



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

&



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ

***ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ***

ΥΠΟ

ΔΕΥΤΕΡΑΙΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ-ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΝ. Μ/Γ ΚΛΙΝΙΚΗΣ Δ.Π.Θ.-ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2017

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα:

ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Αν. Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής,

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΜΕΛΗ:

ΤΣΙΚΟΥΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Αν. Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΠΑΓΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΟΛΓΑ

Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Έρευνα στη Γυναικεία Αναπαραγωγή» στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας. Λαμπροπούλου Μαρίας.

Η προσπάθεια αυτή θα κατέληγε ατελέσφορη, χωρίς τη καθοδήγηση της κας. Λαμπροπούλου, η οποία επί σειρά ετών δείχνει αμέριστη εμπιστοσύνη και υποστήριξη στο πρόσωπό μου, ενθαρρύνει κάθε ερευνητικό μου εγχείρημα και παρέχει μέσα από τη πορεία της ζωντανό παράδειγμα επιστημονικής επάρκειας και ηθικής ακεραιότητας. Οφείλω να της εκφράσω από καρδιάς την ευγνωμοσύνη μου.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στους Καθηγητές μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Αν. Καθηγητή Μαιευτικής/Γυναικολογίας κ. Παναγιώτη Τσικούρα που με την άοκνη επιστημονική του δράση συμμετείχε καθοριστικά στη περάτωση αυτής της μελέτης και την Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας κα. Παγωνοπούλου Όλγα, που με τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της συνέβαλε στην αρτιότερη ολοκλήρωση αυτού του εκπονήματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στο Καθηγητή Στατιστικής κ. Γρηγόρη Τρυψιάνη για το χρόνο που αφιέρωσε στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, καθώς και στην κα. Ρήγα Μαρία για τη πολύτιμη βοήθεια της στη γραμματειακή υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συμπαράσταση και την υποστήριξη τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

**« You cannot prove that all swans are white by counting white swans.
But you can prove that not all swans are white by counting one black swan.»**

Karl Popper

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....6

ABSTRACT.....7

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ.....9-16

2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ.....17-20

3. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ.....21-27

4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ ΚΑΙ ΣΕ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ.....28-36

5. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....37

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΣΚΟΠΟΣ.....39

7. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....40-45

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....46-62

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ63-65

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....66-73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Ανοσοϊστοχημική μελέτη κι αξιολόγηση του ρόλου της απόπτωσης κατά τη διαφοροποίηση τη τροφοβλάστης σε φυσιολογικές και παθολογικές κυήσεις.

Σκοπός: Το παρόν εκπόνημα σκοπό είχε την ανάδειξη του ρόλου του αποπτωτικού μηχανισμού στη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης μέσα από τη συγκριτική μελέτη ιστών από φυσιολογικές και παθολογικές κυήσεις.

Υλικό και Μέθοδοι: Με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκαν συνολικά 72 δείγματα τροφοβλαστικού ιστού, εκ των οποίων 42 προέρχονταν από αυτόματες αποβολές πρώτου τριμήνου και τα υπόλοιπα 30 από ηθελημένες διακοπές στο ίδιο τρίμηνο κύησης. Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν η τεχνική TUNEL κι ο δείκτης M30.

Αποτελέσματα: Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναδείχθηκε έντονη αποπτωτική έκφραση και για τους δυο δείκτες στους ιστούς που προέρχονταν από αυτόματες αποβολές, έναντι των φυσιολογικών. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση ανάδειξε αξιόλογη διαφορά στο μέσο όρο ηλικίας και στον αριθμό του τόκου στις γυναίκες με αυτόματες αποβολές έναντι των μαρτύρων.

Συμπέρασμα: Αν και η απόπτωση αποτελεί βασικό μηχανισμό στην ομαλή ανάπτυξη της τροφοβλάστης και συνεπώς της κύησης, φαίνεται πως η έντονη αποπτωτική δραστηριότητα εμπλέκεται άμεσα στις αυτόματες αποβολές.

ABSTRACT

Title: Immunohistochemical study and evaluation of apoptosis' role during trophoblast differentiation in normal and abnormal pregnancies.

Objective: The purpose of this study was to highlight the role of the apoptotic mechanism in trophoblastic differentiation through the comparative study of tissues from normal and abnormal pregnancies.

Material and Methods: A total of 72 trophoblastic tissue samples were immunohistochemically studied, of which 42 were derived from first trimester spontaneous abortions and the other 30 from elective terminations in the same trimester of pregnancy. For the study of apoptosis, the TUNEL technique and the M30 index were used.

Results: From the obtained results there was a pronounced apoptotic expression for both markers in tissues derived from spontaneous miscarriages compared to normal. In addition, the statistical analysis revealed a remarkable difference in the average age and in the number of parous in women with abortions against the control group.

Conclusion: Although apoptosis is a key mechanism for the normal trophoblastic development and consequently of the whole gestation, it appears that severe apoptotic activity is clearly involved in spontaneous abortions.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

Κατά τη διάρκεια της ζωής των πολυκύτταρων οργανισμών αναπτύσσεται μια λεπτή ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού θανάτου και της κυτταρικής ανανέωσης. Ξεκινώντας από ένα μόλις κύτταρο, το γονιμοποιημένο ωάριο, παράγονται και ακολούθως οργανώνονται όλοι οι κυτταρικοί τύποι, μέσω διαδικασιών που δεν περιλαμβάνουν μόνο το πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αλλά και το προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, γνωστό και ως απόπτωση.¹

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ρυθμίζεται με ακρίβεια, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες του οργανισμού. Στα ενήλικα άτομα, η απόπτωση αντισταθμίζει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με σκοπό τη διατήρηση σταθερού αριθμού κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ημερήσια απώλεια περίπου 5×10^{11} κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος μέσω απόπτωσης επάγοντας με τον τρόπο αυτό τη συνεχή παραγωγή τους από το μυελό των οστών. Επιπρόσθετα, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παρέχει έναν αμυντικό μηχανισμό εξουδετέρωσης κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν κύτταρα που έχουν μολυνθεί από κάποιο ίο ή κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες στο DNA.¹

Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει η απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης διαφόρων ιστών. Στα θηλαστικά η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αρχίζει με τη παραγωγή περισσότερων νευρώνων από όσους υπάρχουν στο ενήλικο άτομο. Περίπου το 50% από αυτούς θα αποπέσουν προγραμματισμένα. Οι νευρώνες που επιβιώνουν επιλέγονται χάρη στην ικανότητα τους να δημιουργούν σωστές συνδέσεις με τα κύτταρα- στόχους τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που αποτρέπουν την απόπτωση κι επάγουν την επιβίωση.¹

Ο όρος **απόπτωση** ενέχει την έννοια της απόσπασης και της πτώσης και χρησιμοποιείται για να καταστήσει διακριτή αυτή τη μορφή κυτταρικού θανάτου από το κυτταρικό θάνατο που είναι προϊόν τραυματισμού ή φλεγμονής.¹

Τα βήματα της απόπτωσης

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kerr το 1972 ως μια ενεργή διαδικασία που εξελίσσεται με συγκεκριμένη σειρά

κυτταρικών μεταβολών και διαφέρει ουσιαστικά από το κυτταρικό θάνατο που οδηγεί στη νέκρωση των ιστών. Συνοπτικά, κατά την απόπτωση, το χρωμοσωμικό DNA τεμαχίζεται ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, η χρωματίνη συρρικνώνεται κι ο πυρήνας κατακερματίζεται. Τέλος, το ίδιο το κύτταρο συρρικνώνεται και κατακερματίζεται σε τμήματα περιβαλλόμενα από μεμβράνη που καλούνται *αποπτωτικά σωμάτια*.² Τα αποπτωτικά κύτταρα και σωμάτια αναγνωρίζονται ώστε να υποστούν φαγοκυττάρωση από μακροφάγα και γειτονικά κύτταρα και να απομακρυνθούν από τους ιστούς. Η διαδικασία αυτή διαφέρει ουσιαστικά από τη νέκρωση καθώς εδώ τα κύτταρα διογκώνονται, λύνονται και τελικά απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στον εξωκυττάριο χώρο, με τελικό αποτέλεσμα τη πρόκληση φλεγμονής.¹

Η πυροδότηση της απομάκρυνσης των αποπτωτικών κυττάρων επάγεται από την έκφραση ειδικών σημάτων (“eat-me signals”) που εκφράζονται στη κυτταρική μεμβράνη. Σε αυτά περιλαμβάνεται η φωσφατιδυλοσερίνη που αποκλειστικά ανιχνεύεται στην εσωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κατά τη διάρκεια της απόπτωσης εμφανίζεται στην κυτταρική επιφάνεια ώστε να αναγνωριστεί από φαγοκυτταρικούς υποδοχείς. Οι πρώτες μελέτες για τη κατανόηση του μηχανισμού της απόπτωσης πραγματοποιήθηκαν στο σκώληκα *C. Elegans*, από όπου ταυτοποιήθηκαν τρία γονίδια υπεύθυνα για την απόπτωση, δυο επαγωγικά: τα *ced-3*, *ced-4* κι ένα κατασταλτικό, το *ced-9*.¹

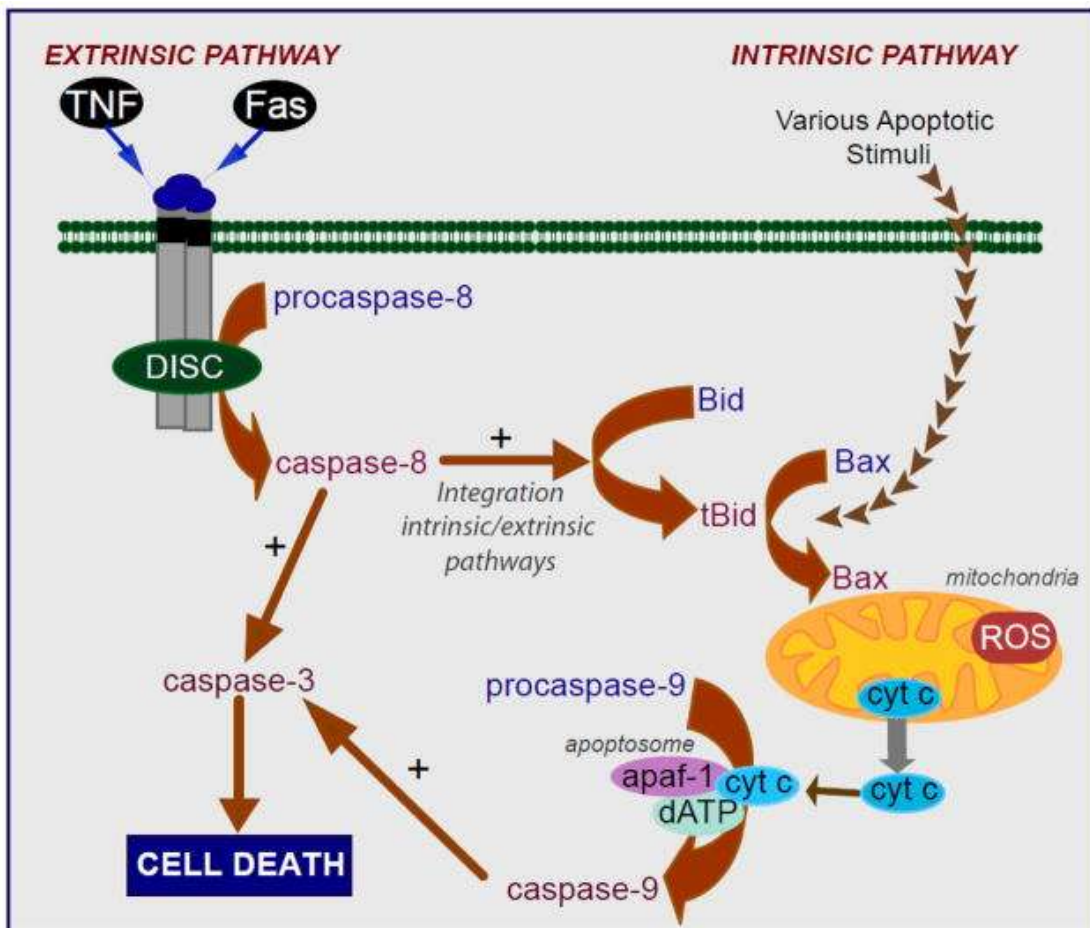
Κασπάσες: οι τελεστές της απόπτωσης

Η κλωνοποίηση και αλληλούχιση του γονιδίου *ced-3* αποκάλυψε πως κωδικοποιεί μια πρωτεάση η οποία αποτέλεσε την απαρχή της αποκάλυψης του μοριακού μηχανισμού της απόπτωσης. Είναι πλέον γνωστό πως η πρωτεάση Ced-3 ανήκει σε μια οικογένεια με περισσότερες από δώδεκα κυστεϊνοπρωτεάσες που αποκαλούνται **κασπάσες** καθώς στα ενεργά κέντρα τους φέρουν κυστεϊνές C και πέπτουν τα υποστρώματα τους στο πεπτιδικό δεσμό της καρβοξυτελικής πλευράς των καταλοίπων του ασπαρτικού οξέος (Asp). Οι κασπάσες αποτελούν τους κύριους εκτελεστές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου καθώς πυροδοτούν τις διαδικασίες απόπτωσης μέσω πέψης περισσότερων από 100 διαφορετικών πρωτεϊνών- στόχων. Στους στόχους αυτούς περιλαμβάνονται ο αναστολέας μιας DNAασης που επάγει το κατακερματισμό του πυρηνικού DNA, πυρηνικές λαμίνες για το κατακερματισμό του πυρήνα καθώς και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού για

την αποδόμηση αυτού. Τέλος, και η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης, ενός eat-me signal, εξαρτάται επίσης από κασπάσες.¹

Οι κασπάσες διακρίνονται είτε σε *ενακτήριες*, είτε σε *εκτελεστικές* και είναι οργανωμένες σε έναν πρωτεολυτικό καταρράκτη που προκαλεί τα γεγονότα της απόπτωσης. Κοινό γνώρισμα των κασπασών είναι η σύνθεση τους ως ανενεργά πρόδρομα μόρια που μετατρέπονται σε ενεργή κασπάση με πρωτεολυτική πέψη από τη καταλυτική δράση μιας άλλης κασπάσης. Οι ενακτήριες κασπάσες ενεργοποιούνται άμεσα αποκρινόμενες στα αποπτωτικά σήματα και πέπτουν κι έτσι ενεργοποιούν τις εκτελεστικές κασπάσες που θα καταλύσουν τη πέψη των πρωτεϊνών-στόχων. Ως εκ τούτου, η ενεργοποίηση μιας ενακτήριας κασπάσης επάγει μια αλυσιδωτή αντίδραση ενεργοποίησης άλλων κασπασών με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου.¹

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η κύρια ενακτήρια κασπάση είναι η κασπάση 9 που ενεργοποιείται με τη πρόσδεση της Araf-1 στο πλαίσιο ενός συμπλόκου με πολλές υπομονάδες που ονομάζεται **αποπτώσωμα**. Για το σχηματισμό αυτού του συμπλόκου απαιτείται η συμμετοχή του κυτοχρώματος c που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια ως απόκριση στη δράση αποπτωτικών ερεθισμάτων. Μετά από την ενεργοποίηση της στο αποπτώσωμα, η κασπάση 9 ενεργοποιεί πέπτοντας άλλες εκτελεστικές κασπάσες που δρουν καθοδικά, όπως η κασπάση 3 και η κασπάση 7.¹



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του ενδογενούς και του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού.³

Κεντρικοί ρυθμιστές της απόπτωσης: η οικογένεια Bcl-2 ¹

Το τρίτο γονίδιο που είχε ταυτοποιηθεί ως βασικός αποπτωτικός ρυθμιστής στο *C.elegans*, το *ced-9*, βρέθηκε πως έχει υψηλή ομολογία με ένα γονίδιο των θηλαστικών, το *bcl-2*, το οποίο ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένα ανθρώπινο ογκογονίδιο υπεύθυνο για την ανάπτυξη λεμφωμάτων από κύτταρα B. Σε αντίθεση με άλλες ογκοπρωτεΐνες, όπως η Ras, η Bcl-2 βρέθηκε ότι αναστέλλει την απόπτωση. Η εμπλοκή της Bcl-2 στη ρύθμιση της απόπτωσης ανέδειξε για πρώτη φορά της σημασία της στην ανάπτυξη καρκίνου, καθώς στα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να ρυθμιστούν φυσιολογικά οι διαδικασίες του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί περισσότερες από 20 πρωτεΐνες ομόλογες της Bcl-2, οι οποίες διακρίνονται με βάση τη λειτουργία τους σε τρεις ομάδες, τις αντιαποπτωτικές, τις προαποπτωτικές πολλαπλών επικρατειών και τις προαποπτωτικές BH3-μονο. Η Bcl-2 ανήκει στη πρώτη ομάδα δρώντας

ανασταλτικά στην απόπτωση. Ωστόσο, άλλα μέλη της οικογένειας είναι προαποπτωτικές πρωτεΐνες, επάγουν δηλαδή την ενεργοποίηση κασπασών και άρα την απόπτωση. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε δυο επιμέρους ομάδες που διαφέρουν ως προς τη λειτουργία τους, αλλά και ως προς το εύρος της ομολογίας τους με την Bcl-2. Η Bcl-2 και τα άλλα μέλη της αντιαποπτωτικής ομάδας διαθέτουν τέσσερις συντηρημένες περιοχές που ονομάζονται επικράτειες ομόλογες της Bcl-2 (BH-2). Τα μέλη της πρώτης υποκατηγορίας της προαποπτωτικής ομάδας ονομάζονται πολλαπλών επικρατειών, αφού διαθέτουν τρεις επικράτειες BH (BH1, BH2 και BH3). Αντίθετα, τα μέλη της δεύτερης υποομάδας ονομάζονται BH3-μονο, καθώς έχουν μόνο την επικράτεια BH3.

Το μέλλον του κυττάρου –επιβίωση ή θάνατος- καθορίζεται κατά βάση από την ισορροπία μεταξύ των προαποπτωτικών και των αντιαποπτωτικών μελών της ίδιας οικογένειας, της Bcl-2, οι δράσεις των οποίων αλληλορυθμίζονται.

Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, δρουν και στα μιτοχόνδρια, ο ρόλος των οποίων είναι κομβικός για την εξέλιξη της αποπτωτικής διαδικασίας. Μετά την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Bax και Bak, αυτές σχηματίζουν ολιγομερή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ο σχηματισμός αυτός οδηγεί στην απελευθέρωση από τον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, του *κυτοχρώματος c*. Όπως προαναφέρθηκε, το γεγονός αυτό είναι που πυροδοτεί την ενεργοποίηση των κασπασών. Πιο αναλυτικά, η κύρια εναρκτήρια κασπάση (κασπάση 9) ενεργοποιείται σχηματίζοντας σύμπλοκο με την Araf-1 στο αποπτώσωμα. Στα θηλαστικά, η συμμετοχή του κυτοχρώματος c είναι άκρως απαραίτητη για το σχηματισμό του συμπλόκου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το κυτόχρωμα c εδράζεται στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, ενώ η κασπάση 9 κι η Araf-1 στο κυτταρόπλασμα. Με τον τρόπο, αυτό η κασπάση 9 διατηρείται ανενεργή. Η ενεργοποιημένη Bax ή Bak επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, όπου και προσδένεται στην Araf-1 και πυροδοτεί το σχηματισμό του αποπτωσώματος. Η όλη διαδικασία καταλήγει στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9.

Μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών συμμετέχει εξίσου ενεργά στη ρύθμιση των κασπασών. Είναι η οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης, **IAP**. Τα μέλη της αλληλεπιδρώντας άμεσα με τις κασπάσες, καταστέλλουν την απόπτωση, είτε αναστέλλοντας την ενζυμική τους ενεργότητα, είτε οδηγώντας τις κασπάσες προς

ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Στα θηλαστικά, η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης που προκαλείται από την ενεργοποίηση των Bax και Bcl-2 συνεπάγεται την απελευθέρωση όχι μόνο του κυτοχρώματος c αλλά και αναστολέων IAP που πιθανώς συμβάλλουν στη διέγερση της ενεργότητας των κασπασών.

Ρυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης ¹

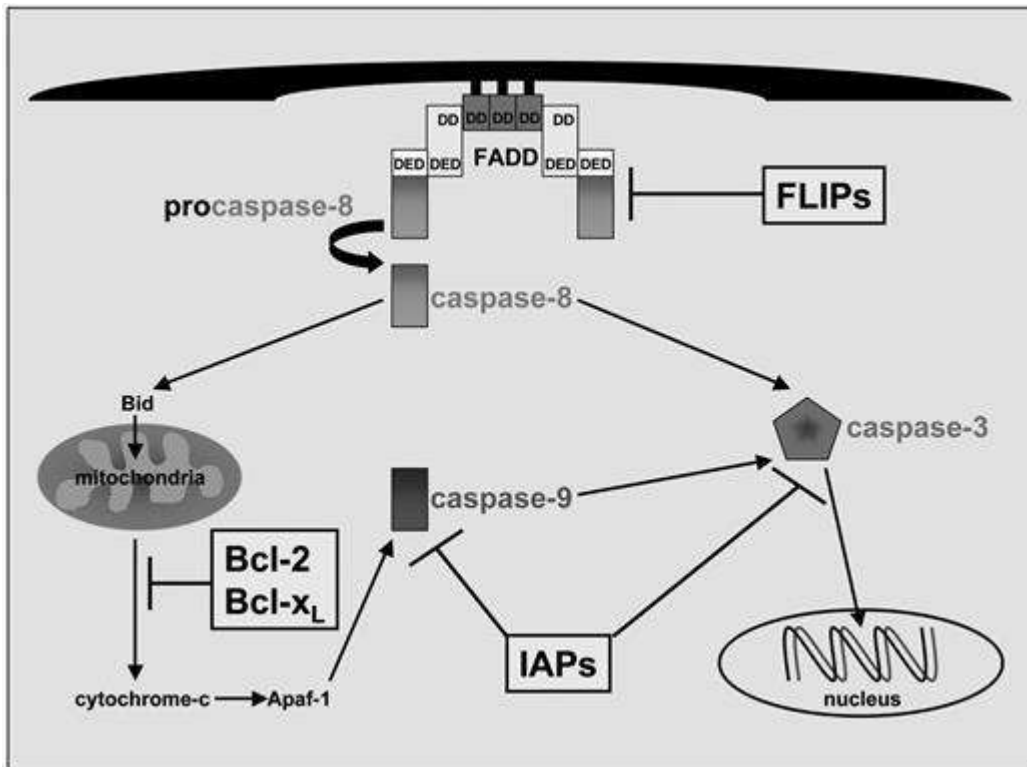
Η ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου γίνεται συντονισμένα μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν είτε το κυτταρικό θάνατο, είτε την κυτταρική επιβίωση. Στα θηλαστικά, διακρίνονται τα ενδογενή και τα εξωγενή μονοπάτια, ανάλογα με τη συμμετοχή των Bcl-2 πρωτεϊνών και της εναρκτήριας κασπάσης. Συμβάματα όπως οι βλάβες του DNA, οι ιικές μολύνσεις κι η έλλειψη αυξητικών παραγόντων ενεργοποιούν το ενδογενές μονοπάτι. Πιο αναλυτικά, μέσα στο κυτταρικό κύκλο υπάρχουν αρκετά σημεία ελέγχου ώστε να ανιχνεύονται οι βλάβες του γονιδιώματος και να ανακόπτεται η πορεία του κύκλου. Στα θηλαστικά, ο μεταγραφικός παράγοντας p53 κατέχει κομβική θέση σε όλη αυτή τη διαδικασία. Αξίζει να σημειωθεί πως η ενεργοποίηση του p53 από βλάβες του DNA μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης από τον p53 προκαλείται, εν μέρει τουλάχιστον, από τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PUMA και Noxa, μέλη της οικογένειας BH3-μονο της Bcl-2. Επακόλουθο αυτής της διεργασίας είναι η ενεργοποίηση των Bax και Bcl-2 που συνεπάγεται την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και εν τέλει την ενεργοποίηση της κασπάσης 9.

Η απουσία αυξητικών παραγόντων στο κυτταρικό περιβάλλον είναι άλλη μια μορφή κυτταρικού στρες που επάγει το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Στην αντίθετη περίπτωση, η απόπτωση αναστέλλεται από σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την επιβίωση ως απόκριση στα ερεθίσματα των αυξητικών παραγόντων. Τα σήματα επιβίωσης εκτός από αυξητικούς παράγοντες, όπως στη περίπτωση των νευρώνων που προαναφέρθηκε, περιλαμβάνονται διακυτταρικές επαφές που ενεργοποιούν κινάσες τυροσίνης που είναι συνδεδεμένες με ιντεγκρίνες. Έτσι, τα περισσότερα κύτταρα των ανώτερων ζωικών οργανισμών είναι προγραμματισμένα να εισέλθουν σε απόπτωση, εκτός αν ληφθούν σήματα επιβίωσης από άλλα κύτταρα.

Ένα από τα κυριότερα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια προώθησης της κυτταρικής επιβίωσης αρχίζει από τη κινάση **PI3**. Η ενεργοποίηση της είναι αποτέλεσμα δράσης είτε κινασών τυροσίνης, είτε υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Η κινάση PI3 φωσφορυλιώνει το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο PIP₂ σε PIP₃, το οποίο ακολούθως ενεργοποιεί τη κινάση σερίνης/θρεονίνης **Akt**. Ο τελικός στόχος της Akt είναι η Bad (προαποπτωτικό μέλος της Bcl-2), η φωσφορυλίωση της οποίας προκαλεί δομικές αλλαγές στη Bad καθιστώντας την ανενεργή. Με τον τρόπο αυτό, αναστέλλεται η απόπτωση κι επάγεται η κυτταρική επιβίωση.

Άλλοι στόχοι της Akt, αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO, η GSK-3 κι η Mcl-1. Οι πολλαπλές αυτές επιδράσεις στα μέλη της οικογένειας Bcl-2 συγκλίνουν στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης, ελέγχοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και προάγοντας την κυτταρική επιβίωση σε ερεθίσματα αυξητικών παραγόντων.

Σε αντίθεση με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν το ενδογενές μονοπάτι κι επάγονται από σήματα κυτταρικού στρες και αυξητικούς παράγοντες, κάποια εκκρινόμενα πολυπεπτίδια δρουν σε υποδοχείς ώστε να ενεργοποιήσουν το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι. Τα πολυπεπτίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια των **παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNF)**. Ένα από τα πλέον μελετημένα μέλη αυτής της οικογένειας είναι ο επιφανειακός υποδοχέας Fas που εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι παράγοντες TNF αποτελούνται από τρεις όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Με τη πρόσδεση τους στον υποδοχέα επάγεται ο τριμερισμός των υποδοχέων. Ακολούθως, οι κυτταροπλασματικές επικράτειες τους προσδένονται σε μόρια-προσαρμοστές που με τη σειρά τους προσδένονται στη κασπάση 8, προκαλώντας την ενεργοποίηση της. Η ενεργοποιημένη κασπάση 8 θα ενεργοποιήσει με μερική πρωτεόλυση άλλες εκτελεστικές κασπάσες που θα δράσουν καθοδικά ή εναλλακτικά θα ασκήσει τη δράση της στη BH3-μονο πρωτεΐνη Bid, η οποία θα με τη σειρά της θα ενεργοποιήσει το ενδογενές μονοπάτι μέσω της κασπάσης 9.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων μηχανισμών ρύθμισης του αποπτωτικού καταρράκτη.⁴

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ

Ο πλακούντας, αν και προσωρινό όργανο, είναι άκρως αναγκαίο για την περάτωση της κύησης, στα περισσότερα θηλαστικά, καθώς είναι προορισμένο να θρέφει και να οξυγονώνει το έμβρυο καθ' όλη τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής. Με την είσοδο του μοριδίου στη μητριάια κοιλότητα παρατηρείται συγκέντρωση υγρού μεταξύ των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, με αποτέλεσμα τη σταδιακή ανάπτυξη της κοιλότητας της βλαστοκύστης.⁵ Η εξωτερική στιβάδα των κυττάρων που περιβάλλει την βλαστοκύστη κι είναι η πολυπληθέστερη ονομάζεται *τροφοβλάστη* και αποτελεί κατά βάση την πρόδρομη δομή τόσο του πλακούντα, όσο και των εμβρυικών μεμβρανών. Ενώ, τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας είναι προορισμένα να σχηματίσουν την εμβρυοβλάστη.⁶

Τη 5^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, κι έχοντας ολοκληρωθεί η επώαση της τροφοβλάστης από τη διαφανή ζώνη, αρχίζει η διαδικασία της εμφύτευσης. Περίπου την 6^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, τα τροφοβλαστικά κύτταρα του εμβρυϊκού πόλου αρχίζουν να εισδύουν και να διαβρώνουν το βλεννογόνο της μήτρας μέσω πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγουν τα ίδια. Το ενδομήτριο επάγει τη πρωτεολυτική συμπεριφορά της βλαστοκύστης, αποδεικνύοντας πως η εμφύτευση είναι μια αμφίδρομη συντονισμένη διαδικασία. Υπό κανονικές συνθήκες, η εμφύτευση της βλαστοκύστης γίνεται στο πρόσθιο ή στο οπίσθιο τοίχωμα του σώματος της μήτρας, μεταξύ των στομίων των αδένων. Πιο αναλυτικά, πριν ακόμα το στάδιο της εκκόλαψης από τη διαφανή ζώνη, στη βλαστοκύστη δημιουργείται ο εμφυτευτικός κώνος, μια δομή αποτελούμενη από αποφυάδες κυττάρων που διαπερνούν τη διαφανή ζώνη και προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Πλην της διήθησης του φθαρτού, τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαβρώνουν το τοίχωμα των σπειροειδών αρτηριών, ενσωματώνονται στο αγγειακό τοίχωμα και σταδιακά αντικαθιστούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτή η στερεή προσκόλληση στο ενδοθήλιο επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών και περίπλοκων κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, που αναλύονται παρακάτω.⁵

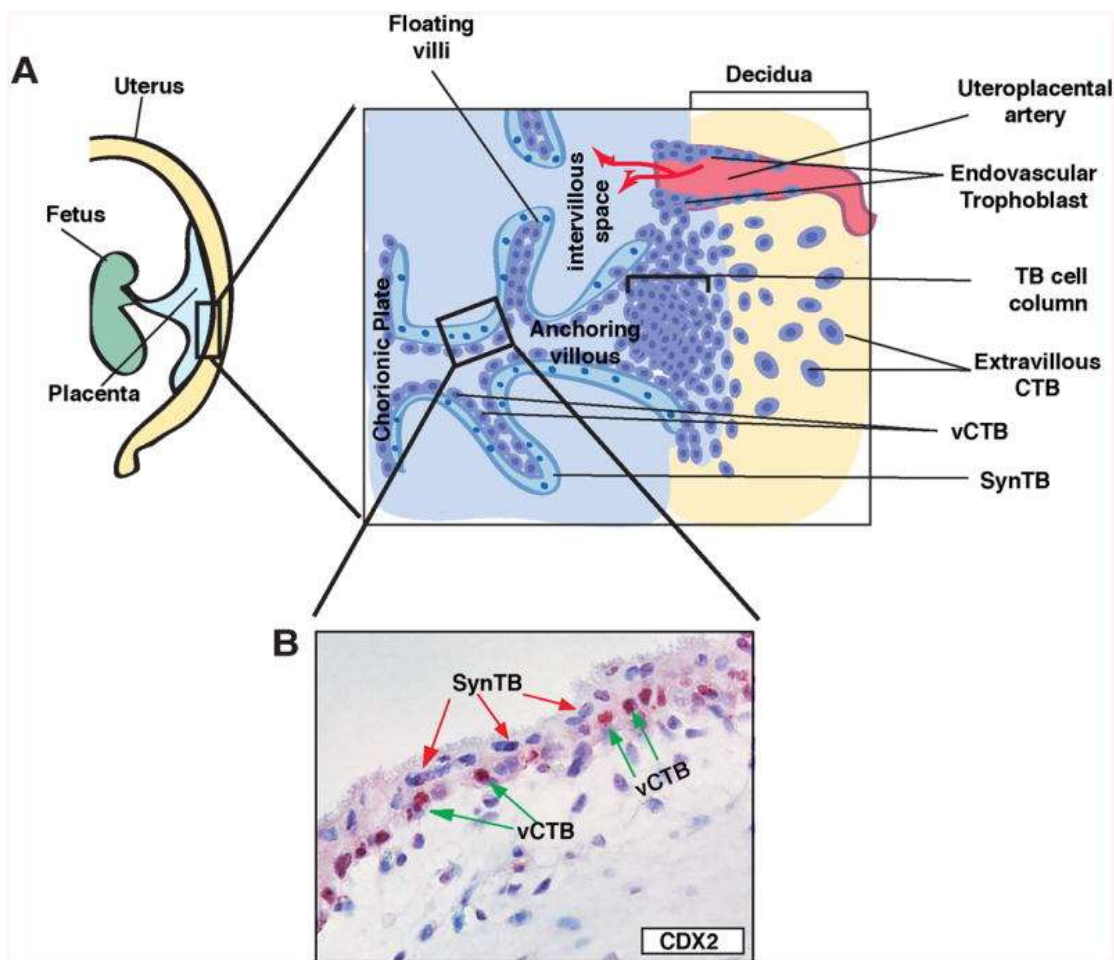
Στο στάδιο της εμφύτευσης, στην εξωτερική επιφάνεια της τροφοβλάστης, αρχίζουν να διαφοροποιούνται δύο κυτταρικές ομάδες. Σχηματίζεται έτσι,

α) η εξωτερική στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης (STB), η οποία χαρακτηρίζεται από κύτταρα με ασαφή κυτταροπλασματικά όρια (συγκύτιο), πολλαπλούς

πυκνοχρωματικούς πυρήνες, αμφίφιλο κυτταρόπλασμα, δυνατότητα αμοιβαδοειδών κινήσεων και ανοσιακή ανοχή καθώς έρχονται σε επαφή με το μητρικό αίμα

β) η εσωτερική στιβάδα της κυτταροτροφοβλάστης (CTB), η οποία δεν έρχεται σε επαφή με τους μητρικούς ιστούς και αποτελείται από μεμονωμένα κύτταρα με σαφή κυτταροπλασματική μεμβράνη, διαυγές κυτταρόπλασμα και φυσαλιδώδεις πυρήνες (κύτταρα Langhans), ο αριθμός των οποίων βαίνει μειούμενος στη διάρκεια της κύησης.^{5,6}

Κατά βάση, η κυτταροτροφοβλάστη είναι το αρχέγονο, κυρίως ενεργό μιτωτικά κύτταρο, που πολλαπλασιαζόμενο συνεχώς διαφοροποιείται σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Ενώ, η τελευταία είναι αυτή που αυξάνεται και διαβρώνει με δακτυλιοειδείς συμπαγείς προσεκβολές το ενδομήτριο.⁶



Εικόνα 3: A) Σχηματική αναπαράσταση των τροφοβλαστικών κυττάρων (TB) στην εμβρυο-μητρική επιφάνεια του αναπτυσσόμενου πλακούντα. SynTB: απεικόνιση των δυο στρωμάτων των τροφοβλαστικών κυττάρων από πλακούντα 9 εβδομάδων.⁷

Ωστόσο, η παραπάνω διαδικασία δεν είναι η μόνη επιλογή διαφοροποίησης για τα τροφοβλαστικά κύτταρα.⁸ Η τροφοβλάστη μπορεί επίσης να διαχωριστεί σε δυο πληθυσμούς: την ενδολάχνια και την εξωλάχνια τροφοβλάστη, στη καθεμία από τις οποίες διακρίνονται άλλοι υποπληθυσμοί. Τόσο η ενδολάχνια, όσο και η εξωλάχνια τροφοβλάστη έχουν κοινή προέλευση, το τροφοεξώδερμα της εμφυτευμένης βλαστοκύστης. Η ενδολάχνια τροφοβλάστη αποτελείται από τα πολλαπλασιαζόμενα μονοπύρηννα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους διαχέονται για να σχηματίσουν τους πολυπύρηνους συγκυτιοτροφοβλάστες, το δεύτερο στρώμα της τροφοβλάστης, το οποίο είναι σε άμεση επαφή με τη μητρική κυκλοφορία.⁹ Από την άλλη πλευρά, η εξωλάχνια τροφοβλάστη είναι εξειδικευμένος πληθυσμός κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, που εντοπίζονται εκτός του στρώματος των λαχνών κι έχουν την ικανότητα να εισδύουν στο φθαρτό και να αναδιαμορφώνουν τα αγγεία της μήτρας με σκοπό την επαρκή αιματική παροχή στο έμβρυο. Αντιστοίχως, τα κύτταρα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης μπορούν να διακριθούν σε δυο υποπληθυσμούς: τα ενδιάμεσα και τα ενδοαγγειακά τροφοβλαστικά κύτταρα. Τα μεν πρώτα (ενδιάμεση τροφοβλάστη) διηθούν το τμήμα του ενδομητρίου που έχει μετατραπεί σε φθαρτό φτάνοντας έως και το μυομήτριο. Το τέλος αυτής της πορείας βρίσκεται στο μυομήτριο στο ύψος του σημείου εμφύτευσης, κι εκεί τα κύτταρα της ενδιάμεσης τροφοβλάστης συγχωνεύονται και σχηματίζουν πολυπύρηννα τροφοβλαστικά γιγαντοκύτταρα. Τα δε δεύτερα (ενδοαγγειακή τροφοβλάστη) εισδύουν και αναδιαμορφώνουν τις σπειροειδείς αρτηρίες.^{10,11}

Ωστόσο, η όλη διαδικασία αλληλεπίδρασης του ενδομητρίου και της βλαστοκύστης είναι αμφίδρομη ρυθμιζόμενη και συνεπώς η προσκόλληση της βλαστοκύστης συνεπάγεται τη δεκτικότητα της μήτρας. Γενικά, η δεκτικότητα του ενδομητρίου ρυθμίζεται από τις στεροειδείς ωθητικές ορμόνες. Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη ασκούν, ως γνωστόν, τη δράση τους μέσω πυρηνικών υποδοχέων με τελικό αποτέλεσμα τα μεν οιστρογόνα να ευνοούν το πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, η δε προγεστερόνη το πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος. Στη πορεία όλης αυτής της διαδικασίας εμπλέκονται πολλά γονίδια, η έκφραση των οποίων είναι αναγκαία για την εξέλιξη της κύησης. Μεταξύ αυτών το γονίδιο της καλσιτονίνης, το γονίδιο Ar (Amphiregulin) και το γονίδιο Indian Hedgehog (IHH) που αναλύεται παρακάτω. Τρεις φάσεις έχουν περιγραφεί για την εξέλιξη της δεκτικότητας του ενδομητρίου. Στη πρώτη, παρατηρούνται μικρολάχνες

στα κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, ενώ αυξάνεται κι ο αριθμός των κυττάρων του στρώματος. Στη δεύτερη φάση, προκαλούνται λειτουργικές και μορφολογικές μεταβολές από την έκκριση της χοριακής γοναδοτροπίνης. Ενώ στη τρίτη φάση, αυξάνεται η διαπερατότητα των υποεπιθηλιακών τριχοειδών που περιβάλλουν τη βλαστοκύστη και αρχίζει η αντίδραση του φθαρτού στα κύτταρα του στρώματος κι η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.⁵

Πιο αναλυτικά, κατά τη διήθηση του στρώματος του ενδομητρίου παρατηρείται ελεγχόμενη σύνθεση και καταστροφή δομικών πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Προεξάρχοντα ρόλο στη διαδικασία αυτή κατέχουν τα πρωτεολυτικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων το σύστημα του ενεργοποιημένου πλασμινογόνου (PA) καθώς και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP). Η πρωτεολυτική δράση των ενζύμων αυτών, που εκκρίνονται ως επί των πλείστων από τη τροφοβλάστη του πρώτου τριμήνου, επιτυγχάνεται η αποδόμηση των πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας, και διευκολύνεται έτσι η μετακίνηση της τροφοβλάστης προς τα αγγεία, διαμέσου του στρώματος. Η μετακίνηση αυτή, ρυθμίζεται κατά βάση, από το μητρικό περιβάλλον, μέσω παραγωγής κυτταροκινών. Ενώ ενεργό συμμετοχή έχουν και τα NK του φθαρτού που εμποδίζουν την υπέρμετρη τροφοβλαστική διήθηση.⁵

Επιπλέον αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης είναι η τροποποίηση στην έκφραση των ιντεγκρινών- τα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν την $\alpha_5\beta_1$ ιντεγκρίνη, ενώ στη φάση της διείσδυσης παράγεται η $\alpha_1\beta_1$ ιντεγκρίνη. Ενώ ταυτόχρονα, η απώλεια της επιθηλιακής φύσης της τροφοβλάστης εκδηλώνεται με τη μείωση της έκφρασης της E-κατχερίνης και τη συνέκφραση ενδοθηλιακών δεικτών όπως ο PECAM1 (CD31), η VE-κατχερίνη και ο MCAM (CD146).⁵

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ

Η επιτυχής εμφύτευση και πλακουντοποίηση στον άνθρωπο υπόκειται στη ρύθμιση πολυάριθμων και περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του εμβρύου και της δέκτριας μήτρας. Οι στεροειδείς ορμόνες, προγεστερόνη και οιστρογόνα, αναμφισβήτητα παίζουν σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, πληθώρα άλλων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων φαίνεται επίσης να εμπλέκονται. Παρακάτω, αναλύονται οι κυριότεροι.¹²

Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt : Ένας σημαντικός σηματοδοτικός καταρράκτης που επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ εμβρύου και μήτρας αλλά και την πλακουντοποίηση είναι το μονοπάτι Wnt. Ο όρος wnt προέκυψε από το συνδυασμό των γονιδίων Wingless (Wg) και Int1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό προσδετών και υποδοχέων, 19 και 10 αντίστοιχα, οδηγώντας σε περισσότερες από 190 διαφορετικές αλληλεπιδράσεις, ενισχυτικής ή ανασταλτικής δυναμικής.¹³ Εν περιλήψει, οι πρωτεΐνες Wnt είναι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες προορισμένοι να προσδέονται σε σύμπλοκα υποδοχέων της οικογένειας Frizzled και LRP με σκοπό τη σταθεροποίηση της β-κατενίνης, ενός μορίου που δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής. Απουσία των πολυπεπτιδίων Wnt, η β-κατενίνη θα φωσφορυλιωθεί από το σύμπλοκο της κινάσης της καζεΐνης 1 (CK1) και της GSK-3, με τις πρωτεΐνες αξίνη και APC με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και τελικά την αποικοδόμηση. Αντίθετα, η πρόσδεση των πρωτεϊνών Wnt στους υποδοχείς τους αποτρέπει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης και οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων της. Ο καταρράκτης Wnt έχει πολλαπλή δράση καθώς διαταραχές σε αυτόν έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση, οστεοπόρωση, εκφυλιστικές νόσους και αναπτυξιακές διαταραχές.¹⁴

Το μονοπάτι Wnt κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία βλαστοκύστης-μήτρας και στην επακόλουθη εμφύτευση. Έρευνες σε έμβρυα επιμύων απέδειξαν την έκφραση γονιδίων Wnt στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης ως απάντηση σε οιστρογόνο-εξαρτώμενα ερεθίσματα από τη μήτρα. Έχει επίσης τεκμηριωθεί πως αναστολή του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης δεν επηρεάζει την εξέλιξη στο στάδιο της βλαστοκύστης αλλά αποτρέπει την πλακουντοποίηση. Από την άλλη πλευρά, το μονοπάτι Wnt κατέχει εξίσου βασικό ρόλο στην φθαρτοποίηση της μήτρας, με την έκφραση της πρωτεΐνης Wnt4 η οποία είναι απύουσα πριν την

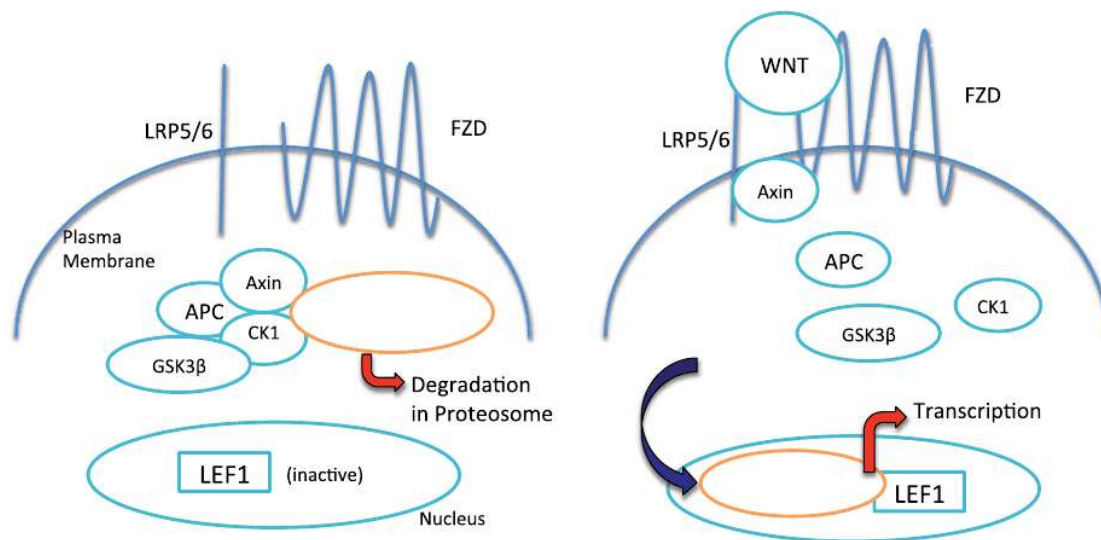
εμφύτευση αλλά εμφανίζει σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια αυτής και συνεχίζει ακολούθως να εκφράζεται στο φθαρτό. Ενώ και άλλα μόρια, όπως οι Wnt5a, Wnt7a, Wnt11, και Wnt16 εκφράζονται κατά τη διάρκεια του παραθύρου εμφύτευσης.¹⁵

Αναφορικά με τον άνθρωπο, πλειάδα μορίων Wnt έχει αποδειχθεί πως εκφράζονται στο ενδομήτριο, τεκμηριώνοντας τη σημασία τους για την ενδομητρική λειτουργία. Ωστόσο, η δράση του καταρράκτη Wnt διαφοροποιείται εν μέρει στον άνθρωπο από τον επίμου, καθώς η διαδικασία της φθαρτοποίησης και της πλακουντοποίησης είναι προγεστερονο-εξαρτώμενες. Έρευνες έχουν δείξει πως κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του καταμήνιου κύκλου υπερεκφράζεται μια πρωτεΐνη- αναστολέας του μονοπατιού Wnt, η Dickkopf 1 (DKK1) η έκκριση της οποίας επάγεται από τη προγεστερόνη. Επιπλέον, αποδείξεις για τη συσχέτιση της προγεστερόνης με το καταρράκτη Wnt παρέχουν μελέτες όπου μετά από χορήγηση μιφεπριστόνης, ενός ανταγωνιστή της προγεστερόνης, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της β-κατενίνης, των Wnt προσδετών και υποδοχέων στον ενδομήτριο.¹⁵

Είναι επίσης γνωστό, πως διαταραχές στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt μπορούν να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα, καθώς παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη μεσοκυκλική έκφραση β-κατενίνης στο ενδομήτριο υπογόνιμων γυναικών. Ενώ, διαταραχές του καταρράκτη Wnt φαίνεται πως συσχετίζονται με τη παθολογία της ενδομητρίωσης, καθώς η ενδομητρική έκφραση του mRNA του DKK1 βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε γυναίκες με ενδομητρίωση.¹⁶

Η σηματοδότηση μέσω Wnt είναι επίσης αναγκαία και για την ανθρώπινη πλακουντοποίηση. 14 από τους 19 Wnt προσδέτες και 8 από τους 10 FZD υποδοχείς εκφράζονται στο πλακούντα. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός πως μόρια όπως οι Wnt1, Wnt7b, Wnt10a και Wnt10b δεν εκφράζονται σε ώριμους πλακούντες, υποστηρίζοντας έτσι έναν ρόλο στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του πλακούντα και της διαφοροποίησης της τροφοβλάστης.¹⁷

Επιπρόσθετα, αποδεικτικά στοιχεία της δράσης των μορίων Wnt και β-κατενίνης παρέχονται από μελέτες που δείχνουν μειωμένη έκφραση των Wnt2 και β-κατενίνης, αλλά και αυξημένη έκφραση της DKK1 σε πλακούντες προερχόμενους από κυήσεις με προεκλαμψία, αλλά και από άλλες έρευνες όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα DKK1 σε ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές.¹⁸



Εικόνα 4: Σχηματικά αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Στο πρώτο ήμισυ χωρίς τη πρόσδεση της πρωτεΐνης Wnt, και στο δεύτερο ήμισυ μετά τη πρόσδεση στον υποδοχέα.¹²

Συμπερασματικά, το μονοπάτι Wnt κατέχει πολυδιάστατο ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ αναστολής κι ενεργοποίησης του διατηρεί φυσιολογική την αναπαραγωγική λειτουργία, καθώς η αναστολή του μονοπατιού είναι αναγκαία για τη σωστή φθαρτοποίηση κι εμφύτευση, ενώ η υπέρμετρη ενεργοποίηση σχετίζεται με υπογονιμότητα. Από την πλευρά της πλακουντοποίησης, η ενεργοποίηση του καταρράκτη Wnt είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διαφοροποίηση του πλακούντα, ενώ η υπερέκφραση μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση χοριοκαρκινωμάτων.¹²

Indian Hedgehog : Ένας άλλος εκκρινόμενος παράγοντας που φαίνεται να έχει σημαντική δράση στην εμφύτευση και στη πλακουντοποίηση είναι η Indian Hedgehog (IHH). Στον άνθρωπο, η εμφύτευση της βλαστοκύστης είναι προγεστερονο-εξαρτώμενη διαδικασία στην οποία ρόλο-κλειδί έχει η IHH.^{19,20} Η πρωτεΐνη Hedgehog προσδένεται στον υποδοχέα Patched (PTC), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που καταστέλλεται μέσω αυτής της πρόσδεσης, επιτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση μιας άλλης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, της Smoothed, η οποία είναι η αρχή ενός άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού που καταλήγει στην ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα, του Gli.¹⁴

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο, η IHH σε συνδυασμό με τον υποδοχέα της προγεστερόνης υπερεκφράζονται κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης του καταμήνιου κύκλου, όπως επίσης και τα μόρια PTC, Gli1 και Gli2.²¹

Ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας : Ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (LIF), είναι μια μικρή πολυλειτουργική κυτοκίνη, αναγκαία στα πρώτα στάδια της κύησης. Είναι μέλος της οικογένειας της ιντερλευκίνης-6 που γλυκοζυλιώνεται και ασκεί τη δράση της αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα της, LIFR, ώστε να πυροδοτήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι Jak/STAT.¹² Η έκφραση του LIF στο ανθρώπινο ενδομήτριο ανιχνεύεται στην αρχή της εκκριτικής φάσης, αυξάνεται στη προεμφυτευτική περίοδο και μεγιστοποιείται στο τέλος αυτής, κυρίως στο αδενικό επιθήλιο. Ενώ στη ρύθμιση της έκφρασης του εμπλέκονται πολλοί αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες όπως η IL-1, ο TNF, ο PDGF και ο EGF, ενώ ανασταλτικά στην έκφραση του LIF ενεργεί η INF-γ.²² Ο LIF έχει βασικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ μήτρας και εμβρύου, καθώς εκκρίνεται από το ενδομήτριο, ενώ ο υποδοχέας του, LIFR, εκκρίνεται από το έμβρυο. Η παρουσία του συμπλόκου LIF-LIFR στο φθαρό και στο πλακούντα αποδεικνύει το ρόλο του, όχι μόνο στην εμφύτευση αλλά και στη πλακουντοποίηση.¹² Τέλος, στο στάδιο της εμφύτευσης, για την έκφραση του LIF φαίνεται να απαιτείται η συνέκφραση των αυξητικών παραγόντων της οικογένειας EGF, μορίων άκρως καθοριστικών για αυτήν την διεργασία.²³

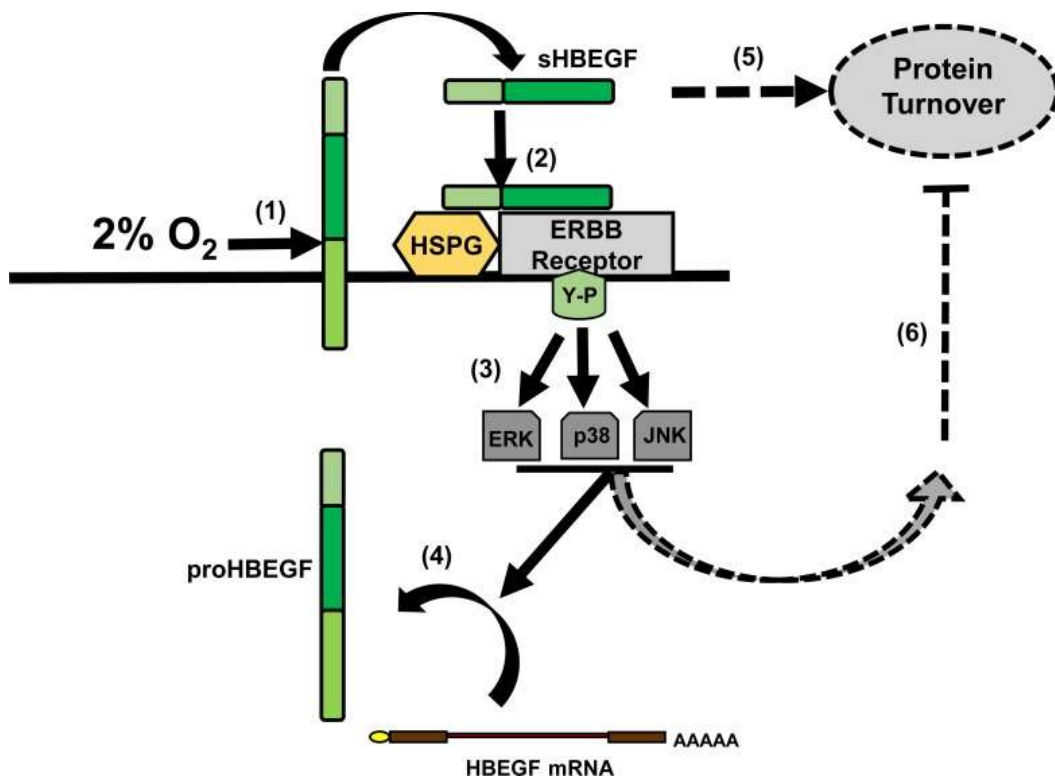
Σηματοδοτικό μονοπάτι του EGF : Η οικογένεια αυξητικών παραγόντων EGF (epidermal growth factor) και οι υποδοχείς τους εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας σειράς βιολογικών διεργασιών μεταξύ των οποίων ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση κι η επιβίωση. Η οικογένεια EGF περιλαμβάνει τους EGF, HBEGF, TGFA, AREG, BTC, EREG και NRG.²⁴ Γενικό χαρακτηριστικό των αυξητικών αυτών παραγόντων είναι η πρόσδεση σε υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης κι η επακόλουθη αυτοφωσφορλίωση της κυταροπλασματικής περιοχής και τελικά ο διμερισμός του υποδοχέα που θα πυροδοτήσει καθοδικότερα μια αλυσίδα αντιδράσεων.¹²

Το μόριο που φαίνεται να εμπλέκεται στην επικοινωνία και τελικά στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στη μήτρα είναι ο HBEGF, ο οποίος είτε στη διαλυτή, είτε στη διαμεμβρανική μορφή του συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου, μαζί με άλλους παράγοντες, όπως ο EGF και ο BTC. Η οικογένεια EGF φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην αναγέννηση κι ωρίμανση του ενδομητρίου και τελικά στην εμφύτευση του εμβρύου.

²⁵ Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η παραγωγή των διαφόρων μορφών του HBEGF έρχεται να ρυθμίσει την έκφραση του TNF και του TGFB και να

προλάβει έτσι το κυτταρικό θάνατο των κυττάρων του ενδομητρίου που έρχονται σε επαφή με αποπτωτικούς παράγοντες.²⁶ Ο HBEGF όμως φαίνεται να συμμετέχει σε έναν ευρύτερο πεδίο που περιλαμβάνει κι άλλα μόρια και πιο συγκεκριμένα το σηματοδοτικό μονοπάτι τροφινίνης-βυστίνης. Στον άνθρωπο τόσο τα τροφοβλαστικά κύτταρα, όσο και τα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας εκφράζουν τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη τροφινίνη που μεσολαβεί στη κυτταρική προσκόλληση μέσω ομοφιλικών δεσμών. Η τροφινίνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την κυτταροπλασματική βυστίνη και τον ERBB4, αναστέλλοντας έτσι τη φωσφορυλίωση του ERBB, γεγονός αναγκαίο για τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της συμπλησίασης της τροφοβλάστης και του ενδομητρικού επιθηλίου, η βυστίνη διαχωρίζεται από τη τροφινίνη με επακόλουθο τη τυροσινική φωσφορυλίωση του ERBB4, ο οποίος θα μπορεί πια να ενεργοποιηθεί από τον HBEGF και να πυροδοτήσει έτσι τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης.²⁷

Αναφορικά με τη διαδικασία της πλακουντοποίησης, τα μέλη της οικογένειας του EGF φαίνεται πως συμμετέχουν εξίσου ενεργά. Η πλακουντιακή έκφραση του HBEGF ανιχνεύεται και στα τρία τρίμηνα, ιδίως όμως στο πρώτο. Αλλά και άλλα μέλη της EGF οικογένειας και υποδοχείς ERBB με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης εκφράζονται σε τροφοβλαστικά κύτταρα, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του πλακούντα.¹² Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως ο HBEGF υποκινεί την έναρξη της τροφοβλαστικής διείσδυσης. Είναι γνωστό πως οι 10 πρώτες εβδομάδες της κύησης είναι περίοδος χαμηλής παροχής οξυγόνου στη μήτρα ($\approx 2\% O_2$), με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται ένα περιβάλλον ευνοϊκό για το πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων και ταυτόχρονα κατασταλτικό για τη διείσδυση, ενώ μετά τη 10^η εβδομάδα φαίνεται πως ξεκινά η αναδιαμόρφωση των σπείροειδών αρτηριών. Η απόδειξη πως ο HBEGF δίνει το έναυσμα για τη μετάβαση αυτή ήρθε από πειράματα σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων τροφοβλαστικών κυττάρων όπου σε αντίστοιχες συνθήκες συγκέντρωσης O_2 παρατηρήθηκε η έκφραση κι η έκκριση μόνο του HBEGF, κι όχι άλλων μελών της ίδιας οικογένειας. Ενώ στις ίδιες συνθήκες μετά την έκφραση του HBEGF φαίνεται πως αναστέλλεται κι η απόπτωση.²⁸



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του HBEGF στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου επάγει τη μετατροπή από τη πρόδρομη στην τελική μορφή του HBEGF, ο οποίος προσδενόμενος στον υποδοχέα ERBB επάγει τη φωσφορυλίωση του τελευταίου και πυροδοτεί έτσι, τα μονοπάτια MAPK (ERK, p38, JNK) που αυξάνουν τη συγκέντρωση του HBEGF και αποτρέπουν την απόπτωση.²⁹

Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, ο πλακούντας είναι προγραμματισμένος να επιβιώνει σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης O₂. Ωστόσο, αν αυτό δεν αποκατασταθεί η κύηση επιπλέκεται με την εμφάνιση προεκλαμψίας και ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης. Καταστάσεις που δεν έχουν μόνο κοινό παρονομαστή την ανεπαρκή τροφοβλαστική διείσδυση και την αυξημένη απόπτωση, αλλά και τη κοινή ρύθμιση από το μονοπάτι του HBEGF, καθώς συγκριτικές μελέτες έκφρασης του HBEGF σε φυσιολογικές και προεκλαμπτικές κυήσεις κατέδειξαν τη μειωμένη πλακουντιακή έκφραση αυτού στις παθολογικές περιπτώσεις.³⁰

Ο ρόλος της υποξίας και των NK κυττάρων : Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η πρώιμη πλακουντοποίηση στον άνθρωπο (< 8^η εβδομάδα κύησης) λαμβάνει χώρα σε συνθήκες υποξίας (P_{O₂}< 20 mmHg, <3% O₂). Συνθήκες που εκτός από το πολλαπλασιασμό τροφοβλαστικών κυττάρων, επάγουν και τη διαφοροποίησή τους μέσω της έκφρασης παραγόντων όπως ο HIF (hypoxia inducible factor), η ιντεγκρίνη-α₅ και τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA-G. Τα τελευταία μάλιστα έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς εκφράζονται αποκλειστικά στην εξωκυτταρική

τροφοβλάστη και αλληλεπιδρούν με τα ΚΝ κύτταρα του φθαρτού. Η αλληλεπίδραση αυτή διεκπεραιώνεται μέσω των KIR υποδοχέων που φέρουν στην επιφάνεια τους τα NK κύτταρα και σκοπό έχει την επακόλουθη παραγωγή κυτταροκινών και αγγειογενετικών παραγόντων που θα πυροδοτήσουν τη τροφοβλαστική διείσδυση.

31

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ ΚΑΙ ΣΕ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Σημαντικός αριθμός κυήσεων επιπλέκονται με παθολογικές καταστάσεις όπως η προεκλαμψία, η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης κι ο πρόωρος τοκετός. Κοινός παρονομαστής σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η ανώμαλη ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα.³² Η φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα εξαρτάται από τη διαφοροποίηση και την είσδυση της τροφοβλάστης, του βασικού κυτταρικού στοιχείου του πλακούντα που προέρχεται από το τροφοεξώδερμα της βλαστοκύστης. Όπως κάθε αναπτυσσόμενο όργανο, έτσι κι ο πλακούντας υφίσταται συνεχή ιστική αναδιαμόρφωση, που χαρακτηρίζεται από τη λειτουργική απώλεια των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω της απόπτωσης.⁹ Η απόπτωση είναι μια ενεργός διαδικασία στην οποία προεξάρχοντα ρόλο κατέχει μια οικογένεια πρωτεασών: οι κασπάσες, ενώ η δράση τους ρυθμίζεται από αρκετούς ενδογενείς αναστολείς, όπως οι IAPs, οι FLIPs και τα μέλη της οικογένειας Bcl-2. Αποπτωτικά κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί τόσο στην εμβρυϊκή, όσο και στη μητρική επιφάνεια του πλακούντα σε φυσιολογικές κυήσεις, ενώ η παρουσία αυτών των κυττάρων φαίνεται να συσχετίζεται με στάδια της πλακουντιακής ανάπτυξης, όπως η προσκόλληση κι η είσδυση της τροφοβλάστης, η αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών κι η διαφοροποίηση της τροφοβλάστης. Επιπλέον, η απόπτωση εμπλέκεται άμεσα στην ανάπτυξη ανοχής του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των πατρικών αντιγόνων που εκφράζονται και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Γενικά, η διαδικασία της απόπτωσης συμπορεύεται με την ενεργοποίηση των μακροφάγων, των κυττάρων που θα απομακρύνουν τα νεκρά κύτταρα μέσω φαγοκυττάρωσης, ενισχύοντας έτσι την επιβίωση των υπόλοιπων τροφοβλαστικών κυττάρων και διευκολύνοντας την είσδυση και την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών.¹¹

Παρακάτω θα αναλυθούν εκτενέστερα όλες αυτές οι διαδικασίες αλλά και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που τους διέπουν.

Ο ρόλος της απόπτωσης στη φυσιολογική κύηση :

Η εμβρυϊκή εμφύτευση εξελίσσεται σε τρεις διακριτές φάσεις: τη συμπλησίαση, τη προσκόλληση και την είσδυση, και στις τρεις εκ των οποίων φαίνεται να εμπλέκεται ο μηχανισμός της απόπτωσης. Στο στάδιο της συμπλησίασης, η βλαστοκύστη αλληλεπιδρά με το ενδομήτριο με σκοπό να προετοιμαστεί για την επακόλουθη

εμφύτευση. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως η παρουσία της ανθρώπινης βλαστοκύστης μειώνει τα ποσοστά απόπτωσης στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, προφανώς μέσω της παραγωγής αντιαποπτωτικών παραγόντων. Αντίθετα, όταν η βλαστοκύστη έχει προσκολληθεί στο ενδομήτριο πυροδοτείται μαζική απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων στο σημείο της προσκόλλησης και πέριξ αυτού. Ένας πιθανός μηχανισμός που επιτυγχάνεται αυτό είναι το σύστημα Fas/FasL. Η πλειοψηφία των επιθηλιακών ενδομητρικών κυττάρων εκφράζουν την πρωτεΐνη Fas στην επιφάνεια τους, ενώ ο FasL εκφράζεται στο τροφοεξώδερμα. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης φαίνεται πως το έμβρυο καθίσταται ικανό να διασπάσει τον επιθηλιακό φραγμό και να εισβάλλει στο φθαρό.^{33,4}

Αποπτωτικές διεργασίες φαίνεται πως εμπλέκονται και στο μετασχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών. Πιο αναλυτικά, προαποπτωτικά σήματα προερχόμενα από την εμφυτευμένη βλαστοκύστη, επάγουν το κυτταρικό θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Και σε αυτή τη περίπτωση, ο επαγωγικός μηχανισμός περιλαμβάνει το σύστημα Fas/FasL, καθώς όχι μόνο τα ενδοθηλιακά κύτταρα των σπειροειδών αρτηριών αλλά και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών εκφράζουν τη πρωτεΐνη Fas.^{34,35}

Αναφορικά με την ανάπτυξη της μητρικής ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος, κι εδώ η απόπτωση διαδραματίζει ενεργό ρόλο. Η αποφυγή της απόρριψης της τροφοβλάστης, που για το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα θα έπρεπε να αντιμετωπίζεται ως αντιγόνο, φαίνεται πως επιτυγχάνεται μέσω της απόπτωσης.⁴ Πιο συγκεκριμένα, τα μητρικά T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν τα πατρικά αντιγόνα της τροφοβλάστης είναι εκλεκτικά καταργημένα κατά τη διάρκεια της κύησης. Και πάλι ο μηχανισμός μέσω του οποίου αναπτύσσεται η ανοχή των T λεμφοκυττάρων στα πατρικά αλλοαντιγόνα είναι το σύστημα Fas/FasL.³⁶

Μια ακόμα σημαντική λειτουργία της απόπτωσης στη διάρκεια της κύησης είναι η ρύθμιση της τροφοβλαστικής ανάπτυξης κι η αναστροφή προς το σχηματισμό λαχνών. Η χοριακή τροφοβλάστη είναι ένας ενεργός ιστός που υφίσταται συνεχή αναδιαμόρφωση και ανανέωση. Σε φυσιολογικές κυήσεις, είναι γνωστό πως τα ποσοστά απόπτωσης στα τροφοβλαστικά κύτταρα αυξάνονται με την εξέλιξη της κύησης. Είναι γνωστό πως η χοριακή τροφοβλάστη αποτελείται από δυο είδη κυτταρικών πληθυσμών: τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα και το συγκυτιοτροφοβλαστικό στρώμα. Τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα στερούνται

της ικανότητας πολλαπλασιασμού και συνεπώς η ανάπτυξη κι η αναγέννηση της χοριακής τροφοβλάστης εξαρτάται από το κυτταροτροφοβλαστικό πληθυσμό. Τα αρχικά πολλαπλασιαζόμενα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται και καταλήγουν να συγχωνεύονται με το συγκυτιοτροφοβλαστικό στρώμα. Ακολουθεί μια δεύτερη διαδικασία διαφοροποίησης που συμβαίνει στο εξωτερικό συγκυτιοτροφοβλαστικό στρώμα και αφορά τους γηρασμένους πυρήνες που πακετάρονται και αποβάλλονται στη μητρική κυκλοφορία.³⁷ Αρκετά στοιχεία του αποπτωτικού καταρράκτη εκφράζονται τόσο στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, όσο και στο συγκυτιοτροφοβλαστικό στρώμα, κι αυτό φαίνεται να συσχετίζεται με το στάδιο της απόπτωσης που παρατηρείται στα διάφορα στοιχεία του πλακούντα. Η πυροδότηση της αποπτωτικής αλυσίδας αρχίζει από τους κυτταροτροφοβλάστες κι ολοκληρώνεται στους συγκυτιοτροφοβλάστες πριν από την αποβολή των αποπτωτικών πυρήνων. Συνεπώς, η αρχική ενεργοποίηση του αποπτωτικού καταρράκτη φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τη πυροδότηση της διαφοροποίησης των κυτταροτροφοβλαστικών κυτάρων παρά με το θάνατο των τροφοβλαστών και σε αυτή τη διεργασία σημαντικό ρόλο κατέχουν οι κασπάσες.³⁸

Ενδογενής ρύθμιση της τροφοβλαστικής απόπτωσης :

Κάθε βήμα του αποπτωτικού καταρράκτη ρυθμίζεται αυστηρά από ενδογενείς αναστολείς που προλαμβάνουν την ανεξέλεγκτη διάδοση αποπτωτικών σημάτων. Αρκετοί από αυτούς τους ενδοκυττάριους αναστολείς εκφράζονται και στο πλακούντα, συμπεριλαμβανομένου των FLIPs, μόρια που έχουν σημαντική δομική ομοιότητα με την κασπάση-8. Η έκφραση των FLIPs στα τροφοβλαστικά κύτταρα βρέθηκε σημαντικά αυξημένη κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, γεγονός που μάλλον στοχεύει στην αναστολή της ενδοκυττάριας αποπτωτικής αλυσίδας και στην ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης, όπως ο NF-κB.³⁹ Ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει και τις δυο ισομορφές του FLIP: FLIP_S (short) και FLIP_L (long). Αξιοσημείωτη είναι η ισορροπία που αναπτύσσεται ανάμεσα στην έκφραση του ισχυρού αυτού αναστολέα της κασπάσης-8 και ταυτόχρονα της έκφρασης της κασπάσης-8 στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Η απάντηση προκύπτει από την μοναδική ικανότητα του FLIP_S να αλληλεπιδρά αποκλειστικά με μια επικράτεια της κασπάσης-8, την DISC, επάγοντας την αναστολή της. Σε αντίθεση, ο FLIP_L δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την επικράτεια DISC και άρα δεν μπορεί να αναστείλει τη

κασπάση-8. Συμπερασματικά, φαίνεται πως ο FLIP_S μπορεί να αναστείλει τη δράση της κασπάσης-8 μέσω της επικράτειας DISC, προστατεύοντας έτσι τα τροφοβλαστικά κύτταρα από την Fas-μεσολαβούμενη απόπτωση, αλλά δεν είναι σε θέση να αποτρέψει την ανεξάρτητη της DISC ενεργοποίηση της.⁴⁰

Η οικογένεια Bcl-2 αποτελείται από πρωτεΐνες που αναστέλλουν τα σήματα θανάτου είτε απευθείας, είτε αναχαιτίζοντας την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια. Αναφορικά με την έκφρασή τους στο πλακούντα, οι συγκυτιοτροφοβλάστες φαίνεται να εκφράζουν περισσότερο τη Bcl-2, όπως και τη Mcl-1 (επίσης αντιαποπτωτική πρωτεΐνη) από ότι τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Αυτό το πρότυπο έκφρασης σχετίζεται άμεσα με τη πρόληψη της συγκυτιοτροφοβλαστικής απόπτωσης μετά τη συγκυτιακή διάχυση.⁴¹ Ωστόσο, να σημειωθεί πως η Bcl-2 και η Mcl-1 αναστέλλουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, αφήνοντας ακέραιη την κασπάση-8, που παίζει βασικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστών.⁴

Η οικογένεια των πρωτεϊνών IAPs έχει τη μοναδική ιδιότητα να αναστέλλει τόσο το μιτοχονδριακό, όσο και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από οκτώ μέλη. Μεταξύ αυτών, ο XIAP φαίνεται να έχει το πιο δυναμικό και πολύπλευρο ρόλο, διαθέτοντας την ικανότητα αναστολής τόσο της κασπάσης-9, όσο και των κασπάσης-7 και -3.⁴² Η έκφραση του XIAP είναι σημαντικά υψηλή στην ενδολάχνια τροφοβλάστη αλλά και στους συγκυτιοτροφοβλάστες στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, ενώ μειώνεται σημαντικά στο τρίτο τρίμηνο.⁴³ Συνεπώς, η δράση του φαίνεται να εστιάζεται στη προστασία των τροφοβλαστικών κυττάρων από την Fas-μεσολαβούμενη απόπτωση κατά τη διάρκεια της κυτταροτροφοβλαστικής διαφοροποίησης, αναστέλλοντας την ενεργότητα της κασπάσης-9 και -3 και προάγοντας το σχηματισμό του συγκυτίου. Αντίθετα, όταν η έκφραση του XIAP μειωθεί αυτομάτως επάγεται η απόπτωση στη τροφοβλάστη.⁴

Εξωγενής ρύθμιση της τροφοβλαστικής απόπτωσης :

Η απόπτωση σε πολυάριθμες περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα εξωγενών ερεθισμάτων, που δεν αποτελούν μέρος των αλληλεπιδράσεων του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, τέτοια παραδείγματα είναι οι κυτοκίνες κι οι αυξητικοί παράγοντες.

Κυτοκίνες των Th1 και Th2 βοηθητικών κυττάρων: Η δράση των κυτοκινών μπορεί να έχει άκρως αντίθετο αποτέλεσμα στην επιβίωση της τροφοβλάστης. Έτσι, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες εκκρινόμενες από τα Th1 κύτταρα, όπως ο TNF-α και η INF-γ μπορούν να επάγουν τη τροφοβλαστική απόπτωση προάγοντας την έκφραση στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα μορίων όπως ο Fas, οδηγώντας σε αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3.⁴⁴ Αντίθετα, αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες παραγόμενες από τα Th2 κύτταρα, όπως η IL-10, μπορούν να αναστείλουν την αποπτωτική δράση των TNF-α και INF-γ, αυξάνοντας την έκφραση του FLIP στα τροφοβλαστικά κύτταρα.⁴⁰

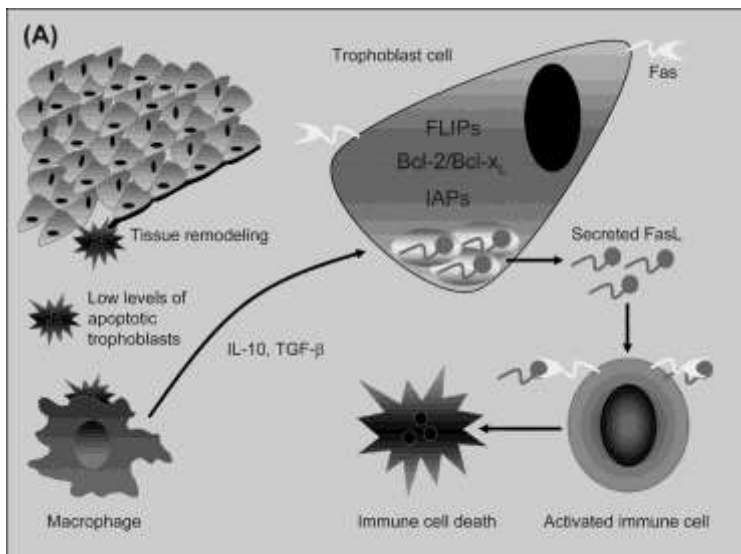
Αυξητικοί παράγοντες: Είναι γνωστό πως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) μπλοκάρει ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένου του TNF-α και της INF-γ, τόσο στα κυτταροτροφοβλαστικά, όσο και στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Όμοια δράση φαίνεται πως έχουν και οι IGF-I, PDGF και bFGF.⁴

Ο ρόλος των μακροφάγων στη ρύθμιση της τροφοβλαστικής απόπτωσης :

Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο γεγονός πως με την ενεργοποίηση της απόπτωσης δεν επέρχεται το τέλος. Η γρήγορη και αποτελεσματική απομάκρυνση των προϊόντων της απόπτωσης είναι βασικό στοιχείο για τη πρόληψη φλεγμονώδους απάντησης. Στη διαδικασία αυτή προεξάρχουσα θέση κατέχουν τα μακροφάγα.⁴

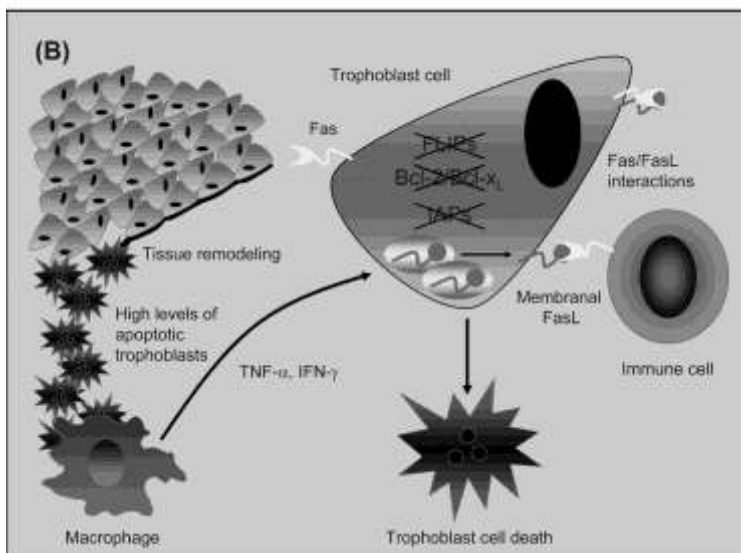
Όπως προαναφέρθηκε, η επικράτηση αντιφλεγμονωδών έναντι προφλεγμονωδών κυτοκινών ως μητρική απάντηση, είναι κομβικής σημασίας για διατήρηση ή όχι της κύησης. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού κι ιδίως τα μακροφάγα είναι η κύρια πηγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, ο ρόλος των οποίων, είναι σημαντικός για τη διαμόρφωση του κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος στην εμβρυο-μητρική επιφάνεια.⁴⁵ Τα μακροφάγα αποτελούν περίπου το 20-30% των ανοσοποιητικών κυττάρων στο σημείο της εμφύτευσης, κι ο αριθμός τους παραμένει σταθερά υψηλός σε όλη τη διάρκεια της κύησης.⁴⁶ Στις πρώτες εβδομάδες μετά την εμφύτευση, τα μακροφάγα ανιχνεύονται στο φθαρτό, ενώ στο τέλος του πρώτου τριμήνου εντοπίζονται στο στρώμα που περιβάλλει την εξωλάχνια τροφοβλάστη. Κατά τη διάρκεια της κύησης, το υλικό που προκύπτει από την απόπτωση των τροφοβλαστών και απελευθερώνεται μέσω των συγκυτιοτροφοβλαστών στη μητρική κυκλοφορία βαίνει αυξανόμενο- υλικό το οποίο γενετικά είναι ξένο για το μητρικό

ανοσοποιητικό σύστημα. Συνεπώς, η έγκαιρη απομάκρυνση των νεκρών τροφοβλαστών είναι κρίσιμη παράμετρος για τη διατήρηση της κύησης. Η διαδικασία αυτή διεκπεραιώνεται από τα μακροφάγα των ιστών ή από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει πως ο ρόλος των μακροφάγων δεν περιορίζεται μόνο στη συλλογή και απομάκρυνση των νεκρών τροφοβλαστών αλλά μάλλον επεκτείνεται και στην οργάνωση της επιλογής μεταξύ θανάτου και επιβίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητα των μακροφάγων να επηρεάζουν το θάνατο ή την επιβίωση των τροφοβλαστών ρυθμίζεται από το βαθμό πρόσληψης των αποπτωτικών κυττάρων, καθώς η συλλογή τους από τα μακροφάγα πυροδοτεί τη παραγωγή αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών όπως η IL-10 και ο TGF- β . Η έκκριση των μορίων αυτών θα δώσει το έναυσμα για την έκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων επάγοντας την επιβίωση των υπόλοιπων τροφοβλαστών.⁴



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της κάθαρσης των αποπτωτικών κυττάρων κατά την επιβίωση της τροφοβλάστης.

A) στη φυσιολογική κύηση και B) σε επιπλεγμένη κύηση.⁴



Εκτός όμως από τη φαγοκυττάρωση των νεκρών τροφοβλαστών και την έκκριση κυτοκινών, τα μακροφάγα φαίνεται πως δύνανται να επάγουν την απόπτωση σε κύτταρα στόχους. Αναλυτικότερα, τα μακροφάγα διευκολύνουν την είσδυση των τροφοβλαστών και την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών επάγοντας την απόπτωση των ενδοθηλιακών και των κυττάρων των λειών μυϊκών ινών. Ο πιθανότερος μηχανισμός για να συμβεί αυτό φαίνεται πως είναι η έκκριση του FasL από τα μακροφάγα. Με τον τρόπο αυτό, τα μακροφάγα δρουν σε δυο επίπεδα, συνεργικά για τη τροφοβλαστική είσδυση και ταυτόχρονα προστατευτικά έναντι των ουδετερόφιλων κυτοκινών που θα μπορούσαν να αναστείλουν την εξέλιξη της τροφοβλαστικής διείσδυσης.⁴

Τροφοβλαστική απόπτωση και επιπλοκές της κύησης : Η απόπτωση τόσο στην ενδολάχνια, όσο και στην εξωλάχνια τροφοβλάστη φαίνεται να συσχετίζεται με επιπλοκές της κύησης, όπως η προεκλαμψία ή ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR), καταδεικνύοντας τη σημαντικότητα της σωστής ρύθμισης της τροφοβλαστικής απόπτωσης στην εξέλιξη και στην έκβαση της κύησης. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί πως πλακούντες προερχόμενοι από κυήσεις με σοβαρή προεκλαμψία ή IUGR έχουν σαφώς μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2, τόσο στους συγκυτιοτροφοβλάστες, όσο και στους εξωλάχνιους κυτταροτροφοβλάστες.⁴⁸ Συνεπώς, η μειωμένη έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στις παθολογικές αυτές καταστάσεις, επάγει την υπέρμετρη απόπτωση.⁴ Ιδιαίτερα στη προεκλαμψία, η αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα μπορεί να είναι είτε η γενεσιουργός αιτία, είτε το επακόλουθο άλλων διαταραχών, όπως η υποξία, ή η παθολογική μητρική ανοσολογική απόκριση προς το έμβρυο, που στα πλαίσια ενός φαύλου κύκλου ενισχύει το αρχικό αίτιο. Τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της τύπου 1 ανοσολογικής απάντησης, με υπερπαραγωγή INF-γ, που μπορεί να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή διαταραχή και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.⁴⁹ Επίσης, ενεργό συμμετοχή στη μείωση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3 έχει η υποξία που πυροδοτεί το οξειδωτικό στρες στο πλακούντα.⁵⁰

Επιπλέον, σε παθολογικές κυήσεις η αυξημένη τροφοβλαστική απόπτωση συνεπάγεται ανεπαρκή διήθηση των σπειροειδών αρτηριών και απουσία αναδιαμόρφωσης των αγγείων, καταλήγοντας τελικά σε ανεπαρκή αιματική παροχή

στο έμβρυο. Από την άλλη πλευρά, σε φυσιολογικές κυήσεις η πρόσληψη των αποπτωτικών κυττάρων καταστέλλει τη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων από τα μακροφάγα και προάγει την έκκριση αντιφλεγμονωδών πρωτεϊνών. Αντίθετα, σε παθολογικές κυήσεις ο αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων κατακλύζει τα μακροφάγα και επάγει τη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, ενισχύοντας περαιτέρω την απόπτωση. Επιπρόσθετα, σε κυήσεις επιπλεγμένες με προεκλαμψία ή IUGR, διαφοροποιείται ακόμα και η κατανομή των μακροφάγων. Ενώ φυσιολογικά τα μακροφάγα εντοπίζονται στο στρώμα που περιβάλλει την εξωλάχνια τροφοβλάστη και τις σπειροειδείς αρτηρίες, στους παθολογικούς πλακούντες τα μακροφάγα παρατηρούνται στο στρώμα μεταξύ σπειροειδών αρτηριών και τροφοβλαστικών κυττάρων. Τελικά, σε παθολογικές κυήσεις τα μακροφάγα φαίνεται πως δρουν σαν φραγμός στην διείσδυση των σπειροειδών αρτηριών επάγοντας την απόπτωση, αντί να διευκολύνουν την αναδιαμόρφωση των μητρικών αγγείων.⁵¹

Ένας ακόμα παράγοντας που προκαλεί αύξηση της τροφοβλαστικής απόπτωσης και συνδέεται άμεσα με παθολογικές καταστάσεις, όπως η προεκλαμψία, ο πρόωρος τοκετός και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης είναι η ενδομήτρια λοίμωξη. Η απάντηση της τροφοβλάστης στη λοίμωξη φαίνεται πως δίνεται μέσα από την έκφραση της οικογένειας των παραγόντων TLRs (toll-like receptors). Η πρόσδεση είτε στον TLR-2 είτε στον TLR-4 υποδοχέα επάγει άμεσα κι έμμεσα αντίστοιχα την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων με την ταυτόχρονη πυροδότηση παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών.⁵²

Τα προϊόντα της τροφοβλαστικής απόπτωσης και ο ρόλος τους : Το μεγαλύτερο τμήμα της εμβρυομητρικής επιφάνειας αποτελείται από τη συγκυτιοτροφοβλάστη, η έκταση της οποίας στο τέλος της κύησης υπολογίζεται περίπου σε 11,3 m².⁵³ Ωστόσο, τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης φαίνεται πως έχουν ορισμένο χρόνο ζωής κι πέραν αυτού υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα προϊόντα της απόπτωσης βρίσκονται σε επαφή με το φθαρτό και απελευθερώνονται στη μητρική κυκλοφορία από την 6^η εβδομάδα της κύησης, με προοδευτικά αυξανόμενο ρυθμό. Είναι εύκολα αντιληπτό πως σε παθολογικές καταστάσεις με αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα, ο αριθμός των κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων είναι κατά πολύ μεγαλύτερος. Αντιστοίχως, τα κυτταρικά αυτά προϊόντα παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις φλεγμονωδών παραγόντων, όπως η IL-12 και η INF-γ και πυροδοτούν με τον τρόπο αυτό φλεγμονώδη αντίδραση στο

μητρικό οργανισμό.⁵⁴ Στο μηχανισμό αυτό, φαίνεται πως αποδίδονται και οι συστηματικές εκδηλώσεις προεκλαμπτικών μητέρων.⁵⁵

ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

M30

Οι κυτταροκερατίνες είναι μια ομάδα είκοσι πρωτεϊνών που αποτελούν βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού και ανιχνεύονται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα.⁵⁶ Η κυτταροκερατίνη 18 κατά τη διάρκεια της απόπτωσης διασπάται από τις κασπάσες κι ιδιαίτερα από τη κασπάση 3. Προϊόν αυτής της διάσπασης είναι ο νεοεπίτοπος CK18 Asp396 NE ο οποίος μπορεί να ανιχνευτεί τόσο στον ορό, όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες αλλά και σε ιστοτεμάχια σκηνωμένα σε παραφίνη. Αναγνωρίζεται από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα IgG (M30) το οποίο μπορεί να ανιχνεύει τα πρώιμα στάδια της απόπτωσης πριν από το κατακερματισμό του DNA.⁵⁷

TUNEL

Η τεχνική TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling) ανήκει στις έμμεσες μεθόδους ανίχνευσης κατακερματισμού του DNA, βασιζόμενη στην απευθείας εντόπιση των ενσωματούμενων νουκλεοτιδίων τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (deoxyuridine triphosphate–dUTP) στα σημεία θραύσεις είτε της μονής, είτε της διπλής έλικας. Η εν λόγω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο τελική δεοξυ-νουκλεοτιδυλ- τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT) και τα νουκλεοτίδια dUTP που χρησιμοποιούνται είναι σημασμένα ώστε να είναι εφικτή η εντόπιση του κατακερματισμένου DNA είτε με μικροσκόπιο φθορισμού, είτε με οπτικό ή και με κυτταρομετρία ροής. Γενικά, αποτελεί μια αξιόπιστη κι εύκολη επιλογή για την άμεση ανίχνευση θραύσεων στις έλικες του DNA, χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερος εξοπλισμός.⁵⁸

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη προσπάθεια κατανόησης μιας από τις συχνότερες εκδηλώσεις της ανθρώπινης υπογονιμότητας, αυτής των αυτόματων αποβολών, ο ρόλος της τροφοβλάστης έχει επιβεβαιωθεί από πλειάδα μελετών. Η επίτευξη ισορροπίας ανάμεσα σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα πρωταρχικά στάδια της κύησης καθορίζουν σημαντικά τη μετέπειτα εξέλιξη κι έκβαση της.

Η παρούσα μελέτη στόχευε στην ανάδειξη του πολυδιάστατου ρόλου της απόπτωσης στη διαδικασία διαφοροποίησης της τροφοβλάστης- ενός γεγονότος βασικού όχι μόνο για τη διατήρηση αλλά και για τη πορεία της κύησης. Υλικό της μελέτης αποτέλεσε τροφοβλαστικός ιστός προερχόμενος από φυσιολογικές και παθολογικές κυήσεις πρώτου τριμήνου. Για τη μελέτη της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένοι αποπτωτικοί δείκτες: M30 & TUNEL.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το υλικό για το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο αποτελούνταν από εβδομήντα δύο (72) δείγματα τροφοβλάστης. Από αυτά, σαράντα δύο (42) προήλθαν από αυτόματες αποβολές 1^{ου} τριμήνου (παθολογικές κύσεις), ενώ τα υπόλοιπα τριάντα (30) προήλθαν από ηθελημένες διακοπές κύησης (φυσιολογικές κύσεις) με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Η ηλικία κύησης στο σύνολο του δείγματος κυμαίνονταν από 8^η-12^η εβδομάδα. Στο κάθε δείγμα ιστού εφαρμόστηκαν ως αποπτωτικοί δείκτες το μονοκλωνικό αντίσωμα M30 και η μέθοδος ανίχνευσης κυτταρικού θανάτου TUNEL.

Το υλικό αυτό προήλθε από την Πανεπιστημιακή Μαιευτική- Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Έβρου και χρονολογείται από το 2010 έως και 2015. Στο παρακάτω πίνακα καταγράφονται η ηλικία της μητέρας κι ο τόκος ανά περίπτωση.

| Αριθμός | Ηλικία Μητέρας | Τόκος |
|--------------------|-------------------|-------|
| ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ | | |
| 1 | 36 | I |
| 2 | 26 | II |
| 3 | 28 | I |
| 4 | 27 | II |
| 5 | 39 | I |
| 6 | 33 | II |
| 7 | 36 | I |
| 8 | 28 | II |
| 9 | 35 | I |
| 10 | 31 | II |
| 11 | 34 | I |
| 12 | 25 | I |
| 13 | 30 | II |
| 14 | 38 | I |
| 15 | 36 | I |
| 16 | 32 | I |
| 17 | 38 | I |
| 18 | 32 | II |

| | | |
|---------------------|----|-----|
| 19 | 22 | I |
| 20 | 16 | II |
| 21 | 35 | I |
| 22 | 32 | II |
| 23 | 26 | I |
| 24 | 15 | I |
| 25 | 36 | I |
| 26 | 35 | I |
| 27 | 38 | I |
| 28 | 25 | III |
| 29 | 27 | I |
| 30 | 36 | I |
| 31 | 34 | IV |
| 32 | 29 | I |
| 33 | 35 | I |
| 34 | 29 | II |
| 35 | 34 | I |
| 36 | 29 | II |
| 37 | 38 | I |
| 38 | 34 | II |
| 39 | 26 | I |
| 40 | 37 | I |
| 41 | 23 | II |
| 42 | 39 | I |
| ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ | | |
| 43 | 29 | III |
| 44 | 15 | I |
| 45 | 36 | I |
| 46 | 35 | III |
| 47 | 24 | I |
| 48 | 25 | IV |
| 49 | 17 | I |
| 50 | 40 | III |
| 51 | 34 | IV |
| 52 | 33 | III |
| 53 | 14 | I |
| 54 | 29 | II |
| 55 | 30 | II |
| 56 | 29 | II |
| 57 | 38 | I |

| | | |
|----|----|-----|
| 58 | 34 | III |
| 59 | 26 | II |
| 60 | 27 | I |
| 61 | 23 | III |
| 62 | 29 | II |
| 63 | 34 | III |
| 64 | 26 | II |
| 65 | 21 | I |
| 66 | 34 | III |
| 67 | 26 | I |
| 68 | 33 | I |
| 69 | 23 | III |
| 70 | 28 | VI |
| 71 | 25 | I |
| 72 | 30 | III |

Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία ανά δείγμα

Οι προς μελέτη ιστοί διατηρούνται σε ουδέτερη φορμόλη 10%. Από τους ιστούς αυτούς λήφθησαν ιστοτεμάχια τα οποία αφού μονιμοποιήθηκαν, σκηνώθηκαν σε παραφίνη. Η διαδικασία μονιμοποίησης των ιστών που είναι τοποθετημένοι σε κασέτες εγκλεισμού περιλαμβάνει αρχικά το στάδιο της αφυδάτωσης. Αυτό λαμβάνει χώρα εξολοκλήρου στην ιστοκινέτα, ένα μηχάνημα με δώδεκα σταθμούς που ο καθένας περιέχει διαφορετικό διάλυμα. Η συνολική επεξεργασία των ιστών στην ιστοκινέτα μπορεί να διαρκέσει από δεκαοκτώ (18) έως και είκοσι τέσσερις (24) ώρες. Κατά το διάστημα αυτό οι ιστοί παραμένουν αρχικά σε διάλυμα φορμόλης και ακολούθως σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 95%, σε διάλυμα ξυλόλης, ενώ στους δυο τελευταίους σταθμούς οι ιστοί επεξεργάζονται με παραφίνη.

Μετά τη μονιμοποίηση και αφυδάτωση, ακολουθεί το στάδιο της σκηνώσης σε υγρή παραφίνη. Χρησιμοποιούνται ειδικές μεταλλικές μήτρες για τη τοποθέτηση της βάσης από τις κασέτες εγκλεισμού και τη κάλυψη του δείγματος από υγρή παραφίνη που βρίσκεται περίπου στους 70°C. Τέλος, οι μήτρες τοποθετούνται σε μεταλλική ψυχωμένη επιφάνεια με σκοπό το σχηματισμό ακέραιων κύβων παραφίνης.

Από τους κύβους παραφίνης κάθε δείγματος λαμβάνονται ιστολογικές τομές πάχους τεσσάρων (4) μm.

Ανοσοϊστοχημεία: Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας είναι η αποπαραφίνωση των ιστολογικών τομών. Αυτό επιτυγχάνεται με ολονύχτια παραμονή στον κλίβανο στους 60°C. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις των τομών σε διαλύματα ξυλόλης, ξυλόλης και αιθανόλης 96%, αιθανόλης 96% και αιθανόλης 100% και τέλος έκπλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline).

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τον αποκλεισμό υπεροξειδάσης. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα παραμένουν για διάστημα 15 λεπτών σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) 0,3% με σκοπό τη δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Ακολουθεί έκπλυση σε PBS και τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε ειδικές θήκες που εφάπτονται κατά τέτοιο τρόπο με τις πλάκες, ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση και τη διάχυση των αντιδραστηρίων και των διαλυμάτων σε όλη την έκταση της πλάκας. Το στάδιο που ακολουθεί περιλαμβάνει την αντίδραση βιοτίνης – στρεπταβιδίνης με τα παρακάτω βήματα:

- i. Προσθήκη 100μl Blocking Reagent σε κάθε δείγμα και επώαση για 20 λεπτά
- ii. Προσθήκη αντισώματος και επώαση για 60 λεπτά

Η ανοσοϊστοχημική χρώση πραγματοποιήθηκε με το σύστημα ανίχνευσης της Dako (Real EnVision, Detection System kit, Dako, Glostrup, Denmark). Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην ανάπτυξη ενός συμπλόκου μεταξύ της αβιδίνης-βιοτίνης του αντισώματος και των επιτόπων των αντιγόνων στους ιστούς που μελετώνται. Για την οπτικοποίηση αυτής της σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο Dako EnVision (AEG, Dakocytomation).

Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη είναι οι εξής:

M30 CytoDeath (Roche Diagnostics) και TUNEL (PROMEGA)

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα αντισώματα, οι αραιώσεις με Phosphate Buffer Saline (PBS) και ο χρόνος επώασης.

| Αντίσωμα | Αραίωση | Χρόνος επώασης |
|----------|---------|----------------|
| M30 | 1/100 | 60min |

Αντίστοιχα για τη μέθοδο TUNEL:

| Τεχνική TUNEL | Ποσότητες | Επώαση |
|---|---|--------|
| Terminal Deoxynucleotide I transferase (Tdt) mediated dUTP Nick End Labeling | 450μl Label Solution και 50μl Enzyme Solution | 60 min |

Για τη μέθοδο TUNEL εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο όπως και στο M30.

- iii. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά
- iv. Προσθήκη 100μl/τομή δευτερογενούς αντισώματος και επώαση για 30 λεπτά
- v. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά
- vi. Προσθήκη 100μl/τομή από το αντιδραστήριο TUNEL και επώαση για 30 λεπτά (σύμφωνα με τις οδηγίες του kit)
- vii. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά.
- viii. Προσθήκη 125μl διαλύματος DAB/τομή . Επώαση για 3 λεπτά
- ix. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- x. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και αναμονή ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα
- xi. Προσθήκη 125μl αιματοξυλίνης/τομή και επώαση για 2 λεπτά
- xii. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και αναμονή ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα

Μετά από τα παραπάνω, απομακρύνονται οι πλάκες από τις ειδικές θήκες και σειρά έχει η αφυδάτωση των δειγμάτων με διαδοχικές πλύσεις σε διαλύματα εωσίνης,

αιθανόλης 96%, αιθανόλης 100%, μείγμα αιθανόλης 100% και ξυλόλης κι ολοκληρώνουμε με πλύση σε ξυλόλη.

Καλύπτουμε με καλυπτρίδες, ώστε να προστατεύεται η ιστολογική τομή και να είναι δυνατή η παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο. Χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse 50i με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα Nikon DIGITAL SIGHT DS-L1 (Nikon Corporation, Japan).

Η αξιολόγηση του συνόλου των αποτελεσμάτων βασίστηκε σε ένα ημι-ποσοτικό σύστημα βαθμολόγησης στο οποίο λαμβάνονταν υπόψιν η ένταση της χρώσης [Staining intensity (SI)] αλλά και η έκταση της [Positive Percentage (PP)]. Έτσι για κάθε ιστολογική τομή προέκυψε ένα score βασισμένο τόσο στην ένταση (καμία χρώση = 0, ασθενής χρώση = 1, μέτρια χρώση = 2, ισχυρή χρώση = 3), όσο και στην έκταση των χρωματισμένων κυττάρων (0 % = 0, 1-10 % = 1, 11-50 % = 2, 51-80 % = 3, 81-100 % = 4). Η τελική βαθμολογία προέκυψε ως το γινόμενο της βαθμολογίας της έντασης επί την έκταση, με ελάχιστη βαθμολογία την τιμή 0 και μέγιστη βαθμολογία την τιμή 12.⁵⁹

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

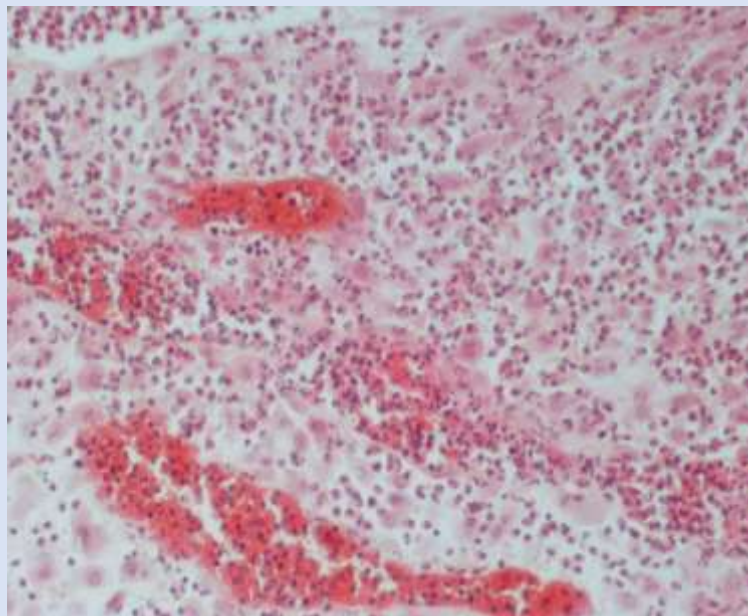
Στο παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη παρατήρηση του συνόλου των ιστολογικών τομών.

| | M30 | | | TUNEL | | |
|----------------------------|-----|----|------|-------|----|------|
| | PP | SI | PPSI | PP | SI | PPSI |
| ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 2 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | 2 | 6 |
| 4 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 5 | 2 | 3 | 6 | 2 | 2 | 4 |
| 6 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 7 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 8 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 12 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 13 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 14 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 15 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 16 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 17 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 18 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 19 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 20 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 21 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 22 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 23 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 24 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 25 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 26 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 27 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 28 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 29 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 30 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 31 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 32 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 33 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 34 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 35 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 36 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| 37 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 38 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 39 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 40 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 41 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 42 | 2 | 3 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| ΜΑΡΤΥΡΕΣ | | | | | | |
| 43 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 45 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

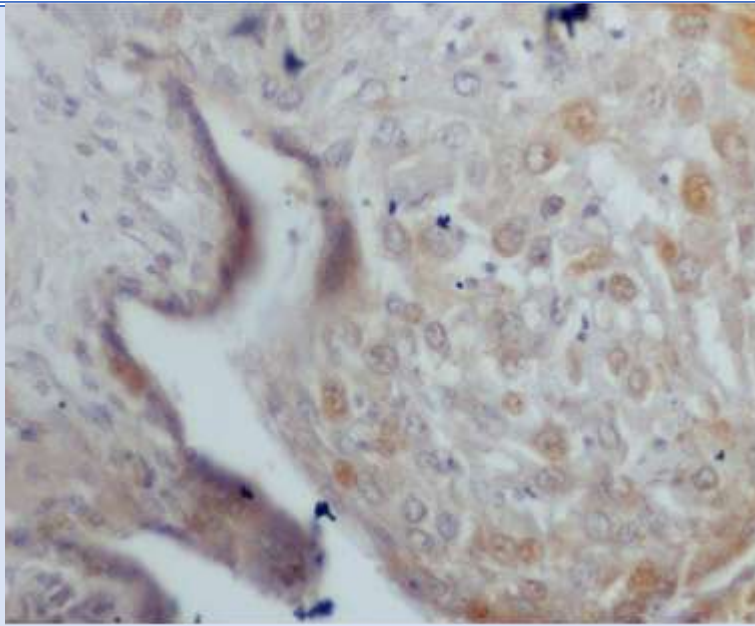
| | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|
| 47 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 49 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 51 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 52 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 54 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 58 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 60 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 61 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 62 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 63 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 65 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 66 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 67 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 68 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 69 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 70 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 71 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Πίνακας 2: Συνολικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τους δυο αποπτωτικούς δείκτες που εφαρμόστηκαν

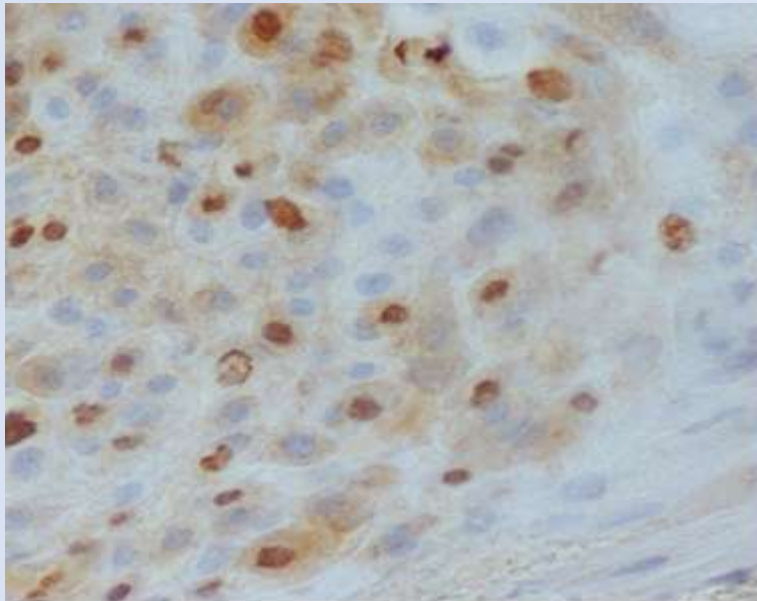
Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά φωτογραφίες ιστολογικών τομών χρώσης αιματοξυλίνης/ εωσίνης (H&E) και ανοσοϊστοχημείας για τους δυο αποπτωτικούς δείκτες.



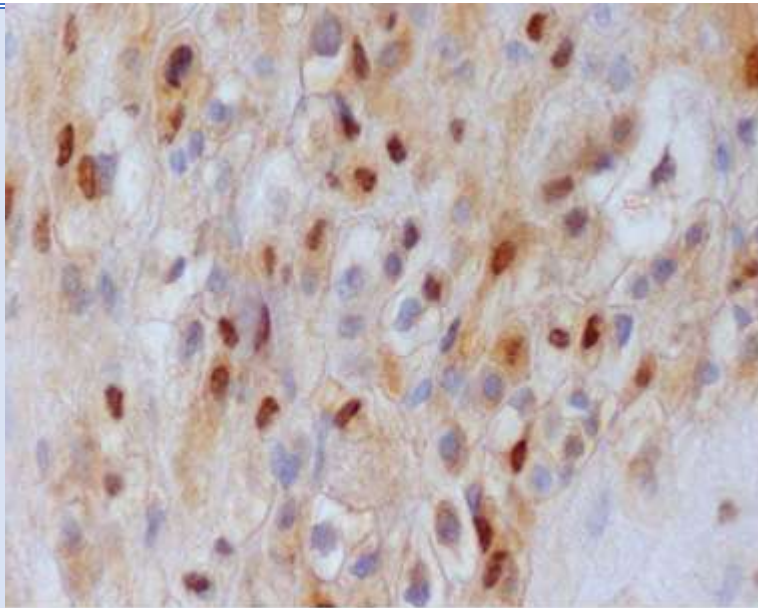
Εικόνα 7: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 9^η προερχόμενης από αυτόματη αποβολή -Χρώση H&E (X100).



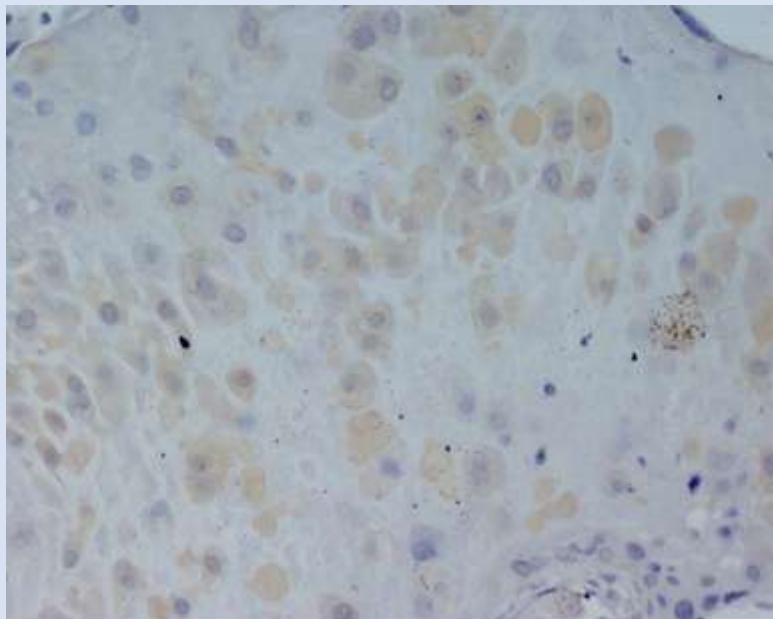
Εικόνα 8: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 11^ω προερχόμενης από τερματισμό κύησης με ήπια αποπτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημική χρώση TUNEL (Χ200).



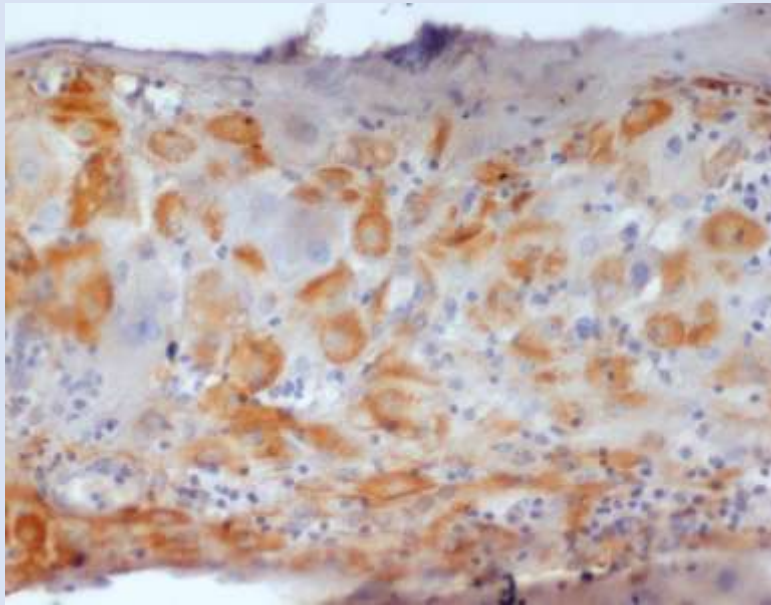
Εικόνα 9: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 12^ω προερχόμενης από αυτόματη αποβολή με μέτρια αποπτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημική χρώση TUNEL (Χ200).



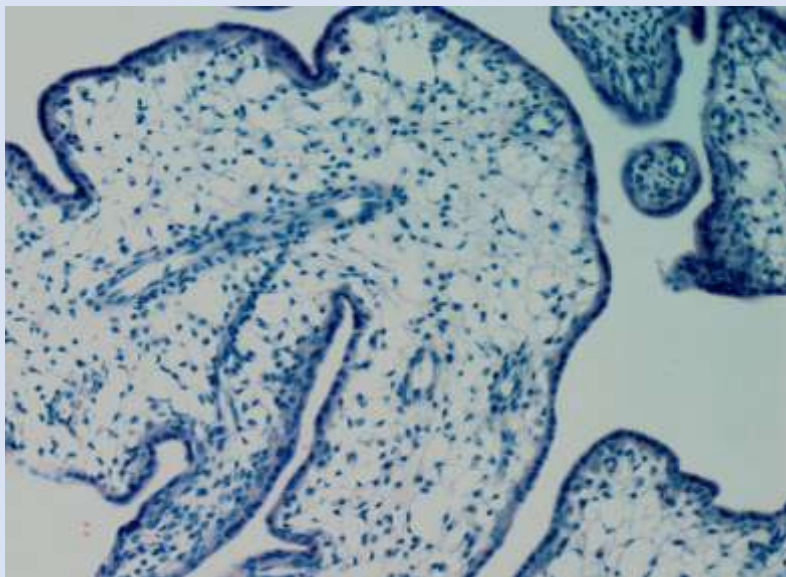
Εικόνα 10: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 8^w προερχόμενης από αυτόματη αποβολή με έντονη αποπτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημική χρώση TUNEL (Χ200).



Εικόνα 11: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 11^w προερχόμενης από αυτόματη αποβολή με ήπια αποπτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημική χρώση M30 (Χ200).

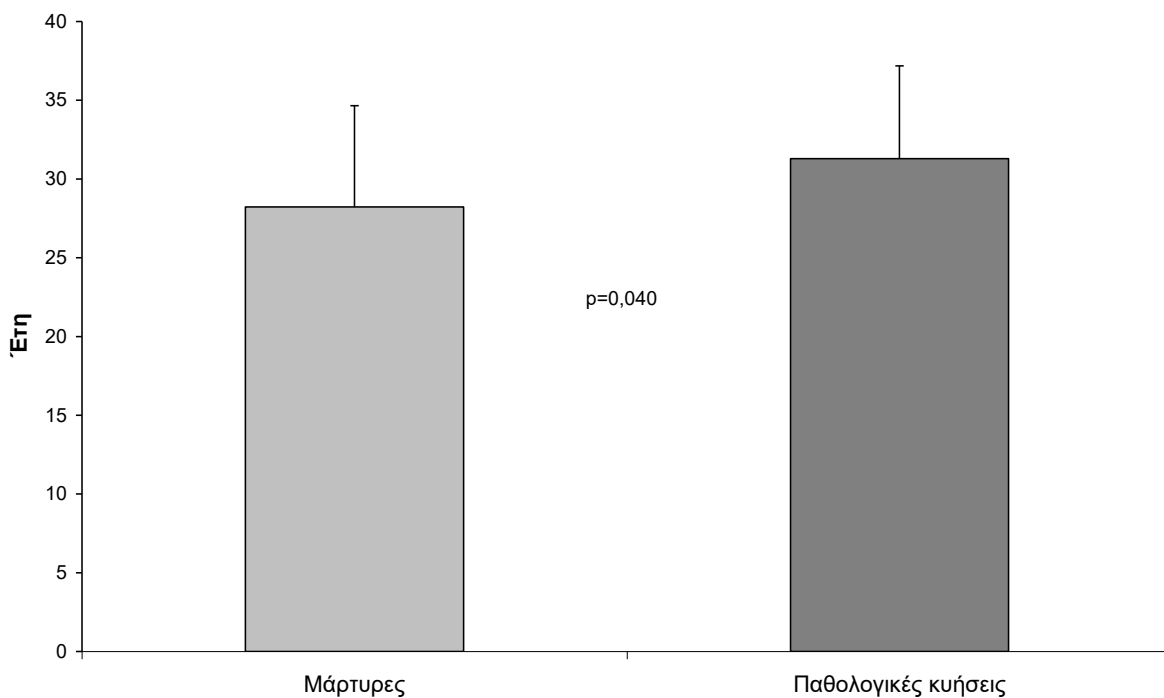


Εικόνα 12: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 10^ω προερχόμενης από αυτόματη αποβολή με έντονη αποπτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημική χρώση M30 (X200).



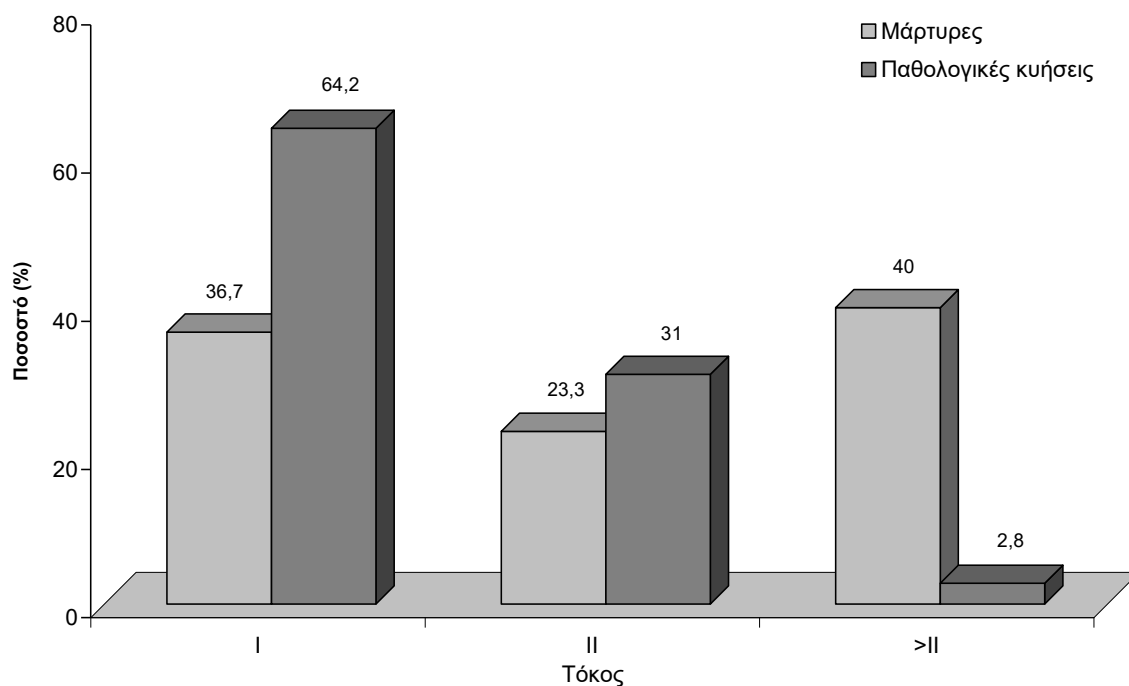
Εικόνα 13: Στοιχεία ενδομήτριας κύησης 9^ω προερχόμενης από αυτόματη αποβολή-Αρνητικός μάρτυρας (X200).

Στο υλικό που μελετήθηκε, η ηλικία των μαρτύρων κυμαίνονταν από 14-40 έτη κι η ηλικία των γυναικών με αυτόματες αποβολές (παθολογικές) από 15-39 έτη. Ωστόσο, η μέση ηλικία στους μάρτυρες κυμαίνονταν από $28,23 \pm 6,42$ έτη, ενώ η μέση ηλικία των παθολογικών δειγμάτων από $31,29 \pm 5,9$ έτη. Από τη στατιστική ανάλυση βρέθηκε πως η ηλικία των παθολογικών είναι στατιστικά υψηλότερη ($p=0,040$) σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ηλικία των μαρτύρων και των γυναικών με παθολογικές κυήσεις

Επιπλέον, αποδείχθηκε σημαντική σχέση του τόκου με την εμφάνιση αυτόματων αποβολών ($p<0,001$). Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των πρωτοτόκων γυναικών αποδείχθηκε υψηλότερο στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τους μάρτυρες (64,2% έναντι 36,7%), ενώ οι πολυτόκες γυναίκες ήταν συχνότερες στην ομάδα των μαρτύρων σε σχέση με την ομάδα των παθολογικών (40% έναντι 2,8%) (Σχήμα 2).



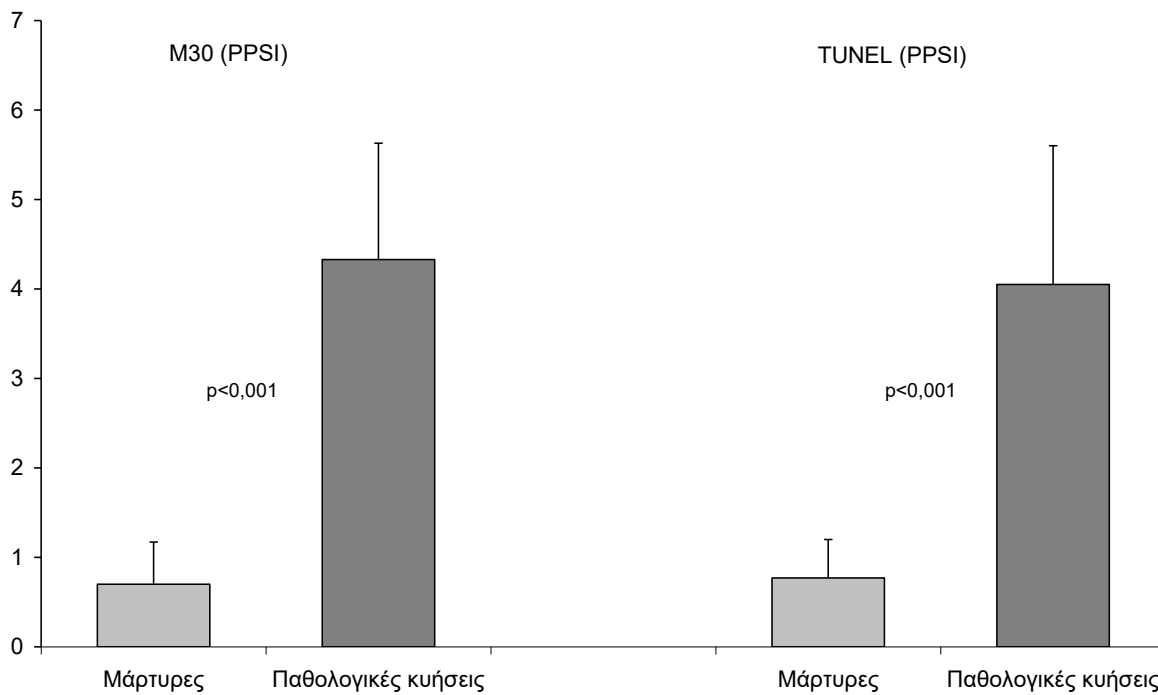
Σχήμα 2: Κατανομή των μαρτύρων και των γυναικών με παθολογικές κυήσεις σε σχέση με τον τόκο

Στο Πίνακα 3 παρουσιάζεται συνοπτικά η έκφραση των δυο αποπτωτικών δεικτών στην ομάδα των μαρτύρων και των παθολογικών κυήσεων, συσχετιζόμενη με την ηλικία και το τόκο.

| | Μάρτυρες | Παθολογικά | Τιμή p |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| Ηλικία (έτη) | 28,23 ± 6,42 | 31,29 ± 5,90 | 0,040 |
| Τόκος | | | <0,001 |
| I | 11 (36,7) | 27 (64,2) | |
| II | 7 (23,3) | 13 (31,0) | |
| >II | 12 (40,0) | 2 (2,8) | |
| M30 (PPSI) | | | <0,001 |
| Μέση τιμή ± SD | 0,70 ± 0,47 | 4,33 ± 1,30 | |
| Διάμεση τιμή (min – max) | 1,00 (0,00 – 1,00) | 4,00 (1,00 – 6,00) | |
| TUNEL (PPSI) | | | <0,001 |
| Μέση τιμή ± SD | 0,77 ± 0,43 | 4,05 ± 1,55 | |
| Διάμεση τιμή (min – max) | 1,00 (0,00 – 1,00) | 4,00 (1,00 – 6,00) | |

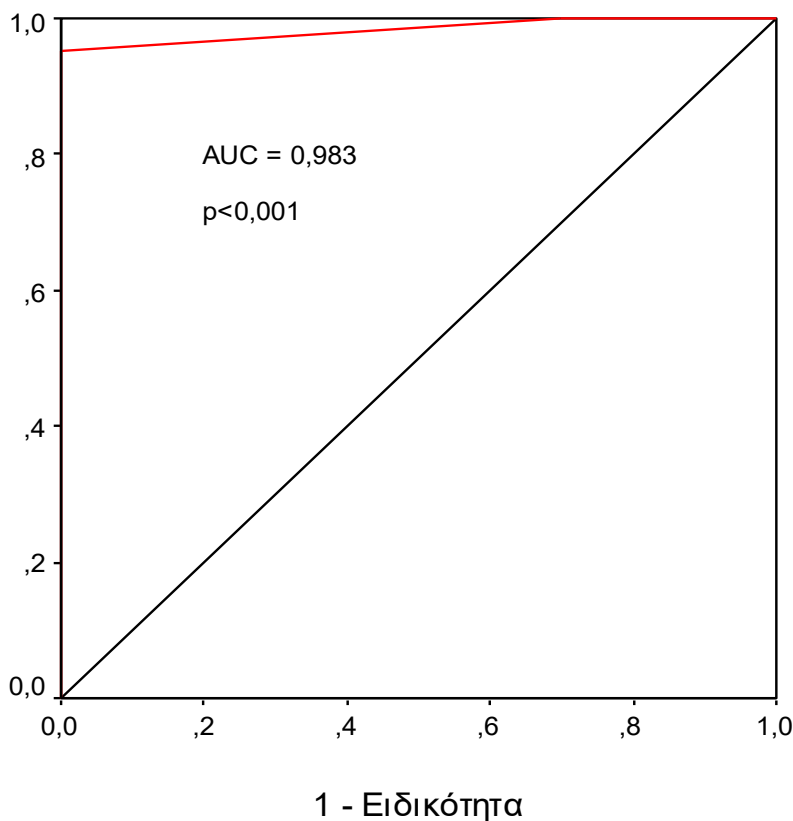
Πίνακας 3: Τιμές M30 και TUNEL (PPSI) σε σχέση με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων-μαρτύρων και των παθολογικών

Από τη παρούσα μελέτη προέκυψε πως στις αυτόματες αποβολές παρατηρείται εντονότερη έκφραση των αποπτωτικών δεικτών M30 και TUNEL σε σύγκριση με αυτήν στις ηθελημένες διακοπές κύησης, όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που φαίνονται στο Πίνακα 3. Σχηματικά, η παρατήρηση αυτή παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 3: Τιμές M30 και TUNEL (PPSI) των μαρτύρων και των γυναικών με παθολογικές κυήσεις

Με σκοπό την αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας του δείκτη M30 (PPSI) στις αυτόματες αποβολές εφαρμόστηκε η καμπύλη ROC.



Σχήμα 4: Καμπύλη ROC για την αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας του δείκτη M30 (PPSI) στις αυτόματες αποβολές

Το εμβαδόν που προέκυψε κάτω από την καμπύλη ήταν 0,983 (95% ΔΕ=0,956 – 1,000, $p < 0,001$), αποδεικνύοντας εξαιρετική διαγνωστική σημασία για το συγκεκριμένο δείκτη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.

Ακολουθώντας, με βάση την ίδια καμπύλη ROC, εντοπίστηκε το καλύτερο σημείο διάκρισης (cut-off value) μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των αυτόματων αποβολών. Το βέλτιστο σημείο διάκρισης ήταν το 1,5 και απέδωσε εξαιρετική ειδικότητα 100,0% και πολύ καλή ευαισθησία 95,2%. Εξαιρετική επίσης ήταν και η θετική και αρνητική προγνωστική αξία (100% και 93,8%, αντίστοιχα).

Η συνολική συμφωνία της κατάταξης των παθολογικών δειγμάτων σύμφωνα με τις τιμές του M30 (PPSI) με την αρχική ταξινόμηση / διάγνωση ήταν 97,2%, ενώ ο συντελεστής kappa του Cohen κατέδειξε άριστη συμφωνία (kappa=0,943, $p < 0,001$).

Στο Πίνακα 4 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά της διαγνωστικής σημασίας του M30 στις αυτόματες αποβολές.

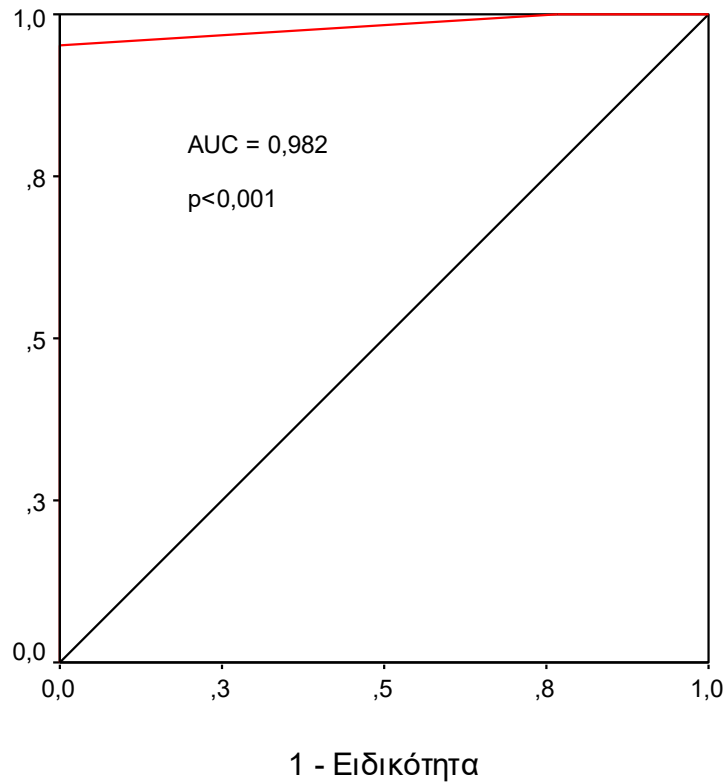
| | M30 (PPSI) | Τιμή p |
|-------------------------------|-----------------------|--------|
| AUC (95% CI) | 0,983 (0,956 – 1,000) | <0,001 |
| Διαχωριστικό σημείο (cut-off) | ≥ 1,50 | |
| Ευαισθησία (%) | 95,2 (82,6 – 99,2) | |
| Ειδικότητα(%) | 100,0 (85,9 – 100,0) | |
| PPV (%) | 100,0 (89,1 – 100,0) | |
| NPV (%) | 93,8 (77,8 – 98,9) | |
| Συνολική συμφωνία (%) | 97,2 | |
| Cohen's kappa | 0,943 | <0,001 |

AUC, area under the curve; CI, confidence interval; PPV, θετική προγνωστική αξία, NPV, αρνητική προγνωστική αξία.

Πίνακας 4: Αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας του M30 (PPSI) για τις αυτόματες αποβολές

Ίδια προσέγγιση ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας της μεθόδου TUNEL (PPSI) για τις αυτόματες αποβολές, όπου χρησιμοποιήθηκε και πάλι η καμπύλη ROC. Το εμβαδό που υπολογίστηκε κάτω από την καμπύλη αυτή ήταν 0,982 (95% ΔΕ 0,952 - 1,000, $p < 0,001$), επιβεβαιώνοντας εξαιρετική διαγνωστική σημασία (Σχήμα 5).

Η ίδια καμπύλη ROC ανέδειξε το καλύτερο σημείο διάκρισης (cut-off value) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των παθολογικών δειγμάτων στο 1,50 αποδίδοντας εξαιρετική τόσο ειδικότητα 100,0% όσο και ευαισθησία 95,2%. Η θετική και αρνητική προγνωστική αξία της συγκεκριμένης μεθόδου αναδείχθηκαν επίσης άριστες (100,0% και 93,8%, αντίστοιχα). Η συνολική συμφωνία της κατάταξης των παθολογικών σύμφωνα με τις τιμές του TUNEL (PPSI) με την αρχική ταξινόμηση / διάγνωση ήταν 97,2%, ενώ ο συντελεστής kappa του Cohen επιβεβαίωσε εξαιρετική συμφωνία ($kappa = 0,943$, $p < 0,001$) (Πίνακας 5).



Σχήμα 5: Καμπύλη ROC για την αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας της μεθόδου TUNEL (PPSI) στις αυτόματες αποβολές

| | TUNEL (PPSI) | Τιμή p |
|-------------------------------|-----------------------|--------|
| AUC (95% CI) | 0,982 (0,952 – 1,000) | <0,001 |
| Διαχωριστικό σημείο (cut-off) | ≥ 1,50 | |
| Ευαισθησία (%) | 95,2 (82,6 – 99,2) | |
| Ειδικότητα(%) | 100,0 (85,9 – 100,0) | |
| PPV (%) | 100,0 (89,1 – 100,0) | |
| NPV (%) | 93,8 (77,8 – 98,9) | |
| Συνολική συμφωνία (%) | 97,2 | |
| Cohen's kappa | 0,943 | <0,001 |

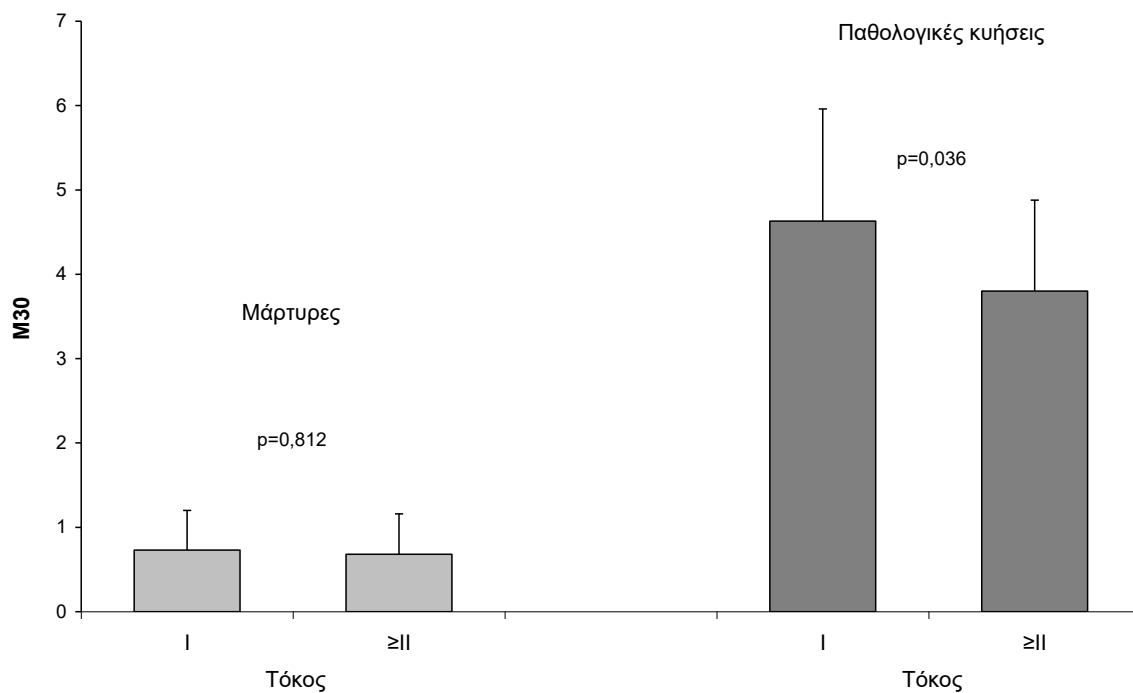
AUC, area under the curve; CI, confidence interval; PPV, θετική προγνωστική αξία, NPV, αρνητική προγνωστική αξία.

Πίνακας 5: Αξιολόγηση της διαγνωστικής σημασίας της μεθόδου TUNEL (PPSI) για τις αυτόματες αποβολές

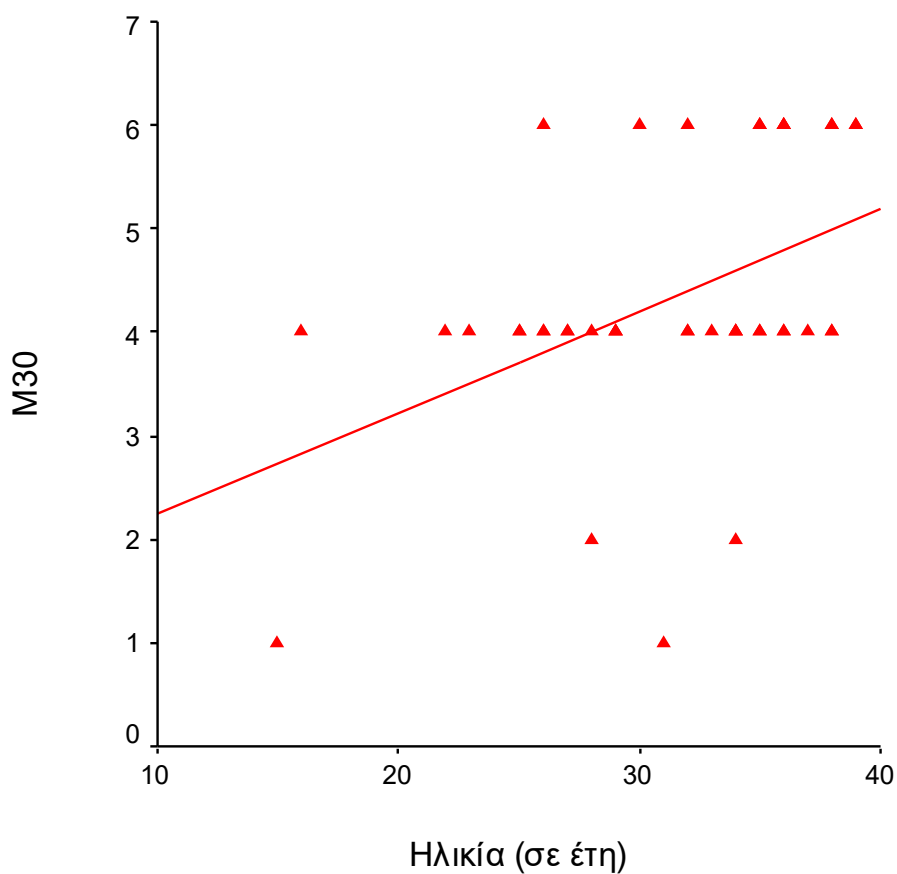
Αναφορικά με την έκφραση του M30, στην ομάδα των μαρτύρων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με την ηλικία ($\rho=0,266$ $\rho=0,156$) αλλά ούτε με το τόκο ($0,73\pm 0,47$ στις πρωτοτόκες έναντι $0,68\pm 0,48$ στις γυναίκες με περισσότερο από έναν τόκους και $\rho=0,812$), όπως φαίνεται στο Πίνακα 6. Αντίθετα, στην ομάδα των παθολογικών δειγμάτων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ηλικίας με την έκφραση του αποπρωτικού δείκτη M30 ($\rho=0,458$ και $\rho=0,002$). Επιπλέον, η έκφραση του M30 ήταν υψηλότερη στις πρωτοτόκες σε σχέση με τις πολυτόκες ($4,63\pm 1,33$ έναντι $3,80\pm 1,08$ και $\rho=0,036$). Η παρατήρηση αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στα Σχήματα 6 και 7 .

| | M30 (PPSI) | Τιμή ρ |
|-----------------------|-----------------|--------|
| Μάρτυρες | | |
| Ηλικία (Spearman's ρ) | 0,266 | 0,156 |
| Τόκος | | 0,812 |
| I | $0,73 \pm 0,47$ | |
| \geq II | $0,68 \pm 0,48$ | |
| Ασθενείς | | |
| Ηλικία (Spearman's ρ) | 0,458 | 0,002 |
| Τόκος | | 0,036 |
| I | $4,63 \pm 1,33$ | |
| \geq II | $3,80 \pm 1,08$ | |

Πίνακας 6: Συσχέτιση της έκφρασης του M30 (PPSI) με τα χαρακτηριστικά των μαρτύρων και των παθολογικών δειγμάτων



Σχήμα 6: Τιμές M30 σε σχέση με τον τόκο των μαρτύρων και των γυναικών με παθολογικές κυήσεις

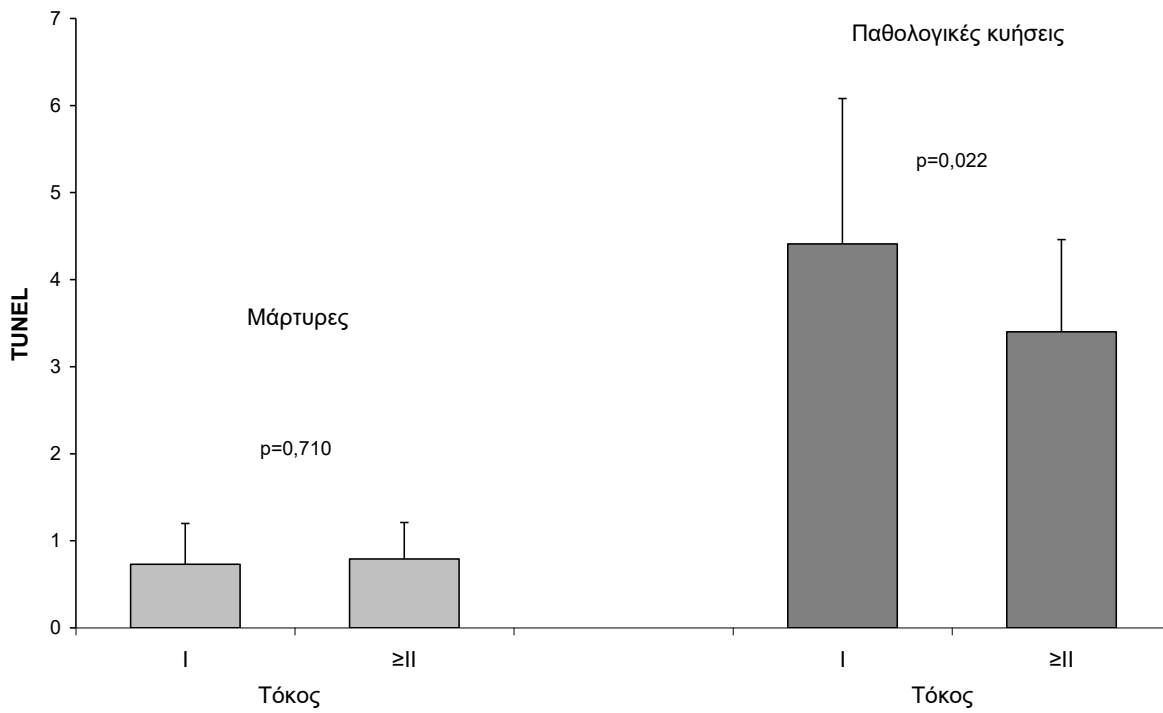


Σχήμα 7: Συσχέτιση των τιμών M30 με την ηλικία των γυναικών με αυτόματες αποβολές

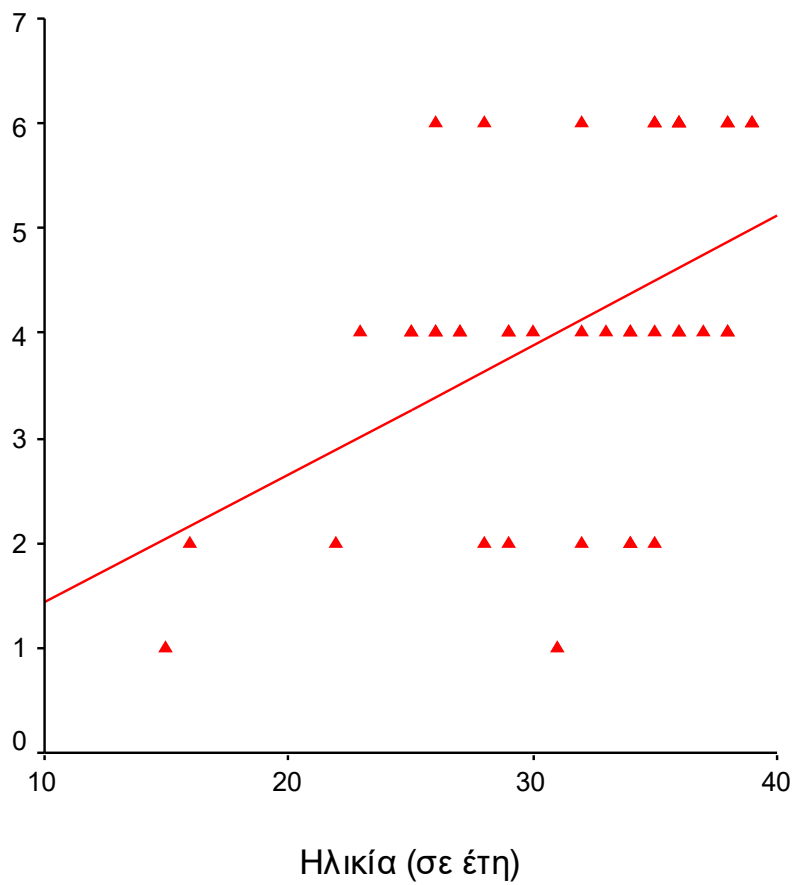
Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση για την έκφραση TUNEL. Η ομάδα των παθολογικών δειγμάτων βρέθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση της ηλικίας με την έκφραση αυτού του αποπτωτικού δείκτη ($\rho=0,459$ $\rho=0,002$), ενώ σημαντική ήταν και η συσχέτιση του τόκου με την έκφραση του συγκεκριμένου δείκτη ($4,41 \pm 1,67$ στις πρωτοτόκες έναντι $3,40 \pm 1,06$ στις πολυτόκες και $\rho=0,022$) (Πίνακας 7). Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται σχηματικά στα Σχήματα 8 και 9.

| | TUNEL (PPSI) | Τιμή ρ |
|-----------------------|-----------------|--------|
| Μάρτυρες | | |
| Ηλικία (Spearman's ρ) | -0,005 | 0,981 |
| Τόκος | | 0,710 |
| I | $0,73 \pm 0,47$ | |
| \geq II | $0,79 \pm 0,42$ | |
| Ασθενείς | | |
| Ηλικία (Spearman's ρ) | 0,459 | 0,002 |
| Τόκος | | 0,022 |
| I | $4,41 \pm 1,67$ | |
| \geq II | $3,40 \pm 1,06$ | |

Πίνακας 7: Συσχέτιση της έκφρασης TUNEL (PPSI) με τα χαρακτηριστικά των μαρτύρων και των παθολογικών δειγμάτων



Σχήμα 8: Τιμές TUNEL σε σχέση με τον τόκο των μαρτύρων και των γυναικών με παθολογικές κυήσεις



Σχήμα 9: Συσχέτιση των τιμών TUNEL με την ηλικία των γυναικών με αυτόματες αποβολές

Τέλος, ελέγξαμε με τη χρήση της ανάλυσης συνδιασποράς (ANCOVA) τη πιθανή επίδραση της ηλικίας και του τόκου ως εν δυνάμει συγχυτικών παραγόντων. Παρατηρήθηκε πως η διαφορά της έκφρασης του M30 μεταξύ μαρτύρων και παθολογικών δειγμάτων παρέμεινε στατιστικά σημαντική αφού έγινε στάθμιση ως προς τους δυο παράγοντες (προσαρμοσμένη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα: $0,89\pm 0,18$ στους μάρτυρες έναντι $4,20\pm 0,15$ στα παθολογικά δείγματα και $p<0,01$). Αντίστοιχο συμπέρασμα προέκυψε για τη έκφραση της TUNEL, όπου η προσαρμοσμένη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε $0,97\pm 0,21$ για τους μάρτυρες, έναντι $3,90\pm 0,18$ για τα παθολογικά δείγματα και $p<0,01$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από 10 έως 25% των διαγνωσμένων κύησεων πρώτου τριμήνου θα καταλήξουν σε αυτόματες αποβολές. Μεταξύ των αιτιών περιλαμβάνονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες, λοιμώξεις, ενδοκρινικές διαταραχές, παθήσεις του αιμοποιητικού και περιβαντολογικοί παράγοντες.⁶⁰ Στη κλινική πράξη βέβαια, περίπου το 55% των περιπτώσεων παραμένουν ανεξήγητες.⁶¹ Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αυτόματων αποβολών πρώτου τριμήνου, παρά τη πληθώρα των βιβλιογραφικών δεδομένων φαίνεται ακόμα ελλιπής. Μείζονα και εν πολλοίς αδιερεύνητο ρόλο κατέχει η τροφοβλάστη, η πρόδρομη μορφή του πλακούντα. Είναι γνωστό, πως η ανεπαρκής διείσδυση της τροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες είναι το βασικό αίτιο ανώμαλης πλακουντοποίησης, η οποία με τη σειρά της μπορεί να εκδηλωθεί στη πορεία της κύησης με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η προεκλαμψία κι η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης.⁶²

Ωστόσο, ο τροφοβλαστικός ιστός μέσω του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του είναι προορισμένος να εξασφαλίζει ανεμπόδιστη παροχή αίματος. Στη διατάραξη αυτής της κανονικότητας, έχει βρεθεί πως εμπλέκονται πολυάριθμα μόρια. Μεταξύ αυτών, σημαντική θέση φαίνεται να έχει ο αποπτωτικός μηχανισμός.⁶³

Είναι κοινώς αποδεκτό, πως η διαδικασία της απόπτωσης είναι αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογικής πλακουντιακής ανάπτυξης. Έχει υπολογιστεί, πως περίπου το 0.5-1% των κυτταροτροφοβλαστών υφίστανται απόπτωση κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου.⁶⁴ Ωστόσο, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, τα ποσοστά αυτά είναι κατά πολύ μεγαλύτερα σε περιπτώσεις παθολογικών κυήσεων, όπως σε ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης ή προεκλαμψία.⁶⁵ Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας φαίνεται πως είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη διατάραξη της ρύθμισης του αποπτωτικού μηχανισμού. Πληθώρα μελετών έχουν περιγράψει το ρόλο της απόπτωσης στην εμφάνιση της προεκλαμψίας, από τη διατάραξη της μητρικής ανοχής ως προς το έμβρυο και τη πλακουντιακή υποξία μέχρι την επίδραση στα μακροφάγα του φθαρτού, την ατελή διείσδυση στις σπειροειδείς αρτηρίες και την αυξημένη συγκυτιοτροφοβλαστική αποικοδόμηση.^{49,66}

Ωστόσο, τόσο η προεκλαμψία, όσο κι η καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης είναι παθολογίες που εκδηλώνονται στο δεύτερο μισό της κύησης. Η παρούσα

μελέτη στόχο είχε τη διερεύνηση του ρόλου της αποπτωτικής διαδικασίας στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκαν συγκριτικά δείγματα τροφοβλαστικού ιστού από αυτόματες αποβολές (παθολογικά) και δείγματα προερχόμενα από ηθελημένες διακοπές κύησης (μάρτυρες).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη παρούσα μελέτη κατέδειξαν αυξημένη αποπτωτική έκφραση στα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που προέχονταν από αυτόματες αποβολές σε σύγκριση με τα δείγματα-μάρτυρες. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Είναι καλά τεκμηριωμένο στη βιβλιογραφία πως σε φυσιολογικές κυήσεις, η αποπτωτική δραστηριότητα είναι χαμηλή στο πρώτο τρίμηνο και βαίνει αυξανόμενη στη πορεία της εγκυμοσύνης.^{67,68}

Από το 1998, όταν οι Kokawa et al. πρότειναν για πρώτη φορά πως η ανατροπή της ισορροπίας ανάμεσα στην απόπτωση και το πολλαπλασιασμό θα μπορούσε να είναι η κυριότερη αιτία που προκαλεί τις αυτόματες αποβολές, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αυτόματων αποβολών χωρίς όμως να έχει γίνει πλήρως κατανοητή.⁶⁹

Οι Sun et al διατύπωσαν σε πρόσφατη μελέτη τους πως σε φυσιολογικές κυήσεις διατηρείται μια ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και το πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης και των κυττάρων του φθαρτού, ενώ σε παθολογικές περιπτώσεις όπως οι αυτόματες αποβολές ανιχνεύεται ιδιαίτερα έντονη αποπτωτική δραστηριότητα.⁷⁰

Οι Rull et al προσπαθώντας να προσδιορίσουν το προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε πλακούντες από καθέξιν αποβολές πρώτου τριμήνου, κατέληξαν στην ανάδειξη του ρόλου της απόπτωσης και τη χρήση του TRAIL, ενός αποπτωτικού μορίου, ως πιθανού βιοδείκτη πρόληψης.⁷¹

Συμπληρωματικά, έχουν ανακοινωθεί μελέτες που διερεύνησαν την αποπτωτική έκφραση σε ιστολογικά δείγματα φθαρτού προερχόμενα από αυτόματες αποβολές, επιβεβαιώνοντας και πάλι την αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα.⁷²

Η μέθοδος TUNEL έχει χρησιμοποιηθεί πολλάκις για τη μελέτη της απόπτωσης. Οι Ishihara et al, εφαρμόζοντας τη συγκεκριμένη τεχνική μελέτησαν τον αποπτωτικό μηχανισμό σε κάθε στάδιο της κύησης σε δείγματα πλακούντα που προέρχονταν

από φυσιολογικές κυήσεις.⁷³ Επιπλέον, η εν λόγω μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση απόπτωσης σε παθολογικά δείγματα πλακούντα τόσο στα πρώιμα⁷⁴ όσο και στα όψιμα στάδια της κύησης.⁷⁵

Από την άλλη πλευρά, ο αποπτωτικός δείκτης M30 αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο ανίχνευσης της πρώιμης απόπτωσης που έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη μελέτη του τροφοβλαστικού ιστού, με σκοπό τη συσχέτιση με διάφορες παθολογίες στη κύηση.^{76,77}

Τέλος, από τη στατιστική συσχέτιση των αποτελεσμάτων προέκυψαν δυο ενδιαφέροντα ευρήματα. Πρώτον, στα παθολογικά δείγματα βρέθηκε πως η ηλικία των μητέρων ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των μαρτύρων και δεύτερον η πλειοψηφία των γυναικών από την ομάδα των αυτόματων αποβολών διένευαν τη πρώτη τους εγκυμοσύνη. Είναι γνωστό πως μεταξύ των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας συγκαταλέγονται τόσο η απουσία προηγούμενου τόκου όσο κι η αυξημένη ηλικία.⁷⁸ Από τη παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη αυτών των προγνωστικών παραγόντων σε κυήσεις πρώτου τριμήνου που κατέληξαν σε αυτόματες αποβολές, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση ή κοινή βάση παθοφυσιολογίας.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη κατέδειξε τη σπουδαιότητα του αποπτωτικού μηχανισμού στη διατήρηση της κύησης στο πρώτο τρίμηνο. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήρθαν σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας κι επιπλέον επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση παραμέτρων όπως η ηλικία της μητέρας κι ο τόκος με την έκβαση της κύησης και την αποπτωτική δραστηριότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. Το κύτταρο-Μια μοριακή προσέγγιση. Αλεξανδρούπολη, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα; 2013
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". 1972. Br J Cancer. 26 (4): 239–57
3. Montserrat Marí, Albert Morales, Anna Colell, Carmen García-Ruiz, Neil Kaplowitz, and José C Fernández-Checa. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. 2013. Biochim Biophys Acta. 1830(5): 3317–3328
4. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. 2005. Endocr Rev. 26(7):877-97
5. Αγγελοπούλου Ρωζάνη. Εμβρυολογία 2^η Έκδοση. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2006
6. Benirschke, Gersell DJ, Kraus FT. Diseases of the placenta. In: Blaustein's pathology of the female genital tract. 2002. 5th ed./editor Kurman RJ, 1103-1193
7. Knott JG, Paul S. Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation. 2014. Reproduction. 148(6):R121-36
8. Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. 2013. Mol Aspects Med. 34(5):981-1023
9. Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. 2001. Histol Histopathol 16:1213-1224
10. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. 2003. Biol Reprod 69:1–7

11. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. 2012. *Nat Med.* (12):1754-67
12. Fritz R, Jain C, Armant DR. Cell signaling in trophoblast-uterine communication. 2014. *Int J Dev Biol.* 2014;58(2-4):261-71
13. Van Amerongen R, Fuerer C, Mizutani M and Nusse R. Wnt5a can both activate and repress Wnt/beta-catenin signaling during mouse embryonic development. 2012. *Dev Biol* 369: 101-114
14. Benjamin Lewin GENES VIII. Αλεξανδρούπολη, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα; 2004
15. Catalano RD, Critchley HO, Heikinheimo O, Baird DT, Hapagnama D, Sherwin JR, Charnock-Jones DS, Smith SK and Sharkey AM. Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium. 2007. *Mol Hum Reprod* 13: 641-654
16. Matsuzaki S, Darcha C, Maleysson E, Canis M and Mage G. Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. 2010. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3437-3445
17. Sonderegger S, Husslein H, Leisser C and Knofler M. Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. 2007. *Placenta* 28 Suppl A: S97-102
18. Zhang Z, Li H, Zhang L, Jia L and Wang P. Differential expression of beta-catenin and Dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies: a comparative study. 2013b. *Reprod Biol Endocrinol* 11: 17
19. Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu C T, Lanske B, Soegiarto DW et al. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. 2006b. *Nat Genet* 38: 1204-1209
20. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang Armant DR.. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. 2013a. *Mol Aspects Med* 34: 939-980

21. Wei Q, Levens ED, Stefansson L and Nieman LK. Indian Hedgehog and its targets in human endometrium: menstrual cycle expression and response to CDB-2914. 2010. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 5330-5337
22. Lass A, Weiser W, Munafo A and Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. 2001. *Fertil Steril* 76: 1091-1096
23. Kimber SJ, Sneddon SF, Bloor DJ, EL-Bareg AM, Hawkhead JA, et al. Expression of genes involved in early cell fate decisions in human. 2008.
24. Holbro T and Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. 2004. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 195-217
25. Chobotova K, Muchmore ME, Carver J, Yoo HJ, Manek S, Gullick WJ et al.. The Mitogenic Potential of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor in the Human Endometrium Is Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor and Is Modulated by Tumor Necrosis Factor- alpha. 2002a. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5769-5777
26. Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH and Mardon HJ. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. 2005. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 913-919
27. Tamura N, Sugihara K, Akama TO and Fukuda MN. Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC-delta. 2011. *Cell Cycle* 10: 135-143
28. Armant DR, Kilburn BA, Petkova A, Edwin SS, Duniek-Dmuchowski ZM, Edwards HJ, Romero R and Leach RE. Human trophoblast survival at low oxygen concentrations requires metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor. 2006. *Development* 133: 751-759
29. Chandni V. Jain, Philip Jessmon, Brian A. Kilburn, Meritxell Jodar, Edward Sandler, Stephen A. Krawetz, and D. Randall Armant. Regulation of HBEGF by Micro-RNA for Survival of Developing Human Trophoblast Cells. 2016. *PLoS One* 11(10)

30. Jessmon P, Leach RE and Armant DR. Diverse functions of HBEGF during pregnancy. 2009. *Mol Reprod Dev* 76: 1116-1127
31. Damayanti Chakraborty, M. A. Karim Rumi, Toshihiro Konno, and Michael J. Soares Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. 2011. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(39): 16295–16300
32. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, Thaler HT, Romero R. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placenta bed in preterm premature rupture of membranes. 2002. *Am J Obstet Gynecol* 187:1137-1142
33. Galan A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohi J, Pampfer S, Pellicer A, Simon C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. 2000. *BiolReprod* 63:430–439
34. Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. 2005. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 102–108
35. Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN, Whitley GS. Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. 2002. *Placenta* 23:232–235
36. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". 1998. *J Immunol* 160:3086–3090
37. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. 2004. *J Soc Gynecol Investig* 11:353–36
38. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. 2004. *Cell Death Differ* 11:90–98
39. Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor

- FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. 2000. *Curr Biol* 10:640–648
40. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the fas/fas ligand system in human trophoblast cells. 2002. *Biol Reprod* 66:1853–1861
41. Marzioni D, Muhlhauser J, Crescimanno C, Banita M, Pierleoni C, Castellucci M. BCL-2 expression in the human placenta and its correlation with fibrin deposits. 1998. *Hum Reprod* 13:1717–1722
42. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. 1996. *Nature* 379:349–353
43. Gruslin A, Qiu Q, Tsang BK. X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. 2001. *Biol Reprod* 64:1264–127
44. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. TNF- κ induces trophoblast apoptosis by upregulating XIAP-associated factor 1 (XAF1). 2004. *J Soc Gynecol Invest* 11:179A
45. Hunt JS. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. 1989. *J Reprod Immunol* 16:1–17
46. Khong TY. Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal and preeclamptic pregnancies at term. 1987. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15:1–8
47. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. 2002. *J Clin Invest* 109:41–50
48. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. 1999. *Am J Pathol* 155:293–301
49. Levy R. The role of apoptosis in preeclampsia. 2005. *IMAJ*; 7:178-181

50. Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, Guner D, Goecke B, Belka C. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. 2004. *Oncogene* 23:3757–376
51. Genbacev O, Di Federico E, Mc Master M, Fisher SJ. Invasive cytotrophoblast apoptosis in preeclampsia. 1999. *Hum Reprod* 14:59–66
52. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. 2004. *J Immunol* 173:4286–429
53. Chamley L.W., Holland O.J., Chen Q, Viall C.A., Stone P.R., Abumaree. Review: Where is the maternofetal interface? 2014. *Placenta*.35 Suppl: S74-80
54. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G et al. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. 2015. *Am J Obstet Gynecol.*:S173-81
55. Shen F, Wei J, Snowise S, DeSousa J, Stone P et al. Trophoblast debris extruded from preeclamptic placentae activates endothelial cells: a mechanism by which the placenta communicates with the maternal endothelium. 2014. *Placenta*.10:839-47
56. Peviva M65 manual. 2003;45-46
57. Peviva M30 Apoptosens ELISA manual 2003;49-51
58. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. 1992. *Intl J Onc.* 1:639-648
59. Xu, L., Mao, L., Fan, C, Zheng, H. MTA1 expression correlates significantly with cigarette smoke in non-small cell lung cancer. 2011. *Virchows Arch* 459:415–422
60. Franssen MT, Musters AM, van der Veen F, Repping S, Leschot NJ, Bossuyt PM et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent

- miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. 2011. *Hum Reprod Update*. 17(4):467-75
61. Mekinian A, Cohen J, Alijotas-Reig J, Carbillon L, Nicaise-Roland P, Kayem G et al. Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? 2016. *Am J Reprod Immunol*. 76(1):8-28
62. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy-a review. 2005. *Placenta*. A:S31-6
63. Atia TA. Placental apoptosis in recurrent miscarriage. 2017. *Kaohsiung J Med Sci*. 33(9):449-452
64. Mayhew T.M. 2014. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? *Placenta* 35:229-240
65. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. 2009. *J Physiol*. 587:3453-8
66. Guenther S, Vrekoussis T, Heublein S, Bayer B, Anz D, Knabl J et al. Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: a potential role for macrophages in trophoblast apoptosis. 2012. *Int J Mol Sci*. 13(7):9069-80
67. Shivali Patel, Brian Kilburn, Anthony Imudia, D. Randall Armant, Debra F. Skafar. Estradiol Elicits Proapoptotic and Antiproliferative Effects in Human Trophoblast Cells. 2015. *Biol Reprod*. 2015 Sep; 93(3): 74
68. Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:697–699
69. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*. 1998; 19: 21–6
70. Sun Q, Zhang XL. Research on apoptotic signaling pathways of recurrent spontaneous abortion caused by dysfunction of trophoblast infiltration. 2017. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. (3 Suppl):12-19

71. K. Rull, K. Tomberg, S. Kõks, J. Männik, M. Möls, M. Sirotkina, et al. 2013. Increased placental expression and maternal serum levels of apoptosis-inducing TRAIL in recurrent miscarriage. *Placenta*, 34, pp. 141-148
72. Cinar O, Kara F, Can A. Potential role of decidual apoptosis in the pathogenesis of miscarriages. 2012. *Gynecol Endocrinol.* 28(5):382-5
73. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez J, Samoto T, Maruo T. Changes in proliferative potential, apoptosis and Bcl-2 protein expression in cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in human placenta over the course of pregnancy. 2000. *Endocr J.* 47(3):317-27
74. Lv X, Cai Z, Li S. Increased apoptosis rate of human decidual cells and cytotrophoblasts in patients with recurrent spontaneous abortion as a result of abnormal expression of CDKN1A and Bax. 2016. *Exp Ther Med.* (5):2865-2868
75. Dagdelen M, Temur M, Yılmaz Ö, Altındag T, Uslu T, Özbay PÖ. Placental bed apoptosis is increased in pregnant women with pre-eclampsia versus normotensive pregnant women. 2016. *J Obstet Gynaecol.* 36(8):974-979
76. Sharma M, Kumar R, Bhatla N, Dhingra R. A comparative study of apoptosis in placentas of normal and preeclamptic Indian pregnant women by TUNEL assay and M30 immunostaining. 2012. *J Clin Lab Anal.* 26(6):459-66
77. Deftereou TE, Lambropoulou M, Chatzaki E, Koffa M, Ypsilantis P, Pagonopoulou O, et al. Increased apoptotic activity on inflammatory human placentas in spontaneous abortions during the first and second trimester of gestation: a histochemical and immunohistochemical study. 2012. *Folia Histochem Cytobiol.* 24;50(1):118-24
78. Kirsten Duckitt and Deborah Harrington. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. 2005. *BMJ.* 12; 330(7491): 565

