουργήσαμε το μείγμα που αναγράφεται στον Πίνακα 4.

10 x buffer	2 μl
25 mM MgCl₂	4 μl
0,1 M DTT	2 μl
RNase out (40 U/μl)	1 μl
SuperScript II RT	1 μl

Πίνακας 5 : Μιξ αντίστροφης μεταγραφής. Οι ποσότητες που αναφέρονται είναι ανα δείγμα

Σε κάθε αντίδραση προσθέσαμε 10 μl από το μιξ και αναδεύσαμε καλά με την πιπέτα. Τέλος, εισάγαμε τα δείγματα μας στο κυκλοποιητή PCR machine στις παρακάτω συνθήκες :

- 25° C για 5 λεπτά
- 42 °C για 50 λεπτά
- 70 °C για 15 λεπτά

Με το τέλος του προγράμματος απομακρύναμε τα δείγματα μας απο τη συσκευή και τα φυλλάξαμε στο ψυγείο, στους 4 °C.

3.4 Real Time PCR για την έκφραση της PRL-3

Με σκοπό την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της PRL3 στα δείγματα μας πραγματοποιήσαμε PCR πραγματικού χρόνου.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε είναι οι :

5' -CACATGC GCTTCCTCATCA-3' (forward)

5' -TCTTGTGCGTGTGTGGGTC TTT-3' (reverse)

Οι εκκινητές έχουν σημείο τήξης Tm τους 55° C.

Το kit που χρησιμοποιήσαμε για την Real Time PCR είναι το Luna Universal Probe qPCR Master Mix της New England Biolabs (M3004G).

Luna Universal Probe qPCR Mix	10μl
Forward Primer (10μM)	0.8 μl
Reverse Primer (10μM)	0.8 μl
Nuclease free water	3.4 μl

Πίνακας 6 : Μίξ PCR πραγματικού χρόνου. Οι ποσότητες ανα δείγμα

Σε πιατάκια 96 well προσθέσαμε τα 5 μl από το κάθε cDNA. Στη συνέχεια προετοιμάσαμε το μίξ που αναγράφεται στον Πίνακα 5 και προσθέσαμε 15 μl από αυτό σε κάθε δείγμα.

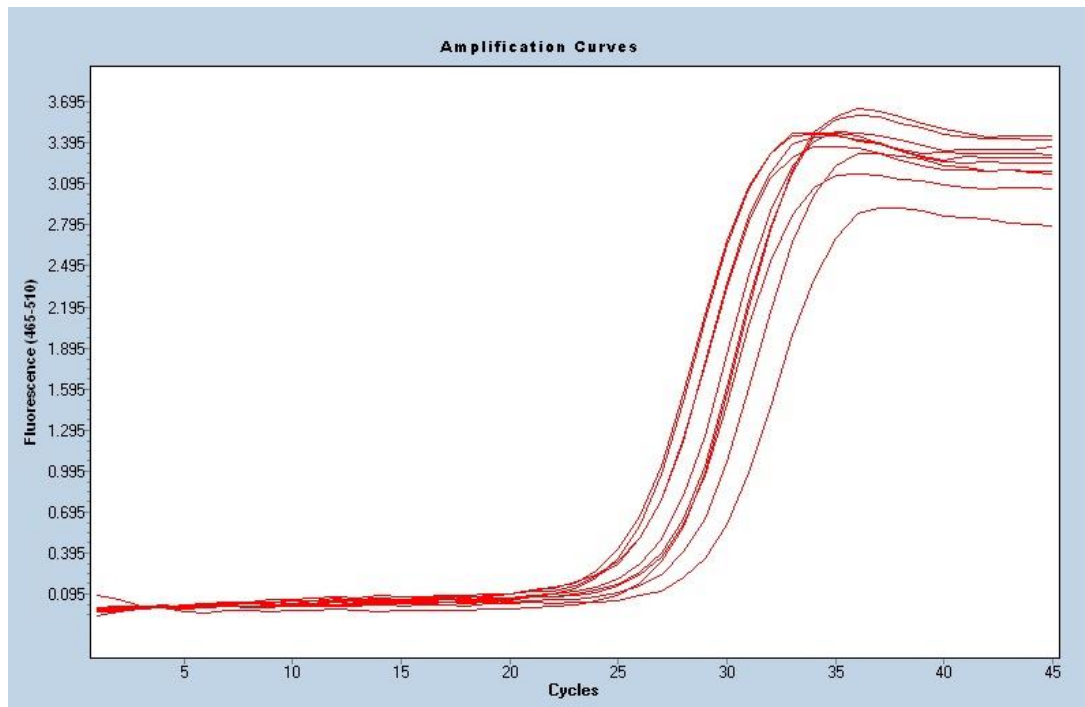
Το μηχάνημα που χρησιμοποιήσαμε είναι το Light Cyclor 480 της Roche.

4. Αποτελέσματα

Μετά το πέρας της Real time PCR, εμφανίζεται στην οθόνη του μηχανήματος ένα γράφημα με καμπύλες. Στο γράφημα αυτό η καμπύλη που προκύπτει σχετίζει την παρουσία φθορισμού σε σχέση με τους κύκλους της PCR. Το προϊόν ξεκινά να ανιχνεύεται στο σημείο όπου η καμπύλη αποκτά ανοδική πορεία (Εικόνα 3). Καταγράψαμε τους κύκλους στους οποίους ανιχνεύθηκε προϊόν, το οποίο μας δίνει μια τιμή - Ct Value, που δηλώνει την ποσοτική έκφραση του εκάστοτε γονιδίου. Το είδος του δείγματος αλλά και το Ct καθενός από αυτά φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 7. Με σκοπό να συγκρίνουμε την έκφραση της PRL-3 ανάμεσα στον ενδομητριωσικό και στον φυσιολογικό ιστό κάθε ασθενούς υπολογίζουμε τον λόγο τους. Στις περισσότερες ασθενείς προέκυψε ότι ο λόγος ενδομητριωσικού ιστού/ φυσιολογικού ιστού ισούται περίπου με 1. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στους δύο ιστούς. Ωστόσο, σε τέσσερις ασθενείς (Ασθενής 16, ασθενής 17, ασθενής 18 & ασθενής 20) ο λόγος διέφερε από το 1. Συγκεκριμένα, για τις ασθενείς 16 και 17 ο λόγος υπολογίσθηκε 0,66 και 0,75 αντίστοιχα. Από τον λόγο αυτό προκύπτει ότι η έκφραση του γονιδίου της PRL-3 είναι υψηλότερη στο φυσιολογικό ιστό σε σχέση με τον ενδομητριωσικό. Αντιθέτως, για το δείγμα 18 ο λόγος υπολογίσθηκε στο 1,28 και για το δείγμα 20 στο 1,4, γεγονός που δηλώνει υψηλότερη έκφραση του γονιδίου της PRL-3 στον ενδομητριωσικό ιστό παρά στο φυσιολογικό.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ (Α)	Ct ΠΙΑ ΤΗΝ PRL-3 ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ Α	ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ (Β)	Ct ΠΙΑ ΤΗΝ PRL-3 ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ Β	Λόγος έκφρασης Α/Β
Ασθενής 1	Κύστη AP ωθήκης	30,83	Ξέσματα ενδομητρίου	33,81	0,911
Ασθενής 2	Κύστες AP & ΔΕ ωθήκης	29,25	Ξέσματα ενδομητρίου	30,05	0,973
Ασθενής 3	Κύστη ΔΕ ωθήκης	30,99	Ξέσματα ενδομητρίου	32,75	0,946
Ασθενής 4	Ενδομητρωσική κύστη AP ωθήκης	32,84	Ξέσματα ενδομητρίου	32,4	1,013
Ασθενής 5	Ενδομητρωσική Κύστη ΔΕ ωθήκης	32,07	Ξέσματα ενδομητρίου	32,01	1,001
Ασθενής 6	Κύστη ΔΕ ωθήκης	33,07	Ξέσματα ενδομητρίου	33,04	1
Ασθενής 7	Ενδομητρωσική Κύστη	32,76	Pipelle	32,5	1,008
Ασθενής 8	Ενδομητρωσική Κύστη	30,93	Pipelle	33,75	0,916
Ασθενής 9	Ενδομητρωσική Κύστη	32,81	Ξέσματα ενδομητρίου	32,51	1,009
Ασθενής 10	Ενδομητρωσική Κύστη	32,86	Pipelle	32,64	1,006
Ασθενής 11	Ταίχωμα Κύστης	31,38	Pipelle	33,9	0,925
Ασθενής 12	Ενδομητρωσική Κύστη	28,01	Ξέσματα ενδομητρίου	32,81	0,853
Ασθενής 13	Ενδομητρωσική Κύστη	27,24	Ξέσματα Ενδομητρίου	25,9	1,051
Ασθενής 14	Ενδομητρωσική Κύστη	25,23	Ξέσματα ενδομητρίου	26,76	0,942
Ασθενής 15	Κύστη ωθήκης	27,23	Ξέσματα ενδομητρίου	27,11	1,004
Ασθενής 16	Κύστη ΔΕ ωθήκης	23,66	Ξέσματα Ενδομητρίου	32,52	0,727
Ασθενής 17	Ενδομητρωσική Κύστη	24,78	Pipelle	32,95	0,752
Ασθενής 18	Ενδομητρωσική Κύστη	38,43	Ξέσματα ενδομητρίου	29,98	1,281
Ασθενής 19	Ενδομητρωσική Κύστη	26,7	Ξέσματα Ενδομητρίου	31,53	0,846
Ασθενής 20	Ενδομητρωσική Κύστη	37,14	Ξέσματα ενδομητρίου	25,27	1,469
Ασθενής 21	Ενδομητρωσική Κύστη	28,87	Ξέσματα ενδομητρίου	26,76	1,078

Πίνακας 7 : Κατάλογος των ασθενών και των δειγμάτων που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη καθώς και των αριθμών κύκλων όπου εμφανίστηκε η έκφραση του γονιδίου PRL-3 σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 3 : Ενδεικτική εικόνα των αποτελεσμάτων της Real Time PCR στο Lightcycler 480. Έκφραση του γονιδίου PRL-3 σε δείγματα πέντε ασθενών. Παρατηρούμε την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου (αύξηση έντασης φθορισμού) μετά τους 25 κύκλους της αντίδρασης.

5. Συζήτηση

Στη σημερινή εποχή πολλά ζευγάρια αντιμετωπίζουν το πρόβλημα επίτευξης της εγκυμοσύνης. Οι λόγοι μπορεί να ποικίλουν και να οφείλονται τόσο στο γυναικείο όσο και στον ανδρικό παράγοντα. Παρόλα αυτά, ένας κύριος λόγος γυναικείας υπογονιμότητας αποτελεί η ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση είναι η πιο κοινή καλοήθης γυναικολογική πάθηση η οποία πλήττει ένα σημαντικό ποσοστό των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η παρουσία ενδομητριωσικού ιστού σε περιοχές εκτός του ενδομητρίου όπως για παράδειγμα στις ωθήκες ή στο περιτόναιο. Στα συμπτώματα της πάθησης συγκαταλέγονται η δυσμηνόρροια, η δυσπαρέυνια, η δυσουρία, το κοιλιακό άλγος και η υπογονιμότητα.

Η πρωτεΐνη PRL-3 αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών PRL- φωσφατάσες της αναγέννησης του ήπατος ο ρόλος των οποίων είναι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές έχει δειχθεί πως εμπλέκονται εμπλέκονται σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο (Bessette et al, 2008). Η PRL-3 μπορεί να εμπλέκεται και στην μετανάστευση, προσκόλληση και εισβολή των κυττάρων του ενδομητρίου στις εστίες ενδομητρίωσης (Bessette et al, 2008). Καθότι η ενδομητρίωση είναι μια πάθηση κατά την οποία ενδομητριωσικός ιστός μεταναστεύει από το ενδομήτριο σε άλλες περιοχές της κοιλιάς έχει μελετηθεί η σχέση της PRL-3 με την ενδομητρίωση.

Οι Ruan et al, 2010 εξέτασαν την έκφραση της PRL-3 σε ιστούς ενδομητρίωσης και την σχέση μεταξύ τους. Παρόλο που δεν ανευρέθηκε κάποια σχέση με την ηλικία της γυναίκας, το χρονικό διάστημα που παρουσιάζει υπογονιμότητα ή την ύπαρξη ή μη πόνου, η έκφραση της PRL-3 ανευρέθηκε σε 72,9% των δειγμάτων έκτοπων κυττάρων ενδομητρίου. Με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η έκφραση της PRL-3 ήταν υψηλότερη στα έκτοπα ενδομήτρια απ'ότι στα φυσιολογικά. Από αυτά τα ευρήματα προκύπτει ότι η PRL-3 έχει στενή σχέση με τα κλινικά στάδια της ενδομητρίωσης αλλά και με την υποτροπή της ασθένειας, γεγονός που τονίζει την κλινική σημασία της PRL-3 στην ενδομητρίωση (Ruan et al, 2010). Παράλληλα με αυτά τα ευρήματα οι Zhan et al, 2016 προτείνουν ότι η PRL-3, ένα μόριο το οποίο εμπλέκεται με διάφορες κακοήθειες παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε τοίχωμα κυστέων από ασθενείς με ενδομητρίωμα. Η αυξημένη της έκφραση σε έκτοπες ενδομητριωσικές βλάβες μπορεί να συσχετίζεται με την πρόοδο της νόσου.

Βάσει των μέχρι τώρα ευρημάτων στη βιβλιογραφία θεωρήσαμε ότι η PRL-3 και η έκφραση της συνδέεται στενά με την ύπαρξη ενδομητριωσικών ιστών σε ασθενείς με ενδομητρίωση και επηρεάζει την πορεία της νόσου. Για αυτό τον λόγο συλλέξαμε δείγματα ενδομητριωσικού ιστού- κύστεις ωοθηκών αλλά και ξέσματα φυσιολογικού ενδομητρίου από 21 ασθενείς οι οποίες παρεβρέθηκαν στην κλινική για γυναικολογικό χειρουργείο. Από τους ιστούς απομονώσαμε το RNA και εν συνεχεία συνθέσαμε το cDNA θέλοντας να μελετήσουμε την ποσοτική έκφραση της PRL-3 σε κάθε ιστό. Σκοπός μας να συγκρίνουμε την έκφραση ανάμεσα στο φυσιολογικό και στο παθολογικό ενδομητρικό ιστό κάθε ασθενούς.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προκύπτει ότι στις περισσότερες γυναίκες δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου της PRL-3 ανάμεσα στο ενδομητρίωμα και στα ξέσματα ενδομητρίου. Σε μερικά δείγματα η έκφραση είναι αυξημένη και σε άλλα χαμηλή (τόσο στο εύτοπο όσο και στο έκτοπο ενδομήτριο), χωρίς όμως να εμφανίζεται ένα συγκεκριμένο πρότυπο που να μπορεί να εξηγήσει αυτή τη διαφορά. Το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι ανεξαρτήτως των επιπέδων έκφρασης, το εύτοπο και το έκτοπο ενδομήτριο έχουν κοινά επίπεδα έκφρασης. Παρόλα αυτά, σε 4 ασθενείς παρουσιάστηκαν διαφορές στην έκφραση ανάμεσα στο φυσιολογικό και στον ενδομητριωσικό ιστό. Στις 2 από αυτές η έκφραση ήταν μεγαλύτερη στο φυσιολογικό ιστό και στις άλλες 2 στον ενδομητριωσικό ιστό.

Επανερχόμενοι στη δημοσίευση στο Fertility Sterility από τους Ruan et. Al το 2010 όπου παρουσιάζεται μηδενική έκφραση της PRL-3 σε επίπεδο πρωτεΐνης στο εύτοπο ενδομήτριο και αυξημένη έκφραση της στα ενδομητρίωματα με την τεχνική του Western Blot .

Εάν στηριχτούμε στην εν λόγω δημοσίευση και την συνδυάσουμε με τα δικά μας αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι εφόσον τα επίπεδα mRNA είναι ίδια στις περισσότερες γυναίκες αλλά τα επίπεδα πρωτεΐνης διαφέρουν, η ρύθμιση γίνεται μετα-μεταγραφικά από κάποιο miRNA που μπλοκάρει την έκφραση του mRNA στο εύτοπο ενδομήτριο. Συνεπώς, πιθανόν να υπάρχει κάποια διαταραχή στην έκφραση του miRNA που ρυθμίζει το Prl3 mRNA στο ενδομητρίωμα, οδηγώντας σε υπερέκφραση του.

Παρόλα αυτά, στην δημοσίευση των Zhan et. Al στο Human Reproduction το 2016 τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA τα ενδομητρίωματα είχαν αυξημένη έκφραση του γονιδίου prl3 σε σχέση με το εύτοπο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση και χωρίς (κοντρολ).

Ωστόσο τα δείγματα τους ήταν στρωματικά κύτταρα που είχαν απομονωθεί και καλλιεργηθεί. Στα δικά μας πειράματα χρησιμοποιήσαμε όλο τον ιστό από τα ενδομητρίωματα και το ενδομήτριο που περιέχει τόσο στρωματικά όσο και επιθηλιακά κύτταρα. Επομένως ίσως η παρουσία των επιθηλιακών κυττάρων να αλλάζει την έκφραση των στρωματικών κυττάρων σε διάφορα γονίδια που επηρεάζουν την διεισδυτικότητα όπως είναι και το p1-3.

Καθώς η PRL-3 έχει συσχετιστεί με την πορεία και πρόοδο της νόσου της ενδομητρίωσης, καλό θα ήταν στις ασθενείς στις οποίες παρουσιάζεται διαφορά στην έκφραση να γίνει follow up για την πορεία τους μετά το χειρουργείο.

Τέλος, στις γυναίκες στις οποίες η έκφραση της PRL-3 είναι ίδια ανάμεσα στις ενδομητρωσικές κύστες και στο φυσιολογικό ενδομήτριο θα μπορούσαμε μελλοντικά να μελετήσουμε εάν υπάρχει κάποιο γονίδιο το οποίο να αναστέλλει την έκφραση της PRL-3. Τέτοια είναι τα γονίδια των TGF- β (Jiang et al, 2011) και PCBP1 (Wang et al, 2010).

Βιβλιογραφία

Achiwa H, Lazo JS. (2007). PRL-1 tyrosine phosphatase regulates c-Src levels, adherence, and invasion in human lung cancer cells. *Cancer Res* 67:643–650.

Ahn JH, Kim SJ, Park WS, Cho SY, Ha JD, Kim SS, Kang SK, Jeong DG, Jung SK, Lee SH, Kim HM, Park SK, Lee KH, Lee CW, Ryu SE. (2006). Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 16:2996–2999.

Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117:699–711.

Attar E, B. S. (2006). Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fert Stert* (85), 1307-18.

Attia GR, Z. K. (2000). Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* (85), 2897-902.

Bardelli A, Saha S, Sager JA, Romans KE, Xin B, Markowitz SD, Lengauer C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B. (2003). PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin Cancer Res* 9:5607–5615.

Barnhart K, D.-S. R.-f. (2002). Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fert Stert* (77), 1148-55.

Basak S, Jacobs SBR, Krieg AJ, Pathak N, Zeng Q, Kaldis P, Giaccia AJ, Attardi LD. (2008). The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell* 30:303–314.

Berkley KJ, D. N. (2004). Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (101), 11094-8.

Bessette DC, Qiu D, Pallen CJ (2008). PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 27:231–252.

Bolun SE. (2009) Endometriosis. *N Engl J Med*; 360:268-279

Brandenberger AW, L. D. (1999). Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod* (5), 651-5.

Brosens. (2004). Endometriosis rediscovered? *Hum Reprod* (19), 1679-80.

Buffart TE, Coffa J, Hermsen MAJA, Carvalho B, van der Sijp JRM, Ylstra B, Pals G, Schouten JP, Meijer GA. (2005). DNA copy number changes at 8q 11–24 in metastasized colorectal cancer. *Cell Oncol* 27:57–65.

Bulun SE, L. Z. (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* (57), 359-83.

Cates CA, Michael RL, Stayrook KR, Harvey KA, Burke YD, Randall SK, Crowell PL, Crowell DN. (1996). Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 110:49–55.

Chang C, Werb Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:S37–S43.

Daouti S, Li WH, Qian H, Huang KS, Holmgren J, Levin W, Reik L, McGady DL, Gillespie P, Perrotta A, Bian H, Reidhaar-Olson JF, Bliss SA, Olivier AR, Sergi JA. (2008). A selective phosphatase of regenerating liver phosphatase inhibitor suppresses tumor cell anchorage-independent growth by a novel mechanism involving p130Cas cleavage. *Cancer Res* 68:1162–1169

Diamond RH, Cressman DE, Laz TM, Abrams CS, Taub R. (1994). PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol* 14:3752–3762.

Dumaual CM, Sandusky GE, Crowell PL, Randall SK. 2006. Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues. *J Histochem Cytochem* 54:1401–1412.

Fagerli UM, Holt RU, Holien T, Vaatsveen TK, Zhan F, Egeberg KW, Barlogie B, Waage A, Aarset H, Dai HY, Shaughnessy JD, Sundan A, Børset M. (2008) .Overexpression and involvement in migration by the metastasis-associated phosphatase PRL-3 in human myeloma cells. *Blood* 111:806–815.

Fauci AS et al, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition

Fei Ruan, M. J.-J.-H.-M.-Y.-F. (2010). Phosphatase of regenerating liver-3: a novel promising marker in human endometriosis. *Fert Stert* (94), 1980-84.

Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD. (2006). PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Res* 66:3153–3161.

Garry. (2004). The endometriosis syndromes: a clinical classification in the presence of aetiological confusion and therapeutic anarchy. *Hum Reprod* (19), 1679-80.

Giudice LC, K. L. (2004). Endometriosis. *Lancet* (364), 1789-99.

Govatati S, Kodati VL, Deenadayal M, Chakravarty B, Shivaji S, Bhanoori M. (2014) Mutations in the PTEN tumor gene and risk of endometriosis: a case- controlled study. *Hum Reprod*. 29(2)324-336

Guo K, Li J, Wang H, Osato M, Tang JP, Quah SY, Gan BQ, Zeng Q. (2006). PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 66:9625–9635.

Guo K, Tang JP, Tan CPB, Wang H, Zeng Q. (2008). Monoclonal antibodies target intracellular PRL phosphatases to inhibit cancer metastases in mice. *Cancer Biol Ther* 7:750–757.

Guzeloglu- Kayisli O, Kayisli UA, Al- Rejjal R, Zheng W, Luleci G, Arici A. Regulation of PTEN expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* (2003)88(10)5017-5026

Guzick DS, S. N. (1997). Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fert Stert*(67), 822-9.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.

Huveneers S, Danen EHJ (2009) Adhesion signaling-crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122:1059–1069.

Jiang Y, Liu X-Q, Rajput A, Geng L, Ongchin M, Zeng Q (2011) Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGF β in colon cancer metastasis. *Cancer Res.* **71**, 234–244doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1487

Kettel LM, M. A. (1996). Treatment of endometriosis with the antiprogestone mifepristone (RU486). *Fert Stert* (65), 23-8.

Kuo L, Chang HC, Leu TH, Maa MC, Hung WC. (2006). Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway. *J Cell Physiol* 207:729–734.

Matter WF, Estridge T, Zhang C, Belagaje R, Stancato L, Dixon J, Johnson B, Bloem L, Pickard T, Donaghue M, Acton S, Jeyaseelan R, Kadambi V, Vlahos CJ. (2001). Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 283:1061–1068.

Mechsner, S. (2016). Endometriosis. An often unrecognized pain disorder. *Schmerz* , 478.

Ming J, Liu N, Gu Y, Qiu X, Wang EH. (2009). PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer. *Pathology* 41:118–126.

Missmer SA, H. D. (2004). Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol* (104), 965-74.

Mohn KL, Laz TM, Hsu JC, Melby AE, Bravo R, Taub R. (1991). The immediate early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol Cell Biol* 11:381–390.

Murphy AA, C. P. (1994). RU486: pharmacology and potential use in the treatment of endometriosis and leiomyomata uteri. *Curr Opin Obstet Gynecol* (6), 269-78.

Olive DL, P. E. (2001). Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* (345), 266-75.

Olive DL, S. L. (1993). Endometriosis. *N Engl J Med* (328), 1759-69.

Ostman A, Hellberg C, Böhmer FD (2006) . Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:307–320.

Park H, Jung SK, Jeong DG, Ryu SE, Kim SJ. (2008). Discovery of novel PRL-3 inhibitors based on the structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* 18:2250–2255.

Pathak MK, Dhawan D, Lindner DJ, Borden EC, Farver C, Yi T. (2002). Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity. *Mol Cancer Ther* 1:1255–1264.

Peng L, Xing X, Li W, Qu L, Meng L, Lian S, Jiang B, Wu J, Shou C. (2009). PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Mol Cancer* 8:110.

Polato F, Codegioni A, Fruscio R, Perego P, Mangioni C, Saha S, Bardelli A, Brogginini M. (2005). PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res* 11:6835–6839.

Qian F, Li YP, Sheng X, Zhang ZC, Song R, Dong W, Cao SX, Hua ZC, Xu Q. (2007). PRL-3 siRNA inhibits the metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells in vitro and in vivo. *Mol Med* 13:151–159.

Ren S, Zhou Y, Fang X, She X, Wu Y, Wu X. (2017) PRL-3 is involved in estrogen- and IL-6 induced migration of endometrial stromal cells from ectopic endometrium. *Reproductive Sciences* 24(1); 124-132

Ridley AJ, Hall A. (1996) The small GTP- binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* Vol 70 p.389-399

Ruan F, Lin J, Wu RJ, Xu KH, Zhang XM, Zhou CY, Huang XF. (2009). Phosphatase of regenerating liver-3: a novel and promising marker in human endometriosis. *Fertil Steril*. in Press, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.065

Ruan F, Lin J, Wu RJ, Xu KH, Zhang XM, Zhou CY, Huang XF. (2010) Phosphatase of regenerating liver-3: a novel and promising marker in human endometriosis. *Fertility and Sterility* Vol 94 No 6 p.1980-1984

Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 294:1343–1346.

Sahai E, Marshall CJ. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2:133–142.

Simpson JL, E. S. (1980). Heritable aspects of endometriosis. *I. Genetic Studies Am J Obstet Gynecol* (137), 327-31.

Stephens B, Han H, Hostetter G, Demeure MJ, Von Hoff DD. Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation

and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2008);7:202-10

Stephens BJ, Han H, Gokhale V, Von Hoff DD. 2005. PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer. *Mol Cancer Ther* 4:1653–1661.

Stovall DW, B. L. (1997). Endometriosis-associated pelvic pain: evidence for an association between the stage of disease and a history of chronic pelvic pain. *Fert Stert* (68), 13-8.

Sun JP, Luo Y, Yu X, Wang WQ, Zhou B, Liang F, Zhang ZY. (2007). Phosphatase activity, trimerization, and the C-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth and migration. *J Biol Chem* 282:29043–29051.

Wang H, Quah SY, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. (2007a). PRL-3 downregulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial–mesenchymal transition. *Cancer Res* 67:2922–2926

Wang H, Vardy LA, Tan CP, Loo JM, Guo K, Li J, Lim SG, Zhou J, Chng WJ, Ng SB, Li HX, Zeng Q. (2010). PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase. *Cancer Cell* 18:52–62.

Wang L, Shen Y, Song R, Sun Y, Xu J, Xu Q. (2009). An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells. *Mol Pharmacol* 76:1238–1245.

Wang Y, Li ZF, He J, Li YL, Zhu GB, Zhang LH, Li YL. (2007b). Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis. *Int J Colorectal Dis* 22:1179–1184.

Werner SR, Lee PA, DeCamp MW, Crowell DN, Randall SK, Crowell PL. (2003). Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 202:201–211.

Xue Q, L. Z. (2007). Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* (77), 681-7.

Yang J, Weinberg RA. (2008). Epithelial–mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14:818–829.

Zeng Q, Hong W, Tan YH. (1998). Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochem Biophys Res Commun* 244:421–427.

Zhan H, Ma J, Ruan F, Bedaiwy M, Peng B, Wu R, Lin J (2016) Elevated Phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cytoskeleton reorganization, cell migration and invasion in endometrial stromal cells from endometrioma. *Human Reproduction*, Vol 31 No 4 pp.723-733

Zhao Z, Lee CC, Monckton DG, Yazdani A, Coolbaugh MI, Li X, Bailey J, ShenY, Caskey CT. (1996). Characterization and genomic mapping of genes and pseudogenes of a new human protein tyrosine phosphatase. *Genomics* 35:172–181.

Zhou J, Wang S, Lu J, Li J, Ding Y. (2009). Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 124:1879–1886.