



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Π.Μ.Σ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική Εργασία

**“Συνδυαστική μελέτη των πολυμορφισμών στις θέσεις -
29 και Ser680Asn του υποδοχέα της FSH σε γυναίκες
IVF/ICSI και σε ομάδα ελέγχου”**

Χρύσα Πασχαλίδου
Βιολόγος

Επιβλέπουσα Συνεργάτις: Δρ. Έλλη Αναγνώστου

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ**, Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας
Πανεπιστημίου Αθηνών
2. **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΑΛΛΙΑΝΙΔΗΣ**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-
Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών
3. **ΠΕΤΡΟΣ ΔΡΑΚΑΚΗΣ**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Την κυρία Αναγνώστου Έλλη για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγησή της σε κάθε τμήμα της εργασίας μου, τις συμβουλές και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε για να ολοκληρωθεί. Επίσης θέλω να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την υπομονή και την ηθική υποστήριξη που είχε καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Τα μέλη της επιτροπής για τις συμβουλές, και τη συμβολή τους στη διεκπεραίωση της εργασίας μου.

Την οικογένεια μου και ακόμα περισσότερο τον πατέρα μου, που όλο αυτό το χρονικό διάστημα με στήριζαν και με ενθάρρυναν να συνεχίζω για να ολοκληρώσω την έρευνά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1. Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	7
1.1 Υποθάλαμος-Υπόφυση-Γονάδες	7
1.2 Ωοθυλακιογένεση	8
1.3 Γονιμοποίηση	10
1.4 Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη και Εμφύτευση	11
2 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	11
2.1 Ορισμοί.....	11
2.2 Επιδημιολογία.....	12
2.3 Φυσιολογική σύλληψη και Διαγνωστική προσέγγιση υπογονιμότητας.....	12
2.4 Αίτια υπογονιμότητας	13
2.4.1 Σαλπινγικός παράγοντας	13
2.4.2 Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας	13
2.4.3 Ενδομητρίωση.....	14
2.4.4 Τραχηλικός παράγοντας	14
2.4.5 Μητριάιος παράγοντας.....	15
2.4.6 Ανεξήγητα αίτια	15
2.5 Θεραπεία υπογονιμότητας	15
3 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	16
3.1 Μέθοδοι Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.....	16
3.1.1 Η ενδομήτριος σπερματέγχυση (IUI)	16
3.1.2 Η κλασσική γονιμοποίηση (IVF).....	17
3.1.3 Η μικρογονιμοποίηση (ICSI).....	18
3.1.4 Δωρεά γαμετών.	18
3.1.5 Παρένθετη μητρότητα	19
3.1.6 Κρυοσυντήρηση.....	19
3.1.7 Ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών ή εμβρύων (GIFT, ZIFT).....	19
4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	19
4.1 G-πρωτεΐνες	20
4.2 Υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCRs).....	21
4.2.1 Ταξινόμηση GPCRs	21
4.2.2 Δομή GPCRs.....	21
4.2.3 Μονοπάτια μετάδοσης του σήματος που αφορούν τους συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς.	22
4.2.4 Μηχανισμοί απευαισθητοποίησης του υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνη.	24
4.3 Οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών. Η ορμόνη FSH.	26
4.4 Υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες. Υποδοχέας της FSH (FSHR).....	28
4.4.1 Δομή υποδοχέα της FSH (FSHR).....	28
4.4.2 Σύνδεση του υποδοχέα FSHR με το μόριο συνδέτη FSH και μεταφορά του σήματος	30
4.4.3 Δομή του γονιδίου του υποδοχέα FSHR.....	31
4.4.4 Μεταλλάξεις στο γονίδιο του FSHR	33
4.4.5 Πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο του FSHR.....	36
5 Σκοπός της Μελέτης.....	40
6 Υλικά & Μέθοδοι.....	41
6.1 Πληθυσμός υπό μελέτη	41
6.2 Πρωτόκολλο υποβοηθούμενης γονιμοποίησης.....	41

6.3	Ανίχνευση πολυμορφισμών με πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real Time-PCR).....	43
6.3.1	Συσκευή LightCycler 480 για την ανίχνευση.....	45
6.3.2	Αναλώσιμα υλικά για τα πειράματα Real-timePCR.....	45
6.3.3	Απομόνωση DNA.....	43
6.3.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PolymeraseChainReaction, PCR) Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
6.3.5	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
6.3.6	Πραγματικού Χρόνου (RealTime) PCR	46
6.3.7	Πειραματική Διαδικασία ανίχνευσης των πολυμορφισμών Ser680Asn και -29 του FSHR γονιδίου.	50
6.4	Στατιστική Ανάλυση.....	52
7	Αποτελέσματα	53
7.1	Κατανομή γονοτύπων στον υπό μελέτη πληθυσμό και στην ομάδα μαρτύρων..	53
7.2	Κλινικά και άλλα χαρακτηριστικά των γυναικών υπό μελέτη αναφορικά με τους γονότυπους των πολυμορφισμών Ser680Asn και -29 του γονιδίου FSHR	54
7.3	Κλινικά και άλλα χαρακτηριστικά των γυναικών υπό μελέτη σε σχέση με τους συνδυασμούς των γονοτύπων των πολυμορφισμών Ser680Asn και -29 του γονιδίου FSHR	59
7.4	Ανάλυση υποομάδας πτωχών απαντητριών	62
8	Συζήτηση-Συμπεράσματα	63
9	Περίληψη	70
10	Summary	72
11	Βιβλιογραφία	74

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

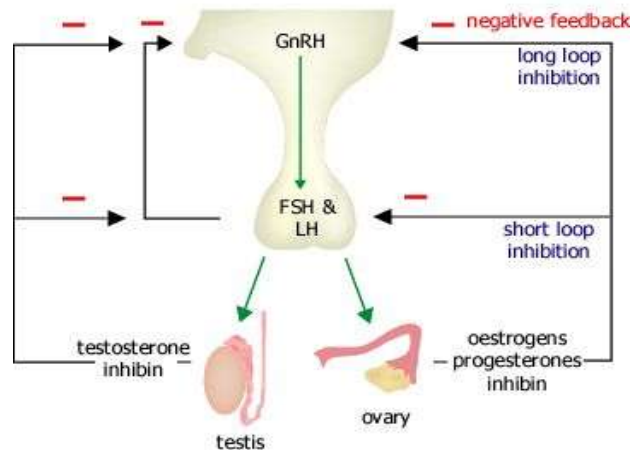
1.1 Υποθάλαμος-Υπόφυση-Γονάδες

Η φυσιολογική λειτουργία της αναπαραγωγής ελέγχεται από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (Υ.Υ.Γ.) και αφορά σε ένα ενιαίο σύστημα που λειτουργεί συνεργικά, ρυθμίζοντας διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος όπως η αναπαραγωγή, ενώ ελέγχει την ανάπτυξη και τη γήρανση (Vander A.).

Η λειτουργία της αναπαραγωγής ελέγχεται από μια αλυσιδωτή σειρά έκκρισης ορμονών. Η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης, (GnRH, Gonadotropin-releasing hormone) είναι μία ορμόνη του υποθαλάμου η οποία εκκρίνεται από τα νευροενδοκρινή κύτταρα του τοξοειδή πυρήνα και καταλήγει στην πρόσθια υπόφυση, μέσω του πυλαίου αγγειακού συστήματος. Εκεί η GnRH δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς των γοναδοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροπινών, δηλαδή της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH, Follicle stimulating hormone) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH, Luteinizing hormone)(Vander A.).

Οι γοναδοτροπίνες είναι οι ορμόνες που δρουν στις γονάδες, δηλαδή στους όρχεις και τις ωothήκες, και ωothήκες, και ενεργοποιούν τη διεργασία της ωογένεσης και της σπερματογένεσης. Επίσης, με τη δράση των τη δράση των γοναδοτροπινών οι γονάδες παράγουν στεροειδείς ορμόνες του φύλου. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεκριμένα οι ωothήκες εκκρίνουν οιστρογόνα, ινχιμίνη (ανασταλτίνη) και προγεστερόνη ενώ οι όρχεις ενώ οι όρχεις τεστοστερόνη και ινχιμίνη (

Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (πηγή:<http://www.endocrinesurgeon.co.uk/index.php/what-is-the-hypothalamo-pituitary-axis>)

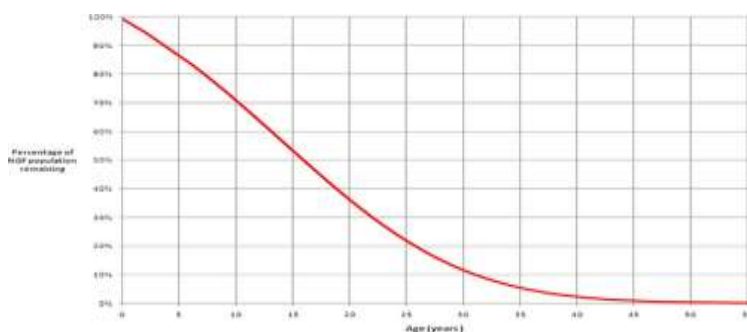
Τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και η ινχιπίνη έχουν ανατροφοδοτική επίδραση στην έκκριση FSH, LH. Επίσης, τα οιστρογόνα δρουν ανασταλτικά στην παραγωγή GnRH από τον υποθάλαμο. Σε υψηλή όμως συγκέντρωση τα οιστρογόνα έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση του κύματος της LH που επιφέρει την ωοθυλακιορρηξία. Η ινχιπίνη αναστέλλει τη δράση της ακτιβίνης που φυσιολογικά ενεργοποιεί τα κύτταρα που παράγουν GnRH. Σε υψηλή συγκέντρωση προγεστερόνης, στα κύτταρα του υποθαλάμου αναστέλλεται η παραγωγή GnRH. Αυτό συμβαίνει για να μην πραγματοποιηθεί το κύμα της LH στην εκκριτική φάση ή στην εγκυμοσύνη (Vander A.).

Στους άνδρες η LH διεγείρει την έκκριση της τεστοστερόνης η οποία είναι ορμόνη αναγκαία για τη σπερματογένεση.

1.2 Ωοθυλακιογένεση

Η ωοθυλακιογένεση ξεκινά κατά την 7^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής, όταν τα αρχέγονα ωοκύτταρα που προέρχονται από το ενδόδερμα του λεκιθικού ασκού, μεταναστεύσουν προς τους γεννητικούς κρημνούς. Ύστερα από πολλές μιτωτικές διαιρέσεις αυξάνουν σε αριθμό. Ήδη από την 11^η-12^η εβδομάδα της κύησης ξεκινούν να μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια μπαίνοντας στο στάδιο της μείωσης, σταματώντας όμως στη δικτυοταινία της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, έως την έναρξη της εφηβείας. Κατά την 20^η εβδομάδα κύησης τα ωοθυλάκια στον φλοιό της ωοθήκης, φτάνουν στο μέγιστο αριθμό τους, $6-7 \times 10^6$ (McGee and Hsueh 2000). Μετά από εκείνη τη στιγμή ξεκινά η απόπτωση των ωοθυλακίων με έντονο ρυθμό, με αποτέλεσμα κατά τη γέννηση να έχουν απομείνει περίπου 1.000.000 ωοθυλάκια στις ωοθήκες της γυναίκας (Block 1953; Forabosco et al. 1991).

Η απώλεια των ωοθυλακίων συνεχίζει κατά τη διάρκεια ζωής της γυναίκας και κατά την εφηβεία απομένουν περί τα 300.000-400.000 ωοθυλάκια (Block 1952) από τα οποία θα οδηγηθούν σε ωορρηξία τα 400-500 (<1% του συνόλου). Η έλευση της εμμηνόπαυσης, γύρω στα 50 έτη, σημαίνει την παύση της ωοθηκικής λειτουργίας: τα ωοθυλάκια που αποτελούν την «αποθήκη ωαρίων» της γυναίκας ελαττώνονται κατά πολύ και τελικά παύουν να υπάρχουν καθώς έχουν οδηγηθεί στην ατρησία. Όπως διαφαίνεται και στην παρακάτω καμπύλη (Εικόνα 2), το 95% των γυναικών έως την ηλικία των 30, διατηρούν το 12% των ωοθυλακίων στις ωοθήκες ενώ ως την ηλικία των 40 μόνο το 3% (Wallace and Kelsey 2010).



Εικόνα 2: Μεταβολή των ωοθηκικών αποθεμάτων με την αύξηση της ηλικίας (από τη γέννηση έως τα 55 έτη). Το μέγιστο απόθεμα ωοθηκών θεωρείται πως υφίσταται τη 18^η-22^η εβδομάδα κύησης (Πηγή: Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause (2010) W. Hamish B. Wallace doi:10.1371/journal.pone.0008772.g005).

Στάδια ανάπτυξης ωοθυλακίων

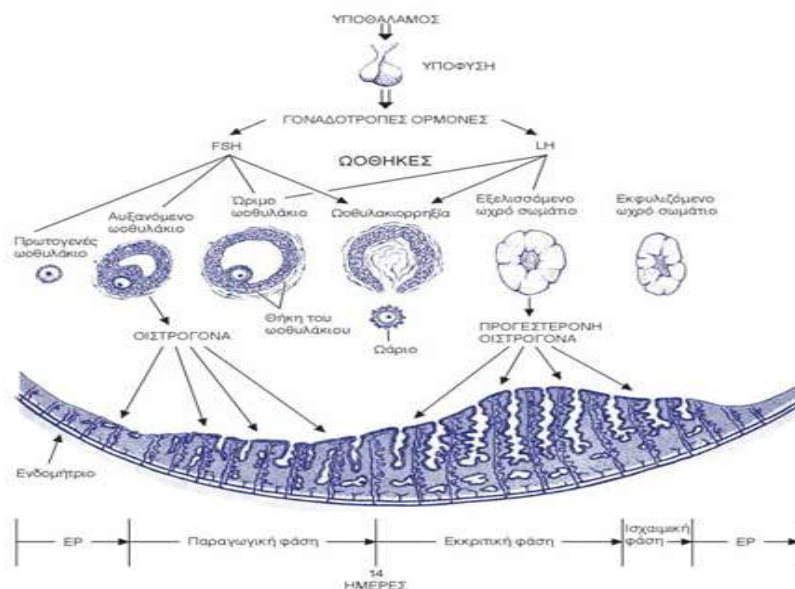
Η ωοθήκη περιέχει ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και ωρίμασης. Τα εξελικτικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης είναι τα εξής:

Αρχέγονο ωοθυλάκιο: περιλαμβάνει το ανώριμο ωοκύτταρο το οποίο περιβάλλεται από μια επίπεδη-πλακώδη στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια είναι αδρανή, χωρίς να έχουν βιολογική δράση, κατάσταση όπου μπορεί να παραμείνουν ακόμη και για 50 χρόνια. Αποτελούν δείκτη του αναπαραγωγικού δυναμικού της ωοθήκης. Η διάμετρός τους είναι 0,03-0,05mm.

Πρωτογενές ωοθυλάκιο: Το ωάριο διαχωρίζεται από κοκκώδη κύτταρα διαμέσου της διάφανης ζώνης. Πρόκειται για μια φάση ενεργοποίησης: τα γονίδια αρχίζουν να μεταγράφονται, δημιουργούνται τα μονοπάτια επικοινωνίας ωαρίου-κοκκωδών κυττάρων ενώ τα γύρω κοκκώδη από πλακώδη γίνονται κυβοειδή. Παρόλο που τα πρωτογενή ωοθυλάκια δεν υπόκεινται ακόμα σε ρύθμιση από τις γοναδοτροφίνες, αρχίζουν να αναπτύσσονται οι υποδοχείς της FSH. Για την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου απαιτούνται περίπου 150 ημέρες, ενώ η διάμετρός τους είναι 0,1mm.

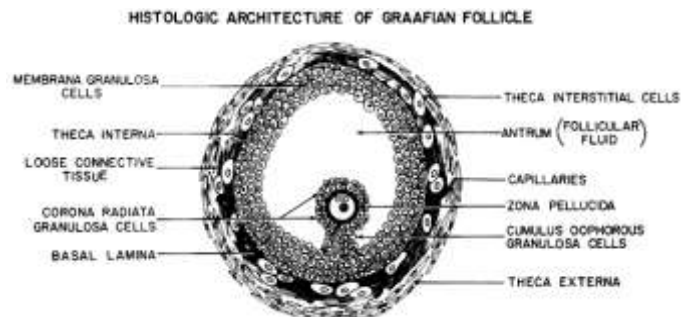
Δευτερογενές ωοθυλάκιο (προ-άντρου): Αυξάνει το μέγεθος του ωοθυλακίου σε 0,2mm, αυξάνονται οι στοιβάδες των κοκκωδών ενώ παρουσιάζονται τα πρώτα κύτταρα της θήκης. Για την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου απαιτούνται περισσότερες από 120 ημέρες.

Δευτερογενές ωοθυλάκιο (με άντρο): επιτελείται γρήγορος πολλαπλασιασμός κοκκωδών κυττάρων και κυττάρων της θήκης. Η ανάπτυξη των δευτερογενών ωοθυλακίων εξαρτάται πλέον από τη διαθεσιμότητα της FSH, από τη στιγμή που ξεκινά να αναπτύσσεται το άντρο. Τα κύτταρα της θήκης εκφράζουν υποδοχείς για την LH, ορμόνη που προάγει την παραγωγή ανδρογόνων στα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 3: Η σχέση υποθαλάμου - υπόφυσης - ωοθήκης και η επίδραση των ορμονών στην ωοθυλακιογένεση κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου (Πηγή: Τρύφων Γεωργ. Λαϊνάς, Οικογενειακή Ιατρική Εγκυκλοπαίδεια).

Ωριμο, με άντρο, ωοθυλάκιο: προκύπτει υπό συνθήκες έντονου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης και γρήγορα εξελίσσεται σε πιο ώριμες μορφές με μεγάλο άντρο. Το στάδιο αυτό που βρίσκεται κάτω από την επίδραση γοναδοτροφινών και στεροειδών ορμονών διαρκεί 2-3 μήνες και τελικά θα δημιουργήσει τα ώριμα ωοθυλάκια από τη δεξαμενή των οποίων και υπό την επίδραση της FSH θα ξεκινήσει η στράτευση του κύματος που θα εξελιχτεί μέσα σε ένα κύκλο προς την ωορρηξία. Πιο συγκεκριμένα, προς το τέλος της ωχράς φάσης κάθε κύκλου, υπό τη δράση της FSH, θα στρατευτεί ένα κύμα 5-6 ωοθυλακίων για εξέλιξη στον αμέσως επόμενο κύκλο. Από αυτό το κύμα ωοθυλακίων, ένα θα αποτελέσει το γραφιανό ωοθυλάκιο (διάμετρος ~ 20 mm).



Εικόνα 4: Το ώριμο-γραφιανό ωοθυλάκιο

(https://www.glowm.com/section_view/heading/Follicle%20Growth%20and%20Development/item/288)

1.3 Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στη λήκυθο της σάλπιγγας και απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ωρίμανση του ωαρίου και η ενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου αφού εισέλθει στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας. Το σπερματοζωάριο εισέρχεται στο ωάριο και οι απλοειδείς πυρήνες (23 χρωμοσώματα ο καθένας) συνενώνονται με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ο ζυγώτης, με 46 χρωμοσώματα. Η συνολική διαδικασία διαρκεί γύρω στις 24 ώρες.

Στο αρχικό στάδιο της γονιμοποίησης το σπερματοζωάριο εισχωρεί ανάμεσα στα κύτταρα που αποτελούν τη στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρων. Από την κεφαλή του σπερματοζωαρίου εκκρίνεται υαλουρονιδάση, ένζυμο το οποίο διασπά το υαλουρονικό οξύ που βρίσκεται μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων. Η ενζυματική λύση του υαλουρονικού οξέος επιτρέπει στο σπερματοζωάριο να κινηθεί ανάμεσα στα κοκκώδη και να φτάσει στη διάφανη ζώνη. Στη συνέχεια, γλυκοπρωτεΐνες της διάφανης ζώνης του ωαρίου (ZP3) αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου (ZP1,ZP2) και επιτρέπουν την πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο πυροδοτώντας την ακροσωμική αντίδραση. Κατά την αντίδραση αυτή η εξωτερική μεμβράνη του ακροσώματος συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου προκαλώντας έκκριση των περιεχομένων του ακροσώματος. Βασική προϋπόθεση για να διέλθει το σπερματοζωάριο από τη διάφανη ζώνη είναι να απελευθερωθούν τα ένζυμα από το ακρόσωμα τα οποία προκαλούν λύση της διάφανης ζώνης. Αφού εισέλθει το σπερματοζωάριο στο ωάριο η διάφανη ζώνη μεταβάλλεται και καθίσταται αδιαπέραστη σε άλλα σπερματοζωάρια για αποφυγή πολυσπερμίας. Σε ένα τρίτο στάδιο, συνενώνονται οι κυτταρικές μεμβράνες των δύο γαμετών επιτρέποντας έτσι στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, πλησιάζουν οι δύο προπυρήνες και ολοκληρώνεται η δεύτερη μειωτική διαίρεση(Vander A.).

Συνολικά, αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών είναι 1) η αντίδραση του φλοιού, δηλαδή η απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων που κάνουν τη διάφανη ζώνη αδιαπέραστη στα άλλα σπερματοζωάρια, 2) η ενεργοποίηση του ωαρίου και η συνέχιση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και 3) η δημιουργία των δύο προπυρήνων. Ο αρσενικός και ο θηλυκός προπυρήνας έρχονται σε επαφή, χάνουν τα πυρηνικά περιβλήματα και αρχίζει ο διπλασιασμός του DNA. Μητρικά και πατρικά χρωμοσώματα τοποθετούνται στην άτρακτο, προετοιμαζόμενα για τη μιτωτική διαίρεση, ενώ ταυτόχρονα κινούνται προς τους αντίθετους πόλους του ωαρίου. Στη συνέχεια δημιουργείται αύλακα η οποία διαχωρίζει σε δύο μέρη το κυτταρόπλασμα σχηματίζοντας δύο κύτταρα. Έτσι, 30 ώρες μετά από τη γονιμοποίηση σχηματίζεται ο ζυγώτης με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (Vander A.).



Εικόνα 5: Γονιμοποιημένο ωάριο(ζυγώτης) όπου φαίνονται οι δύο προπυρήνες που προέρχονται από το μητρικό και πατρικό γενετικό υλικό (<http://www.advancedfertility.com/zygotes1.htm>).

1.4 Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη και Εμφύτευση

Αφού ολοκληρωθεί η γονιμοποίηση, ο ζυγώτης, το πρώτο κύτταρο του οργανισμού, αρχίζει να υφίσταται μιτωτικές διαιρέσεις και έτσι σταδιακά δημιουργείται έμβρυο δύο, τεσσάρων, οκτώ κυττάρων, μορίδιο, πρώιμη βλαστοκύστη και τέλος όψιμη βλαστοκύστη. Στο στάδιο της βλαστοκύστης τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται και διαχωρίζονται σε δύο διακριτούς πληθυσμούς κυττάρων, την έσω κυτταρική μάζα (εμβρυοβλάστη) από την οποία προέρχεται το κυρίως έμβρυο και μέρος των εξωεμβρυικών ιστών, και την έξω κυτταρική μάζα (τροφοβλάστη) από την οποία δημιουργείται ο πλακούντας (McGee and Hsueh 2000).

Η βλαστοκύστη περιβάλλεται από τη διάφανη ζώνη. Όσο το έμβρυο αναπτύσσεται η κοιλότητα της βλαστοκύστης διογκώνεται και η διάφανη ζώνη λεπταίνει και τελικά οδηγείται σε ρήξη (6^η μέρα), επιτρέποντας στο έμβρυο να προσκολληθεί στο ενδομήτριο.

Η εμφύτευση της βλαστοκύστης αρχίζει 1-2 μέρες ύστερα από την είσοδο του γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα, κατά την 18^η-19^η μέρα του κύκλου, ενώ η βλαστοκύστη αιωρείται στην κοιλότητα της μήτρας για 1-2 μέρες προτού εμφυτευτεί. Η διαδικασία της εμφύτευσης πραγματοποιείται σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα υποδεκτικότητας του ενδομητρίου το οποίο ονομάζεται «παράθυρο εμφύτευσης», κατά το οποίο αφού το έμβρυο προσκολληθεί στο ενδομήτριο διεισδύει στο επιθήλιο σύμφωνα με τον προσανατολισμό της κυτταροτροφοβλάστης και εγκαθιστά ένα στρώμα τροφοβλάστης στο φθαρό.

Για να είναι επιτυχής η εμφύτευση θα πρέπει να υπάρχει συγχρονισμός μεταξύ του αναπτυξιακού σταδίου του εμβρύου και της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου, τοπική καταστολή των ανοσολογικών μηχανισμών της μητέρας, αυξημένη αιματική ροή μαζί με

επαρκή αγγειογένεση και διείσδυση της τροφοβλάστης με τρόπο ελεγχόμενο (McGee and Hsueh 2000; Vander A.).

2 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

2.1 Ορισμοί

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζεύγους να επιτύχει κύηση ύστερα από ένα έτος σεξουαλικών επαφών χωρίς τη χρήση αντισυλληπτικών μεθόδων (WHO-ICMART).

Η υπογονιμότητα αφορά στο ζευγάρι και όχι στον άνδρα ή τη γυναίκα μεμονωμένα. Η υπογονιμότητα μπορεί να είναι πρωτοπαθής, δηλαδή το ζευγάρι να μην έχει επιτύχει ποτέ ξανά κύηση στο παρελθόν, είτε δευτεροπαθής, όταν έχει υπάρξει σύλληψη.

Η στειρότητα, όπου υπάρχει πλήρης αδυναμία σύλληψης, δεν είναι συνώνυμη με την υπογονιμότητα, η οποία συνήθως αντιμετωπίζεται.

Σύμφωνα με τον ορισμό της υγείας [“Health is a state of complete physical, mental and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity”] όπως αυτός έχει διατυπωθεί το 1948 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 2003), η υπογονιμότητα πρέπει να αντιμετωπίζεται καθώς αποτελεί διαταραχή της υγείας.

2.2 Επιδημιολογία

Η συχνότητα της υπογονιμότητας δεν είναι αμελητέα. Σύμφωνα με μελέτες και εκτιμήσεις που έχουν γίνει από τον Π.Ο.Υ., η υπογονιμότητα των ζευγαριών αγγίζει το 15-20% διεθνώς και αφορά σε ζευγάρια αναπαραγωγικής ηλικίας. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα, υπολογίζεται πως υπάρχουν περί τα 300.000 υπογόνιμα ζευγάρια. Ανά τους αιώνες τα ποσοστά υπογονιμότητας δε φαίνεται να αλλάζουν ιδιαίτερα, καθώς σύμφωνα με μελέτες κατά τον 19^ο αιώνα ένα στα έξι ζευγάρια εμφάνιζε υπογονιμότητα (Shea O. Rutstein 2003).

Για ένα ζευγάρι αναπαραγωγικής ηλικίας που προσπαθεί να τεκνοποιήσει, η πιθανότητα σύλληψης είναι 20% σε κάθε έμμηνο κύκλο. Το ποσοστό αυτό είναι μεγαλύτερο σε ηλικίες κάτω των 25, ενώ από τα 30 έτη και μετά το ποσοστό ελαττώνεται. Αθροιστικά, για 12 μήνες σε ένα φυσιολογικό ζευγάρι η πιθανότητα φτάνει στο 93%. Δηλαδή, το 50% περίπου των φυσιολογικών γόνιμων ζευγαριών επιτυγχάνει κύηση τον πρώτο χρόνο ενώ το 20-35% των ζευγαριών επιτυγχάνει κύηση κατά το δεύτερο χρόνο προσπαθειών (Shea O. Rutstein 2003).

2.3 Φυσιολογική σύλληψη και Διαγνωστική προσέγγιση υπογονιμότητας

Για να επιτευχθεί φυσιολογική σύλληψη θα πρέπει ταυτόχρονα: να υπάρχει σεξουαλική επαφή τον κατάλληλο χρόνο, ικανός αριθμός, κινητικότητα και μορφολογία σπερματοζωαρίων, φυσιολογική οδός από την οποία θα διέλθουν τα σπερματοζωάρια για να φτάσουν το ωάριο στη σάλπιγγα, φυσιολογική ωρίμανση ωαρίου και ωοθυλακιορρηξία, καλή προετοιμασία του ενδομητρίου για να υποδεχθεί το έμβρυο και τέλος το έμβρυο να έχει την ικανότητα να υποστεί αυλάκωση και να σχηματίσει βλαστοκύστη η οποία θα εμφυτευτεί. Οποιοδήποτε εμπόδιο σε αυτά τα στάδια μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα.

Η αρχική διαγνωστική προσέγγιση ενός υπογόνιμου ζευγαριού, ύστερα από περίοδο 12 μηνών (ή 6 μηνών εάν η γυναίκα είναι άνω των 35 ετών) είναι η λήψη ενός πλήρους οικογενειακού και ατομικού αναμνηστικού και η καταγραφή ηλικίας, βάρους, ύψους, πιθανής φαρμακευτικής αγωγής, κάπνισμα κλπ.

Στον διαγνωστικό έλεγχο ρουτίνας εξετάζονται: ο ανδρικός παράγοντας με ανάλυση σπέρματος, η ωοθυλακιορρηξία με μέτρηση FSH, LH, PRL, E2 την 2^η-3^η μέρα του κύκλου, προγεστερόνη την 21^η μέρα και με υπέρηχο ωοθηκών, ο τραχηλικός παράγοντας (post-coital test), η μήτρα με υπέρηχο, υστεροσκόπηση υστεροσαλπιγγογραφία, η παρουσία ενδομητρίωσης ή άλλης παθολογικής κατάστασης του γεννητικού συστήματος όπως επίσης και οι εφεδρείες των ωοθηκών.

2.4 Αίτια υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται στη γυναίκα, στον άνδρα ή και στους δύο. Ο ανδρικός, όπως και ο γυναικείος παράγοντας ευθύνεται για το 40% των υπογόνιμων ζευγαριών ενώ ανεξήγητη υπογονιμότητα παρουσιάζει το 20% των ζευγαριών αυτών. Στον άντρα τα αίτια ποικίλουν και μπορεί να αφορούν σε ενδοκρινολογικές διαταραχές, ανοσολογικά αίτια, διαταραχές της λειτουργίας των όρχεων, των παραγεννητικών αδένων, ή της εκφορητικής γεννητικής οδού και διαταραχές εκσπερμάτισης. Στις γυναίκες, δύο από τα κυριότερα αίτια υπογονιμότητας είναι ο σαλπιγγικός παράγοντας (~35%) και οι διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας (~35%), ενώ ακολουθούν η ενδομητρίωση (~20%), τα ανεξήγητα αίτια (10%), ο τραχηλικός παράγοντας (3%) και οι διαταραχές της μήτρας που είναι πιο σπάνιες (Cant 1993).

2.4.1 Σαλπιγγικός παράγοντας

Υπογονιμότητα λόγω σαλπιγγικού παράγοντα προκύπτει σε περίπτωση που οι σάλπιγγες ή οι κροσσοί παρουσιάσουν βλάβη ή απόφραξη και δεν μπορούν να μεταφέρουν το ωάριο, το σπερματοζωάριο ή να χρησιμεύσουν ως τόπος γονιμοποίησης, δηλαδή εάν υπάρξει μηχανικός παράγοντας υπογονιμότητας.

Βλάβη στις σάλπιγγες μπορεί να προέλθει είτε από σοβαρές λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, όπως ιστορικό σαλπιγγίτιδας, είτε από φλεγμονή στην πύελο, ενδομητρίωση, είτε χειρουργείο στην πύελο. Όλα αυτά είναι δυνατό να προκαλέσουν απόφραξη των σαλπίγγων, καταστροφή του τοιχώματός τους, δημιουργία υδρόσαλπιγγας ή δημιουργία συμφύσεων στην πύελο που αποφράσσουν τις σάλπιγγες. Η ενδομητρίωση μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα δρώντας αρνητικά στην κινητική ικανότητα των σαλπίγγων ή με τη δημιουργία συμφύσεων. Περίπου το 75% των γυναικών με βλάβη στις σάλπιγγες είχαν ιστορικό χλαμυδιακής λοίμωξης. Η υστεροσαλπιγγογραφία είναι η εξέταση που ελέγχει τη βατότητα των σαλπίγγων (Arumugam and Urquhart 1991).

2.4.2 Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας

Ανωοθυλακιορρηξία είναι η κατάσταση κατά την οποία το ωάριο δεν απελευθερώνεται φυσιολογικά και μπορεί να παρουσιάζεται σε συνδυασμό με διαταραχές της εμμήνου ρύσεως ή και σε φυσιολογικούς καταμήνιους κύκλους. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. υπάρχουν τρεις τύποι ωοθηκικής δυσλειτουργίας:

1)Υποθάλαμο-υποφυσιακή δυσλειτουργία με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό. Οι γυναίκες αυτές παρουσιάζουν υποθαλαμικού τύπου αμηνόρροια, έχουν χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων και γοναδοτροπινών και φυσιολογικά επίπεδα προλακτίνης. Συναντάται συχνά σε γυναίκες που έχουν έντονο stress, ή νευρογενή ανορεξία, ή χαμηλό BMI(<17).

2)Υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός. Οι γυναίκες αυτές, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων λόγω πρωτοπαθούς διαταραχής της γονάδας, συνηθέστερα στο πλαίσιο πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας.

3)Υποθάλαμο-υποφυσιακή δυσλειτουργία με φυσιολογικά επίπεδα γοναδοτροφινών και οιστρογόνων (Brugo-Olmedo et al. 2001). Οι γυναίκες αυτές που παρουσιάζουν συχνά σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, έχουν υψηλό λόγο LH/FSH, κλινική ή/και βιοχημική υπερανδρογοναιμία και μεγαλύτερο όγκο ωοθηκών με πολυκυστική εικόνα των ωοθηκών. Είναι η πιο συχνή μορφή διαταραχής. Άλλα αίτια διαταραχής της ωοθυλακιωρρηξίας αποτελούν η υπερπρολακτιναιμία, η παχυσαρκία, η έντονη άσκηση, οι απότομες αυξομειώσεις βάρους, ενδοκρινικές παθήσεις θυρεοειδούς.

Υπογονιμότητα λόγω ωοθηκικού παράγοντα μπορεί να σχετίζεται και με ανεπάρκεια της ωχρινικής φάσης, δηλαδή μια κατάσταση κατά την οποία μετά την ωοθυλακιωρρηξία παρατηρείται ορμονική ανεπάρκεια που αφορά στην επαρκή έκκριση προγεστερόνης, με αποτέλεσμα να μην επικρατούν οι αναγκαίες συνθήκες για την εμφύτευση του εμβρύου (Brugo-Olmedo et al. 2001).

Γυναίκες που παρουσιάζουν διαταραχή ωοθυλακιωρρηξίας που δεν οφείλεται σε πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, έχουν ποικίλες θεραπευτικές επιλογές, όπως θα δουμε παρακάτω.

2.4.3 Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση αποτελεί πολύ συχνή γυναικολογική πάθηση και σχετίζεται με υπογονιμότητα. Κατά την κατάσταση αυτή υπάρχει λειτουργικός ενδομητρικός ιστός έξω από την κοιλότητα της μήτρας και ανάλογα με την εντόπιση του ιστού στην πύελο χωρίζεται σε περιτοναϊκή, ωοθηκική και ενδομητρίωση του ορθοκολπικού διαφράγματος. Ο έκτοπος αυτός ιστός που δημιουργείται, αιμορραγεί κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως. Η αιμορραγία προκαλεί πόνο, φλεγμονή, συμφύσεις και κύστες στις ωοθήκες. Η συμπτωματολογία της ενδομητρίωσης περιλαμβάνει πυελικό πόνο, δυσμηνόρροια, δυσπαρευνία και υπογονιμότητα.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η ενδομητρίωση προκαλεί υπογονιμότητα ποικίλουν. Οι εστίες ενδομητρίωσης επηρεάζουν την κατάσταση και τη φυσιολογική λειτουργία των σαλπίγγων και δημιουργούν συμφύσεις. Επιπλέον μπορεί να προκαλούν καταστροφή του σπέρματος κατά την είσοδό του στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας, διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας των ωοθηκών και της ωοθυλακιωρρηξίας, ή να επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα με τοπική έκκριση ουσιών δυσμενών για την αναπαραγωγή (Arumugam and Urquhart 1991).

2.4.4 Τραχηλικός παράγοντας

Υπογονιμότητα λόγω τραχηλικού παράγοντα μπορεί να προκύπτει από στένωση του τραχήλου, χειρουργείο, εκτομή λόγω δυσπλασίας, χρόνια τραχηλίτιδα, ή πρόβλημα στην τραχηλική βλέννη. Η φυσιολογική τραχηλική βλέννη προστατεύει τη μητρική κοιλότητα από τα βακτήρια, ενώ μεταβάλλεται κυκλικά κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Στην παραγωγική φάση είναι άφθονη και ρευστή επιτρέποντας στα σπερματοζωάρια να μπορούν να κινηθούν ελεύθερα μέσα σε αυτή ούτως ώστε να εισέλθουν στη μήτρα. Αντίθετα, μετά την ωορρηξία η τραχηλική βλέννη αποτελεί φραγμό για το σπέρμα καθώς καθίσταται παχιά, κολλώδης και ελαττώνεται σε ποσότητα (Arumugam and Urquhart 1991).

Σε κάποιες γυναίκες η βλέννη μπορεί να αποτελεί εμπόδιο για τη γονιμοποίηση λόγω σύστασης (μπορεί να είναι παχιά και κολλώδης), ποσότητας (να είναι ανεπαρκής), ή να περιέχει αντισώματα έναντι των σπερματοζωαρίων, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο συγκολλήσεις.

Με το post-coital test, το οποίο γίνεται 6-24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση είναι δυνατό να ελεγχθεί η ποιότητα της βλέννης και κατά πόσο ο παράγοντας αυτός επηρεάζει τη γονιμότητα. Πιο συγκεκριμένα, θετικό test υποδεικνύει την ύπαρξη αρκετού φυσιολογικού

σπέρματος, φυσιολογική ποσότητα οιστρογόνων και μη-ύπαρξη αντισπερματικών αντισωμάτων. Αρνητικό test μπορεί να σημαίνει πως ο κύκλος ήταν ανωθυλακιορρηκτικός, το σπέρμα μη επαρκές ή πως η εξέταση δεν έγινε τη σωστή ώρα. Επιπλέον αρνητικό test υποδεικνύει πιθανή ανωμαλία στον τράχηλο ή παρουσία αντισωμάτων. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως η λήψη φαρμακευτικής αγωγής (κλομιφαίνη, ταμοξιφαίνη, προγεστινοειδή, νταναζόλη) έχει αντίκτυπο στην ποιότητα της τραχηλικής βλέννης (Brugo-Olmedo et al. 2001).

2.4.5 Μητριαίος παράγοντας

Οι ανωμαλίες στη μήτρα δεν προκαλούν κατ' ανάγκη υπογονιμότητα, αλλά μπορεί να διαταράξουν τη φυσιολογική εμφύτευση και εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Συνήθως προκαλούν επανειλημμένες αποβολές και σπανιότερα σχετίζονται με πρωτοπαθή υπογονιμότητα. Τα αίτια από τη μήτρα συμπεριλαμβάνουν τις συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας, τα ινομυώματα, ενδομητρίτιδα, ενδομητρικές συμφύσεις ή πολύποδες.

Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας και συχνότερα η μονόκερη, δίκερη μήτρα και το διάφραγμα της μήτρας, επηρεάζουν την εξέλιξη της κύησης. Τα ινομυώματα σχετίζονται με υπογονιμότητα εφόσον παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα ή αποφράσσουν την περιοχή των κεράτων. Επιδρούν αρνητικά στην εμφύτευση προκαλώντας τοπική φλεγμονή αλλάζοντας τη συστατικότητα της μήτρας, ή την αγγείωση. Η ενδομητρίτιδα είναι φλεγμονή του ενδομητρίου και έχει χαρακτηριστική υστεροσκοπική εμφάνιση. Οι ενδομητρικές συμφύσεις ευθύνονται για επανειλημμένες αποβολές, δευτεροπαθή αμηνόρροια, oligομηνόρροια και γενικότερα υπογονιμότητα. Συνήθως προκύπτουν ύστερα από αποξέσεις της μήτρας. Οι ενδομητρικοί πολύποδες σχετίζονται με υπογονιμότητα καθώς διαταράσσουν την ενδομητρική κοιλότητα, μειώνουν την αιματική ροή και δημιουργούν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση αυξάνοντας την πιθανότητα αποβολής (Chwalisz et al. 2005).

2.4.6 Ανεξήγητα αίτια

Ένα 10-15% των ζευγαριών δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα που να εξηγεί την υπογονιμότητα. Πιθανόν οι διαθέσιμες εξετάσεις να μην μπορούν να διαγνώσουν το αίτιο της υπογονιμότητας. Είναι σύνηθες στα ζευγάρια αυτά η γυναίκα να έχει μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα λόγω ηλικίας ή οι παράμετροι του σπέρματος να βρίσκονται στα κατώτατα φυσιολογικά όρια (Cant 1993).

2.5 Θεραπεία υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ανάλογα με το αίτιο.

Σε περίπτωση βλάβης των σαλπίγγων διενεργείται χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση των συμφύσεων, του ουλώδους ιστού ή για να διορθωθεί η απόφραξη των σαλπίγγων. Εάν υπάρχει υδροσάλπιγγα, θεραπεία γίνεται με αντιβιοτικά, σαλπινγεκτομή ή αναρρόφηση του υγρού τη στιγμή της ωοληψίας (Bradley J. Van Voorhis 1998). Μετά τη χειρουργική επέμβαση, εάν δεν έχει επιτευχθεί εγκυμοσύνη σε 6-9 μήνες, συνιστάται η γυναίκα να προχωρήσει σε IVF.

Στην περίπτωση της ανωθυλακιορρηξίας, συνιστάται απώλεια βάρους και διατροφή εάν χρειάζεται. Εάν δεν υπάρξει βελτίωση, γίνεται πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με κιτρική κλομιφαίνη η οποία μπορεί να ακολουθείται από ενδομητρική σπερματέγχυση (IUI) ή χρησιμοποιούνται ευαισθητοποιητές ινσουλίνης, όπως η μετφορμίνη, ή γοναδοτροφίνες. Με τη χρήση κιτρικής κλομιφαίνης οι γυναίκες ανταποκρίνονται σε ένα ποσοστό έως και 80%, ενώ είναι λιγότερο επεμβατική μέθοδος, με μικρότερη πιθανότητα πολλαπλής κύησης. Σε

πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια η γυναίκα μπορεί να προβεί σε δωρεά ωαρίων. Στην ανωθυλακιορρηξία που οφείλεται σε υπερπρολακτιναιμία χορηγούνται αγωνιστές ντοπαμίνης.

Εάν διαγνωστεί πρόβλημα στην τραχηλική βλέννη αντιμετωπίζεται αναλόγως. Δηλαδή αν η βλέννη είναι παχύρρευστη χορηγούνται βλεννολυτικά, αν είναι ανεπαρκής, χαμηλές δόσεις οιστρογόνων, ενώ αν το πρόβλημα επιμένει γίνεται σπερματέγχυση ή IVF. Επί παρουσίας αντισπερματικών αντισωμάτων συνίσταται αποφυγή επαφών για ένα διάστημα 6 μηνών για να πάψει η παραγωγή των αντισωμάτων, χορήγηση στεροειδών και αν δεν υπάρξει θετικό αποτέλεσμα IUI και IVF.

Οι ανωμαλίες της μήτρας αντιμετωπίζονται ως επί το πλείστον με τεχνικές υστεροσκοπικής χειρουργικής. Τα ινομυώματα διακρίνονται σε υπορογόνια, ενδομυϊκά και τα υποβλεννογόνια. Τα υπορογόνια δεν επηρεάζουν τη γονιμότητα. Τα ενδοτοιχωματικά ίσως επηρεάζουν τη γονιμότητα και έχουν σχετιστεί με αποβολές (Benson and Hartz 2000; Hart et al. 2001) αλλά δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να δείχνουν πως η ινομυωματεκτομή βελτιώνει τη γονιμότητα. Τα υποβλεννογόνια σχετίζονται επιβεβαιωμένα με υπογονιμότητα, μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη σαλπγγων στο σημείο των κεράτων και συνήθως αφαιρούνται υστεροσκοπικά (Pritts 2001). Οι ενδομητρικές συμφύσεις αφαιρούνται υστεροσκοπικά και η θετική έκβαση εξαρτάται από τον τύπο των συμφύσεων και την έκταση απόφραξης της ενδομητρικής κοιλότητας. Ως προς τους πολύποδες επίσης συνιστάται υστεροσκοπική αφαίρεση εφόσον προκαλεί ανώμαλη αιμορραγία ή απόφραξη του στομίου της σάλπιγγας. Στην περίπτωση της ενδομητρίτιδας χορηγούνται αντιβιοτικά.

Σε γυναίκες με ελάχιστη ή ήπιου βαθμού ενδομητρίωση η θεραπεία εκλογής είναι η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και στη συνέχεια σπερματέγχυση. Σε μετρίου ή σοβαρού βαθμού περιστατικά ενδομητρίωσης υπάρχει η λύση της χειρουργικής επέμβασης αλλά πάντα πρέπει να προσμετράται και ο εγχειρητικός κίνδυνος. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνήθως προτείνεται IVF.

Η πρώτη γραμμή θεραπείας για την ανεξήγητη υπογονιμότητα είναι η χορήγηση κλομιφαίνης μόνη ή σε συνδυασμό με IUI. Εάν τα αποτελέσματα είναι πτωχά, ακολουθεί θεραπεία με γοναδοτροπίνες και IUI. Τέλος, εάν τρεις προσπάθειες με γοναδοτροπίνες και IUI αποτύχουν το ζευγάρι μπορεί να προχωρήσει σε IVF.

3 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Σε ένα υπογόνιμο ζευγάρι, εφόσον τα αίτια υπογονιμότητας αντιμετωπιστούν ή δεν είναι αντιμετωπίσιμα σε ικανοποιητικό βαθμό, εάν δεν υπάρξει επίτευξη κύησης σε καθορισμένο χρονικό διάστημα, ούτε με προγραμματισμένη επαφή, το ζευγάρι προχωράει σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που περιλαμβάνουν λήψη και αποθήκευση γαμετών, έλεγχο και παρακολούθηση της διαδικασίας της γονιμοποίησης των γαμετών του ζεύγους ή από δότη/δóτρια και έλεγχο εμβρύων στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης για παρουσία γενετικών ανωμαλιών.

3.1 Μέθοδοι Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

Οι μέθοδοι της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι (Petrozza 2015):

3.1.1 Η ενδομήτριος σπερματέγχυση (IUI)

Είναι η τοποθέτηση ικανής ποσότητας, κινητικότητας και μορφολογίας, σπέρματος στον πυθμένα της μήτρας με τη βοήθεια καθετήρα. Μετά από εκσπερμάτιση, πραγματοποιείται συλλογή του σπέρματος σε ειδικό δοχείο και εφόσον ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι επαρκής, γίνεται επεξεργασία του προκειμένου να συγκεντρωθεί το μεγαλύτερο ποσοστό των κινητών σπερματοζωαρίων σε μικρή ποσότητα ειδικού θρεπτικού υλικού. Για να έχει επιτυχία θα πρέπει η γυναίκα να έχει φυσιολογικές, διαβατές σάλπιγγες και το σπέρμα να έχει συγκέντρωση τουλάχιστον 2×10^6 .

3.1.2 Η κλασσική γονιμοποίηση (IVF)

Η κλασσική γονιμοποίηση αφορά στην τοποθέτηση, σε κατάλληλο αριθμό τρυβλίων, των ληφθέντων ωαρίων μαζί με το επεξεργασμένο σπέρμα, σε συγκεκριμένες αναλογίες. Δηλαδή πρόκειται για γονιμοποίηση *in vitro*, χωρίς ιδιαίτερη παρέμβαση, διότι τα σπερματοζωάρια διαπερνούν από μόνα τους τις στοιβάδες των κοκκωδών κυττάρων και διατιτράινουν τη διάφανη ζώνη. Οι ενδείξεις που υποδεικνύουν την ανάγκη το ζευγάρι να προβεί σε κλασσική εξωσωματική είναι:

- Δυσλειτουργία του γυναικείου ή ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, π.χ. απόφραξη σαλπίγγων, ανεπαρκής αριθμός σπερματοζωαρίων κακής ποιότητας (O.T.A.), αζωοσπερμία αποφρακτικού ή μη τύπου.
- Αποτυχία άλλων μεθόδων, όπως σπερματέγχυση ή προγραμματισμένη επαφή μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας.
- Κίνδυνος κληρονομησης στο έμβρυο γενετικών νοσημάτων, οπότε και απαιτείται ο έλεγχος με προεμφυτευτική διάγνωση.
- Ενδεχόμενη χημειοθεραπευτική αγωγή σε περιπτώσεις καρκίνου, η οποία αυξάνει κατά πολύ τον κίνδυνο για στειρότητα.
- Απουσία μήτρας, όπως για παράδειγμα στο σύνδρομο Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (απλασία μήτρας), ή σε περίπτωση αφαίρεσης λόγω κακοήθειας, όπου η γυναίκα καταφεύγει στην παρένθετη μητρότητα.
- Οικογενειακός προγραμματισμός και ανάγκη για διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας των γυναικών λόγω καριέρας, ηθικών, νομοθετικών και κοινωνικών αιτιών.
- Ανάγκη για δωρεά ωαρίων, σπέρματος ή εμβρύων σε περιπτώσεις προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας, κακής ποιότητας γαμετών κ.ά.

Στάδια IVF: Τα στάδια της κλασσικής εξωσωματικής είναι η διέγερση των ωοθηκών για να επιτευχθεί ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων, η ωοληψία, η σπερμοληψία του συντρόφου ή του δότη, η γονιμοποίηση *in vitro* και τέλος η εμβρυομεταφορά.

Ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών. Υπάρχουν ποικίλα πρωτόκολλα για τη διέγερση των ωοθηκών και η επιλογή εξαρτάται από το ιστορικό της γυναίκας, την ηλικία κλπ. Συνήθως χορηγούνται γοναδοτροφίνες για την ανάπτυξη πολλών ωοθυλακίων, σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστές ή ανταγωνιστές, για αποφυγή της πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρακολουθείται υπερηχογραφικά για τις επόμενες 8-14 ημέρες, καθώς επίσης και τα επίπεδα των ορμονών. Όταν τα ωοθυλάκια φτάσουν στο επιθυμητό μέγεθος χορηγείται hCG που μιμείται τη δράση της LH (κύμα LH) και οδηγεί στην ωρίμανση τα ωοθυλάκια.

Ωοληψία. Προτού προλάβει να γίνει η ωοθυλακιορρηξία, 34-38 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG πραγματοποιείται ωοληψία κατά την οποία συλλέγονται τα ωάρια με τη βοήθεια ενδοτραχηλικού σωλήνα με βελόνα, ο οποίος διέρχεται διαμέσου του κοιλιακού τοιχώματος

και διατιτραίνει την ωοθήκη. Ωοληψία μπορεί να γίνει και σε φυσικό κύκλο, όπου λαμβάνονται ένα ή δύο ωάρια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τοπική ή γενική αναισθησία.

Σπερμοληψία. Την ίδια μέρα με την ωοληψία, ο σύντροφος απέχοντας από επαφή 2-5 ημέρες θα πρέπει να χορηγήσει το σπέρμα του σε ειδικό δοχείο. Ακολουθεί επεξεργασία και συμπύκνωση με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό, κατά την οποία το σπέρμα ενεργοποιείται και πλέον έχει γονιμοποιητική ικανότητα.

Γονιμοποίηση in vitro. Αφού ολοκληρωθεί η επεξεργασία του σπέρματος, τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια τοποθετούνται σε ειδικά τρυβλία καλλιέργειας που περιέχουν θρεπτικό υλικό. Η γονιμοποίηση (ημέρα 0) πραγματοποιείται εντός 12-14 ωρών και ελέγχεται με την παρουσία των δύο προπυρήνων την επόμενη ημέρα (ημέρα 1). Εφόσον επιβεβαιωθεί η γονιμοποίηση ο ζυγώτης μεταφέρεται σε νέο τρυβλίο και ελέγχεται η ανάπτυξή του. Την 2^η ημέρα το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο 2-4 κυττάρων, την 3^η ημέρα στο στάδιο των 8 κυττάρων, την 4^η στο στάδιο του μοριδίου και την 5^η στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Εμβρυομεταφορά. Από τη δεύτερη και ως την πέμπτη ημέρα μετά την ωοληψία μπορεί να γίνει μεταφορά του/των εμβρύων που παρουσιάζουν φυσιολογική μορφολογία, με τη βοήθεια διαφόρων τύπων καθετήρα και χωρίς να απαιτείται αναισθησία. Η μεταφορά γίνεται στον πυθμένα της μήτρας και ο αριθμός των εμβρύων που μεταφέρονται (2-4) εξαρτάται από την ηλικία της γυναίκας, το ιστορικό, τη χώρα, τον αριθμό προηγούμενων προσπαθειών κλπ. Μετά από δύο εβδομάδες ελέγχεται εάν υπάρχει εγκυμοσύνη. Όσα έμβρυα δεν εμφυτεύτηκαν μπορούν να κρυσυνητηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικούς κύκλους.

3.1.3 Η μικρογονιμοποίηση (ICSI)

Αφορά στην έγχυση ενός σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου με μικροχειρισμούς και με χρήση ειδικού μηχανισμού. Οι ενδείξεις για ICSI είναι:

- Αδυναμία γονιμοποίησης ή επίτευξη κύησης με την κλασική μέθοδο εξωσωματικής (IVF).
- Μικρός αριθμός ωαρίων που λήφθηκαν κατά την ωοληψία, κατάσταση που υποδεικνύει ανάγκη για πιο παρεμβατική και σίγουρη τεχνική.
- Υπογονιμότητα λόγω ανδρικού παράγοντα, όπως για παράδειγμα πολύ μικρός αριθμός και κακής ποιότητας σπερματοζωάρια (O.T.A.), ή αζωοσπερμία αποφρακτική ή μη.
- Παρουσία αντισωμάτων έναντι των σπερματοζωαρίων που προκαλούν συγκολλήσεις μειώνοντας τη γονιμοποιητική τους ικανότητα.

3.1.4 Δωρεά γαμετών

Η δωρεά ωαρίων μπορεί να αφορά σε γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας των οποίων τα ωάρια έχουν υποστεί κάποιου βαθμού εκφύλιση. Επιπλέον, αφορά σε γυναίκες με πρόωρη έκπτωση της ωοθηκικής λειτουργίας ή εκείνες που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για καρκίνο και που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, Η δότρια μπορεί να προέρχεται από φιλικό/οικογενειακό περιβάλλον ή να είναι άγνωστη (στην Ελλάδα εφαρμόζεται μόνο η ανώνυμη δωρεά). Το πιο κρίσιμο μέρος της διαδικασίας αυτής, εάν γίνει χρήση «φρέσκων» ωαρίων, είναι να συγχρονιστεί μέσω της χρήσης ορμονικής αγωγής ο κύκλος της δότριας με εκείνον της λήπτριας προκειμένου να γίνει η εμβρυομεταφορά τον κατάλληλο χρόνο, όταν θα είναι υποδεκτικό το ενδομήτριο.

Από την άλλη πλευρά, η χρήση σπέρματος δότη είναι πιο απλή διαδικασία. Επιλέγεται ως λύση όταν στον άντρα διαγιγνώσκεται μη αποφρακτική αζωοσπερμία, δηλαδή υπάρχει παντελής έλλειψη σπερματοζωαρίων. Ο δότης ανευρίσκεται από κάποια τράπεζα

κρυοσυντήρησης, παραμένει επίσης ανώνυμος και διενεργείται εκτεταμένος έλεγχος για μεταδιδόμενα και γενετικά νοσήματα.

3.1.5 Παρένθετη μητρότητα

Ορισμός: Η περίπτωση κατά την οποία μία γυναίκα κυοφορεί και γεννά (φέρουσα ή κυοφόρος), ύστερα από εξωσωματική γονιμοποίηση και μεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων, με χρήση ωαρίου ξένου προς την ίδια, για λογαριασμό άλλης γυναίκας, η οποία επιθυμεί να αποκτήσει παιδί αλλά αδυνατεί να κυοφορήσει για ιατρικούς λόγους. (Άρθρο 3, νόμος 3305/2005 Δικαστική άδεια – έγγραφη και χωρίς αντάλλαγμα συμφωνία – αιτούσα και κυοφόρος κάτοικοι Ελλάδος).

Οι ενδείξεις της μεθόδου είναι οι παρακάτω: γυναίκες που δεν μπορούν να επιτύχουν κύηση λόγω επανειλημμένων αποβολών, απουσία/απλασία μήτρας, αδυναμία να κυοφορήσουν για ιατρικούς λόγους, ή που έχουν πολλαπλές αποτυχίες κύησης με καλής ποιότητας έμβρυα. Προϋπόθεση αποτελεί η ύπαρξη φυσιολογικών γαμετών και των δύο συντρόφων. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στο εργαστήριο και το έμβρυο μεταφέρεται στη μήτρα της μέλλουσας κυοφόρου γυναίκας.

3.1.6 Κρυοσυντήρηση

Σε ένα εμβρυολογικό εργαστήριο είναι δυνατό να κρυοσυντηρηθούν ωάρια, σπερματοζωάρια ή έμβρυα με στόχο τη μεταγενέστερη χρήση τους στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Οι γαμέτες και τα έμβρυα μετά τις ανάλογες τεχνικές κατάψυξης, διατηρούνται στο υγρό άζωτο (LN, -196°C) για περισσότερα από 5 έτη. Με την υαλοποίηση, που αποτελεί μια σχετικά νέα τεχνική, τα ωάρια έχουν πολύ καλά ποσοστά επιβίωσης γονιμοποίησης και εμφύτευσης εμβρύων σε σύγκριση με την παλαιότερη τεχνική της σταδιακής-αργής κατάψυξης καθώς αποφεύγεται σε μεγάλο βαθμό η δημιουργία κρυστάλλων πάγου. Παρόλα αυτά σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM), η πιθανότητα μια γυναίκα να γεννήσει μετά από γονιμοποίηση αποψυγμένου ωαρίου φτάνει το 2%.

3.1.7 Ενδοσαλπγγική μεταφορά γαμετών ή εμβρύων (GIFT, ZIFT)

Αποτελούν εναλλακτικές μεθόδους, παραλλαγές της IVF. Οι γαμέτες ή τα έμβρυα του ζευγαριού μεταφέρονται απευθείας στη σάλπιγγα της γυναίκας με λαπαροσκοπικές μεθόδους. Χρησιμοποιείται ως τεχνική σε γυναίκες που ενώ έχουν ωοθυλακιορρηξία, είναι υπογόνιμες λόγω σαλπγγικού παράγοντα ή σε υπογόνιμα ζευγάρια που θέλουν να αποφύγουν την IVF. Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιείται ωοληψία όπου συλλέγονται τα ωάρια της γυναίκας και μετά τοποθετούνται στη σάλπιγγα, κάτω από το σημείο της απόφραξης μαζί με το σπέρμα. Ειδάλλως, συλλέγεται το σπέρμα και τοποθετείται σε τρυβλίο καλλιέργειας μαζί με το ωάριο για γονιμοποίηση *in vitro*. Μπορεί να γίνει χορήγηση στεροειδών ορμονών προκειμένου να βοηθηθεί η γονιμοποίηση και να αποφευχθεί η αποβολή του κυήματος.

4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Από το 1972, όταν οι Gorter και Grendel καθιέρωσαν το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού έως και σήμερα, επικρατεί ότι η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων, η οποία βρίσκεται σε «υγρή κατάσταση», δηλαδή έχει τη δυνατότητα αλλαγής θέσης

και περιστροφής (ρευστότητα). Η θέση των πρωτεϊνών εντός αυτής της διπλοστοιβάδας ποικίλει και ανάλογα με τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη χωρίζονται σε διαμεμβρανικές, περιφερειακές και λιποσυνδεδεμένες πρωτεΐνες (Μαρμαράς Βασίλης 2005).

Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Είναι οι πρωτεΐνες εκείνες οι οποίες διαπερνούν μια ή περισσότερες φορές ολόκληρη τη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων από το εσωτερικό ως το εξωτερικό μέρος της, ενώ τμήματα της πρωτεΐνης προεξέχουν στον εξωκυττάριο χώρο αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Στον εξωκυττάριο χώρο τα τμήματα της πρωτεΐνης δύναται να σχηματίσουν δυσουλφιδικούς δεσμούς, εξαιτίας του αναγωγικού περιβάλλοντος. Τα τμήματα των πρωτεϊνών αυτών που βρίσκονται εντός της μεμβράνης, έχουν δομή α-έλικας καθώς τα πεπτίδια λόγω του υδρόφοβου περιβάλλοντος, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Βασικό χαρακτηριστικό των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι ο καθορισμένος προσανατολισμός τους επάνω στη μεμβράνη, γεγονός που δείχνει όχι μόνο πως υπάρχει συγκεκριμένος μηχανισμός που ενσωματώνονται στη μεμβράνη αλλά και πως ο ρόλος τους δεν είναι τόσο δομικός αλλά έγκειται στο να επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί αρκετά είναι η γλυκοφορίνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια και η ροδοψίνη.

Περιφερειακές πρωτεΐνες. Οι περιφερειακές πρωτεΐνες δεν διαπερνούν το στρώμα των λιπιδίων, αλλά εφάπτονται σε μία από τις δυο πλευρές της μεμβράνης. Συνδέονται με ασθενείς, μη ομοιοπολικούς, υδρόφιλους δεσμούς με τα λιπίδια ή με άλλες πρωτεΐνες.

Λιποσυνδεδεμένες πρωτεΐνες. Είναι οι πρωτεΐνες που βρίσκονται έξω από τη στοιβάδα των λιπιδίων και συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με αυτά.

4.1 G-πρωτεΐνες

Οι G-πρωτεΐνες είναι οικογένεια πρωτεϊνών (GTPases) οι οποίες χάρη στην ιδιότητα τους να προσδένουν και να υδρολύουν GTP σε GDP είναι υπεύθυνες για τη μεταβίβαση σημάτων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, καθώς όταν προσδένουν GTP είναι ενεργές, και ανενεργές όταν προσδένουν GDP. Υπάρχουν δύο τάξεις G-πρωτεϊνών, οι μονομερείς μικρές GTPάσες (υπεροικογένεια Ras), οι οποίες ουσιαστικά αποτελούνται από μια Gα-υπομονάδα και τα ετεροτριμερή σύμπλοκα G-πρωτεϊνών. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν Gα, και στενά συνδεδεμένες Gβ και Gγ υπομονάδες (Gilchrist et al. 1996; Williams 1995). Υπάρχουν πολλές τάξεις Gα υπομονάδων, όπως για παράδειγμα G_s(stimulatory), G_i(inhibitory), G_{12/13}^α κ.ά. Οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες είναι τα μόρια εκείνα που τις ενεργοποιούν και ο ρόλος τους θα αναλυθεί στη συνέχεια, ενώ οι RGS (Regulators of G protein signaling) ή GAPs πρωτεΐνες τις απενεργοποιούν επάγοντας την υδρόλυση του GTP .

Υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός ενεργοποίησης των G-πρωτεϊνών. Ο συνδέτης συνδέεται στον υποδοχέα ο οποίος ενεργοποιεί την G-πρωτεΐνη. Μετά την ενεργοποίηση πραγματοποιείται αλλαγή στη δομή του υποδοχέα που του επιτρέπει να λειτουργεί ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF). Δηλαδή στην Gα υπομονάδα, στη θέση όπου υπάρχει GDP, βρίσκεται πλέον GTP. Η ανταλλαγή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα να αποδεσμευτεί η Gα υπομονάδα με το προσδεδεμένο GTP, από τις β και γ (διμερές Gβγ) και από τον υποδοχέα. Έτσι τόσο η Gα υπομονάδα όσο και το διμερές Gβγ μπορούν στη συνέχεια να σημάνουν την έναρξη ποικίλων μοριακών μονοπατιών συνδεδεμένα με πρωτεΐνες τελεστές, ενώ ο υποδοχέας μπορεί και πάλι να συνδεθεί με μια G-πρωτεΐνη.

Μετά την ολοκλήρωση της δράσης της ενεργοποιημένης Gα υπομονάδας, το συνδεδεμένο GTP υδρολύεται σε GDP με τη βοήθεια RGS πρωτεϊνών και η Gα υπομονάδα μπορεί και πάλι να

συνδεθεί με ένα διμερές Gβγ ξεκινώντας νέο κύκλο. Οι πρωτεΐνες RGSs (GAPs)δρουν επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP σε GDP ώστε να τερματιστεί η μετάδοση του σήματος.

4.2 Υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCRs)

Το κύτταρο αποκρίνεται στα διάφορα σήματα από το ενδοκυττάριο ή το εξωκυττάριο περιβάλλον χρησιμοποιώντας υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, τον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα. Έτσι, ανάλογα με τη θέση τους διακρίνονται σε ενδοκυττάρους και επιφανειακούς υποδοχείς. Εδώ θα αναλυθούν οι επιφανειακοί υποδοχείς και πιο ειδικά οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (Bjarnadottir et al. 2006).

Οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες, επίσης γνωστοί ως 7TM (transmembrane) υποδοχείς, αποτελούν μεγάλη ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στις οποίες συνδέονται διάφορα μόρια-συνδέτες, όπως οσφρητικά ερεθίσματα, βιογενείς αμίνες, ορμόνες, φερορμόνες, νευρομεταβιβαστές, μικρές ή μεγάλες πεπτιδικές ορμόνες όπως οι FSH και LH. Αποτελούν την ομάδα των υποδοχέων τους οποίους χρησιμοποιούν οι περισσότερες πεπτιδικές ορμόνες για μετάδοση του σήματος. Η σύνδεση του μορίου-συνδέτη ενεργοποιεί τον υποδοχέα και το εξωκυττάριο μήνυμα μεταδίδεται στο εσωτερικό του κυττάρου διαμέσου ποικίλων μοριακών μονοπατιών και κυτταρικών αποκρίσεων (Bjarnadottir et al. 2006).

4.2.1 Ταξινόμηση GPCRs

Έχουν αναγνωριστεί περί τα 800 γονίδια, υπεύθυνα για την κωδικοποίηση μελών της υπεροικογένειας των GPCRs. Παραδοσιακά η ταξινόμησή τους αφορά σε 3 κύριες τάξεις όπου δεν υπάρχει διαχωρισμός με βάση την ομολογία. Οι τάξεις αυτές είναι η A, η τάξη που προσομοιάζει στη δράση ροδοψίνης, η B που προσομοιάζει στη δράση σεκρετίνης και η C με δράση παρόμοια με τον υποδοχέα γλουταμικού. Το μεγαλύτερο μέρος των υποδοχέων GPCRs ανήκει στην τάξη A. Παρά το γεγονός πως δεν υπάρχει ομολογία, όλοι οι GPCRs έχουν κοινή δομή και μηχανισμό μετάδοσης του σήματος (Bjarnadottir et al. 2006).

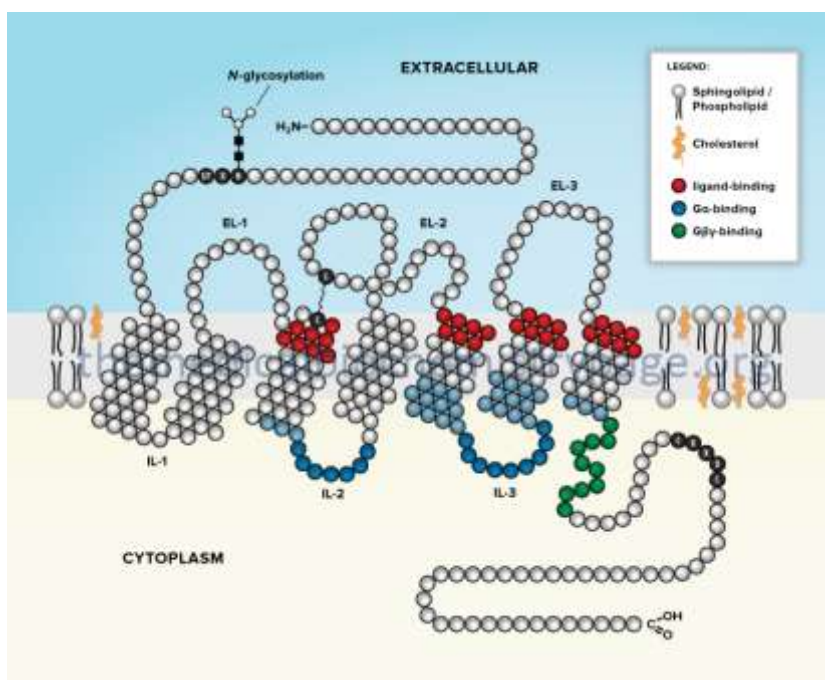
Σύμφωνα με το πιο πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης που προτάθηκε το 2006 οι GPCRs ταξινομούνται σε 6 τάξεις (ClassA-F), με βάση την ομολογία των αλληλουχιών τους και τη λειτουργική ομοιότητα που έχουν. Η τάξη A (Rhodopsin-like), και η τάξη B (Secretin receptor family)είναι εκείνες που περιλαμβάνουν τους συζευγμένους με τις G-πρωτεΐνες υποδοχείς των πεπτιδικών ορμονών (Bjarnadottir et al. 2006).

4.2.2 Δομή GPCRs

Ως προς τη δομή, Οι GPCRs αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές α-έλικες (TM1-TM7), ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα (N-τελικό άκρο) με 3 θηλιές, EL1-EL3 και ένα ενδοκυτταρικό με άλλες 3, IL1-IL3(C-τελικό άκρο). Τα εξωκυττάρια τμήματα του υποδοχέα μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένα. Περιέχουν 340-420 αμινοξέα τα οποία δύνανται να συνδεθούν με μεγάλα τμήματα μορίων-συνδετών, μοριακού βάρους περίπου 33kDa. Τα τμήματα αυτά μπορεί επίσης να περιέχουν δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Εικόνα 6).

Οι υποδοχείς αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση, των εξωκυττάρων μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω της ενεργοποίησης G- πρωτεΐνης (Lefkowitz et al. 2002), η οποία προκαλείται λόγω της αλλαγής στη δομή του υποδοχέα. Η μετάδοση του σήματος διαμέσου του υποδοχέα είναι μια διαδικασία που δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμα. Είναι γνωστό πως στην ανενεργή κατάσταση ο GPCR είναι συνδεδεμένος σε μια ετεροτριμερή G-πρωτεΐνη. Με την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα, (στο N-τελικό άκρο και/ή διαμεμβρανικό τμήμα και/ή εξωκυττάριο τμήμα), μεταδίδεται το σήμα μέσω του C-τελικού

τμήματος ή του ενδοκυττάριου τμήματος, αλλάζει η δομή του υποδοχέα και ενεργοποιείται η Gα υπομονάδα της πρωτεΐνης με φωσφορυλίωση του GDP που είναι προσδεδεμένο, σε GTP.



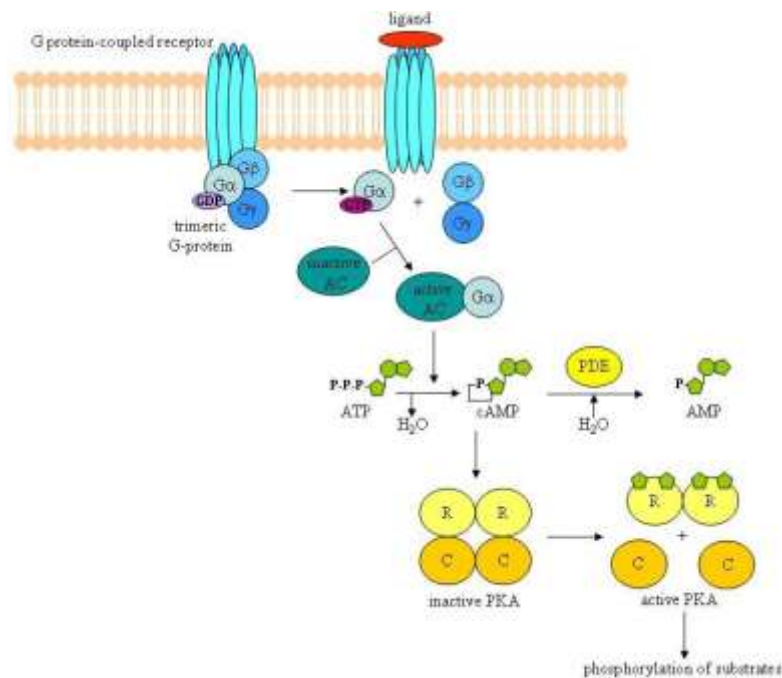
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της κλασικής δομής ενός υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνη. Το μόριο αυτό εδραζόμενο στην πλασματική μεμβράνη, αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές έλικες που τη διαπερνούν. Επιπλέον διαθέτει 3 εξωκυτταρικές (EL1-3) και 3 ενδοκυτταρικές (IL1-3) θηλιές. Οι περισσότεροι από τους υποδοχείς αυτούς έχουν εξωκυττάρια τμήματα που είναι γλυκοζυλιωμένα με προσθήκη υδρογονανθράκων. (Πηγή: <http://themedicalbiochemistrypage.org>)

4.2.3 Μονοπάτια μετάδοσης του σήματος των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων

Υπάρχουν πολλά μονοπάτια όπου χρησιμοποιούνται ποικίλα μόρια μετάδοσης σήματος. Τα πιο συνήθη είναι κυρίως: το μονοπάτι του κυκλικού AMP και το μονοπάτι της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης.

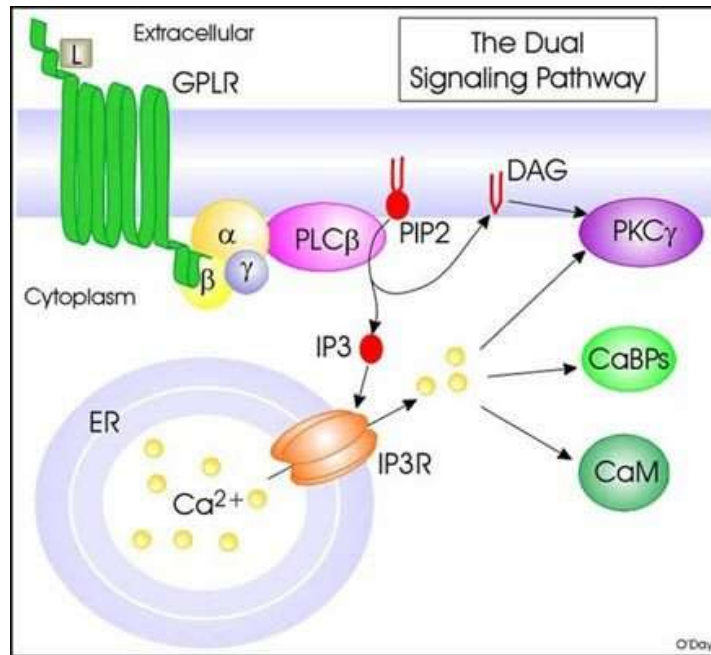
Το μονοπάτι της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP)/ PKA (Εικόνα 7): Στο μονοπάτι αυτό εμπλέκονται 5 μόρια, ο ενεργοποιημένος ή απενεργοποιημένος υποδοχέας R_s/R_i , η ενεργοποιημένη ή απενεργοποιημένη G-πρωτεΐνη G_s/G_i , η αδενυλική κυκλάση, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η φωσφοδιεστεράση. Με τη σύνδεση του μορίου συνδέτη στον υποδοχέα, ο υποδοχέας ενεργοποιείται (R_s) και ενεργοποιεί τη G_s α υπομονάδα της ετεροτριμερούς πρωτεΐνης. Αυτή με τη σειρά της, προσδένεται και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση η οποία καταλύει την μετατροπή του ATP σε cAMP (cyclic adenosine monophosphate) με τη βοήθεια Mg^{2+} ή Mn^{2+} . Με αυτόν τον τρόπο αυξάνει η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου cAMP που οδηγεί σε ενεργοποίηση ιοντικών καναλιών, άλλων πρωτεϊνών, όπως επίσης και ενός ενζύμου που καλείται πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η ενεργοποίηση της PKA προκαλεί ρύθμιση μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων, φωσφορυλίωση διαφόρων μορίων όπως πχ. μεταγραφικών παραγόντων, του γλυκογόνου σε γλυκόζη, ενζύμων που προκαλούν τη σύσπαση του καρδιακού μυ αυξάνοντας τον καρδιακό ρυθμό κ.ά. Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιείται μόνο επί παρουσίας cAMP. Ειδικότερα, όταν υπάρχει cAMP αυτό προσδένεται στις δύο ρυθμιστικές υπομονάδες του ενζύμου αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους με τελικό αποτέλεσμα να απομακρύνει τις δύο καταλυτικές υπομονάδες του ενζύμου γεγονός

που συνδέεται με την ενεργοποίηση της PKA. Από την άλλη πλευρά η cAMP φωσφοδιεστεράση αποδομεί το cAMP σε 5'-AMP απενεργοποιώντας και σταματώντας τη δράση της κινάσης (Sassone-Corsi 2012).



Εικόνα 7: Στο σχήμα φαίνεται το μονοπάτι σηματοδότησης cAMP/PKA. Όταν ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας που συνδέεται με την τριμερή πρωτεΐνη G, λόγω της πρόσδεσης του συνδέτη, η μονάδα Gαβγ διασπάται στο ενεργό Gα τμήμα που φέρει το GTP και στο Gβγ τμήμα. Η Gα υπομονάδα θα ενεργοποιήσει την αδενοκυκλάση (AC) η οποία χρησιμοποιώντας ATP παράγει cAMP. Το cAMP εν συνεχεία συνδέεται σε ρυθμιστικές υπομονάδες της πρωτεϊνικής κινάσης A (R) και προκαλεί τη διάσπαση του ολοενζύμου. Οι καταλυτικές υπομονάδες (C) της PKA μπορούν να εκκινήσουν τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους. Η φωσφοδιεστεράση (PDE) υδρολύει το cAMP σε AMP απενεργοποιώντας το μονοπάτι cAMP/PKA (Πηγή: "Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility", Nancy Gerits, Sergiy Kostenko, Alexey Shiryayev, Mona Johannessen, Ugo Moens*).

Το μονοπάτι ενεργοποίησης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (IP3/DAG) (Εικόνα 8): Στο μονοπάτι σηματοδότησης IP3/DAG ο συνδέτης συνδέεται στον υποδοχέα του που είναι συνδεδεμένος με τη G-πρωτεΐνη και ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C η οποία βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη. Η φωσφολιπάση C υδρολύει τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) σε δύο άλλα μόρια, την τριφωσφορική ινοσιτόλη, IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) και τη διακυγλυκερόλη, DAG (diacylglycerol), η οποία παραμένει στην πλασματική μεμβράνη. Η IP3 συνδέεται στον υποδοχέα της στις μεμβράνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου και στα μιτοχόνδρια και προκαλεί τη διάνοιξη των καναλιών Ca²⁺. Η DAG με τη βοήθεια Ca²⁺ ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί άλλες πρωτεΐνες τροποποιώντας την κυτταρική λειτουργία όπως επίσης και την CaM κινάση (κινάση της καλμοδουλίνης). Ως προς το μονοπάτι της CaM κινάσης, η καλμοδουλίνη που είναι πρωτεΐνη που εξαρτάται από τα Ca²⁺, συνδεδεμένη με αυτά, αλλάζει ως προς τη δομή της και ενεργοποιεί την κινάση της καλμοδουλίνης II. Η τελευταία συνδέεται στην καλμοδουλίνη γεγονός που επιτρέπει τη ενεργοποίηση άλλων ενζύμων (Thatcher 2010).



Εικόνα 8: Στο σχήμα φαίνεται το μονοπάτι σηματοδότησης DAG/IP3. Εδώ η ενεργοποιημένη G πρωτεΐνη συνδέεται και ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C. Εκείνη διασπά ένα μόριο φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PIP2) σε DAG και IP3. Η IP3 συνδέεται στους ειδικούς υποδοχείς της στο ενδοπλασματικό δίκτυο που αποτελούν κανάλια Ca²⁺. Αυτά ανοίγουν και επιτρέπουν στο ασβέστιο να αυξηθεί ενδοκυτταρίως. Με αυτόν τον τρόπο το Ca ενεργοποιεί άλλα μόρια όπως για παράδειγμα την PKC και την CaM (Πηγή:<https://gprotein10.wordpress.com>).

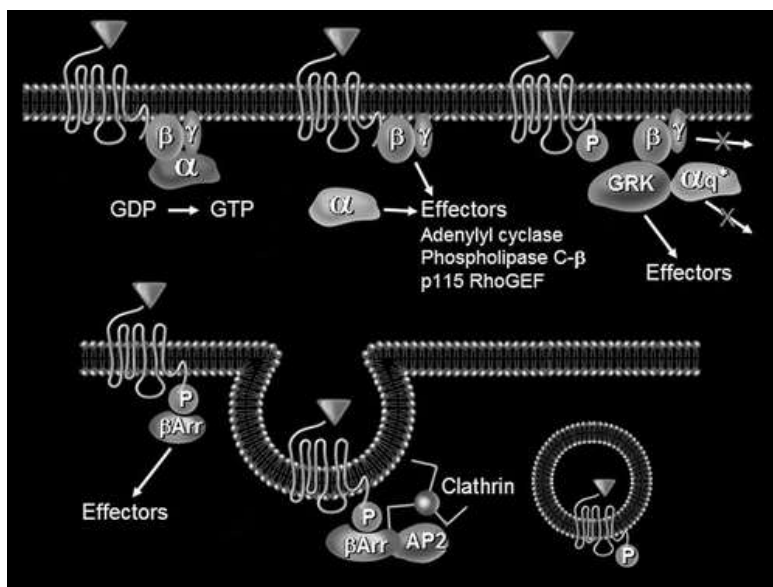
4.2.4 Μηχανισμοί απευαισθητοποίησης του υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνη

Η ικανότητα έναρξης του μονοπατιού σηματοδότησης είναι εξίσου σημαντική όσο και η ικανότητα καταστολής του. Ο συνδέτης σε μια ορισμένη συγκέντρωση μπορεί να προκαλεί ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση του υποδοχέα, ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρισκόταν προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα, η συνεχής ενεργοποίηση ενός υποδοχέα συνδέεται με μειωμένη ικανότητα να ενεργοποιείται και στο μέλλον (απευαισθητοποίηση), ενώ η χαμηλή ενεργοποίησή του σχετίζεται με το αντίθετο (ευαισθητοποίηση) (Hurowitz et al. 2000).

Η απόκριση του υποδοχέα, δηλαδή το εάν θα ενεργοποιηθεί ή όχι, καθορίζεται από τη συγκέντρωση του συνδέτη στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η παρουσία των υποδοχέων δεν είναι στατική, αλλά δυναμική και στο επίπεδο αυτό, η ικανότητα τους να ενεργοποιούν κάποιο μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτάται από τον αριθμό των υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη και από την κατάλληλη ρύθμιση της δράσης τους. Πολλές φορές μετά την ενεργοποίησή τους οι υποδοχείς εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου και μπορούν να ανακυκλωθούν και είτε να επανατοποθετηθούν στην επιφάνεια του κυττάρου (επανευαισθητοποίηση) για περαιτέρω δράση, είτε να αποδομηθούν στα λυσοσώματα. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί σε μεταγενέστερη απώλειά τους από την επιφάνεια του κυττάρου (Bohm et al. 1997).

Ένας κύριος μηχανισμός που ρυθμίζει την απόκριση των GPCRs (Εικόνα 9) είναι η ρύθμισή τους βάσει της ενεργοποίησής τους που αλλιώς ονομάζεται και *ομόλογη απευαισθητοποίηση* (Clainig et al. 2002; Hausdorff et al. 1990; Lefkowitz 1998; Perry et al. 2002; Sterne-Marr and Benovic 1995). Όταν ο υποδοχέας είναι ενεργοποιημένος δεν εξυπηρετεί μόνο την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης, αλλά δρα και ως υπόστρωμα προς φωσφορυλίωση από μια

ομάδα πρωτεϊνών, τις κινάσες των GPCRs (GRKs). Οι κινάσες αυτές διαχωρίζουν την ανενεργή και την ενεργή κατάσταση του υποδοχέα καθώς ενεργοποιούνται καταλυτικά από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς. Έως σήμερα έχουν βρεθεί 7 υπότυποι GRKs ταξινομημένοι ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους. Η δράση των GRKs είναι ρυθμιζόμενη διαδικασία και μπορεί να καθορίζεται από το επίπεδο έκφρασης και την ενδογενή δράση των GRKs αλλά και από την υποκυτταρική διαμερισματοποίησή τους. Στον φωσφορυλιωμένο πλέον υποδοχέα συνδέεται ένα μέλος μιας διαφορετικής πρωτεϊνικής ομάδας, των αρρεστινών (Luttrell and Lefkowitz 2002; Perry et al. 2002). Οι πρωτεΐνες αυτές παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση της Gα υπομονάδας, αποτρέποντας την ανταλλαγή GTP →GDP. Το σύστημα GRKs-αρρεστίνης βοηθά επιπλέον στην εσωτερικοποίηση των απενεργοποιημένων υποδοχέων και στην ανακύκλωση των επανευαισθητοποιημένων στην επιφάνεια του κυττάρου. Η αρρεστίνη συνδέεται στην πρωτεΐνη AP2 αλλά και στην ίδια την κλαθρίνη με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η μεταφορά των φωσφορυλιωμένων υποδοχέων σε κοιλότητες που καλύπτονται από κλαθρίνη, στο εσωτερικό του κυττάρου (Goodman et al. 1996; Laporte et al. 1999).



Εικόνα 9: Σχηματική παρουσίαση της δράσης του υποδοχέα GPCR και της ομόλογης απευαισθητοποίησής του. (Πηγή: *Desensitization of G-protein coupled receptors and neuronal functions*, Raul R. Gainetdinov, Richard T. Premont, Laura M. Bohn, Robert J. Lefkowitz, and Marc G. Caron, July 2004).

Εκτός του μηχανισμού ομόλογης απευαισθητοποίησης που αναλύθηκε παραπάνω, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ενδογενή ρύθμιση των GPCRs. Αυτοί αφορούν στην ανεξάρτητη από τον συνδέτη ρύθμιση του υποδοχέα, στην ετερόλογη απευαισθητοποίηση, σε μηχανισμούς που λειτουργούν ρυθμίζοντας απευθείας τις G-πρωτεΐνες, ή σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη δράση μεταγενέστερων τελεστών στο μονοπάτι. Κοινό παράδειγμα τέτοιας ρύθμισης είναι η περίπτωση των β-αδρενεργικών υποδοχέων οι οποίοι χρησιμοποιούν το μοριακό μονοπάτι cAMP/PKA για τη μετάδοση του σήματος. Η PKA τελικά εκτός των άλλων ρόλων που διαδραματίζει δύναται να φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς απενεργοποιώντας τους και καθιστώντας τους μη ικανούς να επανενεργοποιηθούν από το μόριο- συνδέτη. Ανάλογη ρύθμιση προκύπτει και από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), MAPκινάσες κ.ά. Οι ίδιες κινάσες πέραν του υποδοχέα είναι δυνατό να φωσφορυλιώνουν και το cAMP, τη φωσφολιπάση C κλπ.

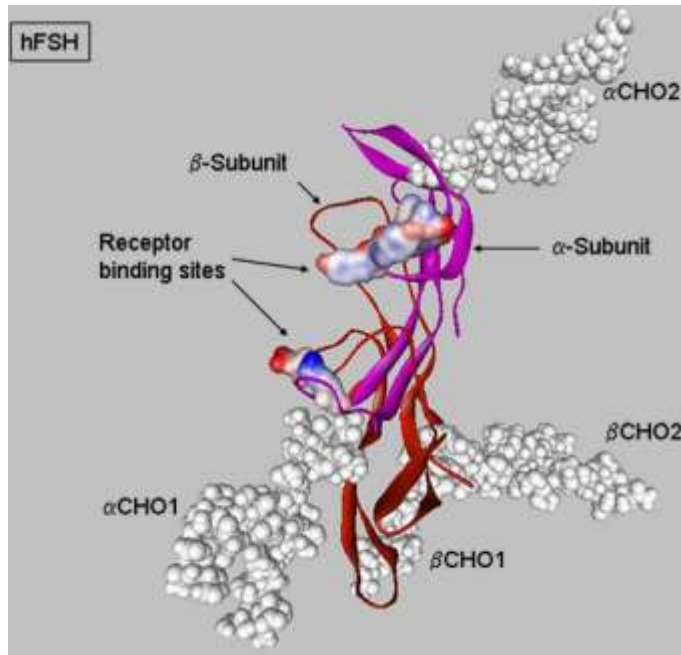
Μια άλλη διακριτή ομάδα πρωτεϊνών, οι RGS πρωτεΐνες, έχουν δράση GTPάσης για τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες (Berman and Gilman 1998; Dohlman and Thorner 1997; Neubig 2002). Ρόλος τους είναι να αδρανοποιούν το GTP που είναι προσδεμένο στην Gα υπομονάδα αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη συνέχιση του μοριακού μονοπατιού.

4.3 Οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών - Η ορμόνη FSH

Ορισμός: Ως γλυκοπρωτεΐνη χαρακτηρίζεται το μόριο εκείνο το οποίο αποτελείται από πεπτιδικές αλυσίδες που φέρουν προσθετικές ομάδες υδατανθράκων υπό μορφή πλευρικών αλυσίδων. Η πεπτιδική αλυσίδα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τους ολιγοσακχαρίτες. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία, ενώ κάποιες βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα με ρόλο όμως λιγότερο διευκρινισμένο (Mullen Michael P. 2013).

Από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, υπό τη δράση της GnRH, εκκρίνονται οι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες FSH και LH. Μια άλλη σημαντική γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη είναι η hCG, η οποία εκκρίνεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη μετά την εμφύτευση του εμβρύου στον πλακούντα. Οι παραπάνω ορμόνες, μαζί με την TSH, αποτελούν τα τέσσερα μέλη της οικογένειας των γλυκοπρωτεϊνών, τα οποία και είναι ομόλογα ως προς την αλληλουχία, τη δομή και τη λειτουργία τους. Παρά το γεγονός όμως πως οι αμινοξικές τους αλληλουχίες παρουσιάζουν κάποια ομολογία, δεν είναι ταυτόσημες. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη LH και hCG παρουσιάζουν ομολογία περίπου 70%. Είναι όλες ετεροδιμερείς πρωτεΐνες αποτελούμενες από μια κοινή α και μια ετερογενή β υπομονάδα οι οποίες δε συνδέονται ομοιοπολικά. Η α υπομονάδα είναι ταυτόσημη στις LH, FSH, TSH και hCG και αποτελείται από 92 αμινοξέα στον άνθρωπο (από 96 στα σπονδυλωτά, ενώ στα ασπόνδυλα δεν υπάρχουν γλυκοπρωτεΐνες). Η β υπομονάδα διαφέρει και είναι υπεύθυνη για την ειδική σύνδεση των ορμονών στους αντίστοιχους υποδοχείς, καθώς και για την ειδική βιολογική δράση της κάθε ορμόνης. Μόνο η β υπομονάδα της LH παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την αντίστοιχη της hCG γεγονός που αποδεικνύεται και από το ότι οι δύο αυτές ορμόνες συνδέονται σε κοινό υποδοχέα. Παρόλα αυτά η β υπομονάδα της hCG διαθέτει 24 επιπλέον αμινοξέα, ενώ υπάρχουν διαφορές και στις αλυσίδες υδατανθράκων. Επίσης, στο διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης αντικατοπτρίζεται και ο διαφορετικός χρόνος ημίσειας ζωής αυτών των ορμονών. Οι τέσσερις ετεροδιμερείς αυτές ορμόνες παρά την ομολογία και παρόμοια δομή τους συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς με υψηλή ειδικότητα πρόσδεσης, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα παρόμοια μοριακά μονοπάτια αλλά διακριτές βιολογικές δράσεις (Mullen Michael P. 2013).

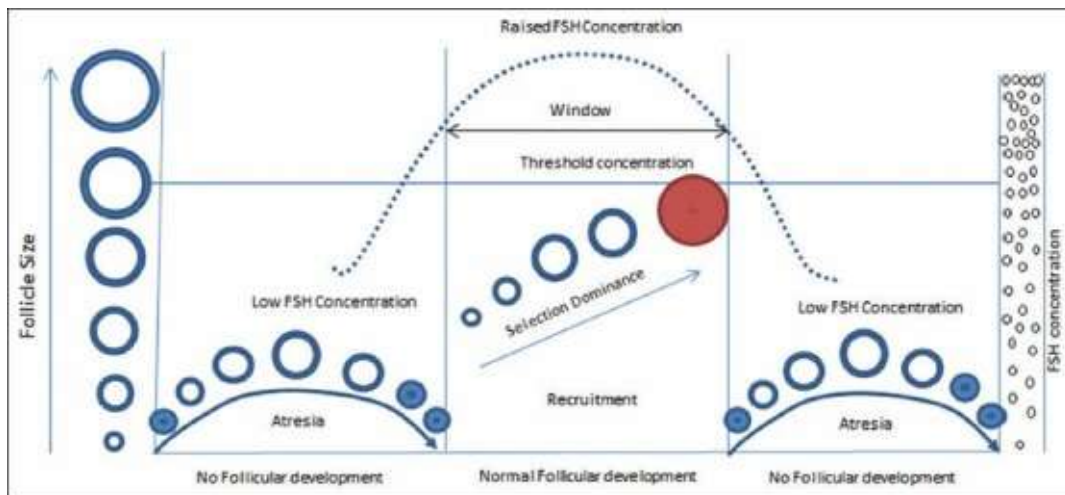
Η ορμόνη FSH, είναι και αυτή μια πεπτιδική ορμόνη (γοναδοτροπίνη) η οποία ρυθμίζει τη γαμετογένεση και τη στεροειδογένεση στις γονάδες. Εκκρινόμενη από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, μπορεί να ρυθμίσει τον εμμηνορυσιακό κύκλο και την ωρίμανση του ωοθυλακίου και στηρίζει την παραγωγή του σπέρματος. Είναι μόριο ετεροδιμερές μεγέθους 35,5kDa. Αποτελείται από την κοινή α-υπομονάδα των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών, που όπως προαναφέρθηκε συνίσταται από 92 αμινοξέα και μια β-υπομονάδα αποτελούμενη από 111 αμινοξέα που διαφέρει δομικά και παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η FSH αποτελείται από 2 υπομονάδες, την α υπομονάδα (μώβ) και τη β υπομονάδα (κόκκινο) και επίσης έχει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης υδατανθράκων. Η έλλειψη υδατάνθρακα στη θέση αCHO1 μπορεί να καταργήσει την μεταβίβαση σήματος, ενώ οι υδατάνθρακες της β υπομονάδας (βCHO1 και βCHO2) διαφέρουν προιούσης της ηλικίας των γυναικών ως προς τη γλυκοζυλίωσή τους. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες παρουσιάζουν συνήθως δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης σε αυτές τις θέσεις, ενώ νεότερες σε ηλικία γυναίκες μπορεί να έχουν δύο ή και καμία θέση γλυκοζυλίωσης. Τα σημαντικά κατάλοιπα για την πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα (receptor-binding sites) παρουσιάζονται στην εικόνα όπως έχουν πιστοποιηθεί από την κρυσταλλική δομή του hFSH/hFSHR (Source: Courtesy James A. Dias, Ph.D Fertil Steril 2008;90:S13–20).

Το γονίδιο για την α-υπομονάδα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p21.1-23 και η έκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Το γονίδιο για την β-υπομονάδα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13 και εκφράζεται στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, ελεγχόμενο από την έκκριση της GnRH (Mullen Michael P. 2013).

Η δράση της FSH αφορά στην ανάπτυξη, αύξηση, ωρίμανση και αναπαραγωγική διαδικασία του ανθρώπινου οργανισμού. Ειδικότερα, και στα δύο φύλα η FSH διεγείρει την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων. Στους άντρες, διεγείρει τα κύτταρα Sertoli να εκκρίνουν ορμόνες όπως η ινχιμίνη. Η διαδικασία ρυθμίζεται από την αρνητική ανάδραση που έχει η έκκριση της ινχιμίνης στην πρόσθια υπόφυση, καθώς και η τεστοστερόνη σε υπόφυση και υποθάλαμο. Στις γυναίκες, η FSH διεγείρει την ωοθυλακική ανάπτυξη κυρίως μέσω της δράσης της στα κοκκώδη κύτταρα και είναι έμμεσα υπεύθυνη για τη σύνθεση οιστρογόνων (συνεργική δράση με LH). Φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα σπουδαίο ρόλο στα αρχικά στάδια του ωοθηκικού κύκλου, πιθανόν σε μία προσπάθεια να επάγει το ένζυμο της αρωματάσης για την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστραδιόλη, ενώ στα τελικά στάδια ανάπτυξης (προωορρηκτικά) οι ακτιβίνες και η οιστραδιόλη φαίνεται να αυξάνουν τη δράση της FSH (Richards and Pangas 2010).



Εικόνα 11: Τα κατώτερα όρια της FSH και το παράθυρο επιλογής (Raju et al. 2013).

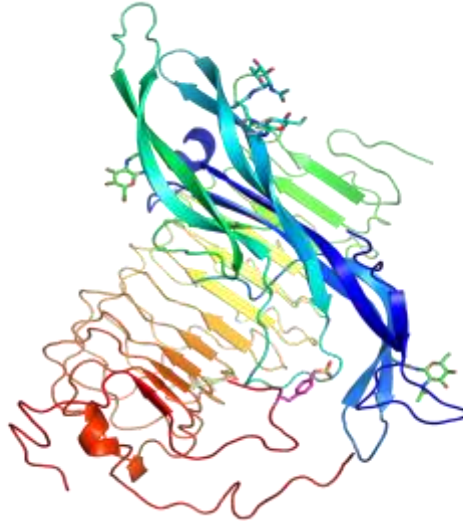
Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της FSH πρέπει να μεταβάλλονται προκειμένου να επιτευχθεί η ολοκλήρωση της ωοθυλακικής ανάπτυξης (Εικόνα 11). Στο τέλος κάθε κύκλου (τέλος ωχρινικής φάσης) παρατηρείται μια αύξηση της FSH η οποία διατηρείται και στην αρχή του επόμενου κύκλου. Η μικρή αυτή αύξηση της FSH είναι αναγκαία για την έναρξη του νέου κύκλου, προκειμένου να ξεκινήσει η περαιτέρω ανάπτυξη ενός κύματος ωοθυλακίων. Αργότερα, (ωοθυλακική ή παραγωγική φάση) τα επίπεδα της FSH ακολουθούν πτωτική πορεία, επιτρέποντας την επιλογή ενός μόνο ωοθυλακίου, το πιο ευαίσθητο στην FSH και επομένως το πιο αναπτυγμένο, το οποίο θα οδηγηθεί σε ωρίμανση (Mullen Michael P. 2013; Raju et al. 2013).

4.4 Υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες - Υποδοχέας της FSH (FSHR)

Οι υποδοχείς των γλυκοπρωτεϊνών είναι μέλη της οικογένειας των GPCRs (G-protein coupled receptors), δηλαδή της οικογένειας υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (Bjarnadottir et al. 2006). Ο υποδοχέας της FSH (FSHR), είναι το μόριο εκείνο στο οποίο συνδέεται ειδικά η ορμόνη FSH. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση του συνδέτη είναι αναγκαία προϋπόθεση για την αποτελεσματική ορμονική δράση της FSH. Το γονίδιο για τον υποδοχέα της FSH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p16.3 και η γονιδιακή αλληλουχία αποτελείται από 2.080 νουκλεοτίδια.

4.4.1 Δομή υποδοχέα της FSH (FSHR)

Η πρωτεΐνη FSHR (Εικόνα) αποτελείται από 695 αμινοξέα και σε συνάφεια με τις ομοιότητες της με τους GPCRs υποδοχείς παρουσιάζει 7 διαμεμβρανικές περιοχές με κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία συμμετέχουν σε δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν τον υποδοχέα. Έχει μοριακό βάρος περίπου 76kDa και το εξωκυττάριο τμήμα του, μήκους 359 αμινοξικών καταλοίπων, διαθέτει 4 N-προσδεδωμένες θέσεις γλυκοζυλίωσης, με το C-τελικό τμήμα να εντοπίζεται εντός του κυτταροπλάσματος (Jiang et al. 2014).



Εικόνα 12: Ο υποδοχέας FSHR

Το εξωκυττάριο τμήμα του FSHR είναι αυτό που παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση πρόσδεσης με την FSH, διαθέτει πολλές επαναλήψεις του αμινοξέος λευκίνη (LRRs), είναι γλυκοζυλιωμένο και χωρίζεται σε δύο λειτουργικά τμήματα. Το πρώτο είναι άκαμπτο, βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του εξωκυττάριου τμήματος και είναι υπεύθυνο για την ειδική αναγνώριση του μορίου-συνδέτη. Το δεύτερο τμήμα, στο C-τελικό άκρο του ίδιου τμήματος, είναι υπεύθυνο για την ειδικότητα της μετάδοσης του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου και περιλαμβάνει στη θέση 335 μια τυροσίνη με θεική ομάδα (sTyr) και είναι το τμήμα συνδέτης του εξωκυττάριου τμήματος με την διαμεμβρανική περιοχή (7TM) του υποδοχέα, ενώ παράλληλα αποτελεί τη δεύτερη περιοχή σύνδεσης της FSH στον υποδοχέα. Έχει δειχθεί πως η τυροσίνη αυτή είναι αναγκαία για την αναγνώριση της ορμόνης αλλά και για τη μετάδοση του σήματος (Jiang et al. 2014).

Πρόσφατες μελέτες που επικεντρώνονται στις κρυσταλλικές δομές του συμπλόκου FSH και το τμήμα του FSHR που προσδέεται στην ορμόνη (FSHR_{HB}) αναδεικνύουν τμήματα κλιμακωτών καμπυλοτήτων που αυξάνονται προς το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 7-10) και δείχνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος των β υπομονάδων στο εσωτερικό του υποδοχέα συμμετέχει στην διεπαφή του με την FSH, ενώ οι υδατάνθρακες δεν συμμετέχουν στην πρωτογενή δέσμευση. Παράλληλα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η περιοχή LRR όπως προαναφέρθηκε, η οποία στο N-τελικό της άκρο πλευρίζεται από ένα κουτί πλούσιο σε κυστεΐνη που σχηματίζει δύο δισουλφιδικές γέφυρες (Nataraja et al. 2015). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι οι περιοχές αυτές είναι κοινές για τους GPCRs, αλλά διαμορφώνονται διαφορετικά σε σχέση με τον προσδέτη τους (Jiang et al. 2014).

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα γίνεται σε δύο βήματα, αρχικά η FSH προσδέεται στον υποδοχέα (στην υπομονάδα με τα LLRs 1-8) και αυτό προκαλεί το διμερισμό του συμπλόκου με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτομερών του FSHR_{HB} με κεντρικό σημείο το κατάλοιπο Y110. Ο διμερισμός και η δημιουργία του θύλακα sTyr φαίνεται να ανασηκώνει την φουρκέτα που σχηματίζεται μεταξύ των κατάλοιπων κυστεΐνης 338 και 292 και να ενεργοποιεί την διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα πυροδοτώντας τη μετάδοση του σήματος στην πλασματική μεμβράνη την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών. Περαιτέρω δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο FSHR σε βασικό επίπεδο σχηματίζει τριμερή τα οποία μπορούν να φιλοξενήσουν ένα μόνο γλυκοζυλιωμένο μόριο FSH. Απουσία FSH τα τριμερή είναι κλειστές δομές, ενώ παρουσία της γλυκοζυλιωμένης FSH υπόκεινται σε δομικές αλλαγές που τα καθιστούν ανοιχτά πιέζοντας την ογκώδη δομή των N52α υδατανθράκων στο κέντρο του

τριμερούς και κατά συνέπεια ενεργοποιούν τον ένα από τους τρεις υποδοχείς, ο οποίος και προσδένεται σε ένα μόριο G-πρωτεΐνης δρώντας σαν ένα μονομερές υποδοχέα (Jiang et al. 2014). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι ο FSHR μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή με τον υποδοχέα της LH (LHR) που έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση του σήματος της LH και της FSH σε μια προσπάθεια λεπτής ρύθμισης της σηματοδότησης των δύο ορμονών (Nataraja et al. 2015).

4.4.2 Σύνδεση του υποδοχέα FSHR με το μόριο συνδέτη FSH και μεταφορά του σήματος

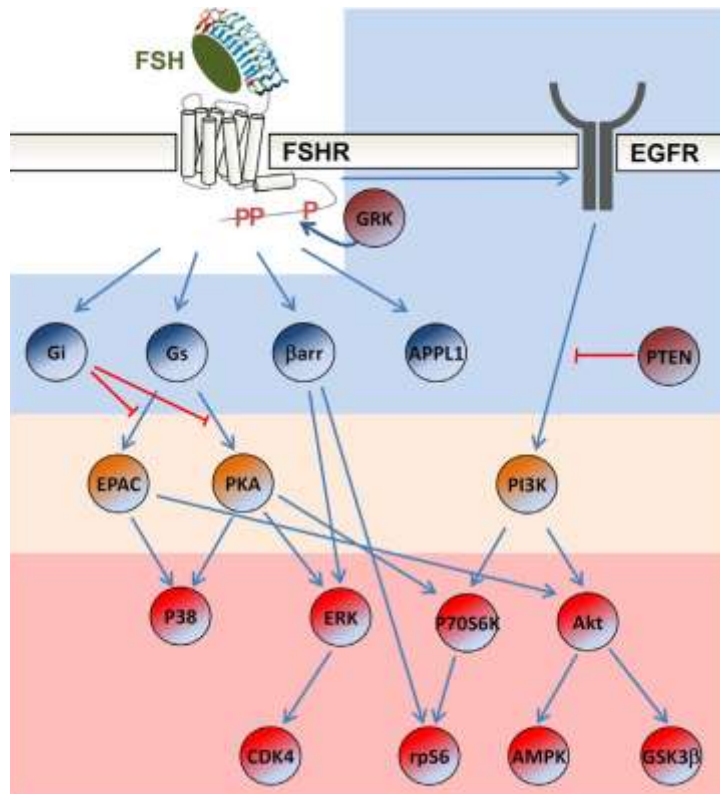
Η σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης FSH με τον υποδοχέα της είναι κεντρικής σημασίας στην ανθρώπινη αναπαραγωγή αφού παρουσιάζει υψηλού βαθμού ιστολογική εξειδίκευση στοχεύοντας τα κοκκώδη και τα Sertoli κύτταρα. Τις τελευταίες δεκαετίες η ιδέα διαφορετικών δομών του υποδοχέα σε σχέση με το μόριο συνδέτη ισχυροποιεί τη θέση ότι η δομή της FSH επηρεάζει τη δομή του FSHR και κατ'επέκταση την ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος (Wacker et al. 2013).

Μία πληθώρα ενδοκυττάρων μονοπατιών έχουν πλέον συνδεθεί με την σύνδεση της FSH στον υποδοχέα της και φαίνεται να πυροδοτούν όχι μόνο την μεταγραφή γονιδίων αλλά και την μετάφραση πρωτεϊνών (Musnier et al. 2010) ενώ φαίνεται να εξαρτώνται από διάφορα σημεία της σηματοδότησης όπως τη δομή και πρόσδεση της FSH στον υποδοχέα, την δομή αλλά και τη δομική διαμόρφωση του υποδοχέα και αλλαγές στην στοιχειομετρία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα (Landomiel et al. 2014).

Σύμφωνα με μελέτη που έχει γίνει ο FSHR αλληλεπιδρά με το συνδέτη σε δύο βήματα. Αρχικά πλησιάζει το μόριο της FSH στον υποδοχέα και στη συνέχεια γίνεται αναγνώριση της sTyr (sulfo tyrosine). Η FSH προσδένεται με μεγάλη ειδικότητα στον υποδοχέα στην περιοχή των επαναλήψεων λευκίνης και αλλάζει δομή δημιουργώντας ένα θυλάκιο sTyr (θειωμένη τυροσίνη). Ο υποδοχέας FSHR στη συνέχεια εισάγει την sTyr στο θυλάκιο αυτό οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, δηλαδή την ενεργοποίηση του επταμερούς διαμεμβρανικού τμήματος. Αυτό οδηγεί στη μεταφορά του σήματος για την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης που συνδέεται στον υποδοχέα ενδοκυττάρως. Έτσι, η πρόσδεση της FSH οδηγεί στην αλλαγή της δομής του υποδοχέα, ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης και ενεργοποίηση του συστήματος cAMP.

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας οδηγεί στην διάσπαση των υπομονάδων α , β , γ , του ετεροτριμερούς της G-πρωτεΐνης ενδοκυττάρως. Η α -υπομονάδα ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση που οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων cAMP. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή στεροειδών ορμονών, αναγκαίων για την ωοθυλακική ανάπτυξη και ωοθυλακιορρηξία στις γυναίκες. Τα ελεύθερα $\beta\gamma$ διμερή προσελκύουν GPCR κινάσες προς τον υποδοχέα που με τη σειρά τους προσελκύουν β -αρρεστίνη.

Ένας σημαντικός όμως αριθμός μονοπατιών σχετίζεται με μηχανισμούς σηματοδότησης ανεξάρτητους από τα Gas, όπως στην περίπτωση της ενεργοποίησης του cAMP και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Gai, Gaq, β -αρρεστίνων, του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και της πρωτεΐνης προσαρμογέα με περιοχή ομολογίας πλεκστρίνης, περιοχή πρόσδεσης φωσφοτυροσίνης και μοτίβο φερμουάρ Λευκίνης (APPL1), ενώ η σηματοδότηση της FSH έχει συσχετιστεί και με την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 (PI3K) και του ομολόγου της φωσφατάσης και της τενσίνης (PTEN) (Εικόνα).



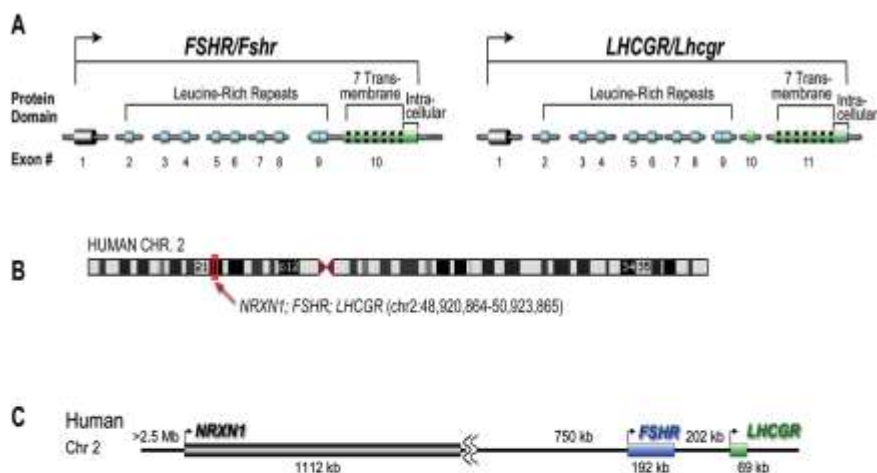
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των βασικών ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών της FSH. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την πρόσδεση στον FSHR απεικονίζονται σε μπλε, οι δευτερογενείς παράγοντες σηματοδότησης απεικονίζονται σε πορτοκαλί και τα εν συνεχεία σηματοδοτικά μονοπάτια σε κόκκινο (Gloaguen et al. 2011).

Με την πρόσδεση της FSH στον υποδοχέα της αυτός υιοθετεί μία ενεργή διαμόρφωση που επιτρέπει την στρατολόγηση και φωσφορυλίωση των GPCR κινασών (GRK). Πρόσφατα δεδομένα μάλιστα προτείνουν ότι διαφορετικοί υποτύποι GRK δρουν και επηρεάζουν τους ενδοκυττάρους στόχους της σηματοδότησης, όπως για παράδειγμα οι GRK 2 και 3 ανταγωνίζονται τις GRK 5 και 6 για τη φωσφορυλίωση του FSHR και έχουν ανασταλτική ή επαγωγική αντίστοιχα δράση στην εξαρτώμενη από την β-αρρεστίνη ενεργοποίηση της ERK (Kara et al. 2006). Εκτός από την πρόσδεση αρκετών μορίων αγωνιστών και ανταγωνιστών του υποδοχέα FSHR, είναι ευρέως γνωστό ότι διαφορετικές ισομορφές της FSH μπορούν να πυροδοτήσουν διαφορετική κυτταρική απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, ισομορφές της FSH που παρουσιάζουν χαμηλού βαθμού οξύτητας αλυσίδες γλυκανών (διαφορετικές γλυκοζυλιωμένες ισομορφές) παρουσιάζουν αλλαγή στη σύζευξη του υποδοχέα από Gs σε Gi/Go (Arey and Lopez 2011). Επιπροσθέτως, παραλλαγές στη δομή του ίδιου του υποδοχέα υπό την μορφή πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων στο γονίδιο του μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τη σηματοδοτική ικανότητα αλλά και την σηματοδοτική ακολουθία του μονοπατιού FSH/FSHR. Τα τελευταία χρόνια μια πληθώρα τέτοιων αλλαγών έχουν περιγραφεί και μελετηθεί μοριακά αλλά αυτές οι αλλαγές θα αναλυθούν λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο.

4.4.3 Δομή του γονιδίου του υποδοχέα FSHR

Το γονίδιο του FSHR, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκεται στο κοντό σκέλος του χρωμοσώματος 2 στη θέση 2p16.3 μεταξύ των θέσεων 21-16 και εκτείνεται σε μία απόσταση 54kb αποτελούμενο από 10 εξώνια. Η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου είναι πλέον γνωστή και αναρτημένη στο NCBI με τον κωδικό NG_008146.1. Τα εξώνια 2-9 κωδικοποιούν της LLRs

περιοχές (N-άκρο εξωκυττάρειο τμήματος) και το εξώνιο 10 το οποίο είναι και το μεγαλύτερο εξώνιο μήκους 1,234 bp, κωδικοποιεί το C-τελικό μέρος του εξωκυττάρειο τμήματος, καθώς και το διαμεμβρανικό και το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα (George et al. 2011) (Εικόνα).



Εικόνα 14: Οργάνωση του FSHR γονιδίου A) Δομή FSHR και LHCGR γονιδίων, και κατανομή των πρωτεϊνικών περιοχών των υποδοχέων στα εξώνια. B) Η περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια NRXN1, FSHR, και LHCGR στο χρωμόσωμα 2 (κόκκινο κουτί). C) Έκταση των γονιδίων NRXN1/Nrxn1, FSHR/Fshr, και LHCGR/Lhcgr στον άνθρωπο.

Το γονίδιο FSHR εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα κύτταρα Sertoli και στα κοκκώδη κύτταρα, με τα πρώτα αντίγραφα να ανιχνεύονται στις γονάδες τη 14.5 ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα αρσενικά και την 20.5 ημέρα στα θηλυκά, αλλά τα μετάγραφα αυτά ανταποκρίνονται μόνο στο εξωκυττάρειο τμήμα του υποδοχέα. Η έκφραση της πλήρους μορφής του υποδοχέα και ανίχνευση σηματοδότησης εντοπίζεται αργότερα στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ η παρουσία του έχει ανιχνευθεί και σε άλλες δομές όπως τη μήτρα, τον προστάτη, τα οστά και το επιθήλιο του ωαρίου. Όμως η δράση του φαίνεται να περιορίζεται στις γονάδες (George et al. 2011).

Η μεταγραφή του γονιδίου βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου και συγκεκριμένα μία 5' περιοχή μήκους 1000 bp πριν από το κωδικόνιο έναρξης η οποία φαίνεται να είναι και η πιο συντηρημένη περιοχή του υποκινητή. Μελέτες υποκινητών από διάφορα είδη (ποντικό, πρόβατο άνθρωπο) δείχνουν ότι ο υποκινητής περιέχει ένα στοιχείο, το E κουτί που υπόκεινται στον μεταγραφικό έλεγχο των παραγόντων USF 1 και 2 (Upstream Stimulatory Factors), ενώ παράλληλα αναγνωρίζονται αλληλουχίες που ελέγχονται από τον στεροειδογενή παράγοντα 1 (SF1), τον παράγοντα SMAD3, τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, των παραγόντων πρόσδεσης GATA 1 (GATA 1) και τις E-είκοσι-έξι πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα η 5' περιοχή του FSHR γονιδίου -1 έως -225 είναι απαραίτητη για την λειτουργικότητα του υποκινητή και μέσα σε αυτή αναγνωρίζονται 5 θέσεις έναρξης της μεταγραφής η -184, η -114, η -99, η -83 και η -79, με τη θέση -99 να αποτελεί τη βασική θέση έναρξης (Gromoll et al. 1994). Η ιστοειδικότητα στην έκφραση του FSHR όμως φαίνεται να οφείλεται σε αλληλουχίες πολύ απομακρυσμένες από το ίδιο το γονίδιο και τον υποκινητή του και μπορεί να βρίσκονται ακόμα και 50Kbps μακριά γεγονός που απαιτεί την χρήση πιο εξειδικευμένων μοριακών τεχνικών για τον πλήρη προσδιορισμό του μεταγραφικού ελέγχου του FSHR γονιδίου (George et al. 2011).

διαταραγμένη έκφραση του υποδοχέα στη μεμβράνη, ενώ η δεύτερη έδειξε να μειώνει την μεταγωγή σήματος του FSHR (Beau et al. 1998). Επίσης, η μετάλλαξη A189V που ανιχνεύεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα σε ομοζυγωτία προκαλεί υπεργοναδοτροπική ωοθυλακική δυσγενεσία στις γυναίκες, ενώ οι άντρες της οικογένειας παρουσίασαν διαφορετικά επίπεδα μειωμένης σπερματογένεσης, χωρίς όμως κάποιο άτομο να παρουσιάζει αζωοσπερμία και μόνο ένα από αυτά να μην είναι γόνιμο (Tapanainen et al. 1997). Η μετάλλαξη αυτή όμως, έχει βρεθεί σε ετεροζυγωτία σε αρκετές γυναίκες με πρωτοπαθή αμηνόρροια από τη Φινλανδία αλλά και σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη A419T σε μία επίσης Φινλανδή με πρωτοπαθή αμηνόρροια, όπου φαίνεται ότι μαζί προκαλούν πλήρη έλλειψη στην ενεργοποίηση του cAMP (Doherty et al. 2002). Παρόλο που η περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 189 έως 193 είναι πολύ συντηρημένη και περιλαμβάνει μια θέση γλυκοζυλίωσης στο 191, γεγονός που εξηγεί τις διαταραχές στη διακίνηση του υποδοχέα που παρουσιάζονται στη μετάλλαξη A189V αλλά και στην ετερόζυγη μετάλλαξη N191I, η γυναίκα που φέρει τη N191I παρουσιάζει φυσιολογική γονιμότητα και ωοθυλακική λειτουργία (Gromoll et al. 1996b; Gromoll et al. 2002) και συνεπώς δεν φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργικότητα του υποδοχέα.

Άλλες μεταλλάξεις που επίσης εντοπίζονται στα εξωκυττάρια τμήματα του υποδοχέα, είτε στη εξωκυττάρια περιοχή (V221G, D224V και P348R) είτε στους εξωκυττάριους βρόγχους (P519T και L601V), ανιχνεύονται σε γυναίκες με πρωτοπαθή αμηνόρροια και συνήθως παρουσιάζουν χαμηλή ή πλήρως διαταραγμένη συγγένεια δέσμευσης με την FSH (V221G, D224V, P348R και P519T) είτε χαμηλή παραγωγή cAMP (L601V) (Allen et al. 2003; Meduri et al. 2003; Nakamura et al. 2008; Touraine et al. 1999).

Πίνακας 1: Απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στον FSHR [Επεξεργασία από (Desai et al. 2013a)]

No	Προσδεσιμότητα FSH	Αύξηση cAMP	Φαινότυπος	Μετάλλαξη	Νουκλεοτίδιο	Βιβλιογραφία
1	Μείωση	Μείωση	Δευτεροπαθής αμηνόρροια με αυξημένα επίπεδα FSH	Ετερόζυγες στο εξώνιο 6 479 C>T και στο εξώνιο 10 1717 C>T	160 Ile→Thr εξωκυττάριο τμήμα 573 Arg→Cys Ενδοκυττάριος βρόγχος 3	(Beau et al. 1998)
	Ουδέτερη	Μείωση				
2	Μείωση	Μείωση	Υπεργοναδοτροπική ωοθυλακική δυσγενεσία και διάφορες διαταραχές στα επίπεδα σπερματογένεσης	Ομόζυγη στο εξώνιο 7 566 C>T	189 Ala→Val εξωκυττάριο τμήμα	(Aittomaki et al. 1995; Tapanainen et al. 1997)
3	Μείωση	Έλλειψη	Πρωτοπαθής αμηνόρροια με αυξημένα επίπεδα FSH	Ετερόζυγες στο εξώνιο 7 566 C>T και στο εξώνιο 10 1255 G>A	189 Ala→Val εξωκυττάριο τμήμα 419 Ala→Thr διαμεμβρανική έλικα 2	(Doherty et al. 2002)
	Ουδέτερη	Έλλειψη				
4	Μη διευκρινισμένο	Έλλειψη	Φυσιολογική γονιμότητα και λειτουργικότητα ωαρίου	Ετερόζυγη στο εξώνιο 7 573 A>T	191 Asn→Ile εξωκυττάριο τμήμα	(Gromoll et al. 1996b; Gromoll et al. 2002)
5	Μη διευκρινισμένο	Μη διευκρινισμένο	Πρωτοπαθής αμηνόρροια	Ετερόζυγη στο εξώνιο 8 662 T>G	221 Val→Gly εξωκυττάριο τμήμα	(Nakamura et al. 2008)
6	Μείωση	Έλλειψη	Πρωτοπαθής αμηνόρροια με αυξημένα επίπεδα FSH	Εξώνιο 7 671 A>T εξώνιο 10 1801 C>G	224 Asp→Val εξωκυττάριο τμήμα 601 Leu→Val Εξωκυττάριος βρόγχος 3	(Touraine et al. 1999)
	Ουδέτερη	Μείωση				
7	Έλλειψη	Έλλειψη	Πρωτοπαθής αμηνόρροια με αυξημένα επίπεδα	Ημιζυγωτική στο εξώνιο 10 1043 C>G	348 Pro→Arg εξωκυττάριο τμήμα στο	(Allen et al. 2003)

FSH				τιμήμα σύνδεσης με το διαμεμβρανικό τμήμα (hinge domain)		
8	Μη διευκρινισμένο	Ουδέτερη	Σύνδρομο Πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)	Ετερόζυγη εξώνιο 10 1231 A>T	411 Ile→Asn Διαμεμβρανική έλικα 2	(Orio et al. 2006)
9	Ελάχιστη	Έλλειψη	Πρωτοπαθής έλλειψη ωαρίου με FSH	Ομόζυγη στο εξώνιο 10 1555 C>A	519 Pro→Thr Εξωκυττάριος βρόγχος 2	(Meduri et al. 2003)
10	Μη διευκρινισμένο	Μη διευκρινισμένο	Πρωτοπαθής αμηνόρροια με υπεργοναδοτροπισμό και υπεργοναδισμό	Ομόζυγη στο εξώνιο 10 1723 C>T	575 Ala→Val διαμεμβρανική έλικα 6	(Achrekar et al. 2010)
11	Μη διευκρινισμένο	Έλλειψη	Πρωτοπαθής αμηνόρροια	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1760 C>A	587 Pro→His διαμεμβρανική έλικα 6	(Kuechler et al. 2010)

Εκτός από τις μεταλλάξεις όμως που εντοπίζονται στην εξωκυττάρια περιοχή έχουν περιγραφεί και μεταλλάξεις που εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές έλικες όπως η I411N, η A419I, η I575N και η P587H εκ των οποίων μόνο η I411N συνδέθηκε με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών αφού οι υπόλοιπες βρέθηκαν σε γυναίκες με πρωτοπαθή αμηνόρροια και σε ορισμένες από αυτές δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος ο λειτουργικός τους ρόλος (Achrekar et al. 2010; Doherty et al. 2002; Kuechler et al. 2010; Orio et al. 2006). Τέλος, μια μετάλλαξη που εντοπίζεται σε ενδοκυττάριο βρόγχο (R573C) δεν φαίνεται να επηρεάζει την συγγένεια δέσμευσης του υποδοχέα αλλά εντοπίζεται σε γυναίκα με δευτεροπαθή αμηνόρροια και αυξημένα επίπεδα FSH (Beau et al. 1998).

4.4.4.2 Ενεργοποιητικές Μεταλλάξεις

Όσον αφορά στις ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ή γνωστές και ως μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας (

Πίνακας 2) εντοπίζονται κυρίως στο εξώνιο 10 (2-7 στον Πίνακα 1), αφορούν στην πλειοψηφία στις διαμεμβρανικές έλικες ή βρόγχους και αφορούν συνήθως σε γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης (Εικόνα). Επίσης, οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις δείχνουν επικρατή κληρονομικότητα ακόμα και στην ετερόζυγη μορφή τους και συνδέονται με διαταραγμένο φαινότυπο σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις καταστολής.

Πίνακας 2: Ενεργοποιητικές Μεταλλάξεις στον FSHR [Επεξεργασία από (Desai et al. 2013a)]

No	Προσδεσιμότητα FSH	Αύξηση cAMP Βασική/επαγωγή με FSH	Φαινότυπος	Μετάλλαξη	Νουκλεοτίδιο	Βιβλιογραφία
1	Παρόμοια	Παρόμοια/αυξημένη ευαισθησία στην επαγωγή με hCG	Γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης	Ετερόζυγη στο εξώνιο 5 383 C>A	128 Ser→Tyr εξωκυττάριο τμήμα	(De Leener et al. 2008)
2	Μείωση	Χαμηλότερη/Αυξημένη (σε φυσιολογική FSHR έκφραση)	Φυσιολογική σπερματογένεση με μειωμένα επίπεδα FSH	Ετερόζυγη στο Εξώνιο 10 12921 A>T	431 Asn→Ile Εξωκυττάριος διαμεμβρανικός βρόγχος 1	(Casas-Gonzalez et al. 2012)
3	Παρόμοια	Παρόμοια/ Παρόμοια (↑ με επαγωγή hCG & TSH)	Γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1346 C>T	449 Thr→Ile διαμεμβρανική έλικα 3	(Vasseur et al. 2003)
4	Μη διευκρινισμένο	2.5 Fold αύξηση/ Παρόμοια (↑ με επαγωγή hCG & TSH)	Γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1345 A>G	449 Thr→Ala διαμεμβρανική έλικα 3	(Montanelli et al. 2004)

5	Παρόμοια	130% αύξηση/αύξηση (↑ με επαγωγή hCG & TSH)	υπερενεργοποίησης Γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1634 T>C	545 Ile→Thr διαμεμβρανική έλικα 5	(De Leener et al. 2006)
6	Μη διευκρινισμένο	1.5 Fold αύξηση/Ουδέτερη	Άνδρας με υποφυσιοεκτομή και μη ανιχνεύσιμη επίπεδα FSH	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1700 A>G	567 Asp→Gly διαμεμβρανικός βρόγχος 3	(Gromoll et al. 1996a)
7	Παρόμοια	3 Fold αύξηση/Παρόμοια (↑ με επαγωγή hCG & TSH)	Γυναίκες με σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης	Ετερόζυγη στο εξώνιο 10 1699 G>A	567 Asp→Asn διαμεμβρανικός βρόγχος 3	(Smits et al. 2003)

Αναλυτικότερα, η μετάλλαξη S128Y που είναι και η μοναδική ενεργοποιητική μετάλλαξη που εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα δεν οδηγεί σε αλλαγές στη βασική δραστηριότητα αλλά παρουσίασε αυξημένη συγγένεια και ευαισθησία στην επαγωγή με hCG (καθόλου σε TSH) το οποίο περαιτέρω μελέτες έδειξε να μην οφείλεται στην απώλεια της σερίνης(De Leener et al. 2008). Επίσης, η μετάλλαξη N431I στον εξωκυττάριο βρόγχο 1 βρέθηκε σε άντρα χωρίς συμπτώματα αλλά φαίνεται να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα του υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη (Casas-Gonzalez et al. 2012).

Επιπροσθέτως, στη θέση 449 που βρίσκεται στην διαμεμβρανική έλικα 3 περιγράφονται δύο μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία, η T449I και η T449A, οι οποίες παρουσιάζουν μειωμένη ορμονική πρόσδεση και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς ανταποκρίνονται σε επαγωγή με hCG (Montanelli et al. 2004; Vasseur et al. 2003). Η επίσης διαμεμβρανική μετάλλαξη I545T αποδείχθηκε ότι προκαλεί εγκάρσια ευαισθησία του υποδοχέα στις ορμόνες hCG και TSH καθώς και διατήρηση της βασικής δραστηριότητας σε αντίθεση με άλλες μεταλλάξεις σε διαμεμβρανικά τμήματα που δεν δείχνουν διαφορετική ανταπόκριση στις παραπάνω ορμόνες (De Leener et al. 2006). Τέλος, μεταλλάξεις στην ενδοκυττάρια θέση 567, μία ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή σε όλους τους γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς, βρέθηκαν αρχικά σε ένα άντρα γόνιμο, με υπογοναδοτροπισμό και ο οποίος είχε υποβληθεί σε υποφυσιοεκτομή (D567G) και σε μία γυναίκα που εμφάνισε σύνδρομο αυθόρμητης ωοθυλακικής υπερενεργοποίησης (D567N), οι οποίοι εμφάνισαν αυξημένη βασική δραστηριότητα που στην πρώτη περίπτωση υπήρχε δίχως μόριο συνδέτη, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ο υποδοχέας ανταποκρινόταν και σε επαγωγή με hCG και TSH (Gromoll et al. 1996b; Smits et al. 2003).

4.4.5 Πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο του FSHR

Πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) ονομάζονται αλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδίων στο γονίδιο, οι οποίες οδηγούν σε διακυμάνσεις των αλληλίων και τελικά σε διαφοροποίηση της αλληλουχίας των αμινοξέων στο μόριο της παραγόμενης πρωτεΐνης. Αυτές οι μετατροπές δεν παρατηρούνται σποραδικά, αλλά περιγράφονται και διανέμονται σε ένα πληθυσμό με καλά περιγεγραμμένες αναλογίες, οπότε και διαφέρουν από τις σημειακές μεταλλάξεις. Παρόλο που ανιχνεύονται και σε φυσιολογικό πληθυσμό, ο συνδυασμός τους ή ακόμα και η μεμονωμένη παρουσία τους μπορεί να προκαλέσει σημαντικές λειτουργικές αλλαγές που συχνά συνδέονται με παθολογικούς φαινοτύπους. Το γονίδιο του υποδοχέα της FSH (FSHR) και οι πολυμορφισμοί που απαντώνται σε αυτό έχουν αποτελέσει πεδίο έρευνας. Έτσι, διαπιστώθηκε στο πλαίσιο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ότι ασθενείς που φέρουν συγκεκριμένους γονότυπους χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις ανασυνδυασμένης ανθρώπινης γοναδοτροπίνης (r-hFSH) για να αντιμετωπίσουν την

μειωμένη ωοθυλακική ευαισθησία. Επίσης, μελέτες κατέδειξαν ότι ο γονότυπος του FSHR σχετίζεται με την απάντηση των ασθενών σε εξωγενώς χορηγούμενη θεραπεία με γοναδοτροπίνες και ιδιαίτερα στις μελέτες που αφορούσαν ασθενείς από την Ισπανία (de Castro et al. 2004), την Ελλάδα (Loutradis et al. 2006) και την Ουκρανία (Livshyts et al. 2009), ενώ σε ασθενείς από τις Κάτω Χώρες δεν αναδείχθηκε καμία συσχέτιση (Perez Mayorga et al. 2000).

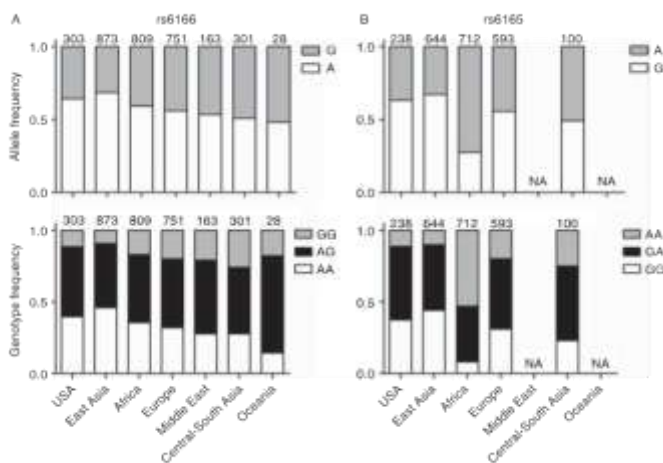
Μια πληθώρα SNPs (>1300) έχουν αναγνωριστεί και περιγραφεί σε διάφορους πληθυσμούς στο γονίδιο του FSHR εκ των οποίων οι οκτώ-βρίσκονται στην κωδική περιοχή του γονιδίου και μόλις δύο από αυτούς σχετίζονται με παθολογική κλινική εικόνα: Thr307Ala (rs6165 σύμφωνα με το NCBI) και Asn680Ser (rs6166 σύμφωνα με το NCBI), ενώ δύο βρίσκονται στην μη κωδική 5'αμετάφραστη περιοχή του υποκινητή (5'UTR) στις θέσεις -29 (rs1394205 σύμφωνα με το NCBI) και -114 και παρουσιάζουν συνδεσιμότητα.

4.4.5.1 Κλινικά σημαντικοί πολυμορφισμοί του FSHR

Δυο από τις πιο σημαντικές, μη συνώνυμες και εκτενώς μελετημένες σημειακές αλλαγές/πολυμορφισμούς φαίνεται να φέρει ο FSHR στο εξώνιο 10, αφορούν στις αμινοξικές θέσεις 307 (c.919 A>G, p.T307A) και 680 (c.2039 A>G, p.N680S) και βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium, LD). Η αλλαγή ασπαραγίνης σε σερίνη (Asn680Ser ή N680S) αντικαθιστά μια θέση N γλυκοζυλίωσης, υπεύθυνη για την μετατόπιση του υποδοχέα στο κύτταρο, με μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από τις εξαρτώμενες από το cAMP κινάσες στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που συνήθως παίζουν ρόλο στην πρωτεϊνική ανακύκλωση του υποδοχέα. Η αλλαγή θρεονίνης σε αλανίνη (Thr307Ala ή T307A) έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος με πολικότητα, σε ένα υδρόφοβο αμινοξύ χωρίς πολικότητα, συνεπώς αφαιρεί δυνητικά μια θέση O-γλυκοζυλίωσης (Sudo et al. 2002).

Η κατανομή του αρχέγονου αλληλίου A (

Εικόνα 4) για τον N680S πολυμορφισμό το καθιστά πιο επικρατές για πληθυσμούς που βρίσκονται στην νοτιοδυτική Ασία, ενώ το αλληλίο G είναι πιο επικρατές σε πληθυσμούς του βορειοανατολικού Πακιστάν, της Σιβηρίας, της Βραζιλίας και της Ωκεανίας γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην γενετική τους, κατά μία έννοια, απομόνωση (Simoni and Casarini 2014). Είναι σημαντικό να αναφερθεί και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε μελέτες γενετικών συσχετισμών ότι το αλληλίο G είναι εμπλουτισμένο σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και σε πληθυσμούς της Μέσης και της Νότιο-κεντρικής Ασίας και της Ωκεανίας και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πληθυσμιακή απομόνωση αυτών των εθνοκοιτητών (Simoni and Casarini 2014). Μελέτες δείχνουν ότι η σερίνη στο αμινοξύ 680 παρουσιάζει μια «αντίσταση» στην FSH και στους άντρες και στις γυναίκες χωρίς να είναι διευκρινισμένος ακόμα ο λόγος εμφάνισης και ο επιπολασμός του G αλληλίου στο γονίδιο.



Εικόνα 4: Κατανομή των συχνοτήτων των αλληλίων και των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς rs6165 (T307A) και rs6166 (N680S)(Simoni and Casarini 2014).

Από την άλλη μεριά, το αρχέγονο αλληλίο G για τον T307A πολυμορφισμό εντοπίζεται πιο συχνά σε Αφρικανικούς πληθυσμούς (

Εικόνα 4) και μπορεί να μην έχει συνδεσιμότητα με τον N680S πολυμορφισμό σε κάποιες εθνικές ομάδες. Στους περισσότερους όμως σύγχρονους ανθρώπους το A αλληλίο είναι και το πιο επικρατές, γεγονός που θέτει τους δύο πολυμορφισμούς όπως προαναφέρθηκε σε LD και ορίζει ως τους πιο συχνούς απλότυπους στο εξώνιο 10 τους T307-N680 και A307-S680 (Simoni and Casarini 2014).

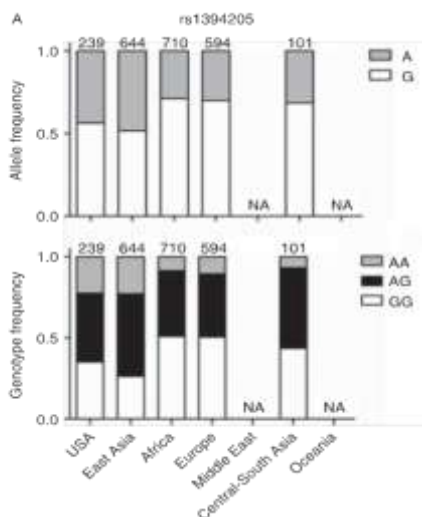
In vitro λειτουργικές μελέτες σε άντρες δεν έδειξαν κάποια διαταραχή και ο επιπολασμός των δύο αυτών πολυμορφισμών δεν ήταν αυξημένος στους άντρες με υπογονιμότητα (Simoni et al. 2008b). Μόλις πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο N680S συσχετίζεται με μειωμένο συνολικό όγκο των όρχεων σε άντρες της Βαλτικής (Grigorova et al. 2013). Η παρουσία των πολυμορφισμών T307A και N680S σε γυναίκες σχετίζεται με πτωχά αποτελέσματα διέγερσης των ωοθηκών (COS) και συγκεκριμένα ο ετερόζυγος γονότυπος στη θέση 680 παρουσιάζει πτωχά αποτελέσματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι ασθενείς με τον απλότυπο A307-S680 όταν υποβάλλονται σε ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART) χαρακτηρίζονται από χαμηλή ευαισθησία στην FSH αφού παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα κυκλοφορούσας στον ορό FSH, υψηλότερες απαιτήσεις χορηγούμενης FSH και υψηλότερο κίνδυνο υπό- ή υπέρ-απόκρισης (Perez Mayorga et al. 2000). Σε ένα ποσοστό που αγγίζει το 35% των ασθενών που εντάσσονται σε πρωτόκολλα ART ανιχνεύονται FSHR προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, γεγονός που επισημαίνει τη σημαντικότητα ανίχνευσης πολυμορφισμών στον γονότυπο χαμηλών/πτωχών απαντητριών σε θεραπείες υπογονιμότητας (Simoni et al. 2008a; Simoni et al. 2008b). Πρόσφατη *in vitro* λειτουργική μελέτη των απλοτύπων των δύο πολυμορφισμών (Simoni and Casarini 2014) σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα έδειξε ότι η ενεργοποίηση της ERK1/2 είναι αμβλυμένη στα κύτταρα που εκφράζουν τον απλότυπο A307-S680 και έτσι όντως ο απλότυπος αυτός φαίνεται να δημιουργεί έναν λιγότερο ενεργό λειτουργικά FSHR. Επιπρόσθετα, το αλληλίο G για τη θέση 680 εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες με PCOS και ο γονότυπος GG (δηλ. Ser/Ser σε επίπεδο αμινοξέων) είναι πιο συχνός στις ωορρηκτικές διαταραχές, στην υπογονιμότητα και στην υπό ή υπέρ-απάντηση σε FSH θεραπεία κατά την ART.

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να καταδείξουν την χρησιμότητα του FSHR γονότυπου στον προσδιορισμό της δόσης FSH στην ART και στην πρόβλεψη της απάντησης του οργανισμού στη θεραπεία και αρκετές από αυτές επιβεβαίωσαν ότι γυναίκες με 1 ή 2 A αλληλία στη θέση 680 είχαν χαμηλότερα επίπεδα FSH στον ορό (Simoni and Casarini 2014). Είναι όμως πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχει μια πληθώρα αντικρουόμενων δεδομένων και σε αυτό πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η ηλικία των γυναικών ιδιαίτερα όταν μελετάται η επίπτωση του N680S πολυμορφισμού στα επίπεδα της FSH. Πλέον είναι αποδεκτό ότι η παρουσία του N680S πολυμορφισμού παίζει ιδιαίτερα καθοριστικό ρόλο στην ευαισθησία του ωοθυλακίου στην FSH όταν αφορά νεαρές (<40 έτη) ωορρηκτικές γυναίκες (Lledo et al. 2013) αλλά δεν είναι διευκρινισμένο εάν ο ρόλος του μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τους άλλους πολυμορφισμούς είναι καθοριστικός σε μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες ζευγαριών που παρουσιάζουν υπογονιμότητα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που συνοδεύονται με μη βέλτιστη λειτουργία των ωαρίων και/ή μειωμένο απόθεμα.

Πίνακας 3: Σημαντικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με κλινικές οντότητες στον FSHR και τα χαρακτηριστικά τους.

ref SNP (NCBI)	Νουκλεοτίδιο	Αμινοξύ	Λειτουργική σημασία	Επίπεδα της FSH στον ορό	Επιπτώσεις στην γονιμότητα	Απόκριση σε θεραπεία με hFSH
rs1394205	-29 G>A	-	↓ δραστηριότητα του υποκινητή (Desai et al. 2011) (↓ επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης FSHR)	-	-	-
rs6165	919 A>G	307 Thr→Ala	↓ δραστηριότητα ERK1/2 (Simoni and Casarini 2014) (↓ ευαισθησία στην FSH)	↑ (νεαρές φυσιολογικές γυναίκες) (Perez Mayorga et al. 2000)	-	-
rs6166	2039 A>G	680 Asn→Ser	↓ δραστηριότητα ERK1/2 (Simoni and Casarini 2014) (↓ ευαισθησία στην FSH)	↑ (νεαρές φυσιολογικές γυναίκες) (Perez Mayorga et al. 2000)	Μειωμένη στις γυναίκες	Μειωμένη στις γυναίκες [(GG) ↓ επίπεδα E2] Αυξημένη στους άντρες (G αλληλίο ↑ αριθμού σπερματοζωαρίων)

Ο τρίτος πιο σημαντικός πολυμορφισμός στον FSHR ο -29G>A, έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται στην ειδική αλληλουχία ιογενή μετασχηματισμού E26 (c-ETS-1), που αποτελεί και θέση πρόσδεσης του ETS-1 μεταγραφικού παράγοντα (Wunsch et al. 2005). Όσον αφορά στην κατανομή του σε σχέση με την εθνικότητα το G αλληλίο είναι και το επικρατές αρχέγονο αλληλίο, βρίσκεται σε >50% στον πληθυσμό της Ευρώπης και ένα πολύ μικρό ποσοστό εμφανίζει τον γονότυπο AA (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.). Λειτουργικές μελέτες του υπολειπόμενου αλληλίου A είναι αντικρουόμενες και ορισμένες από αυτές δείχνουν μια μειωμένη ενεργότητα του υποκινητή. Η μείωση αυτή μπορεί να φτάσει και το 56% και φαίνεται να εξηγεί τους κλινικούς συσχετισμούς του πολυμορφισμού εάν ληφθεί υπόψη ότι η ενεργότητα του υποκινητή φαίνεται να εξαρτάται από την κυτταρική σειρά στην οποία γίνεται η δοκιμασία έκφρασης (Nakayama et al. 2006).



Εικόνα 17: Κατανομή των συχνοτήτων των αλληλίων και των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs1394205 (-29G>A) (Simoni and Casarini 2014)

In vitro μελέτες του -29G>A πολυμορφισμού, παρόλο που δείχνουν μειωμένη λειτουργικότητα του υποκινητή δεν φαίνεται να συσχετίζονται με τα επίπεδα FSH. Ωστόσο, μελέτη με Ινδές που φέρουν το αλληλίο A χρειάστηκαν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες FSH στην διάρκεια της ART, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης FSHR που εμφανίζουν φορείς του πολυμορφισμού αυτού (Desai et al. 2011). Ενδιαφέρον επίσης έχει προκαλέσει πρόσφατη μελέτη του συνδυασμού των πολυμορφισμών -29G>A(A) και N680S, όπου δείχθηκε ότι γυναίκες που φέρουν σε ομοζυγωτία τα υπολειπόμενα αλληλία (AA και GG, αντίστοιχα) στις θέσεις αυτές είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό χαμηλότερης θεραπευτικής απόκρισης και χρειάζονται υψηλότερες δόσεις FSH κατά την θεραπεία, γεγονός αντικρουόμενο της μοριακής λειτουργικότητας των δύο πολυμορφισμών (μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα για τον -29G>A και αυξημένη ευαισθησία στην FSH για τον N680S (Desai et al. 2013b).

Περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, οι οποίες θα προσπαθήσουν να συμπεριλάβουν τους συνδυασμένους απλότυπους των παραπάνω πολυμορφισμών και θα ορίσουν με αυστηρότερα ίσως κριτήρια των υπό μελέτη πληθυσμό (πχ μεταξύ άλλων ηλικία και εμμηνορυσιακό κύκλο) πιθανόν να διαλευκάνουν την κλινική σημασία αυτών των πολυμορφισμών και των συνδυασμών τους και να ξεδιαλύνουν το τοπίο από την έως σήμερα βιβλιογραφική ετερογένεια.

5 Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου των πολυμορφισμών Ser680Asn και -29 του γονιδίου του υποδοχέα της FSH (FSHR) μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό, στην έκβαση πρωτοκόλλων υποβοηθούμενης γονιμοποίησης και η συσχέτιση τους με τα βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετέχουν σε αυτά.

6 Υλικά & Μέθοδοι

6.1 Πληθυσμός υπό μελέτη

Η μελέτη αφορά σε 141 γυναίκες με φυσιολογική ωορρηξία που βρίσκονταν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης στη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης της 1^{ης} Γυναικολογικής και Μαιευτικής κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα, καθώς και 94 γυναικών μαρτύρων. Ο υπό μελέτη πληθυσμός παρουσιάζει υπογονιμότητα για τουλάχιστον 1 χρόνο, ενώ αποκλείστηκαν γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

6.2 Πρωτόκολλο υποβοηθούμενης γονιμοποίησης

Ορμονικός Έλεγχος

Την τρίτη ημέρα του κύκλου, πριν από την ωοθηκική διέγερση, μετρήθηκαν τα επίπεδα FSH, LH και PRL στον ορό με ανοσοδοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Germany) ενώ από την 5^η έως και την ημέρα χορήγησης της hCG μετρούνταν τα επίπεδα της E2 με το kit Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA kit, Abbott laboratories, Abbott Park IL, USA). Η μέτρηση των επιπέδων προλακτίνης πραγματοποιήθηκε προς αποκλεισμό υπερπρολακτιναιμίας.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ωοθηκική διέγερση των ασθενών:

- ✓ GnRH agonist, Suprefact 100μg/dose, Sanofi Aventis
- ✓ Human hCG, Organon, Oss, The Netherlands
- ✓ Human Recombinant FSH-rFSH, Organon, Oss, The Netherlands
- ✓ Τρυβλία petri
- ✓ Καλλιεργητικό μέσο Universal IVF Medium (Medicult, Jyllinge Denmark)
- ✓ Διαλύματα κλιμακωτής συγκέντρωσης (45-90%) (IxaPrep System Medicult, Jyllinge, Denmark)
- ✓ Καλλιεργητικό μέσο προετοιμασίας σπέρματος (Medicult, Jyllinge Denmark)
- ✓ Υαλουρονιδάση (type VII, 320 IU/ml, Sigma -Aldrich, Dorset, UK)
- ✓ PVP (PVP Clinical grade, Medicult, Jyllinge Denmark)
- ✓ Liquid paraffin, Medicult, Jyllinge, Denmark
- ✓ Incubator Thermo-Forma
- ✓ Στερεοσκόπιο Nikon-Japan
- ✓ Ανάστροφο μικροσκόπιο Nikon-Japan /Μικροχειριστήρια Narishige

Διέγερση ωοθηκών-Πρωτόκολλα

1. *Επιμηκνυμένο πρωτόκολλο:* Σε ασθενείς ηλικίας <35 ετών την 21^η ημέρα του προηγούμενου κύκλου έγινε εκτίμηση των ωοθηκών υπερηχογραφικά και ξεκίνησε η χορήγηση αγωνιστή 100μg ημερησίως -έως την ημέρα χορήγησης της hCG. 15 ημέρες μετά την έναρξη του αγωνιστή ξεκίνησε η χορήγηση γοναδοτροπινών ενώ γινόταν και εκτίμηση των επιπέδων E2 στον ορό. Με έλεγχο των επιθυμητών επιπέδων E2 (>400pg/ml) και παρουσία τουλάχιστον δύο ωοθυλακίων μεγέθους >18mm, χορηγήθηκε η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη 10.000IU. Η ωοληψία ακολούθησε 36 ώρες μετά την εν λόγω χορήγηση με διακοπτική κεφαλή υπερήχων.

2. *Βραχύ πρωτόκολλο*: Σε ασθενείς ηλικίας ≥ 35 ετών ακολουθήθηκε το βραχύ πρωτόκολλο πρόκλησης από τη 2^η ημέρα του κύκλου χορηγώντας 500μg αγωνιστή ημερησίως (η δόση προσαρμόζοταν αναλόγως της ωοθηκικής απόκρισης της εκάστοτε γυναίκας). Την 3^η ημέρα έγινε έναρξη χορήγησης 200IU rFSH. Από την 5^η ημέρα έως και την ημέρα χορήγησης της hCG γινόταν καταμέτρηση των επιπέδων E2. Όταν τα επίπεδα E2 έφταναν στο επιθυμητό και υπήρχαν τουλάχιστον δύο ωοθυλάκια $>18\text{mm}$, γινόταν η χορήγηση της hCG.

Διαδικασία κλασσικής γονιμοποίησης

Αφού γίνει η συλλογή των ωαρίων (σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου), αυτά τοποθετούνται σε ειδικό τρυβλίο με 4ml καλλιεργητικό μέσο Universal IVF Medium για 6 ώρες και σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ προτού έρθουν σε επαφή με το σπέρμα. Σε τρυβλία τοποθετούνται όλα τα ωάρια, είτε είναι ώριμα-MIIs είτε ανώριμα-GVs. Τα ώριμα ωάρια έρχονται σε επαφή με το σπέρμα εντός 6-8 ωρών ενώ τα ανώριμα διατηρούνται περισσότερο χρόνο στο τρυβλίο προκειμένου να εξάγουν το πολικό σωματίο (in vitro ωρίμανση).

Η συλλογή του σπέρματος πραγματοποιείται την ίδια ημέρα με την ωοληψία, επεξεργάζεται με διάλυμα διαβαθμισμένης πυκνότητας (45 και 90%) και φυγοκεντρείται στις 400g για 20 λεπτά αρχικά και για 10 λεπτά κατόπιν, αφού τοποθετηθεί σε νέο καλλιεργητικό μέσο (5-10ml). 100.000 σπερματοζωάρια /ml από το επεξεργασμένο δείγμα τοποθετούνται στο τρυβλίο όπου επωάζονται τα ωάρια.

18 ώρες μετά την επώαση πραγματοποιείται έλεγχος της γονιμοποίησης: ελέγχεται η παρουσία των δύο προπυρήνων και η εξαγωγή και δεύτερου πολικού σωματίου, απομακρύνοντας τα κοκκώδη κύτταρα με μηχανικό τρόπο.

Τα γονιμοποιημένα ωάρια επωάζονται σε νέο τρυβλίο για τις επόμενες ώρες και η μεταφορά των εμβρύων πραγματοποιείται την 2^η, 3^η ή 5^η ημέρα της εξέλιξης.



Εικόνα 18: Ωριμο (MII) ωάριο, Ανώριμο (GV) ωάριο και ζυγώτης (2 προπυρήνες στο κέντρο του κυτταροπλάσματος).

Διαδικασία μικρογονιμοποίησης (ICSI)

Αφού ολοκληρωθεί η ωοληψία και μετά το πέρας 4 ωρών τα ωάρια καθαρίζονται από το σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων μηχανικά, τοποθετώντας αρχικά υαλουρονιδάση (4ml για 30δευτερόλεπτα) και στη συνέχεια με πιπετάρισμα. 2-3 ώρες μετά το καθάρισμα πραγματοποιείται η μικρογονιμοποίηση μόνο στα ωάρια που έχουν εξάγει το πρώτο πολικό σωματίο (MII). Η επεξεργασία του σπέρματος λαμβάνει χώρα όπως παραπάνω.

Η διαδικασία της μικρογονιμοποίησης πραγματοποιείται με χρήση δύο μικροπιπετών. Η μία κρατά το ωάριο ακινητοποιημένο (με το πολικό σωματίο στην ώρα 6 ή 12) και η άλλη εγχύει το σπερματοζωάριο εντός του κυτταροπλάσματος. Στο τρυβλίο η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ελαττώνεται με χρήση PVP.

Μετά το ICSI τα ωάρια τοποθετούνται σε νέο καλλιεργητικό μέσο και επωάζονται για 16-18 ώρες προτού ελεγχθεί η γονιμοποίηση, όπως και στην κλασική γονιμοποίηση.

Εμβρυομεταφορά

Την 2^η, 3^η ή 5^η ημέρα εξέλιξης ελέγχεται η εξέλιξη των εμβρύων ως προς τις κυτταρικές διαιρέσεις και την ποιότητα και πραγματοποιείται η εμβρυομεταφορά. Επιλέγονται για τοποθέτηση στη μήτρα τα έμβρυα τα οποία έχουν ισομερή βλαστομερίδια και που έχουν εξωκυττάρια θραύσματα σε ποσοστό <20%. Σε γυναίκες <40 ετών τοποθετούνται έως 3 έμβρυα, ενώ σε γυναίκες >40 ετών τοποθετούνται 4 έμβρυα.

16 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά ελέγχεται βιοχημικά η κύηση και την 6^η εβδομάδα της κύησης επιβεβαιώνεται η παρουσία εμβρυικού σάκου.

6.3 Ανίχνευση πολυμορφισμών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR)

Για το πρωτόκολλο της RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- ✓ QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany)
- ✓ Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK)
- ✓ Συσκευή LightCycler 480.

6.3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA αναφέρεται στη διαδικασία λήψης κεκαθαμένου DNA χρησιμοποιώντας φυσικές και χημικές μεθόδους. Έχοντας επιλέξει τα κύτταρα τα οποία επιθυμούμε να μελετήσουμε πραγματοποιείται λύση τους για την απελευθέρωση κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Πλέον διατίθενται ειδικά kit τα οποία επιτρέπουν την εύκολη και γρήγορη απομόνωση και καθαρισμό DNA από πολλαπλά δείγματα συγχρόνως. Η διαδικασία επιτρέπει την απομόνωση κατά μέσο όρο 6 μg DNA από 200μl περιφερικού αίματος.

Η απομόνωση του DNA που χρησιμοποιήθηκε για το εν λόγω πείραμα έγινε με το kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την λύση λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και την απομόνωση-πρόσδεση γενωμικού DNA από τους πυρήνες αυτών των κυττάρων σε μεμβράνες σιλικόνης της περιστρεφόμενης στήλης QIAamp spin column, εκλούοντας τελικά υψηλής καθαρότητας νουκλεϊκά οξέα και απομακρύνοντας έτσι τις πρωτεΐνες και άλλα στοιχεία που δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη. Η στήλη φυγοκεντρείται με ρυθμιστικά διαλύματα επιτρέποντας την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και την λήψη κεκαθαμένου DNA.

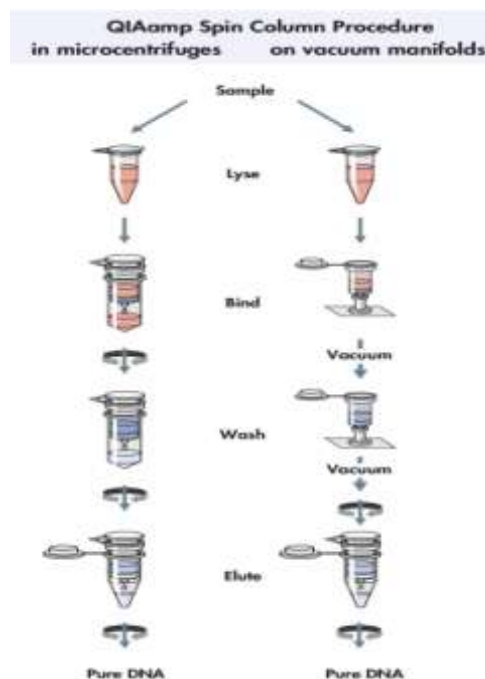
6.3.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από περιφερικό αίμα

Από τις 235 γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη έγινε λήψη περιφερικού αίματος (στις γυναίκες της ομάδας IVF έγινε τη δεύτερη ημέρα χορήγησης των γοναδοτροπινών). Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιείται ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα τύπου erpendorf αναμειγνύονται (ανάδευση σε vortex 15 δευτερόλεπτα) 200μl περιφερικού αίματος, 20μl διαλύματος πρωτεάσης και 200 μl

διαλύματος λύσης. Η πρωτεάση αποδιοργανώνει τις πρωτεϊνικές μεμβράνες, ενώ το διάλυμα λύσης σπάει τις κυτταρικές μεμβράνες.

2. Το παραπάνω διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 56°C για 10 λεπτά για την ενίσχυση της δράσης των διαλυμάτων και την ολική λύση των κυττάρων.
3. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 8000rpm και τα προϊόντα λύσης συσσωρεύονται στη βάση του σωλήνα.
4. Σε αυτό το ίζημα προστίθενται 200μl αιθανόλης 96% με σκοπό την ομογενοποίηση, απαραίτητη για να μειώσει το ιξώδες του προϊόντος λύσης που παράγεται από τη διάσπαση. Το διάλυμα αναδεύεται με vortex για 15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα στις 8000rpm.
5. Το δείγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενη στήλη QIAampSpinColumn σε σωληνάριο συλλογής 2ml, όπου και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 8000rpm.
6. Τοποθετείται καινούργιος συλλεκτικός σωλήνας σε κάθε στήλη και προστίθεται 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1, το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό (8000rpm) και το σωληνάριο συλλογής απορρίπτεται.
7. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής. Προστίθενται 500 μl του δεύτερου ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και το δείγμα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά (14000rpm). Το σωληνάριο απορρίπτεται με το περιεχόμενό του.
8. Η περιστρεφόμενη στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης (Eppendorf tube 1,5ml). Προστίθενται 120μl διαλύματος έκπλυσης, ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και κατόπιν φυγοκέντρωση για 1 λεπτό (8000rpm). (Qiagen, February 2003).



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης γενωμικού DNA από δείγμα περιφερικού αίματος. (<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/qiaamp-dna-blood-mini-kit/#productdetails>)

Η απομόνωση και η ποσότητα απομόνωσης του DNA πιστοποιήθηκε με φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 256nm (Qubit™ Fluorometer).

6.3.2 Συσκευή LightCycler 480 για την ανίχνευση

Το σύστημα LightCycler 480 είναι μια υψηλής απόδοσης συσκευή PCR που διαθέτει 96 φρεάτια και η οποία χρησιμοποιείται σε μεθόδους ανίχνευσης γονιδίων, ανάλυσης της έκφρασης γονιδίων, ανάλυση arrays κα. Το σύστημα ThermoBase Technology επιτρέπει την πραγματοποίηση 40 κύκλων PCR σε πολύ μικρό χρόνο (<1ώρα) διατηρώντας την ομοιογένεια της θερμοκρασίας σε κάθε σημείο της πλάκας. Επιπλέον, η ειδική κατανομή των οπτικών στοιχείων εξασφαλίζει την ομοιόμορφη ανάγνωση των σημάτων έκφρασης, ανεξαρτήτως του σημείου τοποθέτησης του δείγματος, ενώ διαθέτει 5 φίλτρα διέγερσης φθορισμού και 6 φίλτρα ανίχνευσης εκπεμπόμενου φθορισμού, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Xenon lamp (430-630)							
Excitation filters	440	465	498	533			618
Emission filters	488	510	580	610	640	660	
Dye	LightCycler® Cyan 500	SYBR ResoLight	Fluorescein FAM	HEX (VIC)	LightCycler® Red 610	LightCycler® Red 640	Cy5
Detection formats	Melting Curve	•					
	HRM	•					
	SimpleProbe probes		•				
	HybProbe probes			(*)	•	•	•
	Hydrolysis probes 1-3 colors		•		•		•
Hydrolysis probes 4 colors	•		•		•		•

(*) FRET Donor

Πίνακας 4: Τεχνικά Χαρακτηριστικά συσκευής LightCycler 480

(<https://lifescience.roche.com/shop/products/lightcycler14301-480-instrument-ii>)

6.3.3 Αναλώσιμα υλικά για τα πειράματα Real-timePCR

Τα αντιδραστήρια και αναλώσιμα που παρέχονται από την Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany είναι τα εξής:

- ✓ ρυθμιστικό διάλυμα LightCycler 480 Genotyping Master(5xconcentrated)
- ✓ LightCycler480 H₂O,
- ✓ PCRgrade και LightCycler480 MgCl₂ (2,5mM)
- ✓ μικρο-πλάκες με 96 φρεάτια (LightCycler480 Multiwellplate 96)
- ✓ ταινίες για την επικόλληση των πλακών (sealingfoils).

Επιπροσθέτως χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) και ανιχνευτές (probes) για την ανίχνευση των μελετώμενων πολυμορφισμών, από την TIB Molbiol, Berlin, Germany (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών

	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Tm ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ
-29G>A	PRIMERS	
FSHR R	TGATGACATCCTGAGCCCAAG	56,8
FSHR F	ACATGACCCTACCAGTTCTCAAG	57,8
	PROBES	
FSHR Abchor	LC640-TGGATGGATGCATAATTATGGCCCT--PH	58,5
Rs1394205A	CTGCAAATGCAGAAAGAAATCAG--FL	54,2
Asn680Ser	PRIMERS	
FSHR S	AGTGTGGCTGCTATGAAATCC	56,6
FSHR A	GGCTAAATGACTTAGAGGGACAAGTA	56,9
	PROBE	
SP(A)	CCCAGAGTCACCAATGGTXITCCA-PH	62,1

6.3.4 Πραγματικού Χρόνου (Real Time) PCR

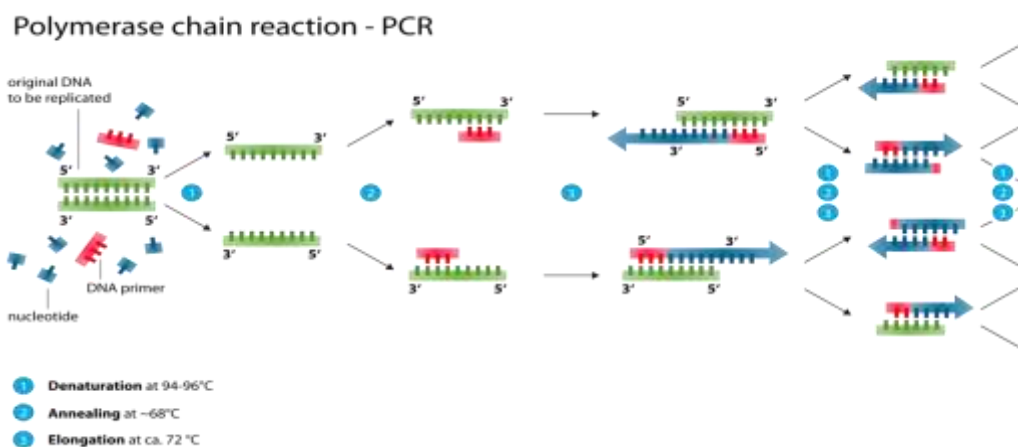
Η Real Time PCR είναι μια τεχνική που βασίζεται στην κλασσική PCR. Η επιλεκτική αντιγραφή DNA με τη μέθοδο PCR χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA-αλληλουχιών στόχων με σκοπό την αναλυτικότερη μελέτη αυτών. Η μέθοδος στηρίζεται στην θερμική αποδιάταξη και επαναδιάταξη του DNA.

Για την εφαρμογή της κλασσικής PCR απαραίτητα στοιχεία είναι:

1. DNA στόχος που θα πολλαπλασιαστεί.
2. Ταq πολυμεράση: DNA πολυμεράση που απομονώνεται από βακτήρια θερμών πηγών και δρα σε θερμοκρασία >90°C.
3. Εκκινητές: μικρά τμήματα DNA που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές με την αλληλουχία DNA-στόχο.
4. dNTPs: τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δομικά στοιχεία από τα οποία η DNA πολυμεράση θα συνθέσει τη νέα αλυσίδα.
5. PCR Buffer: ρυθμιστικό διάλυμα PCR με pH=8,2 για τη διατήρηση των συνθηκών.
6. MgCl₂, απαραίτητο συστατικό για την ομαλή διεξαγωγή της αντίδρασης

Το δείγμα DNA στόχος αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση. Το μίγμα θερμαίνεται στους 92-94°C και το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται. Η θερμοκρασία της αντίδρασης χαμηλώνει για 20-40 δευτερόλεπτα επιτρέποντας στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στα 5' άκρα της αλληλουχίας στόχου. Το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η θερμοκρασία πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε να επιτρέπει την υβριδοποίηση των συμπληρωματικών αλληλουχιών, αλλά τόσο υψηλή ώστε να επιτρέπει μόνο την ειδική σύνδεση. Έτσι ξεκινά ο πολυμερισμός του DNA με τη βοήθεια της Ταq πολυμεράσης και δημιουργούνται οι συμπληρωματικοί κλώνοι και προς τις δυο κατευθύνσεις. Με την ολοκλήρωση του κύκλου ανυψώνεται πάλι η θερμοκρασία οπότε τα δίκλινα DNA αποδιατάσσονται, και εν συνεχεία το μίγμα ψύχεται, υβριδοποιούνται οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση ξεκινά και πάλι τον πολυμερισμό. Ο κύκλος αυτός

επαναλαμβάνεται συνέχεια διπλασιάζοντας κάθε φορά το ποσό του DNA για 25 έως 40 κύκλους.



Εικόνα 20: Διαγραμματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

Η Real Time PCR είναι η εργαστηριακή μοριακή τεχνική που στηρίζεται στην κλασσική τεχνική PCR, με τη διαφορά πως η ποσοτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης γίνεται σε πραγματικό χρόνο και όχι στο τέλος της αντίδρασης. Δύο είναι οι κοινές μέθοδοι ανίχνευσης οι οποίες χρησιμοποιούνται: α)μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που αλληλεπιδρούν με οποιοδήποτε τμήμα DNA και β)ειδικό DNA-ανιχνευτές, αποτελούμενοι από σημασμένα ολιγονουκλεοτιδια, που υβριδοποιούνται με την αλληλουχία-στόχο.

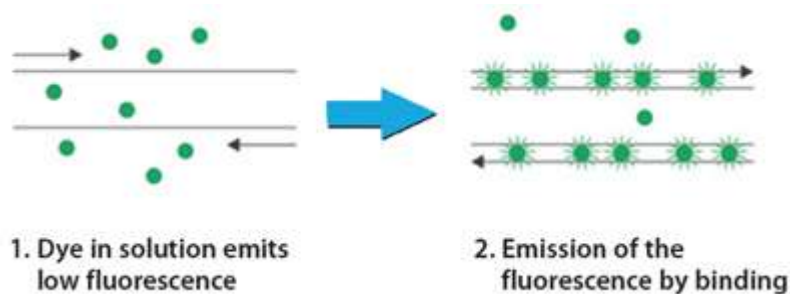
Όπως ακριβώς και στην κλασσική PCR, έτσι στην Real time PCR χρησιμοποιείται το DNA στόχος, ένα ζευγάρι ειδικοί ανιχνευτές, δεοξυριβονουκλεοτίδια, ρυθμιστικό διάλυμα, και DNA πολυμεράση. Το μείγμα αυτό τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα θερμικού πολλαπλασιασμού (thermalcycler) το οποίο διαθέτει αισθητήρες ανίχνευσης του εκπεμπόμενου φθορισμού από την αντίδραση. Με αυτόν τον τρόπο σε κάθε κύκλο μετρίεται το παραγόμενο προϊόν και τα δεδομένα αναλύονται σε συνδεδεμένο με το μηχάνημα υπολογιστή.

Η διαδικασία της RT-PCR περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη σειρά αλλαγών θερμοκρασίας (25-50 φορές) καθώς ο θερμικός πολλαπλασιαστής έχει την δυνατότητα να θερμαίνει και να ψύχει ταχύτατα τα δείγματα αξιοποιώντας έτσι τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νουκλειικών οξέων και της πολυμεράσης. Ο κάθε κύκλος πολλαπλασιασμού αποτελείται από τρία στάδια: το πρώτο (~95°C), όπου οι δύο αλυσίδες DNA αποχωρίζονται, το δεύτερο (~50-60°C), όπου συνδέονται οι αλληλουχίες των εκκινητών με το DNA-στόχο, και το τρίτο (68-72°C), όπου και πραγματοποιείται ο πολυμερισμός με τη βοήθεια της πολυμεράσης.

6.3.4.1 Τεχνικές ανίχνευσης

Μη ειδική ανίχνευση με χρήση χρωστικών που προσδένονται στο DNA ως ανιχνευτές (π.χ.SYBR Green). Οι εν λόγω χρωστικές προσδένονται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA προκαλώντας φθορισμό της χρωστικής, επομένως όσο αυξάνεται το προϊόν που παράγεται

τόσο αυξάνεται ο φθορισμός σε κάθε κύκλο. Το μείγμα της αντίδρασης προετοιμάζεται ως συνήθως και όσο προχωράει η αντίδραση η χρωστική εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν προσδένεται στο DNA. Το αρνητικό της συγκεκριμένης τεχνικής είναι πως ενδεχομένως να μην υπάρχει ακριβής ποσοτικοποίηση μόνο της αλληλουχίας-στόχου, αλλά να έχουμε και καταμέτρηση μη ειδικού προϊόντος.



Εικόνα 21: Διαδικασία ανίχνευσης με χρήση SYBR green χρωστικής

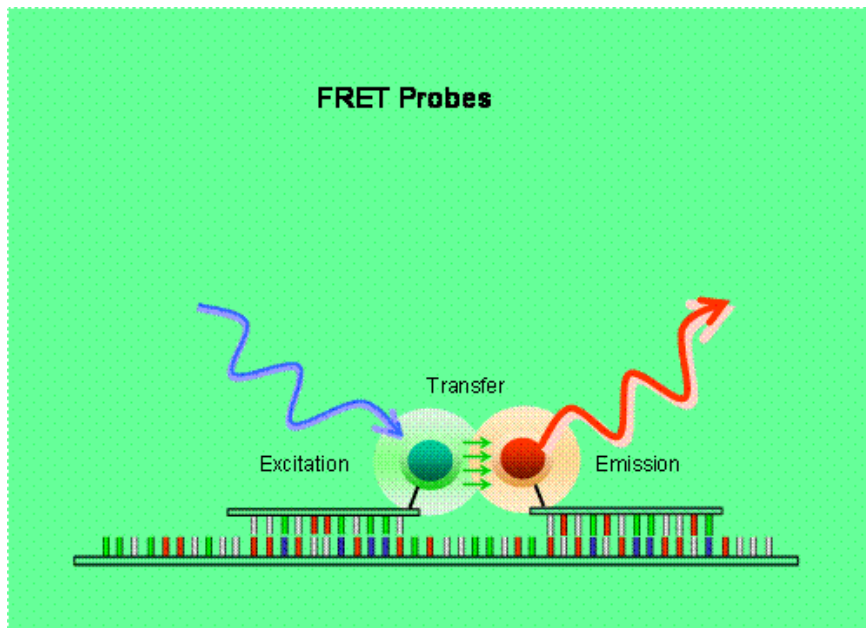
(<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html>)

Η ειδική ανίχνευση, με τη χρήση σημασμένων μορίων ανιχνευτών βασίζεται στον εντοπισμό και πρόσδεση των ανιχνευτών ειδικά και μόνο με την αλληλουχία DNA που είναι συμπληρωματική τους, γεγονός που αυξάνει την ειδικότητα και επιτρέπει την παρουσία και άλλου δίκλωνου DNA στο δείγμα το οποίο μπορεί εξίσου να προσδιοριστεί. Τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής των εν λόγω μορίων επιτρέπουν το σαφή διαχωρισμό τους. Παραδείγματα τέτοιων ανιχνευτών είναι οι Taqmanprobes, οι MolecularBeacon, Scorpions και Hybridization probes.

6.3.4.2 Ανιχνευτές Υβριδοποίησης

Στην Real Time PCR με ανιχνευτές υβριδοποίησης, χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές. Ο ένας ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που λειτουργεί ως δότης ενέργειας, ενώ ο άλλος ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που λειτουργεί ως δέκτης ενέργειας. Οι δύο ανιχνευτές βρίσκονται σε κοντινές θέσεις με αποτέλεσμα όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση πολυμερισμού, προσδένονται στο προϊόν, πλησιάζουν τα δυο φθορίζοντα μόρια και μεταφέρεται ενέργεια από το μόριο δότη στο μόριο δέκτη (φαινόμενο FRET) μέσω φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού δείχνει την ποσότητα του προϊόντος που παράγεται από την αντίδραση, σε πραγματικό χρόνο.

Στην περίπτωση χρήσης τέτοιων ανιχνευτών το μείγμα της αντίδρασης προετοιμάζεται όπως συνήθως και προστίθεται ο ανιχνευτής. Ο φθορισμός μετριέται στο μηχάνημα Real Time PCR και η γεωμετρική αύξηση, που αντιστοιχεί και στην αύξηση του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση (Cq) σε κάθε κύκλο.



Εικόνα 6: Ανιχνευτές FRET

(<http://www.moleculardiagnostickits.com/real-time-pcr.htm>)

6.3.4.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR (Melting Curve)

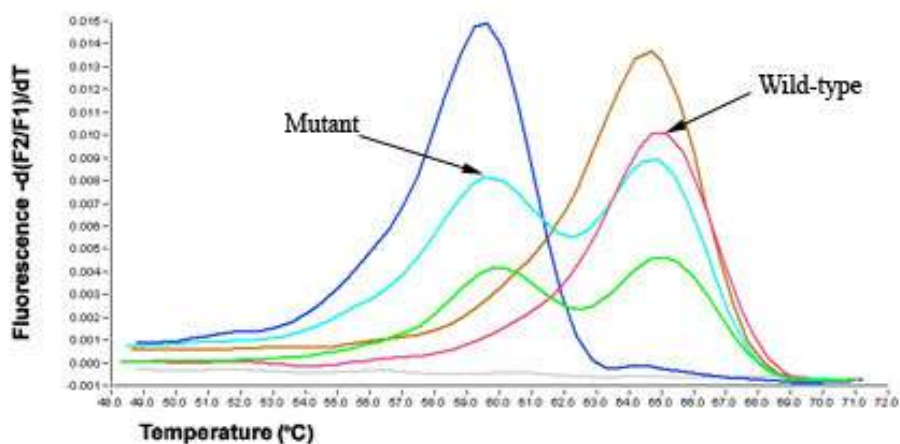
Χάρη στην RT-PCR υπάρχει η δυνατότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένου τμήματος DNA με βάση τη θερμοκρασία αποδιάταξης του (T_m). Η ανάλυση με βάση την T_m αφορά στο δίκλωνο DNA. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται αυξάνοντας την απορρόφηση του (υπερχρωμικότητα) και η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA έχει αποδιαταχτεί είναι γνωστή ως θερμοκρασία τήξης.

Η θερμοκρασία τήξης είναι εξαρτώμενη από το μήκος του δίκλωνου μορίου, το ποσοστό σε ζεύγη GC, AT αλλά και από την παρουσία αναντιστοιχίας σε κάποια βάση (base pair mismatch) μεταξύ των δυο αλυσίδων DNA. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό σε ζεύγη GC τα οποία έχουν τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τα ζεύγη AT που έχουν δύο, τόσο υψηλότερη θερμοκρασία τήξης θα έχει το μόριο. Επιπλέον όσο μεγαλύτερη είναι η αναντιστοιχία σε κάποια βάση τόσο πιο χαμηλή θα είναι η θερμοκρασία τήξης, φαινόμενο που παρατηρείται συνήθως σε μόρια μικρότερου μήκους.

Το μείγμα το οποίο έχει τοποθετηθεί στο μηχανήμα της Real Time PCR αρχικά θερμαίνεται στην ιδανική-ελεγμένη θερμοκρασία ώστε να αποδιαταχτεί το δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια ψύχεται άμεσα σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία που γίνεται η υβριδοποίηση του DNA-στόχου, και τέλος η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά ώστε να υβριδοποιηθούν οι ανιχνευτές με το DNA-στόχο και εν τέλει να μετρηθεί το ποσό του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο. Στις περιοχές του DNA όπου υπάρχουν πολυμορφισμοί (SNPs), το μόριο έχει πιο «ασταθείς» δεσμούς λόγω αναντιστοιχίας οπότε και η θερμοκρασία τήξης θα είναι χαμηλότερη.

Οι καμπύλες ανάλυσης της διαδικασίας είναι διαγράμματα που δείχνουν τις θερμοκρασίες τήξης των δειγμάτων σε σχέση με το φθορισμό. Η κορυφή κάθε καμπύλης (peak) απεικονίζει τη θερμοκρασία τήξης του εκάστοτε δείγματος. Όσο σταθερότεροι είναι οι δεσμοί του μορίου (wildtype) τόσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τήξης (peak της

καμπύλης). Αντιθέτως, όσο πιο ασταθείς είναι οι δεσμοί λόγω παρουσίας πολυμορφισμών (mutant), τόσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τήξης.



Εικόνα 7: Απεικόνιση των καμπυλών ανίχνευσης

(<http://www.biomedcentral.com/1742-6413/3/10/figure/F2?highres=y>)

6.3.5 Πειραματική Διαδικασία ανίχνευσης των πολυμορφισμών Ser680Asn και -29 του FSHR γονιδίου.

6.3.5.1 Ανίχνευση Πολυμορφισμού Ser680Asn του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της FSH (FSHR).

Το μείγμα για την αντίδραση RT-PCR που παρατίθεται στον **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**, είναι συνολικού όγκου 20 μl και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιούμε ανήκει στην κατηγορία SimpleProbe ανιχνευτών. Το κάθε δείγμα τοποθετείται σε φρεάτια στην ειδική πλακέτα (96 φρεατίων) που εισάγεται στο μηχάνημα της RealtimePCR. Μετά την εισαγωγή του μείγματος με το DNA σε κάθε φρεάτιο, γίνεται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 28°C για 1 λεπτό, στις 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm).

Πίνακας 6: Συστατικά αντίδρασης PCR

Υλικά	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Reaction Buffer	2 μl	0.5x
50mM MgCl ₂	1,6 μl	1,5 mM
Πρόσθιος (νοηματικός) Εκκινητής S (25 μM)	0,5 μl	0,5 μM
Οπίσθιος (αντινοηματικός) Εκκινητής A (25 μM)	1 μl	1 μM
Ανιχνευτής Υβριδοποίησης	0,2 μl	
DNA	5 μl	1 μg
H ₂ O	έως 20 μl	

Η πλακέτα τοποθετείται στο μηχάνημα RT-PCR. Η διπλή έλικα αρχικά ξεκινά να αποδιατάσσεται και ακολουθούν 40 κύκλοι αντίδρασης με τα εξής βήματα: θέρμανση για μετουσίωση, ψύξη σε θερμοκρασία υβριδισμού και τελική θερμοκρασία επέκτασης. Η ενίσχυση του παραγόμενου προϊόντος ακολουθεί στη συνέχεια, με την πρόσδεση του ανιχνευτή με αύξηση και στη συνέχεια απότομη πτώση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία στη συνέχεια ανεβαίνει σταδιακά έως τους 75°C, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να μειώνεται, επιτρέποντας τη δυνατότητα προσδιορισμού του Tm για το κάθε δείγμα. Τέλος, πραγματοποιείται ψύξη του δείγματος (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**).

Πίνακας 7: Βήματα PCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	95°C	10 λεπτά
2	95°C	5 δευτερόλεπτα
3	56°C	20 δευτερόλεπτα
4	72°C	10 δευτερόλεπτα
5	40 κύκλοι επανάληψη βημάτων 2-4	
6	95°C	1 λεπτό
7	40°C	Άνοδος με ρυθμό 0.11 ^o C/sec
8	75°C	10 λεπτά
9	40°C	30 δευτερόλεπτα

6.3.5.2 REAL TIME PCR για τον πολυμορφισμό στη θέση -29 για το γονίδιο του υποδοχέα της FSH

Το μείγμα για την αντίδραση RT-PCR όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8 είναι σε τελικό όγκο 20μl και οι ανιχνευτές ανήκουν στην κατηγορία Hybridization probes ανιχνευτών.

Πίνακας 8: Συστατικά αντίδρασης PCR

Υλικά	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Reaction Buffer	4 μl	1x
50mM MgCl ₂	1,6 μl	1,5 mM
Πρόσθιος (νοηματικός) ΕκκινητήςF(25 μM)	0,5 μl	0, 5 μM
Οπίσθιος (αντινοηματικός) ΕκκινητήςR (25 μM)	0,5 μl	2 μM
Ανιχνευτής Υβριδοποίησης PH	0,2 μl	1,3 μM
Ανιχνευτής Υβριδοποίησης FL	0,2 μl	1,3 μM
DNA	5 μl	1 ng
H ₂ O	έως 20 μl	

Το κάθε δείγμα τοποθετείται σε φρεάτια στην ειδική πλακέτα που εισάγεται στο μηχάνημα της RealtimePCR. Μετά την προσθήκη DNA σε κάθε φρεάτιο ακολουθεί επίσης φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 28°C για 1 λεπτό, στις 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και η πλακέτα εισάγεται στο μηχάνημα RTPCR.

Η διπλή έλικα αρχικά ξεκινά να αποδιατάσσεται και να μετουσιώνεται σε θερμοκρασία 95°C, με τη θερμοκρασία υβριδισμού για τους εκκινητές αυτούς επίσης στους 56°C και με αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C για επέκταση (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**). Ακολουθεί υβριδοποίηση του ενισχυμένου παραγόμενου προϊόντος ακολουθεί με τον ανιχνευτή με θέρμανση και απότομη πτώση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία στη συνέχεια ανεβαίνει σταδιακά έως τους 75°C, με αποτέλεσμα ο φθορισμός να μειώνεται. Τέλος πραγματοποιείται ψύξη του δείγματος στους 40°C για 30 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 9: Βήματα PCR		
Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	95°C	10 λεπτά
2	95°C	5 δευτερόλεπτα
3	56°C	20 δευτερόλεπτα
4	72°C	10 δευτερόλεπτα
5	40 κύκλοι επανάληψη βημάτων 2-4	
6	95°C	1 λεπτό
7	40°C	Άνοδος με ρυθμό 0.06 ^o C/sec
8	75°C	10 λεπτά
9	40°C	30 δευτερόλεπτα

6.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε τις εξής μεθόδους: για τις παραμετρικές μεταβλητές independent sample t-test και one way ANOVA, και Mann-Whitney U test και Kruskal-Wallis για τις μη παραμετρικές. Οι διαφορές των ποιοτικών παραμέτρων ελέγχθηκε με Chi-square test (Fisher exact test όπου κρίθηκε απαραίτητο). Ο αλγόριθμος Sasieni (Sasieni algorithm-1997) και η συνθήκη Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium) ελέγχθηκαν με διαδικτυακό υπολογιστικό πρόγραμμα που βρίσκεται στη διεύθυνση <http://ihg.gsf.de>.

Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε τιμή $p \leq 0.05$ και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με στατιστικό λογισμικό πακέτο SPSS. "Statistics Package for Social Sciences" (SPSS), version 15, Minitab 12.

7 Αποτελέσματα

7.1 Κατανομή γονοτύπων στον υπό μελέτη πληθυσμό σε σύγκριση με μάρτυρες

Η γονοτύπηση του πολυμορφισμού Ser680Asn του γονιδίου FSHR με PCR πραγματικού χρόνου αναδεικνύει τους εξής γονοτύπους: 1) γυναίκες ομόζυγες για το «φυσιολογικό» (wild type) αλληλόμορφο, SerSer (ή GG), 2) γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό Ser, SerAsn (ή GA) και 3) γυναίκες ομόζυγες για τον πολυμορφισμό, AsnAsn (ή AA) (Πίνακας 10). Ο έλεγχος της κατανομής των γονοτύπων και των αλληλίων αυτών όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1 στις γυναίκες σε πρόγραμμα IVF/ICSI σε σύγκριση με τον πληθυσμό ελέγχου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

Πίνακας 10: Κατανομή συχνότητας των διαφορετικών γονοτύπων του πολυμορφισμού Ser680Asn του γονιδίου FSHR στους δύο υπο μελέτη πληθυσμούς: μάρτυρες και γυναίκες IVF/ICSI

Γονότυπος	Μάρτυρες n (%)	Περιστατικά n (%)	Odds Ratio-95% CI ¹	p- value ²
SerSer/GG	32 (34.0)	40 (28.4)	0.767 [0.437 - 1.346]	0.355
SerAsn/GA	38 (40.4)	70 (49.6)	1.453 [0.857 - 2.463]	0.163
AsnAsn/AA	24 (25.5)	31 (22.0)	0.822 [0.446 - 1.515]	0.529
Σύνολο	94	141		

Αλληλίο	Συχνότητα (%)			
G	102 (54.3)	150 (53.2)	0.958 [0.662 - 1.387]	0.821
A	86 (45.7)	132 (46.8)	1.044 [0.721 - 1.511]	

¹CI: Διάστημα εμπιστοσύνης

²Fisher exact test

Επιπλέον, η γονοτύπηση του πολυμορφισμού στη θέση -29 για το γονίδιο FSHR ανέδειξε αντίστοιχα τρεις γονοτύπους: 1) γυναίκες ομόζυγες για το wild type αλληλόμορφο, GG, 2) γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό -29, GA και 3) γυναίκες ομόζυγες για τον πολυμορφισμό -29, AA (Πίνακας 11). Ο έλεγχος της κατανομής των γονοτύπων και των αλληλίων αυτών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των περιστατικών και των μαρτύρων ($p > 0.05$).

Πίνακας 11: Κατανομή συχνότητας των διαφορετικών γονοτύπων του πολυμορφισμού στη θέση -29 του γονιδίου FSHR στους δύο υπο μελέτη πληθυσμούς: μάρτυρες και γυναίκες IVF/ICSI

Γονότυπος	Μάρτυρες n (%)	Περιστατικά n (%)	Odds Ratio-95% CI ¹	p- value ²
GG	47 (51.6)	72 (51.4)	0.991 [0.585 - 1.681]	0.974
GA	40 (44.0)	60 (42.9)	0.956 [0.562 - 1.628]	0.869
AA	4 (4.4)	8 (5.7)	1.318 [0.385 - 4.511]	0.659
Σύνολο	91	140		

Αλληλίο	Συχνότητα (%)			
G	134 (73.6)	204 (72.9)	0.962 [0.631 - 1.466]	0.855
A	48 (26.4)	76 (27.1)	1.040 [0.682 - 1.586]	

¹CI: Διάστημα εμπιστοσύνης

²Fisher exact test

Συνεπώς, ο έλεγχος της κατανομής των γονοτύπων και των αλληλίων για τους πολυμορφισμούς του FSHR γονιδίου δεν παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στις γυναίκες με υπογονιμότητα.

7.2 Κλινικά και άλλα χαρακτηριστικά των γυναικών υπό μελέτη σε σχέση με τους γονότυπους του πολυμορφισμού Ser680Asn και του πολυμορφισμού στη θέση -29 του FSHR γονιδίου

Ο υπό μελέτη πληθυσμός κατηγοριοποιήθηκε σε 3 ομάδες ανάλογα με τον γονότυπο: ομόζυγες για το wild type, ετερόζυγες και ομόζυγες για τον πολυμορφισμό. Και στις 3 ομάδες εξετάστηκαν τα κλινικά (ηλικία, διάρκεια υπογονιμότητας, αριθμός IVF προσπαθειών) και βιοχημικά χαρακτηριστικά (FSH, LH, AMH), οι παράμετροι ωοθηκικής διέγερσης (δόση FSH, E2 την ημέρα χορήγησης hCG, ημέρες πρόκλησης, αριθμός ωοθυλακίων, ποσοστό ωρίμανσης, αριθμός ωαρίων κ.α) καθώς και η έκβαση της ωοθηκικής διέγερσης, και πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτών.

Η εξέταση των γονοτύπων (Πίνακας 12) των γυναικών με υπογονιμότητα για τον πολυμορφισμό Ser680Asn ανέδειξε χαμηλότερα επίπεδα LH στις γυναίκες με τον πολυμορφισμό είτε σε ετεροζυγωτία (GA) είτε σε ομοζυγωτία (AA) σε σύγκριση με τις γυναίκες που φέρουν τα wild type αλληλίο (5.13 ± 2.36 έναντι 6.45 ± 3.00, p=0.007). Επιπρόσθετα, σε ό,τι αφορά στις παραμέτρους ωοθηκικής διέγερσης φάνηκε ότι στις γυναίκες που έφεραν έστω και ένα αλληλόμορφο του Asn πολυμορφισμού (GA ή AA) παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένο πάχος στο ενδομήτριο τους σε σύγκριση με αυτές που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό (GG) (9.92 ± 2.28 έναντι 8.82 ± 2.26, p=0.043)(Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Κλινικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών και παράμετροι που αφορούν στην έκβαση της ωοθηκικής διέγερσης και των κηύσεων ανάλογα με τον γονότυπο του πολυμορφισμού Ser680Asn του γονιδίου FSHR.

Γονότυποι	GG N=40	GA N=70	AA N=31	p- value ²
N=101				
Κλινικά Χαρακτηριστικά				
Ηλικία (έτη)	35.88 ± 4.82	36.01 ± 5.44	35.61 ± 4.84	0.937
		35.89 ± 5.24		0.987
Διάρκεια Υπογονιμότητας	4.90 ± 3.19	5.10 ± 3.55	4.47 ± 3.08	0.688
		4.91 ± 3.41		0.986
Αριθμός IVF προσπαθειών	1.60 ± 0.90	1.86 ± 1.31	1.71 ± 1.32	0.552
		1.81 ± 1.31		0.35
Βιοχημικό προφίλ				
FSH (mIU/L)	8.04 ± 2.19	7.63 ± 3.19	7.82 ± 3.53	0.795
		7.69 ± 3.28		0.538
LH (mIU/L)	6.45 ± 3.00	5.36 ± 2.43	4.57 ± 2.14	0.010
		5.13 ± 2.36		0.007
AMH (pg/l)	7.82 ± 7.21	12.41 ± 10.99	8.99 ± 8.10	0.168
		11.32 ± 10.20		0.143
Παράμετροι Ωοθηκικής διέγερσης				
Ολική δόση FSH (IU)	2868 ± 943	3018 ± 1093	2765 ± 1122	0.507
		2940 ± 1103		0.716
Οιστραδιόλη (Ημέρα hCG, pg/ml)	1912 ± 912	2032 ± 1228	1897 ± 952	0.790
		1991 ± 1149		0.697
Ημέρες πρόκλησης	9.93 ± 1.23	9.96 ± 1.62	10.67 ± 1.63	0.074
		10.17 ± 1.65		0.396
Αριθμός Ωοθυλακίων	6.75 ± 3.32	6.57 ± 2.84	6.16 ± 2.89	0.705
		6.45 ± 2.85		0.586
Αριθμός συμπλέγματος ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC)	6.13 ± 3.04	5.96 ± 2.86	5.58 ± 2.90	0.731
		5.84 ± 2.86		0.603
COC ποιότητα	4.50 ± 2.38	4.29 ± 2.40	4.10 ± 2.17	0.769
		4.23 ± 2.32		0.534
% ποσοστό ωρίμανσης	0.76 ± 0.18	0.72 ± 0.16	0.76 ± 0.16	0.393
		0.74 ± 0.16		0.464
Αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων	4.50 ± 2.29	4.35 ± 2.30	3.94 ± 1.93	0.552
		4.22 ± 2.19		0.501
% ποσοστό γονιμότητας	0.76 ± 0.16	0.73 ± 0.15	0.73 ± 0.21	0.668
		0.73 ± 0.17		0.368
Πάχος ενδομητρίου (mm)	8.82 ± 2.26	10.17 ± 2.45	9.45 ± 1.90	0.065
		9.92 ± 2.28		0.043

Οι τιμές αφορούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση
²p values από ANOVA

Όσον αφορά στον πολυμορφισμό στην θέση -29, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τη σύγκριση των κλινικών και ενδοκρινολογικών παραμέτρων στις γυναίκες με υπογονιμότητα (Πίνακας 13). Ωστόσο, οι γυναίκες που ήταν ομόζυγες για τον πολυμορφισμό (AA) παρουσίαζαν μεγαλύτερο αριθμό συμπλέγματος ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC), δηλαδή ληφθέντων ωαρίων (8.63 ± 2.00 έναντι 6.13 ± 3.04 και 5.95 ± 2.72, p=0.034) όπως και- καλύτερη ποιότητα COC (5.75 ± 2.75 έναντι 4.56 ± 2.51 και 3.82 ± 2.00,

p=0.038) -σε σύγκριση με αυτές που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό (GG) ή έφεραν ένα αλλήλιο παρουσιάζοντας ετεροζυγωτία (GA), αντίστοιχα.

Πίνακας 13: Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών και παράμετροι που αφορούν στην έκβαση της ωθηκικής διέγερσης και των κήσεων ανάλογα με το γονότυπο του πολυμορφισμού -29 του γονιδίου FSHR.

Γονότυποι	GG N=72	GA N=60 N=140	AA N=8	p- value ²
Κλινικά Χαρακτηριστικά				
Ηλικία (έτη)	35.49 ± 4.73	36.40 ± 5.56 36.25 ± 5.50	35.13 ± 5.25	0.547 0.379
Διάρκεια Υπογονιμότητας	5.11 ± 3.56	4.65 ± 2.94 4.73 ± 3.11	5.38 ± 4.31	0.680 0.507
Αριθμός IVF προσπαθειών	1.81 ± 1.19	1.58 ± 0.96 1.71 ± 1.24	2.63 ± 2.39	0.064 0.628
Βιοχημικό προφίλ				
FSH (mIU/L)	7.70 ± 2.91	7.97 ± 3.28 7.87 ± 3.15	7.11 ± 1.98	0.337 0.747
LH (mIU/L)	5.52 ± 2.57	5.56 ± 2.78 5.47 ± 2.72	4.84 ± 2.24	0.763 0.904
AMH (pg/l)	9.92 ± 9.95	10.11 ± 8.03 10.87 ± 9.02	16.23 ± 14.72	0.449 0.667
Παράμετροι Ωθηκικής διέγερσης				
Ολική δόση FSH (IU)	2997 ± 1132	2849 ± 979 2842 ± 982	2788 ± 1070	0.682 0.388
Οιστραδιόλη (Ημέρα hCG, pg/ml)	1984 ± 1036	1878 ± 1144 1920 ± 1117	2229 ± 890	0.647 0.724
Ημέρες πρόκλησης	10.13 ± 1.53	10.02 ± 1.62 10.04 ± 1.55	10.25 ± 0.89	0.881 0.759
Αριθμός Ωοθυλακίων	6.785 ± 3.18	6.57 ± 2.84 6.45 ± 2.85	6.16 ± 2.89	0.705 0.586
Αριθμός συμπλέγματος ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC)	6.13 ± 3.04	5.95 ± 2.72 6.26 ± 2.77	8.63 ± 2.00	0.034 0.312
COC ποιότητα	4.56 ± 2.51	3.82 ± 2.00 4.04 ± 2.14	5.75 ± 2.55	0.038 0.197
% ποσοστό ωρίμανσης	0.75 ± 0.17	0.74 ± 0.16 0.73 ± 0.16	0.71 ± 0.16	0.731 0.475
Αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων	4.49 ± 2.33	3.92 ± 2.05 4.10 ± 2.10	5.50 ± 2.00	0.099 0.313
% ποσοστό γονιμότητας	0.75 ± 0.15	0.73 ± 0.20 0.73 ± 0.19	0.71 ± 0.11	0.795 0.618
Πάχος ενδομητρίου (mm)	9.72 ± 2.44	9.47 ± 1.94 9.58 ± 2.16	10.40 ± 3.65	0.675 0.776

Οι τιμές αφορούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση
² p values από ANOVA

Η ανάλυση κατανομής των παραμέτρων έκβασης της ωθηκικής διέγερσης και των κήσεων σε σχέση με την κατανομή των τριών γονοτύπων του πολυμορφισμού Ser680Asn (Πίνακας 14) έδειξε μειωμένα ποσοστά παρουσίας ενδομητρίου ποιότητας I στις γυναίκες που έφεραν τον πολυμορφισμό είτε σε ετεροζυγωτία (GA, 18.6% έναντι GG, 50.0 %, p=0.051)

είτε σε ομοζυγωτία (AA, 22.7% έναντι GG, 50.0 %, $p=0.051$) με τη στατιστική σημαντικότητα να αυξάνεται όταν η σύγκριση αφορά στο σύνολο των γυναικών που φέρουν έστω και ένα αλληλίο του πολυμορφισμού (GA ή AA, 20% έναντι GG, 50%, $p=0.016$). Συγκεκριμένα, στον πληθυσμό υπό μελέτη το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών (73.8%) που φέρουν τον πολυμορφισμό παρουσιάζουν ποιότητα ενδομητρίου τύπου II με τις άλλες παραμέτρους όπως λόγοι υπογονιμότητας και ποσοστά κυήσεων να μην παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές

Πίνακας 14: Ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζευγαριών που ακολούθησαν IVF, και έκβαση της IVF:κατανομή βάσει γονοτύπου Ser680Asn του γονιδίου FSHR.

	GG N (%)	GA N (%)	AA N (%)	p- value ²
Λόγοι IVF				
Σαλπινγγικός	16 (40.0)	33 (47.1) 48 (47.5)	15 (48.4)	0.975 * 0.873 **
Ανδρικός	21 (52.5)	32 (45.7) 45 (44.6)	13 (41.9)	
Μικτός	1 (2.5)	2 (2.9) 3 (3.0)	1 (3.2)	
Άλλο	2 (5.0)	3 (4.3) 5 (5.0)	2 (6.5)	
Ποιότητα Ενδομητρίου				
I	13 (50.0)	8 (18.6) 13 (20.0)	5 (22.7)	0.051* 0.016**
II	12 (46.2)	33 (76.7) 48 (73.8)	15 (68.2)	
III	1 (3.8)	2 (4.7) 4 (6.2)	2 (9.1)	
Εγκυμοσύνη				
Όχι	30 (75.0)	60 (87.0) 83 (83.0)	23 (74.2)	0.170 * 0.343 **
Ναι	10 (25.0)	9 (13.0) 17 (17.0)	8 (25.8)	

Οι τιμές αφορούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση

² p values από Fishers exact test

* p value σύγκριση AA vs Aa vs aa, ** p value σύγκριση AA vs Aa/aa

Σε ότι αφορά στην ανάλυση κατανομής των γονοτύπων που προκύπτουν για τον πολυμορφισμό στη θέση -29 σε σχέση με τις παραμέτρους έκβασης της ωθηκικής διέγερσης και τις κήσεις (**Πίνακας 15**), αυτή δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των γυναικών που έφεραν τον πολυμορφισμό σε σύγκριση με αυτές που είχαν wild type γονότυπο.

Πίνακας 15: Ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζευγαριών που ακολούθησαν IVF και έκβαση της IVF : κατανομή βάσει γονοτύπου στη θέση -29 του γονιδίου FSHR.

	GG N (%)	GA N (%)	AA N (%)	p- value ²
Λόγοι IVF				
Σαλπγγικός	28 (38.9)	32 (53.3)	3 (37.5)	0.614 *
		35 (51.5)		0.347 **
Ανδρικός	36 (50.0)	25 (41.7)	5 (62.5)	
		30 (44.1)		
Μικτός	3 (4.2)	1 (1.7)	0 (0.0)	
		1 (1.5)		
Άλλο	5 (6.9)	2 (3.3)	0 (0.0)	
		2 (2.9)		
Ποιότητα Ενδομητρίου				
I	13 (28.3)	11 (28.2)	1 (20.0)	1.000*
		12 (27.3)		1.000**
II	30 (65.2)	26 (66.7)	4 (80.0)	
		30 (68.2)		
III	3 (6.5)	2 (5.1)	0 (0.0)	
		2 (4.5)		
Εγκυμοσύνη				
Όχι	55 (76.4)	50 (84.7)	7 (87.5)	0.525 *
		57 (85.1)		0.207 **
Ναι	17 (23.6)	9 (15.3)	1 (12.5)	
		10 (14.9)		

Οι τιμές αφορούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση

² p values από Fishers exact test

* p value σύγκριση BB vs Bb vs bb ** p value σύγκριση BB vs Bb/bb

Σε ότι αφορά στην ανάλυση κατανομής των γονοτύπων που προκύπτουν για τους δύο πολυμορφισμούς σε σχέση με τα ποσοστά των κήσεων, αυτή δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ των γυναικών που έφεραν τον πολυμορφισμό (σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) σε σύγκριση με αυτές που είχαν wild type γονότυπο.

7.3 Κλινικά και άλλα χαρακτηριστικά των γυναικών υπό μελέτη αναφορικά με τους συνδυασμούς των γονοτύπων του πολυμορφισμού Ser680Asn και του πολυμορφισμού στη θέση -29 του γονιδίου FSHR.

Μελετήθηκε η κατανομή των 141 γυναικών της μελέτης ανάλογα με τον συνδυασμένο γονότυπο των μελετώμενων πολυμορφισμών γονιδίου FSHR. Από το συνδυασμό των δύο γονιδιακών τόπων, προκύπτουν εννέα διαφορετικοί συνδυασμοί γονοτύπων.

Στη συνέχεια, για λόγους ευκολότερης αναπαράστασης αλλά και ομαλότερης κατανομής του πληθυσμού, οι γυναίκες ομαδοποιήθηκαν με βάση τον αριθμό των ππολυμορφικών αλληλίων που φέρουν, οπότε και προέκυψαν οι εξής πέντε συνδυασμοί: **1) κανένα πολυμορφικό αλληλίο** ή ομοζυγωτία για wild type ($GG^{680}GG^{-29}$), **2) ένα πολυμορφικό αλληλίο** ή ετεροζυγωτία για ένα αλληλίο ($GG^{680}GA^{-29}$ ή $GA^{680}GG^{-29}$), **3) δύο πολυμορφικά αλληλία** = δυο υπολειπόμενα αλληλία είτε σε ετεροζυγωτία ($GA^{680}GA^{-29}$) είτε σε ομοζυγωτία ($AA^{680}GG^{-29}$ ή $GG^{680}AA^{-29}$), **4) τρία υπολειπόμενα αλληλία** = είτε σε ετεροζυγωτία είτε σε ομοζυγωτία για τον κάθε πολυμορφισμό ($GA^{680}AA^{-29}$ ή $AA^{680}GA^{-29}$), **5) ομοζυγωτία πολυμορφισμών** ($AA^{680}AA^{-29}$).

Τέλος, διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: **1) κανένα έως ένα αλληλίο** για τους πολυμορφισμούς και **2) τουλάχιστον δυο αλληλία** για τους πολυμορφισμούς (**Πίνακας 16 & 17**).

Πίνακας 16: Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών και παράμετροι που αφορούν την έκβαση της ωθητικής διέγερσης και των κυήσεων σε σχέση με το συνδυασμό των δύο γονιδιακών τύπων Ser680Asn και -29 του γονιδίου FSHR

Γονότυποι	GG ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹	GG ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹ ή GA ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹	GA ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹ ή AA ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹ ή GG ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹	GA ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹ ή AA ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹	AA ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹	p-value ²
	N=25	N=48	N=44	N=21	N=2	
	0-1 N=73			2-4 N=67		
Κλινικά Χαρακτηριστικά						
Ηλικία (έτη)	35.40 ± 4.76	35.92 ± 4.86	36.34 ± 5.65	35.00 ± 5.30	38.50 ± 0.71	0.778
Διάρκεια Υπογονιμότητας	5.12 ± 3.22	5.50 ± 3.88	3.98 ± 2.38	5.15 ± 3.47	7.50 ± 6.36	0.098
Αριθμός IVF προσπαθειών	1.76 ± 1.05	1.83 ± 1.24	1.59 ± 1.08	1.52 ± 0.814	6.00 ± 1.41	0.604
Βιοχημικό προφίλ						
FSH (mIU/L)	7.81 ± 1.88	7.88 ± 3.22	7.57 ± 3.20	8.23 ± 3.41	5.03 ± 0.75	0.745
LH (mIU/L)	5.97 ± 2.52	5.98 ± 3.13	5.13 ± 2.15	4.80 ± 2.15	2.62 ± 0.68	0.023
AMH (pg/l)	7.71 ± 7.26	11.33 ± 11.04	10.24 ± 8.36	11.87 ± 11.29	12.00 ± 0	0.688
Παράμετροι Ωθητικής διέγερσης						
Ολική δόση FSH (IU)	2892 ± 1031	3116 ± 1070	2755 ± 1046	2860 ± 1148	2900 ± 636	0.171
Οιστραδιόλη (Ημέρα hCG, pg/ml)	1881 ± 969	2011 ± 1091	1964 ± 1151	1845 ± 1034	2275 ± 1449	0.872
Ημέρες πρόκλησης	10.08 ± 1.07	9.81 ± 1.62	10.20 ± 1.68	10.45 ± 1.54	10.50 ± 0.70	0.142
Αριθμός Ωοθυλακίων	7.04 ± 3.69	6.40 ± 2.85	6.50 ± 2.74	6.14 ± 3.05	8.00 ± 2.83	0.718
Αριθμός συμπλέγματος ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC)	6.36 ± 3.41	5.85 ± 2.71	5.89 ± 2.88	5.52 ± 2.99	7.00 ± 2.83	0.655
COC ποιότητα	4.88 ± 2.66	4.15 ± 2.39	4.20 ± 1.96	4.10 ± 2.55	5.50 ± 3.53	0.636
% ποσοστό ωρίμανσης	0.79 ± 0.17	0.71 ± 0.17	0.74 ± 0.14	0.75 ± 0.17	0.74 ± 0.20	0.809
Αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων	4.60 ± 2.45	4.29 ± 2.29	4.37 ± 2.15	3.76 ± 1.97	5.00 ± 2.82	0.636
% ποσοστό γονιμότητας	0.74 ± 0.14	0.75 ± 0.18	0.75 ± 0.15	0.69 ± 0.22	0.69 ± 0.13	0.562
Πάχος ενδομητρίου (mm)	8.34 ± 1.90	10.25 ± 2.46	9.97 ± 2.26	9.54 ± 2.06	8.00 ± 1.41	0.696

Οι τιμές αφορούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση
²p value από ANOVA

Η ανάλυση έδειξε ότι οι πιο συχνοί συνδυασμοί γονότυπων στον υπό μελέτη πληθυσμό είναι γυναίκες που φέρουν μόνο ένα πολυμορφικό αλληλίο (GA⁶⁸⁰GG⁻²⁹ ή GG⁶⁸⁰GA⁻²⁹, 34.3%) και γυναίκες που φέρουν δυο πολυμορφικά αλληλία (GA⁶⁸⁰GA⁻²⁹ ή AA⁶⁸⁰GG⁻²⁹ ή GG⁶⁸⁰AA⁻²⁹, 31.4%). Μόνο 2/141 γυναίκες είναι σε ομοζυγωτία και για τους δύο πολυμορφισμούς (AA⁶⁸⁰AA⁻²⁹, 1.4%).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 17, ο συνδυασμός των γονοτύπων των πολυμορφισμών σε σχέση με τα κλινικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών με υπογονιμότητα έδειξε μία στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της LH μεταξύ των δύο κατηγοριών που αφορούν τις γυναίκες με δύο και παραπάνω αλληλία για τους δύο πολυμορφισμούς σε σχέση με αυτές που δεν φέρουν κανένα ή έστω ένα (4.96 ± 2.15 έναντι 5.98 ± 2.92 , $p=0.023$). Όσον αφορά στις παραμέτρους ωθητικής διέγερσης, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Επιπλέον, από τη μελέτη των συνδυασμών αναφορικά με τις παραμέτρους υπογονιμότητας και των αποτελεσμάτων θεραπείας δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζευγαριών που ακολούθησαν IVF και έκβαση της IVF: κατανομή βάσει γονοτύπου Ser680Asn και -29 του γονιδίου FSHR.

	GG ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹ N=25	GG ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹ ή GA ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹ N=48	GA ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹ ή AA ⁶⁸⁰ GG ⁻²⁹ ή GG ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹ N=44	GA ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹ ή AA ⁶⁸⁰ GA ⁻²⁹ N=21	AA ⁶⁸⁰ AA ⁻²⁹ N=2	p- value ²
	0-1		2-4			
Λόγοι IVF						
Σαλπινγγικός	7 (11.1)	26 (41.3)	17 (27.0)	12 (19.0)	1 (1.6)	0.971 *
	33 (52.4)		30 (47.0)			
Ανδρικός	15 (22.7)	20 (30.3)	21 (31.8)	9 (13.6)	1 (1.5)	0.971 *
	35 (53.0)		31 (47.6)			
Μικτός	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.971 *
	2 (50.0)		2 (50.0)			
Άλλο	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.971 *
	3 (42.8)		4 (57.2)			
Ποιότητα Ενδομητρίου						
I	9 (36.0)	5 (20.0)	8 (32.0)	3 (12.0)	0 (0.0)	0.768*
	14 (56.0)		11 (44.0)			
II	7 (11.7)	22 (36.7)	20 (33.3)	9 (15.0)	2 (3.3)	0.768*
	29 (48.3)		31 (51.7)			
III	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0.768*
	2 (40.0)		3 (60.0)			
Εγκυμοσύνη						
Όχι	17 (15.2)	41 (36.6)	35 (31.3)	18 (16.1)	1 (0.90)	0.825 *
	58 (51.8)		54 (48.2)			
Ναι	8 (29.6)	7 (25.9)	8 (29.6)	3 (11.1)	1 (3.7)	0.825 *
	15 (55.5)		12 (44.5)			

Οι τιμές αφορούν N (%)

* p values από Fishers exact test σύγκριση 0-1 έναντι 2-4

7.4 Ανάλυση υποομάδας πτωχών απαντητριών

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι γυναίκες που παρουσίασαν πτωχή απάντηση στη θεραπεία. Ως **πτωχές απαντήτριες** ορίστηκαν οι γυναίκες με τα εξής χαρακτηριστικά, βάσει κριτηρίων Bologna (A.P. Ferraretti et al. 2011): ηλικία ≥ 40 ετών και αριθμός προσπαθειών ≥ 2 ή ηλικία <40 ετών και αριθμός προσπαθειών ≥ 3 . Ακολούθησε ανάλυση και σύγκριση των γυναικών που παρουσίασαν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία (ηλικία ≥ 40 ετών και προσπάθειες <2 ή ηλικία <40 ετών και προσπάθειες ≤ 2 , **καλές απαντήτριες**) σε σχέση με γυναίκες που παρουσίασαν μειωμένη ανταπόκριση και εξετάστηκε η κατανομή των πολυμορφισμών μεμονωμένα ή σε συνδυασμό.

Η ομάδα των πτωχών απαντητριών αποτελούνταν από 30 γυναίκες, ενώ η ομάδα των καλών απαντητριών από 110 γυναίκες (απόλυτος αριθμός). Οι δύο ομάδες δεν βρέθηκε να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ότι αφορά στην κατανομή των πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των γυναικών που έφεραν των πολυμορφισμό Ser680Asn σε ετεροζυγωτία ήταν το μεγαλύτερο και για τις πτωχές (60%) αλλά και για τις καλές απαντήτριες (46.8%). Από την άλλη πλευρά ο αριθμός των γυναικών που έφεραν τον πολυμορφισμό στη θέση -29 ήταν σχεδόν ίδιος και στις πτωχές (43.3%) και στις καλές απαντήτριες (50.0%). Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός των πολυμορφισμών έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των πτωχών απαντητριών έφερε ένα μόνο αλληλίο των πολυμορφισμών ($GA^{680}GG^{-29}$ ή $GG^{680}GA^{-29}$, 43.3%), ενώ οι καλές απαντήτριες παρουσίαζαν παρόμοια κατανομή μεταξύ των συνδυασμών με ένα αλληλίο ($GA^{680}GG^{-29}$ ή $GG^{680}GA^{-29}$, 31.8 %) και δύο αλληλία ($GA^{680}GA^{-29}$ ή $AA^{680}GG^{-29}$ ή $GG^{680}AA^{-29}$, 33.6 %). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι καμία γυναίκα με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία δεν έφερε τον συνδυασμό ομοζυγωτίας για τους πολυμορφισμούς ($AA^{680}AA^{-29}$).

8 Συζήτηση

Η υπογονιμότητα αποτελεί μία μάστιγα των ζευγαριών του σύγχρονου δυτικού κόσμου, με το 15% των ζευγαριών αυτών να μην παρουσιάζουν καμία παθολογία του αναπαραγωγικού συστήματος. (World Health Organization 2000). Τα αίτια που προκαλούν υπογονιμότητα είναι άλλοτε βιολογικά και άλλοτε κοινωνικά. Τα ποσοστά υπογονιμότητας αναμένεται να αυξηθούν τα επόμενα χρόνια λόγω της συνεχούς παράτασης τεκνοποίησης, ενώ παράλληλα υπάρχει αυξημένη προσβασιμότητα σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στις ανεπτυγμένες χώρες.

Ο ρόλος των γενετικών ιδιομορφιών, όπως οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί σε γυναίκες που εμφανίζουν υπογονιμότητα και εντάσσονται σε προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης, αποτελεί στόχο πολλών μελετών και μέχρι σήμερα δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Εξέχουσας σημασίας είναι ο ρόλος της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και του υποδοχέα της FSHR, τόσο στην ενδοκρινή ρύθμιση των γυναικών όσο και στη ρύθμιση της γαμετογένεσης στους άντρες, συμβάλλοντας ενεργά στην ωοθυλακική ωρίμανση (Casper 2015) και στην παραγωγή των οιστρογόνων (Nordhoff et al. 2011). Το γονίδιο του FSHR που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2, αποτελείται από 10 εξώνια και σε αυτά όπως και σε άλλες περιοχές έχουν αναγνωριστεί μονό-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που φαίνεται να συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης και επηρεάζουν παραμέτρους της γονιμότητας τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες.

Επειδή η ενδοκρινής ρύθμιση δημιουργίας και ωρίμανσης ικανών ωαρίων και συνεπώς η γυναικεία γονιμότητα είναι εξαρτώμενη της FSH, στην παρούσα μελέτη επιδιώχθηκε να διευκρινιστούν ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό οι επιπτώσεις δύο σημαντικών πολυμορφισμών του FSHR σε κλινικά χαρακτηριστικά και παραμέτρους που καθορίζουν την υποβοηθούμενη γονιμοποίηση και το αποτέλεσμα της. Διερευνήθηκαν 141 γυναίκες και αναλύθηκαν οι γονότυποι που προκύπτουν ξεχωριστά (τρεις ανά πολυμορφισμό) και σε συνδυασμό (εννέα συνολικά) των πολυμορφισμών Ser680Asn (rs6166) και -29 (rs1394205) του γονιδίου FSHR.

Η κατανομή των συχνοτήτων του κάθε πολυμορφισμού στον πληθυσμό γυναικών υπό εξωσωματική γονιμοποίηση δεν διέφερε σημαντικά όταν συγκρίθηκε με αντίστοιχο πληθυσμό 94 μαρτύρων. Ας σημειωθεί πως στην ομάδα IVF τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στον ετερόζυγο γονότυπο για τον πολυμορφισμό Ser680Asn (GA/SerAsn στο 49.6%, Πίνακας 10) και στον ομόζυγο (wild type) για τον πολυμορφισμό στη θέση -29 (GG στο 51.4%, Πίνακας 11) του FSHR γονιδίου.

Ένας αριθμός προηγούμενων μελετών φαίνεται να επιβεβαιώνει το εύρημα της παρούσας μελέτης για τον ελληνικό πληθυσμό, ότι ο συχνότερος γονότυπος για τον πολυμορφισμό rs6166 του FSHR γονιδίου είναι ο ετερόζυγος SerAsn, με ποσοστά που κυμαίνονται από το 42% για άτομα που μελετήθηκαν στη Δανία μέχρι και 55% για πληθυσμό που συλλέχθηκε στο Μάλμε της Σουηδίας. Ο αμέσως επόμενος γονότυπος σε συχνότητα είναι ο ομόζυγος γονότυπος AsnAsn και βρίσκεται σε χαμηλές ως μέτριες συχνότητες (28%-40.5%), χωρίς όμως να αναφέρονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συχνοτήτων (Borgbo et al. 2015; Huang et al. 2015; Lindgren et al. 2016; Loutradis et al. 2012; Perez Mayorga et al. 2000). Ωστόσο, άλλες μελέτες που αφορούσαν ισπανικό αλλά και παλαιότερη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό έδειξαν ότι συχνότερος γονότυπος είναι ο ομόζυγος για το wild type αλλήλιο, ο SerSer, με συχνότητες της τάξεως του 43% με 45.5% και μετά ακολουθεί ο ετερόζυγος γονότυπος SerAsn (22.7-37%) (Lledo et al. 2016; Loutradis et al. 2006). Άλλωστε, είναι γνωστή η

διαφορετική κατανομή γονοτύπων ανά εθνότητα. Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση από τη Simoni και Casarini το 2014 (Simoni and Casarini 2014) φαίνεται να προτείνεται ότι το αρχέγονο αλληλίο είναι το αλληλίο A (νουκλεοτίδιο Asn) το οποίο ακόμα και σήμερα φαίνεται να επικρατεί στην πλειονότητα των πληθυσμών που έχει μελετηθεί συμπεριλαμβανομένων των Ευρωπαίων, ενώ το αλληλίο G (νουκλεοτίδιο Ser) είναι αυτό που πρόσφατα εμφανίστηκε ως πολυμορφισμός και βρίσκεται εμπλουτισμένο σε πληθυσμούς της Ευρώπης σε αντίθεση με πληθυσμούς της Άπω Ανατολής και της Νοτίου Αμερικής. Όλα τα παραπάνω συνεπώς οδηγούν στο συμπέρασμα ότι σχετικά με τον πολυμορφισμό στη θέση 680 του FSHR γονιδίου η αλλαγή ακόμα και για τον ελληνικό πληθυσμό αφορά στην αντικατάσταση της ασπαραγίνης (Asn) με σερίνη (Ser) και η εισαγωγή της νέας θέσης φωσφορυλίωσης στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα πιθανόν να εξυπηρετεί κάποιο σημαντικό σκοπό στην μετατόπιση ή και ανακύκλωση του υποδοχέα ενδοκυττάρια.

Η ανάλυση του πολυμορφισμού στη θέση -29 του FSHR γονιδίου που έχει συνδεθεί με αλλαγές στην έκφραση του υποδοχέα λόγω αλλαγών στη θέση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Nakayama et al. 2006; Wunsch et al. 2005), δεν έδειξε υψηλότερη συχνότητα στον υπό μελέτη πληθυσμό γυναικών υποβοηθούμενης γονιμοποίησης σε σύγκριση με τον πληθυσμό των μαρτύρων. Και στους δύο πληθυσμούς τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν για τον wild type γονότυπο GG (51.4% και 51.6%, αντίστοιχα, Πίνακας 11).

Μελέτες που διερεύνησαν τον πολυμορφισμό του υποκινητή στη θέση -29 φαίνεται να επιβεβαιώνουν εθνικές διαφορές στην παρουσία των γονοτύπων, καθώς και την άποψη ότι το αρχέγονο αλληλίο είναι το αλληλίο G το οποίο εκφράζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες στους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ δείχνει να μειώνεται και να αντικαθιστάται από το A αλληλίο σε πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας και κάποιες φορές της Νότιας Ασίας (Simoni and Casarini 2014). Σε συμφωνία λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για τον ελληνικό πληθυσμό, προηγούμενες έρευνες σε άλλων εθνοτήτων πληθυσμούς δείχνουν ότι ο συχνότερος γονότυπος είναι ο ομόζυγος GG, ο οποίος εκφράζεται σε ποσοστά που πλησιάζουν ή και ξεπερνούν το 50% του πληθυσμού (49.9%-55.4%), ενώ σε επίσης αρκετά υψηλά ποσοστά φαίνεται να ακολουθεί και ο ετερόζυγος γονότυπος GA (Desai et al. 2011; Tohlob et al. 2016; Wunsch et al. 2005). Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά αυτόν τον πολυμορφισμό σε ελληνικό έδαφος, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε γυναίκες που εντάσσονται σε πρόγραμμα IVF/ICSI.

Όσον αφορά στα κλινικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού γυναικών που ακολούθησαν πρόγραμμα εξωσωματικής, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς την ηλικία, τη διάρκεια υπογονιμότητας και τον αριθμό των εξωσωματικών δοκιμασιών για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς. Πολλές έρευνες έχουν τονίσει τον δυσμενή ρόλο της μεγάλης ηλικίας σε πρωτόκολλα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, με τις γυναίκες >40 ετών να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε κλινικά χαρακτηριστικά όπως και σε παραμέτρους που επηρεάζουν την επιτυχή έκβαση του πρωτοκόλλου. Ωστόσο οι γυναίκες της παρούσας μελέτης ήταν στην πλειονότητα τους <40 ετών (77.3%), επομένως «αμβλύνεται» η επίδραση του παράγοντα ηλικία. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν πως ο παράγων ηλικία ευθύνεται κατά περίπτωση για την έλλειψη διαφορών σε κάποιες παραμέτρους (Lledo et al. 2013).

Ωστόσο, τα καινούργια δεδομένα της παρούσας μελέτης αφορούν σε άτομα φορείς του αλληλίου A για τον πολυμορφισμό Ser680Asn με γονότυπους GA (SerAsn) και AA (AsnAsn), τα οποία παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα LH (5.13 ± 2.36 και 4.57 ± 2.14 mIU/L, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις γυναίκες που έφεραν τον γονότυπο GG (SerSer) (6.45 ± 3.00 mIU/L, $p=0.010$) (βλέπε Πίνακα 12), σημαντικότητα που αυξήθηκε ακόμα περισσότερο ($p=0.007$) όταν η σύγκριση έγινε μεταξύ των ατόμων με ένα τουλάχιστον αλληλίο A και αυτών με ομόζυγο γονότυπο GG. Επιπροσθέτως, οι γονότυποι GA (SerAsn) και AA (AsnAsn) σε συνδυασμό είχαν μεγαλύτερο πάχος ενδομητρίου σε σχέση με τα άτομα με γονότυπο GG (SerSer) (9.92 ± 2.28 έναντι 8.82 ± 2.26 mm, $p=0.043$), με τα άτομα με ετερόζυγο γονότυπο (GA/SerAsn) να τείνουν ($p=0.065$) να παρουσιάσουν το υψηλότερο πάχος ενδομητρίου (10.17 ± 2.45). Τάση προς στατιστική σημαντικότητα φαίνεται να έχει η αύξηση στις ημέρες πρόκλησης που παρατηρήθηκε στις γυναίκες με τον γονότυπο AA (AsnAsn) με μέσο όρο τις 10.67 ± 1.63 συγκριτικά με τους άλλους γονότυπους που είχαν μέσο όρο 9.94 ± 1.42 ($p=0.074$). Επιπλέον αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών με ποιότητα ενδομητρίου II έφεραν τον ετερόζυγο γονότυπο SerAsn (76.7%, $p=0.051$) και τα ποσοστά παρέμεναν αυξημένα και στατιστικά σημαντικά όταν συμπεριελάμβαναν και τους δύο γονότυπους με το Asn [73.8%, τον ετερόζυγο (SerAsn) και τον ομόζυγο (AsnAsn), $p=0.016$] όταν συγκρίθηκαν με τους ομοζυγώτες που έφεραν γονότυπο GG (SerSer) οι οποίοι παρουσίαζαν το υψηλότερο ποσοστό για την ποιότητα ενδομητρίου I (50%), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 14. Τα παραπάνω δεδομένα πιθανόν να συσχετίζουν την παρουσία της σερίνης (Ser) σε ομοζυγωτία με αυξημένα επίπεδα LH όπως αυτά εκτιμήθηκαν την 3^η ημέρα του κύκλου της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης και μειωμένο πάχος ενδομητρίου, με την ποιότητα αυτού όμως να βρίσκεται στην πλειονότητα του πληθυσμού στο επίπεδο I.

Συχνά στη βιβλιογραφία έχει συσχετιστεί η παρουσία του Ser νουκλεοτιδίου στη θέση 680 του FSHR με φαινοτύπους (κλινικούς και βιοχημικούς) που συμβάλλουν αρνητικά στην αποτελεσματικότητα και στην επιτυχία προγραμμάτων υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, όμως τα αποτελέσματα των μελετών αυτών πολλές φορές αντικρούονται από έρευνες που υποστηρίζουν ότι το Asn νουκλεοτιδίο συσχετίζεται με αρνητικές για την έκβαση της γονιμοποίησης παραμέτρους. Αναλυτικότερα, η παρουσία του γονότυπου SerSer φαίνεται σχετίζεται με την πτωχή απάντηση των ωοθηκών όπως αυτή εκφράζεται από αυξημένα βασικά επίπεδα της FSH στον ορό, χαμηλή παραγωγή οιστραδιόλης σε διέγερση με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και μεγαλύτερες δόσεις FSH για την διέγερση των ωοθηκών (Behre et al. 2005; de Castro et al. 2004; Greb et al. 2005; Perez Mayorga et al. 2000; Sudo et al. 2002), ενώ αυξημένα μπορεί να είναι τα ποσοστά πτωχής απάντησης στην υποβοηθούμενη γονιμοποίηση (de Castro et al. 2004). Εν αντιθέσει, μελέτες στην Ολλανδία και στο Ηνωμένο Βασίλειο δεν βρήκαν κάποιο συσχετισμό των γονοτύπων του Ser680Asn με την πτωχή ανταπόκριση των ωοθηκών (Laven et al. 2003; Mohiyiddeen et al. 2012), ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι ο αριθμός των ωοθηκικών καταβολών, τα επίπεδα της οιστραδιόλης και ο αριθμός των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων είναι αυξημένος στο γονότυπο SerSer σε σύγκριση με αυτόν στον γονότυπο AsnAsn (Greb et al. 2005; Loutradis et al. 2006). Επίσης, μία μελέτη παρατήρησε χαμηλότερα ποσοστά κύησης στις γυναίκες με AsnAsn γονότυπο (Klinkert et al. 2006).

Η βιβλιογραφική αυτή έλλειψη καθαρής συσχέτισης των γονοτύπων του Ser680Asn πολυμορφισμού με χαρακτηριστικά υπογονιμότητας τόσο σε γυναίκες όσο

και σε άντρες, φαίνεται να επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα της παρούσας έρευνας που αναδεικνύουν ότι η παρουσία του Ser αλληλομόρφου δεν ευνοεί τις γυναίκες αυτές ως προς τα επίπεδα της LH, που είναι ελαφρώς αυξημένα στην αρχή του κύκλου, αλλά και ως προς το πάχος του ενδομητρίου, ωστόσο δεν φαίνεται αυτά τα χαρακτηριστικά να επηρεάζουν την ποιότητα του ενδομητρίου για το γονότυπο SerSer η οποία παραμένει στο I. Αντιθέτως η ποιότητα του ενδομητρίου όπως και πιθανόν οι ημέρες πρόκλησης στις γυναίκες αυτής της μελέτης φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία του Asn αλληλομόρφου. Οι αλλαγές στα άτομα φορείς του SerSer γονοτύπου πιθανόν να αντιπροσωπεύουν αλλαγές που σχετίζονται με χαμηλότερη ευαισθησία του ωοθυλακίου και χαμηλότερες πιθανότητες επιτυχούς εγκυμοσύνης αλλά δεν φαίνεται να είναι φαινοτυπικά τόσο καθοριστικές τουλάχιστον σε ότι αναφορά τις γυναίκες της παρούσας έρευνας. Σε αυτή τη μελέτη δεν αναδείχθηκαν διαφορές μεταξύ γονοτύπων σε ό,τι αφορά τη βασική τιμή FSH, όπως είχε φανεί παλαιότερα σε μελετώμενο ελληνικό πληθυσμό (Loutradis, 2006, Anagnostou 2012).

Επιπλέον, η ανομοιογένεια τόσο των υπό μελέτη πληθυσμών μεταξύ τους όσο και η έλλειψη δεδομένων *in vitro* που υποστηρίζουν την λειτουργική σημασία αυτού του πολυμορφισμού, μελέτες στο παρελθόν δείχνουν ότι η προσδεσιμότητα της FSH και τα επίπεδα της cAMP δεν μεταβάλλονται στις δύο ισομορφές του FSHR που μελετήθηκαν (Sudo et al. 2002); - πιθανόν να δημιουργούν αυτό το θολό τοπίο για τον Ser680Asn πολυμορφισμό. Συνεπώς η συσχέτιση που βρέθηκε για πρώτη φορά του γονότυπου SerSer με υψηλά επίπεδα LH και πάχος ενδομητρίου πιθανόν να αφορούν σε εύρημα με χαμηλή επίδραση στο αποτέλεσμα της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, αφού βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων.

Επιπροσθέτως, σε ό,τι αφορά στα χαρακτηριστικά κλινικών και άλλων παραμέτρων του προγράμματος της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης για τον πολυμορφισμό στην θέση -29 (Πίνακας 13), ο ομόζυγος γονότυπος για το πολυμορφικό αλληλίο AA παρουσίασε υψηλότερο αριθμό συμπλέγματος ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC, 8.63 ± 2.00 , $p=0.034$) και καλύτερη COC ποιότητα (5.75 ± 2.55 , $p=0.038$) έναντι των άλλων γονοτύπων GG και GA (6.04 ± 3.01 και 4.19 ± 2.25 , συγκεντρωτικά αντίστοιχα). Παράλληλα, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στους διαφορετικούς γονότυπους του πολυμορφισμού στη θέση -29 αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού γυναικών με υποβοηθούμενη γονιμοποίηση (Πίνακας 15).

Σε ότι αφορά στον πολυμορφισμό στην θέση -29, ο πληθυσμός των γυναικών αυτής της μελέτης φαίνεται να ευνοείται από την παρουσία του A αλληλομόρφου, αφού τα άτομα με AA γονότυπο σχετίζονται με αυξημένο αριθμό συμπλεγμάτων ωαρίου και κοκκιωδών κυττάρων (COC) και καλύτερη ποιότητα αυτών. Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με αναλύσεις *in vitro* του A αλληλίου για τον πολυμορφισμό στη θέση -29, που έχουν δείξει χαμηλότερα επίπεδα ενεργότητας της λουσιφεράσης σε σύγκριση με το αλληλίο G (Nakayama et al. 2006) τα οποία φαίνεται να αντιστοιχούν σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του FSHR, γεγονός που συνάδει με δεδομένα που δείχνουν ότι τα άτομα με τον AA γονότυπο παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένο αριθμό ωοθυλακίων και ανακτώμενων ωαρίων, αυξημένες δόσεις FSH για βέλτιστη ανταπόκριση και μεγαλύτερα ποσοστά πτωχών απαντητριών (Achrekar et al. 2009; Desai et al. 2011; Trevisan et al. 2014). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η συσχέτιση αυξημένων επιπέδων FSHR με καλύτερης ποιότητας COC (Calder et al. 2003). Άλλες μελέτες όμως δεν έχουν βρει σημαντική συσχέτιση του γονότυπου AA με δείκτες που αφορούν την έκβαση της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης ή του

αποθέματος των ωοθυλακίων (Tohlob et al. 2016), ενώ δεν επιβεβαιώνουν την μειωμένη δραστηριότητα του υποκινητή του FSHR γονιδίου με την παρουσία του A στη θέση -29 (Wunsch et al. 2005). Όλα τα παραπάνω φαίνεται να ισχυροποιούν το συμπέρασμα ότι οι γυναίκες της παρούσας μελέτης με τον γονότυπο AA πιθανόν δεν έχουν μειωμένα επίπεδα του FSHR και ίσως για αυτό το λόγο διατηρούν αυξημένη την ποιότητα των COC τους.

Κανένας από τους δύο πολυμορφισμούς δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της έκβασης, δηλαδή τα ποσοστά κύησης.

Η μελέτη του συνδυασμού των δύο πολυμορφισμών έρχεται να επιβεβαιώσει τα μειωμένα επίπεδα της LH που σχετίστηκαν με το αλληλόμορφο Asn. Αναλυτικότερα η συνύπαρξη ≥ 2 υπολειπόμενων αλληλίων συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα LH σε σύγκριση με τους φορείς < 2 υπολειπόμενων αλληλίων (4.96 ± 2.15 έναντι 5.98 ± 2.92 , $p=0.023$), με τις γυναίκες με τον πλήρη υπολειπόμενο γονότυπο (AsnAsn⁶⁸⁰AA⁻²⁹) να παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα 2.62 ± 0.68 mIU/L. Παρότι η παρουσία του A αλληλίου για τη θέση 680, όταν μελετήθηκε ξεχωριστά παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερο πάχος ενδομητρίου ο συνδυασμός των δύο υπολειπόμενων αλληλίων (AA/AsnAsn⁶⁸⁰AA⁻²⁹) ήταν κοντά στα επίπεδα του πάχους που παρατηρήθηκε και για τον ομόζυγο γονότυπο wild type (8.00 ± 1.41 έναντι 8.34 ± 1.90) με τους άλλους γονότυπους να παρουσιάζουν $\geq 9.54 \pm 2.06$ mm πάχους (Πίνακας 16). Επίσης η κατανομή των συνδυασμένων γονοτύπων με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζευγαριών δεν διέφερε σημαντικά (Πίνακας 17).

Τα επίπεδα LH δεν έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την παρουσία του Asn και A αλληλομόρφων και αυτό αποτελεί μια καινοτόμο παρατήρηση. Το γεγονός βέβαια ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών που παρουσίαζαν περισσότερα από δύο υπολειπόμενα αλληλία ακολουθούσαν πρόγραμμα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης λόγω αντρικής υπογονιμότητας πιθανόν να εξηγεί την έλλειψη μεγαλύτερων ή και δραστηκότερων συσχετίσεων με τους γονότυπους που έφεραν τους πολυμορφισμούς. Η σχέση του FSHR γονιδίου με την αντρική υπογονιμότητα έχει αποδειχθεί σε σχετικά πρόσφατη μελέτη που αναφέρει μειωμένο όγκο όρχεων σε αντρικό πληθυσμό της Βαλτικής που φέρει στο γονότυπο του το αλληλόμορφο Ser για τη θέση 680 (Grigoriou et al. 2013), ενώ προηγούμενη μετά-ανάλυση των τριών συχνότερων πολυμορφισμών στους άντρες δεν δείχνει να αυξάνει την γενετική προδιάθεση της αντρικής υπογονιμότητας ή τα επίπεδα αζωοσπερμίας (Wu et al. 2012). Η σημαντικότητα αυτών των πολυμορφισμών σε αντρικό πληθυσμό μένει να επιβεβαιωθεί και για την Ελλάδα.

Πολλές μελέτες των πολυμορφισμών του FSHR αλλά και άλλων γονιδίων που συνδέονται με υπογονιμότητα έχουν προσπαθήσει να συνδέσουν την παρουσία των πολυμορφισμών με την ανταπόκριση των γυναικών στην θεραπεία καθορίζοντας κάθε φορά με δικά τους κριτήρια τις πτωχές και καλές απαντήτριες. Οι γυναίκες της παρούσας μελέτης που έδειξαν πτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία και χρειάστηκαν > 2 προσπάθειες υποβοηθούμενης γονιμοποίησης δεν διέφεραν σε ότι αφορά την κατανομή των γονοτύπων από τις καλές απαντήτριες, παρ'ότι έφεραν σε μεγαλύτερο ποσοστό τους γονότυπους SerAsn⁶⁸⁰GG⁻²⁹ ή SerSer⁶⁸⁰GA⁻²⁹ (43.3%).

Όλα τα παραπάνω, παρόλο που δεν φαίνεται να συνθέτουν μια εικόνα πτωχής ανταπόκρισης βασιζόμενη μόνο σε γενετικά δεδομένα που αφορούν στο γονίδιο FSHR δίνουν ελπιδοφόρα κίνητρα για περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο πληθυσμό, δεδομένου ότι παρουσιάστηκε μία συσχέτιση του A αλληλομόρφου (θέση -29) μεμονωμένα με την ποιότητα των COC, ενώ και προηγούμενες μελέτες έχουν

επιβεβαιώσει την έκφραση του FSHR υποδοχέα σε COCδομές (Shemesh et al. 2001) καθώς και την θετική του επίδραση στην υπογονιμότητα (Serikawa et al. 2006). Αναδεικνύεται όμως η ανάγκη ελέγχου και άλλων γενετικών τόπων και γονιδίων που σε συνδυασμό μπορεί να διαλευκάνουν την ανομοιογένεια των φαινοτύπων και να ισχυροποιήσουν την προβλεψιμότητα των μοντέλων πτωχών απαντητριών σε πρωτόκολλα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης. Πολυ- ή/και ολιγο-γονιδιακά μοντέλα ερευνών που συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο FSHR σε συνδυασμό με τα γονίδια ESR1 και ESR2 (Anagnostou et al. 2012; de Castro et al. 2004), ή/και μελέτες που αντιμετωπίζουν την ετερογένεια του πληθυσμού με υπέρ-απάντηση στα πρωτόκολλα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης (COH, πτωχή απάντηση)(Pabalan et al. 2014) έχουν συσχετίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια το φαινότυπο των πτωχών απαντητριών και δείχνουν να φέρουν συμπεράσματα σημαντικής κλινικής αξίας.

9 Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρόλο που δεν φαίνεται να ενισχύουν την άποψη ότι ο συνδυασμός των δύο πολυμορφισμών του FSHR, μεμονωμένα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα θεραπευτικά πρωτόκολλα IVF και ICSI δεν φαίνεται να καθορίζουν και την πορεία μελλοντικών μελετών, αφού η έλλειψη σημαντικών συσχετίσεων πιθανόν να οφείλεται στους περιορισμούς της μελέτης. Συγκεκριμένα, ο αριθμός γυναικών με τον ομόζυγο για τους πολυμορφισμούς γονότυπο είναι ιδιαίτερα χαμηλός (n=2), ενώ η φύση της μελέτης (μελέτη παρατήρησης) δεν επέτρεψε τη λήψη μεγάλου αριθμού δειγμάτων γυναικών που ακολουθούσαν το ίδιο θεραπευτικό πρωτόκολλο και είχαν σχετικά ομοιογενή χαρακτηριστικά υπογονιμότητας με αποτέλεσμα να επηρεάζεται πολύ τόσο η ηλικία των γυναικών που συμμετείχαν όσο και να αυξάνεται η ετερογένεια του δείγματος, αφαιρώντας στατιστική αλλά και φαινοτυπική δύναμη από την μελέτη. Η πραγματοποίηση ενός γενετικού ελέγχου πριν ή και μετά από μία αποτυχημένη θεραπευτική προσπάθεια με την επιλογή ενός ευρύτερου συνδυασμού γενετικών δεικτών που εξετάζουν τόσο το γονίδιο του FSHR αλλά και άλλων γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γονιμότητα τόσο της γυναίκας αλλά και των αντρών, μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την ανταπόκριση του ασθενούς στο πρωτόκολλο υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, γνώση σημαντική για τις αποφάσεις που καλείται να πάρει ο κλινικός ιατρός όσον αφορά στο σχεδιασμό αρχικών αλλά και επόμενων προσπαθειών υποβοηθούμενης γονιμοποίησης.

Σήμερα, η εμφάνιση σύγχρονων τεχνολογιών γνωστών ως OMICS, που συμπεριλαμβάνουν μια πληθώρα προηγμένων μοριακών και γενετικών εργαλείων όπως την επιγονιδιωματική, τη γονιδιωματική, τη μεταγραφωματική, την πρωτεϊνωματική και τη μεταβολωμική, θα επιτρέψει την απόκτηση μίας πληθώρας πληροφοριών που αφορούν στις βιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική διεργασία και θα διευκολύνει την ένταξη καινούργιων, χαμηλού κόστους και εύρηστων εργαλείων για την κλινική πράξη στα κέντρα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης. Νέα δεδομένα που προτείνουν επιγενετικές αλλαγές στο DNA από χημικές ουσίες που διαταράσσουν τις ενδοκρινικές λειτουργίες, πλατφόρμες μικροσυστοιχιών για την ανάλυση εμβρύων (Konstantinidis 2011) ωαρίων και άλλων

κυττάρων, ο έλεγχος της έκφρασης μεταγράφων (mRNA) με σημαντικές επιπτώσεις για την αναπαραγωγική ποιότητα και ικανότητα των ωοκυττάρων και των σπερματοζωαρίων, η αναγνώριση πρωτεϊνικών προφίλ που συσχετίζονται με την υπογονιμότητα και μεταβολικών δεικτών που διασφαλίζουν τη σωστή λειτουργία και εξέλιξη των εμφυτευόμενων εμβρύων, θα έρθουν να αλλάξουν το μέλλον της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης (Egea et al. 2014). Ήδη σήμερα εργαλεία όπως η συστοιχία ελέγχου της δεκτικότητας του ενδομητρίου (ERA test) ή της γονιμότητας του σπερματοζωαρίου, καθώς και στρατηγικές βασιζόμενες στην αναγέννηση και παραγωγή ωοκυττάρων από βλαστοκύτταρα (Volarevic et al. 2014) έρχονται να ταραξουν τα νερά της σύγχρονης αναπαραγωγικής ιατρικής.

Η διεξαγωγή τέτοιων ερευνών σε συνεργαζόμενα κέντρα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης ίσως σε πανευρωπαϊκό ή και παγκόσμιο επίπεδο, πιθανόν να μπορέσει να αναδείξει μια πληθώρα γενετικών και άλλων δεικτών και να αποσαφηνίσει την βιολογική διεργασία πίσω από την πολυπλοκότητα της γονιμοποίησης. Απώτερος σκοπός η επιτυχής έκβαση, ενδυναμώνοντας τεχνικά, φαρμακευτικά αλλά και ουσιαστικά το σύστημα επιλογής και εφαρμογής επιτυχών πρωτοκόλλων υποβοηθούμενης γονιμοποίησης.

10 Περίληψη

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός υπογόνιμων ζευγαριών, σε συνδυασμό με την έλλειψη διακριτών δεικτών και παραμέτρων που φαίνεται να καθορίζουν την επιτυχή έκβαση των πρωτοκόλλων υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, οδήγησαν το ερευνητικό ενδιαφέρον στην μελέτη γενετικών τόπων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στο αναπαραγωγικό σύστημα. Ένας από αυτούς είναι και το γονίδιο του υποδοχέα της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSHR) που συμβάλει ενεργά στην ωοθυλακική ωρίμανση και στην παραγωγή των οιστρογόνων συμμετέχοντας ενεργά στην γυναικεία αλλά και αντρική γονιμότητα. Πληθώρα μελετών έχουν προσδιορίσει την σημαντικότητα κάποιων πολυμορφισμών στο γονίδιο του FSHR και έχουν συσχετίσει τους γονότυπους που προκύπτουν από αυτούς με φαινότυπους και χαρακτηριστικά που έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υποβοηθούμενη γονιμοποίηση. Οι περισσότερες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση της επίδρασης του Ser680Asn πολυμορφισμού μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τον πολυμορφισμό Thr307Ala με τον οποίο βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης, και μερικές εξ αυτών παρατήρησαν χαμηλή ευαισθησία στην FSH και υψηλότερο κίνδυνο υπέρ-απάντησης, ενώ άλλες αυξημένο αριθμό ώριμων ωοκυττάρων και υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης. Από την άλλη πλευρά ο πολυμορφισμός στην θέση -29 του υποκινητή του FSHR γονιδίου (A>G) είναι ένας λιγότερο μελετημένος πολυμορφισμός που φαίνεται να επηρεάζει τα εκφραζόμενα επίπεδα του FSHR, ενώ ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει διερευνήσει το ρόλο του σε συνδυασμό με τους άλλους πολυμορφισμούς.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αναλύσει δύο διαφορετικούς γονιδιακούς πολυμορφισμούς, τον Ser680Asn πολυμορφισμό και αυτόν στη θέση -29 του υποκινητή, μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό, σε πληθυσμό γυναικών στην Ελλάδα που ακολουθούν πρωτόκολλο υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην έκβαση της διέγερσης των ωοθηκών και στα ποσοστά των κυήσεων καθώς και η χρησιμότητα τους ως δείκτες υπογονιμότητας.

Η γονοτύπηση για τους δύο πολυμορφισμούς 141 γυναικών με φυσιολογική ωορρηξία που ακολουθούσαν πρόγραμμα IVF ή ICSI και 94 φυσιολογικών γυναικών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Κάθε πολυμορφισμός εκτιμήθηκε ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό, σχετικά με την κατανομή των γονοτύπων στον πληθυσμό των υποβοηθούμενης γονιμοποίησης γυναικών και σχετικά με τα κλινικά (ηλικία, διάρκεια γονιμότητας, αριθμός δοκιμών), βιοχημικά (FSH, LH και AMH) αλλά και άλλα χαρακτηριστικά που αφορούν την έκβαση της ωοθηκικής διέγερσης (οιστραδιόλη, ημέρες πρόκλησης, αριθμός και ποιότητα COC, ποσοστά γονιμότητα κα) καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που αφορούσαν τους λόγους της υπογονιμότητας, την ποιότητα του ενδομητρίου και την κύηση. Επίσης διερευνήθηκε η επίπτωση του γονότυπου στην πτωχή απάντηση των γυναικών.

Η μελέτη του κάθε πολυμορφισμού ξεχωριστά ανέδειξε μια συσχέτιση του SerSer γονοτύπου για τον πολυμορφισμό Ser680Asn με υψηλότερα επίπεδα LH όπως αυτά εκτιμήθηκαν την 3^η ημέρα ωοθηκικής διέγερσης, και μικρότερο πάχος ενδομητρίου, ενώ ο συχνότερος γονότυπος SerAsn για τον πληθυσμό των γυναικών σε υποβοηθούμενη γονιμοποίηση συσχετιζόταν με ποιότητα II ενδομητρίου. Από την άλλη πλευρά το αλληλόμορφο A για τον πολυμορφισμό στη θέση -29 συσχετιζόταν με υψηλότερο αριθμό και καλύτερη ποιότητα συμπλέγματος ωαρίου και κοκκωδών

κυττάρων (COC). Κατά τη συνδυαστική μελέτη των δύο πολυμορφισμών, δε φάνηκε να επικρατεί ή να μειονεκτεί κάποιος συνδυασμός. Ο γονότυπος AsnAsn/AA εμφάνιζε τα χαμηλότερα επίπεδα LH (2.62 ± 0.68 mIU/L), αλλά ανιχνεύεται σε πολύ μικρό ποσοστό γυναικών (1.4%).

Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει την κλινική αξία αποσαφήνισης πολλαπλών γενετικών τύπων που εμπλέκονται στην έκβαση της ελεγχόμενης διέγερσης των ωοθηκών σε μεγαλύτερους πληθυσμούς τόσο στην Ελλάδα όσο και σε πανευρωπαϊκό επίπεδο, υποστηρίζοντας τις προσπάθειες προηγούμενων μελετών στο να διαλευκάνουν το ρόλο του FSHR στις βιολογικές διεργασίες του αναπαραγωγικού συστήματος. Περαιτέρω μελέτες σε ένα συνδυασμό κατάλληλων πολυμορφισμών και γενετικών τύπων σε μεγάλο αριθμό γυναικών αλλά και αντρών θα οδηγήσει στον καλύτερο σχεδιασμό και στην αποτελεσματικότερη εφαρμογή ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης.

11 Summary

The ever increasing number of infertile couples, without any pathological findings in the reproductive system, in the modern society of the Westernized world, in combination with the lack of distinct markers and parameters that define the successful outcome of stimulation treatments, lead the research interest towards the study of genetic markers that seem to play a pivotal role in the reproductive system. One of those is the Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) gene that actively contributes towards follicle maturation and estrogen production, hence controlling female and male fertility. A number of studies have defined the importance of several polymorphisms in the FSHR gene and have associated the derived genotypes with phenotypes that relate to reduced or unsuccessful stimulation protocols. The majority of these studies have investigated the impact of Ser680Asn polymorphism individually or in combination with the Thr307Ala polymorphism, with which it is at a linkage disequilibrium (LD), and some of them have associated the polymorphisms with reduced oocyte or follicle sensitivity to FSH and increased risk of hypo- or hyper-responsiveness, while others with increased follicle or oocyte number and higher implantation or pregnancy rates. On the other hand, -29 promoter polymorphism (A>G) in FSHR is a less studied polymorphism that seems to lead to reduced FSHR expression levels, whereas a limited number of studies have investigated its impact in combination with other polymorphisms.

Therefore, the aim of this study was to analyze two different polymorphisms, Ser680Asn and -29 (A>G) promoter polymorphism, of the FSHR gene, individually but also in combination, in a sample of Greek women undergoing IVF or ICSI, in order to elucidate their role in the outcome of controlled oocyte stimulation (COS) protocols and in pregnancy rates, as well as to determine their value as infertility markers.

The genotyping for the two polymorphisms was performed in 141 women undergoing an infertility therapy (IVF or ICSI) and in 94 controls, by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Each polymorphism was analyzed separately and in combination, concerning the the genotype distribution in the infertility group and also concerning the clinical (age, infertility duration, number of trials), biochemical (FSH, LH and AMH) and other parameters that determine COS outcome (estradiol, days of stimulation, number and quality of COC, fertility rates etc.) as well as the qualitative parameters concerning infertility cause, endometrial quality and pregnancy rates. Furthermore, the impact of genotype on poor response to the protocol was also determined.

The study of each locus revealed a positive correlation of the SerSer genotype with higher LH levels, as assayed on the 3rd day of stimulation, and decreased endometrial thickness, whereas the most frequent heterozygote genotype (SerAsn) in the study group undergoing COS exhibited type II endometrial quality. On the other hand, the A allele for the -29 polymorphism correlated to increased number and quality of cumulus oocyte complexes (COCs). The worst theoretically combined genotype of the two polymorphisms AsnAsn AA exhibited the lowest LH levels (2.62 ± 0.68 mIU/L), was not found in the good COS responders and women underwent stimulation due to male infertility.

The present study supports the clinical value of the functional clarification of multiple genetic loci that are involved in the outcome of COS in Greece as well as in other European countries, verifying the efforts of other research groups that are attempting to elucidate the significance of FSHR in the biological processes of reproduction. Further investigations in a greater number of combined genetic loci in large cohorts of infertile women as well as men will contribute to the fine planning and successful implementation of controlled ovarian stimulation protocols.

12 Βιβλιογραφία

- Αναπλιώτου, Μαργαρίτα *Ωοθυλακιογένεση*. p. 53-70.
- Μαρμαράς Βασίλης, Μαρμαρά-Λαμπροπούλου Μαρία (2005), *Βιολογία Κυττάρου Μοριακή Προσέγγιση* (TYPORAMA).
- Achrekar, S. K., et al. (2010), 'Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea', *J Assist Reprod Genet*, 27 (6), 317-26.
- Achrekar, S. K., et al. (2009), 'Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism', *Reprod Biomed Online*, 18 (4), 509-15.
- Aittomaki, K., et al. (1995), 'Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure', *Cell*, 82 (6), 959-68.
- Allen, L. A., et al. (2003), 'A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics', *Hum Reprod*, 18 (2), 251-6.
- Anagnostou, E., et al. (2012), 'ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a useful genetic tool for the prediction of poor responders', *Curr Pharm Biotechnol*, 13 (3), 426-34.
- Arey, B. J. and Lopez, F. J. (2011), 'Are circulating gonadotropin isoforms naturally occurring biased agonists? Basic and therapeutic implications', *Rev Endocr Metab Disord*, 12 (4), 275-88.
- Arumugam, K. and Urquhart, R. (1991), 'Causes for infertility: a comparative study', *Ann Acad Med Singapore*, 20 (3), 351-2.
- Beau, I., et al. (1998), 'A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor', *J Clin Invest*, 102 (7), 1352-9.
- Behre, H. M., et al. (2005), 'Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation', *Pharmacogenet Genomics*, 15 (7), 451-6.
- Benson, K. and Hartz, A. J. (2000), 'A comparison of observational studies and randomized, controlled trials', *Am J Ophthalmol*, 130 (5), 688.
- Berman, D. M. and Gilman, A. G. (1998), 'Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate', *J Biol Chem*, 273 (3), 1269-72.
- Bjarnadottir, T. K., et al. (2006), 'Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse', *Genomics*, 88 (3), 263-73.
- Block, E. (1952), 'Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages', *Acta Anat (Basel)*, 14 (1-2), 108-23.
- (1953), 'A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants', *Acta Anat (Basel)*, 17 (3), 201-6.
- Bohm, S. K., Grady, E. F., and Bunnnett, N. W. (1997), 'Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors', *Biochem J*, 322 (Pt 1), 1-18.
- Borgbo, T., et al. (2015), 'Effect of the FSH receptor single nucleotide polymorphisms (FSHR 307/680) on the follicular fluid hormone profile and the granulosa cell gene expression in human small antral follicles', *Mol Hum Reprod*, 21 (3), 255-61.
- Bradley J. Van Voorhis, Amy E.T. Sparks, Craig H. Syrop and D. W. Stovall. (1998), *Ultrasound-guided aspiration of hydrosalpinges is associated with improved pregnancy and implantation rates after in-vitro fertilization cycles*, ed. 3 (13; Human Reproduction).

- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., and Kopelman, S. (2001), 'Definition and causes of infertility', *Reprod Biomed Online*, 2 (1), 41-53.
- Calder, M. D., et al. (2003), 'Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro', *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 14.
- Cant, S. (1993), 'Infertility: causes and treatment', *Nurs Stand*, 7 (13-14), 28-30.
- Casas-Gonzalez, P., et al. (2012), 'Normal testicular function without detectable follicle-stimulating hormone. A novel mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene leading to apparent constitutive activity and impaired agonist-induced desensitization and internalization', *Mol Cell Endocrinol*, 364 (1-2), 71-82.
- Casper, R. F. (2015), 'Introduction: Gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final follicular maturation for in vitro fertilization', *Fertil Steril*, 103 (4), 865-6.
- Chwalisz, K., et al. (2005), 'Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis', *Endocr Rev*, 26 (3), 423-38.
- Claing, A., et al. (2002), 'Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins', *Prog Neurobiol*, 66 (2), 61-79.
- de Castro, F., et al. (2004), 'Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait', *Pharmacogenetics*, 14 (5), 285-93.
- De Leener, A., et al. (2006), 'Presence and absence of follicle-stimulating hormone receptor mutations provide some insights into spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome physiopathology', *J Clin Endocrinol Metab*, 91 (2), 555-62.
- De Leener, A., et al. (2008), 'Identification of the first germline mutation in the extracellular domain of the follitropin receptor responsible for spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome', *Hum Mutat*, 29 (1), 91-8.
- Desai, S. S., Roy, B. S., and Mahale, S. D. (2013a), 'Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction', *Reproduction*, 146 (6), R235-48.
- Desai, S. S., et al. (2013b), 'Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response', *Reprod Biomed Online*, 27 (4), 400-6.
- Desai, S. S., et al. (2011), 'Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells', *J Clin Endocrinol Metab*, 96 (9), 2805-12.
- Doherty, E., et al. (2002), 'A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure', *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (3), 1151-5.
- Dohlman, H. G. and Thorner, J. (1997), 'RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins', *J Biol Chem*, 272 (7), 3871-4.
- Egea, R. R., et al. (2014), 'OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology', *J Hum Reprod Sci*, 7 (2), 73-92.
- Forabosco, A., et al. (1991), 'Morphometric study of the human neonatal ovary', *Anat Rec*, 231 (2), 201-8.
- George, J. W., Dille, E. A., and Heckert, L. L. (2011), 'Current concepts of follicle-stimulating hormone receptor gene regulation', *Biol Reprod*, 84 (1), 7-17.
- Gilchrist, H. D., Allard, B. L., and Simone, D. A. (1996), 'Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats', *Pain*, 67 (1), 179-88.
- Gloaguen, P., et al. (2011), 'Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 45.

- Goodman, O. B., Jr., et al. (1996), 'Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor', *Nature*, 383 (6599), 447-50.
- Greb, R. R., et al. (2005), 'A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle', *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (8), 4866-72.
- Grigorova, M., et al. (2013), 'Study in 1790 Baltic men: FSHR Asn680Ser polymorphism affects total testes volume', *Andrology*, 1 (2), 293-300.
- Gromoll, J., Dankbar, B., and Gudermann, T. (1994), 'Characterization of the 5' flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene', *Mol Cell Endocrinol*, 102 (1-2), 93-102.
- Gromoll, J., Pekel, E., and Nieschlag, E. (1996a), 'The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene', *Genomics*, 35 (2), 308-11.
- Gromoll, J., Simoni, M., and Nieschlag, E. (1996b), 'An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man', *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (4), 1367-70.
- Gromoll, J., et al. (2002), 'Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism', *Eur J Endocrinol*, 147 (5), 597-608.
- Hart, R., et al. (2001), 'A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception', *Hum Reprod*, 16 (11), 2411-7.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990), 'Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function', *FASEB J*, 4 (11), 2881-9.
- Huang, X., et al. (2015), 'The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 82 (4), 577-83.
- Hurowitz, E. H., et al. (2000), 'Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes', *DNA Res*, 7 (2), 111-20.
- Jiang, X., Dias, J. A., and He, X. (2014), 'Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling', *Mol Cell Endocrinol*, 382 (1), 424-51.
- Kara, E., et al. (2006), 'A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation', *Mol Endocrinol*, 20 (11), 3014-26.
- Konstantinidis, M. (2011), *A novel tool for the assessment of IVF embryos*. (Hum Reprod, 26: Oxford, England) 124-6.
- Kuechler, A., et al. (2010), 'An unbalanced translocation unmask a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance', *Eur J Hum Genet*, 18 (6), 656-61.
- Laissue, P. (2015), 'Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing', *Mol Cell Endocrinol*, 411, 243-57.
- Landomiel, F., et al. (2014), 'Biased signalling in follicle stimulating hormone action', *Mol Cell Endocrinol*, 382 (1), 452-9.
- Laporte, S. A., et al. (1999), 'The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (7), 3712-7.
- Laven, J. S., et al. (2003), 'Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility', *Fertil Steril*, 80 (4), 986-92.

- Lefkowitz, R. J. (1998), 'G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization', *J Biol Chem*, 273 (30), 18677-80.
- Lefkowitz, R. J., Pierce, K. L., and Luttrell, L. M. (2002), 'Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity', *Mol Pharmacol*, 62 (5), 971-4.
- Lindgren, I., et al. (2016), 'Combined assessment of polymorphisms in the LHCGR and FSHR genes predict chance of pregnancy after in vitro fertilization', *Hum Reprod*, 31 (3), 672-83.
- Livshyts, G., et al. (2009), 'A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine', *J Assist Reprod Genet*, 26 (1), 29-34.
- Lledo, B., et al. (2016), 'Clinical efficacy of recombinant versus highly purified follicle-stimulating hormone according to follicle-stimulating hormone receptor genotype', *Pharmacogenet Genomics*, 26 (6), 288-93.
- Lledo, B., et al. (2013), 'Effect of follicle-stimulating hormone receptor N680S polymorphism on the efficacy of follicle-stimulating hormone stimulation on donor ovarian response', *Pharmacogenet Genomics*, 23 (5), 262-8.
- Loutradis, D., et al. (2012), 'Genetic profile of SNP(s) and ovulation induction', *Curr Pharm Biotechnol*, 13 (3), 417-25.
- Loutradis, D., et al. (2006), 'FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs', *J Assist Reprod Genet*, 23 (4), 177-84.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002), 'The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals', *J Cell Sci*, 115 (Pt 3), 455-65.
- McGee, E. A. and Hsueh, A. J. (2000), 'Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles', *Endocr Rev*, 21 (2), 200-14.
- Meduri, G., et al. (2003), 'Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies', *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (8), 3491-8.
- Mohiyiddeen, L., et al. (2012), 'Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers', *Fertil Steril*, 97 (3), 677-81.
- Montanelli, L., et al. (2004), 'Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor', *Mol Endocrinol*, 18 (8), 2061-73.
- Mullen Michael P., Cooke Dara J. and Crow Mark A. (2013), *Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species*. p. ISBN: 978-53-51-1006-4.
- Musnier, A., et al. (2010), 'GPCR signalling to the translation machinery', *Cell Signal*, 22 (5), 707-16.
- Nakamura, Y., et al. (2008), 'A novel mutation in exon8 of the follicle-stimulating hormone receptor in a woman with primary amenorrhea', *Gynecol Endocrinol*, 24 (12), 708-12.
- Nakayama, T., et al. (2006), 'Mutation of the follicle-stimulating hormone receptor gene 5'-untranslated region associated with female hypertension', *Hypertension*, 48 (3), 512-8.
- Nataraja, S. G., Yu, H. N., and Palmer, S. S. (2015), 'Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 142.
- Neubig, R. R. (2002), 'Regulators of G protein signaling (RGS proteins): novel central nervous system drug targets', *J Pept Res*, 60 (6), 312-6.

- Nordhoff, V., et al. (2011), 'Effects of the FSH receptor gene polymorphism p.N680S on cAMP and steroid production in cultured primary human granulosa cells', *Reprod Biomed Online*, 23 (2), 196-203.
- opinion, a committee 'Endometriosis and infertility', *Fertility and Sterility*, 98 (3), 591-98.
- Orio, F., Jr., et al. (2006), 'Genetic analysis of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with polycystic ovary syndrome', *J Endocrinol Invest*, 29 (11), 975-82.
- Pabalan, N., et al. (2014), 'Evaluating influence of the genotypes in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn (rs6166) polymorphism on poor and hyper-responders to ovarian stimulation: a meta-analysis', *J Ovarian Res*, 7, 285.
- Perez Mayorga, M., et al. (2000), 'Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype', *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (9), 3365-9.
- Perry, S. J., et al. (2002), 'Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins', *Science*, 298 (5594), 834-6.
- Petrozza, John C (2015), 'Assisted Reproduction Technology', *Medscape*.
- Pritts, E. A. (2001), 'Fibroids and infertility: a systematic review of the evidence', *Obstet Gynecol Surv*, 56 (8), 483-91.
- Raju, G. A., et al. (2013), 'Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation', *J Hum Reprod Sci*, 6 (4), 227-34.
- Richards, J. S. and Pangas, S. A. (2010), 'The ovary: basic biology and clinical implications', *J Clin Invest*, 120 (4), 963-72.
- Sassone-Corsi, P. (2012), 'The cyclic AMP pathway', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (12).
- Serikawa, T., et al. (2006), 'Maintenance of in vitro granulosa cell function by adenoviral mediated follicle stimulating hormone receptor gene transduction', *J Assist Reprod Genet*, 23 (4), 199-206.
- Shea O. Rutstein, Iqbal H. Shah (2003), *DHS Comparative Reports 9: Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries*. p. 1-57.
- Shemesh, M., et al. (2001), 'Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of cAMP and inositol phosphate in vitro and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin in vivo', *Reprod Biol*, 1 (2), 13-32.
- Simoni, M. and Casarini, L. (2014), 'Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view', *Eur J Endocrinol*, 170 (3), R91-107.
- Simoni, M., et al. (2008a), 'Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response', *Hum Reprod Update*, 14 (5), 459-84.
- Simoni, M., et al. (2008b), 'Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility', *Pharmacogenet Genomics*, 18 (3), 193-200.
- Smits, G., et al. (2003), 'Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor', *N Engl J Med*, 349 (8), 760-6.
- Sterne-Marr, R. and Benovic, J. L. (1995), 'Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins', *Vitam Horm*, 51, 193-234.
- Sudo, S., et al. (2002), 'Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene', *Mol Hum Reprod*, 8 (10), 893-9.
- Tapanainen, J. S., et al. (1997), 'Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility', *Nat Genet*, 15 (2), 205-6.

- Thatcher, J. D. (2010), 'The inositol trisphosphate (IP3) signal transduction pathway', *Sci Signal*, 3 (119), tr3.
- Tohlob, D., et al. (2016), 'Association of a promoter polymorphism in FSHR with ovarian reserve and response to ovarian stimulation in women undergoing assisted reproductive treatment', *Reprod Biomed Online*, 33 (3), 391-7.
- Touraine, P., et al. (1999), 'New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype', *Mol Endocrinol*, 13 (11), 1844-54.
- Trevisan, C. M., et al. (2014), 'Ala307Thr and Asn680Ser polymorphisms of FSHR gene in human reproduction outcomes', *Cell Physiol Biochem*, 34 (5), 1527-35.
- Vander A., Sherman j., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. *Φυσιολογία του Ανθρώπου: Μηχανισμοί της Λειτουργίας του οργανισμού Κεφ. 19 Αναπαραγωγή* (Ελληνική έκδοση edn., II).
- Vasseur, C., et al. (2003), 'A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome', *N Engl J Med*, 349 (8), 753-9.
- Volarevic, V., et al. (2014), 'Stem cells as new agents for the treatment of infertility: current and future perspectives and challenges', *Biomed Res Int*, 2014, 507234.
- Wacker, D., et al. (2013), 'Structural features for functional selectivity at serotonin receptors', *Science*, 340 (6132), 615-9.
- Wallace, W. H. and Kelsey, T. W. (2010), 'Human ovarian reserve from conception to the menopause', *PLoS One*, 5 (1), e8772.
- WHO (2003), 'WHO definition of Health'.
- WHO-ICMART 'revised glossary'.
- Williams, M. (1995), *The G-protein linked receptor factsbook*. S. Watson and S. Arkininstall (xiii Drug Dev. Res., 34: 86–87; London: Academic Press) 427 pages.
- World Health Organization, WHO (2000), 'WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple.', *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Wu, W., et al. (2012), 'Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: a meta-analysis', *Gene*, 505 (2), 388-92.
- Wunsch, A., et al. (2005), 'Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor', *Fertil Steril*, 84 (2), 446-53.