

Πηνελόπη Τομαρά

«Διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων της Prokineticin 1 (PROK-1) στο ωοθυλακικό υγρό με το ορμονικό προφίλ και την έκβαση του κύκλου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης στις Πτωχές Απάντητριες»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Prokineticin 1 (PROK-1) αποτελεί μια αγγειογενετική πρωτεΐνη με πλειοτροπικές ιδιότητες. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας λειτουργεί ως μια εκλεκτική πρωτεΐνη εξειδικευμένη για τους ιστούς που παρουσιάζουν ενδοκρινική λειτουργία. Εκτός από αγγειογενετικές ιδιότητες, η PROK-1 σε διάφορους ιστούς δρα ως πρωτεΐνη με μιτογόνο και αντι-αποπτωτικό ρόλο. Στην αναπαραγωγική οδό ο ρόλος της δεν έχει πλήρως κατανοηθεί ακόμα. Εκφράζεται στην ωοθήκη, τον πλακούντα και το ενδομήτριο Λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο της στην αναπαραγωγή, η PROK-1 μεσολαβεί σε σημαντικές αγγειογενετικές λειτουργίες στην εμβρυομητρική επιφάνεια. Έτσι, αλλαγές στην έκφραση ή/και την λειτουργία της PROK-1 οδηγούν σε διαταραχές της εγκυμοσύνης οφειλόμενες σε παθολογική εμφύτευση και σε δυσλειτουργία του πλακούντα. Επίσης, πρόσφατες δημοσιευμένες μελέτες έχουν καταδείξει ότι η PROK-1 συσχετίζεται με την ωοθηκική λειτουργία και την αναπτυξιακή ικανότητα του ωαρίου. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα που να συσχετίζουν την PROK-1 με το φαινόμενο της Πτωχής Ωοθηκικής Απάντησης (POR). Στο παρελθόν μελέτες που έγιναν σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF), συσχέτισαν αρνητικά τα επίπεδα της PROK-1 του ωοθυλακικού υγρού (FF PROK-1) με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων μετάφασης II (MII) και με τα επίπεδα της οιστραδιόλης (E2) την ημέρα πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας, υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδά της FF PROK-1 είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν ως ένας δείκτης της ωοθηκικής απάντησης στη θεραπεία IVF.

Η αγγειογένεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοθυλακίου. Το φαινόμενο αυτό ελέγχεται τόσο από αγγειογόνα όσο και από αντι-αγγειογόνα μηνύματα και η σωστή ισορροπία των δυο αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη της αγγείωσης του ωοθυλακίου σε κάθε στάδιο της ωοθυλακιογένεσης. Στον παρελθόν η έρευνα κατάφερε να ταυτοποιήσει αρκετούς παράγοντες κριτικής σημασία, όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), η PROK-1 (Prokineticin 1) και τον PEDF (Pigment Epithelium-derived Factor). Η Πτωχή Ωοθηκική Απάντηση θεωρείται μια από τις βασικές αιτίες υπογονιμότητας, ωστόσο η παθοφυσιολογία του φαινομένου δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Διάφορα δημοσιευμένα δεδομένα έχουν αποδείξει ότι στους POR ασθενείς υπάρχει μικρότερος βαθμός αγγείωσης του ωοθυλακίου και διαταραγμένες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αγγείωση στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου. Αυτό καταδεικνύει ότι η διαταραχή των αγγειογενετικών μηχανισμών μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ωοθηκική διέγερση, οδηγώντας σε μικρότερο αριθμό ληφθέντων ωαρίων και σε χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης. Σε αυτή την περίπτωση η αναγνώριση των πρωτεϊνών που έχουν επηρεαστεί και η ανεύρεση των μοριακών αλληλεπιδράσεων θα βοηθήσει στην εν τω βάθει κατανόηση του φαινομένου POR και θα διευκολύνει την εύρεση νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα στοχεύουν συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση.

Η παρούσα μελέτη διερευνά την πιθανή συσχέτιση των FF PROK-1 επιπέδων σε POR περιστατικά με το αποτέλεσμα της διέγερσης, όπως επίσης και με τις συγκεντρώσεις άλλων παραγόντων του ωοθυλακικού υγρού, που σχετίζονται με την

ωοθηκική λειτουργία, όπως ο Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ο Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) και ο Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF). Συνολικά συμπεριλήφθηκαν 32 ασθενείς που ορίστηκαν ως Πτωχές Απαντήτριες σύμφωνα με τα κριτήρια της Bologna. Τα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της ωοληψίας και ύστερα φυγοκεντρήθηκαν και φυλάχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως την ανάλυση. Τα επίπεδα των PROK1, VEGF, BMP-15 και PEDF αξιολογήθηκαν με την μέθοδο ELISA με την χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση της R γλώσσας προγραμματισμού.

Η παρούσα μελέτη για πρώτη φορά ποσοτικοποιεί τα επίπεδα της PROK-1 στο ωοθυλακικό υγρό πτωχών απαντητριών. Οι συγκεντρώσεις της FF PROK-1 και του FF VEGF ήταν $3229.63 \pm 2372.66\text{ }\mu\text{g/ml}$ και $2309.63 \pm 412.49\text{ }\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο μέσος όρος των επιπέδων της BMP-15 ήταν $434.13 \pm 106.38\text{ }\mu\text{g/ml}$. Η συγκέντρωση του PEDF στο ωοθυλακικό υγρό των POR γυναικών ήταν $7.43 \pm 1.95\text{ }\mu\text{g/ml}$. Με στόχο να εμβαθύνουμε περισσότερο αναφορικά με τα αγγειογενετικά φαινόμενα, υπολογίστηκε ο λόγος FF PEDF/VEGF. Ο μέσος όρος της τιμής του λόγου ήταν 3.33 ± 1.08 . Τα επίπεδα της PROK-1 συσχετίστηκαν αρνητικά με τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων -0.37 (P-value=0.01) και τον αριθμό των ΜΠ ωαρίων -0.33 (P-value=0.03). Ο BMP-15 συσχετίστηκε θετικά με τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων 0.31 (P-value=0.04). Ο VEGF συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα της AMH -0.33 (P-value=0.03) και τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων -0.30 (P-value=0.05). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της FF PROK-1 συσχετίζονται με την ανταπόκριση των ωοθηκών στον πληθυσμό POR και παρουσιάζουν παρόμοιες συσχετίσεις με τον VEGF. Συγκρίνοντας τα επίπεδα των FF PROK-1 και FF VEGF της μελέτης με αυτά προηγούμενων μελετών μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ωοθήκη των POR γυναικών εμφανίζει βλάβες στα φυσιολογικά φαινόμενα της αγγειογένεσης, οδηγώντας στην αύξηση των PROK-1 και VEGF πρωτεϊνών πιθανώς μέσω ανατροφοδοτικών μηχανισμών.

Στους περιορισμούς της μελέτης συγκαταλέγονται ο μικρός πληθυσμός, καθώς και η έλλειψη δεδομένων που αφορούν την έκβαση της IVF. Επιπλέον, είναι απαραίτητα μοριακά δεδομένα σχετικά με τον πιθανό ρόλο της PROK-1 στο POR φαινόμενο. Συμπερασματικά, περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίο να διεξαχθούν ώστε να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

ABSTRACT

“Investigating the correlation between Prokineticin 1 follicular fluid levels with the hormonal profile and with the In Vitro Fertilization outcome in Poor Responders”

Prokineticin 1 (PROK-1) is an angiogenic protein with pleiotropic properties. Previous studies have shown that this factor functions as a selective protein specific for tissues exhibiting endocrine function. In addition to angiogenic properties, PROK-1 in various tissues acts as a protein with mitogenic and anti-apoptotic roles. In the reproductive tract its role is not yet fully understood. It is expressed in the ovary, placenta and endometrium. Considering its role in reproduction, PROK-1 mediates important angiogenic functions in the embryo-maternal interface. Thus, changes in PROK-1 expression and/or function lead to pregnancy complication due to abnormal implantation and placental dysfunction. In addition, recent published studies have demonstrated that PROK-1 correlates with ovarian function and oocyte

developmental capacity. However, there are no data correlating PROK-1 with the phenomenon of Poor Ovarian Response (POR). Previous studies in patients undergoing in vitro fertilization (IVF) have negatively correlated follicular fluid PROK-1 (FF PROK-1) levels with the number of mature metaphase II (MII) oocytes and estradiol (E2) levels on the day of ovulation induction, indicating that FF PROK-1 levels are likely to be used as an indicator of ovarian response to IVF treatment.

Angiogenesis plays an important role in follicle development and maturation. This phenomenon is controlled by both angiogenic and anti-angiogenic signals, and the proper balance of the two is a prerequisite for the development of follicular vasculature at each stage of folliculogenesis. In the past, research has been able to identify several factors of critical importance, such as VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PROK-1 (Prokineticin 1) and PEDF (Pigment Epithelium-derived Factor). Poor Ovarian Response is considered one of the major causes of infertility, however the pathophysiology of the phenomenon has not been fully elucidated. Several published data have demonstrated that in POR patients there is a lower degree of follicular vascularization and impaired concentrations of vascularization-related proteins in the follicular microenvironment. This demonstrates that disruption of angiogenic mechanisms can negatively affect ovarian stimulation, leading to a lower number of oocytes retrieved and lower pregnancy rates. In this case, identifying the affected proteins and finding the molecular interactions will help to gain a deeper understanding of the POR phenomenon and facilitate the identification of new therapeutic strategies targeting specific molecular pathways that regulate angiogenesis.

The present study investigates the possible correlation of FF PROK-1 levels in POR cases with the outcome of stimulation, as well as with the concentrations of other factors in follicular fluid associated with ovarian function, such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF). A total of 32 patients defined as Poor responders according to the Bologna criteria were included. Follicular fluid samples were collected during oocyte retrieval and then centrifuged and stored at -80 °C until analysis. The levels of PROK1, VEGF, BMP-15 and PEDF were assessed by ELISA using a commercially available kit. Statistical analysis was performed using R programming language.

The present study for the first time quantifies PROK-1 levels in the follicular fluid of poor responders. The concentrations of FF PROK-1 and FF VEGF were 3229.63 ± 2372.66 pg/ml and 2309.63 ± 412.49 pg/ml, respectively. In addition, the mean levels of BMP-15 were 434.13 ± 106.38 pg/ml. The concentration of PEDF in the follicular fluid of POR women was 7.43 ± 1.95 ng/ml. In order to go deeper regarding the angiogenic phenomena, the FF PEDF/VEGF ratio was calculated. The mean value of the ratio was 3.33 ± 1.08 . PROK-1 levels were negatively correlated with the number of oocytes retrieved -0.37 (P-value=0.01) and the number of MII oocytes -0.33 (P-value=0.03). BMP-15 was positively correlated with the number of oocytes retrieved 0.31 (P-value=0.04). VEGF was negatively correlated with AMH levels -0.33 (P-value=0.03) and number of oocytes retrieved -0.30 (P-value=0.05). These data support that FF PROK-1 levels correlate with ovarian response in the POR population and show similar correlations with VEGF. By comparing the FF PROK-1 and FF VEGF levels of this study with those of previous studies, we can hypothesize that the ovaries of POR women are impaired in the physiological phenomena of angiogenesis, leading to an increase in PROK-1 and VEGF proteins possibly through feedback mechanisms.

Limitations of the study include the small population and the lack of data regarding IVF outcome. In addition, molecular data on the possible role of PROK-1 in the POR phenomenon are needed. In conclusion, more studies are necessary to be conducted to confirm the findings of the present study.