

# I

---

---

## Παράγοντες εμφύτευσης γονιμοποιημένου ωαρίου

### 1. Εισαγωγή

Η εμφύτευση είναι μία πολύπλοκη και έξοχα προγραμματισμένη διαδικασία. Το σύστημα της μητέρας βρίσκεται σε εγρήγορση για την παρουσία του γονιμοποιημένου ωαρίου και ανταποκρίνεται ανάλογα. Το έμβρυο ωριμάζει κατά τη διάρκεια της διαδρομής του στη σάλπιγγα και πλέοντας ελεύθερα στη μήτρα, περιμένει την ανάπτυξη των κατάλληλων συνθηκών για εγκατάσταση, προσκόλληση και διείδυση. Έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της επικοινωνίας μεταξύ των μητρικών και εμβρυϊκών κυτταρικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της κριτικής αυτής περιόδου. Επιπρόσθετα, στα καλώς μελετημένα ενδοκρινικά κυκλώματα και τα προϊόντα του μεταβολισμού του αραχιδονικού, οι πολυπεπτιδικοί παράγοντες που καλούνται κυτταροκίνες δίνουν σημαντικά μηνύματα. Η σύνθεση, η έκθεση στις κυτταρικές μεμβράνες και η απελευθέρωση στον περιβάλλοντα χώρο των ισχυρών αυτών ουσιών και των υποδοχέων τους ενορχηστρώνονται προσεκτικά στο περί την εμφύτευση ενδομήτριο και το έμβρυο.

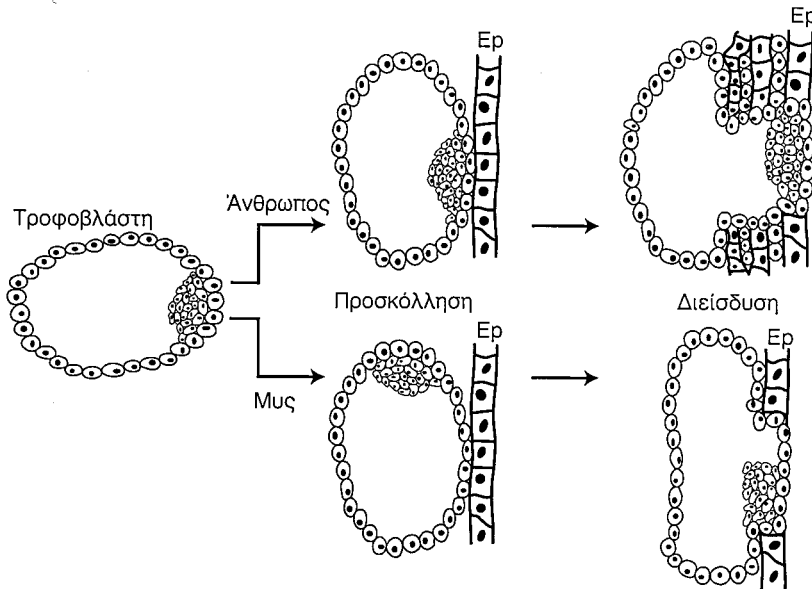
Αυτή η μελέτη εστιάζεται στην έκφραση, ρύθμιση και τις λειτουργίες των διαλυτών παραγόντων που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αρχόμενη κήση. Δίνεται κυρίως έμφαση σε νέες γνώσεις που αναδύονται από την έρευνα των κυτταροκινών<sup>1-11</sup>.

## 2. Πρότυπα συστήματα

Καινοτόμα *in vivo* και *in vitro* συστήματα των ενδοκρινικών και προσταγλανδινικών / λευκοτριενικών συστατικών – στοιχείων της αναπαραγωγής, έχουν αποφέρει πολλές χρήσιμες πληροφορίες τις περασμένες δεκαετίες<sup>12</sup>. Αυτές και νεότερες μελέτες των κυτταροκινών έχουν ωφελήσει, καθώς ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, μονοκλωνικά αντισώματα και γονιδιακοί ανιχνευτές έγιναν ευρέως διαθέσιμοι. Με αυτά τα νέα «εργαλεία» έχουν αναγνωρισθεί, με ιλιγγιώδεις ρυθμούς, ειδικές κυτταροκίνες και οι υποδοχείς τους στα ανθρώπινα θήλαα και άρρενα αναπαραγωγικά συστήματα. Έχει γίνει εφικτή η απόκτηση ορισμένων γνώσεων σχετικά με μηχανισμούς που ρυθμίζουν την παραγωγή των κυτταροκινών, μελετώντας γυναίκες με έμμηνο κύκλο και εκείνες που αντιμετωπίζονται με συγκεκριμένα φάρμακα, όπως ο ανταγωνιστής στεροειδών RU 38486 (μιφεπριστόνη). Πάντως τα περισσότερα πειράματα στις διαδικασίες ρύθμισης και σχεδόν όλες οι λειτουργικές μελέτες απαιτούν πειραματόζωα, έτσι ώστε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν όλα τα σχετικά στοιχεία. Οι μύες και οι επίμυες είναι εξαιρετα μοντέλα για να μελετηθεί η ανθρώπινη εγκυμοσύνη, γιατί οι οιστριονικοί τους κύκλοι ρυθμίζονται από τις ωθητικές στεροειδείς ορμόνες, την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη (Σχ. 1). Το σχήμα 2 δείχνει τις ομοιότητες και τις διαφορές ανάμεσα στην εμφύτευση στους μύες και τον άνθρωπο<sup>13</sup>. Όπως και στους ανθρώπους, η εμφύτευση στους μύες και τους επίμυες περιλαμβάνει αντικατάσταση του ενδοαυλικού επιθηλίου της μήτρας από το εκ της βλαστοκύστης προερχόμενο τροφοεξώδεσμα. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα του ανθρώπου, όχι όμως και των μυών, παρενθέτουν το επιθήλιο και μεταναστεύουν στο ενδομητρικό στρώμα. Ο σχηματισμός του πλακούντα στους επίμυες και τους μύες είναι επίσης παρόμοιος με εκείνον του ανθρώπου, διότι είναι του αιμοχοριακού τύπου, στον οποίο τα τροφοβλαστικά κύτταρα, που προέρχονται από την τροφοε-



**Σχήμα 1:** Εικόνα των επιπέδων των στεροειδών ορμονών του θήλαος φύλου στο αίμα μυών με κύκλο. Η διάρκεια του οιστριονικού κύκλου στους μύες είναι περίπου 5 ημέρες, αλλά ποικίλει μεταξύ ζώων και γενών. Η γονιμοποίηση συμβαίνει στον οίστρο και η εμφύτευση λαμβάνει χώρα στην 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> ημέρα.



**Σχήμα 2:** Εμφύτευση στον άνθρωπο και τους μύες. Να σημειωθεί ότι η διείσδυση στον άνθρωπο προϋποθέτει διήθηση των επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας από την τροφοβλάστη.

ξωδερμική σιβάδα της βλαστοκύστης, λούονται συνεχώς στο μητρικό αίμα. Το κύριο μειονέκτημα στη χρήση μυών και επίμυων είναι ότι οι οιστριονικοί κύκλοι τους δεν συμπεριλαμβάνουν φάση απόπτωσης. Επίσης, παρόλο που τα μοντέλα έκφρασης των μυών είναι πολύ όμοια με εκείνα του ανθρώπου, δεν είναι απολύτως ταυτόσημα.

Οι μύες με παράδοξη έκφραση των γονιδίων των κυτταροκινών είναι ισχυρά μοντέλα μελέτης της λειτουργίας των κυτταροκινών στην κήση. Η στόχευση ειδικών γονιδίων με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα προς παραγωγή διαγονιδιακών σειρών (transgenic strains) με ειδικό γονίδιο «knockout» είναι μια καινοτόμος προσπάθεια για να μελετηθεί η ανεπάρκεια και διατίθενται επίσης φυσικά μεταλλαγμένα μοντέλα για αυτούς τους τύπους πειραμάτων. Μπορούν ακόμα να παραχθούν υπερεκφραζόμενα transgenic strains, αλλά σε πολλά από αυτά είναι δύσκολο να είναι κανείς βέβαιος ότι τα αποτελέσματα δεν οφείλονται απλά στην γενωμική θέση του DNA του ειδικού των κυτταροκινών.

### 3. Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών και των υποδοχέων τους

Ο όρος «κυτταροκίνη» δεν έχει αυστηρό ορισμό, αλλά γενικά περιλαμβάνει πολυπεπτιδικούς παράγοντες MB 15-30 kd που βρίσκονται συνδεδεμένοι σε κύτταρα ή διαλυτές μορφές και ασκούν αυτοκρινή (αυτοστόχευση) και παρακρινή (στόχευση σε άλλα κύτταρα) δράση. Η έκφραση του γονιδίου των κυτταροκινών είναι διαλείπουσα και η παραγωγή βιολογικού δραστικού παράγοντα ελέγχεται στενά. Τα επίπεδα της ρύθμισης περιλαμβάνουν έλεγχο στη μεταγραφή, την αποθήκευση και σταθερότητα του mRNA, τις μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις, τη μετάφραση, την πρωτεϊνική αποθήκευση και την ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια λειτουργία των πρόδρομων πεπτιδίων<sup>1,4</sup>.

Όλες αυτές οι κυτταροκίνες, που θεωρούνται σημαντικές για επιτυχή εγκυμοσύνη, ανακαλύφθηκαν αρχικά σε άλλου είδους πλαίσια. Για παράδειγμα, οι παράγοντες διέγερσης αποικιών (CSF), όπως εκείνοι για κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα (GM-CSF), κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα / μακροφάγα (CSF-1), αρχικά βρέθηκαν στο μυελό των οστών, άλλο ένα μέρος έντονης κυτταρικής ωρίμανσης και διαφοροποίησης. Μελέτες σε μύες έδειξαν ότι το επιθήλιο της μήτρας είναι ένας ιδιαίτερα ενεργός παραγωγός των CFS<sup>5,9</sup>. Προκαλεί επίσης έκπληξη, το ότι αυτή η κυτταρική στιβάδα συνθέτει κι άλλες κυτταροκίνες, που αναφέρθηκαν για πρώτη φορά ως προϊόντα ανοσοποιητικών κυττάρων σχετιζόμενα με φλεγμονή, όπως η ιντερλευκίνη-6<sup>9</sup>. Ο παράγοντας-α νέκρωσης όγκου (TNF-α), ή πιθανόν ένα δομικά και λειτουργικά όμοιο μόριο, έχει επίσης ανακαλυφθεί σ' αυτήν την κυτταρική στιβάδα<sup>14,15</sup>. Η παραγωγή των κυτταροκινών δεν περιορίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας. Τα επιθηλιοειδή κύτταρα της πλακουντιακής τροφοβλάστης παράγουν πολλούς επίσης από τους ίδιους παράγοντες<sup>10,16</sup>. Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις, αδιαφοροποιήτα κύτταρα του στρώματος της μήτρας και τα παράγωγά τους, κύτταρα του φθαρτού, και τα αιμοποιητικά κύτταρα της μήτρας και του πλακούντα, μεταγράφουν και μεταφράζουν γονίδια κυτταροκινών. Αυτοί οι ίδιοι κυτταρικοί τύποι συνεισφέρουν αυξητικούς παράγοντες για την αιμοποίηση στο μυελό των οστών. Παρόλο που πιστεύεται ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα, ειδικά τα T-κύτταρα και τα μακροφάγα, μπορούν να διεγερθούν προς παραγωγή σημαντικά υψηλότερων επιπέδων κυτταροκινών από άλλους τύπους κυττάρων και ότι οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί στα αιμοποιητικά κύτταρα είναι πιθανόν διαφορετικοί<sup>14</sup>, καμιά από αυτές τις απόψεις δεν υποστηριζέ-

ται επαρκώς με συγκριτικές μελέτες της παραγωγής από αρχικές καλλιέργειες απομονωμένων κυττάρων.

Πρόσφατα οι Wegmann και συν.<sup>17</sup>, πρότειναν ότι την κύηση την χαρακτηρίζει η κατά προτίμηση τοπική παραγωγή κυτταροκινών, που παραδοσιακά σχετίζονται με τις υποομάδες των TH-2 βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, όπως η ιντερλευκίνη-4 και ιντερλευκίνη-10. Παρόλο που η απλότητα της την καθιστά ελκυστική ως σύλληψη, η αποδοχή της απαιτεί να παραβλεφθούν αρκετές πληροφορίες που αφορούν στη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων κυτταροκινών τα οποία σχετίζονται με TH-1, όπως ο TNF<sup>14</sup> και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ)<sup>18,19</sup>. Μια πιο λογική ερμηνεία των πληροφοριών που αποκτήθηκαν ως τώρα είναι ότι η κυτταροκίνες δεν είναι εγγενώς ούτε ωφέλιμες, ούτε επιβλαβείς. Αντιθέτως, ο συνδυασμός συγέντρωσης κυτταροκινών και συγγένειας με τους υποδοχείς προφανώς καθορίζει το εάν προωθείται μια φυσιολογική διαδικασία ή επακολουθεί ασθένεια. Αυτό είναι ιδιαίτερα πιθανό με τις TH-2 κυτταροκίνες που είναι συχνά βιολογικά ενεργείς σε δόσεις της τάξης του picomole. Η δυσκολία στην ανακάλυψη αυτών των κυτταροκινών στους φυσιολογικούς ιστούς μπορεί να οφείλεται στην ευρεία κυτταρική έκφραση των υποδοχέων και στη «σάρωση» των κυτταροκινών από διαλυτούς υποδοχείς, όπως συζητείται πιο κάτω.

Οι κυτταροκίνες δεσμεύονται από ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι, μπορούν να εισέλθουν στις κυτταρικές μεμβράνες ή να απελευθερωθούν σε διαλυτή μορφή<sup>4</sup>. Έχουν αναγνωριστεί οικογένειες υποδοχέων. Μια ομάδα που αποτελείται από τις ιντερλευκίνες-2, 4 και 7 χρησιμοποιεί μια κοινή υπομονάδα<sup>20</sup>. Επομένως, βλάβες σ' αυτή την υπομονάδα έχουν βαρύνουσες επιδράσεις. Οι συνδεδεμένοι με τη μεμβράνη υποδοχείς μεταβιβάζουν τα μηνύματα της κυτταροκίνης στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω πολλαπλών δρόμων, οι οποίοι περιλαμβάνουν ενεργοποίηση της κινάσης, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και διέγερση παραγωγής παραγόντων πυρηνικής μεταγραφής και κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων. Οι διαλυτοί υποδοχείς, που είναι περισσότερο κοινοί για τις κυτταροκίνες τις σχετιζόμενες με φλεγμονή όπως ο TNF, η ιντερλευκίνη-1 και η IFN-γ, πιστεύεται ότι δρουν ως φυσικοί ελεγκτές που εμποδίζουν τη βλάβη από υπερδραστικούς παράγοντες. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός, ότι οι διαλυτοί υποδοχείς για TNF<sup>14</sup> και για άλλες κυτταροκίνες είναι άφθονοι στο ανθρώπινο αμνιακό υγρό και τα ούρα, δοθέντος ότι οι δυναμικά τοξικές κυτταροκίνες παράγονται για φυσιολογικούς σκοπούς κατά τη διάρκεια της κύησης.

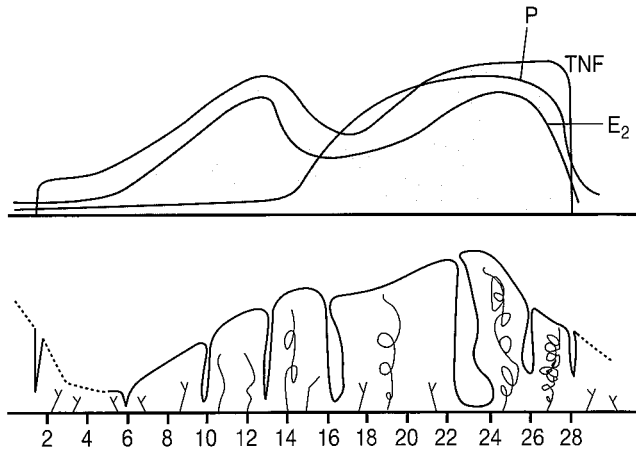
Τις κυτταροκίνες τις διαχωρίζουν ιδιαίτερα βιοχημικά χαρακτηριστικά από δύο άλλους τύπους διαμεσολαβητικών ουσιών που βρίσκονται στα άρρενα και θήλεα αναπαραγωγικά συστήματα: τις στεροειδείς ορμόνες και τους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος. Πάντως από λειτουργικής άποψης είναι μερικές φορές πολύ δύσκολο να αναλυθούν αυτοί οι παράγοντες. Όπως περιγράφεται λεπτομερέστερα πιο κάτω, είναι πολύ κοινές οι αμοιβαίες ρυθμιστικές σχέσεις μεταξύ των κυτταροκινών και των στεροειδών ορμονών του θήλεος φύλου. Παρόλο που γνωρίζουμε λιγότερα για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυτταροκινών και των βιοδραστικών λιπιδίων στην κύηση, είναι ασφαλές να προβλέψουμε, ότι όπως έχει δειχθεί στα αιμοποιητικά κύτταρα, αυτές θα αναδειχθούν πολύ σημαντικές.

#### **4. Προετοιμασία της μήτρας για την εγκυμοσύνη**

Πάνω απ' όλα, οι στεροειδείς ορμόνες οιστραδιόλη και προγεστερόνη ελέγχουν τις κυκλικές αλλαγές που συμβαίνουν στη μήτρα κατά την προετοιμασία για την εγκυμοσύνη. Οι δύο ορμόνες έχουν διαφορετικές δράσεις στη σύνθεση του DNA σε καθορισμένες σειρές κυττάρων του ενδομητρίου. Η οιστραδιόλη διεγείρει την υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας, ενώ η δράση της επιτρέπει στην προγεστερόνη να διεγείρει τη σύνθεση DNA στα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου<sup>11,21,22</sup> που απαιτείται για την εμφύτευση. Άλλες αλλαγές που σχετίζονται με τον κύκλο περιλαμβάνουν τη «στρατολόγηση» επιλεγμένων υποπληθυσμών αιμοποιητικών κυττάρων, οίδημα και αυξημένη αγγείωση.

#### **5. Ορμόνες που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου των κυτταροκινών**

Τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει μια νέα σημαντική θεώρηση στην αναπαραγωγή: οι ορμόνες συχνά διεκπεραιώνουν τις διαφορετικές λειτουργίες τους ρυθμίζοντας την παραγωγή αυξητικών παραγόντων, (κυτταροκινών και υποδοχέων) γι' αυτά τα ισχυρά πολυπεπτίδια<sup>11</sup>. Μερικές από τις ορμονικώς ρυθμιζόμενες μητροπλακουντιακές κυτταροκίνες αναφέρονται από τους Hunt και συν.<sup>23</sup>. Αν και τα κύτταρα του ενδομητρίου που εκτίθενται στη δράση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης διεγείρονται προς παραγωγή ενός εντυπωσιακού φάσματος κυτταροκινών, μόνη της η προγεστερόνη σπάνια είναι διεγερτική και ίσως ακόμα και να είναι ανασταλτι-



**Σχήμα 3:** Ανθρώπινος καταμήνιος κύκλος. (Πάνω) Σχέσεις μεταξύ των ορμονοκαθοδουμένων κυκλικών αλλαγών στο ανθρώπινο ενδομήτριο και επίπεδα του TNF mRNA. Η συμφωνία μεταξύ των επιπέδων της οιστραδιόλης ( $E_2$ ) στον ορό και της προγεστερόνης (P) και η ένταση των σημάτων της TNF mRNA in situ υβριδοποίησης δίνουν τις πρώτες αποδείξεις της ορμονικής ρύθμισης αυτού του γονιδίου στο ενδομήτριο. (Κάτω) Παράλληλες αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου ενδομητρίου.

κή. Αυτό ίσως να σχετίζεται με την ικανότητά της να ανταγωνίζεται την οιστραδιόλη. Παράδειγμα ορμονικής ρύθμισης βρίσκεται στις μελέτες του TNF, οι οποίες έδειξαν ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου στο ενδομήτριο γυναικών με κύκλο (Σχ. 3) και στα κύτταρα του επιθηλίου και του στρώματος του ενδομητρίου επίμυων και μυών ελέγχεται από την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη<sup>14</sup>.

## 6. Κυτταροκίνες που ρυθμίζουν τα αιμοποιητικά κύτταρα της μήτρας

Οι κυτταροκίνες ίσως θεωρούνται ότι, ως δεύτεροι αγγελιοφόροι, διεκπεραιώνουν ειδικές αυτοκρινείς και παρακρινείς λειτουργίες που σχετίζονται με την προετοιμασία για εγκυμοσύνη (Σχ. 4). Παρόλο που αυτές είναι πολλές και ποικίλες, μια πιθανή λειτουργία είναι η επίδρασή τους στις αναλογίες και την κατανομή των αιμοποιητικών κυττάρων στη μήτρα. Στους μύες, τους επίμυες και τους ανθρώπους, τα μακροφάγα είναι τα κύρια συστατικά στοιχεία της μήτρας<sup>24</sup>. Τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα πολλά στο τέλος της οιστριονικής και την αρχή της μη οιστριονικής περιόδου, 24 ώρες ή και λιγότερες μετά την αιχμή των επιπέδων οιστραδιόλης στο αίμα.