



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ Arg72Pro ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ TP53 ΣΕ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

ΔΕΛΟΥΣΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη	4
Abstract.....	6
Γενικό Μέρος.....	7
Κεφάλαιο 1.....	8
Υπογονιμότητα και Τεχνολογίες Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ART).....	8
Κεφάλαιο 2.....	12
Καθ' ἑξιν αποβολές	12
Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας.....	14
Γενετικοί παράγοντες.....	17
Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	17
Γονικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις.....	18
Ανδρικός παράγοντας	21
Ανοσολογικοί παράγοντες.....	22
Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και καθ' ἑξιν αποβολές.....	22
Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK cells).....	22
T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs).....	24
Μακροφάγα	26
Μαστοκύτταρα.....	27
Πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMNs)	28
Αυτοάνοσα νοσήματα.....	28
Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος	29
Ανεπάρκεια της Ωχρινικής Φάσης (LPD).....	30
Σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)	31
Παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος	32
Υπερθυρεοειδισμός	32
Υποθυρεοειδισμός	33
Αντιθυρεοειδικά αντισώματα	33
Σακχαρώδης Διαβήτης	34
Υπερπρολακτιναιμία.....	34
Θρομβοφιλικό παράγοντες.....	35
Λοιμώδεις παράγοντες.....	37
Συνήθειες και τρόπος ζωής	39
Κεφάλαιο 3.....	40

Η έννοια του Γενετικού πολυμορφισμού	40
Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro)	43
Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro) και η συσχέτιση του με την εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών	45
Κεφάλαιο 4.....	48
p53: Το γονίδιο, η πρωτεΐνη και οι ισομορφές	48
Η ιστορία της πρωτεΐνης p53 από την ανακάλυψη της έως σήμερα	48
Δομή και οργάνωση του γονιδίου TP53	50
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και οι λειτουργικές περιοχές της	53
p53: Ο μοριακός φύλακας του γονιδιώματος	55
Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στον καρκίνο.....	58
Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 στην αναπαραγωγή	59
Σκοπός.....	62
Ειδικό μέρος	63
Πειραματική διαδικασία	64
Υλικά και Μέθοδοι	64
Δείγματα.....	64
Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα	64
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	67
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)	73
Αποτελέσματα.....	75
Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	77
Συζήτηση	78
Βιβλιογραφία	81

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς και τον αδερφό μου, για την αμέριστη και γεμάτη αγάπη υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Δεν έχει υπάρξει μέρα που να μην ήταν δίπλα μου σε κάθε απόφαση, κάθε προσπάθεια, κάθε βήμα, κάθε στιγμή. Επίσης, ένα γεμάτο αγάπη ευχαριστώ στον Ανδρέα Διαμαντή για την καταλυτική βοήθεια και την παντοτινή στήριξη του.

Μέσα από την καρδιά μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μαυρογιάννη Δέσποινα για όλη τη βοήθεια και τη γεμάτη δημιουργικότητα καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής μελέτης. Η συμβολή της σε κάθε βήμα ήταν καθοριστική και αναντικατάστατη. Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ γεμάτο σεβασμό, αγάπη και εκτίμηση για όλη την κατανόηση και υποστήριξη της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ράμι Ραουάσντε για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας όσο και σε κάθε άλλο δημιουργικό ερευνητικό μας εγχείρημα.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Δρακάκη Πέτρο, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» και να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα.

Περίληψη

Οι καθ' ἑξίν αποβολές αποτελούν ένα μείζον αναπαραγωγικό ζήτημα το οποίο επηρεάζει το 1-5 % των ζευγαριών σε αναπαραγωγική ηλικία. Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE), ως καθ' ἑξίν αποβολές ορίζονται οι αποβολές δύο ή περισσότερων κήσεων πριν την 24^η εβδομάδα κύησης. Διάφοροι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνισή τους, όπως για παράδειγμα οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, οι ορμονικές διαταραχές, γενετικά ή ανοσολογικά αίτια, ορισμένες λοιμώξεις του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος ή ακόμα και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Ωστόσο, τα αίτια των καθ' ἑξίν αποβολών παραμένουν αδιευκρίνιστα στο 50% των περιπτώσεων. Οι πολυμορφισμοί έχουν προταθεί ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες των ιδιοπαθών επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro) και της εμφάνισης καθ' ἑξίν αποβολών. Ο Arg72Pro μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός καθώς και ο κρίσιμος ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 στην αναπαραγωγή, έχουν αποτελέσει ιδιαίτερο σημείο ενδιαφέροντος και μελέτης τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, οι ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως οι ομόζυγες γυναίκες για το γονότυπο Pro/Pro αλλά και οι ετερόζυγες γυναίκες με γονότυπο Arg/Pro, έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καθ' ἑξίν αποβολών σε σχέση με τις ομόζυγες για το γονότυπο Arg/Arg. Η εμφάνιση των επανειλημμένων αποβολών στις γυναίκες που φέρουν το κωδικόνιο για την προλίνη, πιθανώς οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα αυτής της παραλλαγής να επάγει την απόπτωση των κυττάρων καθώς και στις διαταραχές που προκαλεί στην πλακουντιακή δομή και κυκλοφορία.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως υπάρχει μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του Arg72Pro πολυμορφισμού και της εμφάνισης καθ' ἑξίν αποβολών στο μελετώμενο πληθυσμό. Τα αποτελέσματά αυτά είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς συνάδουν με τα αντίστοιχα ερευνητικά δεδομένα και ενισχύουν την υπόθεση πως ο Arg72Pro πολυμορφισμός θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αποβολών. Καταλήγοντας, σκόπιμη κρίνεται η διενέργεια επιπρόσθετων ερευνητικών μελετών

αναφορικά με τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της εμφάνισης καθ' ἑξιν αποβολών σε πληθυσμούς και άλλων εθνοκοτήτων, προκειμένου να τεκμηριωθεί ο Arg72Pro πολυμορφισμός ως παράγοντας κινδύνου για τις καθ' ἑξιν αποβολές αλλά και για να δημιουργηθεί ένα γενετικό προφίλ, που χαρακτηρίζει τη μοναδική γενετική ταυτότητα της κάθε γυναίκας.

Abstract

Recurrent miscarriages are a major reproductive issue affecting 1-5% of couples of reproductive age. According to the most recent definition of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), recurrent pregnancy loss is defined as the loss of two or more pregnancies before the 24th week of pregnancy. Various factors have been implicated for their occurrence, such as anatomical uterus abnormalities, hormonal disorders, genetic or immunological causes, certain infections of the female reproductive system or even environmental factors. However, the causes of recurrent miscarriages remain unclear in 50% of cases. Polymorphisms have been suggested as potential causative agents of idiopathic recurrent miscarriages.

In this study, the association of single nucleotide polymorphism at codon 72 of the TP53 (Arg72Pro) gene with recurrent miscarriages was studied. Arg72Pro polymorphism as well as the critical role of the TP53 gene in reproduction have been of particular interest and have been researched in recent years. Specifically, studies have shown that homozygous women for the Pro / Pro genotype as well as heterozygous women with the Arg / Pro genotype have an increased risk of recurrent miscarriage than the homozygous for the Arg / Arg genotype. The occurrence of recurrent miscarriages in women bearing the allele for proline is probably due to the reduced ability of this allele to induce cell apoptosis as well as disorders caused to placental structure and circulation.

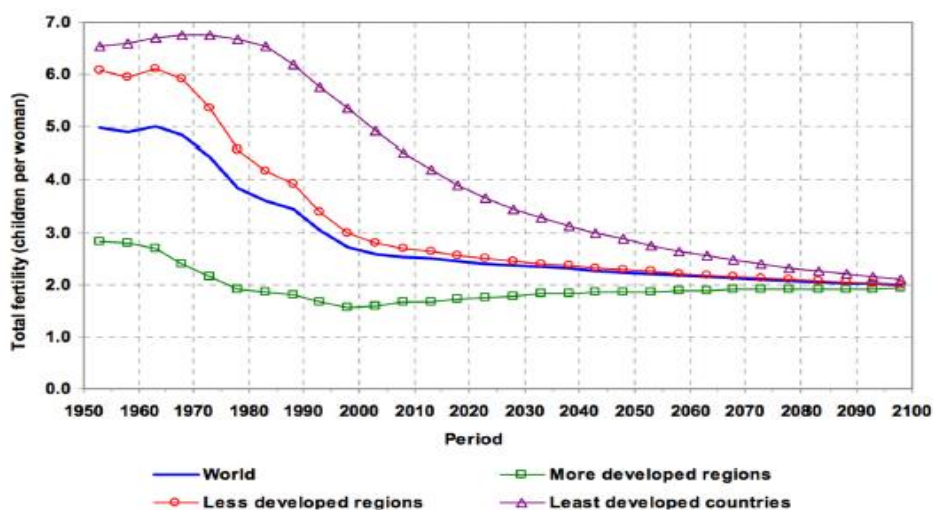
Our results showed that there is a statistically significant association between Arg72Pro polymorphism and the occurrence of recurrent pregnancy loss in the population studied. These results are particularly encouraging as they are in line with relevant research data and support the hypothesis that Arg72Pro polymorphism could be a causative factor for recurrent miscarriages. Summing up, it is advisable to carry out additional research on the association between Arg72Pro polymorphism and the occurrence of recurrent miscarriages in populations of other nationalities, in order to substantiate Arg72Pro polymorphism as a risk factor for recurrent miscarriages and to develop a genetic profile, which characterizes the unique genetic identity of each woman.

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

Υπογονιμότητα και Τεχνολογίες Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ART)

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*World Health Organization*), υπογονιμότητα ονομάζεται η πάθηση του αναπαραγωγικού συστήματος που ορίζεται από την αδυναμία σύλληψης ύστερα από 12 μήνες τακτικών ελεύθερων και φυσιολογικών σεξουαλικών επαφών. Παγκοσμίως, η υπογονιμότητα εκτιμάται πως επηρεάζει το 8-12% των ζευγαριών που βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία (Vander Borgh & Wyns, 2018). Στην κεντρική και Ανατολική Ευρώπη τα ποσοστά υπογονιμότητας αγγίζουν το 30%. Ο επιπολασμός της υπογονιμότητας στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας εκτιμάται πως είναι ένα στα εφτά ζευγάρια στο δυτικό κόσμο και ένα στα τέσσερα ζευγάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η μείωση της γονιμότητας έχει επιταχυνθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Σε παγκόσμιο επίπεδο, αναμένεται πως η γονιμότητα θα συνεχίσει να μειώνεται και στα επερχόμενα χρόνια (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η μείωση της γονιμότητας στην πάροδο των χρόνων (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Ως πρωτογενής υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού να συλλάβει όταν δεν έχει επιτύχει

ποτέ κύηση, ενώ η δευτερογενής υπογονιμότητα αναφέρεται στην αδυναμία σύλληψης από ένα ζευγάρι που έχει συλλάβει στο παρελθόν ανεξάρτητα από την έκβαση της σύλληψης (Zegers-Hochschild et al., 2017). Η δευτερογενής υπογονιμότητα αποτελεί την πιο κοινή μορφή γυναικείας υπογονιμότητας και είναι συχνότερη σε περιοχές με υψηλά ποσοστά μη ασφαλών αμβλώσεων και πτωχής φροντίδας της μητέρας. Ο ισχυρότερος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας της γονιμότητας είναι η προχωρημένη ηλικία της γυναίκας κατά τη σύλληψη (Hart, 2016). Η μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας στις γυναίκες αρχίζει ήδη από την ηλικία των 25-30 ετών, ενώ η μέση ηλικία τελευταίας γέννησης είναι τα 40-41 έτη στους περισσότερους μελετημένους πληθυσμούς με φυσιολογική γονιμότητα. Στους παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιμότητα συγκαταλέγεται επίσης ο τρόπος ζωής, ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και ορισμένες ασθένειες που μπορεί να αφορούν το ένα ή και τα δύο φύλα. Στις παθήσεις που επηρεάζουν τη γονιμότητα και στα δύο φύλα περιλαμβάνονται ο υπογόναδοτροφικός υπογοναδισμός, η υπερπρολακτιναιμία, η κυστική ίνωση, οι λοιμώξεις και τα συστηματικά νοσήματα. Ειδικότερα, η γυναικεία γονιμότητα μπορεί να επηρεαστεί από παθήσεις όπως η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, η ενδομητρίωση, τα ινομώματα της μήτρας ή οι πολύποδες του ενδομητρίου. Από την άλλη πλευρά, η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται τόσο σε ορχικά όσο και μετα-ορχικά αίτια.

Η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας στηρίζεται στη συμβουλευτική σε θέματα γονιμότητας, σε αλλαγές στον τρόπο ζωής του ζευγαριού, την ιατρική/χειρουργική θεραπεία των υποκείμενων παθήσεων, τη φαρμακευτική αγωγή και στις Τεχνολογίες Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ARTs) (Nardelli, Stafinski, Motan, Klein, & Menon, 2014). Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, ως μια σειρά πρακτικών των τελευταίων δεκαετιών, ήρθε να καλύψει προβλήματα της υπογονιμότητας. Από το 1978, που πραγματοποιήθηκε η πρώτη γέννηση με την τεχνική της IVF από τους Patrick Steptoe και Robert Edwards, περισσότερα από 5 εκατομμύρια παιδιά έχουν γεννηθεί με τη βοήθεια της Τεχνολογίας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ART) και κυρίως με την τεχνική της IVF και ICSI. Με τις εφαρμογές της υποβοήθησης, δίνεται η δυνατότητα τεκνοποίησης, όταν υπάρχει τεκμηρίωση της υπογονιμότητας, δηλαδή αντιμετώπιση της αδυναμίας απόκτησης τέκνων με φυσικό τρόπο καθώς και αντιμετώπιση ειδικών παθήσεων ή συνδρόμων που επηρεάζουν την γονιμότητα, ενώ παρατείνεται το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μια γυναίκα μπορεί με ασφάλεια για

την ίδια και για το παιδί να τεκνοποιήσει. Οι Τεχνολογίες Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ARTs) αφορούν σε όλες τις θεραπείες ή τις διαδικασίες για την έναρξη μίας εγκυμοσύνης και περιλαμβάνουν τον *in vitro* χειρισμό των ωοκυττάρων, του σπέρματος ή των εμβρύων, την κλασσική εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF, *in vitro fertilization*), την ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου ή μικρογονιμοποίηση (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*), την ομόλογη ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI), την κρυσυντήρηση γαμετών και εμβρύων, την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD, *preimplantation genetic diagnosis*) και τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο (PGS, *preimplantation genetic screening*) (M. Chen & Heilbronn, 2017). Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν και άλλες τεχνικές όπως η σαλπγγική μεταφορά γαμετών (GIFT, *gamete intrafallopian transfer*), η σαλπγγική μεταφορά ζυγωτών (ZIFT, *zygote intrafallopian transfer*), η ενδοσαλπγγική μεταφορά εμβρύων (TET, *tubal embryo transfer*), η POST (peritoneal oocyte and sperm transfer) και η τοποθέτηση σπερματοζωαρίων κάτω από τη ζώνη (SUZI, *subzonal sperm injection*).

Εν συντομία, η τυπική διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- i. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας
- ii. Ωοληψία
- iii. Γονιμοποίηση και ανάπτυξη του εμβρύου
- iv. Εμβρυομεταφορά
- v. Εμφύτευση του εμβρύου

Η συγκεκριμένη διαδικασία συνίσταται στην χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής (γοναδοτροπίνες) για την παραγωγή ικανού αριθμού ωαρίων σε ένα κύκλο. Σε χρονικό διάστημα 34 με 36 ωρών το αργότερο, ο γιατρός λαμβάνει τα ωάρια από τις ωοθήκες της γυναίκας με τη βοήθεια διακολλπικού καθετήρα και υπερήχου και τη χρήση βελόνας αναρρόφησης υπό νάρκωση με τοπικό αναισθητικό. Παράλληλα με την ωοληψία ο σύντροφος δίνει δείγμα σπέρματος. Στο εργαστήριο IVF οι εμβρυολόγοι προετοιμάζουν κατάλληλα τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια και τα αναμειγνύουν για να επιτευχθεί γονιμοποίηση. Τα έμβρυα καλλιεργούνται μέσα σε ειδικούς επωαστές με τη βοήθεια ειδικών καλλιεργητικών μέσων για τρεις ημέρες για να φτάσουν στο στάδιο των 8 κυττάρων ή για πέντε ημέρες προκειμένου να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τελικά, τα έμβρυα μεταφέρονται στη μήτρα ή

καταψύχονται για μελλοντική μεταφορά. Σε δύο περίπου εβδομάδες μετά την εμβρυομεταφορά, η γυναίκα υποβάλλεται σε τεστ εγκυμοσύνης. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό, σημαίνει πως το έμβρυο έχει εμφυτευθεί στο ενδομήτριο (M. Chen & Heilbronn, 2017).

Αν και η μέθοδος της κλασσικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) είναι αποτελεσματική για περιπτώσεις γυναικείας υπογονιμότητας, ανεξήγητης υπογονιμότητας, και ορισμένες περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας, η ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) απαιτείται για τη θεραπεία της σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας.

Οι μέθοδοι της Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής εφαρμόζονται με τρόπο που εξασφαλίζουν το σεβασμό της ελευθερίας του ατόμου και του δικαιώματος της προσωπικότητας καθώς και την ικανοποίηση της επιθυμίας για απόκτηση απογόνων, με βάση τα δεδομένα της Ιατρικής και της Βιολογίας, σε συνδυασμό με τις αρχές της Βιοηθικής. Αναμφίβολα, η Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή έχει συμβάλλει τα μέγιστα στη ζωή του σύγχρονου ανθρώπου.

Κεφάλαιο 2

Καθ' ἑξιν αποβολές

Η εμπειρία της αποβολής είναι μία από τις δυσκολότερες για ένα ζευγάρι που θέλει να αποκτήσει παιδί, πόσο μάλλον όταν οι αποβολές είναι επαναλαμβανόμενες. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Κοινότητα Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE), ως αποβολή ορίζεται η αυτόματη απώλεια μίας κύησης πριν το έμβρυο αναπτυχθεί αρκετά για να είναι βιώσιμο. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει όλες τις αποβολές από τη στιγμή της σύλληψης, έως την 24^η εβδομάδα κύησης. Όσον αφορά τις καθ' ἑξιν αποβολές, διάφοροι ορισμοί έχουν προταθεί, καθώς δεν υπάρχει ομοφωνία απόψεων. Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό της ESHRE, ως καθ' ἑξιν αποβολές ορίζονται οι δύο ή περισσότερες αυτόματες αποβολές, έως την 24^η εβδομάδα κύησης. Αντίστοιχα, η Αμερικανική Κοινότητα Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM) ορίζει ως επανειλημμένες αποβολές την απώλεια δύο ή περισσότερων κυήσεων, κλινικά αναγνωρισμένων, που έχουν δηλαδή τεκμηριωθεί με υπερηχογραφικό έλεγχο ή ιστοπαθολογική εξέταση (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013). Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με το Βασιλικό Κολέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων (RCOG) ο ορισμός των καθ' ἑξιν αποβολών αναφέρεται σε τρεις ή περισσότερες διαδοχικές αποβολές κυήσεων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν είναι ανιχνεύσιμες με υπερηχογραφικό έλεγχο.

Οι καθ' ἑξιν αποβολές συνιστούν ένα σημαντικό αναπαραγωγικό ζήτημα καθώς επηρεάζουν το 1-5% των ζευγαριών σε αναπαραγωγική ηλικία (Kacprzak et al., 2016). Ταξινομούνται σε πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς. Πρωτοπαθείς ονομάζονται οι καθ' ἑξιν αποβολές οι οποίες αφορούν εγκυμοσύνες με τον ίδιο σύντροφο, χωρίς ποτέ κάποια από αυτές να έχει προχωρήσει πέραν της 24^{ης} εβδομάδας κύησης. Ως δευτεροπαθείς χαρακτηρίζονται οι αποβολές οι οποίες συμβαίνουν αφού έχει προηγηθεί εγκυμοσύνη, η οποία συνεχίστηκε και πέραν από τις 24 εβδομάδες. Οι δευτεροπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές είναι λιγότερο συχνές σε σχέση με τις πρωτοπαθείς. Ο αριθμός προηγούμενων αποβολών όπως και η ηλικία της μητέρας, αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μίας νέας αποβολής. Γυναίκες με ιστορικό δύο, τριών ή τεσσάρων διαδοχικών επανειλημμένων αποβολών, εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο για μία νέα αποβολή σε σχέση με γυναίκες που έχουν ιστορικό

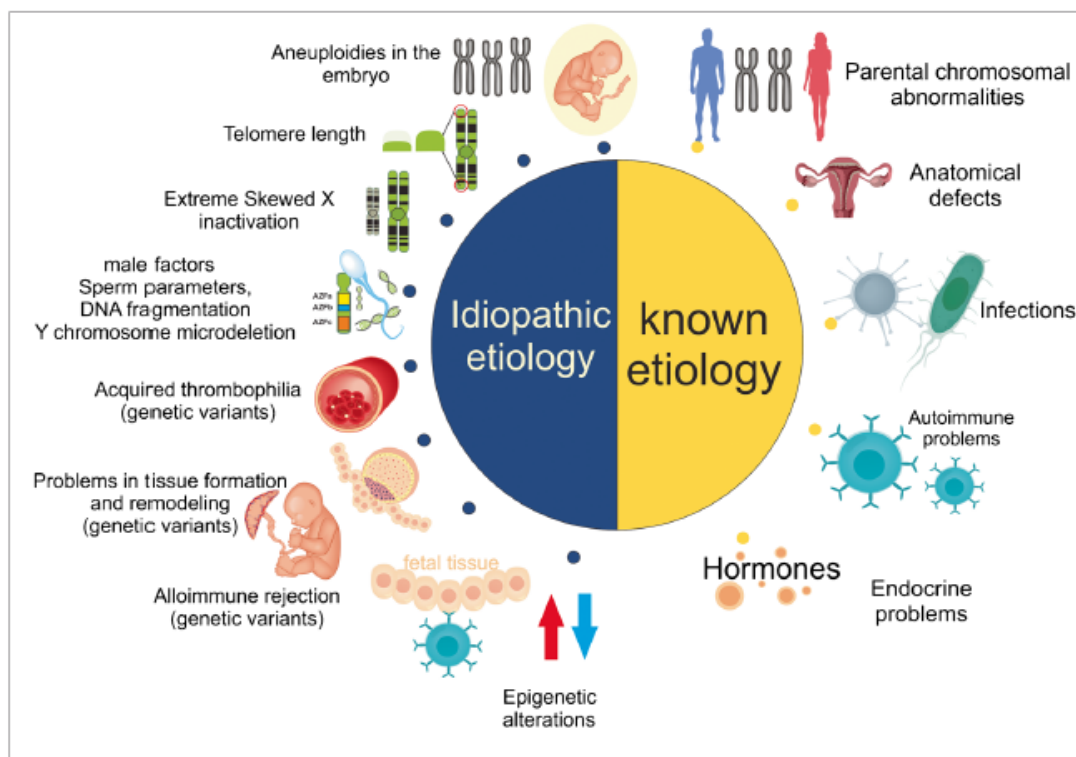
μόνο επιτυχών κνήσεων (Shapira et al., 2012). Συνεπώς, το γυναικολογικό και μαιευτικό ιστορικό αποτελεί ένα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση μίας μελλοντικής κύησης.

Μία πληθώρα παραγόντων εμπλέκεται στην αιτιολογία των καθ' ἑξιν αποβολών. Σήμερα γνωρίζουμε πως στα αίτια αυτά περιλαμβάνονται οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, διάφοροι γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες, ορισμένες διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος, θρομβοφιλικό παράγοντες, λοιμογόνοι παράγοντες καθώς και οι συνήθειες και ο τρόπος ζωής των γυναικών (Πίνακας 1, Εικόνα 2). Ωστόσο, ακόμα και μετά από πλήρη διερεύνηση, τα αίτια των καθ' ἑξιν αποβολών παραμένουν αδιευκρίνιστα στο 50% περιπτώσεων, οπότε μιλάμε για ιδιοπαθείς ή αγνώστου αιτιολογίας καθ' ἑξιν αποβολές.

Αίτια καθ' ἑξιν αποβολών

- ❖ **Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας**
 - Συγγενείς
 - Επίκτητες
- ❖ **Γενετικοί παράγοντες**
 - Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες
 - Γονικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις
 - Ανδρικός παράγοντας
- ❖ **Ανοσολογικοί παράγοντες**
 - NK κύτταρα
 - T-ρυθμιστικά κύτταρα
 - Μακροφάγα
 - Μαστοκύτταρα
 - Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα ή PNM5
 - Αυτοάνοσα νοσήματα
- ❖ **Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος**
 - Ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης (LPD)
 - Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)
 - Θυρεοειδοπάθειες
 - Σακχαρώδης διαβήτης
 - Υπερπρολακτιναμία
- ❖ **Θρομβοφιλικό παράγοντες**
- ❖ **Λοιμώδεις παράγοντες**
- ❖ **Συνήθειες – τρόπος ζωής**

Πίνακας 1: Αίτια καθ' ἑξιν αποβολών



Εικόνα 2: Τα αίτια των καθ' έξιν αποβολών (Arias-Sosa et al., 2018).

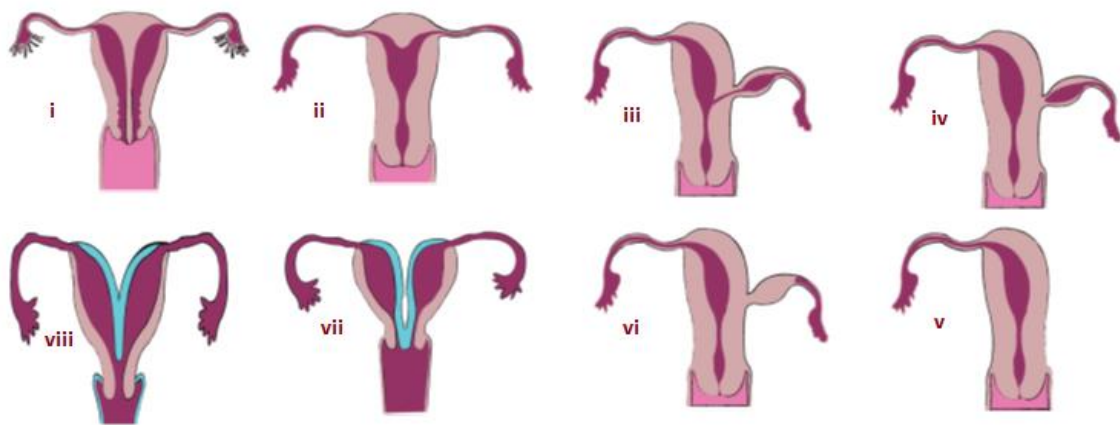
Τα αίτια των καθ' έξιν αποβολών

Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας

Οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας ανευρίσκονται στο 19% των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές και ταξινομούνται σε συγγενείς και επίκτητες. Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας προκύπτουν στην αρχή της όψιμης εμβρυϊκής περιόδου είτε λόγω αποτυχίας σχηματισμού των παραμεσονεφρικών πόρων ή πόρων του Müller, είτε λόγω ατελούς ένωσης αυτών (Marcal, Nothhaft, Coelho, Volpato, & Iyer, 2011) (Εικόνα 3). Η διαφραγματοφόρος μήτρα (*septate uterus*) είναι η συχνότερη από τις μυλλεριανές ανωμαλίες (ποσοστό > 50%). Οι διαμαρτίες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- ❖ **Απλασία της μήτρας:** προκύπτει όταν δε γίνεται επαρκής ουραία ανάπτυξη των παραμεσονεφρικών πόρων. Συνήθης είναι η υποπλασία της μήτρας, δηλαδή η ύπαρξη ενός υπανάπτυκτου οργάνου.

- ❖ **Μονόκερως μήτρα (*unicornuate uterus*):** προκύπτει όταν υπολείπεται η ανάπτυξη ενός από τους δύο παραμεσονεφρικούς πόρους. Επί απουσίας του ενός προκύπτει μια μονόκερως μήτρα (35%), επί μερικής ανάπτυξης παραμένει ένα υποπλαστικό κέρασ. Το υποπλαστικό κέρασ μπορεί να έχει ή να μην έχει λειτουργικό ενδομήτριο και να επικοινωνεί ή να μην επικοινωνεί με την κυρίως ενδομήτρια κοιλότητα. Ο τράχηλος είναι μονήρης.
- ❖ **Δίδελφους μήτρα (*didelphys uterus*):** προκύπτει από την αδυναμία συνένωσης των παραμεσονεφρικών πόρων. Από κάθε παραμεσονεφρικό πόρο προκύπτει μια ξεχωριστή μήτρα (ημι-μήτρα) με τον τράχηλό της.
- ❖ **Δίκερως μήτρα (*bicornuate uterus*):** προκύπτει από την ατελή συνένωση των παραμεσονεφρικών πόρων στο ύψος του πυθμένα της μήτρας και αφορά το 10% των μυλλερειανών παθήσεων της μήτρας.
- ❖ **Διαφραγματοφόρος μήτρα (*septate uterus*):** Οφείλεται στην αδυναμία απορρόφησης του διαφράγματος που χωρίζει τους παραμεσονεφρικούς πόρους μετά τη συνένωσή τους. Έτσι, παραμένει ολόκληρο ή τμήμα του διαφράγματος, διαιρώντας στη μέση τη μητριαία κοιλότητα. Διακρίνεται η πλήρης διαφραγματοφόρος μήτρα και η μερική διαφραγματοφόρος μήτρα.
- ❖ **Τοξοειδής μήτρα (*arcuate uterus*):** προκύπτει ως αποτέλεσμα της σχεδόν αλλά όχι πλήρους απορρόφησης του διαφράγματος.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση συγγενών ανωμαλιών της μήτρας: (i) Διαφραγματοφόρος μήτρα, (ii) Τοξοειδής μήτρα, (iii) Μονόκερως μήτρα με επικοινωνών λειτουργικό κέρασ, (iv) Μονόκερως μήτρα με μη επικοινωνών λειτουργικό κέρασ, (v) Μονόκερως μήτρα με κέρασ χωρίς κοιλότητα (μη λειτουργικό), (vi) Μονόκερως μήτρα χωρίς υποπλαστικό κέρασ, (vii) Δίδελφους Μήτρα, (viii) Δίκερως μήτρα.

Οι επίκτητες ανωμαλίες της μήτρας, σε αντίθεση με τις συγγενείς, αναπτύσσονται σε απάντηση ορμονικών ή φυσιολογικών ερεθισμάτων που εμφανίζονται μετά την εφηβεία. Στις γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές, οι επίκτητες ανατομικές ανωμαλίες παρουσιάζονται σχεδόν σε διπλάσια συχνότητα σε σχέση με τις συγγενείς (Bailey, Jaslow, & Kutteh, 2015). Οι επίκτητες ανωμαλίες περιλαμβάνουν τις συμφύσεις εντός της ενδομητρικής κοιλότητας ή σύνδρομο Asherman, τα ινομύωματα και τους ενδομητρικούς πολύποδες. Οι ενδομητρικές συμφύσεις εμφανίζονται σε θέσεις όπου η βασική μεμβράνη του ενδομητρίου έχει καταστραφεί όπως είναι δυνατό να συμβεί ύστερα από τη διενέργεια απόξεσης, μία χειρουργική επέμβαση ή λοίμωξη (Deans & Abbott, 2010). Μελέτες έχουν δείξει πως η συμφυσίολυση μειώνει σημαντικά τα ποσοστά αποβολών και για το λόγο αυτό συνιστά την προτιμώμενη θεραπεία για γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές (Jaslow, Carney, & Kutteh, 2010).

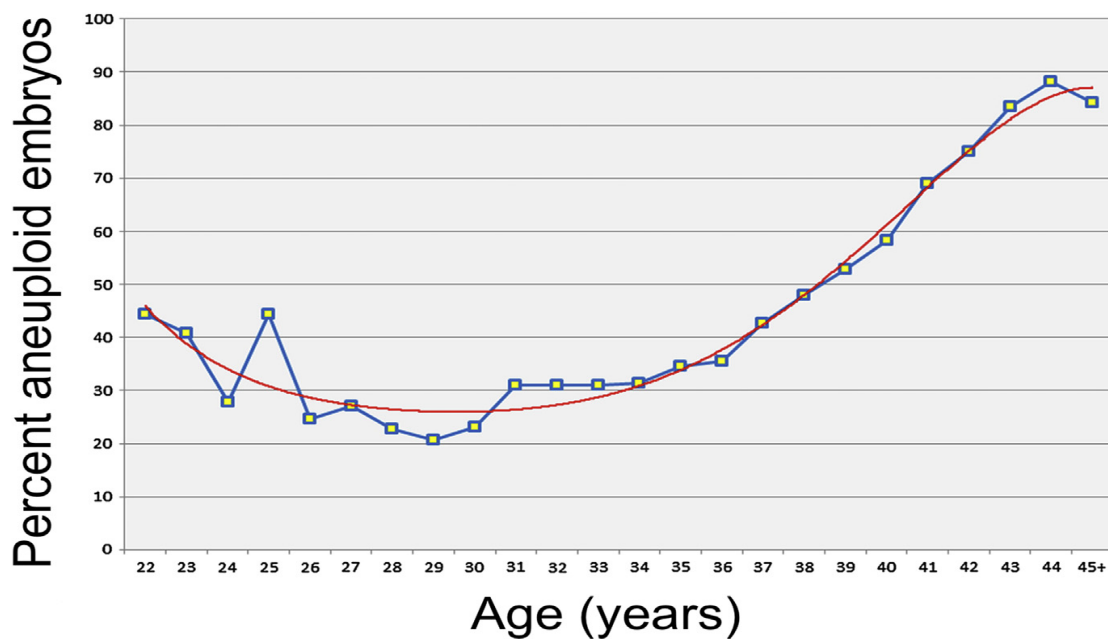
Τα ινομύωματα αποτελούν συνήθεις καλοήθεις όγκους του γυναικείου γεννητικού συστήματος και επηρεάζουν τη γονιμότητα καθώς και την έκβαση μίας εγκυμοσύνης ανάλογα με τη θέση, το μέγεθος και τον αριθμό τους (Yan et al., 2018). Ταξινομούνται με βάση τη θέση τους στη μήτρα ως υποβλεννογόνια, ενδομυϊκά και υπορογόνια. Τα υποβλεννογόνια ινομύωματα τα οποία ανευρίσκονται στο 4.5% των γυναικών με καθ' ἑξίν αποβολές, παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη φυσιολογική εμφύτευση (Bajekal & Li, 2000). Τα υποβλεννογόνια ινομύωματα συνίσταται να αφαιρούνται χειρουργικά κάθε φορά που διαγιγνώσκονται (Jaslow, 2014). Όσον αφορά τα ενδομυϊκά ινομύωματα, αναδρομικές μελέτες σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση έδειξαν πως ασθενείς με ενδομυϊκά ινομύωματα μεγαλύτερα των δύο εκατοστών τα οποία φτάνουν στην ενδομητρική κοιλότητα, παρουσίαζαν μικρότερα ποσοστά εμφύτευσης, εγκυμοσύνης αλλά και γεννήσεων ζώντων νεογνών. Γενικά, τα ινομύωματα μπορούν να εμπλέκονται στην παθολογία των καθ' ἑξίν αποβολών, όταν παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα ή/και όταν το μέγεθος τους είναι μεγαλύτερο των έξι εκατοστών (Jun, Ginsburg, Racowsky, Wise, & Hornstein, 2001). Διάφορες τεχνικές έχουν προταθεί για την αφαίρεση ή την καταστροφή των ινομυωμάτων στις γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές, συμπεριλαμβανομένων ποικίλων χειρουργικών μεθόδων. Τέλος, η τραχηλική ανεπάρκεια που έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποπεράτωση μίας

εγκυμοσύνης, συγκαταλέγεται στις επίκτητες ανωμαλίες της μήτρας που αυξάνουν το ποσοστό εμφάνισης των καθ' έξιν αποβολών (R. Rai & Wakeford, 2001).

Γενετικοί παράγοντες

Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Η εμβρυϊκή ανευπλοειδία αποτελεί τη συνηθέστερη αιτία αποβολής κυρίως πριν τη 10^η εβδομάδα της κύησης και αφορά περίπου στο 50-70% των ζευγαριών που βιώνουν μία αποβολή (Raj Rai & Regan, 2006). Η πλειονότητα αυτών των ανωμαλιών εμφανίζεται στο έμβρυο *de novo*, παρά κληρονομείται (Carp et al., 2006). Κυτταρογενετικές μελέτες έχουν δείξει πως οι συχνότερες αριθμητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν κυρίως την τρισωμία και τη μονοσωμία, καθώς και την τριπλοειδία ή τετραπλοειδία. Η συχνότερη μονοσωμία είναι η 45X ενώ οι συνηθέστερες τρισωμίες είναι οι 15, 16, 21 και 22. Οι περισσότερες ανθρώπινες ανευπλοειδίες προκύπτουν από λάθη κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση του ωοκυττάρου, η οποία ξεκινάει προεμβρυϊκά και ολοκληρώνεται μετά την ωοθυλακιορρηξία. Ένα αυξημένο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών του σπερματοζωαρίου έχει αναφερθεί σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές, αλλά μόνο το 7% των εμβρυϊκών τρισωμιών προκύπτουν από πατρικά μειωτικά λάθη. Ο κίνδυνος εμφάνισης τους αυξάνεται με την προχωρημένη ηλικία της μητέρας, η οποία αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου τόσο για τις σποραδικές όσο και για τις καθ' έξιν αποβολές (Tur-Torres, Garrido-Gimenez, & Alijotas-Reig, 2017) (Εικόνα 4).

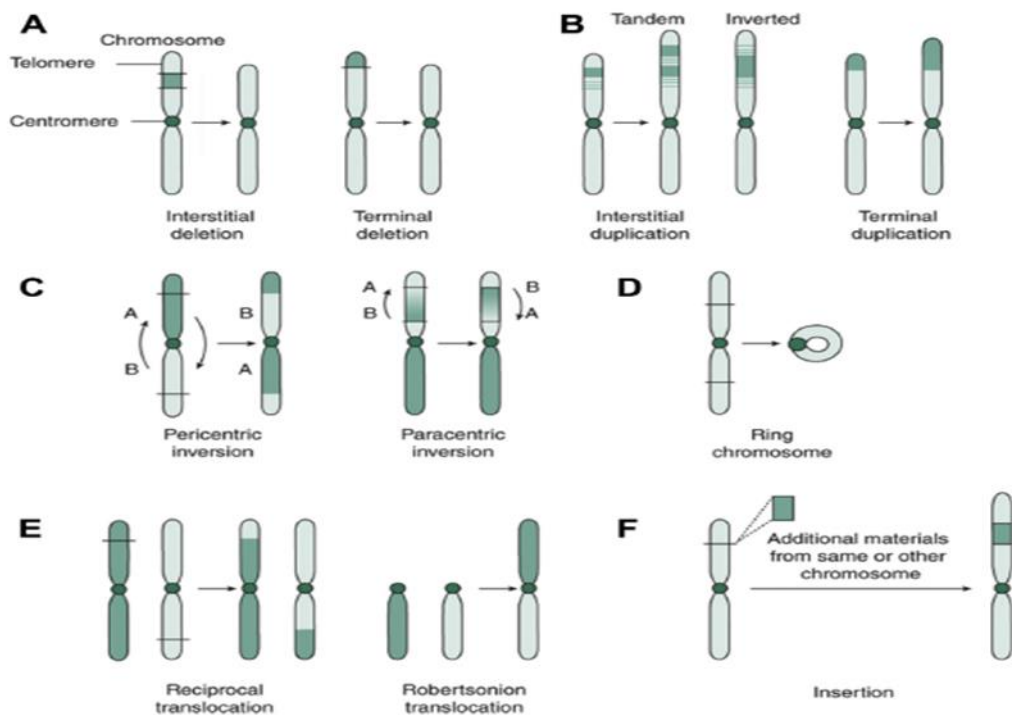


Εικόνα 4: Η συχνότητα εμφάνισης εμβρυϊκής ανευπλοειδίας σε σχέση με την προχωρημένη ηλικία της γυναίκας (Kaser, 2018).

Γονικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις

Οι γονικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται στο 2% έως 5% των ζευγαριών με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών, σε αντίθεση με το 0,2% που παρατηρείται στο γενικό πληθυσμό (van den Berg, van Maarle, van Wely, & Goddijn, 2012). Οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή μη ισοζυγισμένων γαμετών εξαιτίας ανώμαλου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Όπως συμβαίνει και με τις αριθμητικές ανωμαλίες, οι δομικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μπορεί να είναι παρούσες σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, ή απλώς σε ένα μόνο ποσοστό των κυττάρων, ο λεγόμενος μωσαϊκισμός. Ο αναπαραγωγικός κίνδυνος λόγω των δομικών ανωμαλιών εξαρτάται από τον τύπο της αναδιάταξης αλλά και από το φύλο του φορέα (Kaser, 2018; Munné, Escudero, Sandalinas, Sable, & Cohen, 2000).

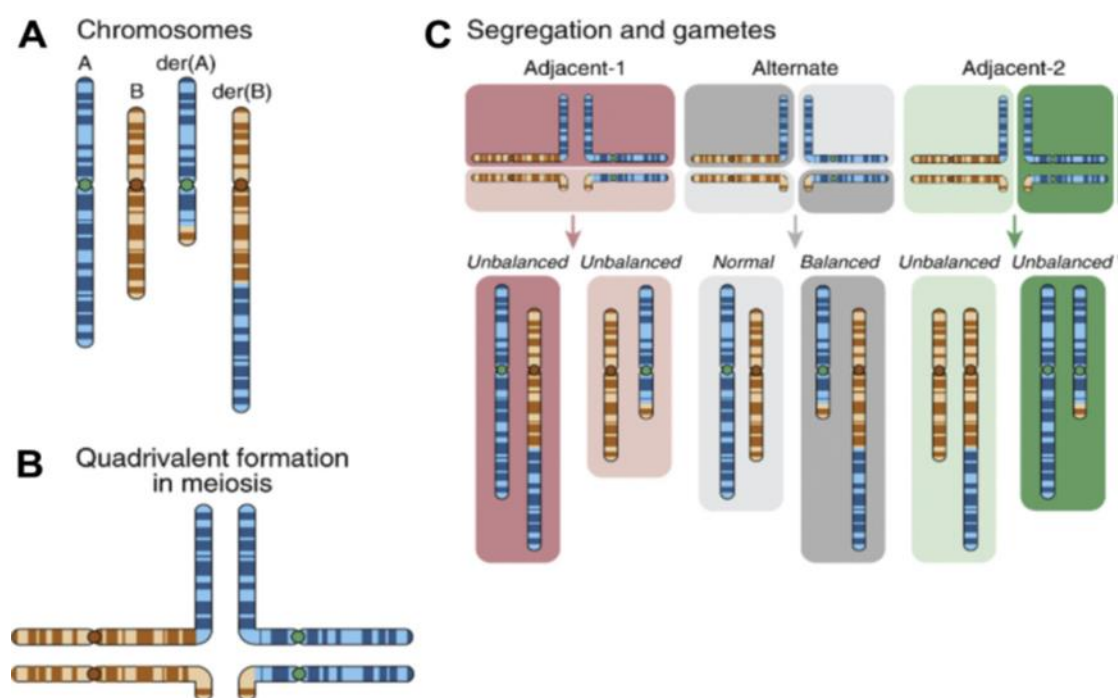
Υπάρχουν διάφοροι τύποι δομικών αναδιατάξεων που σχετίζονται με τις καθ' ἑξιν αποβολές, συμπεριλαμβανομένων των μετατοπίσεων, των αναστροφών, των ενθέσεων και των δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Επισκόπηση των δομικών χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, συμπεριλαμβανομένων των (A) ελλείψεων, (B) διπλασιασμών, (C) περικεντρικών και παρακεντρικών αναστροφών, (D) δακτυλοειδών χρωμοσωμάτων, (E) αμοιβαίων και Ροβερτιανών μετατοπίσεων και (F) ενθέσεων (Kaser, 2018).

Οι αμοιβαίες μεταθέσεις είναι αποτέλεσμα θραύσης μη ομόλογων χρωμοσωμάτων και αμοιβαίας ανταλλαγής των αντίστοιχων χρωμοσωματικών θραυσμάτων. Υπό την προϋπόθεση πως η ανταλλαγή είναι πραγματικά αμοιβαία χωρίς απώλεια ή προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού και πως το σημείο της θραύσης δεν περιλαμβάνει ένα κρίσιμο γονίδιο, συνήθως οι φορείς των αμοιβαίων μεταθέσεων είναι φαινοτυπικά φυσιολογικοί (Nussbaum, McInnes, Willard, Hamosh, & Nussbaum, 2016). Ωστόσο, τα άτομα αυτά διατρέχουν έναν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αποβολών λόγω της παραγωγής μη ισοζυγισμένων γαμετών. Κατά τη διάρκεια της μείωσης, ένας σταυροειδής ή τετρακτινωτός σχηματισμός είναι απαραίτητος για να εξασφαλιστεί η ορθή ευθυγράμμιση των δύο παραγώγων και των δύο φυσιολογικών χρωμοσωμάτων. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο τα μέλη του τετρακτινωτού σχηματισμού διαχωρίζονται στους αντίθετους πόλους (εναλλασσόμενος διαχωρισμός, παρακείμενος διαχωρισμός-1, παρακείμενος διαχωρισμός-2), θα προκύψουν φυσιολογικοί, ισοζυγισμένοι και μη ισοζυγισμένοι

γαμέτες. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, ο εναλλασσόμενος διαχωρισμός παράγει φυσιολογικούς και ισοζυγισμένους γαμέτες, ενώ τα παρακείμενα μοτίβα διαχωρισμού παράγουν πάντα μη ισοζυγισμένους γαμέτες.



Εικόνα 6: (A) Αμοιβαία μετάθεση. (B) Ο τετρακτινωτός σχηματισμός που είναι απαραίτητος για να εξασφαλιστεί η ορθή ευθυγράμμιση των δύο παραγώγων και των δύο φυσιολογικών χρωμοσωμάτων. (C) Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο τα μέλη του τετρακτινωτού σχηματισμού διαχωρίζονται στους αντίθετους πόλους (εναλλασσόμενος διαχωρισμός, παρακείμενος διαχωρισμός-1, παρακείμενος διαχωρισμός-2), θα προκύψουν φυσιολογικοί, ισοζυγισμένοι και μη ισοζυγισμένοι γαμέτες (Kaser, 2018).

Η Ροβερτιανή μετάθεση ή μετάθεση κατά Robertson περιλαμβάνει δύο ακροκεντρικά χρωμοσώματα (13, 14, 15, 21 και 22), τα οποία συντήκονται κοντά στην περιοχή του κεντρομερούς τους, με ταυτόχρονη απώλεια των μικρών βραχιόνων τους. Ο καρύοτυπος που προκύπτει είναι ισοζυγισμένος αλλά έχει μόνο 45 χρωμοσώματα, συμπεριλαμβανομένου και του χρωμοσώματος με τη μετάθεση, που αποτελείται στην πραγματικότητα από τους μεγάλους βραχίονες δύο χρωμοσωμάτων. Επειδή οι μικροί βραχίονες των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων περιλαμβάνουν δορυφορικό DNA και πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA, η απώλεια δύο από αυτούς δεν είναι επιβλαβής (Nussbaum et al., 2016). Αν και ένας φορέας Ροβερτιανής μετάθεσης είναι φαινοτυπικά φυσιολογικός, παρουσιάζει αυξημένο

κίνδυνο να παράγει μη ισοζυγισμένους γαμέτες. Συνεπώς, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για αποβολή του εμβρύου ή γέννηση ζώντος νεογνού με συγγενείς δυσπλασίες ή νοητική υστέρηση (Tur-Torres et al., 2017). Ο κίνδυνος αυτός εξαρτάται από τη συγκεκριμένη Ροβερτιανή μετατόπιση και το φύλο του φορέα. Χαρακτηριστικά, στην περίπτωση της Ροβερτιανής μετάθεσης που περιλαμβάνει το χρωμόσωμα 21, ο κίνδυνος είναι σημαντικά υψηλότερος στην περίπτωση που η μετάθεση είναι μητρικής προέλευσης (Kaser, 2018).

Ανδρικός παράγοντας

Η συνήθης αιτιολογία των καθ' ἑξιν αποβολών τείνει να υποτιμά την επίδραση των γενετικών παραμέτρων του σπέρματος, αλλά ορισμένοι παράγοντες όπως ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων, η απώλεια της οργάνωσης, η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και η χρωμοσωμική ανευπλοειδία, συνδέονται με τις ιδιοπαθείς επαναλαμβανόμενες αποβολές (Zidi-Jrah et al., 2016). Ο κατακερματισμός του σπερματικού DNA είναι ο κύριος ανδρικός παράγοντας που σχετίζεται με την εμφάνιση των καθ' ἑξιν αποβολών και μπορεί να συμβάλλει σε ανεπιτυχή εγκυμοσύνη ακόμα και στην περίπτωση που η ποσότητα, η κινητικότητα και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι φυσιολογική (Bareh et al., 2016). Η συγκεκριμένη βλάβη στο DNA προκαλείται κυρίως από το οξειδωτικό στρες, που οφείλεται στην αύξηση των ελεύθερων ριζών, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την ακεραιότητα του DNA των κυττάρων. Κατά συνέπεια, λόγω της επίδρασης του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και του ρόλου του οξειδωτικού στρες στις ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές, η διαχείριση αυτών των ασθενών με αντιοξειδωτική συμπληρωματική θεραπεία, φαίνεται να συνιστά μία σημαντική στρατηγική για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης γενετικής βλάβης στους γαμέτες (Imam, Shamsi, Kumar, Deka, & Dada, 2011). Επιπροσθέτως, πρόσφατες μελέτες έχουν φανερώσει πως ζευγάρια με ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά ανευπλοειδίας σπέρματος, ακόμα και όταν ο άνδρας παρουσιάζει φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος, όπως μορφολογία και κινητικότητα (Ramasaamy et al., 2015). Ένας ακόμα ανδρικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στην αιτιολογία των ιδιοπαθών καθ' ἑξιν αποβολών, είναι η παρουσία μικροελλείψεων στην περιοχή του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZFa, AZFb και AZFc) στο μακρύ βραχίονα του Y χρωμοσώματος, που είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική σπερματογένεση.

Ανοσολογικοί παράγοντες

Ο ζυγώτης φέρει γενετικό υλικό που κατά το ήμισυ προέρχεται από τον πατέρα και επομένως δρα ως ξένο μόσχευμα που θα μπορούσε να προκαλέσει ανοσολογική αντίδραση απόρριψης. Για το λόγο αυτό, το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας περιέρχεται σε μια κατάσταση “ανοχής” ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη της ημιαλλογενούς εμβρυοπλακουντιακής μονάδας (Svensson-Arvelund et al., 2015). Η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα ενεργοποιεί την ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας με τη βοήθεια των ρυθμιστικών T κυττάρων (regulatory T cells) και των M2 μακροφάγων. Η ανοσολογική απόρριψη του εμβρύου που οφείλεται στην αναγνώριση των πατρικών αντιγόνων από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας και η οποία καταλήγει στην παραγωγή και κινητοποίηση κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος και κυτταροκινών, υποστηρίχθηκε ότι είναι μια από τις αιτίες των ανεξήγητων αποβολών (Laird et al., 2003) Σε άλλες περιπτώσεις, η παρουσία αυτοαντισωμάτων στην κύηση μπορεί να καταλήξει σε επαναλαμβανόμενες αποβολές με χαρακτηριστικό παράδειγμα, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (Heilmann, von Tempelhoff, & Pollow, 2003).

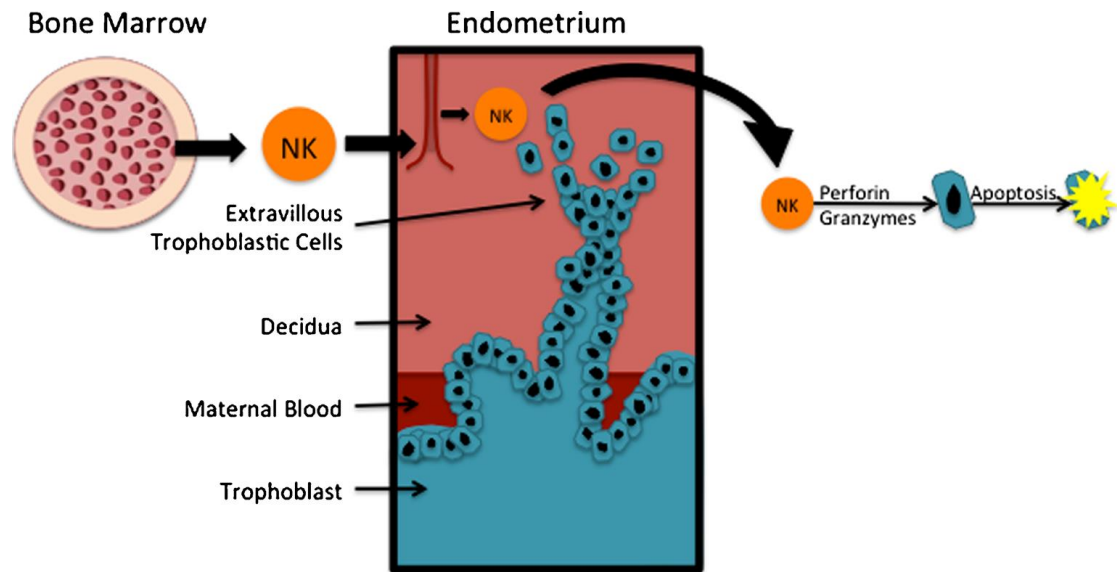
Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και καθ’ ἑξιν αποβολές

Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK cells)

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK κύτταρα), αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο αριθμό λεμφοκυττάρων στη μήτρα (Krieg & Westphal, 2015). Εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης, στο φθαρτό, ως απάντηση στα αντιγόνα της τροφοβλάστης. Τα προερχόμενα από το μυελό των οστών NK κύτταρα μεταναστεύουν στη μήτρα υπό την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης (Εικόνα 7). Τα NK κύτταρα είναι υπεύθυνα για την καταστροφή νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και κυττάρων μολυσμένων από ιούς, μέσω της αναγνώρισης τροποποιημένων πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I). Ειδικότερα, τα NK κύτταρα απελευθερώνουν την λυτική πρωτεΐνη περφορίνη καθώς και πρωτεάσες σερίνης με αποτελέσματα να επάγουν την απόπτωση των εξωλάχιων τροφοβλαστικών κυττάρων-στόχων. Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω της αλληλεπίδρασης με τα ανθρώπινα

λευκοκυτταρικά αντιγόνα HLA-G, HLA-E και HLA-C στην επιφάνεια του πλακούντα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση των HLA-G και HLA-E αντιγόνων από την τροφοβλάστη αναστέλλει τα NK κύτταρα, ενισχύοντας την ανοσολογική ανοχή της μητέρας προς το έμβρυο και ευοδώνοντας την ανάπτυξη του (Blaschitz, Hutter, & Dohr, 2001). Επιπλέον, είναι απαραίτητα για την τροφοβλαστική μετανάστευση και διείσδυση. Τα NK κύτταρα εκκρίνουν επίσης την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) επάγοντας την τοπική αγγείωση και το σχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών που αιματώνουν τη λειτουργική ζώνη του ενδομητρίου (Bansal, 2010; Teles & Zenclussen, 2014). Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα NK κυττάρων ή μη ρυθμισμένα NK κύτταρα, έχουν βρεθεί στη βασική στοιβάδα του ενδομητρίου γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές σε σχέση με γυναίκες που έχουν επιτυχείς κήσεις (Krieg & Westphal, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί πως ο φαινότυπος των NK κυττάρων είναι καθοριστικός τόσο για τη λειτουργικότητα τους όσο και για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος χαρακτηρίζονται από την έκφραση των δεικτών CD56 και CD16 ($CD56^+/CD16^+$) στην επιφάνεια τους. Όταν αυτά τα κύτταρα εγκαθίστανται στο φθαρτό, χάνουν το δείκτη CD16 ($CD56^{bright}/CD16^-$). Μελέτες έχουν δείξει πως ο φαινότυπος $CD56^{bright}$ των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων, ανευρίσκεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στο ενδομήτριο γόνιμων γυναικών με επιτυχείς κήσεις σε αντίθεση με τις γυναίκες που εμφανίζουν καθ' ἑξιν αποβολές. Τα $CD56^{bright}$ NK κύτταρα απελευθερώνουν ένα μεγάλο αριθμό κυτοκινών και εμφανίζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα (Christiansen, 2013). Επίσης, εκφράζουν τους LFA-1 υποδοχείς οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την εξασφάλιση επιτυχούς εμφύτευσης (Kodama, Hara, Okamoto, Kusunoki, & Ohama, 1998). Επιπρόσθετα, γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές εμφανίζουν μία σημαντικά χαμηλότερη αναλογία $CD56^{bright}/CD56^{dim}$ τόσο στο ενδομήτριο όσο και στο περιφερικό αίμα (King, Smith, Chapman, & Sacks, 2010). Τέλος, τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος πιθανώς να αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών καθώς έχει δειχθεί πως παράγουν εμβρυοτοξικά επίπεδα κυτοκινών όταν διεγείρονται από τα τροφοβλαστικά αντιγόνα (Polgar & Hill, 2002).

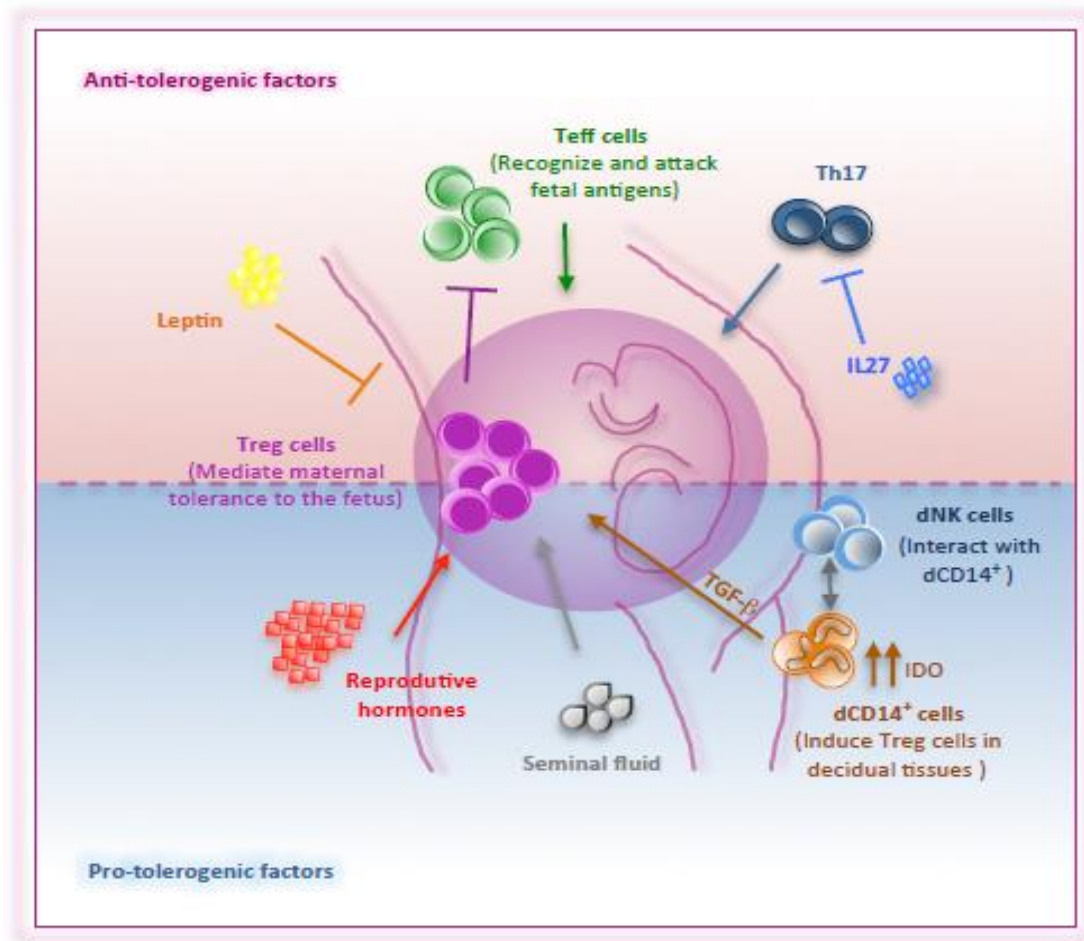


Εικόνα 7: Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK cells) μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στη μήτρα ύστερα από την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Τα NK κύτταρα ανιχνεύουν τροποποιημένες πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I) και επάγουν την απόπτωση των εξωλάχιων τροφοβλαστικών κυττάρων-στόχων (Grimstad & Krieg, 2016).

T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs)

Τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs) και ιδιαίτερα οι υποπληθυσμοί $CD4^+$, $CD25^+$ και $FoxP3^+$, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσιακή ανοχή του κυήματος από την μητέρα. Κατά τα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης ο φθαρτός περιέχει άφθονα $CD4^+$, $CD25^+$ και $FoxP3^+$ T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα. Τα μητρικά T-ρυθμιστικά κύτταρα μεταναστεύουν στο ενδομήτριο υπό την επίδραση των οιστρογόνων και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β -hCG). Στο ενδομήτριο εκφράζουν την ιντερλευκίνη-10 (IL-10) και το μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα-β (TGF- β), οι οποίοι συνιστούν χαρακτηριστικούς μεσολαβητές για την εξασφάλιση της ανοσολογικής ανοχής της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας (Grimstad & Krieg, 2016). Ο πολλαπλασιασμός των Tregs διεγείρεται από τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF). Ο G-CSF έχει θετική επίδραση στην τροφοβλαστική ανάπτυξη και το μεταβολισμό του πλακούντα. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα ασκούν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις, ανοσορυθμιστικές και αγγειορυθμιστικές λειτουργίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση μίας επιτυχούς εμφύτευσης αλλά και για την εξέλιξη μίας υγιούς εγκυμοσύνης (Robertson, Care, & Moldenhauer, 2018). Διάφοροι παράγοντες οι οποίοι

είτε ευοδώνουν είτε εμποδίζουν την ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας ως προς το ημι-αλλογενές έμβρυο, όπως ορισμένες κυτταροκίνες, ορμόνες εγκυμοσύνης, το σπερματικό υγρό και οι πληθυσμοί των NK και CD14⁺ κυττάρων στο φθαρτό, μπορούν να τροποποιήσουν τον αριθμό και τις λειτουργίες των T-ρυθμιστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (La Rocca, Carbone, Longobardi, & Matarese, 2014) (Εικόνα 8). Ωστόσο, ο ανεπαρκής αριθμός των T-ρυθμιστικών κυττάρων αλλά και η διαταραχή της λειτουργικής τους ικανότητας, σχετίζονται με την εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών, επανειλημμένων αποτυχιών εμφύτευσης αλλά και τη εκδήλωση επιπλοκών σε μεταγενέστερο στάδιο της κύησης (Robertson et al., 2018). Πράγματι, αρκετές ερευνητικές μελέτες έχουν φανερώσει πως τα επίπεδα των T-ρυθμιστικών κυττάρων είναι μειωμένα σε σημαντικό βαθμό στο φθαρτό και το περιφερικό αίμα γυναικών με επαναλαμβανόμενες αποβολές (Robertson et al., 2018; Sharma, 2014). Έχει προταθεί πως η μέτρηση των συγκεντρώσεων των Tregs στο περιφερικό αίμα, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως προγνωστικός δείκτης με σκοπό την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης αποβολής, καθότι οι γυναίκες με φυσιολογική κύηση έχουν υψηλότερο αριθμό κυκλοφορούντων T-ρυθμιστικών κυττάρων σε σύγκριση με τις γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές (La Rocca et al., 2014). Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως η θεραπεία των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές με τον παράγοντα διέγερσης του πολλαπλασιασμού (G-CSF) των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων, μπορεί να μειώσει τα ποσοστά εμφάνισης αποβολών και κατ' επέκταση να αυξήσει το ποσοστό επιτυχιών κύσεων (Grimstad & Krieg, 2016).



Εικόνα 8: Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανοσιακή ανοχή του εμβρύου από τη μητέρα (La Rocca et al., 2014).

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα συνιστούν το δεύτερο μεγαλύτερο πληθυσμό λευκοκυττάρων στο ενδομήτριο. Τα κύτταρα αυτά συγκεντρώνονται κοντά στο σημείο εμφύτευσης. Τα μακροφάγα είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης, καθώς εμπλέκονται σε ποικίλες διεργασίες όπως στην αγγειακή αναδιαμόρφωση, την ανοσολογική ανοχή, την ανοσορύθμιση των μητρικών λεμφοκυττάρων του φθαρτού και την έναρξη του τοκετού (Co et al., 2013; Shynlova, Nedd-Roderique, Li, Dorogin, & Lye, 2013). Ακόμα, επάγουν την απόπτωση των κατεστραμμένων κυττάρων, την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων καθώς και την εξάλειψη των εισβαλλόντων παθογόνων (Mor & Abrahams, 2003).

Τα μακροφάγα μπορούν να διακριθούν στους υποτύπους M1 και M2, ανάλογα με το περιβάλλον. Τα M1 μακροφάγα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ενώ τα M2 μακροφάγα προάγουν την ιστική αναδιαμόρφωση και επιδιόρθωση (Colin, Chinetti-Gbaguidi, & Stael, 2014). Κατά τα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης, τα μακροφάγα του φθαρτού πολώνονται προς το M2 υπότυπο προκειμένου να εξασφαλιστεί η ανοσολογική ανοχή (Gustafsson et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, ο M1 υπότυπος των μακροφάγων αυξάνεται σημαντικά και τείνει να διηθεί τα τροφοβλαστικά κύτταρα σε περιπτώσεις καθ' ἑξιν αποβολών καθώς και σε άλλες επιπλοκές της εγκυμοσύνης όπως στην προεκλαμψία (Guenther et al., 2012). Επιπλέον, ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως τα μακροφάγα του φθαρτού επάγουν την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης του παράγοντα FasL. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του FasL στο φθαρτό. Συνεπώς, προτείνεται πως τόσο η διείσδυση των μακροφάγων του φθαρτού στα τροφοβλαστικά κύτταρα όσο και η θανάτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω της επαγόμενης από τα μακροφάγα του φθαρτού Fas/FasL αποπτωτικής οδού, συνιστούν πιθανούς μηχανισμούς εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Μαστοκύτταρα

Τα μαστοκύτταρα αποτελούν μία κατηγορία κυττάρων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πλακουντοποίησης, της ιστικής αναδιαμόρφωσης, του σχηματισμού των σπειροειδών αρτηριών και της αγγειογένεσης. Η δράση τους ρυθμίζεται από την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Τα μαστοκύτταρα εντοπίζονται στην περιφερική κυκλοφορία και στη μήτρα, ενώ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ανευρίσκονται σε υψηλά επίπεδα περιαγγειακά της εμβryo-μητρικής επιφάνειας επαφής (Grimstad & Krieg, 2016a). Πειραματικές μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει πως η έλλειψη των μαστοκυττάρων σχετίζεται με μειωμένα ποσοστά εμφύτευσης λόγω απορρύθμισης της έκφρασης του TGF-β, με ελαττωματικό σχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών καθώς και με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Η γονιμότητα σε αυτά τα πειραματόζωα αποκαταστάθηκε ύστερα από τη χορήγηση μαστοκυττάρων (Woidacki et al., 2013). Συνεπώς, τα πρόσφατα αυτά δεδομένα υποδηλώνουν πως τα

μαστοκύτταρα, ένας κυτταρικός πληθυσμός που έως τώρα συσχετιζόταν κυρίως με τις αλλεργικές αποκρίσεις, αποτελούν ένα νέο ρυθμιστή της εμφύτευσης που θα μπορούσε να εμπλέκεται στην αιτιολογία των επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης και των επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (PMNs)

Τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα είναι προφλεγμονώδη κύτταρα τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιστική αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου και της εμφύτευσης. Στον άνθρωπο, ένας μεγάλος πληθυσμός αυτών των κυττάρων ανευρίσκεται ακριβώς πριν την έναρξη της εμμήνου ρύσεως. Τα κύτταρα αυτά παράγουν ντεφενσίνες προάγοντας την ανάπτυξη ενδομητρίτιδας η οποία αποτελεί έναν ευρέως αποδεκτό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013). Ωστόσο, η διάγνωση της ορισμένες φορές καθίσταται δύσκολη καθότι τυπικά είναι ασυμπτωματική. Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί για τη διάγνωση της ενδομητρίτιδας, αλλά εξέταση εκλογής αποτελεί η βιοψία του ενδομητρίου με σκοπό την ανεύρεση πλασματοκυττάρων στο στρώμα του ενδομητρίου μέσω ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της συνδεκάνης-1 (CD138), ενός δείκτη των πλασματοκυττάρων (Bouet et al., 2016). Η θεραπεία της ενδομητρίτιδας αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά των γεννήσεων ζωντανών βρεφών (McQueen, Bernardi, & Stephenson, 2014). Παρόλα αυτά, υπάρχει έλλειψη ομοφωνίας αναφορικά με τον τύπο των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών, τη δοσολογία αλλά και τη διάρκεια της θεραπείας (Krieg & Westphal, 2015).

Αυτοάνοσα νοσήματα

Η απώλεια της ανοσολογικής ανοχής στα αυτοαντιγόνα καθώς και η αύξηση των φλεγμονωδών αντιδράσεων που χαρακτηρίζει τις αυτοάνοσες παθήσεις, σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά καθ' ἑξιν αποβολών και μειωμένη γονιμότητα σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (Sharif et al., 2018). Συνεπώς, γυναίκες με αυτοάνοσα νοσήματα διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS), αποτελεί την αυτοάνοση διαταραχή η οποία σχετίζεται περισσότερο συχνά με δυσμενή μαιευτικά αποτελέσματα και καθ' έξιν αποβολές (Chighizola, de Jesus, & Branch, 2016). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Graham Hughes το 1983 στο νοσοκομείο Hammersmith (Kemp & Thomas, 2018). Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο συνιστά μία πολυσυστηματική αυτοάνοση νόσο που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις, νοσηρότητα της κύησης και παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPLs) στον ορό. Οι κύριες υποομάδες των aPLs αντισωμάτων είναι τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (ACL), το αντιπηκτικό του λύκου (LA) και τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2GPI) (Kolitz, Shiber, Sharabi, Winder, & Zandman-Goddard, 2019). Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο απαντάται σε ποσοστό 1-5% στο γενικό πληθυσμό και στο 15-20% σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές πρώτου τριμήνου (Kemp & Thomas, 2018).

Οι επανειλημμένες αποβολές στις γυναίκες με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο προκύπτουν από αγγειοπάθεια και τοπική θρόμβωση των αγγείων του πλακούντα, λόγω της αλληλεπίδρασης των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων με πρωτεΐνες σημαντικές για τη ρύθμιση των μηχανισμών πήξης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων με την ανεξίνη V της τροφοβλάστης που έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αντιπηκτικής της δράσης (Amolak S. Bansal, Bajardeen, Shehata, & Thum, 2011). Επιπλέον, τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα μειώνουν το σχηματισμό νέων αγγείων, την παραγωγή του VEGF καθώς και τη δεσμευτική ικανότητα του NF-kB. Συνεπώς, επιδεινώνουν διάφορες πτυχές της αγγειογένεσης συμβάλλοντας στη μη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα και την αποβολή του εμβρύου. Πρόσφατα, μελέτες έχουν δείξει πως τα anti-β2GPI αντισώματα μειώνουν τη μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Τέλος, ελαττώνουν την παραγωγή ορμονών από την τροφοβλάστη οδηγώντας σε πλακουντιακή ανεπάρκεια και τελικά σε αυτόματες αποβολές.

Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος

Οι ενδοκρινικές διαταραχές αποτελούν το 15-20% όλων των περιπτώσεων καθ' έξιν αποβολών. Σε αυτές συγκαταλέγεται η Ανεπάρκεια της Ωχρινικής Φάσης (LPD), το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), ορισμένες παθήσεις του

θυρεοειδούς αδένες, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπερπρολακτιναιμία. Από την άλλη πλευρά, οι ήπιες δυσλειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος δε σχετίζονται με την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αποβολών (Garrido-Gimenez & Alijotas-Reig, 2015).

Ανεπάρκεια της Ωχρινικής Φάσης (LPD)

Η Ανεπάρκεια της Ωχρινικής Φάσης (LPD) αναφέρεται στην ανεπαρκή ποσότητα ενδογενούς προγεστερόνης η οποία είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η εκκριτική λειτουργία του ενδομητρίου και η φυσιολογική εμβρυϊκή εμφύτευση και ανάπτυξη. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τη Jones το 1949 (Jones, 1949). Η ανεπάρκεια της Ωχρινικής Φάσης (LPD) θεωρείται ένας καθοριστικός παράγοντας για την υπογονιμότητα, την πρόωμη απώλεια κύησης καθώς και τις καθ' έξιν αποβολές. Η εμφύτευση του εμβρύου σε ένα ακατάλληλο περιβάλλον θα μπορούσε να εξηγήσει τη συμβολή της συγκεκριμένης ενδοκρinoπάθειας στην εμφάνιση των καθ' έξιν αποβολών. Η συχνότητα εμφάνισης κυμαίνεται μεταξύ 5-10% στις υπογόνιμες γυναίκες και μεταξύ 10-25% σε αυτές με ιστορικό επαναλαμβανόμενων πρώιμων αποβολών (Czyzyk, Podfigurna, Genazzani, & Meczekalski, 2017). Οι πιθανοί μηχανισμοί εμφάνισης της περιλαμβάνουν την ανεπαρκή ανάπτυξη του ωοθυλακίου, την ακανόνιστη ωορρηξία, την ανεπαρκή λειτουργία του ωχρού σωματίου και τη μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης, ή την αναποτελεσματική απόκριση του ενδομητρίου στην εκκρινόμενη προγεστερόνη (Ke, 2014). Οι μηχανισμοί αυτοί δύναται να προκύψουν από ένα ευρύ φάσμα ενδοκρinoπαθειών και συννοσηροτήτων, όπως η υπερπρολακτιναιμία, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός ή το στρες (M. L. Smith & Schust, 2011).

Όπως είναι γνωστό, διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εκτιμηθεί η LPD. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την εκτίμηση της βασικής θερμοκρασίας σώματος, τα κιτ που ανιχνεύουν το κύμα της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) στα ούρα, την εκτίμηση των επιπέδων της προγεστερόνης του ορού και τη βιοψία του ενδομητρίου. Ωστόσο, σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM), από το 2015 δεν υπάρχουν πρακτικά κριτήρια για τη διάγνωση της LPD, καθώς οι προτεινόμενες μέθοδοι δεν είναι απόλυτα αξιόπιστες και ακριβείς για να θέσουν τη διάγνωση (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015). Στις θεραπευτικές μεθόδους που έχουν προταθεί για την

αντιμετώπιση της LPD συγκαταλέγεται η επαγωγή ωορρηξίας, η συμπληρωματική χορήγηση προγεστερόνης, η συμπληρωματική χορήγηση προγεστερόνης και οιστρογόνων καθώς και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (Fox et al., 2017; Ke, 2014). Η συμπληρωματική χορήγηση της προγεστερόνης είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία και φαίνεται πως είναι επωφελής για γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές (El Hachem et al., 2017).

Σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μία κοινή ενδοκρινική διαταραχή η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση των καθ' ἑξίν αποβολών. Μία πληθώρα παραγόντων έχει συνδεθεί με την παθοφυσιολογία των καθ' ἑξίν αποβολών στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης της ινσουλίνης και της υπερινσουλιναιμίας, της υπερανδρογοναιμίας καθώς και της αυξημένης δραστηριότητας του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) (El Hachem et al., 2017). Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η υπερινσουλιναιμία προκαλεί αποβολές αφορά στο γεγονός πως οι αυξημένες συγκεντρώσεις ινσουλίνης είναι υπεύθυνες για τις μειωμένες συγκεντρώσεις της γλυκοδελίνης του ορού και της δεσμευτικής πρωτεΐνης IGFBP-1 που έχουν παρατηρηθεί στο πρώτο τρίμηνο εγκυμοσύνης γυναικών με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Cocksedge, Li, Saravelos, & Metwally, 2008). Η γλυκοδελίνη και η δεσμευτική πρωτεΐνη IGFBP-1 εκκρίνονται από το ενδομήτριο και έχουν καθοριστική σημασία για την εμφύτευση και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η γλυκοδελίνη εμπλέκεται στην πρόιμη πλακουντιακή ανάπτυξη μέσω της τροποποιητικής της δράσης στα ανοσοποιητικά και τροφοβλαστικά κύτταρα. Η δεσμευτική πρωτεΐνη IGFBP-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος ρυθμίζοντας τον έμμηνο κύκλο, την ήβη, την ωορρηξία, τη φθαρτοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου (Kamalanathan, Sahoo, & Sathyapalan, 2013). Η καταστολή της παραγωγής τους δημιουργεί ένα εχθρικό ενδομητρικό περιβάλλον. Η καταστολή αυτή επάγει τη δυσλειτουργία του ενδομητρίου τόσο σε επιθηλιακό όσο και σε στρωματικό επίπεδο κατά της διάρκειας της προεμφυτευτικής περιόδου. Ακόμη, η μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης η οποία προκαλείται από την απενεργοποίηση του υποδοχέα IGF-1, οδηγεί τη βλαστοκύστη σε

απόπτωση καθώς η υπεργλυκαιμία στο υπόβαθρο της αντίστασης στην ινσουλίνη επάγει την έκφραση κασπασών οδηγώντας τελικά στην απόπτωση (Hinck, Thissen, & De Hertogh, 2003).

Επιπλέον, η υψηλή δραστικότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) έχει βρεθεί πως συσχετίζεται με τις καθ' ἑξιν αποβολές και πως είναι σημαντικά αυξημένη στις γυναίκες με PCOS ανεξάρτητα από το BMI. Η δραστικότητα του PAI-1 αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για αποβολές, πιθανώς λόγω διαταραχής της ινωδόλυσης η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του πλακούντα μέσω της αυξημένης θρόμβωσης της πλακουντιακής κοίτης (Kamalanathan et al., 2013). Οι επιδράσεις των αυξημένων επιπέδων του PAI-1 μπορεί επίσης να επιδεινώνονται από την αυξημένη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης, προκαλώντας τελικά θρόμβωση.

Η υπερανδρογοναιμία συνιστά μία ακόμα πιθανή αιτία για την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών σε γυναίκες με PCOS. Μελέτες έχουν δείξει την παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων τεστοστερόνης σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές με ή χωρίς PCOS σε σχέση με γόνιμες γυναίκες. Τα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα γεγονός το οποίο μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη του ενδομητρίου και την εμφύτευση. Η πτωχή αναπαραγωγική ικανότητα που παρατηρείται σε γυναίκες με PCOS μπορεί να οφείλεται τόσο στα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων του ορού όσο και στον αυξημένο αριθμό των ανδρογονικών υποδοχέων στο ενδομήτριο (Apparao, Lovely, Gui, Lininger, & Lessey, 2002). Τα στεροειδή του φύλου ρυθμίζουν τη δεκτικότητα της μήτρας για την εμφύτευση του εμβρύου ελέγχοντας την έκφραση του γονιδίου HOXA10 το οποίο ρυθμίζεται χωρικά και χρονικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών μειώνουν την έκφραση του γονιδίου HOXA10 με αποτέλεσμα να καθιστούν τη μήτρα λιγότερο δεκτική στην εμφύτευση του εμβρύου.

Παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος

Υπερθυρεοειδισμός

Η επίπτωση του υπερθυρεοειδισμού στην εγκυμοσύνη υπολογίζεται πως είναι περίπου 0,2%. Οι περισσότερες γυναίκες έχουν συμπτώματα πριν την εγκυμοσύνη ενώ

άλλες εκδηλώνουν τη νόσο για πρώτη φορά κατά την περίοδο αυτή. Η συχνότερη αιτία είναι η νόσος Grave's η οποία είναι υπεύθυνη για το 85-90% των περιπτώσεων. Η κλινική εικόνα μπορεί να μην είναι διαφωτιστική, καθώς εκδηλώσεις όπως ταχυκαρδία, εφίδρωση, δύσπνοια, ευερεθιστότητα και συστολικό φύσημα στην καρδιά παρατηρούνται και φυσιολογικά κατά την κύηση. Ο ρόλος του υπερθυρεοειδισμού στην παθογένεια των καθ' ἑξίν αποβολών έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό κατά τις προηγούμενες δεκαετίες και οι έρευνες τον συσχετίζουν κυρίως με την πρόκληση προεκλαμψίας αλλά και με την πρόκληση θρομβοφιλικής κατάστασης. Η σύγχρονη σχετική βιβλιογραφία είναι σχετικά ελλιπής, ωστόσο τονίζεται η ανάγκη καλής ρύθμισης και σωστής παρακολούθησης της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος τόσο πριν την σύλληψη όσο και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για να επιτευχθεί μία όσο το δυνατόν ομαλότερη έκβαση αυτής.

Υποθυρεοειδισμός

Η επίπτωση του υποθυρεοειδισμού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης εκτιμάται περί το 2,5%. Σε περιοχές με ένδεια ιωδίου, οι ανωμαλίες του θυρεοειδούς είναι συχνότερες. Οι περισσότερες ασθενείς είναι ασυμπτωματικές αλλά έχουν αυξημένα επίπεδα TSH στον ορό. Ο υποθυρεοειδισμός είναι γνωστός παράγοντας υπογονιμότητας, υπέρτασης της κύησης και πρόωρης αποκόλλησης του πλακούντα που οδηγούν σε υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη και καθυστέρηση της νοητικής ανάπτυξης του εμβρύου και συνεπώς αυξημένο κίνδυνο αποβολών.

Αντιθυρεοειδικά αντισώματα

Τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα έχουν προταθεί ως ένας πιθανός αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης επανειλημμένων αποβολών σε ευθυρεοειδικές γυναίκες. Οι έρευνες δείχνουν αυξημένη συχνότητα αποβολών ανάμεσα σε γυναίκες με αυτοαντισώματα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αυξημένη συχνότητα ανεύρεσης αυτοαντισωμάτων ανάμεσα στις γυναίκες που απέβαλαν σε σχέση με αυτές που περάτωσαν την εγκυμοσύνη τους, αυξημένα επίπεδα TSH στις ευθυρεοειδικές γυναίκες με αυτοαντισώματα και σημαντική αύξηση του όγκου του θυρεοειδούς αδένος στις θετικές γυναίκες, παρά τα φυσιολογικά επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών. Ωστόσο,

περισσότερες μελέτες πρέπει να διεξαχθούν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση του συγκεκριμένου παράγοντα με την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών.

Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης και οι διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης συνιστούν συχνές ενδοκρινικές παθήσεις που σχετίζονται με τις καθ' ἑξιν αποβολές. Οι έγκυες ινσουλινοεξαρτώμενες διαβητικές γυναίκες με πτωχό μεταβολικό έλεγχο έχουν ένα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση αποβολών πρώτου τριμήνου. Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών έχουν αυξημένο κίνδυνο για αντίσταση στην ινσουλίνη κατά το πρώτο τρίμηνο. Αυτό οδηγεί σε υπεργλυκαιμία που σχετίζεται με αποβολές σε διαβητικές και μη διαβητικές γυναίκες (Garrido-Gimenez & Alijotas-Reig, 2015). Οι ασθενείς που πάσχουν από αυτή την κλινική κατάσταση διατρέχουν ένα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για αυτόματες αποβολές, πρόωρο τοκετό, υπερτασικές και λειτουργικές διαταραχές. Η κύρια υποκείμενη αιτία είναι οι θανατηφόρες εμβρυϊκές δυσπλασίες, η συχνότητα των οποίων αυξάνεται στην περίπτωση του μη ελεγχόμενου διαβήτη κατά τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης (Gutaj, Zawiejska, Wender-Ozegowska, & Brazert, 2013). Η γλυκόζη έχει τερατογόνο δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις και τα ποσοστά συγγενών εμβρυϊκών ανωμαλιών σχετίζονται άμεσα με το γλυκαιμικό έλεγχο στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Πρόσφατα δεδομένα φανερώνουν πως έγκυες γυναίκες με καλά ελεγχόμενο διαβήτη δε διατρέχουν κίνδυνο για την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών και πως η προσοχή θα πρέπει πρώτα να δοθεί στο βέλτιστο μεταβολικό έλεγχο διαβητικών γυναικών στα πρώτα στάδια της κύησης (Pluchino et al., 2014).

Υπερπρολακτιναιμία

Η προλακτίνη συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από τα λακτοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, καθώς και από το μαστικό αδένα, τον πλακούντα, τη μήτρα και τα T-λεμφοκύτταρα. Συνιστά μία κύρια πολυπεπτιδική ορμόνη η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση των ορμονών του αναπαραγωγικού συστήματος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η υπερπρολακτιναιμία σχετίζεται με αναπαραγωγική αποτυχία, συμπεριλαμβανομένων

των πρώιμων και όψιμων αποβολών (Alijotas-Reig & Garrido-Gimenez, 2013). Η υπερπρολακτιναιμία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανώμαλα υψηλών επιπέδων προκακτίνης στην κυκλοφορία, τα οποία στην περίπτωση των γυναικών υπερβαίνουν τα 25 μg/L ή 530 mIU/L (H. Chen, Fu, & Huang, 2016). Στην αιτιολογία της συγκαταλέγεται η φυσιολογική υπερέκκριση όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή του θηλασμού, η επαγόμενη από φάρμακα υπερέκκριση, η αυξημένη έκκριση από την υπόφυση λόγω ενός προλακτινώματος καθώς και συστηματικές ή ενδοκρινικές διαταραχές όπως η νεφρική ανεπάρκεια, η ηπατική ανεπάρκεια, ο πρωτοπαθής υποθυρεοειδισμός και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) (glezer 2014). Όταν καμία αιτία δε μπορεί να βρεθεί χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής (Majumdar 2013).

Κλινικές παρατηρήσεις καταδεικνύουν πως οι συγκεντρώσεις της προλακτίνης είναι σημαντικά αυξημένες σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές στις οποίες δεν υπάρχει κάποια άλλη εμφανής αιτία για τις αποβολές. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι πως τα υψηλά επίπεδα προλακτίνης επηρεάζουν τη λειτουργία των ωοθηκών, οδηγώντας σε ανεπάρκεια της ωχρινικής φάσης (LPD) και τελικά σε αποβολές. Συγκεκριμένα, οι υψηλές συγκεντρώσεις PRL στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των ωοθηλακικών κυττάρων αναστέλλουν την έκκριση της προγεστερόνης οδηγώντας σε LPD.

Θρομβοφιλικό παράγοντες

Η κληρονομική θρομβοφιλία αποτελεί διαταραχή πήξης του αίματος η οποία αυξάνει τον κίνδυνο για φλεβική θρομβοεμβολή. Οι αιτίες της κληρονομικής θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν μία ομάδα αυστηρά κληρονομούμενων διαταραχών από ποικίλες γενετικές βλάβες, όπως την ανεπάρκεια των φυσικών αντιπηκτικών (αντιθρομβίνης, πρωτεΐνης C και πρωτεΐνης S), τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden (FVL G1691A), τη μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης (PT G20210A) και μία δεύτερη ομάδα με πολυπαραγοντικές και τουλάχιστον εν μέρει κληρονομούμενες διαταραχές, όπως τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII (FVIII) και η υπερομοκυστεϊναιμία (Coppens, Kaandorp, & Middeldorp, 2006). Η εγκυμοσύνη είναι μία γνωστή προθρομβωτική κατάσταση, αλλά ο αντίκτυπος της κληρονομικής θρομβοφιλίας στις καθ' έξιν αποβολές παραμένει αμφιλεγόμενος. Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των καθ' έξιν αποβολών και της κληρονομικής θρομβοφιλίας βασίζεται στο ότι

η διαταραχή στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του πλακούντα λόγω μίας προηγηθείσας φλεβικής ή/και αρτηριακής θρόμβωσης, θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποβολή του εμβρύου. Με βάση μελέτες που έχουν δείξει πως το μητρικό αίμα αρχίζει να ρέει εντός των μεσολάχιων χώρων του πλακούντα περίπου στις 10 εβδομάδες κύησης, η σύνδεση μεταξύ της θρομβοφιλίας και των αποβολών έχει μεγαλύτερη πιθανότητα μετά τις 10 εβδομάδες κύησης σε σχέση με εκείνες που εμφανίζονται πριν τις 10 εβδομάδες κύησης. Ωστόσο, δεδομένου ότι η μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από το μητρικό αίμα στους εμβρυϊκούς ιστούς εξαρτάται από την αιματική ροή της μήτρας και συνεπώς μπορεί να επηρεαστεί από θρομβωτικά συμβάντα που συμβαίνουν εκεί, προτείνεται ένα ρόλος των θρομβοφιλιών στις αποβολές ανεξάρτητα από την ηλικία κύησης (Ford & Schust, 2009).

Οι υπερπηκτικές καταστάσεις επηρεάζουν την εγκυμοσύνη σε όλα τα στάδια έχοντας ως συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας θρόμβων, τις αποβολές, την προεκλαμψία, τον περιορισμό της ενδομήτριας ανάπτυξης, την αποκόλληση του πλακούντα και τη θνησιγένεια. Ο παράγοντας V Leiden και η αντι-πρωτεΐνη C επηρεάζουν την εγκυμοσύνη. Η μετάλλαξη Leiden του γονιδίου του παράγοντα V της πήξης μπορεί να οδηγήσει στην αντίσταση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C η οποία αποτελεί βασικό συστατικό στην αντιπηκτική οδό που αποτρέπει τη δράση των παραγόντων πήξης V και VIII. Η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C οδηγεί σε υπερπηκτική κατάσταση. Γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές έχουν υψηλότερα ποσοστά αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Σε γενικές γραμμές, οι γυναίκες με ανεξήγητες επανειλημμένες αποβολές ή άλλες επιπλοκές στην εγκυμοσύνη που σχετίζονται με θρόμβωση ή ανεπάρκεια του πλακούντα μπορεί να επωφεληθούν από τον έλεγχο για κληρονομική θρομβοφιλία. Τέλος, η κατάλληλη θεραπεία τόσο για τις κληρονομικές όσο και για τις επίκτητες θρομβοφιλίες πρέπει να ακολουθηθεί ύστερα από τη διάγνωση της συγκεκριμένης διαταραχής. Η θεραπεία είναι ειδική για την εκάστοτε διαταραχή και περιλαμβάνει τη συμπληρωματική χορήγηση φυλλικού οξέος για τις γυναίκες με υπερομοκυστεϊναιμία, την προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή σε περιπτώσεις μεμονωμένων θρομβωτικών συμβάντων χωρίς ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό θρομβωτικών επιπλοκών καθώς και τη θεραπευτική αντιπηκτική αγωγή σε συνδυασμένες θρομβοφιλικές διαταραχές.

Λοιμώδεις παράγοντες

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος μπορούν να διαδραματίσουν έναν αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση πρόωρου τοκετού, την πρόωρη ρήξη υμένων αλλά και τις αποβολές. Η κυριότερη οδός των ενδοαμνιακών λοιμώξεων είναι η ανιούσα οδός και εμπλέκεται τόσο η λοίμωξη του κατώτερου όσο και του ανώτερου γεννητικού συστήματος (Soper, Mayhall, & Dalton, 1989). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν: (i) την παραγωγή τοξινών ή κυτταροκινών οι οποίες προκαλούν συσπάσεις της μήτρας και βλάπτουν την εμβρυοπλακουντιακή μονάδα (ii) την εμβρυϊκή λοίμωξη, η οποία θα προκαλέσει τον θάνατο του εμβρύου ή την εμφάνιση δυσπλασιών (iii) την πλακουντιακή λοίμωξη με επακόλουθη την ανεπάρκεια του πλακούντα και τον εμβρυϊκό θάνατο (iv) τη χρόνια ενδομητρίτιδα που παρεμβαίνει στην εμφύτευση του εμβρύου και (v) την αμνιονίτιδα η οποία προκαλεί αποβολές πρώτου τριμήνου καθώς και πρόωρο τοκετό στο τρίτο τρίμηνο της κύησης.

Οι λοιμώξεις από συγκεκριμένα βακτήρια έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση καθ' ἑξίν αποβολών. Η φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου αποτελείται ως επί το πλείστον από γαλακτοβακίλλους (*Lactobacillus*) οι οποίοι μεταβολίζουν το γλυκογόνο σε γαλακτικό οξύ, καθιστώντας το pH του κόλπου όξινο. Το όξινο περιβάλλον μειώνει την εμφάνιση παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν κολπίτιδες. Η βακτηριακή κολπίτιδα χαρακτηρίζεται από την υπερανάπτυξη εντός του κόλπου κυρίως αναερόβιων βακτηρίων όπως του *Gardnerella vaginalis* και την ταυτόχρονη μείωση ή απουσία των γαλακτοβακίλλων (Nigro et al., 2011). Η βακτηριακή κολπίτιδα κυμαίνεται στις εγκύους σε ένα ποσοστό 13-31% και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καθ' ἑξίν αποβολών. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές πάσχουν από λοιμώξεις από το βακτήριο *Gardnerella vaginalis* και gram αρνητικά αναερόβια βακτήρια. Αυτό πιθανώς να υποδηλώνει μία συσχέτιση μεταξύ του κολπικού μικροβιώματος, της τοπικής φλεγμονής, των αλλαγών των ανοσολογικών παραμέτρων και των αποβολών. Τα μυκοπλάσματα των γεννητικών οργάνων *Ureoplasma urealyticum* και *Mycoplasma hominis*, εμφανίζονται συχνά στο αμνιακό υγρό των γυναικών με πρόωρο τοκετό ή πρόωρη ρήξη υμένων και συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αποβολών. Μελέτες έχουν δείξει πως ο αποικισμός του ενδομήτριου από το *U. urealyticum* είναι περισσότερο συχνός σε γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες (Naessens, Foulon, Cammu, Goossens, & Lauwers, 1987). Επιπλέον, τα μυκοπλάσματα μπορούν να

προκαλέσουν ενδομητρίτιδα η οποία συνιστά ένα γνωστό αιτιολογικό παράγοντα εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αποβολών (McQueen, Perfetto, Hazard, & Lathi, 2015).

Αναφορικά με τη λοίμωξη από το βακτήριο *Chlamydia trachomatis*, που αποτελεί ένα από τα συνηθέστερα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, ορολογικές μελέτες έχουν προτείνει την ύπαρξη μίας πιθανής συσχέτισης μεταξύ αυτής της βακτηριακής λοίμωξης και των καθ' ἑξίν αποβολών. Ειδικότερα, μία εμμένουσα χλαμυδιακή λοίμωξη δύναται να αυξήσει την πιθανότητα αποβολής λόγω της μόλυνσης του εμβρύου ή της διέγερσης φλεγμονώδους αντίδρασης από το έμβρυο. Ακόμα, η χλαμυδιακή λοίμωξη θα μπορούσε να οδηγήσει στην αποβολή του εμβρύου μέσω μίας εκτεταμένης μητρικής ανοσολογικής αντίδρασης προς τη βακτηριακή θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη HSP60 (Nigro et al., 2011).

Οι ιοί συγκαταλέγονται στα παθογόνα που συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με μία πιθανή αποβολή, προκαλώντας εμβρυϊκή λοίμωξη και θάνατο μέσω της διαπλακουντιακής ή της ανιούσας οδού. Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) ο οποίος μπορεί να προκαλέσει μία χρόνια ή επαναλαμβανόμενη μητρική λοίμωξη και εμφανίζει υψηλό τροπισμό προς το βλεννογόνο του τραχήλου, είναι ο πλέον εμπλεκόμενος ιός στην εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αποβολών. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο κυτταρομεγαλοϊός μπορεί να φτάσει στον πλακούντα από τον τράχηλο ή από ιαμία που ακολουθεί μία πρωτογενή ή επαναλαμβανόμενη μητρική λοίμωξη, με επακόλουθη αγγειακή ανεπάρκεια, ιστική βλάβη και μετάδοση του ιού στο έμβρυο (Yamamoto-Tabata, McDonagh, Chang, Fisher, & Pereira, 2004). Ιοί όπως ο CMV απενεργοποιούν τα μόρια της κυτταροτροφοβλάστης όπως την ιντεγκρίνη α1β1 και τις μητρικές μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), που είναι απαραίτητες για τη διεύθυνση του πλακούντα στη μήτρα αλλά και την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ακόμα, η αλληλεπίδραση του CMV με τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK) του φθαρτού, μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίησή τους και τελικά τον εμβρυϊκό θάνατο (Tanaka et al., 2006).

Ο παρβοϊός B19 (parvovirus B19) αποτελεί το παθογόνο που εμπλέκεται περισσότερο συχνά στην απώλεια του εμβρύου και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει σχετιστεί με την εμφάνιση καθ' ἑξίν αποβολών. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος για έμβρυα που μολύνθηκαν από τον συγκεκριμένο ιό μεταξύ της 10^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας κύησης, καθώς ο παρβοϊός B19 αναστέλλει την ερυθροποίηση και προκαλεί μη άνοσο

εμβρυϊκό ύδρωπα (Skjöldebrand-Sparre, Fridell, Nyman, & Wahren, 1996). Ένας ακόμη ιός που σχετίζεται με την εμφάνιση επανειλημμένων αποβολών και ανήκει στην οικογένεια των παρβοϊών είναι ο αδενο-εξαρτώμενος ιός (AAV). Από την άλλη πλευρά, ο ιός της ανεμοβλογιάς-έρπητα ζωστήρα (VZV), ο ιός Epstein-Barr και ο ανθρώπινος ερπητοϊός-6 σχετίζονται κυρίως με σποραδικές και όχι επαναλαμβανόμενες αποβολές (Nigro et al., 2011).

Συνήθειες και τρόπος ζωής

Αξίζει να σημειωθεί πως πέραν των παραγόντων που αναφέρθηκαν προηγουμένως ως αιτιολογικοί παράγοντες εμφάνισης των καθ' έξιν αποβολών, ο τρόπος ζωής και ορισμένες συνήθειες έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο αποβολής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση καφεΐνης, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η κοκαΐνη. Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ δε συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επανειλημμένων αποβολών. Κατ' επέκταση, ένας υγιεινός τρόπος ζωής με ελάχιστη έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες θα πρέπει να συνίσταται σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές (El Hachem et al., 2017).

Κεφάλαιο 3

Η έννοια του Γενετικού πολυμορφισμού

Η κλασική μεντελική θεώρηση του γονιδιώματος χαρακτηρίζει τα αλληλόμορφα των γονιδίων είτε ως αγρίου τύπου είτε ως μεταλλαγμένα. Στην πορεία αναγνωρίστηκε η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων για κάθε γονίδιο, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική επίδραση στο φαινότυπο. Η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου αναφέρεται ως γενετικός πολυμορφισμός. Κάθε τόπος για τον οποίο υπάρχουν πολλαπλά αλληλόμορφα σε σταθερές συχνότητες μέσα στον πληθυσμό είναι εξ ορισμού πολυμορφικός. Συνήθως, ένα αλληλόμορφο θεωρείται πολυμορφικό εάν απαντάται στον πληθυσμό σε συχνότητα $>1\%$.

Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα είναι επίσης πολυμορφικά, όμως στην περίπτωση αυτή αλλοιώνεται η λειτουργία της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο και συνεπώς μεταβάλλεται ο φαινότυπος. Μάλιστα, μολονότι δε γίνεται άμεσα αντιληπτό από το φαινότυπο, ακόμα και τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου μπορεί να είναι πολυμορφικά. Διαφορετικές παραλλαγές ενός αλληλομόρφου αγρίου τύπου μπορεί να διακριθούν μεταξύ τους από διαφορές στην αλληλουχία τους. Αυτές ωστόσο δεν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του αλληλομόρφου και κατά συνέπεια δεν οδηγούν σε φαινοτυπικές αλλαγές. Ένας πληθυσμός μπορεί να εμφανίζει εκτεταμένο πολυμορφισμό στο επίπεδο του γονοτύπου. Σε κάθε γενετικό τόπο είναι δυνατόν να υπάρχουν πολλές διαφορετικές παραλλαγές της αλληλουχίας. Μερικές από αυτές μπορεί να είναι προφανείς, επειδή επηρεάζουν το φαινότυπο, ενώ άλλες μπορεί να είναι κρυφές, χωρίς παρατηρήσιμες συνέπειες.

Υπάρχουν πολλοί τύποι πολυμορφισμών. Κάποιοι πολυμορφισμοί οφείλονται σε παραλλαγές που προκύπτουν από ελλείμματα, διπλασιασμούς, τριπλασιασμούς κ.ο.κ εκατοντάδων έως εκατομμυρίων ζευγών βάσεων του DNA και δε σχετίζονται με κάποιο παθολογικό φαινότυπο. Άλλες αλλοιώσεις παρόμοιου μεγέθους αποτελούν σπάνιες παραλλαγές, οι οποίες είναι εμφανώς υπεύθυνες για κάποιο σοβαρό νόσημα. Επίσης, οι πολυμορφισμοί μπορεί να είναι αλλαγές μίας ή λίγων μόνο βάσεων στο DNA, που εντοπίζονται μεταξύ των γονιδίων ή εντός των ιντρονίων, χωρίς να έχουν κάποια επίδραση στη λειτουργικότητα του γονιδίου και μπορούν να ανιχνευτούν μόνο

με άμεση ανάλυση του DNA. Επιπλέον, αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι δυνατόν να εντοπίζονται εντός της κωδικής περιοχής γονιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνικών παραλλαγών, οι οποίες μπορεί να συνεπάγονται την εκδήλωση διακριτών φαινοτύπων. Τέλος, αλλαγές μπορεί να συμβούν εντός των ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων επηρεάζοντας ενδεχομένως τη μεταγραφή ή τη σταθερότητα του μεταγράφου mRNA και κατά συνέπεια το φαινότυπο.

Ο τεράστιος όγκος πληροφοριών, σε σχέση με την αλληλουχία DNA πολλών εκατοντάδων ατόμων από διάφορες περιοχές της γης, που αποκτήθηκαν χάρη στο Πρόγραμμα Χαρτογράφησης του Γονιδιώματος του Ανθρώπου, έχει προσφέρει τις αναγκαίες πληροφορίες για το χαρακτηρισμό των τύπων και των συχνοτήτων των πολυμορφικών παραλλαγών της αλληλουχίας του γονιδιωματικού DNA του ανθρώπου. Ως αποτέλεσμα, έχουν αρχίσει να δημιουργούνται κατάλογοι της ποικιλότητας της αλληλουχίας DNA του ανθρώπου. Οι πολυμορφισμοί του DNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον τρόπο που διαφέρει η αλληλουχία μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων (Πίνακας 2). Οι πιο απλοί και πιο συχνοί πολυμορφισμοί είναι οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Ένας πολυμορφισμός καλείται μονονουκλεοτιδικός (SNP) όταν τα αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο. Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου μία ανά 1.330 βάσεις. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό πρότυπο SNP. Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου μπορούν να προσδιοριστούν με διάφορους τρόπους, όπως με απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, με φασματοσκοπία μάζας, ή βιοχημικές μεθόδους που ανιχνεύουν διαφορές σε πολυμορφικές θέσεις εντός μίας συγκεκριμένης περιοχής. Ο συνολικός αριθμός των μονονουκλεοτιδικών παραλλαγών μεταξύ όλων των ανθρώπων είναι πολύ μεγαλύτερος και εκτιμάται πως ξεπερνά τα 10.000.000, αν και αυτός ο αριθμός αποτελεί πιθανότατα υποεκτίμηση καθώς δεν είναι ακόμα διαθέσιμος ο πλήρης κατάλογος των παραλλαγών, ιδιαίτερα των σπανίων, όλων των πληθυσμιακών ομάδων της υφηγίου. Πολλά εκατομμύρια SNPs, έχουν ταυτοποιηθεί και κατηγοριοποιηθεί σε διάφορους πληθυσμούς. Μία υποομάδα, που περιλαμβάνει περίπου το 10% των πιο συχνών SNPs, έχουν επιλεγεί και χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για τη δημιουργία ενός λεπτομερούς χάρτη του γονιδιώματος του ανθρώπου, που είναι γνωστός ως χάρτης απλοτύπων (HapMap).

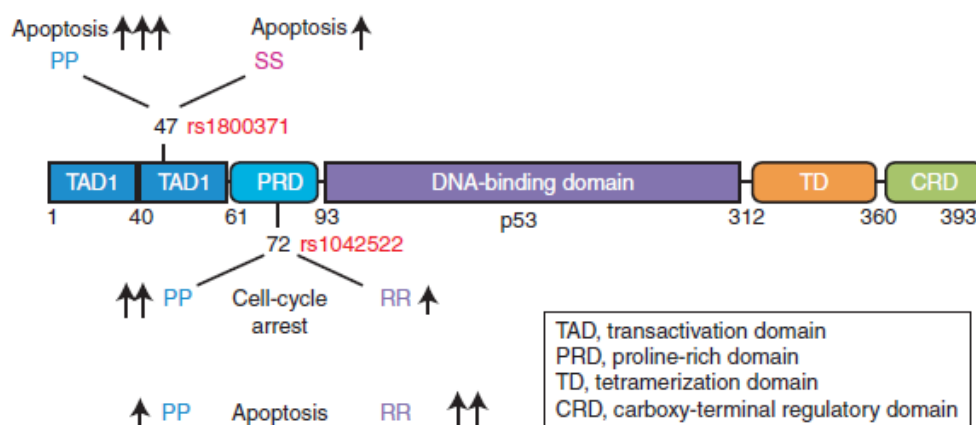
Σήμερα, αντικείμενο μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της σημασίας της πλειονότητας των πολυμορφισμών SNPs στην κατάσταση υγείας. Το γεγονός ότι οι SNPs είναι συχνοί δε σημαίνει πως είναι ουδέτεροι χωρίς καμία επίδραση στην υγεία ή τη μακροζωία. Η μεγάλη συχνότητα τους υποδηλώνει ότι οποιαδήποτε επίδραση τους στην κατάσταση της υγείας θα πρέπει να είναι μία μικρή αλλαγή στην προδιάθεση για την εκδήλωση ενός νοσήματος και ότι δεν αποτελούν την άμεση αιτία μίας σοβαρής νόσου. Οι πολυμορφισμοί αποτελούν τη βάση για τις συνεχιζόμενες προσπάθειες παροχής εξατομικευμένης ιατρικής περίθαλψης που στηρίζεται στο γενετικό υπόβαθρο των ασθενών.

Πολυμορφισμός	Βάση του πολυμορφισμού	Αριθμός αλληλομόρφων
SNP	Αντικατάσταση της μίας εκ των δύο βάσεων σε μία θέση στο γονιδίωμα	2
Πολυμορφισμοί ένθεσης/ελλείμματος		
❖ Απλός	Παρουσία ή απουσία ενός τμήματος DNA μικρού μήκους	2
❖ STRP	~5-25 διαδοχικά αντίγραφα ενός δι-, τρι- ή τετρανουκλεοτιδίου	5 ή περισσότερα
❖ VNTR	Εκατοντάδες έως χιλιάδες διαδοχικά αντίγραφα μίας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας μήκους 10-100 νουκλεοτιδίων	5 ή περισσότερα
CNP	Κατά κανόνα, παρουσία ή απουσία τμημάτων DNA μήκους 200bp έως 1,5 Mb, αν και μπορεί να παρατηρηθεί και εν σειρά διπλασιασμός 2,3,4 ή και περισσότερων αντιγράφων	2 έως λίγα

Πίνακας 2: Τύποι πολυμορφισμών DNA. SNP: μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, STRP: πολυμορφισμός βραχέων εν σειρά επαναλήψεων. VNTR: ποικίλος αριθμός εν σειρά επαναλήψεων. CNP: πολυμορφισμός αριθμού αντιγράφων.

Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro)

Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου Arg72Pro (rs 1042522) συνιστά τον συχνότερα αναφερόμενο πολυμορφισμό στο γονίδιο TP53. Ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 βρίσκεται στο εξόνιο 4 και αποτελεί μία G/C παραλλαγή η οποία οδηγεί στην εμφάνιση στην παραγόμενη πρωτεΐνη είτε του αμινοξέος αργινίνη (Arg, CGC) είτε του αμινοξέος προλίνη (Pro, CCC) (G. J. Matlashewski et al., 1987). Ο πολυμορφισμός Arg72Pro βρίσκεται στην περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD) (Εικόνα 9), η οποία διαδραματίζει ένα θεμελιώδη ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης ως απόκριση σε συνθήκες στρες (Basu & Murphy, 2016). Οι δύο παραλλαγές (R72 ή P72) που προκύπτουν έχουν διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες με αποτέλεσμα να μπορούν να τροποποιούν τα επίπεδα ή τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 9: Οι λειτουργικές περιοχές της p53 και η θέση των αντίστοιχων SNPs. Ο πολυμορφισμός Arg72Pro εμφανίζεται στην PRD περιοχή. Τα βέλη αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα της απόπτωσης και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου που επάγονται από κάθε παραλλαγή (Basu & Murphy, 2016).

Το αρχικό ενδιαφέρον για την PRD περιοχή και τον πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 72, επικεντρώθηκε ύστερα από μελέτες που έδειξαν πως ο πολυμορφισμός αυτός θα μπορούσε να επηρεάσει την ευαισθησία της πρωτεΐνης p53 στην αποικοδόμηση της μέσω του μηχανισμού πρωτεόλυσης μέσω της ουβικουτίνης, από την Ε6 πρωτεΐνη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Οι μελέτες αυτές έδειξαν πως η R72 παραλλαγή ήταν περισσότερο ευάλωτη στην αποικοδόμηση σε σχέση με

την P72 παραλλαγή (Storey et al., 1998). Μετέπειτα, περαιτέρω επιδημιολογικές μελέτες φανέρωσαν πως διαφορές λόγω του πολυμορφισμού Arg72Pro θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία ενός ατόμου για την εμφάνιση διαφορετικών καρκινικών όγκων, είτε σχετίζονταν με τον ιό HPV είτε όχι (Boltze et al., 2002; Papadakis, Soultzizis, & Spandidos, 2002). Επιπρόσθετα, οι βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες της p53 που επηρεάζονται από τον πολυμορφισμό Arg72Pro είναι ιδιαίτερα σαφείς. Διαφορές κατά τη μετανάστευση της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια SDS ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, έδειξαν πως αυτός ο πολυμορφισμός έχει μία προφανή επίδραση στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης (G. J. Matlashewski et al., 1987).

Αργότερα, αποδείχθηκε πως η ικανότητα της πρωτεΐνης p53 να αλληλεπιδρά με τους σχετιζόμενους με τον TFIID παράγοντες TAFII32 και TAFII70, είναι περισσότερο ισχυρή για την R72 παραλλαγή σε σχέση με την P72 (Thomas et al., 1999). Καθότι αυτή η αλληλεπίδραση της p53 με τους TAFII32 και TAFII70 παράγοντες είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική της ικανότητα, αυτό υποδηλώνει πως η R72 παραλλαγή έχει μεγαλύτερη ικανότητα να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων σε σχέση με την P72 (Pim & Banks, 2004). Ακόμα, η P72 παραλλαγή παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα να προκαλεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση, κατά την επιδιόρθωση του DNA και την κυτταρική γήρανση καθώς και να ενεργοποιεί το ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου CDKN1A (p21/waf1), σε σύγκριση με την R72 παραλλαγή (Azzam, Frank, Hollstein, & Murphy, 2011; Bonafé et al., 2004). Από την άλλη πλευρά, η R72 παραλλαγή της p53 επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και καταστέλλει τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ικανότητα αυτής της παραλλαγής να μεταναστεύει στα μιτοχόνδρια και να ενεργοποιεί μέλη της οικογένειας BCL2 αλλά και στην ικανότητα της να επάγει τη μεταγραφή των προ-αποπτωτικών γονιδίων στόχων (Kung, Khaku, Jennis, Zhou, & Murphy, 2015).

Αξίζει να τονιστεί πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομορφικών παραλλαγών P72 και R72 μεταξύ των πληθυσμών διαφορετικών εθνοκοιτητων. Ενδεικτικά, η συχνότητα εμφάνισης του P72 αλληλομόρφου είναι περίπου 60% στους Αφροαμερικανούς, ενώ 30-35% στους Καυκάσιους Αμερικανούς (Beckman et al., 1994). Επιπλέον, η συχνότητα του P72 αλληλομόρφου συνδέεται στενά με το γεωγραφικό πλάτος και αυξάνεται στους

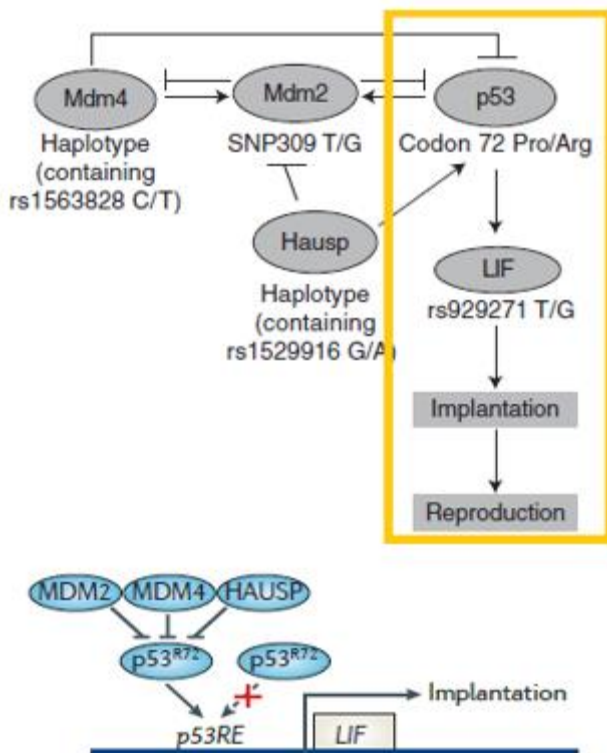
πληθυσμούς που βρίσκονται κοντά στον ισημερινό (Själänder, Birgander, Kivelä, & Beckman, 1995). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 είναι ισορροπημένος και διατηρημένος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης από τη φυσική επιλογή που θα μπορούσε να μεσολαβείται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το ηλιακό φως ή οι μολυσματικές ασθένειες. Συγκρίνοντας το ανθρώπινο γονιδίωμα με αυτό του χιμπατζή, δείχθηκε πως το P72 αλληλόμορφο είναι το παλαιότερο και εμφανίζεται με υψηλότερη συχνότητα στους Αφρικανικούς πληθυσμούς (περίπου 60%), ενώ το R72 αλληλόμορφο προέκυψε αργότερα στους Καυκάσιους και Ασιατικούς πληθυσμούς, όπου και επικρατεί. Η συχνότητα εμφάνισης του P72 αλληλομόρφου στους Καυκάσιους εκτιμάται περίπου στο 25-35% (Hu, 2009).

Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro) και η συσχέτιση του με την εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών

Στις περιπτώσεις των ιδιοπαθών καθ' έξιν αποβολών, οι πολυμορφισμοί έχουν προταθεί ως παράγοντες οι οποίοι μπορούν να αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης αποβολών στις κατά τ' άλλα υγιείς γυναίκες (Pietrowski et al., 2005). Ερευνητικές μελέτες αναφορικά με τον πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου TP53, έχουν δείξει πως γυναίκες ομόζυγες για το γονότυπο Pro/Pro, εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καθ' έξιν αποβολών, σε σύγκριση με τις γυναίκες φορείς του γονοτύπου Arg/Arg (Pietrowski et al., 2005; Zhang, Wu, Qiao, & Zeng, 2016). Παράλληλα, η μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης επανειλημμένων αποβολών, αφορά και τις ετερόζυγες γυναίκες (Arg/Pro), σε σχέση με τις ομόζυγες για το R72 αλληλόμορφο. Ένας πιθανός λόγος για τον οποίο οι γυναίκες που φέρουν το P72 αλληλόμορφο εμφανίζουν καθ' έξιν αποβολές, αφορά στο ότι η συγκεκριμένη αλληλομορφική παραλλαγή προκαλεί διαταραχές στην πλακουντιακή δομή και κυκλοφορία με αποτέλεσμα την ανεπαρκή ανταλλαγή αερίων, ουσιών και άλλων μεταβολικών προϊόντων μεταξύ της μητέρας και του αναπτυσσόμενου εμβρύου, οδηγώντας τελικά στην πρόωρη αποβολή του. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται πιθανώς στο ότι η P72 παραλλαγή επάγει μία παρατεταμένη παραμονή των τροφοβλαστικών

και ενδοθυλιακών κυττάρων στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου αλλά και στη μειωμένη ικανότητα της να επάγει απόπτωση σε σχέση με την R72 παραλλαγή.

Αξίζει να αναφερθεί πως το P72 αλληλόμορφο σχετίζεται και με τα μειωμένα επίπεδα του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας (LIF) στη μήτρα σε σχέση με την R72 αλληλομορφική παραλλαγή (Kang & Rosenwaks, 2018). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η p53 επιδρά στην αναπαραγωγή ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LIF στη μήτρα κατά τη φάση της εμφύτευσης. Λαμβάνοντας υπόψη την αυστηρή ρύθμιση που υφίσταται ο παράγοντας LIF από την p53, η τροποποίηση της λειτουργίας της από πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs), θα μπορούσε να επηρεάσει δυσμενώς τη διαδικασία της εμφύτευσης.



Εικόνα 10: Η επίδραση του πολυμορφισμού Arg72Pro στο στάδιο της εμφύτευσης του εμβρύου (Hu, 2009; Hu, Feng, Teresky, & Levine, 2007).

Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός Arg72Pro κατέχει κυρίαρχη θέση στην εμφάνιση επανειλημμένων αποτυχιών εμφύτευσης. Ειδικότερα, έχει δειχθεί πως το P72 αλληλόμορφο εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποτυχίες εμφύτευσης καθώς και σε γυναίκες με αποτυχίες εμφύτευσης ύστερα από προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης (Hu, 2009; Hu, Feng, Teresky, & Levine, 2007). Δεδομένου ότι η P72 παραλλαγή παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα στην επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων, είναι αναμενόμενο πως επάγει σε

μικρότερο βαθμό και τη μεταγραφή του γονιδίου LIF στους ιστούς της μήτρας. Έτσι, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του LIF έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επανειλημμένων αποτυχιών εμφύτευσης (Εικόνα 10).

Ακόμα, η P72 αλληλομορφική παραλλαγή σχετίζεται με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως με το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και τη

ρευματοειδή αρθρίτιδα (Kang et al., 2009). Για το λόγο αυτό, έχει προταθεί πως η ομοζυγωτία για το P72 αλληλόμορφο πιθανώς να ευαισθητοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας έναντι του εμβρύου κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, οδηγώντας τελικά στην ανοσολογική απόρριψη του (Mojarrad, Hassanzadeh-Nazarabadi, & Tafazoli, 2013).

Κεφάλαιο 4

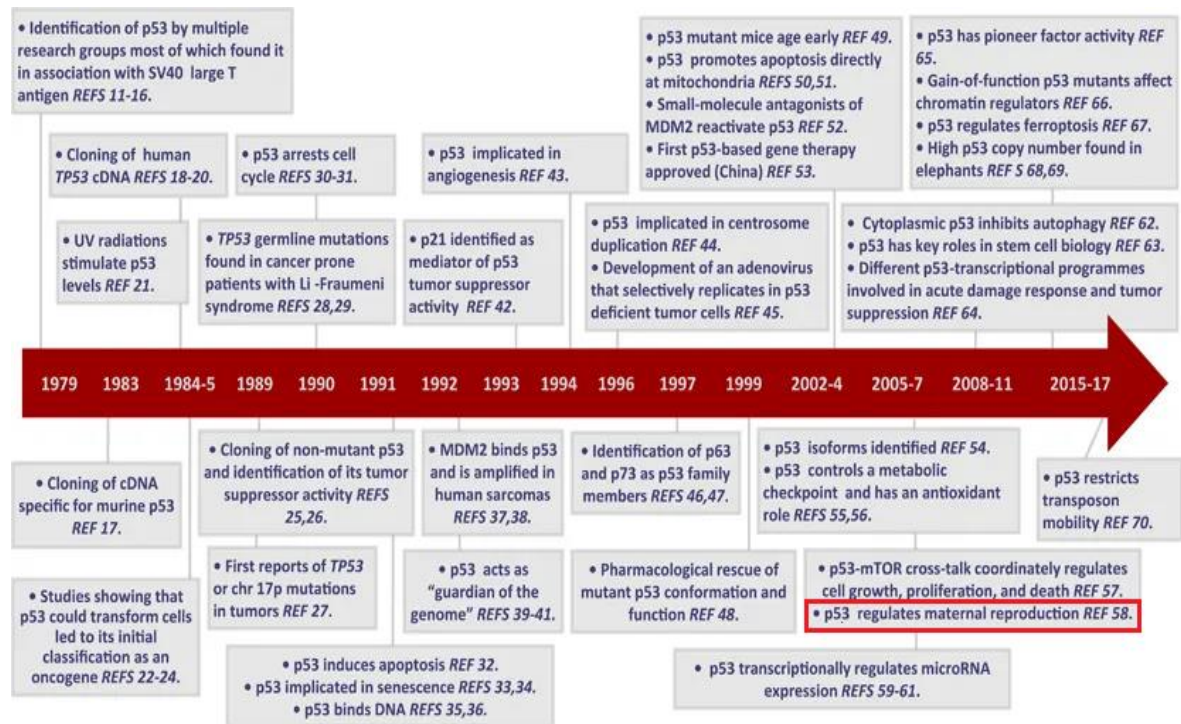
p53: Το γονίδιο, η πρωτεΐνη και οι ισομορφές

Η ιστορία της πρωτεΐνης p53 από την ανακάλυψη της έως σήμερα

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης p53 πραγματοποιήθηκε το 1979, όταν έξι ομάδες ερευνητών, κάθε μία από τις οποίες εργάζονταν ανεξάρτητα, ανέφεραν την ανακάλυψη μίας πρωτεΐνης 53kDa που ήταν παρούσα σε κύτταρα ανθρώπου και ποντικού. Σε πέντε από αυτές τις μελέτες, η πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε διότι συνδεόταν με το μεγάλο T-αντιγόνο σε μολυσμένα κύτταρα από τον ογκογόνο ιό SV40 (DeLeo et al., 1979; Lane & Crawford, 1979) (Εικόνα 11). Κατά τη διάρκεια της πρώτης δεκαετίας ύστερα από την ανακάλυψη της, οι αρχικές μελέτες που διεξήχθησαν με την πρωτεΐνη p53 και αργότερα με το γονίδιο που την κωδικοποιεί, υπέδειξαν πως πρόκειται για ένα ογκογονίδιο λόγω της επίδρασης που είχε στην επαγωγή της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης, όταν αυτό εκφραζόταν σε κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, η διαπίστωση αυτή κρίθηκε εσφαλμένη καθώς οι πρώτες προσπάθειες για να διευκρινιστεί η δράση του, πραγματοποιήθηκαν σε μεταλλαγμένα TP53 γονίδια και όχι σε γονίδια αγρίου τύπου. Την ίδια δεκαετία, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του TP53 και διαπιστώθηκε τελικά πως δεν είναι ένα ογκογονίδιο όπως θεωρήθηκε αρχικά, αλλά ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο μεταλλάσσεται πολύ συχνά στους διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου.

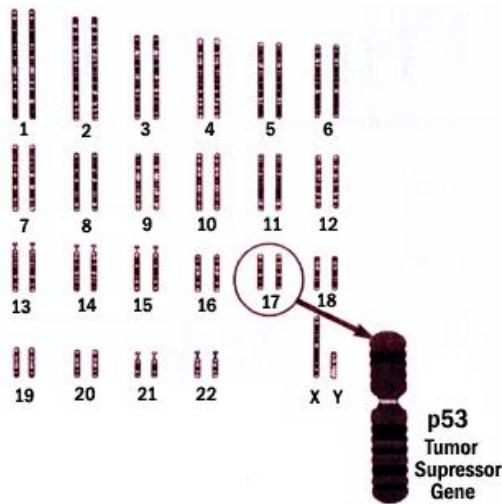
Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, χρησιμοποιώντας βιοχημικές και μοριακές προσεγγίσεις, αποκαλύφθηκε η λειτουργία της p53 ως μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την κυτταρική γήρανση, ύστερα από την επίδραση στρεσογόνων μηνυμάτων (Marcel, Nguyen Van Long, & Diaz, 2018). Επίσης, στα τέλη της δεκαετίας του 1990, περιγράφηκαν οι πρωτεΐνες p63 και p73, οι οποίες μοιράζονται δομική, βιοχημική και βιολογική ομολογία με την p53 (Surget, Khoury, & Bourdon, 2013a). Μετέπειτα, κατά την τρίτη δεκαετία ερευνητικής μελέτης της p53, αποκαλύφθηκαν νέες λειτουργικές δράσεις της, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης διάφορων μεταβολικών οδών και κυτοκινών που απαιτούνται για τη φυσιολογική εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου. (Arnold J. Levine & Oren, 2009). Τα τελευταία χρόνια βρίσκουν την έρευνα για την πρωτεΐνη p53

να είναι περισσότερο εστιασμένη στη δράση της στις μεταβολικές διεργασίες, την αναπαραγωγή και τη γονιμότητα, τη γονιδιωματική αστάθεια αλλά και τη μακροβιότητα των οργανισμών. Αναμφισβήτητα, υπάρχουν πολλές ακόμα ασθένειες πέραν του καρκίνου, όπου η p53 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο και η γνώση των διάφορων μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53 μπορεί να φανεί χρήσιμη τόσο για την πρόγνωση όσο και για τη θεραπεία τους.



Εικόνα 11: Το χρονοδιάγραμμα των ανακαλύψεων σχετικά με την p53 (Marcel, Nguyen Van Long, & Diaz, 2018).

Δομή και οργάνωση του γονιδίου TP53

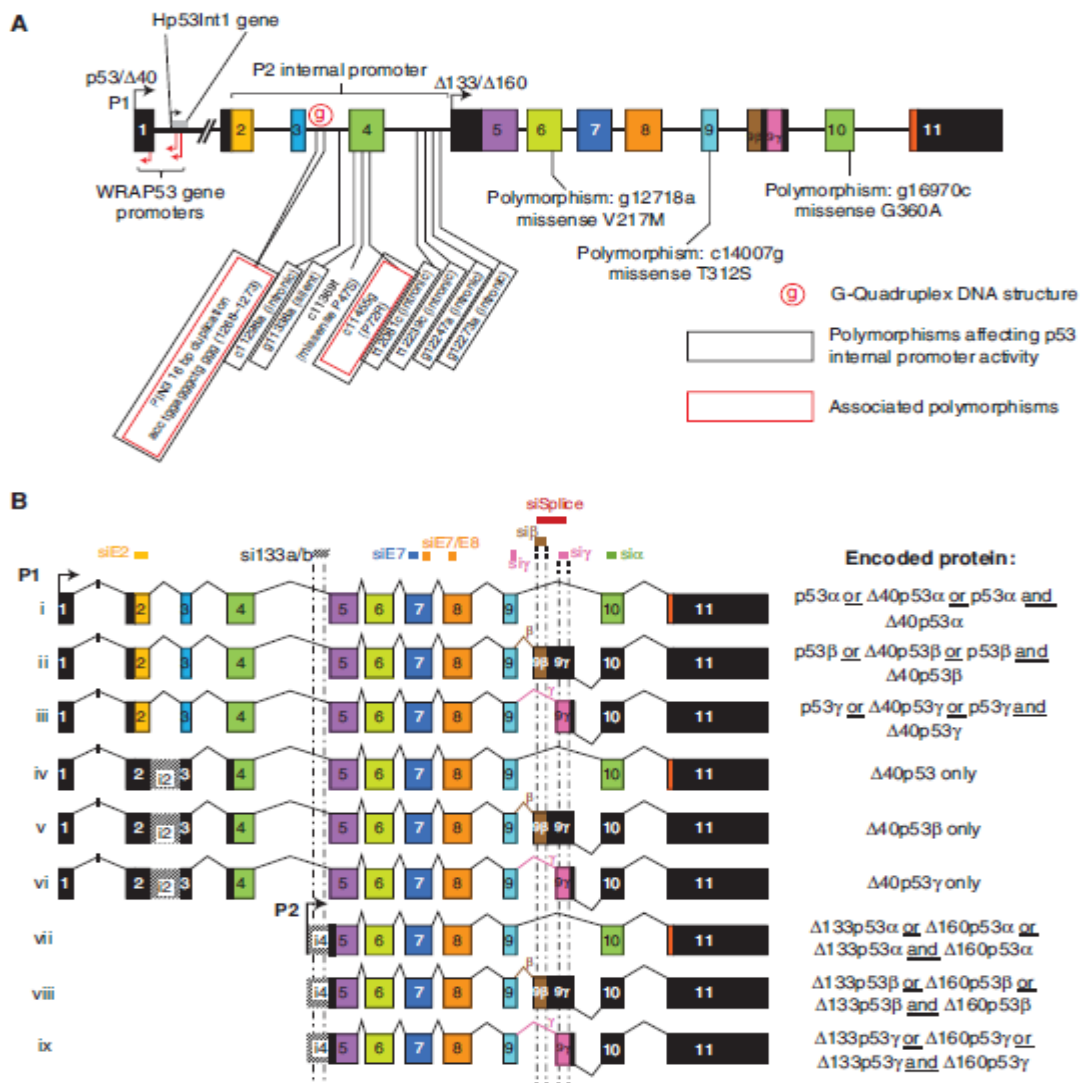


Εικόνα 12: Η θέση του γονιδίου TP53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17.

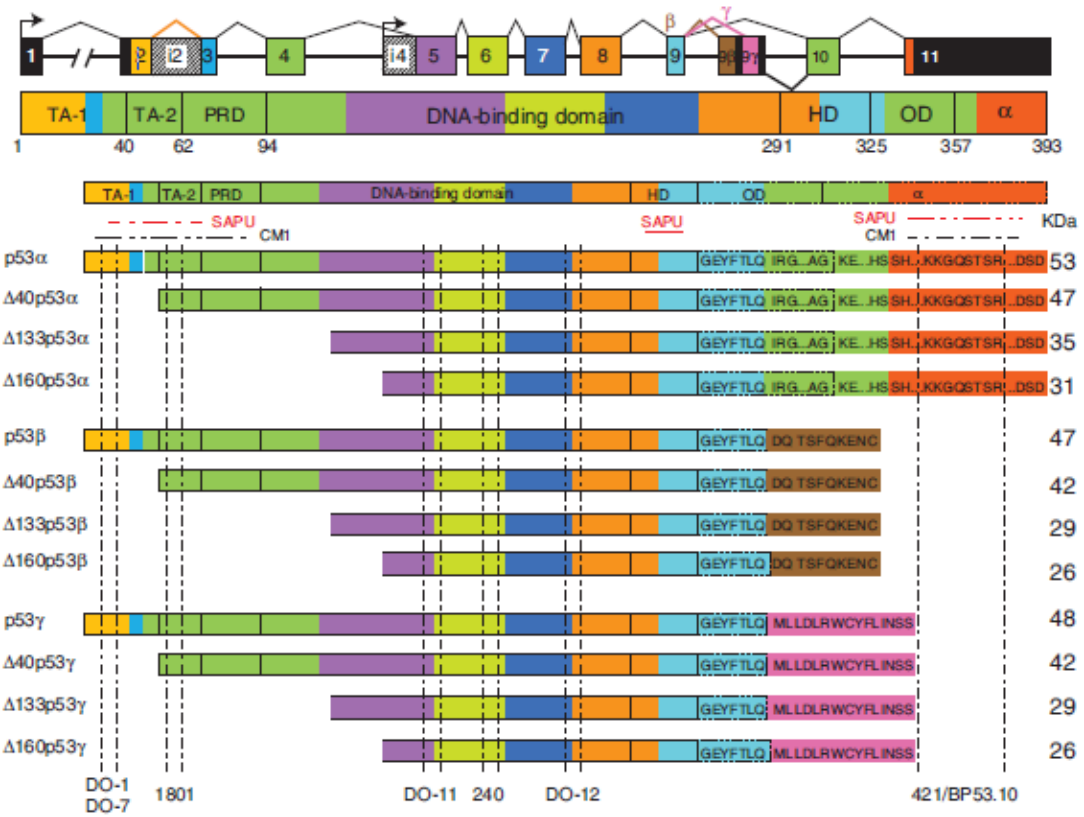
οποία είναι κρυφά (9β και 9γ) και 10 ιντρόνια. Το πρώτο εξόνιο είναι μη μεταφραζόμενο και χωρίζεται από το δεύτερο εξόνιο με ένα ιντρόνιο μήκους 10.738 bp (Reisman, Bálint é, Loging, Rotter, & Almon, 1996). Η έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου TP53 ελέγχεται από δύο υποκινητές, τους P1 και P2. Λόγω της παρουσίας των δύο υποκινητών, το TP53 συχνά αναφέρεται ως διπλό γονίδιο (Khoury & Bourdon, 2010; Vieler & Sanyal, 2018). Ο πρώτος υποκινητής P1 εντοπίζεται 250 bp ανοδικά του πρώτου εξονίου, ενώ ο δεύτερος υποκινητής P2 βρίσκεται στο ιντρόνιο 4. (Vieler & Sanyal, 2018) (Εικόνα 13 α).

Η ύπαρξη των δύο διαφορετικών υποκινητών σε συνδυασμό με το εναλλακτικό μάτισμα που πραγματοποιείται έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των διαφορετικών ισομορφών της p53. Ορισμένες από τις ισομορφές της p53 ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1980 από τον Matlashewski και τους συνεργάτες του για τον άνθρωπο καθώς και από τον Wolf και τους συνεργάτες του για τα ποντίκια, αντίστοιχα (G. Matlashewski et al., 1984; Wolf, Harris, Goldfinger, & Rotter, 1985). Στη συνέχεια, περιγράφηκε το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου, ενώ στην πορεία χρησιμοποιώντας περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές αποδείχθηκε πως το γονίδιο TP53 κωδικοποιεί τουλάχιστον 12 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης (Bourdon, Surget, & Khoury, 2013) (Εικόνες 13, 14). Η έναρξη της μεταγραφής από τον υποκινητή P1 παράγει ένα μετάγραφο από τη μετάφραση του οποίου θα προκύψουν είτε οι p53(α, β, γ) ισομορφές, είτε οι Δ40p53(α, β, γ). Στο σχηματισμό των Δ40p53

ισομορφών, συμμετέχει το εναλλακτικό μάτισμα στο ιντρόνιο-2 ή/και η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης (Bourdon et al., 2013). Η έναρξη της μεταγραφής από τον υποκινητή P2 επάγει το σχηματισμό των $\Delta 133p53(\alpha, \beta, \gamma)$ και $\Delta 160p53(\alpha, \beta, \gamma)$ ισομορφών. Οι $\Delta 160p53$ ισομορφές στερούνται των πρώτων 159 αμινοξέων και προκύπτουν από τα $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$, και $\Delta 133p53\gamma$ mRNAs μέσω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης από το ATG 160. Οι ισομορφές α , β , και γ παρουσιάζουν παραλλαγές στο C-καρβοξυτελικό άκρο και προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα στο ιντρόνιο-9. Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη (p53a, p53 ή FLp53) είναι η πρώτη που ανακαλύφθηκε και αποτελεί την περισσότερο άφθονη ισομορφή (Bourdon et al., 2013).



Εικόνα 13: Σχηματική παρουσίαση της δομής του TP53 γονιδίου (A) και των παραγόμενων p53mRNAs (B). Στο γονίδιο επισημαίνονται οι δύο υποκινητές (P1 και P2) και η διάταξη των εξονίων και ιντρονίων (Joruz & Bourdon, 2016).

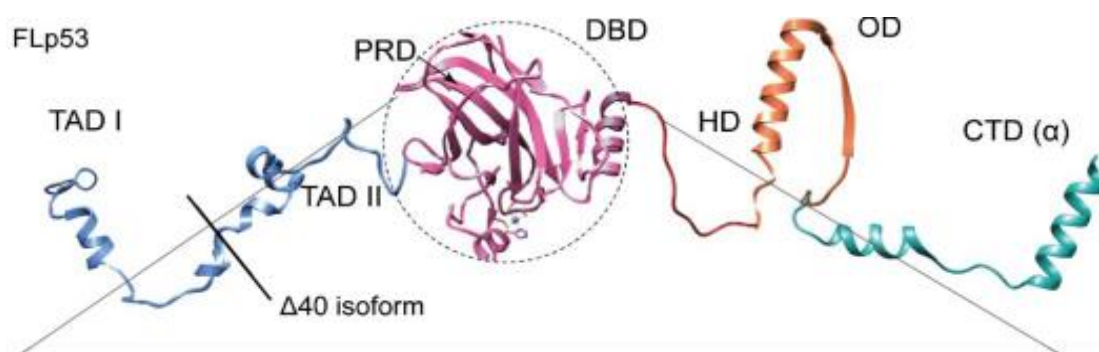


Εικόνα 14: Οι ισομορφές της ανθρώπινης πρωτεΐνης p53 (Jorruiz & Bourdon, 2016).

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και οι λειτουργικές περιοχές της

Η πρωτεΐνη p53 είναι μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 393 αμινοξέων, αποτελούμενη από δύο διμερή που ενώνονται με ιοντικούς δεσμούς και δημιουργούν ένα τετραμερές με δίδερη συμμετρία (Jeffrey, Gorina, & Pavletich, 1995; Vousden & Lane, 2007). Η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 53 kDa και μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, περίπου 20 λεπτά. Η ονομασία p53 περιγράφει την φαινομενική μοριακή μάζα. Σύμφωνα με ανάλυση SDS-PAGE, είναι μία πρωτεΐνη 53kDa. Ωστόσο, η πραγματική μοριακή μάζα της πρωτεΐνης p53 πλήρους μήκους με βάση το άθροισμα των μαζών των αμινοξικών καταλοίπων είναι μόνο 43,7kDa. Η διαφορά αυτή οφείλεται στον υψηλό αριθμό καταλοίπων προλίνης στην πρωτεΐνη, η οποία έχει βραδεία μετανάστευση σε SDS-PAGE, καθιστώντας τη έτσι να φαίνεται βαρύτερη από ότι είναι στην πραγματικότητα (Arnold J. Levine & Oren, 2009).

Η πρωτεΐνη p53 αποτελείται από επτά λειτουργικές περιοχές. Ειδικότερα, αποτελείται από δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD I και TAD II aa 1-67), την περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD aa 68-98), την κύρια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD aa 94-292), την HD περιοχή (HD aa 293-325), την περιοχή ολιγομερισμού (OD aa 326-353) και την καρβοξυτελική ρυθμιστική μη κωδική περιοχή (CTD aa 353-393) (Vieler & Sanyal, 2018) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης p53 (Vieler & Sanyal, 2018).

Οι δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD I και TAD II) στο N-τελικό άκρο, μπορούν ανεξάρτητα να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Candau et al., 1997). Οι δύο περιοχές TAD δεν είναι ισοδύναμες και επάγουν την ενεργοποίηση διαφορετικών υποκινητών (Brady et al., 2011). Οι περιοχές TAD

αλληλεπιδρούν με μία ποικιλία πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων TFIIID και TFIIA, της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο πλαίσιο TATA (TBP), των συνενεργοποιητών της μεταγραφής p300/CBP (CREB-binding protein) και των αρνητικών ρυθμιστών της p53, MDM2/MDM4 (Di Lello et al., 2006). Το N-τελικό άκρο της p53 πρωτεΐνης επίσης βοηθά στη στρατολόγηση των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, οι οποίοι εξασφαλίζουν την πρόσβαση της p53 και του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού στο DNA. Επιπλέον, σε απόκριση στη βλάβη του DNA οι περιοχές TAD μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε πολλαπλές θέσεις από διακριτές κινάσες, οι οποίες ρυθμίζουν τη σταθερότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη λειτουργικότητα της p53 (Meek & Anderson, 2009).

Στην ανθρώπινη p53, η περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD) που συνδέει την περιοχή TAD με την περιοχή πρόσδεσης του DNA (DBD), περιλαμβάνει 12 κατάλοιπα προλίνης και πέντε αντίγραφα του μοτίβου PXXP (Walker & Levine, 1996). Το μοτίβο PXXP δημιουργεί ένα σημείο πρόσδεσης για τις SH3 επικράτειες το οποίο μεσολαβεί αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης κατά τη μεταγωγή σήματος (Chillemi et al., 2017). Σε αντίθεση με τις άλλες δομικές περιοχές της p53, η PRD περιοχή είναι σχετικά μη συντηρημένη. Έχει δειχθεί πως η περιοχή PRD, είναι απαραίτητη για την απόπτωση και την καταστολή της ανάπτυξης που μεσολαβείται από την p53 (Venot et al., 1998).

Η κεντρική περιοχή (DBD) της πρωτεΐνης αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πρωτεϊνικά φύλλα δευτεροταγούς δομής, τα οποία περιέχουν τέσσερις και πέντε β αλυσίδες, αντίστοιχα. Τα δύο αυτά φύλλα αναδιπλώνονται στο χώρο, το ένα δίπλα στο άλλο και δημιουργούν μία δομή που χρησιμεύει σαν θήκη για τρεις α-ελικοειδείς πρωτεϊνικές θηλειές, οι οποίες είναι αυτές που συνδέονται με το τμήμα DNA (Jeffrey et al., 1995). Οι δύο από αυτές τις πρωτεϊνικές θηλειές συγκρατούνται κατά ένα μέρος σε μία στερεοχημική ισορροπία από ένα άτομο ψευδαργύρου (Zn^{2+}), το οποίο συνδέεται με τρία μόρια κυστεΐνης (cys) και ένα μόριο ιστοιδίνης (his). Η p53 προσδέεται σαν ένα τετραμερές σε μία περιοχή πρόσδεσης και επάγει την έκφραση των παρακαείμενων γονιδίων. Η πρωτεΐνη αναγνωρίζει αλληλουχίες DNA της τάξης του πενταμερούς μορίου Pu-Pu-Pu-C-(A/T)|(T/A)-G-Py-Py-Py (Pu: πουρίνη, Py: πυριμιδίνη) (Riley, Sontag, Chen, & Levine, 2008).

Η περιοχή ολιγομερισμού (OD) αποτελείται από ένα βήτα κλώνο, που ακολουθείται από μία άλφα έλικα απαραίτητη για το διμερισμό (Jeffrey et al., 1995).

Σε αυτή την περιοχή εντοπίζεται ακόμα ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (NES), το οποίο καλύπτεται από την τετραμερή διάταξη της p53. Η κάλυψη του NES εμποδίζει την p53 να εξέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου δεν μπορεί να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση (Riley et al., 2008). Η περιοχή OD επίσης εξασφαλίζει πως η περιοχή DBD θα προσδεθεί σταθερά στο DNA. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να σημειωθεί πως όλες οι N-τελικές ισομορφές της πρωτεΐνης p53 περιλαμβάνουν την OD περιοχή, γεγονός που μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργική δράση τους.

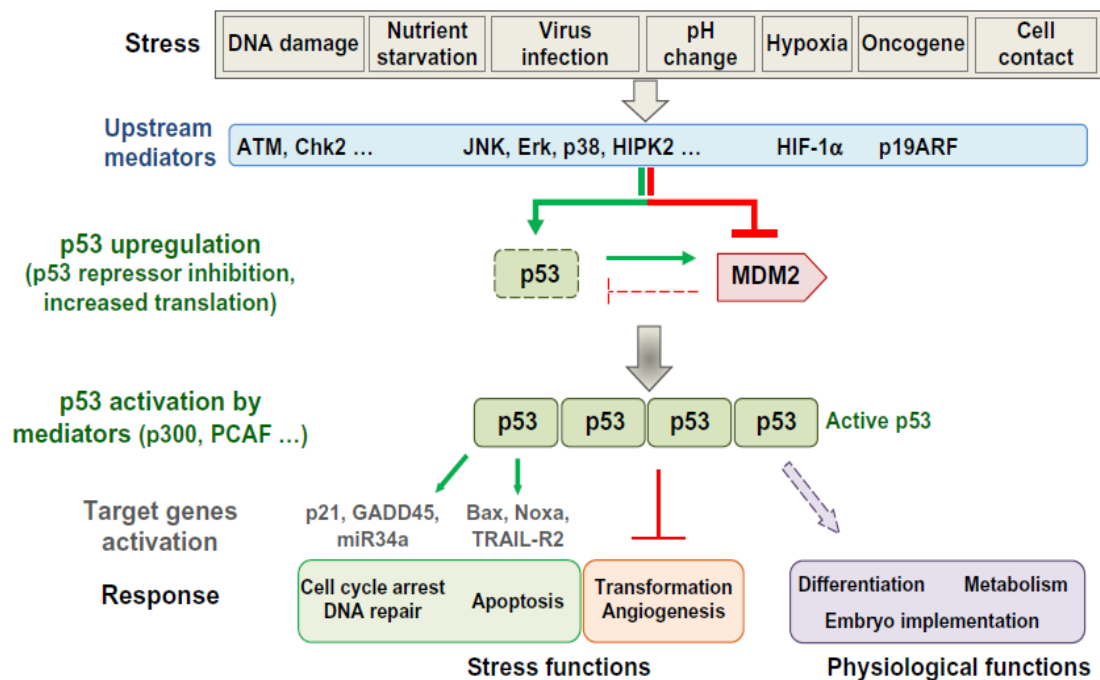
Η C-τελική περιοχή (CTD) περιέχει τρία σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μία μη ειδική περιοχή πρόσδεσης του DNA που προσδέεται σε κατεστραμμένο DNA. Η πρόσδεση DNA-CTD βασίζεται σε χαμηλής συγγένειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο DNA και στα κατάλοιπα Λυσίνης της CTD περιοχής (Chillemi et al., 2017). Αυτή η επικράτεια εμπλέκεται επίσης στην καταστολή της δέσμησης του DNA από την κεντρική περιοχή.

p53: Ο μοριακός φύλακας του γονιδιώματος

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 διεγείρεται από μία πληθώρα παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της διαταραχής της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης, της βλάβης του DNA, της έλλειψης θρεπτικών συστατικών, της θερμικής καταπληξίας, της ιικής λοίμωξης, της αλλαγής του pH, της υποξίας και της ενεργοποίησης ογκογονιδίων (Oren, 2003). Η πρωτεΐνη p53 εξασφαλίζει τη γενετική σταθερότητα ρυθμίζοντας διαφορετικές διεργασίες όπως τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τον ενεργειακό μεταβολισμό. Σε απουσία στρεσογόνων σημάτων, τα επίπεδα της p53 στον πυρήνα διατηρούνται χαμηλά μέσω μίας δυναμικής και λεπτώς συντονισμένης ισορροπίας μεταξύ της μεταγραφής του γονιδίου της και της αποικοδόμησης της. Η ισορροπία αυτή έχει μεγάλη σημασία καθώς η υπερβολική ποσότητα της p53 μπορεί να είναι θανατηφόρος για τα κύτταρα, ενώ από την άλλη πλευρά τα πολύ χαμηλά επίπεδα της μπορούν να επιτρέψουν την καρκινική ανάπτυξη. Ακόμα, η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζεται "σφιχτά" σε απάντηση σε διάφορες κυτταρικές στρεσογόνες καταστάσεις στο επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης. Επιπλέον, στη ρύθμιση της συμμετέχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η ουβικουϊτίνωση και η μεθυλίωση (Meek & Anderson, 2009). Ειδικότερα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53

ρυθμίζονται από λιγάσες ουβικουϊτίνης όπως η ανθρώπινη HDM2 και η Pirh2 (Honda, Tanaka, & Yasuda, 1997; Leng et al., 2003).

Όλες αυτές οι τροποποιήσεις ελέγχουν την ενεργοποίηση της p53, τον κυτταρικό της εντοπισμό, την αποικοδόμηση της και συνεπώς το αποτέλεσμα της κυτταρικής απόκρισης ύστερα από στρες που τελικά θα οδηγήσει είτε στην κυτταρική επιβίωση είτε στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Πράγματι, ύστερα από την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται από ποικίλους μεσολαβητές όπως μεταξύ άλλων των ATM, CHK, ARF, οι οποίοι επάγουν τη συσσώρευση των επιπέδων της p53 στον πυρήνα, ως αποτέλεσμα της αναστολής των καταστολέων της όπως της MDM2 (Εικόνα 16). Η MDM2 αποτελεί τη βασική λιγάση ουβικουϊτίνης της p53.



Εικόνα 16: Η p53 σηματοδοτική οδός. Διαφορετικοί κυτταρικοί στρεσογόνοι παράγοντες επάγουν την ενεργοποίηση των μεσολαβητών που προκαλούν την αύξηση των επιπέδων της p53 (π.χ. ATM, Chk2, p19ARF), μέσω αναστολής της αλληλεπίδραση της με την MDM2. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη από διεγερτικούς μεσολαβητές p53 πρωτεΐνη, ενεργοποιεί ή καταστέλλει με τη σειρά της γονίδια στόχους, σύμφωνα με το τελικό αποτέλεσμα που αναμένεται. Σε απουσία στρεσογόνων παραγόντων, η p53 ρυθμίζει πολλές άλλες φυσιολογικές λειτουργίες. (Surget, Khoury, & Bourdon, 2013)

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται άμεσα και ειδικά στο DNA για να επάγει ή να καταστείλει τη γονιδιακή έκφραση (el-Deiry, Kern, Pietenpol, Kinzler, & Vogelstein, 1992; Funk, Pak, Karas, Wright, & Shay, 1992). Εκτιμάται πως περισσότερα από 3.600 γονίδια-στόχοι ρυθμίζονται άμεσα από την p53 (Li et al., 2012). Φυσιολογικά, η p53 αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Η λειτουργία αυτή συνιστά ένα μεγάλο πλεονέκτημα καθώς τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη είναι περισσότερο πιθανό να περιέχουν μεταλλάξεις και ως εκ τούτου να εμφανίζουν ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου (Donehower et al., 1992; Hall, McKee, Menage, Dover, & Lane, 1993). Ανάλογα με τον τύπο του στρεσογόνου παράγοντα, η ενεργοποιημένη p53 προκαλεί είτε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση του DNA είτε απόπτωση του κυττάρου, με τον ακριβή μηχανισμό που καθορίζει την επιλογή μεταξύ αυτών των δύο γεγονότων να παραμένει επί του παρόντος αδιευκρίνιστος.

Ύστερα από την ενεργοποίησή της, η p53 μπορεί να προκαλέσει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου είτε στη φάση G1 είτε στη φάση G2. Μετά από βλάβη του DNA, η p53 επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, ενός αναστολέα κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης ο οποίος μεσολαβεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και S, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την επιδιόρθωση του DNA. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη p53 μπορεί να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη επιδιόρθωσης των βλαβών GADD45, η οποία ρυθμίζει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G2 και M (Taylor & Stark, 2001). Στα γονίδια που αποτελούν στόχους της p53 και εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου ανήκει επίσης το miR34a καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 14-3-3. Συνεπώς, η παρουσία της λειτουργικής p53 είναι σημαντική για τα διαφορετικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας με τον τρόπο αυτό χρόνο στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τη βλάβη στο DNA (Sperka, Wang, & Rudolph, 2012).

Όταν η βλάβη στο DNA είναι αδύνατο να επιδιορθωθεί, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί πως η απόπτωση που επάγεται από την πρωτεΐνη p53 είναι η κύρια αιτία της καταστολής ανάπτυξης καρκίνου. Πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης και ειδικότερα στην ενδογενή οδό, αποτελούν στόχους για την p53. Χαρακτηριστικά, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί ορισμένα από τα προαποπτωτικά μέλη

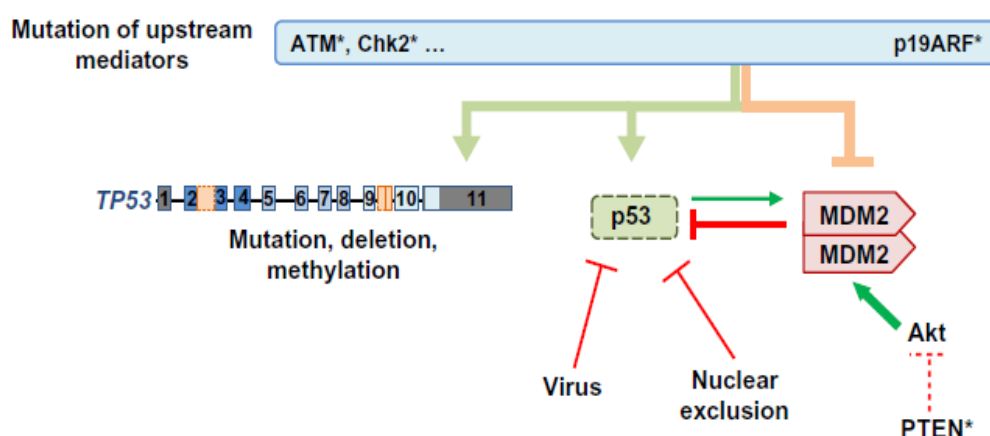
της οικογένειας Bcl-2 (Bax, Bid, Noxa και Puma), τον παράγοντα-1 ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεΐνης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών καθώς και τον μιτοχονδριακό ενεργοποιητή των κασπασών/DIABLO (Kuribayashi & El-Deiry, 2008). Αντίθετα, η έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως των Bcl-2, Bcl-xL ή της σουρβιβίνης (survivin) μπορεί να κατασταλεί από την p53. Όσον αφορά την εξωγενή οδό της απόπτωσης, έχει αποδειχθεί πως η p53 ρυθμίζει την έκφραση των υποδοχέων θανάτου TRAIL-R2 και Fas (Sheikh et al., 1998; Wu et al., 1997). Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η p53 εμπλέκεται και σε άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου όπως η αυτοφαγία και η νεκρόπτωση (Crighton et al., 2006).

Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στον καρκίνο

Όλα τα γεγονότα τα οποία είναι πιθανό να προάγουν το σχηματισμό καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα μία ανώμαλη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η βλάβη στο DNA ή ένας μη φυσιολογικός κυτταρικός κύκλος, οδηγούν στην ενεργοποίηση της p53. Αυτή η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη σταματά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη, πυροδοτεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και συνεπώς αποτρέπει το σχηματισμό καρκίνου. Λόγω του κομβικού της ρόλου στην ολοκλήρωση εξοκυττάρων και ενδοκυττάρων σημάτων προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιότητα, η p53 είναι ανενεργή στις περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις καρκίνου (Hollstein, Sidransky, Vogelstein, & Harris, 1991; A. J. Levine, Momand, & Finlay, 1991). Ακόμα, η p53 μπορεί να αδρανοποιηθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες ιικές/κυτταρικές πρωτεΐνες, ή λόγω της επίδρασης επιγενετικών φαινομένων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της υπερμεθυλίωσης του TP53 (Arnold J. Levine, 2009). Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως η p53 σηματοδοτική οδός μπορεί να απενεργοποιηθεί έμμεσα μέσω αύξησης της αποικοδόμησης της, όπως συμβαίνει μεταξύ άλλων στην περίπτωση της υπερέκφρασης της MDM2, της μετάλλαξης του γονιδίου PTEN και της απορρύθμισης του μονοπατιού Akt, καθώς και μέσω αυξημένου πυρηνικού αποκλεισμού ή διαταραχών στις οδούς που επάγουν την ενεργοποίηση της (Εικόνα 17).

Οι μεταλλάξεις του TP53 εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), με αποτέλεσμα να ελαττώνουν ή ακόμα και να εξαλείφουν εντελώς τη

λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι μεταλλαγμένες μορφές της p53 έχουν φανερώσει νέες ιδιότητες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως “κέρδος λειτουργίας” (gain of function), οι οποίες διαφέρουν από τις φυσιολογικές της δράσεις και ενισχύουν την ογκογονικότητα (Freed-Pastor & Prives, 2012; Goldstein et al., 2011). Συχνά, οι μεταλλάξεις του TP53 σχετίζονται με μη καλή ανταπόκριση σε μία χημειοθεραπευτική προσπάθεια, την πρόοδο του όγκου, τη μετάσταση και γενικότερα με μία βραχύτερη συνολική επιβίωση. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες μορφές καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, η οξεία μυελογενής λευχαιμία και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, οι οποίες εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα στις TP53 μεταλλάξεις και για το λόγο αυτό δε συνδέονται πάντα με μία δυσμενή πρόγνωση. Επομένως, σε αυτούς τους τύπους καρκίνου, το μονοπάτι της p53 διαταράσσεται πιθανώς με άλλους τρόπους (Surget et al., 2013).



Εικόνα 17: Τρόποι απενεργοποίησης της p53 σηματοδοτικής οδού στον καρκίνο. Το p53 μονοπάτι μπορεί να απενεργοποιηθεί είτε άμεσα με μετάλλαξη, έλλειψη, ή μεθυλίωση του TP53 είτε έμμεσα λόγω μεταλλάξεων των μεσολαβητών του p53 μονοπατιού, της επίδρασης ιικών πρωτεϊνών ή του πυρηνικού αποκλεισμού της (Surget et al., 2013).

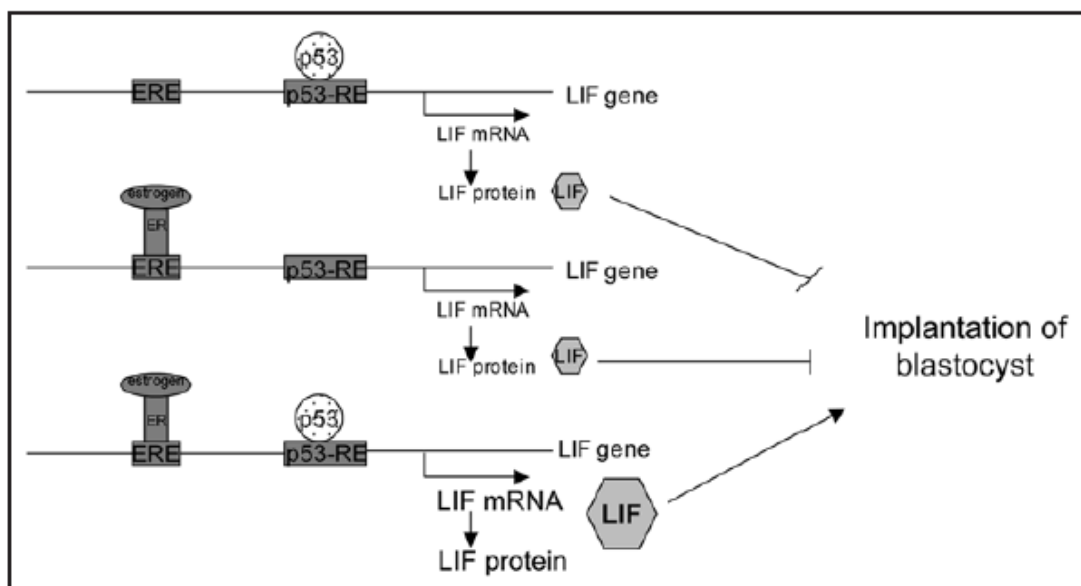
Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 στην αναπαραγωγή

Η πρωτεΐνη p53 διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, μέσω της συμμετοχής της στη ρύθμιση του σταδίου της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Η εμφύτευση αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο της

εμβρυικής ανάπτυξης στα θηλαστικά. Κατά τη διάρκεια της, η βλαστοκύστη εξασφαλίζει μία στενή αλληλεπίδραση με τους ιστούς της μήτρας, που οδηγεί στο σχηματισμό του πλακούντα ώστε να εξασφαλιστεί η θρέψη και η ανάπτυξη του εμβρύου. Η διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο είναι το αποτέλεσμα της ισορροπημένης δράσης μεταξύ των αυξητικών παραγόντων και της απόπτωσης. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχειδειχθεί πως εμπλέκεται στην τροφοβλαστική διείσδυση και αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένης και της p53 (Red-Horse et al., 2004). Ωστόσο, τα ποσοστά εμφύτευσης στον άνθρωπο είναι σχετικά ανεπαρκή. Η αποτυχία στην εμφύτευση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα είτε ενός προβλήματος που αφορά το έμβρυο όπως για παράδειγμα μία χρωμοσωμική ανωμαλία, είτε του περιβάλλοντος στο οποίο το έμβρυο προσπαθεί να εμφυτευτεί. Η αποτυχία εμφύτευσης συνιστά την πιο συχνή αιτία απώλειας εγκυμοσύνης ύστερα από εξωσωματική γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά (Hoozemans, Schats, Lambalk, Homburg, & Hompes, 2004).

Έχειδειχθεί πως η παρουσία επαρκούς ποσότητας του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) στη μήτρα, αποτελεί ουσιώδη προϋπόθεση για την έναρξη της εμφύτευσης (Hambartsoumian, 1998). Ο παράγοντας LIF αποτελεί μία εκκρινόμενη πολυ-λειτουργική κυτοκίνη που ανήκει στην υπεροικογένεια της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) (Yue, Wu, & Hu, 2015). Σε πολλά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ποντικού και του ανθρώπου, ο παράγοντας LIF εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους αδένες του ενδομητρίου κατά την έναρξη της εμφύτευσης. Στη συνέχεια, εκκρίνεται στον αυλό της μήτρας και προσδένεται στους υποδοχείς του που βρίσκονται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, προετοιμάζοντας τη μήτρα για την εμφύτευση της βλαστοκύστης (Hu, Feng, Atwal, & Levine, 2008). Χαμηλότερα επίπεδα του παράγοντα LIF έχουν παρατηρηθεί σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες. Το γονίδιο LIF αποτελεί ένα γονίδιο-στόχο για την p53 και περιέχει μία θέση για την πρόσδεση της στην περιοχή του υποκινητή. Η p53 σε συνεργασία με τα οιστρογόνα, ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LIF σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων και των ιστών της μήτρας. Το γονίδιο LIF είναι οιστρογόνο-απαντητικό και τα επίπεδα των οιστρογόνων αυξάνονται σημαντικά κατά την εμφύτευση για να επάγουν την αύξηση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου στους ιστούς της μήτρας (Sherwin et al., 2004) (Εικόνα 18). Συνεπώς, η αλληλεπίδραση μεταξύ της p53, των οιστρογόνων και των

οιστρογονικών υποδοχέων (ERs) είναι απαραίτητη για την επαρκή αύξηση των επιπέδων του παράγοντα LIF και συνεπώς για την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Εικόνα 18). Απουσία της p53 πρωτεΐνης, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LIF στη μήτρα μειώνονται σημαντικά, με αποτέλεσμα την αδυναμία εμφύτευσης του εμβρύου. Επομένως, τα μειωμένα επίπεδα του παράγοντα LIF στη μήτρα συσχετίζονται συχνά με μειωμένη γονιμότητα. Η αλληλεπίδραση αυτή συνιστά ένα νέο πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζει τα γονίδια στόχους της (Hu et al., 2008).



Εικόνα 18: Η έκφραση του γονιδίου LIF μπορεί να ρυθμιστεί από την πρωτεΐνη p53 μέσω της πρόσδεσης της στο αντίστοιχο σημείο πρόσδεσης (p53RE), καθώς και από τα οιστρογόνα και τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) μέσω του στοιχείου απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE). Η συνεργατική ρύθμιση μεταξύ της p53 και των οιστρογόνων στην αρχή της εμφύτευσης, είναι απαραίτητη για την επαρκή αύξηση των επιπέδων του παράγοντα LIF και συνεπώς για την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Hu et al., 2008).

Σκοπός

Οι πολυμορφισμοί έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στην αιτιολογία των ιδιοπαθών καθ' έξιν αποβολών. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στο ρόλο που διαδραματίζει το ογκοκατασταλτικό γονιδίου TP53 στην αναπαραγωγή καθώς και στην επίδραση που έχει ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 του συγκεκριμένου γονιδίου στην εμφάνιση επανειλημμένων αποβολών.

Η παρούσα εργασία διεξήχθη με σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του πολυμορφισμού μονού νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 72 του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 και της εμφάνισης καθ' έξιν αποβολών στον Ελληνικό πληθυσμό.

Ειδικό μέρος

Πειραματική διαδικασία

Υλικά και Μέθοδοι

Δείγματα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 100 γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές και 100 γόνιμες γυναίκες. Οι ασθενείς αντιπροσωπεύουν γυναίκες με ιστορικό τουλάχιστον δύο συνεχόμενων αυτόματων αποβολών οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα των Επανελημμένων Αποβολών της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από γυναίκες που έχουν ολοκληρώσει τουλάχιστον μία επιτυχημένη εγκυμοσύνη και δεν περιλαμβάνεται καμία απώλεια κύησης στο ατομικό τους αναμνηστικό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα

Το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, βαμβακοφόρους στυλεούς και ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded tissues). Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται με απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος (2-3 ml) και τοποθετείται σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό, συγκεκριμένα ηπαρίνη ή EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη (φιαλίδιο γενικής αίματος). Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων, την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και την κατακρήμνιση του DNA.

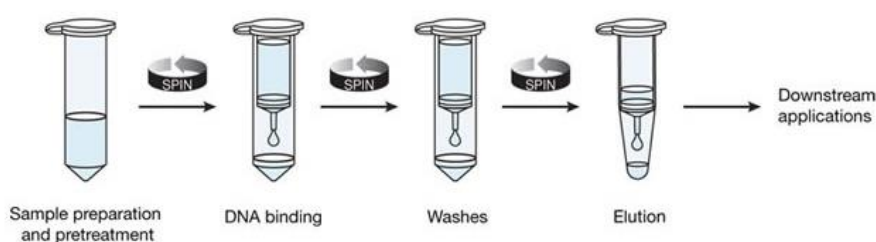
Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης (Eppendorf tube του 1.5 ml) προστίθενται 200 µl φρέσκου ή κατεψυγμένου περιφερικού αίματος μαζί με 200 µl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer, 20 µl πρωτεΐνάσης K και 20 µl RNάσης A. Το Genomic Lysis/ Binding Buffer προκαλεί την πλήρη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων προκειμένου να απελευθερωθεί στο διάλυμα το DNA που ανευρίσκεται στον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Το διάλυμα λύσης που περιέχεται στα περισσότερα κιτ απομόνωσης περιέχει υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικών αλάτων, όπως υδροχλωρική γουανιδίνη (Guanidine hydrochloride), θειοκυανιούχος γουανιδίνη (Guanidine thiocyanate), ουρία, και υπερχλωρικό λίθιο. Τα άλατα αυτά καταστρέφουν τους δεσμούς υδρογόνου, τις δυνάμεις Van der Waals και τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης μειώνεται η διαλυτότητα του DNA στο νερό και οι πρωτεΐνες αποσταθεροποιούνται. Τα διαλύματα λύσης περιέχουν επίσης απορρυπαντικά για τη λύση των μεμβρανών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες που μπορούν να βλάψουν τα κεκαθαμένα μόρια του DNA. Είναι μια πρωτεάση σερίνης, που αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της ποικίλει από 50° C έως 70° C. Μετά την προσθήκη της στο διάλυμα, η πρωτεΐνάση K απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεΐνάσης K είναι ότι παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων όπως το Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Η ριβονουκλεάση A (RNάση A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση που αποικοδομεί το μονόκλωνο RNA (single-stranded RNA), έχει συγκέντρωση 20 mg RNase A/mL σε 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA και προέρχεται από πάγκρεας βοός.

Το προϊόν της λύσης επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 55° C για 10 λεπτά για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών. Το γονιδιωματικό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, που ονομάζονται πυρηνικά χρωμοσώματα και για να θεωρείται πετυχημένη η διαδικασία της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA πρέπει να έχει αποδώσει ένα μόριο DNA απαλλαγμένο από πρωτεΐνες για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για PCR. Έπειτα

προσθέτουμε αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA και μεταφέρουμε το ομογενοποιημένο διάλυμα σε μια περιστρεφόμενη στήλη όπου μετά από φυγοκέντρηση το DNA που έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα που περιέχονται στο διάλυμα δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη, αλλά εκλύονται στο σωλήνα συλλογής, ο οποίος απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις της περιστρεφόμενης στήλης με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων που έχουν δεσμευθεί στη μεμβράνη και να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η καθαρότητα του DNA. Η συναπομόνωση πρωτεϊνών μειώνει την επιτυχία της PCR και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να ελαχιστοποιηθούν ή ακόμη καλύτερα να εξαλειφθούν τα στοιχεία εκτός του DNA που δεσμεύονται στη μεμβράνη της στήλης. Το κεκαθαρισμένο DNA εκλύεται από τη μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column χρησιμοποιώντας διάλυμα έκπλυσης, elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο συλλογής που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20° C για να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του DNA και ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια με PCR.



Το πρωτόκολλο (PureLink Genomic DNA Kits Manual, Life Technologies) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- ❖ Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου αίματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
- ❖ Προσθέτουμε 20 μl πρωτεϊνάσης K.

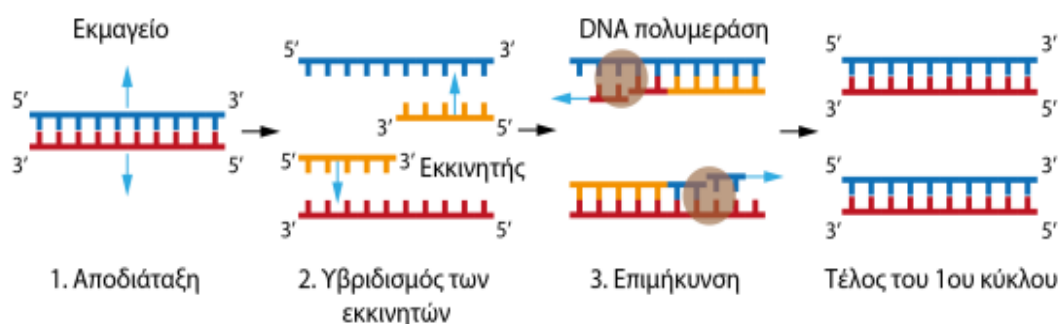
- ❖ Προσθέτουμε 20 μl RNάσης A, αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- ❖ Προσθέτουμε 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
- ❖ Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55° C για 10 λεπτά για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
- ❖ Προσθέτουμε 200 μl 96-100% αιθανόλη.
- ❖ Αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
- ❖ Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μl) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.
- ❖ Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
- ❖ Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη.
- ❖ Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
- ❖ Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη.
- ❖ Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
- ❖ Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης του 1,5 ml.
- ❖ Προσθέτουμε 150 μl PureLink Elution Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
- ❖ Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml.
- ❖ Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20° C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Το 1983 ο Kary Mullis σκέφθηκε μία ευφυέστατη μέθοδο ενίσχυσης ειδικών αλληλουχιών DNA που ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase

chain reaction, PCR). Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί βασικό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας και έχει συμβάλει τα μέγιστα στην ανάπτυξη της γονιδιακής και ευρύτερης βιολογικής έρευνας. Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς. Ένας κύκλος PCR χωρίζεται σε τρία επιμέρους στάδια:

1. **Διαχωρισμός των αλυσίδων:** οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για περίπου 30 με 60 δευτερόλεπτα.
2. **Υβριδοποίηση των εκκινητών:** το διάλυμα ψύχεται απότομα στους 55-65°C για περίπου 30 δευτερόλεπτα, για να δοθεί η ευκαιρία στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις αλυσίδες του DNA.
3. **Σύνθεση DNA:** στη συνέχεια το διάλυμα θερμαίνεται στους 72°C, ιδανική θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο προέρχεται από το *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφίλο βακτήριο που ζει στις θερμές πηγές. Η πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς το μέρος του στόχου διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ακολουθεί την πορεία από το 5' προς το 3' - άκρο.



Εικόνα 19: Τα στάδια της αντίδρασης PCR.

Τα τρία αυτά στάδια – διαχωρισμός των αλυσίδων, υβριδοποίηση των εκκινητών και σύνθεση του DNA, αποτελούν έναν κύκλο ενίσχυσης PCR και μπορούν να επαναληφθούν συνεχώς με απλή αλλαγή της θερμοκρασίας του μείγματος. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια:

- ❖ **το μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής (template DNA)** για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η ποιότητα της μήτρας του DNA που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA που κυμαίνεται από 0,01 μg έως 1 μg.
- ❖ **ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ένας νοηματικός εκκινητής (forward primer) και ένας αντινοηματικός εκκινητής (reverse primer),** τα οποία υβριδίζονται στις 5' και 3' γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων (συνήθως 20 βάσεων) συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Το περιεχόμενό τους σε ζεύγη βάσεων G/C, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε G/C, κυμαίνεται από 40% έως 60% με αντιπροσωπευτικότερο ποσοστό συνήθως το 50%. Οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, Tm) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα πρέπει να είναι περίπου 50-72° C και

τα T_m των δύο εκκινητών να μην διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερους από 5° C. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως θέσεις πέψης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 20 μM (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$).

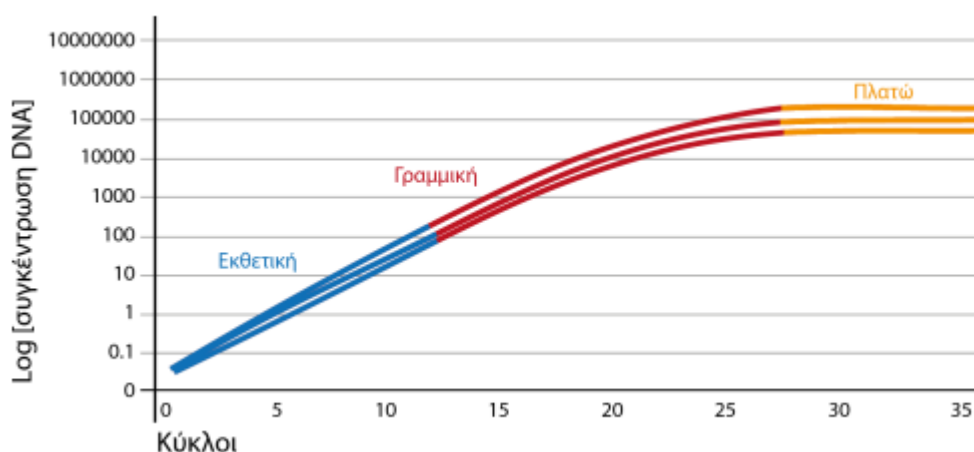
- ❖ **η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση** που είναι σταθερή στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας. Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα εμπορικώς διαθέσιμο ένζυμο που απομονώνεται από βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό το ένζυμο έχει τη δραστηριότητα της 5' → 3' πολυμεράσης και τη δραστηριότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3' → 5' εξωνουκλεολυτική δραστηριότητα με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση (proofreading activity).
- ❖ **τα 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (2'-deoxynucleotide 5'-triphosphates, dNTPs, που περιλαμβάνουν την dATP, την dTTP, την dGTP, και την dCTP)** που προσθέτει η DNA πολυμεράση για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα. Τα dNTPs σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} . Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους πρέπει να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του MgCl_2 .
- ❖ **το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)** που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες pH και αλατότητας για τη δράση της πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 °C), MgCl_2 , KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη και
- ❖ **τα ιόντα μαγνησίου Mg^{2+} με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου MgCl_2** που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του MgCl_2 προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαράγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδικό υβριδισμό των εκκινητών στο DNA, οδηγώντας σε παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά, με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων 1-4 mM. Σταθεροποιεί το

δίκλωνο DNA αυξάνοντας την T_m και τελικά την ειδικότητα των εκκινητών. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,5 mM έως 2,5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.

Κινητική της αντίδρασης PCR

Στη θεωρία, η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική, γιατί κάθε μόριο DNA που παράγεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον επόμενο κύκλο. Στην πραγματικότητα όμως η PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις (Εικόνα 20):

- ❖ **Εκθετική φάση:** Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.
- ❖ **Γραμμική φάση:** Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
- ❖ **Φάση πλατώ:** Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων.



Εικόνα 20: Οι τρεις φάσεις της αντίδρασης PCR: στην αρχική εκθετική φάση τα προϊόντα της PCR σχηματίζονται με εκθετικό ρυθμό, κατά τη γραμμική φάση ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται και στη φάση του πλατώ δεν συντίθενται πλέον νέα προϊόντα PCR.

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των P72 και R72 αλληλομόρφων περιλαμβάνει τα βήματα:

1. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης του 0,5 mL προσθέτουμε 5μl 10X PCR Buffer minus Mg²⁺, 1μl 10 mM dNTP mixture, 1,5 μl 50 mM MgCl₂, 1μl Primer Sense mix, 1μl Primer Antisense mix, 2,5 μl Template DNA, 0,5 μl *Taq* DNA polymerase, 12,5 μl απεσταγμένο νερό.
2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζουμε στους 94°C για 5 λεπτά.
3. Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 45 κύκλους: 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 56°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 45 δευτερόλεπτα.
4. Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 5 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4° C.
5. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι:

Pro codon	GCCAGAGGCTGCTCCCCC	CGTGCAAGTCACAGACTT
Arg codon	TCCCCCTTGCCGTCCCAA	CTGGTGCAGGGGCCACGC

Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από κάποια είδη θαλάσσιων φυκών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 45°C σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων εφαρμόζεται για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR. Η πηκτή αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 8 μL βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδες φως.

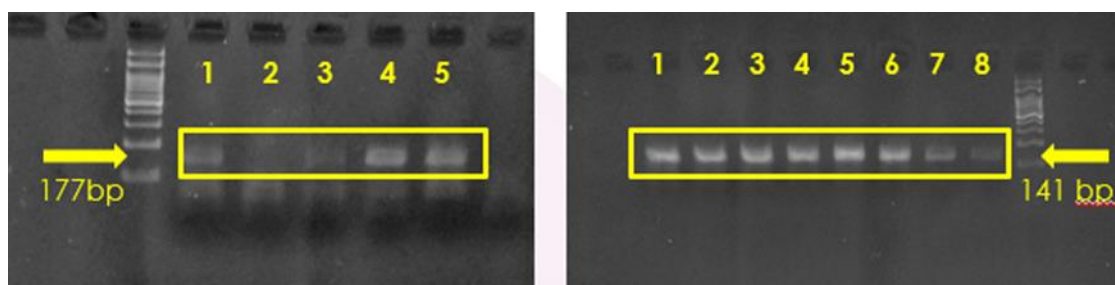
Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/cm. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μάς επιτρέπει να παρακολουθούμε τη γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet, UV, radiation). Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές

ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

Αποτελέσματα

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη συμπεριελήφθησαν συνολικά 200 γυναίκες, οι οποίες ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες με βάση την εμφάνιση ή όχι καθ' ἑξιν αποβολών. Στην ομάδα των ασθενών με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών (RPL group) περιλαμβάνονται 100 γυναίκες που έχουν τουλάχιστον δύο συνεχόμενες απώλειες κήσεων πριν από την 20^η εβδομάδα κύησης. Στην ομάδα ελέγχου (Control group) περιλαμβάνονται 100 γυναίκες οι οποίες έχουν αποκτήσει παιδιά μετά από φυσιολογική σύλληψη.

Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος της εργασίας, με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) επιτυγχάνεται η εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει κάθε φορά για περαιτέρω ανάλυση. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να μελετηθεί ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) Arg72Pro (rs1042522), ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR το τμήμα του γονιδίου TP53 το οποίο περιέχει την πολυμορφική θέση 72 για το P72 και R72 κωδικόνιο, αντίστοιχα. Ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 συνιστά μία G/C παραλλαγή η οποία οδηγεί στην παρουσία στην παραγόμενη πρωτεΐνη είτε της αργινίνης (CGC), είτε της προλίνης (CCC). Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν έχουν μήκος 177 bp για το P72 πολυμορφικό αλληλόμορφο και 141 bp για το R72 αλληλόμορφο. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, μας επέτρεψε να οπτικοποιήσουμε και να καθορίσουμε την ύπαρξη των προϊόντων ενίσχυσης. Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν 25 μl από το κάθε προϊόν ενίσχυσης.

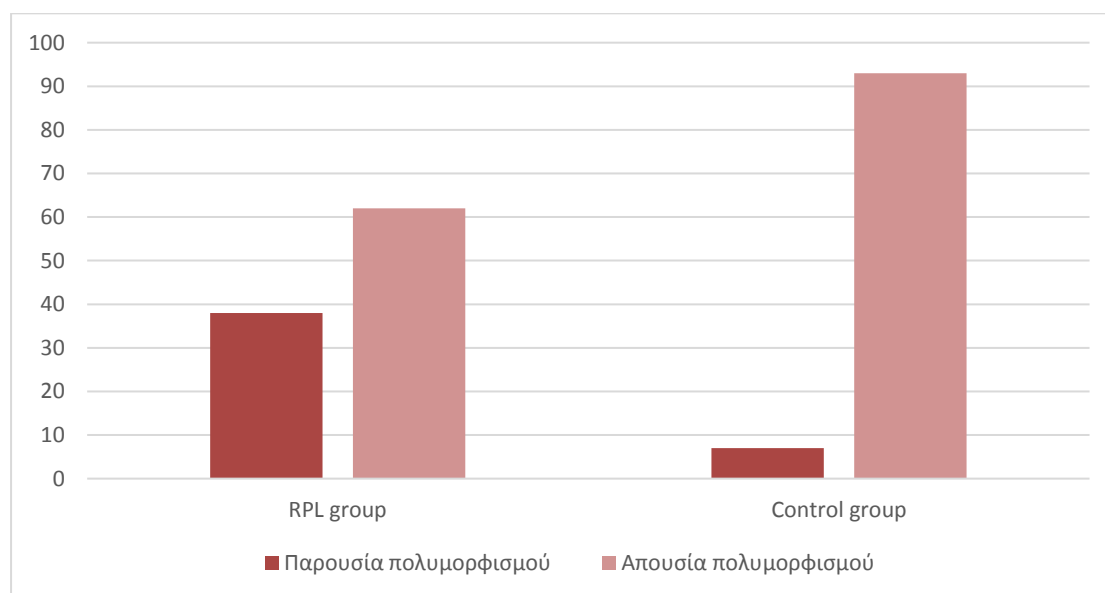


Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων. Αριστερά διακρίνεται το P72 προϊόν της PCR μήκους 177 bp, από δείγματα γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές. Δεξιά, το R72 προϊόν της PCR μήκους 141 bp από δείγματα γυναικών της ομάδας ελέγχου.

Στις ασθενείς με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών (RPL group) ο πολυμορφισμός Arg72Pro ταυτοποιήθηκε στις 38 από τις 100 γυναίκες (38%), ενώ στην ομάδα ελέγχου (Control group), ανιχνεύθηκε στις 7 από τις 100 γυναίκες (7%), όπως φαίνεται στον παρακείμενο πίνακα και στο αντίστοιχο γράφημα.

Εμφάνιση του Arg72Pro πολυμορφισμού	RPL group	Control group
ΘΕΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	38 (38%)	7 (7%)
ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	62 (62%)	93 (93%)
Σύνολο	100	100

Πίνακας αποτελεσμάτων: Συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού Arg72Pro στις δύο υπό μελέτη ομάδες.

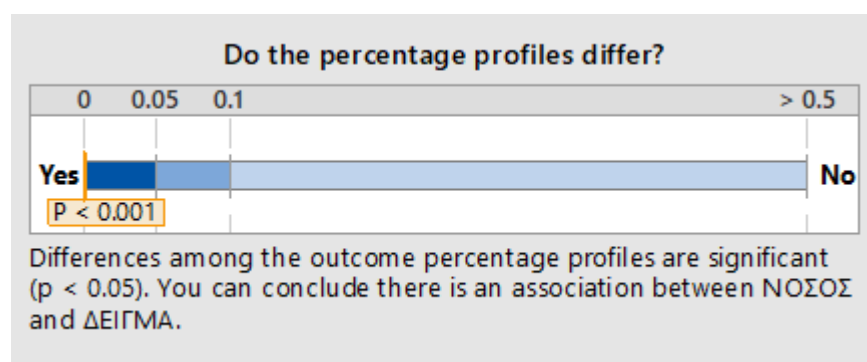


Γράφημα: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων με τη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού Arg72Pro στις γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές (RPL group, 38%) και τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου (Control group, 7%).

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πειραματικής έρευνας πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης “Minitab Statistical Software”, version 18. Για τον υπολογισμό του p-value χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 (Chi-Square test), ένα μη-παραμετρικό τεστ ελέγχου υποθέσεων, το οποίο προσδιορίζει την λογαριθμική εξάρτηση (logistic regression) των μελετώμενων μεταβλητών. Ένα p-value μικρότερο από 0,05 θεωρείται στατιστικώς σημαντικό.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με p-value < 0.001, δηλαδή p-value < 0.05, μεταξύ των ποσοστών εμφάνισης του πολυμορφισμού Arg72Pro στην ομάδα των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές (RPL group) και την ομάδα ελέγχου (control group), στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (5%). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας φανερώνουν πως ο πολυμορφισμός Arg72Pro μπορεί να επιδρά στην εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών, συμβαδίζοντας έτσι με την αρχική μας υπόθεση αλλά και την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.



Chi-Square Test – Minitab 18.

Συζήτηση

Οι καθ' ἑξίν αποβολές αποτελούν ένα μείζον αναπαραγωγικό ζήτημα με σημαντική ψυχολογική επιβάρυνση για το ζευγάρι που τις βιώνει. Ποικίλοι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση τους, όπως για παράδειγμα οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, οι ορμονικές διαταραχές, γενετικά ή ανοσολογικά αίτια, ορισμένες λοιμώξεις του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος καθώς και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Παρ' όλα αυτά, τα αίτια των επαναλαμβανόμενων αποβολών παραμένουν αδιευκρίνιστα στο 50% των περιπτώσεων (Arias-Sosa et al., 2018). Οι πολυμορφισμοί έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αιτιολογία των καθ' ἑξίν αποβολών. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στο ρόλο που διαδραματίζει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 στην αναπαραγωγή καθώς και στην επίδραση που έχει ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 του συγκεκριμένου γονιδίου (Arg72Pro, rs1042522), στις καθ' ἑξίν αποβολές. Παρά το γεγονός πως η ανακάλυψη του TP53 το 1979 ταυτίστηκε με την ογκοκατασταλτική του δράση, η φυλογενετική του ανάλυση αποκαλύπτει πως πρόκειται για ένα εξελικτικά συντηρημένο γονίδιο από τα ασπόνδυλα έως τα θηλαστικά, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση και άλλων λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και της γονιμότητας (Hu, 2009).

Το TP53 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή μέσω της συμμετοχής του στο στάδιο της εμφύτευσης. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη p53, το προϊόν του TP53, δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου LIF. Τα επαρκή επίπεδα του παράγοντα LIF στη μήτρα αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για μία επιτυχή εμφύτευση. Η πλειονότητα των γυναικών με ανεξήγητη υπογονιμότητα παρουσιάζει σημαντική μείωση στα επίπεδα του παράγοντα LIF, γεγονός που επισημαίνει τον κρίσιμο ρόλο του στο στάδιο της εμφύτευσης (Mojarrad et al., 2013). Ακόμα, η p53 φαίνεται πως συμμετέχει ενεργά στην αναπαραγωγή μέσω της ρύθμισης που ασκεί στις διαδικασίες της αγγειογένεσης και της απόπτωσης, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εξασφάλιση της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης (Kay, Jeyendran, & Coulam, 2006). Επιπλέον, είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού σχηματισμού του πλακούντα (Wei et al., 2005).

Η παρούσα ερευνητική εργασία διεξήχθη με σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του πολυμορφισμού Arg72Pro και της εμφάνισης καθ' ἑξιν αποβολών στον Ελληνικό πληθυσμό. Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 72 στο εξόνιο 4 του γονιδίου TP53 (Arg72Pro), αποτελεί μία G/C παραλλαγή η οποία επάγει στην παραγόμενη πρωτεΐνη την αντικατάσταση της αργινίνης από την προλίνη. Με αυτό τον τρόπο παράγονται δύο πρωτεϊνικά παράγωγα με διακριτές βιοχημικές και βιολογικές ιδιότητες, που εμπλέκονται με διαφορετικό τρόπο στη ρύθμιση των διαδικασιών της αναπαραγωγής. Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως οι ομόζυγες γυναίκες για το γονότυπο Pro/Pro αλλά και οι ετερόζυγες με γονότυπο Arg/Pro, έχουν σημαντικά αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επανειλημμένων αποβολών σε σύγκριση με τις γυναίκες που είναι φορείς του Arg/Arg γονοτύπου (Firouzabadi, Ghasemi, Rozbahani, & Tabibnejad, 2009; Pietrowski et al., 2005; Zhang, Wu, Qiao, & Zeng, 2016). Η εμφάνιση επανειλημμένων αποβολών από τις γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο για την προλίνη (P72 αλληλόμορφο), πιθανώς οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα αυτής της παραλλαγής να επάγει την απόπτωση των κυττάρων. Η διασφάλιση της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Επομένως, η μειωμένη απόπτωση που επάγεται από την P72 παραλλαγή διαταράσσει αυτή την ισορροπία και θεωρείται πως ευθύνεται για την ανεπαρκή τροφοβλαστική διείσδυση που με τη σειρά της μπορεί να προκαλεί την εμφάνιση καθ' ἑξιν αποβολών (Zhang, Wu, Qiao, & Zeng, 2016).

Ένας ακόμα πιθανός λόγος για τον οποίο οι γυναίκες που φέρουν το P72 αλληλόμορφο εμφανίζουν καθ' ἑξιν αποβολές, αφορά στο ότι η συγκεκριμένη παραλλαγή προκαλεί διαταραχές στην πλακουντιακή δομή και κυκλοφορία με αποτέλεσμα την ανεπαρκή ανταλλαγή αερίων, ουσιών και άλλων μεταβολικών προϊόντων μεταξύ της μητέρας και του αναπτυσσόμενου εμβρύου, οδηγώντας τελικά στην πρόωρη αποβολή του (Pietrowski et al., 2005). Αξίζει να αναφερθεί πως ο πολυμορφισμός Arg72Pro έχει συσχετιστεί και με επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης του εμβρύου. Το P72 αλληλόμορφο εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποτυχίες εμφύτευσης ύστερα από προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης (Hu, 2009; Hu et al., 2007). Η επίδραση αυτή αποδίδεται στη μειωμένη ικανότητα της P72 παραλλαγής να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου LIF, του οποίου τα υψηλά επίπεδα έκφρασης στους ιστούς της μήτρας είναι απαραίτητα για την εξασφάλιση επιτυχούς εμφύτευσης (Hu, 2009).

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν πως υπάρχει μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του Arg72Pro πολυμορφισμού και της εμφάνισης καθ' έξιν αποβολών στον υπό μελέτη πληθυσμό. Επομένως, τα αποτελέσματα μας συνάδουν με τα έως τώρα ερευνητικά δεδομένα και ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής του συγκεκριμένου μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στην αιτιολογία των επανειλημμένων αποβολών. Καταλήγοντας, καθότι ο αριθμός των μελετών που αφορούν τη συσχέτιση του Arg72Pro πολυμορφισμού με τις καθ' έξιν αποβολές είναι ακόμα σχετικά μικρός, η διενέργεια περισσότερης έρευνας στο συγκεκριμένο ζήτημα κρίνεται απαραίτητη. Η μελέτη και η επιβεβαίωση της συγκεκριμένης συσχέτισης σε πληθυσμούς άλλων χωρών και διαφορετικών εθνικοτήτων θα ήταν ιδιαίτερης σημασίας προκειμένου να τεκμηριωθεί ο Arg72Pro πολυμορφισμός ως παράγοντας κινδύνου για τις καθ' έξιν αποβολές. Τέλος, η γνώση της συμμετοχής του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην εμφάνιση των καθ' έξιν αποβολών μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία ενός γενετικού προφίλ, που προσφέρει τη μοναδικότητα στο γενετικό αποτύπωμα της κάθε γυναίκας.

Βιβλιογραφία

- Alijotas-Reig, J., & Garrido-Gimenez, C. (2013). Current concepts and new trends in the diagnosis and management of recurrent miscarriage. *Obstetrical & Gynecological Survey, 68*(6), 445–466. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31828aca19>
- Apparao, K. B. C., Lovely, L. P., Gui, Y., Lininger, R. A., & Lessey, B. A. (2002). Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biology of Reproduction, 66*(2), 297–304. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.297>
- Arias-Sosa, L. A., Acosta, I. D., Lucena-Quevedo, E., Moreno-Ortiz, H., Esteban-Pérez, C., & Forero-Castro, M. (2018). Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 35*(3), 355–366. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1108-y>
- Azzam, G. A., Frank, A. K., Hollstein, M., & Murphy, M. E. (2011). Tissue-specific apoptotic effects of the p53 codon 72 polymorphism in a mouse model. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 10*(9), 1352–1355. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15344>
- Bajekal, N., & Li, T. C. (2000). Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Human Reproduction Update, 6*(6), 614–620. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.6.614>
- Bansal, A. S. (2010). Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989), 64*(5), 307–315. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00864.x>
- Bareh, G. M., Jacoby, E., Binkley, P., Chang, T. “Arthur,” Schenken, R. S., & Robinson, R. D. (2016). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: A prospective study. *Fertility and Sterility, 105*(2), 329-336.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.033>

- Basu, S., & Murphy, M. E. (2016). Genetic Modifiers of the p53 Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a026302.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026302>
- Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, N., Holmberg, P. A., Kivelä, A., & Beckman, L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Human Heredity*, 44(5), 266–270. <https://doi.org/10.1159/000154228>
- Blaschitz, A., Hutter, H., & Dohr, G. (2001). HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy (Online)*, 5(1), 67–69.
- Boltze, C., Roessner, A., Landt, O., Szibor, R., Peters, B., & Schneider-Stock, R. (2002). Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *International Journal of Oncology*, 21(5), 1151–1154.
- Bonafé, M., Salvioli, S., Barbi, C., Trapassi, C., Tocco, F., Storci, G., ... Franceschi, C. (2004). The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death and Differentiation*, 11(9), 962–973. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401415>
- Bouet, P.-E., El Hachem, H., Monceau, E., Gariépy, G., Kadoch, I.-J., & Sylvestre, C. (2016). Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: Prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertility and Sterility*, 105(1), 106–110.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.025>
- Bourdon, J.-C., Surget, S., & Khoury, M. P. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, 57.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S53876>
- Brady, C. A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M., ... Attardi, L. D. (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses

and tumor suppression. *Cell*, 145(4), 571–583.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.035>

Candau, R., Scolnick, D. M., Darpino, P., Ying, C. Y., Halazonetis, T. D., & Berger, S. L. (1997).

Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene*, 15(7), 807–816.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201244>

Carp, H., Guetta, E., Dorf, H., Soriano, D., Barkai, G., & Schiff, E. (2006). Embryonic karyotype

in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations. *Fertility and Sterility*, 85(2), 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1305>

Chen, H., Fu, J., & Huang, W. (2016). Dopamine agonists for preventing future miscarriage in

women with idiopathic hyperprolactinemia and recurrent miscarriage history. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD008883.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD008883.pub2>

Chen, M., & Heilbronn, L. K. (2017). The health outcomes of human offspring conceived by

assisted reproductive technologies (ART). *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(4), 388–402. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000228>

Chighizola, C. B., de Jesus, G. R., & Branch, D. W. (2016). The hidden world of anti-

phospholipid antibodies and female infertility: A literature appraisal. *Autoimmunity Reviews*, 15(6), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.018>

Chillemi, G., Kehrlöesser, S., Bernassola, F., Desideri, A., Dötsch, V., Levine, A. J., & Melino, G.

(2017). Structural Evolution and Dynamics of the p53 Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028308>

Christiansen, O. B. (2013). Reproductive immunology. *Molecular Immunology*, 55(1), 8–15.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.025>

Co, E. C., Gormley, M., Kapidzic, M., Rosen, D. B., Scott, M. A., Stolp, H. A. R., ... Fisher, S. J.

(2013). Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive

- cytotrophoblasts during human pregnancy. *Biology of Reproduction*, 88(6), 155.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099465>
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunological Reviews*, 262(1), 153–166.
<https://doi.org/10.1111/imr.12218>
- Coppens, M., Kaandorp, S. P., & Middeldorp, S. (2006). Inherited thrombophilias. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 33(3), 357–374.
<https://doi.org/10.1016/j.ogc.2006.05.011>
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., ... Ryan, K. M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 126(1), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.034>
- Czyzyk, A., Podfigurna, A., Genazzani, A. R., & Meczekalski, B. (2017). The role of progesterone therapy in early pregnancy: From physiological role to therapeutic utility. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 33(6), 421–424.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1291615>
- Deans, R., & Abbott, J. (2010). Review of intrauterine adhesions. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 17(5), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2010.04.016>
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., & Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(5), 2420–2424.
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.5.2420>
- Di Lello, P., Jenkins, L. M. M., Jones, T. N., Nguyen, B. D., Hara, T., Yamaguchi, H., ... Omichinski, J. G. (2006). Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the

- interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53. *Molecular Cell*, 22(6), 731–740. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.007>
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S., & Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366), 215–221. <https://doi.org/10.1038/356215a0>
- el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*, 1(1), 45–49. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>
- El Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., & Bouet, P.-E. (2017). Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. *International Journal of Women's Health*, 9, 331–345. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S100817>
- Ford, H. B., & Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: Etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2(2), 76–83.
- Fox, C., Azores-Gococo, D., Swart, L., Holoch, K., Savaris, R. F., Likes, C. E., ... Lessey, B. A. (2017). Luteal phase HCG support for unexplained recurrent pregnancy loss—A low hanging fruit? *Reproductive Biomedicine Online*, 34(3), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.11.016>
- Freed-Pastor, W. A., & Prives, C. (2012). Mutant p53: One name, many proteins. *Genes & Development*, 26(12), 1268–1286. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., & Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 12(6), 2866–2871.
- Garrido-Gimenez, C., & Alijotas-Reig, J. (2015). Recurrent miscarriage: Causes, evaluation and management. *Postgraduate Medical Journal*, 91(1073), 151–162. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2014-132672>

- Goldstein, I., Marcel, V., Olivier, M., Oren, M., Rotter, V., & Hainaut, P. (2011). Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: New landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Therapy*, *18*(1), 2–11.
<https://doi.org/10.1038/cgt.2010.63>
- Grimstad, F., & Krieg, S. (2016a). Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(7), 833–847.
<https://doi.org/10.1007/s10815-016-0720-6>
- Grimstad, F., & Krieg, S. (2016b). Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(7), 833–847.
<https://doi.org/10.1007/s10815-016-0720-6>
- Guenther, S., Vrekoussis, T., Heublein, S., Bayer, B., Anz, D., Knabl, J., ... Jeschke, U. (2012). Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: A potential role for macrophages in trophoblast apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 9069–9080.
<https://doi.org/10.3390/ijms13079069>
- Gustafsson, C., Mjösberg, J., Matussek, A., Geffers, R., Matthiesen, L., Berg, G., ... Ernerudh, J. (2008). Gene expression profiling of human decidual macrophages: Evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS One*, *3*(4), e2078.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002078>
- Gutaj, P., Zawiejska, A., Wender-Ożegowska, E., & Brązert, J. (2013). Maternal factors predictive of first-trimester pregnancy loss in women with pregestational diabetes. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, *123*(1–2), 21–28.
- Hall, P. A., McKee, P. H., Menage, H. D., Dover, R., & Lane, D. P. (1993). High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, *8*(1), 203–207.

- Hambartsoumian, E. (1998). Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 39(2), 137–143.
- Hart, R. J. (2016). Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological Reviews*, 96(3), 873–909.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2015>
- Heilmann, L., von Tempelhoff, G.-F., & Pollow, K. (2003). Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 9(2), 143–150. <https://doi.org/10.1177/107602960300900209>
- Hinck, L., Thissen, J. P., & De Hertogh, R. (2003). Identification of caspase-6 in rat blastocysts and its implication in the induction of apoptosis by high glucose. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1808–1812. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010009>
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5015), 49–53.
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 420(1), 25–27.
- Hoozemans, D. A., Schats, R., Lambalk, C. B., Homburg, R., & Hompes, P. G. A. (2004). Human embryo implantation: Current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(6), 692–715.
- Hu, W. (2009). The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001073. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001073>
- Hu, W., Feng, Z., Atwal, G. S., & Levine, A. J. (2008). p53: A new player in reproduction. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(7), 848–852. <https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5658>
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K., & Levine, A. J. (2007). P53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, 450(7170), 721–724. <https://doi.org/10.1038/nature05993>

- Imam, S. N., Shamsi, M. B., Kumar, K., Deka, D., & Dada, R. (2011). Idiopathic recurrent pregnancy loss: Role of paternal factors; a pilot study. *Journal of Reproduction & Infertility*, *12*(4), 267–276.
- Jaslow, C. R. (2014). Uterine factors. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, *41*(1), 57–86. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2013.10.002>
- Jeffrey, P. D., Gorina, S., & Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5203), 1498–1502.
- Jones, G. E. S. (1949). Some newer aspects of the management of infertility. *Journal of the American Medical Association*, *141*(16), 1123–1129, illust. <https://doi.org/10.1001/jama.1949.02910160013004>
- Joruiz, S. M., & Bourdon, J.-C. (2016). p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026039>
- Jun, S. H., Ginsburg, E. S., Racowsky, C., Wise, L. A., & Hornstein, M. D. (2001). Uterine leiomyomas and their effect on in vitro fertilization outcome: A retrospective study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *18*(3), 139–143. <https://doi.org/10.1023/a:1009403819377>
- Kacprzak, M., Chrzanowska, M., Skoczylas, B., Moczulska, H., Borowiec, M., & Sieroszewski, P. (2016). Genetic causes of recurrent miscarriages. *Ginekologia Polska*, *87*(10), 722–726. <https://doi.org/10.5603/GP.2016.0075>
- Kamalanathan, S., Sahoo, J. P., & Sathyapalan, T. (2013). Pregnancy in polycystic ovary syndrome. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *17*(1), 37–43. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.107830>
- Kang, H.-J., Feng, Z., Sun, Y., Atwal, G., Murphy, M. E., Rebbeck, T. R., ... Hu, W. (2009). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), 9761–9766. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904280106>
- Kang, H.-J., & Rosenwaks, Z. (2018). P53 and reproduction. *Fertility and Sterility*, 109(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.026>
- Kaser, D. (2018). The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 45(1), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.10.007>
- Kay, C., Jeyendran, R. S., & Coulam, C. B. (2006). P53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(4), 492–496. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60635-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60635-9)
- Ke, R. W. (2014). Endocrine basis for recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 41(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2013.10.003>
- Kemp, M., & Thomas, W. (2018). Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Lupus*, 27(1_suppl), 28–31. <https://doi.org/10.1177/0961203318801664>
- Khoury, M. P., & Bourdon, J.-C. (2010). The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000927. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000927>
- King, K., Smith, S., Chapman, M., & Sacks, G. (2010). Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(1), 52–58. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep349>
- Kodama, T., Hara, T., Okamoto, E., Kusunoki, Y., & Ohama, K. (1998). Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.1036>

- Kolitz, T., Shiber, S., Sharabi, I., Winder, A., & Zandman-Goddard, G. (2019). Cardiac Manifestations of Antiphospholipid Syndrome With Focus on Its Primary Form. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00941>
- Krieg, S., & Westphal, L. (2015). Immune Function and Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*, *33*(4), 305–312. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1554917>
- Kung, C.-P., Khaku, S., Jennis, M., Zhou, Y., & Murphy, M. E. (2015). Identification of TRIML2, a novel p53 target, that enhances p53 SUMOylation and regulates the transactivation of proapoptotic genes. *Molecular Cancer Research: MCR*, *13*(2), 250–262. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0385>
- Kuribayashi, K., & El-Deiry, W. S. (2008). Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *615*, 201–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_10
- La Rocca, C., Carbone, F., Longobardi, S., & Matarese, G. (2014). The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunology Letters*, *162*(1 Pt A), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.06.013>
- Laird, S. M., Tuckerman, E. M., Cork, B. A., Linjawi, S., Blakemore, A. I. F., & Li, T. C. (2003). A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update*, *9*(2), 163–174. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg013>
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, *278*(5701), 261–263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>
- Leng, R. P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., ... Benchimol, S. (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*, *112*(6), 779–791.
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, *351*(6326), 453–456. <https://doi.org/10.1038/351453a0>

- Levine, Arnold J. (2009). The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*, 384(2), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.034>
- Levine, Arnold J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 749–758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>
- Marcál, L., Nothaft, M. A., Coelho, F., Volpato, R., & Iyer, R. (2011). Mullerian duct anomalies: MR imaging. *Abdominal Imaging*, 36(6), 756–764. <https://doi.org/10.1007/s00261-010-9681-x>
- Marcel, V., Nguyen Van Long, F., & Diaz, J.-J. (2018). 40 Years of Research Put p53 in Translation. *Cancers*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cancers10050152>
- Matlashewski, G. J., Tuck, S., Pim, D., Lamb, P., Schneider, J., & Crawford, L. V. (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Molecular and Cellular Biology*, 7(2), 961–963. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.961>
- Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., & Benchimol, S. (1984). Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: Expression of the human p53 gene. *The EMBO Journal*, 3(13), 3257–3262.
- McQueen, D. B., Bernardi, L. A., & Stephenson, M. D. (2014). Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. *Fertility and Sterility*, 101(4), 1026–1030. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.031>
- McQueen, D. B., Perfetto, C. O., Hazard, F. K., & Lathi, R. B. (2015). Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 104(4), 927–931. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.044>
- Meek, D. W., & Anderson, C. W. (2009). Posttranslational modification of p53: Cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a000950. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000950>

- Mojarrad, M., Hassanzadeh-Nazarabadi, M., & Tafazoli, N. (2013). Polymorphism of genes and implantation failure. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(1), 1–8.
- Mor, G., & Abrahams, V. M. (2003). Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 1, 119.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-119>
- Munné, S., Escudero, T., Sandalinas, M., Sable, D., & Cohen, J. (2000). Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90(3–4), 303–308. <https://doi.org/10.1159/000056793>
- Naessens, A., Foulon, W., Cammu, H., Goossens, A., & Lauwers, S. (1987). Epidemiology and pathogenesis of ureaplasma urealyticum in spontaneous abortion and early preterm labor. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 66(6), 513–516.
<https://doi.org/10.3109/00016348709015726>
- Nardelli, A. A., Stafinski, T., Motan, T., Klein, K., & Menon, D. (2014). Assisted reproductive technologies (ARTs): Evaluation of evidence to support public policy development. *Reproductive Health*, 11(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1742-4755-11-76>
- Nigro, G., Mazzocco, M., Mattia, E., Di Renzo, G. C., Carta, G., & Anceschi, M. M. (2011). Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 24(8), 983–989.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2010.547963>
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., Hamosh, A., & Nussbaum, R. L. (2016). *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Retrieved from <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C2009059798X>

- Papadakis, E. D., Soultziz, N., & Spandidos, D. A. (2002). Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: The Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *British Journal of Cancer*, *87*(9), 1013–1018. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600595>
- Pietrowski, D., Bettendorf, H., Riener, E.-K., Keck, C., Hefler, L. A., Huber, J. C., & Tempfer, C. (2005). Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *20*(4), 848–851. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh696>
- Pluchino, N., Drakopoulos, P., Wenger, J. M., Petignat, P., Streuli, I., & Genazzani, A. R. (2014). Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones (Athens, Greece)*, *13*(3), 314–322. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1505>
- Polgar, K., & Hill, J. A. (2002). Identification of the white blood cell populations responsible for Th1 immunity to trophoblast and the timing of the response in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, *53*(1), 59–64. <https://doi.org/10.1159/000049413>
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, *99*(1), 63. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.023>
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2015). Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, *103*(4), e27-32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.128>
- Rai, R., & Wakeford, T. (2001). Recurrent miscarriage. *Current Obstetrics & Gynaecology*, *11*(4), 218–224. <https://doi.org/10.1054/cuog.2001.0185>
- Rai, Raj, & Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet (London, England)*, *368*(9535), 601–611. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69204-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69204-0)

- Ramasamy, R., Scovell, J. M., Kovac, J. R., Cook, P. J., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2015). Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, *103*(4), 906-909.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.029>
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., & Fisher, S. J. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*(6), 744–754. <https://doi.org/10.1172/JCI22991>
- Reisman, D., Bálint é null, Loging, W. T., Rotter, V., & Almon, E. (1996). A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Genomics*, *38*(3), 364–370.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(5), 402–412. <https://doi.org/10.1038/nrm2395>
- Robertson, S. A., Care, A. S., & Moldenhauer, L. M. (2018). Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(10), 4224–4235. <https://doi.org/10.1172/JCI122182>
- Shapira, E., Ratzon, R., Shoham-Vardi, I., Serjienko, R., Mazor, M., & Bashiri, A. (2012). Primary vs. Secondary recurrent pregnancy loss—Epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome. *Journal of Perinatal Medicine*, *40*(4), 389–396. <https://doi.org/10.1515/jpm-2011-0315>
- Sharif, K., Sharif, Y., Watad, A., Yavne, Y., Lichtbroun, B., Bragazzi, N. L., ... Shoenfeld, Y. (2018). Vitamin D, autoimmunity and recurrent pregnancy loss: More than an association. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *80*(3), e12991. <https://doi.org/10.1111/aji.12991>

- Sharma, S. (2014). Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(2–4), 219–229.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.140109ss>
- Sheikh, M. S., Burns, T. F., Huang, Y., Wu, G. S., Amundson, S., Brooks, K. S., ... el-Deiry, W. S. (1998). P53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Research*, 58(8), 1593–1598.
- Sherwin, J. R. A., Freeman, T. C., Stephens, R. J., Kimber, S., Smith, A. G., Chambers, I., ... Sharkey, A. M. (2004). Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(9), 2185–2195. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0110>
- Shynlova, O., Nedd-Roderique, T., Li, Y., Dorogin, A., & Lye, S. J. (2013). Myometrial immune cells contribute to term parturition, preterm labour and post-partum involution in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 90–102.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01650.x>
- Själänder, A., Birgander, R., Kivelä, A., & Beckman, G. (1995). P53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Human Heredity*, 45(3), 144–149.
<https://doi.org/10.1159/000154275>
- Skjöldebrand-Sparre, L., Fridell, E., Nyman, M., & Wahren, B. (1996). A prospective study of antibodies against parvovirus B19 in pregnancy. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 75(4), 336–339. <https://doi.org/10.3109/00016349609033326>
- Soper, D. E., Mayhall, C. G., & Dalton, H. P. (1989). Risk factors for intraamniotic infection: A prospective epidemiologic study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(3), 562–566; discussion 566-568. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90356-](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90356-)

- Sperka, T., Wang, J., & Rudolph, K. L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(9), 579–590.
<https://doi.org/10.1038/nrm3420>
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., ... Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, *393*(6682), 229–234. <https://doi.org/10.1038/30400>
- Surget, S., Khoury, M. P., & Bourdon, J.-C. (2013a). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, *7*, 57–68.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S53876>
- Surget, S., Khoury, M. P., & Bourdon, J.-C. (2013b). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, *7*, 57–68.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S53876>
- Svensson-Arvelund, J., Mehta, R. B., Lindau, R., Mirrasekhian, E., Rodriguez-Martinez, H., Berg, G., ... Ernerudh, J. (2015). The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *194*(4), 1534–1544.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401536>
- Tanaka, K., Yamada, H., Minami, M., Kataoka, S., Numazaki, K., Minakami, H., & Tsutsumi, H. (2006). Screening for vaginal shedding of cytomegalovirus in healthy pregnant women using real-time PCR: Correlation of CMV in the vagina and adverse outcome of pregnancy. *Journal of Medical Virology*, *78*(6), 757–759.
<https://doi.org/10.1002/jmv.20619>
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, *20*(15), 1803–1815. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204252>

- Teles, A., & Zenclussen, A. C. (2014). How cells of the immune system prepare the endometrium for implantation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(5), 358–364. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383735>
- Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., & Matlashewski, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1092–1100. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.2.1092>
- Tur-Torres, M. H., Garrido-Gimenez, C., & Alijotas-Reig, J. (2017). Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 42, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007>
- van den Berg, M. M. J., van Maarle, M. C., van Wely, M., & Goddijn, M. (2012). Genetics of early miscarriage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(12), 1951–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.001>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., & Debussche, L. (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *The EMBO Journal*, 17(16), 4668–4679. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4668>
- Vieler, M., & Sanyal, S. (2018). P53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers*, 10(9), 288. <https://doi.org/10.3390/cancers10090288>
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). P53 in health and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(4), 275–283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Walker, K. K., & Levine, A. J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 93(26), 15335–15340.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15335>

Woidacki, K., Popovic, M., Metz, M., Schumacher, A., Linzke, N., Teles, A., ... Zenclussen, A. C.

(2013). Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. *Cell Death & Disease*, 4, e462. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.214>

Wolf, D., Harris, N., Goldfinger, N., & Rotter, V. (1985). Isolation of a full-length mouse cDNA

clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 127–132.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., ... el-Deiry, W. S.

(1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genetics*, 17(2), 141–143. <https://doi.org/10.1038/ng1097-141>

Yamamoto-Tabata, T., McDonagh, S., Chang, H.-T., Fisher, S., & Pereira, L. (2004). Human

cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Journal of Virology*, 78(6), 2831–2840. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.2831-2840.2004>

Yan, L., Yu, Q., Zhang, Y.-N., Guo, Z., Li, Z., Niu, J., & Ma, J. (2018). Effect of type 3 intramural

fibroids on in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcomes: A retrospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 109(5), 817-822.e2.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.007>

Yue, X., Wu, L., & Hu, W. (2015). The regulation of leukemia inhibitory factor. *Cancer Cell &*

Microenvironment, 2(3). <https://doi.org/10.14800/ccm.877>

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., ... van

der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>

- Zhang, Y., Wu, Y.-Y., Qiao, F.-Y., & Zeng, W.-J. (2016). Association between p53 polymorphism at codon 72 and recurrent spontaneous abortion. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 36(3), 402–405. <https://doi.org/10.1007/s11596-016-1599-2>
- Zidi-Jrah, I., Hajlaoui, A., Mougou-Zerelli, S., Kammoun, M., Meniaoui, I., Sallem, A., ... Ibal-Romdhane, S. (2016). Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 105(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.041>
- Ziemer, M. A., Mason, A., & Carlson, D. M. (1982). Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(18), 11176–11180.