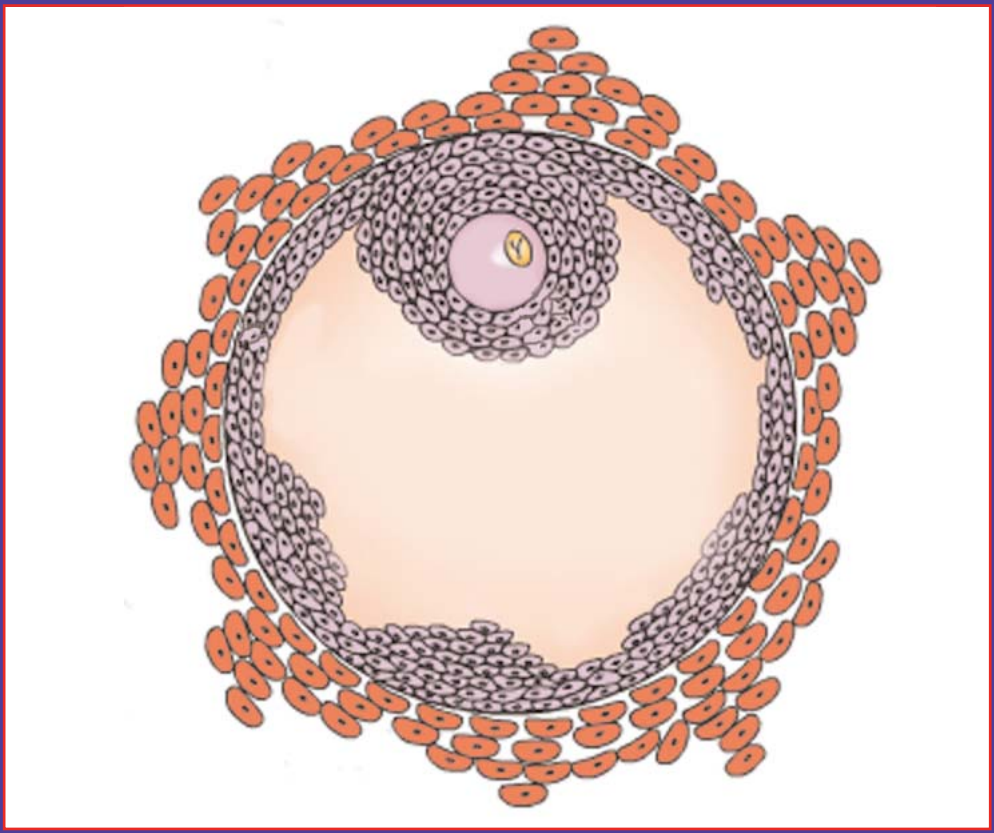
Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής &
Αναγεννητικής Ιατρικής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική
Υπεύθυνος Καθηγητής: Δ. Λουτράδης

Διπλωματική
για Δίπλωμα Ειδίκευσης (M.Sc.)
στην "Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική"

# Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων OCT-4, DAZL και σουρβαϊβίνη (SURVIVIN) στα ανθρώπινα ωοθυλακικά ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών, γυναικών που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI) και εμβρυομεταφορά: Κλινικές συσχετίσεις

ΜΙΧΑΗΛ ΒΑΡΡΑΣ



ΑΘΗΝΑ 2012

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής &
Αναγεννητικής Ιατρικής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική
Υπεύθυνος Καθηγητής: Δ. Λουτράδης

# Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων OCT-4, DAZL και σουρβαϊβίνη (SURVIVIN) στα ανθρώπινα ωοθυλακικά ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών, γυναικών που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI) και εμβρυομεταφορά: Κλινικές συσχετίσεις

ΜΙΧΑΗΛ ΒΑΡΡΑΣ

Διπλωματική
για Δίπλωμα Ειδίκευσης (M.Sc.)
στην “Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική”

ΑΘΗΝΑ 2012

**Στην σύζυγό μου Έφη,**
**και στις κόρες μου Νάντια και Φανή-Νίκη,**
**για την υπομονή τους...**

**Επιστημονικά υπεύθυνος**
**του Μεταπτυχιακού Προγράμματος**
**του Τμήματος Ιατρικής**
**του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**
**“ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ - ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ”**
**Καθηγητής: Δ. Λουτράδης**

**Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ, Καθηγητής**
**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής (επιβλέπων)**
**ΠΕΤΡΟΣ ΔΡΑΚΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής**

**Εκ βαθέων ευχαριστώ ιδιαιτέρως τους:**

**κ. Δημήτρη Λουτράδη**

**κ. Κωνσταντίνο Στεφανίδη**

**κ. Μαρίνα Ματζουράνη**

**κ. Ντέπη Μαυρογιάννη**

**κ. Κατερίνα Πολονύφη**

**κ. Θεοδώρα Γρίβα**

**κ. Ρίτσα Μπλέτσα**

**κ. Βάλια Ντινοπούλου**

**κ. Χριστίνα Μάρα**

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Να καθορίσουμε την συχνότητα έκφρασης των γονιδίων SURVIVIN, OCT-4 και DAZL στα ανθρώπινα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών κατά την διάρκεια της ωοθηκικής πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας σε γυναίκες με φυσιολογικά επίπεδα FSH, που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI). Να διερευνήσουμε την ύπαρξη ή μη βλαστικών κυττάρων στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου. Να εξετάσουμε εάν τα επίπεδα έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων στα κοκκιώδη κύτταρα θα μπορούσαν να υποδηλώνουν τον αριθμό των ωαρίων, που ανευρίσκονται κατά την ωοληψία, την ποιότητα των ωαρίων και την ικανότητα για περαιτέρω ανάπτυξη. Να ανακαλύψουμε τυχόν συσχετίσεις της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων με κλινικές παραμέτρους των ασθενών, την αποτελεσματικότητα της πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας και την έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) ή μικρογονιμοποίησης (ICSI). Να εξερευνήσουμε εάν τα υπό εξέταση γονίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν μοριακούς προγνωστικούς δείκτες για την ανάπτυξη των εμβρύων ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα για επιτυχή εγκυμοσύνη με τις τεχνολογίες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, βελτιστοποιώντας την επιλογή των ωαρίων και εμβρύων.

**Σχεδιασμός:** Προδρομική κλινική έρευνα σε ασθενείς που υποβλήθησαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI).

**Τόπος Μελέτης:** Τμήμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και αναπαραγωγικής ιατρικής της Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ" και Ερευνητικό Εργαστήριο Πρώτης Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "ΛΑΙΚΟ".

**Ασθενείς:** Γυναίκες που υποβλήθησαν σε IVF ή ICSI μετά από πρόκλη-

ση ωοθυλακιορρηξίας με γοναδοτροπίνες έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για να λάβουν μέρος στην έρευνα. Είκοσι εννέα (29) γυναίκες εξετάσθηκαν για έκφραση του γονιδίου SURVIVIN και είκοσι μία (21) για έκφραση των γονιδίων OCT-4 and DAZL. Οι αιτίες υπογονιμότητας ήταν αντρικός ή σαλπιγγικός παράγοντας.

**Παρεμβάσεις:** Σε γυναίκες που υποβλήθησαν σε ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση μετρήθηκαν τα επίπεδα των ορμονών τους, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρακολουθήθηκε υπερηχογραφικά και η ωοληψία έγινε μετά την χορήγηση της hCG. Τα ωάρια απογυμνώθηκαν από τα κοκκιώδη κύτταρά τους μηχανικά και τα κοκκιώδη κύτταρα αναλύθηκαν για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Σε όλες τις ασθενείς μεταφέρθηκαν τρία έμβρυα.

**Υλικό και Μέθοδοι:** Όλες οι ασθενείς υποβλήθησαν σε ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση με το ίδιο στάνταρ πρωτόκολλο ανάλογου GnRH-ανασυνδιασμένης FSH. Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών και αντίστροφα μεταγράφηκε σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους ανιχνευτές για SURVIVIN, OCT-4 και DAZL. Τα SURVIVIN mRNA, OCT-4 mRNA και DAZL mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα ανιχνεύθηκαν με RT-PCR με τη χρήση φθοριζόντων ανιχνευτών υβριδοποίησης. Για να καθορισθεί το σταθερό ποσό για τα επίπεδα SURVIVIN mRNA, OCT-4 mRNA και DAZL mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα αναπτύχθηκε μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (QC RT-PCR). Ο αριθμός των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων των δειγμάτων ομαλοποιήθηκε σύμφωνα με τον αριθμό των μεταγράφων των γονιδίων αναφοράς ABL και G6PD. Η απόλυτη έκφραση του SURVIVIN mRNA υπολογίσθηκε σαν τον λόγο SURVIVIN mRNA / ABL mRNA, του OCT-4 mRNA σαν τον λόγο OCT-4 mRNA / G6PD mRNA και του DAZL mRNA σαν τον λόγο DAZL mRNA / G6PD mRNA.

**Κύριες Μετρήσεις Έκβασης:** Καθορίσθηκε η συχνότητα έκφρασης των γονιδίων: SURVIVIN, OCT-4 και DAZL στα ανθρώπινα κοκκιώδη κύτταρα

των ωοθυλακίων των ωοθηκών, των γυναικών που μελετήθηκαν. Οι μεταβλητές που αναλύθηκαν περιλάμβαναν: την ηλικία των γυναικών, το BMI, τις αιτίες υπογονιμότητας, την διάρκεια υπογονιμότητας, τις προηγούμενες προσπάθειες IVF/ICSI, τις συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος της FSH, LH, οιστραδιόλης, AMH στην αρχή του γεννητικού κύκλου, τα επίπεδα προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους έξι (6) κύκλους, τα επίπεδα της 17-βητα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH και την ημέρα χορήγησης της hCG, την διάρκεια διέγερσης, την ολική δόση της FSH, την ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας, την ωριμότητα των ωαρίων, την ποιότητα των εμβρύων (grade), την ικανότητα για γονιμοποίηση και τα ποσοστά εγκυμοσύνης.

**Αποτελέσματα:** ABL και SURVIVIN mRNA ανιχνεύθηκε στα κοκκιώδη κύτταρα σε ποσοστό 93.1% (27/29). Ο διάμεσος για SURVIVIN mRNA /ABL mRNA ήταν 0.45 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.22 έως 2.94. Τα επίπεδα έκφρασης του SURVIVIN mRNA ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα στις φυσιολογικές γυναίκες (αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας) συγκριτικά με γυναίκες με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας (p=0.007, Wilcoxon ran-sum test). G6PD και OCT-4 mRNA ανιχνεύθηκε στα κοκκιώδη κύτταρα σε ποσοστό 47.6%. Ο διάμεσος για OCT-4 mRNA / G6PD mRNA ήταν 1.75 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.10 έως 98.21. Τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 mRNA συσχετίσθηκαν στατιστικά με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία. Όταν η έκφραση OCT-4 mRNA ήταν υψηλότερη τότε περισσότερα από έξι (6) ωάρια ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.037, Wilcoxon rank-sum). Δεν ανιχνεύθηκε DAZL mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 mRNA δεν συσχετίσθηκαν στατιστικά με τα επίπεδα έκφρασης του SURVIVIN mRNA (Spearma's rho=0.429, p=0.289). Δεν υπήρχαν επιπρόσθετες στατιστικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του SURVIVIN mRNA ή του OCT-4 mRNA και στα επίπεδα της οιστραδιόλης ή την συνολική δόση της FSH που χρειάσθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας ή τον αριθμό των κυρίαρχων ωοθυλακίων

που αναρροφήθηκαν ή το ποσοστό των κλινικών κυήσεων αντίστοιχα. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του SURVIVIN mRNA και τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία. Δεν υπήρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα και την ωοθηκική ανταπόκριση στις γοναδοτροπίνες. Επίσης, δεν υπήρχε επίδραση στα ποσοστά κλινικών κυήσεων ανάμεσα στην ύπαρξη ή την απουσία έκφρασης του OCT-4 mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα ή ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής του.

**Συμπεράσματα:** Υψηλά επίπεδα της έκφρασης του SURVIVIN mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα φαίνεται να παρατηρούνται σε περιπτώσεις υπογονιμότητας όταν υπάρχει σαλπιγγικός παράγοντας για πιθανή προστασία από την απόπτωση. Ένας υποπληθυσμός των ασθενών με χαμηλά επίπεδα SURVIVIN mRNA θα μπορούσε να ωφεληθεί με μικρογονιμοποίηση (ICSI), αποφεύγοντας τους πιθανούς φυσικούς φραγμούς της αλληλεπίδρασης σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Τόσο η έκφραση του OCT-4 mRNA, ο οποίος είναι ένας τυπικός δείκτης βλαστικών κυττάρων, όσο και η απουσία του DAZL mRNA, ο οποίος είναι ένας τυπικός δείκτης γεννητικών κυττάρων, αυξάνουν τις ενδείξεις ότι ένας υποπληθυσμός ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων σε υγιή ωοθηκικά ωοθυλάκια (47.6%) αποτελείται από βλαστικά κύτταρα, τα οποία όμως δεν προέρχονται από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Ο αυξημένος αριθμός των ωαρίων που ανευρίσκονται κατά την ωοληψία, φαίνεται να σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 mRNA. Η έκφραση του OCT-4 mRNA στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων φαίνεται ότι δεν χρειάζεται για την προστασία τους από την απόπτωση.

**Λέξεις κλειδιά:** Απόπτωση, ανθρώπινη ωοθήκη, ωοθηκικά ωοθυλάκια, κοκκιώδη κύτταρα, ποιότητα ωαρίων, βαθμός εμβρύου, POU5F1, OCT-4, SURVIVIN, DAZL,IVF, ICSI, βλαστικά κύτταρα

# ABSTRACT

**Objective:** To determine the incidence of expression of SURVIVIN, OCT-4 and DAZL in human granulosa cells during ovarian stimulation in women with normal FSH levels, undergoning IVF or ICSI. To investigate the presence or not of stem cells in follicular granulosa cells. To test if the levels of genes expression in granulosa cells could indicate number of oocytes retrieved, oocyte quality and developmental competence. To discover any correlation of genes expression with the clinical parameters of patients, the efficacy of ovulation and the outcome of IVF or ICSI. To explore if the examnined genes could be molecular prognostic markers for embryo development to increase the chance of a successful pregnancy with assisted reproductive technologies by optimizing oocyte and embryo selection.

**Designe:** Prospective Clinical research study of patients undergoing IVF or ICSI.

**Setting:** IVF Center, University Department of Obstetrics and Gynecology, “Alexandra” General Hospital, Athens and Research Laboratory, First Department of Internal Medicine, “Laiko” General Hospital, Athens, Greece

**Patient(s):** Women undergoing oocyte retrieval for IVF or ICSI after ovulation induction with gonadotropins gave written consent to participate in this study. Twenty nine women were examine for SURVIVIN gene expression and twenty one for OCT-4 and DAZL gene expression. The causes of infertility were male or tubal factor.

**Intervention(s):** Controlled ovarian hyperstimulation, serum hormone level measurements, ultrasonographic scanning of ovarian follicles, oocyte retrieval after hCG administration and embryo transfer were performed. Cumulus–oocyte complexes were denuded separately and the

cumulus cells were analyzed for each patient separately. In all cases three embryos were transferred.

**Material and Methods:** All of the patients were stimulated with standard GnRH analogue-recobinant FSH protocol. Total RNA was extracted from granulosa cells and was reverse transcribed into cDNA using specific designed primers for SURVIVIN, OCT-4 and DAZL. SURVIVIN mRNA, OCT-4 mRNA and DAZL mRNA in human granulosa cells were detected by RT-PCR using fluorescent probes. To determine the steady amount for SURVIVIN, OCT-4 and DAZL mRNA levels in granulosa cells, a quatitative competitive PCR (QC RT-PCRE) was developed. The number of trancripts of studied target genes was normalized according to the number of trancripts of the internal standard genes ABL and G6PD. The respective quatitative ratio was determined by the density of each target to the internal standard: Survivin mRNA / ABL mRNA, OCT-4 mRNA / G6PD mRNA and DAZL mRNA / G6PD mRNA.

**Main Outcome Measure(s):** The expression rates of SURVIVIN, OCT-4 and DAZL of granulosa cells surrounding the oocytes were determined in the studied patients. Many variables were analyzed: age, BMI, infertility causes, infertility duration, previous IVF/ICSI cycles, serum concentrations of FSH, LH, progesterone, AMH at the beginning of the mentrual cycle, serum PRL levels, as measured during one of the previous six months, serum 17b-estradiol levels on the 5th day of FSH treatment and on the day of hCG, duration of stimulation, total FSH dose used for ovarian stimulation, ovarian response, oocyte maturity, embryo quality (grade), good quality embryos score, fertilization and pregnancy rates.

**Results:** ABL and SURVIVIN mRNA was detected in the granulosa cells in 93.1% (27/29). The median of SURVIVIN mRNA /ABL mRNA was 0.45 with intra-quarteral range from 0.22 to 2.94. The quatitative ratio of Survivin mRNA was significantly lower in normal women (male infertility factor) compared to women with tubal infertility factor (p=0.007, Wilcoxon ran-sum test). G6PD and OCT-4 mRNA was detected in the

granulosa cells in 47.6% (10/21). The median of OCT-4 mRNA / G6PD mRNA was 1.75 with intra-quarteral range from 0.10 to 98.21. The OCT-4 mRNA expression was statistically significant correlated with the number of oocytes retrieved; when the OCT-4 mRNA expression was higher then more than six oocytes were retrieved (p=0.037, Wilcoxon rank-sum). No detection of DAZL mRNA was found in granulosa cells. The levels of expression of OCT-4 were not connected with the levels of expression of SURVIVIN (Spearman's rho=0.429, p=0.289). There was no additional statistically significant correlation between the levels of SURVIVIN or OCT-4 expression and the estradiol levels or the dosage of FSH for ovulation induction or the number of dominant follicles aspirated or the clinical pregnancy rates respectively. There was no statistically significan correletion between the levels of SURVIVIN expression and the number of retrieved oocytes. No association was found between the presence or absence of OCT-4 mRNA expression in granulosa cells and the ovarian response to gonadotropin stimulation. Also, no influence on pregnancy was observed between presence and abscence of OCT-4 mRNA expression in granulosa cells or accordingly to its expession levels.

**Conclusions:** High levels of SURVIVIN mRNA expression in luteinized granulosa cells in cases with tubal infertility seems to be observed for possible protection from follicular apoptosis. A subpopulation of patients with low levels of SURVIVIN mRNA in granulosa cells might benefit with ICSI treatment to bypass possible natural barriers of the sperm-oocyte interactions. The expression of OCT-4 mRNA, which is a typical stem cell marker and the abscence of expression of DAZL mRNA, which is a typical germ cell marker, both increase the indications that a subpopulation of luteinized granulosa cells in healthy ovarian follicles (47.6%) consists of stem cells which are not originated from primordial germ cells. Increased number of oocytes retrieved seems to correlate to higher levels of OCT-4 mRNA expression. Oct-4 expression in luteinized granulosa cells seems not to be required for protection from apoptosis.

**Key Words:** Apoptosis, human ovary, ovarian follicle, granulosa cells, oocyte quality, embryo grade, POU5F1, OCT-4, SURVIVIN, DAZL,IVF, ICSI, stem cells

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**.....v
**ABSTRACT**.....ix
**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**.....xii

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

**Η ανατομία και βιολογία των ωοθηκών του ανθρώπου** .....1
**1.1. Η εμβρυολογία της ωοθήκης και η διαφοροποίηση ενός θήλεος εμβρύου**.....1
**1.2. Η ανατομία της ωοθήκης**.....3
**1.2.1.** Κατασκευή της ωοθήκης.....4
**1.2.2.** Στήριξη της ωοθήκης.....8
**1.2.3.** Αγγείωση της ωοθήκης.....9
1.2.3.1. Αρτηρίες της ωοθήκης.....9
1.2.3.2. Φλέβες της ωοθήκης..... .10
**1.2.5.** Νεύρωση της ωοθήκης..... ....10
**1.3. Λειτουργία της ωοθήκης**..... ...11
**1.4. Μειωτικές διαιρέσεις του ωοκυττάρου**.....11
**1.5. Η γονιμοποίηση**..... 16
**1.6. Περιγραφή του ώριμου ωοθυλακίου**.....18
**1.7. Οι ορμόνες κατά τον γεννητικό κύκλο**.....18
**1.7.1.** FSH.....20
**1.7.2.** Οιστραδιόλη.....21
**1.7.3.** LH.....21
**1.7.4.** Προγεστερόνη.....22
**1.7.5.** Ανασταλτίνη.....22
**1.7.6.** Ακτιβίνη.....22.
**1.8. Το μοντέλο των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροπινών**.....23
**1.81.** Φάση ωρίμανσης των ωοθυλακίων ή ωοθυλακική φάση ή παραγωγική φάση.....23
**1.8.2.** Φάση ωχρού σωματίου .....27

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**

**Η απόπτωση και επιβίωση στην ωοθήκη και η SURVIVIN στην αναπραγωγική ιατρική**.....21.

**2.1. Γενικά περί απόπτωσης**.....21

**2.2. Η σήμανση NODAL και η απόπτωση**.....32

**2.3. Η υπεροικογένεια του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (NTF) και η απόπτωση**.....33

**2.4. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η απόπτωση**.....34

**2.5. Τα εξωγενή μονοπάτια της απόπτωση**.....35

**2.6. Τα ενδογενή μονοπάτια της απόπτωσης**.....36

**2.7. Γονίδια επιβίωσης**.....41

**2.7.1.** Η κινάση PI3K και η επιβίωση.....41

**2.7.2.** Η οικογένεια Bcl-2 και η επιβίωση.....41

**2.7.3.** Ο συνδέτης του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων και η επιβίωση.....43

**2.7.4.** Η οικογένεια των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis proteins, IAPs) του ανθρώπου και η επιβίωση.....43

2.7.4.1. Η X-συνδεδεμένη αναστολέας της απόπτωσης πρωτεΐνη (XIAP) και η επιβίωση.....45

2.7.4.2. Η SURVIVIN και η επιβίωση.....45

2.7.4.3. Ο ρόλος της SURVIVIN στην αναστολή της απόπτωσης.....48

2.7.4.4. Ο ρόλος της SURVIVIN στην καρκινογένεση.....49

**2.7.5.** Η απόπτωση και επιβίωση στην ωοθήκη και οι μοριακοί μηχανισμοί.....51

2.7.5.1. Η πρωτεΐνη Bax και η απόπτωση στην ωοθήκη.....54

2.7.5.2. Η υπεροικογένεια του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων και η απόπτωση στην ωοθήκη.....54

2.7.5.3. Οι κασπάσες και η απόπτωση στην ωοθήκη.....56

2.7.5.4. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η απόπτωση στην ωοθήκη.....56

2.7.5.5. Μέλη της υπεροικογένειας του TGF-β (transforming

growth factor-β) και η απόπτωση στην ωοθήκη.....57
2.7.5.6. Η κινάση Akt και η επιβίωση στην ωοθήκη.....57
2.7.5.7. Τα μέλη της οικογένειας bcl-2 και η επιβίωση στην ωοθήκη.....58
2.7.5.8. Ο KIT-συνδέτης, οι c-KIT υποδοχείς και η επιβίωση στην ωοθήκη.....60
2.7.5.9. Ο παράγοντας των βλαστικών κυττάρων και η επιβίωση στην ωοθήκη.....60
2.7.5.10. Μέλη της οικογένειας του TGF-β (Transfroming growth factor-β) και η επιβίωση στην ωοθήκη.....60
2.7.5.11. Οι γοναδοτροπίνες και η επιβίωση στην ωοθήκη.....61
2.7.5.12. Τα οιστρογόνα και η επιβίωση στην ωοθήκη.....62
2.7.5.13. Η ινσουλίνη, οι αυξητικοί παράγοντες ινσουλίνης, οι υποδοχείς του και η επιβίωση στην ωοθήκη.....62
2.7.5.14. Ο EGF, ο TGF-α και η επιβίωση στην ωοθήκη.....63
2.7.5.15. Η αυξητική ορμόνη (GH) και η επιβίωση στην ωοθήκη.....63
2.7.5.16. Η οικογένεια IAP (inhibitors of apoptosis) και η επιβίωση στην ωοθήκη.....63

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**

**Τα βλαστικά κύτταρα και τα γονίδια OCT-4 και DAZL**.....65
**3.1. Γενικά περί βλαστικών κυττάρων**.....65
**3.2. Ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα**.....69
**3.3. Θεραπευτική χρήση των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων**.....69
**3.4. Ενήλικα ή σωματικά βλαστικά κύτταρα**.....69
**3.5. Θεραπευτική χρήση των βλαστικών κυττάρων των ενηλίων**.....71
**3.6. Ικανότητα αναγέννησης (renewal) των γεννητικών κυττάρων**.....72
**3.7. Το γονίδιο του παράγοντα Oct-4 (POU5F1)**.....73
**3.8. Τα γονίδια της οικογένειας DAZL**.....78

**3.9. Η πολυδυναμικότητα (multipotency) των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων των ώριμων ωοθυλακίων: ένα νέο πεδίο έρευνας**.....81

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

**Υλικό και Μέθοδοι**.....85

**4.1. Προέλευση των δειγμάτων**.....85

**4.2. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας**.....86

**4.3. Παράμετροι αξιολόγησης**.....88

**4.4. Εγχύληση του RNA**.....90

**4.5.Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA**.....90

**4.6. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (με φθορίζοντες ανιχνευτές υβριδοποίησης) για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN**.....90

**4.7. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (με φθορίζοντες ανιχνευτές υβριδοποίησης) για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων OCT-4 και DAZL**.....94

**4.8. Στατιστική ανάλυση**.....95

4.8.1. Στην περίπτωση έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN.....95

4.8.2. Στην περίπτωση έκφρασης του γονιδίου OCT-4.....96

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

**Αποτελέσματα**

**5.1. Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας**.....97

**5.2. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI**.....98

**5.3. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης του γονιδίου OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI**.....166

**5.4. Η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων OCT-4 και**

SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI και εμβρυομεταφορά.....228
5.5. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης του γονιδίου DAZL στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI....221

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ
Συμπεράσματα -Συζήτηση
6.1. Η έκφραση του γονιδίου OCT-4 και η απουσία έκφρασης του γονιδίου DAZL στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI.....222
6.2. Η έκφραση του γονιδίου SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI.....226
6.3. Η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων OCT-4 και SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI.....228

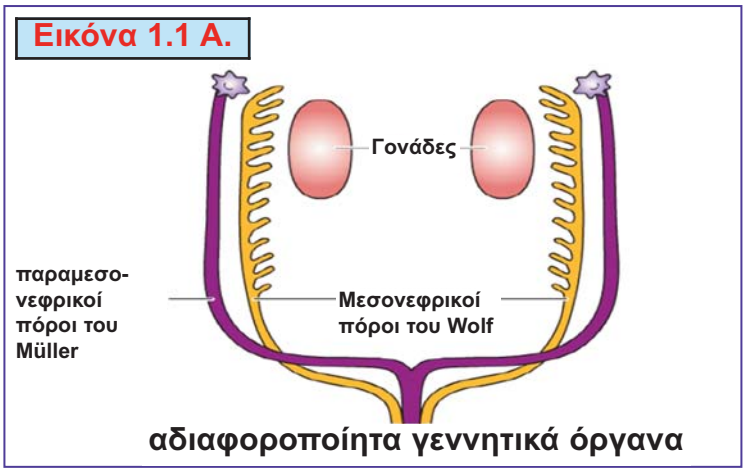
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....230

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

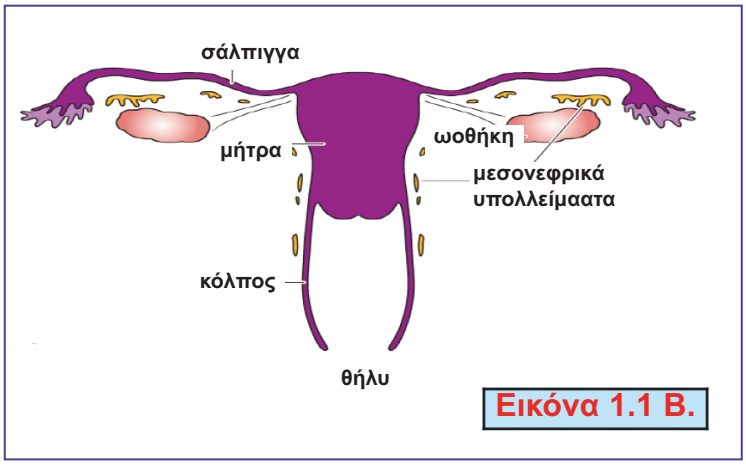
# Η ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

## 1.1. Η εμβρυολογία της ωοθήκης και η διαφοροποίηση ενός θήλεος εμβρύου

Μια αλληλουχία γεγονότων ξεκινάει από τον **καρυότυπο** και οδηγεί σε έκφραση γονιδίων με αποτέλεσμα τον **καθορισμό του φύλου** (sex determination) και στην συνέχεια η δράση ορμονών επιφέρει την **διαφοροποίηση του φύλου** (sex differentiation) που οδηγεί στην διαμόρφωση των έσω και έξω γεννητικών οργάνων. Κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες της εμβρυϊκής ανάπτυξης ο **γεννητικός κρημνός** (gonadal ridge), τα **αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** (germ cells), τα ζεύγη των **εσωτερικών πόρων** (internal ducts) (Wolffian και Müllerian) και τα έξω γεννητικά όργανα είναι όμοια και αμφιδύναμα τόσο στα 46XX όσο και στα 46XY έμβρυα. Ο **γοναδικός κρημνός** (gonadal ridge) θα διαφοροποιηθεί σε ωοθήκες ή όρχεις. Τα **γεννητικά κύτταρα** θα διαφοροποιηθούν σε ωοκύτταρα ή σπερματοκύτταρα. Το ένα ζευγάρι εσωτερικών πόρων θα αναπτυχθεί, ενώ το άλλο θα υποστραφεί. Τα αμφιδύναμα έξω γεννητικά όργανα θα αρρενοποιηθούν ή θα παραμείνουν θήλεος. Ο **αμφιδύναμος γεννητικός κρημνός** βρίσκεται στο έμβρυο των 5 εβδομάδων στην μέση γραμμή των **ουρογεννητικών κρημνών**. Τα **αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** (primordial germ cells) παράγονται εξωγοναδικώς από το ενδόδερμα και μετά την τέταρτη εβδομάδα της




εγκυμοσύνης μεταναστεύουν από τα τοιχώματα του **λεκιθικού ασκού** (yolk sac) προς τον **γοναδικό κρημνό** (gonadal ridge). Για την μετανάστευση αυτή των γεννητικών κυττάρων είναι απαραίτητος ο Kit συνδέτης και ο υποδοχέας του c-kit, ο οποίος είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης (Nilsson and Skinner, 2001). Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα αρχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους κατά την μετανάστευση και κατά την έκτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης, στο τέλος του αδιαφοροποίητου σταδίου, έχουν πολλαπλασιαστεί με μιτώσεις σε έναν συνολικό αριθμό 10.000. Κατά την




**Εικόνες 1.1Α & 1.1Β. Η διαφοροποίηση του θήλεος εμβρύου** (Fritz and Speroff, 2011).

έκτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης οι αδιαφοροποίητες γονάδες (indifferent gonads) περιέχουν τα γεννητικά κύτταρα και υποστηρικτικά κύτταρα που προέρχονται από το **βλαστικό επιθήλιο** (coelomic epithelium) και το **μεσέγχυμα του γεννητικού κρημνού** (Fritz and Speroff, 2011). Στο θήλυ είναι απαραίτητη η εγκατάσταση των γεννητικών κυττάρων στην αρχέγονη ωοθήκη για την διαφοροποίησή της και την λειτουργικότητά της. Έτσι, εάν δεν επιτελεσθεί η εγκατάσταση των αργέγονων γεννητικών κυττάρων στις ωοθήκες, δημιουργούνται **ταινιοειδείς γονάδες** (steak gonads) (Merchant-Larios and Centeno, 1981; Oktem and Oktay, 2009). Σε αντίθεση, στο άρρεν η εγκατάσταση των γεννητικών κυττάρων στην αρχέγονη γονάδα είναι απαραίτητη για την γονιμότητα όχι όμως και για την διαφοροποίηση του όρχεος και την λειτουργικότητά του (Johnson and Everitt, 1991).

Ο παράγων, ο οποίος καθορίζει εάν η αδιαφοροποίητη γονάδα θα γίνει όρχης ονομάζεται **TDF** (testes-determing factor) και είναι προϊόν ενός γονιδίου που εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα στην **περιοχή SRY** (sex-determine region). Η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο αυτό περιέχει μιά περιοχή πρόσδεσης του DNA για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (transcription) γονιδίων που οδηγούν την ανάπτυξη των σωματικών κυττάρων των γονάδων σε ωοθυλάκια ή κύτταρα Sertoli. Γονίδια όμοια με το γονίδιο SRY είναι τα γονίδια SOX. Η έκφραση του γονιδίου SRY προχωράει την έκφραση των γονιδίων SOX. Το γονίδιο SOX9 ρυθμίζεται προς τα πάνω από τον στεροειδογενετικό παράγοντα-1 (SF1) και τον παράγοντα Fgf9 (fibroblast growth factor 9). Γονίδια τα οποία προκαλούν την δημιουργία της ωοθήκης είναι τα γονίδιο ***Wht4***, ***Rspo1***, ***Dax1*** και ***Foxl2*** (Fritz and Speroff, 2011).

Οι όρχεις εκκρίνουν δύο βασικές ορμόνες (i) τα ανδρογόνα από τα κύτταρα του Leydig και (ii) την αντιμυλλέρια ορμόνη (AMH) από τα κύτταρα του Sertoli. Με την κρίση των δύο αυτών ορμονών από τους όρχεις γίνεται η διαφοροποίηση ενός εμβρύου προς άρρεν. Στο θήλυ έμβρυο η απουσία τοπικής παραγωγής τεστοστερόνης προκαλεί την υποστροφή των Wolffian πόρων. Η απουσία παραγωγής της αντιμυλλέριας ορμόνης προκαλεί την παραμονή των πόρων του Müller και αναπτύσσονται οι σάλπιγγες, η μήτρα, ο τράχηλος, το άνω τριτημόριο του κόλπου, τα παραωοθήκιο, και το επωοθήκιο (**Εικόνες 1.1A και 1.1B**). Το παραωοθήκιο και επωοθήκιο είναι υπολείμματα του πόρου του Wolf στο μεσοσαλπίγγιο. Στο θήλυ έμβρυο οι **ουρηθρικές πτυχές** (urethral folds) και τα **γεννητικά εξογκώματα** (genital swellings) παραμένουν χωριστά και σχηματίζουν τα μικρά και μεγάλα χείλη. Από το **γεννητικό φύμα** (genital tubercle) σχηματίζεται η κλειτορίδα. Έκθεση ενός θήλεος εμβρύου στα ανδρογόνα έχει ως συνέπεια την αρρενοποίηση των έξω γεννητικών του οργάνων, ενώ ευνουχισμός ή καταστολή των ενδογενών ανδρογόνων σε ένα άρρεν έμβρυο έχει ως συνέπεια την θηλεοποίηση των έξω γεννητικών του οργάνων (Johnson and Everitt, 1991).

## 1.2. Η ανατομία της ωοθήκης

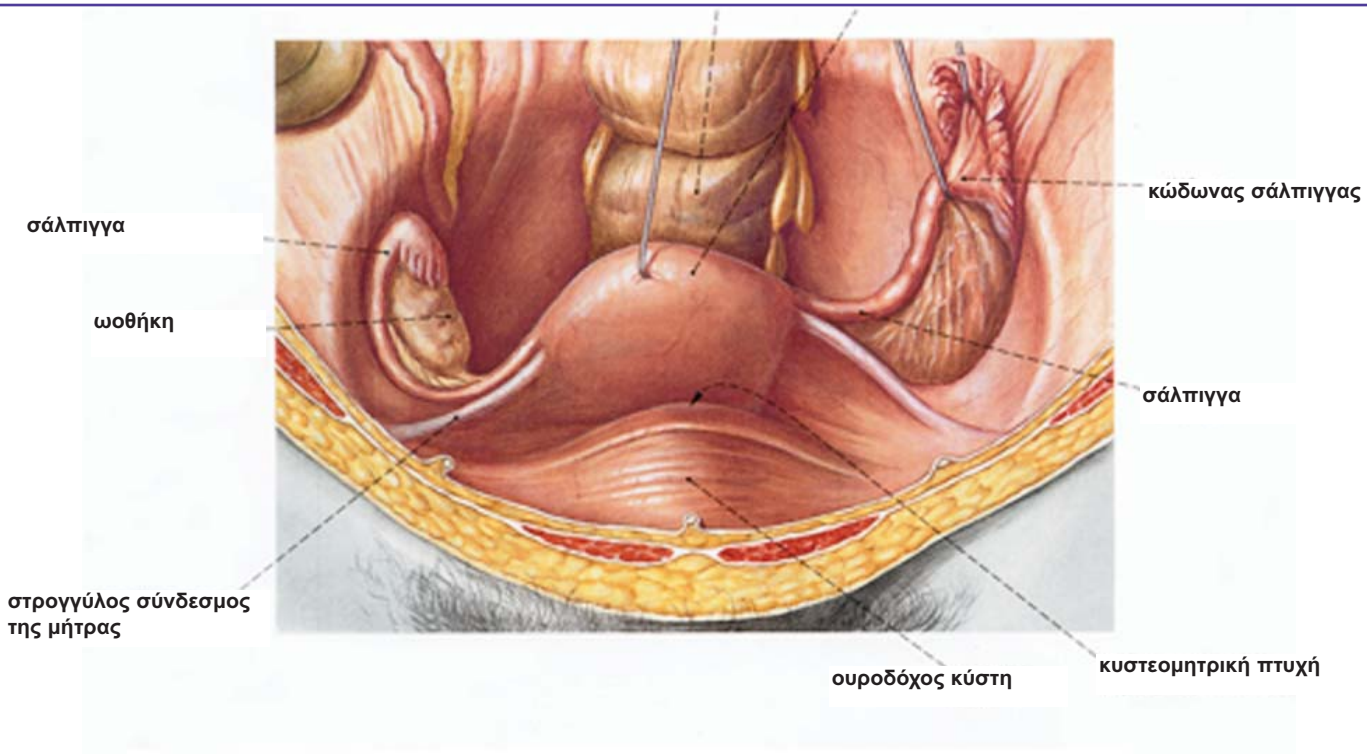
Οι δύο ωοθήκες (δεξιά και αριστερά) αποτελούν τους γυναικείους γεννητικούς αδένες και έχουν σχήμα αμυγδάλου (**Εικόνα 1.2**). Κατά την αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας

παρατηρούνται διαφόρου μεγέθους οζώδεις σχηματισμοί ή ουλές ή συρρικνώσεις που οφείλονται σε ωοθυλάκια, ωχρά σωμάτια (corpora lutea) και λευκά σωμάτια (corpora albiantes). Οι φυσιολογικές διαστάσεις κάθε ωοθήκης ποικίλλουν από γυναίκα σε γυναίκα και κατά μέσο όρο σε μια γυναίκα της αναπαραγωγικής ηλικίας είναι 3 x 2 x 2 - cm με μέσο όγκο 6-ml (3 x 2 x 2 : 2). Στην παιδική ηλικία ο όγκος της ωοθήκης είναι μικρότερος από 1 ml, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες φθάνει τα 2,5 ml. Το βάρος πριν την εμμηνόπαυση είναι 7-14 g και πολύ μικρότερο μετά την εμμηνόπαυση λόγω ατροφίας (Αραβαντινός, 1982, Shaw et al, 1992).

Ο επιμήκης άξονας της ωοθήκης είναι κάθετος και έτσι υπάρχει ένας άνω και κάτω πόλος. Ο άνω πόλος της ωοθήκης αντιστοιχεί περίπου στο ύψος του επιπέδου της εισόδου της πυέλου. Στον άνω πόλο της ωοθήκης συνάπτεται ο κρεμαστήρας σύνδεσμος (infundibulo-pelvic ligament) (περιτοναϊκή αναδίπλωση) και ίνες του κωδωνικού στομίου της σάλπιγγας. Ο κάτω πόλος της ωοθήκης απέχει 2-cm από το πυελικό έδαφος. Στον κάτω πόλο συνάπτεται ο **μητρο-ωοθηκικός σύνδεσμος**, ο οποίος συνδέει την ωοθήκη με τον πυθμένα της μήτρας (uterine cornu) (Αραβαντινός, 1982, Shaw et al, 1992).

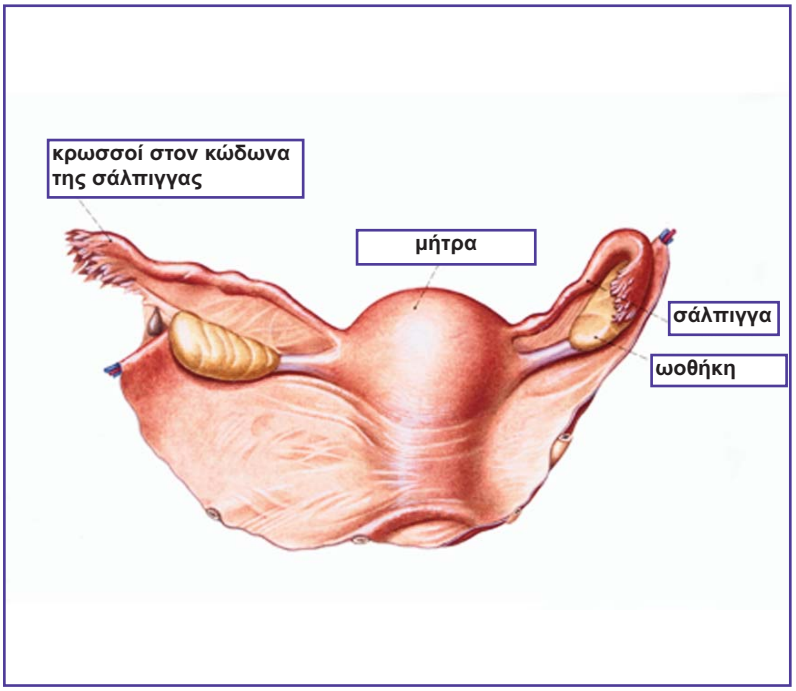
Η ωοθήκη έχει δύο χείλη: Το **πρόσθιο χείλος** (anterior border) και το **οπίσθιο χείλος** (posterior border) (**Εικόνα 1.3**). Το πρόσθιο χείλος της ωοθήκης λέγεται και πυλαίο γιατί από αυτό μπαίνουν στην ωοθήκη αγγεία και νεύρα. Στο πρόσθιο χείλος συνάπτεται το **μεσοωοθήκιο**, το οποίο είναι μια πτυχή δύο στιβάδων του περιτοναίου από την οπίσθια επιφάνεια του πλατέος συνδέσμου (broad ligament). Το οπίσθιο χείλος της ωοθήκης είναι ελεύθερο. Η ωοθήκη φέρει δύο επιφάνειες: την **έσω** και **έξω επιφάνεια**. Η έξω επιφάνεια της ωοθήκης (lateral surface) βρίσκεται σε επαφή με τον **ωοθηκικό βόθρο** (ovarian fossa). Ο ωοθηκικός βόθρος είναι ένα τριγωνικό περιτοναϊκό εντύπωμα και βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον διχασμό της κοινής λαγόνιας αρτηρίας και σε μικρή απόσταση μπροστά από την είσοδο του ουρητήρα στην πύελο. Ο ωοθηκικός βόθρος αφορίζεται από τα έξω και έσω λαγόνια αγγεία. Η έσω επιφάνεια της ωοθήκης (medial surface) αντικρύζει προς τα μέσα τον οπίσθιο Δουγλάσειο χώρο (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

### 1.2.1. Κατασκευή της ωοθήκης



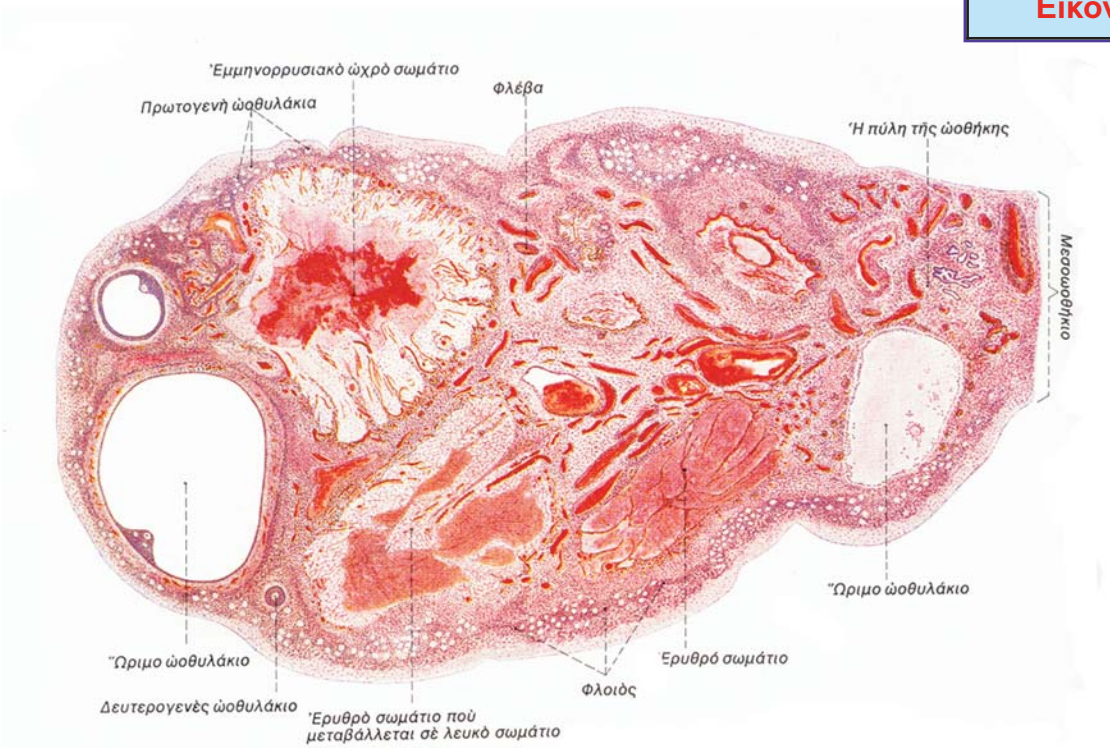

**Εικόνα 1.2. Η μήτρα με τις ωοθήκες και τις σάλπιγγές της** - από πάνω όψη (h.f.fullman Ατλας Ανατομίας 2009).

Οι ωοθήκες παρουσιάζουν **φλοιώδη** (cortex) **μοίρα** περιφερικά και **μυελώδη** (medulla) **μοίρα** κεντρικά. Η επιφάνειά τους καλύπτεται από το σπλαχνικό ή βλαστικό επιθήλιο (germinal epithelium). Η φλοιώδης μοίρα αποτελείται από το στρώμα μέσα στο οποίο βρίσκονται ωοθυλάκια και ωχρά σωμάτια σε διάφορα στάδια ωρίμανσης ή υποστροφής (**Εικόνες 1.4 & 1.5**). Στην παιδική ηλικία υπάρχουν τα αρχέγονα, πρωτογενή και δευτερογενή

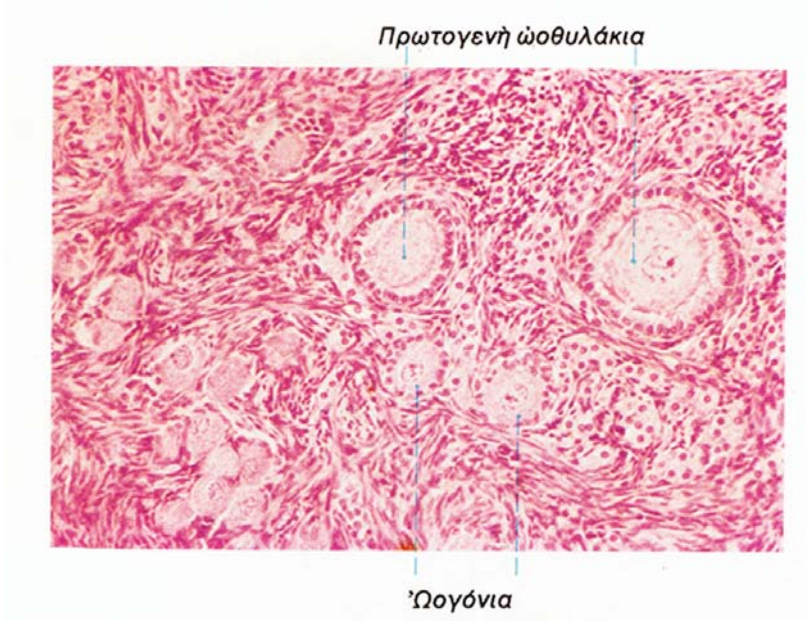



**Εικόνα 1.3. Η μήτρα με τις ωοθήκες και τις σάλπιγγές της** - οπίσθια όψη (h.f.fullman Ατλας Ανατομίας 2009).

Εικόνα 1.4



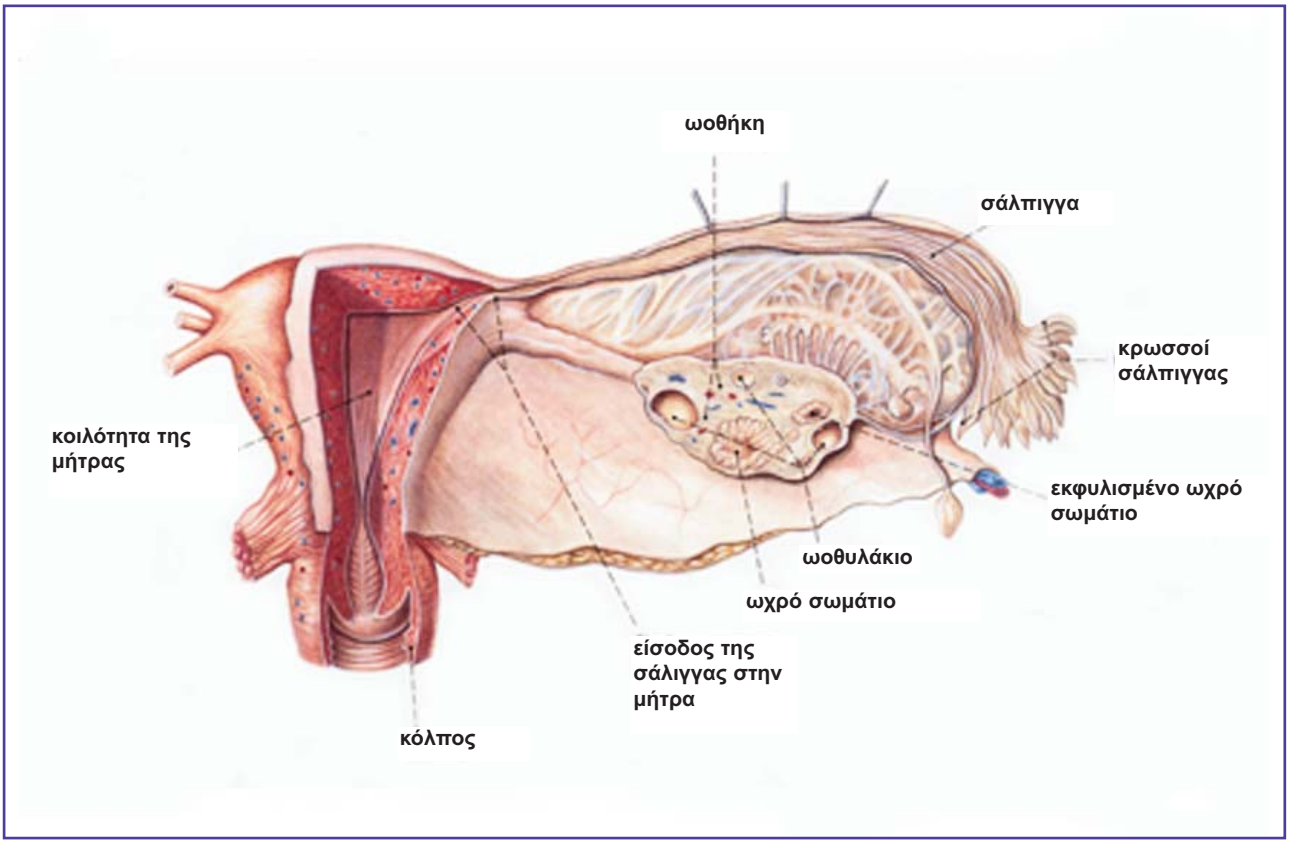

**Εικόνα 1.4 Πλήρης εγκάρσια τομή από ανθρώπινη ωοθήκη.** Χρώση Α και Η. Μεγένθυση x 10.




Εικόνα 1.5

**Εικόνα 1.5. Φλοιϊκή περιοχή από ανθρώπινη ωοθήκη.** Απεικονίζονται αρκετά αρχέγονα και δύο πρωτογενή ωοθυλάκια. Τα πρωτογενή ωοθυλάκια χαρακτηρίζονται από 1) ένα υψηλότερο και αργότερα πολύστιβο επιθήλιο που αποτελείται από κυβικά ή χαμηλά κυλινδρικά κοκκιώδη κύτταρα 2) από μια υαλώδη μεμβράνη που ονομάζεται διαφανής ζώνη και βρίσκεται ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα κοκκιώδη κύτταρα και 3) από το ωοκύτταρο. Χρώση Α και Η. Μεγένθυση x 150. (Sobotta/Hammersen, Ιστολογία 1982).

ωοθυλάκια, ενώ στην ωοθήκη της γεννητικής ηλικίας υπάρχουν και τα ώριμα ωοθυλάκια. Η φλοιώδης μοίρα ωοθήκης είναι το κατεξοχήν λειτουργικό τμήμα της. Το στρώμα είναι ένας ορμονικά ενεργής ιστός. Η μυελώδης μοίρα αποτελείται από συνδετικό ιστό, ελαστικές ίνες, λείες μυικές ίνες, λεμφοφόρα και αιμοφόρα αγγεία. Βρίσκονται διάφορα εμβρυϊκά υπολείμματα και τα κύτταρα της πύλης (hilar cells) που μορφολογικά θεωρούνται ανάλογα με τα διάμεσα κύτταρα του Leydig του όρχεως. Το **βλαστικό επιθήλιο** (germinal epithelium) είναι μονόστιβο κυβικό και καλύπτει  την έξω επιφάνεια της ωοθήκης. Η ωοθήκη δεν έχει περιτοναϊκό επικάλυμα. Κάτω από το βλαστικό επιθήλιο είναι μια στιβάδα πλούσια σε κολλαγόνο και ονομάζεται **ινώδης χιτώνας** (tunica albuginea) (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

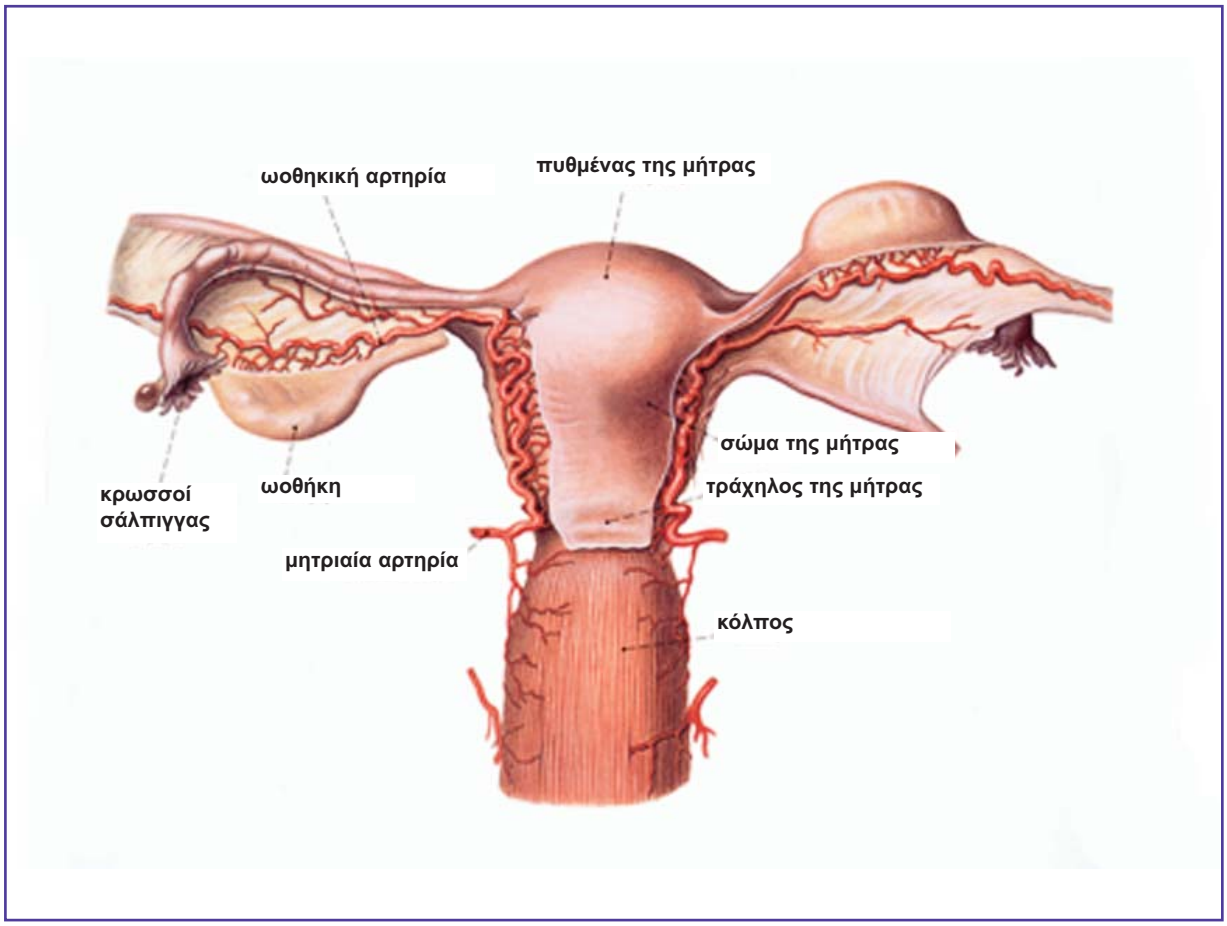



**Εικόνα 1.6. Η μήτρα με τις ωοθήκες και τις σάλπιγγές της** σε γυναίκα αναπαραγωγικής ηλικίας. Έχει αφαιρεθεί σφηνοειδές τμήμα του τοιχώματος της μήτρας. Η ωοθήκη και η σάλπιγγα απεικονίζονται σε επιμήκη διατομή (h.f.fullman Ατλας Ανατομίας 2009).

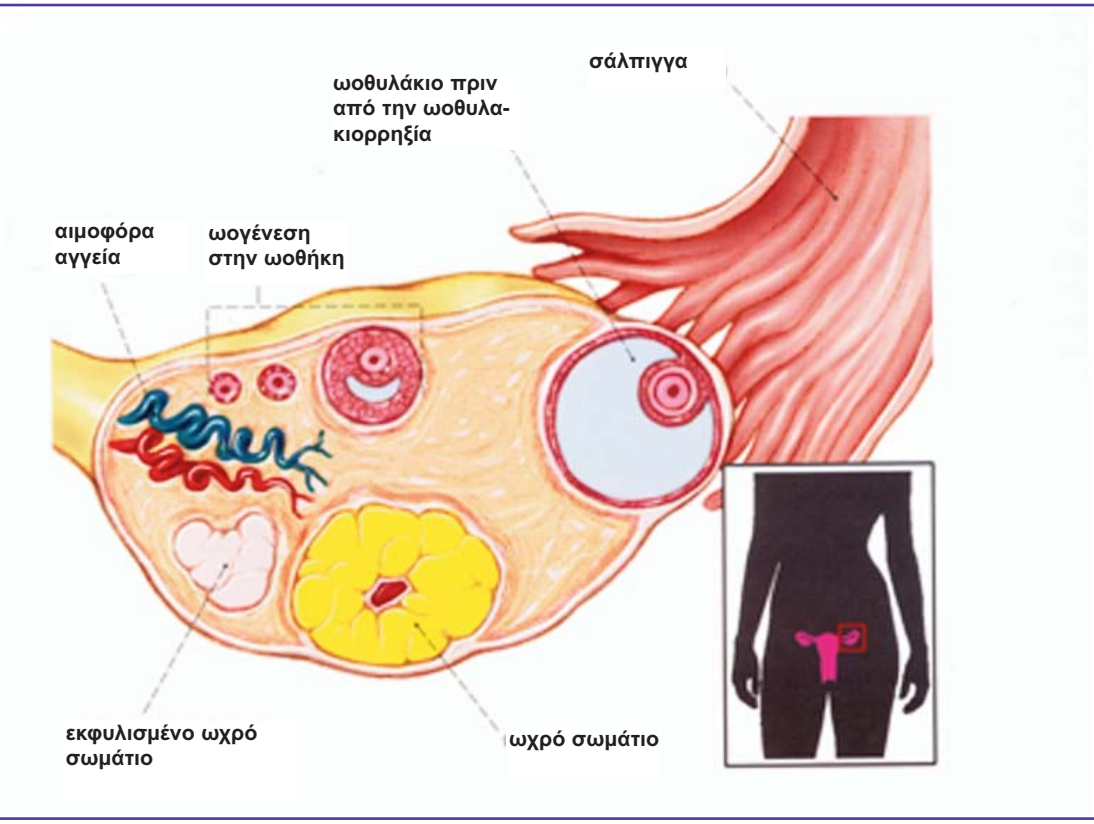
### 1.2.2. Στήριξη της ωοθήκης (Εικόνα 1.6)

1. **Το μεσωοθήκιο** (mesovarium). Είναι μια πτυχή της οπίσθιας επιφάνειας του πλατέως συνδέσμου που συνδέει το πρόσθιο χείλος της ωοθήκης στον πλατύ σύνδεσμο (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

2. **Ο κρεμαστήρας σύνδεσμος** (infundibulopelvic ligament). Είναι τμήμα του πλατέως συνδέσμου που εκφύεται από την λαγόνιο περιτονία και καταφύεται στον άνω πόλο της ωοθήκης. Ο κρεμαστήρας σύνδεσμος συνδέει την ωοθήκη στο πλάγιο πυελικό τοίχωμα και περιέχει τα ωοθηκικά αγγεία και νεύρα. Κάτω από τον κρεμαστήρα σύνδεσμο και σε μικρή




**Εικόνα 1.7. Τα αρτηριακά στελέχη των έσω γεννητικών οργάνων της γυναίκας.**
Έχει αφαιρεθεί τμήμα του περιτοναίου (h.f.fullman Ατλας Ανατομίας 2009).




**Εικόνα 1.8. Η ωοθήκη σε εγκάρσια διατομή.** Σχηματική απεικόνιση που δείχνει την θέση της ωοθήκης στο σώμα. Φαίνεται η ανάπτυξη του ωχρού σωματίου που παράγει την προγεστερόνη (h.f.fullman Ατλας Ανατομίας 2009).

απόσταση περνάει ο ουρητήρας (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

3. **Ο μητροωοθηκικός σύνδεσμος** (ovarian ligament). Εκφύεται από την οπίσθια επιφάνεια του κέρατος της μήτρας, φέρεται μέσα στον πλατύ σύνδεσμο και καταφύεται στον κάτω πόλο της ωοθήκης. Ο μητροωοθηκικός σύνδεσμος αποτελετείται από συνδετικό ιστό με λείες μυϊκές ίνες (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

4. **Ο ωοθηκικός κροσσός** (ovarian fibria). Είναι ο μεγαλύτερος από τους κροσσούς του κώδωνα της σάλπιγγας (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

### 1.2.3. Αγγείωση της ωοθήκης

#### 1.2.3.1. Αρτηρίες της ωοθήκης

Οι **ωοθηκικές αρτηρίες** (**Εικόνα 1.7**) είναι κλάδοι της **κοιλιακής αορτής** και εκφύονται από την κοιλιακή αορτή ακριβώς κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες. Μερικές φορές η αριστερή ωοθηκική αρτηρία προέρχεται από την **αριστερή νεφρική αρτηρία** και όχι κατευθείαν από την αορτή. Η ωοθηκική αρτηρία αναστομώνεται με τον ωοθηκικό και σαλπιγγικό κλάδο της μητριαίας αρτηρίας και έτσι υπάρχει παράπλευρη κυκλοφορία εάν ο κρεμαστήρας σύνδεσμος υποστεί διατομή ή απόφραξη (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

### 1.2.3.2. Φλέβες της ωοθήκης

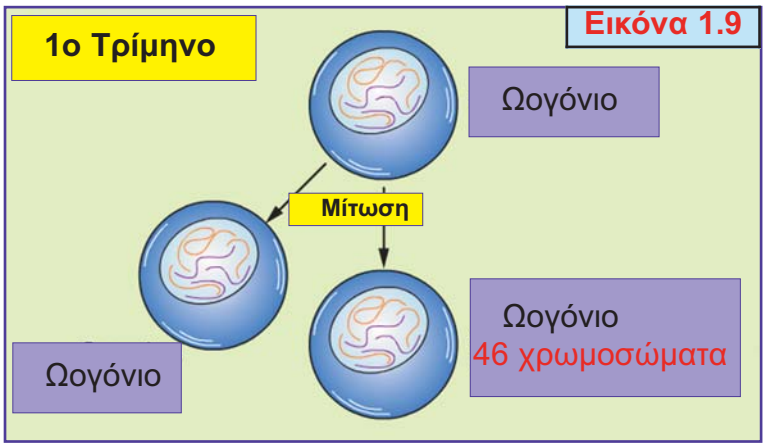
Οι φλέβες των ωοθηκών καθώς βγαίνουν από τις πύλες σχηματίζουν ένα ελικοειδές πλέγμα από το οποίο αρχίζει η δεξιά και αριστερή **ωοθηκική φλέβα** που εκβάλλει δεξιά στην **κάτω κοίλη φλέβα** και αριστερά στην αριστερή **νεφρική φλέβα** (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

### 1.2.3.3. Λεμφαγγεία της ωοθήκης

Τα λεμφαγγεία ανέρχονται κατά μήκος της ωοθηκικής αρτηρίας δεξιά και αριστερά αντίστοιχα και εκβάλλουν στα **παρα-αορτικά λεμφαγγεία** εγγύς της νεφρικής αρτηρίας (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).

### 1.2.3.4. Νεύρωση της ωοθήκης

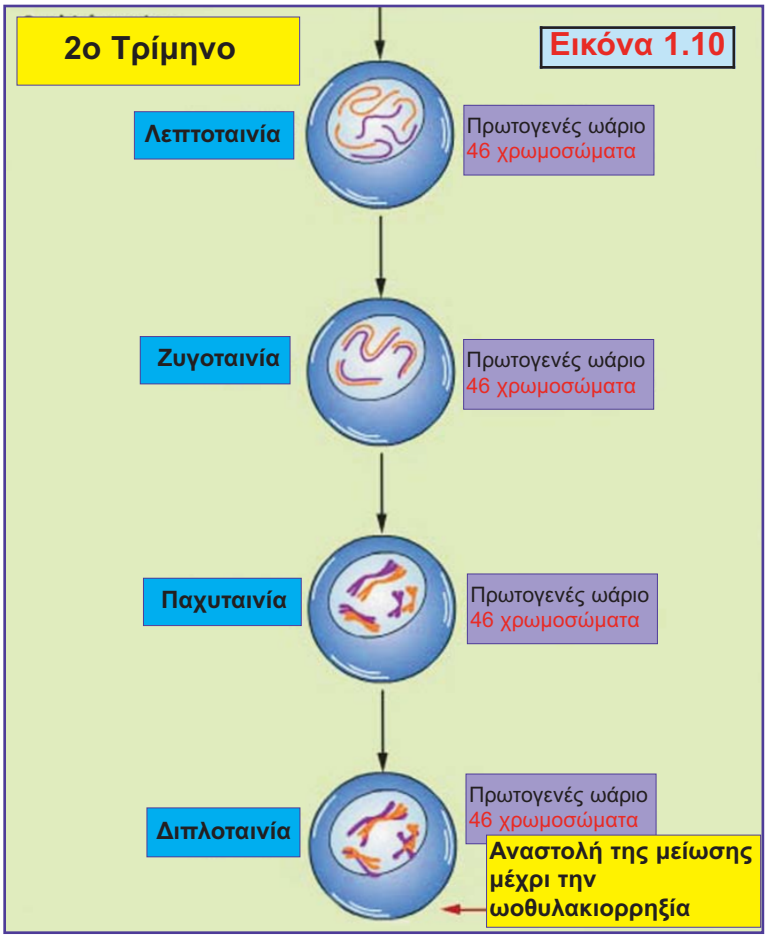
Η νεύρωση της ωοθήκης προέρχεται από κλάδους (1) του **ωοθηκικού πλέγματος** (plexus ovaricus) (2) του **αορτικού πλέγματος** (aortic plexus) και (3) του **νεφρικού πλέγματος** (plexus renalis). Επίσης, συνάπτονται τα **κοιλιακά γάγγλια** (ganglia celliaca) και τα **άνω μεσεντέρια γάγγλια** (gaglia mesenterica superia) (Αραβαντινός 1982, Shaw et al, 1992).



Εικόνα 1.9

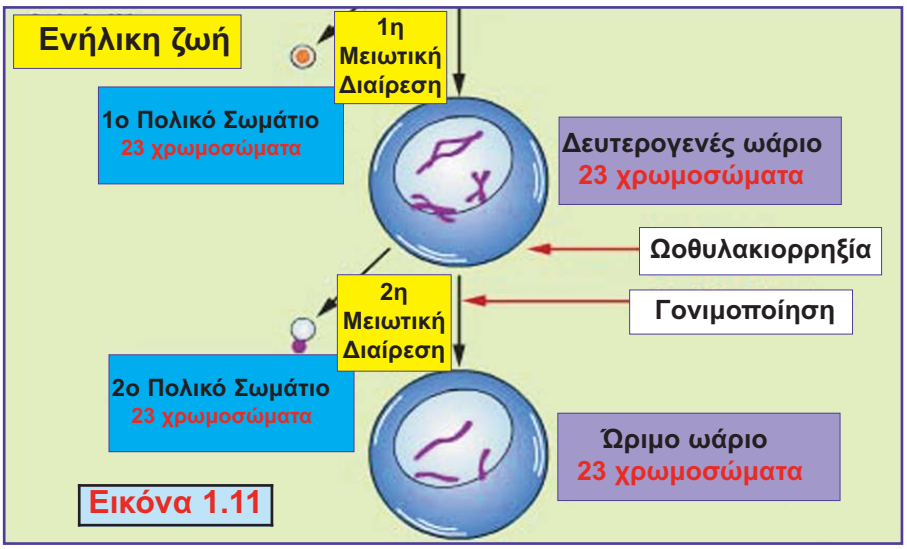
## 1.3. Λειτουργία της ωοθήκης

Στην ωοθήκη επίσης υπάρχουν: (1) **το ωχρό σωμάτιο** (κυτταρικός σχηματισμός απότοκος της ρήξεως του ώριμου ωοθυλακίου) (2) **το λευκό σωμάτιο** (προέρχεται από υποστροφή του ωχρού σωματίου) (3) **άτρητες μορφές ωοθυλακίων** (4) **ινώδη σωμάτια** (5) **αιματώματα ωχρών σωματίων.** Οι λειτουργίες των ωοθηκών συνίστανται αφ'ενός στην ωρίμανση του ωαρίου και αφ'ετέρου στην παραγωγή των ορμονών του φύλου (**Εικόνα 1.8**).



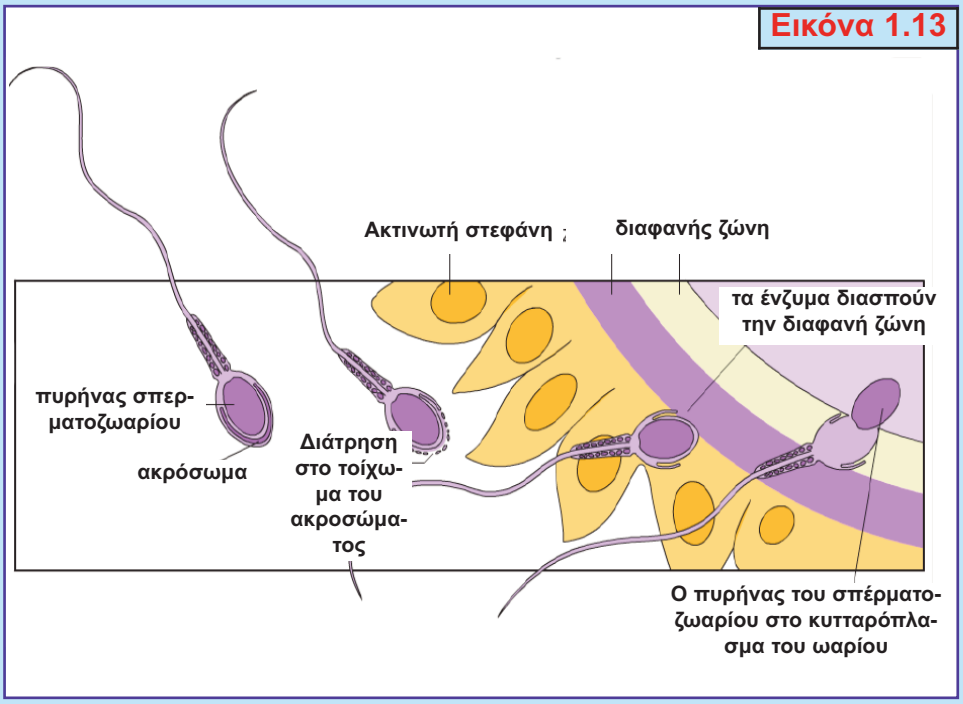

## 1.4. Οι μειωτικές διαιρέσεις του ωοκυττάρου

Από κάθε ένα **αρχέγονο γεννητικό κύτταρο** της γυναίκας (primordial germ cell) που περιέχει ένα διπλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (46 χρωμοσώματα) με μιτωτική διαίρεση προκύπτουν **δύο ωογόνια** κατά την έκατη εβδομάδα της εγκυμοσύνης (**Εικόνα 9**). Κάθε ωογόνιο περιέχει ένα διπλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (46 χρωμοσώματα). Κατά την εντέκατη με δωδέκατη εβδομάδα της εγκυμοσύνης στο ωογόνιο με μιτωτική διαίρεση γίνεται αντι-



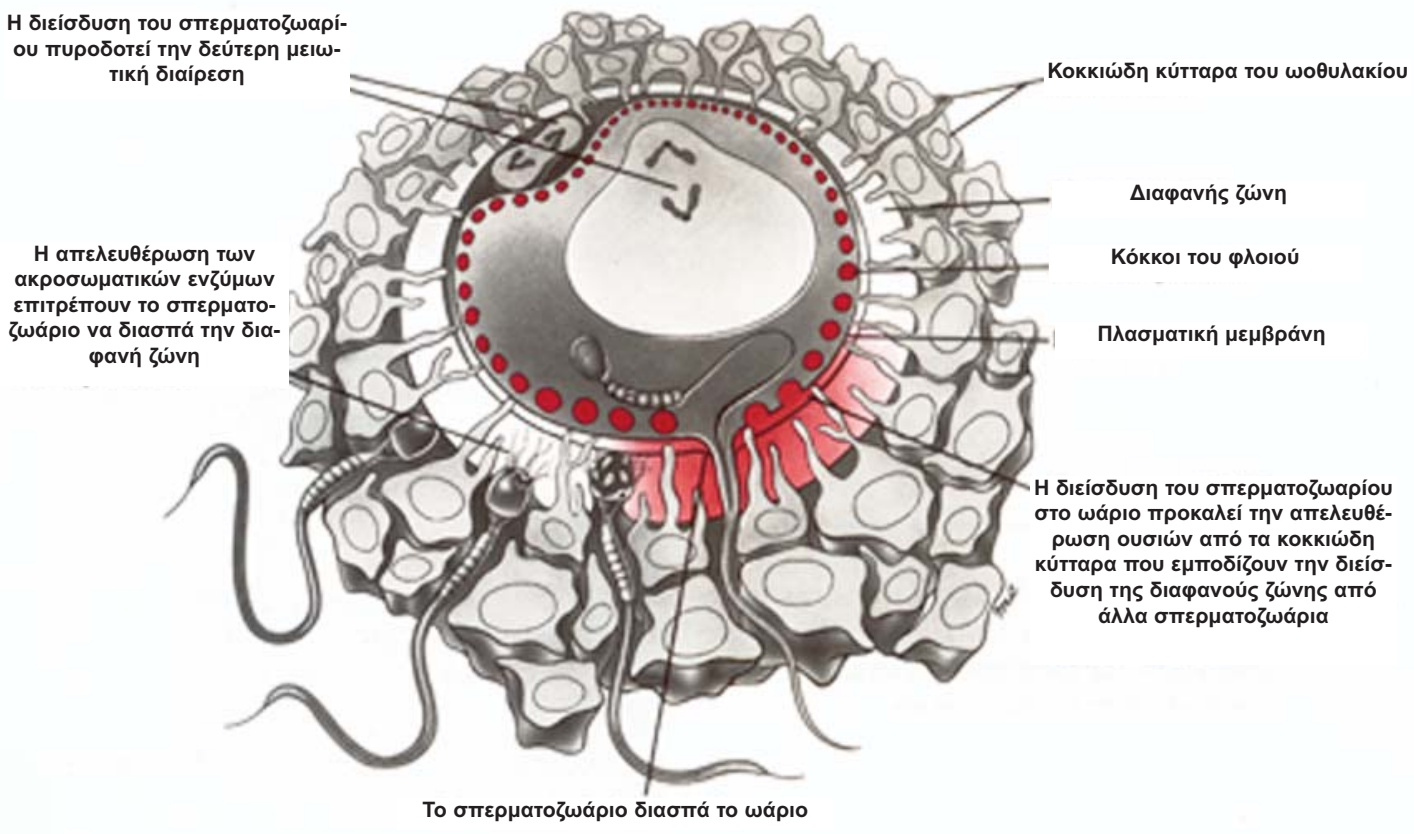
γραφή του DNA και σχηματίζεται το **πρωτογενές ωάριο** που περιέχει δύο θυγατρικά διπλοειδικά σετ χρωμοσωμάτων (2 σετ 46 χρωμοσωμάτων). Το πρωτογενές ωάριο αρχίζει την 1η μειωτική διαίρεση κατά την εμβρυϊκή ζωή και σχηματίζεται το **πρωτογενές ωοθυλάκιο** (primary follicle). Γύρω από τα ωοθυλακικά κύτταρα δημιουργείται η ιδίως μεμβράνη. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο παραμένει αδρανές στην **πρόφαση Ι της 1ης μειωτικής διαίρεσης** μέχρι την εφηβεία (**Εικόνα 1.10**) (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

Με την έναρξη της εφηβείας στο μέσον κάθε γεννητικού κύκλου λίγες ώρες πριν από την εκκριτική αιχμή της LH αρχίζει η συνέχιση της 1ης μειωτικής διαίρεσης όπου το ένα διπλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων και σχεδόν όλο το πρωτόπλασμα πηγαίνουν στο **δευτερογενές ωάριο**, ενώ το άλλο διπλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων αποπίπτει και σχηματίζεται το **πρώτο πολικό σωμάτιο**. Ενώ συνεχίζεται η 2η μειωτική διαίρεση τόσο στο δευτερογενές ωάριο όσο και στο 1ο πολικό σωμάτιο **η ωοθυλακιορρηξία γίνεται με το δευτερογενές ωάριο αναχαι-**

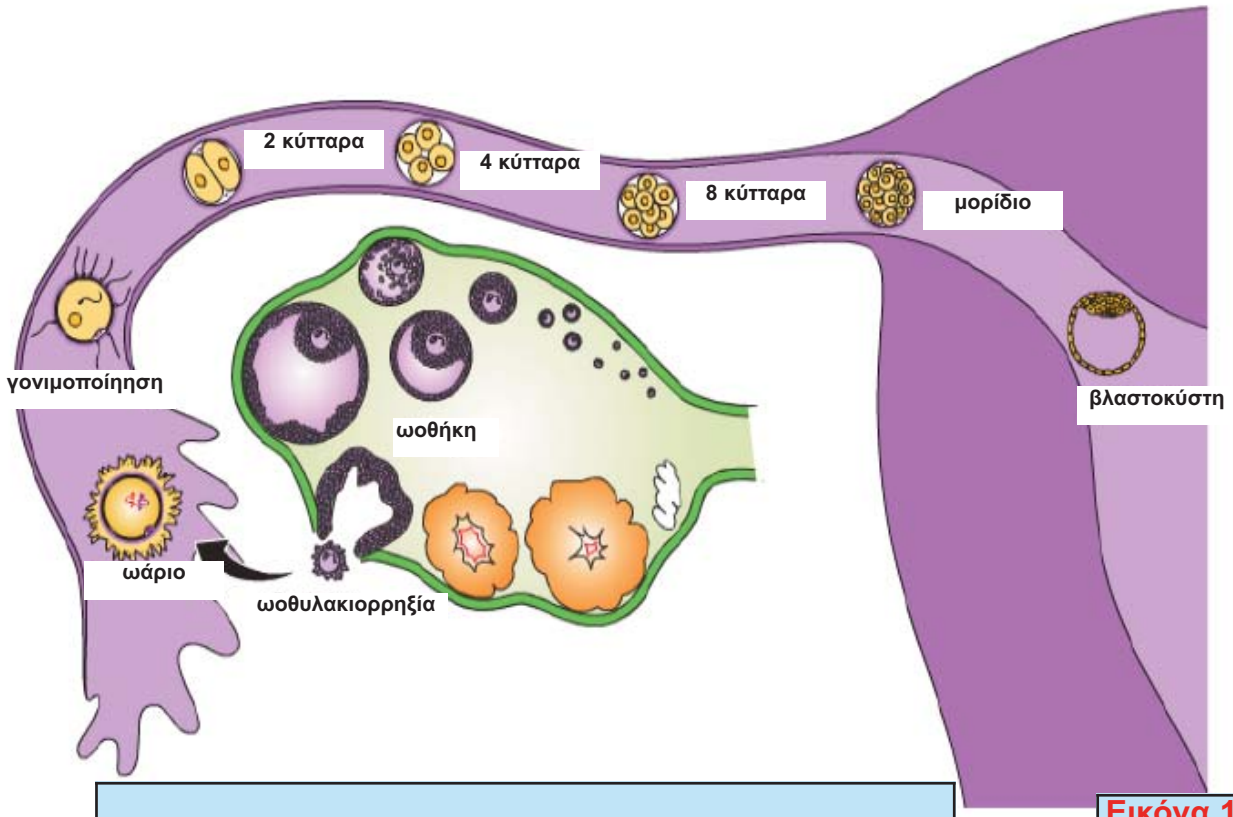



**Εικόνα 1.12. Διάτρηση της διαφανούς ζώνης του ωαρίου από το σπερματοζωάριο** (Fritz and Speroff, 2011).

Εικόνα 1.13




**Εικόνα 1.13. Η γονιμοποίηση.** Τα σπερματοζωάρια στριφογυρίζουν γύρω από τα εν είδη σωρού κοκκιώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus granulosa cells) και απελευθερώνουν τα ένζυμά τους από το ακρόσωμα σε επαφή με την διαφανή ζώνη. Τα ένζυμα ρευστοποιούν την διαφανή ζώνη και επιτρέπουν το σπερματοζωάριο να προσεγγίσει το ωάριο. Μόλις οι μεμβράνες του ωαρίου και σπερματοζωαρίου τηχθούν (fuse) τότε οι κόκκοι του φλοιού του ωαρίου (cortical granules of the oocyte) απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους με αποτέλεσμα η διαφανής ζώνη να γίνεται αδιαπέραστη σε άλλα σπερματοζωάρια. Η είσοδος του πυρήνα του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα προκαλεί το ωοκύτταρο να συμπληρώσει την δεύτερη μειωτική διαίρεση (Larens 1993).

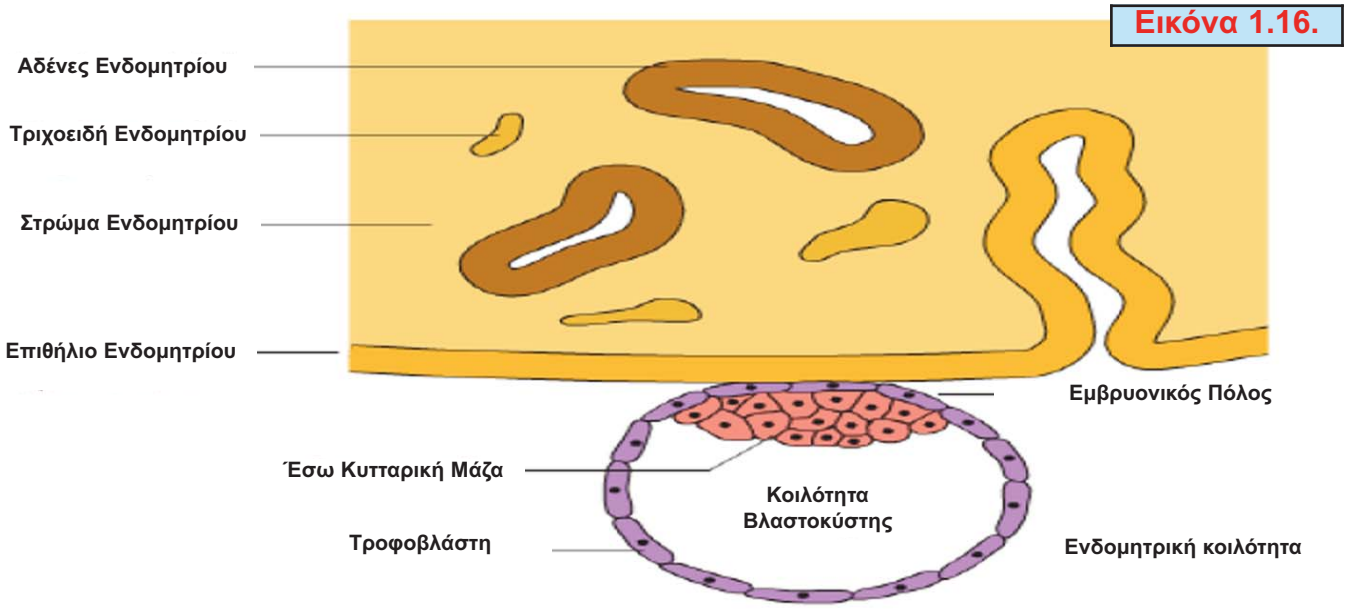



Εικόνα 1.14

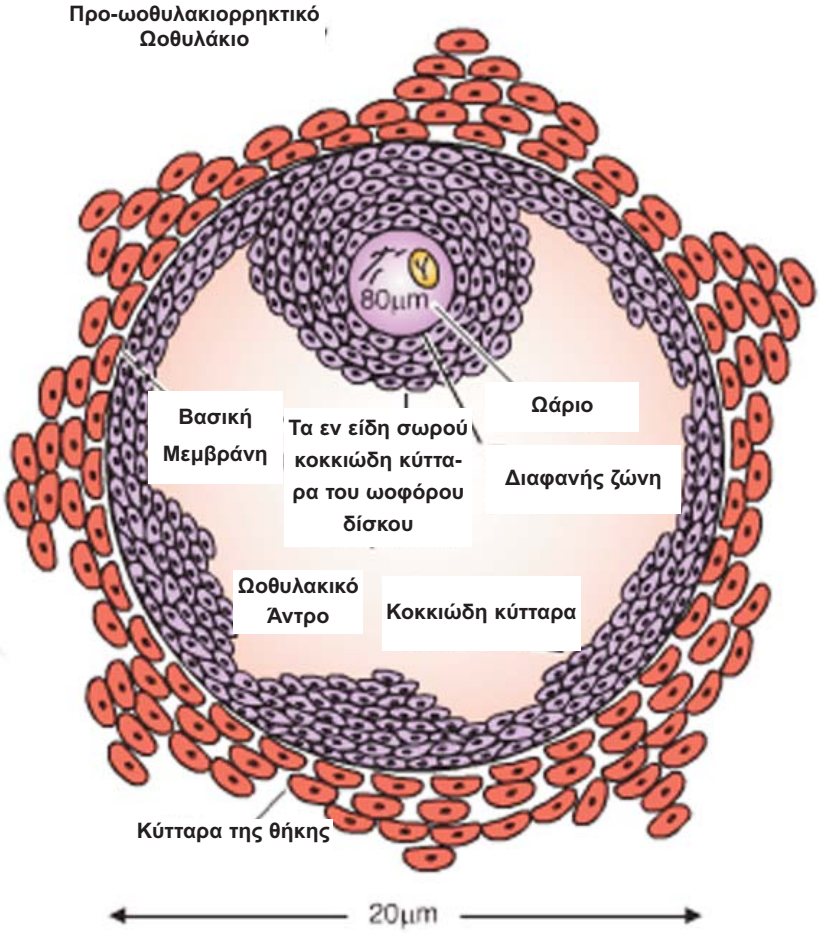
**Εικόνα 1.14. Η γονιμοποίηση εντός της σάλπιγγας** (Fritz and Speroff, 2011).

Εικόνα 1.15

**Εικόνα 1.15. Ο σχηματισμός του ζυγώτη.** Μόλις το ωοκύτταρο συμπληρώσει την μείωση, ο θήλυς προπυρήνας και ο αρσενικός προπυρήνας (ο οποίος είναι μεγαλύτερος) τήκονται για να σχηματισθεί ο διπλοειδικός πυρήνας του ζυγώτη (Larsen, 1993).




**Εικόνα 1.16. Εμφύτευση της βλαστοκύστης εντός του ενδομητρίου** (Fritz and Speroff, 2011).




Εικόνα 1.17

**τισμένο στην μετάφαση ΙΙ** (**Εικόνα 1.11**). Η γονιμοποίηση του δευτερογενούς ωαρίου μετά την ωοθυλακιορρηξία θα πρέπει να γίνει μέσα σε 12-24 ώρες (**Εικόνες 1.12 έως 1.15**). Η 2η μειωτική διαίρεση τελειώνει με την συνένωση της μεμβράνης του σπερματοζωαρίου με την μεμβράνη του ωαρίου. Έτσι σχηματίζεται: **(Α)** Ο αρχέγονος θηλυκός πυρήνας, ο οποίος έχει ένα απλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (23) και **(Β)** Ένα **2ο πολικό σωμάτιο**, το οποίο περιέχει το άλλο απλοειδικό σετ των χρωμοσωμάτων (23). Το 1ο πολικό σωμάτιο συνεχίζει την 2η μειωτική διαίρεση και σχηματίζεται άλλο **ένα νέο πολικό σωμάτιο**. Δηλαδή, συνολικά έχουν παραχθεί **3 πολικά σωμάτια** (**Εικόνα 1.15**) (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

## 1.5. Η γονιμοποίηση

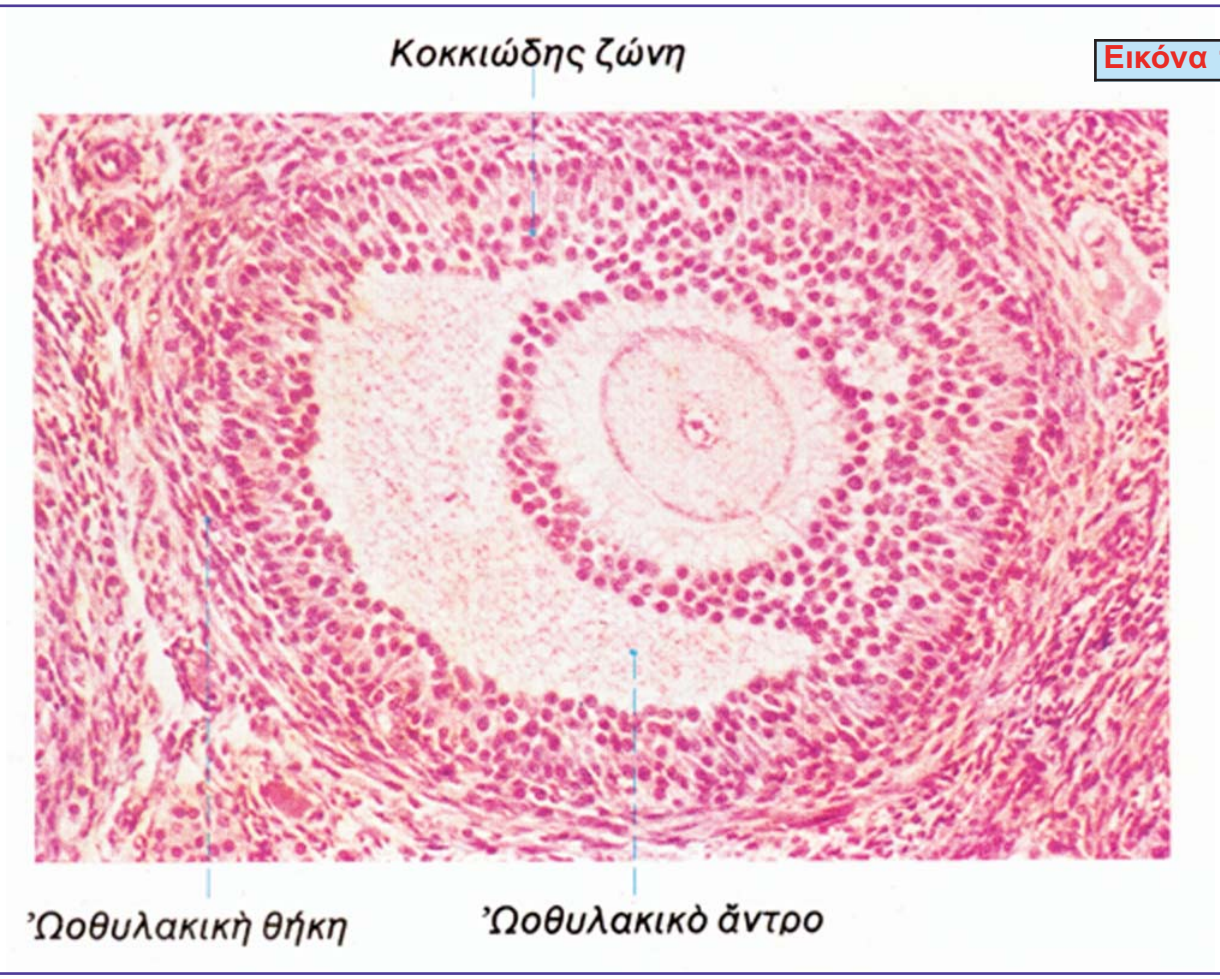
Με την ένωση του αρχέγονου θηλυκού πυρήνα [ένα απλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (23)] με τον αρχέγονο αρσενικό πυρήνα [ένα απλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (23)] δημιουργείται ο **διγενής πυρήνας** [(διπλοειδικό σετ χρωμοσωμάτων (46)]. Το γονιμοποιημένο ωάριο καλείται **ζυγώτης** (**Εικόνα 1.14 και 1.15**). Με μιτωτική διαίρεση ο ζυγώτης διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται **βλαστομερίδια**. Με 2η μιτωτική διαίρεση παράγονται 4 βλαστομερίδια. Τρεις ημέρες μετά την γονιμοποίηση το έμβρυο αποτελείται από 8 κύτταρα.Τέσσερις ημέρες μετά την γονιμοποίηση το έμβρυο αποτελείται από 16-32 κύτταρα. Το έμβρυο των 32 κυττάρων ονομάζεται **μορίδιο** γιατί μοιάζει με μικρό μούρο (**Εικόνα 1.14**). Το μορίδιο αρχίζει να απορροφά υγρό αρχικά εντός των βλαστομεριδίων και στην συνέχεια μεταξύ των βλαστομεριδίων. Μεταξύ των κυττάρων της εξωτερικής στιβάδας του μοριδίου αρχίζουν να σχηματίζονται σφυκτές γέφυρες (tight junctions) που συγκρατούν μεταξύ τους τα κύτταρα. Με την συνεχή είσοδο ύδατος στο μορίδιο αυξάνεται η υδροστατική πίεση εντός αυτού με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια μεγάλη κοιλότητα που ονομάζεται **βλαστική κοιλότητα**.

Η εξωτερική στιβάδα του κυττάρου ονομάζεται **τροφοβλάστη** και είναι μονόστιβη. Θα σχηματισθεί ο πλακούντας και οι εμβρυϊκοί υμένες.

Η εσωτερική στιβάδα των κυττάρων ονομάζεται **εμβρυοβλάστη** και βρίσκεται στην μία πλευρά της κοιλότητας. Θα σχηματισθεί το έμβρυο. Το έμβρυο αυτού του σταδίου ονομάζεται **βλαστοκύστη** και σχηματίζεται 5 ημέρες μετά την γονιμοποίηση.

Στον άνθρωπο το έμβρυο μεταφέρεται στην μήτρα ως βλαστοκύστη. Η βλαστοκύστη

αιωρείται για 2 ημέρες στην μητρική κοιλότητα και εμφυτεύεται στον φθαρτό την 7η ημέρα από την γονιμοποίηση αφού αποβάλλει την διαφανή της ζώνη (**Εικόνα 1.16**) (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).




**Εικόνες 1.17 & 1.18. Δευτερογενές ωοθυλάκιο.** Διακρίνεται η **ωοθυλακική κοιλότητα ή ωοθυλακιό άντρο** σαν μισοφέγγαρο (ωοθυλακικό κέντρο) και το αναπτυσσόμενο **ωοθυλακικό λοφίδιο**. Το πολύστιβο ωοθυλακικό επιθήλιο αποτελεί το τοίχωμα αυτής της σφαίρας που σιγά - σιγά γεμίζει με ωοθυλακικό υγρό. Ο συνδετικός ιστός που βρίσκεται άμεσα δίπλα στο ωοθυλάκιο μεταβάλλεται σε κυτταρικές δεσμίδες που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο με την λεγόμενη ωοθυλακική θήκη, που ακόμα δεν έχει διαφοροποιηθεί σε έσω και έξω θήκη. Χρώση Α και Η. Μεγένθυση x 150 (Sobotta/Hammersen, Ιστολογία 1982).

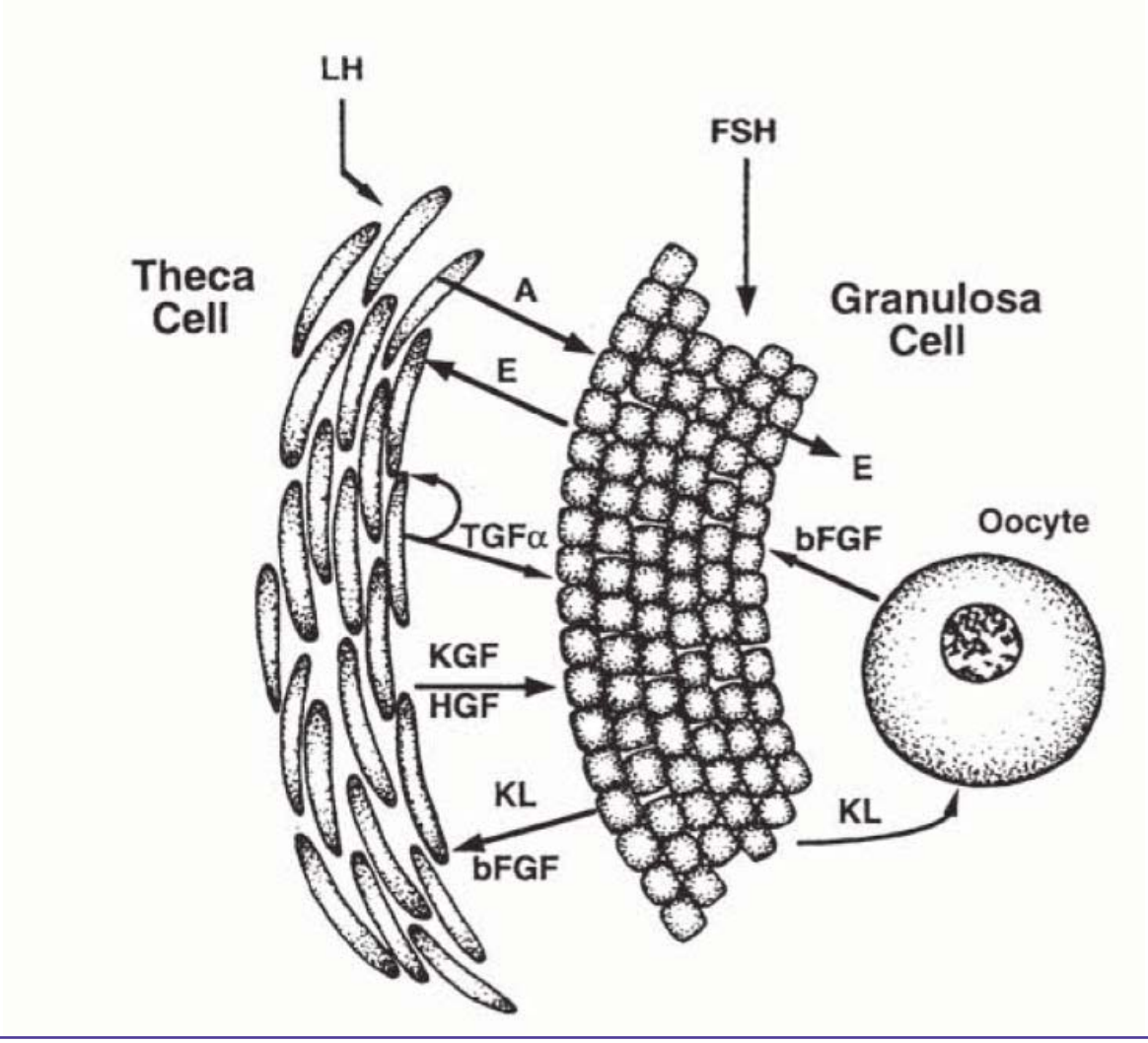
## 1.6. Περιγραφή του ώριμου ωοθυλακίου

**Στο ώριμο ωοθυλάκιο** (**Εικόνες 1.17 & 1.18**) **διακρίνονται:**

1. **Ο ωοφόρος δίσκος (cumulus oophorus):** είναι η προβολή που σχηματίζεται από τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας σε ένα σημείο της ωοθυλακικής κοιλότητας του ώριμου ωοθυλακίου. Μέσα στον ωοφόρο δίσκο βρίσκεται το ωάριο.
2. **Ο ακτινωτός στέφανος:** είναι μια στιβάδα κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας που περιβάλλουν άμεσα το ωάριο.
3. **Η διαφανής ζώνη (zona pellucida).** Είναι μια ζώνη άμορφου υλικού που μεσολαβεί μεταξύ του ωαρίου και του ακτινωτού στεφάνου. Στην επιφάνεια της διαφανούς ζώνης υπάρχουν οι γλυκοπρωτεϊνες: ZP1, ZP2, ZP3. Οι γλυκοπρωτείνες αυτές λαμβάνουν μέρος στην γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο. Κατά την γονιμοποίηση η ικανότητα των σπερματοζωαρίων να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με το ωάριο εξαρτάται από την ειδική αντίδραση ανάμεσα στην επιφάνεια του σπέρματος και την γλυκοπρωτείνη ZP3. Η γλυκοπρωτεϊνη ZP2 μεσολαβεί στην δευτερογενή φάση αντίδρασης σπέρματος-διαφανούς ζώνης.
4. **Το ωάριο (oocyte):** Αποτελεί το γεννητικό κύτταρο της γυναίκας.
5. **την ωοθυλακική κοιλότητα ή άντρο (antrum):** Βρίσκεται στο κέντρο του ώριμου ωοθυλακίου και περιέχει το ωοθυλακικό υγρό. Στην κοιλότητα αυτή προβάλλει ο ωοφόρος δίσκος αλλάζοντας στο σημείο αυτό με τον σχηματισμό της υπέγερσης την σφαιρική μορφολογία της ωοθυλακικής κοιλότητας. Η ποσότητα του ωοθυλακικού υγρού αυξάνει προοδευτικά όσο πλησιάζει η στιγμή της ρήξης του ωοθυλακίου. Η σύσταση του ωοθυλακικού υγρού είναι όμοια με αυτή του αίματος.

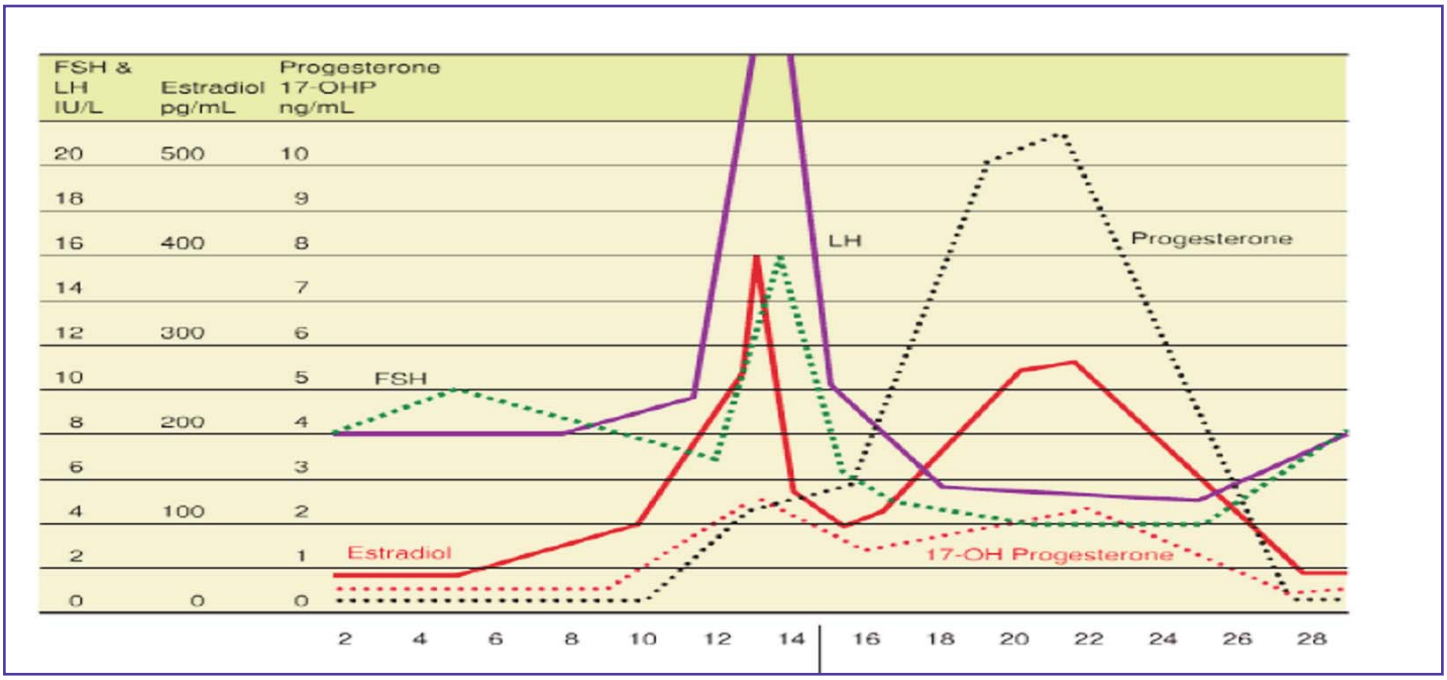
## 1.7. Οι ορμόνες κατά τον γεννητικό κύκλο

Μετά την γέννηση ενός θήλεος εμβρύου τα περισσότερα ωάρια χάνονται και στην εφηβεία η ωοθήκη χάνει το 75% των ωοθυλακίων της (Perez et al 2000). Κατά την ενήλικο ζωή, ένας αριθμός **πρωτογενών ωοθυλακίων** (primordial follicles) αρχίζει να αναπτύσσεται σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο. Συνήθως ένα ωοθυλάκιο θα υποστεί ωοθυλακιορρηξία και η




**Εικόνα 1.19. Αλληλεπιδράσεις ωοκυττάρων, κοκκιωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων που έχουν ωοθυλακική κοιλότητα (άντρο)** (Nilson and Skinner, 2001).

μοίρα των υπόλοιπων ωοθυλακίων είναι η ατρησία διαμέσου του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Τελικά, μόνο περίπου 450 ωοθυλάκια θα υποστούν ωοθυλακιορρηξία κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας. Από την ήβη έως την εμμηνόπαυση της γυναίκας περίπου 250.000 ωοθυλάκια προωρίζονται για ατρησία. Κατά την διάρκεια ενός τυπικού εμμηνορρυσιακού κύκλου περίπου 1000 ωοθυλάκια ξεκινούν να αναπτύσσονται και μόνο ένα ή δύο θα υποστούν ωοθυλακιορρηξία. Η διάρκεια του γεννητικού κύκλου είναι συνήθως 28 ημέρες. Η ωοθυλακιογένεση είναι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων της ωοθήκης. Αρχίζει




**Εικόνα 1.20. Τα επίπεδα των ορμονών στο αίμα της γυναίκας κατά την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου** (Fritz and Speroff, 2011).

με την επιστράτευση του κυρίαρχου ωοθυλακίου (primordial follicle) και τελειώνει είτε με την ωοθυλακιορρηξία είτε με την ατρησία των ωοθυλακίων. Τα ωοθυλάκια είναι αρχέγονα (primordial), πρωτογενή (primary - ωοθυλάκια που ενεργοποιούνται για ανάπτυξη ή ατρησία), δευτερογονενή (secondary - μεγάλου μεγέθους ωοθυλάκια) και τριτογενή ωοθυλάκια (Hussein, 2005). Η διαδικασία της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της επιβίωσής τους εξαρτάται από αυτοκρινή και παρακρινή σήματα, τα οποία περιλαμβάνουν παράγοντες από τα κοκκιώδη κύτταρα, τα κύτταρα της θήκης, τα στρωματικά κύτταρα και τα ωάρια (**Εικόνα 1.19**). Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν αρκετά μόροια όπως: μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 (bone morphogenetic protein, BMP-4), Bcl-2, Kit, FGF, NOBOX, NTS/Trkb, survivin, XIAP, GDF-9, NAIP, AHR, GATA-4, SCF, integrin, gonadotropins, TRAIL. Συγκεκριμένα, ο αυξητικός παράγων μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 και ο υποδοχέας της (BMPR-IB) είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Hussein, 2005). Μετά την ωοθυλακιορρηξία το κυρίαρχο ωοθυλάκιο σχηματίζει το ωχρό σωμάτιο. Η απόπτωση είναι επίσης υπεύθυνη για την εκφύλιση του ωχρού σωματίου (Hussein, 2005).

### 1.7.1. FSH (Εικόνα 1.20)

Πριν από την αναμενόμενη έμμηνη ρύση 2-3 ημέρες αρχίζει μια μικρή αλλά σημαντική αύξηση της FSH, η οποία συνεχίζεται τις πρώτες 5-6 ημέρες της ωοθυλακικής φάσης του νέου κύκλου (**διακυκλική αύξηση**). Η διακυκλική αύξηση της FSH είναι υπεύθυνη για την επιστράτευση μερικών ωοθυλακίων. Στην συνέχεια η FSH μειώνεται και διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της ωοθυλακικής φάσης. Στο μέσο του κύκλου παρατηρείται μια αιχμή στην έκκριση της FSH (σύγχρονη αλλά μικρότερη από εκείνη της LH). Η FSH μετά την μεσοκυκλική εκκριτική αιχμή της παραμένει σε χαμηλά επίπεδα καθόλη την διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου μέχρι την νέα διακυκλική της αύξηση (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

### 1.7.2. Οιστραδιόλη (Εικόνα 1.20)

Με την έναρξη της εμμήνου ρύσεως η οιστραδιόλη βρίσκεται στη χαμηλότερη τιμή της. Μετά το μέσο της παραγωγικής φάσεως παρατηρείται σταθερή αύξηση της παραγωγής των οιστρογόνων. Η αιχμή των οιστρογόνων (1ο peak) παρατηρείται 48 ώρες πριν από την ωοθυλακιορρηξία. Η στάθμη της οιστραδιόλης κατά την στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Τα οιστρογόνα αυξάνουν εκ νέου στην δεύτερη φάση του κύκλου παράλληλα με την προγεστερόνη (γιατί από το ωχρό σωμάτιο εκκρίνονται οιστρογόνα και προγεστερόνη), φτάνοντας σε νέα εκκριτική αιχμή 7 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία (2ο peak). Η δεύτερη αιχμή της αιστραδιόλης είναι μικρότερη εκείνης της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου. Στην συνέχεια εάν δεν επέλθει εγκυμοσύνη το ωχρό σωμάτιο εκφυλίζεται και ελαττώνεται προοδευτικά η στάθμη της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης μέχρι την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως, οπότε η οιστραδιόλη βρίσκεται στην μικρότερη τιμή της. Το ωχρό σωμάτιο εκκρίνει οιστρογόνα και προγεστερόνη για την φθαρτοειδή μετατροπή του ενδομητρίου και την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Παράλληλα δίδεται χρόνος στον πλακούντα να αναπτυχθεί (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

### 1.7.3. LH (Εικόνα 1.20)

Κατά την πρώτη ημέρα του κύκλου η LH εμφανίζει μικρή αύξηση η οποία και

διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το μέσο του κύκλου, όπου παρατηρείται η εκκριτική αιχμή της LH που θα προκαλέσει την ρήξη του προωορρηκτικού ωοθυλακίου. Η διάρκεια του κύματος της LH είναι 48 ώρες και εμφανίζει αρχή, ανιόν σκέλος, κορυφή και κατιόν σκέλος. Το peak της LH εμφανίζεται 24 ώρες μετά το peak των οιστρογόνων. Η ωοθυλακιορρηξία γίνεται 24 ώρες μετά το peak της LH (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

### 1.7.4. Προγεστερόνη (Εικόνα 1.20)

Η εκκριτική αιχμή της LH προκαλεί την ωοθυλακιορρηξία και την δημιουργία του ωχρού σωματίου, το οποίο παράγει οιστρογόνα και προγεστερόνη. Η στάθμη της προγεστερόνης αρχίζει να αυξάνει στην διάρκεια της ωχρινικής φάσης φτάνοντας στην μέγιστη τιμή 7 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία (συμπίπτει με το peak των οιστρογόνων) (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

### 1.7.5. Ανασταλτίνη (inhibin)

Η ανασταλτίνη συντίθεται από τα κοκκιώδη κύτταρα του ωοθυλακίου κάτω από την δράση της FSH. Η ανασταλτίνη αποτελείται από ετεροδιμερή (A, B) με Μ.Β. = 32.000. Κάθε τύπος ανασταλτίνης αποτελείται από μία α- και μια β- υπο-ομάδα. Οι υπο-ομάδες αυτές συνδέονται με δισυλφιδικούς δεσμούς. Κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης εμφανίζει μικρές διακυμάνσεις, εμφανίζοντας αιχμή ταυτόχρονα με την μεσοκυκλική αιχμή των γοναδοτροπινών. Στην συνέχεια η στάθμη της μειώνεται για να αυξηθεί 7 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία ταυτόχρονα με την προγεστερόνη και τα οιστρογόνα, εμφανίζοντας ταυτόχρονη αιχμή, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη της μεσοκύκλιας αιχμής της (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011). Η ανασταλτίνη αυξάνει την δράση της LH στα κύτταρα της θήκης για την παραγωγή των ανδρογόνων (Messinis et al, 2010).

### 1.7.6. Η ακτιβίνη (activin)

Η ακτιβίνη (activin) ανταγωνίζεται την δράση της ανασταλτίνης (inhibin), αλλά ταυτόχρονα αυξάνει την δράση της FSH στην αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα.

Δηλαδή, η ακτιβίνη διευκολύνει την οιστρογονοποίηση του ωοθυλακικού περιβάλλοντος κάτι που είναι σημαντικό για την επιβίωση του ωοθυλακίου (Messinis et al, 2010).

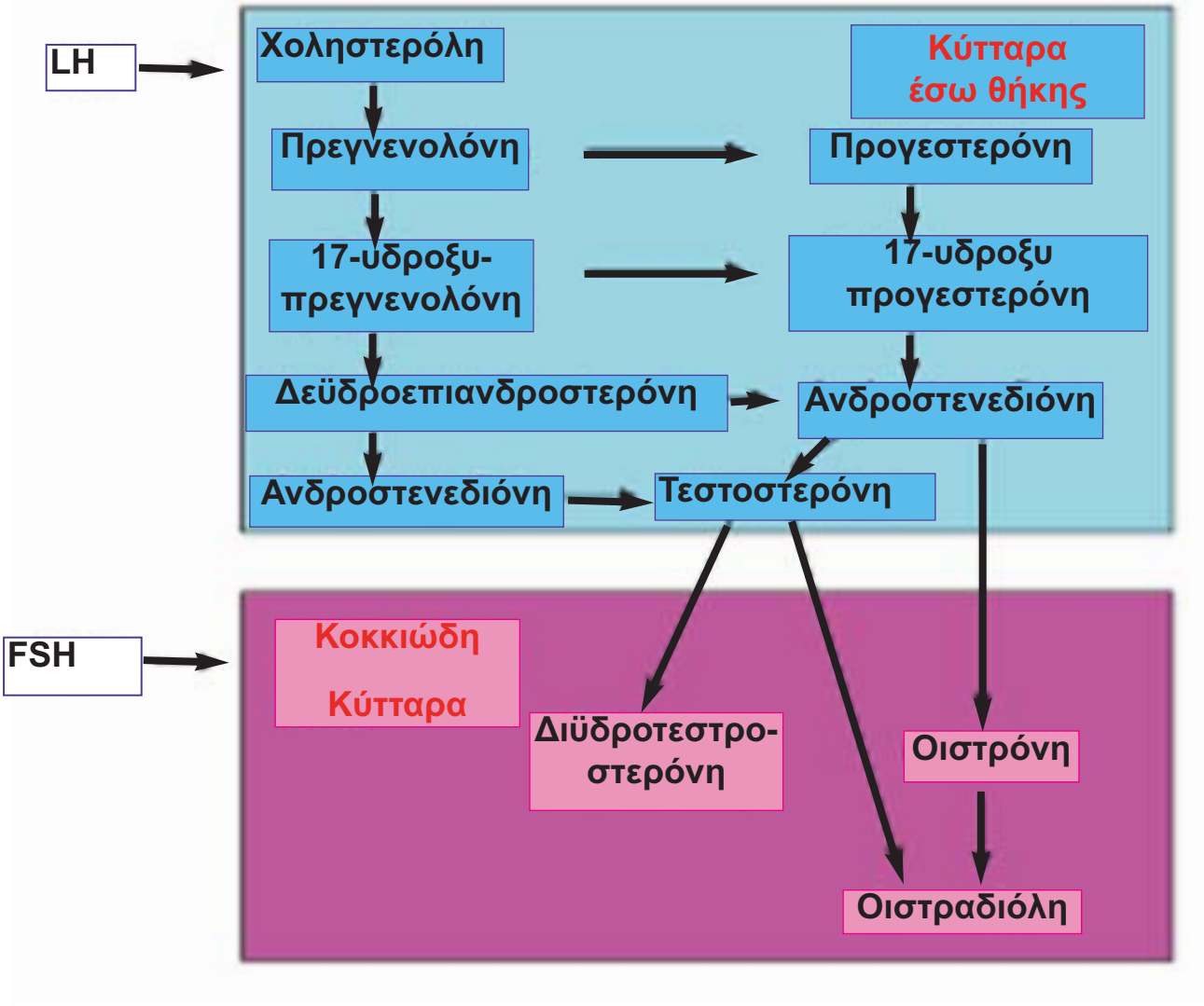
## 1.8. Το μοντέλο των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροπινών (Εικόνα 1.21)

Η ωρίμανση του ωαρίου αποτελείται από την **φάση ωρίμανσης των ωοθυλακίων ή ωοθυλακική φάση ή παραγωγική φάση** και την **φάση του ωχρού σωματίου ή εκκριτική φάση.** Κατά την παραγωγική φάση χρειάζονται 85 ημέρες για να ωριμάσουν τα ωοθυλάκια από την κλάση 1 έως την κλάση 8 με διάμετρο 18 mm. Οι τελευταίες 15 ημέρες της ωρίμανσης των ωοθυλακίων στον άνθρωπο αφορούν την ωοθυλακική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου και εξαρτώνται από την δράση και των δύο γοναδοτροπινών (Messinis et al, 2010).

### 1.8.1. Φάση ωρίμανσης των ωοθυλακίων ή ωοθυλακική φάση ή παραγωγική φάση

#### 1. Η φάση προ του σχηματισμού της ωοθυλακικής κοιλότητας ή ωοθυλακικού άντρου (preantral phase)

Κατά την παραγωγική φάση του γεννητικού κύκλου, στη φάση προ του σχηματισμού του ωοθυλακικού άντρου (preantral phase) τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται **ανεξάρτητα από τον γοναδοτροπικό ερεθισμό**. Προς το τέλος του πρώτου σταδίου της φάσης ωρίμανσης των ωοθυλακίων δηλαδή προ του σχηματισμού της ωοθυλακικής κοιλότητας (preantral phase) τα κοκκιώδη κύτταρα αποκτούν **FSH υποδοχείς**, ενώ τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων αποκτούν **LH υποδοχείς** (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011). Η αρχική επιστράτευση των πρωτογενών ωοθυλακίων του ανθρώπου ρυθμίζεται από παράγοντες που παράγονται από τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων όπως είναι ο insulin-like growth factor-1 (IGF-1), ο epidermal growth factor (EGF), ο transforming growth factor-α (TGF-α), ο transforming growth factor-β (TGF-β), η αντιμυλλέρια ορμόνη, ο growth differentiation factor-9 (GDF-9) και η bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) (Messinis et al, 2010). Οι παράγοντες αυτοί παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση σε διαφορετικές υπο-ομάδες των κοκκιωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων και συμβάλλουν στην πρώιμη ωχρινο-




**Εικόνα 1.21. Στεροειδική βιοσύνθεση στην ωοθήκη.** Στα κύτταρα της θήκης, κάτω από την επίδραση της LH, η χοληστερόλη μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη με αποτέλεσμα την παραγωγή ανδρογόνων. Στο μοντέλο των δύο κυττάρων - δύο γονατροπινών, τα ανδρογόνα παράγονται στα κύτταρα της έσω θήκης και μεταφέρονται στα κοκκιώδη κύτταρα όπου αρωματοποιούνται σε οιστρογόνα (Drummond, 2006).

ποίηση (Messinis et al, 2010).

**2. Η φάση σχηματισμού της ωοθυλακικής κοιλότητας ή ωοθυλακικού αντρου (antral phase)**

Ο σχηματισμός του άνδρου απαιτεί **τονικό ερεθισμό με FSH** που αρχίζει όταν τα ωοθυλάκια είναι 0.25 mm σε διάμετρο. Η τονική διέγερση με FSH είναι αρκετή για την ανάπτυξη μερικών ωοθυλακίων μέχρι 10 mm σε διάμετρο. Η διακυκλική αύξηση της FSH (intercycle rise of FSH) ονομάζεται **"FSH παράθυρο"** ("FSH window") ή **"κυκλική επιστράτευση"** ("cyclic recruiment") (Messinis, et al, 2010). Το ποσό της FSH που χρειάζεται για την διέγερση των ωοθυλακίων δεν έχει καθορισθεί, όμως μια αύξηση κατά 30% πάνω από τα βασικά επίπεδα θεωρείται **"ουδός επίπεδο"** (threshold level) (Messinis et al, 2010). Σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο συνήθως αναπτύσσεται ένα κυρίαρχο ωοθυλάκιο (graffian follicle) από την διάμετρο των 10 mm έως τα 20 mm κατά τον χρόνο της ωοθυλακιορρηξίας.

Τα κύτταρα της έσω θήκης ρυθμιζόμενα από την LH ενεργοποιούν την 17-υδροξυλάση/C17-20 οξειδοαναγωγάση (**P450c17**) που καταλύει την μετατροπή των C21 στεροειδών σε ανδρογόνα **(Εικόνα 1.21)**. Στα κύτταρα της έσω θήκης οι **LH υποδοχείς** είναι παρόντες σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των ωοθυλακικών άντρων. Το ίδιο συμβαίνει και για το P450c17 που προκύπτει από την μεσολάβηση της cAMP. Η cAMP είναι σήμα που βρίσκεται μετά τους LH υποδοχείς στα κύτταρα της έσω θήκης. Τα κύτταρα της έσω θήκης επίσης κατέχουν **υ**ποδοχείς IGF (insulin-like growth factors) που συνδέονται λειτουργικά με την σύνθεση των ανδρογόνων. (A) Στα κοκκιώδη κύτταρα η σύνδεση της FSH με τους υποδοχείς της στην επιφάνεια των κυττάρων ενεργοποιούν το ενζυμικό σύστημα της αρωματάσης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Η αρωματάση είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από το κυτόχρωμα P-450 και το NADPH κυττόχρωμα P450 αναγωγάση. Η FSH δρα δια μέσω των FSH υποδοχέων της στα κοκκιώδη κύτταρα για **να**: **(1)** αυξήσει την κυτταρική ανταπόκριση σε **cAMP** (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) **(2)** αυξήσει τον σχηματισμό της ρυθμιστικής υπομονάδας **RIIβ τύπου II της πρωτεϊνικής κινάσης A**. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων. **Οι IGFs που προέρχονται από τα κοκκιώδη κύτταρα ασκούν: (a)** θετικό παρακρινικό έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων της έσω θήκης **(b)** επίδραση στην στεροειδογεννητική λειτουργία των κυττάρων της έσω θήκης. Η ακτιβίνη (activin) και ινχιμπίνη (inhibin) (που απομονώθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό) είναι ισχυροί τροποποιητές της αρωματοποίησης των ανδρογόνων στα κοκκιώδη κύτταρα. (B) Καθώς τα κοκκιώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται λόγω της δράσης της FSH αποκτούν LH υποδοχείς. Η LH μετά την σύνδεσή της με τους υποδοχείς της στην επιφάνεια των κοκκιωδών

κυττάρων ρυθμίζει: **(1)** Την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα στα κοκκιώδη κύτταρα του προωρρηκτικού ωοθυλακίου **(2)** Την σύνθεση των ανδρογόνων στα κύτταρα της έσω θήκης. Αφού αυξάνεται η αρωματοποίηση στα κοκκιώδη κύτταρα αυξάνονται και οι ανάγκες σε ανδρογόνα (Hillier 1991, Βάρρας και Μιχαλάς, 1994). Επίσης, με την ανάπτυξη του ωοθυλακίου σχετίζεται και η παραγωγή της ινχιμπίνης (inhibin) από τα κοκκιώδη κύτταρα. **Η ανασταλτίνη (inhibin) γίνεται μέγιστη στο προωρρηκτικό ωοθυλάκιο.** Τα ανδρογόνα, η ακτιβίνη, η ανασταλτίνη και οι IGFs εμπλέκονται στην παρακρινική ρύθμιση της επιλογής του επικρατούντος ωοθυλακίου, το οποίο στην συνέχεια θα είναι εκείνο το οποίο θα υποστεί ωοθυλακιορρηξία. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή κατά το πρώτο μισό της παραγωγικής φάσης του γεννητικού κύκλου, **το ωοθυλάκιο του οποίου τα κοκκιώδη κύτταρα παράγουν τα μεγαλύτερα ποσά ακτιβίνης ανταποκρίνεται περισσότερο στην FSH.** Επιπρόσθετα, στην αύξηση της ανταπόκρισης του ωοθυλακίου στην FSH συμβάλλουν: τα **ανδρογόνα σε μικρές ποσότητες** (που παράγονται από τα κύτταρα της έσω θήκης του ωοθυλακίου) και οι **IGFs** που παράγονται από τα κοκκιώδη κύτταρα του ωοθυλακίου (Hillier 1991, Drummond 2006). Κατά το μέσο της παραγωγικής φάσης του γεννητικού κύκλου το ωοθυλάκιο περίπου 10 mm το οποίο αποκτά πιο γρήγορα υποδοχείς LH και εμφανίζει αυξημένη παραγωγή της ανασταλτίνης είναι το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Επομένως η LH μπορεί άμεσα να ερεθίσει την παραγωγή των οιστρογόνων και τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Επίσης, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είναι εκείνο με την αρκετή ποσότητα FSH στο ωοθυλακικό του υγρό και τον βέλτιστο αριθμό υποδοχέων FSH στα κοκκιώδη κύτταρά του. Η εξάρτηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου από την LH είναι μια σταδιακή διαδικασία ώστε το κυρίαρχο ωοθυλάκιο να καθίσταται σταδιακά λιγότερο εξαρτώμενο από την FSH και περισσότερο από την LH. Στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο συνεχίζεται η παραγωγή της ανασταλτίνης παράλληλα με την αρωματική δραστηριότητα και την έκκριση των οιστρογόνων συντελώντας στην αύξηση της σύνθεσης των ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης παρέχοντας έτσι στα κοκκιώδη κύτταρα τις πρώτες ύλες (ανδρογόνα) για την αρωματοποίηση **(θετικό feedback).** Επομένως, καθώς το κυρίαρχο ωοθυλάκιο αρχίζει να αναπτύσσεται από 10 mm στα 20 mm παράγει γρηγορότερα και σε μεγαλύτερα ποσά στην κυκλοφορία του αίματος οιστρογόνα και διαμέσου **αρνητικού feedback** αναστέλλεται η έκκριση της FSH. Η έκκριση της FSH πέφτει κάτω από την ουδό που χρειάζεται για την συνέχιση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Επομένως, τα λιγότερα ώριμα ωοθυλάκια καθότι έχουν λιγότερους FSH υποδοχείς υφίστανται ατρησία, γιατί το περι-

βάλλον τους είναι ανδρογονικό. Έτσι επιλέγεται ένα ωοθυλάκιο. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα της FSH είναι κάτω από την ουδό (τονικό επίπεδο της FSH) το κυρίαρχο ωοθυλάκιο συνεχίζει να αναπτύσσεται γιατί έχει αρκετούς FSH υποδοχείς (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011). Πρέπει να επισημανθεί τα οιστρογόνα συντελούν στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου αυξάνοντας την ευαισθησία του στην FSH (Messinis et al, 2010). Συνεπώς, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο συνεχίζει να αναπτύσσεται γιατί γίνεται σταδιακά ευαίσθητο στην LH και ακόμα γιατί επιδρούν διάφοροι ενδο-ωοθυλακικοί ρυθμιστές (Messinis et al, 2010).

Στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο τα κοκκιώδη κύτταρα μορφολογικά και λειτουργικά διαφοροποιούνται σε τρεις στιβάδες. Η μία στιβάδα βρίσκεται σε στενή επαφή με το ωοκύτταρο και ονομάζεται **"εν είδη σωρού κοκκιώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου"** (cumulus granulosa cells) και έχει υψηλό μιτωτικό δείκτη. Μιά άλλη στιβάδα αφορά τα **"τοιχωματικά κοκκιώδη κύτταρα"** (mural granulosa cells) που εντοπίζονται στην έσω θήκη και δεν βρίσκονται σε φυσική επαφή με το ωάριο. **"Τα τοιχωματικά κοκκιώδη κύτταρα"** εκφράζουν LH υποδοχείς και στεροειδογενετικά ένζυμα. Ανάμεσα στις δύο αυτές στοιβάδες υπάρχει η ενδιάμεση στιβάδα (Messinis et al, 2010).

### 3. Η προωοθυλακιορρηκτική φάση (preovulatory phase)

Όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ωριμάσει (>20 mm) η έκκριση των γοναδοτροπινών είναι αρκετή για να προκαλέσει το **LH κύμα**. Το LH κύμα δρα δια μέσω των προσταγλανδινών, της πλασμίνης, της κολλαγενάσης και της ισταμίνης και προκαλεί αλλαγές στην δομή και βιοχημεία του ωοθυλακίου με αποτέλεσμα την ρήξη του και την απελευθέρωση του ωαρίου (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

## 1.8.2. Φάση του ωχρού σωματίου ή εκκριτική φάση

Στην γυναίκα, ο αναπαραγωγικός κύκλος τελειώνει με το φαινόμενο της λουτεόλυσης (luteolysis) ή υποστροφής του ωχρού σωματίου, που χαρακτηρίζεται λειτουργικά από την πτώση της έκκρισης της προγεστερόνης. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της λουτεόλυσης περιλαμβάνουν μεταβολές στην κυτταρική δομή του ωχρού σωματίου και σταδιακή μετατροπή

του σε μικρή ουλή που αποτελείται από συνδετικό ιστό (corpus albicans) (Hussein, 2005). Η φάση του ωχρού σωματίου διακρίνεται στο (α) στάδιο της υπεραιμίας, (β) στο στάδιο της αγγείωσης (γ) στο στάδιο της ωρίμανσης, όπου παρατηρείται η μέγιστη ορμονική παραγωγή του και (δ) στο στάδιο της ωχρινόλυσης (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

Μετά το LH κύμα η συγκέντρωση των οιστρογόνων στο πλάσμα ελαττώνεται σημαντικά. Τα οιστρογόνα μετά την αυξημένη τους παραγωγή από τα κοκκιώδη κύτταρα ασκούν τοπική αρνητική δράση στα κύτταρα της έσω θήκης καταστέλλοντας την σύνθεση των ανδρογόνων. Κατά την φάση του ωχρού σωματίου παρουσιάζεται μια **δεύτερη αύξηση των οιστρογόνων** παραγόμενα πιθανώς από τα ωχρινοφόρα κύτταρα του ωχρού σωματίου. Η στεροειδογένεση του ωχρού σωματίου (παραγωγή προγεστερόνης και οιστρογόνων) **διεγείρεται από την LH**. Όταν δεν γίνει γονιμοποίηση αρχίζει η διαδικασία εκφύλισης των κυττάρων του ωχρού σωματίου, η οποία ονομάζεται ωχρινόλυση. Τα πολύ χαμηλά επίπεδα της LH στην διάρκεια της ωχρινικής φάσεως είναι ανεπαρκή για την διατήρηση του ωχρού σωματίου με αποτέλεσμα το ωχρό σωμάτιο να υποστρέφεται σιγά-σιγά. Στον άνθρωπο δεν ευθύνονται οι προσταγλανδίνες για την υποστροφή του ωχρού σωματίου. Εάν επιτευχθεί εγκυμοσύνη η HCG που παράγεται από το κύημα μοιάζει με την LH και διατηρεί την εγκυμοσύνη (Johnson and Everitt, 1991; Fritz and Speroff, 2011).

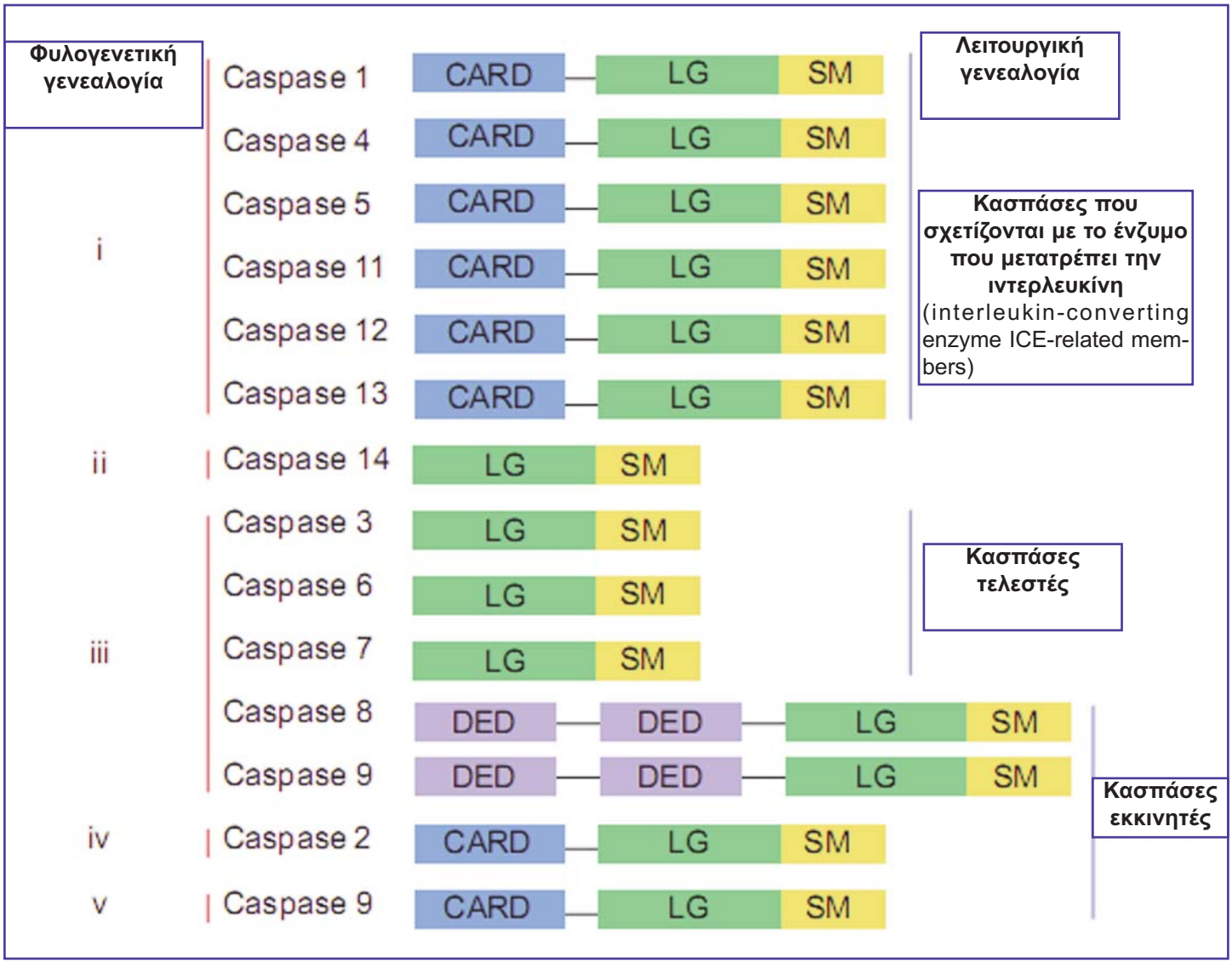
Η ουλή που σχηματίζεται στην ωοθήκη παραμένει για αρκετές εβδομάδες. Αρκετά μόρια εμπλέκονται ως μεσολαβητές στην δομική λουτεόλυση όπως είναι TNF, Fas/Fas ligand, κασπάση-3, Bax, προχιβιτίνη, BMP ligands και υποδοχείς (Hussein, 2005). Για παράδειγμα, ο Sugino και συνεργάτες βρήκαν ότι η λουτεόλυση σχετίζεται με μεταβολές στην έκφραση κάποιων μορίων όπως είναι ο TNF και η αναλογία Bcl-2/Bax (Sugino et al, 2000).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

# Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ ΚΑΙ Η SURVIVIN ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

## 2. 1 Γενικά περί απόπτωσης

Το 1972 για πρώτη φορά ο Kerr έδοσε τον όρο **"απόπτωση"** για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Kerr et al, 1972). Η ελληνική λέξη “απόπτωση” σημαίνει την πτώση ενός καρπού από ένα δένδρο. Η απόπτωση είναι ένας γενετικά καθορισμένος και βιολογικά λειτουργικός τρόπος κυτταρικού θανάτου, ο οποίος εκφράζεται από διακριτές βιοχημικές, μορφολογικές και ανοσοϊστοχημικές μεταβολές (Houssein 2005; Paquet and Pierard, 2007). Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από κατάτμηση του DNA σε τμήματα ολιγονουκλεοσωμάτων (oligonucleosome-sized fragments). Η απόπτωση αναγνωρίζεται μορφολογικά από την κυτταρική συρρίκνωση (cell shrinkage), συμπήκνωση της χρωματίνης κατά μήκος της περιφέρειας του πυρήνα και τον σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων. Όλη η διαδικασία της απόπτωσης διατηρεί καλά την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αποπτωτικά σώματα φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από τα γειτονικά κύτταρα και τα μακροφάγα (Paquet and Pierard, 2007).




**Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση των φυλογενετικών (phylogenetic) και λειτουργικών συσχετίσεων μεταξύ των μελών της οικογένειας των κασπασών.** Φυλογενετικά οι κασπάσες κατατάσσονται σε 5 κύριες γενεαλογίες (lineages), ενώ λειτουργικά κατατάσσονται **(α) στα μέλη που σχετίζονται με το ένζυμο που μετατρέπει την ιντερλευκίνη** (interleukin-converting enzyme (ICE)-related members) και σχετίζονται με την ενεργοποίηση της κυτοκίνης **(β) στις κασπάσες εκκινητές** (initiator capases) και δρουν ως μεταδότες εξωγενών σημάτων από τους υποδοχείς θανάτου ή ενδογενών σημάτων δρώντας διαμέσου των μιτοχονδίων και **(γ) στις κασπάσες τελεστές** (effector caspases) που είναι υπεύθυνες για την προς τα κάτω διάσπαση λειτουργικών κυτταρικών πρωτεϊνών. **CARD:** caspase recruitment domain; **DED:** death effector domain. Μεγάλες (Large, LG) και μικρές (Small, SM) περιοχές υπομονάδες (subunit domains) επεξεργάζονται για να σχηματίσουν τις ενεργείς κασπάσες. Το N-τερματικό (N-terminal) κάθε κασπάσης δεν απεικονίζεται (Wang and Gu 2001; Johnson and Bridgham, 2001).

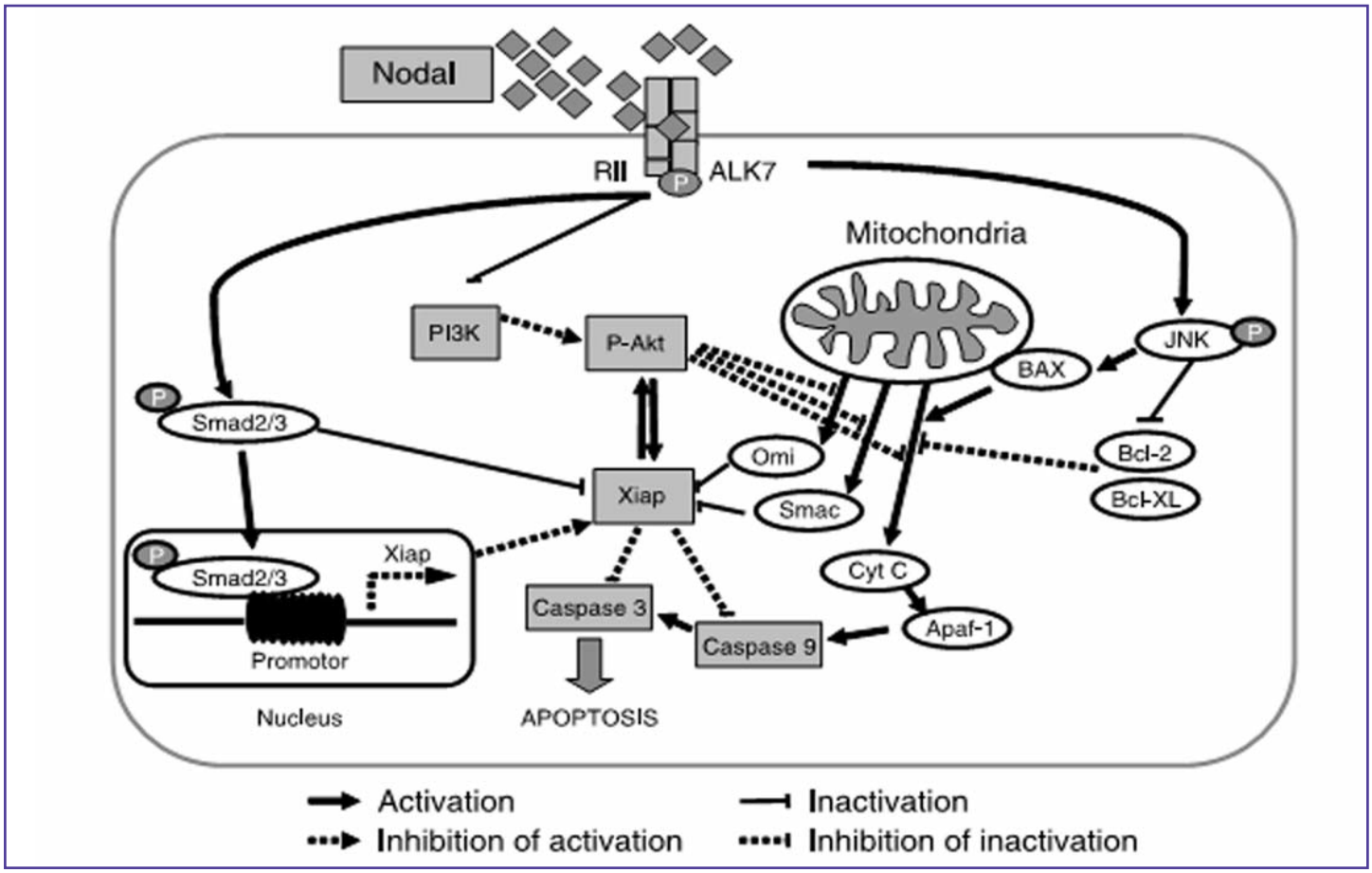
Η διαδικασία της απόπτωσης έρχεται σε αντίθεση με την **νέκρωση**, η οποία ακολουθεί την σοβαρή θανατηφόρα προσβολή. Στην νέκρωση, τα κύτταρα υφίστανται ωσμωτικό οίδημα και λύση (lysis) με απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Η χρωματίνη δεν συμπηκνώνεται στην περιφέρεια του πυρήνα, αλλά σχηματίζει συστάδες (clumps) εντός του πυρήνα ή διασκορπίζεται γρήγορα με διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης. Επομένως, κατά τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο το κυτταρικό περιεχόμενο απελευθερώνεται στον διάμεσο χώρο (interstitium) (Paquet and Pierard, 2007). Είναι εκπληκτικό το γεγονός ότι το ανθρώπινο σώμα καταστρέφει περίπου 60 x $10^9$ κύτταρα ημερησίως διαμέσου της διαδικασίας της απόπτωσης και σε ανταπόκριση φυσιολογικών, παθογόνων και κυτταροτοξικών ερεθισμάτων (Reed, 2002; Subramanian and Steer, 2009). Η απόπτωση μπορεί να διαιρεθεί σε τουλάχιστον τρεις διακριτές φάσεις: (α) την **φάση της αρχής** (initiation), (β) την **φάση της ολοκλήρωσης** (integration) και (γ) την **φάση της αποικοδόμησης** (degradation) (Kroemer et al, 1997; Subramanian and Steer, 2009). Η απόπτωση μπορεί να λάβει χώρα διαμέσου αρκετών μοριακών μονοπατιών (pathways) (Hotckiniss et al, 2009; Subramanian and Steer, 2009). Τα πιο χαρακτηριστικά μονοπάτια είναι τα **ενδογενή** (intrinsic), που περιλαμβάνουν τα μιτοχόνδρια (Shi, 2002), και τα **εξωγενή** τα οποία ενεργοποιούνται από **υποδοχείς θανάτου** (death receptors) στην κυτταρική μεμβράνη στους οποίους προσδένονται τα **μόρια θανάτου** (death molecules) (Ashkenazi, 2002) (**Εικόνα 2.1**). Παρά το γεγονός ότι τα δύο αυτά μονοπάτια είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους αλληλεπιδρούν με την βοήθεια κλειδιών πρωτεϊνών (key proteins), οι οποίες είναι κοινές και στα δύο μονοπάτια (Subramanian and Steer, 2009).

Οι κασπάσες είναι οικογένεια κυστεϊνικών πρωτεασών, οι οποίες ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση και ρυθμίζουν την πορεία της κυτταρικής απόπτωσης (Reed, 2002, Hussein, 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές συνθέτονται ως ανενεργείς πρόδρομες μορφές, οι οποίες υφίστανται την διαδικασία της ενεργοποίησης κατά την διάρκεια της απόπτωσης και ταξινομούνται είτε ως **εκκινητές** (initiators) (π.χ. κασπάση-2, -8, -9, -10) ή ως **τελεστές** (effectors) (π.χ. κασπάση-3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, -13). Η εκκινητής **κασπάση-9** ενεργοποιεί την τελεστή κασπάση-3, η οποία ενεργοποιεί μεταγενέστερους παράγοντες με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Οι κασπάσες προεξέχουν ως παίχτες στην διαδικασία της απόπτωσης

και αυτό οφείλεται στον ρόλο τους να καταργούν (abrogate) τα μονοπάτια επιβίωσης και να ενεργοποιούν μεταγενέστερα γεγονότα τα οποία ευθύνονται για τον κυτταρικό θάνατο. Οι ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis protein, IAP) είναι οι κύριοι αναστολείς της ενεργοποίησης των κασπασών. Ο μεταγραφικός παράγων **p53** και ο **CmrA** (τροποποιητής γονίδιο που ανταποκρίνεται στην κυτοκίνη, cytokine response modifier gene) μπορούν επίσης να ρυθμίσουν την ενεργοποίηση των κασπασών. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα μπορούν να υποστούν απόπτωση μέσω μονοπατιών που είναι ανεξάρτητα από τις κασπάσες και τα οποία περιλαμβάνουν αρκετές **πρωτεάσες** όπως είναι οι **καθεψίνες** (cathepsins), οι **καλπαΐνες** (calpains) και οι **γκρανζίμες** (granzymes) (Thornberry and Lazebnik 1998; Shi 2002; Rosen and Casciola-Rosen, 1997, Crook et al, 1993, Erster et al, 2004; Ray et al, 1992; Subramanian and Steer, 2009).

## 2.2. Η σήμανση NODAL και η απόπτωση (Εικόνα 2.2)

Το Nodal είναι μέλος της υπερ-οικογένειας του TGF-β (Tranforming Growth Factor-β) και ασκεί τα βιολογικά του αποτελέσματα με σήμανση διαμέσου ενός κυτταρικού συμπλέγματος υποδοχέων σερίνης/θρεονίνης κινάσης τύπου I και τύπου II και ενδοκυττάριες Smad (Smad2, Smad3, Smad4) πρωτεΐνες. Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με την Smad4, το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα και προσδένεται στο cis-ενεργώντας (cis-acting) τμήμα του υποκκινητή (promoter) του γονιδίου στόχου για να ρυθμίσει την γονιδιακή μεταγραφή. ALK4 και ALK7 είναι δύο τύπου I υποδοχείς για το Nodal. Ο τύπου II υποδοχέας για το Nodal είναι Ακτιβίνης τύπου II υποδοχέας (ActRIIA, ActRIIB) **(Εικόνα 2.2).** Το Nodal παίζει σπουδαίο ρόλο στην επαγωγή του ραχιαίου μεσοδέρματος, του πρόσθιου πρότυπου και τον σχηματισμό της δεξιάς-αριστερής ασυμμετρίας και την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη. Το Nodal ρυθμίζει την ανάπτυξη του πλακούντα. Επίσης, το Nodal είναι ικανό να προκαλεί την απόπτωση και να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Προαποπτωτικά και αποτελέσματα αναστολής της ανάπτυξης έχουν βρεθεί στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, στα τροφοβλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών. Επιπρόσθετα, ενεργοποίηση του ALK7 προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα ηπατώματος και παγκρεατικά β κύτταρα (Wang and Tsang, 2007).




**Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της απόπτωσης που προκαλείται από την σήμανση Nodal/ALK7.** Το Nodal προκαλεί απόπτωση διαμέσου ενεργοποίησης του τύπου I υποδοχέα ALK7, ο οποίος **(α) ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3** με αποτέλεσμα την προς τα κάτω ρύθμιση της XIAP (X-συνδεδεμένης αναστολέα της απόπτωσης πρωτεΐνη, XIAP) **(β) προκαλεί ενεργοποίηση της JNK σήμανσης**, η οποία ρυθμίζει προς τα κάτω Bcl-2 και Bcl-X και προς τα πάνω Bax και (γ) αναστέλλει την Akt και πυροδοτεί την απελευθέρωση των μιτοχονδριακών Smac, Omi και κυττόχρωμα c με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών και την πρόκληση της απόπτωσης (Wang and Tsang, 2007).

## 2.3. Η υπεροικογένεια του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (NTF) και η απόπτωση

Η υπεροικογένεια του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (NTF) αποτελείται πρωτίστως από τύπου II διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Ο νεκρωτικός παράγοντας των όγκων (TNF) αλληλεπιδρά με δύο υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, που διακρίνονται σε **TNFR1** και **TNFR2**. Η αλληλεπίδραση του TNF με τους υποδοχείς του προκαλεί συσσώρευση

(aggregation) υποδοχέων και επιστράτευση σηματοδοτικών πρωτεϊνών (signalling proteins). Έτσι ο TNFR1 προκαλεί κυτταροτοξικά αποτελέσματα, ενώ ο TNFR2 πολλαπλασιασμό. Ο **υποδοχέας Fas** είναι τύπου Ι διαμεμβρανική πρωτεΐνη της υπεροικογένειας του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (NTF) που εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ο υποδοχέας Fas συνδέεται με τον **Fas συνδέτη** (Fas ligand, FasL), ο οποίος είναι τύπου ΙΙ διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση του Fas πυροδοτεί την απόπτωση με επιστράτευση και ενεργοποίηση της καασπάσης-8 μέσω του πρωτεϊνικού προσαρμογέα **FADD** (Fas-σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου, Fas-associated protein with dead domain, FADD) (Strasser et al, 2009). Το **TNF-related apoptosis ligand** (TRAIL) και οι **υποδοχείς του 1 (TRAIL-R1) και 2 (TRAIL-R2)** είναι επίσης μέλη της υπεροικογένειας του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (NTF) και εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη (Hussein, 2005). Επίσης, η υπεροικογένεια του υποδοχέα του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων περιλαμβάνει και τους **υποδοχείς θανάτου 3 και 6** (death receptors) (Subramanian and Steer, 2009). Τα μέλη της υπεροικογένειας του υποδοχέα του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων μοιράζονται όμοιες εξωκυττάριες περιοχές (domains) πλούσιες σε κυστεΐνη (N-terminal) και έχουν μια κυτταροπλασματική περιοχή από περίπου 80 αμινο-οξέα που ονομάζεται **"περιοχή θανάτου"** (death domain) (C-terminal) (Ashkenazi and Dixit 1998; Subramanian and Steer, 2009). Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει η σήμανση του **συνδέτη TRAIL** έχει ως εξής: Ο συνδέτης TRAIL συνδέεται με την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα οδηγώντας στην επιστράτευση του πρωτεϊνικού προσαρμογέα **FADD** στην ενδοκυττάρια περιοχή θανάτου του υποδοχέα. Έτσι σχηματίζεται ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται **DISC** (death inducing signaling complex, DISC), το οποίο περιλαμβάνει τον υποδοχέα, τον πρωτεϊνικό προσαρμογέα FADD και την καασπάση-8. Η καασπάση-8 σχηματίζει διμερή στο DISC και ο διμερισμός οδηγεί στην καταλυτική της ενεργοποίηση. Το αποπτωτικό σήμα από την ενεργοποιημένη καασπάση-8 είναι ικανοποιητικό σε κάποια κύτταρα (κύτταρα τύπου Ι) να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Σε άλλα κύτταρα (τύπου ΙΙ) η απόπτωση συμβαίνει με την διάσπαση του ανενεργού κυτταροπλασματικού **Bid** από την **καασπάση-8** απελευθερώνοντας το ενεργό τμήμα του **tBid** (Thorburn et al, 2008; Subramanian and Steer, 2009).

### 2.4. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η απόπτωση

Το p53 είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία 53 KDa ογκοκατασταλτική πυρηνική πρωτεΐνη. Η P53 πρωτεΐνη υπάρχει σαν ένα τετραμερές που συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα κατά την φάση G1 (Gap 1) και μεταναστεύει στον πυρήνα στην αρχή της φάσης S (σύνθεση) (Hussein, 2005). Το p53 λειτουργεί σαν ένας μεταγραφικός παράγων που εξαρτώται από την αλληλουχία (sequence-dependent transcription factor), ο οποίος ρυθμίζει ποικίλες ομάδες γονιδίων κάτω από διαφορετικές καταστάσεις στρες και τελικά οδηγεί σε διακοπή ανάπτυξης (growth arrest), γήρανση (senescence) και απόπτωση.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα από την αρνητική αλληλορρύθμιση (negative feedback loop) που αυτή προκαλεί την μεταγραφή του **mdm-2** (murine of double minute), ο οποίος με την σειρά του προσδένεται στο p53 και μεσολαβεί στην αποικοδόμησή του (degradation) (Phillips et al, 1999; Bates and Vousden, 1999; Bates et al, 1998; Subramanian and Steer, 2009). Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 όπως είναι το Bax, Noxa ή Puma είναι μεταγραφικοί στόχοι του p53. Επίσης, το p53 ρυθμίζει προς τα κάτω τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 και έτσι συμβάλλει στην απελευθέρωση αποπτωγόνων παραγόντων από τα μιτοχόνδρια (Miyashita and Reed 1995; Schuler and Green 2001; Thornborrow and Manfredi 2001; Miyashita et al 1994; Subramanian and Steer, 2009). Ο μεταγραφικός παράγων E2F-I ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και προκαλεί **απόπτωση** με την αναστολή των αντι-αποπτωτικών σημάτων, περιλαμβάνοντας τον **πυρηνικό παράγοντα κάππα Β** (nuclear factor kappa B, **NF-Kβ**). Επιπρόσθετα, ο **μεταγραφικός παράγων E2F-I** προκαλεί δραστηριότητα του p53 με έμμεσο μηχανισμό (Subramanian and Steer, 2009).

## 2.5. Τα εξωγενή μονοπάτια της απόπτωσης (Εικόνα 2.3)

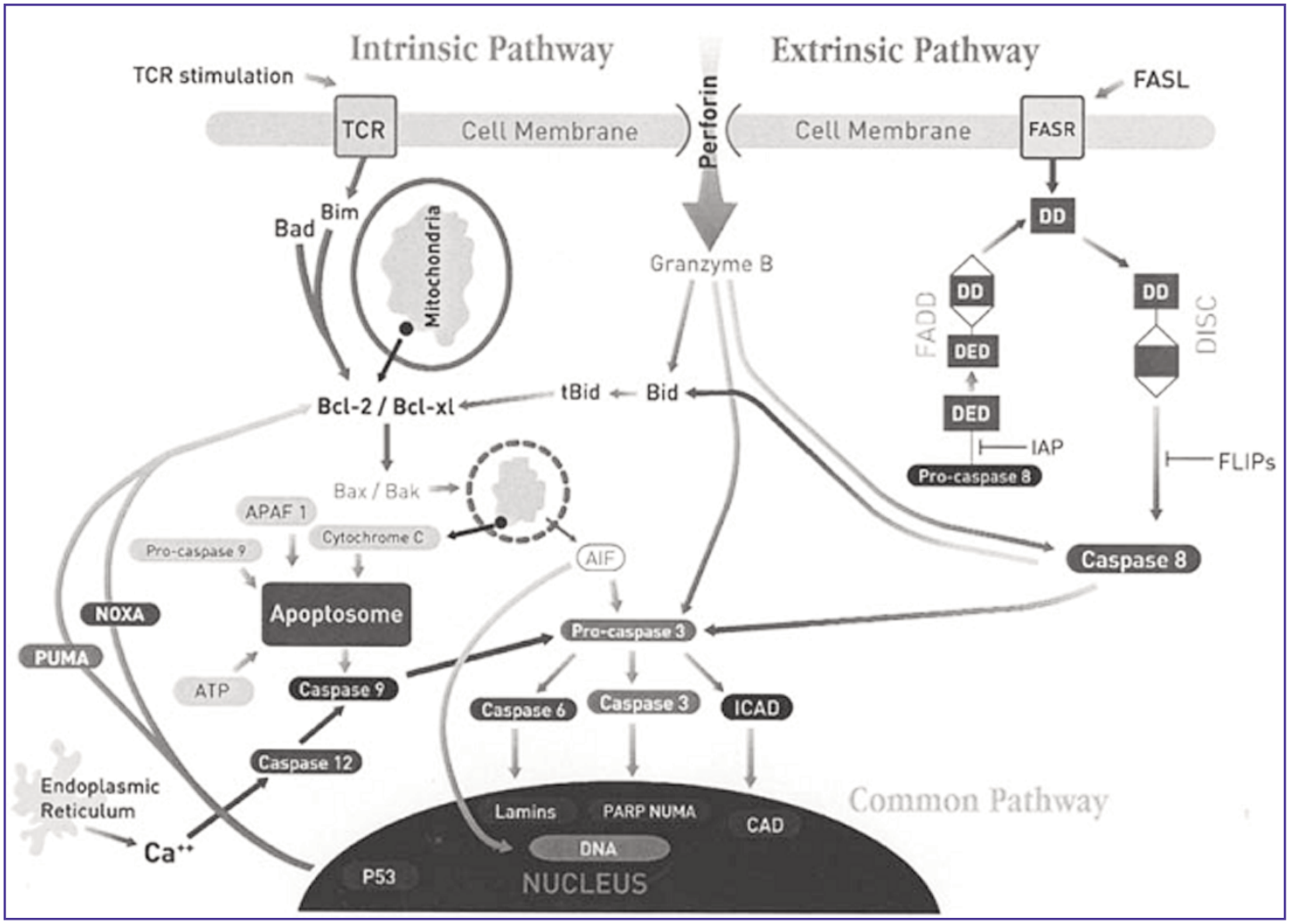
Η απόπτωση που γίνεται με την μεσολάβηση των **υποδοχέων θανάτου** (death receptor-mediated apoptosis) προκαλείται από την ενεργοποίηση ειδικών μορίων που περιλαμβάνουν τους υποδοχείς TNF (TNF-R), TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R) και fibrin adhesive system receptors (FasR) **(Εικόνα 2.1)**. Μετά την σύνδεση (ligation) των υποδοχέων αυτών σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του "σήματος θανάτου" παίζει η **"περιοχή θανάτου" (death domain, DD)** και η **"εκτελεστική περιοχή θανάτου" (death effector domain, DED)** (Paquet and Pierard, 2007). Έτσι, το σήμα

μεταφέρεται από την κυτταρική επιφάνεια μέσα στα ενδοκυττάρια **"μονοπάτια σήμανσης"** (signaling pathways) (Subramanian and Steer, 2009).

Μόλις ενεργοποιηθούν οι **υποδοχείς θανάτου** (death receptors) προκαλείται ενεργοποίηση της **προκασπάσης-8** και της **προκασπάσης-10** με διμερισμό της **"εκτελεστικής περιοχής θανάτου"** (death effector domain, DED) (Subramanian and Steer, 2009). Στα τύπου Ι κύτταρα, η **κασπάση-8** και **κασπάση-10** άμεσα ενεργοποιούν μεταγενέστερες (downstream) κασπάσες, όπως είναι η **κασπάση-3** και η **κασπάση-7** (Peter and Krammer, 2003; Subramanian and Steer, 2009). Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την σύνδεση του TNF στον υποδοχέα Fas περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με μία οικογένεια κυστεϊνικών πρωτεασών που σχετίζονται με την **ICE οικογένεια πρωτεϊνών** (**ιντερλευκίνης 1β-μετατρεπτικό ένζυμο**, interleukin 1β-converting enzyme, ICE) (Fulda et al, 1997; Devaraux et al, 1999; Hussein 2005). Η απόπτωση που προκαλείται από το TRAIL εξαρτάται από τον καταράκτη των κασπασών και μπορεί πλήρως να ανασταλεί από αναστολείς των κασπασών. Έτσι η έκφραση ή η απουσία έκφρασης συγκεκριμένων αποπτωτικών αναστολέων όπως είναι ο FLIP (FLICE-inhibitory protein) καθορίζει την ευαισθησία στην απόπτωση που καθορίζεται από το TRAIL και φαίνεται ότι η απόπτωση προκαλείται μόνο από υψηλές συγκεντρώσεις των αποπτωτικών αναστολέων, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις τους προκαλούν αυξημένη αντίσταση του TRAIL (Nguyen et al, 2000; Chawla-Sarkar et al, 2001; Franco et al, 2001).

## 2.6. Τα ενδογενή μονοπάτια της απόπτωσης (Εικόνα 2.3)

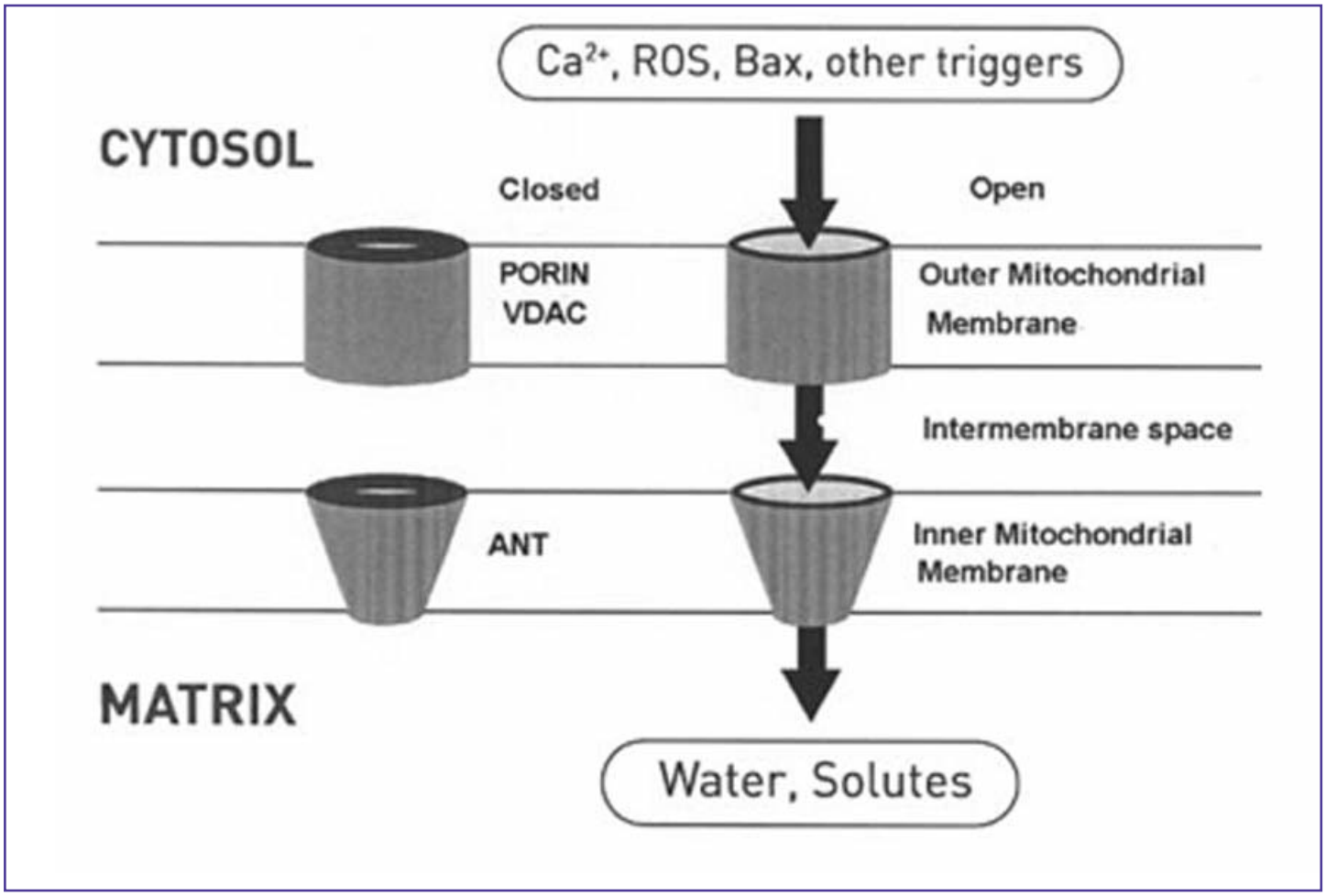
Στα τύπου ΙΙ κύτταρα σήμανσης όπως είναι τα ηπατοκύτταρα η πρόοδος του αποπτωτικού καταρράκτη συμβαίνει στοχεύοντας τα **μιτοχόνδρια** (Li et al, 2002; Subramanian and Steer, 2009). Στην περίπτωση αυτή, η **κασπάση-8** διασπά (cleave) το ανενεργό κυτταροπλασματικό **Bid**, απελευθερώνοντας το ενεργό τμήμα του **tBid** (Scaffidi et al, 1998; Subramanian and Steer, 2009). Μόλις ενεργοποιηθεί το tBid προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης στα προ-αποπτωτικά **Bax** και **Bak** και μετατόπισή τους στα μιτοχόνδρια όπου προκαλούν την απελευθέρωση παραγόντων απόπτωσης όπως είναι το **κυττόχρωμα c** με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγενέστερης **κασπάσης-3** (Eskes et al, 2000; Subramanian and Steer, 2009). Επιπρόσθετα, το tBid μπορεί να αναστείλει την δράση αντι-




**Εικόνα 2.3.** Σχηματική απεικόνιση των εξωγενών και ενδογενών μονοπατιών της απόπτωσης. Στο **εξωγενές μονοπάτι**, οι υποδοχείς θανάτου επιστρατεύουν πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor proteins) και ενεργοποιούν την καστάση-8 και καστάση-10 μετά από αλληλεπίδραση με τους προσδέτες τους. Στο **ενδογενές μονοπάτι** με την συμμετοχή των μιτοχονδρίων, το ερέθισμα θανάτου στοχεύει τα μιτοχόνδρια είτε άμεσα είτε έμμεσα με μεταγωγή (transduction) με τα προ-αποπτωτικά Bax and Bak. Στην συνέχεια, τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν το κυττόχρωμα c, το Smac/DIABLO και άλλους αποπτωγόνους παράγοντες. Το Smac/DIABLO αναστέλλει τους IAPs, που με την σειρά τους αναστέλλουν τις καστάσες. Το κυτόχρωμα c προκαλεί ολιγομερισμό του Apaf-1 με αποτέλεσμα την επιστράτευση της προκασπάσης-9 και ενεργοποίηση της καστάσης-9, και στην συνέχεια ενεργοποίηση άλλων καστασών. Η σύνδεση ανάμεσα στα δύο μονοπάτια ρυθμίζεται από το Bid, το οποίο διασπάται και ενεργοποιείται από την καστάση-8. **CARD**, Caspase activation and recruitment domain; **DED**, death effector domain; **IAP**,inhibitor of apoptosis protein (Paquet and Pierard, 2007, Subramanian and Steer, 2009).

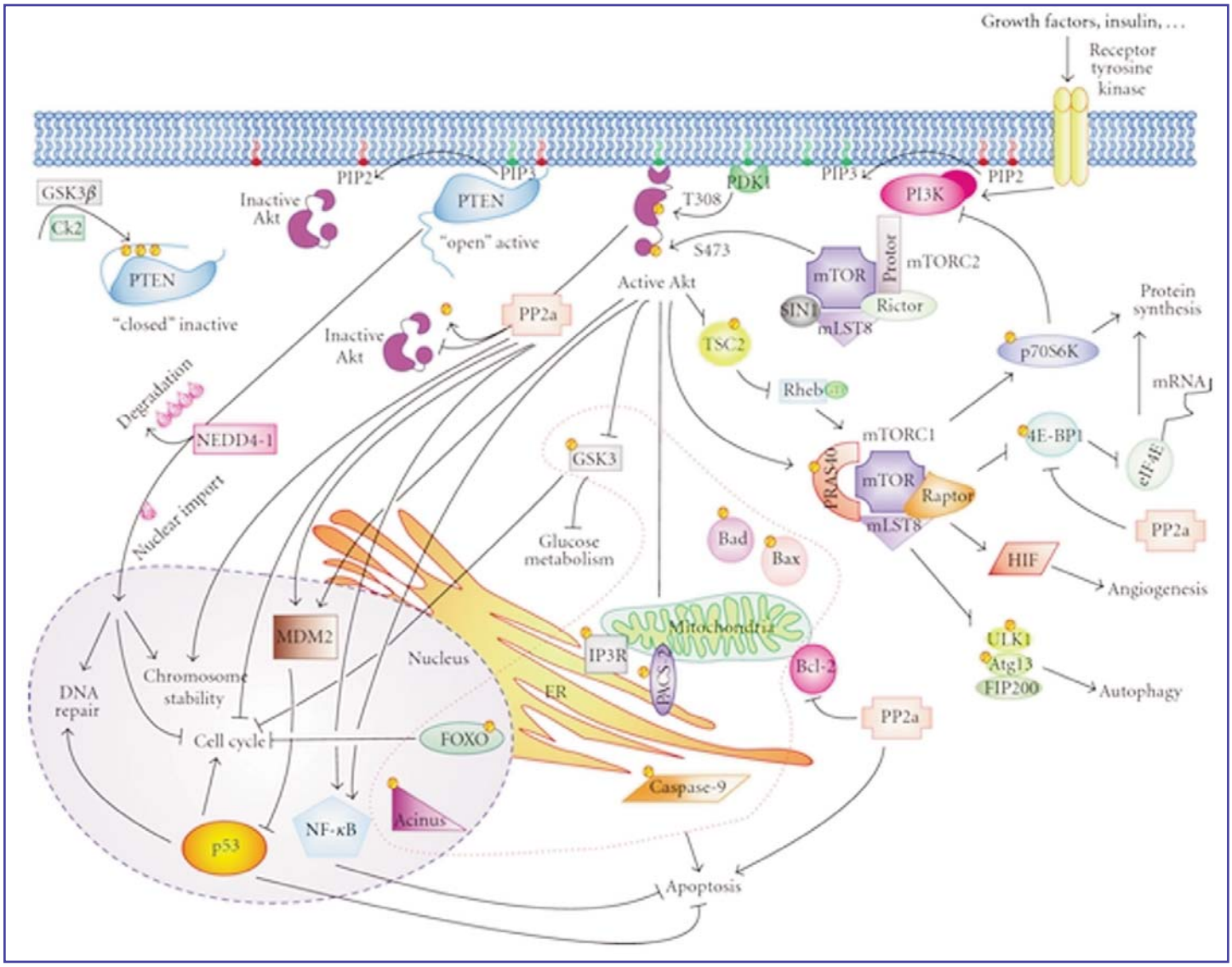
αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η Bcl-2 (Kim et al, 2000; Subramanian and Steer, 2009). Τα μιτοχόνδρια παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Μετά από ένα ερέθισμα απόπτωσης, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η βλάβη του DNA ή βλάβη στο δίπλωμα πρωτεΐνης (protein misfolding) αυξημένα επίπεδα ασβεστίου διαπερνούν (permeabilize) την μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας την απελευθέρωση αποπτωγόνων παραγόντων (apoptogenic factors) (Ricci et al, 2003; Subramanian and Steer, 2009). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η μιτοχονδριακή έσω μεμβράνη (mitochondrial inner membrane, IM) είναι σχετικά αδιαπέραστη στα μόρια. Επίσης, η διαπερατότητα της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης (outer mitochondrial membrane, OM) ρυθμίζεται καλά. Η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilization, **MMP**) μπορεί να συμβεί είτε με άνοιγμα του **μιτοχονδριακού πόρου διαπερατής μετάβασης** (mitochondrial permeability transition pore, MPT) **(Εικόνα 2.4)** είτε με τον σχηματισμό ειδικών καναλιών απελευθέρωσης στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (OM), κάτι το οποίο προωθείται από προ-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας (Subramanian and Steer, 2009). Επιπρόσθετα, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, που ονομάζονται **Bax** (Bcl-2-associated X protein) και **Bak** (Bcl-2 antagonist Killer-1), μπορεί να δράσουν σε στενή συνεργασία με συστατικά του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατής μετάβασης (MPT) όπως είναι ο **VDAC** και ο **μετατοπιστής νουκλεοτιδικής αδενίνης** (ANT) (Subramanian and Steer, 2009). Το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατής μετάβασης (MPT) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο κύριων ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον ενδο-μεμβρανικό χώρο (Paquet and Pierard, 2007; Subramanian and Steer, 2009).

Η πρώτη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που απελευθερώνονται αποτελείται από το **κυτόχρωμα c**, τον **δεύτερο παραγόμενο από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιητή των κασπασών** (second mitochondrial - derived activator of caspases, **Smac**) και την σερινική πρωτεάση **HtrA2/Omi**. Στην συνέχεια ενεργοποιούνται οι **κασπάσες**. Στο κυτταρόπλασμα, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα ως εξής: (i) το κυττόχρωμα c ολιγομερίζεται με τον **ενεγοποιητικό παράγοντα-1 της πρωτεασικής απόπτωσης** (protease-apoptosis activating factor-1, Apaf-I) επί της παρουσίας του dATP (ii) προσλαμβάνεται η προκασπάση-9 και (iii) σχηματίζεται το **αποπτόσωμα** (apoptosome). Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την σχάση (cleavage) και ενεργοποίηση της **κασπάσης-9**, η οποία με την σειρά της προκαλεί σχάση και ενεργοποίηση άλλων κασπασών, που δρουν ως τελεστές (effectors) του




**Εικόνα 2.4.** Σχηματική απεικόνιση του **μιτοχονδριακού πόρου διαπερατής μετάβασης** (mitochondrial permeability transition pore, MPT). Στον μιτοχονδριακό πόρο διαπερατής μεμβράνης υπάρχει ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που εκτείνεται από την έξω στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελεί συστατικό του μιτοχονδριακού πόρου, όπως είναι ο **μετατοπιστής νουκλεοτιδικής αδενίνης** (adenine nucleotide translocator, **ANT**) που βρίσκεται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη (IM) και ο **VDAC** (voltage-dependent anion channel) που βρίσκεται στην έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατής μετάβασης (MPT) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο κύριων ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον ενδο-μεμβρανικό χώρο με αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης (Paquet and Pierard, 2007).

προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Subramanian and Steer, 2009). Ο **δεύτερος παραγόμενος από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιητής των κασπασών** (second mitochondrial - derived activator of caspases, **Smac**) και η **σερινική πρωτεάση HtrA2/Omi** αποδίδουν




**Εικόνα 2.5. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού σήμανσης της κινάσης PI3K:** Το μονοπάτι σήμανσης της φωσφατιδυλ ινοσιτόλη 3-κινάσης (PI3K) αρχίζει με ενεργοποίηση της PI3K με σύνδεση σε υποδοχέα τυρισινικών κινασών κάποιου αυξητικού παράγοντα ή της ινσουλίνης. Η ενεργοποιημένη PI3K φωσφορυλιώνει και μετατρέπει τον λιπιδικό δεύτερο αγγελιοφόρο PIP2 (φωσφατιδυλ ινοσιτόλη 4,5 διφωσφατάση) σε PIP3 (φωσφατιδυλ ινοσιτόλη 3,4,5 τριφωσφατάση) με αποτέλεσμα την διπλή φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt κινάσης. Η Akt προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση με φωσφορυλίωση/αναστολή αρκετών προαποπτωτικών στόχων ή με ενεργοποίηση του συμπλέγματος mTOR1, το οποίο είναι σημαντικό για την αυτοφαγία, την αγγειγένεση και σύνθεση των πρωτεϊνών. Τα μέλη της οικογένειας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2a (PP2a) είναι ικανά να αποφωσφορυλιώνουν και να αναστέλλουν την Akt, διευκολύνοντας την απόπτωση επίσης με άμεση φωσφορυλίωση του Bcl-2. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN αρνητικά ρυθμίζει την σήμανση της PI3K με αποφωσφορυλίωση της PIP3, και επιστροφή της σε PIP2. Η ενεργοποιημένη μορφή του PTEN μετατοπίζεται στον πυρήνα, προωθεί την επιδιώρθωση του DNA, αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο και σταθεροποιεί την χρωματίνη (Bononi et al, 2011).

ώριμα πολυπεπτίδια, τα οποία προωθούν την απόπτωση αναστέλλοντας τα μέλη της οικογένειας των ανασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis protein, IAP family) (Zou et al, 1999; Du et al, 2000; Martins et al, 2002; Subramanian and Steer, 2009).

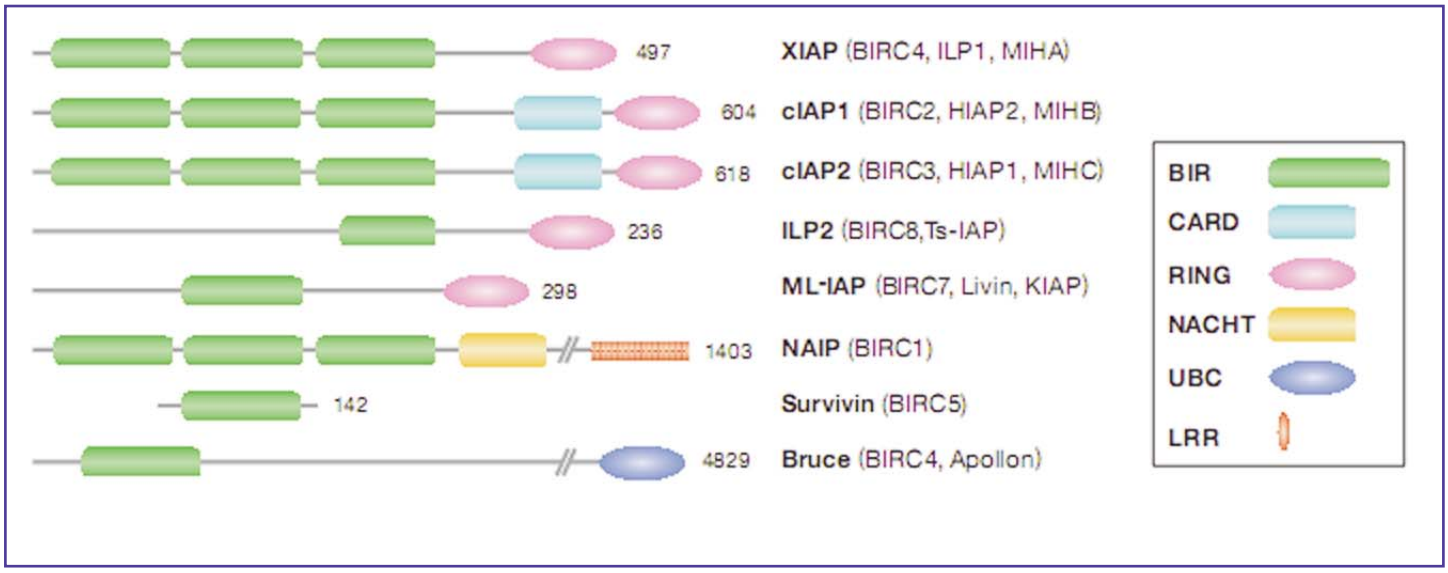
Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που απελευθερώνονται περιλαμβάνει τον **παράγοντα που προκαλεί απόπτωση** (apoptosis - inducing factor, **AIF**), την **ενδονουκλεάση G** (endoG) και τον **παράγοντα 40 που προκαλεί κατάτμιση του DNA (DFF40)** ή την **DNάση που ενεργοποιείται από την κασπάση** (caspase-activated DNase, **CAD**). Η λειτουργία του AIF και της endoG είναι ανεξάρτητη από τις κασπάσες. Κατά την διάρκεια της απόπτωσης, στο μιτοχόνδριο η ακολουθία (sequence) του παράγοντα που προκαλεί απόπτωση (apoptosis - inducing factor, AIF) διασπάται (cleave) δημιουργώντας έτσι ώριμη μορφή πρωτεΐνης, η οποία μεταφέρεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα και στην συνέχεια στον πυρήνα. Εκεί προωθεί την συμπήκνωση της χρωματίνης (chromatin condensation) και την κατάτμηση του DNA (DNA fragmentation) σε μεγάλο βαθμό. Παρόμοιο ρόλο παίζει και η EndoG, μια ειδική μιτοχονδριακή ενδονουκλεάση, η οποία κατά την απόπτωση μεταφέρεται στον πυρήνα αφού υποστεί σχάση (cleavage) σε **κασπάση-3**, προκαλώντας νουκλεοσωμική κατάτμηση του DNA και συμπήκνωση της χρωματίνης (Enari et al, 1998; Susin et al, 1999; Li et al 2001; Elmore, 2007, Subramanian and Steer, 2009).

## 2.7. Γονίδια επιβίωσης

### 2.7.1. Η κινάση PI3K και η επιβίωση (Εικόνα 2.5)

Ένα καλά χαρακτηρισμένο αντι-αποπτωτικό μονοπάτι περιλαμβάνει την σήμανση επιβίωσης της **κινάσης PI3K** (phosphatidyl inositide 3'-OH kinase). Όταν ενεργοποιηθεί η PI3K καταλύει την γένεση (generation) των 3'- φωσφοροεξαρτώμενων φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυτταρικών μεσολαβητών (intermediates) όπως είναι η σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση **Akt** που καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα η Akt προκαλεί φωσφορυλίωση του προ-αποπτωτικού Bad (Subramanian and Steer, 2009).

### 2.7.2. Η οικογένεια Bcl-2 και η επιβίωση




**Εικόνα 2.6. Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης του ανθρώπου (IAP).** Επιπρόσθετα από μία τουλάχιστον περιοχή με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των Bacillovirus ιών (Bacillovirus IAP Repeat domain, **BIR**), τα περισσότερα μέλη της οικογένειας IAP έχουν άλλες διακριτές λειτουργίες. Η περιοχή "πραγματικά ενδιαφέρον νέο γονίδιο" (really interesting new gene, **RING**) που βρίσκεται σε αρκετά μέλη της οικογένειας IAP είναι μία E3 λιγκάση, η οποία πιθανώς απευθείας στοχεύει στο σύστημα αποδόμησης ουβικιτίνη-πρωτεόσωμα (ubiquitin-proteasome degradation system). Οι περιοχές επιστράτευσης των κασπασών (caspase-recruitment domains, **CARDs**) μπορεί να μεσολαβούν στις ομοτυπικές πρωτεΐνη-πρωτεΐνη αλληλεπιδράσεις. Ο αναστολέας της απόπτωσης BRUCE έχει μιά περιοχή σύζευξης ουβικιτίνης (ubiquitin-conjugation domain, **UBC**). Η περιοχή **NACHT** της πρωτεΐνης αναστολέα της απόπτωσης της οικογένειας NRL (NLR family, apoptosis inhibitory protein, NAIP), μοιάζει με μία περιοχή νουκλεοτίδο-ολιγομερισμού (nucleotide-oligomerization domain) που σχετίζεται με την AAA +NTPάση. Οι "πλούσιες σε λευκίνη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες" (leucine-rich repeats, **LRRs**) είναι όμοιες με τους "σαν Toll υποδοχείς" (Toll-like receptors) και λειτουργούν σαν παθογόνοι αισθητήρες. **BIRC**, baculoviral IAP-repeat-containing; **HIAP**, human IAP; **IAP**, inhibitor of apoptosis protein; **ILP**, IAP-like protein; **KIAP**, kidney IAP; **MIH**, mammalian IAP homologue; **ML-IAP** melanoma IAP; **NACHT**, domain found in NAIP, CIITA, HET-E και TP-1; **Ts-IAP**, testicular IAP; **XIAP**, X-linked IAP (Eckelman et al, 2006).

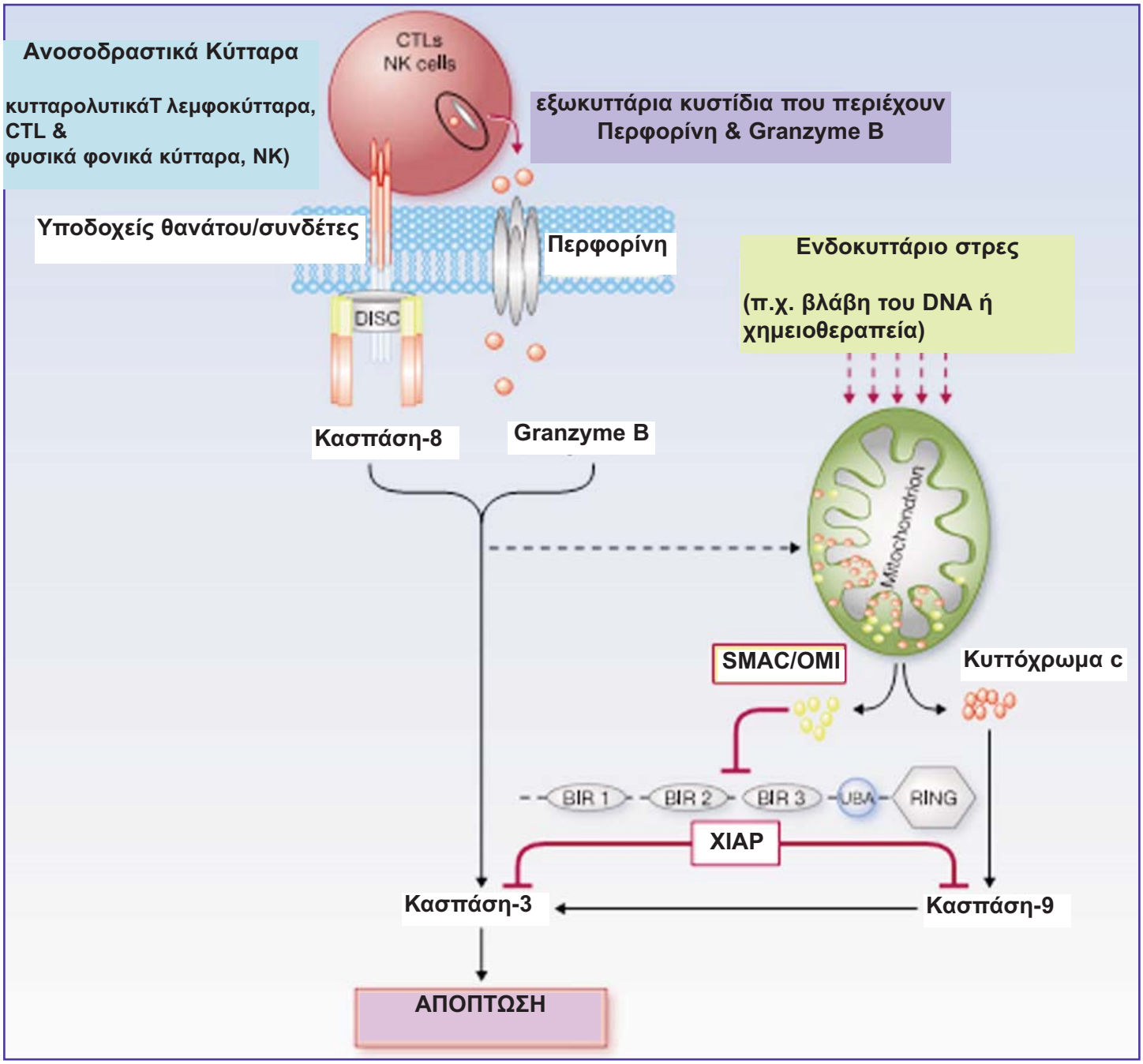
Το γονίδιο Bcl-2 έχει εμπλακεί στα λεμφώματα των Β-κυττάρων (B-cell lymphomas). Τα αντι-αποπτωτικά ή προ-επιβιωτικά (pro-survival) μέλη της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mci-I, AI) είναι αναπόσπαστες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται στη έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σε αντίθεση, τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 όπως είναι το Bax εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ως αδρανείς μορφές (inert forms) ή ανενεργείς πρόδρομες μορφές (inactive precursors) (Gross et al, 1999; Subramanian and Steer, 2009). Η προ-επιβιωτική ή αντι-αποπτωτική δράση των μελών της οικογένειας Bcl-2 όπως είναι το Bcl-2 και το Bcl-xL οφείλεται στα εξής: **(i)** αλληλεπίδραση με το Bax, εμποδίζοντας τον σχηματισμό μιτοχονδριακών πόρων και την απελευθέρωση πρωτεϊνών που προκαλούν απόπτωση, με αποτέλεσμα τον μετριασμό την προόδου της απόπτωσης (Antonsson et al, 1997; Subramanian and Steer, 2009). **(ii)** Ρύθμιση της μιτοχρονδριακής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της αλληλεπίδρασης του Apaf-1 με την κασπάση-9. **(iii)** Μπλοκάρισμα της απόπτωσης που προκαλείται από το c-Myc (Luo et al, 1997, Hussein 2005).

### 2.7.3. Ο συνδέτης του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων και η επιβίωση

Ο παράγων των βλαστικών κυττάρων (stem cell factor) είναι ένας αυξητικός παράγων (growth factor), ο οποίος έχει έκδηλα αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, διαφοροποίηση και επιβίωση αρκετών κυτταρικών τύπων (Hussein, 2005). Το πρωτο-ογκογονίδιο c-KIT είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης, το οποίο ενεργοποιείται από την πρόσδεση του συνδέτη του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (SCF ligand) (Hussein, 2005).

### 2.7.4. Η οικογένεια των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis proteins, IAPs) του ανθρώπου και η επιβίωση (Εικόνα 2.6)

Η οικογένεια των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (IAP) περιλαμβάνει οκτώ γνωστά μέλη, τα οποία είναι η **σουρβαϊβίνη** (survivin), η **λεβίνη** (levin), η **Χ-συνδεδεμένη πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης** (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP), ο **c αναστολέας της απόπτωσης 1** (cIAP1) , ο **c αναστολέας της απόπτωσης 2** (cIAP2), η




**Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση της δράσης της Χ-συνδεδεμένης αναστολέα της απόπτωσης πρωτεΐνης (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) στην αναστολή των καspασών.** Η απόπτωση προκαλείται από την οικογένεια των πρωτεασών, καspάσες. Η δραστηριότητα των καspασών είναι υπεύθυνη για την καταστροφή της οργάνωσης του κυττάρου. Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης είναι ένας αισθητήρας εξωκυττάριων σημάτων, που εκπέμπονται πρωτίστως από τα ανοσοδραστικά κύτταρα (immune-effector cells), τα οποία περιλαμβάνουν τα κυτταρολυτικά Τ λεμφοκύτταρα (cytolytic T lymphocytes, CTL) και τα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK) και εξασφαλίζουν την ομοιόσταση των ιστών και την ανοσοποιητική επιτήρηση. Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης αντιλαμβάνεται την ενδοκυττάρια βλάβη και προωθεί την απελευθέρωση μιτοχονδριακών προαποπτωτικών παραγόντων όπως είναι το κυττόχρωμα c και ενεργοποιεί την καspάση 9, που είναι εκκινητής της απόπτωσης. Η Χ-συνδεδεμένη αναστολέας της απόπτωσης πρωτεΐνη (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη που είναι ισχυρός αναστολέας των καspασών αναστέλλοντας την ενζυμική τους δραστηριότητα τόσο κατά την φάση εκκίνησης της απόπτωσης (initiation phase) (καspάση-9) όσο και κατά την φάση εκτέλεσης της απόπτωσης (execution phase) (καspάση-3 και καspάση-7) (Kashkar, 2010).

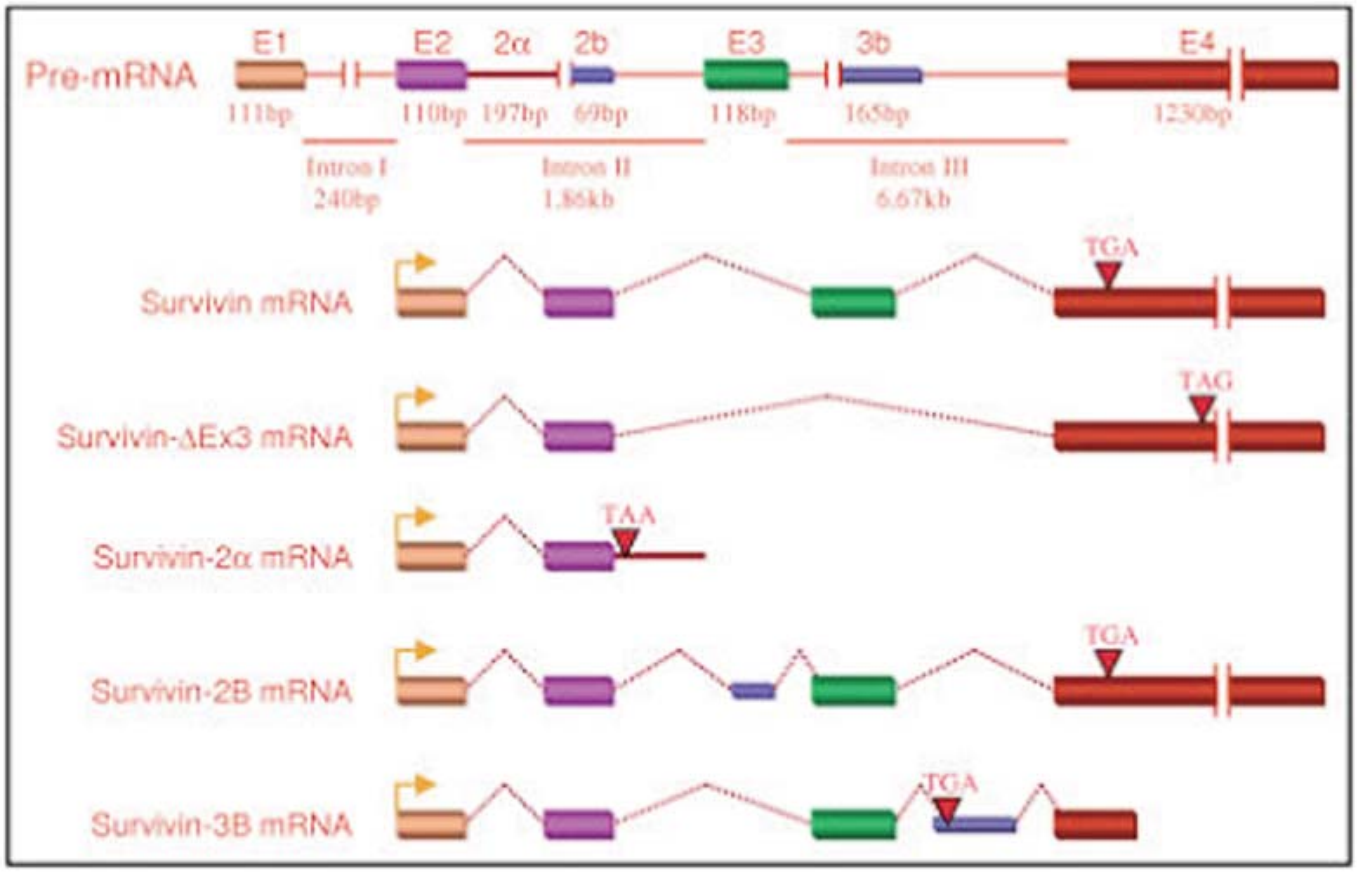
**πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης της οικογένειας NRL** (NLR family, apoptosis inhibitory protein, **NAIP**), η **πρωτεΐνη 2 σαν αναστολέας της απόπτωσης** (IAP-like protein 2, **ILP2**) και ο **αναστολέας της απόπτωσης BRUCE** **(Εικόνα 2.6)** [Altieri 2008; Li et al, 1998; Hunter et al, 2007].

### 2.7.4.1. Η Χ-συνδεδεμένη αναστολέας της απόπτωσης πρωτεΐνη (XIAP) και η επιβίωση

Η Χ-συνδεδεμένη αναστολέας της απόπτωσης πρωτεΐνη (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη που είναι ισχυρός αναστολέας των καασπασών αναστέλλοντας την ενζυμική τους δραστηριότητα τόσο κατά την φάση εκκίνησης της απόπτωσης (initiation phase) (καασπάση-9) όσο και κατά την φάση εκτέλεσης της απόπτωσης (execution phase) (καασπάση-3 και καασπάση-7) (Hussein, 2005; Kashkar, 2010) **(Εικόνα 2.7)**. Η XIAP θεωρείται ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος του καρκίνου και η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη φαρμάκων που θα στοχεύουν την XIAP αφενός στην δημιουργία κλινικών αναστολέων της XIAP που θα εμποδίζουν την έκφραση της XIAP και αφετέρου στην δημιουργία μικρών μορίων αναστολέων που θα ανταγωνίζονται την δράση της XIAP (Kashkar, 2010).

### 2.7.4.2. Η survivin και η επιβίωση

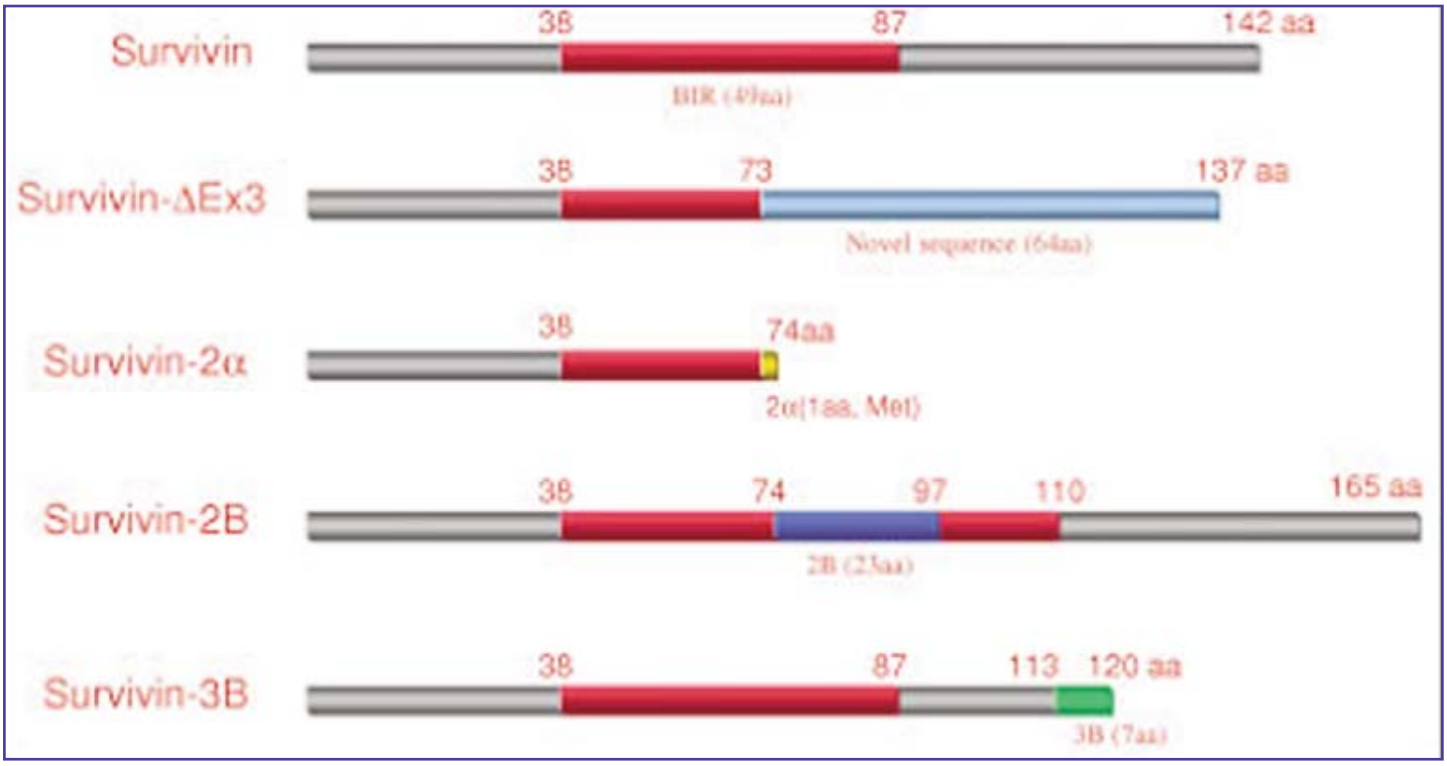
Η survivin είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των **αναστολέων της απόπτωσης** (Inhibitor of Apoptosis Protein family, **IAP**) [Zaffaroni and Pennati, 2005; Ambrosini et al, 1998] και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας **περιοχής με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των Bacillovirus ιών** (Bacillovirus IAP Repeat domain, **BIR**) με τελικές περιοχές που έχουν δακτύλιο ψευδαργύρου (Zn). Η survivin είναι ένα προ-αποπτωτικό μόριο, το οποίο είναι θεμελιώδες για τη σωστή κυτταρική διαίρεση [Ambrosini et al, 1998] και την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Hussein 2005). Η survivin αναστέλλει κυρίως την απόπτωση που εξαρτάται από τις προ-αποπτωτικές καασπάσες αλλά φαίνεται ότι αναστέλλει και την ανεξάρτητη από τις καασπάσες απόπτωση (Hussein, 2005; Li and Ling, 2006), όπως προκύπτει από τις παρακάτω έρευνες: (1) Διευκρίνιση του ρόλου της survivin που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια στην αναστολή των καασπασών στην διαδικασία της




**Εικόνα 2.8. Σχηματική απεικόνιση της δομής των πέντε γνωστών παραλλαγών της σουρβαϊβίνης.** Στο γονίδιο της σουρβαϊβίνης υπάρχουν τέσσερες κυρίαρχες περιοχές (dominant) (E1, E2, E3, E4) και τρία κρυμμένα εξόνια (2α, 2b, 3b). Διαφορετικά ματίσματα (splicing) του προ-mRNA της σουρβαϊβίνης παράγουν 5 γνωστές παραλλαγές του mRNA (Li and Ling, 2006).

απόπτωσης (Dohi et al, 2004a). (2) Εμπλοκή της survivin στην ρύθμιση της ανεξάρτητης από τις κασπάσες απόπτωση (Chakravarti et al, 2004; Liu et al, 2004). (3) Αλληλεπίδραση και συνεργασία της survivin με HBXIP, HSP90, XIAP και c-IAP-1 για την ρύθμιση της απόπτωσης (Marusawa et al, 2003; Fortugno et al, 2003; Dohi et al, 2004b; Samuel et al, 2005; Li and Ling, 2006). (iv) αύξηση της τελομεράσης του ανθρώπου (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) με την μεσολάβηση της survivin (Endoh et al, 2005).

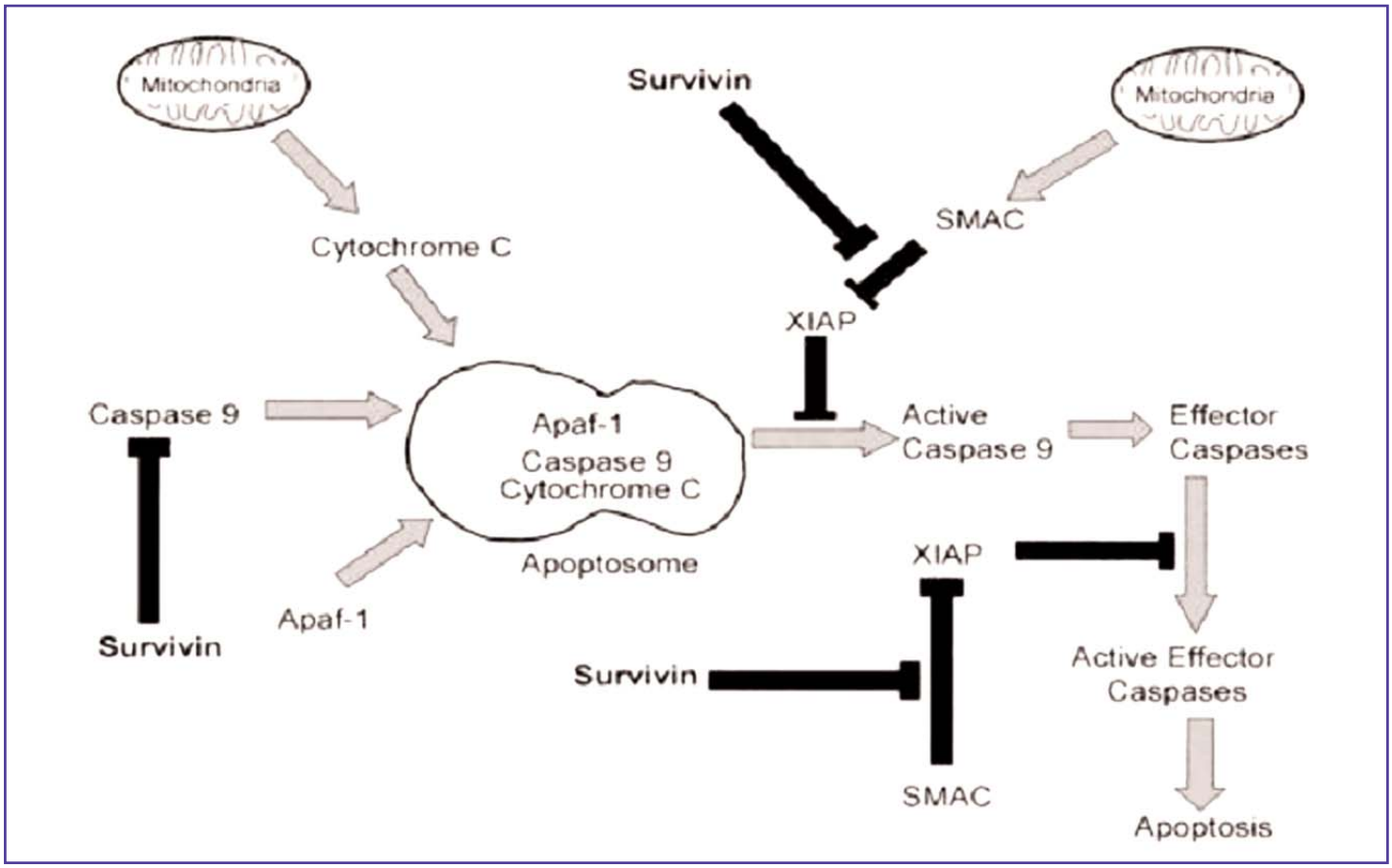
Το γονίδιο SURVIVIN βρίσκεται στο **χρωμόσωμα 17**, εκτείνεται στην ζώνη q25 (17q25) και είναι υπεύθυνο για την πρωτεΐνη survivin (16,5 kDa). Το μόριο της survivin δεν




**Εικόνα 2.9. Σχηματική απεικόνιση των** δομών των πρωτεϊνών για τις παραλλαγές της σουρβαϊβίνης. Η σουρβαϊβίνη και η σουρβαϊβίνη-3Β κατέχουν άθικτη την **περιοχή με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των Bacillovirus ιών** (Bacillovirus IAP Repeat domain, **BIR**), ενώ στην σουρβαϊβίνη-ΔΕx3 και στην σουρβαϊβίνη-2α η περιοχή BIR έχει περικοπεί (Li and Ling, 2006).

εντοπίζεται μόνο στην μιτωτική άτρακτο (mitotic spindle) και στο κεντρομερίδιο (centromere/kinetochrome) των χρωμοσωμάτων, αλλά εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια. Η πολλαπλή υποκυττάρια εντόπιση της survivin ευθύνεται για τις πολλαπλές της λειτουργίες της στον κυτταρικό μεταβολισμό και τις πολλαπλές της ανταποκρίσεις. Εναλλακτικά ματίσματα (splicing) της αντιγραφής (trancript) του γονιδίου της survivin (**Εικόνα 2.8**) κωδικοποιεί διαφορετικές πρωτεϊνες (**Εικόνα 2.9**). Αυτές οι διαφορετικές ισομορφές της survivin φαίνεται να έχουν μοναδικές υποκυττάριες εντοπίσεις και λειτουργίες. Επίσης, έχουν βρεθεί νεότερες μορφές survivin. Η ύπαρξη τόσων ισομορφών survivin κάνουν το γονίδιο της survivin να έχει ποικίλες δράσεις και να ρυθμίζεται περισσότερο αυστηρά (Li and Ling, 2006).

Η **Εικόνες 2.8 και 2.9** απεικονίζει την δομή των πέντε γνωστών παραλλαγών της




**Εικόνα 2.10. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών με τους οποίους η σουρβαϊβίνη αναστέλλει την απόπτωση.** Η σουρβαϊβίνη μπορεί να αναστέλλει την απόπτωση είτε με πρόσδεσή της στην κασπάση-9 είτε με μπλοκάρισμα του Smac (Khalil, 2009).

σουρβαϊβίνης. Η **Εικόνα 2.8** δείχνει την δομή του γονιδίου της σουρβαϊβίνης/προ-mRNA και το ώριμο mRNA αυτής. Στο γονίδιο της σουρβαϊβίνης υπάρχουν τέσσερες κυρίαρχες περιοχές (dominant) (E1, E2, E3, E4) και τρία κρυμμένα εξόνια (2α, 2b, 3b). Διαφορετικά ματίσματα (splicing) του προ-mRNA της σουρβαϊβίνης παράγουν 5 γνωστές παραλλαγές του mRNA. Η **Εικόνα 2.9** απεικονίζει τις δομές των πρωτεϊνών για τις παραλλαγές της σουρβαϊβίνης. Η σουρβαϊβίνη και η σουρβαϊβίνη-3B κατέχουν άθικτη την **περιοχή με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των Bacillovirus ιών** (Bacillovirus IAP Repeat domain, **BIR**), ενώ στην σουρβαϊβίνη-ΔEx3 και στην σουρβαϊβίνη-2α η περιοχή BIR έχει περικοπεί (Li and Ling, 2006).

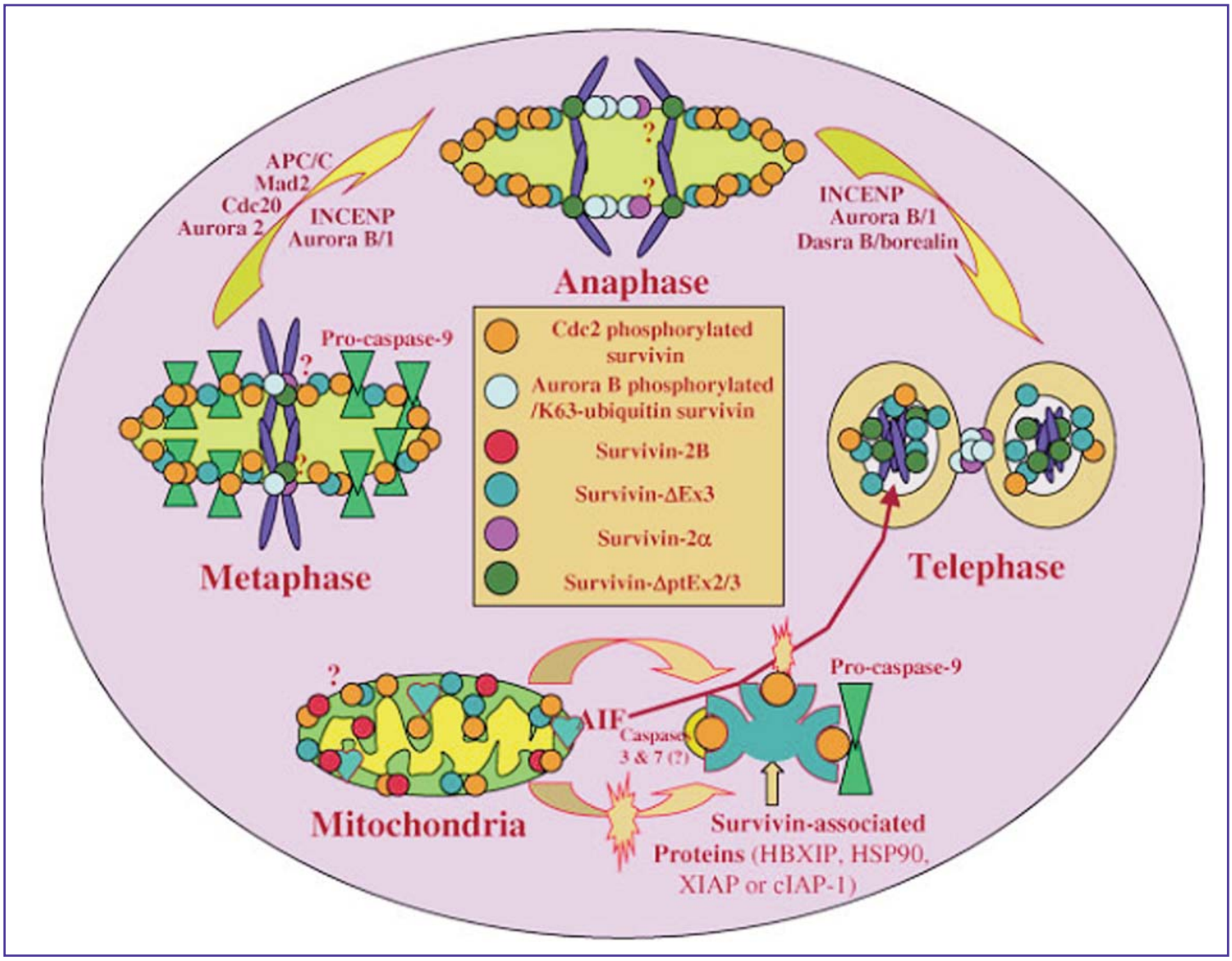
### 2.7.4.3. Ο ρόλος της survivin στην αναστολή της απόπτωσης (Εικόνα 2.10)

Υπάρχουν τρεις αποδείξεις για την υποστήριξη της έννοιας ότι η σουρβαϊβίνη έχει ανεξάρτητο και ξεχωριστό ρόλο τον αναστολή της απόπτωσης, *in vitro* και *in vivo*. Πρώτον, υπερέκφραση της σουρβαϊβίνης σχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού θανάτου που αρχίζει με το εξωγενές ή το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Δεύτερον, διαγονιδιακή (transgenic) έκφραση της σουρβαϊβίνης οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης in vivo και ήπατα που απομονώθηκαν από ζώα ετεροζυγώτες στην σουρβαϊβίνη (+/-) επέδειξαν υπερβολική απόπτωση σε ανταπόκριση της ελαττωμένης σύνδεσης του Fas. Τρίτον, μόρια ανταγωνιστές της σουρβαϊβίνης προκαλούν κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητο από κασπάσες, αύξηση του αποπτωτικού ερεθίσματος και αντικαρκινική δράση *in vivo*. Όμως ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η σουρβαϊβίνη καταστέλλει την απόπτωση δεν είναι ξεκάθαρα κατανοητός και αρκετοί μηχανισμοί θεωρούνται υπεύθυνοι **(Εικόνα 2.10).** Άμεση καταστολή της κασπάσης-3 από την σουρβαϊβίνη εικάζεται από κάποιους ερευνητές. Άλλη εικασία είναι ότι η σουρβαϊβίνη προσδένεται στην κασπάση-9 (Khalil, 2009; Altieri, 2003; Castedo et al, 2004; Li, 2005; Okada and Mak, 2004; Grossman et al, 2001; Jones et al, 2000).

### 2.7.4.4. Ο ρόλος της survivin στην καρκινογένεση

Ο Dohi και συνεργάτες έδειξαν ότι η survivin δεν εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των θετικών στην survivin κυττάρων σε αρκετούς ιστούς ενηλίκων. Όμως η survivin εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές υποδηλώνοντας ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου (Dohi et al, 2004a, 2004b; Li and Ling, 2006). Η survivin θα μπορούσε να είναι στόχος για την πρόληψη του καρκίνου. Έτσι κάποια αντικαρκινικά σκευάσματα φαίνεται να δρούν αναστέλλοντας την έκφρασή της (Li, 2005). Ο Li και συνεργάτες επέδειξαν ότι η αναστολή της δράσης της survivin από ενώσεις βιταμίνης D3 είναι απαραίτητη για την διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης που εξαρτάται από την βιταμίνη D3 στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και την πρόκληση απόπτωσης (Li et al, 2005). Επίσης, ο Zhang και συνεργάτες έδειξαν ότι το sulindac το οποίο είναι χημειοθεραπευτικό σκεύασμα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου προκαλεί σημαντική μείωση της έκφρασης της survivin (Zhang et al, 2004).

Το διαγραμματικό μοντέλο της **Εικόνας 2.11** συνοψίζει τον ρόλο και την υποκυττάρια



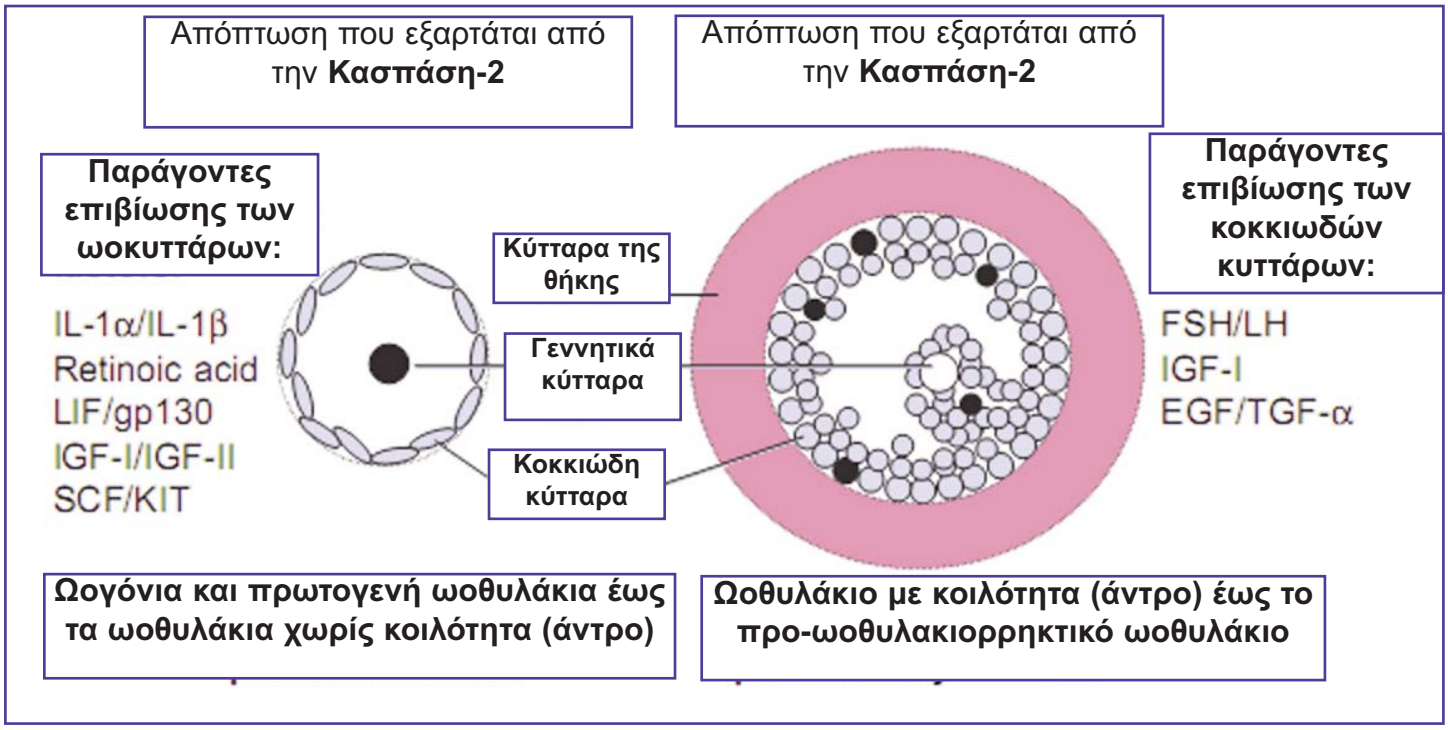

**Εικόνα 2.11. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου και της υποκυττάριας εντόπισης της σουρβαϊβίνης και των παραλλαγών της στην ρύθμιση της απόπτωσης και της μίτωσης σε καρκινικά κύτταρα** (Li and Ling, 2006).

εντόπιση της σουρβαϊβίνης και των παραλλαγών της στην ρύθμιση της απόπτωσης και της μίτωσης σε καρκινικά κύτταρα. **(A).** Η δυναμική Cdc2-φωσφοριωμένη σουρβαϊβίνη εντοπίζεται στην μιτωτική άτρακτο και το κεντρόσωμα για να αναστείλλει ένα αποπτωτικό μονοπάτι κατά την διάρκεια της μίτωσης και να διευκολύνει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου (mitotic spindle). **(B).** Η δυναμική Aurora B-φωσφοριωμένη/K63-ubiquitin σουρβαϊβίνη δημιουργεί σύμπλεγμα με την Aurora B (μια πρωτεϊνική κινάση) και το INCENP (μια πρωτεΐνη του εσωτερικού

κεντρομεριδίου) και παίζει οδηγό ρόλο στην πρόσδεση του χρωμοσωμικού πρωτεϊνικού συμπλέγματος στο κεντρομερίδιο των χρωμοσωμάτων για να ρυθμίσει την ακριβή ολοκλήρωση του χρωμοσωμικού διαχωρισμού (chromosome segregation) και της κυτταροκίνησης (cytokinesis). **(Γ).** Η σουρβαϊβίνη επίσης εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα σε περίπτωση αποπτωτικής προσβολής (apoptotic insult). Η σουρβαϊβίνη που απελευθερώνεται μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες για να ασκήσει τον ρόλο της στην αναστολή της απόπτωσης, G1/S μετάβαση/πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και πιθανές άλλες λειτουργίες. Επιπρόσθετα, η σουρβαϊβίνη που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια μπορεί να μπλοκάρει την απελευθέρωση του παράγοντα που προκαλεί την απόπτωση (apoptosis-inducing factor, AIF) και την πυρηνική μετατόπιση ως έναν μηχανισμό ρύθμισης της απόπτωση ανεξάρτητα από τις κασπάσες. (Δ). Η σουρβαϊβίνη-2B εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Ένας δυνητικός τρόπος της σουρβαϊβίνης-2B να προκαλεί κυτταρικό θάνατο είναι ότι η αυξημένη σουρβαϊβίνη-2B μπορεί να αλληλεπιδρά και να μπλοκάρει την απελευθέρωση της σουρβαϊβίνης από τα μιτοχόνδρια, να προωθεί την απελευθέρωση του AIF και την πυρηνική μετατόπιση. (Ε). Η σουρβαϊβίνη-ΔEx3 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα στα κύτταρα της διάφασης (interphase) και μετατοπίζεται στην μιτωτική άτρακτο κατά την διάρκεια της μίτωσης. Όμως εάν η σουρβαϊβίνη-ΔEx3 παίζει έναν ρόλο στον έλεγχο της μιτωτικής ατράκτου και στην ρύθμιση της απόπτωσης δεν έχει ακόμα καθορισθεί. Η σουρβαϊβίνη-ΔEx3 αποικοδομείται στα νουκλεόλια (nucleolus). (ΣΤ). Η σουρβαϊβίνη-ΔEx3 και η σουρβαϊβίνη-2α σχετίζονται με το χρωμοσωμικό DNA κατά την μίτωση σε συγκεκριμένες καταστάσεις. Η υποκυττάρια εντόπιση της σουρβαϊβίνης-3B δεν έχει καθορισθεί (Li and Ling, 2006).

### 2.7.5. Η απόπτωση και επιβίωση στην ωοθήκη και οι μοριακοί μηχανισμοί (Εικόνα 2.12)

Στη ωοθήκη, οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την ζωή και τον θάνατο περιλαμβάνουν έναν διάλογο ανάμεσα σε προ-αποπτωτικά και προ-επιβιωτικά (pro-survival) μόρια. Μορφολογικά, η απόπτωση βρίσκεται στα ωοθυλάκια της ωοθήκης κατά την εμβρυϊκή και ενήλικη ζωή. Κατά την εμβρυϊκή ζωή, η απόπτωση εντοπίζεται στα ωάρια, ενώ κατά την ενήλικο ζωή ανιχνεύεται στα κοκκιώδη κύτταρα των δευτερογενών ωοθυλακίων και των ωοθυλακίων με άνδρο. Οι




**Εικόνα 2.12. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών που δρουν στην ωοθήκη για την επιβίωση ή απόπτωση των κυττάρων της.** Η απόπτωση που αρχίζει στα ωογόνια και πρωτογενή ωοθυλάκια (primordial) έως και τα ωοθυλάκια χωρίς κοιλότητα (preantral follicles) είναι κασπάση-2 εξαρτώμενη και μπορεί να μετριασθεί από παράγοντες επιβίωσης των κυττάρων της όπως είναι η ιντερλευκίνη-1α (IL-1α) και η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), το ρετινοϊκό οξύ, ο παράγων που αναστέλλει την λευχαιμία (leukaemia inhibiting factor, LIF) διαμέσου του υποδοχέα του gp130, ο αυξητικός παράγων σαν την ινσουλίνη I (insulin-like growth factor, IGF-I), ο αυξητικός παράγων σαν την ινσουλίνη II (insulin-like growth factor, IGF-II) και ο παράγοντας των βλαστικών κυττάρων (stem cell factor, SCF) διαμέσου του υποδοχέα του KIT. Ο θάνατος του ωοκυττάρου οδηγεί τελικά σε θάνατο των κοκκιωδών κυττάρων και ατρησία του ωοθυλακίου. Αντίθετα, η απόπτωση που εξαρτάται από την κασπάση-3 στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων είναι συχνή αιτία ατρησίας των ωοθυλακίων κατά την φάση των ωοθυλακίων με κοιλότητα (άντρο) έως την φάση του τριτογενούς ωοθυλακίου (προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο). Οι μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν αποπτωτικά γεννητικά ή σωματικά κύτταρα. Αυτοκρινικοί και παρακρινικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι γνωστοί ότι προωθούν την επιβίωση στα κοκκιώδη κύτταρα περιλαμβάνουν τα εξής: LH, FSH, IGF-I, EGF (epidermal growth factor) και TGF-α (transforming growth factor α) (Johnson and Bridgham, 2002).

υποθέσεις για τους υποκείμενους μηχανισμούς της αποπτωτικής απώλειας των ωοθυλακίων περιλαμβάνουν: **(i) την "ρύθμιση της ποιότητας" των ωαρίων** για να περιοριστούν οι μειωτικές ανωμαλίες **(ii) την έλλειψη σε παράγοντες επιβίωσης** και **(iii) την "αυτο-θυσία"** (self-sacrifice) (Hussein 2005). **Κατά την διάρκεια της ωογένεσης του ανθρώπου, οι δομικές αλλαγές της απόπτωσης περιλαμβάνουν τις δύο κύριες φάσεις της μειωτικής διαδικασίας: (α) αρχική φάση:** περιλαμβάνει τα ωογόνια και ωοκύτταρα στο στάδιο της προ-λεπτοταινίας και **(β) τελική φάση:** περιλαμβάνει τα ωοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας. Οι πρώιμες μορφολογικές αλλαγές των ωαρίων που έχουν υποστεί ατρησία περιλαμβάνουν επανάταξη (retraction) των κοκκιωδών κυττάρων και μικρολαχνών που προέρχονται από το ωάριο (oocyte-derived microvilli) και συμπήκνωση (condensation) των μιτοχονδρίων με απώλεια των ακρολοφιών τους (cristae). Στην συνέχεια η απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα προχωράει και όταν τελικά χαθούν τα περισσότερα από τα κοκκιώδη κύτταρα τότε περισσότερο σοβαρές αλλαγές συμβαίνουν οι οποίες περιλαμβάνουν κατάτμηση (segmentation) του ωαρίου και σχηματισμό κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα (cytoplasmic vacuolization) (De Pol et al, 1998, Devine et al, 2000; Hussein 2005). Η διαδικασία της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της επιβίωσής τους εξαρτάται από αυτοκρινή και παρακρινή σήματα, τα οποία περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες από τα κοκκιώδη κύτταρα, τα κύτταρα της θήκης, τα στρωματικά κύτταρα και τα ωάρια. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν αρκετά μόρια όπως: την μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 (bone morphogenetic protein, BMP-4), το Bcl-2, το Kit, το FGF, το NOBOX, το NTS/Trkb, την σουρβαϊβίνη, την Χ-συνδεδεμένη αναστολέα της απόπτωσης πρωτεΐνη (XIAP), το GDF-9, το NAIP, το AHR, το GATA-4, το SCF, την integrin, τις γοναδοτροπίνες και το TRAIL. Συγκεκριμένα, ο αυξητικός παράγων μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 και ο υποδοχέας της (BMPR-IB) είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Hussein, 2005). Φαίνεται ότι για την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων στα ωοθυλάκια ισχύουν τα εξής: **(i)** Υπάρχει εμπλοκή πολλών μορίων όπως Fas, κασπάσες, TNF, TVB, Par-4, p53, προχιμπιτίνη, c-Myc, IFN, ενδοθηλίνες. **(ii)** Τα μόρια αυτά περιλαμβάνουν παράγοντες επιβίωσης (γοναδοτροπίνες, IGF-1, ιντερλευκίνη-1β, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, TGF-α, bcl-2, bcl-x) και παράγοντες απόπτωσης (TGF-β, ιντερλευκίνη-6, αντρογόνα, bax, Fas αντιγόνα, p53, TNF, κασπάσες) (Hussein, 2005). Ο Nakahara και συνεργάτες (1997) μελέτησαν την απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων γυναικών που υποβάλλονται σε

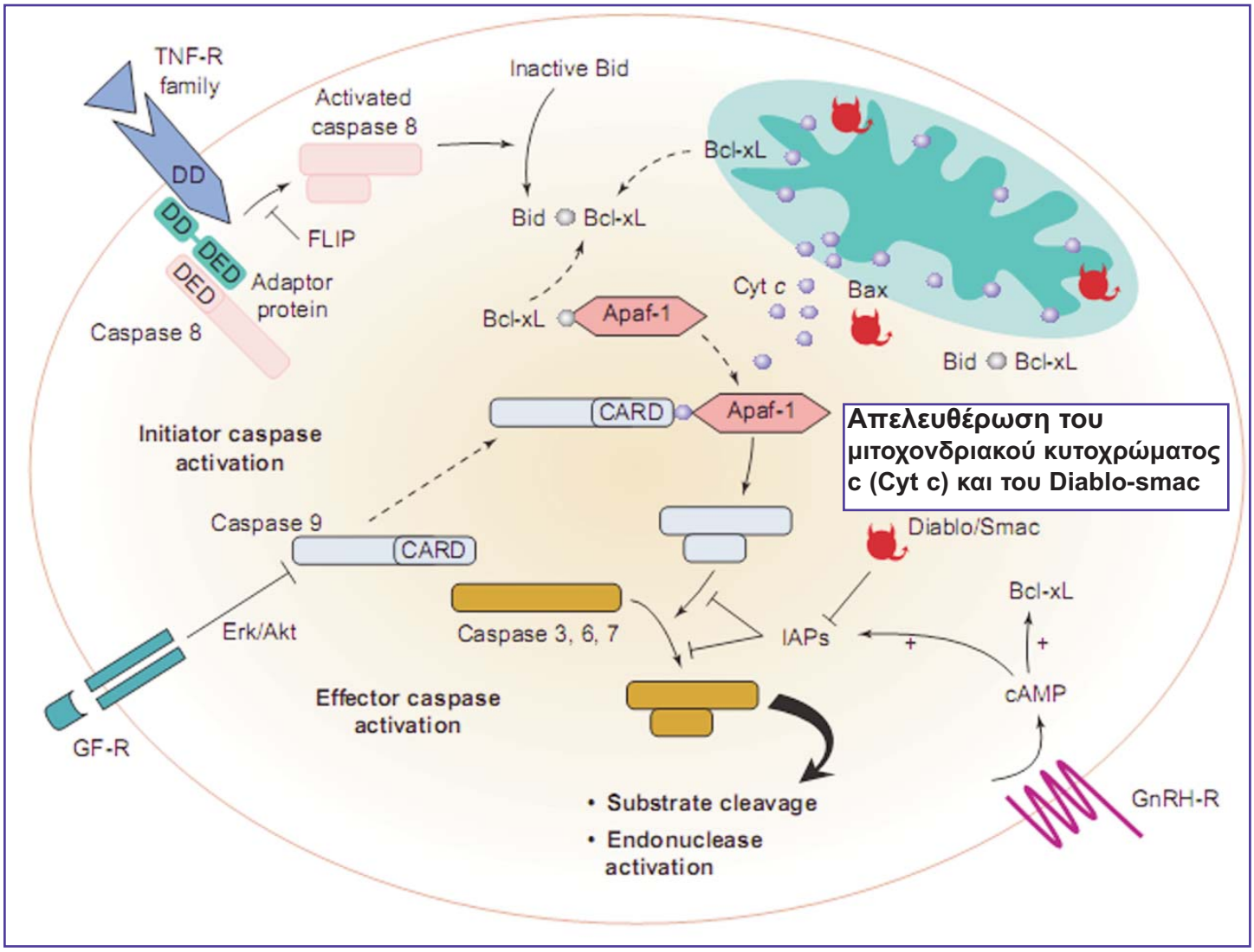
υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και βρήκαν ότι οι γυναίκες που δεν έμειναν έγκυες επέδειξαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αποπτωτικών σωμάτων στα κοκκιώδη κύτταρα συγκριτικά με τις έγκυες γυναίκες. Ο Kumazawa και συνεργάτες (2005) περιγράφει ότι **η σουρβαϊβίνη εμπλέκεται στην υποστήριξη της λειτουργίας του ωχρού σωματίου**. Αντίθετα, στην δομική λουτεόλυση εμπλέκονται αρκετά μόρια όπως είναι TNF, Fas/Fas ligand, κασπάση-3, Bax, προχιβιτίνη, BMP ligands και υποδοχείς (Hussein, 2005). Για παράδειγμα, ο Sugino και συνεργάτες βρήκαν ότι η λουτεόλυση σχετίζεται με μεταβολές στην έκφραση κάποιων μορίων όπως είναι ο TNF και η αναλογία Bcl-2/Bax (Sugino et al, 2000).

#### 2.7.5.1. Η πρωτεϊνη Bax και η απόπτωση στην ωοθήκη

Η πρωτεΐνη Bax (προ-αποπωπτική) εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα των εμβυικών και ενηλίκων ωοθηκών (Nandedkar and Dharma, 2001) και βρίσκεται σε αρκετά ωοθυλάκια που έχουν υποστεί ατρησία (Van Nassauw et al, 1999). Η έκφραση της Bax πρωτεΐνης σχετίζεται με τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης, όπου υψηλότερα επίπεδα γοναδοτροπινών ελαττώνουν την έκφραση του Bax (Sugino et al, 2000). Ο ρόλος της Bax πρωτεΐνης στην απόπτωση στην ωοθήκη υποστηρίζεται από πολλά πειραματικά ευρήματα όπως είναι: (1) Τα ποντίκια με Bax-ανεπάρκεια (Bax-deficient mice) έχουν ανώμαλα ωοθυλάκια με υπερβολικά μεγάλο αριθμό κοκκωδών κυττάρων (Perez et al, 1999) και (2) στα ωοθυλάκια με ατρησία η έκφραση Bax είναι υψηλή συγκριτικά με τα υγιή ωοθυλάκια (Kugu et al, 1998).

#### 2.7.5.2. Η υπεροικογένεια του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων και η απόπτωση στην ωοθήκη

Τα μέλη της υπεροικογένειας του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (TNF) TNF-α, Fas, FasL (Fas Ligand) και TNF-related apoptosis ligand (TRAIL) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ατρησία των ωοθυλακίων. Ο ρόλος αυτός προκύπτει από τα παρακάτω πειραματικά ευρήματα: **(i)** υπάρχουν υψηλότερα επίπεδα του FasL mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα και στα κύτταρα της θήκης στα ωοθυλάκια που έχουν υποστεί ατρησία συγκριτικά με τα υγιή (Porter 1997). **(ii)** Η ικανότητα του Fas να προκαλεί απόπτωση (Hakuno et al, 1996). **(iii)** Η έκφραση πολλαπλών περιοχών θανάτου, οι οποίες σχετίζονται με το TNF πρωτεΐνες στα κοκκιώδη




**Απελευθέρωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c (Cyt c) και του Diablo-smac**

**Εικόνα 2.13. Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών που οδηγούν στην έναρξη της ενεργοποίησης των κασπασών στην ωοθήκη.** Οι κασπάσες ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς που έχουν την περιοχή θανάτου [death domain (DD)- containing receptors] από την οικογένεια του υποδοχέα του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων (tumor necrosis factor receptor, TNF-R) και από αρκετούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που προωοθούν την απελευθέρωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c (Cyt c) και του Diablo-smac. Η ενεργοποίηση της κασπάσης εκκινητή (initiator caspase activation) (κασπάση-8) γίνεται με την βοήθεια μιας πρωτεΐνης προσαρμογέα (adaptor protein) που περιέχει τόσο μια περιοχή θανάτου (death domain, DD) όσο και μια "εκτελεστική περιοχή θανάτου" (death effector domain, DED). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 είτε προκαλεί άμεση ενεργοποίηση μιας κασπάσης τελεστή (effector caspase) είτε δρα στα μιτοχόνδρια (Johnson and Bridgham, 2002).

κύτταρα της όρνιθας (hen granulosa cells) (Bridgham and Johnson 2001). **(iv)** TRAIL και οι υποδοχείς του εκφράζονται στα ωοθυλάκια της ωοθήκης (Bobe and Goetz 2001) (v) Η έκφραση του TRAIL υποδοχέα-1 μειώνεται αισθητά στα κοκκώδη κύτταρα των άτρητων ωοθυλακίων (Wada et al, 2003, Hussein, 2005).

### 2.7.5.3. Οι κασπάσες και η απόπτωση στην ωοθήκη (Εικόνα 2.13)

Οι κασπάσες ενεργοποιούνται με δύο τρόπους στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκών: **(i)** με τους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια **(ii)** με τα μέλη των Bcl-2 πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί με πειράματα έκφραση των κασπάση-1, κασπάση-3, DNA fragmentation factor, ILI-β converting enzyme (ICE), CPP32 και Apaf-1 στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης του ανθρώπου (Flaws et al, 1995; Boone and Tsang 1998; Van Nassauw et al, 1999; Fenwick and Hurst 2002, Hussein 2005). Στην ωοθήκη, η κασπάση-3 εκφράζεται στα κύτταρα της θήκης και στα κύτταρα του ωχρού σωματίου των άτρητων ωοθυλακίων. Η έκφραση αυτή ρυθμίζεται από τις γονοδοτροπίνες (Boone and Tsang 1998; Hussein 2005). Ο Apaf-1 βρίσκεται σε άφθονη ποσότητα στα κοκκιώδη κύτταρα των πρώιμων ωοθυλακίων με άντρο, ενώ *in vivo* επίδραση της γοναδοτροπίνης καταστέλλει εντελώς την έκφραση του Apaf-1 και την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων (Deveraux and Reed 1999).

### 2.7.5.4. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η απόπτωση στην ωοθήκη

Η έκφραση της P53 πρωτεΐνης στα αποπτωτικά κοκκώδη κύτταρα των άτρητων ωοθυλακίων υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στην ατρησία (Kim et al, 1999).

Ο **αποπτωτικός ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στην ωοθήκη** προκύπτει από τα παρακάτω ευρήματα: (1) Η αναστολή της έκφρασης του p53 σχετίζεται με έκδηλη μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων και των ωοθυλακίων που έχουν υποστεί ατρησία (Tilly et al, 1995) και (2) η υπερέκφραση του p53 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση στα κύτταρα που διεγείρονται με cAMP λόγω της διαμόρφωση από το p53 της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων bcl-2 και bax (Tilly et al, 1995; Amsterdam et al, 1996, Hussein, 2005).

### 2.7.5.5. Μέλη της υπεροικογένειας του TGF-β (Tranforming Growth Factor-β) και η απόπτωση στην ωοθήκη

Μέλη της υπεροικογένειας του TGF-β (Tranforming Growth Factor-β) που σχετίζονται με την απόπτωση στην ωοθήκη είναι ο NODAL και η αντιμυλλέρια ορμόνη.Η έκφραση του NODAL και του τύπου I υποδοχέα του ALK7 είναι ειδική κυτταρικού-τύπου (Wang et al, 2006). Έχει βρεθεί ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση του NODAL στα κοκκιώδη κύτταρα είναι ισχυρότερη στα ωοθυλάκια προ του σχηματισμού της ωοθυλακικής κοιλότητας (άντρου) σε σχέση με τα ωοθυλάκια που βρίσκονται σε ποιό προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων ALK7 εκφράζεται υψηλά στα κοκκιώδη κύτταρα, ενώ η έκφραση του Nodal μειώνεται καθώς το ωοθυλάκιο μεταβαίνει από το στάδιο προ του σχηματισμού του ωοθυλακικού άντρου στο στάδιο με ωοθυλακικό άντρο. Όταν μειώνεται η υποστήριξη με γοναδοτροπίνες το ωοθυλάκιο που έχει άντρο και προορίζεται για ατρησία εκφράζει υψηλά επίπεδα Nodal. Επιπρόσθετα, προσθήκη ανασυνδιασμένου Nodal σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων που προέρχονται από μεγάλα ωοθυλάκια με άντρο και προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια αυξάνει την απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα (Wang and Tsang, 2007).

Η αντιμυλλέρια ορμόνη (Mullerian inhibitory substance, MIS) άμεσα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών και ωχρινικών κυττάρων της ωοθήκης και η παρακρινική της λειτουργία είναι πιθανώς η αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Fritz and Speroff, 2011).

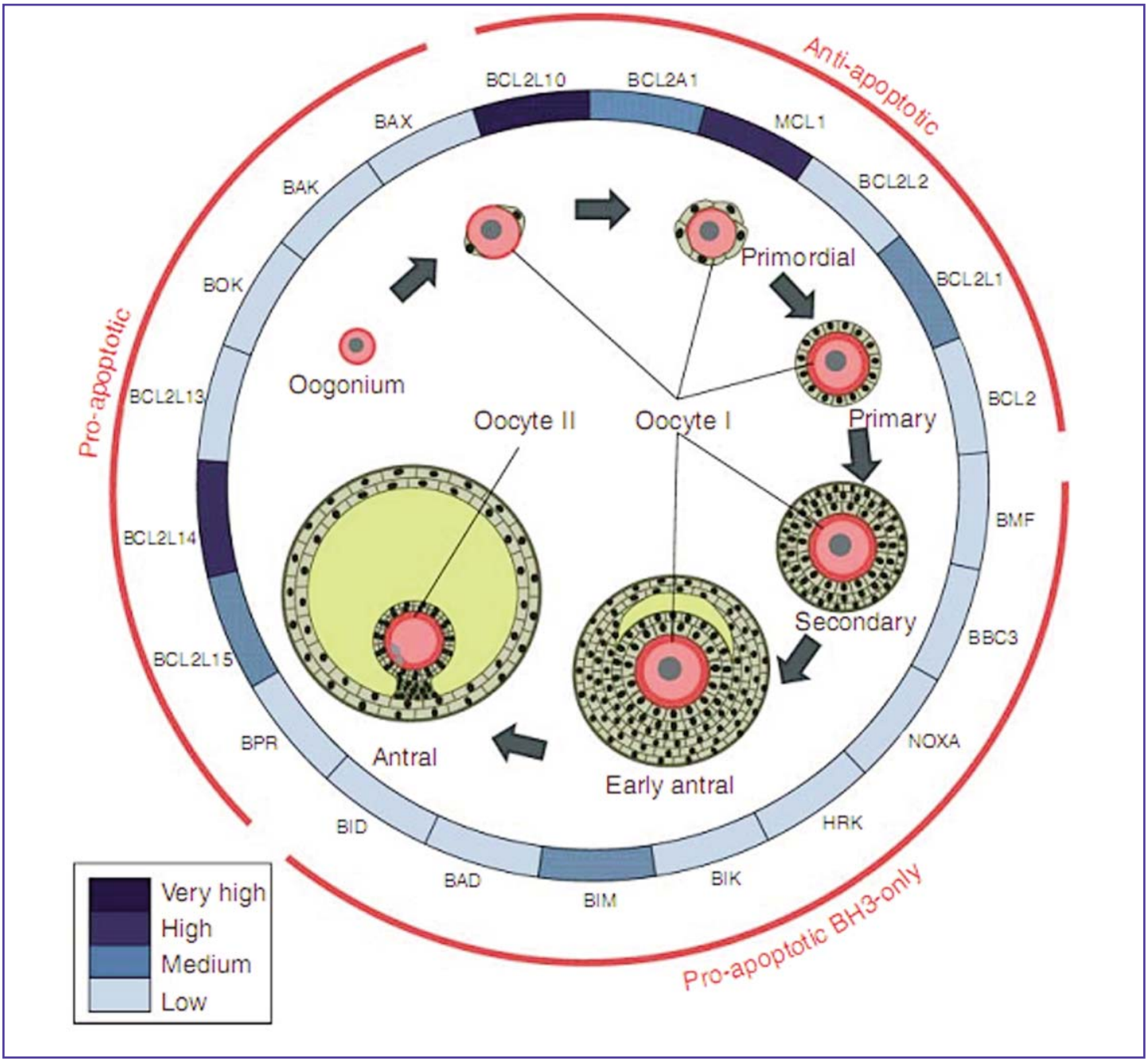
### 2.7.5.6. Η κινάση Akt και η επιβίωση στην ωοθήκη

Η Akt είναι μία σερίνης/θρεονίνης φωσφορική κινάση προς τα κάτω της P13K και είναι ένας σπουδαίος αντιαποπτωτικός παράγοντας στα κοκκιώδη κύτταρα. Η ενεργοποίηση της Akt μειώνει την μιτοχονδριακή απελευθέρωση των Smac, Omi και κυττοχρώματος c που είναι ALK7-ρυθμιζόμενη με αποτέλεσμα την μετρίαση της απόπτωσης στα κοκκιώδη κύτταρα (Wang et al, 2006).

### 2.7.5.7. Τα μέλη της οικογένειας bcl-2 και η επιβίωση στην ωοθήκη

Το Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) είναι ένα μέλος της οικογένειας Bcl-2 που μπλοκάρει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μια εκλεκτική αύξηση της Mcl-1 mRNA έκφρασης έχει ανιχνευθεί στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη του ανθρώπου ανάμεσα στην 14η και 18η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Το Mcl-1 παίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων του θήλεος κατά την διάρκεια της εμβρυικής ζωής και κυρίως κατά το κρίσημο βήμα της συσχέτισης των ωαρίων με τα σωματικά κύτταρα για να σχηματίσουν τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Επίσης, το Bcl-X παίζει σπουδαίο ρόλο στην επιβίωση των γεννητικών κυττάρων του θήλεος κατά την ενδομήτρια ζωή. Το προ-αποπτωτικό Bax εκφράζεται στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα του θήλεος εμβρύου. Η αναλογία Bcl-X/Bax είναι σημαντική για να καθορίσει την τύχη των εμβρυικών γεννητικών κυττάρων στα ποντίκια (Boumela et al, 2011). Το Mcl-1 mRNA εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ωοκύτταρα των ενηλίκων γυναικών **(Εικόνα 2.14)** (Gronhahl et al, 2010; Boumela et al, 2011). Αφθονία του Mcl-1 mRNA σχετίσθηκε θετικά με την ποιότητα των ωαρίων στις αγελάδες, υποδηλώνοντας ότι το Mcl-1 παίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της επιβίωσης των ωαρίων κατά την ενήλικο ζωή (Melka et al, 2009).

Η πρωτεΐνη Bcl-2 (προ-επιβιωτικό), εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα των εμβυικών και ενηλίκων ωοθηκών (Nandedkar and Dharma, 2001) και βρίσκεται σε αρκετά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Van Nassauw et al, 1999). Η έκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης σχετίζεται με τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης, όπου τα υψηλότερα επίπεδα γοναδοτροπινών αυξάνουν την έκφραση του bcl-2 (Sugino et al, 2000). **Ο ρόλος του bcl-2 στην επιβίωση στην ωοθήκη υποστηρίζεται από πειραματικά ευρήματα όπως είναι: (1)** η ύπαρξη ελαττωμένου αριθμού ωοθυλακίων σε ποντίκια με bcl-2-ανεπάρκεια (bcl-2-deficient mice) (Ratts et al, 1995) και **(2)** το γεγονός ότι η εκτενής έκφραση του bcl-2 οδηγεί σε ελαττωμένη απόπτωση των ωοθυλακίων και ελαττωμένη ατρησία (Hsu et al, 1996; Morria and Tilly 1999, Hussein 2005). Στα ωάρια η έκφραση του Bcl-2 γίνεται σε χαμηλά επίπεδα στον άνθρωπο (Guillemin et al, 2009) και στα ποντίκια (Exley et al, 1999). Σε τρανσγενετικά ενήλικα ποντίκια που υπερεκφράζουν Bcl-2 στα σωματικά τους κύτταρα των ωοθηκών (κοκκιώδη κύτταρα, κύτταρα της θήκης, κύτταρα του στρώματος και ωχρινικά κύτταρα) έχει βρεθεί ότι παρατηρούνται αυξημένες αυτόματες ωοθυλακιορρηξίες (Hsu et al, 1996). Σε αντίθεση, η




**Εικόνα 2.14. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης των μελών της οικογένειας Bcl-2 στα ωοκύτταρα των ενήλικων γυναικών.** Απεικονίζονται σχηματικά τα κύρια στάδια της ωοογένεσης/ωοθυλακιορρηξίας του ανθρώπου (Boumela et al, 2011).

υπερέκφραση του Bcl-2 στα ωοκύτταρα δεν σχετίσθηκε με τον αριθμό των ωοθυλακίων και τα ποσοστά ωοθυλακιορρηξίας (Morita et al, 1999).

### 2.7.5.8. Ο KIT-συνδέτης, οι c-KIT υποδοχείς και η επιβίωση στην ωοθήκη

Αλληλεπίδραση των συνδετών (ligands) KIT-KIT έχει κυτταροπροστατευτικά αποτελέσματα στα ωοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση των συνδετών (ligands) KIT-KIT είναι σπουδαία για την επιβίωση των πρωτογενών ωοθυλακίων τόσο στις εμβρυϊκές ωοθήκες όσο και στις ωοθήκες μετά την γέννηση (Markstrom et al, 2002). Επίσης, στην ωοθήκη μετά την γέννηση (postnatal) η αλληλεπίδραση των συνδετών (ligands) KIT-KIT συμβάλλει στην έναρξη της ωοθυλακιογένεσης, ρυθμίζει την ανάπτυξη των ωοκυττάρων και την διαφοροποίηση των κυττάρων της θήκης. Επίσης, προστατεύει τα ωοθυλάκια που δεν έχουν άντρο από το να υποστούν απόπτωση. Στα ωοθυλάκια που έχουν άντρο, η αλληλεπίδραση των συνδετών (ligands) KIT-KIT ρυθμίζει την ικανότητα των ωαρίων να υφίστανται κυτταροπλασματική ωρίμανση και αυξάνει την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων (Driancourt et al, 1998, 2000, Hussein 2005).

### 2.7.5.9. Ο παράγοντας των βλαστικών κυττάρων (SCF) και η επιβίωση στην ωοθήκη

Ο παράγοντας των βλαστικών κυττάρων (SCF) εκφράζεται στα ωογόνια των αρχέγονων ωοθυλακίων (primordial follicles) και στα ωάρια των ωοθυλακίων που δεν έχουν άντρο και η έκφρασή του ελαττώνεται καθώς τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται. Σε καλλιέργειες ωαρίων, η προσθήκη παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (SCF) ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση του BAX και επομένως μειώνει σημαντικά την απόπτωση. Η έκφρασή του SCF στα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης είναι ασθενής (Hussein, 2005, Felici et al, 1999; Gougeon and Busso 2000).

### 2.7.5.10. Μέλη της οικογένειας του TGF-β (Tranforming Growth Factor-β) και η επιβίωση στην ωοθήκη

Μέλη της οικογένειας του TGF-β (Tranforming Growth Factor-β) που σχετίζονται με την επιβίωση στην ωοθήκη αποτελούν η ακτιβίνη, οι παράγοντες BMP-4 και BMP-7 και ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης-9. Η ακτιβίνη δρα στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων καταστέλλοντας την σύνθεση των ανδρογόνων και αυτό επιτυγχάνεται με μείωση

της διεγερτικής δράσης της LH και του IGF-1 (Fritz and Speroff, 2011). Η ακτιβίνη στα ωοθυλάκια των ωοθηκών αυξάνει την πρόσδεση της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα και αυξάνει την δράση της FSH στην αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα  Πριν από την ωοθυλακιορρηξία η ακτιβίνη καταστέλλει την παραγωγή της προγεστερόνης από τα κοκκιώδη κύτταρα προλαβαίνοντας έτσι την πρώιμη ωχρινοποίηση (Messinis et al, 2010, Fritz and Speroff, 2011). Οι παράγοντες BMP-4 και BMP-7 παράγονται από τα κύτταρα της θήκης κάτω από την δράση της LH και έχει βρεθεί ότι **(α)** διεγείρουν την παραγωγή της αρωματάσης και **(β)** αναστέλλουν την STAR (steroidogenic acute regulatory protein) που προκαλείται από την FSH και είναι σημαντική για την παραγωγή της προγεστερόνης. Με τον μηχανισμό αυτό προλαβαίνεται η πρώιμη ωχρινοποίηση κατά την παραγωγική φάση του γεννητικού κύκλου (Messinis et al, 2010). Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 9 [growth differention factor 9 (GDF-9)] είναι ένας παράγοντας που εκκρίνεται από τα ωάρια και είναι σημαντικός για την επιβίωση των μικρών ωοθυλακίων (Markstrom et al, 2002).

### 2.7.5.11. Οι γοναδοτροπίνες και η επιβίωση στην ωοθήκη

Οι κύριοι ρυθμιστές της επιβίωσης των ωοθυλακίων της ωοθήκης είναι οι γοναδοτροπίνες. Οι περισσότεροι αν όχι όλοι από τους ανασταλτικούς παράγοντες της ωοθυλακικής ατρησίας ρυθμίζονται από την FSH και LH. Όπως είναι γνωστό, όταν το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο φθάσει στο στάδιο της ωοθυλακικής κοιλότητας (antral stage) εκφράζει υποδοχείς για FSH και καθίσταται εξαρτώμενο από την FSH διέγερση. Οι ανεπαρκείς συγκεντρώσεις της FSH παίζουν καθοριστικό ρόλο για την επιβίωση των ωοθυλακίων που έχουν διαφοροποιεί σε ωοθυλάκια με ωοθυλακική κοιλότητα και πέρα. Σε κάθε αναπαραγωγικό κύκλο οι συγκεντρώσεις της FSH που αυξάνονται διασώζουν τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια διακυκλικά. Η LH είναι σημαντική για να φθάσουν τα ωοθυλάκια στην ωοθυλακιορρηξία και να εκφράσουν LH υποδοχείς. Αναστολή του LH κύματος προκαλεί μαζική ατρησία των ωοθυλακίων στα ποντίκια (Braw and Tsafriri 1980). Στα ωοθυλάκια προ του σχηματισμού της ωοθυλακικής κοιλότητας (preantral follicles) οι γοναδοτροπίνες δεν δρουν άμεσα, αλλά η επίδρασή τους γίνεται με την μεσολάβησή τους σε ευαίσθητα στις γοναδοτροπίνες κύτταρα (Markstrom et al, 2002). Σε απομονωμένα ωοθυλάκια πρώιμης φάσης σχηματισμού ωοθυλακικής κοιλότητας (early antral follicles) η FSH είναι ο κυριότερος

παράγοντας επιβίωσης. Η FSH είναι ικανή να καταστείλλει την απόπτωση μέχρι 60%. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αναστραφεί με την προσθήκη IGFBP-3 (IGF binding protein-3) υποδηλώνοντας έναν μεσολαβητικό (mediatory) ρόλο του IGF-I. Σε αντίθεση, διέγερση των LH υποδοχέων δεν έχουν επίδραση στην επιβίωση των ωοθυλακίων αυτού του σταδίου (Chun et al, 1996, Markstrom et al, 2002). Κατά το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων τόσο η FSH όσο και η LH καταστέλλουν σε κάποιο βαθμό την απόπτωση σε ποντίκια κάτι το οποίο ρυθμίζεται πιθανώς από τον ενδογενή IGF-1 (Chun et al, 1994).

### 2.7.5.12. Τα οιστρογόνα και η επιβίωση στην ωοθήκη

Τα οιστρογόνα έχει βρεθεί *in vivo* σε ποντίκια που έχει αφαιρεθεί η υπόφυσή τους ότι μειώνουν το ποσοστό της απόπτωσης των κοκκιωδών κυττάρων στα ωοθυλάκια που δεν έχουν σχηματίσει ωοθυλακική κοιλότητα. Το φαινόμενο αυτό αναστέλλεται από την θεραπεία με ανδρογόνα (Billig et al, 1993).

### 2.7.5.13. Η ινσουλίνη, οι αυξητικοί παράγοντες ινσουλίνης, οι υποδοχείς του και η επιβίωση στην ωοθήκη

Η ινσουλίνη είναι ένας άλλος παράγοντας επιβίωσης. Έχει βρεθεί ότι στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια των ποντικών η ινσουλίνη ελαττώνει την ευαισθησία για απόπτωση *in vitro* διαμέσου των IGF-1 υποδοχέων (Chun et al, 1994). Σε απομονωμένα κοκκιώδη κύτταρα ποντικών προωοθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων η ινσουλίνη δεν έχει επίδραση στην απόπτωση, υποδηλώνοντας την συμμετοχή άλλων κυττάρων της ωοθήκης (Tilly et al, 1992). Ο IGF-1 έχει ισχυρότερα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια σε σχέση με την ινσουλίνη (Markostrom et al, 2002). Οι IGFs συνήθως προσδένονται στην IGFBPs και αδρανοποιούνται. Με την δράση της FSH στο κοκκιώδη κύτταρα, μία πρωτεάση παρόμοια με την PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) παράγεται και αποδομεί τις IGFBPs με αποτέλεσμα οι IGFs να απελευθερώνονται και να είναι διαθέσιμοι για δράση (Messinis et al, 2010). Οι IGF-1 και IGF-2 εκφράζονται στα κοκκιώδη κύτταρα και ανιχνεύονται στο ωοθυλακικό υγρό. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν

την παραγωγή των κοκκιωδών κυττάρων και την παραγωγή οιστρογόνων ευαισθητοποιώντας τα ωοθυλάκια στην FSH και LH (Messinis et al, 2010).

### 2.7.5.14. Ο EGF, ο TGF-α και η επιβίωση στην ωοθήκη

Έχει βρεθεί ότι στα προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια των ποντικιών καθώς και στα απομονωμένα κοκκιώδη κύτταρα ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) που παράγεται τοπικώς καταστέλλει την απόπτωση τόσο αποτελεσματικά όσο και οι γοναδοτροπίνες διαμέσου του μονοπατιού της τυροσινικής κινάσης (Tilly et al, 1992). Ο transforming growth factor α (TGF-α) είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοιος με τον επιδερμικό αυξυτικό παράγοντα (EGF) και μοιράζεται τον ίδιο κυτταρικό μεμβρανικό υποδοχέα. Ο TGF-α έχει τα ίδια αποτελέσματα με τον EGF στα προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια των ποντικιών (Tilly et al, 1992).

### 2.7.5.15. Η αυξητική ορμόνη (GH) και η επιβίωση στην ωοθήκη

Η αυξητική ορμόνη καταστέλλει την απόπτωση σε καλλιέργειες προωθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων ποντικιών. Καθότι η δράση της αυξητικής ορμόνης αναστέλλεται με την προσθήκη IGFBP-3, η δράση της ασκείται διαμέσου του IGF-1 (Eisenhauer et al, 1995).

### 2.7.5.16. Η οικογένεια των IAP (inhibitors of apoptosis) και η επιβίωση στην ωοθήκη

Η Χ-συνδεδεμένη αναστολέας της απόπτωσης πρωτεΐνη (XIAP) και η σουρβαϊβίνη (survivin) σχετίζονται με την επιβίωση στην ωοθήκη. Στην ωοθήκη, η αυξημένη έκφραση του XIAP (X-linked inhibitor aof apoptosis) και η καταστολή της απόπτωσης των ωοθυλακίων είναι απαραίτητα για την ρύθμιση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων από την FSH. Η FSH-προκαλούμενη έκφραση του XIAP ρυθμίζεται διαμέσου του NF-kappaB μονοπατιού με την ενεργοποίηση του phosphatidylinositol 3-kinase (Li et al, 1998; Wang et al, 2002). Ο NF-kappaB παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση στην ωοθήκη γιατί ρυθμίζει την έκφραση αρκετών ανασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης όπως είναι A1 και Bcl-2 και επιπρόσθετα

μόρια τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των κασπασών (Degli-Esposti et al, 1997 a,b, Deveraux and Reed 1999). Στην ωοθήκη, προς τα πάνω ρύθμιση (up-regulation) του XIAP με την επίδραση της FSH καταστέλλει την απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα και διευκολύνει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων που προκαλείται από την δράση της FSH. Επίσης, η XIAP είναι ένας σπουδαίος ενδοκυττάριος ρυθμιστής τουTNF-α μονοπατιού σήμανσης θανάτου (TNF-α death-signaling pathway) στα κοκκιώδη κύτταρα. Η έκφραση του XIAP ρυθμίζεται από τον TNF-α διαμέσου του μηχανισμού που περιλαμβάνει την μεσολάβηση του NFκ-B (Xiao et al, 2001). Επιπρόσθετα, η έκφραση του XIAP στα κοκκιώδη κύτταρα ρυθμίζεται από τις γοναδοτροπίνες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ο μηχανισμός με τον οποίο XIAP καταστέλλει την απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα περιλαμβάνει το PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase) μονοπάτι επιβίωσης. Η θεραπεία με γοναδοτροπίνες αυξάνει την έκφαση XIAP στα κοκκιώδη κύτταρα και την ύπαρξη της πρωτεΐνης phospho-Akt και καταστέλλει την απόπτωση, ενώ η απόσυρση (withdrawal) της γοναδοτροπίνης προκαλεί απόπτωση. Η απόπτωση αυτή συνοδεύεται από έκδηλη μείωση της έκφρασης της XIAP (Li et al, 1998, Asselin et al, 2001, Xiao et al, 2001, Sauerwald et al, 2002, Wang et al, 2002, 2003, Johnson et al 2004, Hussein 2005).

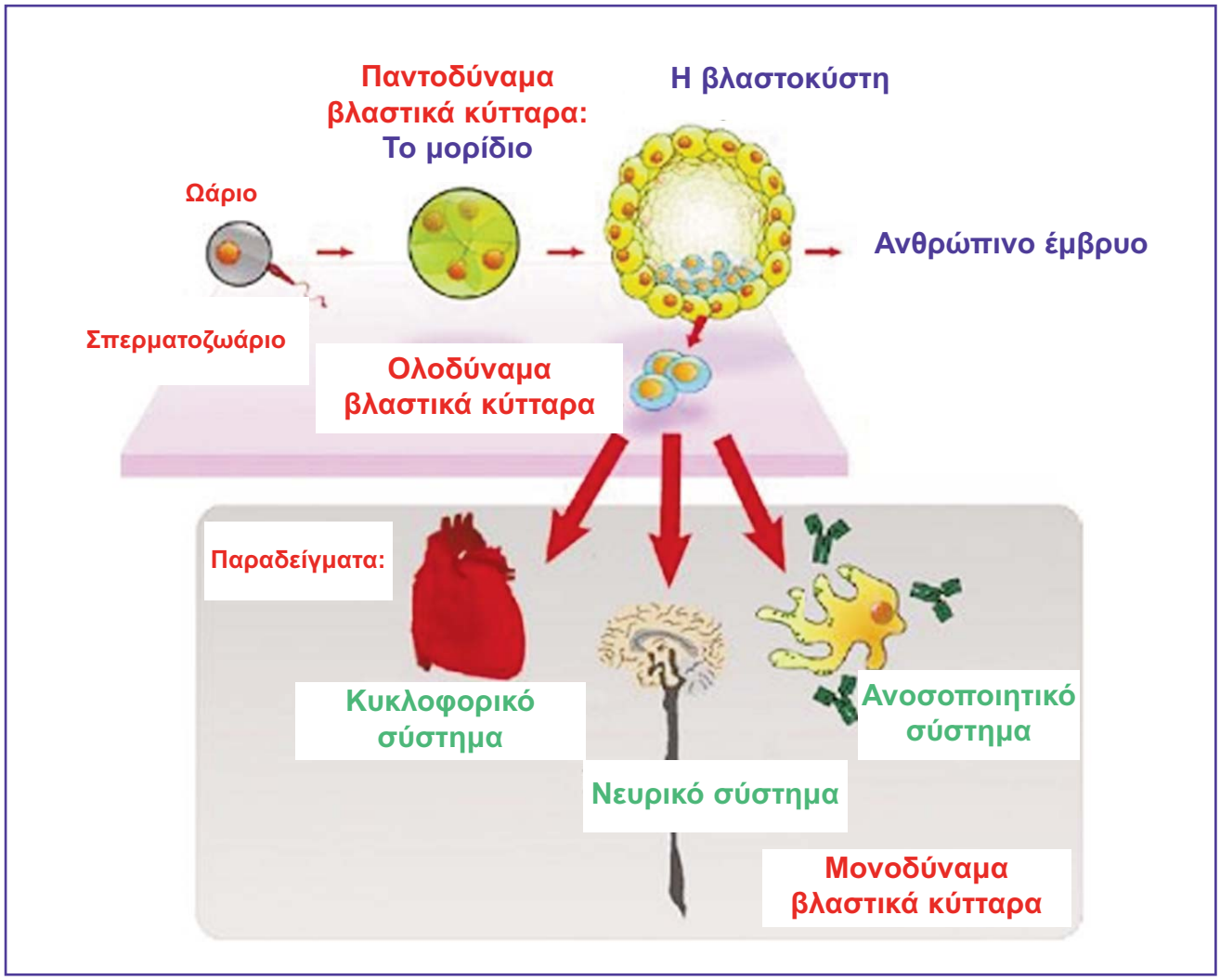
Στην ωοθήκη υψηλά επίπεδα έκφρασης της σουρβαϊβίνης κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων συμβαίνει στα μιτωτικά ενεργά κοκκιώδη κύτταρα των αδιαφοροποίητων ωοθυλακίων (Johnson et al, 2002). Επιπρόσθετα, στα *Xenopus Laevis*, mRNA σουρβαϊβίνης βρίσκεται στα πρώιμα στάδια των *Xenopous* ωοκυττάρων και συσσωρεύεται κατά την ωογένεση. Η μείωση του mRNA σουρβαϊβίνης σχετίζεται με την επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου και την έναρξη της απόπτωσης (Murphy et al, 2002). Fujino et al (2008) μελέτησαν την επίδραση της σουρβαϊβίνης στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και βρήκαν ότι η έκφραση του γονιδίου της σουρβαϊβίνης στην ομάδα ασθενών με ενδομητρίωση ήταν σημαντικότερα χαμηλότερη σε σχέση με την ομάδα ασθενών με αντρικό παράγοντα. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου της σουρβαϊβίνης ήταν υψηλότερη στην ομάδα γυναικών που έμειναν έγκυες σε σχέση με τις γυναίκες που δεν έμειναν έγκυες. Όμως τα ευρήματα αυτά χρήζουν περισσότερης μελέτης προκειμένου να επιβεβαιωθούν ή όχι.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

# ΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ OCT-4 ΚΑΙ DAZL

## 3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

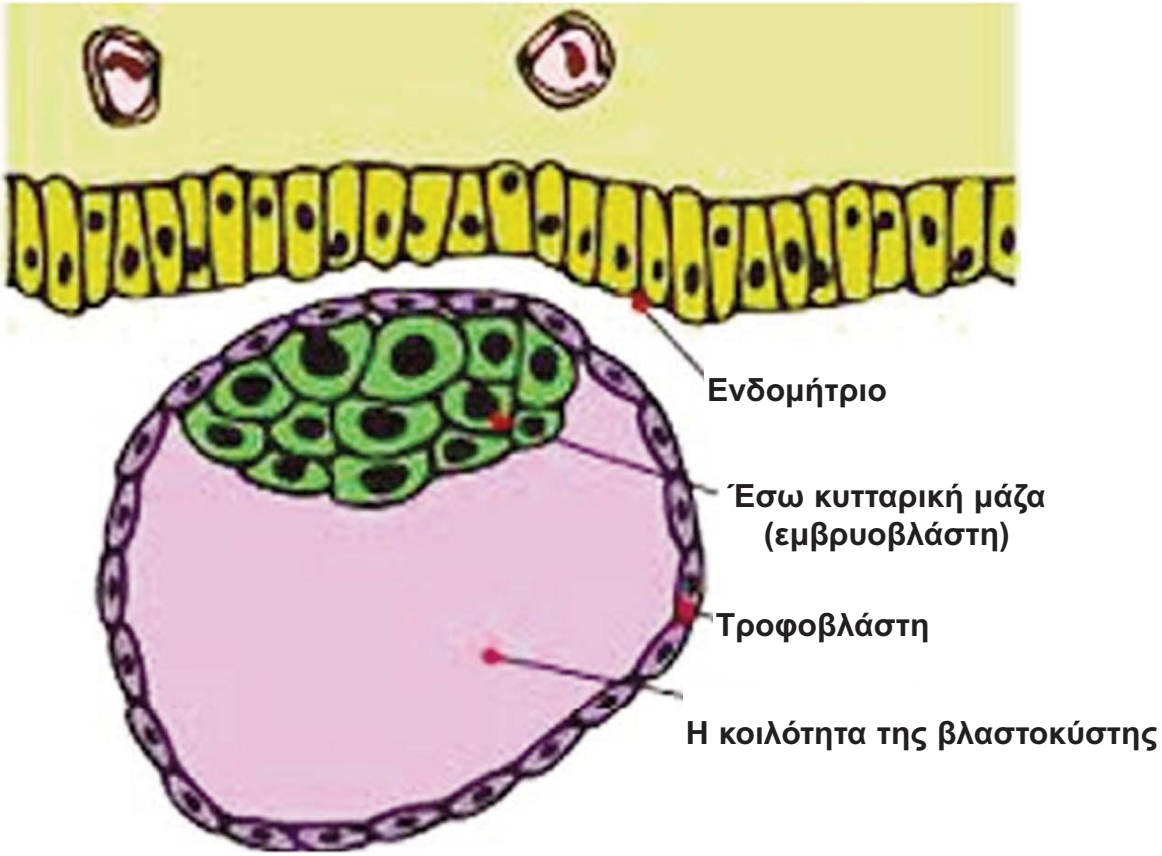
Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρχέγονα, μη διαφοροποιημένα κύτταρα, με μη διαχωριζόμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά, που θα τα έκαναν αμέσως αναγνωρίσιμα στους ιστούς και που έχουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης (self-renewal), δίνοντας όμοια κύτταρα με τα πατρικά (αναγέννηση), ενώ παράλληλα και υπό ειδικές συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, που συνιστούν τον ανθρώπινο οργανισμό (pluripotency), με ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση. Με τον όρο **διαφοροποίηση** εννοούμε ποιοτικές αλλαγές στον φαινότυπο του κυττάρου, οι οποίες προκύπτουν από την σύνθεση νέων γονιδιακών προϊόντων. **Μεταπλασία** είναι η δημιουργία ενός διαφοροποιημένου κυττάρου από ένα άλλο. Τα βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1981 από έμβρυο ποντικού, ενώ ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1998 από τον James Thomson και συνεργάτες (Thomshon et al, 1998; Weissman et al, 2002; Gargett, 2004). Τα βλαστικά κύτταρα έχουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (high proliferative potential) λόγω των υψηλών επιπέδων δραστικής τελομεράσης, παράγοντας συντριπτικό αριθμό τουλάχιστον ενός τύπου λειτουργικών απογόνων (Gargett,




**Εικόνα 3.1.** Τα **παντοδύναμα κύτταρα** (**totipotent stem cells**) προέρχονται από τον ζυγώτη και το μορίδιο και μπορεί να σχηματίσουν όλους τους ιστούς ακόμα και πλακούντα. Τα **ολοδύναμα κύτταρα** (**pluripotent stem cells**) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και μπορεί να σχηματίσουν όλους τους ιστούς εκτός από πλακούντα (Oswal et al, 2011).

2004).

**Τα βασικά χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων αποτελούν τα παρακάτω:** **(α)** Τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα, **(β)** Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να δημιουργούν όμοια αδιαφοροποίητα κύτταρα και **(γ)** Τα βλαστικά κύτταρα μπορεί να διαφοροποιηθούν με δημιουργία διάφορων κυτταρικών τύπων. Τα




**Εικόνα 3.2. Η βλαστοκύστη.** Από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα) προέρχονται τα **ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα** (**pluripotent stem cells**) προέρχονται (Oswal et al, 2011).

βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε παντοδύναμα, ολοδύναμα, πολυδύναμα κύτταρα και μονοδύναμα **(Εικόνα 3.1). Παντοδύναμα κύτταρα** (**totipotent stem cells**) προέρχονται από τον ζυγώτη και το έμβρυο του σταδίου του μοριδίου. **Ολοδύναμα κύτταρα** (**pluripotent stem cells**) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα) **(Εικόνα 3.2). Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων** (**multipotent stem cells**) είναι σωματικά βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στους ενήλικες ιστούς και διαφοροποιούνται σε αρκετές κυτταρικές γενεαλογίες (cell lineages) συνήθως συστατικά κυττάρων των ιστών στους οποίους ανήκουν (Preston et al, 2003; Gargett, 2004).

Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στον εγκέφαλο, το ήπαρ, την καρδιά, τον μυελό των οστών και άλλους ιστούς (Καμπιλαύκος, 2010). **Μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα** (**unipotent stem cells**) είναι τα βλαστικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στους ενήλικες και αναγεννούν μόνο έναν τύπο διαφοροποιημένων απογόνων (differentiated progeny) (Gargett, 2004; Καμπιλαύκος, 2010). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα βλαστικά κύτταρα της βασικής επιδερμίδας που δίνουν γένεση στα κερατινοποιημένα πλακώδη κύτταρα, καθώς και ορισμένα ηπατοκύτταρα που έχουν την ικανότητα αναγέννησης μακροπρόθεσμα (Καμπιλαύκος, 2010). Επίσης, ανήκουν τα σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα των όρχεων (Gargett, 2004). Τα **παντοδύναμα (totipotential) κύτταρα** είναι κύτταρα με απεριόριστο δυναμικό και μπορεί να σχηματίσουν όλους τους εμβρυικούς ιστούς, τους εξωεμβρυικούς ιστούς (τροφοβλάστη) και όλους τους μετεμβρυϊκούς ιστούς και όργανα (Donovan and Gearhart, 2001; Gargett, 2004; Καμπιλαύκος, 2010). Τα **ολοδύναμα (pluripotential) βλαστικά** κύτταρα είναι ικανά να δώσουν γένεση προς όλα σχεδόν τα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τις τρεις βλαστικές στιβάδες (germinal layers): εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα, όχι όμως στο ίδιο το έμβρυο καθώς δεν είναι ικανά να σχηματίσουν τον πλακούντα και τους υποστηριζόμενους ιστούς του (Gargett, 2004; Καμπιλαύκος, 2010). Τα **πολυδύναμα (multipotential) βλαστικά κύτταρα** δίνουν γένεση σε κύτταρα της ίδιας κυτταρικής σειράς. Ο ρόλος τους είναι να επιδιορθώνουν τον ιστό στον οποίο βρίσκονται. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ διαφοροποιημένων κυττάρων στους διάφορους ιστούς ή όργανα (Gargett, 2004; Καμπιλαύκος, 2010).

**Οι διαφορές μεταξύ των εμβρυονικών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων** είναι οι παρακάτω: **(1).** Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έχουν μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης, ενώ τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα έχουν περιορισμένο δυναμικό. **(2).** Από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται όλοι οι κυτταρικοί τύποι του ανθρώπινου σώματος, ενώ τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται. **(3).** Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* σε μεγάλες ποσότητες, ενώ τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στους ιστούς και πολλές φορές η απομόνωση και ανάπτυξή τους είναι δύσκολη. **(4).** Στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μπορεί να προκληθεί "απόρριψη μοσχεύματος", ενώ τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα έχουν το πλεονέκτημα της "αυτόλογης μεταμόσχευσης" (Oswal et al, 2011).

### 3.2. Ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα

Υπάρχουν τρείς πηγές ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (pluripotent stem cells): η **εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης** (εμβρυοβλάστη), τα **αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** και τα **εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα** (Donovan and Gearhart, 2001; Gargett, 2004). Τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από καρκινικά βλαστικά κύτταρα έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από την βλαστοκύστη ή την εμβρυονική γονάδα έχουν φυσιολογικό καρυότυπο (Gargett, 2004). Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου, που προέρχονται από τον **ολοδύναμο κυτταρικό πληθυσμό** (pluripotent cell population) αναπαράγωνται επ' αόριστον κατά την αρχέγονη εμβρυονική κατάσταση (αυτο-αναγέννηση, self-renewal) και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται αυτόματα σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους των τριών βλαστικών στιβάδων (germinal layers): εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Pera et al, 2000; Gargett, 2004).

### 3.3. Θεραπευτική χρήση των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων

Η έρευνα έχει δείξει ότι, έχει γίνει με θετικά αποτελέσματα, μεταμόσχευση κυτταρικά-προερχόμενων (cell-derived) καρδιομυοκυττάρων (cardiomyocytes) εμβυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικιών (mES) σε καρδιές ενήλικων δυστροφικών ποντικών, προκειμένου να βελτιωθεί η καρδιακή τους λειτουργία (Klug et al, 1996). Επίσης, παγκρεατικά προγονικά κύτταρα ελήφθησαν από εμβυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικιών (mES) και μεταμοσχεύθηκαν σε διαβητικά ποντίκια, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να συγκροτήσουν δομές σαν νησίδες (islet-like structures) με έκκριση χαμηλών επιπέδων ινσουλίνης (Lumelsky et al, 2001). Ακόμη, τα εμβυονικά βλαστικά κύτταρα των ποντικιών (mES) μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες που παρήγαγαν ντοπαμίνη (Brustle et al, 1999).

### 3.4. Ενήλικα ή σωματικά βλαστικά κύτταρα

Ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι τα αιμοποιητικά και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στον μυελό των οστών και στο αίμα.

Επιπλέον συναντώνται στο έμβρυο και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα. **Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα είναι ικανά για (α)** διαίρεση σε πανομοιότυπα αδιαφοροποίητα κύτταρα και **(β)** διαφοροποίηση και παραγωγή κυτταρικών τύπων του αίματος. Τα μη αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στον λιπώδη ιστό, στον σκελετικό μύ, τα δόντια, το αρθρικό υγρό, το αμνιακό υγρό και τον ομφάλιο λώρο. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ομφαλίου λώρου βρίσκονται στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Bieback et al, 2004. ) και στην περιοχή Wharton's jelly του ομφαλίου λώρου (Lu et al. 2006.). **Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα (multipotent stem cells) που μπορούν (α)** να πολλαπλασιασθούν και **(β)** να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα διαφόρων μεσεγχυματικών ιστών. Έτσι διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, μυϊκά, λιπώδη και νευρικά κύτταρα (Battula VL., et al. 2007.). Δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε αιμοποιητικά κύτταρα. Ο Διεθνής Σύλλογος για Κυτταρική Θεραπεία (international society for cellular therapy) έχει καθορίσει ορισμένα **κριτήρια για τον καθορισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων: (a).** Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προσκολλώνται σε πλαστική επιφάνεια σε καλλιέργειες (plastic adherent). **(b).** Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα εκφράζουν πρωτεϊνικούς δείκτες όπως CD105, CD90, CD73, CD44, **(c).** Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς δείκτες όπως CD34, CD45, CD14, CD11b, HLA-DR (Dominici et al, 2009).

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από την περιοχή Wharton's jelly του ομφαλίου λώρου προέρχονται από το εξτρα-εμβρυονικό μεσόδερμα και έχουν κοινές ιδιότητες με τα ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αλλά και επιπλέον ιδιαίτερα γνωρίσματα. Έχουν χαρακτηριστική μορφή ινοβλάστη και μπορεί να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Cao and Feng 2009, Pereira et al, 2008, Miao et al, 2006, Baksh et al, 2007; Battula, et al. 2007). Επιπλέον μπορούν να κατευθυνθούν στη δημιουργία ηπατικών, καρδιακών και νευρικών κυττάρων, στοιχείο που τα καθιστά ικανά προς θεραπευτική χρήση στην αναγεννητική ιατρική σε περιπτώσεις ανάπλασης (Sarugaser et al, 2005; Karahuseyinoglu et al, 2007; Fu YS et al; Wang HS et al, 2004; Conconi et al, 2006; Wu et al, 2007; Miao et al, 2006). Ενισχύουν την εγκατάσταση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στον μυελό των οστών λόγω της δυνατότητας στρωματικής υποβοήθησης (λειτουργούν ως feeder layer) (Lu et al, 2006). Επίσης, έχουν την δυνατότητα περαιτέρω πολλαπλασιασμού τους πριν την κρυοσυντήρηση

και μάλιστα σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από τον μυελό των οστών [Lu et al, 2006, Bakhshi et al, 2008].

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου πλεονεκτούν έναντι αυτών του μυελού των οστών γιατί έχουν ταχύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μειωμένη αντιγονικότητα. Σε ενήλικες ο αριθμός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων κυμαίνεται σε 1 ανά 1.000.000 μονοπύρηνα κύτταρα μυελού των οστών, 1.000 έως 5.000 ανά κυβικό εκατοστό ομφαλοπλακουντιακού αίματος και περίπου 10.000 έως 15.000 ανά εκατοστό ιστού ομφαλίου λώρου. Μάλιστα το ποσοστό της απόδοσης της επεξεργασίας και απομόνωσης των κυττάρων αυτών από την γέλη του Wharton του ομφαλίου λώρου είναι περίπου 100% έναντι 63% αυτής του ομφαλοπλακουντιακού αίματος [Karahuseyinoglu et al, 2007; Sarugaser et al, 2005].

### 3.5. Θεραπευτική χρήση των βλαστικών κυττάρων των ενηλίκων

Χορήγηση βλαστοκυττάρων αναστρέφει την **σκλήρυνση κατά πλάκας** (Burt et al, 2009). Η χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό όπλο στην θεραπεία των χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Constantin, et al, 2009). Η ανάπτυξη τρισδιάστων δομών νευρικού ιστού από βλαστοκύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση - επιδιόρθωση κατεστραμμένων περιοχών του εγκεφάλου (Jurgan M et al, 2009). Προκλινικές μελέτες με βλαστικά κύτταρα από την περιοχή Wharton's jelly του ομφαλίου λώρου έχουν γίνει σε ζώα με μοντέλα νόσου του Parkinson [Weiss et al, 2006; Fu et al, 2006], με βλάβη του αμφιβληστροειδούς [Lund et al, 2007], με εγκεφαλική βλάβη [Liao et al, 2009] και όγκους [Rachakatla et al, 2007] με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επίσης δοκιμάζεται εργαστηριακά η ικανότητα των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από την περιοχή Wharton's jelly του ομφαλίου λώρου ως προς την **αναγέννηση οστίτη ιστού** και την επούλωση οστικών καταγμάτων [Schneider et al, 2010; Zhao et al, 2010] καθώς και την κατασκευή ενός κλινικά εφαρμόσιμου μυοκαρδιακού επιράμματος (patch) που θα βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία σε περιπτώσεις **εμφράγματος του μυοκαρδίου** από απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας [Kenar et al, 2010]. Κλινικές δοκιμές με μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από το αίμα του ομφάλιου λώρου γίνονται σε παιδιατρικούς ασθενείς με λευχαιμία που έχουν ήδη υποβληθεί

σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων για να προσδιορισθεί η επίδρασή τους στην εγκατάσταση των αιμοποιητικών κυττάρων στον μυελό των οστών και στο φαινόμενο "αντίδρασης μοσχεύματος έναντι του ξενιστή". Επίσης, δοκιμάζεται η ετερόλογη μεταμόσχευση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από το αίμα του ομφαλίου λώρου σε ασθενείς με τραυματισμένο αρθρικό χρόνδρο στο γόνατο με σκοπό την διερεύνηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητάς της ως νέα θεραπευτική εφαρμογή. Επιπρόσθετα, δοκιμάζεται η μεταμόσχευση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ομφάλιου λώρου σε ασθενείς με **οξεία απλαστική αναιμία** γιατί έχει διαπιστωθεί ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, ενισχύουν την αιμοποίηση και επιδεικνύουν ιδιότητες ανάπλασης ιστών. Βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να βοηθήσουν στην **θεραπεία του διαβήτη τύπου I και II** (Bhansali et al, 2009; Valtareli et al, 2007). Βλαστοκύτταρα ενηλίκων αποδεικνύονται ικανά για την **επανόρθωση των μυών και του δέρματος** καθώς και άλλων μαλακών μορίων (Cherubino et al, 2009). Έχει γίνει κλινική **μεταμόσχευση τραχείας** που δημιουργήθηκε από βλαστοκύτταρα ασθενούς (Macchiarini et al, 2008). Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να εισχωρήσουν στον κοχλία και να προάγουν την ανάπλαση του έσω αυτιού σε ποντίκια, στα οποία προκλήθηκε κώφωση. Είναι η πρώτη ένδειξη σχετικά με την χρήση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων στην **αποκατάσταση της ακοής** (Revoltella et al, 2008). Μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων έγινε για **την θεραπεία της ισχαιμικής αγγειοπάθειας** (Amann et al, 2009). Σε κλινικές μελέτες όπου έγινε μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων σε ασθενείς με **νόσους του ήπατος** έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να βελτιώσουν σε μεγάλο ποσοστό την ηπατική λειτουργία (Flohr et al, 2009). Τα βλαστοκύτταρα προάγουν τον πολλαπλασιασμό των φυσικών δολοφόνων κυττάρων και με αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στην θεραπεία της λευχαιμίας και του καρκίνου χωρίς προηγούμενη χημειοθεραπεία (Boissel et al, 2008).

### 3.6. Ικανότητα αναγέννησης (renewal) των γεννητικών κυττάρων

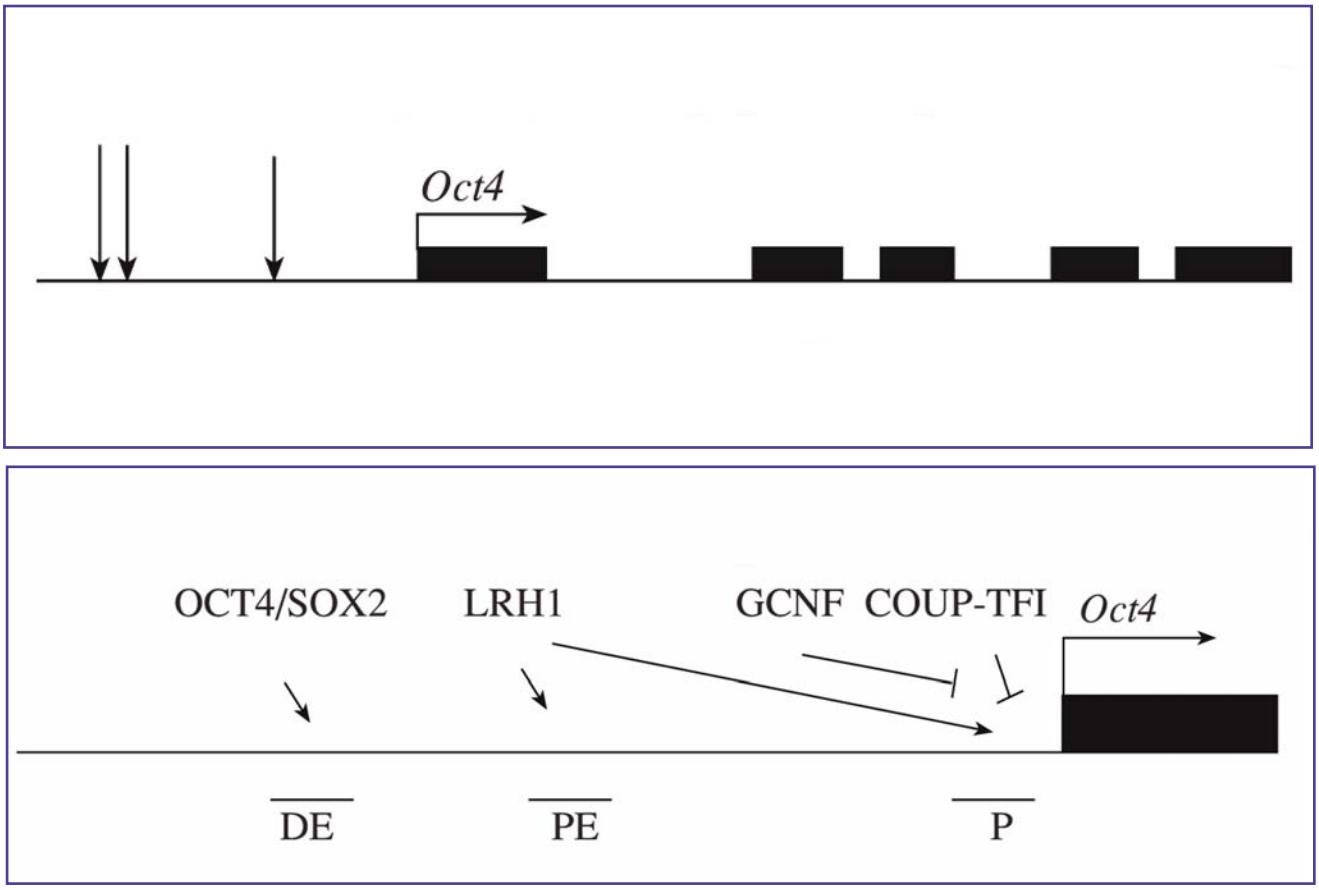
Έχει βρεθεί ότι υπάρχει δυνητικότητα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και των σωματικών βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται μορφολογικά σε γεννητικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν δείκτες γεννητικών κυττάρων. Ο Hubner και συνεργάτες (2003) βρήκαν ότι

*in vitro* τα εμβρυονικά κύτταρα εξέφρασαν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP) με την ρύθμιση του Oct3/4 (POU5F1). Τα διαφοροποιημένα αυτά κύτταρα εξέφρασαν επίσης τον δείκτη των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων (PGC), c-KIT, τον δείκτη των γεννητικών κυττάρων και την Scp3 (synaptoneamal complex protein 3), που είναι ένας μειωτικός δείκτης. Επιπρόσθετα, συνεχιζόμενη καλλιέργεια είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να είναι μορφολογικά παρόμοια με ωοκύτταρα, παρήγαγαν οιστρογόνα και ανιχνεύθηκαν γονίδια σε αυτά που σχετίζονται με την διαφανή ζώνη (Hubner et al, 2003). Ο Duce και συνεργάτες (2004) έδειξαν ότι τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος γουρουνιού μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, αστροκύτταρα και λιποκύτταρα *in vitro* (Dyce et al, 2004). Επίσης, ο Dyce και συνεργάτες (2006) βρήκαν ότι η καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων του δέρματος γουρουνιού εξέφραζε ειδικούς δείκτες γεννητικών κυττάρων όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης-9 (growth differentiation factor-9, GDF-9), ο Mvh και το DAZL. Μετά από 30-40 ημέρες καλλιέργειας τα κύτταρα έμοιαζαν με ωοκύτταρο περιστοιχισμένα από κοκκιώδη κύτταρα. Έκθεση των κυττάρων αυτών σε γοναδοτροπίνη είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να εκφράζουν δείκτες που εκφράζουν τα ωοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών της διαφανούς ζώνης και του Scp3 καθώς και παραγωγή οιστρογόνων και προγεστερόνης. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι κάποια από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα που μεταναστεύουν στον γοναδικό κρημνό διαμένουν στο δέρμα και επομένως μπορεί να ευθύνονται για το παραπάνω φαινόμενο (Dyce et al, 2006).

Σχετικά με την παρουσία βλαστικών κυττάρων στο σπλαχνικό (βλαστικό) επιθήλιο (germinal layer) της ωοθήκης των ποντικιών και την δυνητικότητά τους να σχηματίζουν γεννητικά κύτταρα μετά την γέννηση υπάρχει διχογνωμία (Johnson et al, 2004). Ο Bukovsky και συνεργάτες (2005) δημοσίευσαν ότι το επιθήλιο της ωοθήκης των ενηλίκων γυναικών και τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι πηγή γεννητικών κυττάρων (Bukovsky et al, 2005).

### 3.7. Το γονίδιο του παράγοντα Oct-4 (POU5F1)

Ο Oct-4 είναι μέλος της οικογένειας POU (Pit-Oct-Unc) και δρα σαν ένας μεταγραφικός παράγων (transcription factor) [Okamoto et al, 1990, Scholer et al, 1990]. Το POU5F1 (POU




**Εικόνα 3.3. Απεικόνιση του γονιδίου OCT-4.** Αποτελείται από **5 εξόνια** και δύο δομικά στοιχεία: τον **εγγύς ενισχυτή** (proximal enhancer, PE) και τον **άπω ενισχυτή** (distal enhancer, DE), καθώς και τον **υποστηρική** (promoter, P). Ετεροδιμερή των μεταγραφικών παραγόντων OCT-4 και SOX2 και ο ορφανός υποδοχέας LRH1 ενεργοποιούν την μεταγραφή του γονιδίου OCT-4. Ο ορφανός υποδοχέας GCNG και ο παράγοντας COUP-TF1 καταστέλλουν το γονίδιο OCT-4 (Medvedev et al, 2008).

domain, class 5, homeobox 1) είναι μία από τις δύο ισομορφές του Oct-4 (Kossovska et al, 2009). Η συγκεκριμένη περιοχή POU, η οποία μοιράζεται μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας POU είναι μια **διμερής** (bipartite) **DNA περιοχή πρόσδεσης** που περιέχει την **POU όμοια περιοχή** (POU homeodomain) και την **POU ειδική περιοχή** (POU specific domain). Οι POU μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στην **αλληλουχία του DNA** που ονομάζεται **οκταμερές μοτίβο** (octamer motif). Οι μεταγραφικοί παράγοντες POU είναι ευέλικτοι στην αναγνώριση των περιοχών πρόσδεσής τους λόγω της δομής

διμερούς της περιοχής πρόσδεσης στο DNA που έχουν. Οι Oct-1, Oct-2 και Pit-1 μπορούν να προσδένονται στο DNA σε ομοιοδιμερή και ετεροδιμερή συμπλέγματα ανάλογα με την διευθέτηση των περιοχών πρόσδεσης. Ο Oct-4 αναγνωρίσθηκε αρχικά στα ποντίκια σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας ειδικός της γενετικής σειράς (germline-specific). Αποτελείται από πέντε εξόνια και από υψηλά διατηρημένες νησίδες στην 5' μη μεταφρασμένη περιοχή (5' untranslated region, UTR), οι οποίες αντιπροσωπεύουν κοινά ρυθμιστικά στοιχεία **(Εικόνα 3.3).** (Pesce and Scholer, 2000). Έχει βρεθεί ότι το προϊόν του γονιδίου του αδενοϊού E1A αλληλεπιδρά με το Oct-4 και μιμείται την δράση ειδικών βλαστικών παραγόντων γεφύρωσης (stem cell-specific bridging factors) σε διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές. Η λειτουργική συνέργεια ανάμεσα στο Oct-4 και τον αδενοϊό E1A χρειάζεται την POU περιοχή του Oct-4 και την σταθερή περιοχή 3 (constant region 3, CR3) του αδενοϊού E1A (Scholer et al, 1991). Παράδειγμα θετικής ρύθμισης γονιδίου από τον Oct-4 αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών-4 (fibroblast growth factor-4, FGF-4). Ο FGF-4 εκφράζεται στην έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass) της βλαστοκύστης και προκαλεί πολλαπλασιασμό και επιβίωση της έσω κυτταρικής μάζας. Άλλο παράδειγμα θετικής ρύθμισης γονιδίου από τον Oct-4 αποτελούν το μόριο Opn (Osteopontin adhesion molecule, Opn). Έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση των αρχέγονων (primitive) κυττάρων του ενδοδέρματος στο έμβρυο συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση της πρωτεΐνης Oct-4 και της έκφρασης του Opn mRNA. Επίσης, το Oct-4 συνεργάζεται με το Sox-2 για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων (Pesce and Scholer, 2000).

Το Oct-4 εκφράζεται ασθενώς στα πρώιμα στάδια της εμβυονικής σχάσης (embryonic cleavage) μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων, όπου βρίσκεται υψηλό ποσό πρωτεΐνης Oct-4 στον πυρήνα των βλαστομεριδίων. Η έκφρασή του Oct-4 φαίνεται να χρειάζεται για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (Remenyi et al, 2001; Scholer et al, 1990; Prusa et al, 2003). Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα δεν αρχίζουν απόπτωση, όπως κάνουν τα σωματικά κύτταρα (Mantel et al, 2007). **Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που χάνουν την Oct-4 έκφραση έχουν την μοίρα να υποστούν σωματική διαφοροποίηση** (Pesce and Scholer, 2000). Ο Guo και συνεργάτες (2008) ανακοίνωσαν ότι **η έκφραση του Oct-4 χρειάζεται για την προστασία από την απόπτωση που προκαλείται από στρες στα εμβρυονικά κύτταρα** των ποντικιών και μάλιστα φαίνεται η προστατευτική αυτή δράση να ασκείται διαμέσου του μονοπατιού της

σουρβαϊβίνης (Guo et al, 2008). Μέχρι την **συμπήκνωση του μοριδίου** (compaction of morula), η έκφραση του Oct-4 είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα. Κατά την συμπήκνωση του μοριδίου τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος διαχωρίζονται από τα έσω παντοδύναμα κύτταρα, τα οποία (έσω κύτταρα) θα σχηματίζουν το έμβρυο. Επομένως, η λειτουργία του Oct-4 είναι απαραίτητη για την διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινότυπου των έσω κυττάρων, μόνο όταν τα έξω κύτταρα αποκτήσουν μιά πόλωση (polarization) μετά την συμπήκνωση του μοριδίου. Η κυτταρική σήμανση που εξαρτάταται από την προσκόλληση (cell adhesion-dependent signaling) πιθανώς να εμπλέκεται στον διαχωρισμό των έσω και έξω διαμερισμάτων του εμβρύου ως δύο διαφορετικές περιοχές. Μόνο κύτταρα που λαμβάνουν αρκετή σήμανση, ως αποτέλεσμα της τοποθέτησής τους στο εξωτερικό διαμέρισμα ρυθμίζουν προς τα κάτω το Oct-4 και διαφοροποιούνται, ενώ κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό διαμέρισμα εξαιρούνται από την προς τα κάτω ρύθμιση και διατηρούν την παντοδυναμία (totipotency) (Pesce and Scholer, 2000). Κατάργηση της λειτουργίας του Oct-4 στα ποντίκια έχει βρεθεί ότι προκαλεί πρόωρη θνητότητα, λόγω έλλειψης της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης σε έμβρυα 3,5 ημερών της κύησης (Nichols et al, 1998). Επί απουσίας του Oct-4, τα κύτταρα του μοριδίου (morula) διαφοροποιούνται σε τροφοεξώδερμα και η ύπαρξη των ολοδύναμων (pluripotent) βλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης καταργείται. Η διατήρηση του Oct-4 στην έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης χρειάζεται για να προλαμβάνει την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και να διαχωρίζει το έμβρυο κατάλληλα από τα τροφοεξωδερματικά κύτταρα (Pesce et al, 1989). Επομένως, **το Oct-4 εκφράζεται στα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης.**

Μετά την εμφύτευση, το Oct-4 εκφράζεται στα **επιβλαστικά κύτταρα** και ρυθμίζεται προς τα κάτω κατά την διάρκεια της **γαστριδίωσης** (gastrulation). Κατά το στάδιο της μεσο-γαστριδίωσης, μια μικρή ομάδα κυττάρων διασχίζει την αρχέγονη ράβδωση (primitive streak) πίσω και τοποθείται στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα και διαχωρίζεται ως **αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** (primordial germ cells, PGCs). Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (PGCs) είναι τα μόνα εμβυονικά κύτταρα που διατηρούν έκφραση του Oct-4 μετά την γαστριδίωση (Pesce and Scholer, 2000). Επομένως, **το Oct-4 εκφράζεται στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα** (germ cells). Τα **επιβλαστικά κύτταρα** εντοπίζονται στα έμβρυα των θηλαστικών όταν εκείνα βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης και μπορούν να μετατραπούν με φυσικό τρόπο στον οργανισμό σε αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, δηλαδή τόσο σε κύτταρα που μπορούν να

δώσουν σπερματοζωάρια όσο και σε κύτταρα, από τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν ωάρια. Η ικανότητα των επιβλαστικών κυττάρων να μετατρέπονται σε γεννητικά κύτταρα σχετίζεται με την τοποθεσία τους στο έμβρυο και όχι με την γαστριδίωση. Τοποθέτηση των επιβλαστικών κυττάρων σε εγγύς (proximal) τοποθεσία κάνει τα κύτταρα αυτά ικανά να διαχωρίζονται ως γεννητικά κύτταρα. Αντίθετα, μεταμόσχευση κυττάρων από την εγγύς τοποθεσία σε απομακρυσμένη (distal) τοποθεσία δεν δίνει έκτοπα γεννητικά κύτταρα (Pesce and Scholer, 2000). Ο Lawson και συνεργάτες (1999) έχουν δείξει ότι η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 (bone morphogenic protein-4, BMP-4) εκφράζεται υψηλά στο εξωεμβρυονικό εξώδερμα και στα κύτταρα της αλλαντοΐδας (allantoic cells) και εμπλέκεται πιθανώς στην μετατροπή των επιβλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα (Lawson et al, 1999). Σε έμβρυα ομόζυγα για μεταλλάξεις στο BMP-4 απουσιάζει ή είναι μειωμένο το εξωεμβρυικό μεσόδερμα και ο σχηματισμός των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων είναι καταργημένος (Winnier et al, 1995). Κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης, **το Oct-4** προοδευτικά ρυθμίζεται προς τα κάτω με έναν τρόπο από μπροστά προς τα πίσω και τελικά **περιορίζεται στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα στο εξωεμβρυονικό μεσόδερμα** (extraembryonic mesoderm). Η ύπαρξη του Oct-4 στο οπίσθιο τέλος του εμβρύου είναι απαραίτητη για την γενεαλογία των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων. Επομένως, **η ενεργοποίηση του Oct-4 στα βλαστικά κύτταρα προλαμβάνει την προς τα κάτω ρύθμιση των γεννητικών κυττάρων κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης** (Pesce and Scholer, 2000). Ο παράγοντας BMP-4 φαίνεται ότι ρυθμίζει την ενέργεια του Oct-4 στα γεννητικά κύτταρα. Όμως η υπερέκφραση του Oct-4 με έκθεση στον BMP-4 μόνο δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την μετατροπή των επιβλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα (Pesce and Scholer, 2000).

Οι CD133+ ολοδύναμοι πρόγονοι (pluritopotent progenitors) και τα βλαστικά κύτταρα που μοιάζουν με εμβρυονικά και απομονώνονται από το αίμα του ομφαλίου λώρου βρέθηκε να είναι θετικά για τον Oct-4 [Baal et al 2004, McGuckin et al, 2005]. Επίσης, έκφραση του Oct-4 έχει βρεθεί στον μυελό των οστών που προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα ενήλικα ανθρώπου [Jiang et al, 2002]. Ακόμη, ο Oct-4 εκφράζεται στα εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα [Tai et al, 2005] και στο αμνιακό υγρό [Prusa et al, 2003, Stefanidis et al, 2008].

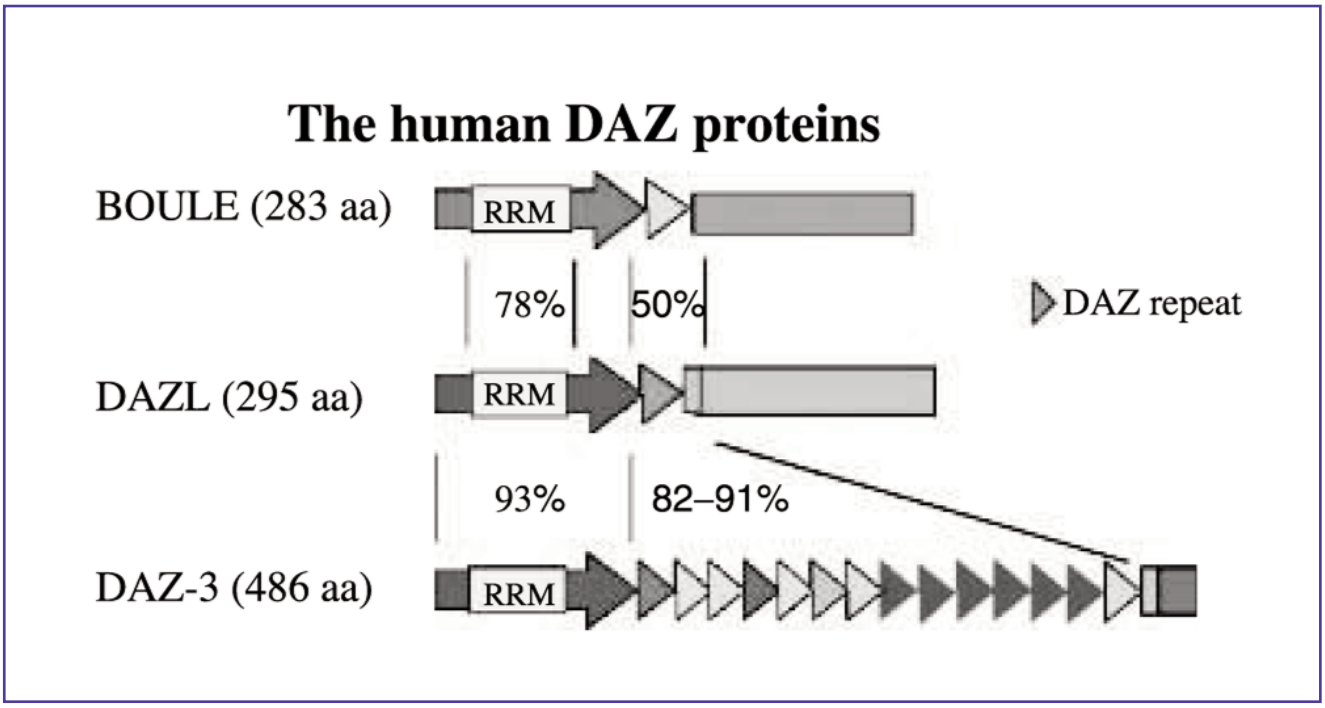
Επομένως, ο Oct-4 φαίνεται να είναι έ**νας δείκτης των ολοδύναμων βλαστικών**

**κυττάρων** (pluripotent stem cells) του ανθρώπου. Στα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή λόγω υπογονιμότητας - εμβρυομεταφορά η έκφραση του Oct-4 δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Επίσης, δεν έχει μελετηθεί εάν υπάρχει συνέργεια ή αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του Oct-4 και της σουρβαϊβίνης στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI) και η κλινική ερμηνεία ενός τέτοιου φαινομένου.

### 3.8. Τα γονίδια της οικογένειας DAZL

Τα γονίδια DAZ, DAZL (DAZ-like) και BOULE ανήκουν στην ίδια οικογένεια γονιδίων, που ονομάζεται οικογένεια DAZL. Τα γονίδια DAZ, DAZL (DAZ-like) και BOULE παράγουν πρωτεΐνες, οι οποίες περιλαμβάνουν μια οικογένεια πρωτεϊνών, που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην γαμετογένεση **(Εικόνα 3.4).** Το γονίδιο DAZ (διαγραμμένο στην αζωοσπερμία, deleted in azoospermia) εντοπίζεται εντός του AZFc (τόπος του παράγοντα αζωοσπερμίας, azoospermia factor lupus, AZFc) του μακρού σκέλους του ανθρώπινου Y-χρωμοσώματος. Το προϊόν του γονιδίου DAZ αναγνωρίσθηκε αρχικά ως ένας υποψήφιος παράγοντας που προκαλεί αζωοσπερμία και ολιγοσπερμία στο 5-10% των υπογόνιμων αντρών (Reijo et al, 1995; Reynolds and Cooke, 2005). Τα ανθρώπινα γονίδια DAZL (hDAZL) και BOULE (hBOULE) είναι αυτοσωματικά και ο ρόλος τους στην ανθρώπινη γονιμότητα δεν είναι ξεκάθαρος. hDAZL SNPs συνδέονται με το σύνδρομο Sertoli-μόνο κύτταρα (Sertoli cell-only syndrome), ολιγοσπερμία και πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (premature ovarian failure, POF) (Reynolds and Cooke, 2005, Fassnacht et al, 2006, Tung et al, 2006). Στα διάφορα ζωικά είδη δεν ανευρίσκονται όλα τα μέλη της οικογένειας DAZL. Έτσι, το DAZ ανευβρίσκεται στους ανθρώπους και στις μαϊμούδες του παλαιού κόσμου (old world monkeys), ενώ τα ασπόνδυλα (invertebrates) κωδικοποιούν μόνο BOULE (Εικόνα).

**Τα γεννητικά κύτταρα (germ cells) είναι ο κύριος τόπος έκφρασης των πρωτεϊνών των μελών της οικογένειας DAZL.** Στον άνθρωπο, τον ποντικό και τα βατράχια Xenopous Laevis η έκφραση DAZL έχει ανιχνευθεί στα αρχέγοντα γεννητικά κύτταρα και σε όλα τα στάδια της ωογένεσης. Στα ωάρια έχει βρεθεί μόνο DAZL έκφραση και όχι έκφραση του DAZ ή του BOULE (Brook et al, 2009). **Έκφραση του DAZL έχει περιγραφεί στα**




**Εικόνες 3.4. Περιγραφή των δομών των πρωτεϊνικών περιοχών (protein domains) της οικογένειας DAZL.** Τα μέλη της οικογένειας DAZL περιέχουν δύο αναγνωρίσιμα μοτίβα: την περιοχή RRM και την περιοχή DAZ. Η περιοχή DAZ είναι μοναδική για αυτή την οικογένεια και αποτελείται από 24 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη BOULE και η πρωτεΐνη DAZL περιέχουν μόνο μία περιοχή DAZ, ενώ η πρωτεΐνη DAZ περιέχει πολλαπλές DAZ περιοχές διατεταγμένες κατά σειρά

**κοκκιώδη κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού**, στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων του ανθρώπου και στα κοκκιώδη - ωχρινικά (luteal) κύτταρα του ωχρού σωματίου του ανθρώπου (Ruggiu et al, 1997; Dorfman et al, 1999; Nishi et al, 1999; Pan et al, 2002; 2008), αλλά **αυτά τα ευρήματα ακόμη αποτελούν διχογνωμία** (Brook et al, 2009). Διαγραφή (deletion) του DAZL στα ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των γεννητικών κυττάρων του θήλεος εμβρύου πριν από την γέννηση, ενώ στο άρρεν προκαλεί αποτυχία έναρξης της μειωτικής διαίρεσης των γεννητικών κυττάρων (Ruggiu et al, 1997, Lin and Page 2005, Lin et al, 2008, Brook et al, 2009). Το γονίδιο DAZ εκφράζεται μόνο στους όρχεις (Reijo et al, 1995). Στους όρχεις του ανθρώπου και του ποντικιού το γονίδιο BOULE είναι παρόν στο κυτταρόπλασμα των σπερματοκυττάρων της παχυταινίας (pachytene spermatocytes) και στις στρόγγυλες σπερματίδες (round spermatids), ενώ απουσιάζει από τα σπερματογόνια (sper-

matogonia) (Xu et al, 2001).

Στην οικογένεια των πρωτεϊνών DAZL έχουν βρεθεί δύο λειτουργικές περιοχές: **η περιοχή RRM** (RNP-type RNA-recognision motific, RRM) και η περιοχή DAZ. Η περιοχή DAZ είναι μοναδική για αυτή την οικογένεια και αποτελείται από 24 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη BOULE και η πρωτεΐνη DAZL περιέχουν μόνο μία περιοχή DAZ, ενώ η πρωτεΐνη DAZ περιέχει πολλαπλές DAZ περιοχές διατεταγμένες κατά σειρά (Yen, 2004). Επομένως, οι πρωτεΐνες DAZ, DAZL και BOULE είναι διακριτές μεταξύ τους. Οι πρωτεΐνες DAZ και DAZL είναι όμοιες στο μεγαλύτερο μέρος του μήκους τους εκτός από τα C-τερματικά άκρα τους (C-terminal ends), όπου οι δύο αλληλουχίες είναι τελείως διαφορετικές λόγω των πολλαπλών DAZ περιοχών διατεταγμένων κατά σειρά στην πρωτεΐνη DAZ. Επομένως, οι πρωτεΐνες DAZ, DAZL και BOULE αλληλεπιδρούν με διαφορετικά RNA υποστρώματα (RNA substrates) και πρωτεΐνες (Yen, 2004). Η υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών της οικογένειας DAZL αλλάζει κατά την διάρκεια της γαμετογένεσης. Οι πρωτεΐνες DAZL και DAZ ανιχνεύονται στους πυρήνες των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (primordial germ cells) των εμβρυϊκών γονάδων (Xu et al, 2001). Στους όρχεις του ανθρώπου και του ποντικιού οι πρωτεΐνες DAZL και DAZ βρίσκονται πρωτίστως στο κυτταρόπλασμα των σπερματίδων της παχυταινίας και σε μικρότερο βαθμό στους πυρήνες των σπερματογονίων (Xu et al, 2001). Επομένως, **οι πρωτεΐνες DAZL και DAZ φαίνεται να μετακινούνται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα κατά τον χρόνο της μείωσης** (Yen 2004). Οι πρωτεΐνες DAZL και DAZ ανιχνεύονται στα ώριμα σπερματοζωάρια, αν και η σημασία αυτής της έκφρασης δεν έχει ξεκαθαρισθεί (Yen, 2004).

Υπάρχουν βάσιμες αποδείξεις ότι η επιστράτευση των μελών της οικογένειας DAZL γίνεται για την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων (Yen, 2004). Ομόζυγα ποντίκια σε μετάλλαξη που ανενεργοποιεί το γονίδιο DAZL (null mutation) και στα δύο φύλα στερούνται της ύπαρξης σπερματογονίων ή ωαρίων (Ruggiu et al, 1997). Οι όρχεις ενός 9-ημερών ποντικιού με μετάλλαξη που ανενεργοποιεί το γονίδιο DAZL (null mutation) περιέχουν πολύ λίγα γεννητικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στον ποιό προχωρημένο κυτταρικό τύπο (A σπερματογόνια), σε σχέση με τα σπερματοκύτταρα της προ-λεπτοταινίας (preleptotene) που βρίσκονται στα φυσιολογικά ποντίκια (wild type mice) της ίδιας ηλικίας. Τα DAZL και DAZ λειτουργούν και τα δύο για την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, την διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων και την ωρίμανση, ενώ το BOULE περιορίζεται

μόνο στην μείωση (Yen, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί έκφραση του DAZL στα κύτταρα του αμνιακού υγρού (Stefanidis et al, 2008).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZL είναι **πρωτεΐνες RNA-πρόσδεσης** (RNA-binding) με την βοήθεια της περιοχής RRM και έχουν έναν ρόλο στην πυρηνική και/ή κυτταροπλασματική γονιδιακή ρύθμιση μετά την μεταγραφή (Yen, 2004; Brook et al, 2009). Επίσης, οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZL παίζουν έναν ρόλο στην μετάφραση των κυττάρων (Brook et al, 2009). Ο Collier και συνεργάτες (2005) χρησιμοποιώντας *Xenopus laevis* ωοκύτταρα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες DAZL έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την έναρξη της μετάφρασης. Επίσης, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες DAZL αλληλεπιδρούν με τις poly(A)-πρόσδεση πρωτεΐνες, οι οποίες είναι σημαντικές για την έναρξη της μετάφρασης (Collier et al, 2005). Αρκετές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα DAZ και DAZL. Οι πρωτεΐνες DAZL μπορεί να υπάρχουν στα κύτταρα ως ομοδιμερή (homodimers) ή ετεροδιμερή (heterodimers). Διμερισμός (dimerization) του mDAZL έχει βρεθεί ότι είναι RNA-ανεξάρτητος και χρειάζεται αλληλουχία το λιγότερο 53 αμινοξέων (Ruggiu and Cooke, 2000). Παραδείγματα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τα DAZ και DAZL είναι οι πρωτεΐνες DAZAP1 και DAZAP2. Η πρωτεΐνη DAZAP1 εκφράζεται σε αφθονία στους όρχεις και βρίσκεται κυρίως στους πυρήνες των σπερματοκυττάρων στο τέλος της παχυταινίας (late pachytene spermatocytes) και στις στρόγγυλες σπερματίδες (round spermatids), ενώ μετακινείται στο κυτταρόπλασμα στις επιμήκεις σπερματίδες (elongated spermatids) (Yen 2004). Η πρωτεΐνη DAZAP2 είναι ταυτόσιμη με την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το Prtb (proline codon-rich trancript, brain expressed) και η έλλειψή της στα ποντίκια δεν προκαλεί σαφείς ανωμαλίες (Yen, 2004).

### 3.9. Η πολυδυναμικότητα των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων των ώριμων ωοθυλακίων: ένα νέο πεδίο έρευνας

Τα κοκκιώδη κύτταρα ενός αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου επιτελούν αρκετές ειδικές λειτουργίες, όπως είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων οιστραδιόλης, η προσαρμογή της υποδεκτικότητας των FSH και LH ορμονών στο ορμονικό περιβάλλον, η φροντίδα του ωοκύτταρου και η επικοινωνία με το ωοκύτταρο καθώς και τα κύτταρα της θήκης. Η σήμανση για ωοθυλακιορρηξία έχει ως αποτέλεσμα την ωχρινοποίηση του ιστού. Τα ωχρινοποιημένα

κοκκιώδη κύτταρα είναι τερματικά διαφοροποιημένα και στο μέσον της ωχρινικής φάσης του εμμηνορρυσιακού κύκλου αντικαθίστανται από μικρά, ωχρινοποιημένα κύτταρα που προέρχονται από τα περιβάλλοντα κύτταρα της θήκης (Niswender et al, 2000; Kossowska et al, 2009). Οι εξειδικευμένες αυτές λειτουργίες των κοκκιωδών κυττάρων των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και ο γρήγορος πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στην υπόθεση ότι ο πληθυσμός των κοκκιωδών κυττάρων ενός υγιούς ωοθυλακίου δεν είναι ομοιόμορφος αλλά αποτελείται από έναν υποπληθυσμό διαφοροποιημένων και έναν άλλο υποπληθυσμό αδιαφοροποίητων κυττάρων, με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα να είναι ικανά για μίτωση (Kossowska et al, 2009). Η υπόθεση αυτή ενθαρρύνεται από άλλους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού που αναπτύσσονται γρήγορα όπως είναι ο μυελός των οστών, ο οποίος περιλαμβάνει μια ποικιλία εξειδικευμένων κυττάρων όπως είναι τα μυελοκύτταρα (myelocytes), τα δικτυοκύτταρα (reticulocytes) και τα μεγακαρυοκύτταρα (megakaryocytes) καθώς και αδιαφοροποίητα κύτταρα που έχουν τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων. Με το κατάλληλο ανατομικό περιβάλλον του μυελού των οστών, τα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να πολλαπλασιασθούν και να διαφοροποιηθούν αντικαθιστώντας τα ηλικιωμένα και αποπτωτικά αιματοποιητικά κύτταρα. Άλλα παραδείγματα είναι το έντερο, ο εγκέφαλος, οι όρχεις και ο πλακούντας (Kossowska et al, 2009). Παρατεταμένη καλλιέργεια *in vitro* των κοκκιωδών κυττάρων που συλλέγονται από τα προωορρηκτικά ωοθυλάκια δεν επιτυγχάνεται πέρα των δέκα ημερών. Ο Kossowska και συνεργάτες (2009) κατάφεραν να καλλιεργήσουν ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα γυναικών που υποβλήθηκαν σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Προκειμένου να υπερκαμφθεί το γεγονός ότι σε κάθε ασθενή η κατάσταση υπογονιμότητας μπορεί να επιβαρύνει την λειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων τα δείγματα όλων των ασθενών που μελετήθηκαν ανακατεύθηκαν όλα μαζί. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τον παράγοντα αναστολέα-λευχαιμίας (leukemia-inhibiting factor, LIF), για να επιτευχθεί μακράς διάρκειας επιβίωση των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων.

Ο LIF είναι κυτοκίνη που χρησιμοποιείται συχνά σε καλλιεργητικά υλικά υποστηρίζοντας την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων (Kossowska et al, 2009). Σε ιστούς όπως είναι το έντερο, ο μυελός των οστών και ο εγκέφαλος, ο LIF είναι σπουδαίος για την αυτο-αναγέννηση (self-renewal) (Bauer et al, 2006; Kalabis et al, 2003; Jiang et al, 2002). Ο LIF έχει ανιχνευθεί σε εμβρυικές και ενήλικες ωοθήκες (Abir et al, 2004) και εμπλέκεται

πιθανώς στην μετάβαση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε πρωτογενή (Nisson et al, 2002). Ο LIF βρίσκεται στο ωοθυλακικό υγρό και η έκκρισή του αυξάνεται από την χοριακή γοναδοτροπίνη (Arici et al, 1997; Coskun et al, 1998). LIF υποδοχέας έχει βρεθεί στα ωοκύτταρα και στα προεμφυτευτικά έμβρυα του ανθρώπου υποδηλώνοντας έναν ρόλο στην εμφύτευση (Arici et al, 1995; Van Eijk et al, 1996).

Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε ο LIF για παρατεταμένη επιβίωση των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων, τα κοκκιώδη κύτταρα έχασαν προοδευτικά τα δικά τους κύρια χαρακτηριστικά όπως είναι οι υποδοχείς FSH (FSHR) και η αρωματάση (Kossowska et al, 2009). Ο τυπικός δείκτης των βλαστικών κυττάρων Oct-4 εκφράστηκε καθ' όλη την παρατεταμένη καλλιέργεια. Οι δείκτες για τα ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα, χαρακτηριστικά των γεννητικών κυττάρων ***nanog***, ***vasa*** και ***stella*** ήταν αρνητικοί. Από τους τυπικούς μεσεγχυματικούς δείκτες για πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD117 και CD166 εκφράσθηκαν όλοι εκτός από τον CD73. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στην έννοια ότι κατά την διάρκεια μακράς καλλιέργειας και επί της παρουσίας του LIF αποδίδουν στην γενεαλογία των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων. Οι ερευνητές Kossowska και συνεργάτες (2009) απέδειξαν την πολυδυναμικότητα (multipotency) ενός υποπληθυσμού των κοκκιωδών κυττάρων που είναι λιγότερο διαφοροποιημένος καταδεικνύοντας την δυνητικότητά του για διαφοροποίηση σε νευρώνες, χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες, εφόσον καλλιεργηθούν με ειδικά καλλιεργητικά υλικά. Και οι τρεις αυτές γενεαλογίες (lineages) ανήκουν στην γενεαλογία του μεσοδέρματος (mesodermal lineage) και δεν βρίσκονται σε φυσιολογικά ωοθυλάκια των ωοθηκών (Kossowska et al, 2009).

Ο Kossowska και συνεργάτες (2009) μελέτησαν επιπρόσθετα την ικανότητα των κοκκιωδών κυττάρων των ωοθυλακίων, που καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά υλικά με προσθήκη LIF να επιβιώσουν και να διαφοροποιηθούν *in vivo* σε άλλους διακριτούς τύπους ιστών. Έτσι τα μεταμόσχευσαν υποδορίως στις πλάτες "ανοσοεπαρκών γυμνών ποντικιών" (immunocompetent nude mices) και βρήκαν ότι τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων *in vivo* αναγέννησαν ιστούς μεσεγχυματικής προέλευσης.

Τα ευρήματα των ερευνητών Kossowska και συνεργάτες (2009) συνηγορούν ότι τα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα με την παρουσία του LIF δεν διαφοροποιούνται σε

γεννητικά κύτταρα γιατί δεν εκφράσθηκαν οι ειδικοί δείκτες για τα γεννητικά κύτταρα ***nanog***, ***vasa*** και ***stella***. Όμως η πολυδυναμικότητα αυτή των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων είναι πιθανό να μπορεί να ερμηνεύσει την παθοφυσιολογία των ωοθηκών κυρίως σε καταστάσεις όπως είναι η ενδομητρίωση και ο καρκίνος.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

# ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 4.1. Προέλευση των δειγμάτων

Για την ανίχνευση της έκφραση του SURVIVIN mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών εξετάσθηκαν δείγματα κοκκιωδών κυττάρων από 29 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Οι 19 περιπτώσεις αναφέρονται σε σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας και υποβλήθηκαν σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) (65.5%) και οι 10 περιπτώσεις αναφέρονται σε αντρικό παράγοντα υπογονιμότητας και υποβλήθηκαν σε τεχνικές μικρογονιμοποίησης (ICSI) (34.5%).

Για την ανίχνευση της έκφραση του OCT-4 mRNA και του DAZL mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου εξετάσθηκαν δείγματα κοκκιωδών κυττάρων από 21 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Οι 13 περιπτώσεις αναφέρονται σε σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας και υποβλήθηκαν σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) (61.9%) και οι 8 περιπτώσεις αναφέρονται σε αντρικό παράγοντα υπογονιμότητας και υποβλήθηκαν σε τεχνικές μικρογονιμοποίησης (ICSI) (38.1%).

Όλα τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στην Α' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ" και αφορούσαν την περίοδο 2011. Πριν από την ωοληψία όλες οι ασθενείς υποβλήθησαν στο ίδιο πρωτόκολλο

πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας. Φόρμα συγκατάθεσης για την χρησιμοποίηση των κοκκιωδών κυττάρων τους ελήφθη από τις ασθενείς αυτές. Οι ορμόνες τους κατά την διάρκεια της θεραπείας προσδιορίσθηκαν με την μέθοδο RIA χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτς. Την δεύτερη με πέμπτη ημέρα του γεννητικού κύκλου υπολογίσθηκαν οι ορμόνες FSH, LH, οιστραδιόλη και AMH. Τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό του αίματος υπολογίσθηκαν μέσα σε έναν από τους 6 προηγούμενους γεννητικούς κύκλους. Επίσης, κατά την διάρκεια της θεραπείας υπολογίσθηκαν τα επίπεδα στον ορό του αίματος της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν (α) κατά την πέμπτη ημέρα χορήγησης της FSH και (β) την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG.

## 4.2. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας

Η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας ξεκίνησε με εμπορικό διαθέσιμο σκεύασμα GnRH αναλόγου (Buserelin, Suprefact), το οποίο αυτο-χορηγήθηκε υποδορίως στον μηρό από τις ασθενείς σε δόση 500 μg/ημέρα ξεκινώντας στο μέσον της ωχρινικής φάσης του προηγούμενου εμμηνορρυσιακού κύκλου, 7 ημέρες πριν την αναμενόμενη εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως και η χορήγησή του συνεχιζόταν έως 24 ώρες προ της χορήγησης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων διεγείρθηκε μετά από 14 ημέρες με ενέσιμη χορήγηση 225 IU/day ανασυνδυασμένης FSH (rFSH) (Gonal F) και συνεχιζόταν μέχρι την χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Σε όλες τις ασθενείς, εκτιμήθηκε υπερηχογραφικά η καταστολή των ωοθηκών (απουσία ωοθηκικής δραστηριότητας, σχηματισμού κύστεων και πολλαπλασιασμού του ενδομητρίου) και τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος των γυναικών (< 40 pg/ml ή 200 pmol/ml) πριν από την χορήγηση της εξωγενούς γοναδοτροπίνης. Εάν τα παραπάνω κριτήρια δεν απαντούνταν τότε η καταστολή του άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - ωοθήκες επεκτεινόταν για μία ακόμα εβδομάδα. Η ανασυνδυασμένη FSH χορηγήθηκε μία φορά ημερησίως υποδορίως στην κοιλιά της ασθενούς. Την πέμπτη ημέρα διέγερσης των ωοθηκών έγινε υπερηχογράφημα και ορμονικός προσδιορισμός της οιστραδιόλης για αναπροσαρμογή της δόσης της rFSH βάσει της ανταπόκρισης. Η μέγιστη επιτρεπόμενη δόση rFSH ήταν 450 IU/ημέρα. Η δόση ελαττώνονταν ή διακόπτονταν εάν η ασθενής ήταν σε κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος μετρώνταν καθημερινώς από την 8η ημέρα χορήγησης της rFSH. Η ωοθυλακιορρηξία προκλήθηκε με 10,000 IU hCG όταν η υπερηχογραφική εξέταση έδειχνε

ότι το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είχε αποκτήσει μια μέση διάμετρο 18-mm ταυτόχρονα με τουλάχιστον δύο ή περισσότερα ωοθυλάκια με μέση διάμετρο >16 mm. Πριν την χορήγηση της hCG γίνονταν ορμονικός προσδιορισμός της οιστραδιόλης. Όλα τα ωοθυλάκια με διάμετρο 10 mm ή περισσότερο τρυπήθηκαν και αναρροφήθηκαν 36 ώρες μετά την χορήγηστη της hCG με ενδοκολπική υπερηγοχραφική καθοδήγηση.

Στην περίπτωση της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) η σπερματέγχυση έγινε με κατάλληλο θρεπτικό μέσον (medium) σπερματέγχυσης 6 ώρες μετά την ωοληψία και η γονιμοποίηση επιβεβαιώθηκε με την αναγνώριση του προπυρήνα 16 ώρες μετά την σπερματέγχυση. Στην περίπτωση της μικρογονιμοποίησης (ICSI) τα ωάρια απογυμνώθηκαν μηχανικά από τα κοκκιώδη κύτταρα με γυάλινη πιπέτα της οποίας το άκρο είχε γίνει λεπτό με την βοήθεια φωτιάς (fire-polished tip). Η ωριμότητα των ωαρίων βασίσθηκε στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η ICSI έγινε μόνο στα ωάρια, τα οποία μορφολογικά βρισκόταν στην μετάφαση II και είχαν εκβάλλει το πρώτο πολικό σωμάτιο. Τα κινητά σπερματοζωάρια επιλέχθηκαν με την Swim-up τεχνική, η οποία αποτελούνταν από έκπλυση του σπέρματος με Gamete medium με φυγοκέντρηση σε 300 x g. Το υπερκείμενο διάλυμα απεκκρίθηκε και στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 ml θρεπτικού υλικού (medium) και αφέθηκε για 30 πρώτα λεπτά ώστε να επιτρέψει τα σπερματοζωάρια να κολυμπήσουν προς τα πάνω (swim-up) από το ίζημα (pellet). Ακριβώς πριν από την εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης, 2 μl του προετοιμασμένου ενεωρήματος σπέρματος (sperm suspension) προστέθηκαν σε 5 μl polyvinylpyrrolidone solution (PVP) για να μειωθεί η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Μόνο ένα σπερματοζωάριο αναρροφήθηκε από το PVP διάλυμα, με πρώτη την ουρά του και ενέθηκε στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου διαμέσου της διαφανούς του ζώνης. Η πιπέτα έγχυσης εξήλθε σιγά-σιγά από το ωάριο. Κατόπιν τα ωάρια στα οποία υποβλήθηκαν στην τεχνική της μικρογονιμοποίησης τοποθετήθηκαν σε 1 ml IVF θρεπτικού υλικού σε ειδικά τριβλία. 16 έως 18 ώρες μετά την τεχνική της μικρογονιμοποίησης (ICSI), τα ωάρια παρατηρήθηκαν με στερεομικροσκόπιο για την ύπαρξη προπυρήνων και πολικών σωματίων.

Η ωχρινική φάση του γεννητικού κύκλου υποστηρίχθηκε με φυσική προγεστερόνη (Utrogestan, Faran, Greece) (200 mg τρεις φορές ημερησίως) ενδοκολπικώς ξεκινώντας μετά την ωοληψία. Η θεραπεία με φυσική προγεστερόνη συνεχιζόταν μέχρι την εμφάνιση εμμηνορρυσίας ή σε περίπτωση επίτευξης εγκυμοσύνης τουλάχιστον κατά τις 3 πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης. Η ύπαρξη εγκυμοσύνης καθορίσθηκε με το θετικό τεστ κύησης (β-hCG) 14 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά. Η κλινική εγκυμοσύνη καθορίσθηκε

με την ύπαρξη ενδομητρίου σάκου κύησης με ενδοκολπικό υπερηχογράφημα, η οποία συνεχίσθηκε μετά την 12η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Ως εγκυμοσύνη ορίζουμε τις περιπτώσεις της κλινικής εγκυμοσύνης και τις περιπτώσεις εκείνες που οδηγήθηκαν σε αποβολή τις πρώτες 12 εβδομάδες της εγκυμοσύνης.

Κατά το μέσον της ωχρινικής φάσης του κύκλου έγινε προσεκτικό υπερηβικό υπερηχογράφημα της ελάσσονος πυέλου για να ανιχνευθούν τυχόν σημεία συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών. Οι ασθενείς στην συνέχεια παρακολουθήθηκαν και η έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής καταγράφηκε (εγκυμοσύνη ή εμμηνορρυσία).

### 4.3. Παράμετροι αξιολόγησης

Εκτιμήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι για την επίδρασή τους στην πιθανή έκφραση των γονιδίων σουρβαϊβίνη (survivin), Oct-4 και DAZL στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που ελήφθηκαν κατά την ωοληψία:

- **Τα χαρακτηριστικά των ασθενών:** Ως προς τα χαρακτηριστικά των ασθενών, οι παράμετροι που αξιολήθηκαν ήταν η ηλικία, το BMI, η διάρκεια υπογονιμότητας, οι προηγούμενες προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, τα βασικά επίπεδα των γονοδοτροπινών ορμονών (FSH, LH), ο λόγος FSH/LH και τα επίπεδα της αντιμυλλέριας ορμόνης στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου καθώς και τα επίπεδα της προλακτίνης μέσα σε έναν από τους 6 προηγούμενους γεννητικούς κύκλους.
- **Οι ιατρικές καταστάσεις των ασθενών:** **Ασθενείς με σαγχαρώδη διαβήτη ή/και σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών καθώς και ενδομητρίωση αποκλείσθηκαν από τη μελέτη.**
- **Οι αιτίες υπογονιμότητας:** Οι παράμετροι υπογονιμότητας περιλάμβαναν δύο κύριες ομάδες:

**1. Ασθενείς με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας**

**2. Ασθενείς με ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας**

Οι ασθενείς με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF), ενώ στις περιπτώσεις εκείνες που υπήρχε αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας έγινε μικρογονιμοποίηση (ICSI).

- **Οι παράμετροι διέγερσης που εξαρτώνται από την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας:** Οι παράμετροι που εξαρτώνταν από την πρόκληση της

ωοθυλακιορρηξίας περιλάμβαναν τον συνολικό αριθμό των ημερών της διέγερσης (διάρκεια διέγερσης < 10 ημέρων ή διάρκεια διέγερσης > 10 ημερών) και την συνολική δόση της ανασυνδιασμένης ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης (rFSH) που χρειάσθηκε για την διέγερση των ωοθηκών (< 3000 IU ή > 3000 IU) καθώς και τα επίπεδα στον ορό του αίματος της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (επίπεδα οιστραδιόλης μεγαλύτερα ή μικρότερα από 2300 pg/ml).

- **Ο αριθμός των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν** (< 7 ωάρια σε σχέση με ≥ 7 ωοθυλακίων).
- **Ο αριθμός των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία** (< 6 ωάρια σε σχέση με ≥ 6 ωάρια ή < 7 ωάρια σε σχέση με ≥ 7 ωάρια ή < 8 ωάρια σε σχέση με ≥ 8 ωάρια ή < 9 ωάρια σε σχέση με ≥ 9 ωάρια).
- **Οι παράμετροι που σχετίζονται με την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων (ωοκυττάρων)** (oocyte developmental competence related variable): Οι παράμετροι που σχετίζονται με την ικανότητα ανάπτυξης των ωοκυττάρων περιλάμβαναν:

**1. Τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση II (MII),** (< 5 ώριμα ωάρια σε σχέση με ≥ 5 ώριμα ωάρια ή < 6 ώριμα ωάρια σε σχέση με ≥ 6 ώριμα ωάρια ή < 7 ώριμα ωάρια σε σχέση με ≥ 7 ώριμα ωάρια ή < 9 ώριμα ωάρια σε σχέση με ≥ 9 ώριμα ωάρια)

**2. Το ποσοστό των ώριμων ωαρίων (oocyte maturation rate).** Ο αριθμός των ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση II (MII) υπολογίσθηκε σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των ωαρίων που ελήφθησαν κατά την ωοληψία (ποσοστό ώριμων ωαρίων < 60%, 60-74.9, ≥ 75% ή <75% σε σχέση με ≥75% ή <61% σε σχέση με ≥61%)

**3. Το ποσοστό γονιμοποίησης,** π.χ. η αναλογία των 2 προ- πυρήνων (PN) που παρατηρήθηκαν 16-18 h μετά την τεχνητή χορήγηση του σπέρματος σε σχέση με τον αριθμό των ανέπαφων ωαρίων μετά την IVF (2PN) ή ICSI. Το στάδιο των 7-κυττάρων την ημέρα-3 μετά το IVF πάνω από τον αριθμό των 2 προ-πυρήνων **(>7-cell Day 3).**

**5. Ο βαθμός κατακερματισμού των εμβρύων (Degree of fragmentation in embryos),** που υπολογίσθηκε σαν την αναλογία εμβρύων με ποσοστό κατακερματισμού μικρότερη του 10% την ημέρα-3 μετά την έγχυση των σπερματοζωαρίων ή την ICSI (χαμηλός κατακερματισμός, Low Fragmentation).

**6. Η αναλογία των καλής ποιότητας εμβρύων,** π.χ. έμβρυα που είχαν τουλάχιστον 7 κύτταρα και < 10% κατακερματισμό την ημέρα-3 μετά την έγχυση των σπερματοζωαρίων ή την ICSI **(καλής ποιότητας έμβρυα βαθμός 3, μέχρι 1 κακής ποιότητας)** (ποσοστό

εμβρύων Grade 3: 100%, σε σχέση με < 100%)

**- Η έκβαση των IVF θεραπειών:** Κλινικά επιβεβαιωμένη εγκυμοσύνη (κλινική εγκυμοσύνη), βιοχημική εγκυμοσύνη, αποτυχία εγκυμοσύνης - εμμηνορρυσία, έκτοπη κύηση, αποβολή.

### 4.4. Εκχύλιση του RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό kit για εκχύλιση RNA, το οποίο ελήφθη από την Qiagen (RNeasy micro kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) και η εκχύλιση εκτελέσθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

### 4.5. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA

Για την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιήθηκαν 10 μl ολικού RNA με 8 μl dNTPMix (Ambion), 10 μl νερό ελεύθερο νουκλεάσης, 4 μl oligo dT Primer (Ambion), 2 μl RNease Inhibitor (Invitrogen), 8 μl First Standard Buffer (Invitrogen) και 1 μl MMLV αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen). Η αντίδραση έγινε στους $80^0$ C για 3 πρώτα λεπτά, στους $42^0$ C για 60 πρώτα λεπτά και στους $92^0$ C για 10 λεπτά σε Mastercycler (Eppendorf).

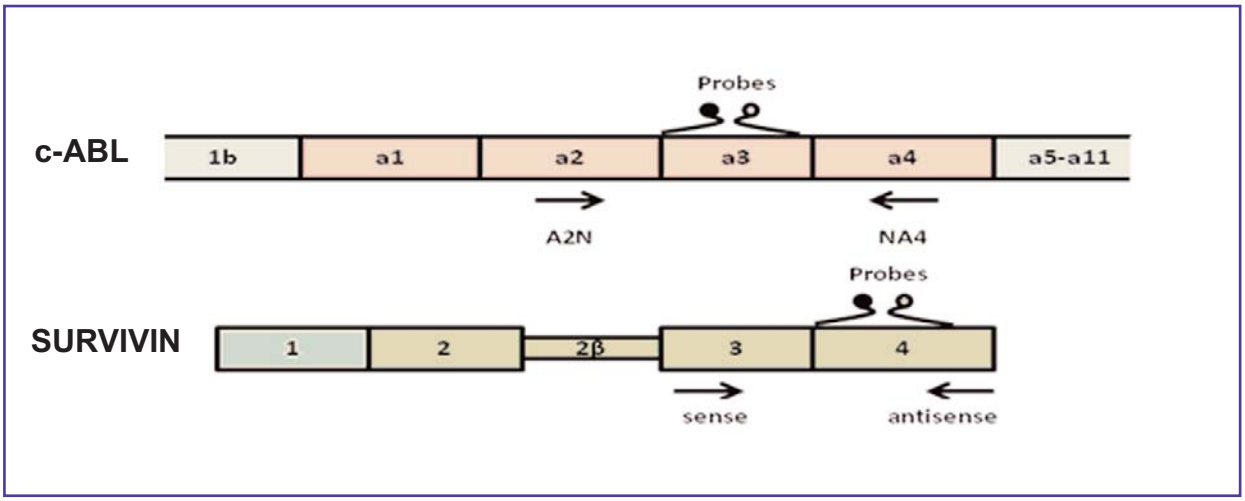
### 4.6. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (με φθορίζοντες ανιχνευτές υβριδοποίησης) για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN

Η real time-PCR για την μελέτη της έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN έγιναν στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Πρώτης Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “ΛΑΪΚΟ”.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (quatitative competitive polymerase chain reaction, QC-PCR) είναι μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου-στόχου, στον εκάστοτε ιστό. Η real time-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού σε πραγματικό χρόνο, RT-PCR) έχει ως αρχή λει-

τουργίας της την μέτρηση σε πραγματικό χρονο του φθορισμού των προϊόντων της PCR στην αρχή της λογαριθμιστικής φάσης αύξησης αυτών. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται με τους ποικίλους τρόπους όπως με τη βοήθεια χρωστικών που προσδένονται στο DNA (dsDNA dye), με φθορίζοντες ανιχνευτές που υδρολύονται από την 5΄-νουκλεολυτική δράση της πολυμεράσης καθώς την εμποδίζουν με την πρόσδεσή τους (Hydrolysis probes) και με φθορίζοντες ανιχνευτές που αλληλεπιδρούν με μεταφορά ενέργειας καθώς προσδένονται στο DNA (Hybridization probes). Με τη μέθοδο αυτή κατασκευάζεται μια λογαριθμική καμπύλη για κάθε δείγμα (συνάρτηση του αριθμού των πολλαπλασιασμένων μορίων προς τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης) με μια φάση υπόβαθρου (background phase), μια λογαριθμική φάση (log phase) και μια φάση κορεσμού (end-point). Η ποσοτική RT-PCR (QC-RT-PCR) συνδυάζει την RT-PCR με τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της σε πραγματικό χρόνο και στην παρούσα μελέτη εφαρμόσθηκε με φθορίζοντες ανιχνευτές υβριδοποίησης (hybridization probes).

Στην RT-PCR που πραγματοποιήθηκε, για να επιτευχθεί ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός έγινε χρήση του ένζυμου **hot start Taq πολυμεράση** που είναι μια 94kDa πρωτεΐνη με 5'-3' δραστηριότητα πολυμερισμού, η οποία είναι πλέον αποτελεσματική στους $70^0$C έως $80^0$C. Είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτική και ο χρόνος ημιζωής της είναι 100 κύκλοι. Η **Real time PCR** εφαρμόσθηκε με τη χρήση των φθοριζόντων ανιχνευτών υβριδοποίησης προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια, αξιοπιστία και απόδοση της αντίδρασης και να μεγιστοποιηθεί η ειδικότητά της. Το ζευγάρι των ανιχθευτών αποτελούνταν από έναν δότη και έναν δέκτη ενέργειας. Στο συγκεκριμένο πείραμα: (α) **ο δέκτης** περιλάμβανε μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία συμπληρωματική με ένα τμήμα της αλληλουχίας-στόχου και την **φθορίζουσα LC Red640** στο 3΄ άκρο του και (β) **ο δότης** περιλάμβανε μια αλληλουχία συμπληρωματική με ένα άλλο τμήμα της αλληλουχίας-στόχου και τη **φθορίζουσα φλουορεσκεΐνη** στο 5΄ άκρο του. Σε όλες τις φάσεις της PCR (εκτός αυτής της πρόσδεσης) εκπέμφθηκε μήκος κύματος 530nm. Όμως κατά τη φάση πρόσδεσης των εκκινητών (probes), η φλουορεσκεΐνη διεγέρθηκε και με μεταφορά ενέργειας από τον δότη στον δέκτη οπότε παρατηρήθηκε εκπομπή μήκους κύματος 640nm από την LC Red640 ανάλογη του ποσού των PCR προϊόντων. Η αντίδραση συνολικά περιλάμβανε 40 κύκλους με επαναλαμβανόμενα στάδια της κλασσικής PCR με αρχική αποδιάταξη του cDNA και ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης σε ένα κύκλο **(Denaturation)**. Στη συνέχεια, αποδιάταξη του cDNA, υβριδοποίηση των εκκινητών με το DNA (α) και επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA (β) για 40 κύκλους. Η συλλογή




**Εικόνα 4.1:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των c-ABL και SURVIVIN μεταγράφων με έμφαση στα τμήματά τους που ενισχύθηκαν από τους αντίστοιχους εκκινητές και στα τμήματά τους που προσδέθηκαν οι αντίστοιχοι φθορίζοντες ανιχνευτές.

δεδομένων-μέτρηση απορρόφησης έγινε στην φάση (α) ή (β) κάθε κύκλου $2^0$C έως $4^0$C κάτω από το σημείο τήξης (Tm) του PCR προϊόντος (**Quantification**). Ακολούθησε ανάλυση της καμπύλης συλλέγοντας δεδομένα φθορισμού καθώς αυξήθηκε η θερμοκρασία από τους $60^0$C στους $95^0$C για ένα κύκλο (**Melting curve**).

Ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ενός δείγματος ομαλοποιείται σύμφωνα με τον αριθμό των μεταγράφων ενός γονιδίου αναφοράς (**housekeeping gene**) στο ίδιο δείγμα, γεγονός που υποδεικνύει την αξιοπιστία και την ποσότητα του cDNA του συγκεκριμένου δείγματος. Κάποια γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται είναι το ABL και το G6PD. Τα αποτελέσματα κάθε δείγματος δηλώνουν τη ποσοτικοποίηση του είτε απόλυτα, είτε σχετικά (ως λόγος των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου προς τα μετάγραφα του γονιδίου αναφοράς) και εκφράζονται αντίστοιχα είτε σε αντίγραφα ή συγκέντρωση προϊόντος, είτε σε κύκλους πολυμερισμού που εντοπίστηκε η αρχή της λογαριθμικής αύξησης των PCR προϊόντων για το συγκεκριμένο γονίδιο-στόχο.

Η απόλυτη έκφραση του SURVIVIN mRNA υπολογίσθηκε σαν τον λόγο mRNA survivin/ mRNA ABL. Υπολογίσθηκε η εγκυρότητα του υπολογισμού και η συγκρισιμότητα των δειγμάτων από διαφορετικές δότριες. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι όλες οι αντιδράσεις PCR σε αυτή την μελέτη είχαν την ίδια αποδοτικότητα (efficiency) με την ενίσχυση του στόχου (target amplification), συγκριτικά με το ABL. Έτσι, έγιναν 10-πλάσιες διαδοχικές διαλύσεις όλων των διαθέσιμων cDNAs που χρησιμοποιήθηκαν και ελήφθησαν πρότυπες καμπύλες. Οι αποδοτικότητες της real-time PCR υπολογίσθηκαν από την κλίση (slope). Οι απόλυτες τιμές που βρέθηκαν ήταν παρόμοιες (<3,3). Τελικά, όλα τα δείγματα του cDNA

έγιναν από το ίδιο ποσό RNA (1μg) και διαλύθηκαν στον ίδιο όγκο, καθότι τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν συγκρίσιμα.

Σκοπός της συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν η ενίσχυση των αλληλουχιών του c-ABL που οριοθετούνται από περιοχές των εξωνίων a2 και a4 και των αλληλουχιών του SURVIVIN που οριοθετούνται από περιοχές των εξωνίων 3 και 4 με τους αντίστοιχους εκκινητές (A2N και NA4, Surv F και Surv R) και η ποσοτικοποίηση αυτών.

**Αντίδραση:**

**Τα αντιδραστήρια και υλικά είχαν ως εξής:**

**2x QuantiTect Multiplex PCR Master Mix, 10μl:**

- PCR Buffer: Διάλυμα $MgCl_2$ (11 mM)
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dntps)

**Πίνακας 4.6.α**

**Εκκινητές και ανιχνευτές της Real Time PCR για το γονίδιο SURVIVIN**

| mRNA | Sequence | Tm |
|---|---|---|
| SURVIVIN F (primer) | 5'-AAA GAG CCA AGA ACA AAA TTG C-3' | $56.6^0$C |
| SURVIVIN R (primer) | 5'- GAG AGA GAA GCA GCC ACT GTT AC -3' | $56.3^0$C |
| SURVIVIN FL (probe) | 5'-TGC TCT TGT TTT GTC TTG AAA GTG GC -- FL-3' | $63^0$C |
| SURVIVIN LC (probe) | 5'-LC640 – CCA GAG GTG CTT CTG CCT GTG C --PH | $65.8^0$C |

**Πίνακας 4.6.β**

**Εκκινητές και ανιχνευτές της Real Time PCR για το γονίδιο ABL**

| mRNA | Sequence | Tm |
|---|---|---|
| ABL A2N (primer) | 5'-CCC AAC CTT TTC GTT GCA CTG T-3' | $62.7^0$C |
| ABL NA4 (primer) | 5'- CGG CTC TCG GAG GAG ACG TAG A-3' | $63.2^0$C |
| ABL a3-3'HP (probe) | 5'- LC640 - AAT GGG GAA TGG TGT GAA GCC CAA A -3' | $66.4^0$C |
| ABL a3-5'HP (probe) | 5'-TGA AAA GCT CCG GGT CTT AGG CTA TAA TCA -- FL | $65.6^0$C |

- Ένζυμο hot start Taq πολυμεράση (Thermus aquaticus)

**Εκκινητές, 0.5 μl:** A2N και NA4 (για το c-ABL), Surv F και Surv R (για SURVIVIN)

**Probes, 0.25 μl:** a3-3'-HP και a3-5'-HP (για c-ABL), FL και LC (για SURVIVIN)

**cDNA:** 2 μl με τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) (sense και antisense) και των ανιχνευτών (probes) (FL και LC) είχαν όπως φαίνονται στον **Πίνακα 4.6.α** και **Πίνακα 4.6.β**.

**Πρωτόκολλο**

**1.** Τοποθετούμε 2 μl cDNA και 18 μl από το μίγμα της αντίδρασης στα αντίστοιχα γυάλινα τριχοειδή σωληνάρια (capillaries) μέσα σε ειδικές θέσεις σε δοχείο που διατηρεί σταθερή χαμηλή θερμοκρασία (criobox).

**2.** Φυγοκεντρούμε τα capillaries 3sec. στις 1.000 στροφές.

**3.** Με το τέλος του προγράμματος, μεταφέρουμε το περιεχόμενο των capillaries σε Eppendorf με φυγοκέντρηση 2sec σε 1.000 στροφές.

**4.** Μέσω του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένη η συσκευή Lightcycler παίρνουμε την ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος.

* Το πρόγραμμα καταγραφής και ανάλυσης των αποτελεσμάτων όσον αφορά στην βασική γραμμή (baseline) και στην μέθοδο ανάλυσης των δεδομένων ήταν αυτόματα ρυθμισμένο στο ανάλογο (proportional) και στο δεύτερο μέγιστο παράγωγο (second derivative maximum) αντίστοιχα.

## 4.7. RT-PCR σε πραγματικό χρόνο (με φθορίζοντες ανιχνευτές υβριδοποίησης) για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων OCT-4 και του DAZL

Οι μοριακές τεχνικές για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων OCT-4 κα DAZL έγιναν στο εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής - Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ".

Χρησιμοποιήθηκαν **εκκινητές** (primers) και **ανιχνευτές** (probes) που ειδικά σχεδιάσθηκαν από την TIB-MOLBIOL για αυτή την μελέτη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) (sense και antisense) και των ανιχνευτών (probes) (FL και LC) είχαν όπως φαίνονται στον **Πίνακα 4.7.α** και **Πίνακα 4.7.β**.

Οι κατάλληλοι εκκινητές (primers) και ανιχνευτές (probes) χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 20 pmol/μl στην κάθε αντίδραση. Ποσοτική real time PCR έγινε σε όγκο τελικής αντίδρασης 20 μl σε Light Cycler 480. Το μίγμα της RT-PCR περιλάμβανε 4 μl Light Cycler 480 Genotyping Master (Roche), 0,5 μl για κάθε εκκινητή (primer), 0,2 μl για κάθε ανιχνευτή (probe), 9,6 μl $H_2O$ του Light Cycler 480 Genotyping Master (Roche) και 5 μl cDNA. Η έκφραση του OCT-4 και του DAZL γονιδίου ομαλοποιήθηκε με την έκφραση του G6PD (Light Mix Kint G6PD, TIB MOLBIOL) και το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 2 μl Light Cycler 480 Genotyping Master, 4 μl μείγμα εκκινητών από 16x hu G6PD (TIB

**Πίνακας 4.7.α**

**Εκκινητές και ανιχνευτές της Real Time PCR για το γονίδιο Oct-4 (POU5f1)**

| mRNA | Sequence | Tm |
|---|---|---|
| Oct-4 Sense | 5'-AAG CAG AAA CCC TCG TG-3' | 52$^0$C |
| Oct-4 Antisence | 5'ACT CGG ACC ACA TCC TT-3' | 50.5$^0$C |
| Oct-4 FL (probe) | 5'-AAC AAA TTC TCC AGG TTG CCT C-3' | 58.2$^0$C |
| Oct-4 LC640 (probe) | 5'-CAC TCG GTT CTC GAT ACT GG TTC GC-PH | 65.2$^0$C |

**Πίνακας 4.7.β**

**Εκκινητές και ανιχνευτές της Real Time PCR για το γονίδιο DAZL**

| mRNA | Sequence | Tm |
|---|---|---|
| DAZL Sense | 5'-GCT ATG TTG TAC CTC CGG CTT A-3' | 57.1$^0$C |
| DAZL Antisence | 5'-GCC CGA CTT CTT CTA AAG TGA TG-3' | 57.6$^0$C |
| DAZL (probe) | 5' - LC640-ACT GAA CAT TCA TTT GGC ACA ACT TCA GCT --PH | 65.2$^0$C |
| DAZL (probe) | 5' – TTT CCA GAG GGT GGA GTA GCT TCA TG - FL | 63.4$^0$C |

MOLBIOL), 2,4 μl $MgCl_2$ και 6,6 $H_2O$ και τα δύο από το Light Cycler 480 Genotyping Master (Roche). Η real time PCR εκτελέσθηκε σε **Light Cycler 480 II (Roche)** με τις παρακάτω παραμέτρους: ένας κύκλος στους 95$^0$ C για 10 πρώτα λεπτά για προ-επώαση, 40 κύκλους για ενίσχυση (95$^0$ C για 10 πρώτα λεπτά, 56$^0$ C για 20 πρώτα λεπτά και 72$^0$ C για 10 πρώτα λεπτά) και ένας κύκλος στους 4$^0$ C για ψύξη.

## 4.8. Στατιστική ανάλυση

### 4.8.1. Στην περίπτωση έκφρασης του γονιδίου SURVIVIN

Για τη σύγκριση μεταξύ ποιοτικών/κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος **$x^2$ του Pearson**. Η σύγκριση των επιπέδων των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των κατηγοριών ποιοτικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους μη παραμετρικούς ελέγχους **Wilcoxon rank-sum** και **Kruskal-Wallis**. Η εκτίμηση του βαθμού συσχέτισης μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών βασίσθηκε στον μη παραμετρικό **συντελεστή συσχέτισης σειράς του Spearman** (Spearman's rho). Για την ανίχνευση παραγόντων που σχετίζονται με την έκφραση της σουρβαϊβίνης **(λόγος**

**survivin/abl)** εφαρμόστηκε **πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση** **(multiple linear regression)** μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό της σουρβαϊβίνης για καλύτερη προσέγγιση της κανονικής κατανομής. Για την ανίχνευση παραγόντων που σχετίζονται με διάφορες δίτιμες ποιοτικές μεταβλητές εφαρμόστηκε η **πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση** **(multiple logistic regression)**.

### 4.8.2. Στην περίπτωση έκφρασης του γονιδίου OCT-4

Για τη σύγκριση μεταξύ ποιοτικών/κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος **Fisher's exact test**. Η σύγκριση των επιπέδων των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των κατηγοριών ποιοτικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιόντας τους μη παραμετρικούς ελέγχους **Wilcoxon rank-sum** και **Kruskal-Wallis**. Η εκτίμηση του βαθμού συσχέτισης μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών βασίσθηκε στον μη παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης σειράς του Spearman (**Spearman's rho**).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 5.1. Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας

**1.** Να εξεταστούν τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων της ωοθήκης ως προς την έκφραση των γονιδίων σουρβαϊβίνη (survivin), Oct-4 και DAZL.

**2.** Να ερευνηθεί η σημασία της διακύμανσης από ασθενή σε ασθενή της έκφρασης των γονιδίων σουρβαϊβίνη (SURVIVIN), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων (έλεγχος συσχετίσεων με ηλικία γυναικών, BMI, επίπεδα γονοδοτροπινών ορμονών στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου, επίπεδα προλακτίνης, όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους γεννητικούς κύκλους).

**3.** Να μελετηθεί τυχόν συσχέτιση των επιπέδων έκφραση των γονιδίων σουρβαϊβίνη (SURVIVIN), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων με την συνολική δόση FSH που απαιτείται για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά την διέγερση των ωοθηκών στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

**4.** Να μελετηθεί τυχόν συσχέτιση των επιπέδων έκφραση των γονιδίων σουρβαϊβίνη (SURVIVIN), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων με τα επίπεδα οιστραδιόλης που επιτυγχάνονται τον χρόνο χορήγησης hCG κατά την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (επίπεδα οιστραδιόλης μεγαλύτερα ή μικρότερα από 2300 pg/ml).

**5.** Να μελετηθεί η ύπαρξη ή μη αλληλεπίδρασης των γονιδίων σουρβαϊβίνη (survivin), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων με τα ωάρια (ποιότητα και αριθμός ωαρίων που λαμβάνονται σε προγράμματα IVF ή ICSI σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SURVIVIN, Oct-4 και DAZL).

**6.** Να διερευνηθεί εάν η έκφρασης των γονιδίων σουρβαϊβίνη (survivin), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακιων επιδρά στην ποιότητα των εμβρύων που λαμβάνονται σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (έμβρυα χαμηλού βαθμού ή έμβρυα υψηλού βαθμού σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SURVIVIN, Oct-4 και DAZL).

**7.** Να αποσαφηνιστεί η ύπαρξη τυχόν προγνωστικού ρόλου της έκφρασης των γονιδίων σουρβαϊβίνη (SURVIVIN), Oct-4 και DAZL στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων στην έκβαση των IVF ή ICSI θεραπειών (βιοχημική εγκυμοσύνη, κλινική εγκυμοσύνη, αποτυχία εγκυμοσύνης - εμμηνορρυσία).

## 5.2. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI και εμβρυομεταφορά

Οι Πίνακες 5.2.1 έως 5.2.3 παρουσιάζουν τα δημογραφικά, ορμονικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν, καθώς και την έκβαση (outcomes) των προσπαθειών IVF ή ICSI των ασθενών αυτών. Η έκφραση της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβλήθησαν σε IVF ή ICSI παρατηρήθηκε στις 27 από τις 29 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (93%) (Πίνακας 5.2.2). Η διάμεσος του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA είναι 0.45 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.22 έως 2.94 (Πίνακας

5.2.3). Οι Πίνακες 5.2.5 έως 5.2.8 παρουσιάζουν συνοπτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής μελέτης έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ή ICSI σε σχέση με κλινικές παραμέτρους.

Από τις 29 ασθενείς που μελετήθηκαν στις 10 υπήρχε αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας (35%) και στις 19 υπήρχε σαλπιγγικός παράγοντας υπογονιμότητας (66%). Στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αντρικός παράγοντας έγινε μικρογονιμοποίηση, ενώ στις περιπτώσεις όπου υπήρχε σαλπιγγικός παράγοντας έγινε IVF. Και στις δύο περιπτώσεις η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας έγινε με το ίδιο πρωτόκολλο. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε εμβρυομεταφορά τριών (3) εμβρύων. Επίτευξη γονιμοποίησης επιτεύχθηκε στο εργαστήριο εμβρυολογίας και στις 29 περιπτώσεις (100%). Θετικό τεστ εγκυμοσύνης βρέθηκε σε ποσοστο 31% (9/29), εγκυμοσύνη σε ποσοστό 24% (7/29) και κλινική εγκυμοσύνη σε ποσοστό 21% (6/29). Πολύδυμη κύηση δεν παρατηρήθηκε σε καμιά περίπτωση. Αποβολή πρώτου τριμήνου παρατηρήθηκε σε 1 περίπτωση (3.4%, 1/29) και έκτοπη κύηση επίσης σε 1 περίπτωση (3.4%, 1/29) (Πίνακας 5.2.2). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες αιτιών υπογονιμότητας που αφορούσαν τον ανδρικό ή σαλπιγγικό παράγοντα ως προς το θετικό ή μη τεστ εγκυμοσύνης (p=0.449), την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης (p=0.369), την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης (p=0.148), την ηλικία των γυναικών (p=0.564), τα επίπεδα προλακτίνης προ της θεραπείας (p=0.920) και τα επίπεδα της οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης FSH (p=0.693) και τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.693) (Πίνακας 5.2.4).

Βρέθηκε ότι **η παρουσία έκφρασης της SURVIVIN συσχετίσθηκε στατιστικά με την ποιότητα των εμβρύων που προέκυψαν κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (p=0.006). Παρατηρήθηκε έκφραση της SURVIVIN στις περιπτώσεις με καλύτερης ποιότητας έμβρυα (grade 3)** (Πίνακας 5.2.11). Επίσης, **βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ομάδα "φυσιολογικές γυναίκες" (αντρικός παράγοντας υπογονιμόητητας) σε σχέση με την ομάδα γυναικών με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.007, Wilcoxon rank-sum test).** Παρατηρείται ότι στις περιπτώσεις των φυσιολογικών γυναικών (ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας) τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN είναι αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής της σε περιπτώσεις με σαλπιγγικό παράγοντα (Πίνακας 5.2.6 και Εικόνα 5.2.15). Είναι προφανές ότι ήταν στατιστικά σημαντική και η συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες

γυναικών που υποβλήθησαν σε μικρογονιμοποίηση (ICSI) σε σχέση τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.007, Wilcoxon rank-sum test). Στις περιπτώσεις με ICSI τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN είναι αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής της στις περιπτώσεις με IVF (Πίνακας 5.2.6 και Εικόνα 5.2.16).

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με την ηλικία των γυναικών (p=0.490, Wilcoxon rank-sum test; p=0.309, Speraman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.1 και 5.2.2), το BMI (p=0.332, Wilcoxon rank sum test; p=0.497, Spearman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.3 και 5.2.4), τα επίπεδα της FSH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.956, Wilcoxon rank-sum test; p=0.472, Spearman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.5 και 5.2.6), τα επίπεδα της LH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.543, Wilcoxon rank-sum test; p=0.924, Spearman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.7 και 5.2.8), τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.9 και 5.2.10), τα επίπεδα προλακτίνης στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.139, Wilcoxon rank-sum test; p=0.367, Spearman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.11 και 5.2.12) και τα επίπεδα AMH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.668, Wilcoxon rank-sum test; p=0.584, Spearman's test) (Πίνακας 5.2.5, Εικόνες 5.2.13 και 5.2.14). Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τις προηγούμενες προσπάθειες IVF ή ICSI των ζευγαριών (p=0.580, Wilcoxon rank-sum test) (Πίνακας 5.2.8, Εικόνας 5.2.17) και την διάρκεια υπογονιμότητας (p=0.399, Wilcoxon rank-sum test) (Πίνακας 5.2.6, Εικόνες 5.2.18 και 5.2.19). Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (Πίνακας 5.2.6, Εικόνες 5.2.20 έως 5.2.22), τα επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως αυτά μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG (Πίνακας 5.2.6, Εικόνες 5.2.23 έως 5.2.25), την συνολική δόση FSH που χρειάσθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (Πίνακας 5.2.6, Εικόνες 5.2.26 και 5.2.27) και την διάρκεια διέγερσης ωοθυλακιορρηξίας (Πίνακας 5.2.6, Εικόνες 5.2.28, 5.2.29 και 5.2.30). Ακόμα, δεν

βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν (Πίνακας 5.2.7, Εικόνες 5.2.31 και 5.2.32), τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Πίνακας 5.2.7, Εικόνες 5.2.33 έως 5.2.37). Η στατιστικη ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.233) (β) επίπεδα προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.733) (γ) επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.453) (δ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.306), (ε) θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.558) (στ) κλινική εγκυμοσύνη (p=0.967) (ζ) εγκυμοσύνη (p=0.812) (Πίνακας 5.2.9). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Πίνακας 5.2.7, Εικόνες 5.2.38 έως 5.2.42) και το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Πίνακας 5.2.7, Εικόνες 5.2.43 έως 5.2.46). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** (<61% σε σχέση με >= 61%) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.608) (β) επίπεδα FSH όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.232) (γ) επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.386) (δ) επίπδα αιχμής οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν κατά την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.212) (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (0.857), (στ) επίπεδα προλακτίνης (p=0.060), (ζ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.699) (Πίνακας 5.2.10). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με την ποιότητα των εμβρύων (embryos grade) (Πίνακας 5.2.7, Εικόνα 5.2.47) και το ποσοστό υψηλής ποιότητας εμβρύων (high-quality embryos grade) (Πίνακας 5.2.7, Εικόνα 5.2.48). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.178), (β) επίπεδα FSH (p=0.402), (γ) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.974), (δ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.197), (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.713), (στ) ποσο-

στό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.504), (ζ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.067), (η) επίπεδα οιστραδιόλης την ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.706), (θ) ποσοστό ανώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.504), (ι) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.153) (Πίνακας 5.2.11). Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτισης ανάμεσα στον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** και στα (α) θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.344) (ιβ) κλινική εγκυμοσύνη (p=0.335) (ιγ) εγκυμοσύνη (p=0.374) (Πίνακας 5.2.11). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με το θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.699, Wilcoxon rank-sum test) (Πίνακας 5.2.8, Εικόνα 5.2.49) και την εγκυμοσύνη (p=0.755, Wilcoxon rank-sum test) (Πίνακας 5.2.8, Εικόνα 5.2.50) ή την κλινική εγκυμοσύνη (p=0.246) (Πίνακας 5.2.8). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"θετικό τεστ εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.107), (β) επίπεδα FSH (p=0.431), (γ) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.181), (γ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.457), (δ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.229), (στ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.621), (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.867), (στ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.356) και (ζ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.699), (Πίνακας 5.2.12). Επίσης, η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη κλινικής εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία (p=0.069), (β) επίπεδα FSH (p=0.634), (γ) επίπεδα προλακτίνης (p=0.054), (δ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης (p=0.398), (ε) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.572), (στ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.686), (ζ) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.756), (η) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=1.00), (θ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.246), (Πίνακας 5.2.13). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) επίπεδα FSH (p=0.426), (β) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.184), (γ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=(δ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης FSH (p=0.372), (ε) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορη-

γήθηκε η hCG (p=0.593), (στ) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.897), (ζ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.897), (η) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.755). Όμως **παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην "επίτευξη εγκυμοσύνης" και την ηλικία των γυναικών (p= 0.035)** (Πίνακας 5.2.14).

Η στατιστική ανάλυση (πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN"** στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.602), (β) BMI των γυναικών (p=0.797), (γ) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (< 6 σε σχέση με ≥6) (p=0.436), (δ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης (p=0.925), (ε) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.701), (στ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.656) (Πίνακες 5.2.15 και 5.2.16). Η στατιστική ανάλυση (πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τους δείκτες είτε **"αριθμός 6 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** είτε **"αριθμός 7 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** είτε **"αριθμός 9 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (β) BMI των γυναικών και (γ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (Πίνακες 5.2.17 έως 5.2.19). Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 5 ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.476), (β) BMI των γυναικών (p=0.316), (γ) ποσοστό ώριμων ωαρίων (p=0.216), (δ) την συνολική δόση γοναδοτροπίνης (0.103), (ε) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης την ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.062) και (στ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.646), (Πίνακας 5.2.20, 5.2.21). Η στατιστική ανάλυση (πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμηση) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποσοστό υψηλής ποιότητας εμβρύων"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.835) (β) BMI των γυναικών (p=0.606) (γ) επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.228), (δ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης (p=0.236), (ε) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.819) και (στ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.389) (Πίνακας 5.2.22, 5.2.23).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.1**

| | Mean (SD) | Range |
|---|---|---|
| **Age (ys)** | 36.03 (4.75) | 27.00-48.00 |
| **Weight (Kg)** | 62.38 (10.04) | 50.00-100.00 |
| **Height (m)** | 1.65 (0.06) | 1.56-1.80 |
| **BMI** | 22.86 (4.04) | 17.28-36.73 |
| **FSH (IU/L)** | 6.59 (2.06) | 3.60-13.00 |
| **FSH/LH** | 1.43 (0.62) | 0.42-2.94 |
| **PRL (ng/ml)** | 13.92 (6.73) | 3.61-29.00 |
| | | |
| | | |
| | **Median (IQR)** | **Range** |
| **LH (IU/L)** | 4.55 (3.37, 5.97) | 1.80-12.33 |
| **AMH (μg/l)** | 5.70 (3.10, 12.20) | 1.20-25.80 |

**Πίνακας 5.2.1.: Δημογραφικά και ορμονικά δεδομένα (data) των ασθενών που μελετήθηκαν.** Η μέση ηλικία των γυναικών ήταν 36 έτη (όρια διακύμανσης από 27 έως 48 και σταθερή απόκλιση 4.75), το BMI των γυναικών ήταν 1.65 (όρια διακύμανσης από 17.28 έως 36.73 και σταθερή απόκλιση 4.04), η μέση τιμή FSH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 22.86 (όρια διακύμανσης από 3.60 έως 13 και σταθερή απόκλιση 2.06), ο διάμερος της LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 4.44 ( με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 4.37 έως 5.97 και όρια διακύμανσης από 1.80 έως 12.33), η μέση τιμή του λόγου FSH/LH στον ορό του αίματος ήταν 1.43 (όρια διακύμανσης από 0.42 έως 2.94 και σταθερή απόκλιση 0.62) και ο διάμεσος της AMH στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 5.70 ( με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 3.10 έως 12.20 και με όρια διακύμανσης από 1.80 έως 12.33). Η μέση τιμή της προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκε σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους ήταν 13.92 (όρια διακύμανσης από 3.61 έως 29 και σταθερή απόκλιση 6.73).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.2

| | N (%) |
|---|---|
| **Infertility Causes** | |
| *Ανδρικός* | 10 (34.5) |
| *Σαλπιγγικός* | 19 (65.5) |
| **Previous IVF/ICSI cycles** | |
| *Όχι* | 20 (69.0) |
| *Ναι* | 9 (31.0) |
| **Είδος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής** | |
| *ICSI* | 10 (34.5) |
| *IVF* | 19 (65.5) |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | |
| *Όχι* | 20 (69.0) |
| *Ναι* | 9 (31.0) |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 23 (79.3) |
| *Ναι* | 6 (20.7) |
| **Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 22 (75.9) |
| *Ναι* | 7 (24.1) |
| **Πολύδυμη Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 29 (100.0) |
| **Αποβολή 1ου τριμήνου** | |
| *Όχι* | 28 (96.6) |
| *Ναι* | 1 (3.4) |
| **Έκτοπη Κύηση** | |
| *Όχι* | 28 (96.6) |
| *Ναι* | 1 (3.4) |
| **Συνέχιση Εγκυμοσύνης** | |
| *Όχι* | 1 (14.3) |
| *Ναι* | 6 (85.7) |
| **SURVIVIN EXPRESSION** | |
| *Όχι* | 2 (6.9) |
| *Ναι* | 27 (93.1) |

**Πίνακας 5.2.2:** Δημογραφικά, κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και έκβαση των προσπαθειών IVF ή ICSI στις ασθενείς που μελετήθηκαν. **Έκφραση της SURVIVIN παρατηρήθηκε παρατηρήθηκε σε ποσοστό 93.1%.**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.3**

| | Median (IQR) |
|---|---|
| Infertility Duration (ys) | 4.00 (3.00, 6.00) |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | 2900.00 (2275.00, 3650.00) |
| Διάρκεια Διέγερσης (ds) | 10.00 (9.00, 11.00) |
| Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH] | 401.00 (300.00, 585.00) |
| Estradiol (pg/ml) - peak | 2022.00 (1561.00, 2569.00) |
| No of follicles aspirated | 9.00 (7.00, 10.00) |
| No of oocyte retrieved | 8.00 (6.00, 10.00) |
| Mature Oocytes Ratio (%) | 71.00 (63.00, 78.00) |
| Immature Oocytes Ratio (%) | 29.00 (22.00, 37.00) |
| Grade 3 Embryos | 4.00 (3.00, 7.00) |
| Grade 2 Embryos | 0.00 (0.00, 2.00) |
| High-Quality Embryos Ratio (%) | 100.00 (66.67, 100.00) |
| Proportion of Cleavage to 4-cells (%) | 100.00 (100.00, 100.00) |
| Αριθμός Εμβρύων που Μεταφέρθηκαν | 3.00 (3.00, 3.00) |
| SURVIVIN Cp | 34.47 (33.09, 35.23) |
| ABL Cp | 34.00 (32.86, 35.79) |
| ΔCp | 0.60 (-1.57, 1.91) |
| SURVIVIN CONCENTRATION | 219.00 (160.60, 630.00) |
| ABL CONCENTRATION | 482.20 (148.00, 661.90) |
| Survivin/ABL | 0.45 (0.22, 2.94) |

**Πίνακας 5.2.2:** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά (data) των ασθενών που μελετήθηκαν. Αποτελέσματα της έκφρασης της SURVIVIN: ο διάμεσος του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA είναι 0.45 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.22 έως 2.94.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.4

| | Infertility Causes | | |
|---|---|---|---|
| | Ανδρικός N (%) | Σαλπιγγικός N (%) | p-value |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 0.449 |
| *Όχι* | 6 (60.0) | 14 (73.7) | |
| *Ναι* | 4 (40.0) | 5 (26.3) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 0.369 |
| *Όχι* | 7 (70.0) | 16 (84.2) | |
| *Ναι* | 3 (30.0) | 3 (15.8) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.148 |
| *Όχι* | 6 (60.0) | 16 (84.2) | |
| *Ναι* | 4 (40.0) | 3 (15.8) | |

| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
|---|---|---|---|
| **Age (ys)** | 36.5 (33.0, 39.0) | 36.0 (33.0, 37.0) | 0.564 |
| **PRL (ng/ml)** | 12.7 (7.2, 17.0) | 14.7 (9.0, 16.6) | 0.920 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 321.5 (300.0, 498.0) | 450.0 (267.0, 758.0) | 0.251 |
| **No of oocyte retrieved** | 8.5 (6.0, 10.0) | 8.0 (6.0, 10.0) | 0.693 |

**Πίνακας 5.2.4:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες αιτιών υπογονιμότητας που αφορούσαν τον ανδρικό ή σαλπιγγικό παράγοντα ως προς το θετικό ή μη τεστ εγκυμοσύνης (p=0.449), την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης (p=0.369), την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης (p=0.148), την ηλικία των γυναικών (p=0.564), τα επίπεδα προλακτίνης προ της θεραπείας (p=0.920), τα επίπεδα της οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.251) και τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.693).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.5**

| | Survivin/ABL | | |
|---|---|---|---|
| **BMI** | **Median** | **IQR** | **p-value** |
| | | | 0.332* |
| *<22.86* | 0.64 | (0.33, 3.04) | |
| *>=22.86* | 0.34 | (0.19, 2.14) | |
| **Age (ys)** | | | 0.490* |
| *<36* | 0.66 | (0.27, 3.04) | |
| *>=36* | 0.36 | (0.21, 2.39) | |
| **FSH (IU/L)** | | | 0.956* |
| *<7* | 0.40 | (0.22, 2.24) | |
| *>=7* | 0.50 | (0.26, 2.74) | |
| **FSH/LH** | | | 0.520* |
| *<1.5* | 0.33 | (0.22, 2.14) | |
| *>=1.5* | 0.64 | (0.19, 2.94) | |
| **AMH (μg/l)** | | | 0.668* |
| *<5.7* | 0.33 | (0.33, 0.49) | |
| *>=5.7* | 2.54 | (0.11, 3.22) | |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | | | 0.771* |
| *<401* | 0.45 | (0.27, 0.66) | |
| *>=401* | 1.26 | (0.22, 3.04) | |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | | | 0.159* |
| *<2022* | 0.34 | (0.19, 0.66) | |
| *>=2022* | 1.30 | (0.33, 3.22) | |

*Wilcoxon rank-sum test

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.6

| | Survivin/ABL | | |
|---|---|---|---|
| | Median | IQR | p-value |
| **Infertility Causes** | | | 0.007* |
| *Ανδρικός* | 0.22 | (0.09, 0.34) | |
| *Σαλπιγγικός* | 1.40 | (0.37, 3.04) | 0.007* |
| **Μέθοδος Θεραπείας** | | | |
| ICSI | 0.22 | (0.09, 0.34) | |
| IVF | 1.40 | (0.37, 3.04) | 0.399* |
| **Infertility Duration (ys)** | | | |
| *<4* | 1.31 | (0.27, 3.22) | |
| *>=4* | 0.41 | (0.15, 2.39) | 0.300* |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | | | |
| *<350* | 0.35 | (0.19, 0.66) | |
| *>=350* | 1.38 | (0.28, 3.17) | 0.771* |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | | | |
| *<401* | 0.45 | (0.27, 0.66) | |
| *>=401* | 1.26 | (0.22, 3.04) | 0.471* |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | | | |
| *<2300* | 0.42 | (0.19, 2.54) | |
| *>=2300* | 0.45 | (0.33, 3.22) | 0.159* |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | | | |
| *<2022* | 0.34 | (0.19, 0.66) | |
| *>=2022* | 1.30 | (0.33, 3.22) | 0.777* |
| **Διάρκεια Διέγερσης (ds)** | | | |
| *<10* | 0.49 | (0.22, 2.94) | |
| *>=10* | 0.36 | (0.23, 2.64) | |
| **Διάρκεια Διέγερσης (ds)** | | | 0.782* |
| *<11* | 0.37 | (0.22, 3.04) | |
| *>=11* | 0.39 | (0.19, 2.24) | |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | | | |
| *<3000* | 2.14 | (0.33, 3.04) | 0.384* |
| *>=3000* | 0.39 | (0.20, 1.45) | |

*Wilcoxon rank-sum test

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.7

| | Survivin/ABL | | |
|---|---|---|---|
| **No of follicles aspirated** | **Median** | **IQR** | **p-value** |
| | | | 0.221* |
| *<7* | 1.45 | (0.49, 2.54) | |
| *>=7* | 0.35 | (0.19, 2.94) | |
| **No of follicles aspirated** | | | 0.209* |
| *<10* | 0.66 | (0.34, 2.94) | |
| *>=10* | 0.33 | (0.22, 0.45) | |
| **No of oocyte retrieved** | | | 0.306* |
| *<6* | 1.45 | (0.57, 2.39) | |
| *>=6* | 0.35 | (0.19, 3.04) | |
| **No of oocyte retrieved** | | | 0.068* |
| *<7* | 2.24 | (0.49, 3.22) | |
| *>=7* | 0.34 | (0.19, 2.54) | |
| **No of oocyte retrieved** | | | 0.199* |
| *<8* | 0.66 | (0.34, 3.04) | |
| *>=8* | 0.34 | (0.17, 2.54) | |
| **No of oocyte retrieved** | | | 0.308* |
| *<9* | 0.64 | (0.34, 2.94) | |
| *>=9* | 0.33 | (0.22, 2.14) | |
| **Mature Oocytes** | | | 0.217* |
| *<5* | 0.66 | (0.49, 2.54) | |
| *>=5* | 0.34 | (0.19, 2.94) | |
| **Mature Oocytes** | | | 0.439* |
| *<7* | 0.55 | (0.33, 2.74) | |
| *>=7* | 0.27 | (0.09, 3.30) | |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | | | 0.309** |
| *<60* | 0.48 | (0.26, 0.64) | |
| *60-74.9* | 2.24 | (0.33, 3.22) | |
| *>=75* | 0.34 | (0.17, 1.51) | |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | | | 0.699* |
| *<61* | 0.62 | (0.33, 2.24) | |
| *>=61* | 0.36 | (0.21, 2.99) | |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | | | 0.283* |
| *<75* | 0.66 | (0.33, 3.04) | |
| *>=75* | 0.34 | (0.17, 1.51) | |
| **Embryos grade** | | | 0.153** |
| *3* | 0.55 | (0.33, 3.13) | |
| *3 + 2* | 0.19 | (0.01, 2.54) | |
| **High-Quality Embryos Ratio (%)** | | | 0.180* |
| *<100* | 0.27 | (0.11, 0.66) | |
| *100* | 0.49 | (0.33, 3.04) | |

*Wilcoxon rank-sum test

**Kruskal-Wallis test

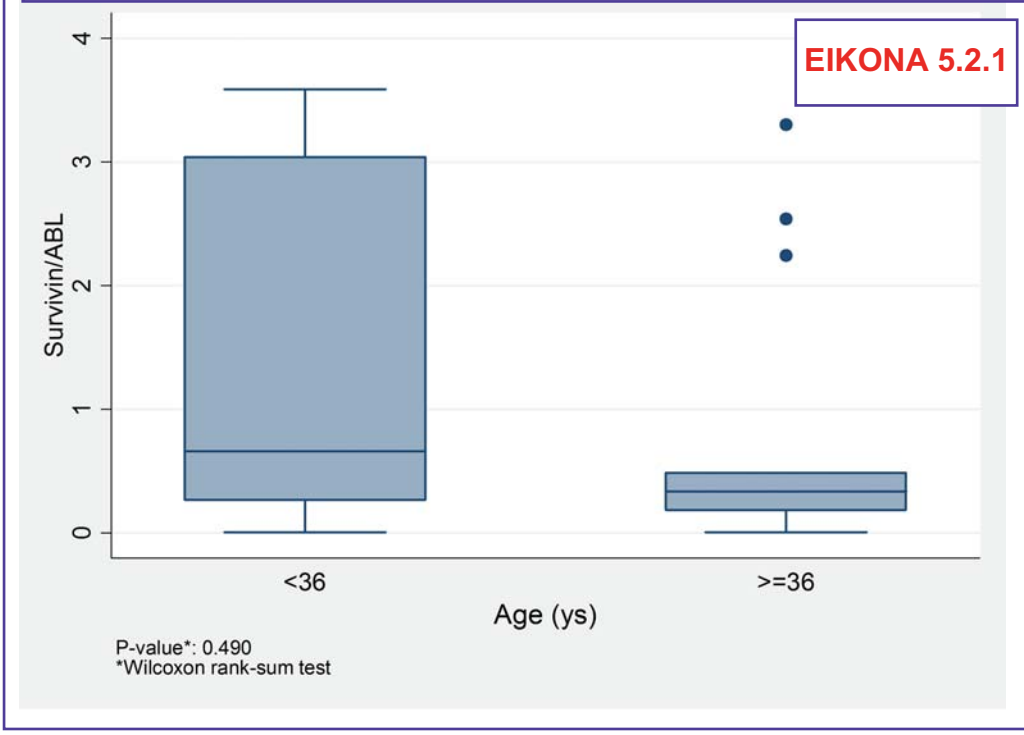
## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.8

| | Survivin/ABL | | |
|---|---|---|---|
| | Median | IQR | p-value |
| **Previous IVF/ICSI cycles** | | | 0.580* |
| *Όχι* | 0.43 | (0.19, 2.74) | |
| *Ναι* | 0.45 | (0.33, 3.04) | |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 0.699* |
| *Όχι* | 0.47 | (0.21, 2.99) | |
| *Ναι* | 0.34 | (0.33, 2.14) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 0.246* |
| *Όχι* | 0.49 | (0.22, 3.04) | |
| *Ναι* | 0.33 | (0.17, 1.24) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.755* |
| *Όχι* | 0.47 | (0.22, 2.94) | |
| *Ναι* | 0.34 | (0.33, 2.14) | |

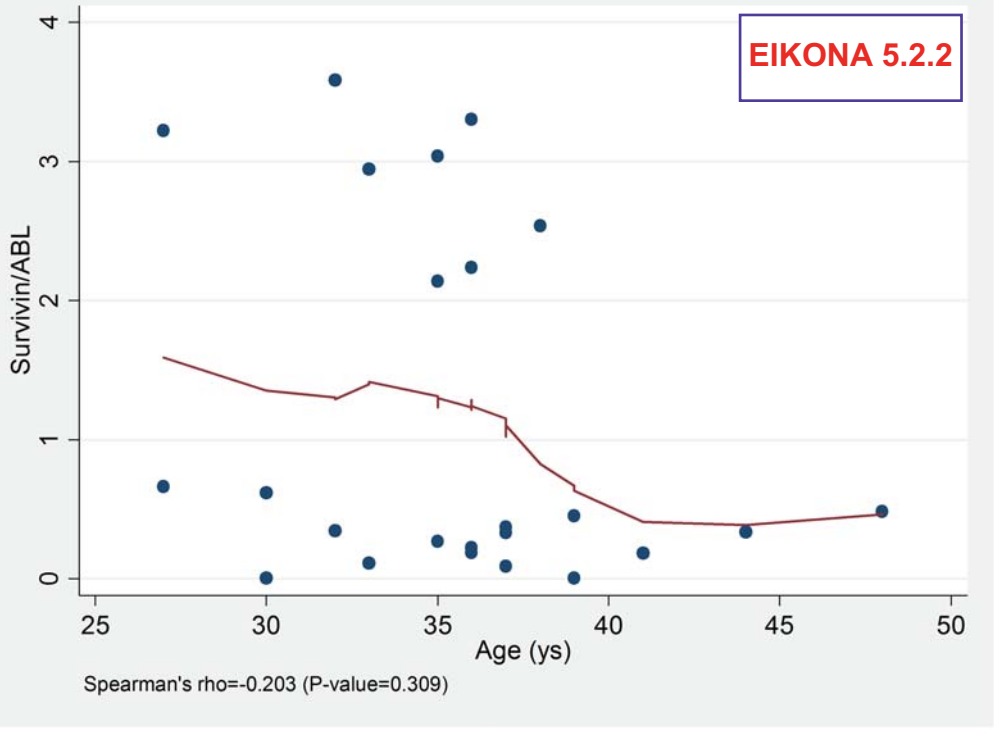
*Wilcoxon rank-sum test

**Πίνακας 5.2.5 έως 5.2.8:** Παρουσίαση συνοπτικά των αποτελεσμάτων της στατιστικής μελέτης έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI σε σχέση με κλινικές παραμέτρους.

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία των γυναικών.**



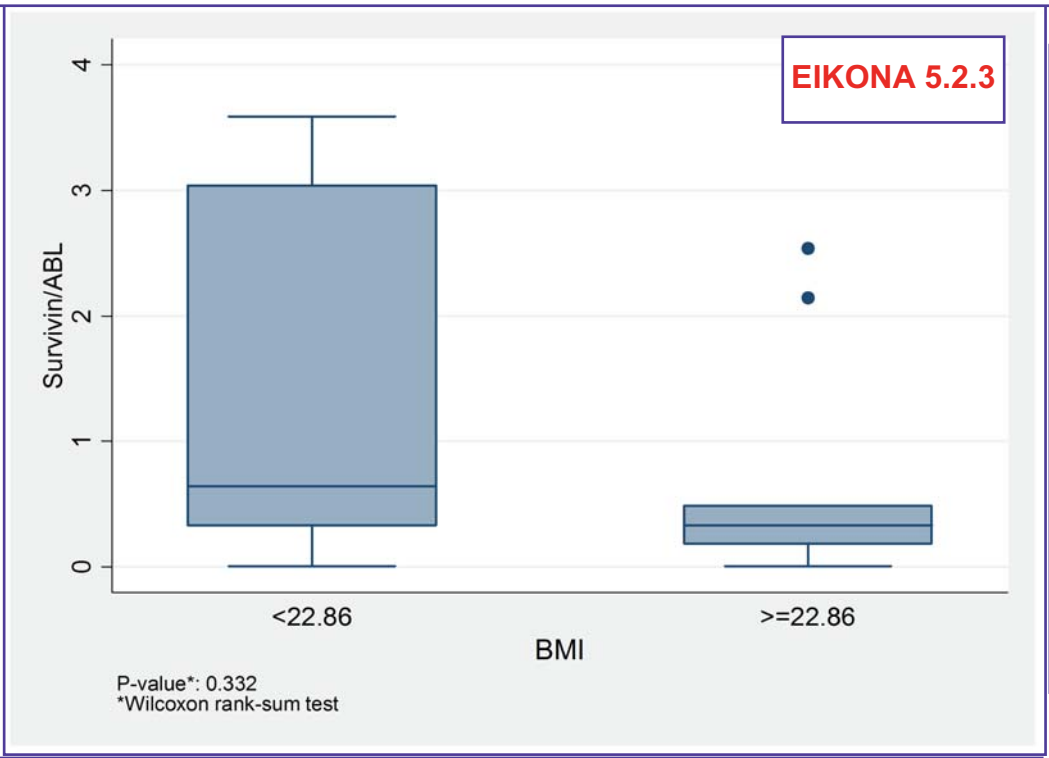

**Εικόνα 5.2.1:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο ηλικιακές ομάδες των γυναικών < 36 ετών και >= 36 ετών και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.490, Wilcoxon rank-sum test).



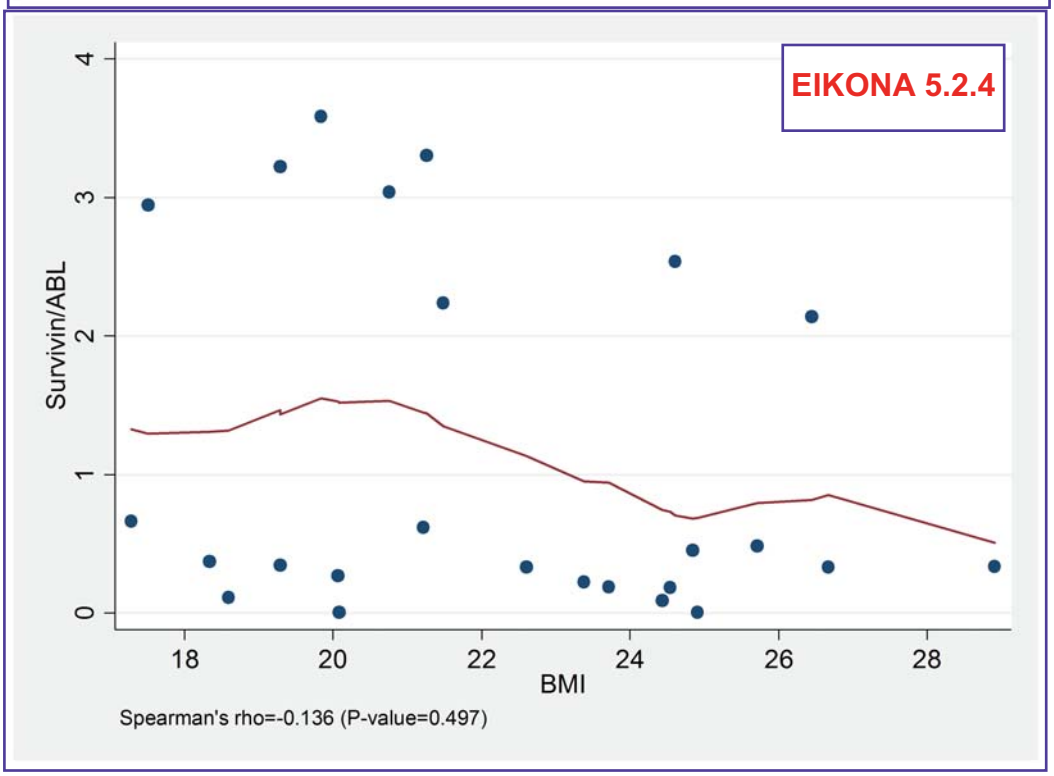

**Εικόνα 5.2.2: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με την ηλικία των γυναικών.**

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ηλικίες των γυναικών και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στην ηλικία των γυναικών (Spearman' rho = -0.203, p=0.309). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.203) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με το BMI των γυναικών.**



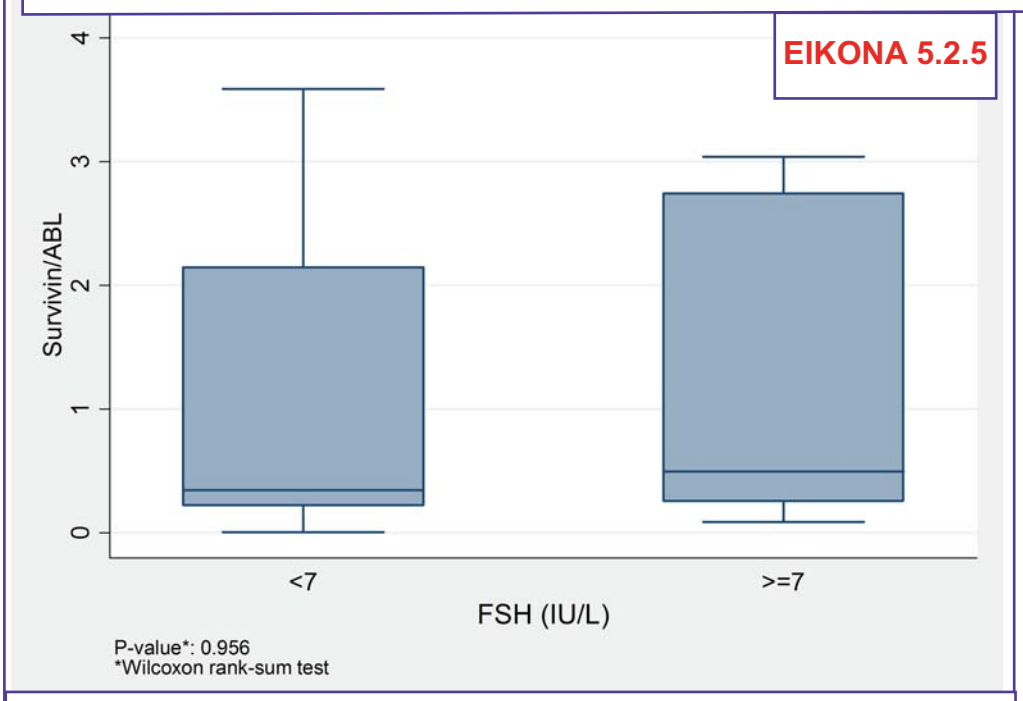

**Εικόνα 5.2.3:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με BMI < 22.86 και BMI >= 22.86 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.332, Wilcoxon rank-sum test).



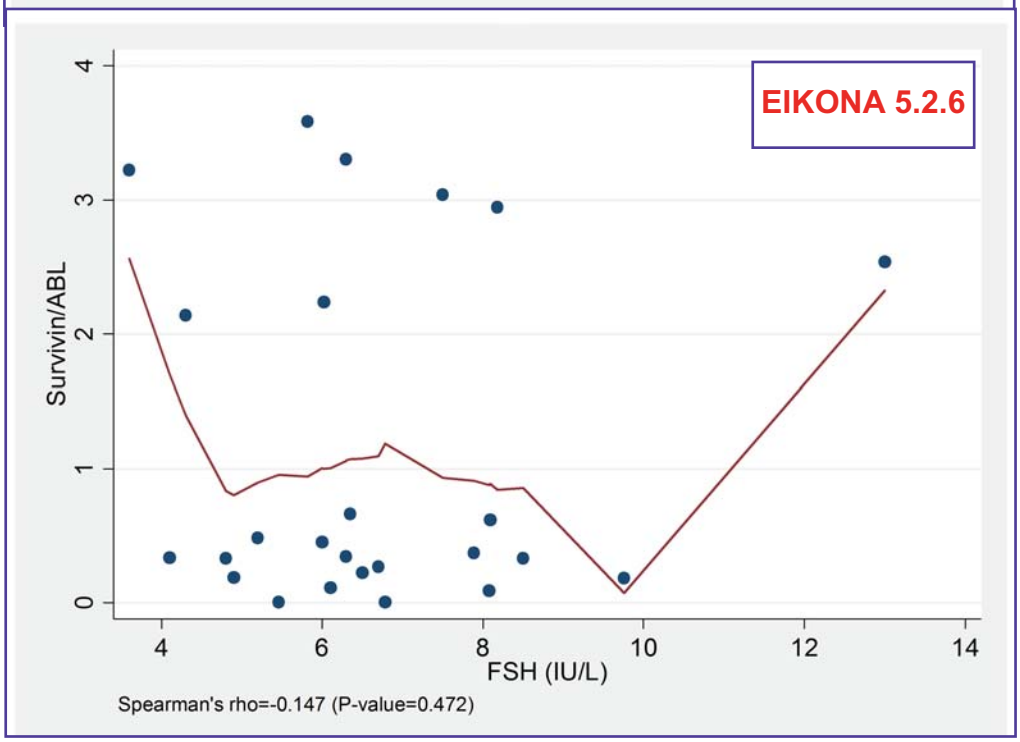

**Εικόνα 5.2.4: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με το BMI των γυναικών.**

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές BMI και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στο BMI των γυναικών (Spearman' rho =-0.136, p=0.497). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.136) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**



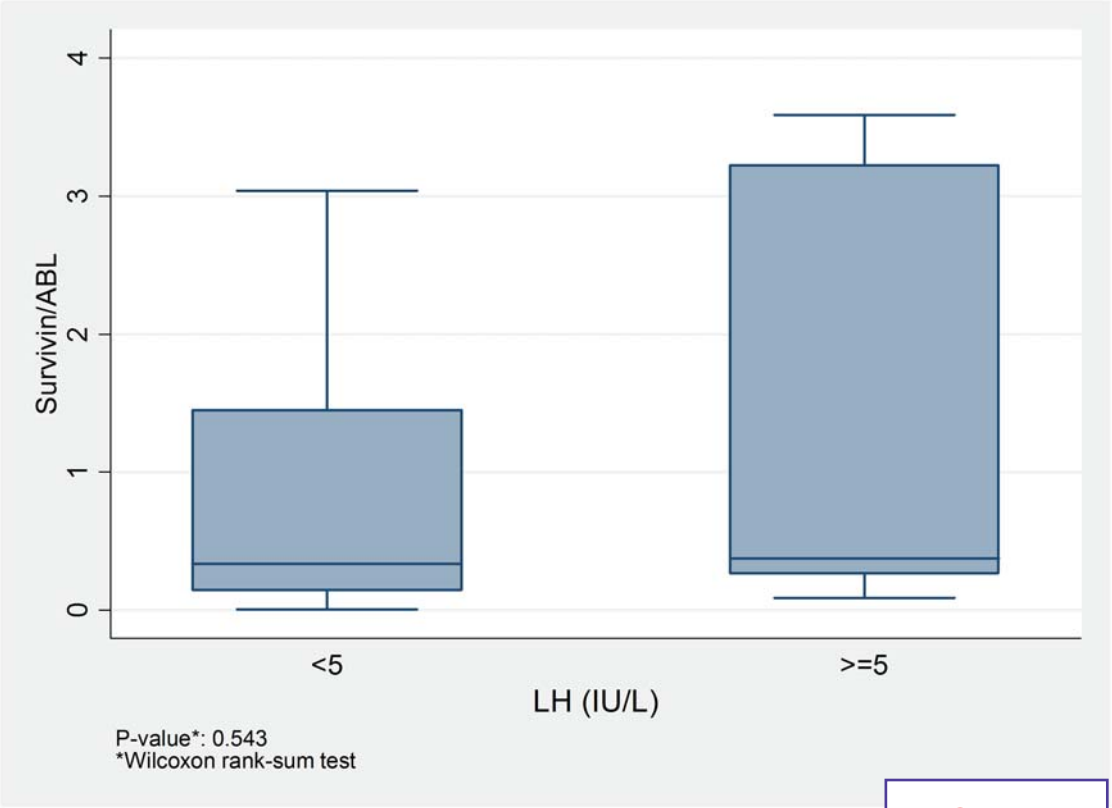

**Εικόνα 5.2.5:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με FSH < 7 και FSH >= 22.86 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.956, Wilcoxon rank-sum test).




**Εικόνα 5.2.6: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με το BMI των γυναικών.**

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές FSH και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = -0.147, p=0.472). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.147) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

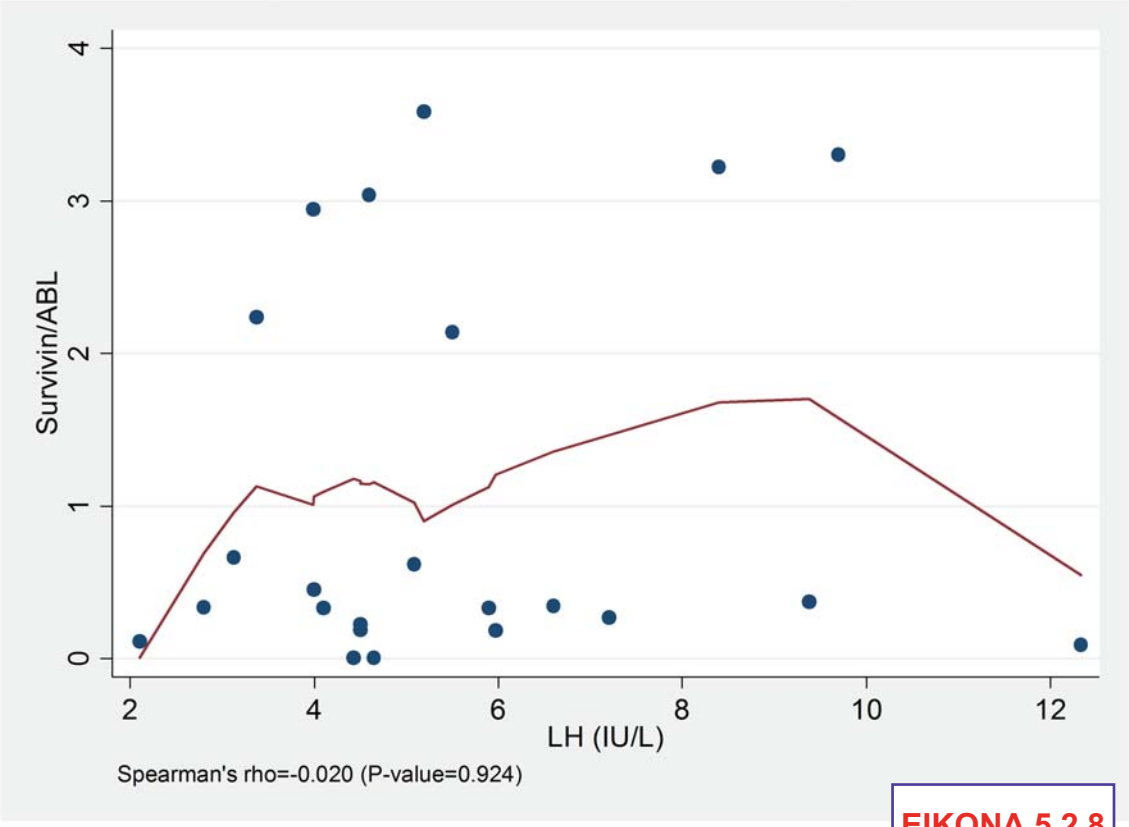
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.7**

**Εικόνα 5.2.7.:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με LH < 5 και LH >= 5 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.543, Wilcoxon rank-sum test).

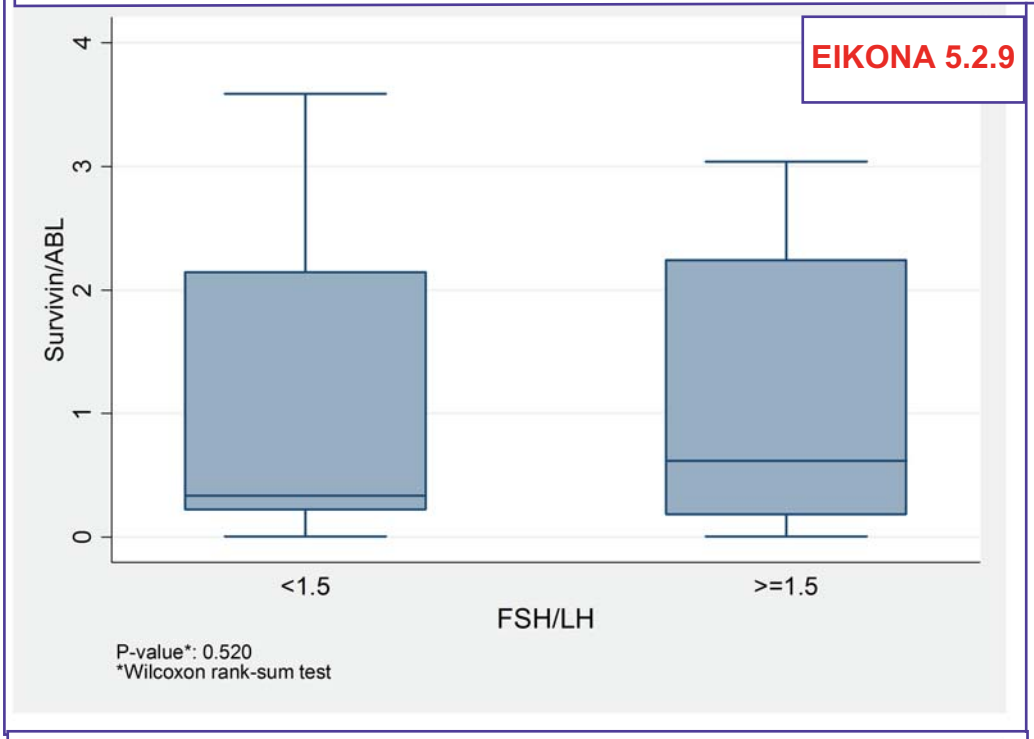
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**



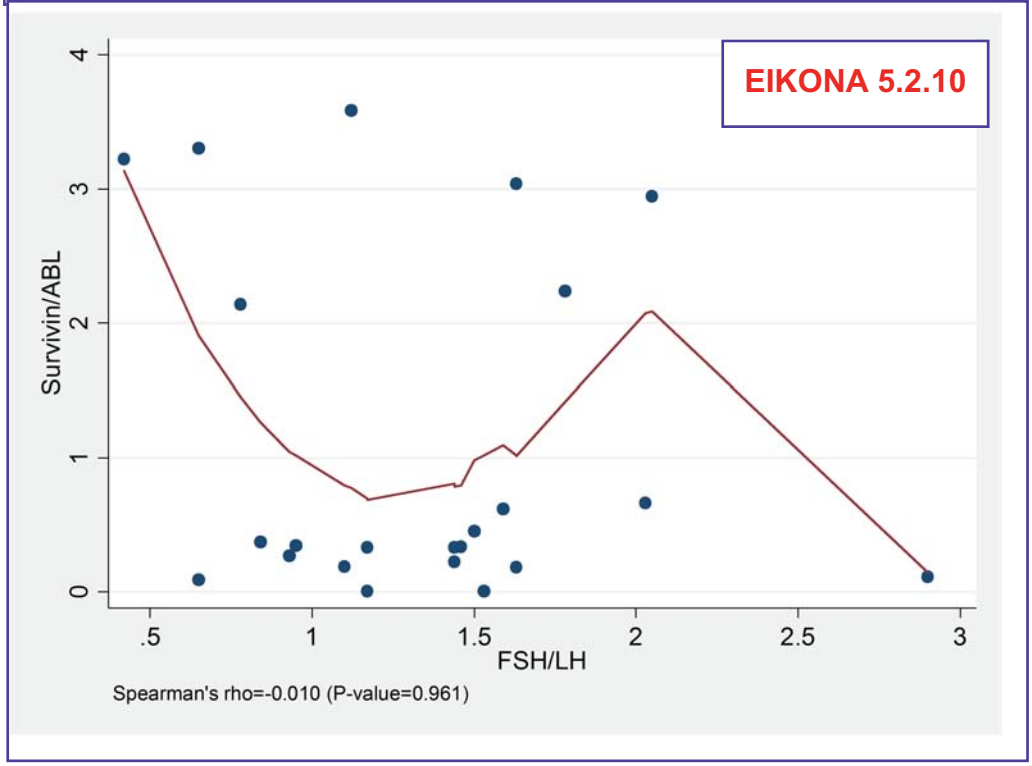

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.8**

**Εικόνα 5.2.8.:** Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές BMI και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = -0.020, p=0.924).
**Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.020) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**



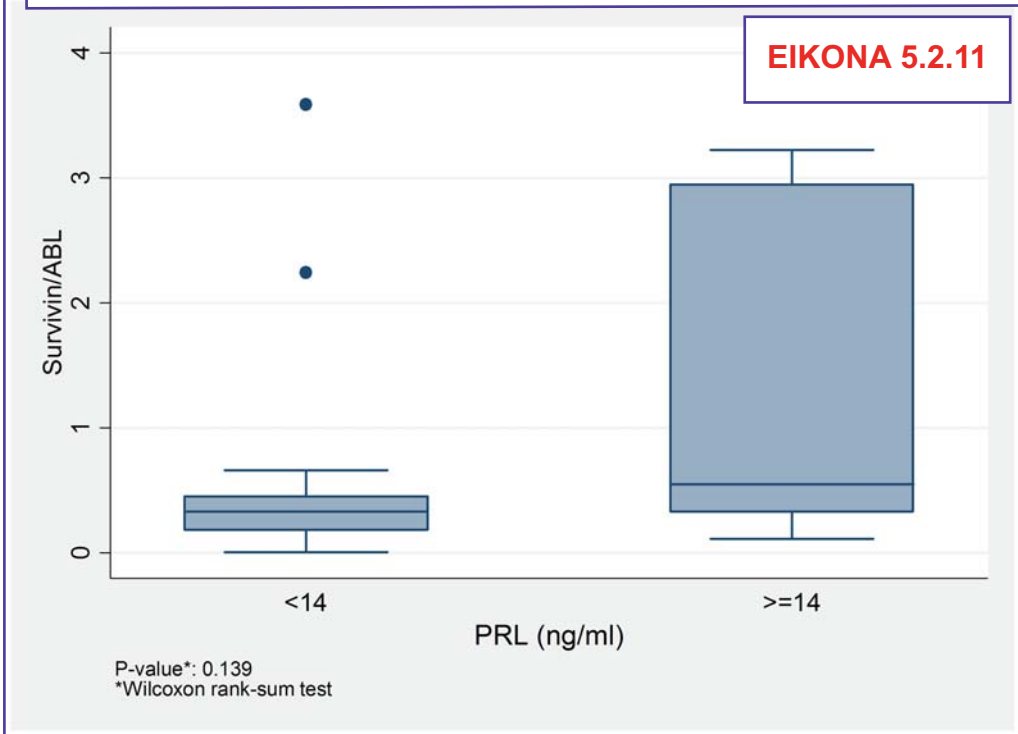

**Εικόνα 5.2.9.:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με FSH/LH < 1.5 και FSH/LH >= 1.5 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.520, Wilcoxon rank-sum test).



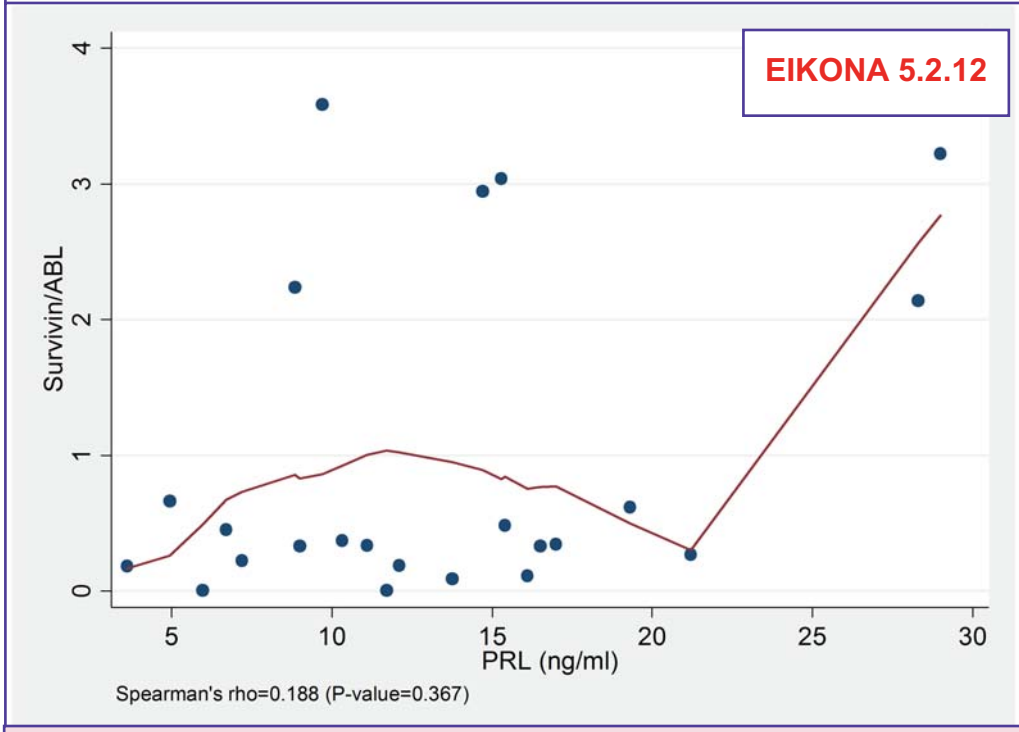

**Εικόνα 5.2.10.: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με το BMI των γυναικών.**

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές του λόγου FSH/LH και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον λόγο FSH/LH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = -0.010, p=0.961).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της PRL στον ορό του αίματος μέσα σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους.**



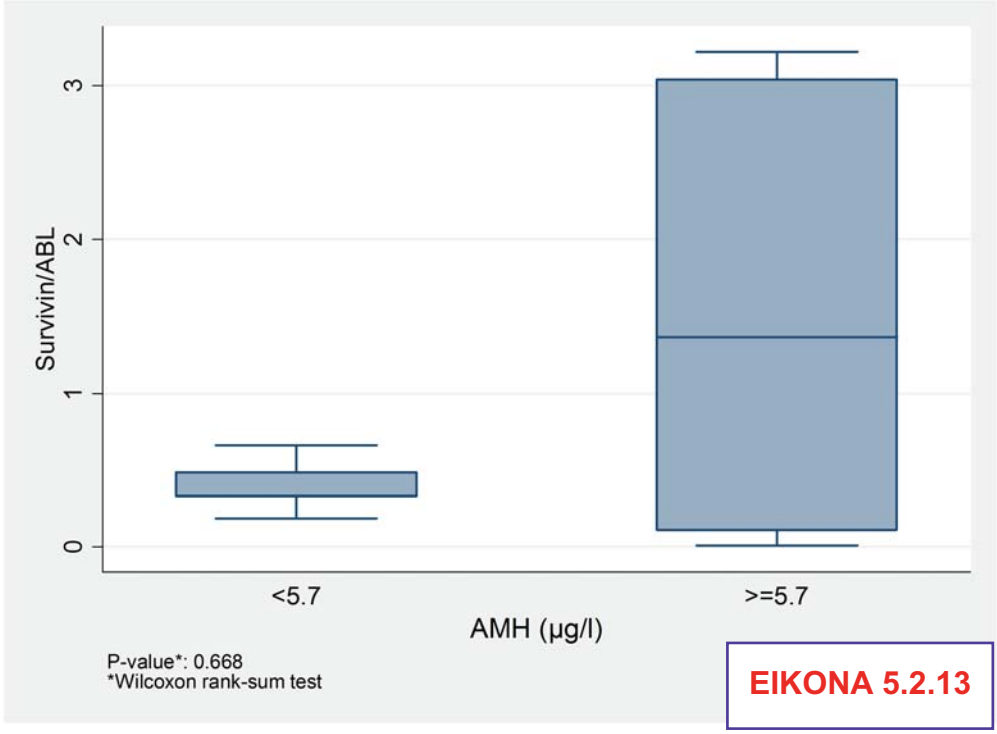

**Εικόνα 5.2.11.:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με PRL < 14 και PRL >= 14 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.139, Wilcoxon rank-sum test).




**Εικόνα 5.2.12.: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με τα επίπεδα PRL των γυναικών.**

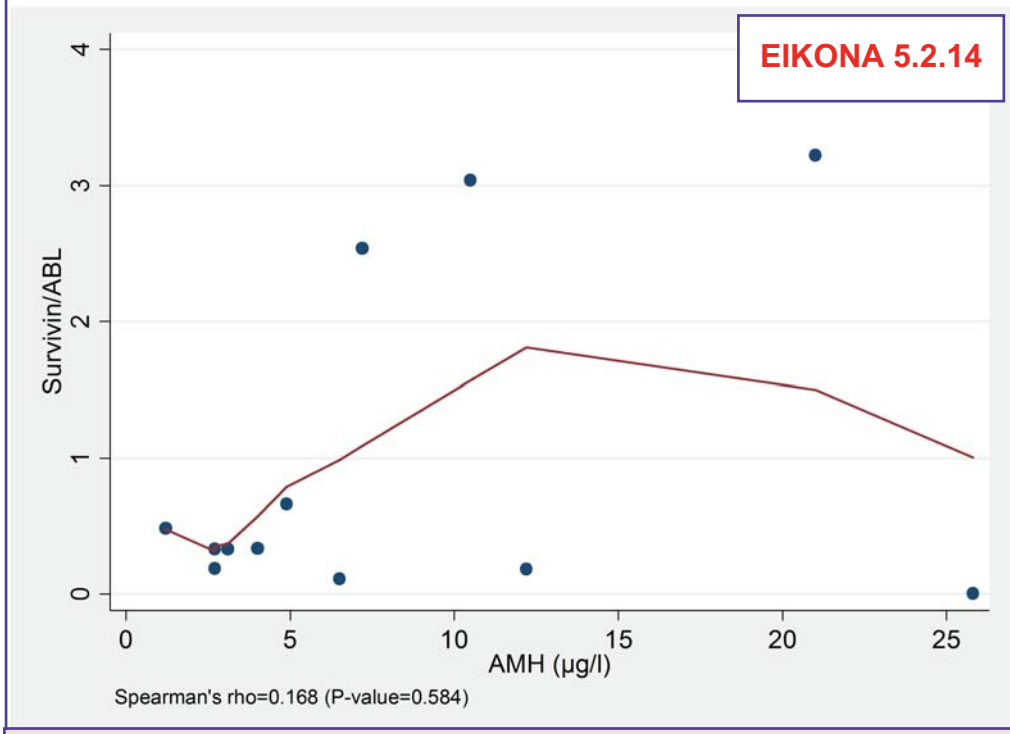
Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές της PRL και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις τιμές PRL στον ορό του αίματος των γυναικών σε έναν από τους 6 προηγούμενους γεννητικούς κύκλους (Spearman' rho = 0.010, p=0.961).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**




ΕΙΚΟΝΑ 5.2.13

**Εικόνα 5.2.13.:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με AMH < 5.7 και AMH >= 5.7 και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.668, Wilcoxon rank-sum test).

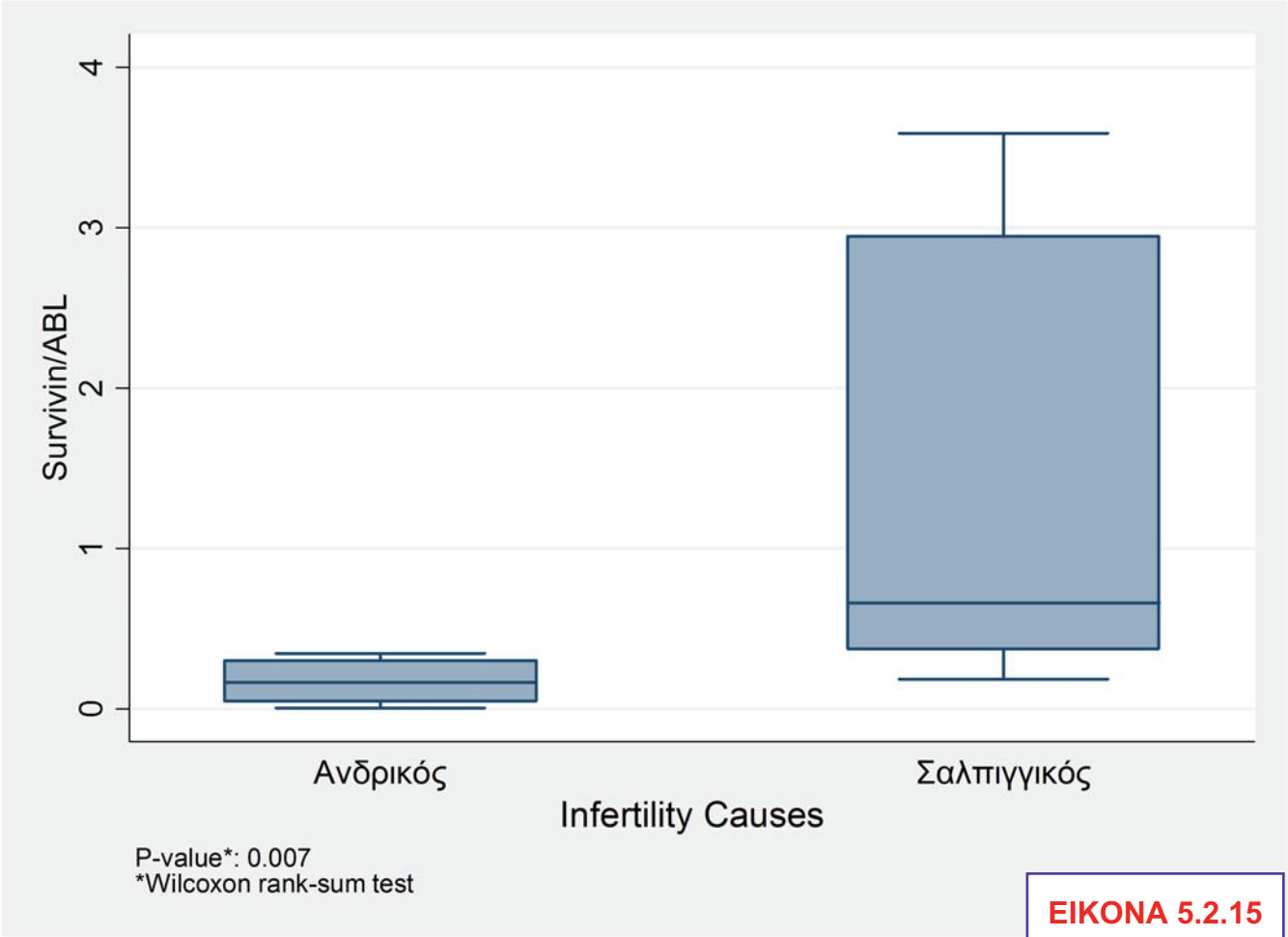



ΕΙΚΟΝΑ 5.2.14

**Εικόνα 5.2.14.: Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος των γυναικών.**

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές της AMH και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = 0.168, p=0.584).

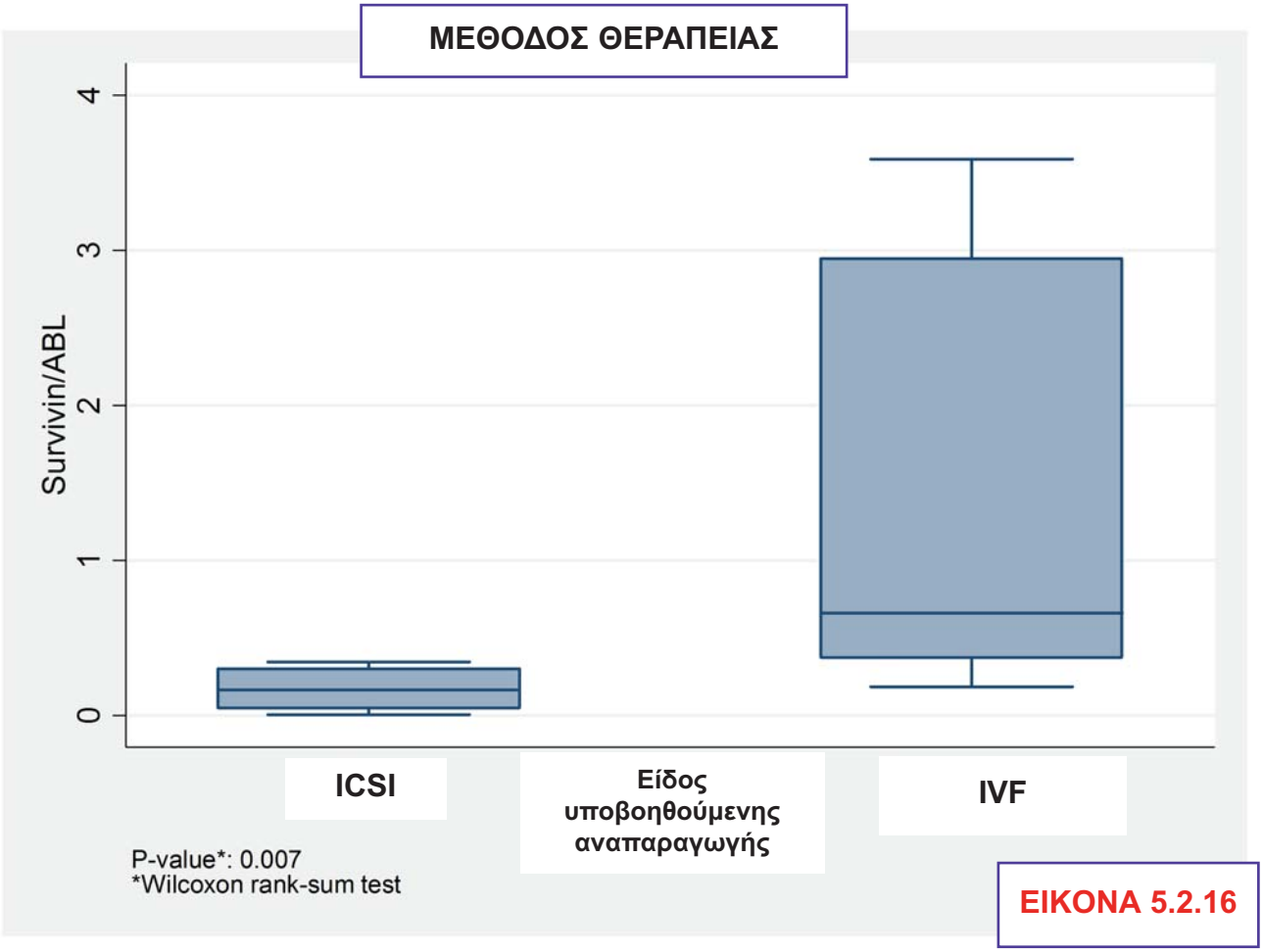
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την αιτία υπογονιμότητας.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.15**

**Εικόνα 5.2.15: Συσχέτιση ανάμεσα στις αιτίες υπογονιμότητας και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων.** Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με αντρικό παράγοντα υπογονιμότητας σε σχέση με τον σαλπιγγικό παράγοντα και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.007, Wilcoxon rank-sum test). Παρατηρείται ότι **στις περιπτώσεις με ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN είναι αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής της σε περιπτώσεις με σαλπιγγικό παράγοντα**.

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το είδος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ICSI σε σχέση με IVF).**

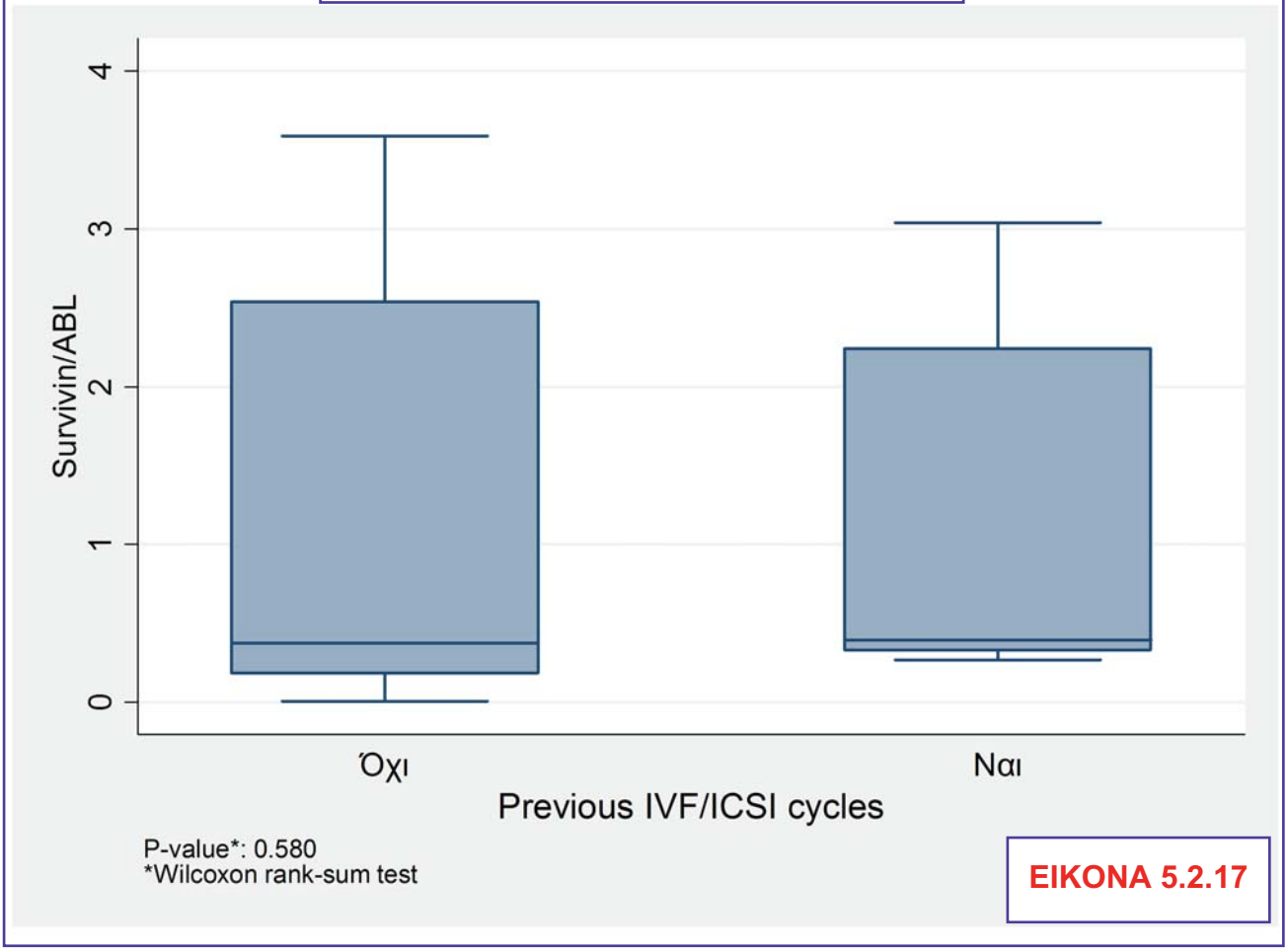



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.16**

**Εικόνα 5.2.16: Συσχέτιση ανάμεσα στην μέθοδο θεραπείας (IVF ή ICSI) και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων.** Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών που υποβλήθησαν σε μικρογονιμοποίηση (ICSI) σε σχέση τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.007, Wilcoxon rank-sum test). Παρατηρείται ότι **στις περιπτώσεις με ICSI τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN είναι αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής της στις περιπτώσεις με IVF**.

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε προηγούμενες προσπάθειες ICSI ή IVF και εκείνες που δεν υποβλήθηκαν.**

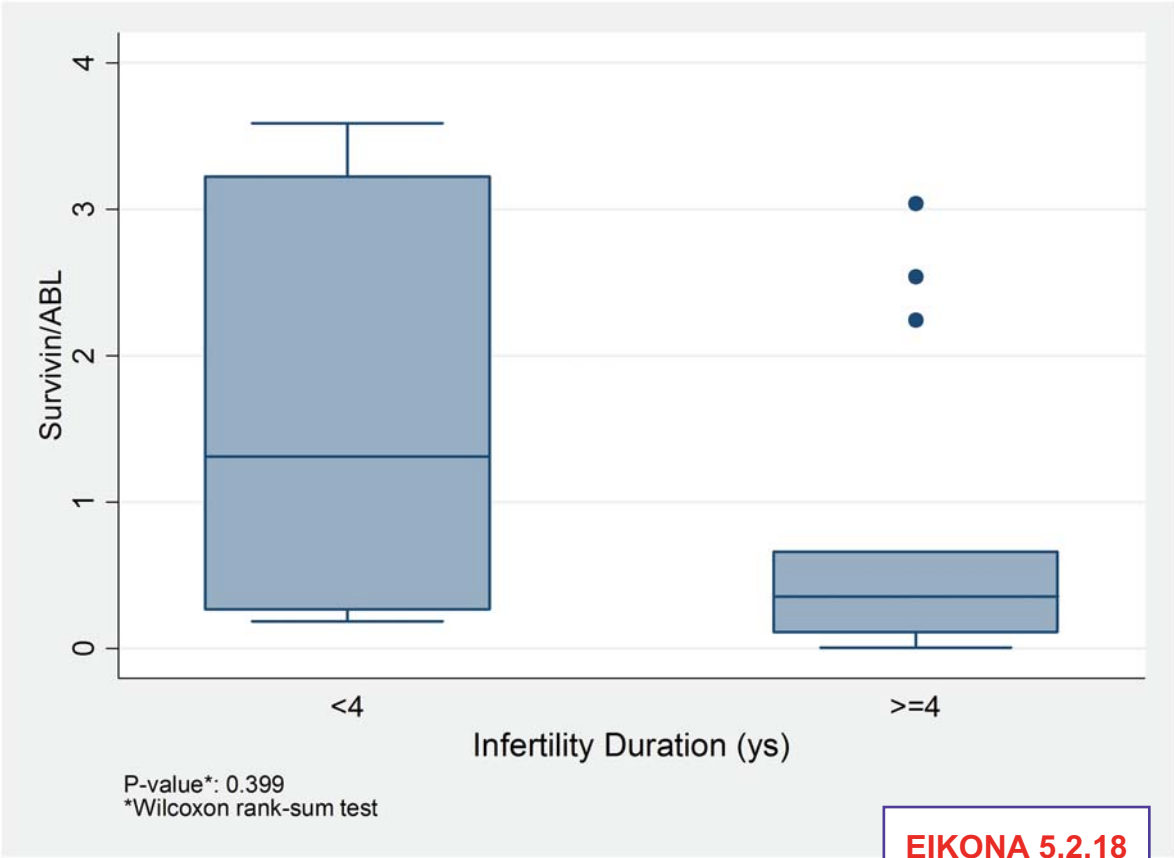
**ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ IVF Ή ICSI ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.17**

**Εικόνα 5.2.17:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με προηγούμενες προσπάθειες για εξωσωματική (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI) σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς προηγούμενες τέτοιες προσπάθειες και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.580, Wilcoxon rank-sum test).

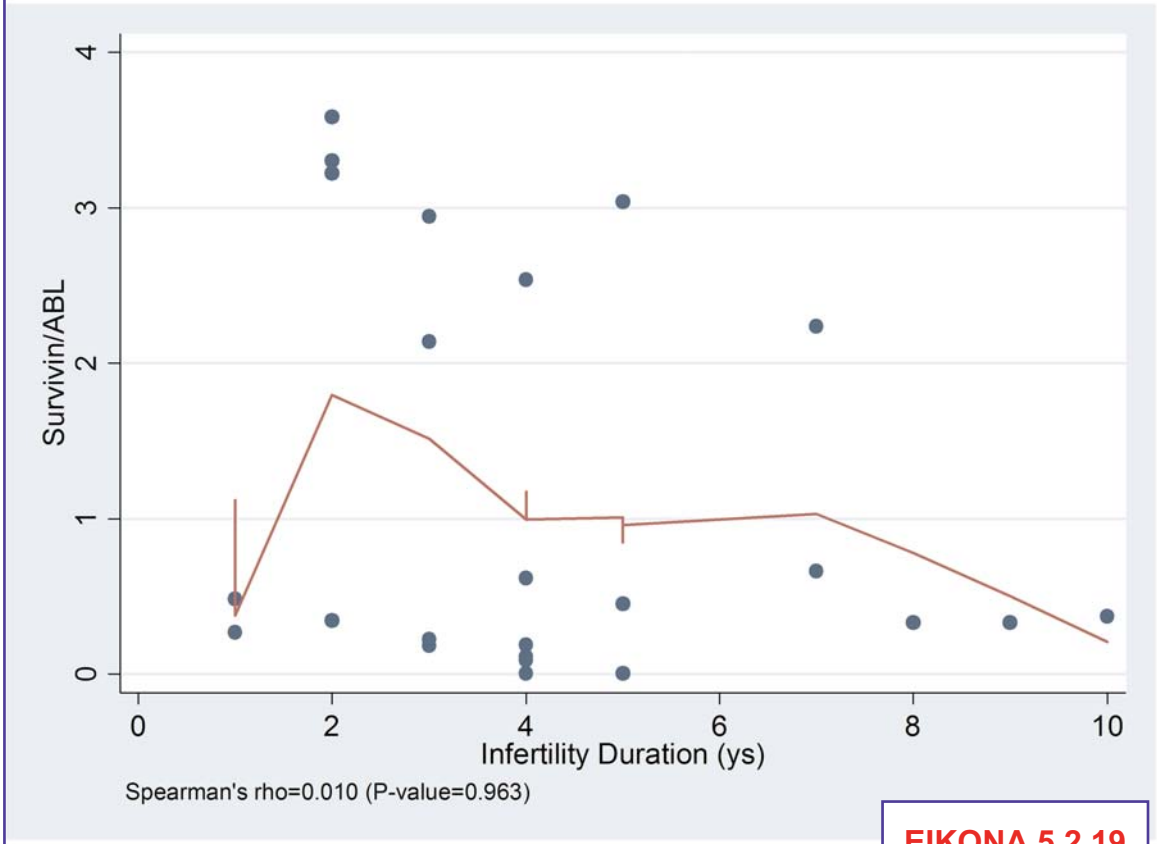
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την διάρκεια υπογονιμότητας.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.18**

**Εικόνα 5.2.18:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με διάρκεια υπογονιμότητας 4 < έτη σε σχέση με διάρκεια υπογονιμότητας >= 4 έτη και τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p = 0.399, Wilcoxon rank-sum test).

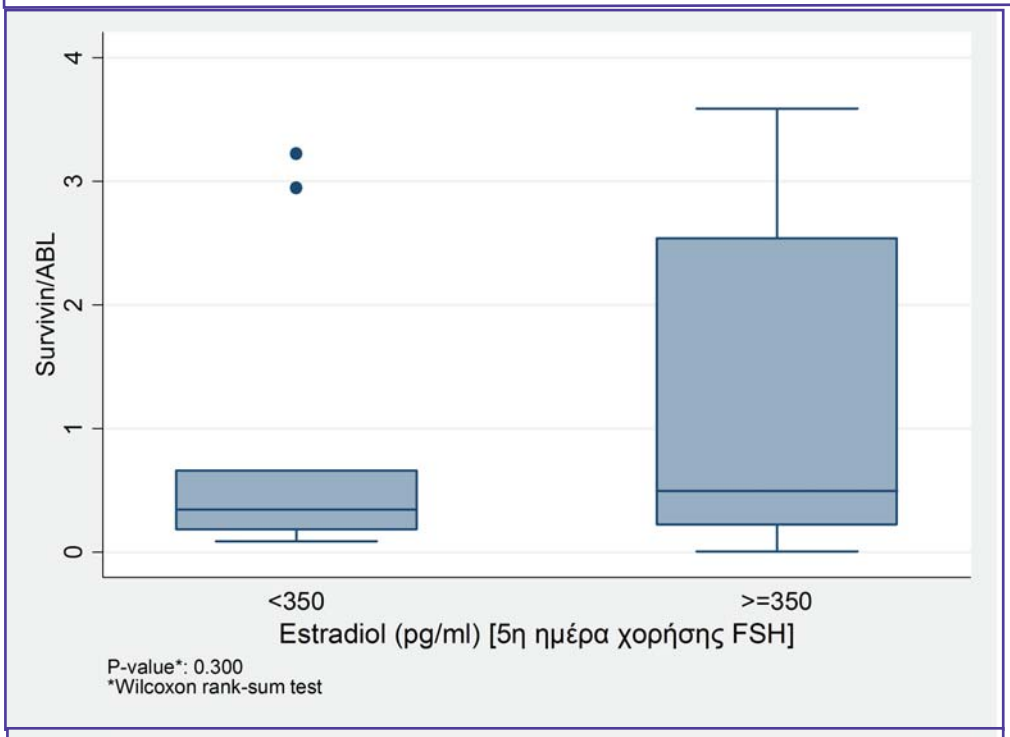
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με την διάρκεια υπογονιμότητας σε έτη.**



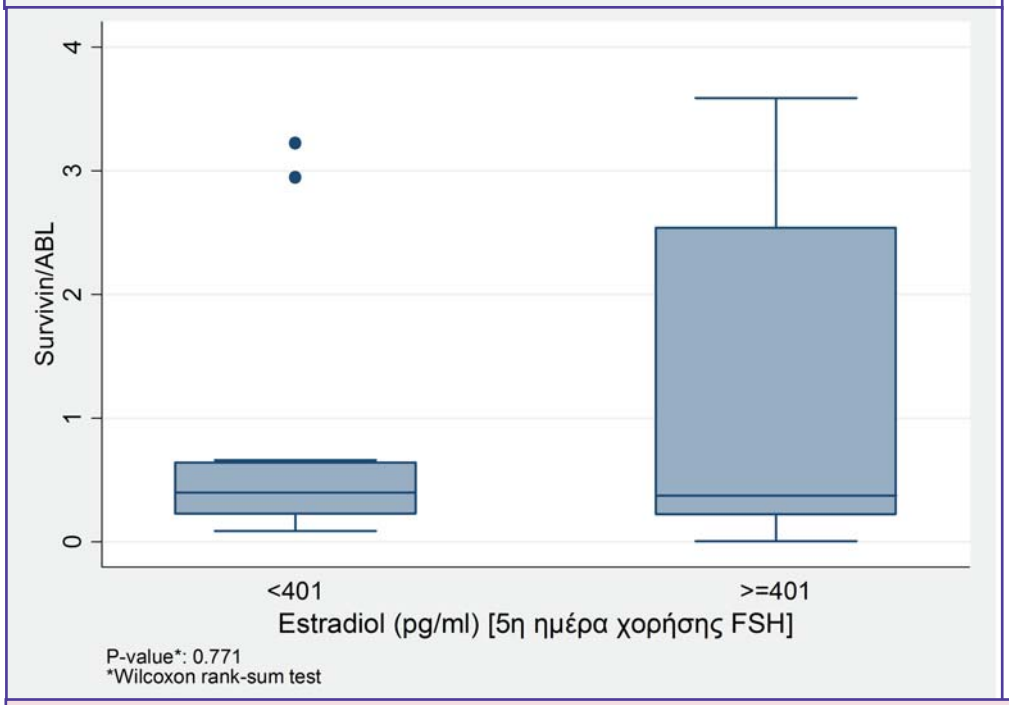

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.19**

**Εικόνα 5.2.19:** Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα έτη υπογονιμότητας και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου SURVIVIN mRNA / ABL mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και την διάρκεια υπογονιμότητας σε έτη (Spearman' rho = 0.010, p=0.963). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.01) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας.**



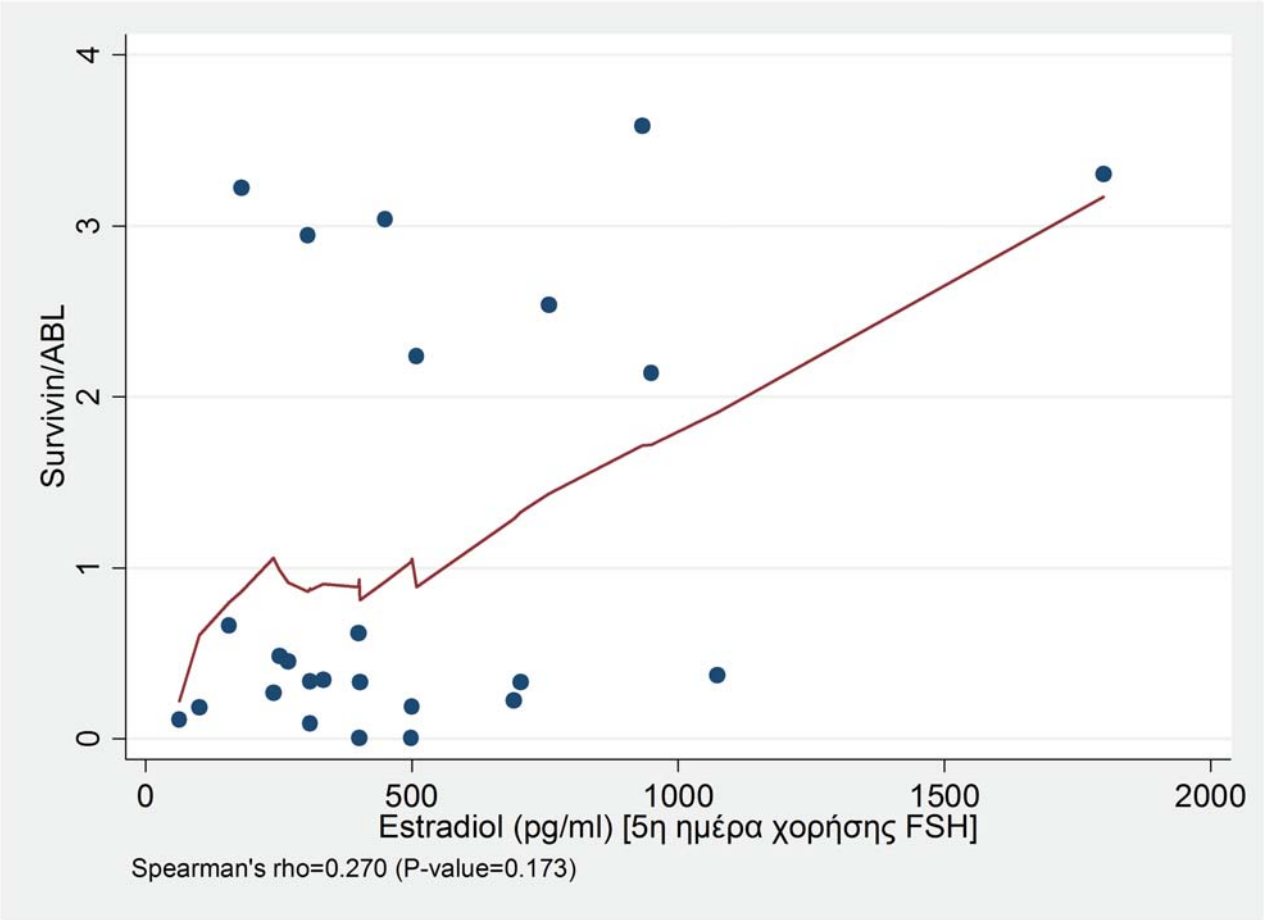

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.20**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.21**

**Εικόνες 5.2.20. & 5.2.21.:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.300 & p= 0.771 αντίστοιχα των παραπάνω εικόνων, Wilcoxon rank-sum test).

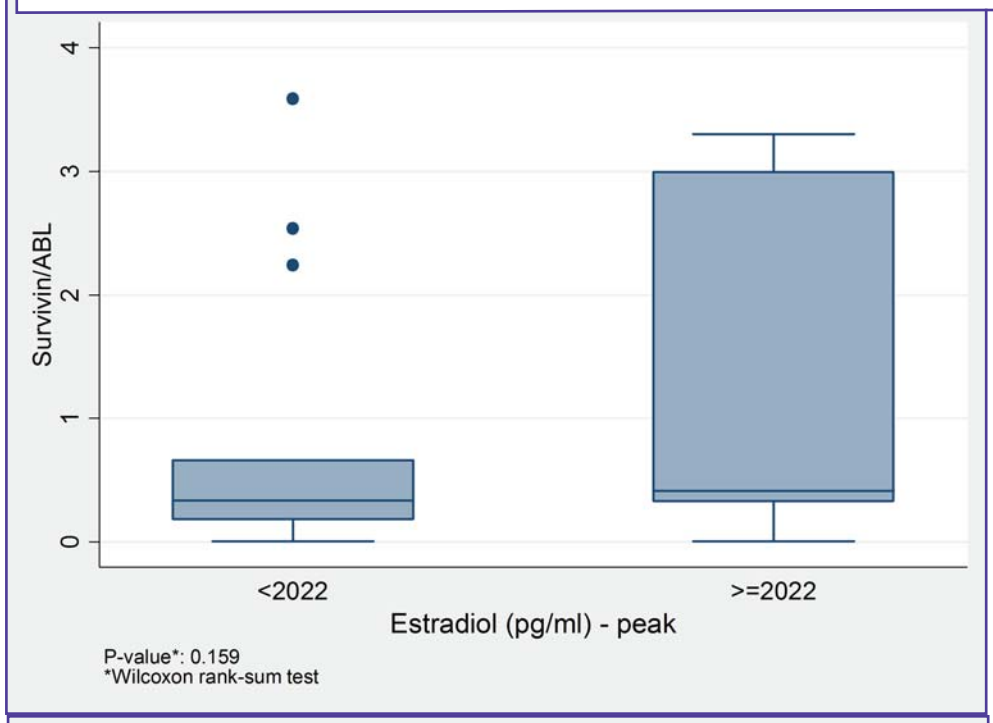
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH.**



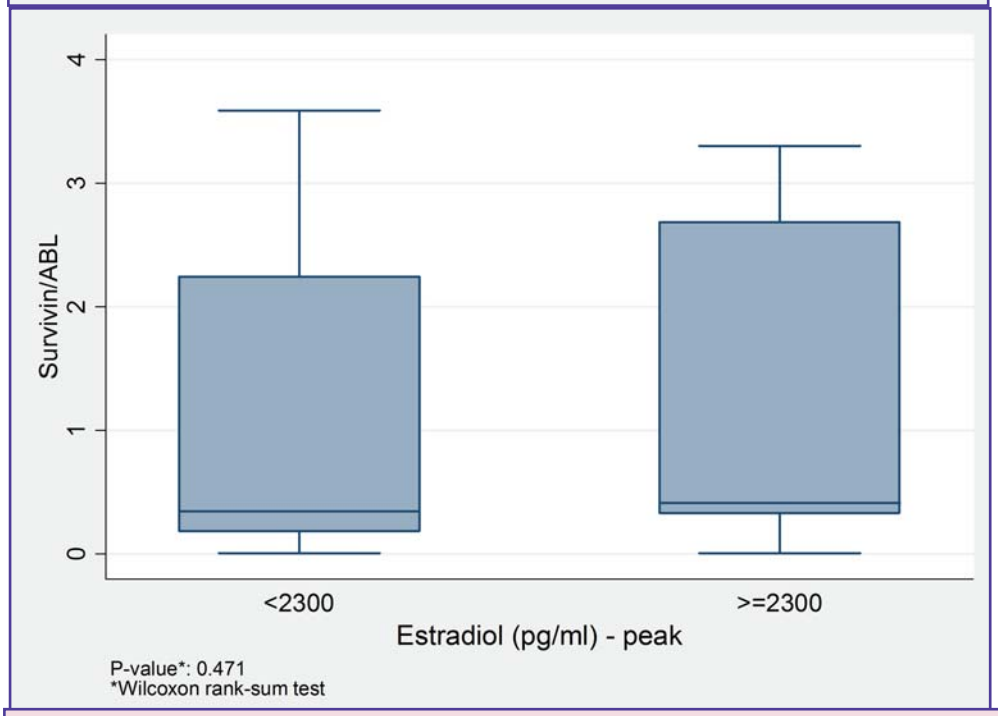

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.22**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.21:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τα επίπεδα της οιστραδιόλης ($E_2$) την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (Spearman' rho = 0.270, p=0.173). Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.270) είναι πολύ μικρότερος από το 1.

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG.**



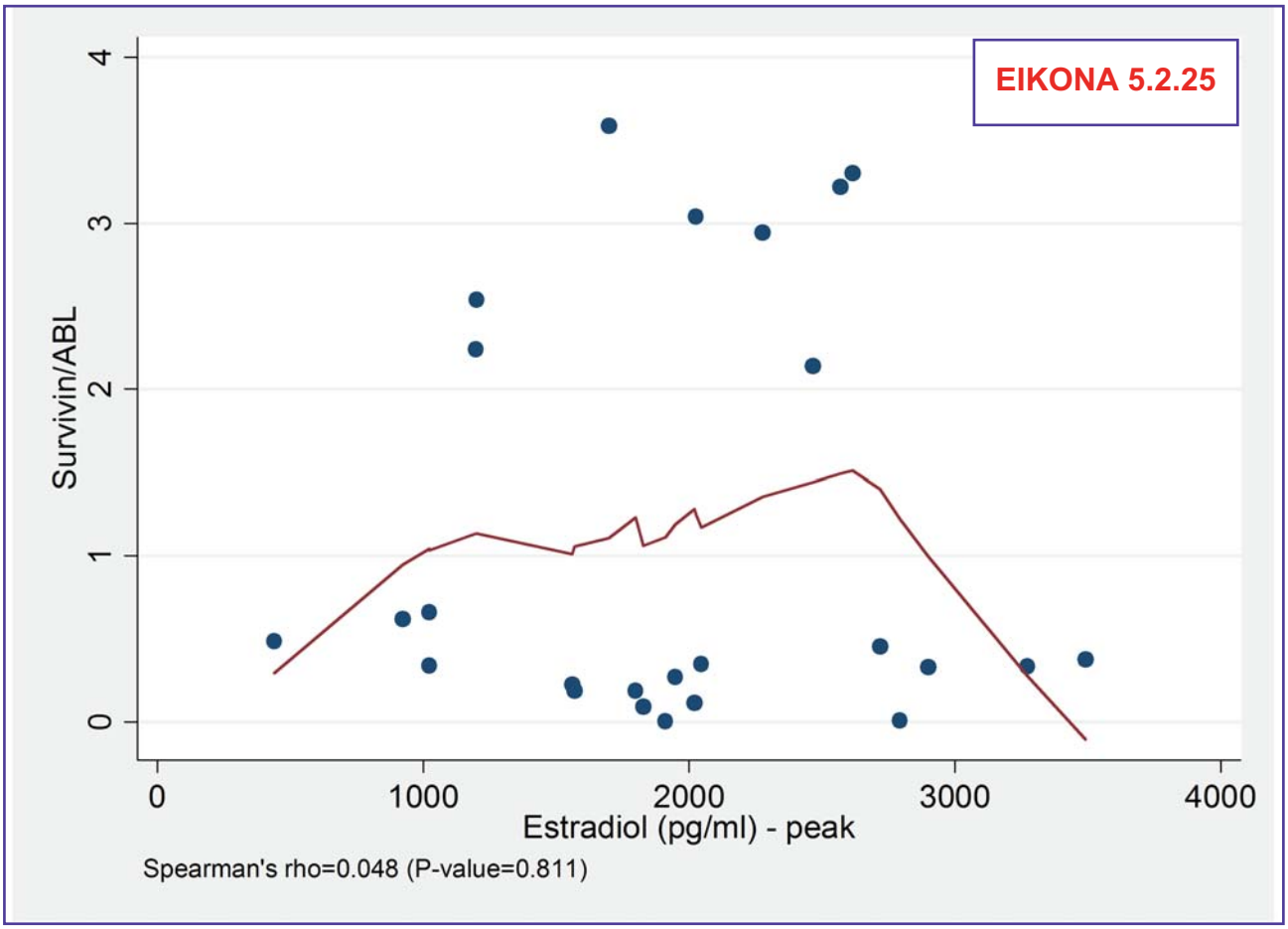

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.23**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.24**

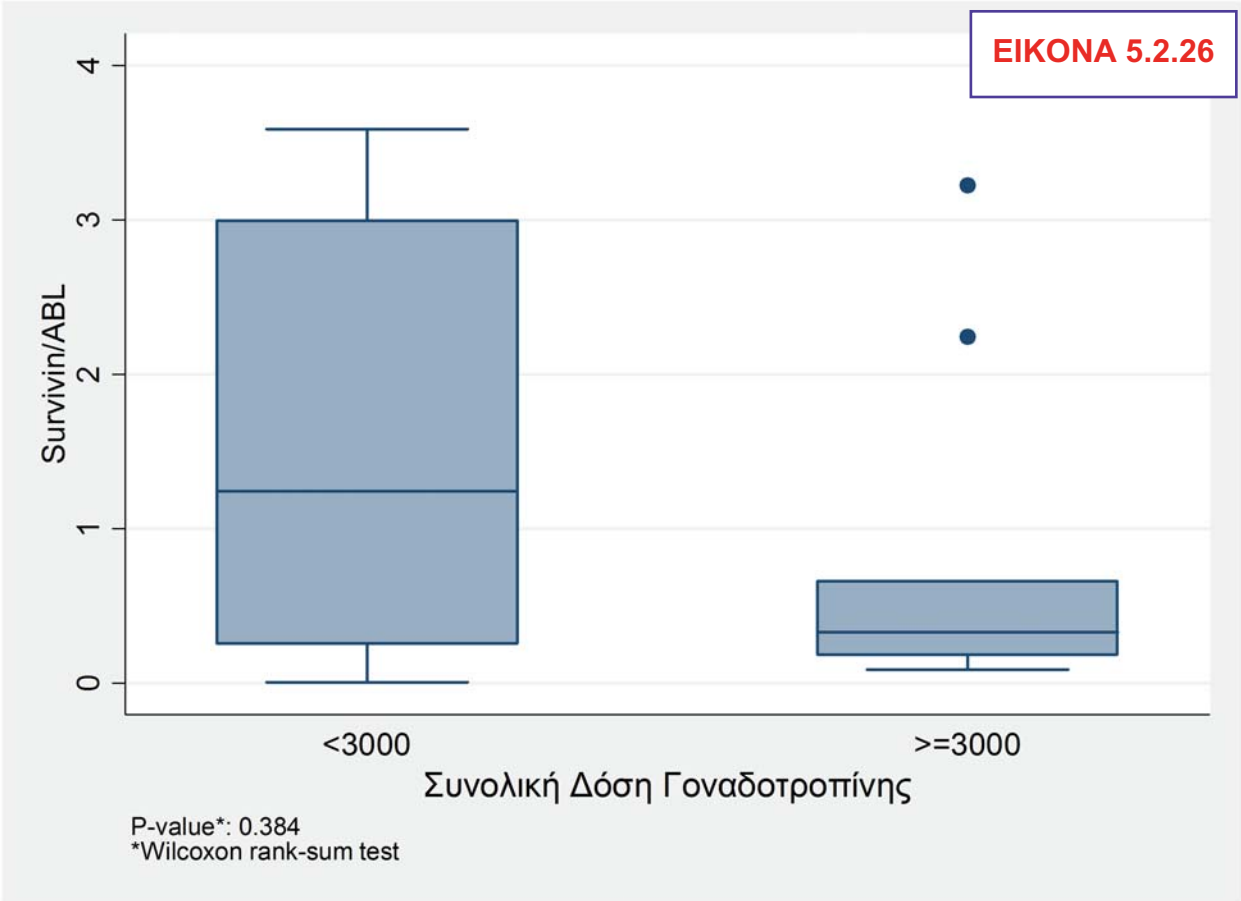
**Εικόνες 5.2.23. & 5.2.24:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG ($p=0.159$ & $p=0.471$ αντίστοιχα, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG.**



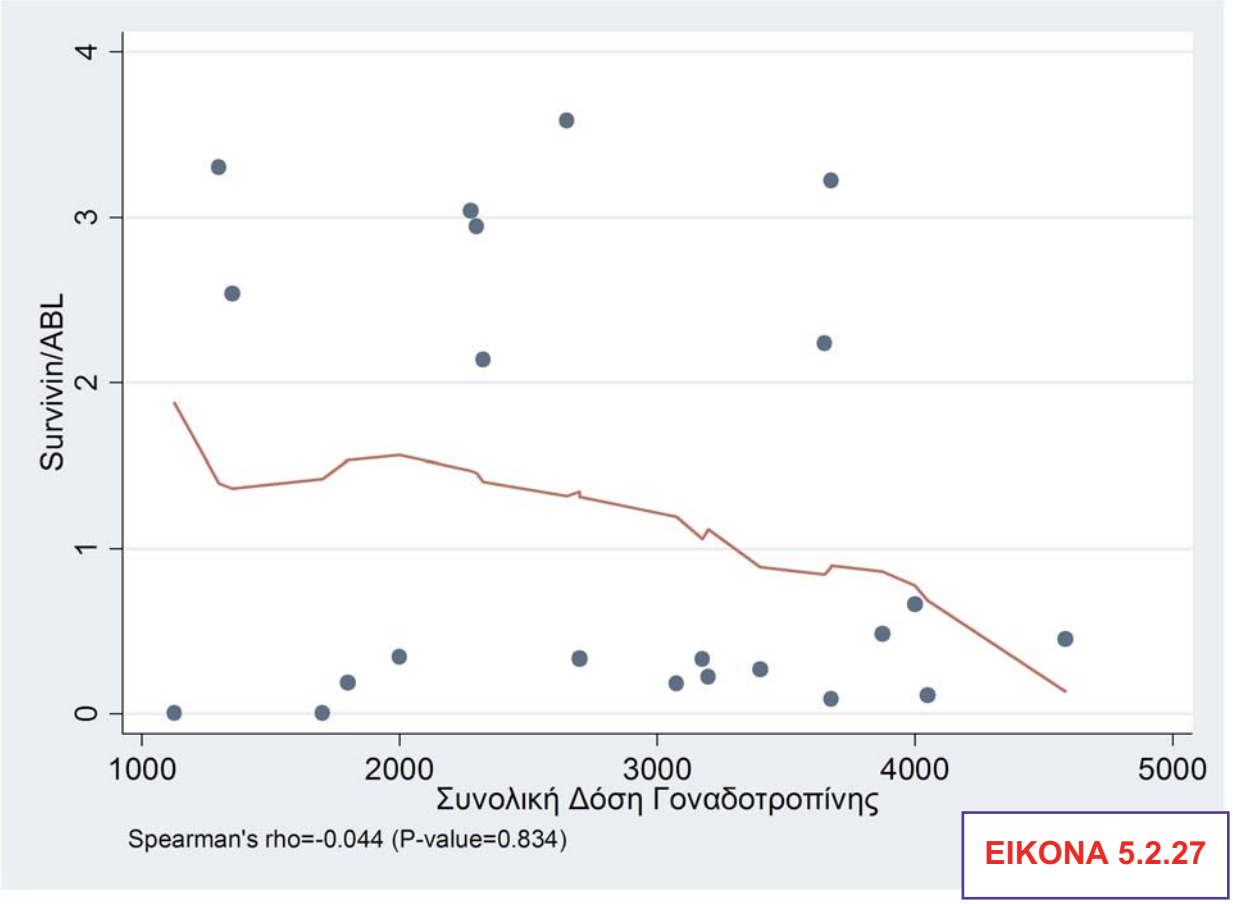

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.25:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τα επίπεδα της οιστραδιόλης ($E_2$) την 5η ημέρα πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας (Spearman' rho = 0.048, p=0.811). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.048) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την συνολική δόση της ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης (FSH) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.26:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις δόσεις της FSH (ως σύνολο) που χρειάσθηκαν για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.384, Wilcoxon rank-sum test).

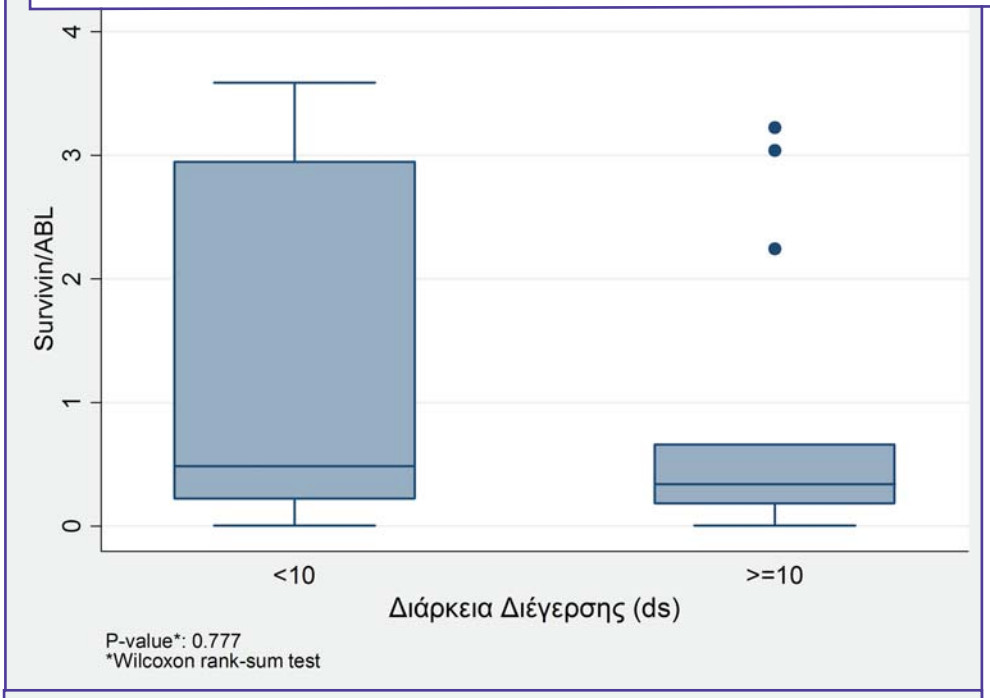
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την συνολική δόση της ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης (FSH) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**



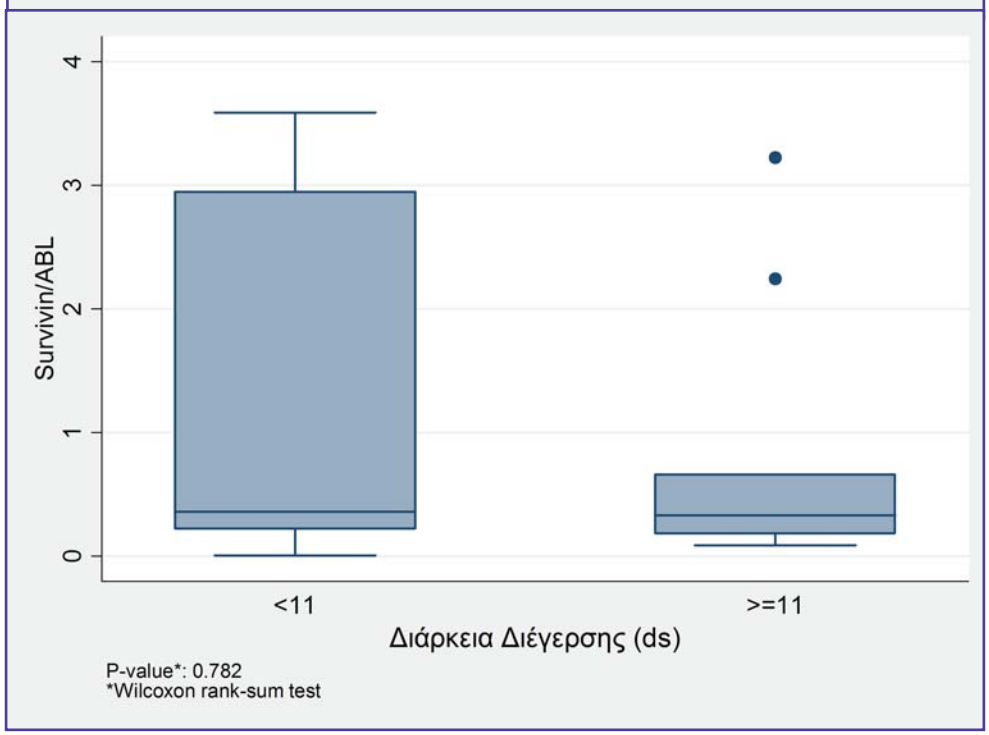

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.27**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.27:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τις δόσεις της FSH που χρειάσθηκαν για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (Spearman' rho = -0.044, p=0.834). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.044) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των ημερών διέγερσης (διάρκεια διέγερσης).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.28**

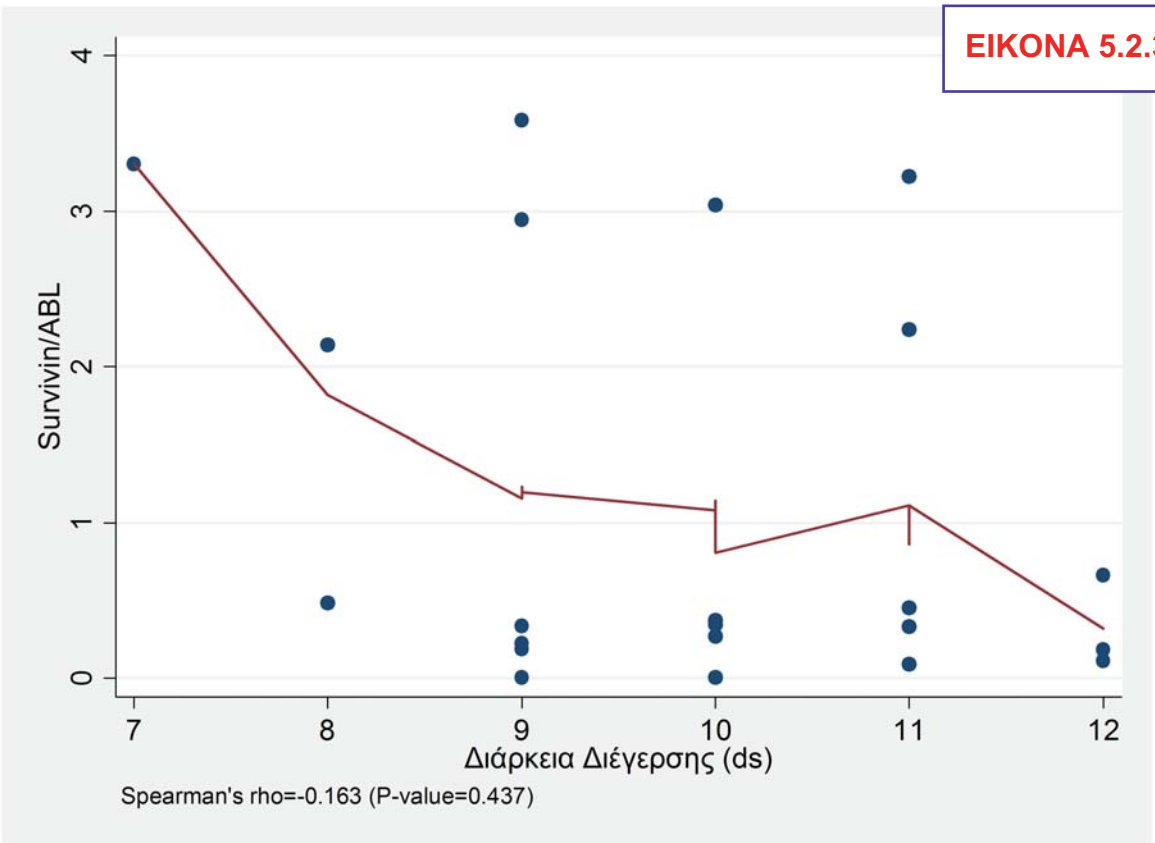



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.29**

**Εικόνες 5.2.28 & 5.2.29:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον συνολικό αριθμό των ημερών διέγερσης (p=0.777 & p=0.782 αντίστοιχα, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την διάρκεια διέγερσης της πρόκλησης σε ημέρες, που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**

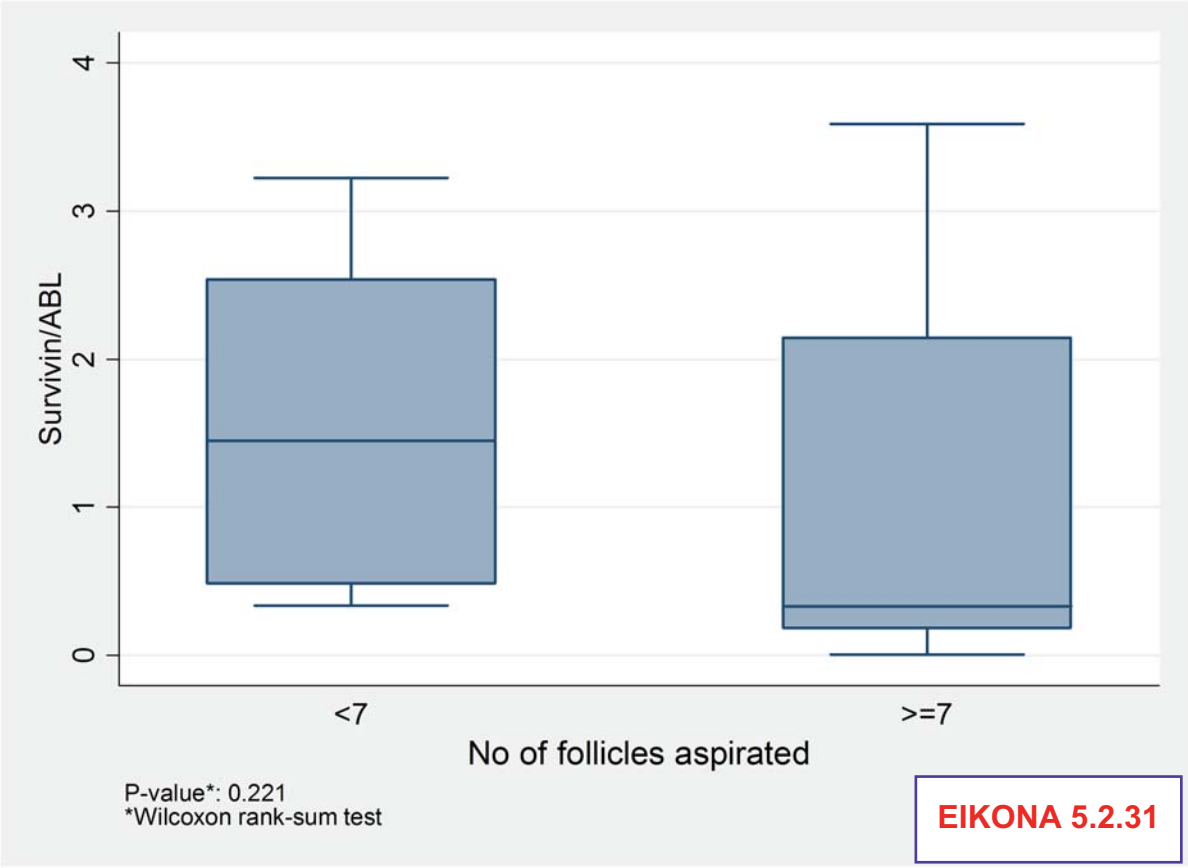
**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.30**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.30:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και την συνολική διάρκεια πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας (σε ημέρες) (Spearman' rho = -0.163, p=0.437).

**Ο συντελεστής συσχέτισης (rho =-0.163) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

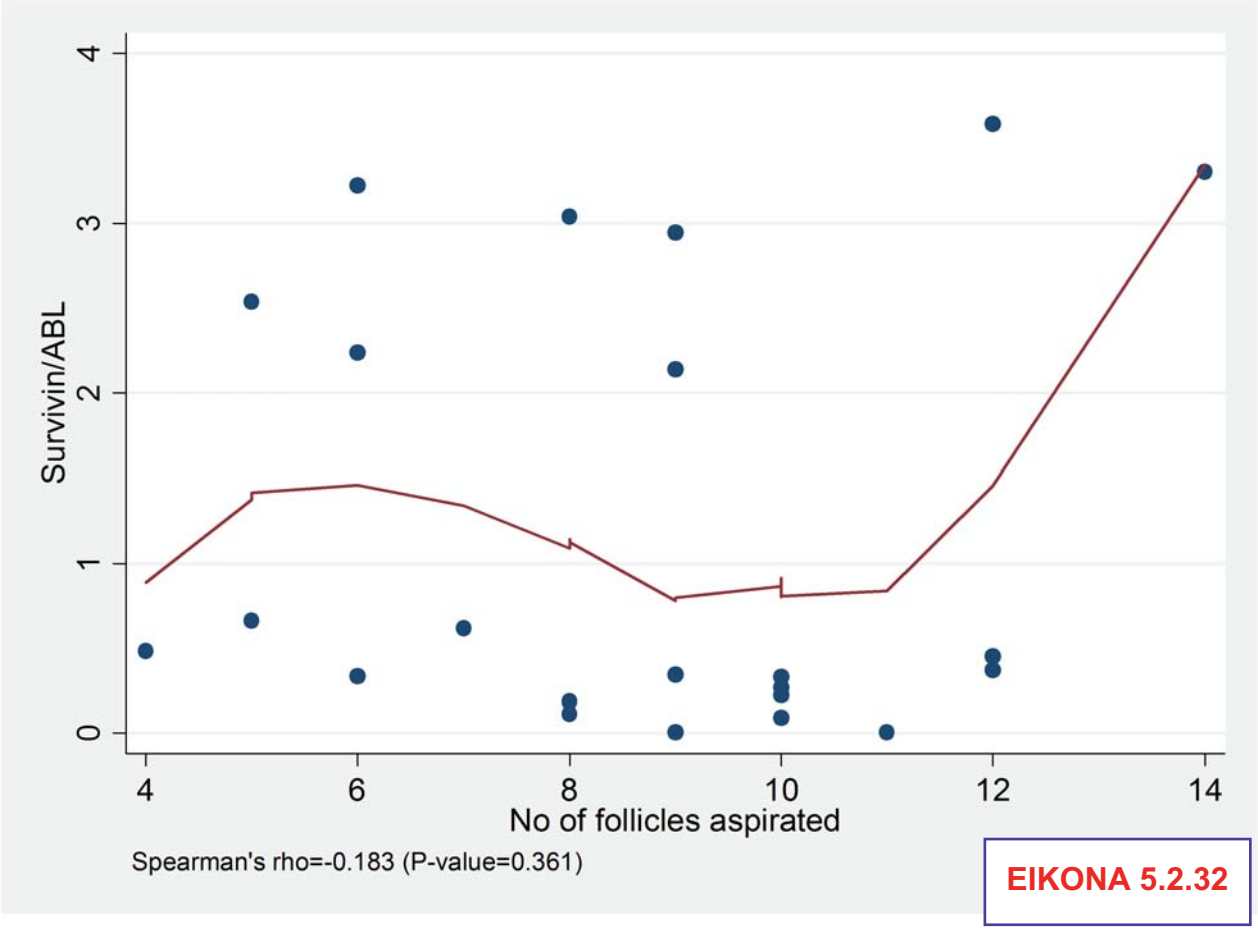
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.31**

**Εικόνες 5.2.31:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (p=0.221, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated).**

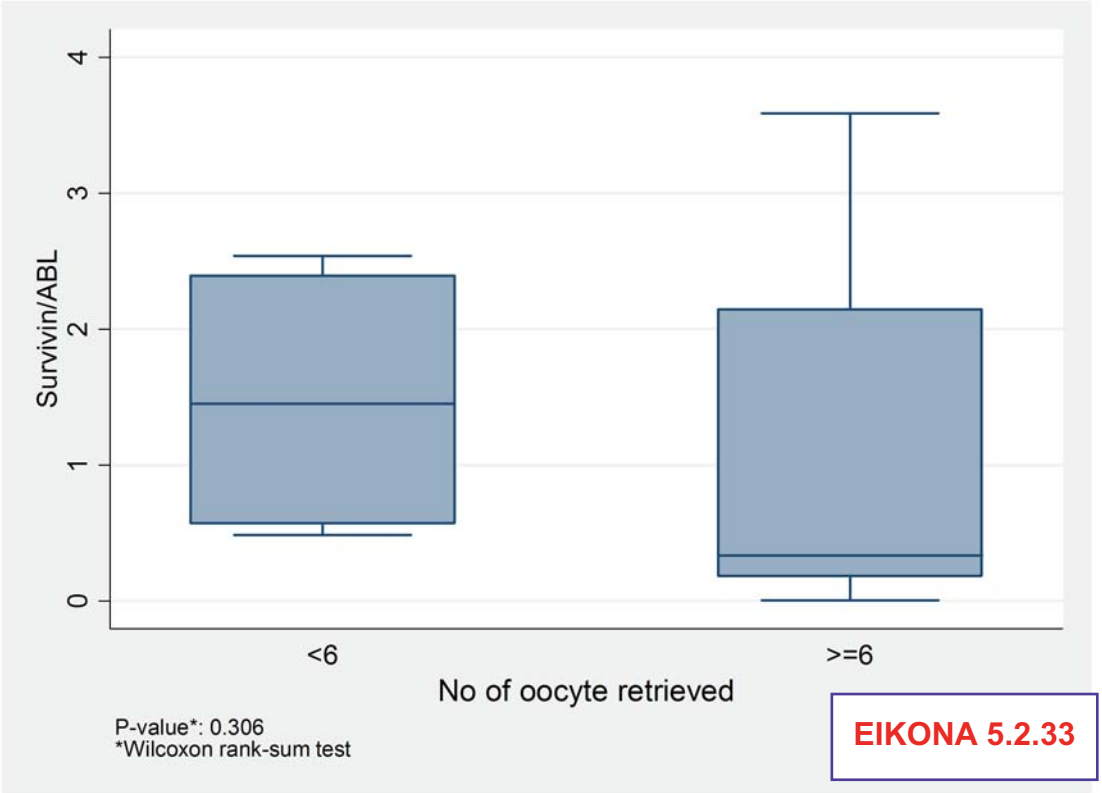



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.32**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.32:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (Spearman' rho = -0.183, p=0.361). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.183) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν (number of oocytes retrieved).**

**ΟΜΑΔΕΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΛΗΨΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΩΑΡΙΩΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ Ή ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΤΩΝ 6**

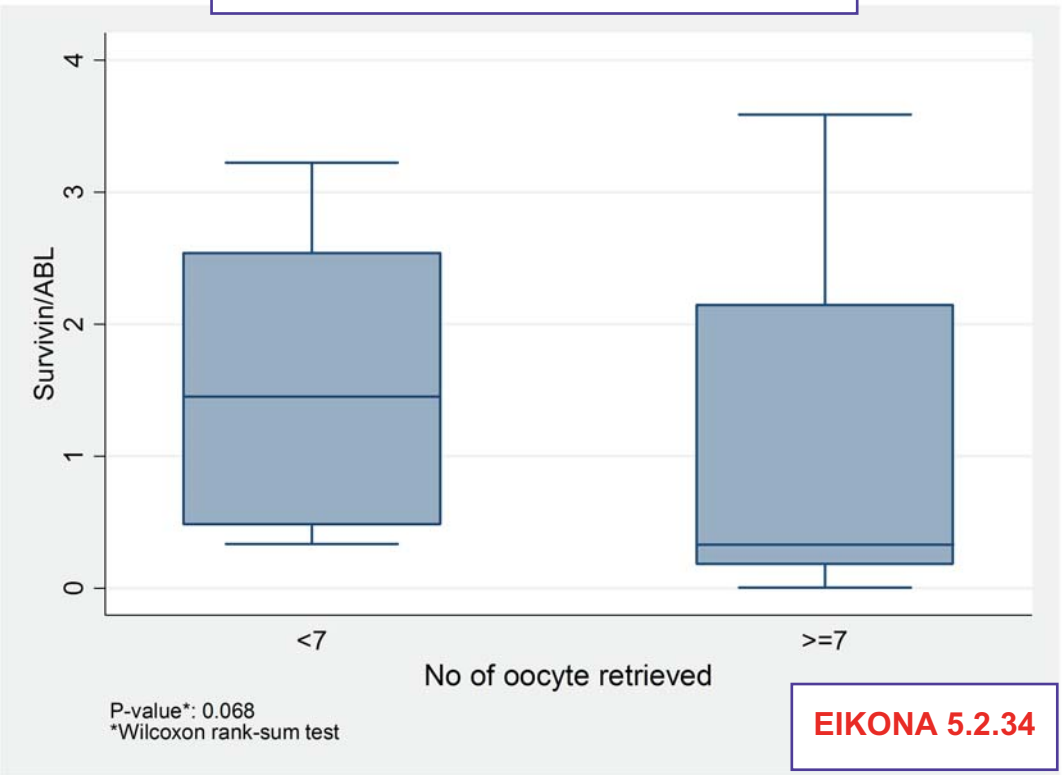



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.33**

**Εικόνες 5.2.33:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό των ωαρίων (<6 σε σχέση με ≥6) που ανερεύθησαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved) (p=0.306, Wilcoxon rank-sum test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved).**

**ΟΜΑΔΕΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΛΗΨΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΩΑΡΙΩΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ Ή ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΤΩΝ 7**

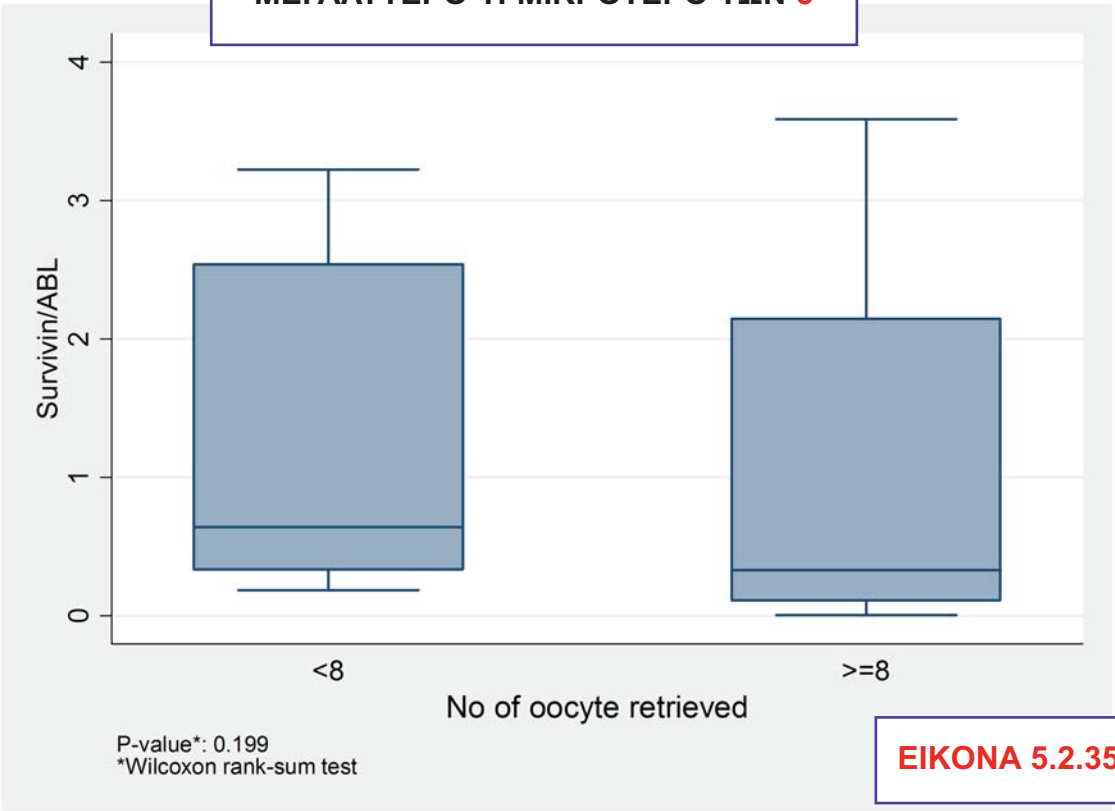



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.34**

**Εικόνες 5.2.34:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό των ωαρίων (<7 σε σχέση με ≥7) που ανερεύθησαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved) (p=0.068, Wilcoxon rank-sum test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν (number of oocytes retrieved).**

**ΟΜΑΔΕΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΛΗΨΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΩΑΡΙΩΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ Ή ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΤΩΝ 8**

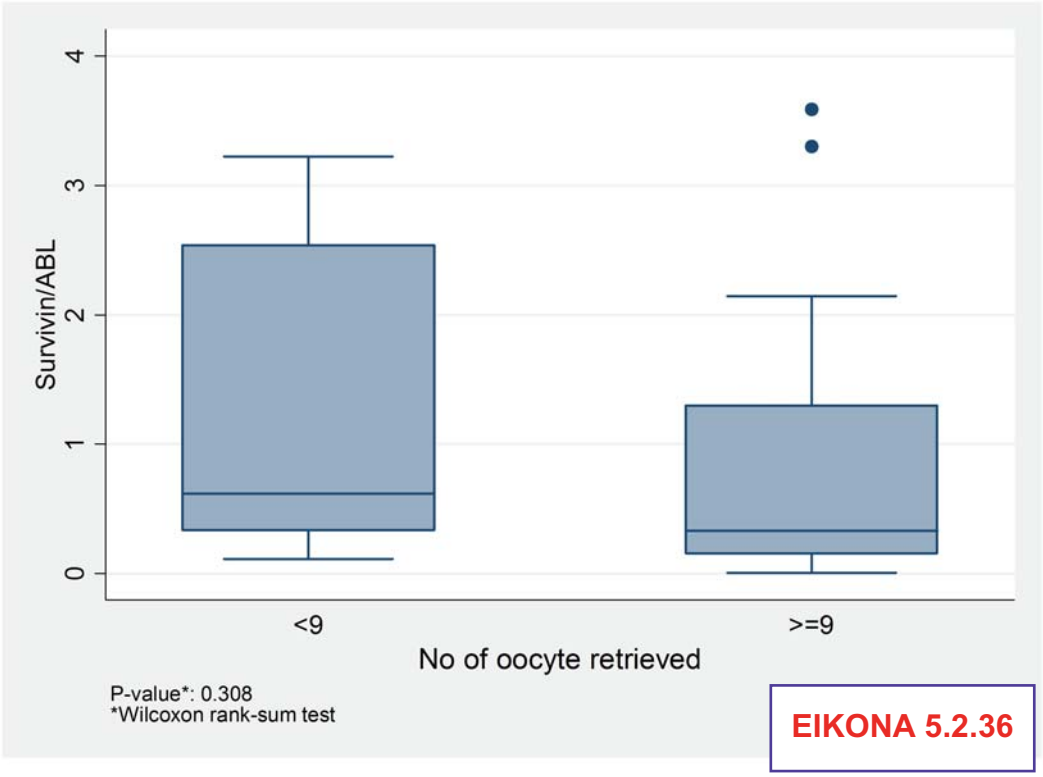



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.35**

**Εικόνες 5.2.35:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό των ωαρίων (<8 σε σχέση με ≥8) που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved) (p=0.199, Wilcoxon rank-sum test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved).**

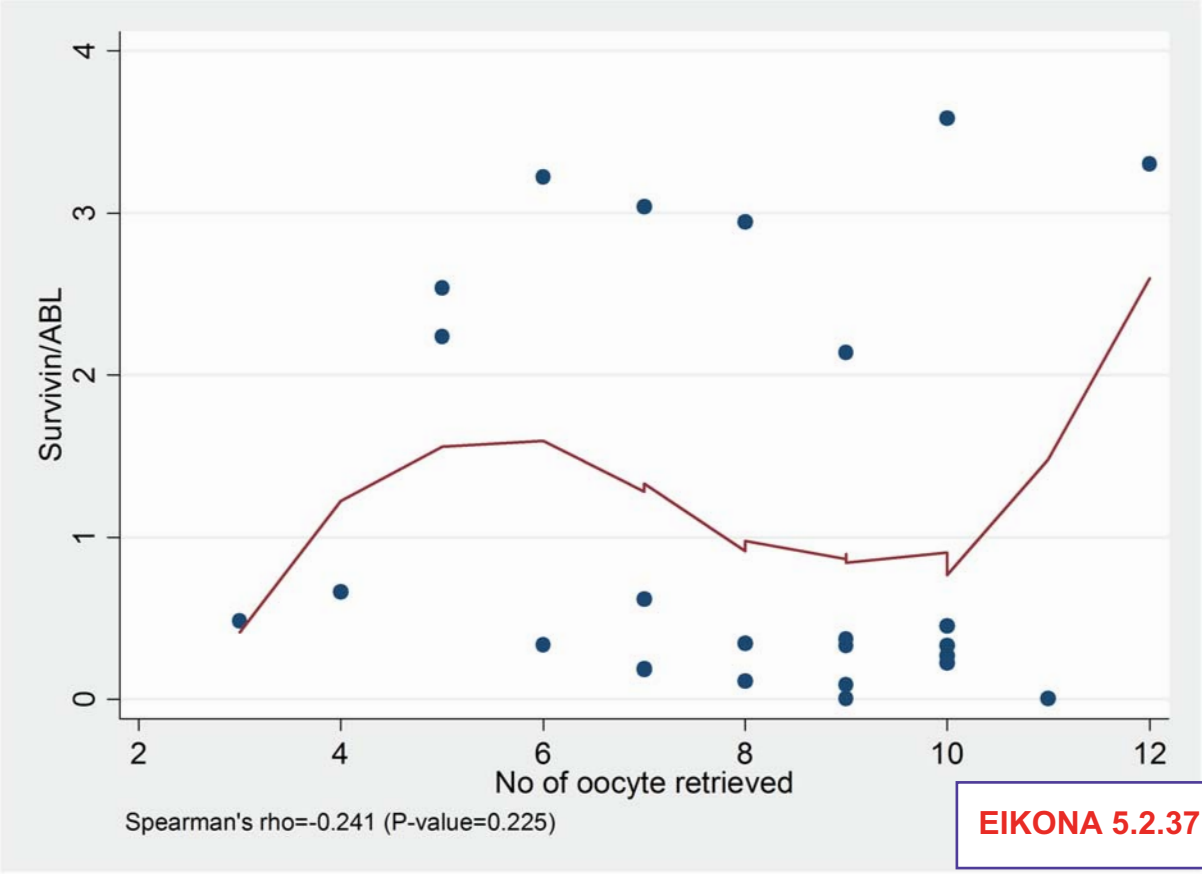
**ΟΜΑΔΕΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΛΗΨΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΩΑΡΙΩΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ Ή ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΤΩΝ 9**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.36**

**Εικόνες 5.2.36:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό των ωαρίων (<9 σε σχέση με ≥9) που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (p=0.308, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με  τον αριθμό των ωαρίων που ανερεύθηκαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.37**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.37:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθη-σαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved) (Spearman' rho = -0.241, p=0.225).

**Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.241) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

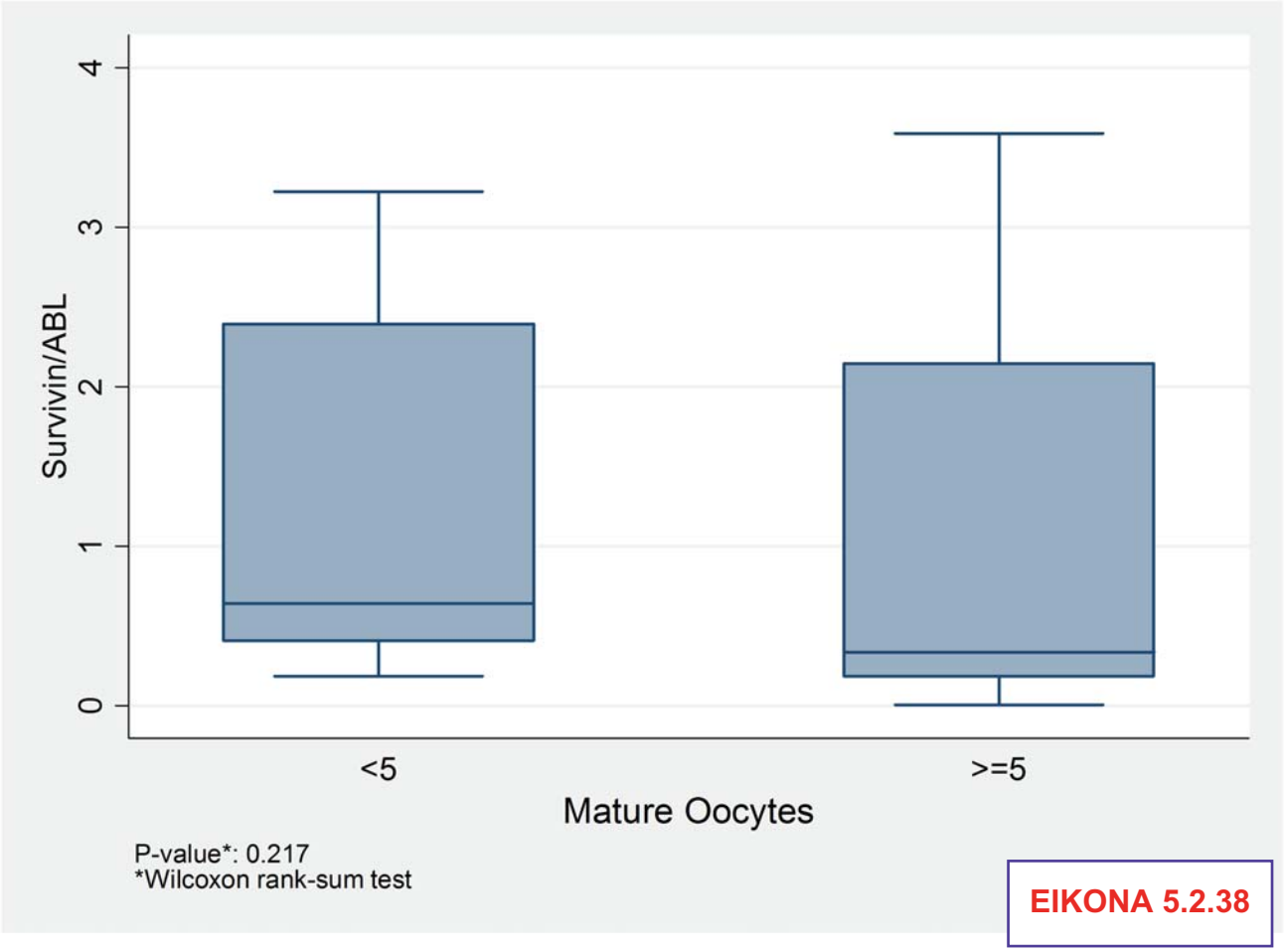
## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.9

| | No of oocyte retrieved | | |
|---|---|---|---|
| | <6 | >=6 | |
| | N (%) | N (%) | p-value |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 0.558 |
| *Όχι* | 4 (80.0) | 16 (66.7) | |
| *Ναι* | 1 (20.0) | 8 (33.3) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 0.967 |
| *Όχι* | 4 (80.0) | 19 (79.2) | |
| *Ναι* | 1 (20.0) | 5 (20.8) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.812 |
| *Όχι* | 4 (80.0) | 18 (75.0) | |
| *Ναι* | 1 (20.0) | 6 (25.0) | |

| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
|---|---|---|---|
| **Age (ys)** | 38.0 (36.0, 45.0) | 36.0 (33.0, 37.0) | 0.233 |
| **PRL (ng/ml)** | 12.1 (6.9, 19.0) | 13.8 (9.0, 17.0) | 0.733 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 300.0 (252.0, 508.0) | 401.5 (306.5, 638.0) | 0.453 |
| **Survivin/ABL** | 1.5 (0.6, 2.4) | 0.3 (0.2, 3.0) | 0.306 |

**Πίνακας 5.2.9:** Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"αριθμός 6 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.233) **(β)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.733) **(γ)** επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.453) **(δ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.306), **(ε)** θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.558) **(στ)** κλινική εγκυμοσύνη (p=0.967) **(ζ)** εγκυμοσύνη (p=0.812).

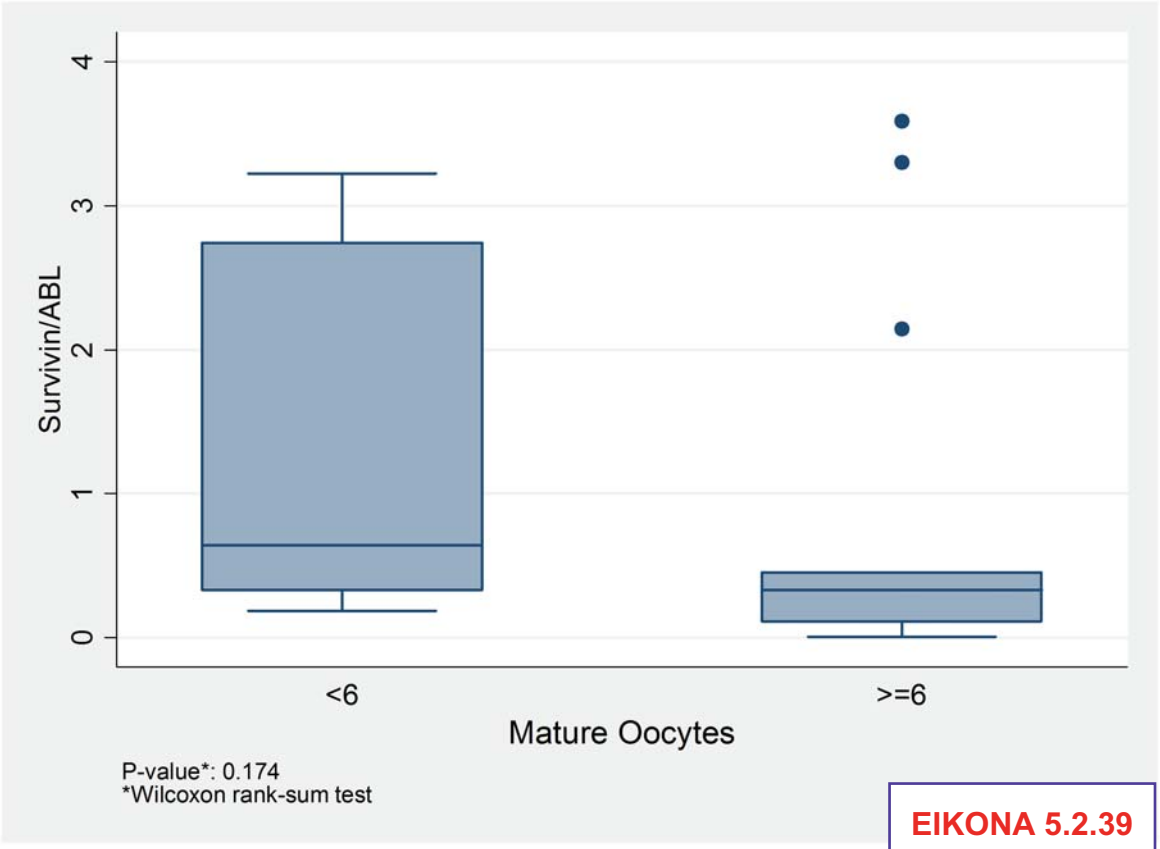
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των 5 ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.38**

**Εικόνες 5.2.38:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στον αριθμό **5** των ώριμων ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes) (p=0.217, Wilcoxon rank-sum test).

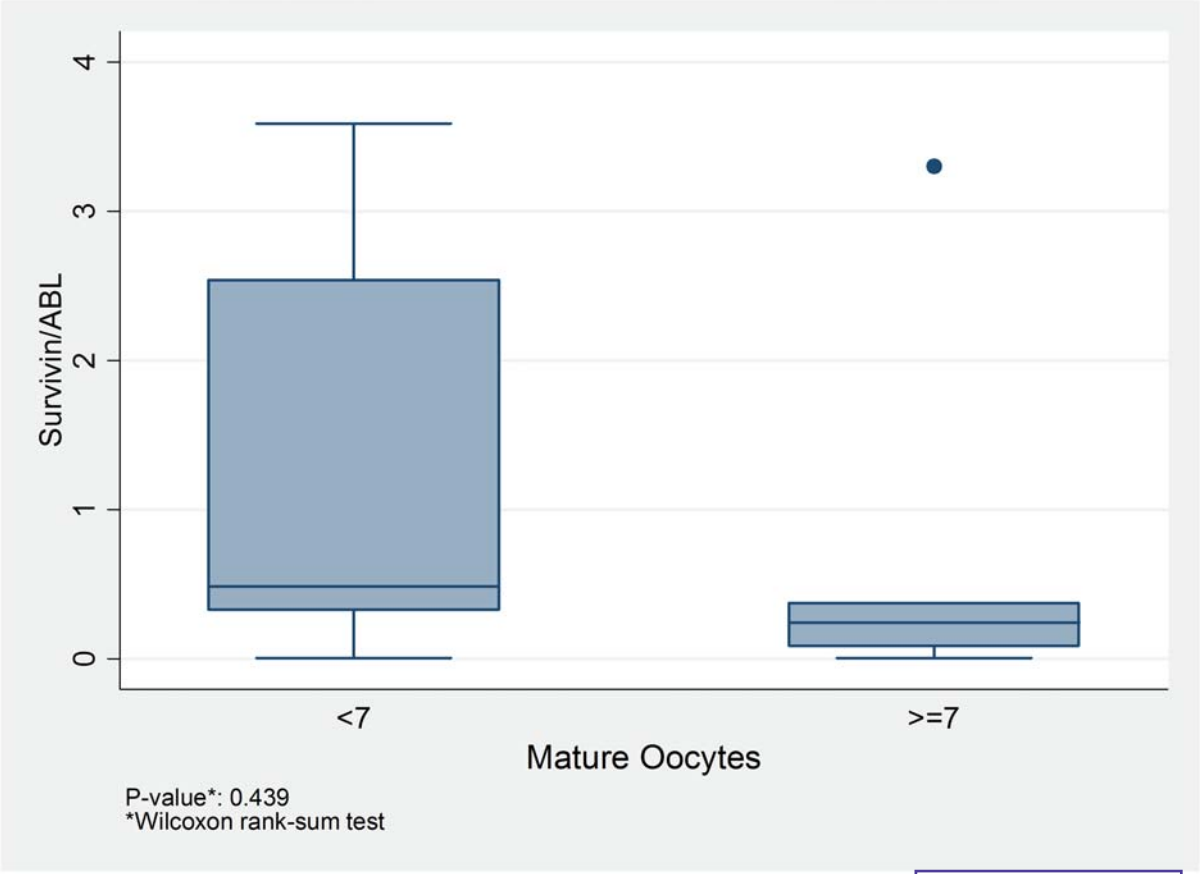
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των 6 ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.39**

**Εικόνες 5.2.39:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό **6** των ώριμων ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (<6 σε σχέση με ≥6) (number of mature oocytes) (p=0.174, Wilcoxon rank-sum test).

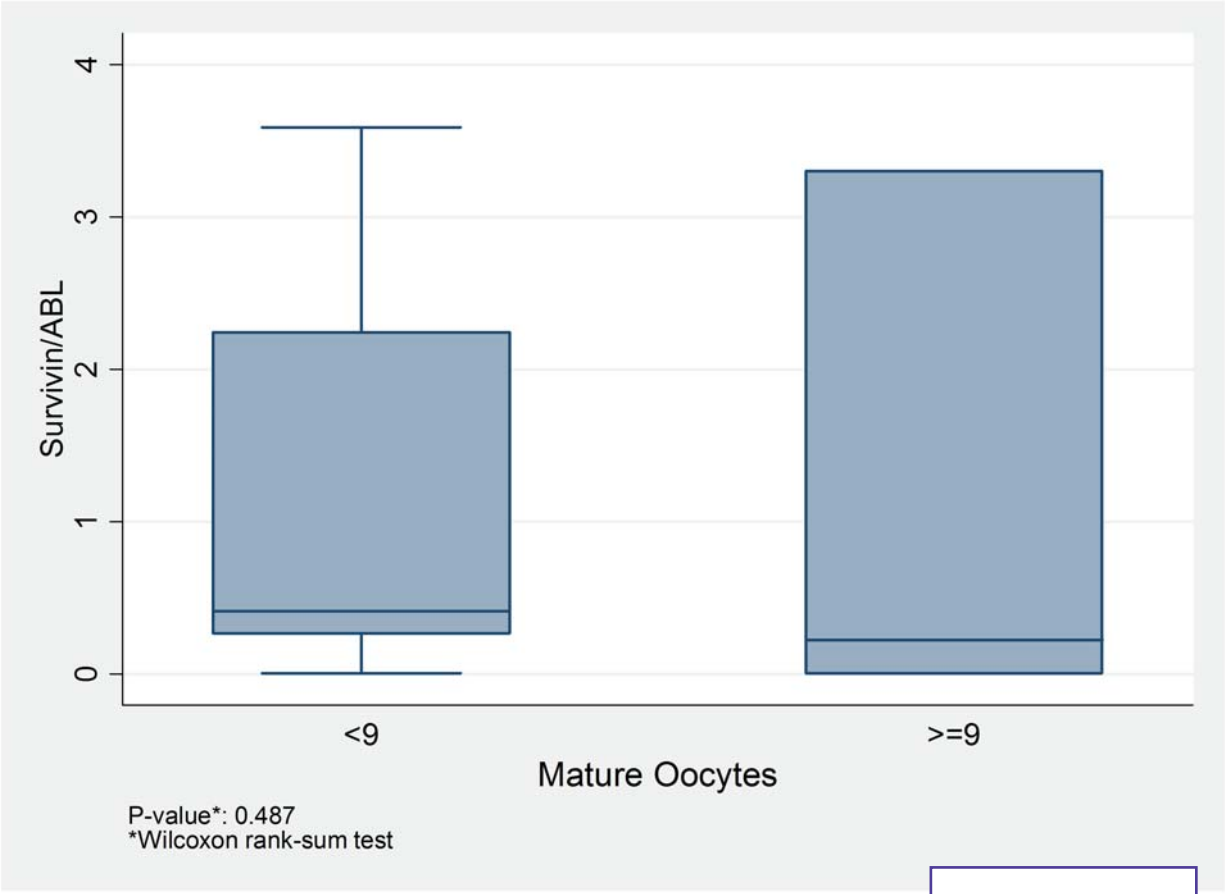
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των 7 ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.40**

**Εικόνες 5.2.40:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στον αριθμό **7** των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (p=0.439, Wilcoxon rank-sum test).

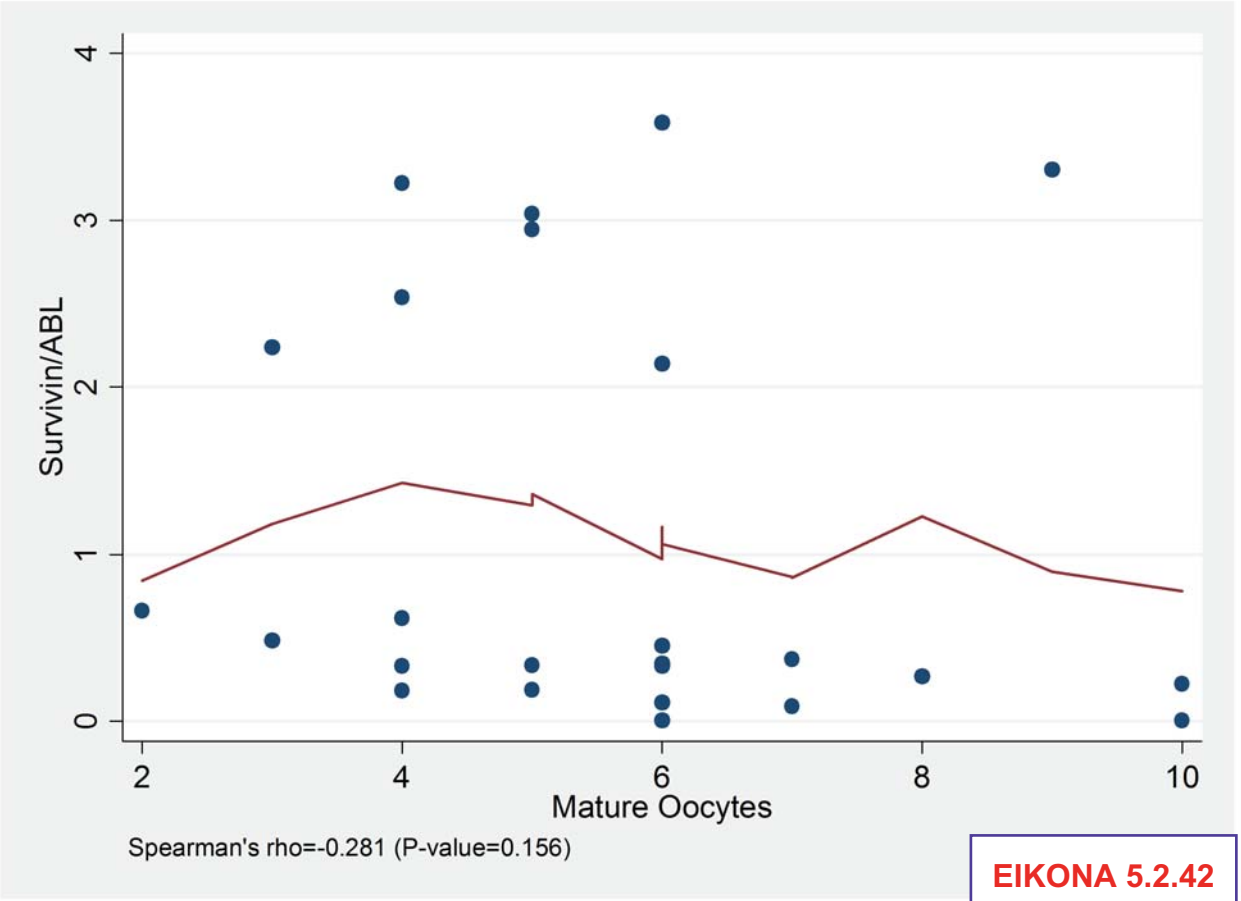
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των 9 ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.41**

**Εικόνες 5.2.41:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με τον αριθμό **9** των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (<9 σε σχέση με ≥9) (number of follicles aspirated) (p=0.439, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με  τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανερεύθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes retrieved).**



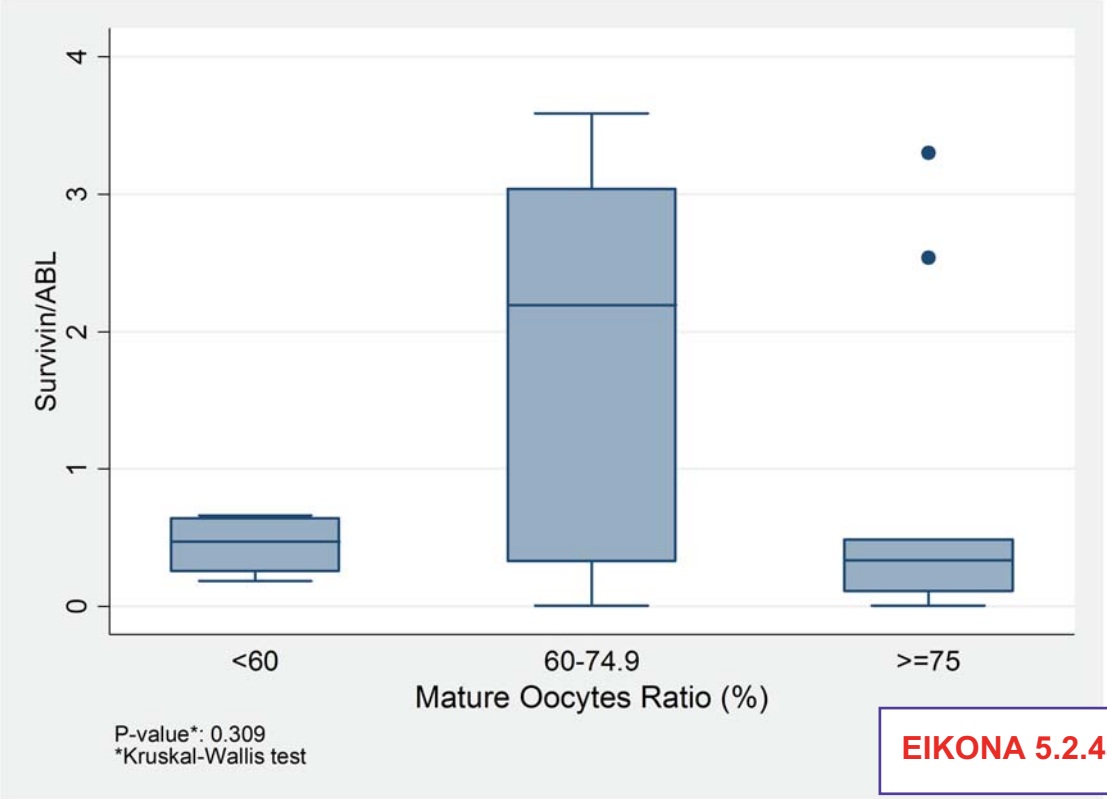

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.42**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.42:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes retrieved) (Spearman' rho = -0.281, p=0.156). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.281) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**

**Τα ώριμα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

- ώριμα ωάρια < 60%,
- ώριμα ωάρια 60-74.9% και
- ώριμα ωάρια ≥ 75%.




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.43**

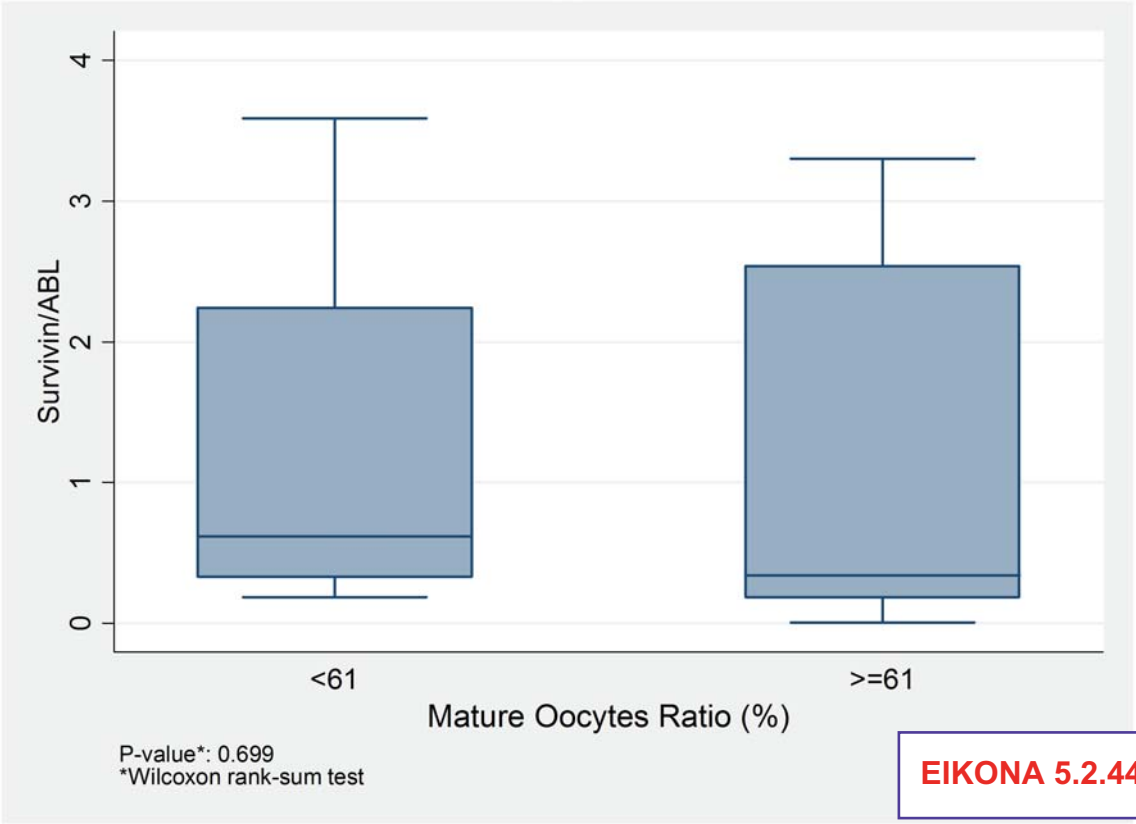
**Εικόνες 5.2.43:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στο ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes ratio)(<60%, 60-74.9%, ≥75%) (p=0.309, Kruskal-Wallis test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**

**Τα ώριμα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

**- ώριμα ωάρια < 61% και**

**- ώριμα ωάρια ≥ 61%.**



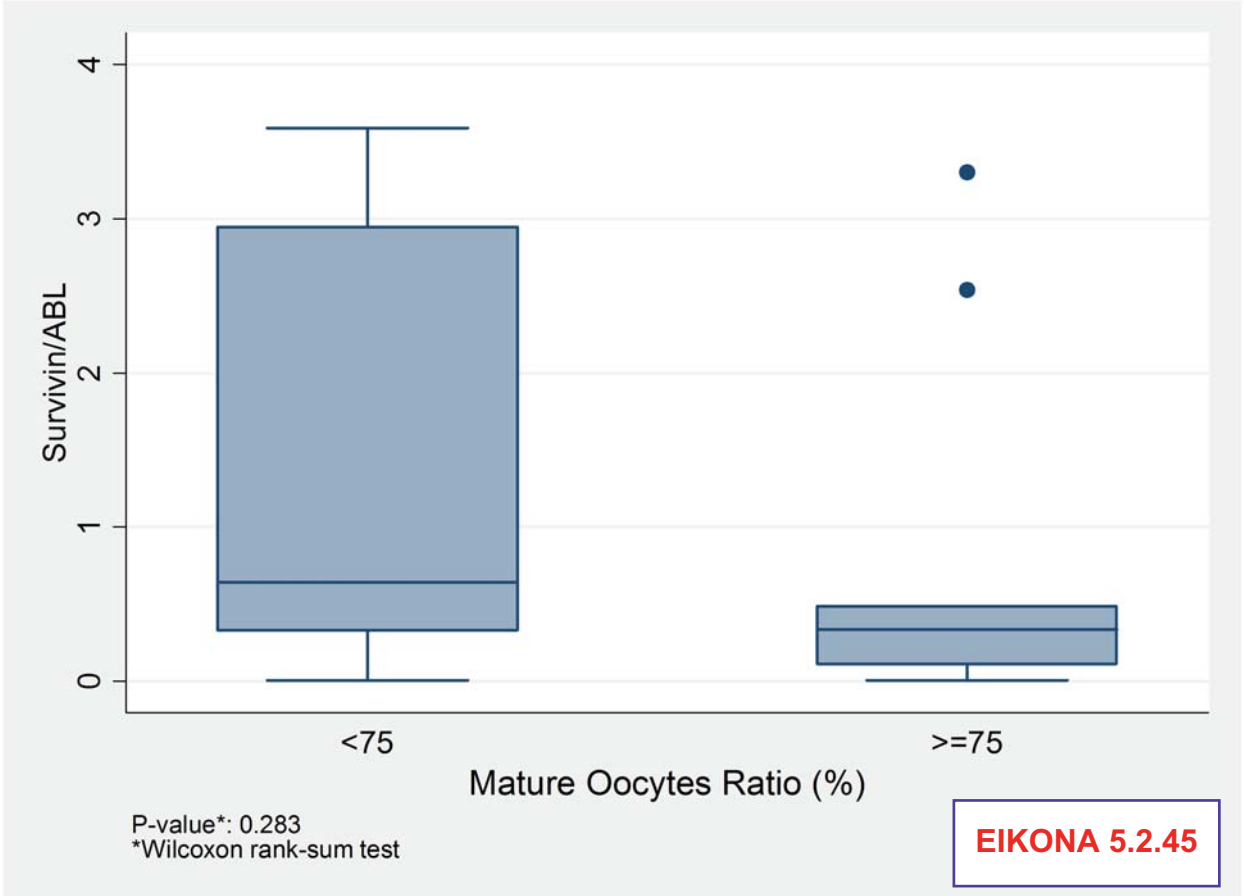

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.44**

**Εικόνες 5.2.44:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και με ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes ratio) (<61% σε σχέση με ≥61%) (p=0.699, Wilcoxon rank-sum test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**

**Τα ώριμα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

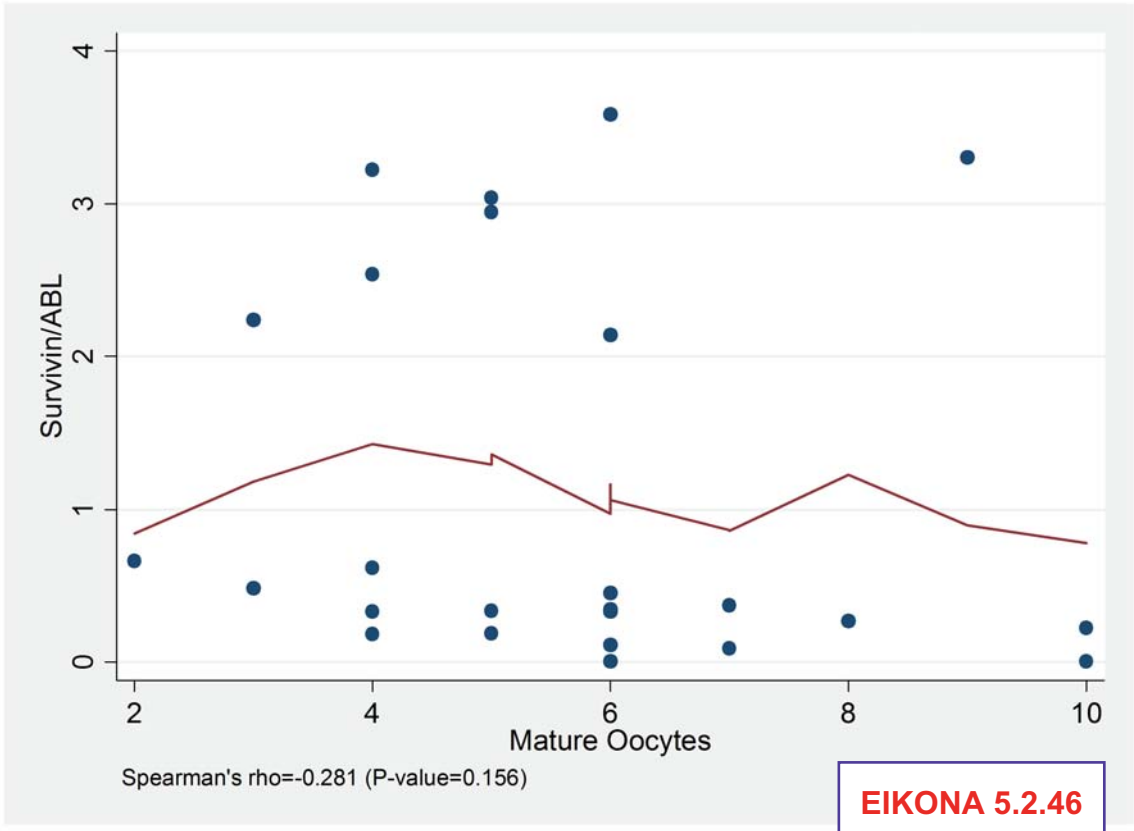
- **ώριμα ωάρια < 75% και**
- **ώριμα ωάρια ≥ 75%.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.45**

**Εικόνες 5.2.45:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και στο ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes ratio) (<75% σε σχέση με ≥75%) (p=0.283, Wilcoxon rank-sum test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανερεύθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes retrieved).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.46**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.46:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (Spearmans' rho = -0.281, p=0.156). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.281) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.10**

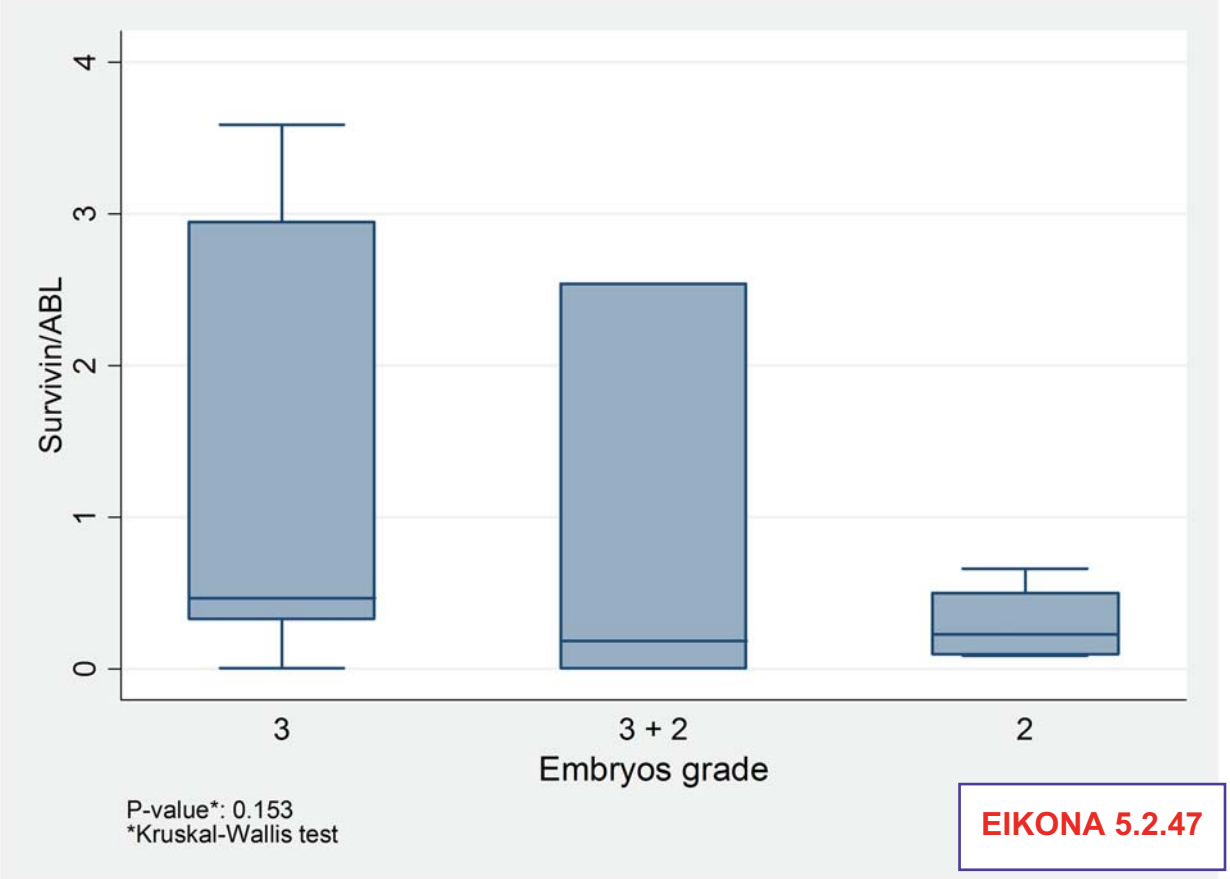
| | Mature Oocytes Ratio (%) | | |
|---|---|---|---|
| | <61 | >=61 | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
| Age (ys) | 36.0 (30.0, 39.0) | 36.0 (35.0, 38.0) | 0.608 |
| FSH (IU/L) | 6.3 (6.0, 8.5) | 6.3 (4.9, 7.5) | 0.232 |
| PRL (ng/ml) | 8.8 (4.9, 16.5) | 15.0 (10.7, 19.1) | 0.060 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | 3412.5 (3075.0, 4000.0) | 2700.0 (2000.0, 3400.0) | 0.062 |
| Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH] | 400.0 (157.0, 508.0) | 425.5 (304.0, 691.0) | 0.386 |
| Estradiol (pg/ml) - peak | 1570.0 (1023.0, 2718.0) | 2035.5 (1800.0, 2569.0) | 0.212 |
| No of oocyte retrieved | 7.0 (5.0, 10.0) | 8.5 (6.0, 9.0) | 0.857 |
| Survivin/ABL | 0.6 (0.3, 2.2) | 0.4 (0.2, 3.0) | 0.699 |

**Πίνακας 5.2.10.:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία" (<61% σε σχέση με >= 61%)** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.608) **(β)** επίπεδα FSH όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.232) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης, όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους έξι γεννητικούς κύκλους (p=0.060) **(δ)** επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.386) **(ε)** επίπδα αιχμής οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν κατά την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.212) **(στ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (0.857) και **(ζ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.699).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την ποιότητα των εμβρύων.**

**Τα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

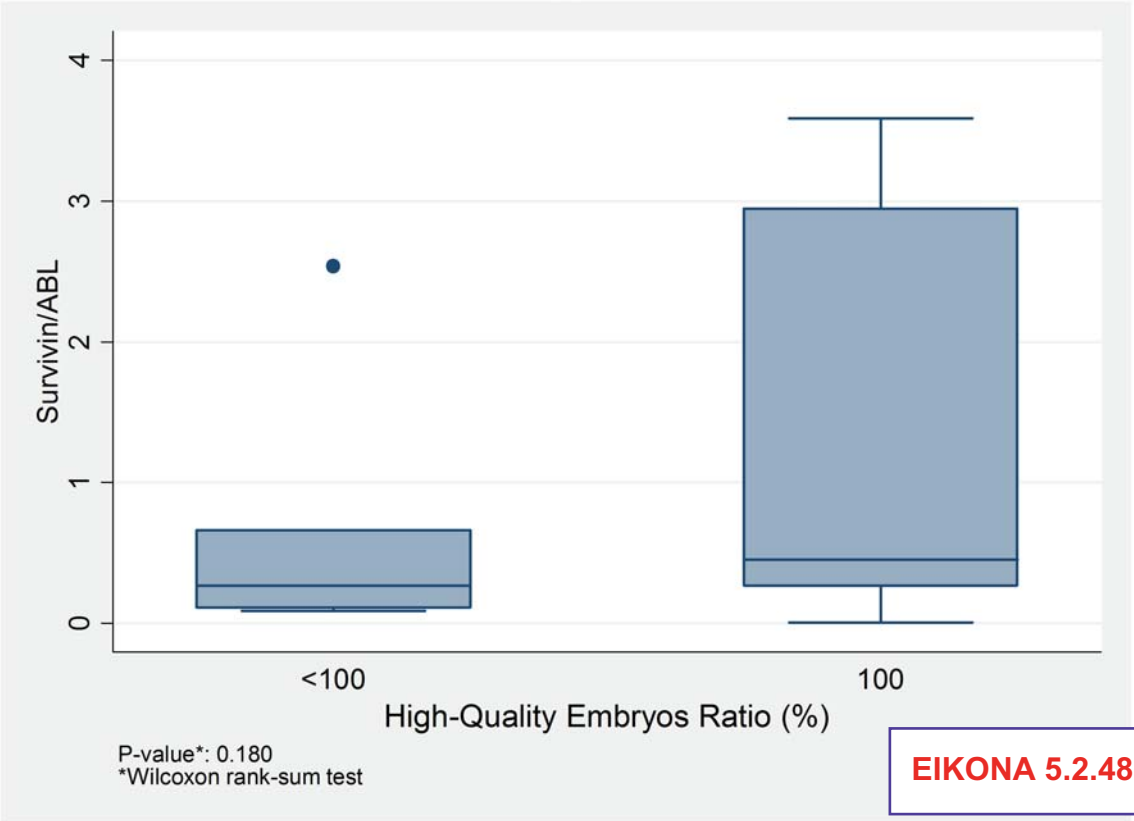
- **Group A = Grade 3 embryos**
- **Group B = Grade 3 + 2 embryos**
- **Group C = Grade 2 embryos**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.47**

**Εικόνες 5.2.47:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και τον βαθμό των εμβρύων (grade) (p=0.153, Kruskal-Wallis test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό υψηλής ποιότητας των εμβρύων (πρώτη ομάδα: ποσοστό υψηλής ποιότητας έμβρυα 100% και δεύτερη ομάδα: ποσοστό υψηλής ποιότητας έμβρυα < 100%).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.48**

**Εικόνες 5.2.48:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και το ποσοστό υψηλής ποιότητας εμβρύων (high-quality embryos ratio) (p=0.180, Wilcoxon rank-sum test).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.11

| | | Embryos grade | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 | 3 + 2 | 2 | |
| | N (%) | N (%) | N (%) | p-value |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | | 0.344 |
| *Όχι* | 13 (65.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 7 (35.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | | 0.335 |
| *Όχι* | 16 (80.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 4 (20.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | | 0.374 |
| *Όχι* | 15 (75.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 5 (25.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **SURVIVIN EXPRESSION** | | | | 0.006 |
| *Όχι* | 0 (0.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| *Ναι* | 20 (100.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
| **Age (ys)** | 36.0 (35.0, 37.5) | 38.0 (36.0, 41.0) | 32.5 (29.5, 35.0) | 0.178 |
| **FSH (IU/L)** | 6.0 (4.9, 7.5) | 9.4 (5.5, 9.8) | 6.3 (6.2, 7.2) | 0.402 |
| **PRL (ng/ml)** | 12.1 (9.0, 16.6) | 13.9 (4.8, 22.3) | 14.9 (9.4, 16.6) | 0.974 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2800.0 (2300.0, 3400.0) | 2550.0 (1700.0, 3075.0) | 3837.5 (2837.5, 4025.0) | 0.197 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 474.0 (306.5, 697.5) | 401.0 (300.0, 509.0) | 233.0 (110.0, 321.5) | 0.087 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 2062.5 (1630.5, 2593.0) | 1570.0 (1254.0, 2795.0) | 1925.0 (1425.5, 2034.0) | 0.706 |
| **No of oocyte retrieved** | 9.0 (6.5, 10.0) | 7.0 (5.0, 10.0) | 8.0 (6.0, 8.5) | 0.713 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 67.0 (61.5, 78.0) | 80.0 (70.0, 91.0) | 75.0 (62.5, 76.5) | 0.504 |
| **Immature Oocytes Ratio (%)** | 33.0 (22.0, 38.5) | 20.0 (9.0, 30.0) | 25.0 (23.5, 37.5) | 0.504 |
| **SURVIVIN Cp** | 34.6 (33.1, 35.5) | 34.1 (31.7, 34.9) | 34.2 (31.6, 36.4) | 0.696 |
| **SURVIVIN CONCENTRATION** | 224.6 (165.3, 602.0) | 167.4 (2.8, 1470.0) | 250.4 (160.4, 2736.0) | 0.813 |
| **Survivin/ABL** | 0.6 (0.3, 3.1) | 0.2 (0.0, 2.5) | 0.2 (0.1, 0.5) | 0.153 |

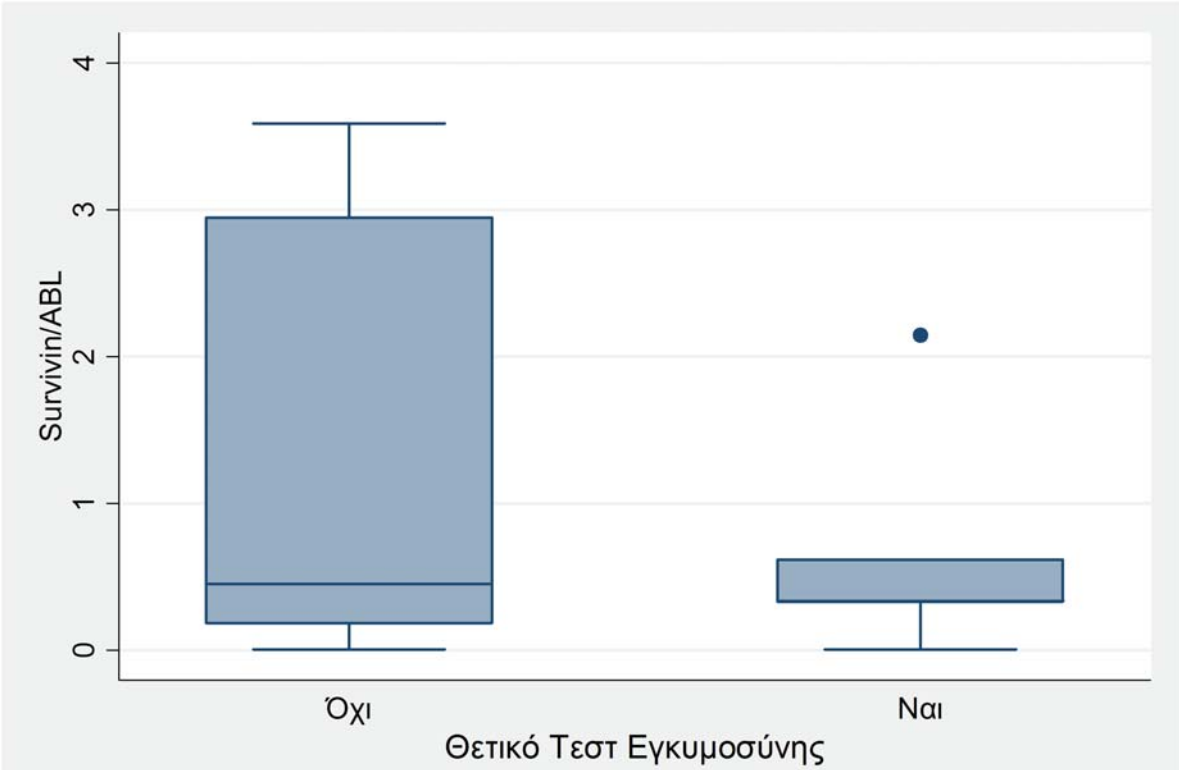
**Πίνακας 5.2.11:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** έδειξε **αρκετά στατιστικά σημαντική διαφορά για την ανεξάρτητη μεταβλητή ύπαρξη έκφρασης της SURVIVIN (p=0.006).**

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.11

| | | Embryos grade | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 | 3 + 2 | 2 | |
| | N (%) | N (%) | N (%) | p-value |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | | 0.344 |
| *Όχι* | 13 (65.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 7 (35.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | | 0.335 |
| *Όχι* | 16 (80.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 4 (20.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | | 0.374 |
| *Όχι* | 15 (75.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| *Ναι* | 5 (25.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| **SURVIVIN EXPRESSION** | | | | 0.006 |
| *Όχι* | 0 (0.0) | 2 (40.0) | 0 (0.0) | |
| *Ναι* | 20 (100.0) | 3 (60.0) | 4 (100.0) | |
| | | | | |
| | | | | |
| | **Median (IQR)** | **Median (IQR)** | **Median (IQR)** | **p-value** |
| **Age (ys)** | 36.0 (35.0, 37.5) | 38.0 (36.0, 41.0) | 32.5 (29.5, 35.0) | 0.178 |
| **FSH (IU/L)** | 6.0 (4.9, 7.5) | 9.4 (5.5, 9.8) | 6.3 (6.2, 7.2) | 0.402 |
| **PRL (ng/ml)** | 12.1 (9.0, 16.6) | 13.9 (4.8, 22.3) | 14.9 (9.4, 16.6) | 0.974 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2800.0 (2300.0, 3400.0) | 2550.0 (1700.0, 3075.0) | 3837.5 (2837.5, 4025.0) | 0.197 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 474.0 (306.5, 697.5) | 401.0 (300.0, 509.0) | 233.0 (110.0, 321.5) | 0.087 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 2062.5 (1630.5, 2593.0) | 1570.0 (1254.0, 2795.0) | 1925.0 (1425.5, 2034.0) | 0.706 |
| **No of oocyte retrieved** | 9.0 (6.5, 10.0) | 7.0 (5.0, 10.0) | 8.0 (6.0, 8.5) | 0.713 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 67.0 (61.5, 78.0) | 80.0 (70.0, 91.0) | 75.0 (62.5, 76.5) | 0.504 |
| **Immature Oocytes Ratio (%)** | 33.0 (22.0, 38.5) | 20.0 (9.0, 30.0) | 25.0 (23.5, 37.5) | 0.504 |
| **SURVIVIN Cp** | 34.6 (33.1, 35.5) | 34.1 (31.7, 34.9) | 34.2 (31.6, 36.4) | 0.696 |
| **SURVIVIN CONCENTRATION** | 224.6 (165.3, 602.0) | 167.4 (2.8, 1470.0) | 250.4 (160.4, 2736.0) | 0.813 |
| **Survivin/ABL** | 0.6 (0.3, 3.1) | 0.2 (0.0, 2.5) | 0.2 (0.1, 0.5) | 0.153 |

**Πίνακας 5.2.11:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.178) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.402) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.974) **(δ)** επίπεδα οιστραδιόλης της 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.087) **(ε)** επίπεδα οιστραδιόλης την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.706) **(στ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.197) **(ζ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.504) **(η)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.504) **(θ)** ποσοστό ανώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.696) **(ι)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.153), **(ια)** θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.344) **(ιβ)** κλινική εγκυμοσύνη (p=0.335) **(ιγ)** εγκυμοσύνη (p=0.374).

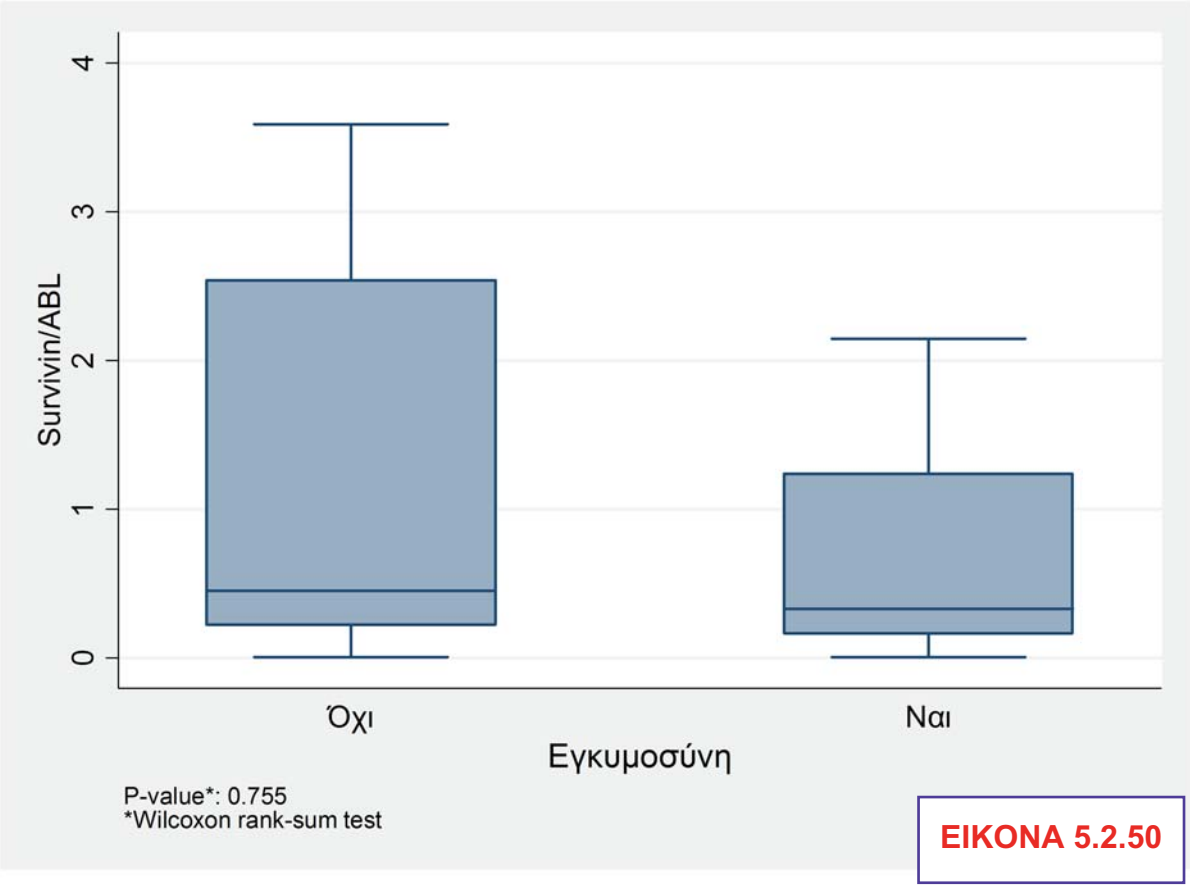
**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς το θετικό ή αρνητικό τεστ εγκυμοσύνης.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.49**

**Εικόνες 5.2.49:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς το θετικό ή αρνητικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.699, Wilcoxon rank-sum test).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.50**

**Εικόνες 5.2.50:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN και την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης (p=0.755, Wilcoxon rank-sum test).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.12

| | Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι | Ναι | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
| Age (ys) | 36.0 (32.5, 37.0) | 37.0 (36.0, 39.0) | 0.107 |
| FSH (IU/L) | 6.3 (5.8, 7.9) | 5.2 (4.3, 8.1) | 0.431 |
| PRL (ng/ml) | 12.9 (7.2, 16.1) | 16.5 (11.1, 21.9) | 0.181 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | 3075.0 (2000.0, 3675.0) | 2700.0 (2437.5, 3162.5) | 0.457 |
| Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH] | 342.0 (246.0, 599.5) | 498.0 (400.0, 585.0) | 0.229 |
| Estradiol (pg/ml) - peak | 1986.0 (1565.5, 2443.0) | 2100.0 (1254.0, 2805.0) | 0.621 |
| No of oocyte retrieved | 8.0 (6.5, 10.0) | 9.0 (6.0, 9.0) | 0.867 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | 75.0 (61.5, 79.0) | 67.0 (67.0, 70.0) | 0.356 |
| Survivin/ABL | 0.5 (0.2, 3.0) | 0.3 (0.3, 2.1) | 0.699 |

**Πίνακας 5.2.12:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"θετικό τεστ εγκυμοσύνης"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.107) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.431) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.181) **(δ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.457) **(ε)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.229) **(στ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.621) **(ζ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.867) **(η)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.356) **(θ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.699).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.13**

| | Κλινική Εγκυμοσύνη | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι<br>Median (IQR) | Ναι<br>Median (IQR) | p-value |
| Age (ys) | 36.0 (32.0, 37.0) | 38.0 (36.0, 44.0) | 0.069 |
| FSH (IU/L) | 6.3 (5.5, 7.9) | 5.5 (4.1, 8.5) | 0.634 |
| PRL (ng/ml) | 12.1 (7.2, 16.1) | 19.2 (11.7, 22.6) | 0.054 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | 3075.0 (2275.0, 3675.0) | 2625.0 (2325.0, 3175.0) | 0.398 |
| Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH] | 400.0 (252.0, 691.0) | 450.0 (309.0, 509.0) | 0.572 |
| Estradiol (pg/ml) - peak | 2022.0 (1561.0, 2569.0) | 2188.5 (1254.0, 2805.0) | 0.686 |
| No of oocyte retrieved | 8.0 (6.0, 10.0) | 9.0 (6.0, 10.0) | 0.765 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | 71.0 (60.0, 78.0) | 68.5 (67.0, 83.0) | 1.000 |
| Survivin/ABL | 0.5 (0.2, 3.0) | 0.3 (0.2, 1.2) | 0.246 |

**Πίνακας 5.2.13.:** Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη κλινικής εγκυμοσύνης"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία (p=0.069) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.634) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) στον ορό του αίματος, όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 κύκλους (p=0.054), **(δ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.398) **(ε)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.572) **(στ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.686) **(ζ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.765) **(η)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=1.00) **(θ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.246).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.14**

| | Έγκυμοσύνη | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι | Ναι | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value |
| Age (ys) | 36.0 (32.0, 37.0) | 38.0 (36.0, 44.0) | 0.035 |
| FSH (IU/L) | 6.3 (5.8, 7.9) | 5.2 (4.1, 8.5) | 0.426 |
| PRL (ng/ml) | 12.9 (8.0, 16.3) | 16.5 (11.1, 22.6) | 0.184 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | 2987.5 (2137.5, 3675.0) | 2700.0 (2325.0, 3175.0) | 0.489 |
| Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH] | 375.0 (252.0, 691.0) | 498.0 (309.0, 585.0) | 0.372 |
| Estradiol (pg/ml) - peak | 1986.0 (1561.0, 2569.0) | 2100.0 (1254.0, 2805.0) | 0.593 |
| No of oocyte retrieved | 8.0 (7.0, 10.0) | 9.0 (6.0, 10.0) | 0.897 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | 73.0 (60.0, 78.0) | 67.0 (67.0, 83.0) | 0.838 |
| Survivin/ABL | 0.5 (0.2, 2.9) | 0.3 (0.3, 2.1) | 0.755 |

**Πίνακας 5.2.14.:** Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη εγκυμοσύνης"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** επίπεδα FSH (p=0.426) **(β)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.184) **(γ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.489) **(δ)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.372) **(ε)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.593) **(στ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.897) **(ζ)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.838) **(η)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.755). **Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία των γυναικών και την επίτευξη εγκυμοσύνης (p=0.035).**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.15**

REGRESS formatted output

Outcome variable: y (ln(Survivin/ABL)), n=27

| Covariate | Coef. | 95% Conf. Interval | P>\|t\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | -0.072 | (-0.353, 0.209) | 0.602 |
| BMI | | | |
| per unit | 0.051 | (-0.356, 0.458) | 0.797 |
| No of oocyte retrieved | | | |
| <6* | 0 | | |
| 6+ | -0.926 | (-3.339, 1.487) | 0.436 |
| Constant | 1.690 | (-5.708, 9.089) | 0.641 |

* Baseline category

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.16**

REGRESS formatted output

Outcome variable: y (ln(Survivin/ABL)), n=25

| Covariate | Coef. | 95% Conf. Interval | P>\|t\| |
|---|---|---|---|
| Estradiol (pg/ml) - peak | | | |
| per unit | -0.000 | (-0.001, 0.001) | 0.925 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | | | |
| <61* | 0 | | |
| >=61 | -0.440 | (-2.789, 1.909) | 0.701 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | | | |
| per unit | -0.445 | (-2.491, 1.602) | 0.656 |
| Constant | 0.174 | (-3.728, 4.076) | 0.927 |

**Πίνακες 5.2.15 και 5.2.16:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.602) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.797) **(γ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (< 6 ή >=6) (p=0.436), **(δ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης (p=0.925), **(ε)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.701) **(στ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.656).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.17**

No of oocyte retrieved

LOGIT formatted output

Outcome variable: oocytes_retrieved_6 (No of oocyte retrieved), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | 0.824 | (0.584, 1.161) | 0.267 |
| BMI | | | |
| per unit | 1.257 | (0.746, 2.117) | 0.390 |
| Survivin/ABL | | | |
| per unit | 1.034 | (0.824, 1.297) | 0.772 |

**Πίνακας 5.2.17:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 6 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.267) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.390) και **(γ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.772).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.18**

No of oocyte retrieved

LOGIT formatted output

Outcome variable: oocytes_retrieved_7 (No of oocyte retrieved), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | 0.984 | (0.741, 1.307) | 0.912 |
| BMI | | | |
| per unit | 0.886 | (0.582, 1.348) | 0.571 |
| Survivin/ABL | | | |
| per unit | 1.010 | (0.923, 1.105) | 0.833 |

**Πίνακας 1.2.18:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 7 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.912) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.571) και **(γ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.833).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.19**

No of oocyte retrieved

LOGIT formatted output

Outcome variable: oocytes_retrieved_9 (No of oocyte retrieved), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | 0.957 | (0.743, 1.232) | 0.732 |
| BMI | | | |
| per unit | 1.122 | (0.773, 1.628) | 0.545 |
| Survivin/ABL | | | |
| per unit | 1.032 | (0.938, 1.135) | 0.514 |

**Πίνακας 5.2.19:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 9 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.732) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.545) και **(γ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.514).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.20**

LOGIT formatted output

Outcome variable: mature_oocytes_5 (Mature Oocytes), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | 1.106 | (0.838, 1.461) | 0.476 |
| BMI | | | |
| per unit | 0.811 | (0.540, 1.220) | 0.316 |
| Survivin/ABL | | | |
| per unit | 1.024 | (0.926, 1.131) | 0.646 |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.21**

LOGIT formatted output

Outcome variable: mature_oocytes_5 (Mature Oocytes), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Estradiol (pg/ml) - peak | | | |
| per unit | 1.002 | (1.000, 1.004) | 0.062 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | | | |
| <61* | 1 | | |
| >=61 | 4.573 | (0.412, 50.760) | 0.216 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | | | |
| per unit | 0.156 | (0.017, 1.453) | 0.103 |

* Baseline category

**Πίνακες 5.2.20 και 5.2.21:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 5 ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.476) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.316) **(γ)** ποσοστό ώριμων ωαρίων (p=0.216), **(δ)** την συνολική δόση γοναδοτροπίνης (p=0.103) και **(ε)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.646).

LOGIT formatted output

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.22**

Outcome variable: hq_embryos_ratio_100 (High-Quality Embryos Ratio (%)), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Age (ys) | | | |
| per unit | 1.034 | (0.754, 1.418) | 0.835 |
| BMI | | | |
| per unit | 1.133 | (0.705, 1.821) | 0.606 |
| Survivin/ABL | | | |
| per unit | 1.800 | (0.692, 4.682) | 0.228 |

LOGIT formatted output

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.23**

Outcome variable: hq_embryos_ratio_100 (High-Quality Embryos Ratio (%)), n=27

| Covariate | Odds Ratio | 95% Conf. Interval | P>\|z\| |
|---|---|---|---|
| Estradiol (pg/ml) - peak | | | |
| per unit | 1.001 | (0.999, 1.002) | 0.236 |
| Mature Oocytes Ratio (%) | | | |
| <61* | 1 | | |
| >=61 | 0.775 | (0.088, 6.848) | 0.819 |
| Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης | | | |
| per unit | 0.441 | (0.069, 2.836) | 0.389 |

* Baseline category

**Πίνακες 5.2.22 και 5.2.23:** Η πολλαπλή λογαριθμιστική παλινδρόμιση (multiple logistic regression) ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποσοστό υψηλής ποιότητας εμβρύων"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.835) **(β)** BMI των γυναικών (p=0.606) και **(γ)** επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN (p=0.228), **(δ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης (p=0.236), **(ε)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.819) **(στ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.389).

## 5.3. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI

Οι Πίνακες 5.3.1 έως 5.3.3 παρουσιάζουν τα δημογραφικά, ορμονικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν, καθώς και την έκβαση των IVF ή ICSI προσπαθειών τους.

Η έκφραση του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβλήθησαν σε IVF ή ICSI παρατηρήθηκε στις 10 από τις 21 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (47.6%) (Πίνακας 5.3.2). Ο διάμεσος του λόγου OCT-4 mRNA / ABL mRNA είναι 1.75 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.10 έως 98.21 (Πίνακας 5.3.3). Οι Πίνακες 5.3.5 έως 5.3.8 παρουσιάζουν συνοπτικά τα αποτελέσματα της στατιστικής μελέτης των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ή ICSI σε σχέση με κλινικές παραμέτρους.

Από τις 21 ασθενείς που μελετήθηκαν στις 8 υπήρχε αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας (38.1%) και στις 13 υπήρχε σαλπιγγικός παράγοντας υπογονιμότητας (61.9%). Στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αντρικός παράγοντας έγινε μικρογονιμοποίηση, ενώ στις περιπτώσεις όπου υπήρχε σαλπιγγικός παράγοντας έγινε IVF. Και στις δύο περιπτώσεις η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας έγινε με το ίδιο πρωτόκολλο. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε εμβρυομεταφορά τριών (3) εμβρύων. Επίτευξη γονιμοποίησης επιτεύχθηκε στο εργαστήριο εμβρυολογίας και στις 29 περιπτώσεις (100%). Θετικό τεστ εγκυμοσύνης βρέθηκε σε ποσοστο 28.6% (6/21), εγκυμοσύνη σε ποσοστό 23.8% (5/21) και κλινική εγκυμοσύνη σε ποσοστό 19% (4/21). Πολύδυμη κύηση δεν παρατηρήθηκε σε καμιά περίπτωση. Αποβολή πρώτου τριμήνου παρατηρήθηκε σε 1 περίπτωση (4.8%, 1/21) και έκτοπη κύηση επίσης σε 1 περίπτωση (4.8%, 1/21) (Πίνακας 5.3.2). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες αιτιών υπογονιμότητας που αφορούσαν τον ανδρικό ή σαλπιγγικό παράγοντα ως προς το θετικό ή μη τεστ εγκυμοσύνης ($p=0.146$), την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης ($p=0.618$), την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης ($p=0.325$), την ηλικία των γυναικών ($p=0.186$), τα επίπεδα προλακτίνης προ της θεραπείας ($p=0.390$), τον αριθμό των ωαρίων που ανευρεύθησαν κατά την ωοληψία ($p=0.769$) και τα επίπεδα της οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης FSH ($p=0.385$) (Πίνακας 5.3.4).

Βρέθηκε ότι **τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 συσχετίσθηκαν στατιστικά στις περι-**

**πτώσεις που ανευρέθησαν περισσότερα από 6 ωάρια κατά την ωοληψία (p = 0.037)** (Πίνακας 5.3.9). Στις περιπτώσεις που βρέθηκαν <6 ωαρίων κατά την ωοληψία ο διάμεσος του λόγου OCT-4/G6PD ήταν μηδέν (0), ενώ στις περιπτώσει όπου βρέθηκαν ≥ 6 ωαρίων ο λόγος OCT-4/G6PD ήταν 6.6 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.3 έως 106.4. Επίσης, **βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τα επίπεδα AMH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.001)** (Εικόνα 5.3.15).

Η στατιστικη ανάλυση για τον δείκτη **"αριθμός 6 ωαρίων και πάνω που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.964) (β) επίπεδα προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.122) (γ) επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.720) (Πίνακας 5.3.9). Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τον δείκτη **"αριθμός 6 ωαρίων και πάνω που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** και (ε) το θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=1.00) (στ) την κλινική εγκυμοσύνη (p=0.546) ή (ζ) την εγκυμοσύνη (p=0.532) (Πίνακας 5.3.9).

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση **της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4** στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με την ηλικία των γυναικών (Εικόνα 5.3.1), το BMI (Εικόνα 5.3.3), τα επίπεδα της FSH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Εικόνες 5.3.5 και 5.3.6), τα επίπεδα της LH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Εικόνα 5.3.8), τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Εικόνες 5.3.10 και 5.3.11), τα επίπεδα προλακτίνης στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (Εικόνα 5.3.13). Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τις αιτίες υπογονιμότητας (αντρικός παράγοντας ή σαλπιγγικός παράγοντας υπογονιμότητας) (Εικόνα 5.3.17), το είδος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IVF ή ICSI) (Εικόνα 5.3.18) και την διάρκεια υπογονιμότητας (Εικόνα 5.3.19). Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (Εικόνες 5.3.20 και 5.3.21), τα επί-

πεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως αυτά μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG (Εικόνες 5.3.23 και 5.3.24), την συνολική δόση FSH που χρειάσθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (Εικόνες 5.3.26 και 5.3.27) και την διάρκεια διέγερσης ωοθυλακιορρηξίας (Εικόνες 5.3.29 και 5.3.30). Ακόμα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν (Εικόνα 5.3.32), τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Εικόνες 5.3.34 έως 5.3.35). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστική συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Εικόνες 5.3.37 και 5.3.38) και το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (Εικόνες 5.3.40 και 5.3.41).

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση **των επιπέδων έκφρασης του OCT-4** στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με την ηλικία των γυναικών (p=0.385), (Εικόνα 5.3.2), το BMI (p=0.115), (Εικόνα 5.3.4), τα επίπεδα της FSH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.059), (Εικόνα 5.3.7), τα επίπεδα της LH στο αίμα στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.580), (Εικόνα 5.3.9), τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.455), (Εικόνα 5.3.12), τα επίπεδα προλακτίνης στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.260), (Εικόνα 5.3.14). Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.676), (Εικόνα 5.3.22), τα επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως αυτά μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.074), (Εικόνες 5.3.25), την συνολική δόση FSH που χρειάσθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.626), (Εικόνα 5.3.28) και την διάρκεια διέγερσης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.787), (Εικόνα 5.3.31). Ακόμα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν (p=0.165), (Εικόνα 5.3.33), τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.537), (Εικόνες 5.3.36). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την

ωοληψία (p=0.252), (Εικόνες 5.3.39).

Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία" (<61% σε σχέση με >= 61%)** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.468), (β) επίπεδα FSH όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.636), (γ) επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.420), (δ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης (p=0.219), (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (0.239), και (στ) επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.433) (Πίνακας 5.3.10). Όμως, **συσχετίσθηκε στατιστικά το "ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία" (<61% σε σχέση με >= 61%) με τα επίπεδα αιχμής οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν κατά την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.018) και τα επίπεδα προλακτίνης όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους έξι κύκλους (p= 0.019),** (Πίνακας 5.3.10).

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με την **"ποιότητα των εμβρύων"** (embryos grade) (p=0.351) (Εικόνα 5.3.42). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.462), (β) επίπεδα FSH (p=0.607), (γ) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.581), (δ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.556), (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.713), (στ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.887), (ζ) ποσοστό ανώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.887), (η) επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.280). Όμως, **συσχετίσθηκε στατιστικά η "ποιότητα εμβρύων" με την συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.029) και τα επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.040)** (Πίνακας 5.3.11). Δεν βρέθηκε στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στην **"ποιότητα των εμβρύων"** και (α) το θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.779), (β) την κλινική εγκυμοσύνη (p=1.00) (γ) την εγκυμοσύνη (p=0.351) και (δ) την ύπαρξη ή όχι έκφρασης του OCT-4 (p=0.351) (Πίνακας 5.3.11).

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε σχέση με το θετικό τεστ

εγκυμοσύνης (p=0.361) (Εικόνα 5.3.43), την εγκυμοσύνη (p=0.635) (Εικόνα 5.3.44) ή την κλινική εγκυμοσύνη (p=1.00) (Εικόνα 5.3.45).

Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"θετικό τεστ εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία των γυναικών (p=0.064), (β) επίπεδα FSH (p=0.201), (γ) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.402), (γ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.509), (δ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.330), (στ) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.613), (ε) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.694), (στ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.938), και (ζ) επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.522) (Πίνακας 5.3.12). Επίσης, η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη κλινικής εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία (p=0.238), (β) επίπεδα FSH (p=0.065), (γ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.345), (δ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.754), (ε) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.687), (στ) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.468), (ζ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.719), (η) επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.296) (Πίνακας 5.3.13). Η στατιστική ανάλυση για τον δείκτη **"επίτευξη εγκυμοσύνης"** δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις ανεξάρτητες μεταβλητές (α) ηλικία (p=0.103), (β) επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.402), (γ) συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.513), (δ) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η χορήγησης της FSH (p=0.591), (ε) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.536), (στ) αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.802), (ζ) ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.480), (η) επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.732). Όμως παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην "επίτευξη εγκυμοσύνης" και στα επίπεδα FSH στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.036)** (Πίνακας 5.3.14). Ο διάμεσος της FSH στις γυναίκες που επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη ήταν 4.3 IU με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 4.5 έως 5.2 IU, ενώ στις γυναίκες που δεν επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη ήταν 6.3 IU με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 5.8 έως 8.1 IU (Πίνακας 5.3.14).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.1**

| | Mean (SD) | Range |
|---|---|---|
| **Age (ys)** | 35.52 (4.06) | 27.00-44.00 |
| **Weight (Kg)** | 62.86 (10.85) | 50.00-100.00 |
| **Height (m)** | 1.65 (0.05) | 1.58-1.80 |
| **BMI** | 23.08 (4.35) | 17.28-36.73 |
| **FSH (IU/L)** | 6.66 (2.52) | 3.60-13.00 |
| **FSH/LH** | 1.34 (0.61) | 0.42-2.90 |
| **PRL (ng/ml)** | 12.97 (7.32) | 3.61-29.00 |

| | Median (IQR) | Range |
|---|---|---|
| **LH (IU/L)** | 4.60 (3.36, 8.40) | 1.80-14.80 |
| **AMH (μg/l)** | 8.85 (4.90, 21.00) | 2.70-25.80 |

**Πίνακας 5.3.1: Δημογραφικά και ορμονικά δεδομένα (data) των ασθενών που μελετήθηκαν.** Η μέση ηλικία των γυναικών ήταν 35.52 έτη (όρια διακύμανσης από 27 έως 44 και σταθερή απόκλιση 4.06), το BMI των γυναικών ήταν 23.08 (όρια διακύμανσης από 17.28 έως 36.73 και σταθερή απόκλιση 4.35), η μέση τιμή FSH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 6.66 (όρια διακύμανσης από 3.60 έως 13 και σταθερή απόκλιση 2.52), ο διάμερος της LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 4.60 (με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 4.36 έως 8.40 και με όρια διακύμανσης 1.80-14.80), η μέση τιμή στον ορό του αίματος του λόγου FSH/LH ήταν 1.34 (όρια διακύμανσης από 0.42 έως 2.90 και σταθερή απόκλιση 0.61) και ο διάμεσος της AMH στην αρχή του γεννητικού κύκλου ήταν 8.85 ( με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 4.90 έως 21.00, με όρια διακύμανσης 2.70-25.80). Η μέση τιμή της προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκε σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους ήταν 12.97 (όρια διακύμανσης από 3.61 έως 29 και σταθερή απόκλιση 7.32).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.2**

| | N (%) |
|---|---|
| **Infertility Causes** | |
| *Ανδρικός* | 8 (38.1) |
| *Σαλπιγγικός* | 13 (61.9) |
| **Previous IVF/ICSI cycles** | |
| *Όχι* | 16 (76.2) |
| *Ναι* | 5 (23.8) |
| **Είδος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής** | |
| *ICSI* | 8 (38.1) |
| *IVF* | 13 (61.9) |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | |
| *Όχι* | 15 (71.4) |
| *Ναι* | 6 (28.6) |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 17 (81.0) |
| *Ναι* | 4 (19.0) |
| **Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 16 (76.2) |
| *Ναι* | 5 (23.8) |
| **Πολύδυμη Εγκυμοσύνη** | |
| *Όχι* | 21 (100.0) |
| **Αποβολή 1ου τριμήνου** | |
| *Όχι* | 20 (95.2) |
| *Ναι* | 1 (4.8) |
| **Έκτοπη Κύηση** | |
| *Όχι* | 20 (95.2) |
| *Ναι* | 1 (4.8) |
| **Συνέχιση Εγκυμοσύνης** | |
| *Όχι* | 1 (20.0) |
| *Ναι* | 4 (80.0) |
| **OCT-4 EXPRESSION** | |
| *Όχι* | 11 (52.4) |
| *Ναι* | 10 (47.6) |

**Πίνακας 5.3.2:** κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και έκβαση των προσπαθειών IVF ή ICSI στις ασθενείς που μελετήθηκαν. **Έκφραση του OCT-4 παρατηρήθηκε παρατηρήθηκε σε ποσοστό 47.6%.**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.3**

| | Median (IQR) |
|---|---|
| **Infertility Duration (ys)** | 4.00 (3.00, 6.50) |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2875.00 (2037.50, 3587.50) |
| **Διάρκεια Διέγερσης (ds)** | 10.00 (9.00, 11.00) |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 500.00 (309.00, 758.00) |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1910.00 (1570.00, 2467.00) |
| **No of follicles aspirated** | 8.00 (6.00, 10.00) |
| **No of oocyte retrieved** | 8.00 (6.00, 9.00) |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 71.00 (67.00, 78.00) |
| **Immature Oocytes Ratio (%)** | 29.00 (22.00, 33.00) |
| **Grade 3 Embryos** | 4.00 (4.00, 6.00) |
| **Grade 2 Embryos** | 0.00 (0.00, 2.00) |
| **High-Quality Embryos Ratio (%)** | 100.00 (66.67, 100.00) |
| **Proportion of Cleavage to 4-cells (%)** | 100.00 (100.00, 100.00) |
| **Αριθμός Εμβρύων που Μεταφέρθηκαν** | 3.00 (3.00, 3.00) |
| **OCT-4 Cp** | 28.80 (27.33, 30.45) |
| **OCT-4 CONCENTRATION** | 2190.00 (653.00, 7910.00) |
| **G6PD Cp** | 31.24 (25.70, 31.67) |
| **G6PD CONCENTRATION** | 701.00 (126.00, 22800.00) |
| **OCT-4/G6PD** | 1.75 (0.10, 98.21) |

**Πίνακας 5.3.3:** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά (data) των ασθενών που μελετήθηκαν. Αποτελέσματα της έκφρασης του OCT-4: **ο διάμεσος του λόγου OCT-4 mRNA/G6PD mRNA είναι 1.75 με ενδοτεταρτημοριακό εύρος από 0.10 έως 98.21.**

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.4

| | Infertility Causes | | |
|---|---|---|---|
| | **Ανδρικός** | **Σαλπιγγικός** | |
| | **N (%)** | **N (%)** | **p-value*** |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 0.146 |
| *Όχι* | 4 (50.0) | 11 (84.6) | |
| *Ναι* | 4 (50.0) | 2 (15.4) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 0.618 |
| *Όχι* | 6 (75.0) | 11 (84.6) | |
| *Ναι* | 2 (25.0) | 2 (15.4) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.325 |
| *Όχι* | 5 (62.5) | 11 (84.6) | |
| *Ναι* | 3 (37.5) | 2 (15.4) | |
| | **Median (IQR)** | **Median (IQR)** | **p-value**** |
| **Age (ys)** | 37.0 (34.5, 38.5) | 36.0 (35.0, 36.0) | 0.186 |
| **PRL (ng/ml)** | 11.1 (7.1, 13.8) | 12.1 (8.8, 21.9) | 0.390 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 449.5 (309.0, 638.0) | 508.0 (350.0, 933.0) | 0.385 |
| **No of oocyte retrieved** | 8.5 (6.0, 9.5) | 7.0 (6.0, 9.0) | 0.769 |

*Fisher's exact test

**Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.4:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες αιτιών υπογονιμότητας που αφορούσαν τον ανδρικό ή σαλπιγγικό παράγοντα ως προς το θετικό ή μη τεστ εγκυμοσύνης (p=0.146), την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης (p=0.618), την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης (p=0.325), την ηλικία των γυναικών (p=0.186), τα επίπεδα προλακτίνης προ της θεραπείας (p=0.390), τα επίπεδα της οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.385) και τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν (p=0.769).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.5**

| | PRESSION | | |
|---|---|---|---|
| | **n** | **%** | **p-value*** |
| **Infertility Causes** | | | 1.000 |
| *Ανδρικός* | 4 | 50.00 | |
| *Σαλπιγγικός* | 6 | 46.15 | |
| **FSH (IU/L)** | | | 1.000 |
| *<7* | 7 | 50.00 | |
| *>=7* | 3 | 50.00 | |
| **FSH (IU/L)** | | | 1.000 |
| *<6.2* | 5 | 50.00 | |
| *>=6.2* | 5 | 50.00 | |
| **LH (IU/L)** | | | 0.070 |
| *<4.6* | 3 | 30.00 | |
| *>=4.6* | 7 | 77.78 | |
| **FSH/LH** | | | 0.370 |
| *<1.4* | 6 | 66.67 | |
| *>=1.4* | 4 | 40.00 | |
| **BMI** | | | 1.000 |
| *<23.2* | 5 | 45.45 | |
| *>=23.2* | 5 | 50.00 | |
| **Age (ys)** | | | 0.659 |
| *<36* | 4 | 57.14 | |
| *>=36* | 6 | 42.86 | |
| **PRL (ng/ml)** | | | 1.000 |
| *<11.4* | 4 | 44.44 | |
| *>=11.4* | 4 | 44.44 | |
| **AMH (μg/l)** | | | 0.524 |
| *<8.8* | 1 | 20.00 | |
| *>=8.8* | 3 | 60.00 | |

**Πίνακας 5.3.5:** Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 σε σχέση με τις αιτίες υπογονιμότητας (ανδρικός ή σαλπιγγικός παράγοντας), τα επίπεδα FSH, LH, AMH στον ορό του αίματος, όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου, την ηλικία, το BMI και τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό του αίματος, όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.6**

| | OCT-4 EXPRESSION | | |
|---|---|---|---|
| | **n** | **%** | **p-value*** |
| **FSH/LH** | | | 1.000 |
| *<1.5* | 6 | 54.55 | |
| *>=1.5* | 4 | 50.00 | |
| **Infertility Duration (ys)** | | | 1.000 |
| *<5* | 5 | 45.45 | |
| *>=5* | 5 | 55.56 | |
| **Είδος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής** | | | 1.000 |
| *ICSI* | 4 | 50.00 | |
| *IVF* | 6 | 46.15 | |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | | | 0.670 |
| *<1910* | 4 | 40.00 | |
| *>=1910* | 6 | 54.55 | |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | | | 0.183 |
| *<2300* | 5 | 35.71 | |
| *>=2300* | 5 | 71.43 | |
| **Διάρκεια Διέγερσης (ds)** | | | 1.000 |
| *<11* | 6 | 46.15 | |
| *>=11* | 4 | 57.14 | |

**Πίνακας 5.3.6:** Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 σε σχέση με τον λόγο FSH/LH, την διάρκεια υπογονιμότητας, το είδος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ICSI ή IVF), επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης και την διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.7**

| | OCT-4 EXPRESSION | | |
|---|---|---|---|
| | **n** | **%** | **p-value*** |
| **Mature Oocytes** | | | 1.000 |
| *<6* | 5 | 50.00 | |
| *>=6* | 5 | 45.45 | |
| **No of oocyte retrieved** | | | 0.659 |
| *<7* | 4 | 57.14 | |
| *>=7* | 6 | 42.86 | |
| **Mature Oocytes** | | | 0.361 |
| *<5* | 4 | 66.67 | |
| *>=5* | 6 | 40.00 | |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | | | 0.480 |
| *<60* | 2 | 100.00 | |
| *60-74.9* | 4 | 44.44 | |
| *>=75* | 4 | 40.00 | |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | | | 1.000 |
| *<61* | 2 | 50.00 | |
| *>=61* | 8 | 47.06 | |
| **Embryos grade** | | | 0.351 |
| *3* | 5 | 35.71 | |
| *3 + 2* | 3 | 75.00 | |
| *2* | 2 | 66.67 | |
| **High-Quality Embryos Ratio (%)** | | | 0.361 |
| *<100* | 4 | 66.67 | |
| *100* | 6 | 40.00 | |

*Fisher's exact test

**Πίνακας 5.3.7:** Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του OCT-4 σε σχέση με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ελήφθησαν κατά την ωοληψία, τον αριθμό των ωαρίων που ελήφθησαν γενικά κατά την ωοληψία, τον λόγο των ώριμων ωαρίων, τον βαθμό των εμβρύων που δημιουργήθηκαν (grade) και τον λόγο των υψηλής ποιότητας εμβρύων (high-quality embryos ratio).

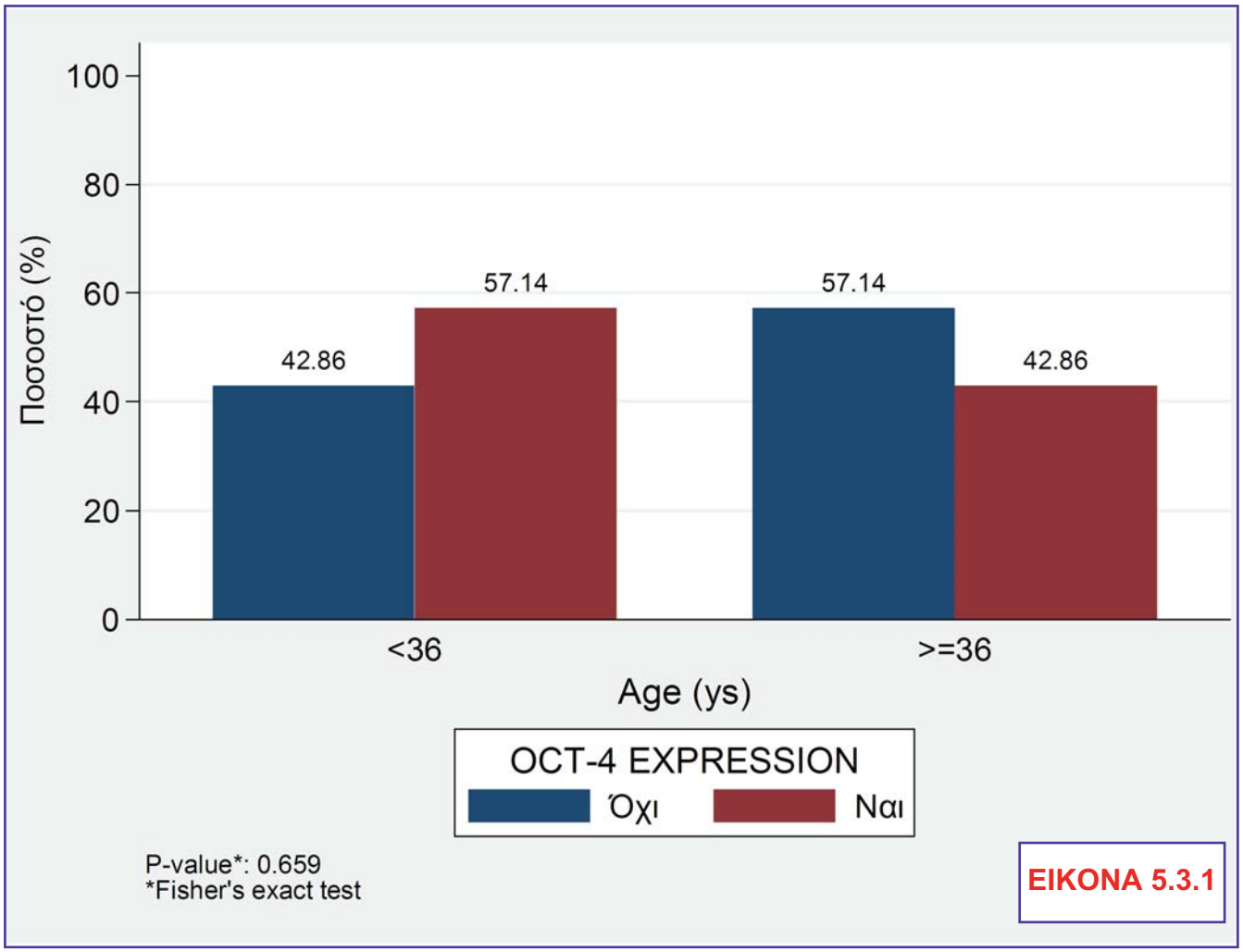
**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.8**

| | OCT-4 EXPRESSION | | |
|---|---|---|---|
| | **n** | **%** | **p-value*** |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 0.361 |
| *Όχι* | 6 | 40.00 | |
| *Ναι* | 4 | 66.67 | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 1.000 |
| *Όχι* | 8 | 47.06 | |
| *Ναι* | 2 | 50.00 | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.635 |
| *Όχι* | 7 | 43.75 | |
| *Ναι* | 3 | 60.00 | |

*Fisher's exact test

**Πίνακες 5.3.5 έως 5.3.8:** Παρουσίαση συνοπτικά των αποτελεσμάτων της στατιστικής μελέτης έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ή ICSI σε σχέση με κλινικές παραμέτρους.

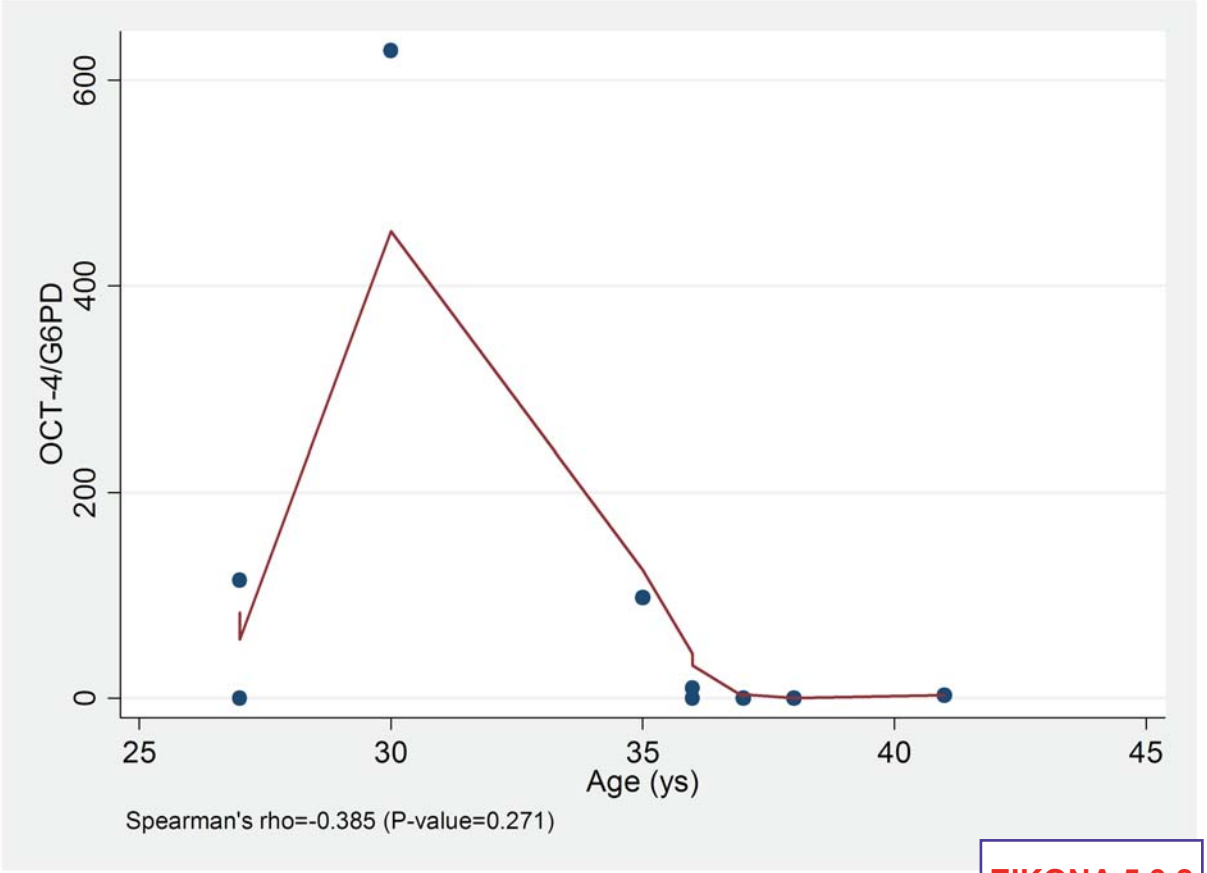
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία των γυναικών.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.1**

**Εικόνα 5.3.1:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο ηλικιακές ομάδες των γυναικών < 36 ετών και >= 36 ετών και την ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 (p = 0.659, Fisher's exact test).

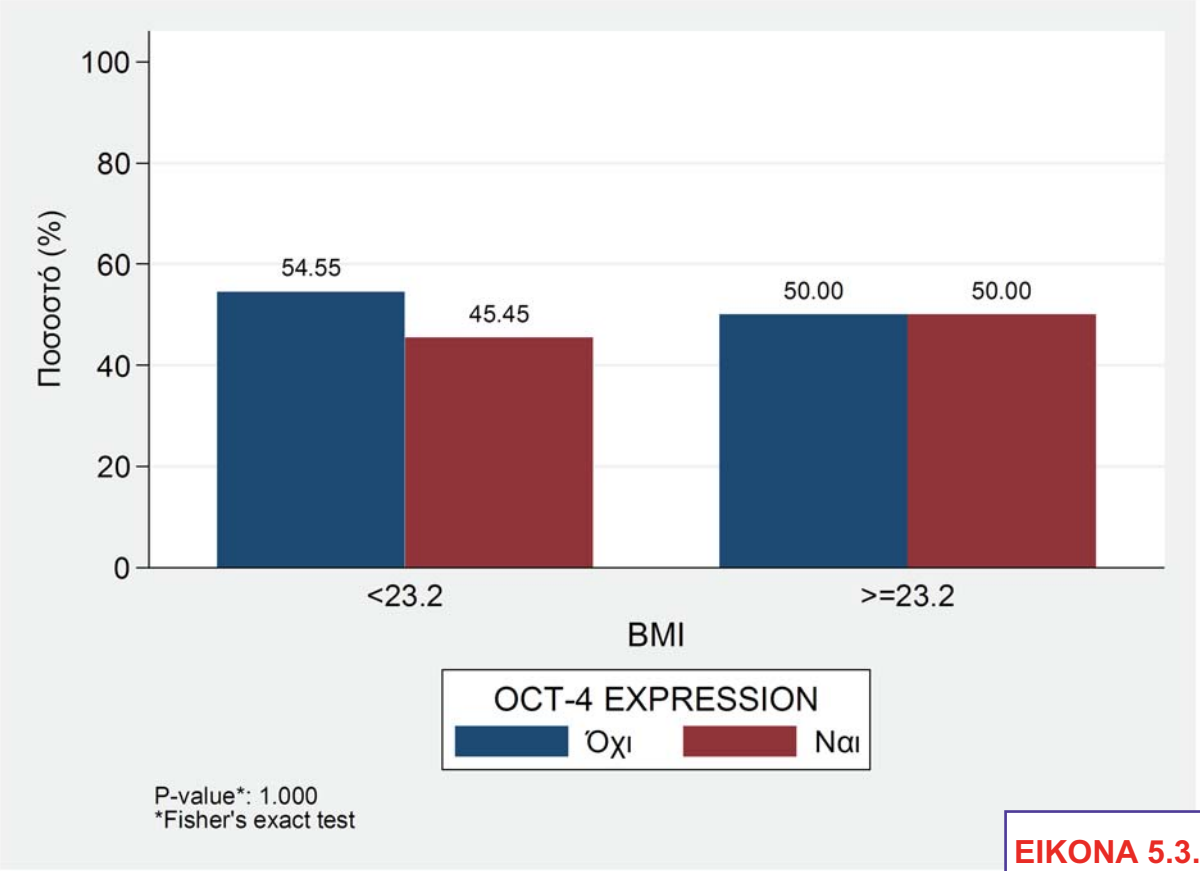
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα με την ηλικία των γυναικών.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.2**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.2:** Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ηλικίες των γυναικών και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης OCT-4 mRNA / G6PD mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και στην ηλικία των γυναικών (Spearman' rho = -0.385, p=0.271). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.385) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

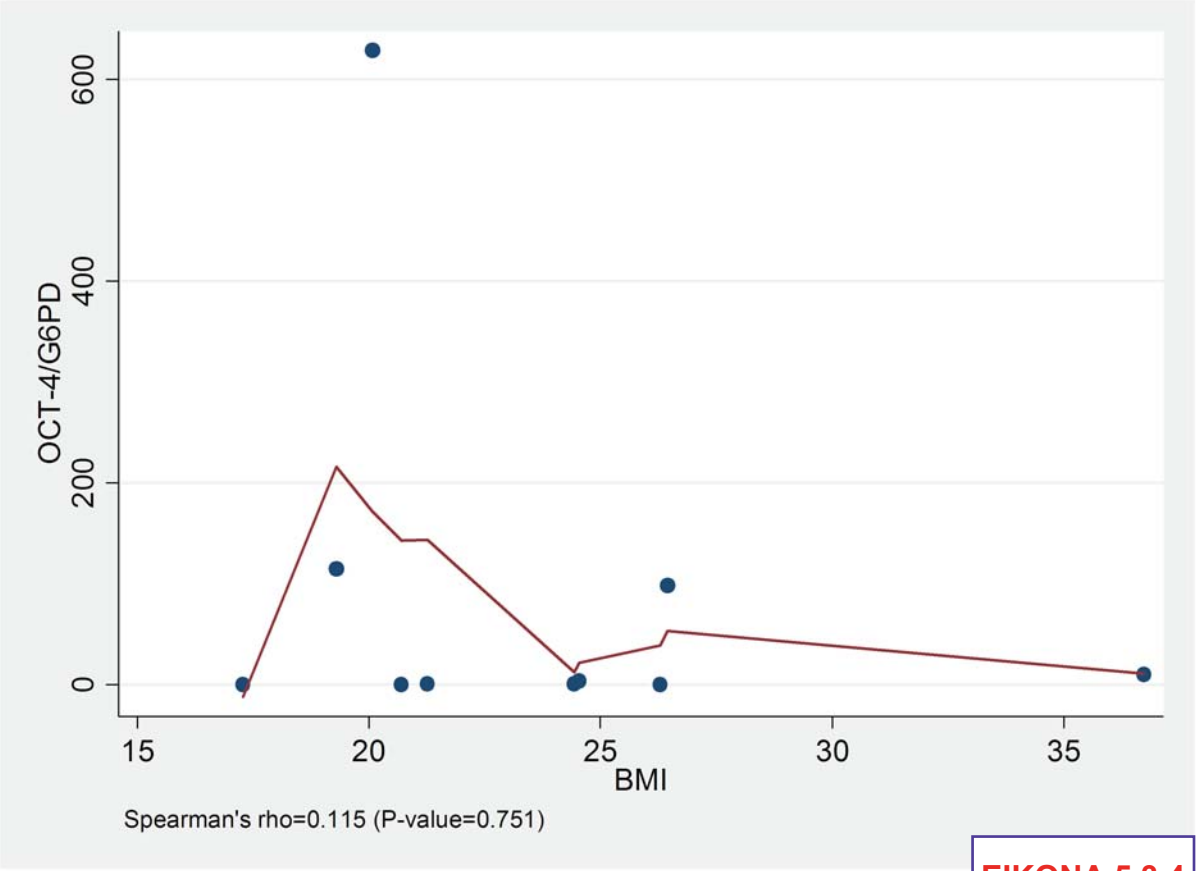
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με το BMI των γυναικών.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.3**

**Εικόνα 5.3.3:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με BMI < 23.2 και BMI >= 23.2 και την ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 (p = 1.00, Fisher's exact test).

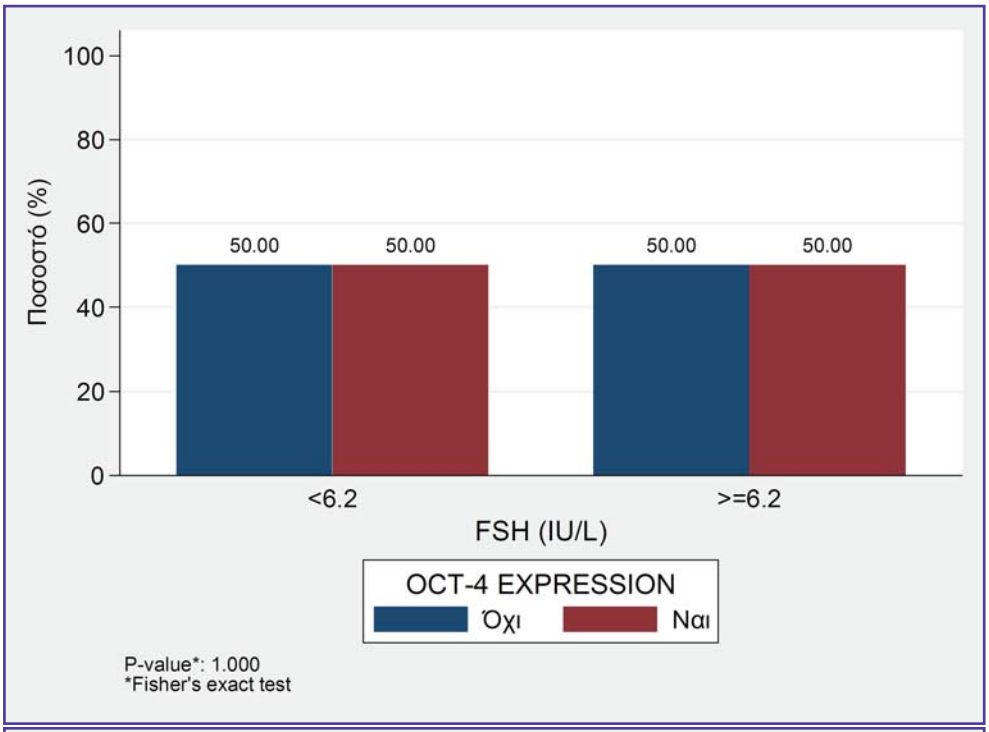
**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα με το BMI των γυναικών.**



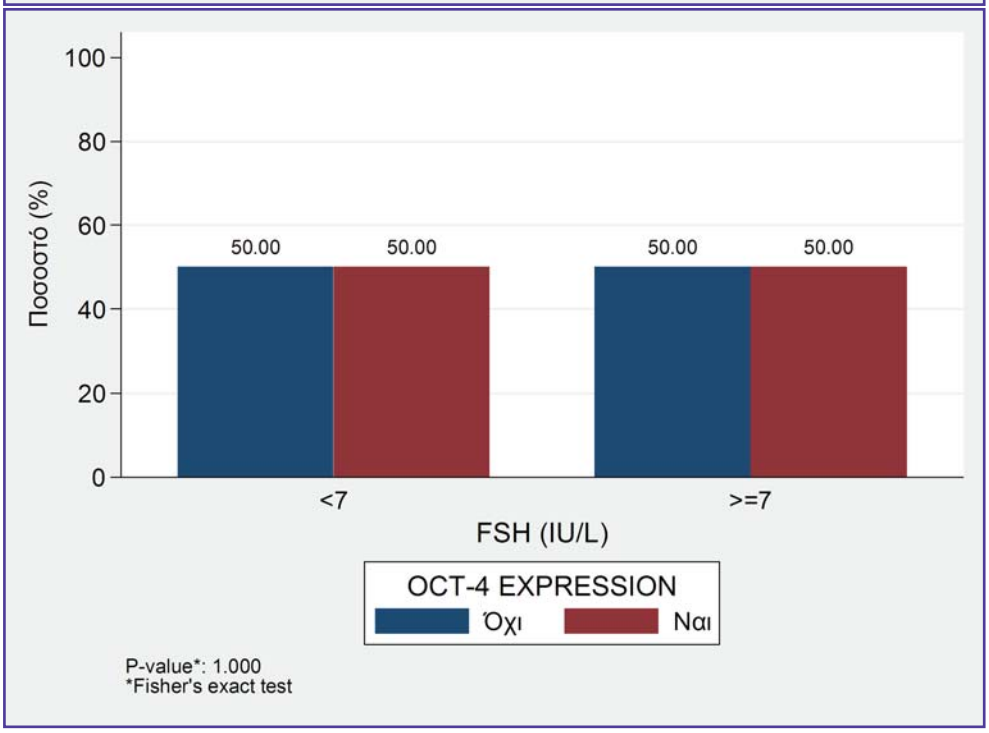

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.4**

**Εικόνα 5.3.4:** Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές BMI και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης OCT-4 mRNA / G6PD mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και στο BMI των γυναικών (Spearman' rho = 0.115, p=0.751). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.115) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**



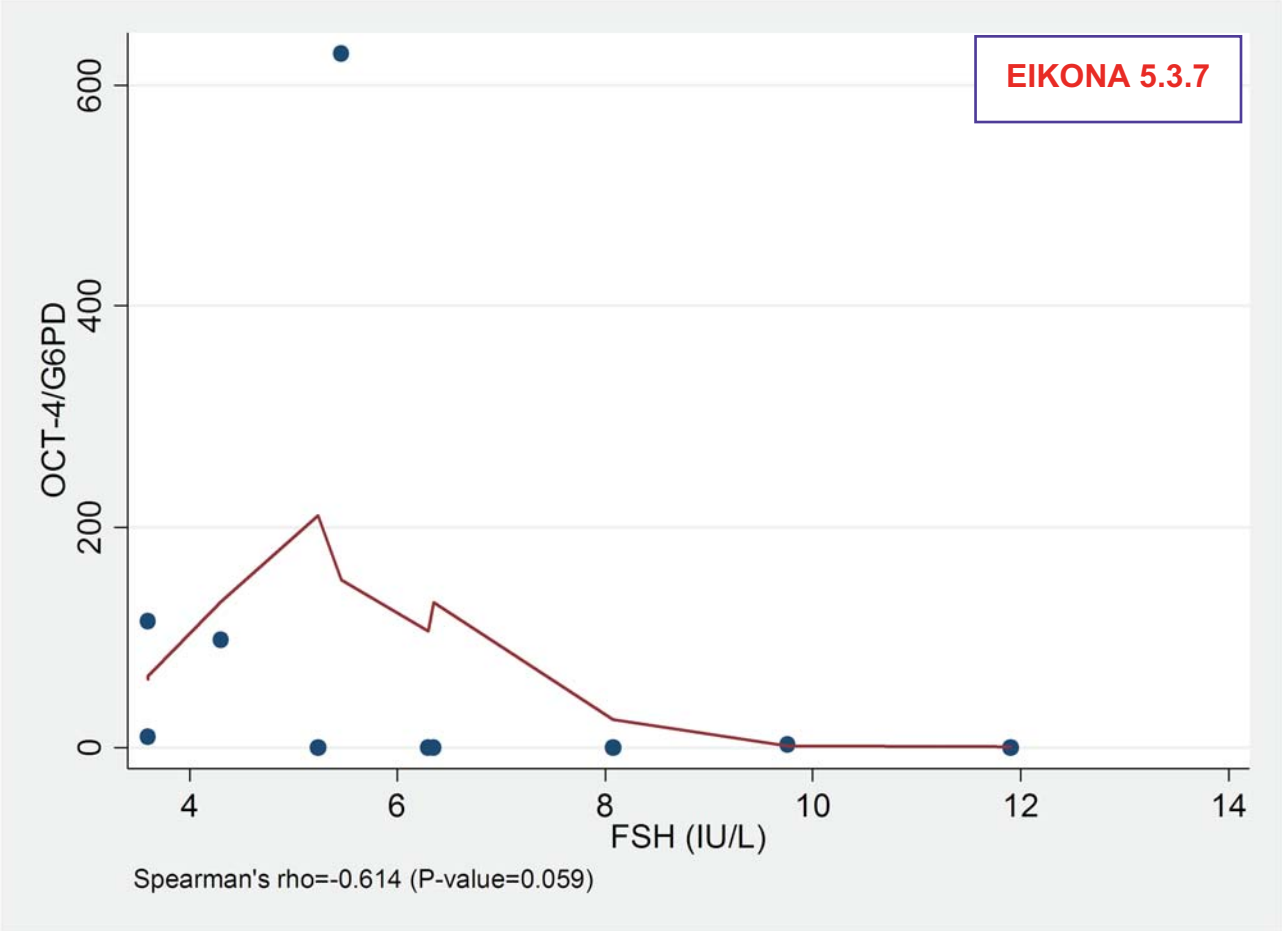

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.5**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.6**

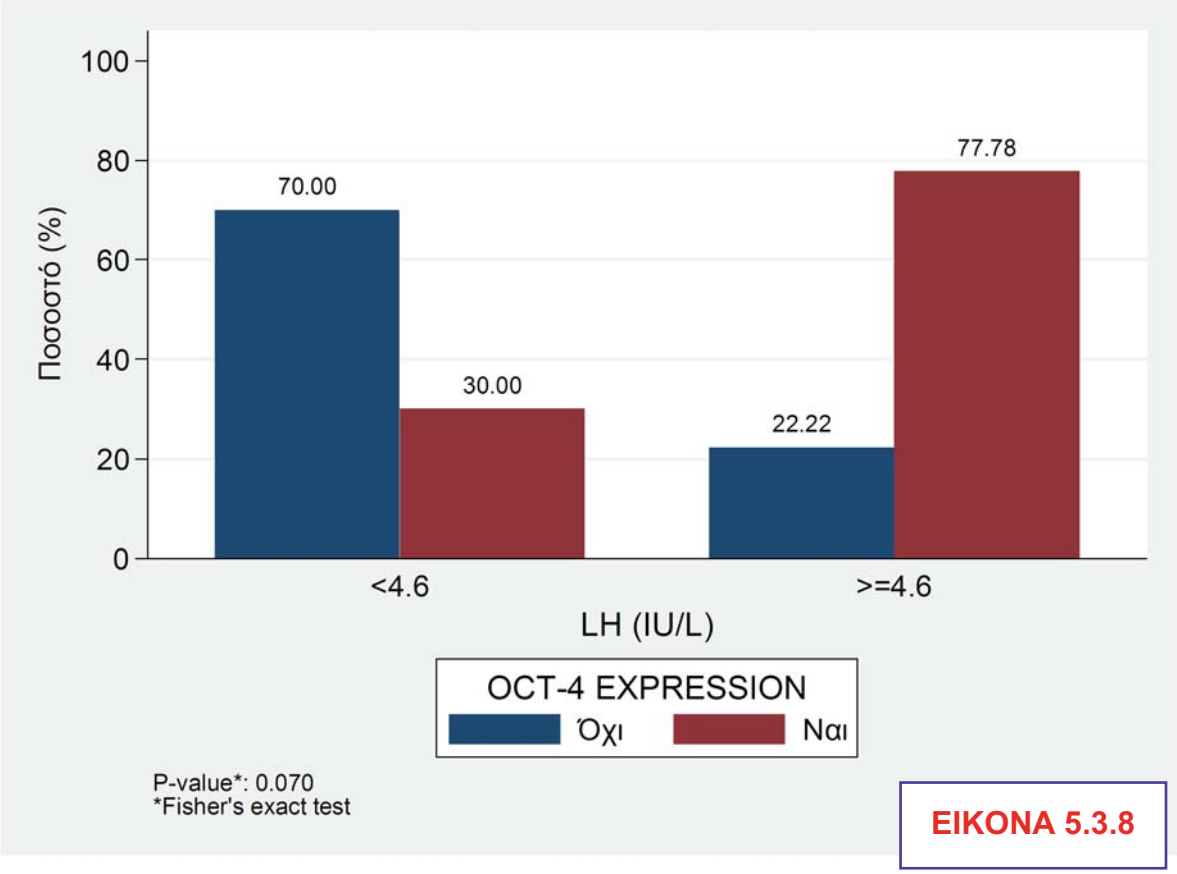
**Εικόνες 5.3.5. & 5.3.6:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση ή όχι του OCT-4 και τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=1.00, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.7:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = -0.614, p=0.059).

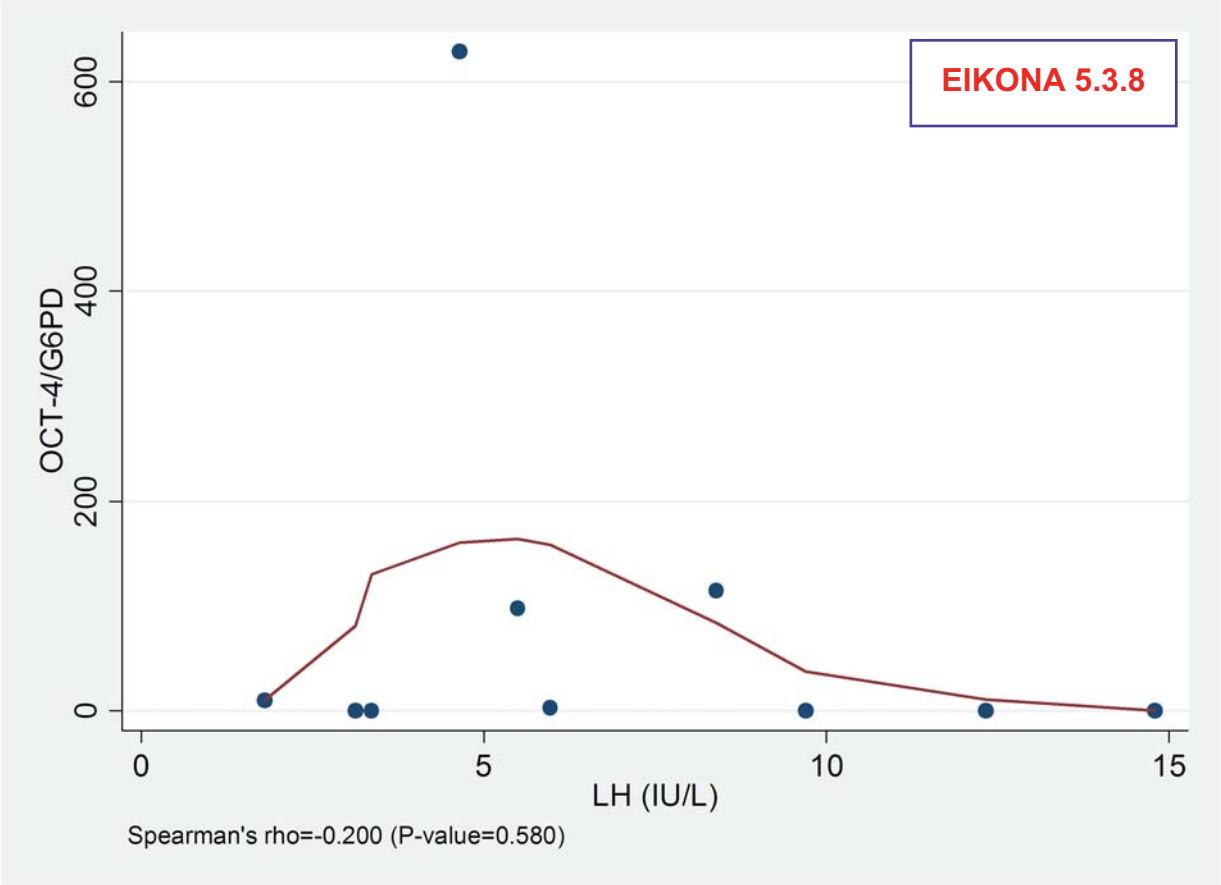
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.8**

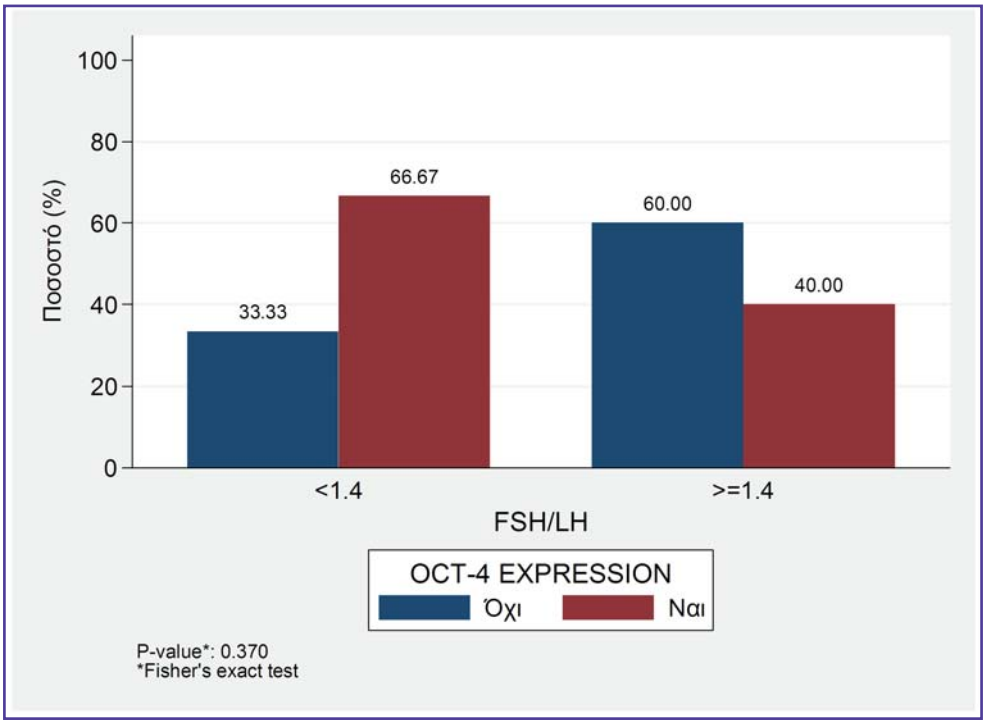
**Εικόνα 5.3.8:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με LH < 4.6 και LH >= 4.6 και στην έκφραση ή όχι του OCT-4 (p = 0.070, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα με τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**

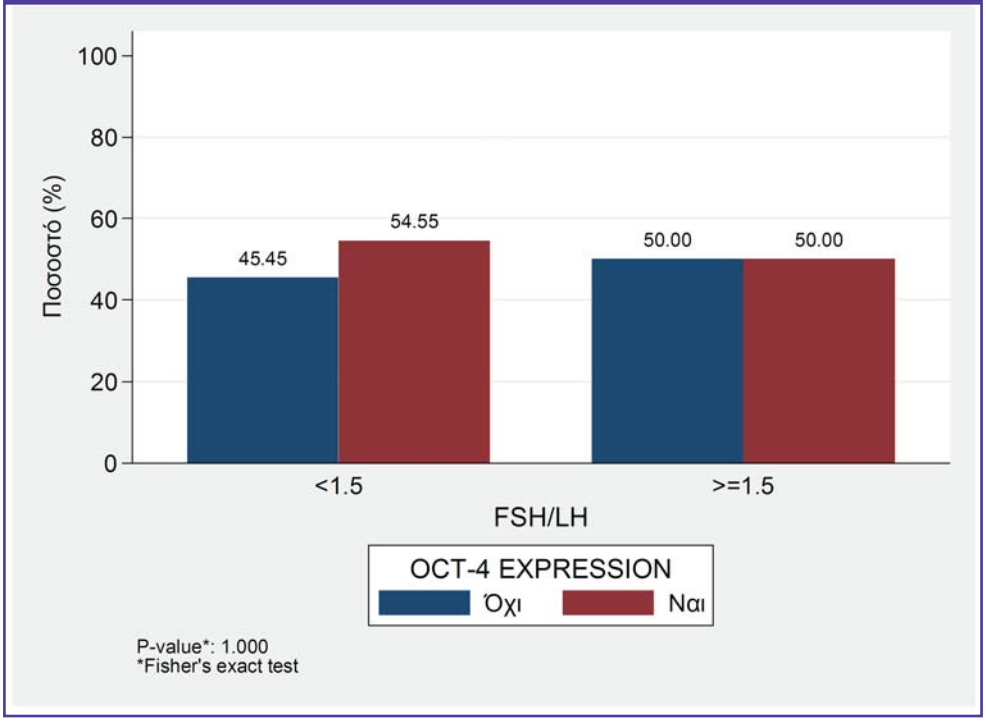



**Εικόνα 5.3.8.:** Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές LH και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου έκφρασης OCT-4 mRNA / G6PD mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τα επίπεδα της LH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = -0.20, p=0.580). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.20) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**



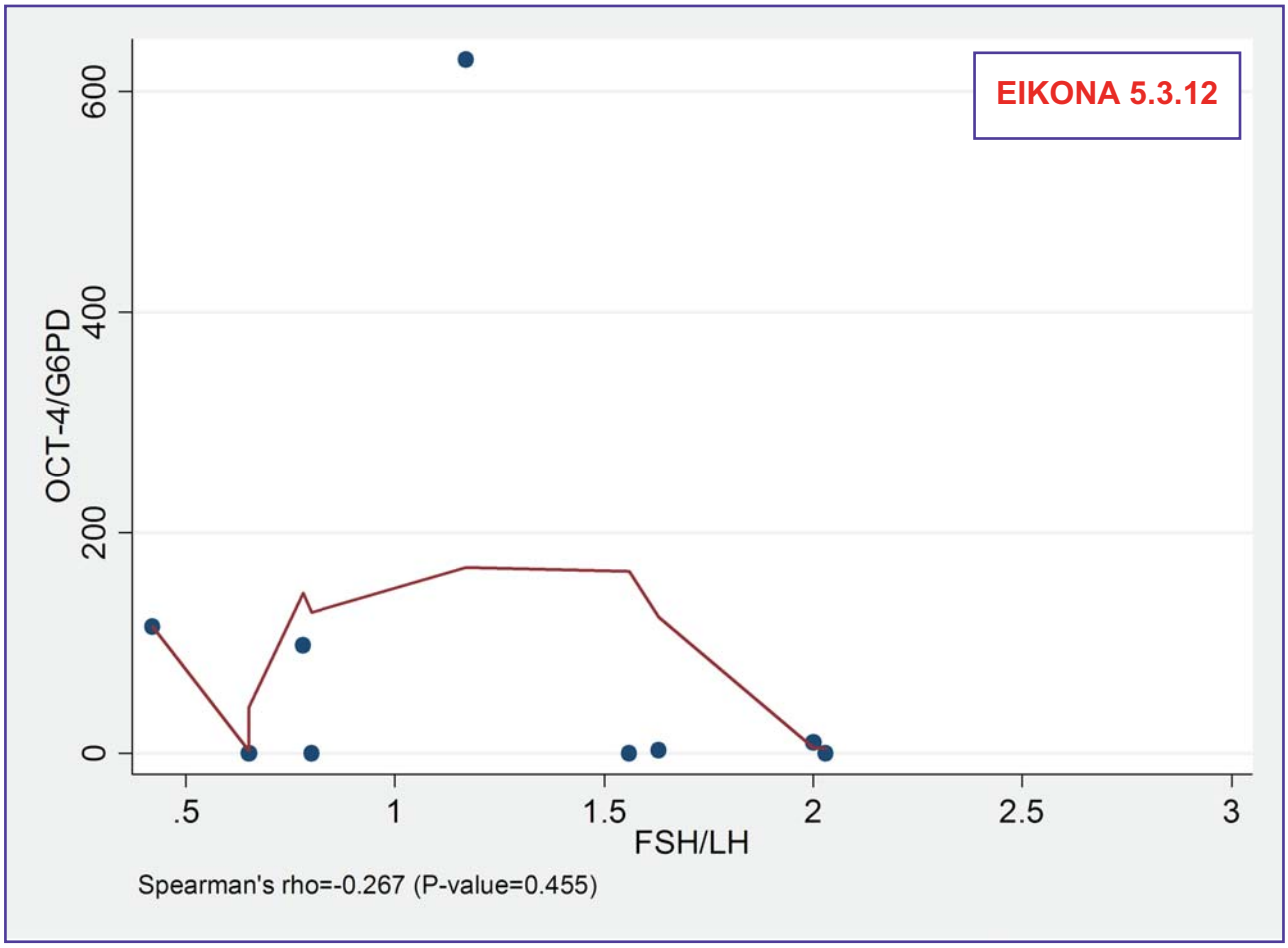

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.10**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.11**

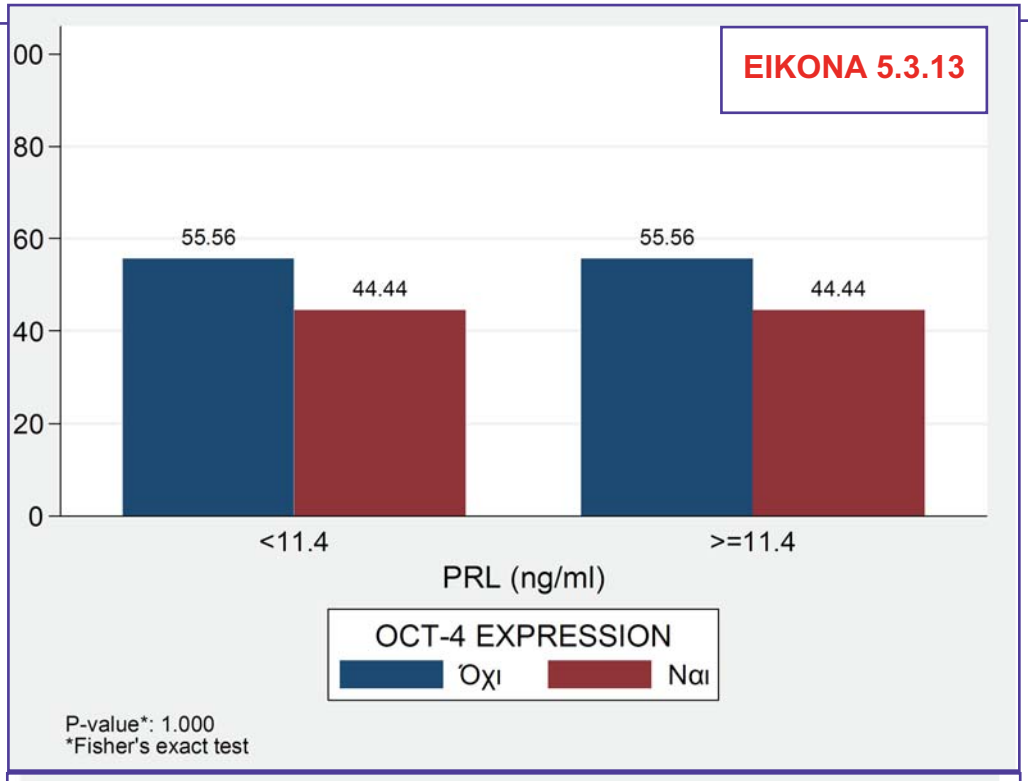
**Εικόνα 5.3.10 και 5.3.11:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με FSH/LH < 1.4 και FSH/LH >= 1.4 ή FSH/LH < 1.5 και FSH/LH >= 1.5 και τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p = 0.370 και p=1.00, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα με τον λόγο των επιπέδων FSH/LH στον ορό του αίματος των γυναικών.**

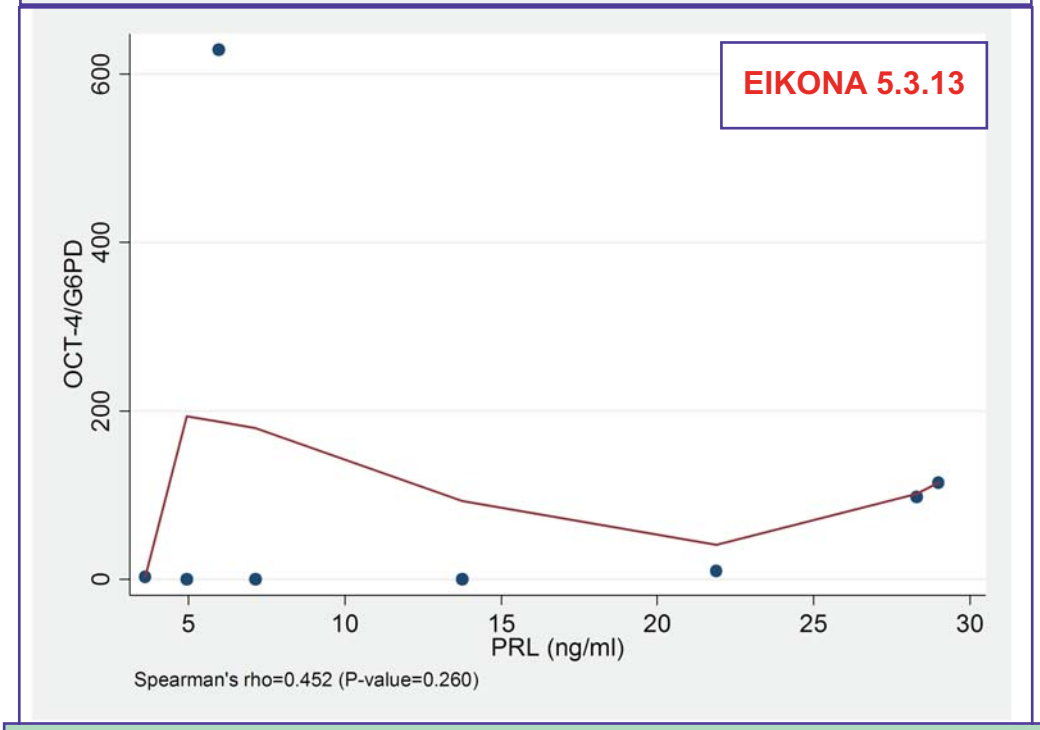



**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.12:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (Spearman' rho = -0.267, p=0.455). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.267) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Εικόνα 5.3.11: Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τα επίπεδα της PRL στον ορό του αίματος μέσα σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους.**



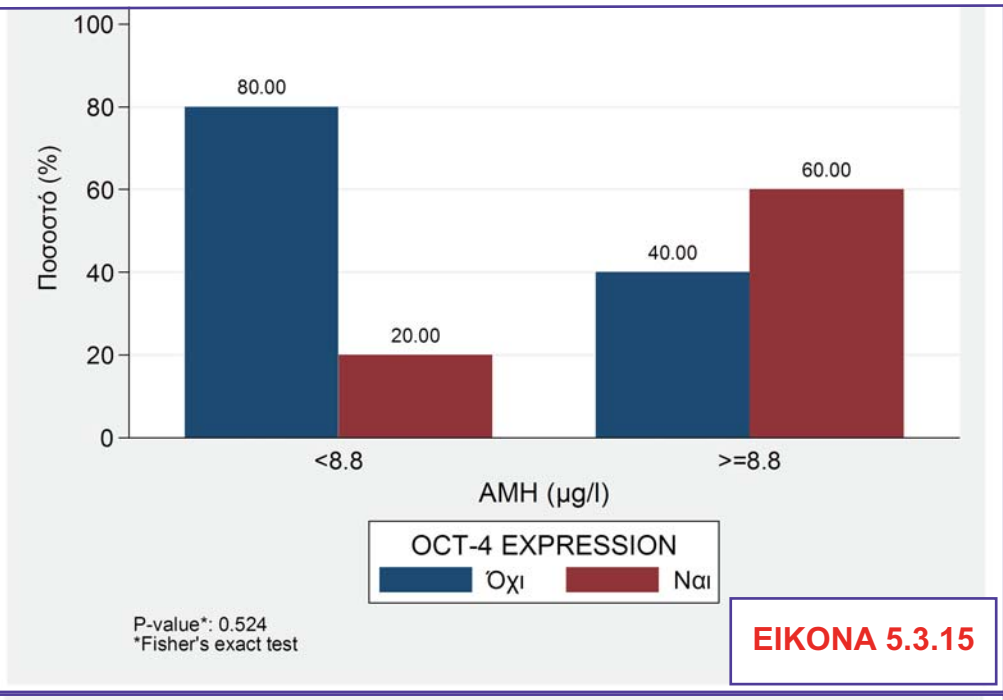

**Εικόνα 5.2.13:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με PRL < 11.4 και PRL >= 11.4 και την ύπαρξη ή απουσία του OCT-4 (p = 1.00, Fisher's exact test).




**Εικόνα 5.3.14:** Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα με τα επίπεδα PRL των γυναικών.

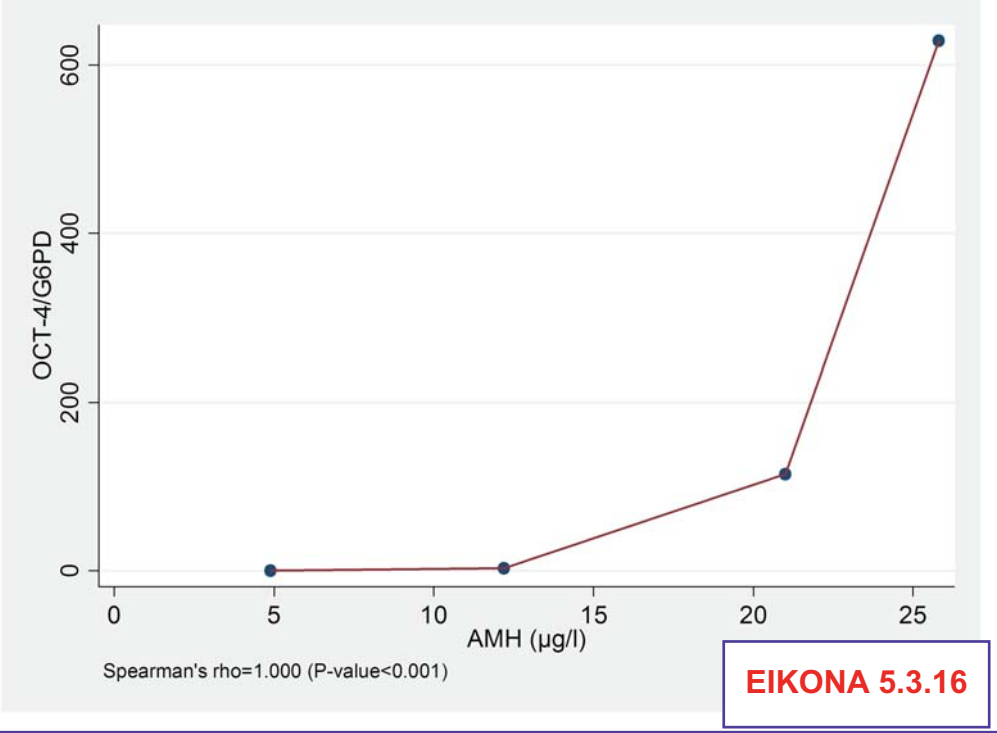
Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές της PRL και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου OCT-4 mRNA / G6PD mRNA. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τις τιμές PRL στον ορό του αίματος των γυναικών σε έναν από τους 6 προηγούμενους γεννητικούς κύκλους (Spearman' rho = 0.452, p=0.260).

**Εικόνα 5.2.15: Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος στην αρχή του γεννητικού κύκλου.**




ΕΙΚΟΝΑ 5.3.15

**Εικόνα 5.2.15:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με AMH < 8.8 και AMH >= 8.8 και την ύπαρξη ή απουσία του OCT-4 (p = 0.524, Fisher's exact test).

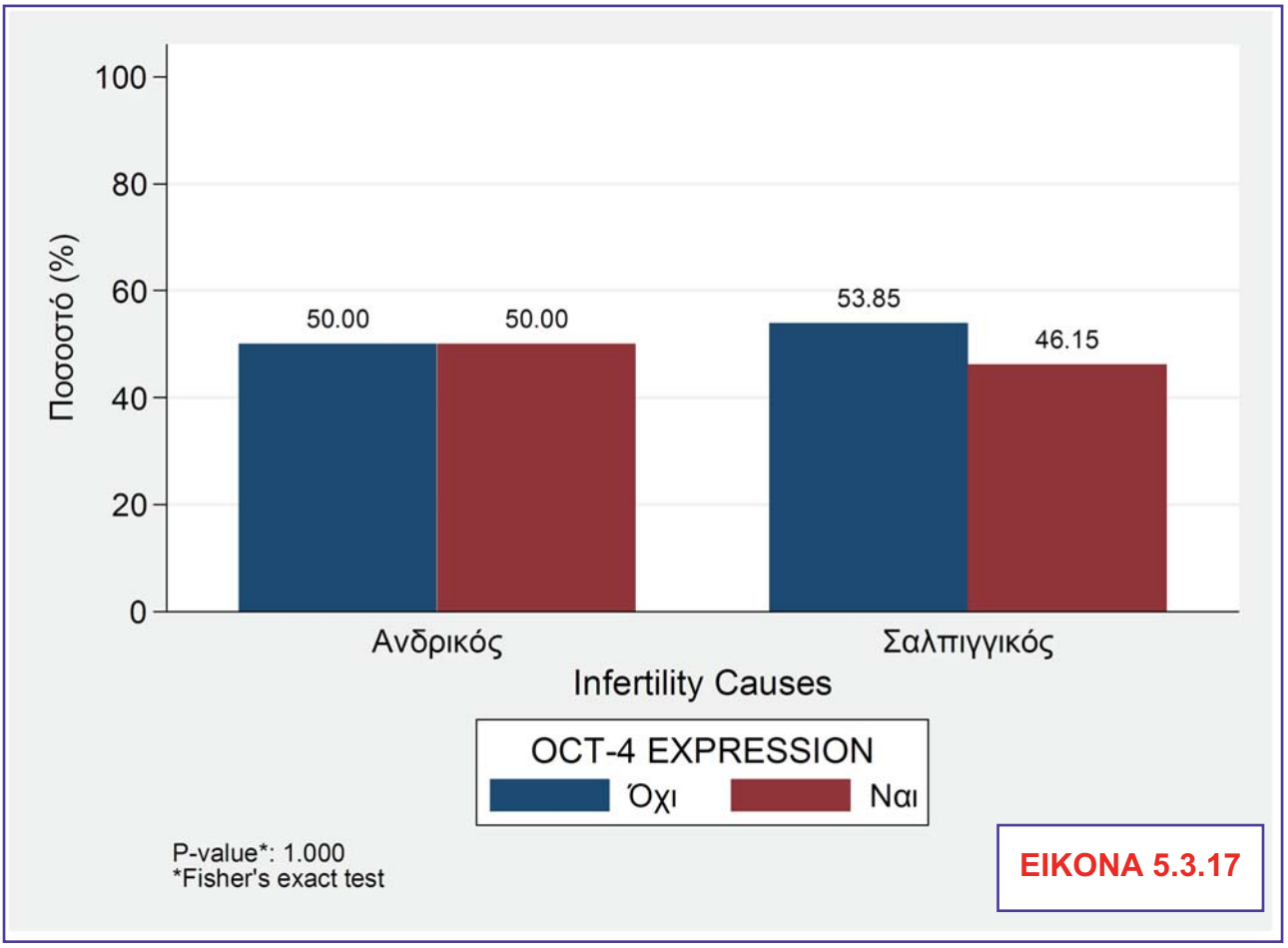



ΕΙΚΟΝΑ 5.3.16

**Εικόνα 5.2.16:** Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάλογα με τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος των γυναικών.

Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι τιμές της AMH και στον κάθετο άξονα οι τιμές του λόγου OCT-4 mRNA / G6PD mRNA. **Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τις τιμές της AMH στον ορό του αίματος των γυναικών στην αρχή του γεννητικού κύκλου (Spearman' rho = 1.00, p=0.001).**

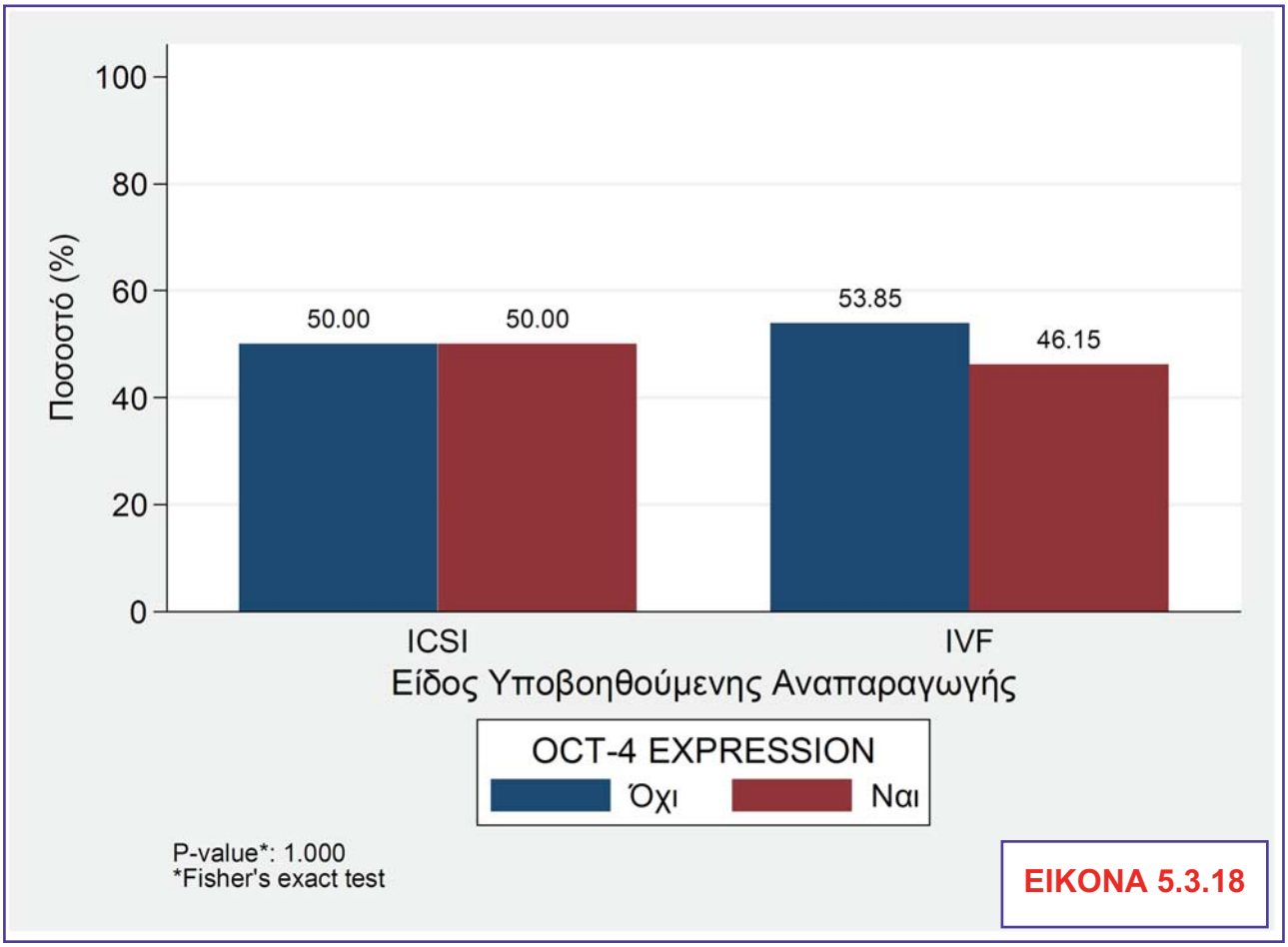
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με την αιτία υπογονιμότητας.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.17**

**Εικόνα 5.3.17:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ομάδα των φυσιολογικών γυναικών (αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας) σε σχέση με την ομάδα γυναικών με σαλπιγγικό παράγοντα και την ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 (p = 1.00, Fisher's exact test).

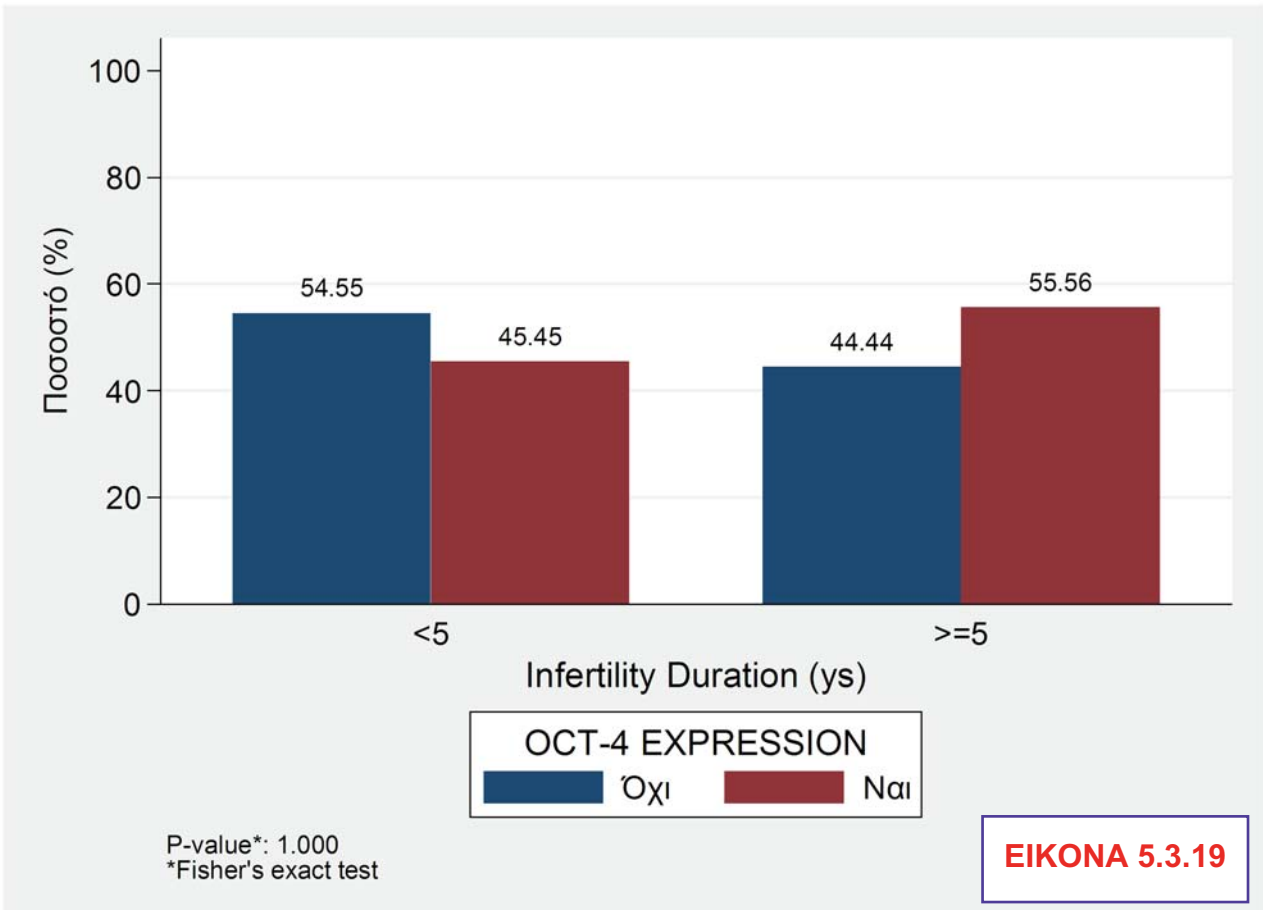
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με το είδος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ICSI σε σχέση με IVF).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.18**

**Εικόνα 5.2.18:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών που υποβλήθηκαν σε ICSI σε σχέση με τις ομάδες γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF και την ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 (p = 1.00, Fisher's exact test).

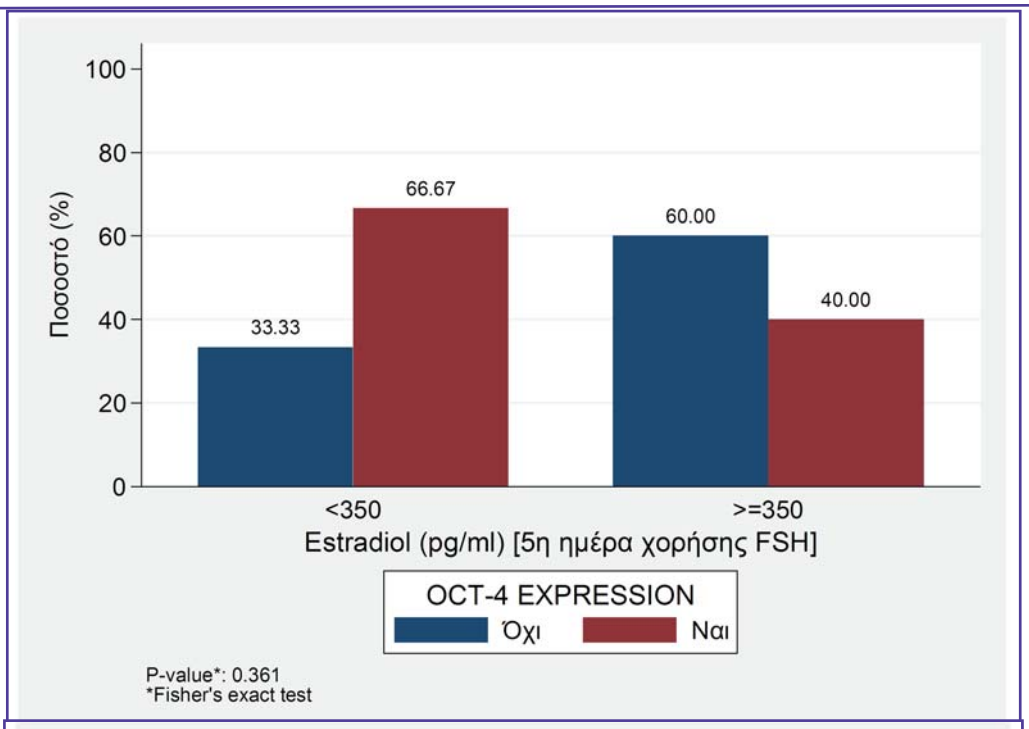
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με την διάρκεια υπογονιμότητας.**



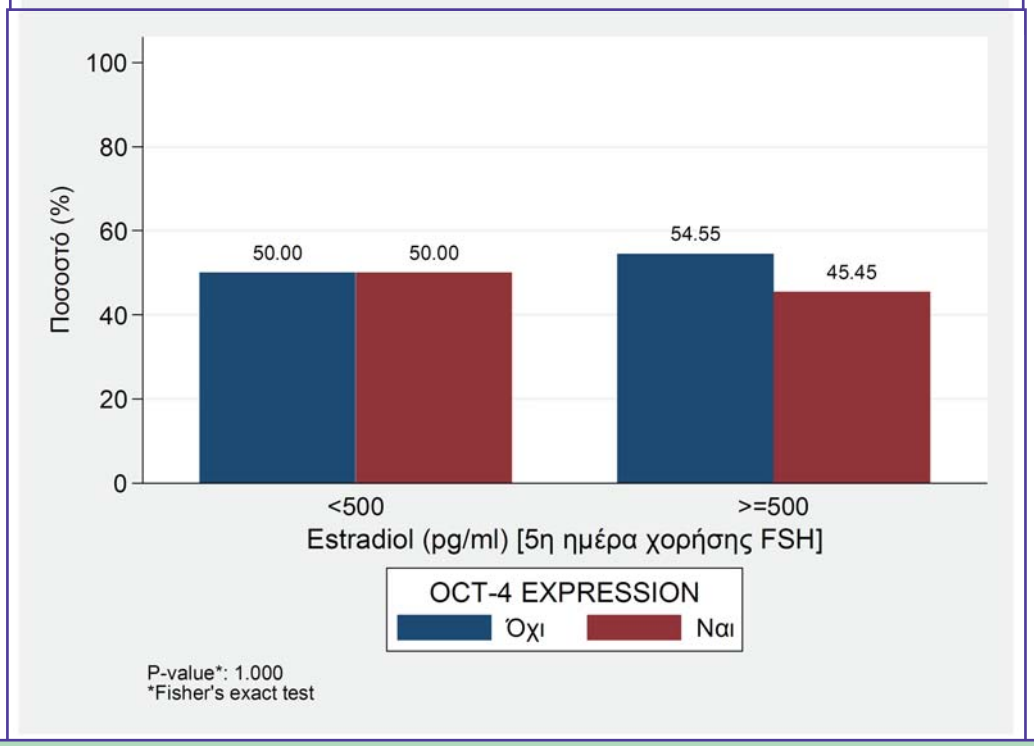

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.19**

**Εικόνα 5.2.19:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις ομάδες γυναικών με διάρκεια υπογονιμότητας 5 < έτη σε σχέση με διάρκεια υπογονιμότητας >= 5 έτη και την ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 (p = 1, Fisher's exact test).

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH.**



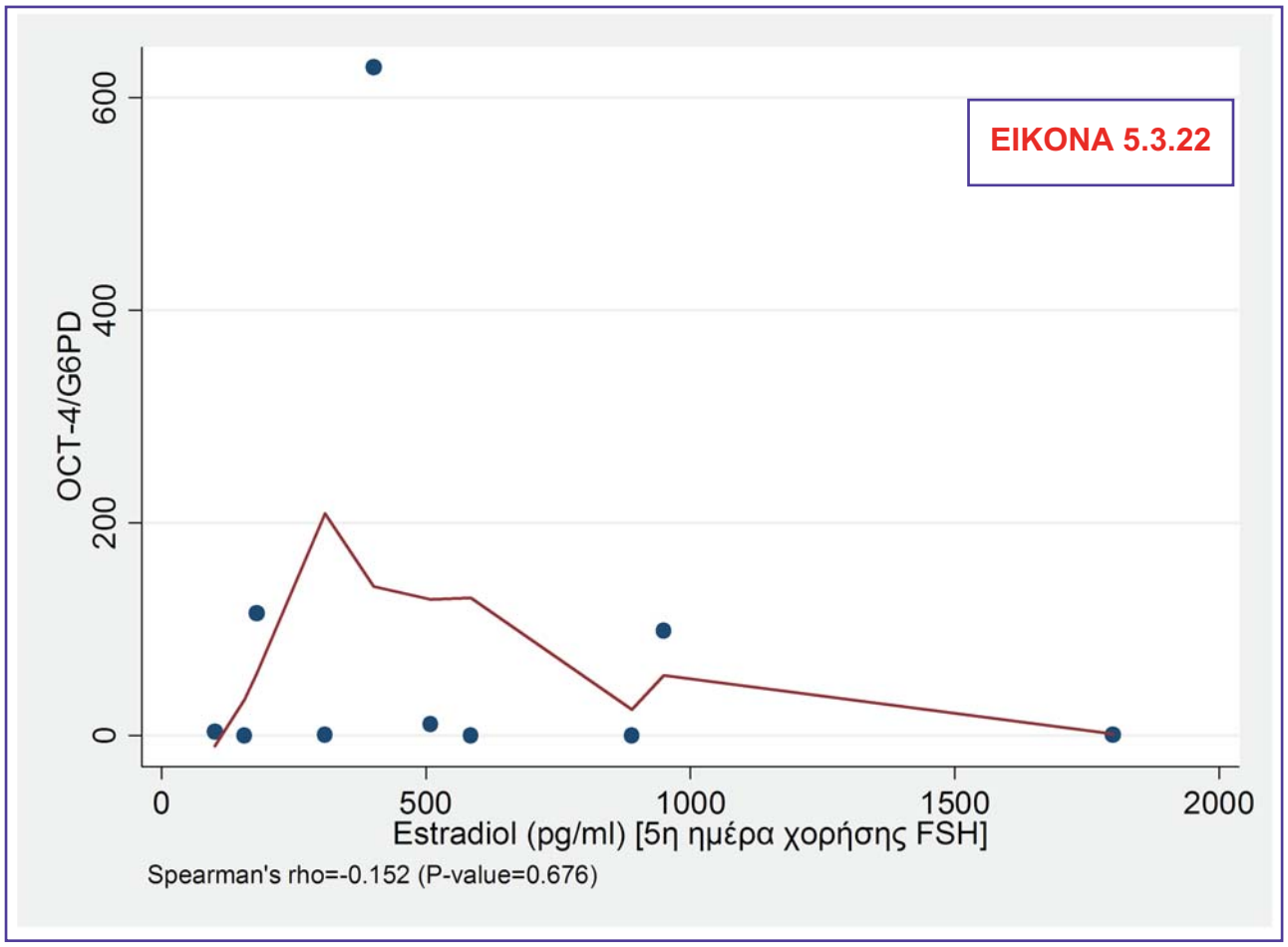

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.20**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.21**

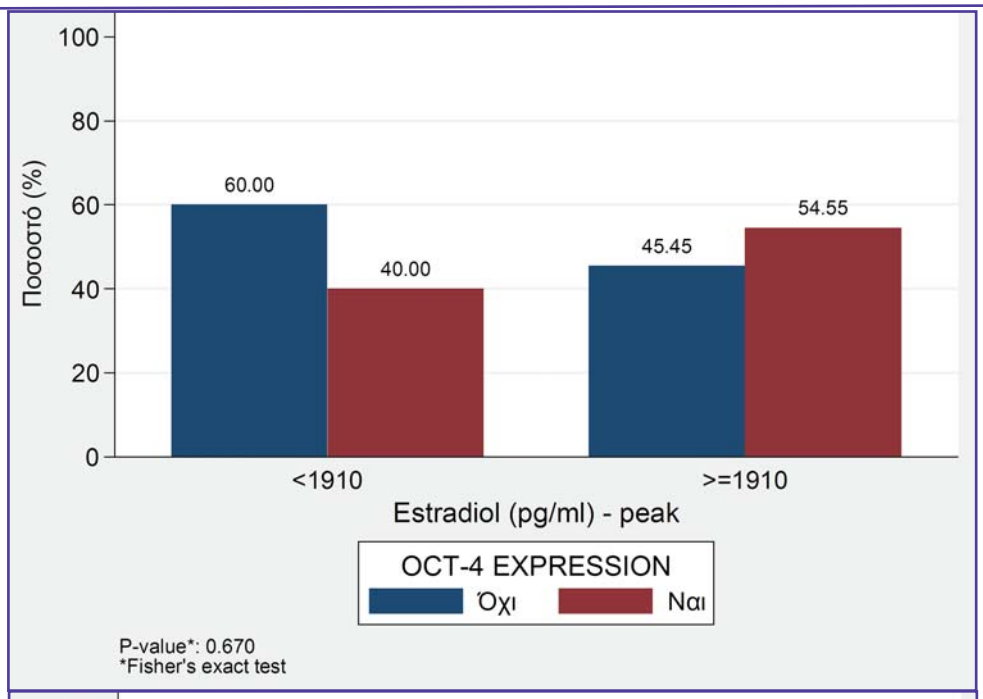
**Εικόνες 5.3.20 & 5.2.21:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης FSH (p=0.361 & p= 1 αντίστοιχα, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα τις τιμές της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών την 5η ημέρα χορήγησης της FSH.**

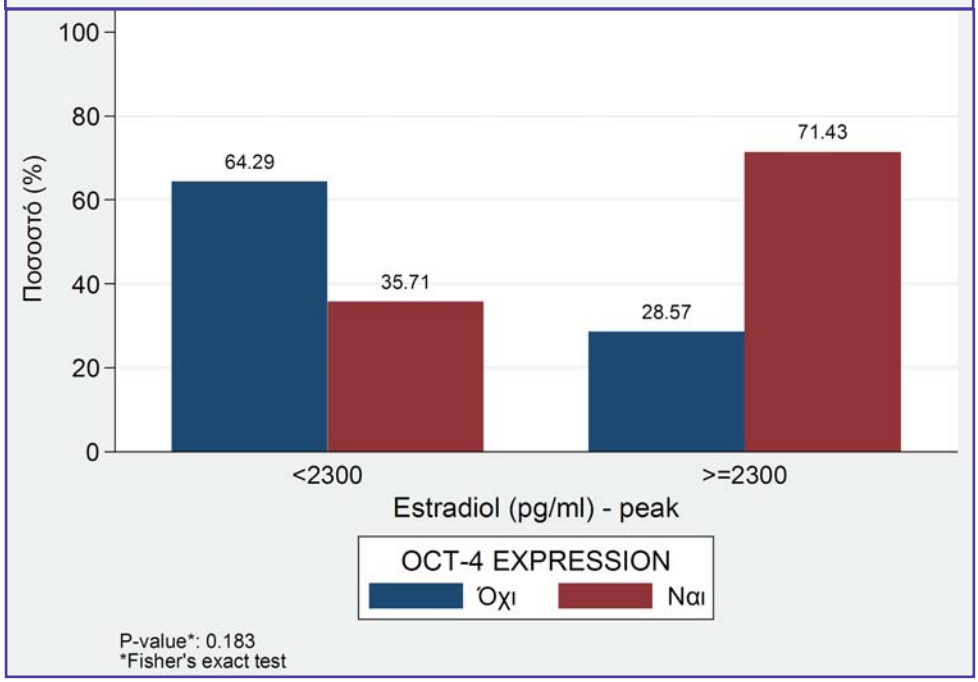



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.22:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τα επίπεδα της οιστραδιόλης ($E_2$) την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (Spearman' rho = -0.152, p=0.676). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.152) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG.**



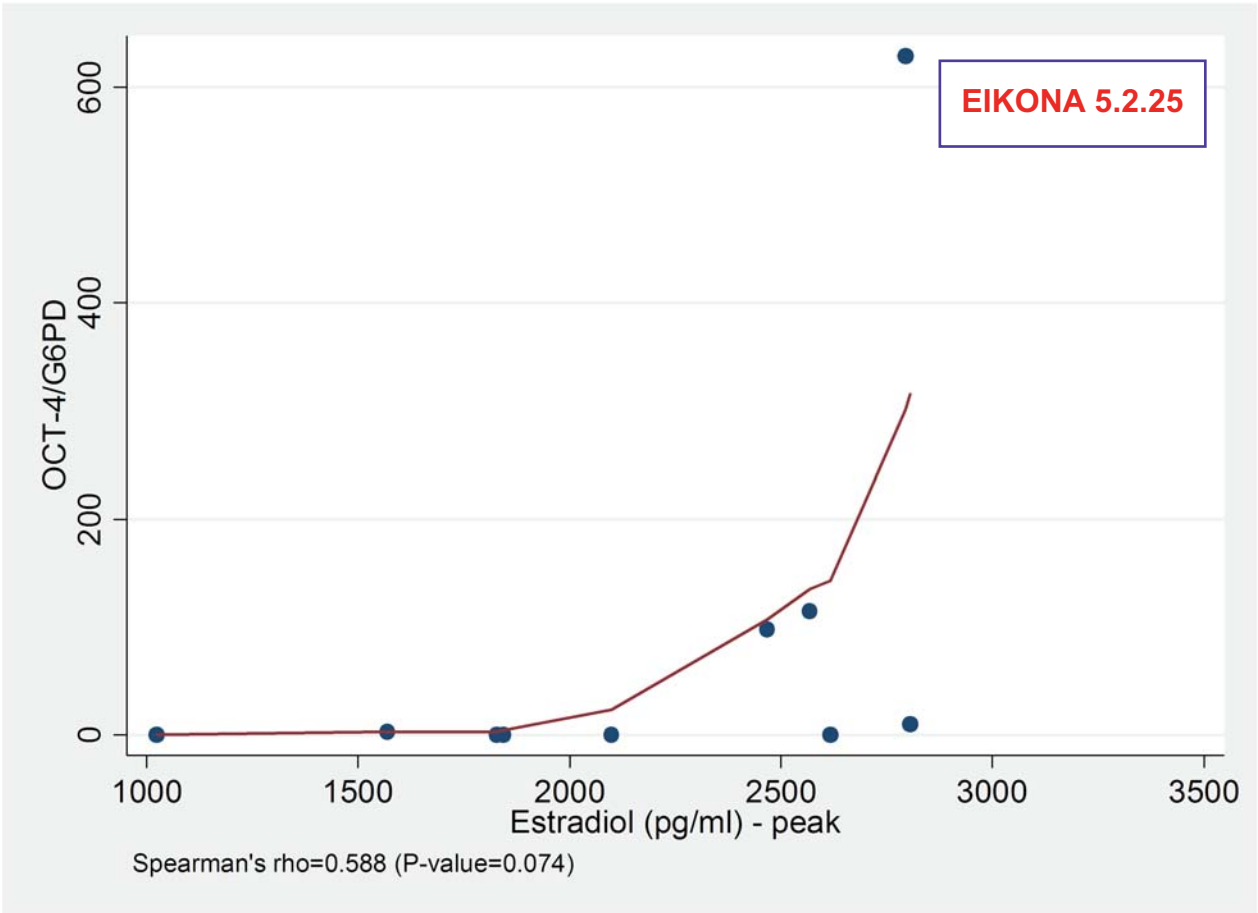

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.23**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.24**

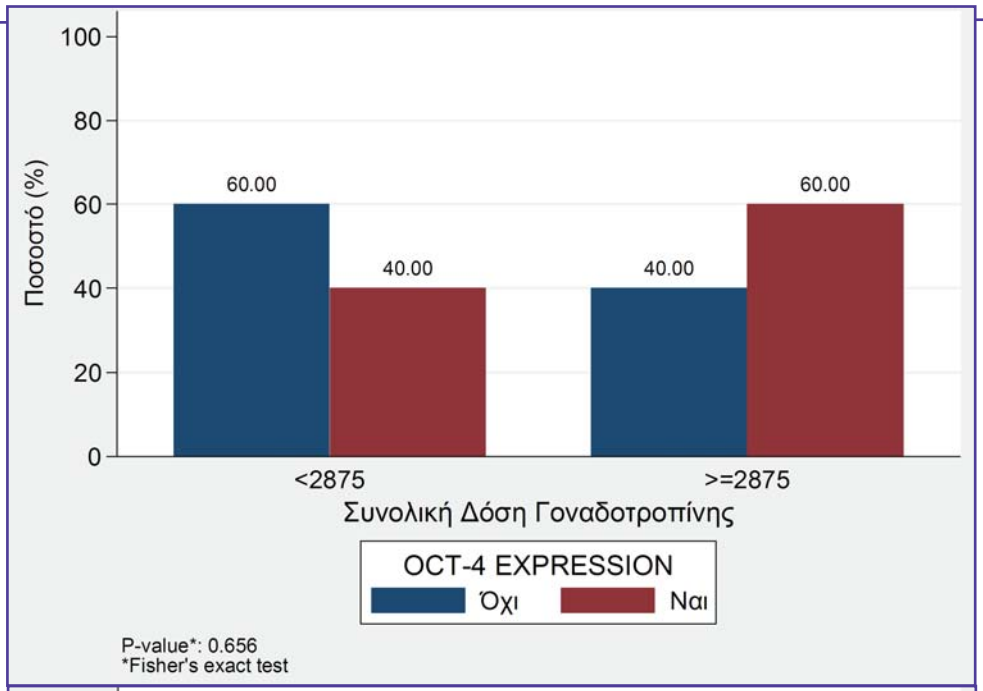
**Εικόνες 5.2.23. & 5.2.24:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG ($p=0.670$ & $p=0.183$ αντίστοιχα των εικόνων, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 ανάλογα τις τιμές αιχμής της οιστραδιόλης ($E_2$) στον ορό του αίματος των γυναικών όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG.**

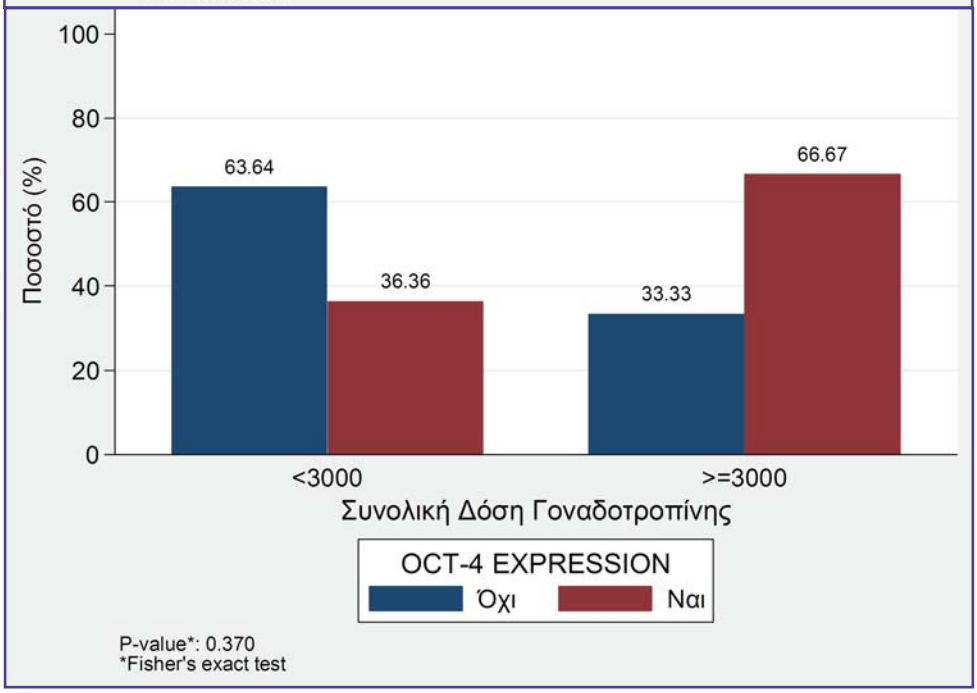



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.25:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τα επίπεδα της οιστραδιόλης ($E_2$) την 5η ημέρα πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας (Spearman' rho = 0.588, p=0.074).

**Επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την συνολική δόση της ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης (FSH) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**



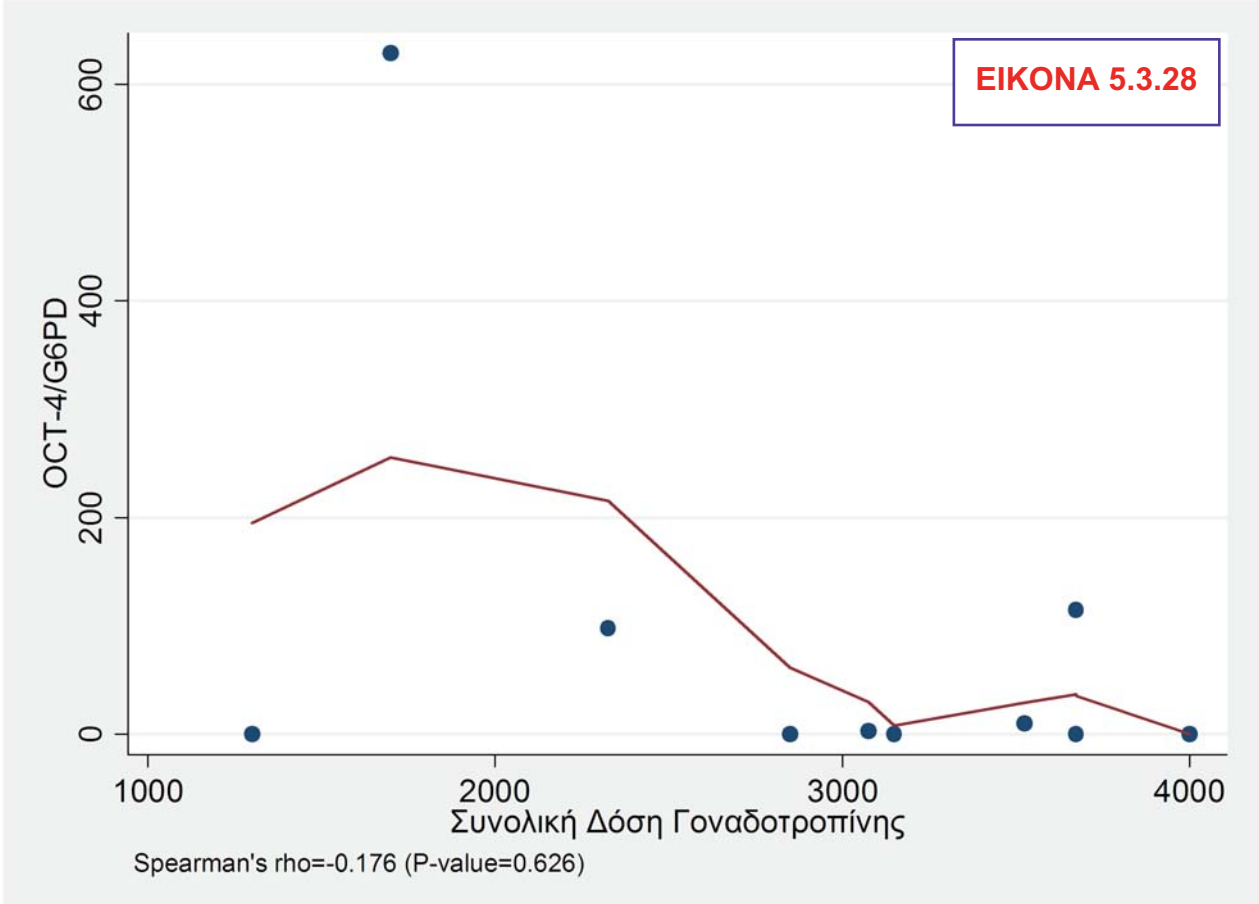

**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.26**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.27**

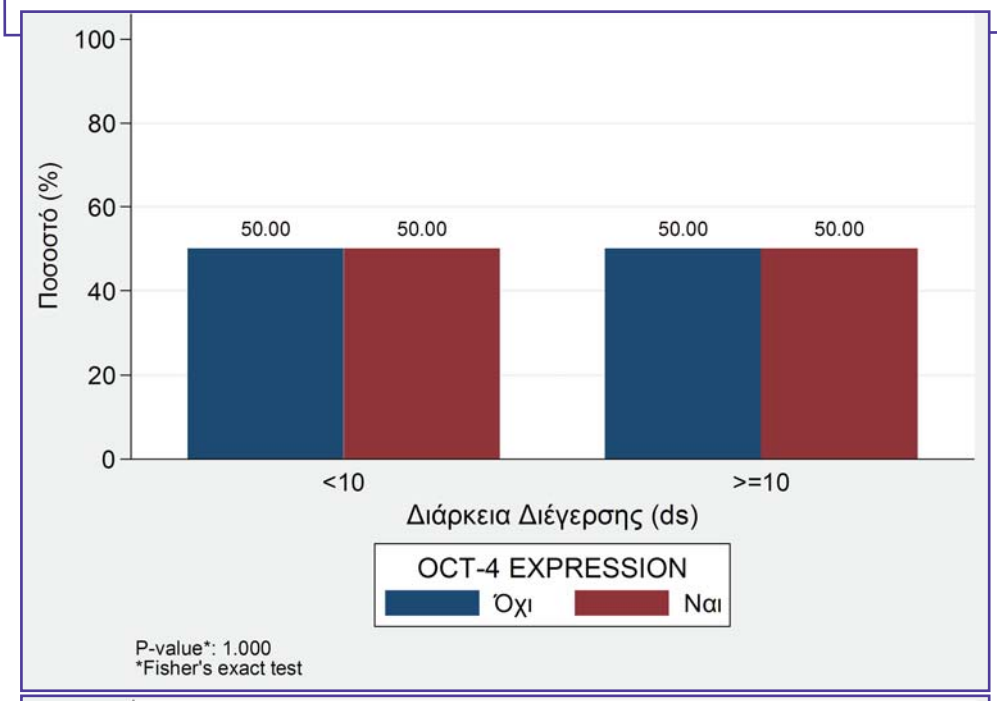
**Εικόνες 5.2.26 & 5.2.27:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και την συνολική δόση FSH που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.656 και p=0.370 αντίστοιχα των εικόνων, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την συνολική δόση της ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης (FSH) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**

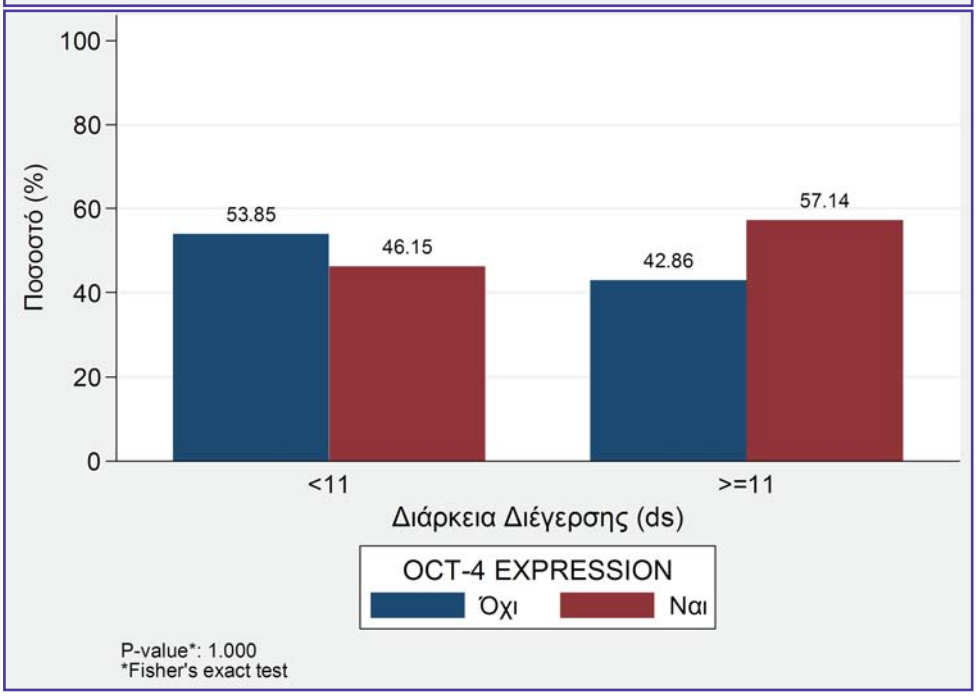



**ΕΙΚΟΝΑ 5.2.28:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τις δόσεις της FSH που χρειάσθηκαν για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (Spearman' rho = -0.176, p=0.626). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.176) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των ημερών διέγερσης (διάρκεια διέγερσης).**



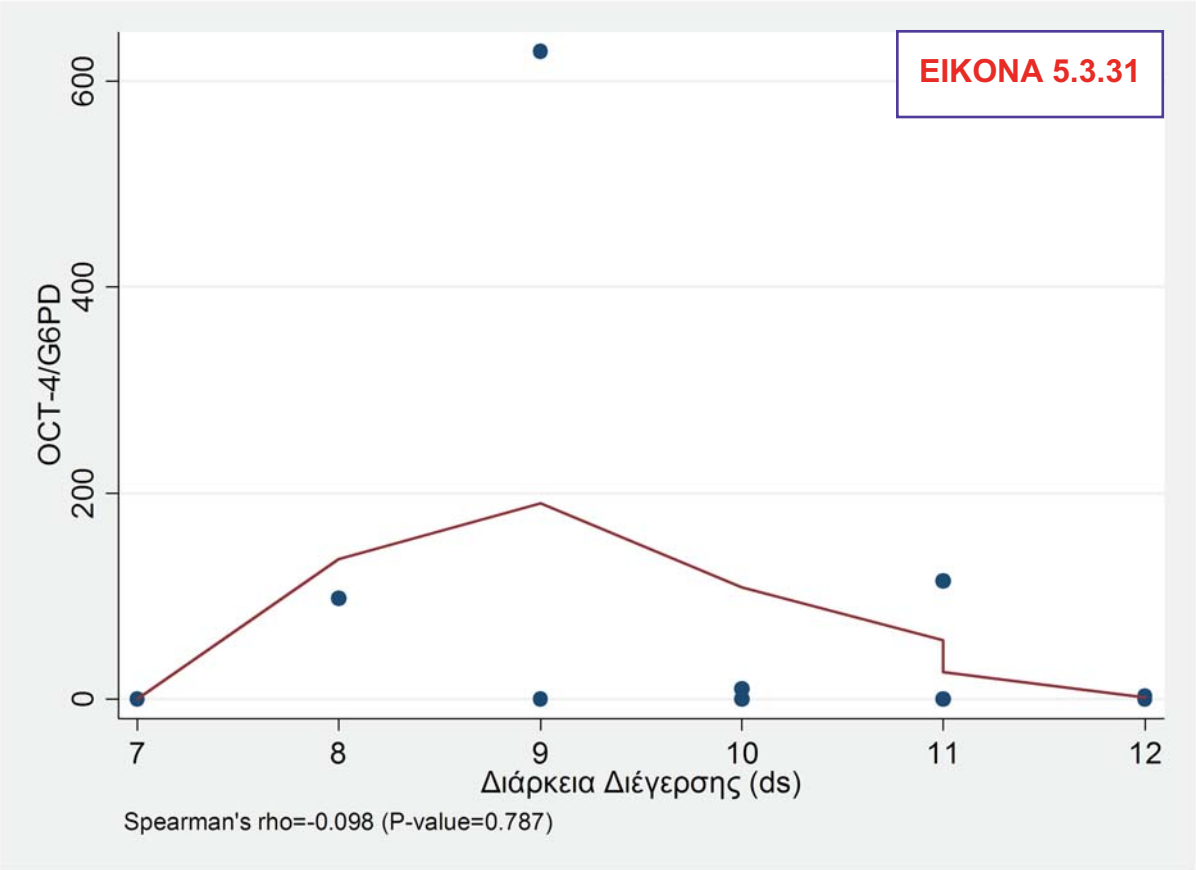

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.29**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.30**

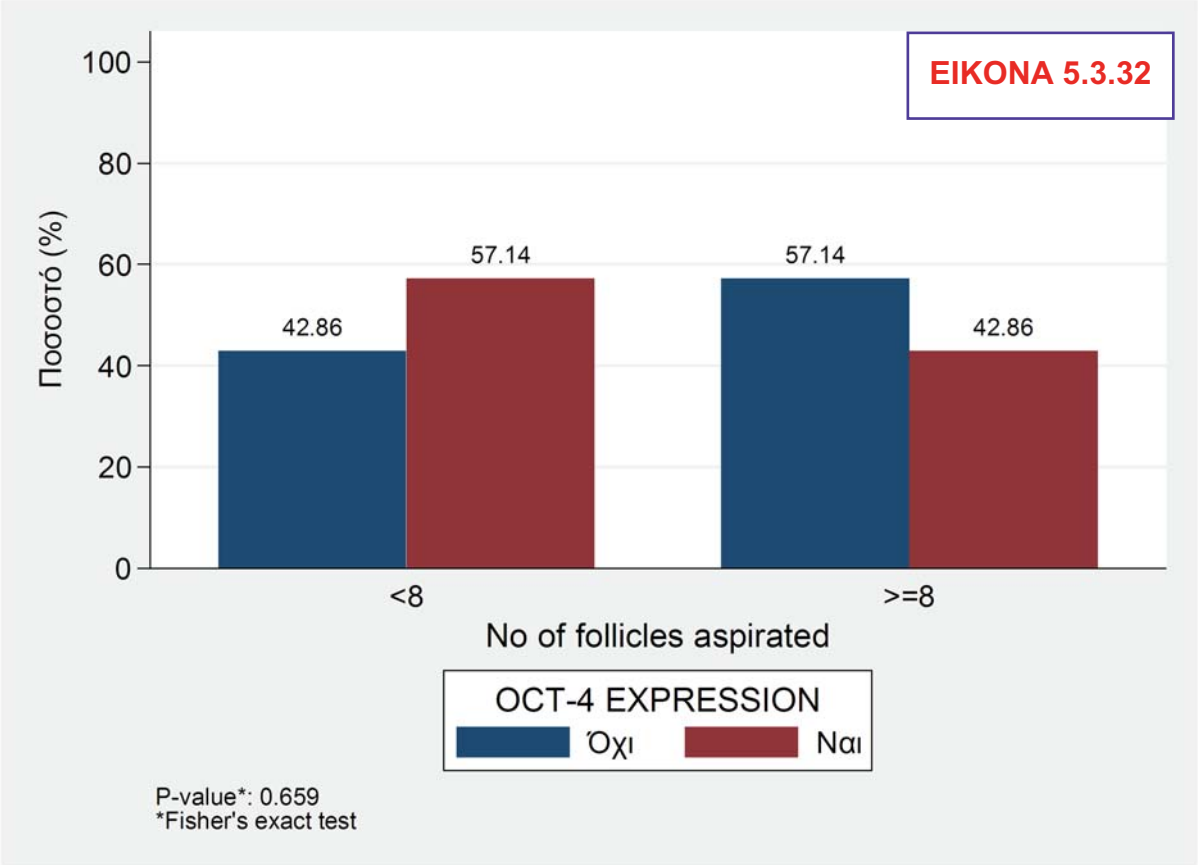
**Εικόνες 5.3.29 & 5.3.30:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και τον συνολικό αριθμό των ημερών διέγερσης (p=1, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την διάρκεια διέγερσης της πρόκλησης σε ημέρες, που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.**



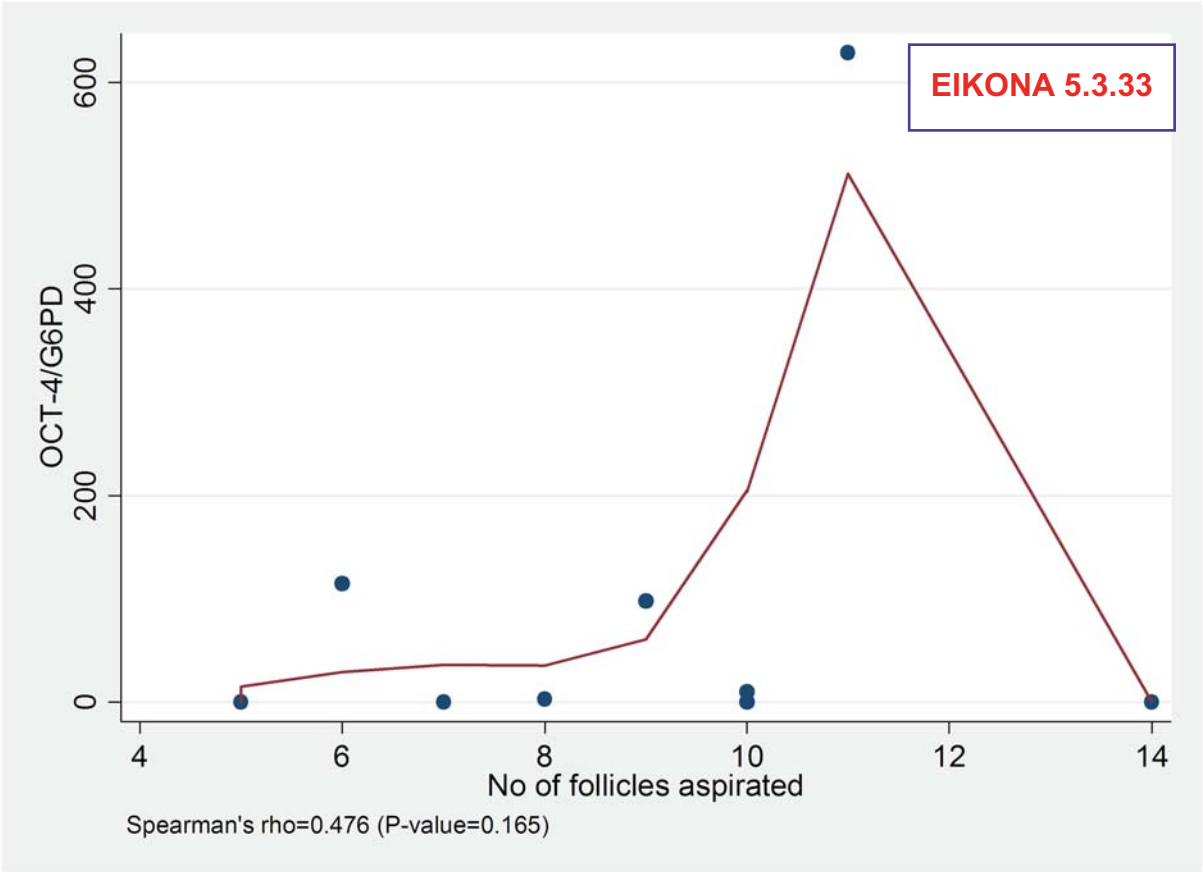

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.31:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και την συνολική διάρκεια πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας (σε ημέρες) (Spearman' rho =-0.098, p=0.787). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = -0.098) είναι πολύ μικρότερος από το -1.**

**΄Υπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated).**



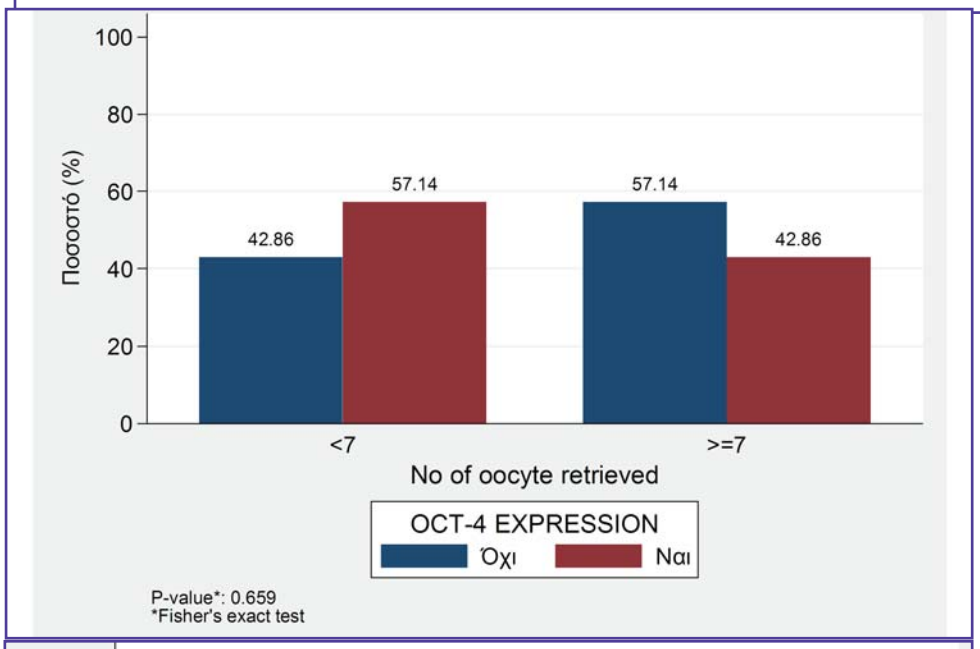

**Εικόνες 5.3.32:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και στον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (p=0.659, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated).**

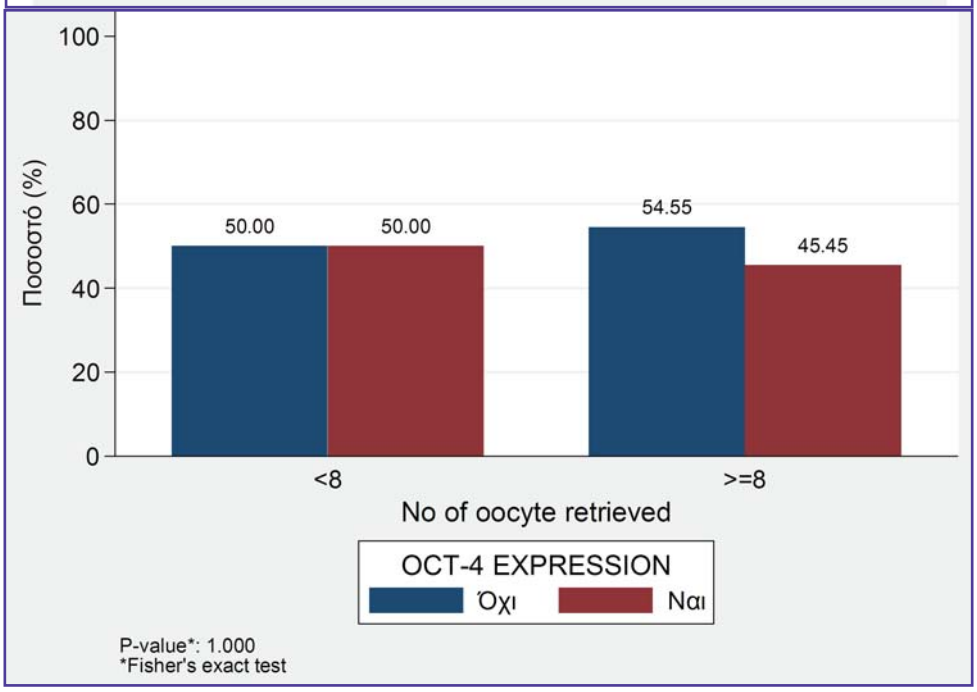



**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.33:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και στον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (Spearman' rho = 0.476, p=0.165). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.476) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωαρίων που ανευρέθησαν (number of oocytes retrieved).**



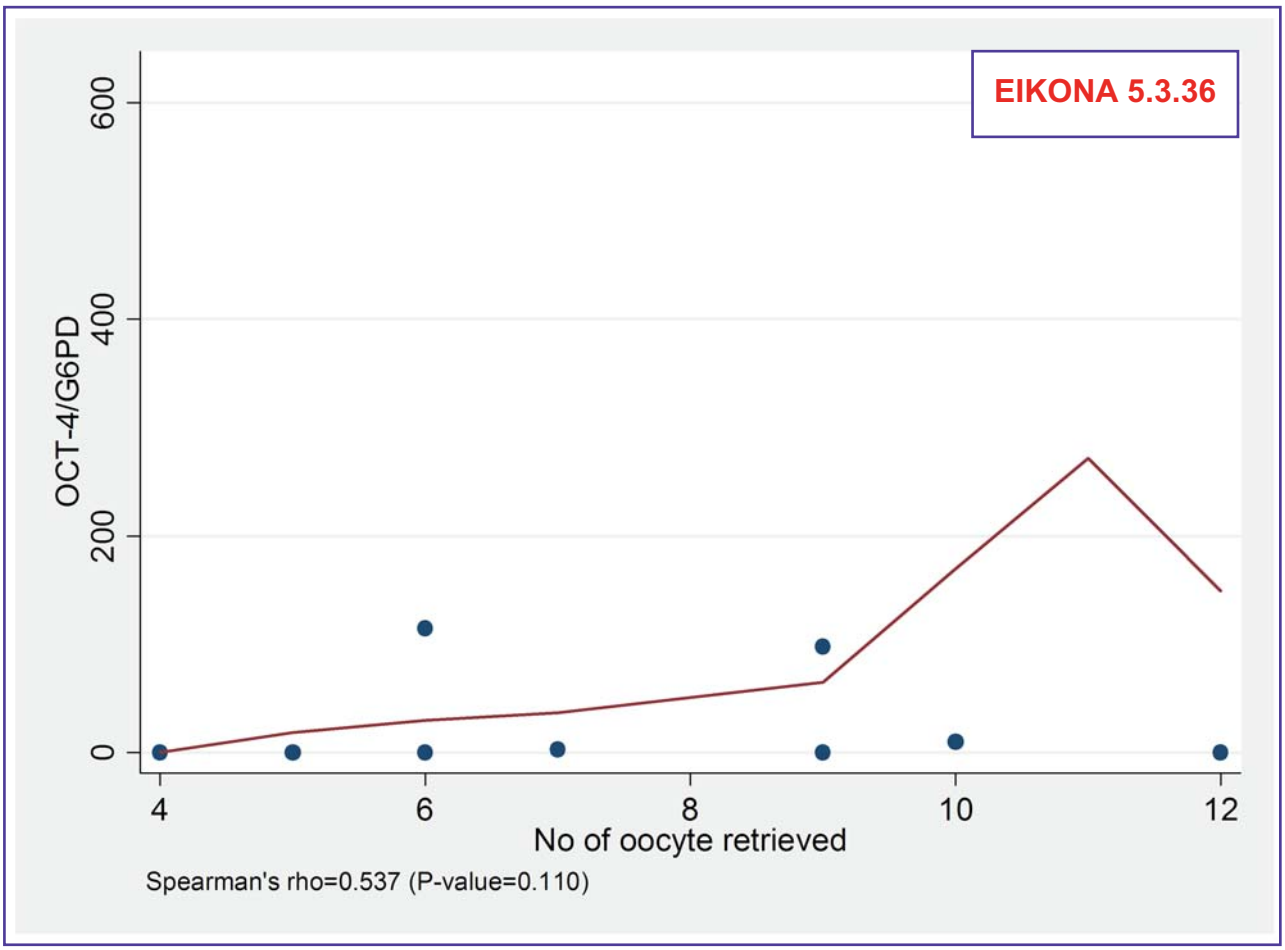

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.34**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.35**

**Εικόνες 5.3.34 και 5.3.35:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και με τον αριθμό των ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved) (p=0.659 και p=1.00, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ωαρίων που ανερεύθηκαν κατά την ωοληψία (number of oocytes retrieved).**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.36:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και στον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of follicles aspirated) (Spearman' rho = 0.537, p=0.110). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.537) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.9

| | No of oocyte retrieved | | |
|---|---|---|---|
| | <6 | >=6 | |
| | N (%) | N (%) | p-value* |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | 1.000 |
| *Όχι* | 3 (75.0) | 12 (70.6) | |
| *Ναι* | 1 (25.0) | 5 (29.4) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | 0.546 |
| *Όχι* | 4 (100.0) | 13 (76.5) | |
| *Ναι* | 0 (0.0) | 4 (23.5) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | 0.532 |
| *Όχι* | 4 (100.0) | 12 (70.6) | |
| *Ναι* | 0 (0.0) | 5 (29.4) | |

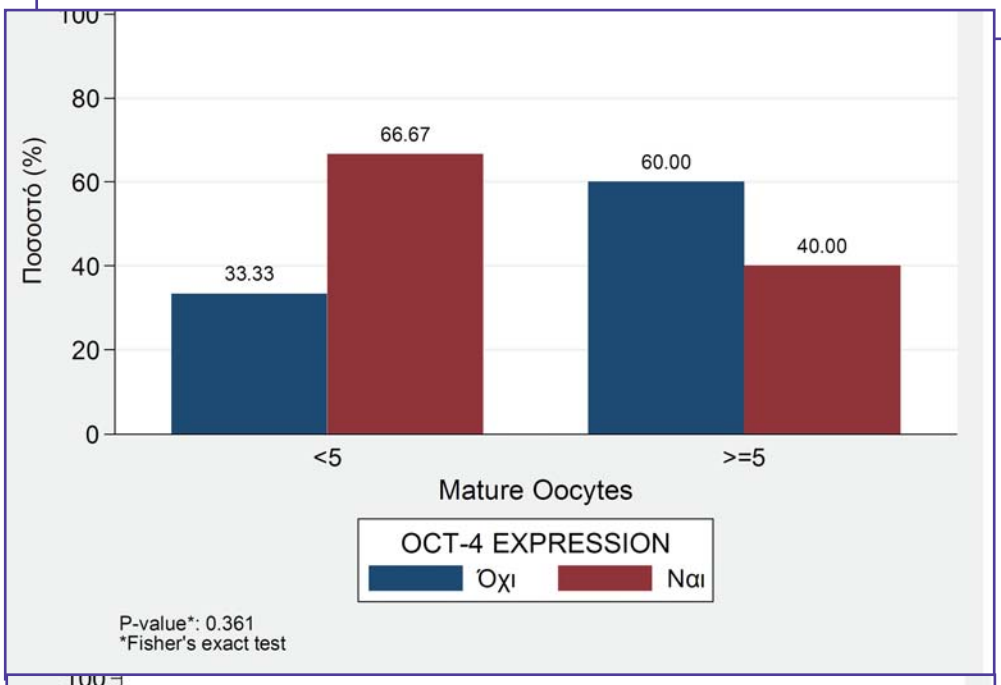
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value** |
|---|---|---|---|
| **Age (ys)** | 36.5 (31.5, 37.5) | 36.0 (35.0, 37.0) | 0.964 |
| **PRL (ng/ml)** | 6.9 (4.9, 8.8) | 11.9 (8.4, 16.3) | 0.122 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 633.0 (332.5, 824.0) | 498.0 (309.0, 691.0) | 0.720 |
| **OCT-4/G6PD** | 0.0 (0.0, 0.0) | 6.6 (0.3, 106.4) | 0.037 |

*Fisher's exact test

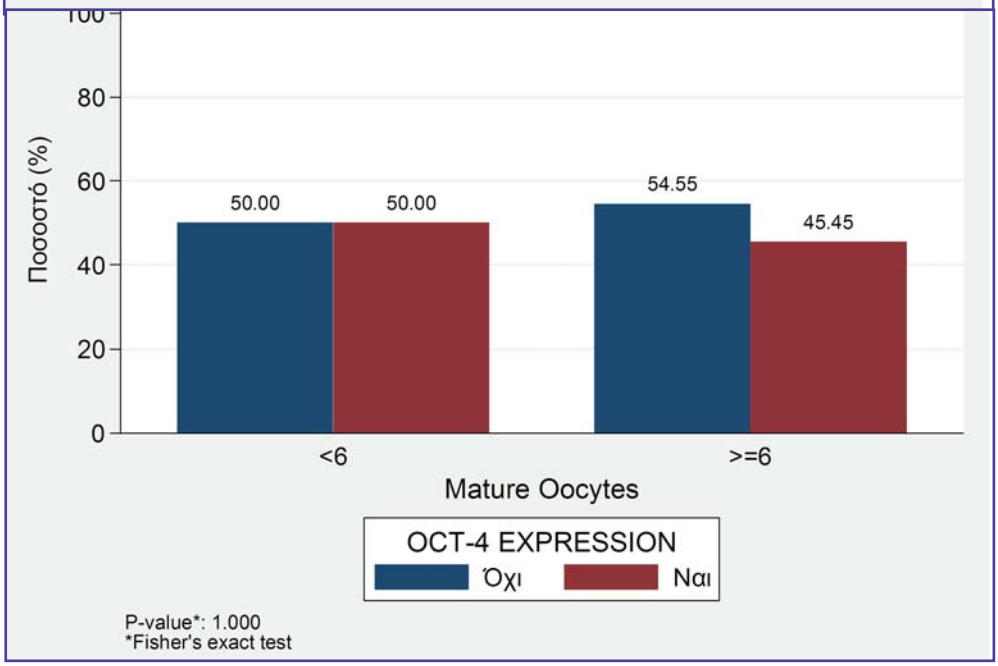
**Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.9:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"αριθμός 6 ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.964) **(β)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 γεννητικούς κύκλους (p=0.122) **(γ)** επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα χορήγησης της FSH (p=0.720) **(δ)** θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=1.00) **(ε)** κλινική εγκυμοσύνη (p=0.546) **(στ)** εγκυμοσύνη (p=0.532). **Έκφραση του Oct-4 παρατηρήθηκε με στατιστικά σημαντική διαφορά στις περιπτώσεις που ανευρέθησαν περισσότερα από 6 ωάρια κατά την ωοληψία (p=0.037).**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.37**

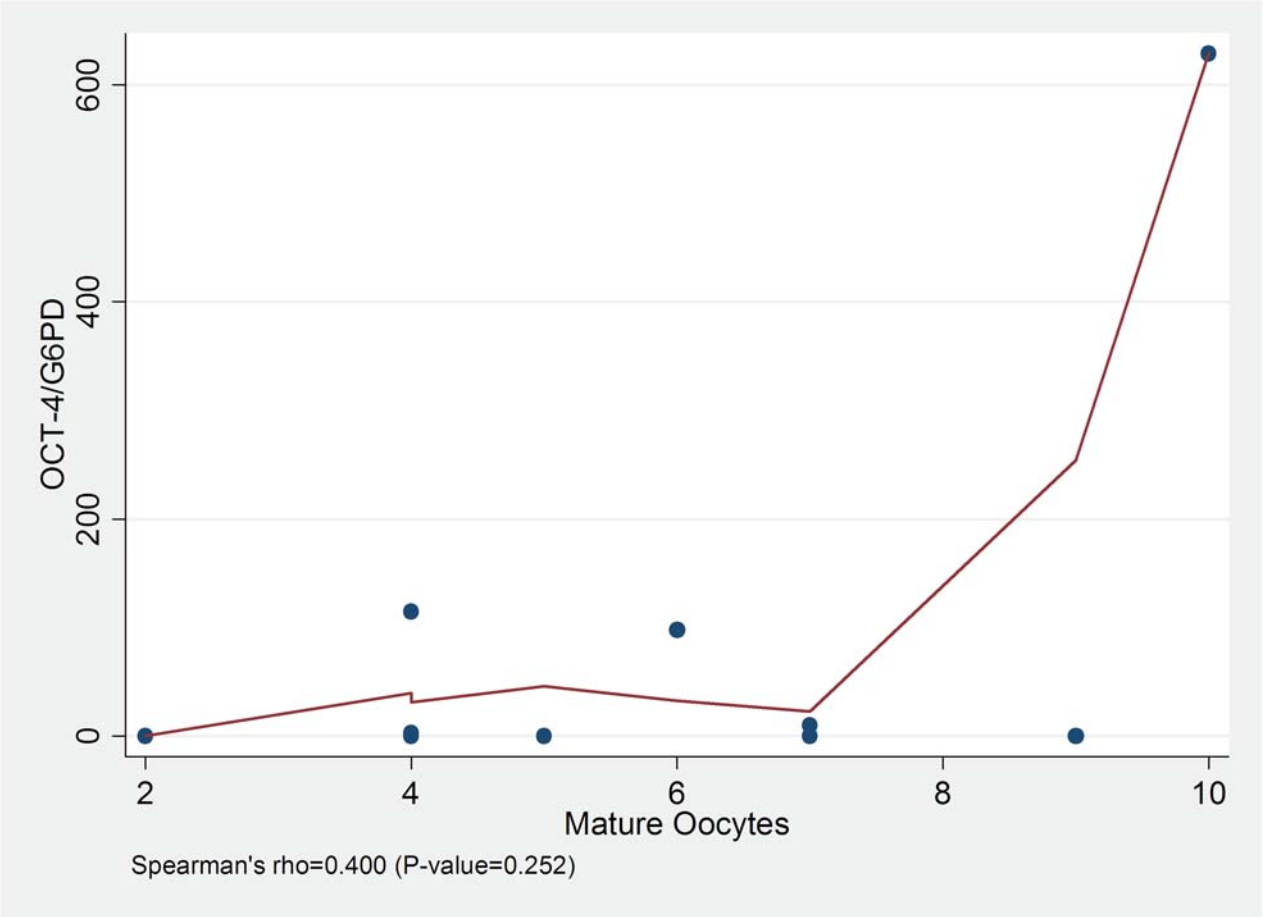



**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.38**

**Εικόνες 5.2.37 και 5.2.38:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και στον αριθμό **< 5 και >= 5** ή **< 6 και >= 6** των ώριμων ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes) (p=0.361 και p=1.00, Fisher's exact test).

**Περιγραφή με scatter plot των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανερεύθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes retrieved).**

**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.30**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.39:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 και τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που αναρροφήθηκαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes retrieved) (Spearman' rho = 0.400, p=0.252). **Ο συντελεστής συσχέτισης (rho = 0.400) είναι πολύ μικρότερος από το 1.**

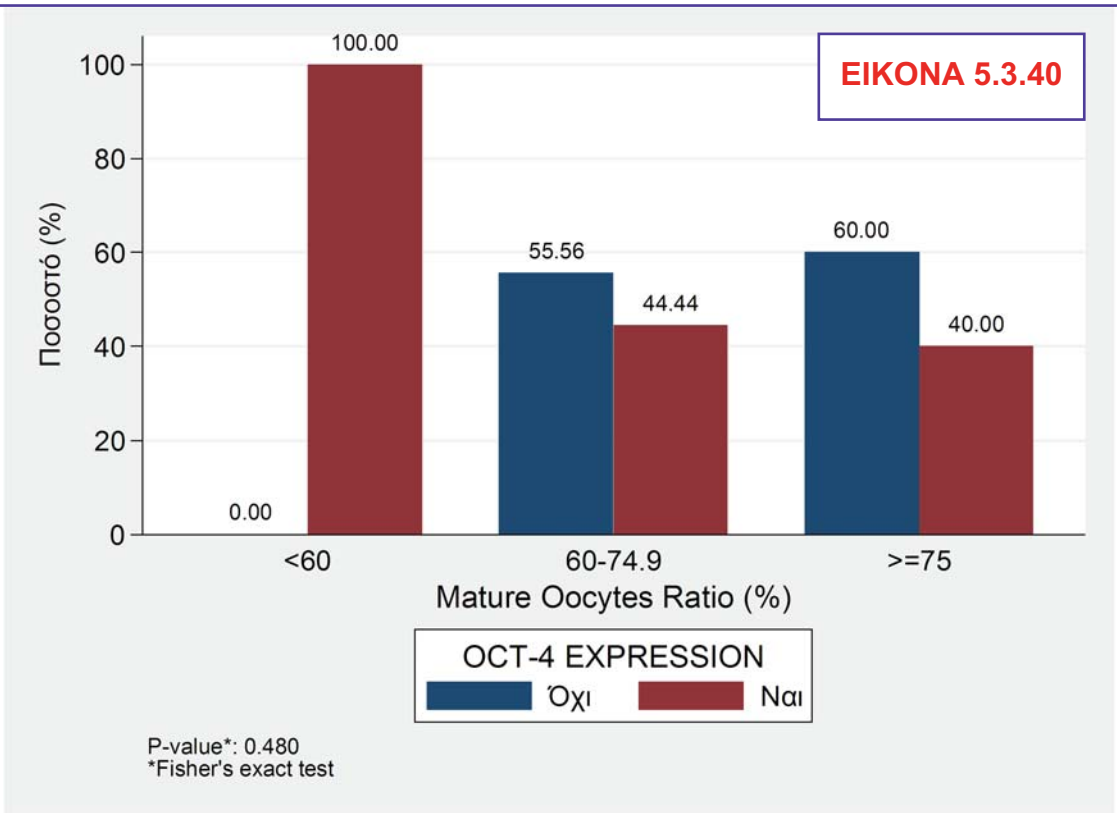
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**

**Τα ώριμα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

**- ώριμα ωάρια < 60%,**

**- ώριμα ωάρια 60-74.9% και**

**- ώριμα ωάρια ≥ 75%.**



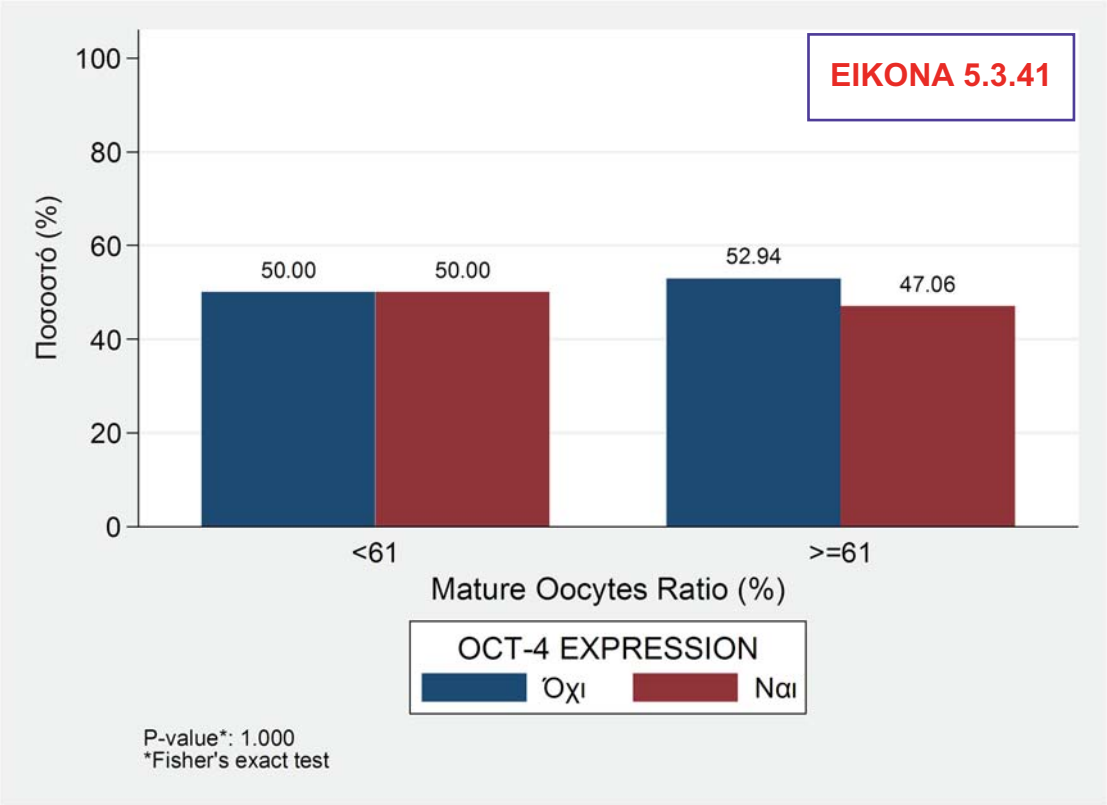

**Εικόνες 5.2.40:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και στο ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes ratio) (p=0.480, Fisher's exact test).

**Επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με το ποσοστό των ώριμων ωαρίων αριθμό των 9 ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία.**

**Τα ώριμα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

**- ώριμα ωάρια < 61% και**

**- ώριμα ωάρια ≥ 61%.**




**Εικόνες 5.3.41:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και στο ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (number of mature oocytes ratio) (p=1.00, Fisher's exact test).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.10

| | Mature Oocytes Ratio (%) | | |
|---|---|---|---|
| | <61 | >=61 | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value* |
| **Age (ys)** | 34.0 (29.5, 38.5) | 36.0 (35.0, 37.0) | 0.468 |
| **FSH (IU/L)** | 6.2 (5.9, 8.1) | 6.2 (4.6, 7.7) | 0.636 |
| **PRL (ng/ml)** | 6.9 (4.3, 9.3) | 12.9 (10.3, 16.6) | 0.019 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 3362.5 (2862.5, 3825.0) | 2775.0 (1750.0, 3362.5) | 0.219 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 332.5 (128.5, 720.5) | 500.0 (350.0, 758.0) | 0.420 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1384.0 (1110.5, 1635.0) | 2025.0 (1828.0, 2569.0) | 0.018 |
| **No of oocyte retrieved** | 6.0 (4.5, 8.5) | 9.0 (6.0, 9.0) | 0.239 |
| **OCT-4/G6PD** | 1.6 (0.0, 3.1) | 5.3 (0.1, 106.4) | 0.433 |

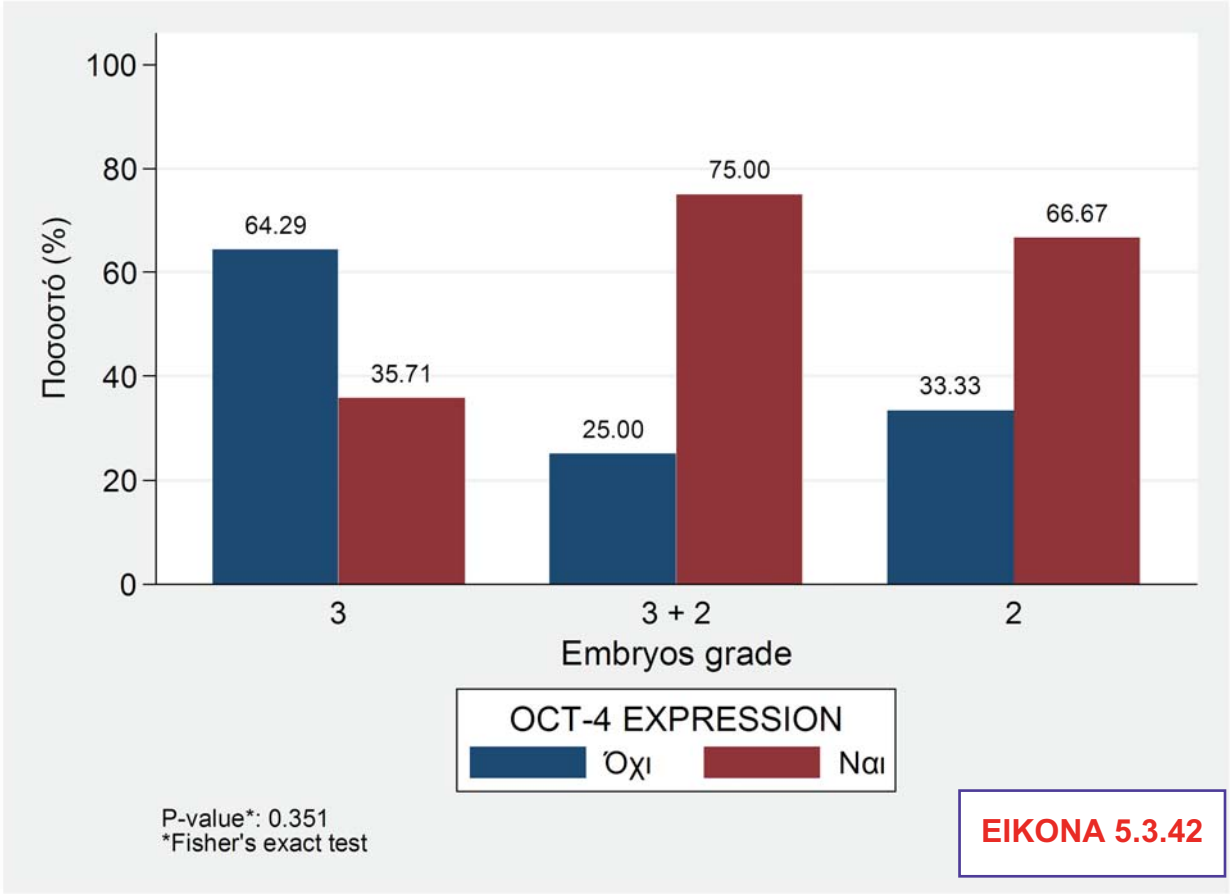
*Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.10.:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία" (<61% σε σχέση με >= 61%)** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.468) **(β)** επίπεδα FSH όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.636) **(γ)** επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος κατά την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.420) **(δ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης (FSH) (p=0.219) **(ε)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (0.239) και **(στ)** επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.433). **Στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στο "ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία" (<61% σε σχέση με >= 61%) και στα επίπεδα προλακτίνης όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους προηγούμενους 6 κύκλους (p=0.019) και στα επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν κατά την ημέρα χορήγησης της hCG (p=0.018)**

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την ποιότητα των εμβρύων.**

**Τα έμβρυα ταξινομήθηκαν στις ομάδες:**

- **Group A = Grade 3 embryos**
- **Group B = Grade 3 + 2 embryos**
- **Group C = Grade 2 embryos**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.42**

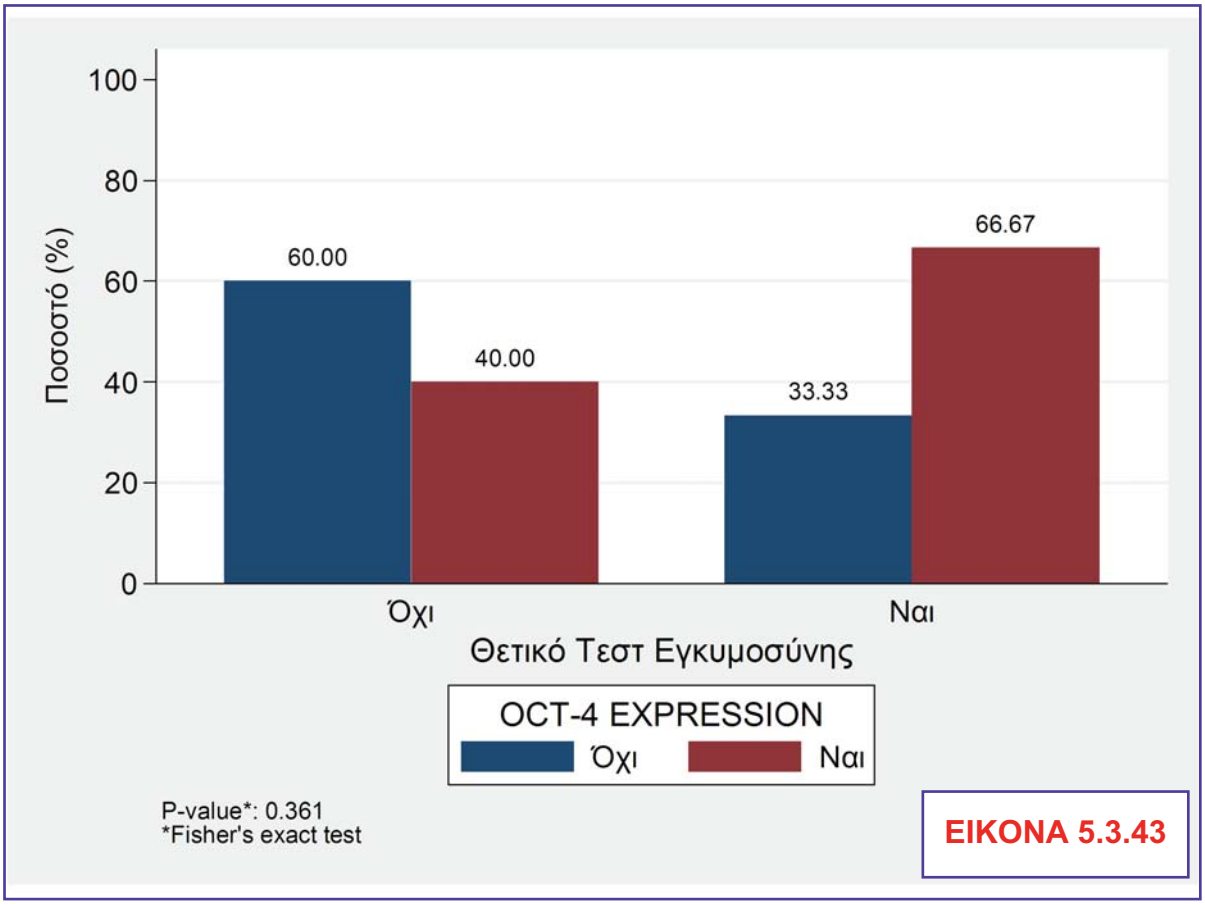
**Εικόνες 5.3.42:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και τον βαθμό των εμβρύων (number of mature oocytes ratio) (p=0.351, Fisher's exact test).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.11

| | Embryos grade | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 | 3 + 2 | 2 | |
| | N (%) | N (%) | N (%) | p-value* |
| **Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης** | | | | 0.779 |
| *Όχι* | 9 (64.3) | 3 (75.0) | 3 (100.0) | |
| *Ναι* | 5 (35.7) | 1 (25.0) | 0 (0.0) | |
| **Κλινική Εγκυμοσύνη** | | | | 1.000 |
| *Όχι* | 11 (78.6) | 3 (75.0) | 3 (100.0) | |
| *Ναι* | 3 (21.4) | 1 (25.0) | 0 (0.0) | |
| **Εγκυμοσύνη** | | | | 0.785 |
| *Όχι* | 10 (71.4) | 3 (75.0) | 3 (100.0) | |
| *Ναι* | 4 (28.6) | 1 (25.0) | 0 (0.0) | |
| **OCT-4 EXPRESSION** | | | | 0.351 |
| *Όχι* | 9 (64.3) | 1 (25.0) | 1 (33.3) | |
| *Ναι* | 5 (35.7) | 3 (75.0) | 2 (66.7) | |
| | | | | |
| | | | | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value** |
| **Age (ys)** | 36.0 (35.0, 37.0) | 37.0 (33.0, 39.5) | 33.0 (27.0, 37.0) | 0.462 |
| **FSH (IU/L)** | 6.0 (4.9, 6.8) | 7.6 (4.5, 11.4) | 6.3 (6.1, 8.1) | 0.607 |
| **PRL (ng/ml)** | 11.4 (9.3, 15.9) | 6.0 (3.6, 21.9) | 13.8 (4.9, 16.1) | 0.581 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2700.0 (2275.0, 3150.0) | 2387.5 (1525.0, 3300.0) | 4000.0 (3675.0, 4050.0) | 0.029 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 546.5 (450.0, 933.0) | 455.0 (250.5, 633.5) | 157.0 (63.0, 309.0) | 0.040 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1967.5 (1700.0, 2467.0) | 2182.5 (1385.0, 2800.0) | 1828.0 (1023.0, 2022.0) | 0.556 |
| **No of oocyte retrieved** | 8.0 (6.0, 9.0) | 8.5 (6.0, 10.5) | 8.0 (4.0, 9.0) | 0.713 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 71.0 (67.0, 78.0) | 75.0 (63.5, 85.5) | 75.0 (50.0, 78.0) | 0.887 |
| **Immature Oocytes Ratio (%)** | 29.0 (22.0, 33.0) | 25.0 (14.5, 36.5) | 25.0 (22.0, 50.0) | 0.887 |
| **OCT-4/G6PD** | 0.1 (0.1, 98.2) | 10.2 (3.1, 628.6) | 0.2 (0.0, 0.4) | 0.280 |
| *Fisher's exact test | | | | |
| **Kruskal-Wallis | | | | |

**Πίνακας 5.3.11:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"ποιότητα εμβρύων"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.462) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.607) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.581) **(δ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.556) **(ε)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.713) **(στ)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.887) **(ζ)** ποσοστό ανώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.887) **(η)** έκφραση του OCT-4 (p=0.280), **(θ)** θετικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.779) **(ι)** κλινική εγκυμοσύνη (p=1.00) **(ια)** εγκυμοσύνη (p=0.785) **(ιβ)** ύπαρξη ή απουσία της έκφρασης του OCT-4 (p=0.351) Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά για τις παραμέτρους: **συνολική δόση γοναδοτροπίνης (p=0.029)** και **επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος την 5η ημέρα χορήγησης FSH (p=0.040).**

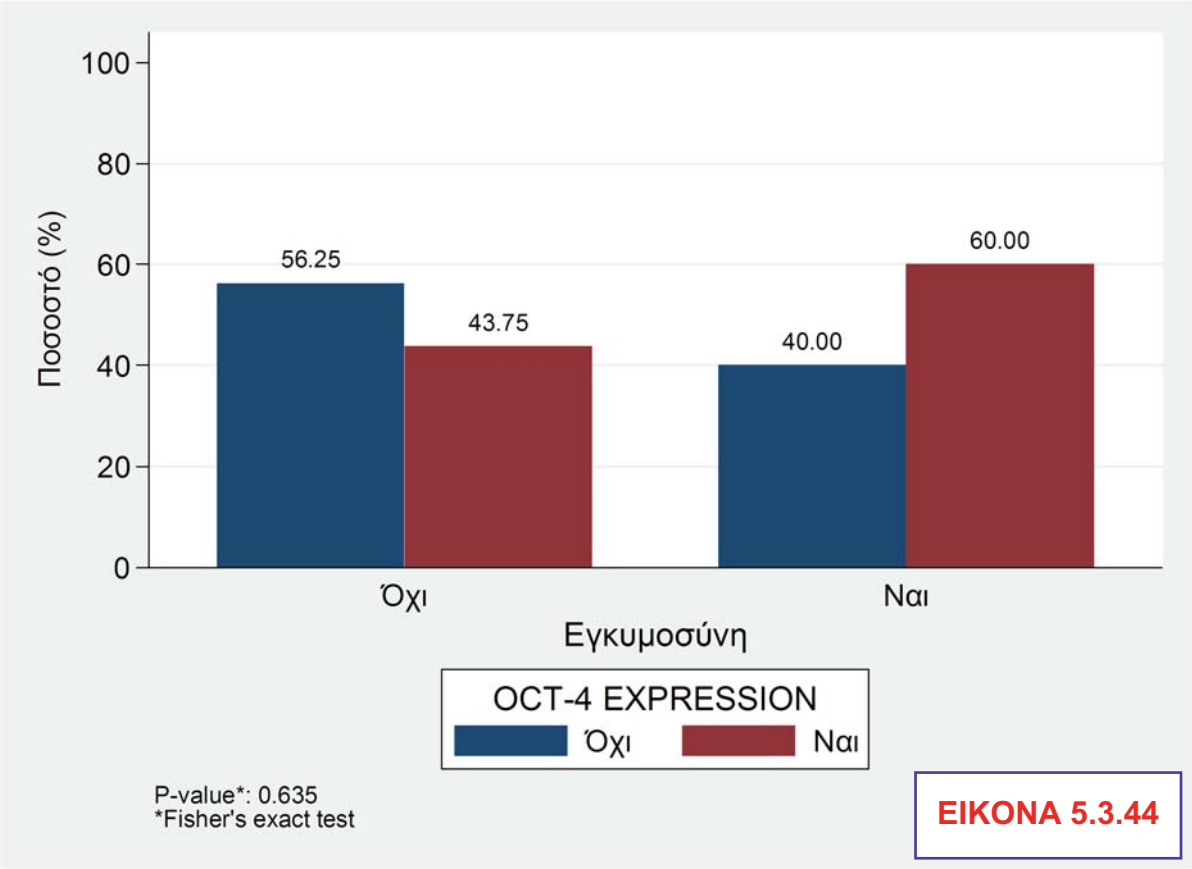
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς το θετικό ή αρνητικό τεστ εγκυμοσύνης.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.43**

**Εικόνες 5.3.43:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς το θετικό ή αρνητικό τεστ εγκυμοσύνης (p=0.361, Fisher's exact test).

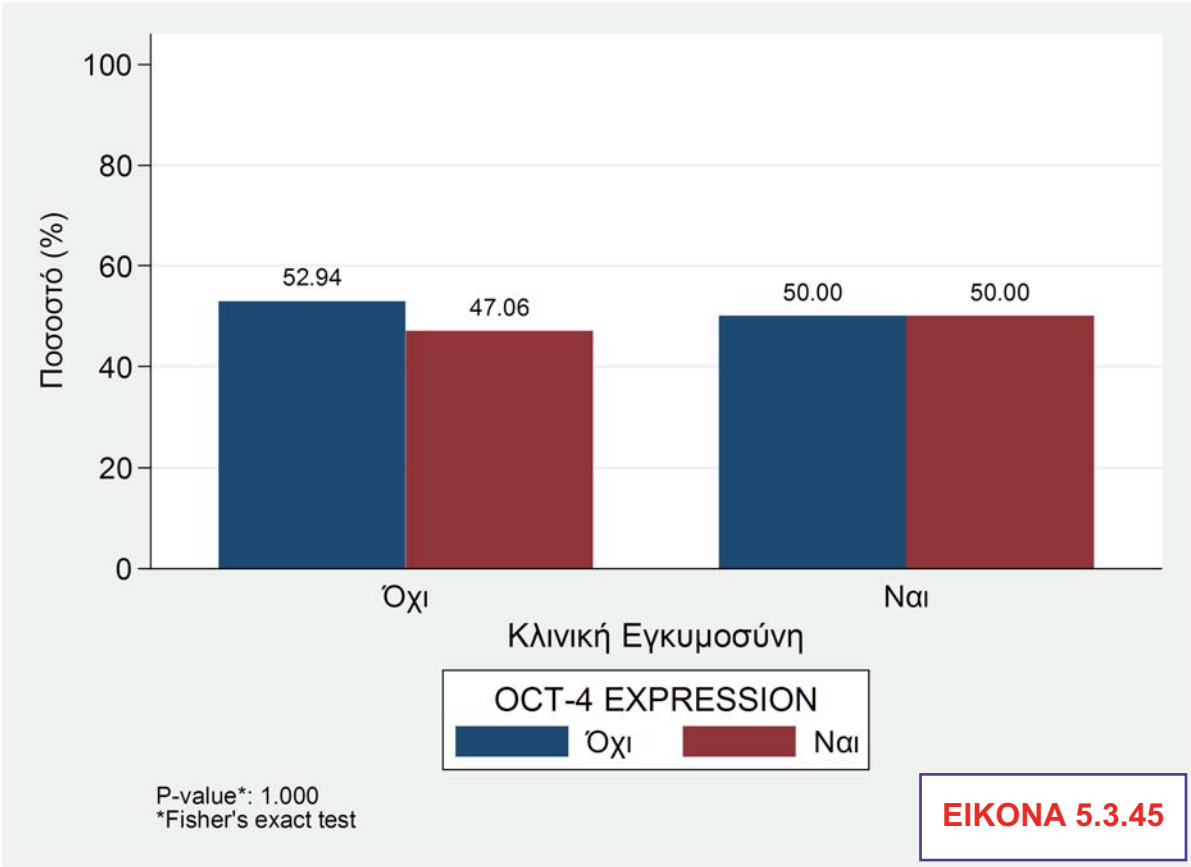
**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.44**

**Εικόνες 5.3.44:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης (p=0.635, Fisher's exact test).

**Ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών ταξινομημένα ανάλογα με την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης.**




**ΕΙΚΟΝΑ 5.3.45**

**Εικόνες 5.3.45:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη ή απουσία έκφρασης του OCT-4 και την έκβαση της προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (outcome) ως προς την επίτευξη ή μη κλινικής εγκυμοσύνης (p=1.00, Fisher's exact test).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.12

| | Θετικό Τεστ Εγκυμοσύνης | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι | Ναι | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value* |
| **Age (ys)** | 36.0 (32.0, 37.0) | 37.5 (36.0, 39.0) | 0.064 |
| **FSH (IU/L)** | 6.3 (5.8, 7.9) | 4.8 (4.1, 6.8) | 0.201 |
| **PRL (ng/ml)** | 10.3 (7.2, 15.3) | 11.7 (11.1, 21.9) | 0.402 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2987.5 (1800.0, 3675.0) | 2775.0 (2325.0, 3150.0) | 0.509 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 450.0 (180.0, 758.0) | 547.0 (498.0, 890.0) | 0.330 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1828.0 (1561.0, 2569.0) | 2005.0 (1845.0, 2467.0) | 0.613 |
| **No of oocyte retrieved** | 8.0 (6.0, 10.0) | 7.5 (6.0, 9.0) | 0.694 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 75.0 (60.0, 78.0) | 68.5 (67.0, 83.0) | 0.938 |
| **OCT-4/G6PD** | 1.8 (0.1, 114.6) | 5.1 (0.1, 54.2) | 0.522 |

*Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.12:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"θετικό τεστ εγκυμοσύνης"** **δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.064) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.201) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.402) **(δ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.509) **(ε)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.330) **(στ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.613) **(ζ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.694) **(η)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.938) **(θ)** επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.522).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.13

| | Κλινική Εγκυμοσύνη | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι | Ναι | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value* |
| **Age (ys)** | 36.0 (33.0, 37.0) | 37.5 (35.5, 41.5) | 0.238 |
| **FSH (IU/L)** | 6.3 (5.6, 8.0) | 4.2 (3.8, 5.5) | 0.065 |
| **PRL (ng/ml)** | 10.0 (7.1, 15.3) | 16.8 (11.4, 25.1) | 0.137 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2987.5 (2037.5, 3662.5) | 2512.5 (1725.0, 3112.5) | 0.345 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 500.0 (309.0, 758.0) | 503.5 (403.5, 729.5) | 0.754 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1845.0 (1570.0, 2317.0) | 2188.5 (1466.5, 2636.0) | 0.687 |
| **No of oocyte retrieved** | 7.0 (6.0, 9.0) | 9.0 (7.5, 9.5) | 0.468 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 75.0 (67.0, 78.0) | 68.5 (67.0, 76.5) | 0.719 |
| **OCT-4/G6PD** | 0.3 (0.1, 58.8) | 54.2 (10.2, 98.2) | 0.296 |

*Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.13:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"κλινική εγκυμοσύνη" δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.238) **(β)** επίπεδα FSH (p=0.065) **(γ)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.137) **(δ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.345) **(ε)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.754) **(στ)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.687) **(ζ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.468) **(η)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.719) **(θ)** επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.296).

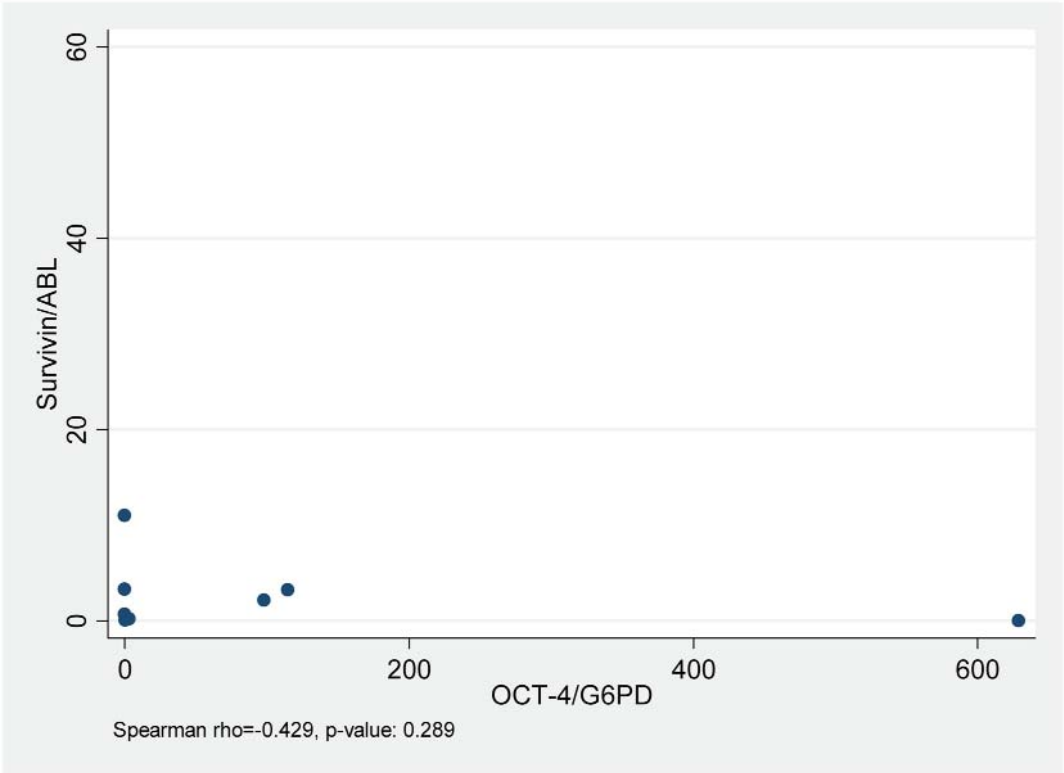
## ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.14

| | Εγκυμοσύνη | | |
|---|---|---|---|
| | Όχι | Ναι | |
| | Median (IQR) | Median (IQR) | p-value* |
| **Age (ys)** | 36.0 (32.5, 37.0) | 38.0 (36.0, 39.0) | 0.103 |
| **FSH (IU/L)** | 6.3 (5.8, 8.1) | 4.3 (4.1, 5.2) | 0.036 |
| **PRL (ng/ml)** | 10.3 (7.2, 15.3) | 11.7 (11.1, 21.9) | 0.402 |
| **Συνολική Δόση Γοναδοτροπίνης** | 2900.0 (1800.0, 3675.0) | 2700.0 (2325.0, 3150.0) | 0.513 |
| **Estradiol (pg/ml) [5η ημέρα χορήσης FSH]** | 475.0 (244.5, 824.0) | 509.0 (498.0, 585.0) | 0.591 |
| **Estradiol (pg/ml) - peak** | 1836.5 (1565.5, 2443.0) | 2100.0 (1910.0, 2467.0) | 0.536 |
| **No of oocyte retrieved** | 7.5 (5.5, 9.5) | 9.0 (6.0, 9.0) | 0.802 |
| **Mature Oocytes Ratio (%)** | 75.0 (63.5, 79.0) | 67.0 (67.0, 70.0) | 0.480 |
| **OCT-4/G6PD** | 0.4 (0.0, 114.6) | 10.2 (0.1, 98.2) | 0.732 |

*Wilcoxon rank-sum

**Πίνακας 5.3.14:** Η στατιστική ανάλυση ως προς πιθανούς καθοριστικούς παράγοντες για τον δείκτη **"κλινική εγκυμοσύνη" δεν** έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τις ανεξάρτητες μεταβλητές **(α)** ηλικία των γυναικών (p=0.103) **(β)** επίπεδα προλακτίνης (PRL) (p=0.402) **(γ)** συνολική δόση γοναδοτροπίνης για την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (p=0.513) **(δ)** επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας (p=0.591) **(ε)** επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης όπως μετρήθηκαν την ημέρα που χορηγήθηκε η hCG (p=0.536) **(στ)** αριθμό ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.802) **(ζ)** ποσοστό ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία (p=0.480) **(η)** επίπεδα έκφρασης του OCT-4 (p=0.732). **Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στα επίπεδα της FSH στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.036) και στην επίτευξη εγκυμοσύνης.**

## 5.4. Η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων OCT-4 και SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI και εμβρυομεταφορά.




**Εικόνα 5.4.1:** Δεν φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN να σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών, γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI και εμβρυομεταφορά (ET) (p=0.289, Spearman's test).

## 5.5. Αποτελέσματα για τον πληθυσμό έκφρασης του DAZL στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI

Ο πληθυσμός μελέτης των γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ή ICSI και εμβρυομεταφορά και στις οποίες ερευνήθηκε στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών τους η έκφραση του γονιδίου DAZL είναι ο ίδιος με αυτόν που ερευνήθηκε η έκφραση του γονδίου OCT-4.

Δεν παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου DAZL στις 21 περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 6.1. Η έκφραση του γονιδίου Oct-4 και η απουσία έκφρασης του γονιδίου DAZL στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI

Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct-4, ο οποίος είναι επίσης γνωστός ως Oct-3 και POU5f1 είναι ένα μέλος της Pit-Oct-Unc οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων (POU transcription factor family) (Scholer et al, 1990a). Ο Oct-4 εκφράζεται στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells, ESCs), στα γεννητικά κύτταρα (germ cells), στα εμβυονικά καρκινικά κύτταρα (embryonal carcinoma cells), σε ολόκληρο το έμβρυο στα διάφορα στάδια της ανάπτυξής του και στους όγκους εκ των γεννητικών κυττάρων (germ-cell tumors) (Schofer et al, 1990b, Nichols et al, 1998, Niwa et al 2000, Pesce and Scholer 2000, Matthai et al, 2006). Ο Oct-4 σε συνεργασία με άλλους παράγοντες όπως είναι ο FOXD3, ο SOX2 και ο STAT3 ρυθμίζουν την μεταγραφή είτε ενεργοποιώντας είτε καταστέλλοντας τα γονίδια στόχους. Οι μεταγραφικοί παράγοντες POU είναι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA (DNA-binding proteins) και ρυθμίζουν τα γονίδια τα οποία περιέχουν ένα οκταμερές μοτίβο (octamer motif), που είναι σπουδαίο για την μεταγραφή των κυττάρων και ιστών. Το οκταμερές μοτίβο (AT GC AA AT) βρίσκεται εντός των ενισχυτικών ή υποκινητικών περιοχών (enhancer or promoter regions) των γονιδίων και σε αυτό προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες POU. Το γονίδιο Oct-4 αποτελείται από

πέντε εξόνια και περιέχει δύο δομικά στοιχεία: τον εγγύς ενισχυτή (proximal enhancer, PE) και τον άπω ενισχυτή (distal enhancer, DE), που είναι αναγκαίοι για την ειδική κυτταρική τύπου έκφραση του Oct-4 καθώς και τον υποστηρική (promoter) (Clerc et al, 1988, Scheidereit et al, 1998; Pesce and Scholer 2001; Yeom et al, 1996; Matthai et al, 2006; Medvedev et al, 2008). Η έκφραση του Oct-4 εντοπίζεται αποκλειστικά στα ολοδύναμα κύτταρα (pluripotent stem cells) και προς τα κάτω ρύθμιση του Oct-4 σχετίζεται με απώλεια της ολοδυναμικότητας (pluripotentiality) αυτών των κυττάρων. Ο OCT-4 είναι ένας δείκτης για ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Donovan, 2001; Pesce and Scholer, 2001). Μια παρεκκλίνουσα από το φυσιολογικό έκφραση (aberrant expression) του Oct-4 σε κλώνους ποντικών έδειξε ότι οδηγεί σε ανωμαλίες σε διάφορα εμβρυονικά στάδια, υποδηλώνοντας έτσι την σπουδαιότητα του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 για την ανάπτυξη (Boiami et al, 2002; Matthai et al, 2006). Καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται ο παράγοντας OC-4 γρήγορα εξαφανίζεται (Donovan, 2001; Pesce and Scholer, 2001). Έκφραση του Oct-4 έχει βρεθεί και στο ενδομήτριο (Matthai et al, 2006). Επιπρόσθετα με το εύρημα αυτό, το γεγονός ότι έχουν βρεθεί στρωματικά ενδομητρικά κύτταρα θετικά για δείκτες βλαστικών κυττάρων όπως είναι η E-cadherin, η κυτταροκερατίνη (cytokeratin), το c-kit, το CD34, το bcl-2 και το Ki67 καθώς και η κλωνογόνα εμφάνιση και το δυναμικό υψηλού πολλαπλασιασμού του ενδομητρίου ενισχύουν την υπόθεση ότι υπάρχουν βλαστικά κύτταρα στο ενδομήτριο (Chan et al, 2004, Gargett et al,, 2004; Matthai et al, 2006). Επίσης, έκφραση του Oct-4 έχει βρεθεί στον μυελό των οστών που προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα ενήλικα ανθρώπου [Jiang et al, 2002].

Τα γονίδια DAZ, DAZL (DAZ-like) και BOULE ανήκουν στην ίδια οικογένεια που ονομάζεται DAZL. Η οικογένεια των γονιδίων DAZL (σαν διαγραμμένο στην αζωοσπερμία, deleted in azoospermia like) κωδικοποιεί δυνητικές πρωτεΐνες που εκφράζονται σε αρσενικά και θηλυκά γεννητικά κύτταρα τόσο ενδομητρίως όσο και μετά την γέννηση. Τα μέλη της οικογένειας DAZL περιέχουν δύο κυρίαρχες περιοχές: την περιοχή RRM και την περιοχή DAZ. Η περιοχή DAZ είναι μοναδική για αυτή την οικογένεια και αποτελείται από 24 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη BOULE και η πρωτεΐνη DAZL περιέχουν μόνο μια περιοχή DAZ, ενώ η πρωτεΐνη DAZ περιέχει πολλαπλές DAZ περιοχές διατεταγμένες κατά σειρά (Brook et al, 2009). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της οικογένειας DAZL εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των εμβρυονικών γεννητικών κυττάρων και στο κυτταρόπλασμα των αναπτυσσόμενων ωοκυττάρων (Stefanidis et al, 2008). Στα διάφορα ζωϊκά είδη δεν ενευρίσκονται όλα τα μέλη της οικογένειας DAZL. Το ασπόνδυλα

κωδικοποιούν μόνο BOULE. Στον άνθρωπο η έκφραση DAZL έχει ανιχνευθεί στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και σε όλα τα στάδια της ωογένεσης. Στα ωάρια έχει βρεθεί μόνο έκφραση του DAZL και όχι έκφραση του DAZ ή του BOULE (Brook et al, 2009).

Από ότι γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη είναι η δεύτερη στην διεθνή βιβλιογραφία που μελέτησε την έκφραση του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβλήθησαν σε IVF ή ICSI μετά την μελέτη των Kossowska και συνεργατών (2009). Όμως οι ερευνητές προκειμένου να υπερκάψουν το γεγονός ότι σε κάθε ασθενή η κατάσταση της υπογονιμότητας μπορεί να επιβαρύνει την λειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων ανακάτεψαν όλα μαζί τα δείγματα των ασθενών που μελέτησαν (Kossowska et al, 2009). Στην παρούσα μελέτη καθορίζουμε, από ότι γνωρίζουμε, για πρώτη φορά την συχνότητα εμφάνισης έκφρασης του OCT-4 στα ωχινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα. Επίσης, μελετήσαμε για πρώτη φορά, την κλινική σημασία μιας τέτοιας έκφρασης στις γυναίκες που υποβάλλονται σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στην παρούσα εργασία **το OCT-4 εκφράσθηκε σε ποσοστό 47.6%**.

Η έκφραση του OCT-4 στα κοκκιώδη κύτταρα, που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, συμφωνεί με τα ευρήματα των Kossowska και συνεργατών (2009) όπου βρήκαν έκφραση του POU5F1 και ενισχύουν την υπόθεση ότι ο πληθυσμός των κοκκιωδών κυττάρων ενός υγιούς ωοθυλακίου δεν είναι ομοιόμορφος αλλά αποτελείται από έναν υποπληθυσμό διαφοροποιημένων και έναν άλλο υποπληθυσμό αδιαφοροποίητων κυττάρων, με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα να είναι ικανά για μίτωση. Η έκφραση του OCT-4 συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι ο υποπληθυσμός αυτός έχει σπουδαία χαρακτηριστικά όπως ολοδύναμη ικανότητα (pluripotent capability) και ικανότητα αυτο-αναγέννησης (self renewal). Οι ερευνητές Kossowska και συνεργάτες (2009) κατέδειξαν την δυνητικότητα για διαφοροποίηση των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων που είναι λιγότερο διαφοροποιημένα σε νευρώνες, χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες, αφού τα καλλιέργησαν σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά. Επίσης, οι ερευνητές αυτοί πέτυχαν πειραματικά τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων *in vivo* να αναγεννήσουν ιστούς μεσεγχυματικής προέλευσης (Kossowska et al, 2009). Επομένως, ένας υποπληθυσμός των ωχρινοποημένων κοκκιωδών κυττάρων γυναικών που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας περιλαμβάνει μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.

Έκφραση του DAZL έχει περιγραφεί στα κοκκιώδη κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικιού, στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων του ανθρώπου και στα κοκκιώδη - ωχρινικά κύτταρα του ωχρού σωματίου του ανθρώπου (Ruggiu et al, 1997; Dorfman et

al, 1999; Nishi et al, 1999; Pan et al, 2002; 2008) αλλά αυτά τα ευρήματα ακόμα αποτελούν διχογνωμία (Brook et al, 2009). Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να μελετήσουμε στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, την έκφραση του DAZL, ο οποίος είναι ένας δείκτης για ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα χαρακτηριστικά των γεννητικών κυττάρων, προκειμένου να ξακαθαρίσουμε τι ακριβώς συμβαίνει σε έναν ερευνητικό πεδίο που υπήρχε ακόμα διχογνωμία. Από τις 21 περιπτώσεις που μελετήσαμε δεν παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου DAZL (0/21). Το εύρημα αυτό είναι πολύ σημαντικό και είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα των ερευνητών Kossowska και συνεργάτες (2009), οι οποίοι αφού μελέτησαν και βρήκαν έκφραση του OCT-4 στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα δεν βρήκαν έκφραση των δεικτών για τα ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα χαρακτηριστικά των γεννητικών κυττάρων nanog, vasa και stella. Επομένως, ενισχύεται η υπόθεση ότι ο υποπληθυσμός των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων που περιλαμβάνει λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί σε γεννητικά κύτταρα γιατί δεν εκφράζονται σε αυτόν οι δείκτες DAZL, nanog, vasa και stella.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κλινική σημασία της έκφρασης του γονιδίου OCT-4 στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών των γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ή ICSI και βρέθηκε ότι **η έκφραση του OCT-4 συσχετίσθηκε στατιστικώς με ύπαρξη από 6 και πάνω ωαρίων που ανευρέθηκαν κατά την ωοληψία** (p=0.037). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του OCT-4 συσχετίσθηκαν με τα επίπεδα της AMH όπως μετρήθηκαν στην αρχή του γεννητικού κύκλου (p=0.001). Όμως, τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με μελέτη μεγαλύτερου αριθμού ασθενών.

Δεν βρέθηκε συσχέτιση της ύπαρξης ή απουσίας της έκφρασης του OCT-4 με τις παρακάτω παραμέτρους: (1) ηλικία των γυναικών, (2) BMI των γυναικών, (3) επίπεδα της FSH και LH στην αρχή του γεννητικού κύκλου, (4) επίπεδα της προλακτίνης όπως μετρήθηκαν σε έναν από τους 6 προηγούμενους γεννητικούς κύκλους, (5) φυσιολογικές γυναίκες (αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας) σε σχέση με γυναίκες με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας, (6) μέθοδο θεραπείας υπογονιμότητας (IVF ή ICSI), (7) διάρκεια υπογονιμότητας, (8) προηγούμενες προσπάθειες IVF ή ICSI και ET, (9) επίπεδα οιστραδιόλης την 5η ημέρα χορήγησης της FSH, (10) επίπεδα αιχμής της οιστραδιόλης, όπως μετρήθηκαν την ημέρα χορήγησης της hCG, (11) διάρκεια διέγερσης σε ημέρες πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας, (12) συνολική δόση FSH, (13) τον αριθμό των ωοθυλακίων που αναρροφή-

θηκαν, (14) τον αριθμό των ώριμων ωαρίων που ανευρέθησαν κατά την ωοληψία, (15) το ποσοστό των ώριμων ωαρίων, (16) την ποιότητα των εμβρύων που δημιουργήθηκαν, (17) το ποσοστό υψηλής ποιότητας εμβρύων και (18) την επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης.

### 6.2. Η έκφραση της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI

Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι τα ωάρια εκκρίνουν παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των κοκκιωδών κυττάρων που τα περιβάλλουν μέσα στο ωοθυλάκιο. Επίσης, τα κοκκιώδη κύτταρα, τα κύτταρα της θήκης και τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

Το γονίδιο SURVIVIN βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης SURVIVIN (16,5 KDa). Η SURVIVIN είναι προ-αποπτωτικό μόριο, απαραίτητο για την κυτταρική διαίρεση και την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η SURVIVIN αναστέλλει την απόπτωση που εξαρτάται από τις κασπάσες, αλλά φαίνεται ότι αναστέλλει και την ανεξάρτητη από τις κασπάσες απόπτωση (Zaffaroni and Pennati 2005; Hussein, 2005; Li and Ling, 2006). Στο γονίδιο της SURVIVIN υπάρχουν τρία εξόνια και τέσσερις κυρίαρχες περιοχές. Η SURVIVIN εκφράζεται κατά την διάρκεια της εμβυονικής και εμβρυϊκής ανάπτυξης και ρυθμίζεται προς τα κάτω και είναι μη ανιχεύσιμη σε φυσιολογικούς ιστούς. Όμως η SURVIVIN εκφράζεται και σε κάποιους φυσιολογικούς ιστούς όπως είναι το δέρμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, το ενδομήτριο και τα κοκκιώδη κύτταρα. Στα κοκκιώδη κύτταρα η SURVIVIN παίζει σπουδαίο ρόλο, δρώντας σαν μία λειτουργική πρωτεΐνη που σχετίζεται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της απόπτωσης (Ambrosini et al, 1997; Chiodino et al, 1999; Konno et al, 2000; O'Connor et al, 2000; O'Driscoll et al, 2003; Johnson et al, 2002). Η κλινική σημασία της έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για IVF ή ICSI δεν είναι ξεκαθαρισμένη. Από ότι γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη είναι η δεύτερη μελέτη στην διεθνή βιβλιογραφία που εξέτασε το ποσοστό έκφρασης της SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κύτταρα των γυναικών που υποβλήθηκαν σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθώς και την κλινική σημασία μιάς τέτοιας έκφρασης. Ο Fujino και συνεργάτες (2008) βρήκαν έκφραση της SURVIVIN και στα 28 δείγματα που μελέτησαν (Fujino et al, 2008). Στην παρούσα μελέτη έκφραση της SURVIVIN βρέθηκε στις 27 από τις 29 περιπτώσεις που μελετήθηκαν

(**93.1%**, 27/29). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφραση της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που είχαν σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας σε σχέση με τις φυσιολογικές γυναίκες (ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει τον προστατευτικό ρόλο της SURVIVIN στο μικροπεριβάλλον της ωοθήκης από καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή (σαλπιγγίτιδα), οι υδροσάλιγγες, η απολίνωση των σαλίγγων και οι σαλπιγγεκτομές. Ο Orvieto και συνεργάτες (2011) μελέτησαν την επίδραση της σαλπιγγεκτομής λόγω υδροσάλπιγγας στην έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και εμβρυομεταφοράς και βρήκαν σημαντική μείωση στην ανταπόκρισης της σύστοιχης ωοθήκης στην πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας ως προς την ανάπτυξη ωοθυλακίων (Orvieto et al, 2011). Είναι επομένως πιθανό η SURVIVIN να προσπαθεί να προστατεύει τις ωοθήκες, των οποίων ενδεχομένως έχει επιρρεασθεί η αιμάτωση λόγω της σαλπιγγεκτομής.

Στην παρούσα εργασία επίτευξη γονιμοποίησης παρατηρήθηκε στο εργαστήριο και στις 29 περιπτώσεις που μελετήθηκε η έκφραση της SURVIVIN. Η ικανότητα για γονιμοποίηση (fertilizability) ήταν 100%, ανεξάρτητα από την μέθοδο IVF ή ICSI που χρησιμοποιήθηκε. Βρέθηκε αυξημένη έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF σε σχέση με την ICSI. Ο Nakahara και συνεργάτες (1997) πρότειναν ότι όταν η ποιότητα των ωαρίων είναι μικρή, μετρώμενη με την απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρά τους, τότε τα ωάρια αυτά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να γονιμοποιηθούν με ICSI σε σχέση με την IVF μέθοδο (Nakahara et al, 1997). Όμως η Clavero και συνεργάτες (2003) βρήκαν ότι το ποσοστό της απόπτωσης στα κοκκιώδη κύτταρα δεν σχετίσθηκε με την ωριμότητα των ωαρίων και την ικανότητα για γονιμοποίησή τους κατά την ICSI ή την ποιότητα των ωοθυλακίων κατά την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας (Clavero et al, 2003). Παρά την διχογνωμία που υπάρχει στην διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την μελέτη της απόπτωσης των ωχρινοποιημένων κοκκιωδών κυττάρων ως προγνωστικό δείκτη της ποιότητας των ωοθυλακίων κατά την πρόκληση και της ωριμότητας των ωαρίων σε κύκλους IVF ή ICSI, η εκτίμηση της επιβίωσης στα κύτταρα αυτά μπορεί να παίζει έναν προγνωστικό ρόλο. Κάποιες ασθενείς από τον υποπληθυσμό των γυναικών με σαλπιγγικό παράγοντα που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και εμβρυομεταφορά πιθανώς να μπορούσαν να ωφεληθούν στην εκτίμηση της ποιότητας των ωαρίων τους με μέτρηση των επιπέδων έκφρασης της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρά τους έτσι ώστε εάν τα επίπεδα της SURVIVIN είναι χαμηλά στα κοκκιώδη κύτταρα να προτιμάται η μέθο-

δος ICSI, η οποία είναι διεισδητική μέθοδος και δεν απαιτεί καλής ποιότητας ωάρια, ενώ εάν τα επίπεδα της SURVIVIN είναι υψηλά στα κοκκιώδη κύτταρα των ωαρίων να προτιμάται η IVF, στην οποία προαπαιτείται η φυσιολογική αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίων-ωαρίου και η καλή ποιότητα των ωαρίων. Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη δεν συσχετίσθηκε η έκφραση της SURVIVIN με την ποιότητα των ωαρίων είναι κατανοητό καθότι η χορήγηση της FSH για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας αυτή καθευατή θεωρείται ότι προωθεί την επιβίωση των ωοθυλακίων, η οποία επιπρόσθετα προωθείται και από τα αυξημένα οιστρογόνα που παρατηρούνται κατά την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας.

Ο Fujino και συνεργάτες (2008) βρήκαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάμεσα στις γυναίκες με ενδομητρίωση και στις φυσιολογικές γυναίκες. Στις γυναίκες με ενδομητρίωση υπήρχε μικρότερη έκφραση της SURVIVIN. Όμως, ένας παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι στην παρούσα μελέτη μας μελετήθηκαν μόνο φυσιολογικές γυναίκες (αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας) και γυναίκες με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας. Γυναίκες με ενδομητρίωση δεν συμπεριλήφθησαν στην παρούσα μελέτη, καθότι η ενδομητρίωση προωθεί την απόπτωση (Nakahara et al, 1997). Επίσης, στην παρούσα μελέτη δεν συμπεριλήφθησαν γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες γιατί τα ανδρογόνα επίσης προωθούν την απόπτωση. Ο Fujino και συνεργάτες (2008) δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN ανάμεσα στις φυσιολογικές γυναίκες (αντρικός παράγοντας υπογονιμότητας) και στις γυναίκες με σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας, όπως βρήκαμε εμείς. Ο Fujino και συνεργάτες (2008) βρήκαν ότι η έκφραση της SURVIVIN στα κοκκιώδη κύτταρα σε όλες τις έγκυες γυναίκες της μελέτης τους ήταν υψηλότερη σε σχέση με όλες τις γυναίκες που δεν επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη. Κάτι τέτοιο όμως δεν προέκυψε από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

### 6.3. Η ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων OCT-4 και SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων των ωοθηκών του ανθρώπου που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI

Ο Guo και συνεργάτες το 2008, δημοσίευσαν ότι η έκφραση του OCT-4 στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικιών φαίνεται να τα προστατεύει από την απόπτωση που προκαλείται από στρες και μάλιστα φαίνεται αυτή η προστατευτική δράση να ασκείται διαμέσου του μονοπατιού της SURVIVIN (Guo et al, 2008). Από ότι γνωρίζουμε, η ταυτόχρονη

έκφραση των γονιδίων OCT-4 και SURVIVIN στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή δεν έχει μελετηθεί ξανά. Στην παρούσα εργασία βρήκαμε ότι δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του OCT -4 με τα επίπεδα έκφρασης της SURVIVIN. Έτσι, ενώ στα εμβρυονικά κύτταρα των ποντικών φαίνεται ότι η ελαττωμένη δραστηριότητα της SURVIVIN άμεσα σχετίζεται με ελαττωμένη έκφραση του OCT-4 (Guo et al, 2008) κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να ισχύει στα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF ή ICSI, όπως προκύπτει από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε σε 20 δείγματα την ταυτόχρονη έκφραση των OCT-4 και SURVIVIN και βρήκαμε ότι παρατηρήθηκε σε 8 περιπτώσεις (8/20). Η SURVIVIN εκφράσθηκε στις 19 περιπτώσεις (19/20) και το OCT-4 σε 9 περιπτώσεις (9/20). Στην μία περίπτωση που δεν εκφράσθηκε η SURVIVIN, ενώ υπήρχε έκφραση του OCT-4 παρατηρήθηκε κλινική εγκυμοσύνη. Η κλινική σημασία της ταυτόχρονης έκφρασης των γονιδίων SURVIVIN και OCT-4 θα έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Κεφάλαιο Πρώτο

Αραβαντινός Δ.Ι. Φυσιολογία της γυναίκας. Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, 1982.

Βάρρας Μ., Μιχαλάς Σ. Ο ρόλος των ανδρογόνων στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας. Εφηβ. Γυν. Αναπ. Εμμην. 1994, 7, 31-39.

Drummond A.E. The role of steroids in follicular growth. Reprod. Biol. Endocrinol. 2006, 4:16, doi:10.1186/1477-7827-4-16.

Fritz M.A., Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins 2011.

h.f.ullamann - Tandem Verlag GmbH. Άτλας ανατομίας. Γ.Κ. Ελευθερουδάκης Α.Ε. 2009.

Hammersen F. Sobotta/Hammersen Ιστολογία. Επιμέλεια - Μετάφραση Α. Κοντόπουλου. Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου 1982.

Hillier S.G. Paracrine control of follicular estrogen synthesis. Semin Reprod Endocrinol 1991, 9, 332-340.

Hussein M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum. Reprod. 2005, 11:162-178.

Johnson M.H. and Everitt B.J. Essential reproduction. Oxford BlackWell Scientific Publications, third edition 1991.

Larsen W.J. Human embryology. Churchili Livingstone New York, 1993.

Merchant-Larios H., Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. Prog. Clin. Biol. Res. 1981, 59B:383-392.

Messinis I.E., Messini Ch.I., Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010, 1205:5-11.

Nilsson E., Skinner M.K. Cellular interaction that control primordial follicle develpment and folliculogenesis. J. Soc. Gynecol. Investig. 2001, 8, S17-S20.

Oktem O., Oktay K. Current Knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. Birth Defects Research (Part C) 2009, 87:90-95.

Perez G.I., Maravei D.V., Trbovich A.M., Cidlowski J.A., Tilly J.L., Hughes F.M., Jr. Identification of potassium-dependent and independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. Biol. Reprod. 2000, 63:1358-1369.

Shaw R., Soutter P., Stanton S. Gynecology. Churchill Livingstone New York, 1992.

Sugiro N., Suzuki T., Kashida S., Karube A., Takiguchi S., Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regula-

tion by human chorionic gonadotropin. J. Clin. Endocrinol. Met. 2000, 85:4379-4386.

## Κεφάλαιο Δεύτερο

Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. Nat Rev Cancer. 2008;8:61-70. doi: 10.1038/nrc2293.

Ambrosini G, Adida C, Sirugo A, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting, J Biol Chem. 1998; 273:11177-82.

Amsterdam A., Keren-Tal I., Aharoni D. Cross-talk between cAMP and p53-generated signals in induction of diffentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells. Steroids 1996, 61:252-256.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. Nat. Rev. Cancer 2002, 2:420-430.

Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998, 281:1305-1308.

Asselin E., Wang Y., Tsang B.K. X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase / Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. Endocrinology 2001, 142:2451-2457.

Bates S., Phillips A.C., Clark P.A., Stott F., Peters G., Ludwig R.L., Vousden K.H. p14ARF links the tumor supressors RB and p53. Nature 1998, 395:124-125.

Bates S., Vousden K.H. Mechanisms of p53-madiated apoptosis. Cell Mol. Life Sci. 1999, 55:28-37.

Billig H., Furuta I., Hsueh A.J. Estrogen inhibit and androgens enhances ovarian granulosa

cell apoptosis. Endocrinology 1993, 133, 2204-2212.

Bobe J., Goetz F.W. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. Comp. Biochem. Physio. B. biochem. Mol. Biol. 2001, 129:457-481.

Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. Enzyme Res. 2011;2011:329098.

Bridgham J.T., Johnson A.L. Expression and regulation of Fas antigen and tumor necrosis factor receptor type I in hen granulosa cells. Biol. Reprod. 2001, 65:733-739.

Boone D.L, Tsang B.K. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. Biol. Reprod. 1998, 58:1533-1539.

Boumela I., Assou S., Aouacheria A., Haouzi D., Dechaud H., De Vos J., Handside A., Hammah S. Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. Endocrinology 2011, 141:549-561.

Braw R.H., Tsafriri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. J. Reprod. Fertil. 1980, 59:259-265.

Chakravarti A., Zhai G.G., Zhang M., Malhotra R., Latham D.E., Delaney M.A., Robe P., Nestler U., Song Q., Loeffler J. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. Oncogene 2004, 23:7494-7506.

Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. Clin. Cancer Res. 2001, 7:1821-1831.

Chun S.Y., Billig H., Tilly J.L., Furuta I., Tsafriri A., Hsueh A.J. Gonadotropin suppresssion of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrinology 1994, 135:1845-1853.

Chun S.Y., Eisenhauer K.M., Minami S., Billing H., Perlas E., Hsueh A.J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. Endocrinology 1996, 137:1447-1456.

Crook N.E., Clem R.J., Miller L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J. Virol. 1993, 67:2168-2174.

De Pol A., Marzona L., Vaccina F., Negro R., Sena P., Forabosco A. Apoptosis in different stages of human oogenesis. Anticancer Res. 1998, 18:3457-3461.

Degli-Esposti M.A., Dougall W.C., Smolak P.J., Waugh J.Y., Smith C.A., Goodwin R.G. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity 1997a, 7:813-820.

Degli-Esposti M.A., Smolak P.J., Walczak H., Waugh J., Huang CP., DuBose R.F., Goodwin R.G., Smith C.A., Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of emergin TRAIL receptor family. J. Exp. Med. 1997b, 186:1165-1170.

Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. Genes Dev. 1999, 13:239-252.

Devine P.J., Payne C.M., McCuskey M.K., Hoyer P.B. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat follicles. Biol. Reprod. 2000, 63:1245-1252.

Dohi T., Beltrami E., Wall N.R., Plescia J., Altieri D.C., Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. J. Clin. Invest. 2004a, 114:1117-1127.

Dohi T., Okada K., Xia F., Wilford C.E., Samuel T., Wlsh K., Marusawa H., Zou H., Armstrong R., Matsuazawa S., Salvesen G.S., Reed J.C., Altieri D.C. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J. Biol. Chem. 2004b, 279, 34087-34090.

Driancourt M.A., Fair T., Reynaud K. [Oocyte apoptosis:when, who, why?]. Contracept. Fert. Sex. 1998, 26:522-527.

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000, 102:33-42.

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep. 2006, 7(10):988-94.

Eisenhauer K.M., Chun S.Y., Billig H., Hsueh A.J. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. Biol. Reprod. 1995, 53:13-20.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol., 2007, 35:495-516.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. Nature 1998, 391:43-50.

Endoh T., Tsuji N., Asanuma K., Yagihashi A., Watanabe N. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1-and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcription gene transcription. Exp. Cell Res. 2005, 305, 300-311.

Erster S., Mihara M., Kim R.H., Petrenko O., Moll U.M., In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target activation. Mol. Cell Biol., 2004, 24:6728-6741.

Eskes R., Desagher S., Antonsson B., Martinou J.C. Bid induces the oligomerization and

insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. Mol. Cell Biol., 2000, 20:929-935.

Exley G.E., Tang C., McElhinny A.S., Warner C.M. Expression of caspase and BCL-2 apoptosis family members in mouse preimplantation embryos. Biol. Reprod., 1999, 61:231-239.

Felici M.D., Carlo A.D., Pesce M., Iona S., Farrace M.G., Piacentini M., Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. Cell Death Differ. 1999, 6:908-915.

Fenwick M.A., Hurst P.R. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. Reproduction2002, 124:659-665.

Flaws J.A., Kugu K., Trbovich A.M., DeSanti A., Tilly K.I., Hirshfield A.N., Tilly J.L. Interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death: dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicles. Endocrinology 1995, 136:5042-5053.

Fortugno P., Beltrami E., Plescia J., Fontana J., Pradhan D., Marchisio P.C., Sessa W.C., Altieri D.C. Regulation of survivin function by Hsp90. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100:13791-13796.

Franco A.V., Zhang X.D., Van Berkel E., Sanders J.E., Zhang X.Y., Thomas W.D., Nguyen T., Hersey P. The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. J. Immunol. 2001, 166:5337-5345.

Frizt M.A., Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Wolters Kluwer, Lippincott Williams and Wilkins (eds), 8th edition, 2011.

Fujino K., Yamashita Y., Hayashi A., Asano M., Morishima S., Ohmichi M. Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing in vitro fertilization - embryo transfer. Fertil. Steril. 2008, 89:60-65.

Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I., Debatin K.M. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Cancer Res., 1997, 57:3823-3829.

Grondahl M.L., Yding Andersen C., Bogstad J., Nielsen F.C., Meinertz H., Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. Human Reproduction 2010, 25:957-968.

Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 1999, 13:1899-1911.

Guillemin Y., Lalle G., Guerin J.F., Hamamah S., Aouacheria A. Oocytes and early embryos selective express the survival factor BCL2L10. J. Mol. Med. 2009, 87:923-940.

Gougeon A., Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. Mol. Cell Endocrinol. 2000, 163:33-42.

Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. Cell death. N. Engl. J. Med. 2009, 361:1570-1583.

Hsu S.Y., Lai R.J. Finegold M., Hsueh A.J. Targeted overexpession of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decrease follicle apoptosis, enhaced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. Endocrinology 1996, 137:4837-4843.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 2007;12:1543-1568. doi: 10.1007/s10495-007-0087-3.

Hussein M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum. Reprod. 2005, 11:162-178.

Johnson A.L., Bridgham J.T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary.

Reproduction, 2002, 124:19-27.

Johnson AL, Langer JS, Bridgham JT. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. Endocrinology. 2002, 143:3405-13.

Kashkar H. X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise. Clin Cancer Res. 2010, 15, 16(18):4496-502.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 172, 26:239-257.

Khalil S. Evaluation of the humoral immune response against survivin in patients with lung cancer. Doctoral Thesis. University of Thessaly, School of Sciences, Faculty of Medicine, Larissa, 2009.

Kim T.H., Zhao Y., Barber M.J., Kuharsky D.K., Yin X.M. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway of mitchondrial permeability transition pore and Bax. J. Biol. Chem. 2000, 275:39474-39481.

Kim J.M., Yoon Y.D., Tsang B.K. Involement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. Endocrinology 1999, 140:2307-2317.

Kromer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol. Today 1997, 18:44-51.

Kugu K., Ratts V.S., Piquette G.N. Tilly K.I., Tao X.J., Martimbeau S., Aberdeen G.W., Krajewski S., Reed J.C., Pere G.J., Albrecht E.D., Tilly J.L. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. Cell Death Differ. 1998, 5:67-76.

Kumazawa Y, Kawamura K, Sato T, Sato N, Konishi Y, Shimizu Y, Fukuda J, Kodama H, Tanaka T. HCG up-regulates survivin mRNA in human granulosa cells. Mol Hum Reprod. 2005 Mar;11(3):161-6. Epub 2005 Feb 11.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature. 1998;396:580-584. doi: 10.1038/25141.

Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br. J. Cancer 2005, 92:212-216.

Li F., Ling X. Survivin study: An update of "what is the next wave". Journal of Cellular Physiology, 2006, 208:476-486.

Li J., Kim J.M., Liston P., Li M., Miyazaki T., Mackenzie A.E., Korneluk R.G., Tsang B.K. Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. Endocrinology 1998, 139:1321-1328.

Li S., Zhao Y., He X., Kim T.H., Kuharsky D.K., Rabinowich H., Chen J., Du C., Yin X.M. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. J. Biol. Chem. 2002, 277:26912-26920

Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when release from mitochondria. Nature 2001, 412:95-99.

Liu T., Brouha B., Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. Oncogene 2004, 23:39-48.

Luo J., Xiao J., Tao Z., Li X. Detection of c-myc gene expression in nasopharyngeal carcinoma by nonradioctive in situ hybridization and immunohistochemistry. Chin. Med. J. (Engl.) 1997, 110:229-232.

Martins L.M., Iaccarino I., Tenev T., Gischmeissner S., Totty N.F., Lemoine N.R., Savopoulos

J., Gray C.W., Creasy C.L., Dingwall C., Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. J. Biol. Chem. 2002, 277:439-444.

Markstrom E., Svensson E.Ch., Shao R., Svanberg B., Billig H. Survival factors regulating apoptosis - dependence of follicle differentiation. Reproduction 2002, 123:23-30.

Marusawa H., Matsuzawa S., Welsh K., Zou H., Armstrong R., Tamm I., Reed J.C. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis susspression. EMBO 2003, 22:2729-2740.

Messinis I.E., Messini C.I., Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010, 1205:5-11.

Miyashita T., Reed J.C. Tumor supressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 1995, 80:293-299.

Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C. Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. Oncogene 1994, 9:1799-1805.

Morita Y., Tilly J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. Dev. Biol., 1999, 213:1-17.

Murphy CR, Sabel JL, Sandler AD, Dagle JM. Survivin mRNA is down-regulated during early Xenopus laevis embryogenesis. Dev Dyn. 2002, 225:597-601.

Nandedkar T.D., Dharma S.J. Expression of bcl(xs) and c-myc in atretic follicles of mouse ovary. Reprod. Biomed. Online 2001, 3:221-225.

Nguyen T., Thomas W., Zhang X.D., Gray C., Hersey P. Immunologically-mediated tumour cell apoptosis: the role of TRAIL in T cell and cytokine-mediated responses to melanoma.

Forum (Genova) 2000, 10:243-252.

Paquet Ph., Pierard G. Toxic epidermal necrolysis: revisiting the tentative link between early apoptosis and late necrosis (review). Int. J. Molec. Med. 2007, 19:3-10.

Peter M.E., Krammer P.H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ. 2003, 10:26-35.

Phillips A.C. Ernst M.K., Bates S., Rice N.R., Vousden K.H. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. Mol. Cell 1999, 4:771-781.

Porter S.B. Current status of clinical trials with anti-TNF. Chest 1997, 112:339S-341S.

Ratts V.S., Flaws J.A., Kolp R., Sorenson C.M., Tilly J.L. Ablation of bcl-2 gene expression decrease the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 1995, 136:3665-3668.

Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., Pickup D.J. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. Cell 1992, 69:597-604.

Reed J.C. Apoptosis-based therapies. Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1:111-121.

Ricci J.E., Gottieb R.A., Green D.R., Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. J. Cell Biol. 2003, 160:65-75.

Rosen A., Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. J. Cell Biochem. 1997, 64:50-54.

Samuel T., Okada K., Hyer M., Welsh K., Zapata J.M., Reed J.C. cIAP1 localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. Cancer Res. 2005, 65:210-218.

Sauerwald T.M., Betenbaugh M.J., Oyler G.A. Inhibiting apoptosis in mammalian cell culture using the caspase inhibitor XIAP and deletion mutants. Bioeng. 2002, 77:704-716.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO 1998, 17:1675-1687.

Schuler M., Green D.R. Mechanism of p53-dependent apoptosis. Biochem Soc. Trans. 2001, 29:684-688.

Shi Y. Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol. Cell 2002, 9:459-470.

Sugino N., Suzuki T., Kashida S., Karube A., Takiguchi S, Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 2000, 85:4379-4386.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J, Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P. Renninger J.M., Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999, 397:441-446.

Subramanian S., Steer C.J. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. J. Cell Physiol., 2010, 223:289-298.

Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. Science 1998, 281:1312-1316.

Thornborrow E.C., Manfredi J.J. The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate trancriptionally the human BAX promoter. J. Biol. Chem. 2001, 276:15598-15608.

Thorburn A., Behbakht K., Ford H. Trail receptor-targeted therapeutics: Resistance mecha-

nisms and strategies to avoid them. Drug Resist Updat 2008, 11:17-24.

Tilly J.L., Kowalski K.I., Schomberg D.W., Hsueh A.J. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid trancripts for gonadotropin receptors an dcytochrome P450 aramatase. Endocrinology 1992, 131:1670-1676.

Tilly J.L., Tilly K.I., Kenton M.L., Johnson A.L. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 1995. 136:232-241.

van Nassauw L., Tao L, Harrisson F. Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. Acta Histochem 1999, 101:103-112.

Wada M., Amae S., Sasaki H., Ishii T., Sano N., Nio M., Hayashi Y., Ohi R. The functional roles of porcine CD80 molecule and its ability to stimulate and regulate human anti-pig cellular response. Transplantation 2003, 75:1887-1894.

Wang H., Tsang B.K. Nodal signalling and apoptosis. Reproduction 2007, 133:847-853.

Wang H., Jiang J.Y., Zhu C., Peng C., Tsang B.K. Role and regulation of nodal/activin receptor-like kinase 7 signaling pathway in the control of ovarian follicular atresia. Mol. Endocrin. 2006, 20:2469-2482.

Wang Y., Asselin E., Tsang B.K. Involvement of transforming growth factor alpha in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by follicle-stimulatio hormone. Biol. Reprod. 2002, 66:1672-1680.

Wang Z., Tamura K., Yoshie M., Tamura H., Immakawa K., Kogo H. Prostaglandin F2alpha-induced functional regression of the corpus luteum and apoptosis in rodents. J. Pharmacol. Sci. 2003, 92:19-27.

Zaffaroni N., Pennati M. Survivin as a target for new anticancer interventions, J. Cell. Mol. Med. Vol 9, No 2, 2005 pp. 360-372.

Zhang T., Fields J.Z., Ehlich S.M., Boman BM. The chemopreventive agent sulindac attenuates expression of the antiapoptotic protein survivin in colorectal carcinoma cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004, 308:434-437.

Zou H., Li Y., Liu X., Wang X., An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem. 1999, 274:11549-11556.

## Κεφάλαιο Τρίτο

### Βλαστικά κύτταρα

Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. Cell Transplant. 2009,18:371-80.

Arici A., Oral E., Bahtiyai O et al. Leukemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. Human Reprod. 1997, 12:1233-1239.

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007, 25:1384-92.

Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, Gregory SA, Fung HC, Christopherson KW 2nd. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. Transfusion. 2008, 48:2638-44.

Bauer S., Patterson P.H. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewall in the adult brain. J. Neurosci. 2006, 26:12089-12099.

Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, Sharma RR, Saluja K, Dutta P, Walia R, Minz R, Bhadada S, Das S, Ramakrishnan S. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. Stem Cells Dev. 2009, 18:1407-16.

Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring HJ. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation.Differentiation. 2007, 75:279-91.

Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22(4):625-34.

Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. Biol Blood Marrow Transplant. 2008, 14:1031-8.

Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science. 1999 Jul 30;285(5428):754-6.

Bukovsky A. Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovary derived germ cell? Reprod. Biol. Endocrinol. 2005, 3:36-38.

Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefoski D, Balabanov R, Katsamakis G, Oyama Y, Russell EJ, Stern J, Muraro P, Rose J, Testori A, Bucha J, Jovanovic B, Milanetti F, Storek J, Voltarelli JC, Burns WH. non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. Lancet Neurol. 2009 Mar;8(3):244-53. Epub 2009 Jan

29.

Cao FJ, Feng SQ. 2009. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. Chin Med J (Engl). 20;122(2):225-31.

Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. Regen Med. 2009, 4:109-17.

Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential.. Int J Mol Med. 2006, 18:1089-1096.

Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Gali M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Stem Cells. 2009 Oct;27(10):2624-35.

Coskun S., Uzumcu M., Jaroudi K., et al. Presence of leukemia inhibitory factor, interleukin-12 in fuman follicular fluid during follicular growth. Am. J. Reprod. Immunol. 1998, 40:13-18.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 8(4): 315-7.

Donovan P.J., Gearhart J. The end of the beggining for pluripotent stem cells. Nature 2001, 414:92-97.

Dyce PW, Wen L, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. Nat Cell Biol. 2006, 8:384-90.

Flohr TR, Bonatti H Jr, Brayman KL, Pruett TL. The use of stem cells in liver disease. Curr Opin Organ Transplant. 2009, 14:64-71.

Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. J Biomed Sci. 2004, 1:652-60.

Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly dopaminergic neurons in vitro: potedntial therapeutic application of Parkinsonism. Stem Cells 2006, 24:115-24

Gargett CE. Stem cells in gynaecology. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2004 Oct;44(5):380-6.

Hubner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003, 300:1251-1256.

Jiang Y., Vaessene B., Lenvik T. et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. Exp Hematol 2002, 30:896-904.

Johnson J., Canning J., Kaneko T et al Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 2004, 428:145-150.

Jurga M, Lipkowski AW, Lukomska B, Buzanska L, Kurzepa K, Sobanski T, Habich A, Coecke S, Gajkowska B, Domanska-Janik K. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. Tissue Eng Part C Methods. 2009 Sep;15(3):365-72.

Kalabis J., Patterson M.J., Enders G.H. et al. Stimulation of human colonic epithelial cells by leukemia inhibitory factor is dependent on collagen-embedded fibroblasts in organotypic culture. FASEB J 2003, 17:1115-1117.

Καμπιλαύκος Π. Ο διαφαινόμενος ρόλος stem κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος, στο δέρμα

και τα κακοήθη νεοπλάσματα του δέρματος. Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες, Κατεύθυνση: Μοριακή Ανατομική, 2010

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007, 25:319-31.

Kenar H., Kose GT., Hasirci V. Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters. Mater Sci Mater Med. 2010, 21:989-97.

Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., Field L.J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells stable intracardiac grafts. J. Clin. Invest. 1996, 98:216-224.

Kossowska-Tomaszczuk K., DeGeyter C., DeGeyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. Stem Cells 2009, 27:210-219.

Liao W, Xie J, Zhong J, Liu Y, Du L, Zhou B, Xu J, Liu P, Yang S, Wang J, Han Z, Han ZC. Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. Transplantation. 2009, 15;87:350-9.

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC.Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica. 2006, 91:1017-1026.

Lumlsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R. Differentation of embryonic stem cells to insulin-sectreting structures similar to pancreatic islets. Science 2001, 292:1389-1384.

Lund R.D., Wang S., Lu B., Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ,

Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. Stem Cells. 2007, 25:602-11.

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet. 2008, 13;372:2023-30.

Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2006, 30:681-7.

Nilsson E.E., Kezele P., Skinner M.K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. Mol. Cell Endocrinol. 2002, 25:188:65-73.

Niswender G.D., Luengel J.L., Silva P.J. et al. Mechanisms controlling the function and the life span of the corpus luteum. Physiol. Rev. 2000, 80:1-24.

Oswal S., Ravindra S., Sanivarapu S. Stem cells in periodontics. J. Stomat. Occ. Med. 2011, doi 10.1007/s12548-011-0019-2.

Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A. Human embryonic stem cells. J. Cell Sci. 2000, 113:5-10.

Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K.2008. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. J Tissue Eng Regen Med. 2008, 2:394-399.

Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J., Direkze N.C., Poulsom R., Wright N.A. The new stem cell biology: Something for everyone. Mol. Pathol. 2003, 56:86-96.

Rachakatla RS, Marini F, Weiss ML, Tamura M, Troyer D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. Cancer Gene Ther. 2007, 10:828-35.

Revoltella RP, Papini S, Rosellini A, Michelini M, Franceschini V, Ciorba A, Bertolaso L, Magosso S, Hatzopoulos S, Lorito G, Giordano P, Simoni E, Ognio E, Cilli M, Saccardi R, Urbani S, Jeffery R, Poulsom R, Martini A. Cochlear repair by transplantation of human cord blood CD133+ cells to nod-scid mice made deaf with kanamycin and noise. Cell Transplant. 2008;17:665-78.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005, 23:220-9.

Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Prez-Bouza A, Neuss S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. Biomaterials 2010, 31:467-80.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998, 282:1145-1147.

Van Eijk M.J., Mandelbaum J., Salat-Baroux J. et al. Expression of leukemia inhibitory factor receptor subunits LIFRβ and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. Mol. Hum. Reprod. 1996, 2:355-360.

Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK. Autologous non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. JAMA. 2007 Apr 11;297(14):1568-76.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells, 2004;22:1330-7.

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. 2006. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells, 24:781-92.

Weissman IL. Stem cells--scientific, medical, and political issues. N Engl J Med. 2002 May 16;346(20):1576-9.

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. J Cell Biochem. 2007, 15;100:608-16.

Zhao L., Weir MD., Xu HH. Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering. Biomaterials 210, 31:3848-57.

## Το γονίδιο Oct-4

Baal N., Reisinger K., Jahr H. et al. Expression of the transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. Thromb. Haemost. 92:767-775, 2004.

Guo Y., Mantel C., Hromas R.A., Broxmeyer H.E. Oct-4 is crutical for Survivin/Antiapoptosis of murine embryonic stem cells subjected to stress: effects associated with Stat3/Survivin. Stem Cells 2008, 26: 30-34.

Kossowska-Tomaszczuk K., DeGeyter C., DeGeyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian fol-

licles. Stem Cells 2009, 27:210-219.

Lawson K.A., Dunn N.R., Roelen B.A., Zeinstra L.M., Davis A.M., Wright C.V., Korving J.P., Hogan B.L. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryos. Genes Dev. 1999, 13:424-436.

McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. Cell Prolif. 38:245-255, 2005.

Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell 1990, 60:461-472.

Pesce M., Scholer H.R. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. Mol. Reprod. Devel. 2000, 55:452-457.

Prusa A.-R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstchlager. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source of stem cell research? Human Reproduction 18(7):1489-1493, 2003.

Scholer H.R., Ruppert S., Suzuki N., et al. New type of POU domain in germ-line specific protein Oct-4. Nature 1990, 344:435-439,

Stefanidis K, Loutradis D, Anastasiadou V, Bletsa R, Kiapekou E, Drakakis P, Beretsos P, Elenis E, Mesogitis S, Antsaklis A. Oxytocin receptor- and Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid. Gynecol Endocrinol. 2008 May;24:280-284.

Tai M.H., Chang C.C., Kiupel M., et al. Oct4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis 26:495-502, 2005.

## Τα γονίδια της οικογένειας DAZL

Brook M., Smith J.W.S., Gray N. The DAZL and PABL families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. Reproduction 2009, 137:595-617.

Collier B., Gorgoni B., Loveridge C., Cooke H.J., Gray N.K. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. EMBO J 2005, 20:2656-2666.

Dorfman D.M., Genest D.R., Reijo Pera R.A. Human DAZL1 encodes a condidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells. Hum. Reprod. 1999, 14: 2531-2536.

Fassnacht W., Mempel A., Strowitzki T., Vogt P.H. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. Current Medicinal Chemistry 2006, 13:1397-1410.

Lin Y., Gill M.E., Koubova J., Page D.C. Germ cell-intrinsic and extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. Science 2008, 322:1685-1687.

Nishi S., Hoshi N., Kasahara M., Ishibashi T., Fujimoto S. Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes. Molec. Hum. Reprod. 1999, 5:495-497.

Pan H.A., Tsai S.J., Chen C.W., Lee Y.C., Lin Y.M., Kuo P.L. Expression of DAZL protein in the humann corpus luteum. Molec. Hum. Reprod. 2002, 8:540-545.

Pan H.A., Lee Y.C., Teng Y.N., Tsai S.J., Lin Y.M., Kuo P.L. CDC25 protein expression and interaction with DAZL in human corpus luteum. Fertil. Steril. 2009, 92:1997-2003.

Reijo R., Lee T.Y., Salo P., Alagappan R., Brown L.G., Rosenber M et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nature Genetics 1995, 10: 383-393.

Reynolds N., Cooke H.J. Role of DAZ genes in male infertility. Reprod. Biomed. Online 2005, 10:72-80.

Ruggiu M., Cooke H.J. In vivo and in vitro analysis of homodimerization activity of the mouse Dazl1 protein. Gene 2000, 252:119-126.

Ruggiu M, Speech R., Taggart M., McKay S.J., Kilanowski F., Saunders P., Dorn J., Cook H.J. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmatic protein essential for gametogenesis. Nature 1997, 389:73-77.

Stefanidis K., Loutradis D., Koumbi L., Anastasiadou V., Dimopoulou V., Kiapekou E., Lavdas A.A., Mesogitis S., Antsaklis A. Deleted in azoospermia-like (DAZL) gene-expression cells in human amniotic fluid: a new source for germ cells research? Fertil. Steril. 2008, 90:798-804.

Tung J.Y., Luetjens C.M., Wistuba J., Xu E.Y., Reijo P., Gromoll J. Evolutionary comparison of the reproductive genes, DAZL and BOULE in primates with and without DAZ. Devel. Genes Evol. 2006a, 216:158-168.

Xu E.Y., Moore F.L., Pera R.A. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans Proc. Nat. Acad. Scien. 2001, 98:7414-7419.

Yen P.H. Putative biological functions of the DAZL family. Int. J. Androl., 2004, 27:125-129.

### Κεφάλαιο Έκτο

Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat. Med. 1997, 3:917-21.

Boiani M., Eckardt S., Scholer H.R., McLaughlin K.J. Oct4 distribution and level in mouse

clones: consequences for pluripotency. Genes Dev. 2002, 16:1209-1219.

Brook M., Smith J.W.S., Gray N. The DAZL and PABL families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. Reproduction 2009, 137:595-617.

Chan R.W., Schwab K.E., Gargett C.E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. Biol. Reprod. 2004, 70:1738-1750.

Clavero A., Castila J.A., Nunez A.I., Garcia-Pena M., Maldonado V., Fontes J., Mendoza N., Matinez L. Apoptosis in human granulosa cells after inductio of ovulation in women participating in an intracytoplasmatic sperm injection program. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2003, 110:181-185.

Clerc R.G., Corcoran L.M., Lebowitz J.H., Boltimore D., Sharp P.A. The B-cell specific Oct-2 protein contains POU box- and homobox-type domains. Genes Dev. 1988, 2:1570-1581.

Chiodino C., Cesinaro A.M., Ottani D., Fanstini F., Giannetti A., Trentini G.P., et al. Communication: expression of the novel inhibition of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. J. Invest. Dermatol. 1999, 113:415-418.

Donovan P.J. High octane fuel powers the stem cell. Nat. Genet. 2001, 29:246-247.

Dorfman D.M., Genest D.R., Reijo Pera R.A. Human DAZL1 encodes a condidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells. Hum. Reprod. 1999, 14: 2531-2536.

Fujino K., Yamashita Y., Hayashi A., Asano M., Morishima S., Ohmichi M. Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing in vitro fertilization - embryo transfer. Fertil. Steril. 2008, 89:60-65.

Gargett C.E. Stem cells in gynaecology. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol., 44:380-386.

Hussein M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum. Reprod. 2005, 11:162-178.

Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418:41-49, 2002.

Johnson A.L., Langer J.S., Bridgeham J.T. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. Endocrinology 2002, 143:3404-3413.

Konno R., Yamakawa H., Utsunomiya H., Ito K., Sato S., Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. Mol. Hum. Reprod. 2000, 6:529-34.

Kossowska-Tomaszczuk K., DeGeyter C., DeGeyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. Stem Cells 2009, 27:210-219.

Li F., Ling X. Survivin study: An update of "what is the next wave". Journal of Cellular Physiology, 2006, 208:476-486.

Matthai C., Horvai R., Noe M., Nagele F., Radjadi A., van Trotsenburg M., Huber J., Kolbus A. Oct-4 expression in human endometrium. Molec. Hum. Reprod. 2006, 12:7-10.

Medvedev SP, Shevchenko AI, Elisaphenko EA, Nesterova TB, Brockdorff N, Zakian SM. Structure and expression pattern of Oct4 gene are conserved in vole Microtus rossiaemeridionalis. BMC Genomics. 2008, 9:162, doi: 10.1186/1471-2164-9-162.

Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, Hiroi M. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. Fertil Steril. 1997, 68:312-317.

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pruripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU trancription factor Oct-4. Cell 1998, 95:379-391.

Nishi S., Hoshi N., Kasahara M., Ishibashi T., Fujimoto S. Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes. Molec. Hum. Reprod. 1999, 5:495-497.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, ded-ifferntiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. 2000, 24:372-376.

O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells.Am J Pathol. 2000 Feb;156(2):393-8.

O'Driscoll L., LInehan R., Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological condi-tion. Curr. Cancer Drug Targets 2003, 3:131-152.

Orvieto R, Saar-Ryss B, Morgante G, Gemer O, Anteby EY, Meltcer S. Does salpingectomy affect the ipsilateral ovarian response to gonadotropin during in vitro fertilization-embryo transfer cycles? Fertil Steril. 2011, 95:1842-1844.

Pan H.A., Tsai S.J., Chen C.W., Lee Y.C., Lin Y.M., Kuo P.L. Expression of DAZL protein in the humann corpus luteum. Molec. Hum. Reprod. 2002, 8:540-545.

Pan H.A., Lee Y.C., Teng Y.N., Tsai S.J., Lin Y.M., Kuo P.L. CDC25 protein expression and interaction with DAZL in human corpus luteum. Fertil. Steril. 2009, 92:1997-2003.

Pesce M., Scholer H. Oct-4: Control of totipotency and germ line determination. Mol. Rep. Dev. 2000, 55:452-457.

Pesce M., Scholer H. Oct-4: gatekeeper at the beginnings of mammalian development. Stem

Cells 2001, 19: 271-278.

Ruggiu M, Speech R., Taggart M., McKay S.J., Kilanowski F., Saunders P., Dorn J., Cook H.J. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmatic protein essential for gametogenesis. Nature 1997, 389:73-77.

Scheidereit C., Cromlish J.A., Gerster T., Kawakami K., Balmaceda C.G., Currie R.A., Roeder R.G. A human lymphoid-specific transcription factor that activate immunoglobulin genes is a homebox protein. Nature 1998, 336:551-557.

Scholer H., Rupert S., Suzuki N., Chowdhury K., Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature 1990a, 244:435-439.

Scholer H., Dressler G., Balling R., Rohdewohld H., Gruss P. Oct-4: a germ line-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. EMBO J. 1990b, 9:2185-2195.

Stefanidis K., Loutradis D., Koumbi L., Anastasiadou V., Dimopoulou V., Kiapekou E., Lavdas A.A., Mesogitis S., Antsaklis A. Deleted in azoospermia-like (DAZL) gene - expression cells in human amniotic fluid: a new source for germ cell research? Fertil Steril 2008, 90:798-804.

Yeom Y., Fuhrmann G., Ovitt C., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hubner K., Scholer HR. Germ line regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle fo embryonal cells. Integrated Ann. Indexes 1996, 122:881-894.

Zaffaroni N., Pennati M. Survivin as a target for new anticancer interventions, J. Cell. Mol. Med. Vol 9, No 2, 2005 pp. 360-372.