

# Προσδιορισμός του «παραθύρου εμφύτευσης» της μήτρας μετά από μοριακό έλεγχο υποδεκτικότητας του ενδομητρίου σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης

Μάρυ-Ρόσα Μητροπούλου, Βάια Γώτα, Σόνια Τεφτσόγλου και Θεοδόσιος Αρκουλής  
Κέντρο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «ΜΙΤΩΣΗ», Πειραιάς

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή/Σκοπός:** Το στάδιο της εμφύτευσης ενός εμβρύου στο ενδομήτριο αποτελεί το πιο κρίσιμο σημείο κατά την αναπαραγωγική διαδικασία. Περιλαμβάνει μια σειρά πολύπλοκων σηματοδοτικών γεγονότων, τα οποία θα οδηγήσουν σε μια επιτυχημένη κύηση. Όμως, πολλές φορές η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο δεν προχωρά φυσιολογικά. Ένας από τους λόγους αυτής της αποτυχίας είναι το κατά πόσο έτοιμο βρίσκεται το ενδομήτριο για την εμφύτευση του εμβρύου. Φυσιολογικά, αυτό συμβαίνει 7<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> μέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία, περίοδος που ονομάζεται και «παραθύρο εμφύτευσης». Σε ορισμένες περιπτώσεις γυναικών το «παραθύρο εμφύτευσης» μπορεί να διαφέρει με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται εμφύτευση του εμβρύου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση με μοριακές τεχνικές της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες προσπάθειες και καλή ποιότητα εμβρύων, ώστε να προσδιοριστεί το «παραθύρο εμφύτευσης».

**Υλικά/Μέθοδος:** Σε 20 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 38,04 (± 3,9) έτη, έγινε λήψη ιστού ενδομητρίου επτά μέρες μετά την αιχμή της LH σε φυσιολογικό κύκλο ή πέντε μέρες μετά την έναρξη χορήγησης προγεστερόνης σε κύκλο με υποκατάσταση ορμονών. Το υλικό ελέγχθηκε για τη διαφορική έκφραση 238 γονιδίων που σχετίζονται με την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος η δοκιμασία επαναλήφθηκε με μία επιπλέον ημέρα για να δοθεί νέα εκτίμηση.

**Αποτελέσματα:** Συνολικά, σε 5 γυναίκες η δοκιμασία έδωσε αρνητικά αποτελέσματα, η οποία και επαναλήφθηκε για να προσδιοριστεί επακριβώς η σωστή μέρα εμφύτευσης. Μετά τον επανέλεγχο, πραγματοποιήθηκε εμβρυομεταφορά των βλαστοκύστεων στην αντίστοιχη μέρα (+6 ή +7), όπου 2 στις 5 γυναίκες πέτυχαν θετικά αποτελέσματα με τελειώμνη κύηση.

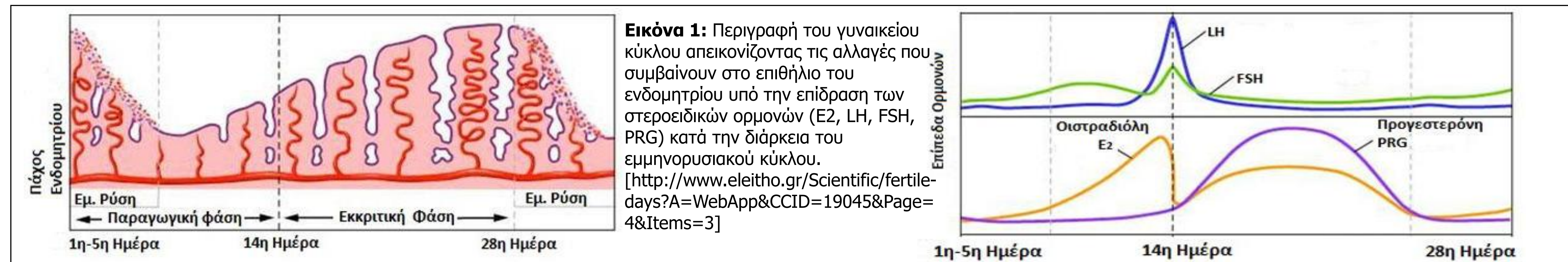
**Συμπεράσματα:** Η εμφύτευση ενός εμβρύου στο ενδομήτριο είναι μια διαδικασία πολύπλοκη, που ελέγχεται μέσα από τη συνεργική έκφραση διαφόρων γονιδίων και μπορεί να συμβεί μόνο σε συγκεκριμένες μέρες κατά την έμμηνο ρύση. Το «παραθύρο εμφύτευσης» διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης, ώστε ο προσδιορισμός του να καθίσταται αναγκαίος σε περιστατικά όπου αργεί να εμφανιστεί.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ΣΚΟΠΟΣ

Ο ιστός του ενδομητρίου χαρακτηρίζεται από υψηλή δυναμική, καθώς έχει την ικανότητα να υπόκειται σε φυσιολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της έμμηνο ρύσεως λόγω της επίδρασης των στεροειδικών ορμονών (**Εικόνα 1**). Οι αλλαγές αυτές, που συμβαίνουν μέσω πολύπλοκων σηματοδοτικών γεγονότων, έχουν σκοπό τη δημιουργία ενός «φιλόξενου» περιβάλλοντος, ώστε να επιτευχθεί εμφύτευση της βλαστοκύστης και κατά συνέπεια εγκυμοσύνη. Φυσιολογικά και για περιορισμένο χρονικό διάστημα, αυτό συμβαίνει την 7<sup>η</sup> – 8<sup>η</sup> μέρα μετά την ωοθυλακιορρηξία, περίοδος που ονομάζεται και «παραθύρο εμφύτευσης».

Σε ορισμένες περιπτώσεις γυναικών το «παραθύρο εμφύτευσης» μπορεί να διαφέρει, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται εμφύτευση του εμβρύου λόγω ανεπάρκειας ενδομητρίου. Η ακαταλληλότητα του ενδομητρίου αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων εμφυτεύσεων, όταν οι βλαστοκύστες είναι καλής ποιότητας.

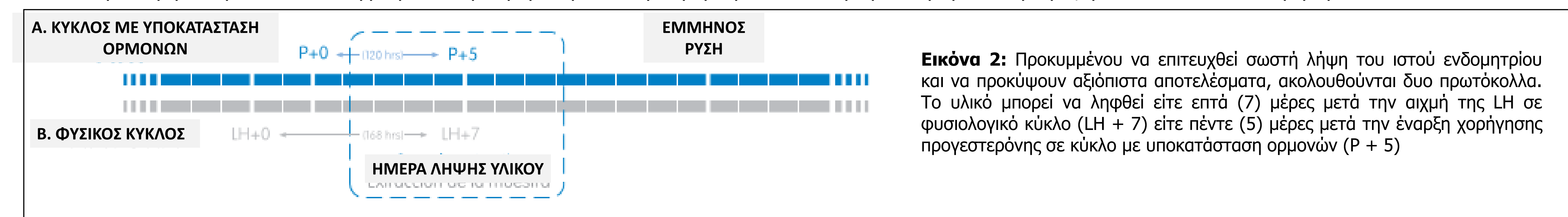
Μέχρι πρότινος, οι γνώσεις μας γύρω από τους μοριακούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται για τη διασφάλιση της δεκτικότητας του ενδομητρίου ήταν περιορισμένες ενώ η εκτίμηση της δεκτικότητας του ενδομητρίου γινόταν με βάση ιστολογικές και υπερηχογραφικές αναλύσεις. Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες διεθνών εργαστηρίων έχουν προσανατολιστεί προς αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιώντας μεγάλο εύρος αναλύσεις τόσο σε μεταγραφικό (transcriptomics) όσο και σε πρωτεϊνικό (proteomics) επίπεδο. Βασίζόμενοι στις μελέτες αυτές σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση με μοριακές τεχνικές της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες προσπάθειες και καλή ποιότητα εμβρύων, ώστε να προσδιοριστεί το «παραθύρο εμφύτευσης».



**Εικόνα 1:** Περιγραφή του γυναικείου κύκλου απεικονίζοντας τις αλλαγές που συμβαίνουν στο επιθήλιο του ενδομητρίου υπό την επίδραση των στεροειδικών ορμονών (E2, LH, FSH, PRG) κατά την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. [http://www.eleitho.gr/Scientific/fertility-days?A=WebApp&CCID=19045&Page=4&Items=3]

## Υλικά/Μέθοδος

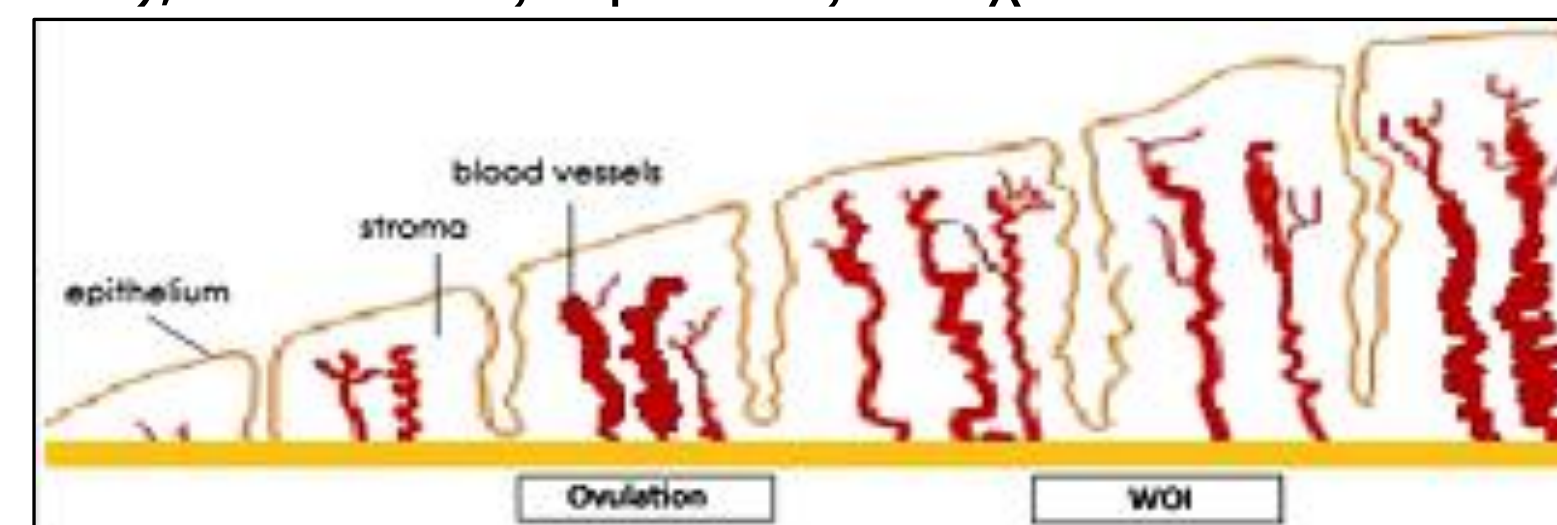
Είκοσι γυναίκες, που προσήλθαν στο κέντρο μας αντιμετωπίζοντας προβλήματα επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων εμφυτεύσεων, επιλέχθηκαν να συμπεριληφθούν στη μελέτη μετά από γραπτή συναίνεση. Ο μέσος όρος ηλικίας των γυναικών ήταν τα 38,04 (± 3,9) έτη ενώ η ποιότητα των εμβρύων τους ήταν καλή σύμφωνα με μορφολογικά κριτήρια. Η λήψη του ιστού ενδομητρίου έγινε με τη χρήση καθετήρα τύπου Pipelle κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες ακολουθώντας δύο πρωτόκολλα είτε i) επτά (7) μέρες μετά την αιχμή της LH σε φυσιολογικό κύκλο (LH + 7) είτε ii) πέντε (5) μέρες μετά την έναρξη χορήγησης προγεστερόνης σε κύκλο με υποκατάσταση ορμονών (P + 5) (**Εικόνα 2**). Η επιλογή της κατάλληλης μέρας συλλογής του υλικού στον φυσικό κύκλο καθορίστηκε από την μέτρηση της LH στο αίμα ενώ στον κύκλο με υποκατάσταση ορμονών καθορίστηκε από την τιμή της E2 στο αίμα και την υπερηχογραφική ανάλυση του ενδομητρίου (> 6,5 mm). Το υλικό ελέγχθηκε για τη διαφορική έκφραση 238 γονιδίων που σχετίζονται με την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarrays) σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του εξωτερικού (**Εικόνα 3**). Η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης κυμαίνονται στο 0,997 και 0,885, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαχωρίστηκαν με το εάν το υλικό είναι «δεκτικό» ή «μη δεκτικό». Στις περιπτώσεις αρνητικού αποτελέσματος η δοκιμασία επαναλήφθηκε είτε μια μέρα πριν είτε μια μέρα μετά ανάλογα με το μοριακό προφίλ, για να δοθεί νέα εκτίμηση.



**Εικόνα 2:** Προκυμμένοι να επιτευχθεί σωστή λήψη του ιστού ενδομητρίου και να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα, ακολουθούνται δύο πρωτόκολλα. Το υλικό μπορεί να ληφθεί είτε επτά (7) μέρες μετά την αιχμή της LH σε φυσιολογικό κύκλο (LH + 7) είτε πέντε (5) μέρες μετά την έναρξη χορήγησης προγεστερόνης σε κύκλο με υποκατάσταση ορμονών (P + 5)

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

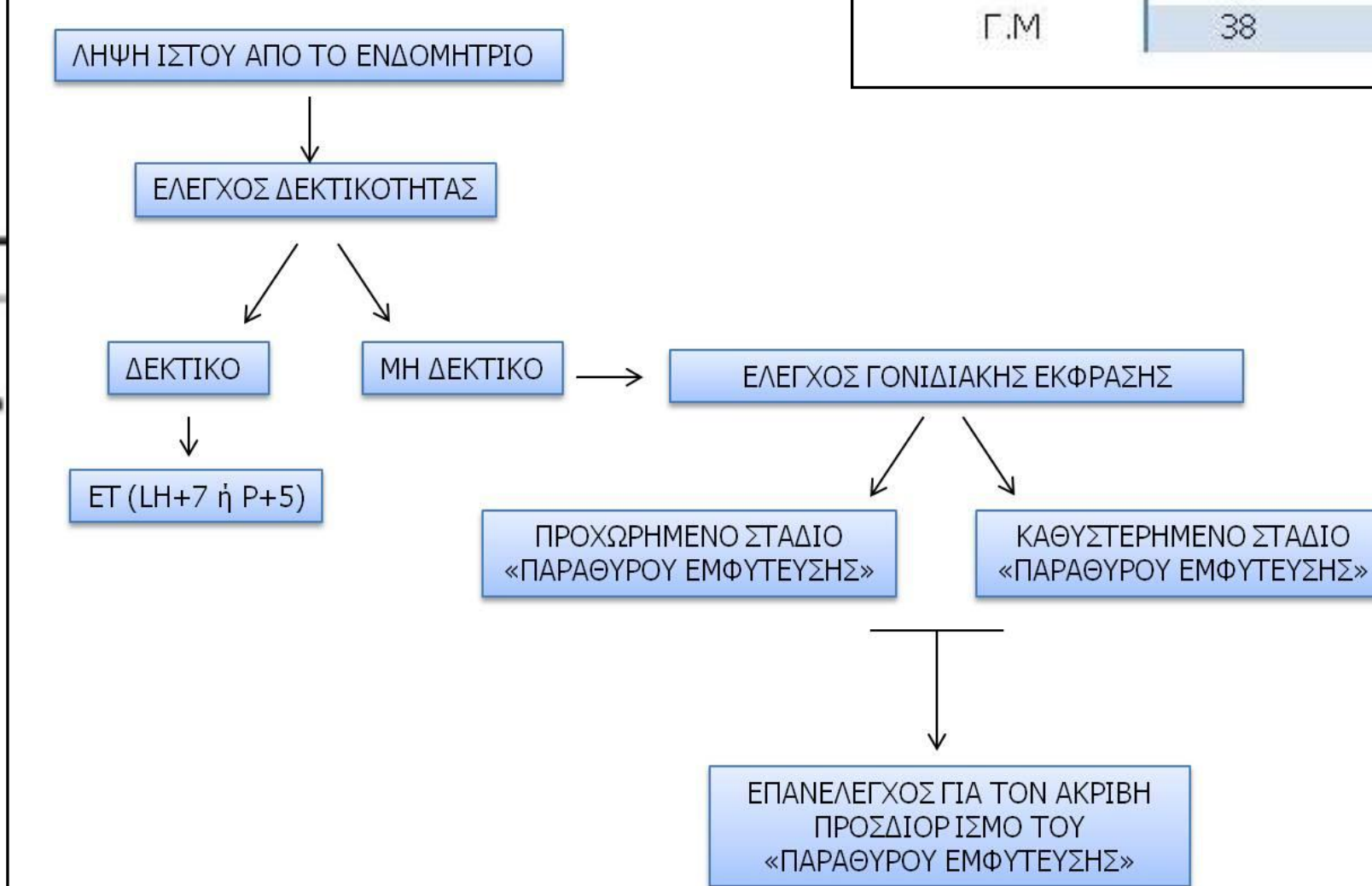
Συνολικά, σε 5 γυναίκες από τις 20 (25%), που υποβλήθηκαν σε έλεγχο υποδεκτικότητας ενδομητρίου, η δοκιμασία έδωσε αρνητικά αποτελέσματα (μη δεκτικό ενδομήτριο) και το υλικό χαρακτηρίστηκε ως «pre-receptive». Για τις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμασία επαναλήφθηκε πραγματοποιώντας βιοψία τη μέρα όπου LH + 9 στον φυσικό κύκλο ενώ στον κύκλο με υποκατάσταση ορμονών η προγεστερόνη χορηγήθηκε για μία επιπλέον μέρα P + 6 ή P + 7, έτσι ώστε να προσδιοριστεί επακριβώς η σωστή μέρα εμφύτευσης. Μετά τον επανέλεγχο και αφού επιβεβαιώθηκε η δεκτικότητα του ενδομητρίου τη συγκεκριμένη μέρα, πραγματοποιήθηκε εμβρυομεταφορά των βλαστοκύστεων στην αντίστοιχη μέρα (+6 ή +7), όπου 2 στις 5 γυναίκες πέτυχαν θετικά αποτελέσματα με τελειώμνη κύηση (**Πίνακας 1**).



**Εικόνα 3:** Κατηγορίες γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του ενδομητρίου ώστε να γίνει κατάλληλο για εμφύτευση. Η διαφορετική έκφραση των γονιδίων, που επάγεται ή αναστέλλεται μέσω των στεροειδικών ορμονών, είναι αυτή που θα καθορίσει το «παραθύρο εμφύτευσης». Garrido-Gomez.et al., 2013

**Πίνακας 1:** Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων μετά από έλεγχο 20 γυναικών με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης. Σε 5 γυναίκες βρέθηκε μη δεκτικό ενδομήτριο τη μέρα ελέγχου που αντιστοιχεί σε LH+7 ή P+5. Πραγματοποιήθηκε επανέλεγχος για να προσδιοριστεί με ακρίβεια το «παραθύρο εμφύτευσης». Στο 40% των περιπτώσεων είχαμε θετικό αποτέλεσμα β-χοριακής, όπου εξελίχθηκαν σε τελειώμνες κυήσεις.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ	ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ	ΗΜΕΡΑ ΕΜΒΡΥΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (hgh)
X.T	46	Κ.Φ	Μη Δεκτικό-pre receptive	LH+9	ΓΕΤΙΚΟ-ΔΙΔΥΜΗ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΗ ΚΥΨΗ
Κ.Μ	35	Κ.Φ	Μη Δεκτικό-pre receptive	P+6	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
N.O	40	Κ.Φ	Μη Δεκτικό-pre receptive	P+6	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
Γ.Ε	32	Κ.Φ	Μη Δεκτικό-pre receptive	P+6	ΓΕΤΙΚΟ-ΔΙΔΥΜΗ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΗ ΚΥΨΗ
Γ.Μ	38	Κ.Φ	Μη Δεκτικό-pre receptive	P+6	ΑΡΝΗΤΙΚΟ



**Εικόνα 4:** Σχηματικός αλγόριθμος που απεικονίζει τα βήματα που ακολουθούνται για τον έλεγχο δεκτικότητας του ενδομητρίου με μικροσυστοιχίες. Maria-Ruiz Alonso .et al., Fertility Sterility, 2013

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μια επιτυχής εμφύτευση προϋποθέτει καλής ποιότητας βλαστοκύστες, δεκτικό ενδομήτριο και συγχρονισμό του ενδομητρίου με το σωστό στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου. Πιθανολογείτε, ότι περίπου τα 2/3 των αποτυχημένων εμφυτεύσεων σε μια προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης οφείλονται στην παρουσία ενός μη δεκτικού ενδομητρίου. Οι τροποποιήσεις που προκαλούνται στο ενδομήτριο ώστε να γίνει δεκτικό ελέγχονται μέσα από τη συνεργική έκφραση διαφόρων γονιδίων και μπορεί να συμβεί μόνο σε συγκεκριμένες μέρες κατά την έμμηνο ρύση. Επομένως, ελέγχοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων σε ιστό ενδομητρίου με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις είμαστε σε θέση να αναγνωρίσουμε και να προσδιορίσουμε με ακρίβεια την ημέρα στην οποία το ενδομήτριο είναι δεκτικό. Στη συνέχεια, ακολουθώντας μια εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση για το κάθε ζευγάρι, αυξάνεται η πιθανότητα επιτυχίας μιας προσπάθειας εξωσωματικής γονιμοποίησης (**Εικόνα 4**).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Garrido-Gomez. Genomics of endometrial receptivity. Fertil Steril, 2013
- Maria-Ruiz Alonso et al., The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure, . Fertil Steril, 2013
- Mohan Sighn et al., Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors . Journal of Endocrinology, 2011