



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΞΩΕΜΒΡΥΪΚΟ ΥΓΡΟ

ΣΤΕΦΑΝΙΑ Η. ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαθεοδώρου Στεφανίας: 11-04-2005

Ημερομηνίας ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 560^α/21-06-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μακρυδήμας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-07-2005

«Μελέτη βιοχημικών παραγόντων στο εξωεμβρυϊκό υγρό»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 718^α/12-07-2011

1. Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπερής Αλέξανδρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Στέφος Θεόδωρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην εμβρυομητρική Ιατρική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μακρυδήμας Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Ναυρόζογλου Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**Άριστα**» στις 13-07-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο εμπνευστή και καθοδηγητή μου στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τον δάσκαλό μου στην Ιατρική και επιβλέποντα κ. Γεώργιο Μακρυδήμα, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η συμβολή του, η βοήθειά του και οι υποδείξεις του έκαναν δυνατή την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Η πολυετής συνεργασία μας ήταν καθοριστική για τη διαμόρφωση της προσωπικής μου ιατρικής σκέψης και ήθους και αποτελεί εξαιρετική τιμή για εμένα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογίας, κ. Ιωάννη Γεωργίου για τη βοήθεια του στην φύλαξη και επεξεργασία των δειγμάτων, καθώς και τη βιολόγο Ελισσάβητ Χατζή και την Αλεξάνδρα Μπέλλου για την πραγματοποίηση των μετρήσεων και την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

Οι μετρήσεις της αντιμυλλεριανής ορμόνης έγιναν στο Βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη για την πολύτιμη βοήθειά της, καθώς και τον βιοχημικό κ. Γεώργιο Κολιό για το ενδιαφέρον και τη διάθεση του χρόνου του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή ΕΣΥ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Τσανάδη για τη συμβολή του στη συλλογή των περιστατικών και την άψογη συνεργασία του κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο μαιευτή κ. Βασίλη Αθανασίου και στη μαία κ. Ελένη Μανιφάβα στην πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των περιστατικών.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κ. Ευάγγελο Παρασκευαΐδη για την αξιόλογη και πολύπλευρη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της ειδίκευσής μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Θεόδωρο Στέφο ο οποίος μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω τη μελέτη αυτή στην κλινική που διευθύνει.

x

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής για την άψογη συνεργασία και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση των υψηλής ανάλυσης υπερήχων έκανε δυνατή την λεπτομερή μελέτη των ανατομικών διαμερισμάτων της αρχόμενης κύησης και την αναγνώριση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας ως τον χώρο που περιβάλλει την αμνιακή κοιλότητα από την 6^η ως την 10^η εβδομάδα της κύησης. Χρησιμοποιώντας ειδικούς οδηγούς και πολύ λεπτές βελόνες μπορεί να γίνει διακολπικά αναρρόφηση του εξωεμβρυϊκού υγρού, παρέχοντας τη δυνατότητα να μελετήσουμε τη φυσιολογία του ενδομήτριου περιβάλλοντος ακόμα και από τις 6 εβδομάδες της κύησης. Έχουν δημοσιευτεί αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία για την βιοχημική κυρίως σύσταση των δύο διαμερισμάτων της αρχόμενης κύησης σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών στον ορό της μητέρας, προσπαθώντας να κατανοήσουμε τον τρόπο μεταφοράς και την προέλευσή τους

Οι τεκμηριωμένες μέθοδοι προγεννητικού ελέγχου, η λήψη χοριακών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν με ασφάλεια πριν τις 10 και 15 εβδομάδες της κύησης αντίστοιχα. Η ανάγκη για προγεννητική διάγνωση νωρίτερα είναι απαραίτητη τόσο για τον καθισχυασμό των γονέων σε περίπτωση ενός υγιούς εμβρύου, όσο και για την ασφαλή τέλεση της διακοπής κύησης σε περίπτωση εμβρύων που πάσχουν. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να βρεθεί μία οδός χορήγησης ενδομήτριας θεραπείας με τη μορφή πολυδύναμων κυττάρων, αφού είναι γνωστό πως το έμβρυο μετά την 11^η εβδομάδα της κύησης τροποποιεί τη ανοσολογική του απάντηση. Η παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας έχει δώσει πολύ θετικά αποτελέσματα τόσο στη διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών όσο και στην χορήγηση ενδομήτριας θεραπείας σε μελέτες που έγιναν σε ζώα. Παραμένει να τεκμηριωθεί η ασφάλεια της μεθόδου έτσι ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη.

Στην παρούσα μελέτη έχει αναλυθεί η φυσιολογική κατανομή της πρωτεΐνης PAPP-A, της ελεύθερης β- HCG και της αντιμυλλεριανής ορμόνης (AMH) στο εξωεμβρυϊκό, το αμνιακό υγρό και τον ορό των γυναικών από υγιείς μονήρεις κύησεις από την 6^η ως την 10^η εβδομάδα της κύησης. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στη βιβλιογραφία σχετικά με την προέλευση της AMH κατά τη διάρκεια της κύησης με τις διάφορες μελέτες να καταλήγουν σε αντίθετα αποτελέσματα.

Παρά το μικρό μας δείγμα καταλήξαμε σε πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα τα οποία πρώτη φορά αναφέρονται στη βιβλιογραφία όσο αφορά την αντιμυλλεριανή

ορμόνη και επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα άλλων μελετών για την κατανομή της πρωτεΐνης PAPP-A και της ελεύθερης β- HCG σε ένα αρκετά μεγαλύτερο δείγμα από αυτό που έχει μελετηθεί έως σήμερα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Στοιχεία εμβρυολογίας	1
Ωογένεση	1
Δομικές αλλαγές στην εξέλιξη του ωοκυττάρου	3
Σπερματογένεση	7
Σπερμιογένεση	9
Πρώτη εβδομάδα ανάπτυξης: από την ωορρηξία ως την εμφύτευση	10
Εμμηνορρυσιακός κύκλος	10
Ωορρηξία	11
Ωχρο σωματίο	11
Μεταφορά ωοκυττάρου	12
Λευκό σωματίο	12
Γονιμοποίηση	13
Η μήτρα στη φάση της εμφύτευσης	17
Δεύτερη εβδομάδα ανάπτυξης: Γεννητικός Δίσκος	18
Εμβρυολογία ανθρώπινου πλακούντα	23
Το αμνιακό υγρό και η κλινική του σημασία	26
Προέλευση αμνιακού υγρού	26
Σύσταση	27
Βιολογία της αμνιακής κοιλότητας στο 1 ^ο τρίμηνο	27
Ποσότητα αμνιακού υγρού κατά τη διάρκεια της κύησης	29
Σύσταση αμνιακού υγρού στη διάρκεια της κύησης	30
Λιπίδια	31
Ένζυμα	31
Γλυκοσιδάσες	32
Ένζυμα και ορμόνες του πεπτικού συστήματος	32
Ιχνοστοιχεία	34
Ανοσοσφαιρίνες και συστατικά ομάδων αίματος	34
Χολερυθρίνες	34
Στεροειδείς ορμόνες	35

AFP	36
Χολινεστεράσες	36
Κυτοκίνες	37
Ελεύθερο εμβρυϊκό γενετικό υλικό στο γενετικό υλικό	43
Παρουσία μηκωνίου στο αμνιακό υγρό	43
Φυσιολογία εξωεμβρυϊκής κοιλότητας	45
Περαιτέρω έρευνα στην αλληλεπίδραση μεταξύ του εξωεμβρυϊκού και αμνιακού υγρού	55
Η αντιμυλλεριανή ορμόνη και ο ρόλος της κατά τη διάρκεια της κύησης	57
Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	59
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
Υλικά και μέθοδοι	61
Ασθενείς και πρωτόκολλο	61
Παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας	62
Μέτρηση της αντιμυλλεριανής ορμόνης	63
Μέτρηση της PAPP-A και της β-HCG	64
Στατιστική ανάλυση	64
Αποτελέσματα	65
PAPP-A	65
Γράφημα 1	66
Γράφημα 2	67
Γράφημα 3	68
B-HCG	69
Γράφημα 4	70
Γράφημα 5	71
Γράφημα 6	72
Γράφημα 7	73
Αντιμυλλεριανή ορμόνη	74
Γράφημα 8	75
Γράφημα 9	76
Γράφημα 10	77
Γράφημα 11	78

	xv
Συζήτηση	79
Συμπεράσματα	83
Περίληψη	85
Abstract	87
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89

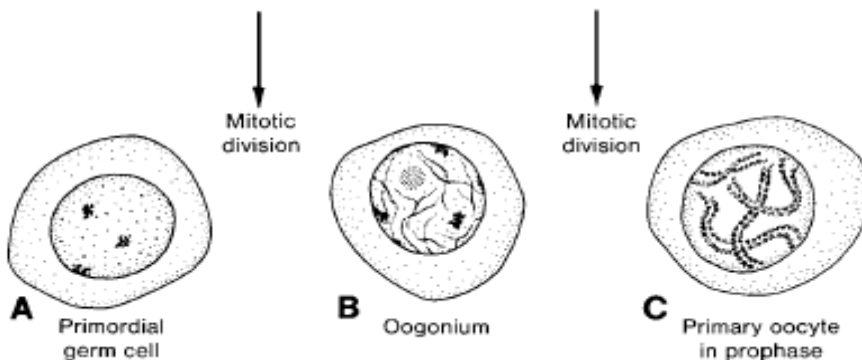
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Η Ωρίμανση των Ωοκυττάρων Ξεκινά Πριν τη Γέννηση

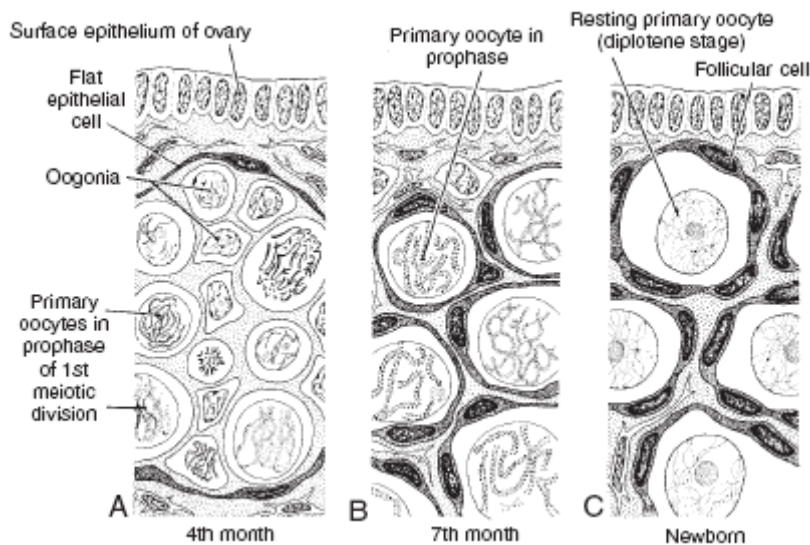
Από τη στιγμή που τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα έχουν φτάσει στις γονάδες του θηλυκού εμβρύου, αυτά διαφοροποιούνται σε ωογόνια (Εικόνα 1, A και B). Τα κύτταρα αυτά υποβάλλονται σε έναν αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων και ως το τέλος του τρίτου μήνα, καταλήγουν να κατανέμονται σε ομάδες που περιβάλλονται από μια στιβάδα επίπεδων επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνες 2 και 3). Ενώ το πιο πιθανό είναι πως όλα τα ωογόνια μιας ομάδας προέρχονται από ένα γεννητικό κύτταρο, τα επίπεδα επιθηλιακά κύτταρα, γνωστά και ως θυλακοειδή κύτταρα, προέρχονται από το επιθήλιο επιφάνειας που καλύπτει την ωοθήκη.



Εικόνα 1. Η διαφοροποίηση των πρωτογενών γεννητικών κυττάρων ξεκινά λίγο μετά την εμφάνισή τους στην ωοθήκη. Ως τον τρίτο μήνα της ανάπτυξης, κάποια ωογόνια εξελίσσονται σε πρωτογενή ωάρια τα οποία βρίσκονται στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Κατά την περίοδο αυτή στο ωάριο υπάρχουν 46 χρωμοσώματα διπλής αλυσίδας.

Η πλειοψηφία των ωογονίων συνεχίζουν να διαιρούνται με μίτωση, όμως κάποια από αυτά σταματούν την κυτταρική τους διαίρεση στην πρόφαση της μείωσης I και διαφοροποιούνται σε πρωτογενή ωοκύτταρα (Εικόνες 1.C και 2A). Στη διάρκεια των επόμενων λίγων μηνών, ο αριθμός των ωογονίων αυξάνεται ταχύτατα, και μέχρι τον πέμπτο μήνα της ενδομήτριας ανάπτυξης, ο συνολικός αριθμός γεννητικών κυττάρων στην ωοθήκη φτάνει στη μέγιστη τιμή του, δηλαδή περίπου 7 εκατομμύρια. Σε εκείνη τη χρονική στιγμή, ξεκινά και η εκφύλιση κάποιων ωογονίων και πολλά

από αυτά καθώς και κάποια πρωτογενή ωοκύτταρα μετατρέπονται σε ατρητικά. Μέχρι τον έβδομο μήνα, η πλειοψηφία των ωογονίων έχουν εκφυλιστεί εκτός από μερικά που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια της ωοθήκης. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα που έχουν επιβιώσει έχουν εισέλθει στην πρόφαση της μείωσης I, και τα περισσότερα εξ' αυτών – το καθένα ξεχωριστά – περικλείονται από ένα περίβλημα επίπεδων επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 2B). Ένα πρωτογενές ωοκύτταρο μαζί με τα επίπεδα επιθηλιακά κύτταρα που το περικλείουν είναι γνωστό ως ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο (Εικόνα 4A).



Εικόνα 2. Τμήμα της ωοθήκης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης

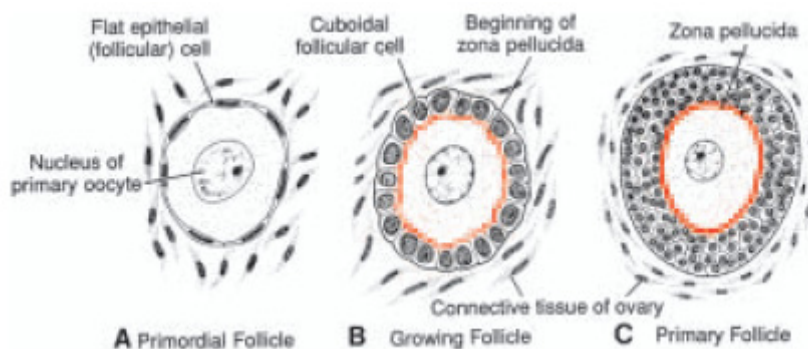
Κοντά στη στιγμή της γέννησης, όλα τα πρωτογενή ωοκύτταρα έχουν ξεκινήσει την πρόφαση της μείωσης I, όμως αντί να προχωρούν στην μετάφαση, εισέρχονται σε ένα στάδιο ακινησίας στη διάρκεια της πρόφασης, που χαρακτηρίζεται από ένα δαντελωτό δίκτυο χρωματίνης (Εικόνα 2C). Τα πρωτογενή ωοκύτταρα παραμένουν στην πρόφαση και δεν ολοκληρώνουν την πρώτη τους μειωτική διαίρεση μέχρι πριν από την ήβη. Ο συνολικός αριθμός των πρωτογενών ωοκυττάρων κατά τη γέννηση υπολογίζεται πως κυμαίνεται μεταξύ 700,000 και 2 εκατομμυρίων. Στη διάρκεια της παιδικής ηλικίας τα περισσότερα ωοκύτταρα θα μετατραπούν σε ατρητικά. Μόνον περίπου 40.000 είναι παρόντα στο ξεκίνημα της εφηβείας, και λιγότερα από 500 θα φτάσουν στην ωορρηξία. Ορισμένα ωοκύτταρα που ωριμάζουν αργότερα στην αναπαραγωγική ζωή, έχουν μείνει στο στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής διαίρεσης για 40 χρόνια ή και περισσότερο, πριν την ωορρηξία. Το αν το στάδιο της διπλοταινίας είναι η πιο κατάλληλη φάση για την προστασία του ωοκυττάρου από τις επιρροές του εξωτερικού περιβάλλοντος παραμένει άγνωστο. Το

γεγονός πως ο κίνδυνος της γέννησης παιδιών με χρωμοσωματικές ανωμαλίες αυξάνεται όσο μεγαλώνει η ηλικία της μητέρας δείχνει πως τα πρωτογενή ωοκύτταρα ενδεχομένως να βλάπτονται από την παρατεταμένη παραμονή στην μειωτική διαίρεση.

Δομικές αλλαγές στην εξέλιξη του ωοκυττάρου

Με την αρχή της ήβης, μια ομάδα από αναπτυσσόμενα αρχέγονα ωοθυλάκια δημιουργείται και συνεχώς διατηρείται από το απόθεμα των αρχέγονων ωοθυλακίων. Κάθε μήνα, 15 με 20 ωοθυλάκια που έχουν επιλεγεί αρχίζουν να ωριμάζουν, περνώντας μέσα από τρία στάδια: 1) πρωτογενές ωοθυλάκιο 2) δευτερογενές ωοθυλάκιο και 3) προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.

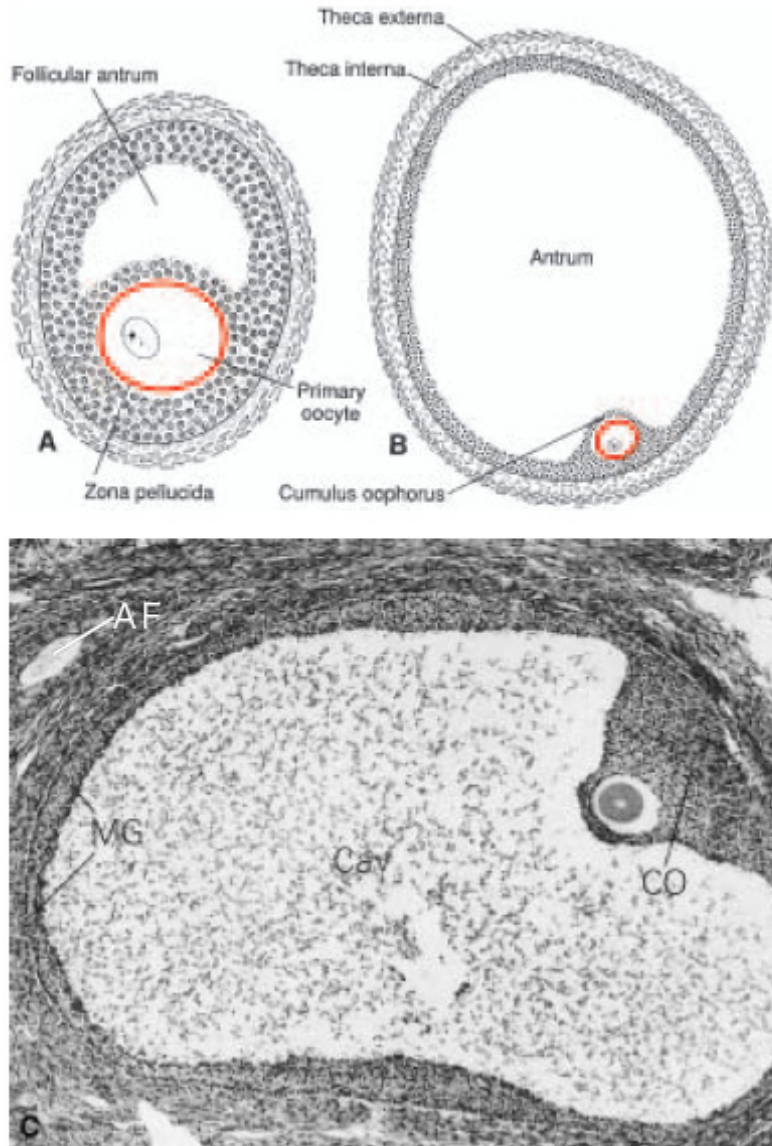
Το κοιλοτικό στάδιο είναι το μεγαλύτερο, ενώ το προ-ωορρηξίας στάδιο περιλαμβάνει περίπου 37 ώρες πριν την ωορρηξία. Καθώς το πρωτογενές ωοκύτταρο αρχίζει να αναπτύσσεται, τα θυλακοειδή κύτταρα που το περιβάλλουν μετατρέπονται από επίπεδα σε κυβοειδή και πολλαπλασιάζονται για να δημιουργήσουν ένα στρωματοποιημένο επιθήλιο από κοκκώδη κύτταρα. Η μονάδα αυτή αποκαλείται πρωτογενές ωοθυλάκιο (Εικόνα 3, Β και C). Τα κοκκώδη κύτταρα και το ωοκύτταρο εκκρίνουν ένα στρώμα από γλυκοπρωτεΐνες στην επιφάνεια του ωοκυττάρου, σχηματίζοντας την διάφανη ζώνη (Εικόνα 3C). Το υλικό της διαφανούς ζώνης είναι πλούσιο σε πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες.



Εικόνα 3. Α. Αρχέγονο ωοθυλάκιο (αποτελείται από ένα πρωτογενές ώριο το οποίο περιβάλλεται από ένα στρώμα από αποπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα) Β. Καθώς το προ-κοιλοτικό ωοθυλάκιο μεγαλώνει, τα επιθηλιακά κύτταρα γίνονται κυβοειδή και αρχίζουν να περιβάλλουν τη διαφανή ζώνη C. Το ώριμο προκοιλοτικό ωοθυλάκιο με το πολύστιβο στρώμα κοκκωδών κυττάρων και τη σαφώς αφοριζόμενη διαφανή ζώνη.

Καθώς τα ωοθυλάκια συνεχίζουν να αναπτύσσονται, τα κύτταρα του οργανώνονται σε μια εσωτερική στοιβάδα εκκριτικών κυττάρων, την theca interna (έσω θήκη), και μια εξωτερική ινώδη στοιβάδα, την theca externa (έξω θήκη). Τα όρια μεταξύ έσω και έξω θήκης δεν είναι σαφή. Σαφές όριο είναι η βασική μεμβράνη μεταξύ της κοκκώδους στοιβάδας και της έξω θήκης. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα της έσω θήκης είναι κυβοειδή και τα δομικά χαρακτηριστικά τους, είναι τα χαρακτηριστικά των κυττάρων που παράγουν στεροειδείς ορμόνες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ωοκυττάρου, η κατανομή των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος αλλάζει. Αυξάνει ο αριθμός των ελεύθερων ριβοσωμάτων, των κυστιδίων, των πολυκυστικών σωματίων καθώς και το κοκκώδες ενδοπλασματικό δίκτυο είναι άφθονο. Με τη δράση του περιεχομένου των κοκκίων που βρίσκονται κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (φλοιϊκών κοκκίων) η διαφανής ζώνη μετατρέπεται σε μεμβράνη γονιμοποίησης, που προφυλάσσει το ωάριο από την είσοδο άλλων σπερματοζωαρίων και δημιουργεί φράγμα στην πολυσπερμία. Επίσης προσεκβολές των θυλακοειδών κυττάρων εκτείνονται κατά μήκος της διαφανούς ζώνης και εφάπτονται με τις μικρό-λάχνες της μεμβράνης κυτταροπλάσματος του ωοκυττάρου, παρόλα αυτά, δεν παρατηρείται κυτταροπλασματική συνέχεια μεταξύ τους. Όμως ανάμεσα στα κοκκώδη κύτταρα και το ωοκύτταρο αναπτύσσονται χασματικές συνάψεις που χρησιμεύουν ως διάυλοι μεσοκυττάριας επικοινωνίας¹. Οι διαδικασίες αυτές είναι σημαντικές για τη μεταφορά μορίων από τα θυλακοειδή κύτταρα στο ωοκύτταρο.

Καθώς η ανάπτυξη συνεχίζεται, εμφανίζονται χώροι γεμάτοι με υγρό ανάμεσα στα κοκκώδη κύτταρα. Το υγρό αυτό είναι πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ, το οποίο μετά από τη συνένωση των μεμονωμένων χώρων γεμίζει μια μηνοειδή κοιλότητα το θυλακικό άντρο. Αρχικά, το άντρο έχει το σχήμα της ημισελήνου, αλλά με την πάροδο του χρόνου, αυτό μεγαλώνει (Εικόνα 4). Τα κοκκώδη κύτταρα που περιβάλλουν το ωοκύτταρο παραμένουν ανέπαφα και σχηματίζουν τον ωοφόρο δίσκο του ωοθυλάκιου. Καθώς το ωάριο ωριμάζει, μπορεί να φτάσει τη διάμετρο των 25 χιλιοστών ή και μεγαλύτερη. Περιβάλλεται από την έσω θήκη, η οποία αποτελείται από κύτταρα που έχουν χαρακτηριστικά έκκρισης στεροειδών, πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, και την έξω θήκη, η οποία σταδιακά ενώνεται με το στρώμα των ωοθηκών (Εικόνα 4).

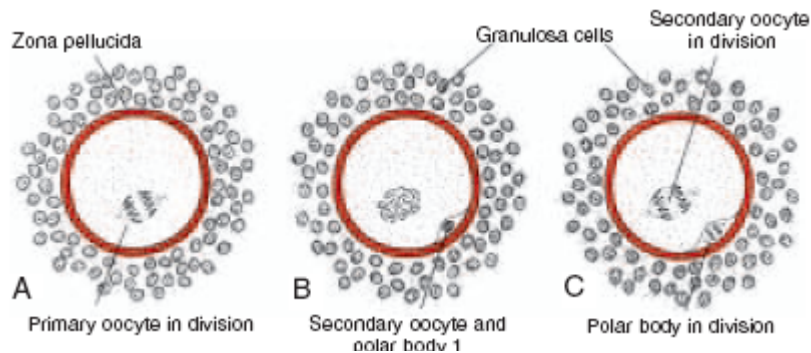


Εικόνα 4. Α. Δευτερογενές ωοθυλάκιο Β. Ωριμο δευτερογενές ωοθυλάκιο C. Το ώριμο δευτερογενές ωοθυλάκιο σε φωτογραφία μικροσκοπίου.

Το προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο εκτείνεται σε όλο το πάχος του φλοιού της ωοθήκης και δημιουργεί προβολή στην ελεύθερη επιφάνειά της. Καθώς πλησιάζει το μέγιστο μέγεθος, η μιτωτική δραστηριότητα των κοκκιωδών κυττάρων ελαττώνεται. Το θυλακικό άντρο μεγαλώνει και η κοκκιώδης στιβάδα λεπταίνει.

Με κάθε εμμηνορυσιακό κύκλο, αρχίζει να δημιουργείται ένας αριθμός από ωοθυλάκια, αλλά συνήθως μόνο ένα φτάνει στην πλήρη ωριμότητα. Τα υπόλοιπα εκφυλίζονται και μετατρέπονται σε ατρητικά (Εικόνα 4C). Όταν το δευτερογενές ωοθυλάκιο ωριμάζει, μια εκκριτική αιχμή της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) δίνει το έναυσμα για το ξεκίνημα της προ-ωορρηξίας φάσης της ανάπτυξης. Η μείωση I

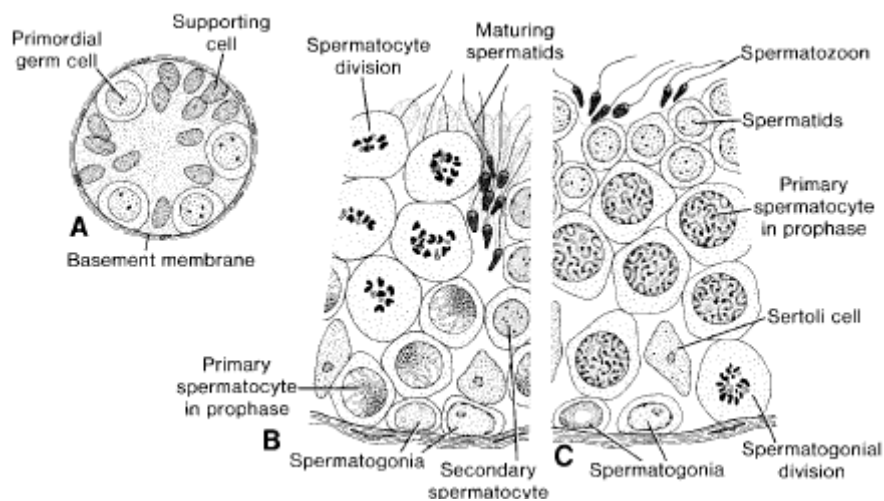
ολοκληρώνεται και καταλήγει στη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων ανόμοιου μεγέθους, το καθένα με 23 διπλά χρωμοσώματα (Εικόνα 5, Α και Β). Ένα κύτταρο, το δευτερογενές ωκύτταρο, λαμβάνει το περισσότερο από το κυτταρόπλασμα. Το άλλο, το πρώτο πολικό σωματίο, στην πράξη δεν παίρνει καθόλου κυτταρόπλασμα. Το πρώτο πολικό σώμα βρίσκεται ανάμεσα στη διάφανη ζώνη και την κυτταρική μεμβράνη του δευτερεύοντος ωοκυττάρου (Εικόνα 5B). Το κύτταρο τότε εισέρχεται στη μείωση ΙΙ αλλά παραμένει στην μετάφαση για περίπου 3 ώρες πριν την ωορρηξία. Η μείωση ΙΙ ολοκληρώνεται μόνο εφόσον το ωάριο γονιμοποιηθεί. Σε αντίθετη περίπτωση εκφυλίζεται περίπου 24 ώρες μετά την ωορρηξία. Το πρώτο πολικό σωματίο, επίσης υφίσταται μια δεύτερη διαίρεση (διχοτόμηση) (Εικόνα 5C).



Εικόνα 5. Ωρίμανση του ωαρίου

ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

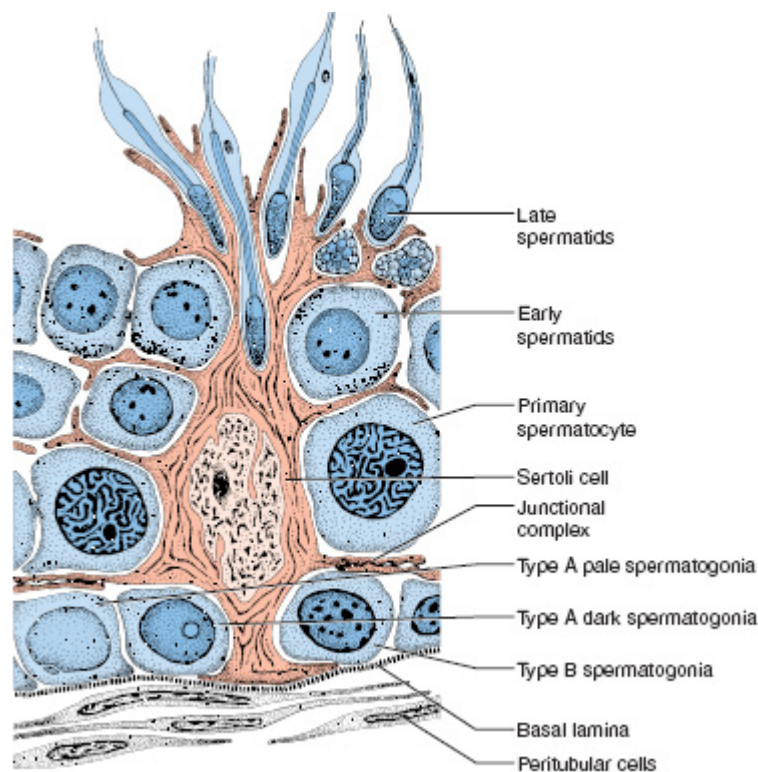
Η σπερματογένεση, που ξεκινά στην εφηβεία, περιλαμβάνει όλα τα γεγονότα με τα οποία τα σπερματογόνια μεταμορφώνονται σε σπερματοζώαρια. Κατά τη γέννηση, τα γενετικά κύτταρα στο αρσενικό άτομο μπορούν να αναγνωριστούν στις σπερματικές χορδές του όρχη ως μεγάλα, αραιοχρωματικά κύτταρα που περιβάλλονται από επιθηλιακά κύτταρα του Sertoli (Εικόνα 6A). Τα υποστηρικτικά κύτταρα, που προέρχονται από το επιφανειακό επιθήλιο του αδένου με τον ίδιο τρόπο όπως τα θυλακοειδή κύτταρα, γίνονται είτε συνδεσμικά κύτταρα είτε κύτταρα Sertoli (Εικόνα 6C).



Εικόνα 6. Στάδια σπερματογένεσης

Λίγο πριν την ήβη, οι σπερματικές χορδές αποκτούν ένα αυλό και μετατρέπονται σε σπερματικά σωληνάρια. Περίπου ταυτόχρονα, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα δημιουργούν τα σπερματογόνια και από αυτά, τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, κάποια κύτταρα εξέρχονται από αυτό τον πληθυσμό των γεννητικών κυττάρων για να σχηματίσουν τα σπερματογόνια τύπου A, και η παραγωγή τους σηματοδοτεί το ξεκίνημα της σπερματογένεσης. Τα κύτταρα τύπου A υπόκεινται σε ένα περιορισμένο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων ώστε να δημιουργήσουν έναν κλώνο από κύτταρα. Η τελευταία κυτταρική διαίρεση παράγει τα σπερματογόνια τύπου B, που τότε διαιρούνται για να σχηματίσουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (Εικόνα 6). Τότε, τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα εισέρχονται σε μια παρατεταμένη πρόφαση (22 ημέρες) την οποία διαδέχεται μια ταχεία ολοκλήρωση της μείωσης I και ο σχηματισμός των δευτερογενών σπερματοκυττάρων. Στη διάρκεια της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, τα κύτταρα

αυτά αμέσως αρχίζουν να σχηματίζουν απλοειδείς σπερματίδες (Εικόνα 6). Στη διάρκεια αυτής της αλυσίδας γεγονότων, από τη στιγμή που τα κύτταρα τύπου A αφήνουν τον πληθυσμό των γεννητικών κυττάρων μέχρι τον σχηματισμό των σπερματίδων, η διαίρεση του κυτταροπλάσματος δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί, και έτσι, διαδοχικές γενεές κυττάρων ενώνονται μεταξύ τους με κυτοπλασματικές γέφυρες. Έτσι, οι απόγονοι ενός μοναδικού σπερματογόνιου τύπου A δημιουργούν έναν κλώνο από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα που διατηρούν επαφή κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Επιπλέον, τα σπερματογόνια και οι σπερματίδες παραμένουν τοποθετημένες σε βαθιές εσοχές στα κύτταρα Sertoli καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (Εικόνα 7). Με αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα Sertoli υποστηρίζουν και προστατεύουν τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, συμμετέχουν στη θρέψη τους και βοηθούν στην απελευθέρωση των ώριμων σπερματοζωαρίων.



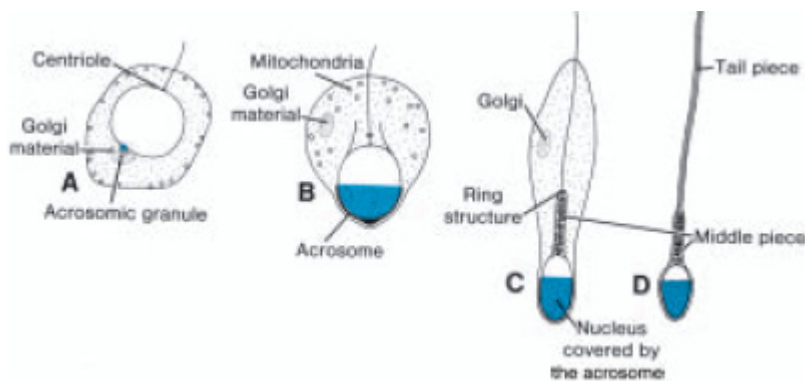
Εικόνα 7. Κύτταρα Sertoli και ωριμάζοντα σπερματοκύτταρα.

Η σπερματογένεση ρυθμίζεται από την παραγωγή των γοναδοτροφινών (LH και FSH) από την υπόφυση². Η LH δρά σε υποδοχείς επάνω στα κύτταρα Leydig και διεγείρει την παραγωγή τεστοστερόνης, η οποία με τη σειρά της δρα μέσω υποδοχέων στα κύτταρα Sertoli για να διεγείρει τη σπερματογένεση. Η FSH είναι επίσης

απαραίτητη στη διαδικασία της σπερματογένεσης επειδή όταν ενώνεται με υποδοχείς στα κύτταρα Sertoli, αυξάνει την παραγωγή του σπερματικού υγρού και προκαλεί τη σύνθεση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών υποδοχέων ανδρογόνων.

Σπερμιόγνεση

Η αλυσίδα των αλλαγών που έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των ώριμων σπερματιδών σε σπερματοζώαρια ονομάζεται σπερμιόγνεση. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν (α) τη δημιουργία του ακροσώματος, που καλύπτει τη μισή από την επιφάνεια του πυρήνα και περιέχει ένζυμα που βοηθούν στη διείσδυση του ωαρίου και των στρωμάτων που το περιβάλλουν στη διάρκεια της γονιμοποίησης (Εικόνα 8), (β) την συμπύκνωση του πυρήνα, (γ) τον σχηματισμό του αυχένα, του ενδιάμεσου τμήματος και της ουράς και, (δ) η απώλεια του μεγαλύτερου μέρους του κυτταροπλάσματος. Στον άνθρωπο, ο χρόνος που απαιτείται ώστε ένα σπερματογόνιο να μετατραπεί σε ένα ώριμο σπερματοζώαριο είναι περίπου 74 ημέρες.



Εικόνα 8. Στάδια ωρίμανσης της ανθρώπινης σπερματίδας σε σπερματοζώαριο.

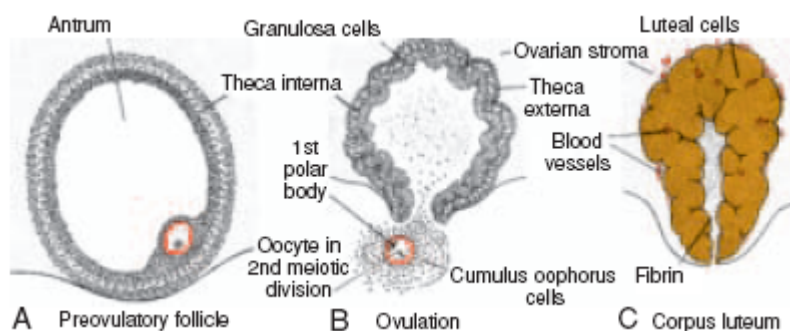
Πρώτη Εβδομάδα Ανάπτυξης: Από την Ωορρηξία ως την Εμφύτευση ***Εμμηνορρυσιακός Κύκλος***

Στην εφηβεία, το θηλυκό άτομο αρχίζει να έχει τακτικούς μηνιαίους κύκλους. Αυτοί οι εμμηνορρυσιακοί κύκλοι ελέγχονται από τον υποθάλαμο. Η ορμόνη που απελευθερώνει τις γοναδοτροπίνες (GnRH) παράγεται από τον υποθάλαμο και επιδρά στα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, ο οποίος με τη σειρά του εκκρίνει γοναδοτροπίνες. Οι ορμόνες αυτές, η θυλακιοτρόπος (FSH) και η ωχρινοτρόπος (LH), θέτουν σε λειτουργία και ελέγχουν τις κυκλικές αλλαγές μέσα στην ωοθήκη.

Η LH διεγείρει τη στεροειδογένεση σε ένα κοινό στάδιο για όλα τα στεροειδή, τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη με διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης. Ουσιαστικά η LH μέσω του κυκλικού AMP ενεργοποιεί μια σειρά γονιδίων στα κύτταρα της έσω θήκης. Κατά την προωοθυλακιορρηκτική αιχμή, όταν οι γοναδοτροπίνες φτάνουν σε υψηλά επίπεδα και μετά από διέγερση του συνόλου της στεροειδογένεσης, η LH προκαλεί τη σύνθεση πρωτεϊνών που αναστέλλουν τη 17-20 λυάση με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή προγεστερόνης. Έτσι, το χαρακτηριστικό της ωοθηκικής λειτουργίας κατά τη δεύτερη φάση του κύκλου είναι ο προσανατολισμός της στεροειδογένεσης προς όφελος της προγεστερόνης υπό την επίδραση των αυξημένων επιπέδων της LH. Ωστόσο, η FSH είναι υπεύθυνη για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου που θα καταφέρει να ραγεί. Η FSH επίσης δίνει το έναυσμα για την ωρίμανση των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο. Με τη σειρά του, ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων υποβοηθείται από τον παράγοντα 9 διαφοροποίησης της ανάπτυξης (GDF-9), ένα μέλος της ομάδας του αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β). Σε συνεργασία μεταξύ τους, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης παράγουν οιστρογόνα που (α) κάνουν το ενδομήτριο να εισέλθει στην παραγωγική φάση, (β) κάνουν τη βλέννα στον τράχηλο λεπτόρρευστη ώστε να επιτρέψει τη διόδo του σπέρματος, και (γ) διεγείρουν την έκκριση της LH. Στο μέσο του κύκλου, υπάρχει μια αιχμή της LH η οποία (α) ανεβάζει τις συγκεντρώσεις του παράγοντα προώθησης-της-ωρίμανσης, κάνοντας τα ωοκύτταρα να ολοκληρώσουν τη μείωση I και να ξεκινήσουν τη μείωση II, (β) δίνει το έναυσμα για την παραγωγή προγεστερόνης από τα κύτταρα στο στρώμα της ωοθήκης, και (γ) προκαλεί την ωορρηξία.

ΩΟΡΡΗΞΙΑ

Τις προηγούμενες ημέρες της ωορρηξίας, κάτω από την επιρροή της FSH και της LH, το δευτερεύον ωοθυλάκιο αναπτύσσεται ταχύτατα και φτάνει σε διάμετρο περίπου τα 25 χιλιοστά. Ταυτόχρονα με την τελική ανάπτυξη του δευτερεύοντος ωοθυλακίου, υπάρχει μια «αιχμή» στην έκκριση της LH γεγονός που κάνει το πρωτεύον ωοθυλάκιο –και κατά συνέπεια το ωάριο- να ολοκληρώσει τη μείωση I. Επίσης, ξεκινά η μείωση II, όμως το ωοκύτταρο παραμένει στη μετάφαση, περίπου 3 ώρες πριν την ωορρηξία. Στο μεταξύ, η επιφάνεια της ωοθήκης αρχίζει να εμφανίζει περιοχές πιο λεπτές σε ορισμένα σημεία της, και στην κορυφή της, εμφανίζεται μια ανάγεια περιοχή, το στίγμα. Η υψηλή συγκέντρωση LH αυξάνει την δραστηριότητα των κολλαγενασών, έχοντας ως αποτέλεσμα την διάσπαση των ινών κολλαγόνου που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο. Τα επίπεδα προσταγλανδινών επίσης αυξάνονται, ανταποκρινόμενα στην αύξηση των επιπέδων της LH. Το σύνολο των φαινομένων αυτών οδηγούν στην έξοδο του ωαρίου το οποίο, μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν απελευθερώνεται (ωορρηξία) από την περιοχή του ωοφόρου δίσκου του ωοθυλακίου (Εικόνα 9). Κάποια από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου το ωοθυλάκιο τότε ανακατανέμονται γύρω από την διαφανή ζώνη για να σχηματίσουν τον ακτινωτό στέφανο (Εικόνα 11).



Εικόνα 9. Α. Προ-ωορρηκτικό ωοθυλάκιο Β. Ωορρηξία C. Ωχρο σωμάτιο

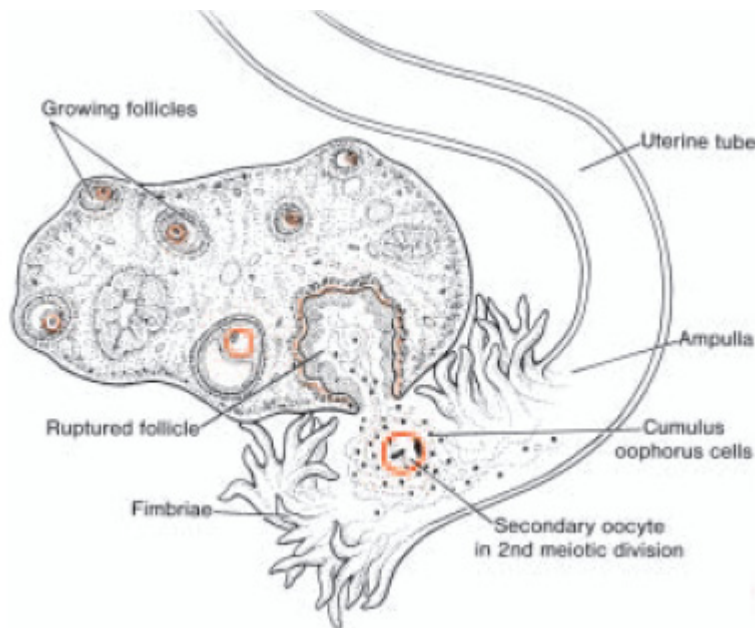
ΩΧΡΟ ΣΩΜΑΤΙΟ

Μετά την ωορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα που παραμένουν στα τοιχώματα του διαρρηγμένου ωοθυλακίου και μαζί με τα κύτταρα από τη έσω θήκη υφίστανται επαναγγείωση από τα περιβάλλοντα αγγεία. Υπό την επιρροή της LH, τα κύτταρα αυτά δημιουργούν μια κιτρινωπή χρωστική ουσία και μετατρέπονται σε ωχρινοποιητικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν το ωχρο σωμάτιο και εκκρίνουν προγεστερόνη (Εικόνα 9C). Η προγεστερόνη, μαζί με τα οιστρογόνα κάνουν το

ενδομήτριο να εισέλθει στην εκκριτική φάση, προετοιμάζοντας το έδαφος για την εμφύτευση του εμβρύου.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Λίγο πριν την ωορρηξία, τα κροσσοφόρα κύτταρα της σάλπιγγας αρχίζουν να σαρώνουν την επιφάνεια της ωοθήκης, και η ίδια η σάλπιγγα αρχίζει να κάνει ρυθμικές κινήσεις. Το ωοκύτταρο, περιβαλλόμενο από κάποια κοκκώδη κύτταρα (Εικόνα 10) μεταφέρεται μέσα στον αγωγό από αυτές τις σαρωτικές κινήσεις των κροσσών.



Εικόνα 10. Σχέση ωοθήκης και σάλπιγγας

Μόλις το ωοκύτταρο εισέλθει στη σάλπιγγα, προωθείται από τις βλεφαρίδες του βλεννογόνου, με το ρυθμό μεταφοράς ο οποίος ρυθμίζεται από την ενδοκρινική κατάσταση κατά τη διάρκεια και μετά την ωορρηξία. Στον άνθρωπο, το γονιμοποιημένο ωάριο φτάνει στην κοιλότητα της μήτρας σε περίπου 3 με 4 μέρες.

ΛΕΥΚΟ ΣΩΜΑΤΙΟ

Αν δεν επιτευχθεί η γονιμοποίηση, το ωχρο σωματίο φτάνει τη μέγιστη ανάπτυξη περίπου 9 μέρες μετά την ωορρηξία. Μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί ως μια κιτρινωπή προεξοχή στην επιφάνεια της ωοθήκης. Ακολούθως, το ωχρο σωματίο συρρικνώνεται λόγω του εκφυλισμού των ωχρινοποιητικών κυττάρων και σχηματίζει μια «ουλή» από ινώδη ιστό, το λευκό σωματίο. Ταυτόχρονα, η παραγωγή

προγεστερόνης μειώνεται, προκαλώντας την έμμηνο ρύση. Αν το ωάριο γονιμοποιηθεί, ο εκφυλισμός του ωχρού σωματίου αποτρέπεται από την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), μια ορμόνη που εκκρίνεται από τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Το ωχρό σωματίο συνεχίζει να μεγαλώνει και σχηματίζει το ωχρό σωματίο της εγκυμοσύνης (corpus luteum gravidatis). Ως το τέλος του τρίτου μήνα, αυτή η δομή μπορεί να έχει φτάσει το ένα-τρίτο ως και το ένα-δεύτερο του συνολικού μεγέθους της ωοθήκης. Το ωχρό σωματίο συνεχίζει να εκκρίνει προγεστερόνη μέχρι το τέλος του τέταρτου μήνα. Στη συνέχεια, αυτά ακολουθούν με αργό ρυθμό μια αντίστροφη πορεία καθώς η έκκριση προγεστερόνης από τον πλακούντα γίνεται αρκετή για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η απομάκρυνση των ωχρού σωματίου της εγκυμοσύνης πριν τον τέταρτο μήνα συνήθως καταλήγει σε αποβολή.

Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση, η διαδικασία με την οποία οι αρσενικοί και οι θηλυκοί γαμέτες ενώνονται, γίνεται στη λύκηθο της σάλπιγγας. Τα σπερματοζώαρια μπορούν να επιβιώσουν μέσα στην αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας για αρκετές μέρες. Μόνο το 1% του σπέρματος που εισέρχεται στον κόλπο, εισχωρεί στον τράχηλο της μήτρας, όπου μπορεί να επιβιώσει για πολλές ώρες. Η κίνηση του σπέρματος από τον τράχηλο της μήτρας μέχρι τη σάλπιγγα επιτυγχάνεται κυρίως από τις δικές του προωθητικές κινήσεις. Το μεταφορά από τον τράχηλο της μήτρας ως τη σάλπιγγα απαιτεί το λιγότερο 2 με 7 ώρες, και αφού φτάσει στον ισθμό, τα σπερματοζώαρια γίνονται λιγότερο κινητικά. Τα σπερματοζώαρια δεν μπορούν να γονιμοποιήσουν το ωοκύτταρο αμέσως μετά την άφιξή τους στη γεννητική οδό του θηλυκού, και έτσι πρέπει να υποστούν (α) ενεργοποίηση (ικανότητα γονιμοποίησης) και (β) την αντίδραση του ακροσώματος για να αποκτήσουν αυτή τη δυνατότητα.

Η ενεργοποίηση είναι μια διαδικασία αλλαγών του σπερματοζωαρίου μέσα στην αναπαραγωγική οδό της γυναίκας, που στους ανθρώπους διαρκεί περίπου 7 ώρες. Μεγάλο μέρος αυτής της διαδικασίας που γίνεται μέσα στη σάλπιγγα, περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις του επιθηλίου ανάμεσα στα σπερματοζώαρια και το βλεννογόνο της σάλπιγγας. Σε αυτή τη χρονική περίοδο, η επικάλυψη γλυκοπρωτεΐνης και οι πρωτεΐνες του πλάσματος του σπέρματος απομακρύνονται από τη μεμβράνη που καλύπτει την περιοχή του ακροσώματος των σπερματοζωαρίων.

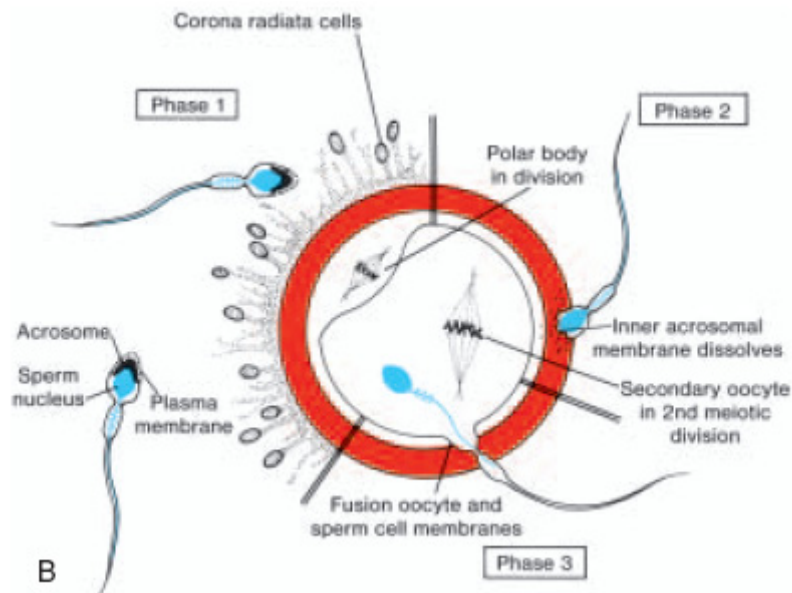
Μόνο τα σπερματοζώαρια που έχουν περάσει αυτή τη διαδικασία μπορούν να υποβληθούν στην αντίδραση του ακροσώματος.

Η αντίδραση των ακροσώματος, που συμβαίνει αφού τα σπερματοζώαρια ενωθούν με τη διάφανη ζώνη, προκαλείται από πρωτεΐνες της ίδιας της διαφανούς ζώνης³. Αυτή η αντίδραση κορυφώνεται με την απελευθέρωση των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη διείσδυση στη διάφανη ζώνη, συμπεριλαμβανομένων ουσιών που προσομοιάζουν στην τρυψίνη και την ακροσίνη (Εικόνα 11).

Οι φάσεις της γονιμοποίησης περιλαμβάνουν τη φάση 1: διείσδυση στον ακτινωτό στέφανο, τη φάση 2: διείσδυση στην διάφανη ζώνη, και φάση 3: συνένωση των κυτταρικών μεμβρανών του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου.

ΦΑΣΗ 1: ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΤΟΥ ΑΚΤΙΝΩΤΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Από τα 200 με 300 εκατομμύρια σπερματοζώαρια που εναποθέτονται στη γεννητική οδό του θηλυκού ατόμου, μόνο 300 με 500 φτάνουν στην περιοχή που γίνεται η γονιμοποίηση. Μόνο ένα από αυτά γονιμοποιεί το ωάριο. Πιστεύεται πως τα υπόλοιπα βοηθούν το σπερματοζώαριο που θα γονιμοποιήσει το ωάριο για να διαπεράσει τα τοιχώματα που προστατεύουν τον θηλυκό γαμέτη. Τα σπερματοζώαρια που έχουν καταστεί ικανά περνούν διαπερνούν τα κύτταρα της ακτινωτής ζώνης (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Οι τρεις φάσεις της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο

ΦΑΣΗ 2: ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΑΝΟΥΣ ΖΩΝΗΣ

Η διαφανής ζώνη είναι ένα περίβλημα γλυκοπρωτεΐνης που περιβάλλει το ωάριο και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση του ακροσώματος. Η αντίδραση του ακροσώματος γίνονται με τη βοήθεια της δεσμευτικής πρωτεΐνης ZP3, η οποία είναι πρωτεΐνη της ζώνης. Η απελευθέρωση των ενζύμων του ακροσώματος (ακροσίνη) δίνει τη δυνατότητα στα σπερματοζωάρια να διεισδύσουν στη διαφανή ζώνη, και συνεπώς να έρθουν σε επαφή με τη μεμβράνη πλάσματος του ωοκυττάρου (Εικόνα 11). Ο βαθμός διαπερατότητας της διαφανούς ζώνης αλλάζει όταν η κεφαλή του σπερματοζωαρίου έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ωοκύτταρου. Η επαφή αυτή προκαλεί την απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων από κοκκία που βρίσκονται κατά μήκος της μεμβράνης πλάσματος του ωοκύτταρου⁴. Ακολούθως, τα ένζυμα αυτά αλλάζουν τις ιδιότητες της διάφανης ζώνης (αντίδραση ζώνης) ώστε να εμποδιστεί η περαιτέρω διείσδυση των σπερματοζωαρίων και να αδρανοποιηθούν οι περιοχές υποδοχής σπερματοζωαρίων στην επιφάνεια της ζώνης. Άλλα σπερματοζωάρια έχουν βρεθεί τοποθετημένα στάσιμα στη διάφανη ζώνη, όμως μόνο ένα φαίνεται να καταφέρνει να εισχωρήσει στη ωοκύτταρο (Εικόνα 11).

ΦΑΣΗ 3: Η ΕΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΤΟΥ ΩΑΡΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Η αρχική προσκόλληση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο γίνεται μέσω της αλληλεπίδραση της ιντεγκρίνης και των δεσμευτικών πρωτεϊνών της, στο ωάριο και στο σπερματοζωάριο. Μετά την προσκόλληση, οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου ενώνονται (Εικόνα 11). Στο ανθρώπινο είδος, η κεφαλή και η ουρά των σπερματοζωων εισχωρούν στο κυτόπλασμα του ωαρίου, όμως η κυτταροπλασματική μεμβράνη μένει πίσω, στην επιφάνεια του ωαρίου. Μόλις το σπερματοζωάριο εισέλθει στο ωάριο, το ωάριο ανταποκρίνεται με τρεις τρόπους:

1. Αντιδράσεις της ζώνης: Σαν αποτέλεσμα της απελευθέρωσης των κοκκίων που βρίσκονται κοντά στη μεμβράνη και περιέχουν λυσοσωματικά ένζυμα, (α) η μεμβράνη του ωαρίου γίνεται αδιαπέραστη για τα υπόλοιπα σπερματοζωα, και (β) η διαφανής ζώνη αλλάζει τη δομή και τη σύστασή της για να εμποδίσει την προσκόλληση και τη διείσδυση των σπερματοζωαρίων. Οι αντιδράσεις αυτές εμποδίζουν την πολυσπερμία (εισχώρηση περισσότερων από ένα σπερματοζωαρίων μέσα στο ωοκύτταρο).

2. Έναρξη της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Το ωάριο ολοκληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεσή της αμέσως μετά την εισχώρηση του σπερματοζωαρίου. Ένα από τα θυγατρικά κύτταρα, που δεν λαμβάνει σχεδόν καθόλου κυτταρόπλασμα, είναι γνωστό ως το δεύτερο πολικό σωματίο. Το άλλο θυγατρικό κύτταρο είναι το τελικό ωάριο. Τα χρωμοσώματά του ($22 + X$) παρατάσσονται σε έναν κυστικό πυρήνα με την ονομασία θηλυκός προ-πυρήνας.

3. Μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου. Ο παράγοντας ενεργοποίησης μάλλον μεταφέρεται από τα σπερματοζωάρια. Η ενεργοποίηση μετά τη συνένωση μπορεί να θεωρηθεί πως περικλείει τα αρχικά κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που σχετίζονται με τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης.

Το σπερματοζωάριο, κινείται προς τα εμπρός μέχρι να βρεθεί κοντά στον θηλυκό προπυρήνα. Ο πυρήνας του μετά από διάφορες αλλαγές σχηματίζει τον αρσενικό πυρήνα (pronucleus). Η ουρά αποκόβεται και αποδομείται. Μορφολογικά, ο αρσενικός και ο θηλυκός πυρήνας δεν έχουν διαφορές ο ένας από τον άλλο, και τελικά, έρχονται σε στενή επαφή και χάνουν το πυρηνικό τους περίβλημα. Στη διάρκεια της ανάπτυξης του αρσενικού και του θηλυκού προπυρήνα (και οι δύο απλοειδείς), ο καθένας πρέπει να δημιουργήσει ένα αντίγραφο του DNA του. Αν δεν συμβεί αυτό, το κάθε κύτταρο από τα δύο του ζυγώτη θα έχει μόνο το μισό από την κανονική ποσότητα DNA. Αμέσως μετά τη σύνθεση του DNA, τα χρωμοσώματα οργανώνονται στην κεντρική άτρακτο και προετοιμάζονται για μια κανονική μιτωτική διαίρεση. Τα 23 μητρικά και τα 23 πατρικά ζεύγη χρωμοσωμάτων διχοτομούνται παράλληλα στο κεντρομερίδιο, και οι αδελφές χρωματίδες κινούνται σε αντίθετους πόλους, παρέχοντας στο κάθε κύτταρο του ζυγώτη τον κανονικό διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων και DNA. Καθώς οι αδελφές χρωματίδες κινούνται σε αντίθετους πόλους, εμφανίζεται μια αύλακα στην επιφάνεια του κυττάρου, χωρίζοντας σταδιακά το κυτταρόπλασμα σε δύο μέρη.

Τα βασικά αποτελέσματα της γονιμοποίησης έχουν ως εξής:

- Αποκατάσταση του διπλοειδούς αριθμού χρωμοσωμάτων, τα μισά προερχόμενα από τον πατέρα και τα μισά προερχόμενα από τη μητέρα. Έτσι, ο ζυγώτης περιέχει ένα νέο συνδυασμό χρωμοσωμάτων και από τους δύο γονείς.
- Καθορισμός του φύλου του νέου ατόμου. Ένα σπερματοζωάριο που μεταφέρει X χρωμόσωμα παράγει ένα θηλυκό (XX) έμβρυο, και ένα σπερματοζωάριο που

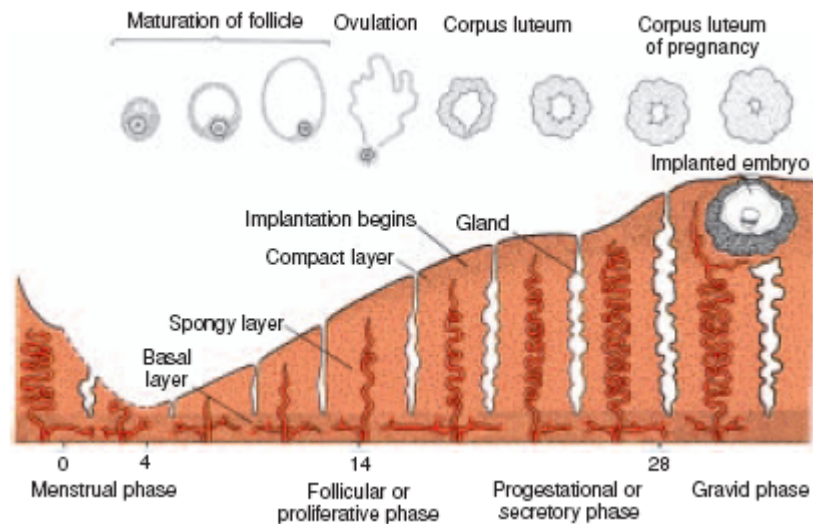
μεταφέρει Y χρωμόσωμα παράγει ένα αρσενικό (XY) έμβρυο. Έτσι, το χρωμοσωμιακό φύλο του εμβρύου καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση.

- Έναρξη της διχοτόμησης. Αν δεν γονιμοποιηθεί, το ωοκύτταρο συνήθως εκφυλίζεται 24 ώρες μετά την ωορρηξία.

Η Μήτρα στη φάση της Εμφύτευσης

Τα τοιχώματα της μήτρας αποτελούνται από τρία στρώματα: (α) το ενδομήτριο (β) το μυομήτριο, ένα παχύ στρώμα λείων μυϊκών ινών, και (γ) ο ορογόνος, το τμήμα του περιτοναίου που καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια της μήτρας. Από την έναρξη της εμμηνου ρύσεως (11-13 χρονών) μέχρι την εμμηνόπαυση (45-50 χρονών), το ενδομήτριο υφίσταται αλλαγές σε έναν κύκλο διάρκειας περίπου 28 ημερών υπό τον ορμονικό έλεγχο των ωοθηκών. Στη διάρκεια αυτού του εμμηνορρυσιακού κύκλου, το ενδομήτριο εμφανίζει 3 στάδια, την παραγωγική φάση, την εκκριτική φάση, και τη φάση της εμμηνου ρύσεως (Εικόνα 12). Η παραγωγική φάση ξεκινά στο τέλος της φάσης της εμμηνου ρύσεως, τελεί υπό την επιρροή οιστρογόνων και έχει ταυτόχρονη ανάπτυξη-εξέλιξη με τα ωοθυλάκια. Η εκκριτική φάση ξεκινά περίπου 2 με 3 μέρες μετά την ωορρηξία, ανταποκρινόμενη στην παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρο σώματιο. Αν δεν επιτευχθεί η γονιμοποίηση, η απόπτωση του ενδομητρίου σηματοδοτεί το ξεκίνημα της εμμηνου ρύσεως. Αν επιτευχθεί η γονιμοποίηση, το ενδομήτριο βοηθά στην εμφύτευση και συνεισφέρει στο σχηματισμό του πλακούντα.

Τη στιγμή της εμφύτευσης, το ενδομήτριο είναι στη εκκριτική φάση (Εικόνα 12). Η εμφύτευση της βλαστοκύστης συνήθως γίνεται κοντά στον πυθμένα της μήτρας, ανάμεσα στους αδένες του ενδομητρίου (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Αλλαγές στο ενδομήτριο σε σχέση με τις αλλαγές στις ωοθήκες

Δεύτερη Εβδομάδα Ανάπτυξης: Γεννητικός Δίσκος Δύο Στρώσεων

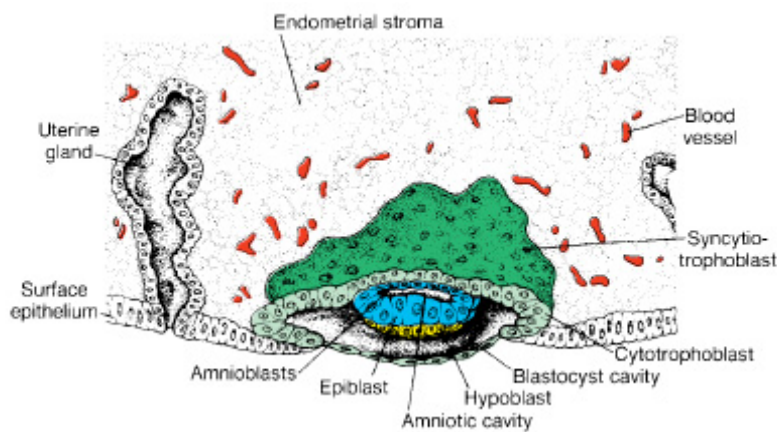
Τα έμβρυα που έχουν γονιμοποιηθεί στην ίδια περίπου χρονική στιγμή δεν αναπτύσσονται απαραίτητα με τον ίδιο ρυθμό. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στο ρυθμό ανάπτυξης ακόμα και στα πρώτα στάδια της δημιουργίας.

Ημέρα 8

Την όγδοη ημέρα της ανάπτυξης, η βλαστοκύστη ενσωματώνεται μερικώς μέσα στο στρώμα του ενδομητρίου. Στην περιοχή επάνω από την εμβρυοβλάστη, η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε δύο στρώματα: (α) το εσωτερικό στρώμα μονοπύρηνων κυττάρων, την κυτταροτροφοβλάστη και (β) μια εξωτερική πολυπυρηνική ζώνη χωρίς ευδιάκριτα όρια των κυττάρων, τη συγκυτιοτροφοβλάστη (Εικόνα 13). Στοιχεία μιτωτικής διαίρεσης μπορούν να βρεθούν στην κυτταροτροφοβλάστη αλλά όχι στην συγκυτιοτροφοβλάστη. Έτσι, τα κύτταρα μέσα στην κυτταροτροφοβλάστη διαιρούνται και μεταναστεύουν μέσα στην συγκυτιοτροφοβλάστη, όπου ενώνονται και χάνουν το κάθε ένα την κυτταρική μεμβράνη του.

Τα κύτταρα της εμβρυοβλάστης επίσης διαφοροποιούνται σε δύο στρώματα: (α) το στρώμα των μικρών κυβοειδών κυττάρων δίπλα στην κοιλότητα της

βλαστοκύστης, γνωστό ως υποβλάστη, και (β) ένα στρώμα υψηλών κυλινδρικών κυττάρων δίπλα στην αμνιακή κοιλότητα, η επιβλάστη (Εικόνα 13). Μαζί, αυτά τα στρώματα σχηματίζουν έναν επίπεδο δίσκο. Την ίδια στιγμή, εμφανίζεται μια μικρή κοιλότητα μέσα στην επιβλάστη. Η κοιλότητα αυτή αναπτύσσεται για να δημιουργήσει την αμνιακή κοιλότητα. Τα κύτταρα της επιβλάστης δίπλα στην κυτταροτροφοβλάστη ονομάζονται αμνιοβλάστες. Μαζί με την υπόλοιπη επιβλάστη, καλύπτουν την αμνιακή κοιλότητα (Εικόνα 13). Το στρώμα του ενδομητρίου στην περιοχή της εμφύτευσης είναι οιδηματώδες και με μεγάλη αγγείωση. Οι αδένες εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου και βλέννης.

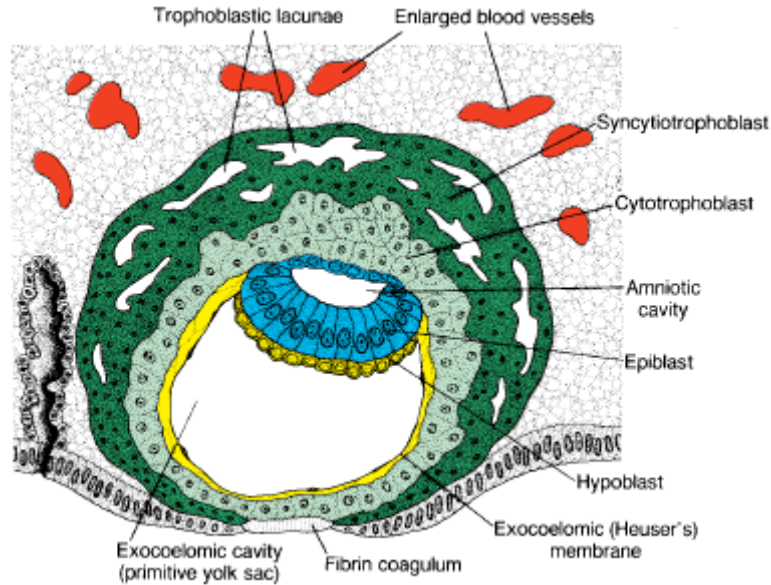


Εικόνα 13. Βλαστοκύστη 8 ημερών. Η τροφοβλάστη αποτελείται από ένα εσωτερικό στρώμα με μονοπύρνα κύτταρα, την κυτταροτροφοβλάστη, και ένα εξωτερικό στρώμα χωρίς διακριτά όρια, την συγκυτιοτροφοβλάστη.

Ημέρα 9

Η βλαστοκύστη εμφυτεύεται βαθύτερα μέσα στο ενδομήτριο (Εικόνα 14). Η τροφοβλάστη παρουσιάζει σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξή της, ειδικά στον εμβρυϊκό πόλο, όπου εμφανίζονται κενοτόπια τα οποία ενώνονται σε μεγάλους σχηματισμούς (Εικόνα 14).

Κάποια επίπεδα κύτταρα που πιθανόν να προέρχονται από την υποβλάστη, σχηματίζουν μια λεπτή μεμβράνη, την εξώκοιλωματική μεμβράνη (μεμβράνη του Heuser), που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια της κυτταροτροφοβλάστης (Εικόνα 14). Αυτή η μεμβράνη, μαζί με την υποβλάστη, σχηματίζει το τοίχωμα της εξώκοιλωματικής κοιλότητας ή τον αρχέγονο λεκιθικό ασκό.



Εικόνα 14. Βλαστοκύστη 9 ημερών. Η συγκυτιοτροφοβλάστη εμφανίζει αρκετά κενοτόπια. Επίπεδα κύτταρα σχηματίζουν την εξωκοιλοματική μεμβράνη.

Ημέρες 11 και 12

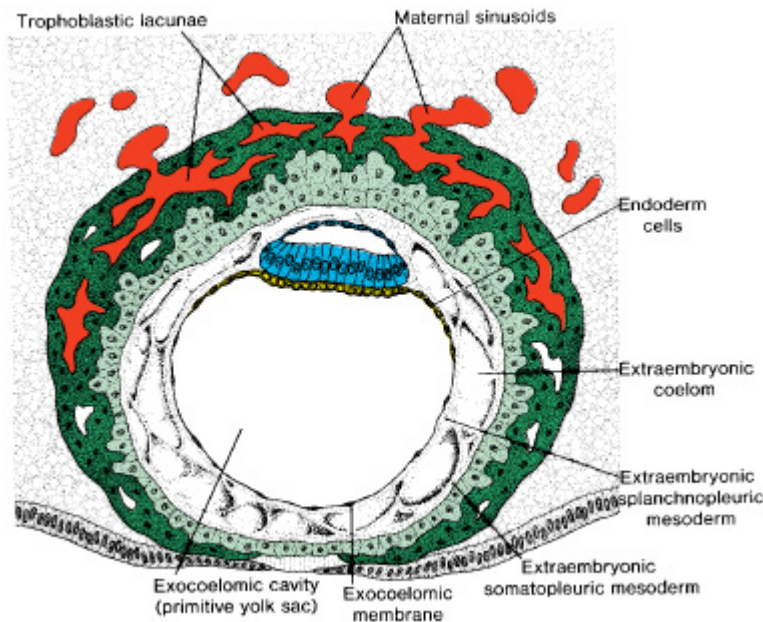
Κατά τη μέρα 11 και 12 της ανάπτυξης, έχει ολοκληρωθεί η εμφύτευση της βλαστοκύστης μέσα στο στρώμα του ενδομητρίου και το επιφανειακό επιθήλιο καλύπτει σχεδόν ολοκληρωτικά το σημείο της εμφύτευσης (Εικόνα 15). Η τροφοβλάστη χαρακτηρίζεται από κενοτοπιώδεις περιοχές μέσα στο συγκυτίο που σχηματίζουν ένα δίκτυο εσωτερικής ενδοεπικοινωνίας. Το δίκτυο αυτό είναι ιδιαίτερα ορατό στον εμβρυϊκό πόλο. Στον μη-εμβρυονικό πόλο, η τροφοβλάστη ακόμα αποτελείται κυρίως από κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα (Εικόνα 15).

Ταυτόχρονα, τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης διεισδύουν βαθύτερα μέσα στο ενδομήτριο και διαβρώνουν το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων της μήτρας. Τα κενοτόπια του συγκυτίου ενώνονται με τα αγγεία και το μητρικό αίμα εισέρχεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη (Εικόνα 15). Καθώς η τροφοβλάστη συνεχίζει να διαβρώνει όλο και περισσότερα αγγεία, το μητρικό αίμα αρχίζει να ρέει μέσα από το τροφοβλαστικό σύστημα, επιτρέποντας την κυκλοφορία του αίματος μεταξύ της μήτρας και του πλακούντα.

Στη συνέχεια, εμφανίζεται ένας νέος πληθυσμός κυττάρων ανάμεσα στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροτροφοβλάστης και την εξωτερική επιφάνεια της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας. Τα κύτταρα αυτά που προέρχονται από κύτταρα του λεκιθικού ασκού, σχηματίζουν έναν λεπτό, χαλαρό συνδετικό ιστό, το έξω-εμβρυονικό μεσόδερμα, το οποίο τελικά καλύπτει όλο τον χώρο ανάμεσα στην

τροφοβλαστή εξωτερικά και την αμνιακή χώρα και την εξωκοιλοματική μεμβράνη εσωτερικά (Εικόνα 15). Σύντομα, δημιουργούνται μεγάλες κοιλότητες μέσα στο έξωεμβρυϊκό μεσόδερμα, και όταν αυτές συνενώνονται, σχηματίζουν έναν νέο χώρο γνωστό με την ονομασία έξωεμβρυϊκή κοιλότητα, ή χοριονική κοιλότητα (Εικόνα 15). Ο χώρος αυτός περιβάλλει τον αρχέγονο λεκιθικό ασκό και την αμνιακή κοιλότητα εκτός από εκεί όπου ο γεννητικός δίσκος συνδέεται με την τροφοβλάστη μέσω συνδετικού ιστού (Εικόνα 16). Το έξω-εμβρυϊκό μεσόδερμα που καλύπτει τον κυτταροτροφοβλάστη και την αμνιακή κοιλότητα ονομάζεται έξω-εμβρυονικό σωματοπλευρικό μεσόδερμα. Τα κύτταρα που καλύπτουν τον λεκιθικό ασκό ονομάζεται έξω-εμβρυονικό σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα (Εικόνα 15).

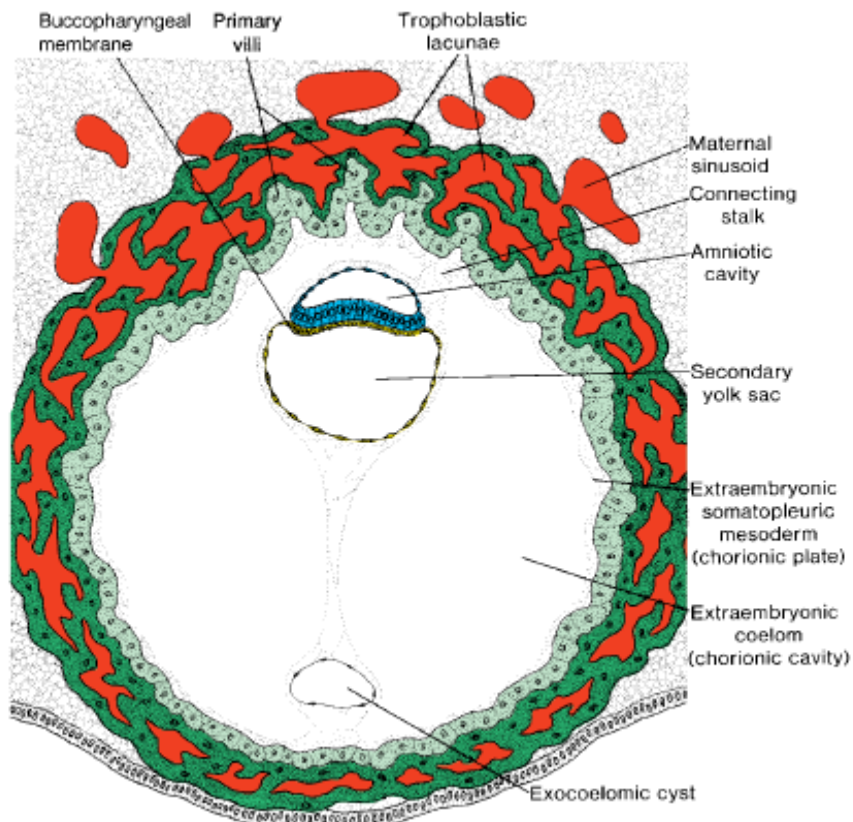
Η ανάπτυξη του δίσκου δύο στρωμάτων είναι σχετικά αργή συγκριτικά με αυτή της τροφοβλάστης. Κατά συνέπεια, ο δίσκος αυτός παραμένει πολύ μικρός (0.1 – 0.2 mm). Τα κύτταρα του ενδομήτριου στη φάση αυτή γίνονται πολυεδρικά και γεμίζουν με γλυκογόνο και λιπίδια. Οι χώροι ανάμεσα στα κύτταρα γεμίζουν με στοιχεία του αίματος που προέρχονται από εξαγγείωση. Αυτές οι αλλαγές, γνωστές ως η αντίδραση φθαρού (φθαρός: το ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της κύησης), στην αρχή περιορίζονται στην περιοχή που περιβάλλει άμεσα την περιοχή της εμφύτευσης, όμως σύντομα λαμβάνουν χώρα στο σύνολο του ενδομητρίου.



Εικόνα 15. Βλαστοκύστη 12 ημερών.

Ημέρα 13

Ως την 13η ημέρα της ανάπτυξης, η επιφάνεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης έχει πλέον καλυφθεί πλήρως από επιθήλιο. Μερικές φορές όμως, δημιουργείται αιμορραγία στην περιοχή της εμφύτευσης λόγω της αυξημένης ροής του αίματος στους κενοτοπιώδεις χώρους. Επειδή αυτή η αιμορραγία συμβαίνει κοντά στην 28η ημέρα του κύκλου της εμμηνου ρύσεως, ενδέχεται να εκληφθεί λανθασμένα ως κανονική έμμηνος ρύση.



Εικόνα 16. Ανθρώπινη βλαστοκύστη 13 ημερών

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Ο σχηματισμός του ανθρώπινου πλακούντα αρχίζει 13-15 ημέρες μετά την ωορηξία δηλαδή στο τέλος της 4ης εβδομάδας μετά την έναρξη της τελευταίας περιόδου⁵. Οι πρωτογενείς λάχνες αποτελούνται από μία κεντρική μάζα κυτταροτροφοβλάστης η οποία περιβάλλεται από ένα παχύ στρώμα από συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Στη διάρκεια της πέμπτης εβδομάδας της κύησης οι πρωτογενείς λάχνες αποκτούν ένα κεντρικό μεσεγγυματικό πυρήνα από εξω-εμβρυονικό μεσόδερμα και διακλαδίζονται, σχηματίζοντας τις δευτερογενείς λάχνες. Η εμφάνιση των εμβρυικών αγγείων εντός αυτού του μεσεγγυματικού πυρήνα, μετατρέπει τις δευτερογενείς σε τριτογενείς λάχνες. Στο τέλος της πέμπτης εβδομάδας της κύησης και οι τρεις πρώιμες μορφές πλακουντιακών λαχνών μπορούν να αναγνωριστούν αλλά οι τριτογενείς λάχνες προοδευτικά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος. Μέχρι την 9η με 10η εβδομάδα μετά την τελευταία περίοδο, διάστημα το οποίο αντιστοιχεί στην τελευταία εβδομάδα της εμβρυονικής περιόδου, λάχνες καλύπτουν ολόκληρη την επιφάνεια του χοριονικού σάκου. Καθώς ο σάκος της κύησης αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, οι λάχνες που έρχονται σε επαφή με τον φθαρτό που περιβάλλει την αμνιακή κοιλότητα (θυλακοειδής φθαρτός) αποδομούνται έτσι ώστε να σχηματίσουν το λείο χόριο ενώ οι λάχνες που έρχονται σε επαφή τον βασικό φθαρτό πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας τον τελική πλακουντιακή μάζα⁶.

Η εξωεμβρυϊκή κοιλότητα αρχίζει να αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας μετά την έναρξη της τελευταίας περιόδου. Περιβάλλει τη βλαστοκύστη η οποία αποτελείται από δύο κοιλότητες που χωρίζονται από τον χοριακό δίσκο σε αμνιακή κοιλότητα και σε πρωτογενή λεκιθικό ασκό. Στο τέλος της τέταρτης εβδομάδας της κύησης, η αναπτυσσόμενη εξωεμβρυϊκή κοιλότητα διαχωρίζει το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα σε δύο στρώματα, το σωματικό μεσόδερμα σε επαφή με την τροφοβλάστη και το σπλαχνικό μεσόδερμα που καλύπτει το δευτερογενή λεκιθικό ασκό και το έμβρυο. Δεν υπάρχει ανατομικός φραγμός μεταξύ του μεσεγγυματικού ιστού του εμβρυϊκού τμήματος του πλακούντα και της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας⁷. Μετά από σχεδόν 31 ημέρες μετά την έναρξη της τελευταίας περιόδου ο σάκος της κύησης έχει μέγεθος 2-3 χιλιοστά σε διάμετρο και μπορεί να διακριθεί με διακολπικό υπέρηχο μόλις η β-HCG στον ορό ξεπεράσει τις 1500 IU.

Η αμνιακή κοιλότητα αναπτύσσεται στην δεύτερη προς τρίτη εβδομάδα της κύησης από την εσωτερική κυτταρική μάζα της εμφυτευμένης βλαστοκύστης και μεγαλώνει μέσα στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα συνεννούμενη με το χοριονικό πλακουντιακό δίσκο στο τέλος του πρώτου τριμήνου⁵. Μέχρι την 9^η-10^η εβδομάδα της κύησης η αμνιακή κοιλότητα είναι μικρότερη από την εξωεμβρυϊκή. Οπότε κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου μήνα της κύησης το έμβρυο περιβάλλεται από την αμνιακή κοιλότητα η οποία με τη σειρά της περιβάλλεται από το δευτερογενή λεκιθικό ασκό.

Ο δευτερογενής λεκιθικός ασκός είναι ένα ανεξάρτητο όργανο που “αιωρείται” εντός της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας. Σχηματίζεται στην αρχή της πέμπτης εβδομάδας και αναπτύσσεται αρκετά γρήγορα έτσι ώστε την 37^η ημέρα είναι μεγαλύτερος από την αμνιακή κοιλότητα⁸. Από την έκτη εβδομάδα της κύησης έχει την εμφάνιση σφαιρικού και κυστικού σχηματισμού ο οποίος καλύπτεται από πολυάριθμα επιφανειακά μικρά αγγεία που συρρέουν στη βάση του αλλαντοειδούς πόρου. Αυτός συνδέει τον λεκιθικό ασκό με το κοιλιακό τοίχωμα του εμβρύου, το έντερο και την αιματική κυκλοφορία. Το τοίχωμα του δευτερογενούς λεκιθικού ασκού σχηματίζεται από ένα εξωτερικό στρώμα μεσοθηλιακό προς την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα, ένα αγγειακό μεσεγγυματικό στρώμα και ένα ενδοδερμικό στρώμα προς την κοιλότητα του λεκιθικού ασκού. Η αιματική κυκλοφορία εγκαθίσταται με τον αλλαντοειδή πόρο προς την κοιλιακή αορτή. Κατά τη διάρκεια της 10ης εβδομάδας ο λεκιθικός ασκός αρχίζει να αποδομείται και πολύ γρήγορα η λειτουργία του παύει⁹.

Με την εφαρμογή της αμνιοπαρακέντησης για τη διερεύνηση του γονιδιώματος και του καρυότυπου του εμβρύου, το αμνιακό υγρό έγινε το πρώτο διαθέσιμο υλικό για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τη φυσιολογία του εμβρύου και του ενδομήτριου περιβάλλοντος. Οι αναλύσεις του αμνιακού υγρού από τον τρίτο μήνα της κύησης και μετά, έχουν δείξει σημαντικές διαφορές στην οξεοβασική ισορροπία, τη συγκέντρωση διαφόρων συστατικών και ηλεκτρολυτών τόσο κατά τη διάρκεια της κύησης όσο και μεταξύ του ορού της μητέρας και του αμνιακού υγρού. Στη δεκαετία του 1970, έγιναν οι πρώτες μελέτες για τη φυσιολογία και τη βιοχημεία του αμνιακού υγρού στο πρώτο τρίμηνο της κύησης^{10,11}.

Λόγω τεχνικών δυσκολιών στην ευκρινή και ξεκάθαρη αναγνώριση των διαμερισμάτων της ενδομήτριας κύησης στο πρώτο τρίμηνο με τον υπέρηχο, είναι πιθανό ότι τα πιο πολλά δείγματα των μελετών αυτών σε ηλικία κύησης κάτω των 12 εβδομάδων, ήταν ένα μείγμα από υγρό της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και του

αμνιακού υγρού. Στην πραγματικότητα, η ύπαρξη της κοιλότητας αυτής η οποία περιβάλλει το έμβρυο και την αμνιακή κοιλότητα για το μεγαλύτερο διάστημα του πρώτου τριμήνου, ήταν άγνωστη στους περισσότερους συγγραφείς ως τότε.

Με την εμφάνιση των υψηλής ανάλυσης κεφαλών των κολπικών υπερήχων στο τέλος της δεκαετίας του 1980, κατέστη δυνατή η λεπτομερής μορφολογική μελέτη του ενδομήτριου σάκου της κύησης κατά το πρώτο τρίμηνο. Συγκεκριμένα έγινε δυνατή η απεικόνιση της μεμβράνης που διαχωρίζει την αμνιακή από την εξω-εμβρυική κοιλότητα και κατέστη δυνατή η αναρρόφηση του εξωεμβρυϊκού υγρού από την 5η εβδομάδα της κύησης. Το 1991 δύο ανεξάρτητες ομάδες, οι οποίες είχαν τη βάση τους στο King's College Hospital Medical School¹² και στο St Bartholomew Hospital Medical College^{13,14}, ανέφεραν στις δημοσιεύσεις τους τα πρώτα δεδομένα για τη βιοχημεία του υγρού της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας. Όμως από το 1958 ο McKay και συνεργάτες είχαν ήδη δημοσιεύσει μία μελέτη για την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του αμνιακού και εξωεμβρυϊκού υγρού σε πέντε φυσιολογικές κυήσεις πρώτου τριμήνου με υστεροτομία¹⁵. Αν και το δείγμα που μελετήθηκε ήταν πολύ μικρό, η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνες που βρέθηκε από τους συγγραφείς στον εξωεμβρυϊκό χώρο, ήταν παρόμοια με αυτή που βρέθηκε σε μελέτες οι οποίες έγιναν 30 χρόνια αργότερα^{16,17,18}.

Η παρακέντηση του εξωεμβρυϊκού χώρου γίνεται επιτυχώς σε ποσοστό πάνω από 95% όταν γίνεται από έμπειρους χειριστές. Θεωρητικά, είναι η ιδανική εναλλακτική λύση στην λήψη χοριακών λαχνών και την αμνιοπαρακέντηση σε μικρή ηλικία κύησης, διότι ο κίνδυνος του τραυματισμού του εμβρύου ή του πλακούντα είναι πολύ μικρός¹⁹. Υπάρχουν μελέτες που εξετάζουν την ασφάλεια της παρακέντησης του εξωεμβρυϊκού χώρου σε συνεχιζόμενες κυήσεις, οι οποίες αναφέρουν ένα ποσοστό αποβολής περίπου 25%²⁰. Σε έρευνα που έγινε για να εξεταστεί η βραχυπρόθεσμη ασφάλεια της μεθόδου σε 108 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε παρακέντηση πριν από τη διακοπή κύησης, ο εμβρυϊκός θάνατος οφειλόμενος στην παρακέντηση εξωεμβρυϊκού χώρου, υπολογίστηκε περίπου σε ποσοστό 2%²¹. Αυτά τα ευρήματα καθώς και η δύσκολη καλλιέργεια κυττάρων από τα δείγματα αυτά είναι οι κύριοι περιορισμοί της εφαρμογής της μεθόδου για τη διερεύνηση της εμβryo-μητρικής φυσιολογίας στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, όπου δεν είναι δυνατή η λήψη εμβρυϊκού αίματος

ΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ ΚΑΙ Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΣΙΑ

Η αμνιακή κοιλότητα αρχίζει να αναπτύσσεται στην δεύτερη εβδομάδα της κύησης από την εσωτερική κυτταρική μάζα της εμφυτευμένης βλαστοκύστης και μεγαλώνει μέσα στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα συνεννοούμενη με το χοριονικό πλακουντιακό δίσκο στο τέλος του πρώτου τριμήνου⁵. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου μήνα της κύησης το έμβρυο περιβάλλεται από την αμνιακή κοιλότητα η οποία με τη σειρά της περιβάλλεται από το δευτερογενή λεκιθικό ασκό.

Η δομή της ολοκληρώνεται κατά την 10^η εβδομάδα της κύησης. Η προέλευση του αμνιακού υγρού είναι διαφορετική στο πρώτο τρίμηνο της κύησης από ότι στο τρίτο και επιτελεί σημαντικές λειτουργίες τόσο στην ανάπτυξη του εμβρύου όσο και στην έναρξη και εξέλιξη του τοκετού.

Η παρουσία αρκετής ποσότητας αμνιακού υγρού εξασφαλίζει τις συνεχείς ενεργητικές και παθητικές κινήσεις του εμβρύου καθώς και την ομαλή ανάπτυξη των μορφολογικών χαρακτηριστικών του προσώπου και των άκρων. Διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία του ενδομήτριου περιβάλλοντος και προστατεύει το έμβρυο από λοιμώξεις. Προφυλάσσει το έμβρυο, τον πλακούντα και τον ομφάλιο λώρο από τραυματισμούς. Στην τελειόμηνη κύηση, με το σχηματισμό του θυλακίου, αποτελεί μηχανικό μέσο για την έναρξη και πρόοδο της διαστολής. Η ρήξη του θυλακίου δίνει το έναυσμα για την έναρξη του τοκετού και δρα ως λιπαντικό του πυελογεννητικού σωλήνα της γυναίκας για την κάθοδο της κεφαλής του εμβρύου. Επιπλέον, βοηθά και στους μαιευτικούς χειρισμούς εφόσον αυτοί κριθούν απαραίτητοι.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η σύσταση και η ποσότητα του αμνιακού υγρού στην ομοιόσταση του εμβρύου. Έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη σύσταση και την αναλογία διαφόρων ουσιών στο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια της κύησης. Στην αρχόμενη κύηση εστιάζουν στις διαφορές της συγκέντρωσης οργανικών και ανόργανων συστατικών ανάμεσα στα διαμερίσματα του σάκου και του ορού της μητέρας²². Στο δεύτερο και το τρίτο τρίμηνο, έχει γίνει έρευνα για τη συσχέτιση ουσιών με τη μεταβολική κατάσταση του εμβρύου καθώς και για την παρουσία μηκωνίου σε σχέση με την εμβρυϊκή δυσχέρεια.

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην ποσότητα και τη σύσταση του αμνιακού υγρού. Οι κυριότεροι είναι ο πλακούντας, το έμβρυο και η

αιματική κυκλοφορία της μητέρας. Στην αρχόμενη κύηση το αμνιακό υγρό θεωρείται πως είναι ένα υπερδιήθημα που προέρχεται από την αιματική κυκλοφορία της μητέρας διαμέσου των μεμβρανών. Στην πορεία της κύησης και καθώς σχηματίζονται τα όργανα του εμβρύου και ο πλακούντας, το αμνιακό υγρό προέρχεται κυρίως από το δέρμα, το γαστρεντερικό σωλήνα, το τραχειοβρογχικό δέντρο και τους νεφρούς του εμβρύου. Ιδιαίτερα στο δεύτερο και στο τρίτο τρίμηνο, είναι σημαντική η συμβολή των ούρων του εμβρύου στην ποσότητα και στη σύσταση του αμνιακού υγρού. Κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου, η συνολική ποσότητα του αμνιακού υγρού ανανεώνεται συνεχώς από τα ούρα και τα υγρά του αναπνευστικού δέντρου που παράγονται και την απομάκρυνσή τους με τις καταποτικές κινήσεις του εμβρύου. Όταν σχηματιστεί η τελική μορφή του πλακούντα, η μετακίνηση του νερού και των ηλεκτρολυτών συμβαίνει και μεταξύ των ελεύθερων μεμβρανών του πλακούντα.

ΣΥΣΤΑΣΗ

Το αμνιακό υγρό αποτελείται σε ποσοστό 98% από νερό. Το υπόλοιπο 2% είναι οργανικά και ανόργανα συστατικά. Οι μισοί από τους ανόργανους διαλύτες είναι πρωτεΐνες. Τα ανόργανα συστατικά είναι παρόμοια με αυτά του εξωκυττάριου υγρού με υψηλές συγκεντρώσεις Cl και Na και μικρές ποσότητες Ca, Mg και PO₄.

Το αμνιακό υγρό ως την 10^η εβδομάδα της κύησης είναι διαυγές. Στη συνέχεια και ιδιαίτερα στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να εμφανίσει ένα χρώμα κίτρινο ανάλογα με τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης σε αυτό. Στην τελειόμηνη κύηση, αποκτά πάλι διαυγή εμφάνιση ενώ αιωρούνται σε αυτό νιφάδες σμήγματος, μια έμμεση ένδειξη εμβρυικής ωριμότητας.

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΜΝΙΑΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟ ΤΡΙΜΗΝΟ

Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, η αμνιακή μεμβράνη διαχωρίζει την αμνιακή και την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα. Παρά την απλότητα της ως δομή⁷, η άμεση μεταφορά από την εξωεμβρυϊκή στην αμνιακή κοιλότητα μέσω της αμνιακής μεμβράνης είναι περιορισμένη, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι το αμνιακό υγρό έχει πολύ μικρή συγκέντρωση σε πρωτεΐνες^{23,24}. Η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο αμνιακό υγρό είναι 50 φορές μικρότερη από ότι στο εξωεμβρυϊκό υγρό και 900 φορές μικρότερη από το πλάσμα. Σχεδόν όλα τα πρωτεϊνικά μόρια, εκτός από την AFP, ανευρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο αμνιακό υγρό. Ο αλλαντοειδής πόρος έχει την ίδια κυτταρική δομή όπως ο δευτερογενής λεκιθικός ασκός⁷. Η AFP

και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του λεκιθικού ασκού οι οποίες βρίσκονται στο αμνιακό υγρό στις αρχές του πρώτου τριμήνου της κύησης, πιθανώς να παράγονται στο επίπεδο που ο αλλαντοειδής πόρος ενώνεται με τον πρωτογενή ομφάλιο λώρο. Η AFP του λεκιθικού ασκού μπορεί να μεταφέρεται στο αμνιακό υγρό μέσω του αλλαντοειδούς πόρου και από τη δέκατη εβδομάδα της κύησης και μετά κατά την οποία ο εμβρυϊκός πεπτικός σωλήνας έρχεται σε επαφή με την αμνιακή κοιλότητα, η AFP που παράγεται από τον πεπτικό σωλήνα ανιχνεύεται στο αμνιακό υγρό⁸.

Δείγματα αμνιακού υγρού τα οποία είχαν συλλεχθεί πριν τις 11 εβδομάδες της κύησης, έχουν μεγαλύτερες τιμές pH, υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικών και διττανθρακικών και μικρότερες συγκεντρώσεις ολικών πρωτεϊνών, φωσφορικών, χλωρίου και νατρίου από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο εξωεμβρυϊκό υγρό που συλλέχθηκαν την ίδια περίοδο²⁵. Από όλους αυτούς τους ηλεκτρολύτες και τις μακρομοριακές ουσίες, μόνο το pH και τα επίπεδα των διττανθρακικών είχαν σημαντική διακύμανση στις ηλικίες κύησης από 7 ως 11 εβδομάδες. Η μεταβολική αλκάλωση του αμνιακού υγρού στο πρώτο τρίμηνο πιθανώς να προκαλείται από τη συνάθροιση των διττανθρακικών και την αυξημένη κατανάλωσή οργανικών ανιόντων όπως τα γαλακτικά από τους εμβρυϊκούς ιστούς. Το εμβρυϊκό δέρμα, το οποίο κερατινοποιείται κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου, είναι πιθανώς μία από τις κύριες πηγές αμνιακού υγρού στα αρχικά στάδια της κύησης. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, σε αντίθεση με το εξωεμβρυϊκό υγρό του οποίου η παραγωγή και η σύνθεση επηρεάζεται από τα προϊόντα μεταβολισμού του πλακούντα και του λεκιθικού ασκού, η σύσταση του αμνιακού υγρού επηρεάζεται κυρίως από τα προϊόντα του μεταβολισμού του εμβρύου τα οποία μπορεί να διαχέονται από το εμβρυϊκό δέρμα ή από τις ορο-φαρρυγγικές μεμβράνες και την αμάρα^{25, 26}. Οι μεμβράνες αυτές, στο τέλος της πέμπτης και της έβδομης εβδομάδας της κύησης αντίστοιχα, διανοίγονται, επιτρέποντας έτσι την ελεύθερη κυκλοφορία μεταξύ του πεπτικού σωλήνα, του αναπνευστικού δέντρου και της αμνιακής κοιλότητας²⁷.

Τα εμβρυϊκά ούρα είναι η κύρια πηγή αμνιακού υγρού στο δεύτερο ήμισυ της κύησης. Η περιεκτικότητα σε ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες και η οξεο-βασική ισορροπία του αμνιακού υγρού αλλάζουν ταχέως στο τέλος του πρώτου τριμήνου^{25, 26, 28, 29}. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να περιγραφούν αυτές οι αλλαγές ειδικά για μεταβολική δραστηριότητα των νεφρών, των πνευμόνων και του πεπτικού σωλήνα. Η ανάπτυξη των νεφρών ξεκινά στις αρχές του τρίτου μήνα και θεωρητικά, ο μετάνεφρος ή ο τελικός νεφρός παράγει τα ούρα από τις 10 εβδομάδες της κύησης

και μετά²⁷. Περίπου στις 11 εβδομάδες, έχει παρατηρηθεί μια απότομη αύξηση στη β₂-μικροσφαιρίνη και στην γ-γλουταμινική τρανσφεράση (γ-GT) στο αμνιακό υγρό και αυτό είναι πιθανό να αντανακλά την ωρίμανση της εμβρυϊκής νεφρικής σπειραματικής λειτουργίας²⁶. Ιδιαίτερα, οι συγκεντρώσεις της β₂-μικροσφαιρίνης στο αμνιακό υγρό κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης έχουν συνδεθεί με την εγκατάσταση της σπειραματικής διήθησης στον εμβρυϊκό νεφρό στη φάση εκείνη που η νεφρική σωληναριακή λειτουργία είναι ακόμα ανώριμη. Η β₂-μικροσφαιρίνη του αμνιακού υγρού μειώνεται κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης ως αποτέλεσμα της αυξημένης ικανότητας επαναπρόσληψης από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια. Η πολύ μικρή δραστηριότητα της γ-GT στο εξωεμβρυϊκό υγρό δείχνει πως οι πλακουντιακές λάχνες δεν είναι η κύρια πηγή αυτού του ενζύμου.

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στη σύσταση του αμνιακού υγρού στο τέλος του πρώτου τριμήνου χαρακτηρίζονται από μείωση του pH, περίσσεια βάσης και τιμές διττανθρακικών και αύξηση στη μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα της συγκέντρωσης του χλωρίου. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, εκτός από τη συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών η οποία παραμένει χαμηλότερη, η μέση τιμή των υπόλοιπων βιολογικών παραμέτρων που παρατηρούνται στο αμνιακό υγρό μετά τις 11 εβδομάδες της κύησης, είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στο εξωεμβρυϊκό υγρό πριν τις 11 εβδομάδες της κύησης²⁴. Παρόμοιες αλλαγές συμβαίνουν κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο¹⁰ και προφανώς αντανακλούν την αυξανόμενη συνεισφορά των διαφόρων εμβρυϊκών οργάνων στη σύσταση του αμνιακού υγρού.

ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Η ποσότητα του αμνιακού υγρού κατά τη διάρκεια της κύησης καθορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η διαπερατότητα των μεμβρανών, οι μηχανισμοί ομοιόστασης του εμβρύου και η μετακίνηση νερού και μεταβολιτών υπό τους μηχανισμούς ρύθμισης της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας.

Στην 8^η εβδομάδα ο όγκος του αμνιακού υγρού είναι 5-10 ml και στην 10^η 20-30 ml. Στην συνέχεια αυξάνει αναλογικά με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ηλικία της κύησης, από τα 250 ml στην 20^η εβδομάδα στα 750-800 ml στις 32-34 εβδομάδες. Ακολουθώντας ελαττώνεται σταδιακά, και έτσι στις 40-42 εβδομάδες είναι 300 ml περίπου.

Στο ανθρώπινο έμβρυο δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποιος συγκεκριμένος αισθητήρας, ο οποίος να ρυθμίζει τον όγκο του αμνιακού υγρού. Πιθανότατα, οι εμβρυϊκοί υμένες και η εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα να έχουν αναλάβει αυτόν τον ρόλο.

Το αμνιακό υγρό δεν είναι μία στατική αλλά μία δυναμικά ανανεώσιμη ποσότητα υγρού. Συγκεκριμένα, τα εμβρυϊκά ούρα παρέχουν περίπου 900 ml ανά ημέρα, οι πνευμονικές εκκρίσεις 150 ml, οι υμένες περίπου 25 ml και άλλα 15 ml προέρχονται από τις δερματικές, στοματικές και εντερικές εκκρίσεις στο τέλος της κύησης. Ταυτόχρονα 550 ml ανά ημέρα καταπίνονται από το έμβρυο, 500 ml ανά ημέρα απορροφώνται από τον πλακούντα και αποδίδονται στην εμβρυϊκή κυκλοφορία και άλλα 10 ml ανά ημέρα απορροφώνται από τους εμβρυϊκούς υμένες. Η μη παραγωγή ούρων από το έμβρυο οδηγεί σε ελάττωση του αμνιακού υγρού (ολιγάμνιο), ενώ αποφρακτικές καταστάσεις του πεπτικού σωλήνα οδηγούν σε πολυάμνιο.

Πολυάμνιο καλείται η ποσότητα αμνιακού υγρού άνω του φυσιολογικού. Συνδέεται συχνότατα με οισοφαγική ή δωδεκαδακτυλική ατρησία, ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού σωλήνα, όπως ανεγκεφαλία και υδροκεφαλία, βλάβες που όπως είναι ευνόητο παρεμβάλλονται στην διαδικασία της κατάποσης.

Ολιγάμνιο -δηλαδή ελαττωμένη ποσότητα αμνιακού υγρού- ωρίς στην κύηση συνδέεται με ποσοστό εμβρυϊκής απώλειας της τάξης του 80%. Μπορεί να οφείλεται σε αγενεσία νεφρών ή σε αποφρακτικές ουροπάθειες, σε ρήξη θυλακίου και σε σοβαρή μητροπλακουντιακή ανεπάρκεια και συνοδό ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου. Είναι μια σοβαρή επιπλοκή της κύησης και συνδέεται με πνευμονική υποπλασία και ανωμαλίες διάπλασης προσώπου και άκρων. Όταν παρουσιάζεται αργά στην κύηση συνδέεται συχνότερα με επιβράδυνση της ενδομήτριας ανάπτυξης, με προεκλαμψία και τέλος με αποφρακτικού τύπου ανωμαλίες του ουροποιητικού.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Είμαι χρήσιμο να γίνει μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας όσο αφορά τις διάφορες ουσίες που έχουν μελετηθεί στο αμνιακό υγρό και η συσχέτισή τους με την ομοιόσταση του εμβρύου, διάφορα νοσήματα καθώς και χρωμοσωμιακές και άλλες συγγενείς ανωμαλίες.

ΛΙΠΙΔΙΑ

Η ποσότητα και το είδος των διαφόρων λιπιδίων στο αμνιακό υγρό έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο για τη διάγνωση της εμβρυϊκής ωριμότητας όσο και για τη διάγνωση γονιδιακών νοσημάτων τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό λιπιδίων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον οργανισμό και την ανάπτυξη του εμβρύου.

Ο λόγος λεκιθίνη/σφιγγομυελίνη (λιπίδια που προέρχονται κυρίως από την αναπνευστική οδό του νεογνού), είναι ένα τεστ που χρησιμοποιείται στο αμνιακό υγρό για τη διαπίστωση της πνευμονικής ωριμότητας του εμβρύου. Και τα δύο ανήκουν στην κατηγορία των φωσφολιπιδίων και εμφανίζονται στο αμνιακό υγρό από την 26^η εβδομάδα της κύησης. Στους εμβρυϊκούς πνεύμονες είναι απαραίτητη η παρουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) για τη μείωση της πίεσης στην επιφάνεια των κυψελίδων. Η λεκιθίνη και η σφιγγομυελίνη είναι βασικά συστατικά του, επομένως ο λόγος αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός στα νεογνά που γεννιούνται πρόωρα. Καθώς εξελίσσεται η ωρίμανση των πνευμόνων, ο λόγος λεκιθίνη/σφιγγομυελίνη αυξάνεται στο αμνιακό υγρό. Εάν το πηλίκο αυτό είναι μεγαλύτερο από 2, είναι ενδεικτικό χαμηλού κινδύνου το έμβρυο να παρουσιάσει σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενώ αν είναι κάτω από 1.5, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσει αναπνευστικά προβλήματα συνδεδεμένα με την προωρότητα^{28, 29, 30, 31}.

Έχουν γίνει μελέτες για το βιοχημικό προφίλ διαφόρων στερολών στο αμνιακό υγρό με σκοπό να βρεθεί μια μέθοδος ανίχνευσης μεταβολικών νοσημάτων σύνθεσης παραγώγων χοληστερόλης³². Ενδεικτικά μπορεί να αναφερθεί η περίπτωση του συνδρόμου Smith Lemli Orpitz, το περιλαμβάνει πολλές ανωμαλίες διάπλασης³³ και οφείλεται σε μεταβολικές διαταραχές σύνθεσης της χοληστερόλης. Αυτή η διαταραχή του μεταβολισμού μπορεί να διαγνωστεί προγεννητικά χρησιμοποιώντας τη χημική ανάλυση των στερολών του αμνιακού υγρού.

ENZYMA

Η μελέτη των διαφόρων ενζύμων στο αμνιακό υγρό έχει δώσει σημαντικά στοιχεία όσο αφορά την λειτουργία των εμβρυϊκών οργάνων κατά τη διάρκεια της κύησης, τη διάγνωση γονιδιακών νοσημάτων που εκφράζονται με έλλειψη ή υπερπαραγωγή πρόδρομων μορφών κάποιου ενζύμου³⁴ καθώς και τη σχέση των συγκεντρώσεών τους με την προεκλαμψία³⁵, τον πρόωρο τοκετό³⁶ και άλλες δυσμενείς εκβάσεις της κύησης³⁷. Φαίνεται πως ο πιο σημαντικός παράγοντας που

επηρεάζει την ποιότητα και ποσότητα των ένζυμων στο αμνιακό υγρό στο πρώτο τρίμηνο έχει να κάνει με το στάδιο δημιουργίας του εμβρυικού δέρματος.

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως το αμνιακό υγρό περιέχει ένζυμα όπως η μονο-αμινοξειδάση Α και Β τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των νευροδιαβιβαστών και ιδιαίτερα της σεροτονίνης³⁸. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν τη σχέση της ελαττωμένης πλακουντιακής μονο-αμινοξειδάσης Α και την εμφάνιση προεκλαμψίας³⁹. Ο μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί, πιθανολογείται πως μέσω αύξησης της εμβρυϊκής σεροτονίνης, προκαλείται αγγειοσύσπαση στα αγγεία του πλακούντα.

Πολλά ένζυμα που ανευρίσκονται στο αμνιακό υγρό φαίνεται να έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και να εμποδίζουν την ανάπτυξη χοριοαμνιονίτιδας. Τέτοια είναι η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη, οι ουδετεροφιλικές πεπτιδάσες 1-3, ο αναστολέας της λευκοκυτταρικής πρωτεάσης⁴⁰.

ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΕΣ

Η νόσος του Pompe, ανήκει στις διαταραχές των λυσοσωμάτων που κληρονομούνται. Χαρακτηρίζεται από έλλειψη του ενζύμου α-γλυκοσιδάσης, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο GAA στο χρωμόσωμα 17q25.2-q25.3. Η απουσία της δραστηριότητας του ενζύμου στη νεογνική μορφή της νόσου Pompe, οδηγεί στη μη φυσιολογική εναπόθεση γλυκογόνου στους λείους μυς καθώς και στον καρδιακό μυ, προκαλεί υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, διαταραχές σίτισης, υποτονία και σε τελικό στάδιο, αναπνευστική ανεπάρκεια. Μπορεί να γίνει προγεννητική διάγνωση της νόσου εξετάζοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου από τα αμνιακά κύτταρα⁴¹.

Τα λυσοσωματικά νοσήματα όπως η νόσος του Gaucher μπορούν να διαγνωστούν προγεννητικά από την δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης στα κύτταρα που ανευρίσκονται στο αμνιακό υγρό⁴². Βέβαια, στη διάγνωση μιας τέτοιας νόσου θα μας οδηγήσει όχι μόνο το οικογενειακό ιστορικό αλλά και διάφορα υπερηχογραφικά ευρήματα.

ENZYMA ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ

Η ανεύρεση ενζυμων του πεπτικού σωλήνα στο αμνιακό υγρό σχετίζεται με τη φυσιολογική ωρίμανση του πεπτικού συστήματος ανάλογα με την ηλικία κύησης⁴³.

Η εμβρυϊκή χοληδόχος κύστη προέρχεται από το ηπατικό όγκωμα το οποίο εμφανίζεται στην 7^η εβδομάδα κύησης. Στη 12^η εβδομάδα, τα ηπατοκύτταρα

αρχίζουν να παράγουν και να εκκρίνουν χολή, η οποία φτάνει στο δωδεκαδάκτυλο μέσω του ηπατικού, κυστικού και χοληδόχου πόρου⁴⁴. Το ηπατικό ένζυμο γ-γλουταμινική τρανσφεράση (γ-GT) εκκρίνεται από τη χοληδόχο κύστη και μεταφέρεται μέσω του πεπτικού σωλήνα στο αμνιακό υγρό. Τα επίπεδά της αρχίζουν να ανεβαίνουν στην αρχή του δευτέρου τριμήνου και μειώνονται μετά τις 20 εβδομάδες της κύησης, πιθανώς λόγω υπερτονικότητας του πρωκτικού σφιγκτήρα⁴⁴.

Μεταξύ της 16^{ης} και 18^{ης} εβδομάδας η εμβρυική χοληδόχος κύστη μπορεί να απεικονιστεί με κολπικό υπέρηχο στο 99% των περιπτώσεων⁴⁵. Όταν η χοληδόχος κύστη δεν μπορεί να απεικονιστεί (1: 1000)^{46, 47}, η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει μεμονωμένη ατρησία χοληδόχου κύστης,⁴⁸ εξω-ηπατική ατρησία χοληφόρων^{49,50}, κυστική ίνωση^{51,52}. Τη χειρότερη πρόγνωση από όλα έχει η εξω-ηπατική ατρησία χοληφόρων η οποία είναι πολύ σπάνια (1:20000) και είναι η κύρια αιτία μεταμόσχευσης ήπατος στην παιδική ηλικία⁴⁷.

Επίπεδα γ-GT κάτω από την 5^η εκατοστιαία θέση μπορεί να είναι ένδειξη ανωμαλίας διάπλασης του χοληφόρου δέντρου⁵³. Οι μελέτες που έχουν καταλήξει σε αυτό το συμπέρασμα έχουν μικρό αριθμό περιστατικών. Άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα γ-GT είναι η κυστική ίνωση λόγω μειωμένης κινητικότητας του εντέρου και απόφραξης του τελικού ειλεού και οι χρωμοσωμιακές ανωμαλίες κυρίως η τρισωμία 13⁵⁴. Υψηλά επίπεδα γ-GT σχετίζονται με στένωση δωδεκαδακτύλου, ατρησία οισοφάγου και χρωμοσωμιακές ανωμαλίες⁵³.

Υπάρχουν μελέτες οι οποίες έχουν αποδείξει πως τα επίπεδα ινσουλίνης και λεπτίνης διαφέρουν σημαντικά στο δεύτερο τρίμηνο σε φυσιολογικές κυήσεις και σε κυήσεις που έχουν επιπλεχθεί με σακχαρώδη διαβήτη της κύησης⁵⁵. Τα επίπεδα των ορμονών αυτών καθώς και άλλων ορμονών που προέρχονται από το πάγκρεας, είναι περίπου ίδια στη μητρική κυκλοφορία και στο αμνιακό υγρό⁵⁶. Έχουν γίνει μελέτες οι οποίες εξετάζουν την υπόθεση αν η γλυκόζη του αμνιακού υγρού που ελήφθη κατά τη διάρκεια της αμνιοπαρακέντησης στο δεύτερο τρίμηνο μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα του βάρους γέννησης νεογνού και της διάρκειας της κύησης με αντίθετα αποτελέσματα τόσο σε υγιείς γυναίκες όσο και σε γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη^{57, 58}.

Έχουν επιπλέον μελετηθεί και άλλες πεπτικές ορμόνες από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 στην κυκλοφορία της μητέρας και στο αμνιακό υγρό τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε κυήσεις διαβητικών γυναικών⁵⁹. Για παράδειγμα, το ανασταλτικό γαστρικό πεπτίδιο βρέθηκε πως είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα στο

αμνιακό υγρό γυναικών με σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Η ορμόνη αυτή βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο αμνιακό υγρό σε σχέση με την εμβρυική κυκλοφορία⁵⁶.

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και το σελήνιο είναι τα ιχνοστοιχεία που έχουν μελετηθεί περισσότερο στο αμνιακό υγρό στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης. Τα επίπεδά τους παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια της κύησης. Λόγω του γεγονότος ότι τα ιχνοστοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στις ενζυμικές καταλυτικές αντιδράσεις, μείωση των συγκεντρώσεών τους αυξάνουν τα επίπεδα των παραγώγων οξειδωσης λιπαρών οξέων όπως η μαλονο-διαλδεύδη⁶⁰.

ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Υπάρχουν μελέτες που εξετάζουν την ύπαρξη ανοσοσφαιρινών στο αμνιακό υγρό στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης, έχοντας ως κύριο ρόλο την προστασία του εμβρύου με τη δράση τους ως ανοσολογικός φραγμός. Ο βασικός ισότυπος που υπάρχει στο αμνιακό υγρό είναι η IgG. Η IgA βρίσκεται σε μικρότερα επίπεδα ενώ η IgM βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μέχρι την 35^η εβδομάδα και στη συνέχεια αυξάνεται. Εξάλλου οι ανοσοσφαιρίνες αυτές έχουν ανιχνευτεί στα εμβρυϊκά ούρα, οπότε είναι εύκολα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο καταλήγουν στο αμνιακό υγρό. Εκτός από τον προστατευτικό τους ρόλο στις λοιμώξεις, έχει προταθεί ο ρόλος τους κατά των αυτό-αντισωμάτων που προέρχονται από τη μητέρα⁶¹.

Τα υδατοδιαλυτά συστατικά των ομάδων αίματος A, B και H, υπάρχουν στο αμνιακό υγρό από την 9^η -24^η εβδομάδα της κύησης.

ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μικρά ποσά έμμεσης χολερυθρίνης μπορούν να ανιχνευτούν φυσιολογικά στο αμνιακό υγρό. Συνήθως οι τιμές αυτές αυξάνονται μέχρι την 27^η εβδομάδα και στη συνέχεια μειώνονται προοδευτικά πλησιάζοντας προς το τέλος της κύησης. Σε γυναίκες οι οποίες είναι Rh ευαισθητοποιημένες, τα επίπεδα της χολερυθρίνης αυξάνονται σημαντικά. Οι μετρήσεις γίνονται στο υλικό που λαμβάνουμε από την αμνιοπαρακέντηση με

φασματομετρική εργαστηριακή μέθοδο και με βάση αριθμητικά μοντέλα και γραφικές παραστάσεις, μας δίνουν στοιχεία για το βαθμό της αιμόλυσης.

Η προέλευση της χολερυθρίνης στο αμνιακό υγρό σε υγιείς, ανεπίπλεκτες κυήσεις δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Η συγκέντρωσή της καθορίζεται πρώτον από τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης στο αίμα του εμβρύου και δεύτερον από το λόγο αλβουμίνης αμνιακού υγρού/εμβρυϊκού αίματος. Μεταξύ των πέντε πιο πιθανών οδών μέσω των οποίων θα μπορούσε η χολερυθρίνη να φτάσει στο αμνιακό υγρό (εμβρυϊκοί νεφροί, πνεύμονες, δέρμα, πεπτικός σωλήνας, μεταφορά μέσω μεμβρανών), η τελευταία είναι η μόνη η οποία είναι συμβατή με τους λόγους χολερυθρίνης αμνιακού υγρού/εμβρυϊκού αίματος και γι αυτό το λόγο είναι η πιο σημαντική οδός μεταφοράς⁶².

ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Η ανίχνευση στεροειδών ορμονών στο αμνιακό υγρό και οι συγκεντρώσεις τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων. Τα προϊόντα του μεταβολισμού που οφείλονται στην ανεπάρκεια της 21- υδροξυλάσης μπορούν να ανιχνευτούν στο αμνιακό υγρό ή εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κύτταρα για ανάλυση DNA του γονιδίου CYP21B και των γονιδίων που ρυθμίζουν τα αντιγόνα του C4 και των HLA τάξεως I και II. Η αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χορήγηση συνθετικών κορτικοειδών στη μητέρα από τη στιγμή που θα γίνει η διάγνωση του νοσήματος⁶³.

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσο αφορά την προέλευση της προλακτίνης που ανιχνεύεται στο αμνιακό υγρό. Κάποια ποσότητα παράγεται από τον πλακούντα, κάποια από τη μητρική υπόφυση και κάποια από την εμβρυϊκή υπόφυση. Ο ρόλος της φαίνεται να είναι η ρύθμιση του όγκου του αμνιακού υγρού μαζί με άλλους παράγοντες επηρεάζοντας παράγοντες που δρουν στην αντλία Na και H₂O. Επίσης έχουν γίνει μελέτες που συσχέτισαν την προλακτίνη του αμνιακού υγρού με τον πρόωρο τοκετό χωρίς να βρεθεί κάποια στατιστικά σημαντική σχέση⁶⁴. Η προλακτίνη έχει πιθανώς δράσεις παρόμοιες με την ACTH και την αυξητική ορμόνη στο έμβρυο και βοηθά τόσο στην αύξηση του μεγέθους του όσο και στην ωρίμανση του νευρικού συστήματος και το συντονισμό των διαφόρων λειτουργιών.

AFP (α -ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ)

Η α -εμβρυϊκή πρωτεΐνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 69000 Da, παρόμοιο με αυτό της αλβουμίνης. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τους βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4. Στην αρχόμενη κύηση παράγεται από τον λεκιθικό ασκό ενώ στη συνέχεια παράγεται από το εμβρυϊκό ήπαρ. Η μέγιστη συγκέντρωσή της παρατηρείται στο τέλος του πρώτου τριμήνου. Στη συνέχεια η συγκέντρωσή της μειώνεται με σταθερό ρυθμό, ενώ μετά τις 30 εβδομάδες μειώνεται με πολύ γρήγορο ρυθμό. Στην κυκλοφορία του εμβρύου η συγκέντρωση της AFP είναι 200 φορές μεγαλύτερη από ότι στο αμνιακό υγρό μέσω των εμβρυϊκών ούρων.

Όταν ένα έμβρυο πάσχει από ελλείμματα του νευρικού σωλήνα, οι εκτεθειμένες μεμβράνες και οι επιφάνειες των αγγείων, επιτρέπουν στην AFP να τις διαπερνά, να βρίσκεται στο αμνιακό υγρό και στη συνέχεια στον ορό της μητέρας. Έχει διατυπωθεί η θεωρία πως η αύξηση είναι ανάλογη με το μέγεθος του ελλείμματος. Όταν το έλλειμμα καλύπτεται από δέρμα, η συγκέντρωση της AFP είναι σχεδόν φυσιολογική. Μεγάλες συγκεντρώσεις παρατηρούνται και σε περιπτώσεις συγγενών ανωμαλιών του εγκεφάλου για παράδειγμα ολοπροσεγκεφαλία. Το ίδιο συμβαίνει και στα ελλείμματα του κοιλιακού τοιχώματος (ομφαλοκήλη ή γαστροσχισση), σε βλάβες της πειραματικής διήθησης και σε επιμόλυνση του αμνιακού υγρού με εμβρυϊκό αίμα κατά τη διάρκεια της αμνιοπαρακέντησης.

Η AFP χρησιμοποιείται ως μέθοδος screening για το σύνδρομο Down στον ορό της μητέρας. Η εξέταση γίνεται σε ηλικία κύησης 15-18 εβδομάδες σε συνδυασμό με άλλους βιοχημικούς δείκτες, και η χαμηλές τιμές συνδέονται με Τρισωμία 21. Το τριπλό τεστ, όπως αυτό είναι γνωστό, έχει ευαισθησία μόλις 60% για τη διάγνωση του συνδρόμου Down. Η συγκέντρωση της AFP στο αμνιακό υγρό δεν έχει μεγάλη ειδικότητα για τις ανατομικές ανωμαλίες του νευρικού συστήματος, ενώ η λήψη του αμνιακού υγρού για τον προσδιορισμό της τιμής της συνοδεύεται από όλες τις επιπλοκές της αμνιοπαρακέντησης. Αυτές οι συγγενείς ανωμαλίες διαγιγνώσκονται κυρίως με υπερηχογραφική εξέταση και η AFP χρησιμοποιείται μόνο βοηθητικά ⁶⁵.

ΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΕΣ

Στη βιοχημική διάγνωση των ελλειμμάτων του νευρικού σωλήνα, βασικό ρόλο παίζει η ηλεκτροφόρηση των χολινεστερασών του αμνιακού υγρού. Οι χολινεστεράσες είναι μία ομάδα ενζύμων που περιλαμβάνει την

βουτυρυλοχολινεστεράση, η οποία φυσιολογικά ανιχνεύεται στον ορό και το αμνιακό υγρό και την ακετυλοχολινεστεράση η οποία βρίσκεται ειδικά στο νευρικό ιστό αλλά δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα στο αμνιακό υγρό. Αυτά τα δύο ένζυμα έχουν ειδικό και εντελώς διαφορετικό μοτίβο ηλεκτροφόρησης. Η ακετυλοχολινεστεράση έχει μια ταχέως κινούμενη μπάντα ενώ η βουτυρυλοχολινεστεράση έχει μια βραδέως κινούμενη μπάντα ηλεκτροφόρησης. Όταν ένα έμβρυο έχει ελλείμματα του νευρικού σωλήνα, η ακετυλοχολινεστεράση είναι παρούσα σε συνδυασμό με τη βουτυρυλοχολινεστεράση και έτσι το μοτίβο της ηλεκτροφόρησης χαρακτηρίζεται από δύο μπάντες. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα της εξέτασης είναι αποτέλεσμα τεχνικών artifact ενώ το τεστ έχει καλή ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική προγνωστική αξία⁶⁶.

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ

Η εγκυμοσύνη είναι μια περίοδος η οποία χαρακτηρίζεται από πολλές αλλαγές στο ανοσολογικό σύστημα της μητέρας. Η εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου πρέπει να γίνει ανεκτή από τη μητέρα ενώ παράλληλα διατηρούνται οι ανοσολογικές αντιδράσεις που προστατεύουν τη μητέρα και το έμβρυο από τις λοιμώξεις καθώς και οι απαραίτητες ανοσολογικές τροποποιήσεις για την ανάπτυξη των ιστών και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Όπως είναι αναμενόμενο, υπάρχουν αρκετές διαφορές μεταξύ της ανοσολογικής απάντησης του εμβρύου και του ενήλικα. Σε απάντηση των βακτηριακών λιποπολυσακχαριδών, τα εμβρυϊκά μονοκύτταρα (τα οποία έχουν συλλεγεί από τον ομφάλιο λώρο), παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ιντερλευκινών IL- 6, IL-10 και IL-23 αλλά μικρότερες ποσότητες IL-1β, IL-12 και TNF-α σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ενήλικα^{67, 68, 69}).

Η IL-23 είναι μέλος της οικογένειας κυτοκινών της IL-12. Και οι δύο κυτοκίνες μοιράζονται μια κοινή υποομάδα, την p40. Επίσης, κάθε μία έχει ξεχωριστή υποομάδα: η IL-12 την p35 και η IL-23 την p19⁷⁰. Η μειωμένη παραγωγή της IL-12 από τα εμβρυϊκά κύτταρα φαίνεται να οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει σε λάθη κατά την κωδικοποίηση του γονιδίου για την p35. Αυτή η ανεπάρκεια κατά τη σύνθεση μπορεί να σχετίζεται με την μειωμένη παραγωγή του ρυθμιστικού παράγοντα της ιντερφερόνης (IRF-3), ο οποίος παίζει ρόλο στην παραγωγή της p35⁶⁴. Σε αντίθεση, η παραγωγή της p19 είναι ανεξάρτητη από την παρουσία της IRF-3. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του κυκλικού AMP που υπάρχουν στον ομφάλιο λώρο επίσης

αυξάνουν την παραγωγή της IL-23⁷¹. Η IL-6, η οποία παράγεται μετά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, βοηθά την έκφραση του υποδοχέα της IL-23⁷². Η IL-12 προάγει την παραγωγή της (IFN)- γ μέσω των CD4 λεμφοκυττάρων και των κυττάρων natural killers.

Οι μικροοργανισμοί που αναγνωρίζονται πιο συχνά στο αμνιακό υγρό είναι τα διάφορα είδη μυκοπλάσματος και κάποια μικρόβια που ανήκουν στη χλωρίδα του κόλπου. Η ανοσία που προάγεται μέσω της IL-23, κινητοποιεί με αποτελεσματικό τρόπο την άμυνα των ουδετερόφιλων κατά του μικρού αριθμού αυτών και άλλων μικροοργανισμών οι οποίοι επιτυχώς διαπερνούν το φραγμό των αμνιακών μεμβρανών. Εάν για κάποιο λόγο γίνει αθρόα είσοδος των μικροοργανισμών στην αμνιακή κοιλότητα ή οι μικροοργανισμοί που εισέρχονται είναι ανθεκτικοί στην ανοσία μέσω των ουδετερόφιλων, αυτό θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF- α και IL-1 β και συνεπώς στην ενεργοποίηση πρόωρου τοκετού⁷³.

Παρόλο που η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων που πυροδοτείται από την IL-23 είναι αναμφίβολα ωφέλιμη για την εμβρυική βιωσιμότητα ως αντιμικροβιακός μηχανισμός «επιτήρησης», η υπερβολική παραγωγή ουδετερόφιλων και η παραγωγή ελευθέρων ριζών, πρωτεασών και άλλων τοξικών μορίων είναι βλαπτικά για το έμβryo. Ο μηχανισμός με τον οποίο μειώνεται η δραστηριότητα της IL-23 στην αμνιακή κοιλότητα έχει μελετηθεί⁷⁴ και δίνονται πιθανές εξηγήσεις για τον τρόπο με τον οποίο εξισορροπούνται οι διάφορες δράσεις.

Όπως προαναφέρθηκε, τα εμβρυικά και τα νεογνικά κύτταρα ρυθμίζουν αυξητικά την παραγωγή της IL-23 ενώ μειώνουν την παραγωγή της IL-12. Αυτός ο εκλεκτικός μηχανισμός υποβοηθά την άμυνα μέσω των ουδετερόφιλων κατά των εξω-κυττάρων παθογόνων. Αν και αυτή η λειτουργία είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων στην αμνιακή κοιλότητα, η απότομη και ραγδαία ανοσολογική απάντηση των ουδετερόφιλων μπορεί να είναι μη ωφέλιμη για την καλή κατάσταση του εμβρύου. Εξάλλου, η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων είναι ένας από τους βασικούς συντελεστές της πρώιμης πρόωρης ρήξης υμένων και κατά συνέπεια του πρόωρου τοκετού. Πρόσφατα βρέθηκε πως το αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο περιέχει μια πρωτεΐνη η οποία εκλεκτικά δεσμεύει την IL-23 αλλά όχι την IL-10, την IL-12 ή τον TNF- α ⁷⁰. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η σύνθεση της πρωτεΐνης αυτής. Ανεξάρτητα από το εάν είναι ένας διαλυτός υποδοχέας IL-23 ή ένα αντίσωμα κατά της IL-23, η παρουσία της παρέχει ένα προστατευτικό μηχανισμό ο

οποίος περιορίζει την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων στην αμνιακή κοιλότητα. Ως τώρα δεν είναι γνωστό εάν η δραστηριότητα ποικίλει ανάλογα με την εθνικότητα ή με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή είναι μειωμένη σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού και πρώιμης πρόωρης ρήξης μεμβρανών.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-6 στο αμνιακό υγρό σε γυναίκες με συμπτώματα πρόωρου τοκετού είναι από τους πιο ευαίσθητους δείκτες του επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού ανθεκτικού στην τοκόλυση⁷⁵. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση πως η IL-6 δρα ως διαμεσολαβητής φλεγμονής και πυροδοτεί τον μηχανισμό συσπάσεων της μήτρας. Όμως αυτό μπορεί να μην είναι η πραγματικότητα. Πειράματα που έγιναν σε πιθήκους έδειξαν πως παρά την έγχυση IL-6 στην αμνιακή κοιλότητα, δεν προκλήθηκαν συμπτώματα πρόωρου τοκετού⁷⁶. Επιπλέον, αν και τα επίπεδα IL-6 του αμνιακού υγρού στο δεύτερο τρίμηνο βρίσκονται στα ίδια επίπεδα σε γυναίκες που γέννησαν τελειόμηνα έμβρυα και σε γυναίκες με πρόωρο τοκετό, η ενδογενής έκκλιση IL-6 από καλλιεργημένο-*ex vivo* αμνιακό υγρό βρέθηκε πως είναι σημαντικά υψηλότερη σε γυναίκες με τελειόμηνη κύηση⁷⁷. Υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση της IL-6 με τον TNF-α και την IL-1β και με αυτόν τον τρόπο βοηθά στην μείωση των στοιχείων της ενδογενούς φλεγμονής.

Όπως και η IL-23, η παραγωγή της IL-6 σε απάντηση στους μικροβιακούς παράγοντες είναι υψηλότερη στο έμβρυο και το νεογνό από ότι στον ενήλικα μέσω των μονοκυττάρων⁶⁴ και αυτό μπορεί να συσχετιστεί στα υψηλότερα επίπεδα c AMP και αδενοσίνης⁷⁸. Οι δράσεις της IL-6 επιτυγχάνονται με δύο τρόπους. Στην κλασική οδό, η IL-6 ενώνεται με τον υποδοχέα της που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης gp130 και την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων. Εναλλακτικά, η IL-6 μπορεί να ενωθεί με μια διαλυτή μορφή του υποδοχέα της και αυτό το σύμπλεγμα μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη επιφάνειας gp130. Με αυτό τον τρόπο, ακόμα και τα κύτταρα που δεν έχουν υποδοχέα της IL-6 στην κυτταρική μεμβράνη μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από τη δράση της IL-6. Η ενεργοποίηση της δεύτερης οδού μπορεί να μπλοκαριστεί από την ένωση του διαλυτού υποδοχέα επιφάνειας με τη διαλυτή μορφή της gp130. Σε πολύ πρόσφατες μελέτες, έχει ανιχνευτεί διαλυτή μορφή gp130 και υποδοχέα IL-6 σε αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης και παρατηρήθηκε πως ο λόγος gp130/ IL-6 είναι σημαντικά αυξημένος σε γυναίκες οι οποίες τελικά εμφανίζουν πρόωρη πρώιμη ρήξη μεμβρανών⁷⁹.

Η IL-10 είναι μια αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη που προέρχεται από τα Τ-βοηθητικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος⁸⁰. Εμποδίζει τις ανοσολογικές αντιδράσεις κυτταρικού τύπου αναστέλλοντας την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα Τ-βοηθητικά 1 κύτταρα όπως TNF-a, IL-1β και IL-12 ενώ παράλληλα προάγει την έναρξη της ανοσολογικής απάντησης μέσω αντισωμάτων. Τα Τ-βοηθητικά 1 κύτταρα επίσης απελευθερώνουν IL-10 ως ένα αυτορρυθμιστικό μηχανισμό για την πρόληψη της παραγωγής υπέρμετρης ποσότητας προ-φλεγμονωδών κυτοκινών⁸¹. Η εμβρυική και νεογνική παραγωγή IL-10 είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των κυττάρων του ενήλικα.

Ο TNF-a είναι πρωτογενής κυτοκίνη η οποία δημιουργεί το αρχικό ερέθισμα για την για την ακολουθία των γεγονότων που καταλήγουν στον πρόωρο τοκετό⁸². Ο TNF-a προάγει επίσης την απόπτωση κυττάρων από τον πλακούντα⁸³. Η βιολογική δραστηριότητα του TNF-a αρχίζει με τη συνένωσή του με έναν από τους δύο υποδοχείς του στην κυτταρική μεμβράνη. Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί, αρχίζουν να λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες απόπτωσης και η παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών⁸⁴. Σε μελέτη που έχει γίνει, χρησιμοποιήθηκε αμνιακό υγρό που συλλέχθηκε κατά τον τοκετό σε τελειόμηνες ή μη κύσεις, παρατηρήθηκε πως το 96-99% όλων των δειγμάτων ήταν θετικά για διαλυτό υποδοχέα 1 TNF-a και το 99% όλων των δειγμάτων ήταν θετικά για τον διαλυτό υποδοχέα 2 TNF-a⁸⁵. Δεν υπήρχε κάποια σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης στο αμνιακό υγρό των δύο υποδοχέων και του πρόωρου τοκετού. Παρόλα αυτά, με βάση τις γενετικές διαφορές στα επίπεδα του TNF-a μεταξύ των περιπτώσεων πρόωρου τοκετού σε γυναίκες ευρωπαϊκής καταγωγής και σε γυναίκες από τη μαύρη φυλή, οι συγγραφείς διατύπωσαν την υπόθεση πως οι διαφορές στο μοριακό βάρος του διαλυτού υποδοχέα εξηγούν τουλάχιστον εν μέρει τις διαφορές στο ποσοστό του πρόωρου τοκετού μεταξύ των δύο ομάδων.

Οι ιστόνες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με το χρωμοσωμιακό DNA. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει πως αρκετές ιστόνες και ιδιαίτερα η ιστόνη H2B μπορεί να βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα και σε εξωκυττάρια υγρά όπου παίζουν σημαντικό αντιμικροβιακό ρόλο⁸⁶. Έχει βρεθεί πως η ικανότητα των εξωγενών λιπο-πολυσακχαριτών να προάγουν την παραγωγή TNF-a από τα αμνιοκύτταρα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση ιστόνης H2B στο αμνιακό υγρό⁸⁷. Αμνιακό υγρό που συλλέχθηκε από 20 γυναίκες με τελειόμηνες κύσεις χωρίς συμπτώματα τοκετού βρέθηκε ότι περιέχουν 250 ± 67 ng/ml ιστόνης

H2B ενώ αμνιακό υγρό που συλλέχθηκε από γυναίκες με κύηση 15-19 εβδομάδων, βρέθηκε πως περιέχει μια μέση συγκέντρωση ιστόνης H2B 341 ng/ml⁸⁸. Χάρη στις αντιμικροβιακές λειτουργίες τους, οι ιστόνες μπορούν να σχηματίσουν ένα φραγμό και να εμποδίσουν την είσοδο παραγόντων φλεγμονής μέσω των μεμβρανών στην αμνιακή κοιλότητα.

Η γκελσολίνη, είναι μια κυτταροπλασματική και εξωκυττάρια πρωτεΐνη που προσελκύει τα νημάτια της ακτίνης και με αυτό τον τρόπο βοηθά στη χημειοτακτική αντίδραση ενώ εμποδίζει την το σχηματισμό θρόμβων ακτίνης από τραυματισμένους ιστούς στα αγγεία⁸⁹. Επιπλέον, η γκελσολίνη συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με το λιπο-πολυσακχαριδικό τμήμα των βακτηρίων και είναι αγωνιστικός αναστολέας της πρωτεΐνης που συνδέεται με τους λιπο-πολυσακχαρίδες⁹⁰. Η παρουσία της γκελσολίνης πρόσφατα αναγνωρίστηκε στο αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο από 40 γυναίκες που ήρθαν σε επαφή με λιπο-πολυσακχαρίδες από την *Escherichia coli*⁹¹. Μεγαλύτερης ακόμα σημασίας είναι η παρατήρηση πως η παραγωγή TNF-α από πρόσφατα συλλεχθέν αμνιακό υγρό καλλιεργημένο *ex vivo* με την παρουσία των λιπο-πολυσακχαριδών, είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση γκελσολίνης αμνιακού υγρού. Επιπλέον, η καλλιέργεια αμνιακού υγρού με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-γκελσολίνης οδηγεί σε απελευθέρωση TNF-α μέσω λιπο-πολυσακχαριδών. Αντίθετα, η παραγωγή IL-10 είναι ανεξάρτητη από τα ενδο-αμνιακά επίπεδα της γκελσολίνης.

Η απελευθέρωση νουκλεοτιδίων αδενοσίνης σε σημεία φλεγμονής οδηγεί στην μετατροπή τους από εξω-νουκλεάσες σε εξωκυτταρική αδενοσίνη. Στη συνέχεια, η ενδοκυττάρια τριφοσφορική αδενοσίνη μετατρέπεται σε διφωσφορική και αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση ελεύθερης αδενοσίνης. Η αδενοσίνη συνδέεται στους υποδοχείς της στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων/μακροφάγων και T- λεμφοκυττάρων, αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP(cAMP) και αναστέλλει ισχυρά την έκλυση κυτοκινών μέσω υποδοχέων^{92, 93}. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση της αδενοσίνης στον ορό των εμβρύων είναι σχεδόν 20 φορές μεγαλύτερη από αυτές στον ορό του ενήλικα. Επιπλέον, η ικανότητα του εμβρυικού ορού να αναστέλλει την παραγωγή TNF-α μέσω των περιφερικών μονοκυττάρων, ελαττώθηκε σημαντικά όταν προστέθηκε απαμινάση της αδενοσίνης, ένα ένζυμο που μη- αναστρέψιμα αποδομεί την αδενοσίνη στο εμβρυικό πλάσμα. Παρόμοιες παρατηρήσεις αναφέρθηκαν πρόσφατα από δείγματα αμνιακού υγρού στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης⁹⁴. Η ικανότητα των κυττάρων του αμνιακού υγρού από

καλλιέργειες *ex vivo* να απελευθερώνουν TNF-α αυξήθηκε από 0.9 σε 7.3 pg/ml ($p=0.001$) εάν στο καλλιεργητικό μέσο είχε προστεθεί απαμινάση της αδενοσίνης. Αυτό το εύρημα, το οποίο συνάδει με παρατηρήσεις που έγιναν στον ορό των νεογνών, αποδεικνύει πως η αδενοσίνη περιέχεται στο αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα είναι το γεγονός ότι η παραγωγή TNF-α μέσω της απαμινάσης της αδενοσίνης είναι ανάλογη με τον αριθμό των τοκετών που έχει μια γυναίκα. Καθώς ο τοκετός έχει πρόσφατα αποδειχτεί πως έχει ως αποτέλεσμα τον εποικισμό μικροοργανισμών στην αμνιακή κοιλότητα⁹⁵, είναι πιθανό η αυξημένη παραγωγή TNF-α σε διαδοχικούς τοκετούς να είναι το αποτέλεσμα του αθροιστικού εποικισμού μικροβίων στην αμνιακή κοιλότητα μετά από κάθε τοκετό.

Άλλος ένας μηχανισμός που δίνει το έναυσμα για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, αποτελείται από το συνδετικό μόριο-πρωτεΐνη S100A12 και από υποδοχείς τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (Receptor for advanced glycation end-products RAGE). Η ένωση της S100A12 με τους RAGE οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του πυρηνικού παράγοντα B και την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή TNF-α και άλλων κυτοκινών⁹⁶. Διαλυτές μορφές RAGE,(soluble) sRAGE, έχουν επίσης αναγνωριστεί⁹⁷. Στο αμνιακό υγρό υγιών γυναικών χωρίς συμπτώματα πρόωρου τοκετού βρέθηκε ανιχνεύσιμη ποσότητα sRAGE⁹⁸. Η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλή στο δεύτερο τρίμηνο και αυξάνεται κατά 100 φορές σχεδόν κατά την 30^η εβδομάδα της κύησης. Η μέση συγκέντρωση των sRAGE στο αμνιακό υγρό σε τελειόμηνη κύηση είναι 16.5 ng/ml. Σε αντίθεση, η πρωτεΐνη S100A12 ανιχνεύτηκε μόνο στο αμνιακό υγρό γυναικών με συμπτώματα πρόωρου τοκετού ή σε γυναίκες με πρόωρη πρόιμη ρήξη μεμβρανών.

Τα ουδετερόφιλα και οι ουσίες που παράγουν έχουν θετικές και αρνητικές επιδράσεις στην εγκυμοσύνη. Εκτός από την IL-23, το αμνιακό υγρό και οι μεμβράνες έχουν επίσης ανιχνεύσιμες ποσότητες επιθηλιακού πεπτιδίου που ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα (epithelial neutrophil-activating peptide-78 ENA-78)⁹⁹. Το ENA-78 είναι συνδετικό μόριο για τον υποδοχέα των χυμοκινών οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων (CXCR2). Με αυτό τον τρόπο τα ουδετερόφιλα προσελκύονται στις μεμβράνες και στο αμνιακό υγρό. Αν και η συγκέντρωση του ENA-78 είναι αυξημένη σε περιπτώσεις ενδομήτριας λοίμωξης, η παρουσία του σε υγιείς κύσεις είναι μια ένδειξη ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο και στις υγιείς κύσεις. Μπορεί να περιλαμβάνει την παραγωγή κάποιων ουσιών από

τα ουδετερόφιλα οι οποίες είναι ανιχνεύσιμες στο αμνιακό υγρό και συμμετέχουν ενεργά στην αντιμικροβιακή προστασία (ουδετεροφιλικές defensins 1-3, bacterial/permeability-increasing protein BPI)¹⁰⁰.

ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΙΚΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΣΤΑ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ

Το ελεύθερο εμβρυϊκό (cell-free fetal) νουκλεϊκό οξύ στα βιολογικά υγρά της μητέρας είναι μια ξεχωριστή μορφή εμβρυϊκού γενετικού υλικού, τα οποία έχουν γίνει αντικείμενο εντατικής έρευνας όσο αφορά τη μη-επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Η παρουσία τους στο αίμα της μητέρας αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1989¹⁰¹, ενώ σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοριακοί διαγνωστικοί δείκτες και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ως μη-επεμβατική μέθοδος για τον καθορισμό του φύλου και του παράγοντα rhesus¹⁰². Επιπλέον, έχει μελετηθεί η παρουσία και η φυσιολογία της δεοξυπιβονουκλεάσης I στο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια της κύησης και του τοκετού¹⁰³. Έχουν γίνει προσπάθειες για την ανίχνευση ελεύθερων εμβρυϊκών νουκλεϊκών οξέων και σε άλλα μητρικά βιολογικά υγρά όπως στο αμνιακό υγρό¹⁰⁴, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό¹⁰⁵ και τα ούρα¹⁰⁶. Η μελέτη του γενετικού υλικού στο αμνιακό υγρό μας δίνουν την ευκαιρία να εξερευνήσουμε τις δυνατότητες του προγεννητικού ελέγχου ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων καθώς και άλλων μονογονιδιακών νοσημάτων.

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΗΚΩΝΙΟΥ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ

Τα τελευταία τριάντα χρόνια, η ευρεία διαθεσιμότητα και χρήση των μέσων παρακολούθησης της εμβρυϊκής δυσχέρειας όπως το υπερηχογράφημα, το καρδιοτοκογράφημα, τα Doppler, η παλμική οξυμετρία και το βιοφυσικό προφίλ έχουν αλλάξει σημαντικά το πεδίο της μαιευτικής παρακολούθησης και αντιμετώπισης των συμβαμάτων κατά τη διάρκεια του τοκετού^{107, 108}. Πριν υιοθετηθούν τα μέσα αυτά στην καθημερινή κλινική πράξη, η παρακολούθηση της κατάστασης του εμβρύου περιοριζόταν στην περιοδική ακρόαση των εμβρυϊκών παλμών καθώς και στην αξιολόγηση του αμνιακού υγρού¹⁰⁹. Η παρουσία μηκωνίου στα αμνιακό υγρό θεωρούνταν ανέκαθεν ένας σημαντικός αρνητικός δείκτης στην αξιολόγηση της κατάστασης του εμβρύου¹¹⁰. Μετά από μελέτες παρατήρησης και πειραματικά δεδομένα, δημιουργήθηκε η θεωρία της εμβρυϊκής υποξίας συσχετιζόμενης με αποβολή μηκωνίου στο αμνιακό υγρό. Οξέα συμβάματα υποξίας οδηγούν σε διέγερση του παρασυμπαθητικού αυτόνομου νευρικού συστήματος στον

πεπτικό σωλήνα του εμβρύου, ακολουθούμενη από ανώριμες, σχετιζόμενες με το στρες κινήσεις του εντέρου και απελευθέρωση του μηκωνίου στο αμνιακό υγρό¹¹¹. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η μεγάλη πλειοψηφία των νεογνών που γεννιούνται με κεγχρωσμένο αμνιακό υγρό, δεν εμφάνισαν επιπλοκές ούτε βραχυπρόθεσμες ούτε μακροπρόθεσμες¹¹². Υπάρχουν αρκετές μελέτες για τα βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα της ύπαρξης μηκωνίου στο αμνιακό υγρό, με τις περισσότερες από αυτές να δείχνουν μια θετική σχέση με χαμηλό Apgar-score και μειωμένες τιμές pH ομφαλίου λώρου^{113, 114} ενώ άλλες δεν αποδεικνύουν κάποια σχέση¹¹⁵.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΞΩΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η μελέτη της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας μας έχει δώσει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για τη μεταβολική δραστηριότητα του πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης καθώς και για τους μηχανισμούς που συνδέονται με την παθοφυσιολογία της παλίνδρομης κύησης και την πιθανή εφαρμογή θεραπευτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση σημαντικών παθολογικών καταστάσεων του εμβρύου.

Το υγρό του εξωεμβρυϊκού χώρου, έχει χαμηλότερο pH, διττανθρακικά και πρωτεΐνη από το φλεβικό αίμα της μητέρας, ενώ αντίθετα έχει μεγαλύτερη μερική πίεση CO₂, γαλακτικών και μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φώσφορο από τον ορό της μητέρας. Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν με μεταβολική αναερόβια οξέωση η οποία οφείλεται κυρίως στη συγκέντρωση στο χώρο αυτό των προϊόντων μεταβολισμού του πλακούντα²⁵. Ως συνέπεια της αναπνευστικής αλκάλωσης της κύησης, η νεφρική απέκκριση των διττανθρακικών αυξάνεται αντιρροπιστικά και το pH του αίματος της μητέρας μένει σταθερό. Εκτός από τις ολικές πρωτεΐνες και τη συγκέντρωση των γαλακτικών κατιόντων, δεν υπάρχει σημαντική διακύμανση στη βιοχημική σύσταση του υγρού του εξωεμβρυϊκού χώρου στις 7-11 εβδομάδες της κύησης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η οξεοβασική ισορροπία του εξωεμβρυϊκού χώρου πιθανώς δεν επηρεάζεται άμεσα από τις αλλαγές στην φυσιολογία της μητέρας.

Η αγγειογένεση και η εγκατάσταση της μητρο-πλακουντιακής κυκλοφορίας στην αρχόμενη κύηση ρυθμίζεται από μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων και μορίων. Δύο από αυτά, ο παράγοντας ανάπτυξης του πλακούντα (PlGF, placental growth factor) και η διαλυτή μορφή του υποδοχέα flt-1 του παράγοντα ανάπτυξης ενδοθηλίου (VEGF, sFlt-1), έχουν μελετηθεί ως πιθανοί δείκτες για την ανάπτυξη προεκλαμψίας και ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης. Σε έρευνα που έγινε για τα επίπεδα των ορμονών αυτών στον ορό, εξωεμβρυϊκό και αμνιακό υγρό γυναικών στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, βρέθηκε ότι η κατανομή τους συμφωνεί με την προέλευσή τους και τις αναφερόμενες αλλαγές στην τάση του οξυγόνου στο πλακουντιακό περιβάλλον στην αρχόμενη κύηση¹¹⁶.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, το εξωεμβρυϊκό υγρό έχει κίτρινο χρώμα και έχει μεγαλύτερο ιξώδες από το αμνιακό υγρό, το οποίο είναι πάντα διαυγές. Αυτό οφείλεται κυρίως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών του εξωεμβρυϊκού υγρού από το αμνιακό υγρό. Έχει βρεθεί ότι στις 6-12 εβδομάδες της κύησης, η μέση συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών είναι 18 φορές μικρότερη από ότι στον ορό της μητέρας αλλά 54 φορές υψηλότερη από ότι στο αμνιακό υγρό¹⁷. Πιο

συγκεκριμένα, η συγκέντρωση σχεδόν όλων των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη στο εξωεμβρυϊκό υγρό -από 2 έως και 50 φορές- ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που μελετάται (Πίνακας 1). Ουσίες με μικρό μοριακό βάρος όπως η ουρία μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη συνεπώς είναι αναμενόμενο να μην υπάρχει σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις μεταξύ των διαμερισμάτων του σάκου της κύησης και του ορού της εγκύου (Πίνακας 1). Ουσίες με ελαφρώς μεγαλύτερο μοριακό βάρος όπως η κρεατινίνη, εμφανίζουν κάποια διαφορά συγκέντρωσης. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν πως η μεταφορά ουσιών μεταξύ της μεμβράνης που διαχωρίζει την αμνιακή και την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα, έχει διάφορους περιορισμούς.

Υπάρχει μία αύξηση της συγκέντρωσης των περισσότερων πρωτεϊνών στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου. Αυτό μπορεί να αποδοθεί από την αργή ανανέωση του υγρού αυτού καθώς και από την αύξηση της παραγωγής πρωτεΐνης από τα εμβρυϊκά όργανα. Εν αντιθέσει, υπάρχει φυσιολογικά μια μείωση στις ολικές πρωτεΐνες ορού της μητέρας, η οποία συμβαίνει ειδικά στο πρώτο τρίμηνο, και φτάνει σε μείωση από 10 έως 14% από τις τιμές τη μη-εγκύου. Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορό της εγκύου μειώνεται, αντανακλώντας αύξηση του όγκου αίματος και αιμο-αραίωση, ενώ η συγκέντρωση των σφαιρινών και του ινωδογόνου παρουσιάζει αύξηση τόσο σε σχετική όσο και σε απόλυτη τιμή. Σε αυτό το διάστημα, η ποσότητα των ολικών πρωτεϊνών και της προ-αλβουμίνης αυξάνουν στο εξω-εμβρυϊκό υγρό ενώ η αλβουμίνη δεν αλλάζει σημαντικά²⁴. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του κεφαλο-ουραίου μήκους (CRL), του μεγέθους του λεκιθικού ασκού (yolk sac) και στη συγκέντρωση πρωτεϊνών στον εξωεμβρυϊκό χώρο μεταξύ γυναικών με χαμηλές τιμές προ-αλβουμίνης ορού και γυναικών με υψηλές τιμές. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο χώρο αυτό δεν επηρεάζεται άμεσα από αλλαγές στη συγκέντρωση πρωτεϊνών στο πλάσμα της εγκύου κατά το πρώτο τρίμηνο.

Πίνακας 1. Συγκέντρωση συστατικών που έχουν μελετηθεί στο αμνιακό, το εξωεμβρυϊκό υγρό και τον ορό κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης.

Solutes	MC mean	EEC mean	AF mean	MC/EEC	AF/EEC	MC/AF	n	GA
17 α -Hydroxyprogesterone, nmol/l	16	33.3	12.8	-52.0	-61.6	20.0	12	8-12
545 endothelin, pg/ml	25.4	9.7	8.2	61.8	-15.5	67.7	15	7-12
α -Fetoprotein, kIU/l	1.4	21.8	27.09	-93.6	19.5	-94.8	30	8-14
Arginine, μ mol/l	54	204	65.0	-73.5	-68.1	-16.9	17	7-11
Aspartic acid, μ mol/l	12	6	5.0	50.0	-16.7	58.3	17	7-11
Cobalamin, ng/ml	427	3,162	589	-86.5	-81.4	-27.5	22	9-12
Cortisol, nmol/l	441.7	33.3	28.3	92.5	-15.0	93.6	12	8-12
Cotinine, ng/ml	72	108	99.00	-33.3	-8.3	-27.3	23	7-11
Dihydrotestosterone sulfate, μ mol/l	5	0.9	0.9	82.0	0.0	82.0	12	8-12
Estradiol, pg/ml	4,448	26,978	5,083	-83.5	-81.2	-12.5	25	5-7
Glucose, mmol/l	3.4	2.7	2.8	20.6	3.6	17.6	55	7-14
Glycine, μ mol/l	175	251	202.0	-30.3	-19.5	-13.4	17	7-11
Histidine, μ mol/l	75	170	80.00	-55.9	-52.9	-6.3	17	7-11
IGF-1, μ g/l	233	41	38	82.4	-7.3	83.7	21	6-12
IGFBP-2, μ g/l	123	167	49	-26.3	-70.7	60.2	21	6-12
Inhibin B, pg/ml	5.94	24.32	6.3	-75.6	-74.1	-5.9	23	8-10
Inulin, mg/ml	6.9	4.8	3.10	30.4	-35.4	55.1	9	8-11
Isoleucine, μ mol/l	51	101	50.0	-49.5	-50.5	2.0	17	7-11
Lactoferrin, μ mol/l	49	2	2	95.9	0.0	95.9	36	7-13
Leucine, μ mol/l	104	221	120.0	-52.9	-45.7	-13.3	17	7-11
MCP-1, pg/ml	142.6	151.5	337.3	-5.9	55.1	-57.7	27	8-11
Ornithine, μ mol/l	48	112	50.0	-57.1	-55.4	-4.0	17	7-11
Phenylalanine, μ mol/l	55	130	70.00	-57.7	-46.2	-21.4	17	7-11
Potassium, mmol/l	4.1	3.8	3.5	7.3	-7.9	14.6	30	5-13
Serine, mmol/l	126	116	60.0	7.9	-48.3	52.4	17	7-11
Sodium, mmol/l	135.9	130.9	127.1	3.7	-2.9	6.5	30	5-13
T ₄ , nmol/l	145	0.96	0.9	99.3	-9.4	99.4	6-12	6-12
Taurine, μ mol/l	92	191	110.0	-51.8	-42.4	-16.4	17	7-11
Threonine, μ mol/l	124	289	160.0	-57.1	-44.6	-22.5	17	7-11
Tryptophan, μ mol/l	30	29	15	3.3	-48.3	50.0	17	7-11
Valine, μ mol/l	174	403	220.0	-56.8	-45.4	-20.9	17	7-11

Έχει μελετηθεί η παρουσία και λειτουργία της έκφρασης των πρωτεϊνών Fas/FasL που παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία της απόπτωσης σε φυσιολογικές και παλίνδρομες κύσεις¹¹⁷. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδεικνύουν πως η έκφραση του συστήματος αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να είναι διαφορετικός στην αρχόμενη κύηση και η ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω του συστήματος Fas ενδεχομένως συνεισφέρει στο μηχανισμό της παλίνδρομης κύησης.

Η ανάπτυξη του εμβρύου εξαρτάται άμεσα από τη διαθεσιμότητα παροχής των αμινοξέων από τη μητέρα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Η λειτουργία της τροφοβλάστης για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και για την πρωτεϊνοσύνθεση, δημιουργεί υψηλές συγκεντρώσεις αμινοξέων στον πλακούντα και στο εμβρυϊκό αίμα στο δεύτερο ήμισυ της κύησης. Για αρκετά αμινοξέα έχει βρεθεί σημαντική θετική σχέση μεταξύ του πλάσματος της μητέρας και του πλακούντα, γεγονός που σημαίνει ότι η ενεργητική μεταφορά των αμινοξέων από τη συγκυτιοτροφοβλάστη συμβαίνει

ακόμα και από την 7^η εβδομάδα της κύησης¹¹⁸. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι η μεταφορά των περισσότερων αμινοξέων από το αίμα της μητέρας στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα είναι αντίθετη από την διαφορά των συγκεντρώσεων¹¹⁹. Αντίθετα, η κατανομή κάποιων συγκεκριμένων αμινοξέων στο εξωεμβρυϊκό και το αμνιακό υγρό συσχετίζονται, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ενός βαθμού παθητική διάχυση διαμέσου της αμνιακής μεμβράνης μόνο σε ουσίες οι οποίες έχουν μικρό μοριακό βάρος. Διαφορά συγκεντρώσεων μεταξύ εξωεμβρυϊκού χώρου και πλάσματος παρατηρείται για τα πιο πολλά αμινοξέα και συγκεκριμένα έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ του πλάσματος και του εξωεμβρυϊκού υγρού για τη συγκέντρωση του α-αμινοβουτυρικού οξέος, τυροσίνης, και ιστιδίνης, γεγονός που υποδεικνύει πως αυτά αμινοξέα μεταφέρονται πιο γρήγορα από τον πρώιμο πλακούντα.

Εκτός από τα αμινοξέα τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση πρωτεϊνών, υπάρχουν και άλλες ουσίες όπως οι βιταμίνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση βιοχημικών αντιδράσεων του μεταβολισμού. Για παράδειγμα η βιταμίνη E, η οποία είναι κυρίως λιποδιαλυτή, είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό του οργανισμού και παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της οξειδωσης των λιπιδίων στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες. Έχει μελετηθεί η συγκέντρωση και η μεταφορά κάποιων λιποδιαλυτών βιταμινών στο αμνιακό υγρό και την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης¹²⁰. Οι βιταμίνες A και E, ανιχνεύτηκαν στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε αντίθεση με το αμνιακό στο οποίο η συγκέντρωσή τους δεν μπορούσε να ανιχνευτεί. Όπως προαναφέρθηκε, το εξωεμβρυϊκό υγρό είναι ένα υπερδιήθημα από τις εκκρίσεις της τροφοβλάστης, του χορίου, του φθαρτοποιημένου ενδομητρίου και του πλάσματος της μητέρας. Τέτοιου είδους θρεπτικά συστατικά μπορούν να μεταφερθούν σε αυτό μέσω του δευτερογενούς λεκιθικού ασκού και του αλλαντοειδούς πόρου. Εξάλλου, μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι ο φθαρτός περιέχει ρετινόλη και πρωτεΐνες δέσμευσης ρετινόλης¹²¹. Λόγω του ότι οι βιταμίνες αυτές είναι λιποδιαλυτές, μεταφέρονται στο περιβάλλον του εξωεμβρυϊκού χώρου και του πλάσματος της μητέρας δεσμευμένες με πρωτεΐνες μεταφοράς. Η βιταμίνη A δεσμεύεται από τη πρωτεΐνη μεταφοράς της ρετινόλης και η βιταμίνη E, όπως η χοληστερόλη, μεταφέρεται από λιποπρωτεΐνες. Το γεγονός ότι ο λόγος βιταμίνη E/χοληστερόλη είναι παρόμοιος στο πλάσμα της μητέρας και στο εξωεμβρυϊκό υγρό, δείχνει πως η μειωμένη συγκέντρωση της βιταμίνης E μπορεί να οφείλεται από μειωμένη ικανότητα μεταφοράς της. Πιθανώς και οι συγκεντρώσεις

της πρωτεΐνης δέσμευσης της ρετινόλης είναι επίσης μικρότερες στο εξωεμβρυϊκό υγρό από ότι στο πλάσμα. Η παρατήρηση πως η συγκέντρωση των βιταμινών στο εξωεμβρυϊκό υγρό είναι υψηλότερες από αυτές του αμνιακού υγρού, συνάδουν με προηγούμενα στοιχεία σύμφωνα με τα οποία η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι πολύ μικρότερες στο αμνιακό υγρό από ότι στο εξωεμβρυϊκό. Η υπερ-βιταμίνωση Α μπορεί να προκαλέσει εμβρυοτοξικά και τερατογόνα αποτελέσματα όπως παλίνδρομη κύηση, καταρράκτης, ανωμαλίες ουροποιογεννητικού, λαγόχειλος και λυκόστομα και ανεγκεφαλία. Δεν υπάρχουν τεκμηριωμένες βλάβες στο έμβρυο από την υπερ-βιταμίνωση Ε.

Μόρια όπως οι θυροειδικές ορμόνες, οι ανοσοσφαιρίνες (Ig), παράγοντες συμπληρώματος, η ρηλαξίνη και ο σίδηρος δεν συντίθενται από την εμβρυοπλακουντιακή μονάδα κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου αλλά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Αυτά τα μόρια είναι ανιχνεύσιμα στο εξωεμβρυϊκό υγρό, πιθανώς από τη φάση που σχηματίζονται οι τριτογενείς λάχνες. Συγκεκριμένα, η θυροξίνη (T4) και η τρι-ιωδοθυρονίνη (rT3) έχουν βρεθεί σε δείγματα εξωεμβρυϊκού υγρού, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι θυροειδικές ορμόνες είναι πιθανώς διαθέσιμες στο έμβρυο ακόμα από την 5^η εβδομάδα της κύησης¹²². Άλλο ένα αντίστοιχο παράδειγμα είναι οι ανοσοσφαιρίνες. Ίχνη IgG και IgM έχουν βρεθεί μόνο σε κυτταροκαλλιέργειες από εμβρυϊκό ήπαρ και σπλήνα στο τέλος του τρίτου τριμήνου, ενώ η σύνθεση της IgA έχει αποδειχτεί *in vitro* μόνο μετά τις 30 εβδομάδες της κύησης από το 1969¹²³. Μόνο πολύ μικρές ποσότητες από IgG και IgM έχουν ανιχνευθεί στο αίμα των νεογνών στη 12-14^η εβδομάδα της κύησης. Η συγκέντρωση της ανοσοσφαιρίνης IgG, συμπεριλαμβανομένης και της IgG σφαιρίνης για το *Toxoplasma gondii*, τον κυτταρομεγαλοϊό και τον ιό της ερυθράς, καθώς και η ανοσοσφαιρίνη IgA, είναι ανιχνεύσιμες σε δείγματα εξωεμβρυϊκού υγρού από την 6^η εβδομάδα της κύησης ενώ η IgM δεν είναι¹²⁴. Τα στοιχεία αυτά μας δείχνουν ότι η μεταφορά των IgG και των IgA μορίων μέσω του πλακούντα ξεκινά από τις πρώτες εβδομάδες της κύησης. Οι ανοσοσφαιρίνες αυτές στο εξωεμβρυϊκό υγρό πιθανώς έχουν κάποια συμμετοχή στην αντιγονική απάντηση των πρόδρομων μορφών των κυττάρων του αίματος σε κάθε πρώιμη συγγενή λοίμωξη. Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία, η μεταφορά του σιδήρου μέσω του πλακούντα έχει αποδειχθεί από την 7^η εβδομάδα της κύησης ενώ σίδηρος έχει βρεθεί να συναθροίζεται στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα¹²⁵. Η κατανομή του σιδήρου και των σιδηροδεσμευτικών

πρωτεϊνών στα διάφορα διαμερίσματα του σάκου της κύησης δεν έχει σημαντική διαφορά μεταξύ των τριμήνων της κύησης.

Η τροφοβλάστη παράγει μια ποικιλία από ειδικές πρωτεΐνες όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG), πλακουντιακό γαλακτογόνο (hPL), ακτιβίνη A ή ινχιμπίνη τα οποία εκκρίνονται και στα διαμερίσματα του σάκου και στην κυκλοφορία της μητέρας (Πίνακας 1). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των μορίων αυτών στο εξω-εμβρυικό υγρό, σε σχέση με τον ορό της μητέρας, μπορούν να αποδοθούν στη στενή ανατομική σχέση που υπάρχει μεταξύ του εξω-εμβρυικού χώρου και της τροφοβλάστης, καθώς οι δύο αυτές δομές διαχωρίζονται από χαλαρό μεσεγγυματικό ιστό⁷. Εξαιρέση σε αυτό αποτελεί η πρωτεΐνη PAPP-A, της οποίας θεωρητικά η σύνθεση γίνεται από τον χοριακό ιστό, παρόλα αυτά βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ορό της μητέρας από ότι στο υγρό της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας¹²⁶. Εκτός από τη χρήση της ως βιοχημικός δείκτης πρώτου τριμήνου για το screening των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε υγιείς¹²⁷ και μη γυναίκες¹²⁸, έχει μελετηθεί η σχέση της πρωτεΐνης PAPP-A με το βάρος γέννησης του νεογνού^{129,130}, την υπερέμεση κύησης¹³¹, την πλακουντοποίηση και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης¹³², την προεκλαμψία¹³³ με ποικίλα αποτελέσματα. Η συγκέντρωση της ελεύθερης α-HCG και ελεύθερης β-HCG είναι 185 και 33 φορές μεγαλύτερη αντίστοιχα στον εξωεμβρυϊκό χώρο σε φυσιολογικές κυήσεις από ότι στο πλάσμα της μητέρας¹³⁴. Με βάση τις τιμές αυτές, μπορούμε να πούμε ότι στο πρώτο τρίμηνο, υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή της α-υποομάδας της χοριακής γοναδοτροφίνης από ότι της β-υποομάδας στην τροφοβλάστη¹³⁵ και επιβεβαιώνει το ότι η κάθαρση της ορμόνης αυτής είναι πιο αργή στον εξωεμβρυϊκό χώρο από ότι στο πλάσμα.

Είναι πιθανό ότι η χοριακή γοναδοτροπίνη ορού στον ορό της μητέρας, επηρεάζεται τόσο από τη σύνθεση της ορμόνης αυτής στις λάχνες όσο και από τη σύνθεση στην τροφοβλάστη. Οι συγκεντρώσεις της χοριακής γοναδοτροπίνης στο εξωεμβρυϊκό υγρό, επηρεάζονται μόνο από την παραγωγή από τις τροφοβλαστικές λάχνες, αφού η εξωεμβρυϊκή κοιλότητα περιβάλλεται εξολοκλήρου από λάχνες. Έχοντας υπόψη ότι ο χώρος αυτός έχει πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ελεύθερης α-HCG και ότι η ελεύθερη α-HCG μπορεί να διεγείρει την έκκριση της προλακτίνης του φθαρτού *in vitro*¹³⁶, είναι πιθανό ότι αυτή η υψηλή συγκέντρωση κάποιων ορμονών του πλακούντα στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα έχει ρυθμιστική επίδραση στην ενδοκρινική λειτουργία της μητρο-πλακουντιακής μονάδας. Σε αντίθεση με το πλάσμα της μητέρας, οι συγκεντρώσεις της ολικής HCG καθώς και της α-HCG στον

εξωεμβρυϊκό χώρο μειώνονται προοδευτικά από τις 8-12 εβδομάδες της κύησης ενώ οι τιμές της β -HCG δεν έχουν σημαντικές διακυμάνσεις¹³⁴. Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και η προγεστερόνης επίσης μειώνονται στο εξωεμβρυϊκό υγρό μεταξύ της 8^{ης} και της 12^{ης} εβδομάδας της κύησης ενώ το αντίθετο συμβαίνει στο πλάσμα της μητέρας. Αυτές οι αλλαγές στη συγκέντρωση των ορμονών στον εξωεμβρυϊκό χώρο, πιθανώς να οφείλονται στη μείωση της επιφάνειας ανταλλαγής ουσιών, καθώς τα δύο τρίτα του πρωτογενούς ιστού του πλακούντα αρχίζουν να αποδομούνται κατά τον τρίτο μήνα της κύησης¹⁷. Η μείωση της συγκέντρωσης στην ολική HCG και στην ελεύθερη α -HCG στο εξω-εμβρυϊκό υγρό όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία κύησης μπορεί να οφείλεται δευτερογενώς και στη μείωση των διαφοροποιημένων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, καθώς και στην εξαφάνιση των δύο τρίτων του πλακουντιακού ιστού η οποία συμβαίνει την ίδια περίοδο. Σε μετρήσεις που έγιναν σε δείγματα από γυναίκες στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, στον ορό, το αμνιακό και το εξωεμβρυϊκό υγρό, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της HCG μεταξύ του αμνιακού (διάμεση τιμή 6.3 U/ml; εύρος 1.6-310.0 U/ml) και του εξωεμβρυϊκού υγρού (διάμεση τιμή 400.0 U/ml; εύρος 135.0-2250.0 U/ml) ($p < 0.001$; Mann-Whitney U-test)¹³.

Εκτός από το αμνιακό υγρό, η παρουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA έχει μελετηθεί από την 7^η εβδομάδα της κύησης στον εξωεμβρυϊκό χώρο, το αμνιακό υγρό και τον ορό από κυήσεις με άρρενα έμβρυα¹³⁷. Η κατανομή του στα διαμερίσματα της κύησης παρέχουν στοιχεία πως η πιθανή προέλευση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στην κυκλοφορία της μητέρας είναι η τροφοβλάστη. Όσο αφορά τον προγεννητικό έλεγχο των χρωμοσωμάτων με τη παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας, έχει εφαρμοστεί η τεχνική FISH (fluorescence in situ hybridization) με πολύ θετικά αποτελέσματα από τις 7 εβδομάδες της κύησης¹³⁸. Η πληροφορία του γενετικού υλικού που μπορεί να εξαχθεί από την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και για τεστ πατρότητας¹³⁹.

Μόρια όπως η βιταμίνη B12, η προλακτίνη και η πλακουντιακή πρωτεΐνη 14 (PP14), είναι γνωστό ότι παράγονται από τον φθαρτό. Συχνά βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο εξωεμβρυϊκό υγρό από ότι στο πλάσμα της μητέρας. Μπορούμε λοιπόν να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει επικοινωνία μεταξύ του φθαρτού και τις κοιλότητες του σάκου της κύησης διαμέσου των λαχνών της τροφοβλάστης. Ο μηχανισμός αυτός βοηθά στο να παρέχονται στο έμβρυο τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξή του πριν αναπτυχθεί πλήρως η κυκλοφορία

μέσω των λαχνών. Ουσίες όπως οι insulin-like growth factors (IGFs) και πρωτεΐνες μεταφοράς τους (IGFPs), είναι επίσης σημαντικές στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και παράγονται από διάφορους ιστούς της μητέρας και του εμβρύου. Οι συγκεντρώσεις του IGF-I και II είναι υψηλές στο πλάσμα της μητέρας ενώ είναι χαμηλές στο αμνιακό και εξωεμβρυϊκό υγρό¹⁴⁰. Οι συγκεντρώσεις IGFBP-1 είναι υψηλότερες στο εξωεμβρυϊκό υγρό από το πλάσμα της μητέρας και το αμνιακό υγρό και έχουν σημαντική συσχέτιση με την ηλικία κύησης. Ανάλυση φωσφορυλιωμένων μορφών των IGFBP-1 δείχνουν σαφείς διαφορές μεταξύ της φωσφορυλίωσης των IGFBP-1 μεταξύ των διαμερισμάτων του σάκου της κύησης και του πλάσματος με το πλάσμα να περιέχει κυρίως τις φωσφορυλιωμένες μορφές και το εξωεμβρυϊκό υγρό να περιέχει σχεδόν αποκλειστικά τις μη- φωσφορυλιωμένες μορφές. Αυτά τα ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις του IGF-II και η απουσία των ανασταλτικών φωσφορυλιωμένων μορφών των IGFBP-1 στο εξωεμβρυϊκό υγρό, μπορούν πιθανώς να ευνοούν τη μιτωτική δραστηριότητα των στοιχείων του πρώιμου εμβρυϊκού σάκου¹⁴⁰.

Υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε πρωτεΐνες οι οποίες θεωρητικά παράγονται από την τροφοβλάστη και η επιβεβαίωση της προέλευσης τους από τις συγκεντρώσεις στα διαμερίσματα στην αρχόμενη κύηση. Η πρωτεΐνη ADAM-12, η οποία παράγεται από τον πλακούντα, έχει μελετηθεί ως δείκτης για τρισωμία 21 και 18, την προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Η κατανομή της στα διαμερίσματα της αρχόμενης κύησης και στον ορό, έχει επιβεβαιώσει την προέλευσή της από τη συγκυτιοτροφοβλάστη¹⁴¹. Η λεπτίνη, η οποία παράγεται εκτός κύησης από τα λιποκύτταρα, κατά τη διάρκεια της κύησης παράγεται επιπλέον και από τον πλακούντα. Σε μελέτη που έγινε σε δείγματα εξωεμβρυϊκού, αμνιακού υγρού και ορού, σε φυσιολογικές και παλίνδρομες κυήσεις, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση στο εξωεμβρυϊκό υγρό, είναι 4 φορές υψηλότερη από τον ορό¹⁴², γεγονός που επιβεβαίωσε τη συμβολή του πλακούντα στην παραγωγή της λεπτίνης.

Το ενδοδερμικό στρώμα του δευτερογενούς λεκιθικού ασκού, είναι γνωστό ότι συνθέτει αρκετές πρωτεΐνες του πλάσματος μαζί με το εμβρυϊκό ήπαρ, όπως η α-φετοπρωτεΐνη (AFP), α1-αντιθρυψίνη, αλβουμίνη, προ-αλβουμίνη και τρανσφερρίνη^{143, 144}. Εκτός από σπάνιες περιπτώσεις, η σύνθεση από τις περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες γίνεται στα διαμερίσματα του σάκου της κύησης και η συμβολή του λεκιθικού ασκού στις συγκεντρώσεις αυτών τους στο πλάσμα είναι πολύ περιορισμένη. Αυτό το γεγονός μπορεί να εξηγήσει γιατί οι

συγκεντρώσεις τους είναι πάντα υψηλότερες στο αμνιακό και το εξωεμβρυϊκό υγρό από ότι στο πλάσμα. Η AFP παράγεται επίσης και από το εμβρυϊκό ήπαρ από την 6^η εβδομάδα της κύησης έως τον τοκετό έχοντας υψηλό μοριακό βάρος (± 70 kDa) και αντίθετα από τη HCG, έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωσή της είναι παρόμοια και στα δύο διαμερίσματα που χωρίζει η αμνιακή μεμβράνη (Πίνακας 1). Σε αναλύσεις χρησιμοποιώντας την κονκαναβαλίνη A η οποία έχει μοριακή συγγένεια με την AFP, υπάρχουν ενδείξεις ότι και στο αμνιακό αλλά και στο εξωεμβρυϊκό υγρό, τα μόρια της AFP προέρχονται κυρίως από τον λεκιθικό ασκό ενώ η AFP του πλάσματος προέρχεται κυρίως από το εμβρυϊκό ήπαρ¹⁷. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως ο ανθρώπινος δευτερογενής λεκιθικός ασκός έχει αποκρινείς λειτουργίες και εκκρίνει AFP στα διαμερίσματα του σάκου της κύησης.

Ο πιθανός απορροφητικός ρόλος του λεκιθικού ασκού έχει μελετηθεί σε έρευνες οι οποίες εξετάζουν την κατανομή των πρωτεϊνών και ενζύμων μεταξύ του εξωεμβρυϊκού υγρού και του λεκιθικού ασκού ή συγκρίνοντας τη συνθετική ικανότητα του δευτερογενούς λεκιθικού ασκού, του εμβρυϊκού ήπατος και του πλακούντα για τη HCG και την AFP²³. Η κατανομή των πρωτεϊνών που παράγονται ειδικά από τον πλακούντα και η χοριακή γοναδοτροπίνη του λεκιθικού ασκού και του εξωεμβρυϊκού υγρού, καθώς και η απουσία έκφρασης mRNA της HCG στον λεκιθικό ασκό, μας δίνουν τις πρώτες ενδείξεις για τη λειτουργία απορρόφησης ουσιών από αυτόν. Οι ομοιότητες μεταξύ της σύστασης του λεκιθικού ασκού και του εξωεμβρυϊκού υγρού, αποτελούν ενδείξεις πως υπάρχει ελεύθερη διακίνηση για τα περισσότερα μόρια μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων διαμέσου των μεμβρανών που τα διαχωρίζουν. Ο ανατομικός σχηματισμός που καθορίζει τον λεκιθικό ασκό περιέχει πεπτικά ένζυμα τα οποία δεν υπάρχουν στον εξωεμβρυϊκό χώρο αλλά υπάρχουν -και σε αυξανόμενες ποσότητες καθώς προχωράει η κύηση- στην αμνιακή κοιλότητα. Συνεπώς παρατηρούμε ότι η μεμβράνη του λεκιθικού ασκού είναι σημαντική ζώνη μεταφοράς μεταξύ των διαμερισμάτων του σάκου της κύησης και ότι η κύρια ροή των διαφόρων μορίων συμβαίνει προς την αμνιακή κοιλότητα και το λεκιθικό ασκό, για παράδειγμα από την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα προς την αμνιακή μεμβράνη και τελικά στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Στη συνέχεια, μετά τη δέκατη εβδομάδα της κύησης, τα κυτταρικά στοιχεία του τοιχώματος του δευτερογενή λεκιθικού ασκού αρχίζουν να υποστρέφουν οπότε αυτή η οδός μεταφοράς ουσιών δεν είναι πλέον λειτουργική και οι περισσότερες ανταλλαγές ουσιών μεταξύ της

εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και της εμβρυϊκής κυκλοφορίας γίνονται στο επίπεδο της χοριοϊκής πλάκας.

Εκτός από την έμμεση μελέτη του μεταβολισμού του πλακούντα και του εμβρύου, έχουν ερευνηθεί και οι άμεσες επιπτώσεις της παρακέντησης της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας στο καρδιαγγειακό σύστημα του εμβρύου, καταγράφοντας τον καρδιακό ρυθμό του εμβρύου πριν την επέμβαση και 1, 5 και 10 λεπτά μετά¹⁴⁵. Συμπερασματικά, η παρακέντηση του εξωεμβρυϊκού χώρου δεν έχει μείζονες επιπτώσεις στην καρδιακή συχνότητα του εμβρύου.

Είναι πολύ σημαντική η έρευνα που έχει γίνει στη συμβολή της παρακέντησης της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας στην πρόιμη διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών^{146, 147, 148}. Σε 26 κήσεις από τις οποίες έγινε παρακέντηση εξωεμβρυϊκού χώρου, στις 25 κατέστη δυνατή η απομόνωση πάνω από 30 κυττάρων και σε όλες ήταν δυνατή η μοριακή ανάλυση για αιμοσφαιρινοπάθειες, η παρουσία ή όχι των οποίων επιβεβαιώθηκε με λήψη χοριακών λαχνών ή αμνιοπαρακέντηση. Επίσης, έχει μελετηθεί η παρουσία λειτουργικών εμβρυϊκών μεγαλοβλαστών στον εξωεμβρυϊκό χώρο¹⁴⁹, δίνοντας περεταίρω δυνατότητες στη μελέτη του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος του εμβρύου.

ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΚΑΙ ΕΞΩΕΜΒΡΥΪΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Η σημασία των μηχανισμών ανταλλαγής ουσιών μεταξύ μητέρας και εμβρύου ήταν δύσκολο να αξιολογηθεί στο παρελθόν λόγω των προβλημάτων στην απεικόνιση και λήψη δειγμάτων από τον εξω-εμβρυικό χώρο και την αμνιακή κοιλότητα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Η έρευνα που έχει γίνει μέχρι σήμερα για διάφορες ουσίες στα υγρά αυτά, έχει δείξει πως ο εξωεμβρυϊκός χώρος δεν είναι ένα ανενεργό διαμέρισμα αλλά ένας χώρος στον οποίο συμβαίνουν πολύ σημαντικές ανταλλαγές συστατικών μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου. Οι μελέτες που υπάρχουν μέχρι σήμερα είναι περιγραφικές, δείχνοντας την ανάγκη για μελέτες όσο αφορά τις συγκεντρώσεις των διαφόρων ουσιών στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε σχέση με το φθαρτό, τον πλακούντα και τους εμβρυικούς ιστούς σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

Το εξωεμβρυϊκό υγρό μπορεί να συλλεχθεί και σε περιπτώσεις πρόσφατης παλινδρομής κύησης. Η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών είναι πολύ μικρή σε παλινδρομες κύσεις με προχωρημένη τροφοβλαστική νέκρωση ενώ η συγκέντρωση της HCG είναι πολύ χαμηλή μόνο όταν δεν υπάρχουν στοιχεία του σάκου της κύησης στην εξέταση με τον υπέρηχο¹⁵⁰. Φυσιολογικές ή χαμηλές τιμές AFP στον ορό (η οποία προέρχεται από το λεκιθικό ασκό κυρίως στις κύσεις στις οποίες δεν αναγνωρίζονται εμβρυικά στοιχεία στον υπέρηχο) μας παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις ότι η πιο πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι πολύ πρόωμη παλινδρόμηση του εμβρύου με παραμονή του πλακουντιακού ιστού¹⁵⁰. Συνεπώς, η συντριπτική πλειοψηφία των κύσεων που χαρακτηρίζονται ως σύνδρομο κενού σάκου, στην πραγματικότητα είναι το αποτέλεσμα πολύ πρόωμης παλινδρόμησης του εμβρύου. Το έμβρυο που έχει αναπτυχθεί τουλάχιστον για 14 ημέρες μετά την ωορρηξία ανταποκρίνεται στο στάδιο της εμβρυικής ζωής όπου ο δευτερογενής λεκιθικός ασκός αρχίζει να σχηματίζεται. Παρόμοιες μελέτες πρέπει να γίνουν έτσι ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητός ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει η πρόωμη παλινδρόμηση κύησης.

Η φυσιολογία του πλακούντα είναι πολύ δύσκολο να μελετηθεί *in vivo*. *In vitro* μοντέλα έχουν μελετηθεί εκτενώς και οι περισσότερες πληροφορίες έχουν συλλεχθεί από μελέτες σε πλακούντες τελειόμηνων κύσεων. Η παρουσία της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας μεταξύ του πλακούντα και του αμνιακού σάκου που περιέχει το έμβρυο, η παλινδρόμηση των δύο τρίτων του αρχικού πλακουντιακού ιστού και οι μεγάλες αλλαγές της μητρικής και της εμβρυικής κυκλοφορίας στο τέλος

του πρώτου τριμήνου, κάνουν τις συγκρίσεις μεταξύ της φυσιολογίας του πλακούντα στο πρώτο και στο τρίτο τρίμηνο σχεδόν αδύνατη. Η μοναδική ανατομική θέση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας, η οποία στα πρωτεύοντα είναι σε άμεση επαφή με το μεσέγχυματικό ιστό των χοριακών λαχνών, δίνει νέες δυνατότητες για να μπορέσουμε να αναπαράγουμε *in vivo* τα πειράματα αυτά που γίνονται μέχρι τώρα *in vitro*. Διάφοροι καθετήρες¹⁵¹ μπορούν να εισαχθούν στα διαμερίσματα του σάκου της κύησης κάτω από άμεση υπερηχογραφική παρακολούθηση, δίνοντάς μας έτσι τη δυνατότητα να αποκτήσουμε κάποια στοιχεία για τη φυσιολογία του πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης.

Η μεταφορά ουσιών διαμέσου του πλακούντα έχουν κυρίως μελετηθεί σε πειράματα σε ζώα όπως οι χοίροι και οι πίθηκοι, επειδή ιστολογικά ο πλακούντας τους μοιάζει πολύ με τον ανθρώπινο¹⁵². Στα κατώτερα σπονδυλωτά, ο λεκιθικός ασκός χρησιμεύει ως η βασική μεμβράνη μεταφοράς για ανταλλαγές ουσιών και μακρομορίων του πλακούντα. Πιο συγκεκριμένα, τα τροφτικά, έχουν πλακούντα που εξορμάται από το λεκιθικό ασκό, ο οποίος περιβάλλει πλήρως το έμβρυο σε όλη τη διάρκεια της κύησης και αποτελεί ως η κύρια πηγή λήψης πρωτεϊνών προς το έμβρυο. Λόγω της πολυπλοκότητας των πειραματικών συνθηκών στα πειραματόζωα καθώς και των εμβρυολογικών διαφορών μεταξύ του ανθρώπου και κάποιων ειδών, ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς ουσιών δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Παρόλα αυτά, η εκλεκτική αναρρόφηση υγρού από την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα έχει επίσης προσφέρει μια νέα προσέγγιση στη μελέτη της μεταφοράς φαρμάκων διαμέσου του πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο. Έως τώρα, αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι η διαπερατότητα του πλακούντα είναι πιο μεγάλη στο πρώτο τρίμηνο της κύησης από ότι στο τρίτο. Επιπλέον, η πολύ αργή ανανέωση των ουσιών του εξωεμβρυϊκού υγρού, στις οποίες εκτίθεται η μητέρα οδηγούν στην αυξημένη συγκέντρωσή τους στο διαμέρισμα αυτό¹⁵³. Αυτή η παρατεταμένη έκθεση σε διάφορες ουσίες όπως οι καρκινογόνες ουσίες του καπνού, έχει πολύ σημαντική τερατογόνο δράση και θα έπρεπε να μελετηθεί εκτενέστερα.

Η ΑΝΤΙΜΥΛΛΕΡΙΑΝΗ ΟΡΜΟΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

Η αντιμυλλεριανή ορμόνη (Anti-mullerian hormone, AMH), γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία και ως Mullerian Inhibiting Factor (MIF), ανήκει στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων TGF-β (transforming growth factor-β) και είναι μια διμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 140kDa¹⁵⁴. Άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των TGF εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και έχουν διάφορες βιολογικές επιδράσεις ανάλογα με την προέλευση τους και τα όργανα-στόχους. Αντίθετα, η αντιμυλλεριανή ορμόνη έχει ένα μοναδικό και αποδεδειγμένο ρόλο στη διαφοροποίηση του φύλου στα αρρενα έμβρυα. Παράγεται από τα εμβρυικά κύτταρα Sertoli την περίοδο του σχηματισμού των όρχεων και προάγει την υποστροφή των πόρων του Μύλλερ. Όταν η ορμόνη αυτή δεν υπάρχει, οι πόροι του Μύλλερ αναπτύσσονται και σχηματίζουν τμήμα των εσωτερικών γεννητικών οργάνων του θήλεος εμβρύου, δηλαδή τη μήτρα, τις σάλπιγγες και το άνω τριτημόριο του κόλπου¹⁵⁵.

Στις ωοθήκες των θήλεων εμβρύων, η αντιμυλλεριανή ορμόνη (AMH) έχει ανιχνευτεί από τις 36 εβδομάδες της κύησης^{156, 157}. Δεν υπάρχουν στοιχεία για την παραγωγή της AMH από τα πρωτογενή ωοθυλάκια. Σε μελέτες που έχουν γίνει με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, βρέθηκε ότι η παραγωγή της ορμόνης γίνεται στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξής τους¹⁵⁸. Περίπου το 75% των δευτερογενών ωοθυλακίων ήταν θετικά στον ανοσοφθορισμό και το πιο ισχυρό σήμα προερχόταν από προ-κοιλοτικά και μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια¹⁵⁹.

Η AMH έχει ανιχνευτεί στον ορό των γυναικών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας λόγω του ότι εξακολουθεί να παράγεται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια έως ότου φτάσουν στο στάδιο αυτό της διαφοροποίησης στο οποίο μπορούν να επιλεγούν ως επικρατούντα. Τα επίπεδα της ορμόνης διαφοροποιούνται ελάχιστα κατά τη διάρκεια του κύκλου, φτάνοντας στην υψηλότερή τους τιμή περίπου στη μέση του¹⁶⁰. Η συγκέντρωση της AMH μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου σε νεαρές γυναίκες χωρίς διαταραχές περιόδου και σχετίζεται με την ηλικία, τα επίπεδα της FSH και τον αριθμό των κοιλοτικών ωοθυλακίων¹⁶¹. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η AMH είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της «γήρανσης» των ωοθηκών¹⁶² και έχει χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και του ποσοστού

των γεννήσεων σε περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης^{163, 164, 165}. Οι διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση της ορμόνης κατά τη διάρκεια της κύησης σε υγιείς γυναίκες καθώς και η συγκέντρωση της στην περίοδο της λοχείας, έχουν μελετηθεί με αντίθετα αποτελέσματα^{166, 167, 168}.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Έχουν δημοσιευτεί μελέτες για τη διαφορά της συγκέντρωσης της AMH στον ορό σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της κύησης και σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της εμμηνου ρύσεως με σκοπό να διευκρινιστεί εάν υπάρχει και κάποια άλλη πηγή παραγωγής της AMH εκτός από την ωοθήκη στην κύηση με αντίθετα αποτελέσματα. Επίσης έχουν γίνει μελέτες φυσιολογικής κατανομής της PAPP-A και της β-HCG στα διαμερίσματα της αρχόμενης κύησης σε μικρό αριθμό ασθενών που υπεβλήθησαν σε παρακέντηση του εξωεμβρυϊκού χώρου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συγκέντρωσης της AMH στο εξωεμβρυϊκό και το αμνιακό υγρό καθώς και στον ορό γυναικών στο πρώτο τρίμηνο της κύησης δίνοντας έτσι επιπλέον στοιχεία για την παραγωγή της AMH κατά τη διάρκεια της κύησης. Επιπλέον γίνεται μελέτη της κατανομής της PAPP-A και της ελεύθερης β-HCG στο μεγαλύτερο μέχρι στιγμής δείγμα μελέτης για τις συγκεκριμένες ουσίες, έχοντας ως στόχο να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα που έχουν μέχρι τώρα δημοσιευτεί για τη φυσιολογία και την προέλευση τους.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς και πρωτόκολλο

Παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και/ή αμνιοπαρακέντηση έγινε συνολικά σε 56 γυναίκες με μονήρη κύηση από την 6^η ως τη 10^η εβδομάδα της κύησης.

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Οι ασθενείς προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ζητώντας διακοπή της κύησης για κοινωνικούς λόγους.

Κατά την πρώτη επίσκεψη των γυναικών, αφού έγινε η απαραίτητη κλινική εξέταση και διαπιστώθηκε η ηλικία κύησης, ακολούθησε λεπτομερής ενημέρωση για το σκοπό της παρούσας μελέτης και τον τρόπο με τον οποίο θα τελεστεί η επέμβαση. Από όλες τις γυναίκες που συμμετείχαν, ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση. Συνολικά προσεγγίστηκαν 190 γυναίκες από το 2006 έως το 2011 και συμφώνησαν στο να συμμετέχουν οι 56.

Σε 56 γυναίκες έγινε παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας πριν τη διακοπή της κύησης ενώ σε γυναίκες με ηλικία κύησης πάνω από 8 εβδομάδες, έγινε και παρακέντηση της αμνιακής κοιλότητας. Σε καμία γυναίκα δεν έγινε προετοιμασία του τραχήλου με προσταγλανδίνες. Τα δείγματα του ορού ελήφθησαν από τη μεσοβασιλική φλέβα ακριβώς πριν τη χορήγηση της γενικής αναισθησίας. Μετά τη φυγοκέντησή τους, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -30° C για περαιτέρω επεξεργασία.

Οι καταγραφόμενοι παράγοντες για κάθε γυναίκα ήταν τα προσωπικά της στοιχεία (ονοματεπώνυμο, ηλικία, επάγγελμα, διεύθυνση, τηλέφωνο), σωματομετρικά χαρακτηριστικά (βάρος-ύψος), έξεις (κάπνισμα-αλκοόλ), ηλικία κύησης κατά την πρώτη εξέταση, τόκος, ηλικία κύησης κατά τη διακοπή κύησης, κεφαλοουραίο μήκος (CRL) εμβρύου κατά τη διακοπή κύησης, ιστορικό αυτόματων ή τεχνητών εκτρώσεων καθώς και την ακριβή ποσότητα σε ml του ορού, αμνιακού και εξωεμβρυϊκού υγρού που συλλέχθηκε από κάθε ασθενή.

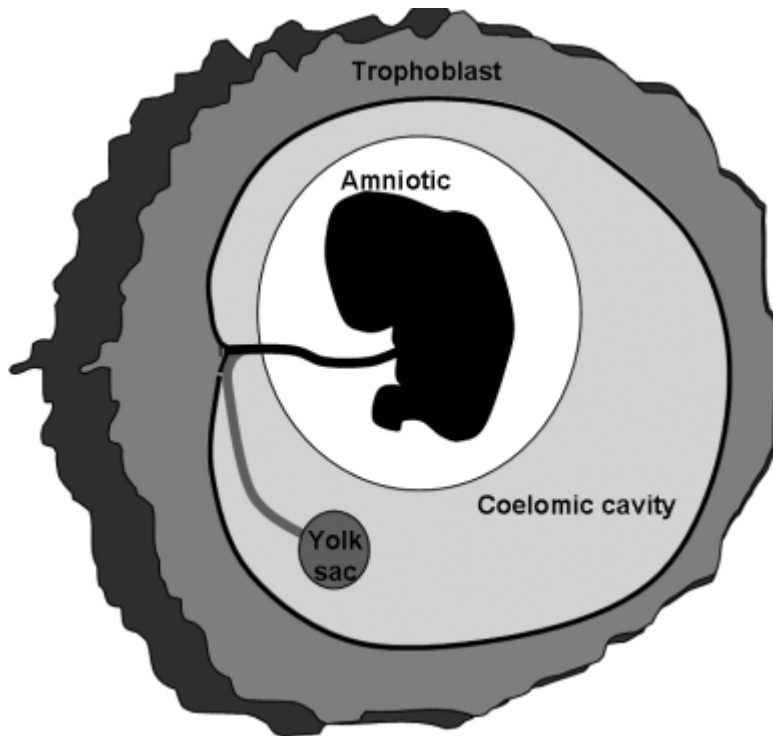
Έγινε μέτρηση των συγκεντρώσεων της αντιμυλλεριανής ορμόνης, της PAPP-A και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης στα δείγματα του ορού, εξωεμβρυϊκού και αμνιακού υγρού από όπου αυτό ήταν δυνατό.

Παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας

Μετά τη χορήγηση γενικής αναισθησίας και την τοποθέτηση της ασθενούς σε θέση λιθοτριψίας, έγινε επιμελής καθαρισμός των έξω γεννητικών οργάνων και του κόλπου με αντισηπτικό διάλυμα.

Στη συνέχεια, αφού έγινε κάλυψη της κεφαλής των 5 MHz του υπερήχου (General Electric) με αποστειρωμένο προφυλακτικό ακολούθησε λεπτομερής υπερηχογραφικός έλεγχος κατά τον οποίο προσδιορίστηκε η θέση του σάκου της κύησης, οι εμβρυϊκοί υμένες και το έμβρυο. Επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της καρδιακής λειτουργίας και έγινε μέτρηση του κεφαλοουραίου μήκους του εμβρύου (CRL).

Χρησιμοποιώντας ειδικό οδηγό προσαρμοζόμενο στην κεφαλή του υπερήχου, μια βελόνη 20G εισήχθη στην εξωεμβρυϊκή κοιλότητα κάτω από συνεχή υπερηχογραφική παρακολούθηση (Εικόνα 1). Ακολούθησε αναρρόφηση 1-2.5 ml εξωεμβρυϊκού υγρού ενώ τα πρώτα 0.2 ml πετάχθηκαν για να αποφευχθεί η μητρική επιμόλυνση. Αμέσως μετά, νέα βελόνη 20G εισήχθη δια μέσου του ειδικού οδηγού στην αμνιακή κοιλότητα και ακολούθησε αναρρόφηση του αμνιακού υγρού. Στη συνέχεια, ακολούθησε διακοπή κύησης με διαστολή του τραχηλικού στομίου και χρήση αναρροφητικού ξέστρου.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας. Η παρακέντηση γίνεται υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση με κοιλικό υπέρηχο.

Μέτρηση της αντιμυλλεριανής ορμόνης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αντιμυλλεριανής ορμόνης έγινε με τη μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας το USCNK ELISA kit E90228Hu (Life Science Inc. GmbH, Germany). Όλες οι διαδικασίες της μέτρησης έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα στάνταρ διαλύματα καθώς και τα αραιωμένα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις μέτρησης του kit τα οποία ήταν καλυμμένα με αντίσωμα ειδικό για την AMH. Στη συνέχεια αβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση προστέθηκε σε κάθε θέση και έγινε επώαση για 2 ώρες. Μετά τοποθετήθηκε διάλυμα TMB σε κάθε θέση του kit. Μόνο στις θέσεις όπου υπήρχαν δείγματα τα οποία περιείχαν AMH παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο χρώμα. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη οξέος και η αλλαγή του χρώματος μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. Η συγκέντρωση της AMH προσδιορίστηκε με βάση τη σύγκριση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε σχέση με τη στάνταρ καμπύλη. Η θεωρητική (αναλυτική) ευαισθησία της μεθόδου είναι 0.053 ng/ml , η ενδοαναλυτική (intra-assay) διακύμανση των τιμών του συντελεστή μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) για τις υψηλές τιμές ήταν

3% και η διαναλυτική (inter-assay) διακύμανση του coefficient of variation, CV για τις υψηλές τιμές ήταν 6.7%.

Η μέτρηση της αντιμυλλεριανής ορμόνης έγινε στα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά το διάστημα Φεβρουάριος- Μάρτιος 2011 για να εξασφαλιστεί η άριστη ποιότητα των δειγμάτων.

Μέτρηση της πρωτεΐνης PAPP-A και β-χοριακής γοναδοτροπίνης

Η μέτρηση της πρωτεΐνης PAPP-A και β-χοριακής γοναδοτροπίνης έγινε με τον αυτόματο αναλυτή KRYPTOR που χρησιμοποιείται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων για την επεξεργασία των δειγμάτων ορού στο screening πρώτου τριμήνου για χρωμοσωμιακές ανωμαλίες. Ο συγκεκριμένος αναλυτής έχει πιστοποιηθεί από το Fetal Medicine Foundation για τη χρήση του στο βιοχημικό screening πρώτου τριμήνου.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με μη-παραμετρικές μεθόδους περιγραφικής στατιστικής. Η σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων της αντιμυλλεριανής ορμόνης, της πρωτεΐνης PAPP-A και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης έγινε με το Wilcoxon test για να καθοριστεί η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των συγκεντρώσεων της AMH, PAPP-A και β-χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό, το αμνιακό και το εξωεμβρυϊκό υγρό. Το Pearson's r χρησιμοποιήθηκε για τις συσχετίσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέση ηλικία των γυναικών στη μελέτη μας ήταν 27 έτη (εύρος 18-40 έτη) και η μέση ηλικία κύησης στη χρονική στιγμή που ελήφθησαν τα δείγματα 8.5 εβδομάδες (εύρος 6.2-9.3). Η μέση τιμή του κεφαλοουραίου μήκους στη χρονική στιγμή τέλεσης της διακοπής κύησης ήταν 22.6 mm (εύρος 18.3-26.6). Το μέσο βάρος των γυναικών ήταν 65 kgf (εύρος 54-82) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των γυναικών που πήραν μέρος στη μελέτη.

N	ΗΛΙΚΙΑ	ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ		ΒΜΙ		ΤΟΚΟΣ			ΚΑΠΝΙΣΜΑ		CRL	
	Διάμεση Τιμή (Εύρος)	Διάμεση (Εύρος)	Τιμή (Εύρος)	Διάμεση (Εύρος)	Τιμή (Εύρος)	1	2	3	Ναι	Όχι	Διάμεση (Εύρος)	τιμή (Εύρος)
	27.5 (18-40)	8.5 (6.2-9.3)		22 (18.4-25)		12	30	14	23	33	22.6 (18.3-26.6)	

PAPP-A

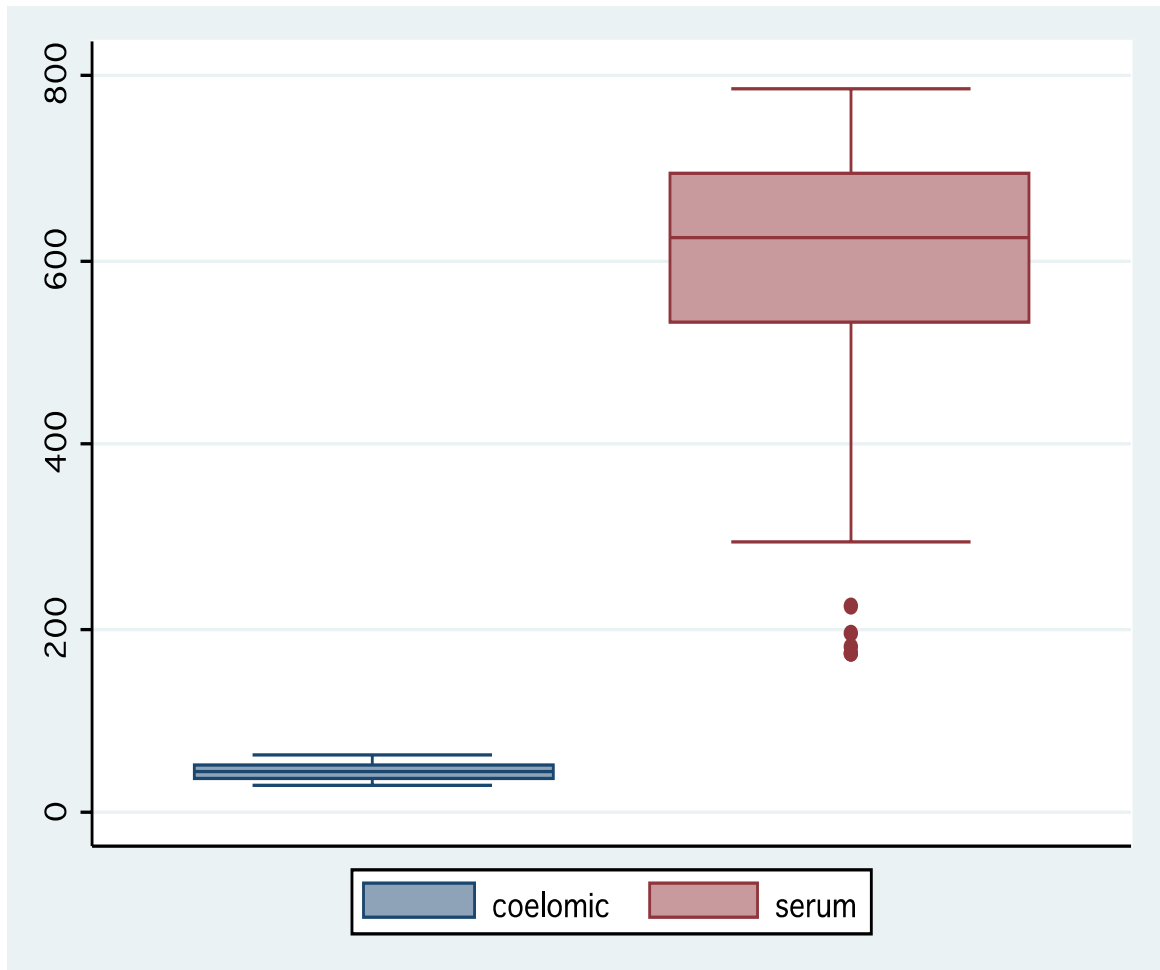
Η διάμεση συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό ήταν 624.75 mU/I (εύρος 173.3- 783.90), σημαντικά υψηλότερη από τη συγκέντρωσή της στο εξωεμβρυϊκό υγρό (διάμεση τιμή 45.06 mU/I, εύρος 30- 63.31; $p < 0.001$). Υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στον εξωεμβρυϊκό υγρό και τον ορό ($r=-0.6945$, $n=56$, $p=0.003$)

(Γράφημα 1).

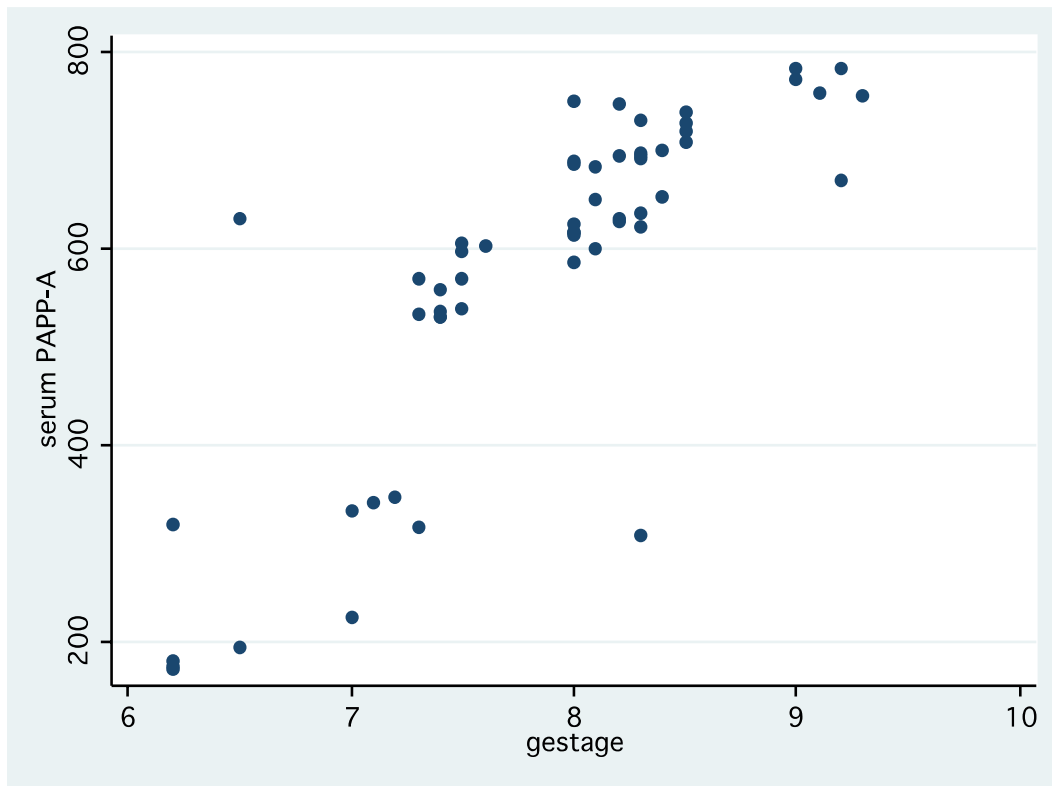
Υπάρχει μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό σε σχέση με την ηλικία κύησης ($r=0.837$, $n=56$, $p=0.001$) (Γράφημα 2). Αντίθετα, η συγκέντρωση της στο εξωεμβρυϊκό υγρό δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με την ηλικία κύησης ($r=-0.2169$, $n=56$, $p=0.096$) (Γράφημα 3), ωστόσο υπάρχει μια τάση για μείωση της συγκέντρωσης όσο αυξάνεται η ηλικία κύησης.

Στις μετρήσεις που έγιναν στα 10 δείγματα αμνιακού υγρού, στα πέντε από αυτά η συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A δεν ήταν ανιχνεύσιμη και στα υπόλοιπα η συγκέντρωσή της ήταν πολύ μικρή (3.172- 4.214 mU/I) συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

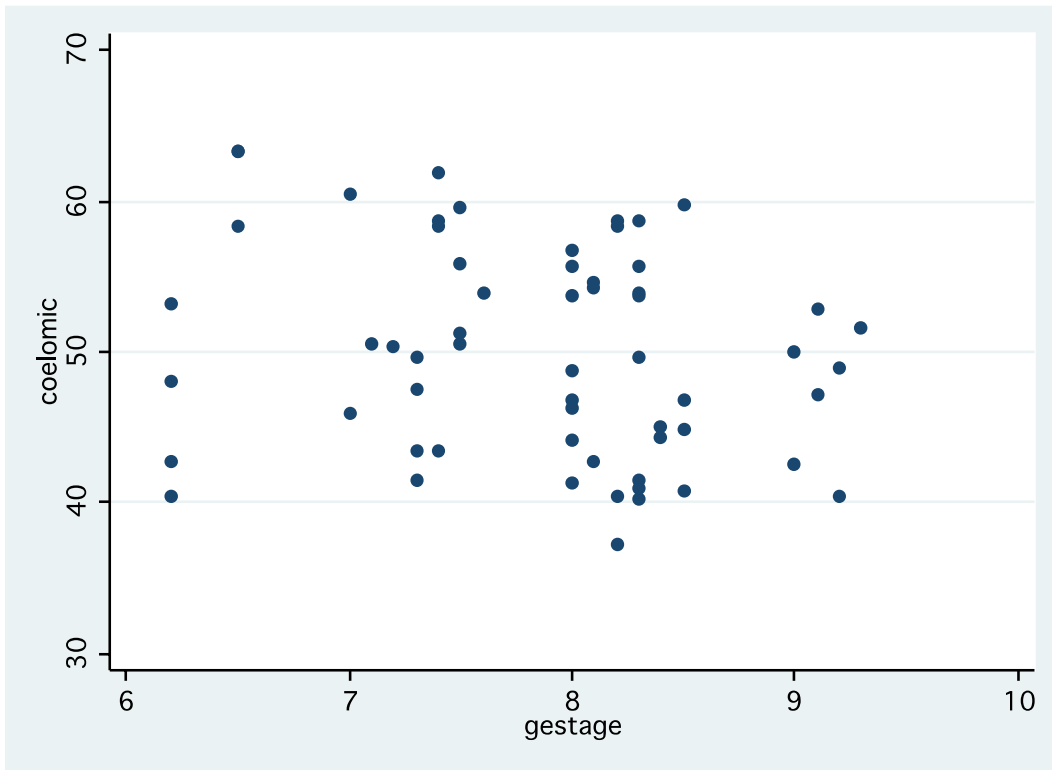
Γράφημα 1. Συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στο εξωεμβρυϊκό υγρό και στον ορό των γυναικών



Γράφημα 2. Συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης.



Γράφημα 3. Συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης



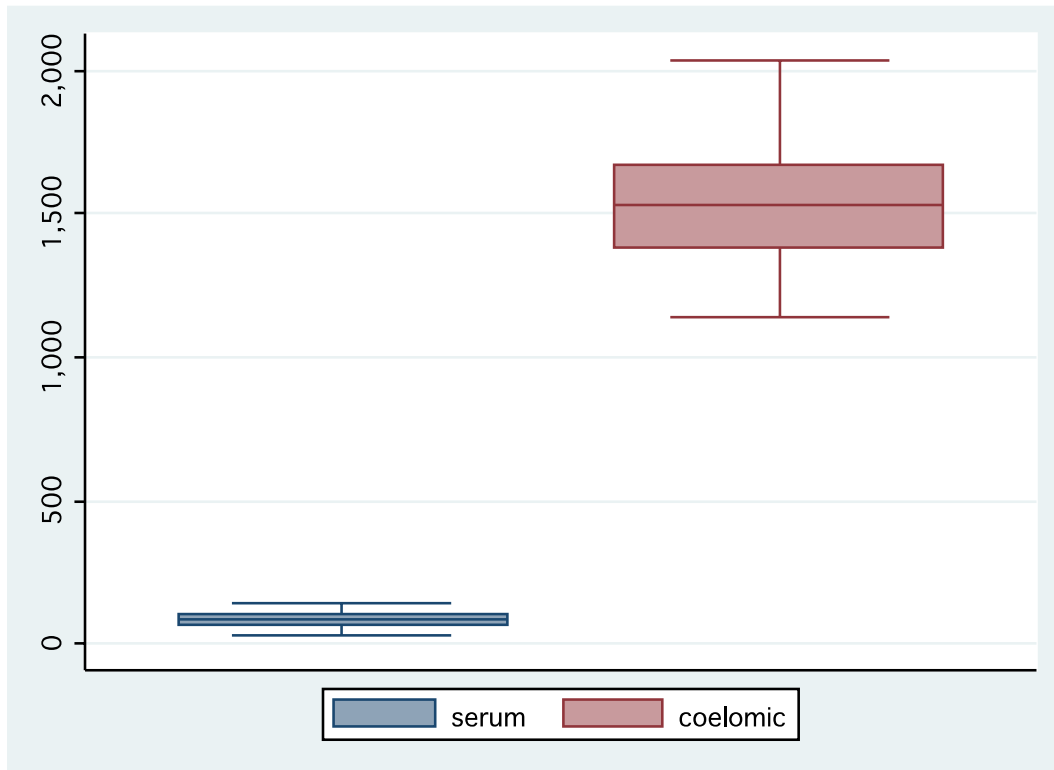
β-Χοριακή γοναδοτροπίνη

Στα 56 δείγματα ορού που εξετάστηκαν, η διάμεση συγκέντρωση της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης ήταν 86.35 ng/ml (εύρος 35-142.5), σημαντικά μικρότερη από τη συγκέντρωση της στο εξωεμβρυϊκό υγρό (διάμεση τιμή 1535 ng/ml, εύρος 1139-2034; $p < 0.001$). Η γραφική παράσταση της κατανομής της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης στα δύο διαμερίσματα φαίνεται στο **Γράφημα 4**.

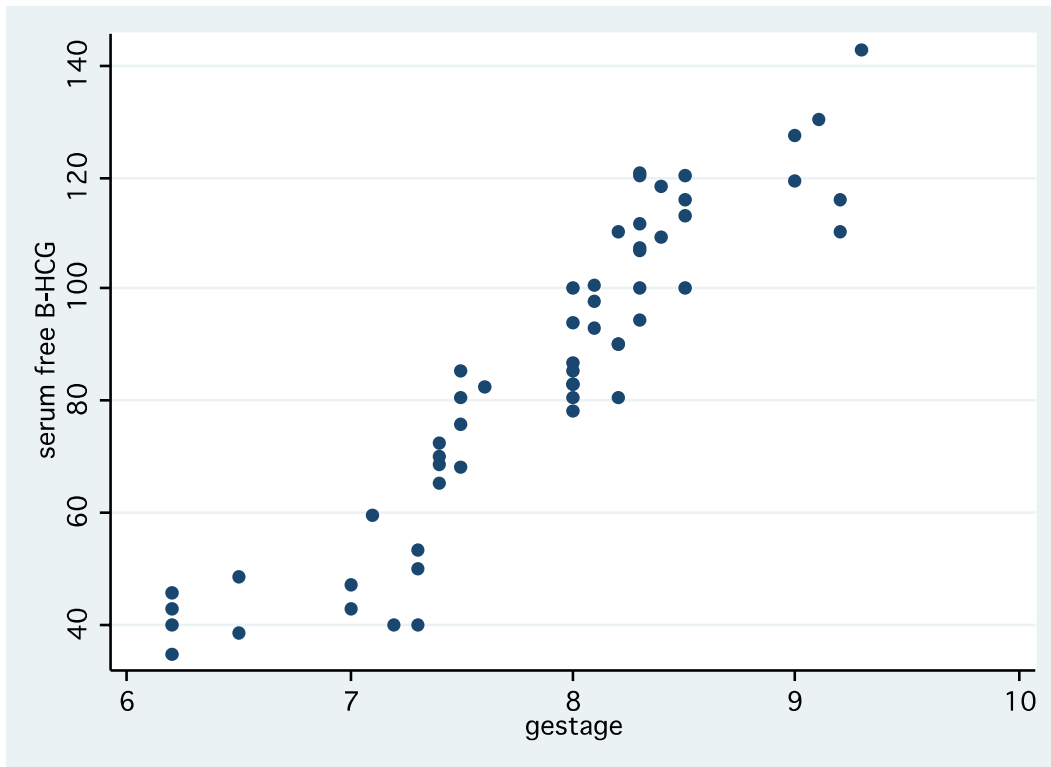
Η συγκέντρωση της ορμόνης στον ορό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης φαίνεται στο **Γράφημα 5**. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα επίπεδα της ορμόνης στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε σχέση με την ηλικία κύησης (**Γράφημα 6**).

Στις δέκα γυναίκες στις οποίες ελήφθη δείγμα αμνιακού, εξωεμβρυϊκού υγρού και ορού, η συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό (διάμεση τιμή 24.865 ng/ml, εύρος 15.35-40.72) ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του ορού (82.66 ng/ml, εύρος 36.6-195.4; $p=0.005$) και σημαντικά μικρότερη από τη συγκέντρωση στο εξωεμβρυϊκό υγρό (διάμεση τιμή 1807 ng/ml, εύρος 965.3- 2491) (**Γράφημα 7**). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της β-χοριακής γοναδοτροπίνης σε σχέση με την ηλικία κύησης.

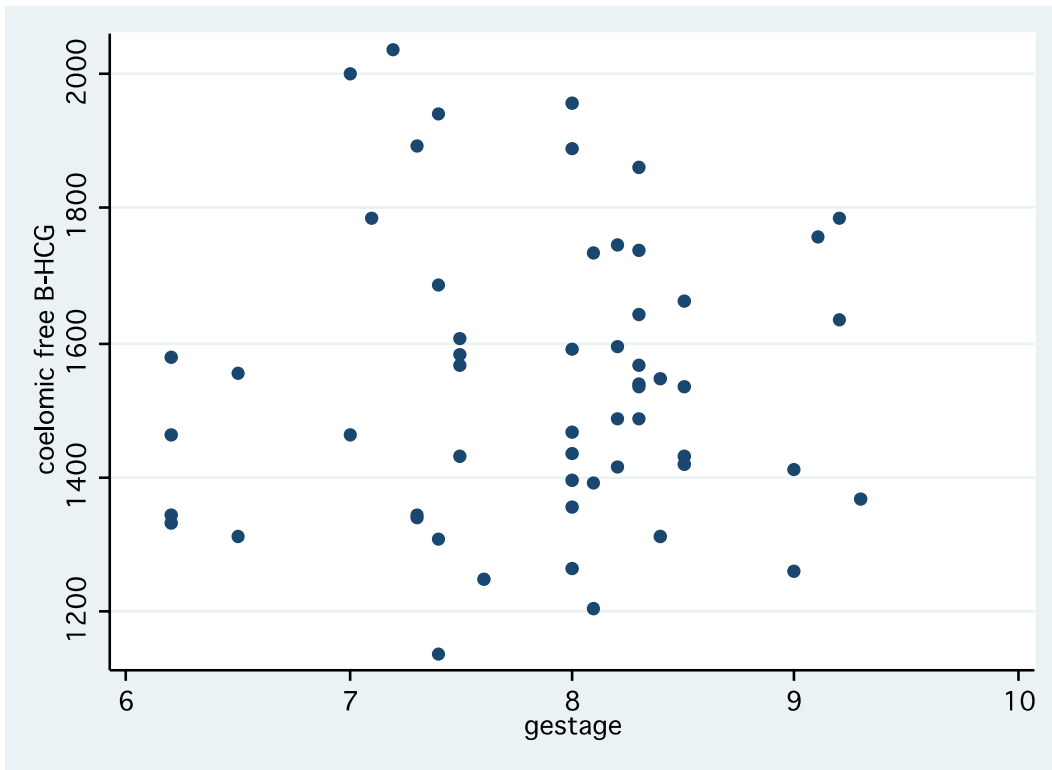
Γράφημα 4. Κατανομή της συγκέντρωσης της β-χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό και στο εξωεμβρυϊκό υγρό.



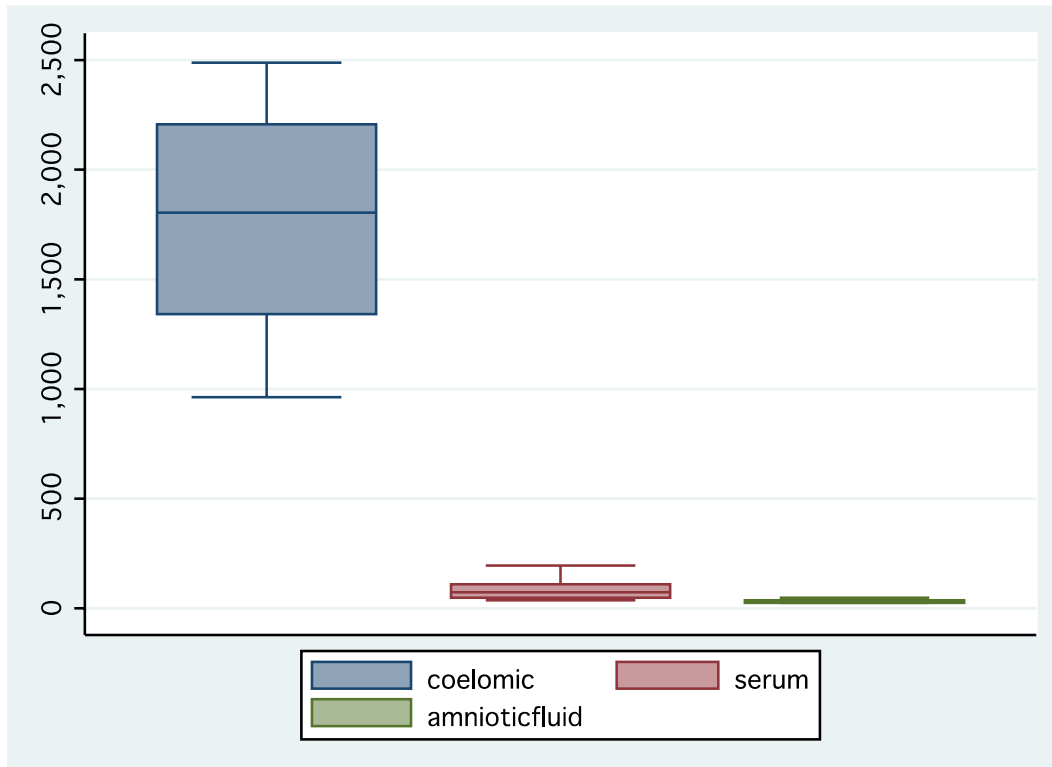
Γράφημα 5. Συγκέντρωση της β -HCG στον ορό σε σχέση με την ηλικία κύησης.



Γράφημα 6. Συγκέντρωση της β -HCG στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε σχέση με την ηλικία κύησης.



Γράφημα 7. Κατανομή της β -HCG σε δείγματα ορού, αμνιακού και εξωεμβρυϊκού υγρού που ελήφθησαν από γυναίκες με ηλικία κύησης από 8.3-9.2 εβδομάδες (N=10).

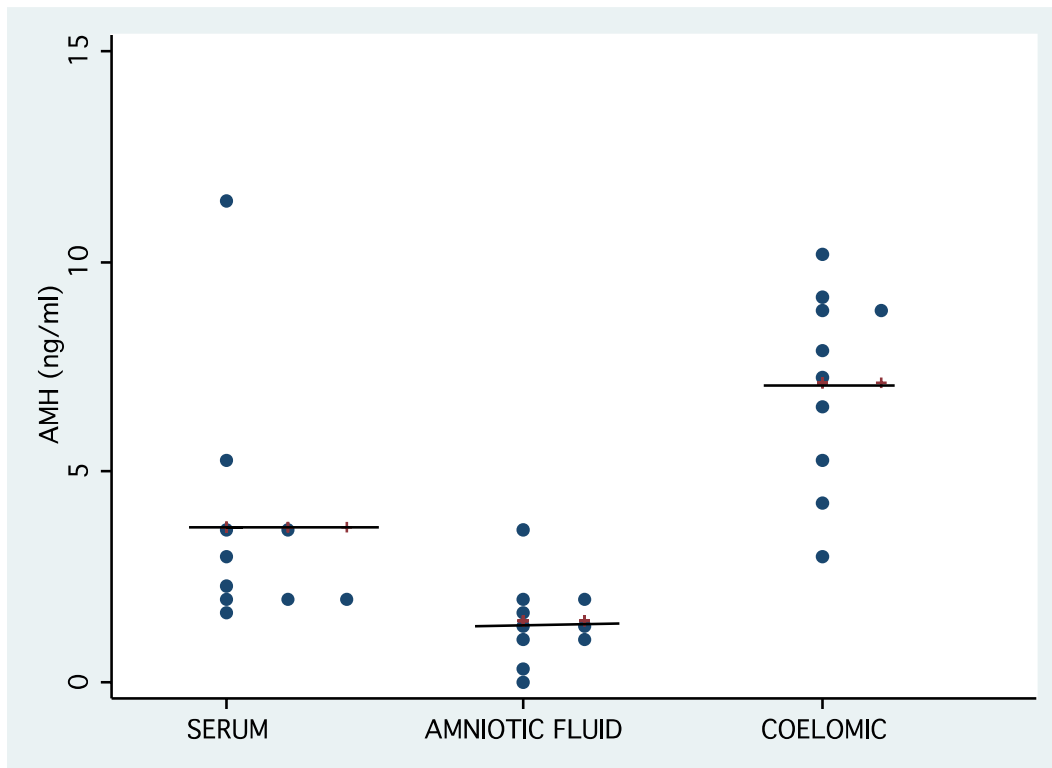


Αντιμυλλεριανή ορμόνη

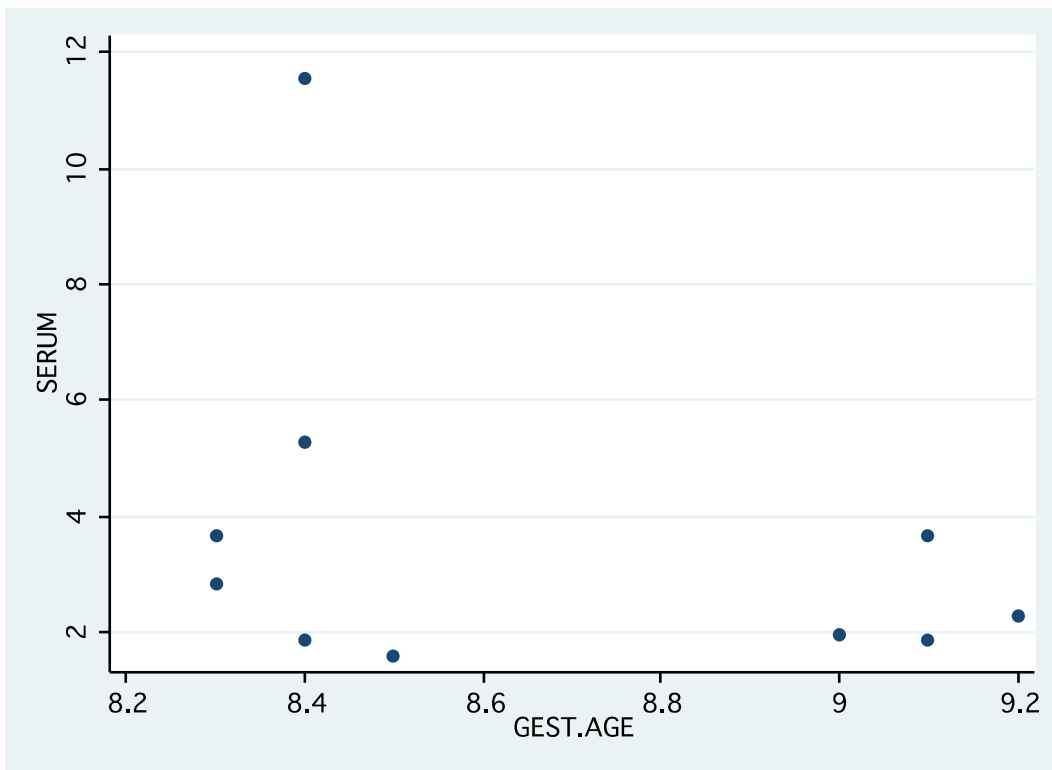
Η διάμεση τιμή της συγκέντρωσης της AMH στον ορό ήταν 2.54 ng/ml (εύρος 1.59-11.52). Στο εξωεμβρυϊκό υγρό, η διάμεση συγκέντρωση της AMH ήταν 7.55 ng/ml (εύρος 3.018-10.267), στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από τη συγκέντρωσή της στον ορό ($p=0.006$) και από τη συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό (1.25 ng/ml, εύρος 0.15-3.5, $p=0.005$). Η κατανομή των συγκεντρώσεων φαίνεται στο **Γράφημα 8**.

Δεν βρέθηκε καμία σχέση μεταξύ της ηλικίας κύησης και της συγκέντρωσης της AMH στον ορό ($r=0.3413$, $n=10$, $p=0.334$), το αμνιακό υγρό ($r=-0.009$, $n=10$, $p=0.9793$) και το εξωεμβρυϊκό υγρό ($r=-0.517$, $n=10$, $p=0.1254$). (**Γράφημα 9**, **Γράφημα 10**, **Γράφημα 11**)

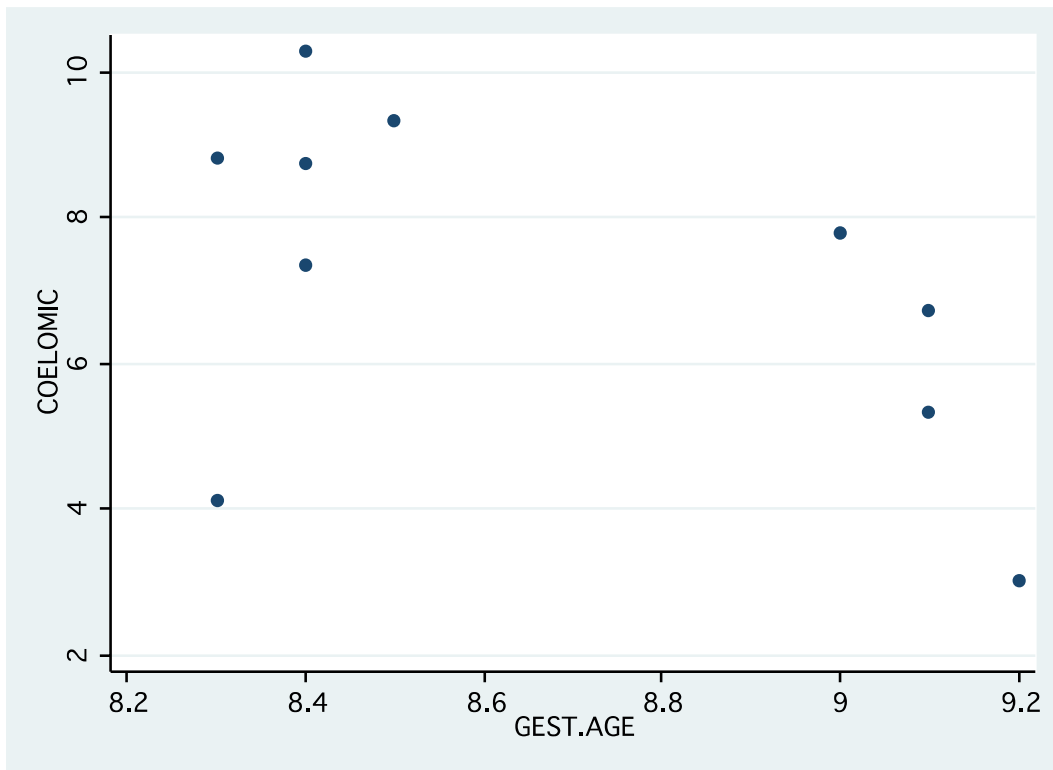
Γράφημα 8. Κατανομή των συγκεντρώσεων της AMH στον ορό, το εξωεμβρυικό και το αμνιακό υγρό (N=10).



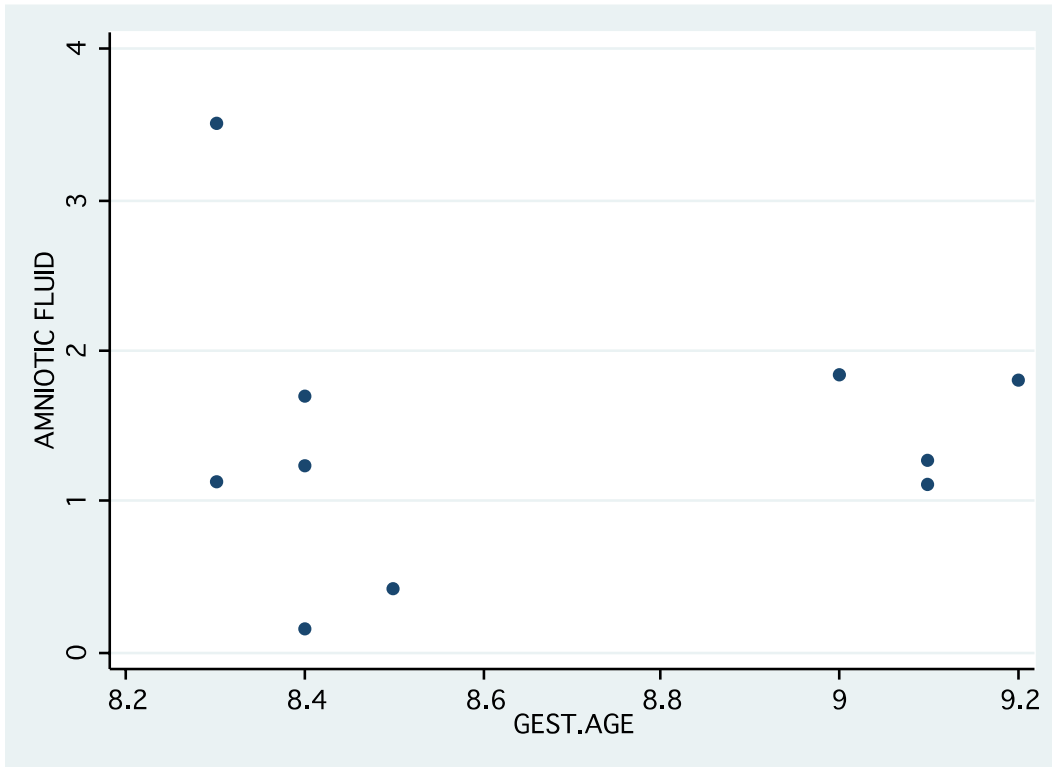
Γράφημα 9. Συγκέντρωση AMH στον ορό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης (N=10).



Γράφημα 10. Συγκέντρωση AMH στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης.



Γράφημα 11. Συγκέντρωση της AMH στο αμνιακό υγρό σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό στο πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι πολύ υψηλότερη από τη συγκέντρωση στο εξωεμβρυϊκό υγρό, ενώ στα περισσότερα δείγματα αμνιακού υγρού που εξετάστηκαν, τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι μη ανιχνεύσιμα. Αντίθετα, η συγκέντρωση της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης στο εξωεμβρυϊκό υγρό είναι 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή στον ορό και 60 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων δημοσιεύσεων στις οποίες μελετήθηκε η συγκέντρωση της PAPP-A^{126, 169, 170}, σε αντίθεση με τις μελέτες άλλων πρωτεϊνών^{139, 142} και της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης^{23, 128, 23, 171} στα διαμερίσματα της κύησης στο πρώτο τρίμηνο.

Η τροφοβλάστη παράγει διάφορες ειδικές ουσίες όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG), το πλακουντιακό γαλακτογόνο (hPL) και η ακτιβίνη, οι οποίες ανιχνεύονται και στον ορό της μητέρας και στα διαμερίσματα της κύησης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε σύγκριση με τον ορό μπορούν να εξηγηθούν από τη στενή ανατομική σχέση που υπάρχει μεταξύ της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και της τροφοβλάστης καθώς και οι δύο αυτές δομές διαχωρίζονται μόνο από ένα χαλαρό μεσεγγυματικό ιστό^{7, 172, 173}. Εξαιρέση σε αυτή την αρχή αποτελεί η πρωτεΐνη PAPP-A η οποία παρόλο που παράγεται από τον τροφοβλαστικό ιστό, βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον ορό από ότι στο εξωεμβρυϊκό υγρό¹²⁶. Είχε αρχικά διατυπωθεί η θεωρία πως η PAPP-A παράγεται από τα διαφοροποιημένα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και όχι από τα ανώριμα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης. Το στρώμα των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης σχηματίζει μια διαχωριστική επιφάνεια με το φθαρτό ενώ έρχεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα. Η ανάπτυξη της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας θεωρείται ότι αποτελεί έναυσμα για την παραγωγή της PAPP-A καθώς και άλλων προϊόντων του πλακούντα όπως το πλακουντιακό γαλακτογόνο (hPL). Ένα άλλο στοιχείο που θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία της πρωτεΐνης στο αμνιακό υγρό είναι το μεγάλο μοριακό βάρος (180 kDa) το οποίο δεν επιτρέπει τη μεταφορά της διαμέσου της αμνιακής μεμβράνης, η οποία είναι σχεδόν αδιαπέραστη σε ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιβεβαιώνουν πως

δεν υπάρχει κάποιου είδους μεταφορά- ενεργητική ή παθητική- ουσιών μεταξύ αμνιακής και εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και είναι πιθανό η κύρια πηγή των μεγαλομοριακών ουσιών στην αμνιακή κοιλότητα στο πρώτο τρίμηνο να είναι τα προϊόντα του μεταβολισμού του εμβρύου.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της PAPP-A στον ορό σε σχέση με την ηλικία κύησης πιθανώς αντανακλά την αυξημένη παραγωγή της καθώς και τη βελτιωμένη της μεταφορά λόγω της πλήρους ανάπτυξης της μητρο-πλακουντιακής κυκλοφορίας. Δεδομένου ότι ο όγκος αίματος- και κατά συνέπεια του πλάσματος- είναι σημαντικά αυξημένος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό, επηρεάζονται σημαντικά από την αυξημένη παραγωγή της. Αντίθετα, δεν υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της PAPP-A στο εξωεμβρυϊκό υγρό και της ηλικίας κύησης, πιθανώς λόγω της απόστασης που υπάρχει μεταξύ της συγκυτιοτροφοβλάστης και της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας, η οποία αναιρεί το αντίκτυπο της αυξημένης παραγωγής.

Τα επίπεδα των υπο-ομάδων της HCG στον ορό και στα διαμερίσματα της κύησης (ελεύθερη α- HCG και ελεύθερη β- HCG) έχουν μελετηθεί σε προηγούμενες δημοσιεύσεις και τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης¹³⁴. Η συγκέντρωση της α- HCG και της β- HCG είναι 185 και 33 φορές μεγαλύτερες αντίστοιχα στο εξωεμβρυϊκό υγρό από ότι στον ορό. Αυτό το εύρημα είναι υπέρ της υπόθεσης πως στο πρώτο τρίμηνο υπάρχει μια υπεροχή της παραγωγής της α-υπομάδας έναντι της β-υπομάδας από την τροφοβλάστη¹³⁵ και επιπλέον επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη μας ότι ο ρυθμός κάθαρσης της ορμόνης είναι πολύ πιο αργός από αυτόν στον ορό της μητέρας. Είναι πιθανό ότι οι συγκεντρώσεις της HCG στον ορό επηρεάζονται από την τροφοβλαστική σύνθεση τόσο στις λάχνες όσο και εκτός λαχνών, ενώ η συγκέντρωση της HCG στον εξω-εμβρυϊκό χώρο επηρεάζεται μόνο από την παραγωγή στις λάχνες (η εξωεμβρυϊκή κοιλότητα περιβάλλεται πλήρως από λάχνες). Η μελέτη μας επιβεβαίωσε τα ευρήματα προηγούμενων μελετών^{134, 171}, σύμφωνα με τα οποία τα επίπεδα της ελεύθερης β- HCG δεν διαφοροποιούνται σημαντικά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου στο εξωεμβρυϊκό υγρό.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της αντιμυλλεριανής ορμόνης έγινε σε συζευγμένα δείγματα ορού, αμνιακού και εξωεμβρυϊκού υγρού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η συγκέντρωση της ορμόνης στο εξωεμβρυϊκό υγρό είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή του ορού και του αμνιακού υγρού, ενώ η

συγκέντρωση στον ορό είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφουν προηγούμενες μελέτες^{166, 174}.

Υπάρχει μόνο μία μελέτη στη βιβλιογραφία η οποία εξετάζει τη συγκέντρωση της αντιμυλλεριανής ορμόνης στο εξωεμβρυϊκό και στο αμνιακό υγρό από φυσιολογικές κύσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου¹⁷⁴. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της ανάπτυξης μιας ευαίσθητης μεθόδου ανοσολογικής βάσης για τη μέτρηση της AMH και οι ερευνητές συμπεριέλαβαν έξι δείγματα από ορό της μητέρας, αμνιακό υγρό και υγρό από την εξωεμβρυϊκή κοιλότητα. Αν και τα επίπεδα της ορμόνης ήταν μη-ανιχνεύσιμα στο αμνιακό και στο εξωεμβρυϊκό υγρό, η συγκέντρωση της AMH κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (1.6 ± 0.2 ng /ml) ήταν σχεδόν διπλάσια από ότι κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως (0.6 ± 0.1 ng/ml) και από τη συγκέντρωση στο υγρό που πάρθηκε από τα ωοθυλάκια υγιών γυναικών (0.64 ± 0.1 ng /ml), γεγονός που υποδηλώνει μια επιπλέον εμβρυοπλακουντιακή παραγωγή σε συνδυασμό με κάποιο πιθανό βιολογικό ρόλο της AMH στην αρχόμενη κύηση. Οι συγγραφείς αναφέρουν παρόλα αυτά πως τα δείγματα εξωεμβρυϊκού και αμνιακού υγρού πάρθηκαν από γυναίκες με ηλικία κύησης 5-14 εβδομάδες, γεγονός που δημιουργεί κάποια αβεβαιότητα σχετικά με τη σωστή προέλευση των συγκεκριμένων δειγμάτων από τα διαμερίσματα της κύησης.

Ο La Marca *et al* 2005¹⁶⁶, μελέτησε τη φυσιολογία και τις αλλαγές στα επίπεδα της AMH στον ορό υγιών πρωτοτόκων γυναικών στο πρώτο, δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης. Η ανάλυση έγινε σε πέντε ομάδες: σε ομάδα ελέγχου, γυναίκες στο πρώτο, δεύτερο και τρίτο τρίμηνο καθώς και σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της λοχείας και βρέθηκε πως η συγκέντρωση της AMH δεν μεταβάλλεται σημαντικά, παρόλο που υπήρχε μια τάση για μείωση στο τρίτο τρίμηνο, όχι στατιστικά σημαντική. Στη λοχεία, η AMH στον ορό είχε παρόμοια συγκέντρωση με αυτή κατά τη διάρκεια της κύησης. Ο Nelson *et al*¹⁶⁷ δημοσίευσε τα αποτελέσματα μιας προοπτικής κοόρτης κατά την οποία μετρήθηκε η επίδραση της κύησης και του αρχικού βάρους της μητέρας στα επίπεδα της AMH με στόχο να εξετάσει εάν ορισμένες ορμόνες (ινσουλίνη, λεπτίνη, αντιπνεκτίνη, E2, SHGB) συσχετίζονται με διαφοροποιήσεις στην AMH. Φάνηκε πως οι συγκεντρώσεις της AMH στα τρίμηνα της εγκυμοσύνης σχετίζονται ισχυρά μεταξύ τους καθώς και με τις μετρήσεις που είχε κάθε γυναίκα πριν την εγκυμοσύνη, ενώ τα επίπεδα βρέθηκαν μειωμένα στο τρίτο τρίμηνο, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Ο Lutterodt *et al* 2009¹⁶⁸ μελέτησε 153 γυναίκες στο πρώτο τρίμηνο οι οποίες υπεβλήθησαν σε διακοπή κύησης για

κοινωνικούς λόγους, και βρέθηκε πως η AMH στον ορό των γυναικών δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτή των μη-εγκύων. Οι διαφορές αυτές στα αποτελέσματα μπορούν να οφείλονται στο διαφορετικό σχεδιασμό των μελετών αυτών και στο μικρό αριθμό δείγματος που είχαν κάποιες από αυτές, γεγονός που δεν μας επιτρέπει να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, υπάρχουν ενδείξεις ότι κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης ενδεχομένως υπάρχει και άλλη ανατομική θέση παραγωγής της AMH (τροφοβλάστη) εκτός από την ωοθήκη.

Δύο δυνητικοί περιορισμοί της παρούσας μελέτης είναι ο μικρός αριθμός γυναικών που βρισκόταν σε ηλικία κύησης κατάλληλη για να τελεστεί και αμνιοπαρακέντηση καθώς και η μη δυνατότητα τέλεσης εμβρυικού καρυότυπου έτσι ώστε να διαπιστώσουμε την εμβρυική συμβολή στη συγκέντρωση της AMH στο αμνιακό υγρό. Παρόλα αυτά, το δείγμα είναι το μεγαλύτερο μέχρι στιγμής που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία όσο αφορά την PAPP-A και τη β -HCG καθώς και την AMH.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A είναι μεγαλύτερη στον ορό από ότι στο εξωεμβρυϊκό και το αμνιακό υγρό
- Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A αυξάνεται με την ηλικία κύησης στον ορό της μητέρας
- Η συγκέντρωση της ελεύθερης β- HCG είναι μεγαλύτερη στο εξωεμβρυϊκό υγρό από τον ορό και το αμνιακό υγρό
- Η συγκέντρωση της ελεύθερης β- HCG είναι μεγαλύτερη στον ορό από ότι στο αμνιακό υγρό
- Η συγκέντρωση της ελεύθερης β- HCG παραμένει σταθερή στο εξωεμβρυϊκό υγρό κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης
- Η συγκέντρωση της AMH είναι μεγαλύτερη στο εξωεμβρυϊκό υγρό από τον ορό και το αμνιακό υγρό και αυτό πιθανολογεί και μια άλλη πηγή παραγωγής της AMH (τροφοβλάστη) εκτός από την ωοθήκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η μελέτη της συγκέντρωσης και κατανομής της PAPP-A, της ελεύθερης β-HCG και της αντιμυλλεριανής ορμόνης (AMH) στο αμνιακό, εξωεμβρυϊκό υγρό και ορό γυναικών στο πρώτο τρίμηνο της κύησης.

Ασθενείς και μέθοδοι: Παρακέντηση της εξωεμβρυϊκής κοιλότητας και/ή αμνιοπαρακέντηση έγινε σε 56 γυναίκες με μονήρη κύηση από την 6^η ως τη 10 η εβδομάδα. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της PAPP-A, της ελεύθερης β-HCG στο εξωεμβρυϊκό υγρό και τον ορό, ενώ επιπλέον προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της AMH σε 10 γυναίκες στις οποίες έγινε και αμνιοπαρακέντηση.

Αποτελέσματα: Η διάμεση συγκέντρωση της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό ήταν 624.75 mU/I, σημαντικά υψηλότερη από τη συγκέντρωσή της στο εξωεμβρυϊκό υγρό (διάμεση τιμή 45.06 mU/I; $p < 0.001$). Υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στον εξωεμβρυϊκό υγρό και τον ορό ($r=-0.6945$, $n=56$, $p=0.003$). Επίσης, υπάρχει μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης PAPP-A στον ορό σε σχέση με την ηλικία κύησης ($r=0.837$, $n=56$, $p=0.001$). Η συγκέντρωσή της στο αμνιακό υγρό στα περισσότερα δείγματα ήταν μη-ανιχνεύσιμη. Η διάμεση συγκέντρωση της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό ήταν 86.35 ng/ml, σημαντικά μικρότερη από τη συγκέντρωσή της στο εξωεμβρυϊκό υγρό (διάμεση τιμή 1535 ng/ml; $p < 0.001$). Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα επίπεδα της ορμόνης στο εξωεμβρυϊκό υγρό σε σχέση με την ηλικία κύησης. Η συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό (διάμεση τιμή 24.865 ng/ml) ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του ορού ($p=0.005$). Η διάμεση τιμή της συγκέντρωσης της AMH στον ορό ήταν 2.54 ng/ml. Στο εξωεμβρυϊκό υγρό, η διάμεση συγκέντρωση της AMH ήταν 7.55 ng/ml, σημαντικά υψηλότερη από τη συγκέντρωσή της στον ορό ($p=0.006$) και από τη συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό (1.25 ng/ml, $p=0.005$).

Συμπεράσματα: Η κατανομή της αντιμυλλεριανής ορμόνης στα διαμερίσματα της αρχόμενης κύησης μπορεί να αποτελεί ένδειξη μιας επιπλέον πηγής προέλευσης της ορμόνης εκτός από την ωοθήκη κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου. Οι συγκεντρώσεις της PAPP-A είναι σε αντίθεση με αυτές που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες που παράγονται από την τροφοβλάστη. Τα επίπεδα της ελεύθερης β-HCG είναι σημαντικά υψηλότερα στο εξωεμβρυϊκό υγρό από ότι στο αμνιακό υγρό και στον ορό.

Abstract

ANTI-MULLERIAN HORMONE, PAPP-A AND FREE β -HCG IN EMBRYONIC COMPARTMENTS AND MATERNAL SERUM DURING THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Objectives: The present study aims to evaluate the concentration and distribution of pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A), free β -HCG and anti-mullerian hormone (AMH) in amniotic fluid, coelomic fluid and maternal serum in the first trimester of pregnancy.

Materials and Methods: Coelocentesis was performed in 56 women with singleton pregnancy from 6 to 10 weeks of gestation. The concentrations of PAPP-A and free β -HCG were measured in the coelomic fluid and maternal serum and additionally AMH was measured in 10 women to which amniocentesis was also performed.

Results: The median concentration of PAPP-A in maternal serum was 624.75 mU/I, significantly higher than the concentration in coelomic fluid (median 45.06 mU/I; $p < 0.001$). There is a significant correlation between the levels of PAPP-A in coelomic fluid and maternal serum ($r = -0.6945$, $n = 56$, $p = 0.003$). The concentration of maternal serum PAPP-A increased significantly with gestation ($r = 0.837$, $n = 56$, $p = 0.001$). In most of our amniotic fluid samples the concentration of this protein was undetectable. The median concentration of free β -HCG in maternal serum was 86.35 ng/ml, significantly lower than the concentration in coelomic fluid (median 1535 ng/ml; $p < 0.001$). The levels of free β -HCG in the coelomic fluid did not vary with gestation. The amniotic fluid concentration (median 24.865 ng/ml) was significantly lower than the one in maternal serum ($p = 0.005$). The median concentration of AMH in maternal serum was 2.54 ng/ml. In coelomic fluid the median levels were 7.55 ng/ml, significantly higher than serum concentration ($p = 0.006$) and amniotic fluid concentration (median 1.25 ng/ml, $p = 0.005$).

Conclusion: The distribution of AMH in the compartments of the gestational sac in the first trimester may suggest another source of anti-mullerian hormone apart from the ovary during pregnancy. The distribution of PAPP-A is in contrast with the one described in other placental-derived proteins. The levels of free β -HCG are significantly higher in coelomic fluid than in amniotic fluid and maternal serum and are consistent with its syncytiotrophoblast origin.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Larsen WJ, Wert SE. Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. *Tissue Cell* 1988;20:809-48.
2. Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 2009;30:883-925.
3. Sun TT, Chung CM, Chan HC. Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein Cell* 2011;2:92-8.
4. Pokkyla RM, Lakkakorpi JT, Nuojua-Huttunen SH, Tapanainen JS. Sequence variations in human ZP genes as potential modifiers of zona pellucida architecture. *Fertil Steril* 2011;95:2669-72.
5. Hamilton WJ, Boyd JD. Trophoblast in human utero-placental arteries. *Nature* 1966;212:906-8.
6. Jauniaux E, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J. Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 1991;12:269-76.
7. Jones CJ, Jauniaux E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. *Micron* 1995;26:145-73.
8. Hamilton WJ, Boyd JD. Specializations of the syncytium of the human chorion. *Br Med J* 1966;1:1501-6.
9. Jones CJ, Jauniaux E, Stoddart RW. Glycans of the early human yolk sac. *Histochem J* 1995;27:210-21.
10. Sinha R, Carlton M. The volume and composition of amniotic fluid in early pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1970;77:211-4.
11. Johnell HE, Nilsson BA. Oxygen tension, acid-base status and electrolytes in human amniotic fluid. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1971;50:183-92.
12. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Gervy C, Ooms HA, Campbell S. Biochemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991;78:1124-8.
13. Wathen NC, Cass PL, Kitau MJ, Chard T. Human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein levels in matched samples of amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 1991;11:145-51.

14. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:866-70.
15. Mc KD, Richardson MV, Hertig AT. Studies of the function of early human trophoblast. III. A study of the protein structure of mole fluid, chorionic and amniotic fluids by paper electrophoresis. *Am J Obstet Gynecol* 1958;75:699-707.
16. Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S. In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991;1:435-45.
17. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Schaaps JP, Campbell S, Meuris S. Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1993;8:782-7.
18. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Thiry P, Campbell S, Ooms HA. Determination of protein pattern in embryonic cavities of human early pregnancies: a means to understand materno-embryonic exchanges. *Hum Reprod* 1992;7:886-9.
19. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Mitchell M, Lees C, Layton M. Detection of sickle gene by coelocentesis in early pregnancy: a new approach to prenatal diagnosis of single gene disorders. *Hum Reprod* 1995;10:1287-9.
20. Ross JA, Jurkovic D, Nicolaides K. Coelocentesis: a study of short-term safety. *Prenat Diagn* 1997;17:913-7.
21. Makrydimas G, Kaponis A, Skentou C, Lolis D. Short-term safety of celocentesis for the mother and the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:243-5.
22. Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J, Espinoza J, Goncalves LF, Romero R. Solutes in maternal circulation and gestational sac compartments during early human development. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:287-92.
23. Gulbis B, Jauniaux E, Cotton F, Stordeur P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. *Mol Hum Reprod* 1998;4:857-62.
24. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Campbell S, Collins WP, Ooms HA. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod* 1994;9:161-6.
25. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Collins WP, Zaidi J, Campbell S. Investigation of the acid-base balance of coelomic and amniotic fluids in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1365-9.

26. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Gervy C, Ooms HA. Biochemical investigation of fetal renal maturation in early pregnancy. *Pediatr Res* 1996;39:731-5.
27. O'Rahilly R, Muller F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs* 2010;192:73-84.
28. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Jr., Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971;109:440-5.
29. Whitfield CR, Chan WH, Sproule WB, Stewart AD. Amniotic fluid lecithin: sphingomyelin ratio and fetal lung development. *Br Med J* 1972;2:85-6.
30. Wijnberger LD, de Kleine M, Voorbij HA, et al. Prediction of fetal lung immaturity using gestational age, patient characteristics and fetal lung maturity tests: a probabilistic approach. *Arch Gynecol Obstet* 2009.
31. Spillman T, Cotton DB. Current perspectives in assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:341-89.
32. Chevy F, Humbert L, Wolf C. Sterol profiling of amniotic fluid: a routine method for the detection of distal cholesterol synthesis deficit. *Prenat Diagn* 2005;25:1000-6.
33. Opitz JM. RSH/SLO ("Smith-Lemli-Opitz") syndrome: historical, genetic, and developmental considerations. *Am J Med Genet* 1994;50:344-6.
34. Oca F, Dreux S, Gerard B, et al. Amniotic fluid digestive enzyme analysis is useful for identifying CFTR gene mutations of unclear significance. *Clin Chem* 2009;55:2214-7.
35. Lavee M, Goldman S, Daniel-Spiegel E, Shalev E. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:85.
36. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:38-57.
37. Soto E, Romero R, Richani K, et al. Evidence for complement activation in the amniotic fluid of women with spontaneous preterm labor and intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:983-92.
38. Pfeiffer S, Boyle J, Daly S, Dowd E, Haase J, McLaughlin D. Human amniocytes regulate serotonin levels by active uptake and express genes suggestive of

a wider role in facilitating neurotransmitter regulation in the fetal environment. *Stem Cells Dev* 2011;20:341-9.

39. Sivasubramaniam SD, Finch CC, Billett MA, Baker PN, Billett EE. Monoamine oxidase expression and activity in human placentae from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 2002;23:163-71.

40. Akinbi HT, Narendran V, Pass AK, Markart P, Hoath SB. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:2090-6.

41. Hamdan MA, Almalik MH, Mirghani HM. Early administration of enzyme replacement therapy for Pompe disease: Short-term follow-up results. *J Inherit Metab Dis* 2008.

42. Sarfati R, Hubert A, Dugue-Marechaud M, Biran-Mucignat V, Pierre F, Bonneau D. Prenatal diagnosis of Gaucher's disease type 2. Ultrasonographic, biochemical and histological aspects. *Prenat Diagn* 2000;20:340-3.

43. Muller F, Oury JF, Dumez Y, Boue J, Boue A. Microvillar enzyme assays in amniotic fluid and fetal tissues at different stages of development. *Prenat Diagn* 1988;8:189-98.

44. Sadler TW, Denno KM, Hunter ES, 3rd. Effects of altered maternal metabolism during gastrulation and neurulation stages of embryogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1993;678:48-61.

45. Blazer S, Zimmer EZ, Bronshtein M. Nonvisualization of the fetal gallbladder in early pregnancy: comparison with clinical outcome. *Radiology* 2002;224:379-82.

46. Hertzberg BS, Kliwer MA, Maynor C, et al. Nonvisualization of the fetal gallbladder: frequency and prognostic importance. *Radiology* 1996;199:679-82.

47. Davenport M, Hadzic N. Prenatal diagnosis of liver and biliary tract disease. *Semin Neonatol* 2003;8:347-55.

48. Ochshorn Y, Rosner G, Barel D, Bronshtein M, Muller F, Yaron Y. Clinical evaluation of isolated nonvisualized fetal gallbladder. *Prenat Diagn* 2007;27:699-703.

49. Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. *Pediatrics* 1997;99:376-82.

50. Hinds R, Davenport M, Mieli-Vergani G, Hadzic N. Antenatal presentation of biliary atresia. *J Pediatr* 2004;144:43-6.

51. Dehecchi MC, Girella E, Borgo G, Mastella G. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. Analytical evaluation of microvillar enzyme determinations in amniotic fluid. *Enzyme* 1989;42:209-18.

52. Szabo M, Munnich A, Teichmann F, Huszka M, Veress L, Papp Z. Discriminant analysis for assessing the value of amniotic fluid microvillar enzymes in the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1990;10:761-9.
53. Burc L, Vuillard E, Guibourdenche J, et al. Prenatal diagnosis and follow up of biliary atresia. *BJOG* 2001;108:1108-10.
54. Macek M, Anneren G, Gustavson KH, et al. Gamma-glutamyl transferase activity in the amniotic fluid of fetuses with chromosomal aberrations and inborn errors of metabolism. *Clin Genet* 1987;32:403-8.
55. D'Anna R, Baviera G, Cannata ML, De Vivo A, Di Benedetto A, Corrado F. Midtrimester amniotic fluid leptin and insulin levels and subsequent gestational diabetes. *Gynecol Obstet Invest* 2007;64:65-8.
56. Adrian TE, Soltesz G, MacKenzie IZ, Bloom SR, Aynsley-Green A. Gastrointestinal and pancreatic hormones in the human fetus and mother at 18-21 weeks of gestation. *Biol Neonate* 1995;67:47-53.
57. Stefos T, Sotiriadis A, Kaponis A, Dalkalitsis N, Lolis D. Amniotic fluid glucose at the time of genetic amniocentesis: correlation with duration of pregnancy and birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;106:144-7.
58. Tarim E, Bagis T, Kilicdag EB, Sezgin N, Yanik F. Are amniotic fluid C-reactive protein and glucose levels, and white blood cell counts at the time of genetic amniocentesis related with preterm delivery? *J Perinat Med* 2005;33:524-9.
59. Fallucca F, Kuhl C, Lauritsen KB, Del Balzo P, Gargiulo P, Pachi A. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) concentration in human amniotic fluid. *Horm Metab Res* 1985;17:251-5.
60. Mihailovic M, Cvetkovic M, Ljubic A, et al. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res* 2000;73:47-54.
61. Quan CP, Forestier F, Bouvet JP. Immunoglobulins of the human amniotic fluid. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:219-25.
62. Sikkel E, Pasman SA, Oepkes D, Kanhai HH, Vandenbussche FP. On the origin of amniotic fluid bilirubin. *Placenta* 2004;25:463-8.
63. Spiliotis BE. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia and consequences in adults. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 Suppl 5:1299-302; discussion 317.

64. Honest H, Forbes CA, Duree KH, et al. Screening to prevent spontaneous preterm birth: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess* 2009;13:1-627.
65. Muller F. Prenatal biochemical screening for neural tube defects. *Childs Nerv Syst* 2003;19:433-5.
66. Wald N, Cuckle H, Nanchahal K. Amniotic fluid acetylcholinesterase measurement in the prenatal diagnosis of open neural tube defects. Second report of the Collaborative Acetylcholinesterase Study. *Prenat Diagn* 1989;9:813-29.
67. Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J Immunol* 2009;183:7150-60.
68. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Goldman M, Willems F. Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. *Eur J Immunol* 2006;36:21-6.
69. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatr Res* 2006;60:205-9.
70. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
71. Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005;105:1582-9.
72. Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:409-17.
73. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 1993;81:941-8.
74. Herway C, Bongiovanni AM, Skupski D, Witkin SS. An interleukin-23 binding protein in mid-trimester amniotic fluid. *Am J Reprod Immunol* 2009;62:308-13.
75. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.

76. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1578-89.
77. Sezen D, Bongiovanni AM, Jean-Pierre C, Linhares IM, Skupski D, Witkin SS. Ex vivo cytokine production by whole mid-trimester amniotic fluid. *J Reprod Immunol* 2008;78:22-7.
78. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 2006;177:1956-66.
79. Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. *BJOG* 2011;118:145-53.
80. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995;154:5492-9.
81. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007;7:425-8.
82. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:336-41.
83. Renaud SJ, Cotechini T, Quirt JS, Macdonald-Goodfellow SK, Othman M, Graham CH. Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion. *J Immunol* 2011;186:1799-808.
84. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-25.
85. Menon R, Thorsen P, Vogel I, et al. Racial disparity in amniotic fluid concentrations of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and soluble TNF receptors in spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:533 e1-10.
86. Kawasaki H, Iwamuro S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect Disord Drug Targets* 2008;8:195-205.
87. Snegovskikh VV, Schatz F, Arcuri F, et al. Intra-amniotic infection upregulates decidual cell vascular endothelial growth factor (VEGF) and neuropilin-1

and -2 expression: implications for infection-related preterm birth. *Reprod Sci* 2009;16:767-80.

88. Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol* 2002;168:2356-64.

89. Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 1999;274:33179-82.

90. Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, et al. Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin. *Biochemistry* 2005;44:9590-7.

91. Sezen D, Bongiovanni AM, Gelber S, et al. Gelsolin down-regulates lipopolysaccharide-induced intraamniotic tumor necrosis factor-alpha production in the midtrimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:191 e1-4.

92. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33-9.

93. Ezeamuzie CI, Khan I. The role of adenosine A(2) receptors in the regulation of TNF-alpha production and PGE(2) release in mouse peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol* 2007;7:483-90.

94. Perni U, Sezen D, Bongiovanni AM, Linhares IM, Skupski D, Witkin SS. Endogenous adenosine down-modulates mid-trimester intraamniotic tumor necrosis factor-alpha production. *Am J Reprod Immunol* 2009;62:232-7.

95. Seong HS, Lee SE, Kang JH, Romero R, Yoon BH. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:375 e1-5.

96. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect* 2004;6:1219-25.

97. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.

98. Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CM, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:181 e1-13.

99. Keelan JA, Yang J, Romero RJ, et al. Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 is present in fetal membranes and amniotic fluid at increased concentrations with intra-amniotic infection and preterm delivery. *Biol Reprod* 2004;70:253-9.
100. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;13:2-21.
101. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;2:1363-5.
102. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139-51.
103. Lolis DE, Kalantaridou SN, Stefos T, Makrydimas G, Georgiou I. The role of deoxyribonuclease I in amniotic fluid during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;77:177-80.
104. Bianchi DW, Lo YM. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:119-31.
105. Angert RM, Leshane ES, Yarnell RW, Johnson KL, Bianchi DW. Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of women during the peripartum period. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1087-90.
106. Koide K, Sekizawa A, Iwasaki M, et al. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn* 2005;25:604-7.
107. Hammacher K, Huter KA, Bokelmann J, Werners PH. Foetal heart frequency and perinatal condition of the foetus and newborn. *Gynaecologia* 1968;166:349-60.
108. Manning FA, Platt LD, Sipos L. Antepartum fetal evaluation: development of a fetal biophysical profile. *Am J Obstet Gynecol* 1980;136:787-95.
109. Fenton AN, Steer CM. Fetal distress. *Am J Obstet Gynecol* 1962;83:354-62.
110. Walker J. Foetal anoxia; a clinical and laboratory study. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1954;61:162-80.
111. Richey SD, Ramin SM, Bawdon RE, et al. Markers of acute and chronic asphyxia in infants with meconium-stained amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1212-5.

112. Ziadeh SM, Sunna E. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies with term labour and meconium-stained amniotic fluid. *Arch Gynecol Obstet* 2000;264:84-7.
113. Baker PN, Kilby MD, Murray H. An assessment of the use of meconium alone as an indication for fetal blood sampling. *Obstet Gynecol* 1992;80:792-6.
114. Alchalabi H, Abu-Heija AT, El-Sunna E, Zayed F, Badria LF, Obeidat A. Meconium-stained amniotic fluid in term pregnancies-a clinical view. *J Obstet Gynaecol* 1999;19:262-4.
115. Manganaro R, Mami C, Palmara A, Paolata A, Gemelli M. Incidence of meconium aspiration syndrome in term meconium-stained babies managed at birth with selective tracheal intubation. *J Perinat Med* 2001;29:465-8.
116. Makrydimas G, Sotiriadis A, Savvidou MD, Spencer K, Nicolaides KH. Physiological distribution of placental growth factor and soluble Flt-1 in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2008;28:175-9.
117. Kaponis A, Skyrilas A, Zagorianakou N, et al. Coelomic cells show apoptosis via Fas/FasL system: a comparative study between healthy human pregnancies and missed miscarriages. *Hum Reprod* 2008;23:1159-69.
118. Jauniaux E, Gulbis B, Gerlo E, Rodeck C. Free amino acid distribution inside the first trimester human gestational sac. *Early Hum Dev* 1998;51:159-69.
119. Jauniaux E, Sherwood RA, Jurkovic D, Boa FG, Campbell S. Amino acid concentrations in human embryological fluids. *Hum Reprod* 1994;9:1175-9.
120. Campbell J, Wathen NC, Merryweather I, Abbott R, Muller D, Chard T. Concentrations of vitamins A and E in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994;71:F49-50.
121. Trout WE, McDonnell JJ, Kramer KK, Baumbach GA, Roberts RM. The retinol-binding protein of the expanding pig blastocyst: molecular cloning and expression in trophectoderm and embryonic disc. *Mol Endocrinol* 1991;5:1533-40.
122. Contempre B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S, de Escobar GM. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1719-22.
123. Gitlin D, Biasucci A. Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-

macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *J Clin Invest* 1969;48:1433-46.

124. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10:3297-300.

125. Gulbis B, Jauniaux E, Decuyper J, Thiry P, Jurkovic D, Campbell S. Distribution of iron and iron-binding proteins in first-trimester human pregnancies. *Obstet Gynecol* 1994;84:289-93.

126. Iles RK, Wathen NC, Sharma KB, Campbell J, Grudzinskas JG, Chard T. Pregnancy-associated plasma protein A levels in maternal serum, extraembryonic coelomic and amniotic fluids in the first trimester. *Placenta* 1994;15:693-9.

127. Sorensen S, Momsen G, Sundberg K, Friis-Hansen L, Jorgensen FS. First-Trimester Risk Calculation for Trisomy 13, 18, and 21: Comparison of the Screening Efficiency between 2 Self-Developed Programs and Commercial Software. *Clin Chem* 2011.

128. Savvidou M, Samuel I, Syngelaki A, Poulton M, Nicolaides K. First-trimester markers of aneuploidy in women positive for HIV. *BJOG* 2011;118:844-8.

129. Plasencia W, Gonzalez Davila E, Tetilla V, Padron Perez E, Garcia Hernandez JA, Gonzalez Gonzalez NL. First trimester screening for large for gestational age infants. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011.

130. Kuc S, Wortelboer EJ, Koster MP, de Valk HW, Schielen PC, Visser GH. Prediction of macrosomia at birth in type-1 and 2 diabetic pregnancies with biomarkers of early placentation. *BJOG* 2011;118:748-54.

131. Derbent AU, Yanik FF, Simavli S, et al. First trimester maternal serum PAPP-A and free beta-HCG levels in hyperemesis gravidarum. *Prenat Diagn* 2011;31:450-3.

132. Odibo AO, Zhong Y, Longtine M, et al. First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta* 2011;32:333-8.

133. Cuckle HS. Screening for pre-eclampsia--lessons from aneuploidy screening. *Placenta* 2011;32 Suppl:S42-8.

134. Jauniaux E, Gulbis B, Nagy AM, Jurkovic D, Campbell S, Meuris S. Coelomic fluid chorionic gonadotrophin and protein concentrations in normal and complicated first trimester human pregnancies. *Hum Reprod* 1995;10:214-20.

135. Nagy AM, Jauniaux E, Jurkovic D, Meuris S. Placental production of human chorionic gonadotrophin alpha and beta subunits in early pregnancy as evidenced in fluid from the exocoelomic cavity. *J Endocrinol* 1994;142:511-6.
136. Blithe DL, Iles RK. The role of glycosylation in regulating the glycoprotein hormone free alpha-subunit and free beta-subunit combination in the extraembryonic coelomic fluid of early pregnancy. *Endocrinology* 1995;136:903-10.
137. Makrydimas G, Gerovassili A, Sotiriadis A, Kavvadias A, Nicolaides KH. Cell-free fetal DNA in celomic fluid. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:594-5.
138. Chatzimeletiou K, Makrydimas G, Sotiriadis A, Paraskevaidis E, Nicolaides KH. Aneuploidy screening in coelomic samples using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Prenat Diagn* 2005;25:919-26.
139. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. Prenatal paternity testing using DNA extracted from coelomic cells. *Fetal Diagn Ther* 2004;19:75-7.
140. Miell JP, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Mol Hum Reprod* 1997;3:343-9.
141. Makrydimas G, Sotiriadis A, Spencer K, Cowans NJ, Nicolaides KH. ADAM12-s in coelomic fluid and maternal serum in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2006;26:1197-200.
142. Makrydimas G, Vandecruys H, Sotiriadis A, Lakasing L, Spencer K, Nicolaides KH. Coelomic fluid leptin concentration in normal first-trimester pregnancies and missed miscarriages. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:406-9.
143. Gitlin D, Perricelli A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-foetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. *Nature* 1970;228:995-7.
144. Shi WK, Hopkins B, Thompson S, Heath JK, Luke BM, Graham CF. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sack and other foetal organs. *J Embryol Exp Morphol* 1985;85:191-206.
145. Makrydimas G, Lolis D, Georgiou I, Skendou C, Nicolaides KH. Fetal heart rate following coelocentesis. *J Matern Fetal Med* 1997;6:314-6.
146. Giambona A, Makrydimas G, Leto F, et al. Feasibility of DNA diagnosis of haemoglobinopathies on coelocentesis. *Br J Haematol* 2011.

147. Makrydimas G, Georgiou I, Bouba I, Lolis D, Nicolaides KH. Early prenatal diagnosis by celocentesis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;23:482-5.
148. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by coelocentesis. *Mol Hum Reprod* 1997;3:729-31.
149. Renda MC, Giambona A, Fecarotta E, et al. Embryo-fetal erythroid megaloblasts in the human coelomic cavity. *J Cell Physiol* 2010;225:385-9.
150. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Gavriil P, Campbell S. The origin of alpha-fetoprotein in first-trimester anembryonic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1749-53.
151. Ward S, Jauniaux E, Shannon C, Rodeck C, Boyd R, Sibley C. Electrical potential difference between exocoelomic fluid and maternal blood in early pregnancy. *Am J Physiol* 1998;274:R1492-5.
152. Burton GJ, Tham SW. Formation of vasculo-syncytial membranes in the human placenta. *J Dev Physiol* 1992;18:43-7.
153. Jauniaux E, Gulbis B, Hyett J, Nicolaides KH. Biochemical analyses of mesenchymal fluid in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:765-9.
154. di Clemente N, Josso N, Gouedard L, Belville C. Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:9-14.
155. Munsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613-24.
156. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-44.
157. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;114:1315-20.
158. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002;124:601-9.
159. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.

160. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859-61.
161. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357-62.
162. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Changes in anti-Mullerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod* 2004;19:2036-42.
163. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, et al. Anti-Mullerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2011;22:341-9.
164. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718.
165. Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, et al. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG* 2006;113:1472-80.
166. La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A. Anti-Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod* 2005;20:1569-72.
167. Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimullerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril* 2010;93:1356-8.
168. Lutterodt M, Byskov AG, Skouby SO, Tabor A, Yding Andersen C. Anti-Mullerian hormone in pregnant women in relation to other hormones, fetal sex and in circulation of second trimester fetuses. *Reprod Biomed Online* 2009;18:694-9.
169. Bischof P, Duberg S, Herrmann W, Sizonenko PC. Amniotic fluid and plasma concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) throughout pregnancy: comparison with other fetoplacental products. *Br J Obstet Gynaecol* 1982;89:358-63.
170. Duberg S, Bischof P, Schindler AM, Beguin F, Herrmann W, Sizonenko PC. Tissue and plasma concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-

A): comparison with other fetoplacental products. *Br J Obstet Gynaecol* 1982;89:352-7.

171. Iles RK, Wathen NC, Campbell DJ, Chard T. Human chorionic gonadotrophin and subunit composition of maternal serum and coelomic and amniotic fluids in the first trimester of pregnancy. *J Endocrinol* 1992;135:563-9.

172. Jauniaux E, Gulbis B. In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:45-9.

173. Jauniaux E, Gulbis B. Fluid compartments of the embryonic environment. *Hum Reprod Update* 2000;6:268-78.

174. Al-Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, et al. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Mullerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:267-73.

