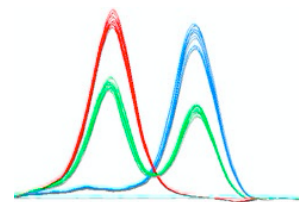




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ-ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

**ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ
FSH ΚΑΙ ΤΗΣ AMH ΣΕ ΠΤΩΧΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ ΣΤΗΝ IVF**

Υπεύθυνος Καθηγητής: Δημήτριος Λουτράδης

Πολίνα Γιαννέλου
ΑΘΗΝΑ 2017

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Συνδυαστική μελέτη συσχετισμού των πολυμορφισμών στους υποδοχείς της FSH και της AMH σε πτωχές και καλές απαντήτριες στην IVF»

ΠΟΛΙΝΑ ΓΙΑΝΝΕΛΟΥ

A.M.:20130567

Επιβλέπων: Δημήτριος Λουτράδης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δημήτριος Λουτράδης

Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών
Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Πέτρος Δρακάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωνσταντίνος Καλλιανίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών

Στον αδερφό μου,

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 IVF και Υπογονιμότητα

1.1.1 Υπογονιμότητα

1.1.2 Αίτια Υπογονιμότητας

1.1.3 Ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART - Assisted reproductive technology)

1.1.4 Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF - *in vitro* fertilisation)

1.1.4.1 Κλινική προσέγγιση της γυναίκας

1.1.4.2 Πρωτόκολλα

1.1.4.3 Ωοθηκική Απόκριση

1.2 Ωοθυλακιότροπος ορμόνη – FSH (follicle stimulating hormone)

1.2.1 Ωογένεση και Ωοθυλακική Ανάπτυξη

1.2.2 FSH και Φυσιολογία Ωοθήκης

1.2.3 Δομή FSH

1.2.4 Υποδοχέας της FSH-FSHR (FSH-receptor)

1.2.4.1 Το γονίδιο του υποδοχέα FSHR

1.2.4.2 Σύνδεση με τον υποδοχέα και μετάδοση σήματος

1.3 Αντιμυλλέριος ορμόνη – AMH (Anti- Mullerian Hormone)

1.3.1. Ο ρόλος της AMH στη φυσιολογία της ωοθήκης

1.3.2. Ο ανασταλτικός ρόλος της AMH

1.3.3. Παράγοντες που διαμορφώνουν τα επίπεδα της AMH στις γυναίκες

1.3.4. Η AMH ως αυξητικός παράγοντας

1.3.4.1 Η υπερ-οικογένεια του TGFβ

1.3.4.2 Μηχανισμός δράσης της AMH

1.4.5. AMHR II Υποδοχέας

1.4 SNPs

1.4.1 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της FSHR (FSHR)

1.4.2 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της AMH (AMHR II)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον FSHR

3.2 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον AMHR II

3.3. Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων στις δυο ομάδες

3.4. Πληθυσμός IVF

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί αποτέλεσμα κοπιαστικής εργασίας υπό την επίβλεψη, καθοδήγηση αλλά και συνεργασία διακεκριμένων και σεβαστών επιστημόνων που θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω.

Καταρχήν θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή της Α΄Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», κ. Δημήτριο Λουτράδη που μου έδωσε την δυνατότητα να παρακολουθήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών με τίτλο «Αναπαραγωγική & Αναγεννητική Ιατρική» κάνοντας πραγματικότητα το όνειρο μου να εξειδικευτώ στον κλάδο της ανθρώπινης εμβρυολογίας και δίνοντας έμπνευση με το επιστημονικό του έργο και το παράδειγμά του ως ερευνητή και επιστήμονα.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Πέτρο Δρακάκη και στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Καλλιανίδη οι οποίοι υπήρξαν έμπνευση και παράδειγμα καθ' όλη την διάρκεια των μαθημάτων του Μεταπτυχιακού αυτού προγράμματος και με τις γνώσεις τους συνεισέφεραν τα μέγιστα στην κατανόηση του γνωστικού αντικείμενου και την συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Στην συνέχεια θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Δρ. Έλλη Αναγνώστου η οποία με χαρά, ανεξάντλητη υπομονή και σεβασμό στους προσωπικούς μου ρυθμούς καθοδήγησε την εκπόνηση της παρακάτω εργασίας από την αρχή έως την συγγραφή της. Μου μετέδωσε απλόχερα τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες τόσο στο ερευνητικό όσο και στο γνωστικό αντικείμενο μελέτης μου χωρίς τις οποίες η διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής εργασίας θα ήταν ανέφικτη.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από αυτές τις ευχαριστίες την διευθύντρια του εργαστηρίου της εξωσωματικής γονιμοποίησης και καθηγήτρια κ. Δέσποινα Μαυρογιάννη η οποία υπήρξε το παράδειγμα για όλους μας στο εργαστήριο, ήταν παρούσα σε κάθε ανάγκη μας αλλά και με την υπομονή και την εμπιστοσύνη της μας άνοιξε τον δρόμο στηρίζοντας μας σε κάθε σημείο καθ' όλη την διάρκεια των δυο τελευταίων χρόνων αφιερώνοντας τον πολύτιμο χρόνο της και τις απεριόριστες γνώσεις της στο αντικείμενο της μοριακής βιολογίας και της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Σε αυτό το σημείο ολοκληρώνοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τους συμφοιτητές μου αλλά και στα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου καθώς και σε όλο το προσωπικό της μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» που με την πολύτιμη εμπειρία τους βοήθησαν στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους αυτής της εργασίας, στην επίλυση τυχόν προβλημάτων αλλά και την δημιουργία ενός όμορφου κλίματος συνεργασίας και υποστήριξης καθ' όλη την διάρκεια των παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) είναι γλυκοπρωτεΐνη, η οποία παράγεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και η παραγωγή της ρυθμίζεται από τη γοναδορελίνη (GnRH) η οποία με την σειρά της εκκρίνεται από τον υποθάλαμο. Στις γυναίκες ο ρόλος της FSH είναι πολλαπλός: αυξάνει την παραγωγή ανασταλτίνης, διεγείρει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, προετοιμάζει τα ωοθυλάκια για την δράση της LH και προάγει την παραγωγή οιστρογόνων μαζί με την LH. Η δράση της στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της (FSHR), η ενεργοποίηση του οποίου είναι απαραίτητη για την ορμονική λειτουργία της FSH.

Ο υποδοχέας ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται GPCRs (G protein-coupled receptor) και αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στις μεμβράνες κυττάρων της μήτρας, της ωοθήκης και των όρχεων. Το γονίδιο του υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα p21 και αποτελείται από περίπου 2.080 νουκλεοτίδια. Προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο γονίδιο του υποδοχέα της ορμόνης FSH έχουν ανιχνεύσει την ύπαρξη πολυμορφισμών μερικοί από τους οποίους είναι οι εξής: Asn680Ser, Ala189Val, Ile160Thr και Thr449Ile. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της FSH φαίνεται ότι επηρεάζουν τον τρόπο πρόσδεσης της ορμόνης με τον υποδοχέα της μεταβάλλοντας μοριακούς μηχανισμούς φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης με αποτέλεσμα μειωμένη δράση της ορμόνης. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι σε γυναίκες που πρόκειται να υποβληθούν σε IVF/ICSI η ωοθηκική διέγερση επηρεάζεται από το είδος ή τον αριθμό των αλληλομόρφων που φέρουν οι γυναίκες. Υπάρχουν πληθώρα μελετών τόσο στον ελληνικό πληθυσμό όσο και σε διεθνές επίπεδο που αφορούν στον συσχετισμό των διαφορετικών γονοτύπων με την ανταπόκριση των γυναικών σε πρωτόκολλα IVF/ICSI, ωστόσο οι απόψεις δίστανται ως προς το ποιος, τελικά, γονότυπος είναι περισσότερο ευνοϊκός για την επίτευξη της ωοθηκικής διέγερσης.

Η AMH είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων TGF-β. Η AMH παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκικών ωοθυλακίων. Αρχικά παράγεται από τα πρωτογενή ωοθυλάκια ; η παραγωγή της είναι υψηλότερη στα στάδια του δευτερογενούς και του πρώιμου τριτογενούς ωοθυλακίου (διαμέτρου μικρότερης από 4 χιλιοστά) και καθώς τα ωοθυλάκια αυξάνουν σε μέγεθος η παραγωγή της μειώνεται και στη συνέχεια σταματά. Η AMH αντανακλά σε μεγάλο βαθμό την ωοθηκική εφεδρεία των γυναικών και αποτελεί προγνωστικό παράγοντα της απόκρισης των ωοθηκών σε επικείμενη προσπάθεια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Η δράση της ορμόνης αυτής όπως και της FSH στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της με μια πρωτεΐνη υποδοχέα η οποία ονομάζεται Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR) ή AMHRII. Όπως έχει δειχθεί από έρευνες, ο υποδοχέας της AMH υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις καρκίνου τόσο των ωοθηκών όσο και του μαστού. Η έρευνα για την ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο του υποδοχέα οδήγησε στην εντόπιση πολυμορφισμών όπως ο -482 A>G, ο οποίος σχετίζεται με την δυσλειτουργία της ανάπτυξης των ωοθυλακίων σε γυναίκες από την Ιαπωνία. Ωστόσο, σχετικά με την υπογονιμότητα, οι ερευνητές δεν έχουν καταλήξει εάν τελικά υπάρχει κάποια συσχέτιση της ύπαρξης πολυμορφισμών με την ανταπόκριση γυναικών σε πρωτόκολλα IVF/ICSI.

ΣΚΟΠΟΣ:

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) των υποδοχέων της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSHR) και της αντι-μυλλέριου ορμόνης (AMHR) σε γυναίκες που συμμετέχουν σε πρωτόκολλο IVF/ICSI και σε ομάδα ελέγχου. Στόχος είναι η μελέτη της κατανομής των γονοτύπων στις 2 ομάδες γυναικών καθώς και η συνδυαστική μελέτη των γονοτύπων και ο συσχετισμός τους με παραμέτρους της IVF καθώς και την επίτευξη ή όχι εγκυμοσύνης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

Στην παρούσα μελέτη θα χρησιμοποιηθούν συνολικά δείγματα από εκατόν ογδόντα (180) γυναίκες. Από το συνολικό δείγμα, οι ογδόντα (80) γυναίκες θα αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου, ενώ οι υπόλοιπες εκατό (100) έχουν ακολουθήσει πρωτόκολλο IVF/ICSI στο τμήμα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του νοσοκομείου «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» και μπορούν να διαχωριστούν σε πενήντα (50) καλές και πενήντα (50) πτωχές απαντήτριες.

Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι:

- DNA extraction από λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των γυναικών.
- PCR αντίδραση για ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών (SNPs).
- Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.
- Real Time PCR και αξιολόγηση της καμπύλης τήξης (Melting curve analysis).
- Στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 IVF και Υπογονιμότητα

1.1.1 Υπογονιμότητα

Υπογονιμότητα ορίζεται ως αδυναμία επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης από ένα ζευγάρι αναπαραγωγικής ηλικίας, μετά την πάροδο 1 τουλάχιστον έτους, κατά την διάρκεια του οποίου είχε τακτικές, φυσιολογικές σεξουαλικές επαφές χωρίς κανένα μέτρο αντισύλληψης WHO.(Sullivan, Zegers-Hochschild et al. 2013)

Η υπογονιμότητα χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την πρωτοπαθή (70%) και την δευτεροπαθή (30%).

Πρωτοπαθής υπογονιμότητα ονομάζεται η αδυναμία ενός άτεκνου ζευγαριού να κάνει παιδιά για πρώτη φορά ενώ δευτεροπαθής υπογονιμότητα ονομάζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού που έχει μια τουλάχιστον μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη στο παρελθόν χωρίς απαραίτητα να έχει οδηγήσει στην γέννηση ενός υγιούς τέκνου.(Gurunath, Pandian et al. 2011)

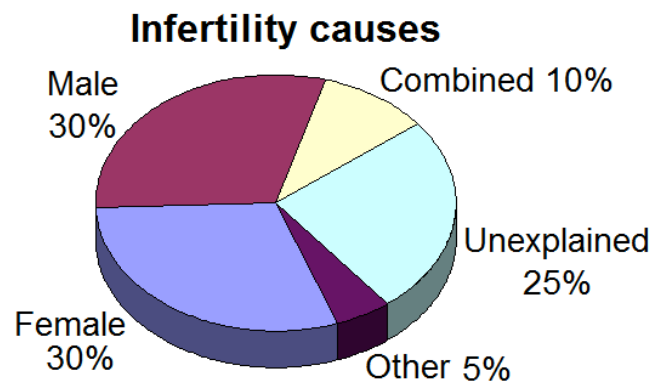
1.1.2 Αίτια Υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα είναι παγκοσμίως ένα κοινό πρόβλημα καθώς περίπου ένα στα έξι ζευγάρια αντιμετωπίζουν κάποιο πρόβλημα υπογονιμότητας. Στον γενικό πληθυσμό περίπου το 84% των γυναικών θα συλλάβουν σε ένα έτος με τακτικές σεξουαλικές επαφές και το ποσοστό αυτό αυξάνει αθροιστικά στο 92% μετά από 2 έτη και στο 93% μετά από 3 έτη. Η επίτευξη μιας φυσικής σύλληψης προϋποθέτει φυσιολογική ωοθυλακιορρηξία, εναπόθεση φυσιολογικών σπερματοζωαρίων στον οπίσθιο κοιλικό θόλο τα οποία θα κατευθυνθούν μέχρι το τμήμα της

σάλπιγγας όπου θα γίνει η γονιμοποίηση και στην συνέχεια τη μεταφορά του γονιμοποιημένου ωαρίου στην φυσιολογική μήτρα όπου θα εμφυτευθεί.

Αυτή η περίπλοκη διαδικασία εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων. Μερικοί από αυτούς είναι η ενδοκρινική λειτουργία της γυναίκας που θα οδηγήσει στην ωοθυλακιορρηξία, η ύπαρξη και μεταφορά ζωντανών και κινητών σπερματοζωαρίων, η κατάλληλη χρονική στιγμή της επαφής, η συχνότητα των επαφών και γενική κατάσταση της υγείας του ζεύγους. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιμότητα είναι η ηλικία κυρίως της γυναίκας, η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, το κάπνισμα, η παχυσαρκία ή το σημαντικά χαμηλό βάρος σώματος, η συχνή χρήση φαρμάκων, οι ναρκωτικές ουσίες καθώς και παράγοντες που αφορούν στον χώρο εργασίας.

Όμως η γονιμότητα ενός ζευγαριού εξαρτάται και από τα δύο μέλη του ζεύγους. Σε γενικές γραμμές στο 60% των περιπτώσεων υπογονιμότητας ευθύνεται είτε ο ανδρικός είτε ο γυναικείος παράγοντας, στο 10% των περιπτώσεων ευθύνονται συνδυαστικά και οι δύο πλευρές, στο 25% των περιπτώσεων υπάρχουν ανεξήγητοι λόγοι υπογονιμότητας ενώ στο υπόλοιπο 5% υπάρχουν άλλοι πιο σπάνιοι λόγοι (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Λόγοι που οδηγούν στην υπογονιμότητα.

1.1.3 Ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART-Assisted reproductive technology)

Η ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (Υ.Ι.Α.) αποτελεί μια εξειδίκευση της μαιευτικής και γυναικολογίας στόχος της οποίας είναι η απόκτηση παιδιών από υπογόνιμα ζευγάρια. Το πρώτο στάδιο αφορά στη διάγνωση και τον εντοπισμό του αιτίου ή του συνδυασμού αυτών που οδηγούν στην υπογονιμότητα. Στην συνέχεια σχεδιάζεται η θεραπευτική στρατηγική η οποία είναι εξειδικευμένη για κάθε ζεύγος. Η Υ.Ι.Α. περιλαμβάνει την ενδομήτρια σπερματέγχυση, την εξωσωματική γονιμοποίηση και τις παραλλαγές της καθώς και την

κρυοσυντήρηση. Άλλες μέθοδοι και δυνατότητες που έχουν εφαρμοστεί είναι η δωρεά γαμετών και εμβρύων, η παρένθετη μητρότητα, η μεταθανάτια γονιμότητα και η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση.

1.1.4 Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF – *in vitro* fertilisation)

Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα ωάριο γονιμοποιείται από ένα σπερματοζώαριο έξω από το σώμα της γυναίκας, υπό συνθήκες εργαστηρίου (*in vitro*). Στόχος της διαδικασίας είναι η παράκαμψη του ωαγωγού και η δυνατότητα μορφολογικής αξιολόγησης των γαμετών και της γονιμοποίησης. Ταυτόχρονα, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες τεχνικές που αφορούν είτε τους γαμέτες είτε τα ίδια τα έμβρυα όπως η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση.

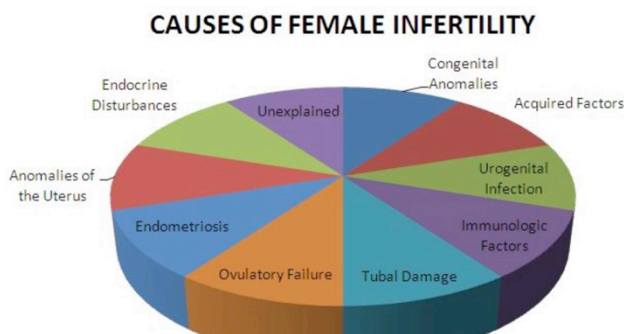
Η διαδικασία αρχικά περιλαμβάνει την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων με φαρμακευτική αγωγή, στην συνέχεια την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και την ωοληψία. Παράλληλα γίνεται λήψη και επεξεργασία του δείγματος του σπέρματος. Το επόμενο στάδιο είναι η γονιμοποίηση των ωαρίων και η καλλιέργεια τους στο εργαστήριο. Καθ' όλη την παραμονή τους στο εργαστήριο εκτιμάται αρχικά το ποσοστό των γονιμοποιημένων ωαρίων και στην συνέχεια η ανάπτυξη των εμβρύων με κριτήριο βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την επιλογή των καλύτερων εμβρύων για την μεταφορά τους στην μήτρα ή την κρυοσυντήρηση τους και την διατήρηση τους σε υγρό άζωτο μέχρι την επιλογή της κατάλληλης χρονικής στιγμής για την εμβρυομεταφορά. Το πρώτο παιδί που γεννήθηκε ύστερα από IVF σε φυσικό κύκλο χωρίς την χρήση φαρμάκων διέγερσης είναι η Louise Brown το 1978 και χάρισε στον Robert G. Edwards το Νόμπελ φυσιολογίας και Ιατρικής το 2010.

1.1.4.1 Κλινική προσέγγιση της γυναίκας

Τα αίτια της γυναικείας υπογονιμότητας είναι αρκετά πολύπλοκα καθώς αφορούν μια ποικιλία οργάνων και ενδοκρινολογικών μονοπατιών της γυναικείας φυσιολογίας. Μερικά από αυτά τα αίτια αφορούν σε (α) διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, (β) τη μη φυσιολογική λειτουργία των σαλπίνγων, (γ) την ύπαρξη περιτοναϊκών προβλημάτων όπως η ενδομητρίωση, τα ενδομητρίωματα και οι πυελικές συμφύσεις και τέλος (δ) προβλήματα που αφορούν στη

μήτρα όπως ινομυώματα, ενδομητρίτιδα, ενδομητρικές συμφύσεις και ενδομητρικούς πολύποδες.

Κατά το πρώτο διερευνητικό στάδιο αξιολόγησης της ύπαρξης γυναικείας υπογονιμότητας είναι απαραίτητο η λήψη πλήρους ιατρικού ιστορικού, η φυσική εξέταση της γυναίκας, ο έλεγχος του ωοθηκικού, του σαλπινγικού και του περιτοναϊκού παράγοντα ενώ θα πρέπει οπωσδήποτε να γίνει ενδοκρινολογικός και ανοσολογικός έλεγχος της γυναίκας.



Εικόνα 1.2: Αίτια γυναικείας υπογονιμότητας

1.1.4.2 Πρωτόκολλα πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης

Φυσικός κύκλος

Ο φυσικός εμμηνορρυσιακός κύκλος αναφέρεται εδώ παρόλο που δεν αποτελεί πρωτόκολλο φαρμακευτικής ωοθηκικής διέγερσης διότι σε κατάλληλες περιπτώσεις ακόμα και σήμερα επιλέγεται έναντι της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Συχνά, ζευγάρια, με την καθοδήγηση του ιατρού υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, θα επιλέξουν τον φυσικό εμμηνορρυσιακό κύκλο. Ο φυσικός κύκλος παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας ανά κύκλο από αυτά των κύκλων με διέγερση των ωοθηκών και αυξημένα ποσοστά ακύρωσης, κι αυτό γιατί λαμβάνει χώρα η λήψη του κυρίαρχου ωοθυλακίου μόνο. Ακόμα και στις περιπτώσεις που η λήψη και η γονιμοποίηση του ενός αυτού ωαρίου επιτευχθεί, καταλήγουμε με ένα έμβρυο για εμφύτευση. Δεν υπάρχει δηλαδή η δυνατότητα επιλογής ή κατάψυξης εμβρύων και η επιτυχία της προσπάθειας αντανακλά την ικανότητα εμφύτευσης ενός μόνο εμβρύου.

Παρ' όλα αυτά, ο φυσικός κύκλος επιλέγεται για ασθενείς που είναι πτωχές απαντήτριες σε πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών και γι' αυτές που λόγω ιατρικών συνθηκών έχουν αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών όταν υποβληθούν σε διέγερση των ωοθηκών.

Κιτρική κλομιφαίνη – hMG

Η χορήγηση της κιτρικής κλομιφαίνης (CC) προκαλεί την ελάχιστη διέγερση των ωοθηκών με στόχο να αυξηθεί ο αριθμός των ωοθυλάκιων που στρατολογούνται σε κάθε κύκλο. Η χορήγηση ξεκινά συνήθως την 3^η με 5^η ημέρα του κύκλου με δόση 50mg/ημέρα για 5 ημέρες. Η δόση μπορεί να αυξηθεί στα 100 mg ημερησίως για 5 ημέρες εάν η ωοθυλακιορρηξία δεν συμβεί με τη μικρότερη δόση στον 1^ο κύκλο. Εάν δεν έχουμε ωοθυλακιορρηξία η δόση αυξάνεται κατά 50mg μέχρι τα 150 mg/ημέρα για 5 ημέρες.

Αρχικά, το πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών στηρίζονταν στη χορήγηση μόνο κιτρικής κλομιφαίνης, αλλά αργότερα αντικαταστάθηκε με τον συνδυασμό κιτρικής κλομιφαίνης και γοναδοτροπίνης (hMG – ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνης FSH/LH) για μεγαλύτερη συνέργεια της δράσης των δύο αυτών ουσιών. Η προσθήκη της hMG αρχίζει από την 2^η , 5^η , ή 7^η ημέρα του κύκλου σε κυμαινομένη δόση αναλόγως με την ασθενή. Το ποσοστό κύησης είναι μικρότερο από το ποσοστό επιτυχούς ωοθυλακιορρηξίας και το 25% των αποβολών σημειώνονται μετά από τη χορήγηση κιτρικής κλομιφαίνης, λόγω της αντιστρογονικής της δράσης στο ενδομήτριο και ελάττωσης των υποδοχέων οιστρογόνων σ' αυτό, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της ωχρινικής φάσης. Προς αποφυγή των παραπάνω, οι ιατροί οδηγήθηκαν στην χρήση σχημάτων με μόνη την hMG.

Τα σχήματα αυτά εξατομικεύονται ανάλογα με την απάντηση της κάθε γυναίκας, συνήθως όμως η χορήγηση αρχίζει από την 3^η ημέρα ενός κύκλου 28 ημερών με 3 αμπούλες hMG καθημερινά και προσαρμόζεται στη συνέχεια ανάλογα.

Τα προβλήματα των πρωτοκόλλων αυτών είναι το μεγάλο ποσοστό ακυρωθέντων κύκλων λόγω πρώιμης αιχμής της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH και η ασύγχρονη ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Με χορήγηση της hMG κάποια ωοθυλάκια είναι περισσότερο ώριμα και άλλα

λιγότερο, αλλά η αναρρόφηση όλων γίνεται ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τα ληφθέντα ωάρια να μην είναι όλα αρκετά ώριμα για γονιμοποίηση.

Εξωγενώς χορηγούμενες γοναδοτροφίνες

Σήμερα διαθέτουμε συνθετικές και φαρμακευτικά παραγόμενες υποφυσιακές γοναδοτροπίνες που χορηγούνται με σκοπό την ανάπτυξη και την ωρίμανση πολλών ωοθυλακίων. Τα φάρμακα που κυκλοφορούν ανήκουν σε δύο κατηγορίες: τις ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες και τις γοναδοτροπίνες ούρων. Οι ορμόνες αυτές χορηγούνται με ένεση. Τα φάρμακα αυτά κυκλοφορούν: α) σε μορφή έτοιμου ενέσιμου διαλύματος, β) σε μορφή σκόνης που αναμιγνύεται με ειδικό διαλύτη για να παραχθεί ενέσιμο διάλυμα και γ) σε προγεμισμένο φυσίγγιο ή σύριγγα υπό μορφή πέννας.

Οι ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες είναι φάρμακα νέας τεχνολογίας. Η μοριακή βιολογία επέτρεψε στη φαρμακευτική βιομηχανία να εφαρμόσει την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA στην παραγωγή φαρμάκων. Σήμερα οι γοναδοτροπίνες αυτές κυκλοφορούν ευρέως με τη γενική ονομασία ανασυνδυασμένη FSH (recombinant). Οι εμπορικές τους ονομασίες είναι Puregon και Gonal-F. Επίσης κυκλοφορεί, ως προϊόν της ίδιας τεχνολογίας, η άλλη γοναδοτροπίνη (LH), με την εμπορική ονομασία Luveris.

Πρωτόκολλα με GnRH ανάλογα, αγωνιστές (GnRH-a)

Το 1984 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η χρήση αναλόγου της GnRH (GnRH-a) σε συνδυασμό με hMG σε πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης, για διέγερση των ωοθηκών. Τα GnRH ανάλογα είναι συνθετικά παράγωγα της γοναδοτροπικής εκκριντικής ορμόνης (GnRH), τα οποία έχουν προκύψει από αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος στο μόριο της GnRH. Τα παράγωγα αυτά είναι κατά πολύ δραστικότερα της GnRH και αν δοθούν σε μεγαλύτερες δόσεις από εκείνες που χρειάζονται για τη διέγερση της υπόφυσης και σε συνεχή χορήγηση, προκαλούν απευαισθητοποίηση της υπόφυσης (down regulation), ελάττωση της

έκκρισης των γοναδοτροπινών και καταστολή των ωοθηκών με παρεμπόδιση της ωοθυλακιορρηξίας.

Μελέτες που έγιναν έδειξαν ότι η χρήση των GnRH-a εμποδίζει την αιχμή της LH, ελαττώνοντας το ποσοστό των ακυρωμένων κύκλων, αλλά και βελτιώνοντας την ωοθηκική ανταπόκριση, κυρίως σε ασθενείς με φτωχά αποτελέσματα (poor responders) σε προηγούμενα πρωτόκολλα. Επιπλέον, φάνηκε να βελτιώνουν το ποσοστό γονιμοποίησης και εμφύτευσης, οδηγώντας σε μια καθαρή αύξηση του ποσοστού κυήσεων ανά κύκλο. Τα πρωτόκολλα με GnRH-a που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τρία: το βραχύ, το επιμηκυμένο και το υπερβραχύ.

- **Βραχύ πρωτόκολλο**

Το πρωτόκολλο αυτό εκμεταλλεύεται την άμεση διεγερτική δράση των GnRH-a στην υπόφυση και συμβάλλει μαζί με την hMG στη στρατολόγηση και περαιτέρω ανάπτυξη των ωοθυλάκιων. Γενικά, χορηγούνται GnRH-a από την 1^η ή 2^η ημέρα του κύκλου μαζί με την hMG και για περίπου 12 ημέρες, ανάλογα με την απάντηση των ωοθηκών. Το διάστημα αυτό είναι, θεωρητικά, αρκετό για την απευαισθητοποίηση της υπόφυσης και την αναστολή της εκκριτικής αιχμής της LH. Στην πράξη, όμως, βρέθηκε να υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό ακυρωθέντων κύκλων, μικρότερος αριθμός ληφθέντων ωαρίων, μικρότερα ποσοστά γονιμοποίησης και κυτταρικής διαίρεσης και, τελικά, μικρότερο ποσοστό κυήσεων συγκριτικά με το επιμηκυμένο πρωτόκολλο.

- **Επιμηκυμένο πρωτόκολλο**

Το πρωτόκολλο αυτό είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Εκμεταλλεύεται τη δευτεροπαθή δράση των GnRH-a στην υπόφυση. Η χορήγηση του αναλόγου ξεκινά στην αρχή του κύκλου ή στο τέλος του προηγούμενου. Μετά από 15 περίπου ημέρες επέρχεται καταστολή της υπόφυσης και αρχίζει η χορήγηση hMG ενώ συνεχίζεται και η χορήγηση του αναλόγου. Η χορήγηση του αναλόγου προτιμάται να γίνεται προς το τέλος της ωχρινικής φάσης του προηγούμενου κύκλου γιατί αν η LH είναι σε υψηλά επίπεδα τις ημέρες πριν τη

χορήγηση του αναλόγου, τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι φτωχότερα απ' ό,τι αν η LH είναι σε χαμηλά επίπεδα. Το πρωτόκολλο αυτό έχει τα καλύτερα μέχρι στιγμής αποτελέσματα συγκρινόμενο με άλλα σχήματα και επιτρέπει τον καλύτερο προγραμματισμό λήψεων των ωαρίων και γενικά τον συγχρονισμό του προγράμματος χωρίς ιδιαίτερο κόστος σε σχέση με το βραχύ.

- **Υπερβραχύ πρωτόκολλο**

Το πρωτόκολλο αυτό είναι μια παραλλαγή του βραχέος πρωτοκόλλου, κατά το οποίο το ανάλογο χορηγείται για τρεις ημέρες για να διεγείρει την ωοθήκη και μετά συνεχίζεται η εξωγενής χορήγηση μεμονωμένα γοναδοτροπινών. Η πρώιμη εκκριτική αιχμή της LH εμφανίζεται συχνότερα με αυτό το πρωτόκολλο και, συνεπώς, τα αποτελέσματά του είναι φτωχότερα συγκρινόμενα με τα δύο άλλα πρωτόκολλα. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται πολύ σπάνια, συνήθως σε πτωχές απαντήσεις για μια εντονότερη διέγερση των ωοθηκών.

Πρωτόκολλα με GnRH ανάλογα, ανταγωνιστές

Τα GnRH ανάλογα που ανταγωνίζονται τη φυσική GnRH σε επίπεδο υποδοχέων και καταλαμβάνουν αντί αυτής τον GnRH υποδοχέα καλούνται GnRH ανταγωνιστές. Αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των γοναδοτροπινών και ενεργούν μόνο στο επίπεδο της υπόφυσης. Η χορήγησή τους προκαλεί άμεσο και παροδικό υπογοναδισμό με την καταστολή της έκκρισης των LH και FSH. Η ανασταλτική τους δράση παρατηρείται γρήγορα μόλις λίγες ώρες μετά τη χορήγησή τους, δεν υπάρχει αρχική διεγερτική δράση (flare-up), όπως στους αγωνιστές και η δράση του φαρμάκου σταματά λίγες ώρες μετά το πέρας της χορήγησης. Οι δράσεις τους είναι δόσοεξαρτώμενες, προλαμβάνουν την αιχμή της LH, χωρίς να καταργούν πλήρως τις ενδογενείς γοναδοτροπίνες, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων. Επίσης, επηρεάζουν λιγότερο την ωχρινική λειτουργία σε σχέση με τους αγωνιστές. Λόγω της άμεσης αναστολής των υποδοχέων της GnRH που προκαλούν, απαιτείται για το ίδιο αποτέλεσμα μια πολύ πιο σύντομη περίοδος θεραπείας.

1.1.4.3. Ωοθηκική απόκριση

Η ωοθηκική διέγερση χρησιμοποιείται στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με σκοπό να προκληθεί η ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων και, κατ' επέκταση, να είναι δυνατή η ανάκτηση περισσότερων του ενός ωαρίου. Η ωοθηκική απόκριση στα πρωτόκολλα διέγερσης με γοναδοτροπίνες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ωοθηκικό δυναμικό της κάθε γυναίκας, το οποίο συνιστά παράγοντα επιτυχίας για την IVF (Devroey, Fauser et al. 2009).

Ως ωοθηκική απόκριση ορίζεται η αντίδραση των ωοθηκών σε οποιοδήποτε εξωγενές ερέθισμα, ενώ η εκτίμηση αυτής πρέπει να γίνεται σε σχέση με το εν χρήσει πρωτόκολλο διέγερσης, συμπεριλαμβανομένης της ημερήσιας και/ή συνολικής δόσης της χορηγηθείσας FSH και οποιοδήποτε άλλου παράλληλου σχήματος. Γενικά, έχει προταθεί να εκτιμάται η ωοθηκική απόκριση ως η απόκριση της γυναίκας στη διέγερση με γοναδοτροπίνες.

Επομένως, οι ασθενείς της εξωσωματικής είναι δυνατόν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ωοθηκική απόκριση στο διεγερτικό πρωτόκολλο. Δεν υπάρχουν παγκοσμίως αποδεκτοί ορισμοί που να προσδιορίζουν τις τρεις αυτές κατηγορίες με ακρίβεια, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυσκολίες στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών (Tarlatzis, Zepiridis et al. 2003, Verberg, Eijkemans et al. 2009).

Καλές απαντήτριες – Good Responders

Είναι γυναίκες με φυσιολογική ωοθηκική εφεδρεία, οι οποίες αναπτύσσουν κατά μέσο όρο 8-10 κυρίαρχα ωοθυλάκια σε απόκριση της συμβατικής ωοθηκικής διέγερσης, με τον αντίστοιχο αριθμό των ωαρίων (Broekmans, Kwee et al. 2006).

Πτωχές απαντήτριες – Poor Responders

Ο όρος αυτός αφορά ένα ποσοστό γυναικών (2-30 %) που υπόκειται σε ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση για τις οποίες δεν υπήρχαν μέχρι πρόσφατα σαφή και παγκοσμίως αποδεκτά κριτήρια για τον προσδιορισμό τους. Στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης μπορεί να προσδιοριστεί ως η αποτυχία στρατολόγησης και ανάπτυξης επαρκούς αριθμού ωοθυλακίων

που θα οδηγήσουν στην ανάκτηση ώριμων ωαρίων και/ή η επίτευξη μιας αιχμής της οιστραδιόλης μικρότερης από μια καθορισμένη τιμή που προσδιορίζεται ως ελάχιστη τιμή και η οποία ποικίλει ανάλογα με το κέντρο (Keay, Liversedge et al. 1997).

Ορισμένα από τα κριτήρια, που έχουν χρησιμοποιηθεί παλαιότερα από τα κέντρα εξωσωματικής και έχουν προκύψει από μελέτες, για τον προσδιορισμό των πτωχών απαντητριών είναι τα εξής:

1. Ο αριθμός των αναπτυσσόμενων ωοθυλάκιων και/ή ο αριθμός των ανακτηθέντων ωαρίων
 - είναι μικρότερος από 3 – 5 κυρίαρχα ωοθυλάκια την ημέρα χορήγησης της hCG (Land, Yarmolinskaya et al. 1996, Raga, Bonilla-Musoles et al. 1999) και/ή
 - είναι μικρότερος από 3 – 5 ανακτηθέντα ωάρια (Rombauts, Suikkari et al. 1998, Surrey, Bower et al. 1998)
2. Χαμηλή αιχμή οιστραδιόλης E2
 - Μικρότερη από 300 – 500 pg/ml (Raga, Bonilla-Musoles et al. 1999)
 - Μικρότερη από 100 pg/ml την 5η ημέρα διέγερσης (Schoolcraft, Schlenker et al. 1997)
3. Αυξημένα επίπεδα FSH την 3η ημέρα μεγαλύτερα των 7 – 15 mIU/ml (Karande, Morris et al. 1997, Faber, Mayer et al. 1998)
4. Προχωρημένη ηλικία ασθενούς (άνω των 40 ετών) (Karande, Morris et al. 1997)
5. Χαμηλή ή μη απόκριση στο τεστ δοκιμασίας με κιτρική κλομιφαίνη (CC) (Navot, Rosenwaks et al. 1987)
6. Μη επιτυχές Lupron screening test (Katayama, Roesler et al. 1988)
7. Ύπαρξη τουλάχιστον ενός ακυρωθέντος κύκλου IVF (Schachter, Friedler et al. 2001)
8. Αυξημένη χορήγηση hMG ή FSH (Shaker, Fleming et al. 1992)
9. Ανάγκη για αυξημένη δόση εξωγενώς χορηγούμενων γοναδοτροπινών (πάνω από 300 IU/ημέρα) (Faber, Mayer et al. 1998)
10. Επιμήκυνση του πρωτοκόλλου διέγερσης (Toth, Awwad et al. 1996)

Τον Ιούλιο του 2011 θεσπίστηκαν από την σύνοδο της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) τα κριτήρια της Μπολόνια (Ferraretti, La Marca et al. 2011) τα

οποία συμπεριέλαβαν όλες τις προηγούμενες μελέτες και έδωσαν ένα τελικό ορισμό για τις πτωχές απαντήτριες και έκτοτε χρησιμοποιούνται πανευρωπαϊκά από τα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Βάσει των κριτηρίων της Bologna πτωχές απαντήτριες είναι οι γυναίκες με:

1. ηλικία μεγαλύτερη ή ίση των 40 ετών,
2. προηγούμενους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης με φτωχή ανταπόκριση (≤ 3 ωάρια) με τη συνήθη δόση φαρμάκων,
3. λίγες καταβολές ωοθυλακίων $< 5-7$ ωοθυλάκια και χαμηλή AMH (ορμόνη Anti-Müllerian $< 0.5-1.1 \text{ ng/ml}$)

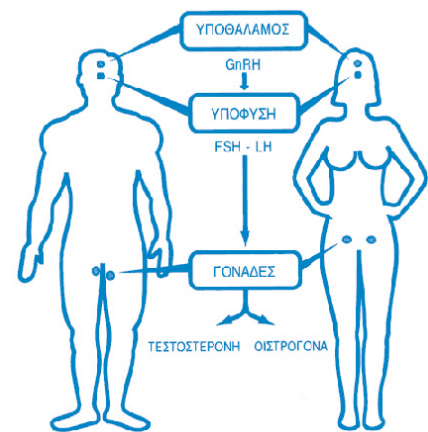
Σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών - OHSS

Το σύνδρομο αναφέρεται στην υπερβολική απόκριση των ωοθηκών στη διέγερση με γοναδοτροπίνες και σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων: ήπιο σύνδρομο, που χρειάζεται απλή παρακολούθηση, έως σοβαρό που απαιτεί εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας, ενώ παράλληλα εγκυμονεί κίνδυνο για τη ζωή της ασθενούς. Η έκκριση των ωοθηκών που περιέχουν πλέον πολλαπλά ωχρά σωματίδια ευθύνεται για την παραγωγή διαφόρων αγγειοκινητικών παραγόντων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την έξοδο υγρού από τα αγγεία το οποίο συσσωρεύεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ασκίτη. Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του OHSS είναι η μικρή ηλικία της γυναίκας, ο χαμηλός δείκτης μάζας σώματος, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, το προηγούμενο ιστορικό OHSS και η υψηλή τιμή οιστραδιόλης E2 την ημέρα χορήγησης της hCG. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση εμφάνισης του συνδρόμου με υψηλές τιμές της AMH (La Marca, Sighinolfi et al. 2010).

1.2 Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη – FSH (follicle stimulating hormone)

Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη ή FSH είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, και μαζί με την ωχρινοποιητική ορμόνη ή LH ονομάζονται **γοναδοτροπίνες**. Το διεγερτικό σήμα για την έκκριση των γοναδοτροπινών από την αδenoϋπόφυση ξεκινάει από τον υποθάλαμο, με την έκκριση της ορμόνης γοναδορελίνη ή GnRH, κατά ώσεις. (εικόνα 1.3)

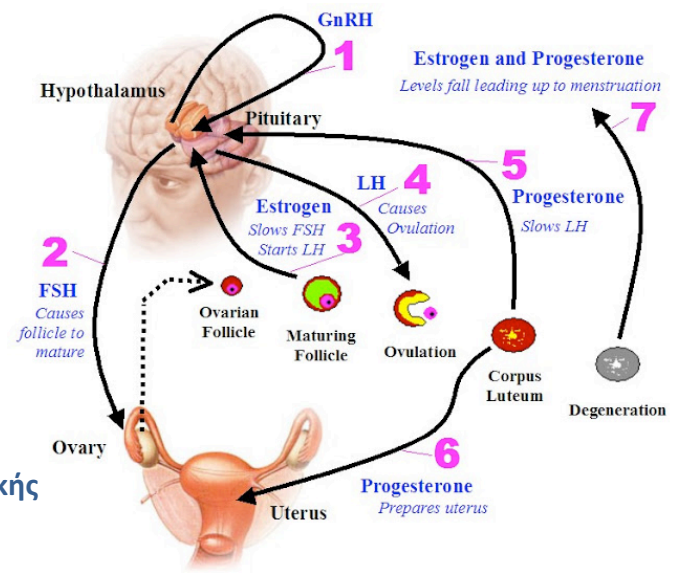
Στις γυναίκες η FSH προάγει την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας. Επίσης, προάγει τη διαδικασία της αρωματοποίησης (δηλαδή της παραγωγής οιστραδιόλης από τα ανδρογόνα, που προέρχονται από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθηκών). Στους άνδρες η FSH συμμετέχει στην διαφοροποίηση των σπερματοκυττάρων. Η FSH διεγείρει κύτταρα του Sertoli των όρχεων να παράγουν μια πρωτεΐνη, την ABP (Androgen Binding Protein). Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύει την τεστοστερόνη, που είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της σπερματογένεσης.



Εικόνα 1.3: Άξονας υποθάλαμο-υπόφυση-ωοθήκες/όρχεις

Η καταστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών γίνεται από τις ορμόνες του φύλου (οιστρογόνα, προγεστερόνη και τεστοστερόνη), οι οποίες εκκρίνονται από τις γονάδες, δημιουργώντας έτσι ένα κύκλωμα αρνητικής ανατροφοδότησης (feedback). (εικόνα 1.4)

Εικόνα 1.4: Κύκλωμα αρνητικής ανατροφοδότησης (feedback)

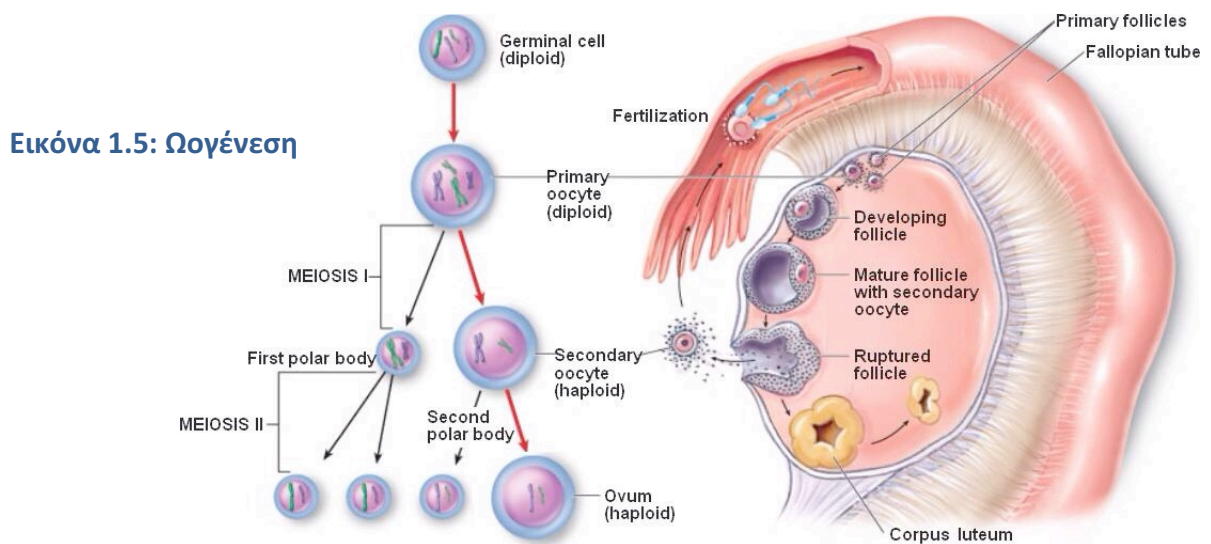


1.2.1 Ωογένεση και Ωοθυλακική Ανάπτυξη

1.2.1.1 Ωογένεση

Η διαδικασία της **ωογένεσης** περιλαμβάνει τις μεταβολές των γεννητικών κυττάρων του θήλεος από την αρχική καταβολή τους ως την πλήρη ωρίμανσή τους (Κεράμεος-Φορόγλου 1987).

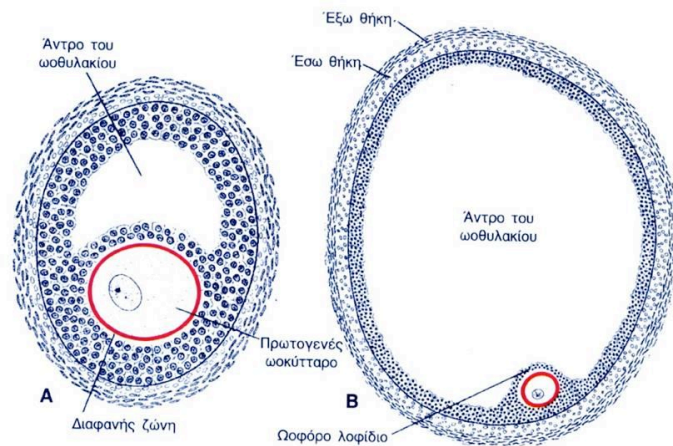
Κατά τη γέννηση, οι ωοθήκες περιέχουν περίπου 1 έως 2 εκατομμύρια ωοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται σταματημένα στο στάδιο της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (Roberts, Iatroulou et al. 2005). Καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας, ομάδες αρχέγονων ωοθυλακίων ξεκινούν να αναπτύσσονται ενώ όλα τα υπόλοιπα καταστρέφονται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται **ατρησία**, με αποτέλεσμα στην αρχή της εφηβείας να υπάρχουν μόνο 400.000 και στις δύο ωοθήκες. Είναι γνωστό πως αρχέγονα ωοθυλάκια εισέρχονται σε φάση ανάπτυξης ακόμη και κατά τη διάρκεια των κυήσεων, του θηλασμού, σε ανωοθυλακιορρηκτικές καταστάσεις και στην περιεμμηνόπαυση. Από την αρχική δεξαμενή ωοθυλακίων, στη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας, μερικά μόνο (περίπου 400) προορίζονται για ωορρηξία (Peters 1969).



1.2.1.2 Ωοθυλακική ανάπτυξη

Η **ωοθυλακική ανάπτυξη** αποτελεί το σύνολο των μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών που παρατηρούνται στο ωοθυλάκιο από το σχηματισμό του αρχέγονου ωοθυλακίου μέχρι την ωοθυλακιορρηξία, κατά την οποία απελευθερώνεται το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Κάθε εμμηνορρυσιακός κύκλος αποσκοπεί στην ανάπτυξη και ωρίμανση ωοθυλακίων, με σκοπό την επικράτηση ενός μοναδικού ωοθυλακίου (Βλασοπούλου and Κουκούλης 2002).

Η ωοθυλακική ανάπτυξη ξεκινά από την εμβρυϊκή ηλικία με τη σταδιακή μεταμόρφωση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε ωάρια και τον εγκλεισμό αυτών σε δομές που ονομάζονται ωοθυλάκια. Η θεμελιώδης αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης είναι το ωοθυλάκιο το οποίο αποτελείται από το ωκύτταρο, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης που το περιβάλλουν (Messinis 2005).



Εικόνα 1.6: Ωοθυλάκιο προς ωρίμανση (με άντρο)

Η **ωοθυλακιογένεση** είναι σύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. **Στρατολόγηση αρχέγονων ωοθυλακίων**, που χαρακτηρίζεται από την έναρξη της ωρίμανσης των αρχέγονων ωοθυλακίων. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εντοπίζονται στο φλοιό της ωοθήκης και αποτελούν τη δεξαμενή των ωοθυλακίων από την οποία ξεκινούν καθημερινά κάποια τη διαδικασία της ωρίμανσης. Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων που μπαίνουν σε φάση ωρίμανσης εξαρτάται από το συνολικό αριθμό

τους και μειώνεται με την ηλικία (Faddy and Gosden 1995). Η στρατολόγηση των ωοθυλάκιων ελέγχεται από τοπικούς ενδοωθηκικούς παράγοντες της ωοθήκης και είναι ανεξάρτητη της δράσεως των υποφυσιακών γοναδοτροπινών (Loutradis, Kiarrekou et al. 2006).

2. Βασική ωοθυλακική ανάπτυξη, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό του πρωτογενούς και δευτερογενούς ωοθυλάκιου. Σε αντίθεση με το πρωτογενές ωοθυλάκιο, η διαφοροποίηση του δευτερογενούς ωοθυλάκιου εξαρτάται από τις FSH και LH αλλά και από τοπικούς αυτορυθμιστικούς μηχανισμούς. Σε αυτό το στάδιο υποδοχείς LH υπάρχουν μόνο στα κύτταρα της έσω θήκης, ενώ υποδοχείς FSH εντοπίζονται μόνο στα κοκκώδη κύτταρα (Patsoula, Loutradis et al. 2003, Kiarrekou, Loutradis et al. 2005, Kiarrekou, Zarpanti et al. 2006). Ωστόσο, από το στάδιο σχηματισμού του άντρου μέχρι την ωοθυλακιορρηξία, η ανάπτυξη των ωοθυλάκιων υπόκειται σε ενδοκρινολογικό έλεγχο, κυρίως από την FSH, ενώ λίγο πριν την ωορρηξία εμφανίζονται και στα κοκκώδη κύτταρα υποδοχείς της LH (van der Stege and van der Linden 2001, Smitz and Cortvrindt 2002, Patsoula, Loutradis et al. 2003).

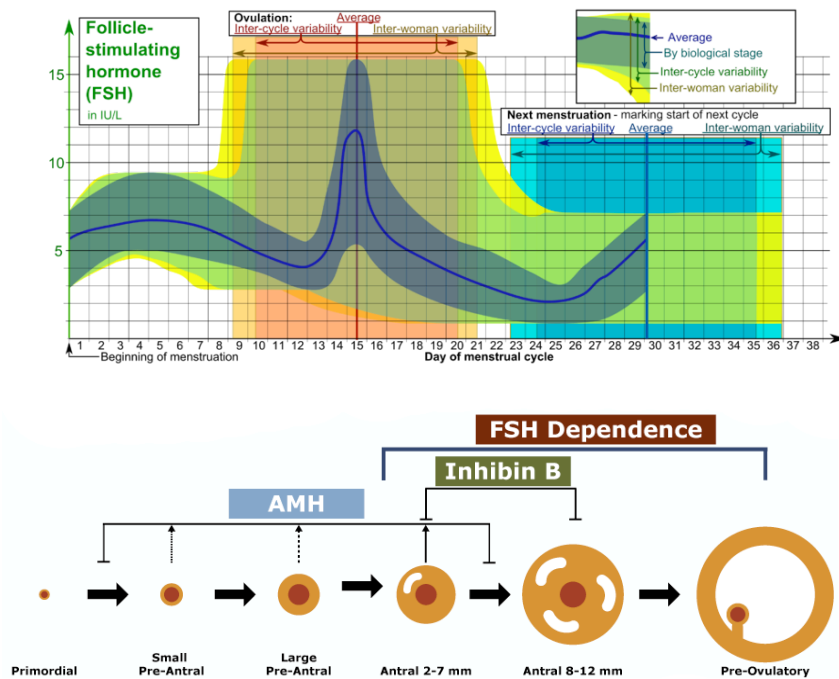
3. Επιλογή και ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλάκιου, μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία όπου συμμετέχουν πλήθος ορμονών και άλλων παραγόντων, χωρίς όμως να έχουν εξιχνιαστεί πλήρως οι μηχανισμοί που τη διέπουν (Salha, Abusheikha et al. 1998, Kiarrekou, Loutradis et al. 2005).

Η ωοθυλακική ωρίμανση φαίνεται να ρυθμίζεται κυρίως από τις γοναδοτροπίνες οι οποίες δεν είναι όμως ικανές από μόνες τους να αρχίσουν και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμασης (Halpin, Charlton et al. 1986, Ataya, Tadros et al. 1989). Άλλες ορμόνες όπως οι GH, IGF-1, PRL, TSH επηρεάζουν την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωαρίων (Howe, Lintern-Moore et al. 1978, Zhu, Ohan et al. 1998, Zhao, Taverne et al. 2001, Kiarrekou, Loutradis et al. 2005), τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Oda, Yoshimura et al. 1991, Yoshimura, Nakamura et al. 1991).

1.2.2 FSH και Φυσιολογία Ωοθήκης

Η έκκριση της FSH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης επηρεάζεται από τρεις ορμόνες πεπτιδικής φύσης, την ινχιμπίνη (ή ανασταλίνη), την ακτιβίνη και τη φολιστατίνη, οι οποίες δημιουργούν ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό κύκλωμα (εκτός από την GnRH στην οποία αναφερθήκαμε προηγουμένως). Η συγκέντρωση της FSH εμφανίζει τη μέγιστη τιμή της στο μέσο του κύκλου, κατά την ωοθυλακιορρηξία. Η εκκριτική αυτή αιχμή είναι μικρότερη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη εκκριτική αιχμή της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH). Μια δεύτερη, μικρότερη αιχμή παρατηρείται αμέσως πριν την εμμηνορρυσία, λόγω άρσης της αναστολής της οιστρογονικής δράσης στην υποθαλαμική GnRH, λόγω της προοδευτικής ελάττωσης παραγωγής των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο στο τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Εικόνα 1.7:
Ενδοκρινολογική
ρύθμιση του
εμμηνορρυσιακού
κύκλου



Τα επίπεδα της FSH είναι χαμηλά προ της ήβης. Μετά την εμμηνόπαυση, η συγκέντρωση της FSH είναι υψηλή, επίσης λόγω ελάττωσης των οιστρογόνων και της άρσης της αναστολής, που αυτά προκαλούν στον υποθάλαμο.

Με την πάροδο της ηλικίας μειώνεται αισθητά η ωοθηκική παρακαταθήκη μιας γυναίκας και

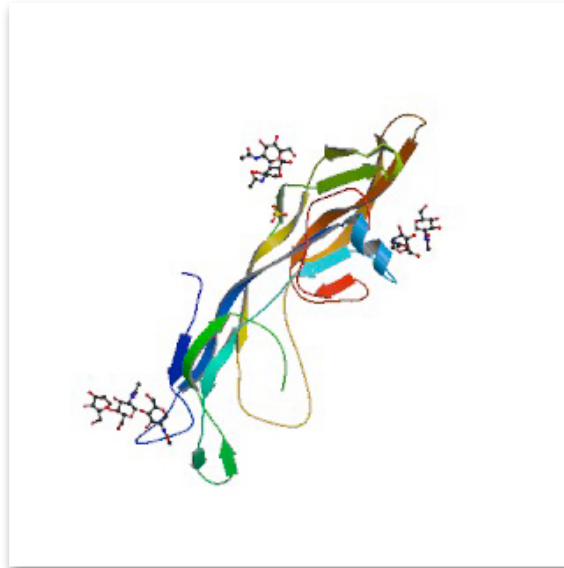
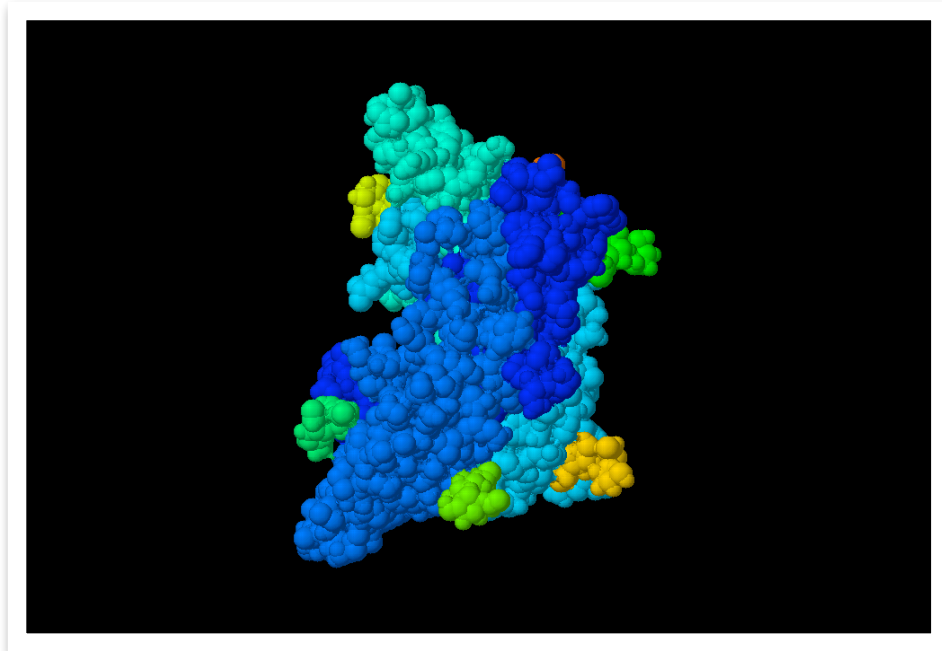
κατ' επέκταση η αναπαραγωγική της ικανότητα. Είναι λοιπόν απαραίτητη η εύρεση κριτηρίων εκτίμησης του ωθητικού αυτού αποθέματος της γυναίκας. Η εκτίμηση της βασικής τιμής της FSH του ορού την 3^η ημέρα του κύκλου φαίνεται να αποτελεί το πιο συχνά εφαρμόσιμο τεσ-δοκιμασία αξιολόγησης της **ωθητικής εφεδρείας**, καθώς αντιπροσωπεύει τα βασικά ή μη κατεσταλμένα επίπεδα της FSH, μέσω του παλίνδρομου μηχανισμού αλληλορύθμισης στην υπόφυση, ενώ παράλληλα παρέχει πληροφορίες σχετικά με το πόσο καλά ή όχι λειτουργεί ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση- γονάδες (Barnhart and Osheroff 1998).

Έχει βρεθεί ότι αυτή η οριακή τιμή (cut-off) της FSH πάνω από την οποία δεν επιτυγχάνεται κύηση μπορεί να αντιπροσωπεύεται είτε από αρκετά χαμηλές τιμές όπως 8 IU/L (van der Steeg, Steures et al. 2007) είτε από υψηλότερες τιμές όπως 15 IU/mL (Ashrafi, Madani et al. 2005), αλλά και από ενδιάμεσες τιμές αυτών (Watt, Legedza et al. 2000, Klinkert, Broekmans et al. 2005, Luna, Grunfeld et al. 2007).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι, αν και η εκτίμηση της FSH την 3η ημέρα του κύκλου είναι ευρέως εφαρμόσιμη κλινική πρακτική, η ακρίβεια που προσφέρει ως προγνωστικός δείκτης μιας φτωχής ωθητικής απόκρισης έχει νόημα μόνο όταν χρησιμοποιούνται πολύ υψηλές οριακές τιμές (thresholds) της ορμόνης. Επιπλέον, η διακύμανση των επιπέδων της FSH που παρουσιάζει την 3η ημέρα κάθε καταμήνιος κύκλος καθιστά δύσκολη την αξιολόγηση της ωθητικής παρακαταθήκης μιας γυναίκας, καθώς τα χαμηλά επίπεδα FSH καταδεικνύουν ικανοποιητική ωθητική εφεδρεία, ενώ τα υψηλά αντιπροσωπεύουν τη φθίνουσα πορεία του ωθητικού δυναμικού. Για το λόγο αυτό, μια μονάχα μέτρηση της βασικής FSH την 3^η ημέρα ίσως δεν είναι αξιόπιστη. Συνίσταται και μια δεύτερη εκτίμηση των επιπέδων της την 3^η ημέρα του επομένου καταμήνιου κύκλου (Perloe, Levy et al. 2000). Επιπλέον, μια αυξημένη τιμή FSH του ορού θεωρείται όψιμος προγνωστικός δείκτης μιας ήδη παρατηρούμενης μείωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας μιας γυναίκας. Για αυτό και είναι σκόπιμο να βρεθεί ένας άλλος δείκτης που θα αποτελεί πρώιμη ένδειξη της μείωσης της ωθητικής εφεδρείας ή και της μειωμένης ικανότητας γονιμοποίησης (Sharara, Scott et al. 1998).

1.2.3 Δομή FSH

Η FSH παρουσιάζει παρόμοια χημική δομή με άλλες γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες, όπως η LH, η β-hCG και η TSH. Συγκεκριμένα, οι ορμόνες αυτές αποτελούνται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, την α και τη β. Η α-υπομονάδα είναι κοινή, ενώ η β-υπομονάδα διαφέρει και δίνει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην ορμόνη, δηλαδή την ειδική βιολογική της δράση.

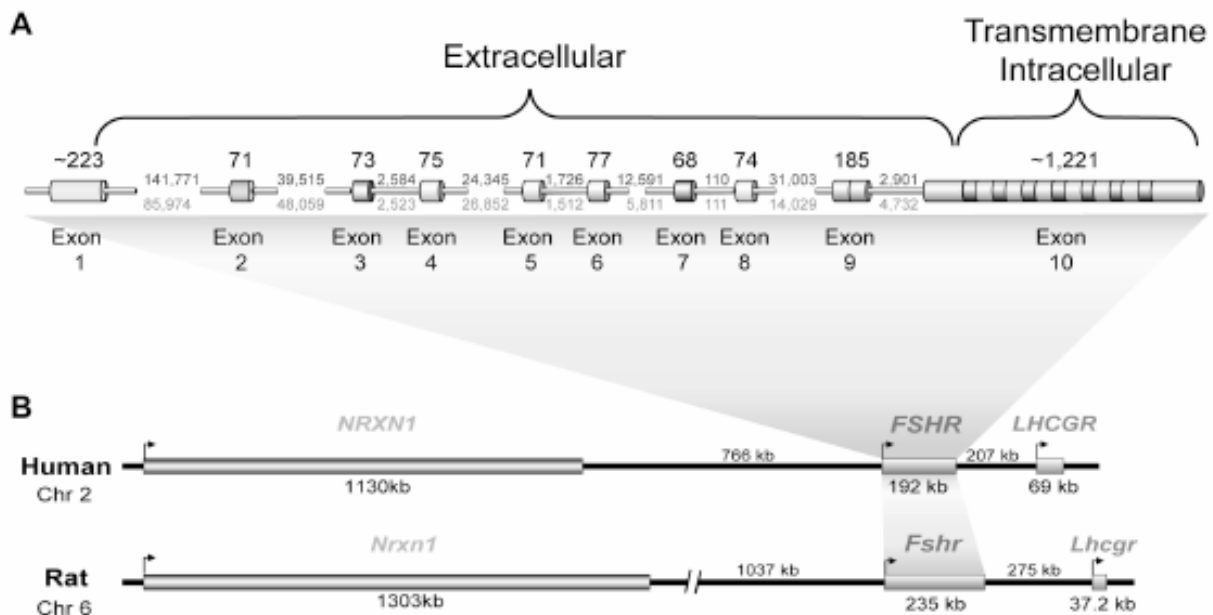


Εικόνα 1.8: Κρυσταλλική δομή της FSH

1.2.4 Υποδοχέας FSH - FSHR

1.2.4.1 Το γονίδιο του υποδοχέα FSHR

Το γονίδιο του υποδοχέα της FSH (FSHR) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 p21- p16 και αποτελεί μια περιοχή μήκους 54kb. Ο υποδοχέας της FSH ανήκει στην οικογένεια των συζευγμένων με τις G πρωτεΐνες υποδοχέων (G protein-coupled receptors) και αποτελείται από 678 αμινοξέα που σχηματίζουν 7 διαμεμβρανικά τμήματα (Gromoll and Simoni 2005). Η μεταγραφή του γονιδίου οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης που αποτελεί τον υποδοχέα της FSH. Η πρώτη απόπειρα παραγωγής κλώνου της αλληλουχίας του γονιδίου FSHR πραγματοποιήθηκε το 1989 (Simoni, Gromoll et al. 1997) ενώ σήμερα, η αλληλουχία του γονιδίου είναι γνωστή και διατίθεται στην GenBank (accession number: NG_008146).



Εικόνα 1.9: Οργάνωση του γονιδίου του υποδοχέα της FSH - FSHR

Η έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της FSH πραγματοποιείται στην ωοθήκη και στον όρχι, με αποτέλεσμα τα μόρια του υποδοχέα της FSH να εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων της ωοθήκης και των κυττάρων Sertoli του όρχι, αντιστοίχως (Lussiana, Guani et al. 2008). Όπως φαίνεται, η FSH έχει ειδική δράση στα ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου του FSHR με αποτέλεσμα χαμηλές τιμές FSH οδηγούν σε μεταγραφή του γονιδίου FSHR (σύνθεση mRNA) και αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της FSH. Αντιστοίχως, υψηλές τιμές FSH οδηγούν σε μείωση των επιπέδων mRNA (down-regulation) και κατ'επέκταση μειωμένες θέσεις σύνδεσης για την FSH. Επιπρόσθετοι παρακρινικοί παράγοντες εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Μερικοί από αυτούς είναι η ακτιβίνη (σε χαμηλές δόσεις) και ο παράγοντας TGF-β που ενισχύουν τη μετάφραση του γονιδίου, ενώ παράγοντες όπως οι EGF, IGF-1 και FGF δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες, οδηγώντας στη μείωση της απαντητικότητας του κυττάρου στην FSH.

Μειωμένα επίπεδα mRNA του γονιδίου FSHR και μειωμένη απαντητικότητα στην FSH σχετίζονται με την ωοθυλακική ατρησία. Κατά την περι-εμμηνόπαυση παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα FSH και μειωμένη έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της FSH, ενώ κατά την εμμηνόπαυση δεν ανιχνεύονται υποδοχείς της FSH.

Στα πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής πραγματοποιείται εξωγενής χορήγηση της FSH αποτέλεσμα να αυξάνεται την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

1.2.4.2 Η πρωτεΐνη του υποδοχέα της FSH – FSHR

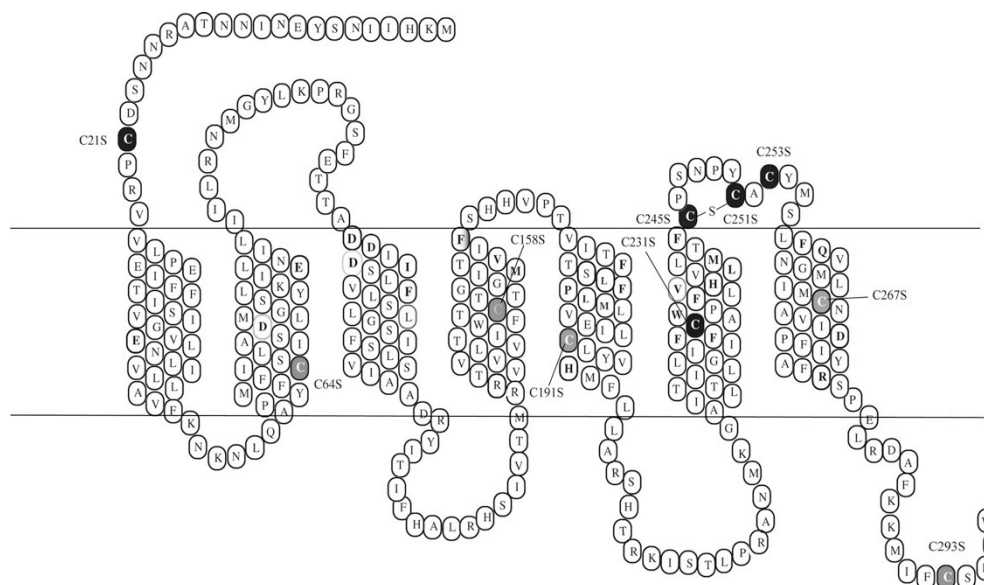
Ο υποδοχέας της FSH ανήκει στην οικογένεια των συζευγμένων με τις G πρωτεΐνες υποδοχέων (G protein-coupled receptors) και αποτελείται από 678 αμινοξέα που σχηματίζουν 7 διαμεμβρανικά τμήματα. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης υπολογίζεται μεταξύ 75 και 76,5 kDa. Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα είναι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την FSH. Η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης και υποδοχέα είναι ταχεία και ειδική και εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία (Simoni, Gromoll et al. 1997).

Αυτό το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα αποτελείται από τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα LRR (leucine-rich-repeats) που είναι πλούσια σε λευκίνη και είναι το σημείο κλειδί για τον σχηματισμό της θέσης σύνδεσης του υποδοχέα με την πρωτεΐνη (Gromoll, Rekel et al. 1996).

Το διαμεμβρανικό τμήμα αποτελείται από 264 αμινοξέα και χαρακτηρίζεται από 7 υδροφοβικές αλληλουχίες α-έλικας και καθεμιά από τις αλληλουχίες αποτελείται από 20-25 αμινοξέα (Lussiana, Guani et al. 2008). Η σύνδεση των αλληλουχιών γίνεται μέσω εναλλασσόμενων ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών βρόχων οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το μόριο της ορμόνης παρόλο που δεν είναι απαραίτητοι για την διαδικασία της σύνδεσης του μορίου με τον υποδοχέα.

Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα είναι το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου και αποτελείται από 65 αμινοξέα. Είναι πλούσιο σε αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης τα οποία συμμετέχουν μέσω φωσφορυλίωσης στην μετάδοση του σήματος μετά την σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της (Gromoll and Simoni 2005).

Τα μόρια του υποδοχέα βρίσκονται διάσπαρτα στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων με ομοιογενή τρόπο. Έχει παρατηρηθεί ότι μετά την πρόσδεση του μορίου της FSH στον υποδοχέα της γίνεται μείωση της έκφρασης του υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω κυκλώματος αρνητικής ρύθμισης (negative feedback loop).



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα της FSH

1.2.4.3 Σύνδεση με τον υποδοχέα και μετάδοση σήματος

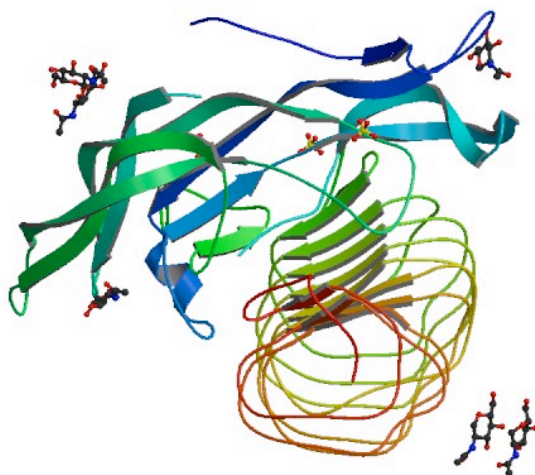
Ο υποδοχέας της FSH, μετά τη σύνθεσή του στα κοκκώδη κύτταρα, γλυκοσυλιώνεται και στη συνέχεια μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου διανέμεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια αυτής μέσω μεμβρανικών συμπλεγμάτων (clusters). Ο υποδοχέας της FSH είναι μία γλυκοπρωτεΐνη της οποίας η αλληλεπίδραση με την FSH εξαρτάται μερικώς από την παρουσία των φωσφολιπιδίων και την ακεραιότητα των δισουλφιδικών δεσμών, τα οποία σταθεροποιούν την τριτοταγή δομή της.

Στην κυτταρική μεμβράνη, ο υποδοχέας της FSH (FSHR) μπορεί να εντοπιστεί σε δύο μορφές: ανενεργός και ενεργός. Ο δεύτερος προκύπτει από αλλαγή στη δομή του πρώτου και αυτό γιατί φαίνεται πως όχι όλοι οι υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι ταυτόχρονα διαθέσιμοι για σύνδεση. Υπάρχει τοπική ενζυματική δραστηριότητα η οποία διαφοροποιεί τις δράσεις της FSH καλύπτοντας και από-καλύπτοντας τους υποδοχείς.

Η σύνδεση της FSH με τον υποδοχέα της είναι ταχεία, ειδική, διαθέτει βαθμό κορεσμού και εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για την πραγματοποίηση της σύνδεσης απαιτείται το μεγαλύτερο μέρος του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, όπου και βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης της ορμόνης και το οποίο εμφανίζει ειδικότητα για αυτή τη γοναδοτροπίνη (Εικόνα 10). Ο υποδοχέας ενεργοποιείται μετά από μετατροπή στη μοριακή δομή του. Ορισμένες φορές, παρόλο που δεν θεωρείται απολύτως απαραίτητο, ο διμερισμός (dimerization) του υποδοχέα μπορεί να είναι χρήσιμος στη σταθεροποίηση της σύνδεσης με την ορμόνη και στη διευκόλυνση της μετάδοσης του σήματος.

Η σύνδεση με την FSH και η μετάδοση του σήματος αποτελούν δύο διαφορετικές λειτουργίες του υποδοχέα. Μετά τη σύνδεση της ορμόνης, ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με την G-πρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της συνδέεται με το μόριο GTP (co-factor guanidyl triphosphate) το οποίο διεγείρει το ένζυμο αδενοκυκλάση για τη σύνθεση του δεύτερου αγγελιοφόρου, του κυκλικού AMP (cAMP). Η αύξηση της παραγωγής του cAMP μέσα στα κοκκώδη και τα Sertoli κύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης-κινάσης A (PKA), η οποία προκαλεί φωσφορυλιώσεις δομικών πρωτεϊνών, ενζύμων καθώς και ρυθμιστών της μεταγραφής. Παράλληλα, η αύξηση της παραγωγής του cAMP στα κύτταρα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της

δραστηριότητας του υποδοχέα της FSH. Το σύνολο των στοιχείων που απαντούν στο κυκλικό AMP (cAMP responsive elements or CRE), των συνδεόμενων πρωτεϊνών (CREBs) και ρυθμιστών (CREMs) είναι ιδιαίτερα σημαντικά ως δευτερογενείς μεσολαβητές στη μετάδοση του σήματος της FSH (Lussiana, Guani et al. 2008). Εκτός από την αλληλεπίδραση με την G-πρωτεΐνη, η σύνδεση της FSH στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων αυξάνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο Ca^{2+} , το οποίο με τη σειρά του εντείνει/πολλαπλασιάζει τις δράσεις του cAMP. Τα ενδοκυττάρια γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα της FSH είναι: α. ρύθμιση μεταβολικών λειτουργιών και β. επαγωγή ή αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων που διαθέτουν CRE στοιχεία στην περιοχή του υποκινητή τους.

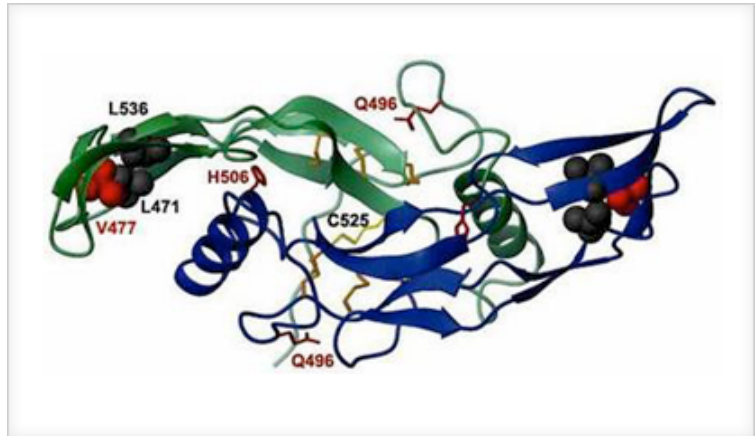


Εικόνα 1.10: Κρυσταλλική δομή της σύνδεσης FSH-FSHR

Η συνεχής έκθεση στην FSH οδηγεί σε μία προοδευτικά μειούμενη απάντηση, μία απευαισθητοποίηση που συνδέεται πιθανότατα με down-regulation του FSHR. Το πρώτο βήμα για το down-regulation του FSHR αποτελεί η μείωση του αριθμού των FSHR λόγω εσωτερικοποίησης (internalization) και καταστροφής των συμπλεγμάτων ορμόνης-υποδοχέα μέσα στα λυσοσώματα, φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα 1 με 4 ώρες μετά τη διέγερση από την FSH. Ύστερα από 24 ώρες, ακολουθεί η μείωση της σύνθεσης του μορίου του υποδοχέα FSHR, που αποτελεί το δεύτερο down-regulation μηχανισμό, που έχει σημαίνει τον κορεσμό στο ερέθισμα της FSH.

1.3 Αντιμυλλέριος ορμόνη – AMH (Anti- Mullerian Hormone)

Η ανασταλτική ορμόνη των πόρων του Müller ή AMH όπως ονομάζεται (Anti-Müllerian Hormone) ή MIS (Müllerian Inhibiting Substance) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και αποτελεί ένα από τα πρωιμότερα ορμονικά προϊόντα των εμβρυικών κυττάρων Sertoli και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του φύλου του άρρενος εμβρύου. Η ύπαρξή της AMH αναφέρθηκε πρώτη φορά από το Γάλλο ερευνητή Alfred Jost το 1940 (Josso 1973).



Εικόνα 1.11: Κρυσταλλική δομή μορίου AMH

1.3.1. Ο ρόλος της AMH στη φυσιολογία της ωοθήκης

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ωοθυλακίων αποτελούν πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες αρχικά ρυθμίζονται ανεξάρτητα από τις γοναδοτροπίνες ενώ στα τελικά στάδια υπόκεινται στην επίδραση της FSH (Fauser and Van Heusden 1997).

Ο ρόλος της AMH στη φυσιολογία της ωοθήκης φαίνεται ότι αφορά στα εξής δύο στάδια της ωοθυλακιογένεσης: α) στην αρχική στρατολόγηση των ωοθυλακίων από το πλήθος των αρχέγονων (initial recruitment) και β) στην κυκλική στρατολόγηση, κατά την οποία, παραγόμενη από τα κοκκώδη κύτταρα των πρωτογενών ωοθυλακίων και δρώντας αυτοκρινικά και παρακρινικά, αναστέλλει την εξελικτική πορεία της ωοθυλακιογένεσης (Weenen, Laven et al. 2004).

Είναι γνωστό ότι η AMH παρεμποδίζει τη δράση της FSH, τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο: δημιουργεί «αντίσταση» των κοκκωδών στη δράση της FSH τοπικά, και καταστέλλει την FSH συστηματικά, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της στεροειδογένεσης και της εξέλιξης των ωοθυλακίων, φαινόμενο ιδιαίτερα έντονο στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Πανίδης, Κανδαράκη, Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, Εντατική εκπαίδευση στις γονάδες, 2010). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν το ρόλο της AMH ως συν-ρυθμιστή της στεροειδογένεσης στα κοκκώδη κύτταρα, καθώς τα επίπεδα της φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα με αυτά της οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό των μικρών ωοθυλακίων με άντρο (Andersen and Byskov 2006). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από μια πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι πολυμορφισμοί που αφορούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την AMH ή τον υποδοχέα της τύπου II σχετίζονται με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην ωοθυλακική φάση, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο τον ενδεχόμενο ρόλο της AMH στη επαγόμενη από την FSH στεροειδογένεση στην ανθρώπινη ωοθήκη (Kevenaar, Themmen et al. 2007).

1.3.2. Ο ανασταλτικός ρόλος της AMH

Ο ανασταλτικός ρόλος της AMH στα αρχικά στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης έχει επιβεβαιωθεί μέσω *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων, τα οποία έδειξαν ότι, απουσία της AMH, τα αρχέγονα ωοθυλάκια στρατολογούνται με ταχύτερο ρυθμό με αποτέλεσμα την πρόωρη εξάντληση της ωοθηκικής εφεδρείας και κατ' επέκταση εμφάνιση πρόωμης εμμηνόπαυσης. Το παραπάνω πόρισμα στηρίζεται στην αποδεδειγμένη συσχέτιση της διάρκειας της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας με το μέγεθος της ωοθηκικής της εφεδρείας ως προς τα αρχέγονα ωοθυλάκια (Durlinger, Kramer et al. 1999, Durlinger, Visser et al. 2002). Αν και τα περισσότερα ευρήματα αφορούν τα τρωκτικά, παρόλα αυτά φαίνεται ότι επιβεβαιώνονται και στον άνθρωπο. Η ύπαρξη πολύ χαμηλών επιπέδων FSH σε knock out-AMH ποντίκια και η παρουσία ιδιαίτερα αυξημένου αριθμού αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων οδήγησε την

επιστημονική κοινότητα στην υπόθεση ότι ελλείπει της AMH τα ωθυλάκια είναι περισσότερο ευαίσθητα ως προς την FSH.

Πράγματι, η AMH αναστέλλει την εξαρτώμενη από την FSH ανάπτυξη των ωθυλακίων πριν το σχηματισμό του άντρου σε *in vitro* καλλιέργειες (Durlinger, Grujters et al. 2001). Ομοίως, σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων, η AMH αναστέλλει την εξαρτώμενη από την FSH δραστηριότητα της αρωματάσης και τον αριθμό των υποδοχέων της LH.

Επιπροσθέτως, *in vivo* μελέτη κατά την οποία η συγκέντρωση της FSH τροποποιούνταν έδειξε ότι στα knock out-AMH ποντίκια υπάρχουν περισσότερα αναπτυσσόμενα ωθυλάκια σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια, παρουσία είτε υψηλών είτε χαμηλών επιπέδων FSH. Αυτός ο ανασταλτικός ρόλος της AMH ως προς την ευαισθησία που παρουσιάζουν τα ωθυλάκια προς την FSH είναι πιθανό να επηρεάζει άμεσα τη διαδικασία της 'επιλογής'.

Όπως προαναφέρθηκε, η AMH, μεταξύ των άλλων ρόλων της, φαίνεται ότι αποτελεί και έναν από τους παράγοντες που καθορίζουν την απόκριση των ωθυλακίων ως προς την FSH κατά την κυκλική στρατολόγηση. Ο ρόλος της αυτός αποδεικνύεται από το πρότυπο έκφρασης της στα μικρά και μεγάλα ωθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου. Παρόλο που αυτά τα ωθυλάκια είναι μορφολογικά δυσδιάκριτα, ορισμένα παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της AMH, ενώ, άλλα αρκετά χαμηλότερη. Ωστόσο, κάθε ωθυλάκιο πρέπει να ξεπεράσει μια συγκεκριμένη ουδό συγκέντρωσης της FSH ώστε να 'επιλεχθεί' για περαιτέρω ανάπτυξη του. Επομένως, χαμηλή έκφραση της AMH εντός των ωθυλακίων μειώνει αυτή την ουδό της FSH επιτρέποντάς τους να αναπτυχθούν και να φθάσουν στην ωθυλακιορρηξία στον επόμενο καταμήνιο κύκλο. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον ανθρώπινο οργανισμό (Durlinger, Visser et al. 2002, Grujters, Visser et al. 2003, Visser, de Jong et al. 2006).

Το γεγονός ότι η AMH παρουσιάζει συγκεκριμένο τρόπο έκφρασης στα αναπτυσσόμενα ωθυλάκια που δεν επιλέγονται έχει υποκινήσει πολλούς ερευνητές προς διερεύνηση της υπόθεσης κατά πόσο ενδεικτικά είναι τα επίπεδα της AMH του ορού σε σχέση με το μέγεθος των ωθητικών εφεδρειών σε αναπτυσσόμενα ωθυλάκια. Ποσοτικά, η ωθητική γήρανση

αντιπροσωπεύεται από τη μείωση του μεγέθους των ωοθηκικών εφεδρειών σε αρχέγονα ωοθυλάκια. Επειδή, όμως, καθίσταται αδύνατη η απ' ευθείας μέτρηση αυτών, ο συνολικός αριθμός των αρχεγόνων ωοθυλακίων αντανακλάται έμμεσα από το συνολικό αριθμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων (Scheffer, Broekmans et al. 2003). Ως εκ τούτου, ο παράγοντας που εκκρίνεται στα πρώιμα στάδια αυτών των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων θεωρητικά είναι σε θέση να εκπροσωπήσει το μέγεθος των ωοθηκικών εφεδρειών, δηλαδή το σύνολο των αρχεγόνων ωοθυλακίων που περιλαμβάνουν οι ωοθήκες. Συνεπώς, εφόσον η AMH εκκρίνεται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Durlinger, Visser et al. 2002) και εφόσον έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύεται στον ορό του αίματος (Hudson, Dougas et al. 1990, Lee, Donahoe et al. 1996) αποτελεί υποψήφιο δείκτη της ωοθηκικής εφεδρείας.

1.3.3. Παράγοντες που διαμορφώνουν τα επίπεδα της AMH στις γυναίκες

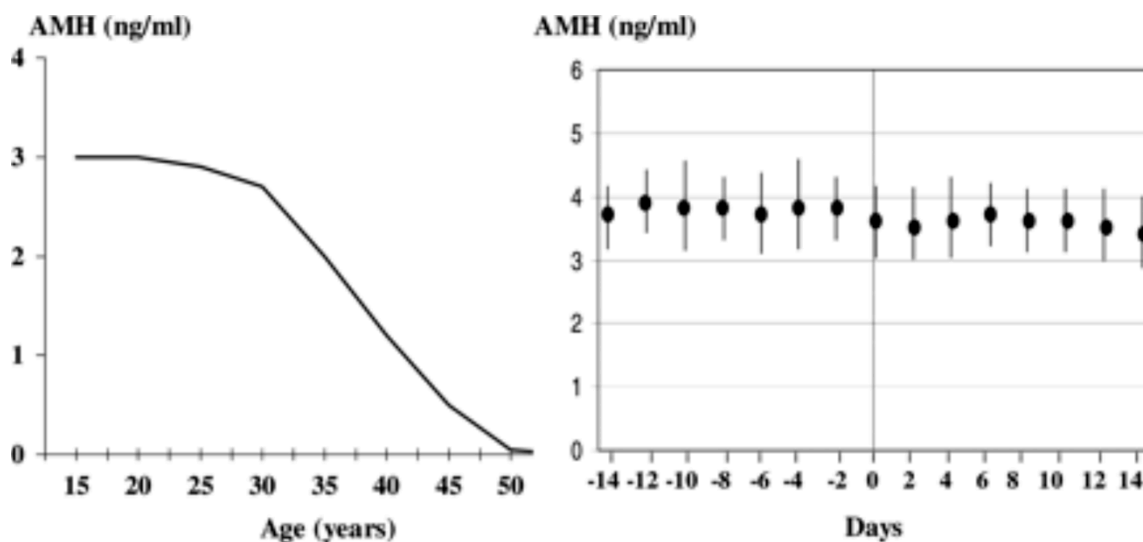
Η AMH παράγεται και εκκρίνεται στις γονάδες και κατόπιν μεταφέρεται στο κυκλοφορικό σύστημα. Αποτελεί ανιχνεύσιμη πρωτεϊνική ορμόνη του ορού του αίματος τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών. Τα επίπεδα της AMH στον ορό των γυναικών είναι συγκριτικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των ανδρών καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Συγκεκριμένα, η AMH είναι, σχεδόν, μη ανιχνεύσιμη κατά τη γέννηση των θήλεων νεογνών και παρουσιάζει μια μικρή αύξηση εντός των πρώτων δυο ή τεσσάρων ετών, ενώ αργότερα παραμένει σταθερή μέχρι την ενηλικίωση. Έχει βρεθεί ότι στην εμμηνόπαυση τα επίπεδά της μειώνονται προοδευτικά ως ένδειξη εξάντλησης του αποθέματος των ωοθυλακίων μέχρι που δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμα μετά το πέρας της εμμηνοπαυσιακής περιόδου. Πιο συγκεκριμένα, τα χρόνια που προηγούνται της εμμηνόπαυσης, η ικανότητα γονιμότητας έχει ήδη αρχίσει να μειώνεται και ο εμμηνορρυσιακός κύκλος να διαταράσσεται. Αυτή η μεταβατική περίοδος προηγείται της εμμηνόπαυσης και περιλαμβάνει τη σταδιακή μείωση των ωοθυλακικού αποθέματος που εμπεριέχεται στις ωοθήκες. Καθώς η AMH αντανακλά την εφεδρεία των ωοθηκών ως προς τα ωοθυλάκια, πιθανή μείωση στον αριθμό των μικρών αναπτυσσόμενων

ωοθυλακίων (pre-antral και antral) μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της κυκλοφορούσας AMH. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία, η οποία πραγματοποιείται στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου και σχετίζεται άμεσα, όπως έχει φανεύ βιβλιογραφικά, με τη μείωση των επιπέδων της ορμόνης (Van Rooij, Broekmans et al. 2005; Robertson, Hale et al. 2008).

Αυτή η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ορμόνης και της εφεδρείας των ωοθηκών σε ωοθυλάκια έχει διαπιστωθεί από πολλούς ερευνητές, οδηγώντας στο να προταθεί η AMH ως προγνωστικός δείκτης εμφάνισης της εμμηνόπαυσης ή δείκτης ωοθηκικής γήρανσης (Sowers, Eynazzadeh et al. 2008, van Disseldorp, Faddy et al. 2008). Ως εκ τούτου, η χρονολογική ηλικία αποτελεί φτωχή ένδειξη της μείωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας μιας γυναίκας και κατ' επέκταση της μείωσης των ωοθηκικών εφεδρειών, εφόσον υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση από γυναίκα σε γυναίκα, όσον αφορά στην ηλικία εμφάνισης της εμμηνόπαυσης και, συνεπώς, στην ηλικία υπογονιμότητας (Visser, de Jong et al. 2006).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, λοιπόν, καθώς η έτοιμη προς στρατολόγηση και ανεξάρτητη από την FSH κοορτή ωοθυλακίων συρρικνώνεται (τιμές στον δεξιά κάθετο άξονα – εικόνα 1.12), η AMH, που παράγεται μονάχα από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, θα μειωθεί σε ένα 'κρίσιμο σημείο', γεγονός το οποίο, υποθέτουμε, ότι συμβαίνει κατά μέσο όρο 5 έτη πριν από τον τελευταίο εμμηνορυσιακό κύκλο. Αυτό, με τη σειρά του, έχει επίπτωση στο στρατολογημένο και άμεσα εξαρτώμενο από την FSH ωοθυλακικό απόθεμα (τιμές στον αριστερό κάθετο άξονα), το οποίο αντανακλάται από τη ελάττωση των επιπέδων της ινχιμίνης Β. Επιπλέον, αυτή η συνεχής μείωση της ινχιμίνης Β επιτρέπει την επιταχυνόμενη αύξηση των επιπέδων της FSH. Ως εκ τούτου, υποστηρίζεται, ως ενδοκρινολογικός ορισμός της έναρξης περιεμμηνόπαυσιακής περιόδου, η μείωση των επιπέδων της AMH και της ινχιμίνης Β, που παρατηρούνται κατά μέσο όρο 5 έτη πριν την τελευταία έμμηνο ρύση (Sowers, Eynazzadeh et al. 2008).

Ανάλογο φαινόμενο ελάττωσης των ωοθυλακίων παρατηρείται και στις γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες (PCOS), με πολύ, όμως, βραδύτερο ρυθμό. Το εύρημα αυτό, που διαπιστώθηκε σε μια πρόσφατη, σχετικά, μελέτη (Piltonen, Morin-Parunen et al. 2005), υποδηλώνει, ενδεχομένως, ότι η διαδικασία της ωοθηκικής γήρανσης επιβραδύνεται στις γυναίκες με PCOS, λόγω της αρνητικής επίδρασης της AMH στη στρατολόγηση των αρχηγόνων ωοθυλακίων.



Εικόνα 1.12: Αριστερά: μέσος όρος των επιπέδων AMH του ορού σε σχέση με την αναπαραγωγική ηλικία Δεξιά: AMH του ορού κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου των γυναικών ηλικίας 18-24 χρονών (La Marca, Dondi et al. 2014).

Όσον αφορά στη συγκέντρωση της AMH κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου υπάρχουν πολλές σχετικές δημοσιεύσεις. Γενικά, η AMH αποτελεί μοναδική ενδοκρινή παράμετρο στη διερεύνηση της ωοθηκικής λειτουργία, καθώς αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι σε αντίθεση με τα στεροειδή του φύλου, τις γοναδοτροπίνες και τα πεπτίδια όπως, η ινχιμπίνη Β, που εκκρίνονται από τις ωοθήκες, τα επίπεδα της AMH δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυτή η σταθερότητα στη συγκέντρωσή της είναι ενδεικτική της χρησιμότητάς της ως αξιόπιστος δείκτης γήρανσης των ωοθηκών (Hehenkamp, Looman et al. 2006, La Marca, Pati et al. 2006, Tsepelidis, Devreker et al. 2007, Fraisse, Ibecheole et al. 2008). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και από κάποιες μελέτες κυκλικές διακυμάνσεις στα επίπεδα της ορμόνης με μια ταχεία πτώση της στην πρώιμη

ωχρινική φάση, οι οποίες όμως θεωρούνται μικρού εύρους και κατ' επέκταση μικρής σημασίας ώστε να λαμβάνονται υπόψη στον κλινικό έλεγχο (Wunder, Guibourdenche et al. 2008, Streuli, Fraisse et al. 2009).

Επιπλέον, η AMH φαίνεται να μη μεταβάλλεται ούτε και σε καταστάσεις στις οποίες η ενδογενής απελευθέρωση γοναδοτροπινών μειώνεται ουσιαστικά, όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (La Marca, Giulini et al. 2005), τη χορήγηση GnRH αγωνιστών (Mohamed, Davies et al. 2006) και την από του στόματος ορμονική αντισύλληψη (Arbo, Vettori et al. 2007). Το παραπάνω δείχνει ότι η μη κυκλική ανεξάρτητη από την FSH ωοθηκική δραστηριότητα εξακολουθεί να υπάρχει ακόμα και όταν η υποθαλαμική έκκριση της FSH καταστέλλεται. Το εύρημα αυτό συνάδει και με την θεωρία ότι η AMH αντανάκλα τη συνεχή μη κυκλική και ανεξάρτητη από την FSH ανάπτυξη των μικρών ωοθυλακίων στις ωοθήκες.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, μια μελέτη στην οποία η AMH ήταν μη ανιχνεύσιμη 3-5 ημέρες μετά από αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή, γεγονός που αποδεικνύει ότι η AMH του ορού προέρχεται αποκλειστικά από τις ωοθήκες (La Marca, De Leo et al. 2005, La Marca, Giulini et al. 2005).

1.3.4. Η AMH ως αυξητικός παράγοντας

Η AMH ανήκει στην υπεροικογένεια αυξητικών μετατροπτικών παραγόντων (Transforming Growth Factor, TGF) της ομάδας β. Τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας παρουσιάζουν ποικίλες λειτουργίες όπως αλληλεπιδράσεις μεσεγχύματος-επιθηλίου, κυτταρική ανάπτυξη, παραγωγή εξωκυττάριου στρώματος και αναγέννηση ιστού (Durlinger, Visser et al. 2002). Η AMH θεωρείται τοπικός αυξητικός παράγοντας και παράγοντας κυτταρικής διαφοροποίησης (Lee, Donahoe et al. 1996).

Επιπλέον, η AMH κατέχει εξέχουσα θέση μεταξύ των άλλων μελών της υπεροικογένειας TGF-β λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων της. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα του μορίου της AMH

έγκειται στη σύνδεση μεταξύ (N)αμινο-τελικών και (C)καρβοξυ-τελικών αλληλουχιών ομοδιμερών, γεγονός που δεν έχει προσδιοριστεί σε άλλο μέλος της υπερ-οικογένειας. Γενικά, τα πεπτίδια των TGFβ παράγονται ως μεγάλα πρόδρομα μόρια που σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου της AMH εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή άλλων μελών της οικογένειας του TGFβ. Αν και το βιολογικά δραστικό είναι το πλήρες μόριο της ορμόνης, η διάσπασή του σε θέση που απέχει περίπου 110 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο παράγει ένα αδρανές αμινοτελικό ομοδιμερές 110 kDa αλλά και ένα 25 kDa καρβοξυτελικό τμήμα που είναι βιολογικά δραστικότερο του πλήρους ομοδιμερούς. Το αμινοτελικό τμήμα είναι εκείνο που υφίσταται τη γλυκοζυλίωση. Η πρωτεόλυση της ορμόνης *in vivo* γίνεται ενδοορχικά από ένζυμα της οικογένειας των προπρωτεϊνικών κονβερτασών. Κατά συνέπεια, όπως έδειξαν και τα *in vitro* πειράματα, η καρβοξυτελική περιοχή είναι από μόνη της βιολογικά δραστική. Παρόλα αυτά, η αμινο-τελική περιοχή φαίνεται ότι ενισχύει τη δραστικότητά της, ενώ παράλληλα ενδέχεται να απομακρύνει τα ανενεργά συσσωρευμένα κατάλοιπα για αυτό και θεωρείται απαραίτητη η συμμετοχή της προκειμένου να υπάρχει μια ολοκληρωμένη δράση (Massague 1990, Wilson, di Clemente et al. 1993).

1.3.4.1 Η υπερ-οικογένεια του TGFβ

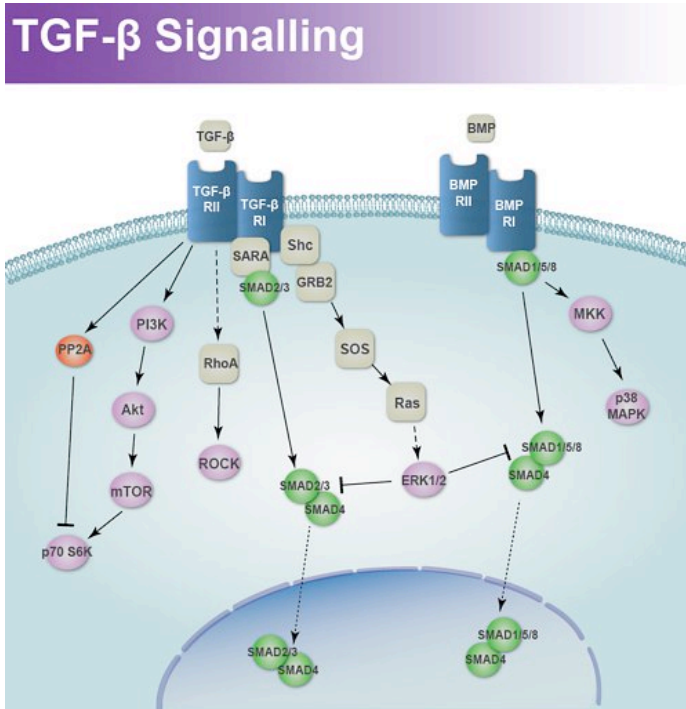
Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β ή TGFβ (Transforming Growth Factor β) ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια πλειοτροπικών κυτταροκινών που δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και η οποία στα θηλαστικά περιλαμβάνει τον TGFβ1, -β2 και -β3 (Massague 1990). Η οικογένεια του TGFβ έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητάς της να ελέγχει βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Οι λειτουργίες αυτές καλύπτουν ευρύ βιολογικό φάσμα από την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι και τη διατήρηση της κυτταρικής-ιστικής ομοιόστασης. Σύμφωνα με μεταγενέστερες μελέτες, ο TGFβ δεν αποτελεί απλά μια εκκρινόμενη ομοδιμερή πρωτεΐνη, αλλά είναι ένας πολυδύναμος αναπτυξιακός παράγοντας ο

οποίος δρα σε όλο το σώμα και επηρεάζει τους περισσότερους τύπους κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο TGFβ έχει εμπλακεί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης, της εναπόθεσης της εξωκυτταρικής ουσίας και της απόπτωσης. Επίσης, είναι ο πιο γνωστός παράγοντας της σύνθεσης και εναπόθεσης της εξωκυτταρικής ουσίας, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην επούλωση τραυμάτων όσο και στην ιστική ίνωση (Roberts and Sporn 1989, Schmierer and Hill 2007).

Στα θηλαστικά έχουν προσδιοριστεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις ισομορφές του TGFβ που είναι οι: TGFβ1, TGFβ2 και TGFβ3. Οι ισομορφές εμφανίζουν 70-80% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία ενώ παρουσιάζουν διαφορετική βιοδραστικότητα: για παράδειγμα σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η TGFβ1 και η TGFβ3 ισομορφή αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η ισομορφή TGFβ2 δεν έχει επίδραση στον πολλαπλασιασμό. Αν και οι τρεις αυτές ισομορφές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, εν τούτοις διαφέρουν κυρίως στο άμινο-τελικό άκρο, την α- έλικα και τις θηλιές μεταξύ των β-πτυχωτών φύλλων (Jennings, Mohan et al. 1988).

Το σημείο-κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ αποτελούν οι δύο τύποι υποδοχέων τύπου I και II, με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης και μια οικογένεια διαμεσολαβητών, τις SMAD πρωτεΐνες. Όλα τα μέλη της οικογένειας του TGFβ μετάγουν το σήμα μέσω του «κανονικού» μονοπατιού το οποίο περιλαμβάνει, στην πλασματική μεμβράνη, ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο που απαρτίζεται από δυο τύπου I και δυο τύπου II υποδοχείς με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης και κυτταροπλασματικούς τελεστές που δρουν καθοδικά και ονομάζονται SMAD πρωτεΐνες (Massague, Seoane et al. 2005). Δύο είναι τα κύρια ενδοκυτταρικά μονοπάτια ανάλογα με τους SMAD διαμεσολαβητές: είτε SMAD2/3, είτε SMAD1/5/8.

Οι τύπου I υποδοχείς όπως και οι τύπου II έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνες, ενώ σε αντίθεση με τους τύπου II, έχουν μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες (GS region) ανάμεσα στην διαμεμβρανική περιοχή και την περιοχή της κινάσης. Το ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων τύπου II περιέχει την περιοχή με την δραστικότητα κινάσης χαρακτηριστική των σερινών/θρεονινών κινάσων (Attisano and Wrana 1996). Επίσης, οι τύπου III υποδοχείς είναι βοηθητικοί υποδοχείς (coreceptor), οι οποίοι έχουν μικρή ενδοκυτταρική περιοχή και διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο στη μεταγωγή του σήματος. Η β-γλυκάνη (betaglycan), η ενδογλίνη (endoglin) και το κρύπτο (crypτο) είναι τρία παραδείγματα υποδοχέων τύπου III. Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν ουσιαστικά την πρόσβαση του TGFβ στους υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την μετάδοση του σήματος, και διευκολύνουν την πρόσδεσή του στο σύμπλοκο TβR-I/TβR-II (Laiho, Weis et al. 1991).



Εικόνα 1.13: Μεταγωγή σήματος στην υπεροικογένεια του TGFβ

Κάθε μέλος της οικογένειας του TGFβ δεσμεύεται σε συγκεκριμένο συνδυασμό των δυο υποδοχέων (I και II). Οι υποδοχείς τύπου I προσδένονται στους υποδοχείς τύπου II, οι οποίοι όμως δε μπορούν να μετάγουν σήματα χωρίς τη συνεργασία των τύπου I υποδοχέων. Επομένως, τα σήματα μεταδίδονται μέσω ετεροδιμερών συμπλόκων των υποδοχέων κινάσης τύπου II και τύπου I. Για παράδειγμα, στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ο TGFβ

μετάγει το σήμα του μέσω του υποδοχέα TGFBR2 και ALK5 (επίσης γνωστός και ως υποδοχέας TGFβ τύπου I, TGFBR1), ενώ οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (bone morphogenetic proteins, BMPs) μεταγουν το σήμα μέσω του υποδοχέα τύπου BMP II (BMPR2) και ALK1, 2, 3 και 6 .

Εν συνεχεία, η πρόσδεση της ορμόνης-πρωτεΐνης στον υποδοχέα τύπου II επάγει την φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα στην περιοχή GS από τον υποδοχέα τύπου II. Ο ενεργοποιημένος τύπου I υποδοχέας επάγει τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, των R-SMADs, οι οποίες είναι οι ενδοκυτταρικοί τελεστές της οικογένειας του TGFβ. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ο TGFβ επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 και ο BMPs επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD1/5/8. Οι ενεργοποιημένες R- SMADs σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκα με τη SMAD4 και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων όπως η SERPINE1, αναστολέας των πρωτεασών σερίνης (plasminogen activator inhibitor) και η ID1 (inhibitor of DNA binding-1). Η παραπάνω ρύθμιση πραγματοποιείται σε συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες, συν- ενεργοποιητές και συν-καταστολείς της μεταγραφής. Οι ανασταλτικές SMADs, όπως η SMAD6 και η SMAD7, ανταγωνίζονται τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των R-SMAD (Massague 1990, Laiho, Weis et al. 1991, Salhi, Cambon-Roques et al. 2004, Schmierer and Hill 2007, ten Dijke and Arthur 2007).

1.3.4.2 Μηχανισμός δράσης της AMH

Όπως και τα άλλα μέλη της υπεροικογένειας TGFβ και σύμφωνα με τα παραπάνω, η AMH δρα μέσω δύο τύπων υποδοχέων (AMHR I και AMHR II) που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μονής αλυσού με δραστηριότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Η AMH προσδέεται στον AMHR II, ο οποίος αποτελείται από μια πλούσια σε κυστεΐνη εξωκυττάρια περιοχή που του προσδίδει ειδικότητα σύνδεσης με την ορμόνη, μια διαμεμβρανική περιοχή καθώς και μια ενδοκυττάρια περιοχή που λειτουργεί ενζυμικά ως κινάση σερίνης/θρεονίνης. Μετά την πρόσδεση του

συνδέτη, ο AMHR II προσλαμβάνει και φωσφορυλιώνει μόρια σερίνης και θρεονίνης του AMHR I, καθιστώντας ενεργό το τμήμα του υποδοχέα τύπου I που δρα ως κινάση, το οποίο με τη σειρά του επάγει την ενεργοποίηση μιας σειράς δραστικών ενδοκυτταρικών διαμεσολαβητικών πρωτεϊνών όπως οι Smads 1, 5 και 8, που δρουν ως αγγελιοφόροι του ορμονικού σήματος στον πυρήνα του κυττάρου, αφού σχηματίσουν ετεροδιμερή. Είναι, επίσης, δυνατό να ενεργοποιηθούν και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως η β-κατενίνη και ο πυρηνικός παράγοντας κΒ. Το διμερές των πρωτεϊνών Smad συνδέεται στον πυρήνα με τις ρυθμιστικές περιοχές των “γονιδίων-στόχων” της AMH, επάγοντας ή αναστέλλοντας την έκφρασή τους (Salhi, Cambon-Roques et al. 2004).

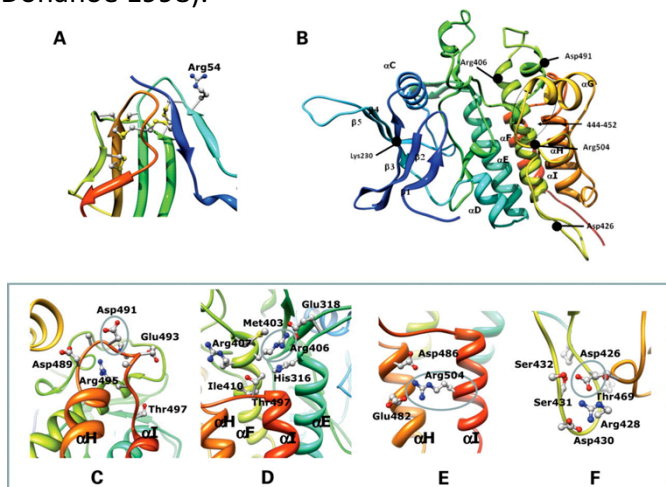
Τα κυριότερα “γονίδια – στόχοι” της δράσης της AMH είναι αυτά της P450 αρωματάσης (CYP19), του υποδοχέα της LH (LHCGR), της 3β- υδροξυστεροειδικής αφυδρογονάσης (HSD3B1), της P450 17α-υδροξυλάσης / λυάσης (CYP17), της P450scc (CYP11A), του p16 αναστολέα της εξαρτώμενης από τη κυκλίνη κινάσης (CDKN2A), του υποδοχέα AMHR-II (AMHRII), της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP2 (MMP2) και του Smad-6 (SMAD6) (Josso and Clemente 2003).

Όσον αφορά στον υποδοχέα τύπου I, οι μέχρι τώρα έρευνες δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν ειδικό υποδοχέα για την AMH και φαίνεται πως η ορμόνη χρησιμοποιεί υποδοχείς τύπου I από κοινού με άλλα μέλη της οικογένειας TGFβ και συγκεκριμένα τις BMPs και τους GDFs. Ο ALK-2 (Activin Receptor- Like Kinase-2), ο ALK-3 και ο ALK-6 έχουν προταθεί ως υποψήφιοι υποδοχείς τύπου I για την AMH. Ο τύπος αυτός είναι υπεύθυνος για την ενδοκυτταρική μετάδοση του ορμονικού σήματος και πιθανολογείται ότι η AMH χρησιμοποιεί διαφορετικούς τύπου I υποδοχείς με «ιστο- εκλεκτικό» τρόπο. Μελέτες έδειξαν ότι στην υποστροφή των πόρων του Müller ο κύριος διαμεσολαβητής της δράσης της AMH είναι ο ALK-2 (Josso and Clemente 2003).

1.3.5. AMHRII Υποδοχέας

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον AMHR II έχει μήκος περίπου 8 kb, αρκετά μικρότερο σε σχέση με άλλους τύπου II υποδοχείς της υπερ-οικογένειας, ενώ εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 12 στη θέση 13 (12q13) και έχει απομονωθεί από τον αρουραίο, το κουνέλι, το ποντίκι και τον άνθρωπο. Αποτελείται από 11 εξώνια, εκ των οποίων τα εξώνια 1-3 κωδικοποιούν την εξωκυτταρική περιοχή, η οποία αποτελείται από 127 αμινοξέα στον ανθρώπινο υποδοχέα, ενώ το εξώνιο 4 είναι υπεύθυνο για τη διαμεμβρανική περιοχή και αποτελείται από 26 αμινοξέα. Η προβλεπόμενη ακολουθία του AMHR II παρουσιάζει 30% ομολογία με τους υπόλοιπους υποδοχείς της TGF- β υπερ-οικογένειας (Salhi, Cambon-Roques et al. 2004). Ο AMHR II στους άρρενες εκφράζεται στα όργανα-στόχους της AMH και συγκεκριμένα στο μεσέγγυμα που περιβάλλει το επιθήλιο του πόρου του Muller, και μάλιστα μόνο κατά το χρονικό διάστημα της υποστροφής του, στα Sertoli κύτταρα και στα κύτταρα Leydig. Επίσης έχει αναφερθεί εντόπιση του υποδοχέα AMHR-II στον προστάτη (Segev, Hoshiya et al. 2002) και στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης τρωκτικών (Bedecarrats, O'Neill et al. 2003).

Στα θήλαα, ο AMHR II εκφράζεται σταθερά στον πόρο του Muller, ενώ παράλληλα ανιχνεύεται έκφραση στη φυσιολογική και κυοφορούσα μήτρα, καθώς και στα ωοθυλάκια, όπως αναφερθήκαμε εκτενώς παραπάνω. Απουσία του υποδοχέα ή της ορμόνης δεν προκαλεί καμία αλλαγή στα θηλυκά ποντίκια, τα οποία διατηρούν τη γονιμότητά τους (Lane and Donahoe 1998).



Εικόνα 1.14: Μοριακή δομή του υποδοχέα τύπου II της AMH και οι μεταλλάξεις του (C) Asp491His (D) Arg406Gln (E) Arg504Cys (F) Asp426Gly

1.4 SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms)

Είναι γνωστό ότι ο γραμμικός συνδυασμός 4 νουκλεοτιδίων καθορίζει την αλληλουχία του DNA. Ωστόσο, η ίδια θέση στο γονιδίωμα δύο ανθρώπων μπορεί να αντιστοιχεί σε δύο διαφορετικά νουκλεοτίδια. Αυτή η διαφορά ονομάζεται **πολυμορφισμός του ενός νουκλεοτιδίου** (Single-Nucleotide Polymorphism) και συμβολίζεται ως **SNP**. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί αποτελούν την πλειοψηφία των γενετικών πολυμορφισμών και συνήθως προκύπτουν από αλλαγή σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων. Δηλαδή, σχεδόν όλοι οι κοινοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν μόνο δύο αλληλόμορφα.

Αυτές οι παραλλαγές στην αλληλουχία του DNA όταν εμφανίζονται με συχνότητα < 1% ονομάζονται μεταλλάξεις, ενώ όταν εμφανίζονται με συχνότητα > 1% του φυσιολογικού πληθυσμού ονομάζονται πολυμορφισμοί.

Ανάλογα, λοιπόν, με το είδος των αλληλόμορφων, οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί διακρίνονται σε μεταβάσεις (transitions) και μεταστροφές (transversions). Στην πρώτη περίπτωση, έχουμε αντικατάσταση μιας πουρίνης από άλλη πουρίνη (αλλαγές μεταξύ αδενίνης (A) και γουανίνης (G)) ή μιας πυριμιδίνης από άλλη πυριμιδίνη (αλλαγές μεταξύ κυτοσίνης (C) και θυμίνης (T)), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε αντικατάσταση μιας πουρίνης από μια πυριμιδίνη (αλλαγές μεταξύ A και C ή T και αλλαγές μεταξύ G και C ή T) ή το αντίστροφο. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η εμφάνιση της γενετικής ετερογένειας των γονιδίων λόγω της ύπαρξης διαφορετικών μορφών ενός γονιδίου, των διαφορετικών δηλαδή αλληλόμορφων ή αλληλίων (alleles). Το αλληλόμορφο που εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό ονομάζεται κοινό (common) ή άγριου τύπου (WT, Wild Type), αφού θεωρείται ότι από μετάλλαξη αυτού προέκυψαν, κάποια στιγμή στο παρελθόν, τα ένα ή περισσότερα σπανιότερα πολυμορφικά (variant) αλληλόμορφα.

Ως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί > 12 εκατομμύρια SNPs (~1/275 ζεύγη βάσεων). Μόνο το ~1% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από εξόνια (δηλαδή κωδικοποιείται προς πρωτεΐνες), τα ιντρόνια αποτελούν το 24% και το υπόλοιπο 75% είναι το ενδιάμεσο

(intergenic) DNA. Μόνο το 12% των SNPs που έχουν συσχετιστεί με κάποια νοσήματα ή χαρακτηριστικά εντοπίζονται σε περιοχές του DNA που κωδικοποιούν σε πρωτεΐνες (εξώνια). Περίπου το 40% των SNPs που έχουν συσχετιστεί με κάποια νοσήματα ή χαρακτηριστικά εντοπίζονται σε ενδιάμεσες περιοχές του DNA μεταξύ των γονιδίων (intergenic regions), περίπου το 40% σε ιντρόνια (περιοχές του DNA που αποκόπτονται από το mRNA και δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες), και το υπόλοιπο περίπου 8% σε διάφορες άλλες μη μεταφραζόμενες περιοχές του DNA.

1.4.1 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της FSHR (FSHR)

Η μελέτη των μεταλλάξεων γίνεται κυρίως με σκοπό τη διερεύνηση ασθενών με διαταραγμένη αναπαραγωγική λειτουργία, γι'αυτό το λόγο οι μεταλλάξεις διαχωρίζονται σε μεταλλάξεις ενεργοποίησης του υποδοχέα, αδρανοποίησης του υποδοχέα, ή ουδέτερες, ανάλογα με το επίπεδο δραστηριότητας του υποδοχέα σε κάθε ένα από τους φαινότυπους. Στη σύγχρονη βάση δεδομένων έχουν καταγραφεί 731 μονο-νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα FSHR.

Η παρουσία μετάλλαξης στην αλληλουχία του γονιδίου του υποδοχέα FSHR έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή στο προϊόν του γονιδίου δηλαδή την πρωτεΐνη του υποδοχέα της FSH. Οι συνέπειες αυτής της αλλαγής της δομής στον υποδοχέα μπορούν να αφορούν στην έκφραση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, στην ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα με το μόριο της FSH αλλά και στην ορθή μετάδοση του σήματος μετά την πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα.

Η ύπαρξη πολυμορφισμών SNP's στο γονίδιο του υποδοχέα FSHR διαφέρει από τις παραπάνω μεταλλάξεις.

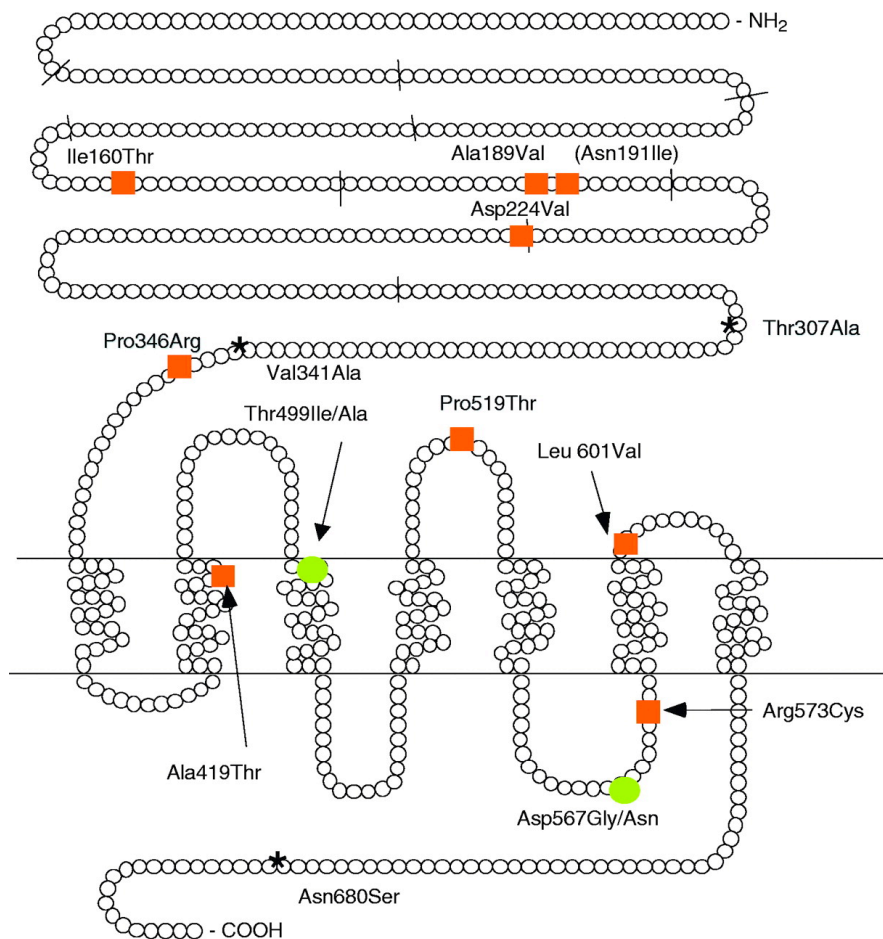
Μετά την περιγραφή της πρώτης μετάλλαξης του υποδοχέα της FSH (Aittomaki, Lucena et al. 1995) ξεκίνησε η έρευνα των μεταλλάξεων σε διάφορες καταστάσεις ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας. Έτσι έγινε αντιληπτό ότι, ενώ οι μεταλλάξεις ήταν ένα πολύ σπάνιο φαινόμενο, οι μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) του γονιδίου FSHR και του υποκινητή του ήταν αρκετά κοινοί, και φαινόταν να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απάντηση κατά τη χορήγηση FSH στην IVF (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000).

Όσον αφορά στην περιοχή του υποκινητή (promoter), αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί, αλλά ο πιο μελετημένος πολυμορφισμός είναι αυτός που εντοπίζεται στη θέση -29 (G/A) του υποκινητή, λόγω της υπόθεσης ότι τροποποιεί την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα ETS, και οδηγεί σε τροποποιημένη mRNA έκφραση του υποδοχέα της FSH (Gromoll, Ried et al. 1994). Μεταγενέστερες μελέτες δε βρήκαν συσχέτισμό του πολυμορφισμού με κλινικές (απάντηση στην ωοθηκική διέγερση) και βιοχημικές (FSH ορού) παραμέτρους (Wunsch, Ahda et al. 2005).

Όσον αφορά στον υποδοχέα της FSH (FSHR), το γονίδιο που τον κωδικοποιεί παρουσιάζει πολυμορφισμούς σε δύο σημεία: (α) στη θέση 307 της πρωτεΐνης, που αποτελεί καίρια θέση για την αλληλεπίδραση της ορμόνης με τον υποδοχέα, μπορεί να υπάρχει θρεονίνη (Thr) ή αλανίνη (Ala) (θέση νουκλεοτιδίου 919, με αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου A από νουκλεοτίδιο G αντίστοιχα) και (β) στη θέση 680 της πρωτεΐνης, η οποία αφορά στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και σχετίζεται με τη μετάδοση του σήματος της FSH, μπορεί να υπάρχει σερίνη (Ser) ή ασπαραγίνη (Asn) (θέση νουκλεοτιδίου 2039, με αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου G από νουκλεοτίδιο A αντίστοιχα).

Ακόμα κι αν προς το παρόν υπάρχει μεγάλη ανομοιογένεια στα αποτελέσματα σχετικά με την κλινική σημασία των πολυμορφισμών στην υπογονιμότητα, θεωρείται ότι η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο γονίδιο του υποδοχέα FSHR που οδηγούν στα αντίστοιχα αμινοξέα στις θέσεις 307 και 680 έχουν αντίκτυπο στην αναπαραγωγική ικανότητα των γυναικών, επηρεάζοντας τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα.

Τα κωδικόνια που κωδικοποιούν τα αμινοξέα στις θέσεις 307 και 680 βρίσκονται σε "linkage disequilibrium" (σύνδεση ανισορροπίας). Οι συνδυασμοί Ala307/Ser680 και Thr307/Asn680 αποτελούν τους πιο συχνούς συνδυασμούς στις διάφορες εθνικότητες, ενώ οι συνδυασμοί Ala307/Asn 680 και Thr307/Ser680 είναι πολύ σπάνιοι και έχουν ανιχνευτεί μόνο σποραδικά (<5%), σε ορισμένες εθνικότητες (Simoni, Gromoll et al. 1999, Sudo, Kudo et al. 2002).



Εικόνα 1.15: Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της FSH. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι activating mutations, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι inactivating mutations. Με αστερίσκο σημειώνονται οι πολυμορφισμοί του γονιδίου. (Themmen, Reproduction 2005).

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται η κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων Ser/Ser, Ser/Asn, Asn/Asn που αφορούν τη θέση 680 του μορίου του υποδοχέα της FSH σε διαφορετικούς πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων, όπως έχουν καταγραφεί από τους ερευνητές που ασχολούνται με γενετικούς βιολογικούς δείκτες. Υπάρχουν φυσικά και άλλοι πολυμορφισμοί που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του υποδοχέα της FSH, αλλά η συχνότητά τους είναι κάτω από 5%, σε αντίθεση με τους πολυμορφισμούς στις αμινοξικές θέσεις 307 και 680, που εμφανίζουν συχνότητα >30%.

| Study | Asn/Asn (%) | Asn/Ser (%) | Ser/Ser (%) | Subjects (type) | Subjects (No) | Origin | Gender |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|---|---------------|-------------|---------|
| Conway, 1999 | 25 | 52 | 23 | PCOS | 93 | UK | Females |
| Perez Mayorga, 2000 | 29 | 45 | 26 | IVF patients | 161 | Germany | Females |
| Sudo, 2002 | 41 | 47 | 12 | Ovulatory and anovulatory | 522 | Japan | Females |
| De Castro, 2003 | 31 | 50 | 19 | IVF patients | 102 | Spain | Females |
| Laven, 2003 | 16 | 44 | 40 | Normogonadotropic anovulatory infertile | 148 | Germany | Females |
| Sundblad, 2004 | 32 | 45 | 23 | Ovulatory | 44 | Argentina | Females |
| Daelemans, 2004 | 25 | 51 | 24 | IVF patients | 130 | Belgium | Females |
| Falconer, 2005 | 35 | 24 | 41 | Infertile women | 68 | Sweden | Females |
| Greb, 2005 | 34 | 49 | 18 | Ovulatory | 125 | Germany | Females |
| De Koning, 2006 | 21 | 58 | 21 | FSH>10 IU/L | 38 | Netherlands | Females |
| | 45 | 42.5 | 12.5 | FSH<10 IU/L | 40 | | |
| Jun, 2006 | 42 | 46 | 12 | IVF patients | 263 | Korean | Females |
| Klinkert, 2006 | 38 | 45 | 17 | IVF patients | 105 | Dutch | Females |
| Loutradis, 2006 | 27 | 39 | 34 | IVF patients | 125 | Greece | Females |
| Livshyts, 2009 | 18.6 | 53.9 | 27.5 | Ovarian dysfunction | 102 | Ukraine | Females |
| | 12.8 | 51.3 | 37.9 | Poor responders | 39 | | |
| | 30.0 | 57.5 | 12.5 | Good responders | 40 | | |
| Achrekar, 2009 | 31 | 56 | 13 | Controls | 100 | India | Females |
| | 42 | 46 | 12 | IVF patients | 50 | | |

Πίνακας . Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων Ser/Ser, Ser/Asn, Asn/Asn που αφορούν τη θέση 680 του μορίου του υποδοχέα της FSH σε διαφορετικούς πληθυσμούς

Οι διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα της FSHR είναι πιθανώς υπεύθυνες για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με την FSH, κυρίως λόγω μεταβολών στο επίπεδο του μοριακού μηχανισμού της γλυκοσυλίωσης και φωσφορυλίωσης. Το μόριο του υποδοχέα είναι ικανό για αλληλεπίδραση με περισσότερους από έναν υποτύπους της G πρωτεΐνης, ανάλογα με τη γλυκοσυλίωση του συνδεόμενου μορίου (Arey, Stevis et al. 1997). Ερευνητές κατέδειξαν

ότι η ασπαραγίνη (Asn) στη θέση 680 δημιουργεί την προϋπόθεση για θέση γλυκοσυλίωσης, γεγονός το οποίο μπορεί να καταστεί σημαντικό κατά τη διαδρομή της πρωτεΐνης εντός του κυττάρου και την έκφραση αυτής στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η σερίνη (Ser) δε συμμετέχει στη διαδικασία φωσφορυλίωσης, το οποίο φαίνεται να επηρεάζει την ανακύκλωση του υποδοχέα (Davis, Liu et al. 1995).

Μετά το 2000, όταν παρουσιάστηκε για πρώτη φορά η ένδειξη για συσχέτισμό του γονότυπου του υποδοχέα της FSH με την ωθητική απάντηση στη εξωγενή χορήγηση FSH σε γυναίκες που ελάμβαναν ελεγχόμενη ωθητική διέγερση-COS (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000), η βιβλιογραφία είναι πλούσια όσον αφορά στην επισήμανση της σχέσης μεταξύ της γενετικής ποικιλότητας του υποδοχέα της FSH και της εξωγενούς χορήγησης FSH, των βασικών τιμών της FSH ορού (Laven, Mulders et al. 2003, de Koning, Benjamins et al. 2006), της ωθητικής απάντησης (Jun, Yoon et al. 2006, Loutradis, Patsoula et al. 2006) ή των ποσοστών κύησης (Klinkert, te Velde et al. 2006).

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στα επίπεδα της FSH ορού, η τιμή FSH ορού κατά την αρχική ωοθυλακική φάση είναι υψηλότερη στις γυναίκες με γονότυπο Ser/Ser (Sudo, Kudo et al. 2002, de Koning, Benjamins et al. 2006, Jun, Yoon et al. 2006, Loutradis, Patsoula et al. 2006), ενώ σε πληθυσμό υπογόνιμων γυναικών, απαντάται συχνότερα ο Ser/Ser γονότυπος σε όσες έχουν FSH>10 IU/ml σε σχέση με όσες έχουν φυσιολογική FSH, υπονοώντας ένα είδους αντίστασης στην FSH.

Στα πλαίσια της *in vitro* γονιμοποίησης, οι ασθενείς με Ser/Ser γονότυπο είχαν ανάγκη από υψηλότερες δόσεις ανασυνδυασμένης FSH για την παραγωγή ωαρίων, ενώ είχαν παράλληλα και υψηλότερες τιμές FSH ορού (Perez Mayorga, Gromoll et al. 2000). Παρομοίως, πολλοί παράγοντες τις ωθητικής διέγερσης, όπως η τιμή της οιστραδιόλης κατά την ωοθυλακιορρηξία (Behre, Greb et al. 2005) ή ο αριθμός των ωαρίων (Simoni, Gromoll et al. 1999) είναι χαμηλότερα στις γυναίκες που φέρουν το Ser αλληλίο. Σε μελέτη αναδρομική μελέτη ασθενών που έλαβαν ωθητική διέγερση, διαπιστώθηκε πως η συχνότητα του αλληλίου Ser ήταν αυξημένη στις πτωχές απαντήτριες, ενώ οι ομόζυγες Ser γυναίκες παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά ακυρωμένων κύκλων. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δεν επιβεβαίωσαν τη σχέση γονοτύπου με την ανάγκη για υψηλότερες δόσεις σε FSH (Daelemans,

Smits et al. 2004, Greb, Behre et al. 2005). Στον αντίποδα της πτωχής απάντησης στη εξωγενή χορήγηση FSH βρίσκεται το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωθηκών (OHSS), το οποίο αποτελεί σοβαρή επιπλοκή της αγωγής ωθηκικής διέγερσης. Κάποιοι ερευνητές κατέληξαν πως το Ser αλληλίο καταγράφεται συχνότερα στις ασθενείς που παρουσιάζουν OHSS, αλλά οι ασθενείς που το εμφάνισαν με βαρεία μορφή ήταν φορείς του Asn αλληλίου (Daelemans, Smits et al. 2004). Άλλοι ερευνητές δεν εντόπισαν συσχέτισμό ανάμεσα στον γονότυπο και το OHSS και δεν επιβεβαίωσαν αυτό το αποτέλεσμα (d'Alva, Serafini et al. 2005, Kerkela, Skottman et al. 2007). Στον ελληνικό πληθυσμό (Loutradis, Patsoula et al. 2006), οι καλές απαντήσεις συνήθως είναι ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό (Ser/Asn). Αυτός ο γονότυπος σχετίζεται με περισσότερα ωοθυλάκια και περισσότερα ωάρια, τόσο στις καλές απαντήσεις, όσο και στις ασθενείς με φυσιολογικό κύκλο αλλά υψηλή FSH.

Όσον αφορά στις κήσεις, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Υπάρχουν ερευνητικές ομάδες που αναφέρουν χαμηλότερα ποσοστά κήσης στις γυναίκες που φέρουν το Ser αλληλίο (Simoni, Gromoll et al. 1999, Jun, Yoon et al. 2006), αλλά υπάρχουν ομάδες που τα υψηλότερα ποσοστά κήσης τα παρουσίασαν οι γυναίκες με Ser/Ser γονότυπο (Klinkert, te Velde et al. 2006).

Πρέπει να σημειωθεί ότι δε βρέθηκε συσχέτισμός ανάμεσα στον πολυμορφισμό και την πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια (Conway, Conway et al. 1999, Sundblad, Chiauzzi et al. 2004), ενώ δεν εντοπίστηκε διαφορά στη χρησιμοποιούμενη δόση FSH ανάμεσα στους τρεις γονότυπους σε γυναίκες με ανωορρηκτικούς κύκλους (PCOS και μη PCOS) και φυσιολογικές τιμές γοναδοτροπινών (Laven, Mulders et al. 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι οι διαφορετικές απαντήσεις λόγω διαφορετικών γονοτύπων εντοπίζονται μόνο σε γυναίκες με φυσιολογικούς κύκλους. Τέλος, πρόσφατες έρευνες συσχέτισαν τον απλότυπο A307/S680 με προδιάθεση για καρκίνο ωθηκών (Yang, Chan et al. 2006).

Αν η γνώση του γενετικού προφίλ των γυναικών που εισέρχονται σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής επιτρέπει την πρόβλεψη της ωθηκικής απάντησης στη διέγερση και συγκεκριμένα την πτωχή απάντηση, τότε υπάρχει η δυνατότητα εξατομίκευσης του πρωτοκόλλου ωθηκικής διέγερσης, ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε γυναίκας.

1.4.2 Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της AMH (AMHRII)

Η παρουσία πολυμορφισμών (SNPs) στο γονίδιο που κωδικοποιεί την AMH και τον υποδοχέα της τύπου II, AMHRII αποτέλεσε αφορμή για τη διερεύνηση της συσχέτισής τους με την ωοθηκική λειτουργία και απόκριση στο πλαίσιο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά τις εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την επίδραση της AMH και των επιπέδων της στον ορό του αίματος στις εκάστοτε παραμέτρους της ωοθηκικής απόκρισης και λειτουργίας, μια μόνο μελέτη έως τώρα έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με την επίδραση αυτών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, σύμφωνα με την οποία διερευνήθηκε η επίδραση αυτών των πολυμορφισμών στην έκβαση της ωοθηκικής διέγερσης κατά τη διεξαγωγή πρωτοκόλλων εξωσωματικής γονιμοποίησης (Hanevik, Hilmarsen et al. 2010). Πρόσφατη μελέτη, η οποία διερεύνησε εκτενώς την επίδραση των πολυμορφισμών (SNPs) στο γονίδιο που κωδικοποιεί την AMH και τον υποδοχέα της τύπου II (AMHRII) σε Καυκάσιες γυναίκες με φυσιολογικούς ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους, αποκάλυψε 15 παραλλαγές της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την AMH, εκ των οποίων βρέθηκαν 8 σημαντικοί SNPs και 4 παραλλαγές αλληλουχίας στο γονίδιο του AMHRII, περιλαμβάνοντας έναν και μόνο SNP. Οι δύο πιο σημαντικοί SNPs είναι ο AMH Ile49Ser (rs 10407022) και ο πολυμορφισμός -482 A>G (rs 2002555) του υποδοχέα AMHRII. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της AMH, ο οποίος εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και συγκεκριμένα στο εξώνιο 1, αντιστοιχεί σε μια σημειακή αλλαγή μιας βάσης και συγκεκριμένα προκαλεί αντικατάσταση της βάσης G (γουανίνη) από τη βάση T (θυμίνη) με αποτέλεσμα στην τελική αλληλουχία αμινοξέων το αμινοξύ Ισολευκίνη να αντικαθίσταται από το αμινοξύ Σερίνη. Από την άλλη, ο πολυμορφισμός -482 A>G του υποδοχέα της AMH εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και συγκεκριμένα στη μη κωδικοποιούσα περιοχή του εκκνητή του γονιδίου, όπου πραγματοποιείται αντικατάσταση της βάσης A (αδενίνης) από τη βάση G (γουανίνη) στη θέση -482 της αλληλουχίας (Kevenaar, Themmen et al. 2007).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γυναίκες Μελέτης

Η παρούσα μελέτη συμπεριέλαβε δείγματα περιφερικού αίματος από 126 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση στο τμήμα εξωσωματικής γονιμοποίησης της Α΄ Πανεπιστημιακής Γυναικολογικής Κλινικής του Γ. Ν. Α. «Αλεξάνδρα» και στο τμήμα εξωσωματικής του νοσοκομείου «Μητέρα». Για την εισαγωγή κάθε περιστατικού στην ομάδα μελέτης είχε προηγηθεί πλήρης αιματολογικός έλεγχος, έλεγχος για λοιμώξεις (CMV, τοξόπλασμα, ερυθρά, χλαμύδια, Αυστραλιανό αντιγόνο, HIV I-II), υπερηχογραφικός έλεγχος έσω γεννητικών οργάνων, υστεροσαλπιγγογραφία, σπερμοδιάγραμμα στο δείγμα σπέρματος που θα χρησιμοποιηθεί και καταγραφή δημογραφικών και άλλων κλινικών πληροφοριών.

Επιπλέον, στην μελέτη συμπεριλήφθησαν δείγματα 100 γόνιμων γυναικών, ηλικίας μεταξύ 18 και 60 ετών, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και είχαν τουλάχιστον μία κύηση στο παρελθόν και παρακολουθούνταν στα εξωτερικά ιατρεία της Α΄ Πανεπιστημιακής Γυναικολογικής Κλινικής του Γ. Ν. Α. «Αλεξάνδρα».

2.2 Απομόνωση γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα

Το πρώτο στάδιο στην διαδικασία της δειγματοληψίας περιλάμβανε την λήψη περιφερικού αίματος (περίπου 5ml ανά ασθενή) από τις γυναίκες που πληρούσαν τα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στην μελέτη το οποίο τοποθετήθηκε σε σωληνάρια αιμοληψίας που περιείχαν ποσότητα EDTA ώστε να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και κατόπιν φυλάχθηκαν στους 4° C στο εργαστήριο.

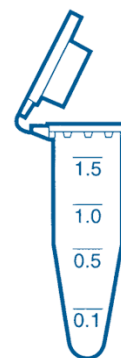
Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου PureLink® Genomic DNA Kit της Invitrogen by Life Technologies το οποίο επιτρέπει να απομονωθεί το γενετικό υλικό από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος,

βαμβακοφόρους στυλεούς, ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη ή έγκλειστους σε παραφίνη.

Συνολικά, η απομόνωση του γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών, την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και τελικά την ~~και τελικά την~~ κατακρήμνιση και συλλογή του DNA.

Το πρωτόκολλο που περιγράφει την πλήρη διαδικασία απομόνωσης του DNA είναι το ακόλουθο:

- Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf (1,5ml) τοποθετούμε 200μl αίματος (φρέσκου ή κατεψυγμένου το οποίο έχει αποψυχθεί).
- Στην συνέχεια προσθέτουμε 20 μl πρωτεάσης K και 20 μl ριβονουκλεάσης A.
- Το μίγμα αναδεύεται σε αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και ακολούθως επωάζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



Η πρωτεάση K αποδομεί τις πρωτεΐνες και η ριβονουκλεάση A αποδομεί το μονόκλωνο RNA.

Εικόνα 2.1: Σωληνάριο τύπου Eppendorf (<http://www.technoplas.com.au>)

- Στη συνέχεια προσθέτουμε 200μl Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε εκ νέου στον αναδευτήρα δίνης (Vortex).

Μέσω του Genomic Lysis/ Binding Buffer γίνεται η λύση των μεμβρανών των κυττάρων.

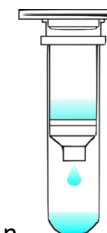
- Το μίγμα επωάζεται στους 55° C για τα 10 λεπτά.

Σε αυτό το στάδιο προωθείται η πέψη των πρωτεϊνών και απελευθερώνεται το γενετικό υλικό από τις συνδεδεμένες με αυτό πρωτεΐνες.

- Στην συνέχεια προστίθεται 200μl αιθανόλη 96%-100% και το μίγμα αναδεύεται εκ νέου.

Η αιθανόλη οδηγεί στην κατακρήμνιση του γενετικού υλικού στο διάλυμα.

- Με την βοήθεια πιπέτας τύπου Gilson το μίγμα τοποθετείται στη στήλη



Εικόνα 2.2: Στήλη τύπου PureLink Spin Column (<http://www.clker.com>)

PureLink Spin Column και φυγοκεντρείται στις 12.500 στροφές ανά λεπτό, για 1 λεπτό.

Με τη φυγοκέντρωση το γενετικό υλικό, απελευθερωμένο πλέον από τα πρωτεϊνικά συγκρίματα, δεσμεύεται στο ειδικό φίλτρο της στήλης, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα συγκεντρώνονται στο σωλήνα συλλογής.

- Ο σωλήνας συλλογής, που περιέχει τις πρωτεΐνες και τα υπολείμματα των μεμβρανών απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής.
- Προσθέτουμε 500μl Wash Buffer 1 (ρυθμιστικό διάλυμα) και φυγοκεντρούμε στις 12.500 στροφές/ λεπτό για 1 λεπτό.
- Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε νέο σωλήνα συλλογής.
- Προσθέτουμε το Wash Buffer 2 (ρυθμιστικό διάλυμα) και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά.

Με τις δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή καθαρότητα του γενετικού υλικού και η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υπολειμμάτων.

- Τοποθετούμε τη στήλη φυγοκέντρωσης σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης του 1.5 ml.
- Προστίθενται 150 μl PureLink Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης και η στήλη φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό.

Αυτό οδηγεί στην έκπλυση του DNA, το οποίο συλλέγεται, απομονωμένο πλέον από κυτταρικά υπολείμματα και πρωτεϊνικά μόρια, στο σωλήνα φυγοκέντρωσης.

- Στο τελευταίο στάδιο το DNA αποθηκεύεται στον σωλήνα φυγοκέντρωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα σε θερμοκρασία -20° C.



Εικόνα 2.3: Διαδικασία απομόνωσης DNA με το PureLink Genome Kit (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf)

2.3 Γονοτύπηση

2.3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

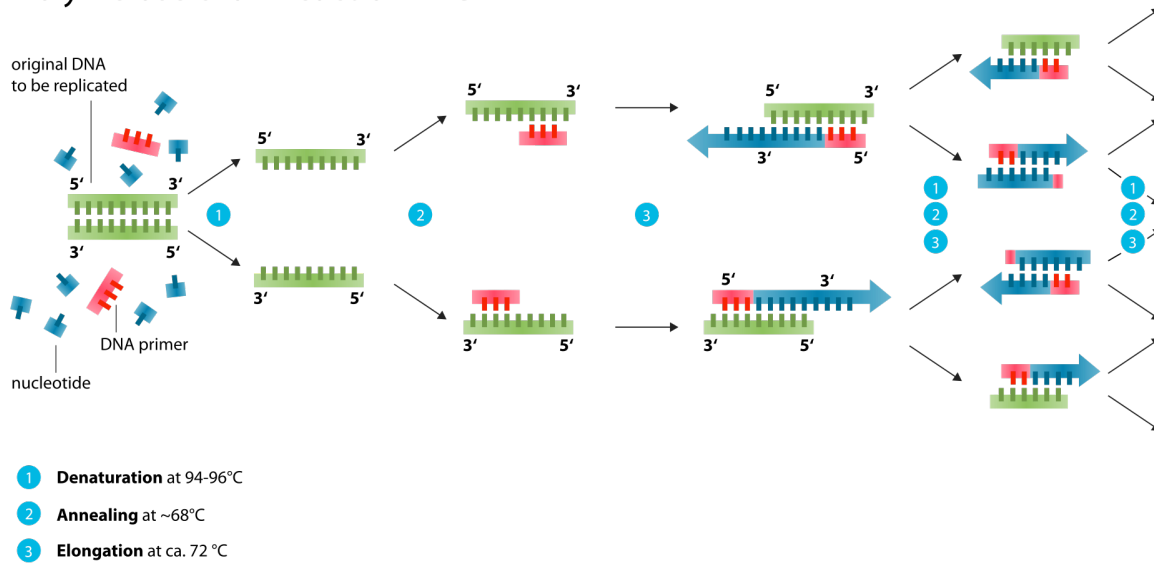
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτέλεσε μία επαναστατική μέθοδο της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας η οποία ανακαλύφθηκε την δεκαετία του 80' από τον ερευνητή Kary Mullis και του συνεργάτες του, περίπου 100 χρόνια μετά την πρώτη απομόνωση του DNA το 1869, και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985 ενώ για την ανακάλυψη αυτή ο K Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 (Saiki, Scharf et al. 1985). Η τεχνική αυτή επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro* μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η τεχνική του Mullis και των συνεργατών του ήταν αργή, δύσκολη και ανακριβής και το μεγαλύτερο μειονέκτημα ήταν ότι σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού ήταν απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης, καθώς με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το ένζυμο αποδιατασσόταν με αποτέλεσμα να χάνει τη λειτουργικότητά του. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χάρη στην απομόνωση της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, η οποία παραμένει αναλλοίωτη κατά την αποδιάταξη στους 95°C και έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72°C, κάτι το οποίο οδήγησε στην αυτοματοποίηση της μεθόδου (Saiki, Gelfand et al. 1988). Σήμερα η PCR έχει συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ιατρική έρευνα και στη διάγνωση ασθενειών.

Πιο συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο *in vitro* πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, ενός DNA ή cDNA δείγματος, με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA (Mullis, Faloona et al. 1986). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί βασικό εργαλείο των σημερινών εργαστηρίων

μοριακής βιολογίας καθώς επιτρέπει την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA που επιθυμείται να ενισχυθεί και αποτελείται από τρία διακριτά βήματα α) την αποδιάταξη του DNA β) τον υβριδισμό των εκκινητών και γ) την επιμήκυνση των εκκινητών που θα οδηγήσουν στην δημιουργία των κλώνων.

Σπουδαίο ρόλο στον τρόπο λειτουργίας της μεθόδου παίζει η θερμοκρασία. Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95°C για 15 min για να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq DNA πολυμεράση. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού, αφού ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών, καθώς και των διμερών τους. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται κατά τη θέρμανση στους 95°C με αποτέλεσμα να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA. Αυτή η θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές. Για να ενισχύσουμε το δείγμα του DNA είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασίας 25-40 φορές, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη αποδοτικότητα χρησιμοποιώντας έναν θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος είναι προγραμματισμένος να εναλλάσσει τη θερμοκρασία στιγμιαία και ικανός να διατηρεί τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου PCR (https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

Απαραίτητα αντιδραστήρια για την εκτέλεση της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

- Το μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η ποιότητα της μήτρας του DNA που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA που κυμαίνεται από 0,01 μg έως 1 μg.
- Ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ένας νοηματικός εκκινητής (forward) και ένας αντινοηματικός εκκινητής (reverse), τα οποία υβριδίζονται στις 5' και 3' γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα

της διπλής έλικας του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 20 μΜ (20 pmol/ μl).

- **Η θερμοσταθερή Ταq DNA πολυμεράση**
- **τα 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)** που προσθέτει η DNA πολυμεράση για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μΜ το καθένα.
- **το ρυθμιστικό διάλυμα** που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 °C), MgCl₂ KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη.
- **τα ιόντα μαγνησίου Mg²⁺ με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου MgCl₂** που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του MgCl₂ προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαραγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης.

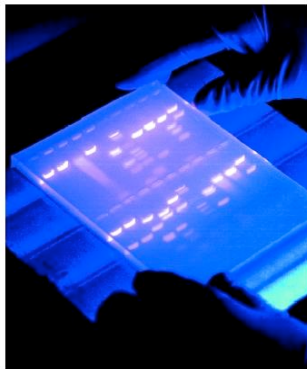
Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετείται εντός του θερμοκυκλοποιητή ο οποίος με το θερμαινόμενο καπάκι επιτυγχάνει ομοιογενή θερμοκρασία στο εσωτερικό του ώστε η αντίδραση να έχει το κατάλληλο περιβάλλον. Στο τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα βρίσκονται στο κατάλληλο σωλήνα eppendorf του μηχανήματος της αντίδρασης και φυλάγονται στους 4° C.



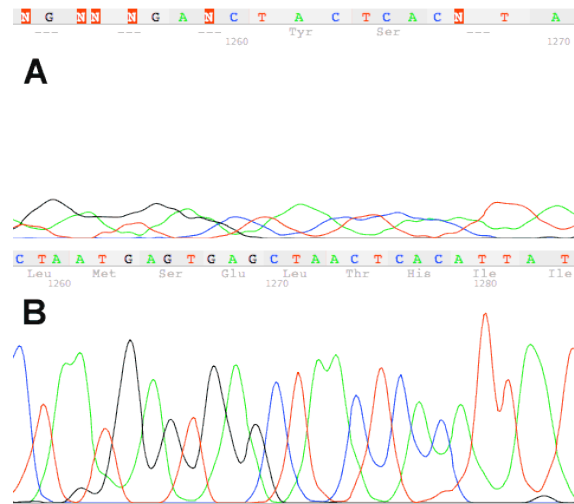
Εικόνα 2.5: Θερμοκυκλοποιητής (<http://www.sci-support.com/items/Eppendorf-Mastercycler-DNA-Engine-Thermal-Cycler-PCR-1659.htm>)

Σήμερα, έχουμε διάφορες παραλλαγές της μεθόδου, τις οποίες χρησιμοποιούμε ανάλογα με της ανάγκες του πειραματικού πρωτοκόλλου, όπως οι: Colony PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, AFLP PCR, Hot Start PCR, In Situ PCR, Inverse PCR, Asymmetric PCR, Long PCR, Long Accurate PCR, Reverse Transcriptase PCR, Allele specific PCR, Real time PCR.

Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος γίνεται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1-3% ή με την τεχνική της αλληλούχισης (sequencing).



Εικόνα 2.6: Οπτικοποίηση του αποτελέσματος της PCR με πήκτωμα αγαρόζης και προβολή με ακτίνες UV (<http://www.biologyreference.com/Dn-Ep/Electrophoresis.html>)



Εικόνα 2.7: Οπτικοποίηση του αποτελέσματος της PCR με αλληλούχιση του τμήματος DNA (<https://www.nucleics.com/dna-sequencing-nucleics/>)

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους.

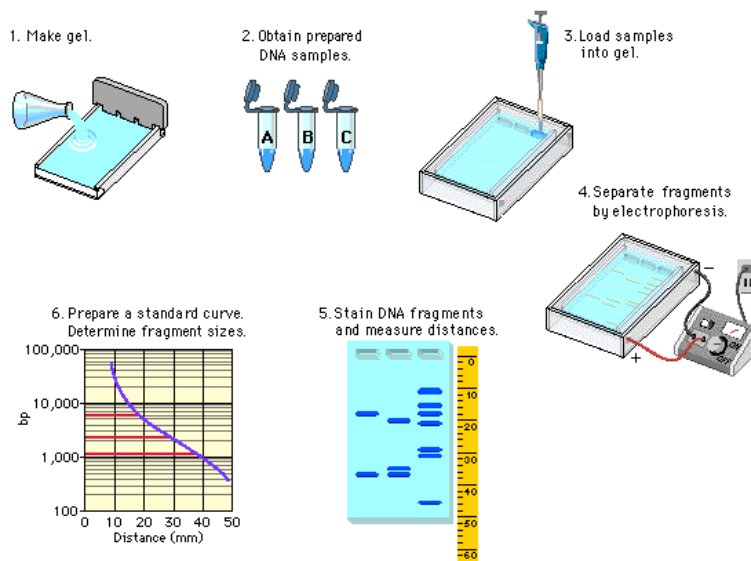
Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από κάποια είδη θαλάσσιων φυκών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 45°C σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ

πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

Στην παρούσα εργασία η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη εφαρμόζεται για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης κλασικής PCR. Το πυκνό πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 5 μl βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/ml, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδεις φως.

Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/ cm. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που

εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

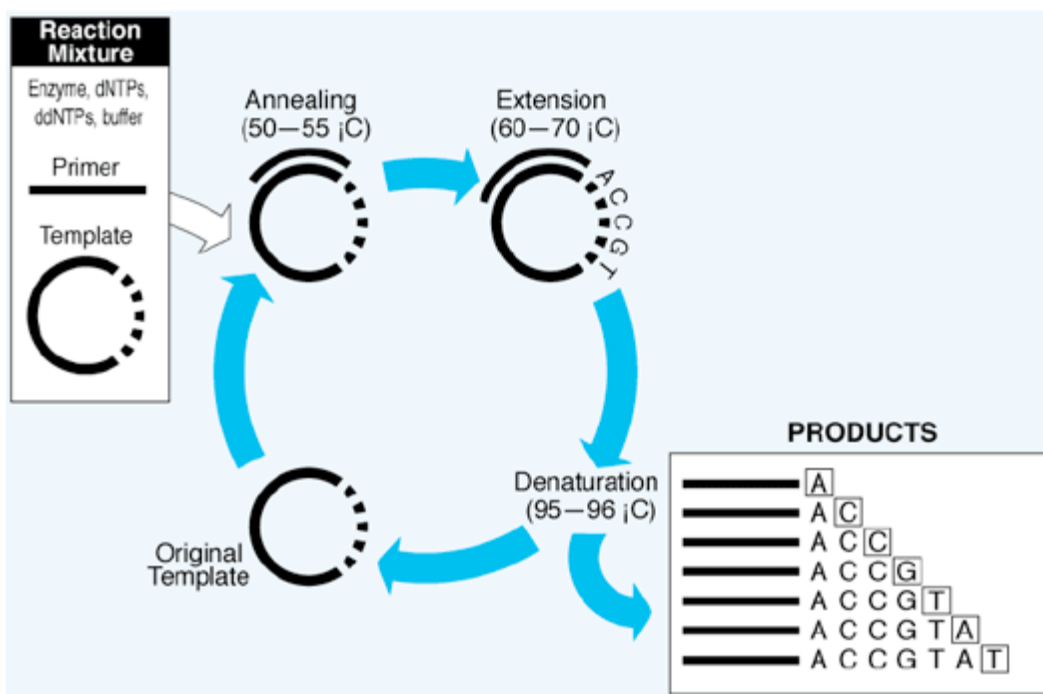


Εικόνα 2.8: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/design2.html)

2.3.3 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων του DNA (DNA sequencing)

Η τεχνική που ακολουθείται για την ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA βασίζεται στη μέθοδο του Sanger, όπου η μία αλυσίδα του DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με τη χρήση κατάλληλου εκκινητή. Στο μίγμα της αντίδρασης εκτός από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) προστίθενται και τα διδεοξυανalogά τους (τριφωσφορικά 2', 3' διδεοξυνουκλεοτίδια, ddNTPs), στα οποία δεν υπάρχει το 3' υδροξυλικό άκρο και είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, καθεμιά από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

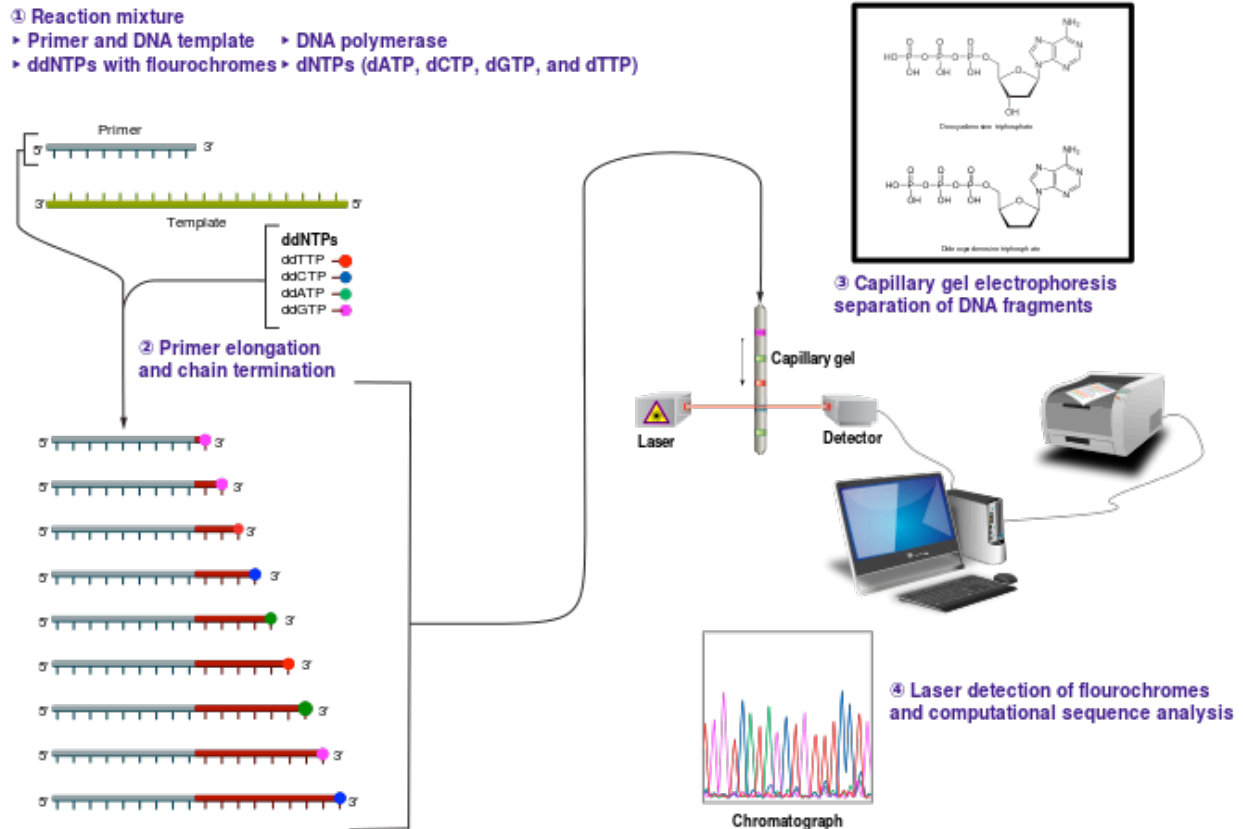
Η σύνθεση της αλυσίδας του DNA γίνεται με τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην περίπτωση που κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου μορίου DNA η *Taq* πολυμεράση εισάγει ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, τότε εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερης 3' υδροξυλομάδας, τερματίζεται πρόωρα η επιμήκυνσή του. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο, ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο είναι επισημασμένο με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ουσίες. Γι' αυτό η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger ονομάζεται εναλλακτικά μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method).



Εικόνα 2.9: Πολυμερισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με ddNTPs (<http://www.appliedbiosystems.com>)

Για την αντίδραση της ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA απαιτούνται 50 ng καθαρισμένου προϊόντος της PCR, τα οποία αναμειγνύονται με έτοιμο μίγμα αντίδρασης Big Dye Termination Ready Reaction Mix (RoRo Mix), version 3.1 (Applied Biosystems, USA), το οποίο περιέχει *Taq* πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος αλληλούχησης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9) με την προσθήκη του εκκινητή (primer) που έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη. Η αντίδραση επιμήκυνσης των εκκινητών πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και γίνεται κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό της PCR, δηλαδή χρησιμοποιούνται εναλλασσόμενα στάδια θερμικής αποδιάταξης στους 94° C, υβριδισμού του εκκινητή στους 55° C και επέκτασης ή διδεοξυτερματισμού στους 72° C.

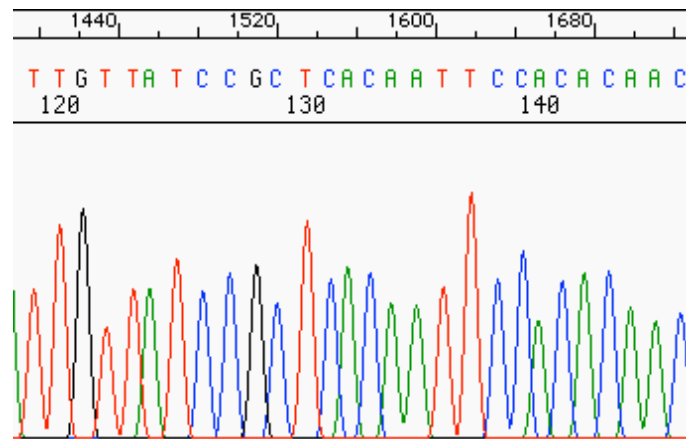
Στη συνέχεια, το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης υπόκειται σε καθαρισμό με στήλη Sephadex G-50, με σκοπό την απομάκρυνση των σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την αντίδραση, καθώς και ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους έως και 20 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 2.10: Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας για την αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>)

Τα σημασμένα τμήματα DNA που παράγονται τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (POP-7 Polymer, Applied Biosystems) και ανιχνεύονται από διάταξη laser αισθητήρων και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Με την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Τα μόρια κατά την έξοδό τους από το τριχοειδές διέρχονται από δέσμη laser, ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική καταγραφική συσκευή (CCD camera). Κάθε φθορίζουσα ουσία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου του κάθε μορίου.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis v 5.2), είναι δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ηλεκτροφερογράφημα (electropherogram), μια αλληλουχία κορυφών (peaks) τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA.



Εικόνα 2.11: Ηλεκτρογράφημα τεσσάρων χρωμάτων για την ανάγνωση μιας αλληλουχίας DNA (<http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/dnaseq/interpret.html>)

2.3.4 Real Time PCR (RT PCR)

Η real time PCR είναι μια τροποποίηση της κλασσικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR analysis). Στην RT PCR ο φθορισμός που εκπέμπεται από τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο (κατά τη διάρκεια της αντίδρασης), σε αντίθεση με την ανίχνευση στο τέλος της αντίδρασης (Picard, Silvy et al. 2006).

Τα πλεονεκτήματα της Real Time PCR είναι ότι:

- Η ενίσχυση μπορεί να παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο
- Δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία των προϊόντων της αντίδρασης (μικρότερος κίνδυνος επιμόλυνσης)
- Πολύ γρήγοροι κύκλοι αντίδρασης (από 30' μέχρι 2 ώρες)
- Απαιτείται 1000 φορές λιγότερο γενετικό υλικό από τη συμβατική
- Επιβεβαιώνεται η ενίσχυση ενός συγκεκριμένου προϊόντος μέσω ανάλυσης των καμπυλών τήξης
- Είναι περισσότερο ειδική, ευαίσθητη και έχει καλύτερη επαναληψιμότητα

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου όπως αναφέρθηκε αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για για την ποσοτικοποίηση νουκλειικών οξέων, την ανίχνευση μεταλλάξεων και τη γονοτύπηση σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και με άλλες ονομασίες όπως Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) ή Kinetic PCR, ενώ πολύ συχνά συγχέεται με την μέθοδο της Αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription PCR) εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR (Wikipedia 2005).

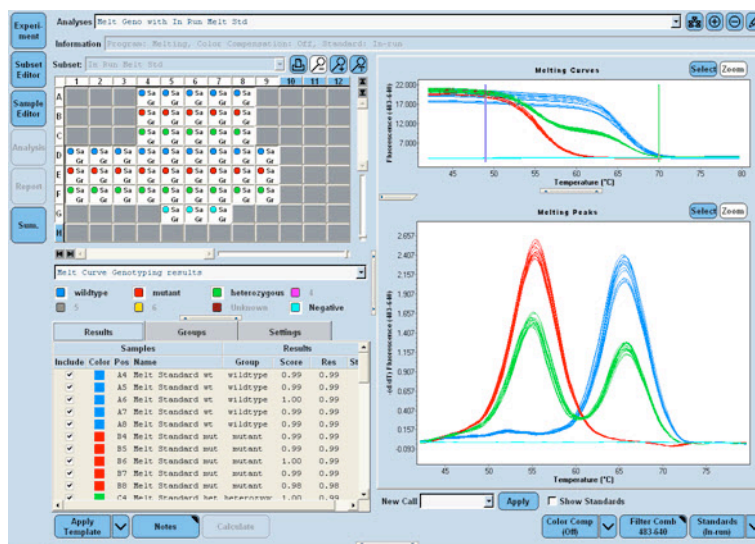
Παρόλο που η μέθοδος της Real Time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και πραγματοποιείται σε μικρότερο χρόνο απ' ότι η

συμβατική PCR, ενώ παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της κλασικής PCR έκτος από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton and Cockerill 2006).

Ανάλυση Καμπυλών τήξης (Melting Curves Analysis)

Μετά το πέρας της PCR, ακολουθεί ανάλυση με τη μέθοδο των καμπυλών τήξης. Προκαλείται αύξηση της θερμοκρασίας σταδιακά, μέχρι τη θερμοκρασία στην οποία προκαλείται αποδιάταξη (τήξη) των δύο ελίκων του DNA. Το σημείο στο οποίο πραγματοποιείται η αποδιάταξη ονομάζεται σημείο τήξης (T_m). Ο λόγος Γουανίνης /Κυτοσίνης (G/C) στο δείγμα του γενετικού υλικού, είναι υπεύθυνος για τον καθορισμό του σημείου τήξης.

Κατά την ανάλυση, οι ανιχνευτές υβριδίζονται με τις αλληλουχίες στόχο. Ακολουθεί σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Ο ανιχνευτής θα αποδιαταχθεί από το γενετικό υλικό σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ ανιχνευτή και γενετικού υλικού στόχου (διαφορά έστω και σε μία βάση) η θερμοκρασία τήξης θα είναι σημαντικά χαμηλότερη. Με αυτό τον τρόπο η παρουσία ενός SNP θα γίνει εμφανής λόγω της αλλαγής στο φθορισμό από την αποδιάταξη του ανιχνευτή σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Στο γράφημα της ανάλυσης των καμπυλών τήξης, οι θερμοκρασίες αποδιάταξης απεικονίζονται ως διακριτές κορυφές επιτρέποντας έτσι την σύγκριση των διάφορων δειγμάτων.

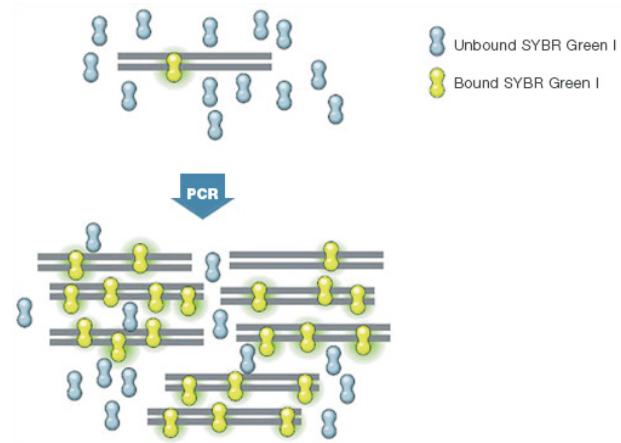


Εικόνα 2.12: Ανάλυση καμπυλών τήξης όπως έχουν προκύψει μετά την ολοκλήρωση ενός πειράματος RT PCR (<https://lifescience.roche.com>)

Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται μέσω της εκπομπής φθορισμού. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των προϊόντων. Ενδεικτικά αναφέρουμε αυτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα (Giulietti, Overbergh et al. 2001).

i. SYBR Green I

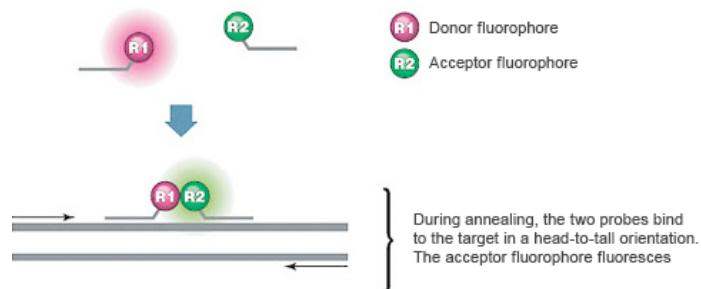
Η χρωστική συνδέεται με δίκλιωνα μόρια DNA, απορροφά κυανό φως (497nm) και εκπέμπει πράσινο φως (520nm). Χρησιμοποιείται κατά την ποσοτικοποίηση του δίκλωνου DNA στην αντίδραση Real Time PCR (Bustin 2000).



Εικόνα 2.13: Ο φθορισμός της SYBR Green I χρωστικής αυξάνεται απότομα όταν τα μόρια της χρωστικής δεσμεύονται στο DNA (<http://www.bio-rad.com>)

ii. Hybridization Probes

Η τεχνική περιλαμβάνει ειδικές αλληλουχίες γενετικού υλικού, συμπληρωματικές με τις προς ανίχνευση αλληλουχίες, σεσημασμένες με ραδιενεργό ή φθορίζουσα χρωστική. Η αλληλουχία δότης φέρει τη χρωστική (R1) στο 3' άκρο της, ενώ η αλληλουχία δέκτης φέρει τη χρωστική (R2) στο 5' άκρο. Κατά τη διάρκεια της PCR, οι δύο ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές περιοχές τους στο DNA στόχο, απέχοντας η μία από την άλλη 3-4 νουκλεοτίδια. Η χρωστική δότης R1 ενεργοποιείται από φωτεινή πηγή, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος



Εικόνα 2.14: Ο φθορισμός των hybridization probes (<http://www.bio-rad.com>)

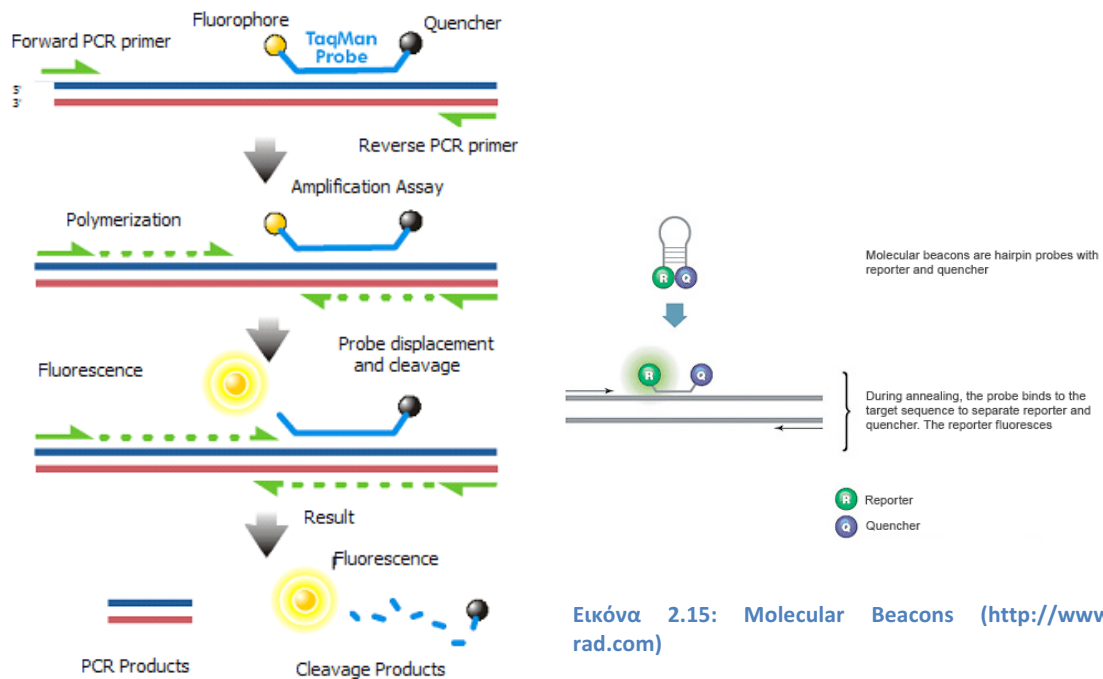
και μεταφέρει μέρος της ενέργειας διέγερσης στη χρωστική δέκτη R2. Η χρωστική δέκτης με τη σειρά της εκπέμπει φως σε διαφορετικό μήκος κύματος, το οποίο ανιχνεύεται και μετράται από το μηχάνημα επιτρέποντας έτσι την γονοτύπηση

iii. Taqman

Σημασμένη αλληλουχία στο 5' και στο 3' άκρο. Το 5' άκρο ενεργοποιείται από φωτεινή πηγή. Ο ανιχνευτής απομακρύνεται από την DNA πολυμεράση και εκπέμπεται φθορισμός.

iv. Beacons

Οι μοριακοί «φάροι» είναι ολιγονουκλεοτιδικά μόρια τα οποία όταν συνδεθούν στην αλληλουχία στόχο εκπέμπουν φθορισμό.



Εικόνα 2.15: Molecular Beacons (<http://www.bio-rad.com>)

Εικόνα 2.16: Ο φθορισμός με την χρήση των Taqman probes (<https://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan>)

Γονοτύπηση

Για την εκτέλεση των πειραμάτων γονοτύπησης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα LightCycler® 480 της εταιρείας Roche και το εμπορικά διαθέσιμο σύνολο αντιδραστηρίων (kit) της εταιρείας Roche LightCycler® 480 Genotyping Master με Cat. No. 04 707 524 001, το οποίο φυλάσσεται στους -20° C. Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για 384 αντιδράσεις με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl η καθεμία.

Τα αντιδραστήρια που εμπεριέχονται στο kit είναι τα εξής:

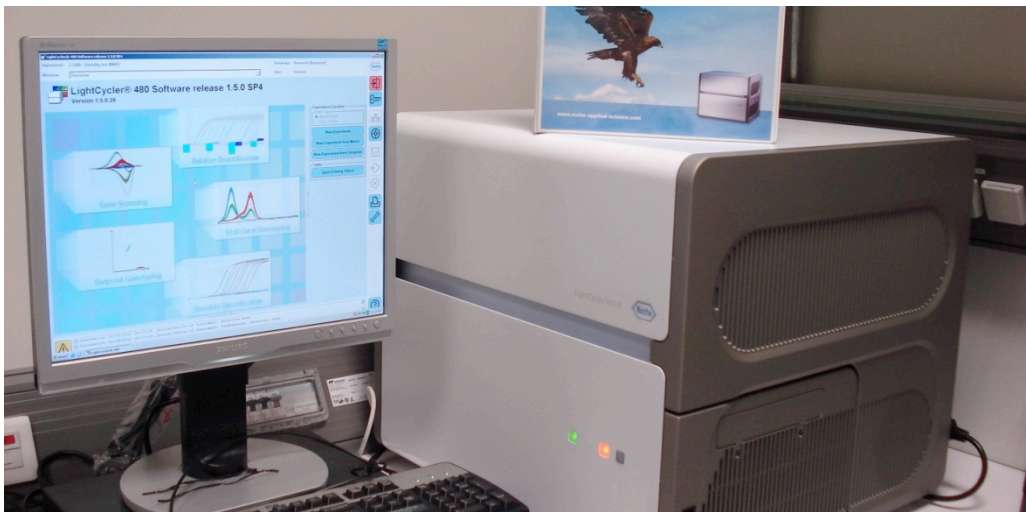
1. Master Mix, 5x conc., 4 x 384 μl, ready-to-use hot start multiplex PCR reaction mix, το οποίο περιλαμβάνει μια τροποποιημένη Taq DNA πολυμεράση, reaction buffer, dNTP mix (with UTP instead of dTTP) και 15 mM MgCl₂
2. MgCl₂, 25 mM, 1 ml
3. H₂O, PCR-grade, 4 φιαλίδια x 1 ml

Το LightCycler® 480 Genotyping Master kit παρέχει τα παραπάνω αντιδραστήρια καθώς επίσης και ένα πρωτόκολλο, το οποίο μας κατεύθυνε για τις τελικές τους συγκεντρώσεις στην προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης (master mix).

Να σημειωθεί ότι συμπληρωματικά με το παραπάνω περιεχόμενο του kit χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον συστατικά και εργαστηριακός εξοπλισμός:

- 5μl απομονωμένου DNA από κάθε δείγμα (ασθενή)
- Ένα ζεύγος εκκινητών για τον υποδοχέα FSHR και άλλο ένα αντίστοιχα για τον υποδοχέα AMHRII από την εταιρεία Roche.
- Ένα ζεύγος ανιχνευτών για τον υποδοχέα FSHR και άλλο ένα αντίστοιχα για τον υποδοχέα της AMHRII από την εταιρεία Roche.

- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
- LightCycler® 480 Sealing Foil
- Ειδική φυγόκεντρος με στροφέιο για πολυφατνιακές πλάκες (Hettich Zentrifugen, Universal 320R)
- Αυτόματες πιπέτες Gilson
- Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών (tips)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου errendorf του 1.5 ml για την προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης



Εικόνα 2.17: Ο αυτοματοποιημένος θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της real time PCR είναι το μηχάνημα LightCycler480

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι αλληλουχίες των primer και probe που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα γονοτύπησης.

Πίνακας 1: Αλληλουχίες των primer και probe της FSHR

| 940997 | hu FSHR (S680N) | | NG_008146 | Tm |
|--|---|---|------------|--------|
| FSHR S | AGTGTGGCTGCTATGAAATGC | S | 196599-619 | 56.6°C |
| FSHR A | GGCTAAATGACTTAGAGGGACAAGTA | A | 196750-729 | 56.9°C |
| SP (Schoolcraft, Schlenker et al.) | CCCAGAGTCACCAATGGT X ITCCA--PH | S | 196697-718 | 62.1°C |

Πίνακας 2: Αλληλουχίες των primer και probe της AMHR2

| 947433 | hu AMHR2 (rs2002555) | | AC_068889 | Tm |
|-----------------|--|---|-----------|--------|
| AMHR2 F | TTgACTCTTCTCAggAggAAACCA | S | 28650-673 | 59.1°C |
| AMHR2 S | gTgAggTCAAATgCTTAgAgCCA | S | 28676-698 | 58.7°C |
| AMHR2 mis | TgAggCCTTCCTATgCCCA | A | 28786-768 | 59.4°C |
| Ancbor AMHR2 | CCTTTCTAgCCTAAgATCTCTTTATATTCaggg- FL | S | 28717-749 | 61.9°C |
| Sensor c | 640- CATATCTgCAACCgCTTgg p | S | 28752-770 | 56.5°C |

2.3 Στατιστική Επεξεργασία

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαμορφώθηκε ένας πίνακας σε αρχείο τύπου excel, ο οποίος περιελάμβανε για την ομάδα των ασθενών της μελέτης τα παρακάτω στοιχεία:

- Ηλικία της γυναίκας
- Διάρκεια της υπογονιμότητας του ζευγαριού

- Προηγούμενος αριθμός προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης
- Αίτιο υπογονιμότητας (σαλπινγικός, ανδρικός, μικτός παράγοντας, ανεξήγητη υπογονιμότητα, άλλος παράγοντας)
- Βάρος
- Ύψος
- BMI
- Επίπεδα ορμονών FSH, LH, PRL, AMH, TSH κατά την έναρξη του κύκλου
- Αριθμός ημερών της διέγερσης
- Τιμή E2 την πέμπτη ημέρα (D5) της διέγερσης
- Τιμή E2 την ημέρα χορήγησης της hCG
- Αριθμός ωοθυλακίων στον υπερηχογραφικό έλεγχο
- Αριθμός των ωαρίων που λάβαμε κατά την ωοληψία και ποιότητα αυτών
- Ποσοστό γονιμοποίησης
- Έκβαση κύκλου
- Γονότυπος για το γονίδιο του υποδοχέα της AMH (AMHR)
- Γονότυπος για το γονίδιο του υποδοχέα της FSH (FSHR)

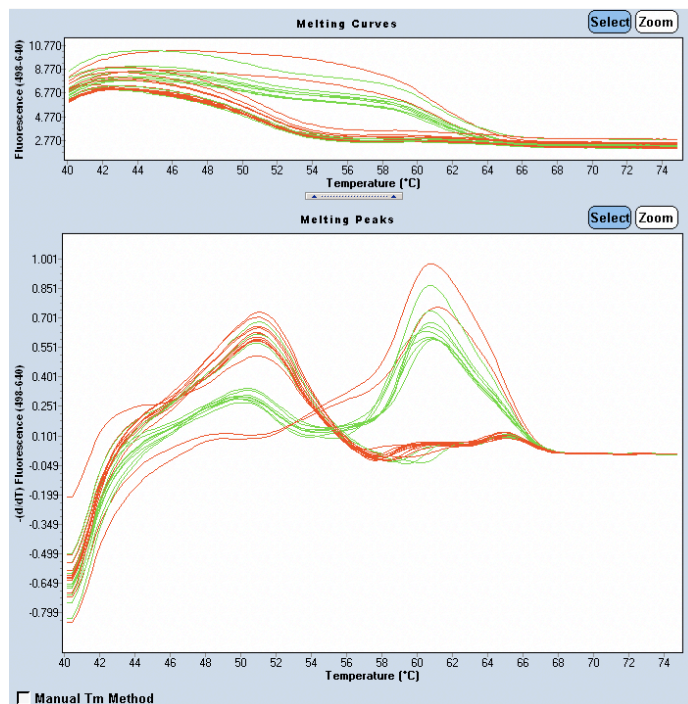
Η στατιστική επεξεργασία των παραπάνω παραμέτρων έγινε με χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης 'Statistics Package for Social Sciences' (SPSS), version 15 και 17. Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε τις εξής μεθόδους: για τις παραμετρικές μεταβλητές independent sample t-test και one way ANOVA, και 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). Ένα p-value κατώτερο του 0.05 θεωρήθηκε ως στατιστικώς σημαντικό. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SD (mean \pm SD). Στο πείραμα οι συχνότητες των ομόζυγων για τον πολυμορφισμό είναι αρκετά χαμηλές μειώνοντας έτσι την ισχύ των στατιστικών δοκιμασιών.

3.Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συχνότητες δυο διαφορετικών πολυμορφισμών που εντοπίζονται στα γονιδια που κωδικοποιούν 1) τον υποδοχέα του FSH - FSHR (Ser680Asn) και 2) τον υποδοχέα της AMH - AMHR II (-482 A>G). Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης μέσω real-time PCR κατέδειξαν τρεις διαφορετικούς γονότυπους για κάθε ένα από τα δύο γονιδια που μελετήθηκαν αντίστοιχα: γυναίκες ομόζυγες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (wild type), γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό και γυναίκες ομόζυγες για τον πολυμορφισμό.

3.1 Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον FSHR

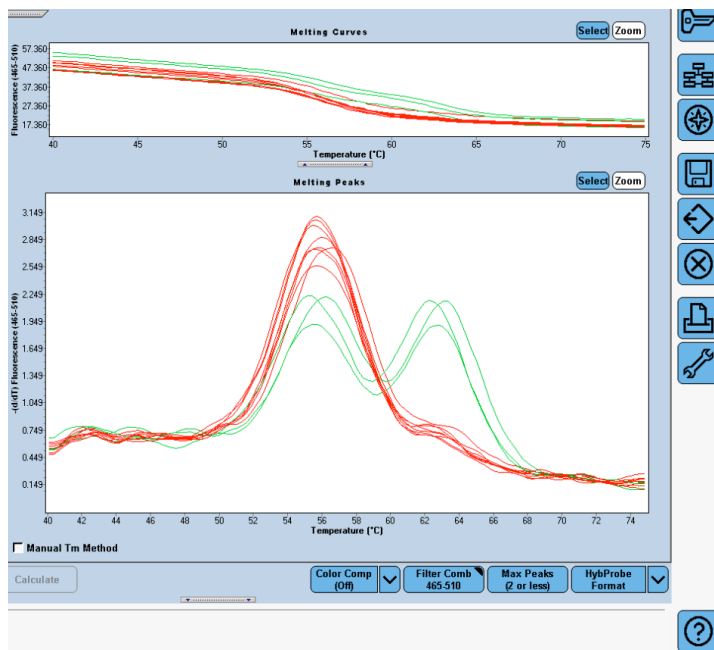
Για τον πολυμορφισμό Ser680Asn, ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε, έχει σχεδιαστεί ώστε να αναγνωρίζει το πολυμορφικό αλληλόμορφο A (αμινοξύ Asn), καθώς έχει υψηλότερη θερμοκρασία τήξης συγκριτικά με το φυσιολογικό αλληλόμορφο (62.1°C VS. 53.4°C), ενώ οι ετερόζυγες γυναίκες απεικονίζονται με 2 κορυφές στις καμπύλες τήξης (πράσινες καμπύλες).



Εικόνα 3.1: Αποτελέσματα μετά από RT-PCR για τον πολυμορφισμό Ser680Asn στο γονίδιο του υποδοχέα της FSH

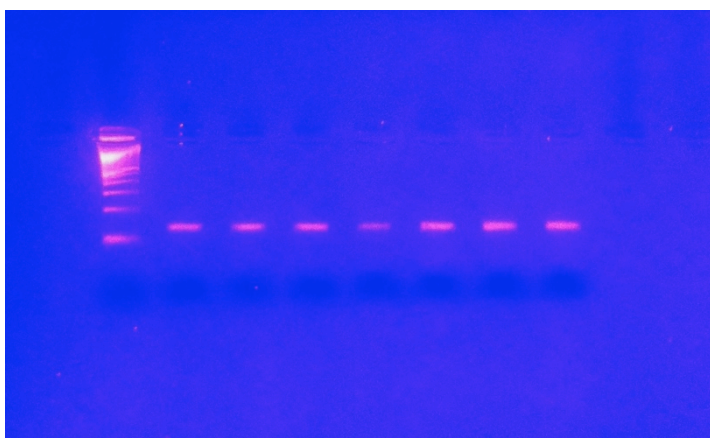
3.2. Αποτελέσματα γονοτύπησης για τον AMHR11

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT-PCR για τον πολυμορφισμό του υποδοχέα τύπου II της AMH - AMHR11 (-482 A>G). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε έχει σχεδιαστεί ώστε να αναγνωρίζει το πολυμορφικό αλληλόμορφο. Οι πράσινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν τις γυναίκες που είναι ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό, ενώ οι κόκκινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν είτε τις γυναίκες που είναι ομόζυγες για τον πολυμορφισμό είτε εκείνες που δεν εμφανίζουν τον πολυμορφισμό, ανάλογα με το αν παρουσιάζουν θερμοκρασία τήξης στους 61-62°C ή στους 49-52°C αντίστοιχα.



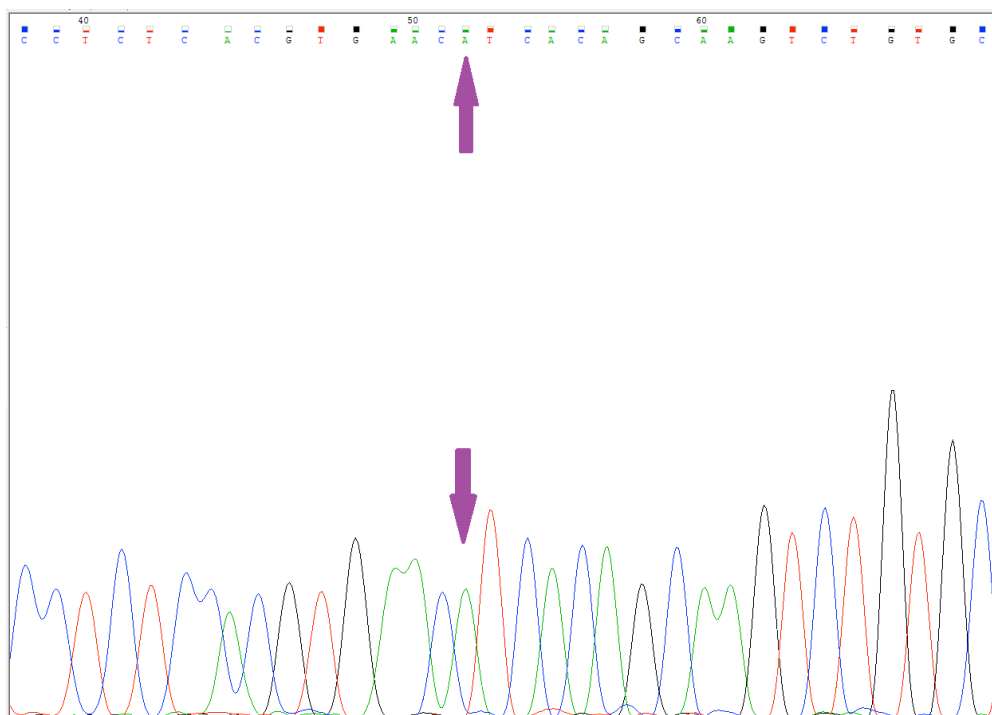
Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα μετά από RT-PCR για τον πολυμορφισμό -482 A>G στο γονίδιο του υποδοχέα της AMH

Επιπλέον, για ορισμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα κλασικής PCR και έγινε καταγραφή των αποτελεσμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης.



Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης μετά από κλασσική PCR

Για την μελέτη του πολυμορφισμού της AMH σε 25 δείγματα της μελέτης πραγματοποιήθηκε sequencing .Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ηλεκτροφερογράφημα (electropherogram) με τη βοήθεια του προγράμματος Chromas Lite, μια αλληλουχία κορυφών (peaks) τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA.



Εικόνα 3.4: Παρουσίαση αποτελεσμάτων sequencing με τη βοήθεια του προγράμματος Chromas Lite

3.3. Κατανομή των συχνότητων των γονοτύπων στις δυο ομάδες

Αρχικά, μελετήθηκε η κατανομή της συχνότητας των 3 γονοτύπων (ομόζυγος για το φυσιολογικό, ετερόζυγος, ομόζυγος για το πολυμορφικό αλληλόμορφο) για τους δύο μελετώμενους πολυμορφισμούς, στους 2 πληθυσμούς: ομάδα ελέγχου και ομάδα IVF. Δε διαπιστώθηκε διαφορά στην κατανομή συχνότητας των διαφορετικών γονοτύπων των δυο πολυμορφισμών μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας IVF, όπως καταδεικνύουν οι παρακάτω πίνακες (3,4).

Πίνακας 3. Κατανομή της συχνότητας των γονοτύπων για τον Ser680Asn SNP

| <i>FSHR</i> | Ομάδα IVF (n, %) | Ομάδα ελέγχου (n, %) | |
|------------------------------------|------------------|----------------------|------------------------|
| Φυσιικός Τύπος Ser/Ser | 31 (24.6%) | 32 (34.04%) | p-value = 0.230 |
| Ετερόλογος Τύπος Ser/Asn | 64 (50.80%) | 38 (40.43%) | |
| Μεταλλαγμένος Τύπος Asn/Asn | 31 (24.60%) | 24 (25.53%) | |
| Total | 126 (100%) | 94 (100%) | |

Πίνακας 4. Κατανομή της συχνότητας των γονοτύπων για τον -482 A>G SNP

| <i>AMHR11</i> | Ομάδα IVF (n, %) | Ομάδα ελέγχου (n, %) | |
|-------------------------------|------------------|----------------------|------------------------|
| Φυσιικός Τύπος GG | 88 (71.54%) | 68 (68%) | p-value = 0.662 |
| Ετερόλογος Τύπος GA | 34 (27.65%) | 30 (30%) | |
| Μεταλλαγμένος Τύπος AA | 1 (0.81%) | 2 (2%) | |
| Total | 123 (100%) | 100 (100%) | |

Οι παρατηρούμενες συχνότητες των γονοτύπων ακολουθούν την ισορροπία Hardy-Weinberg, γεγονός που σημαίνει ότι πρόκειται για παμεικτικούς πληθυσμούς και τυχαία δείγματα.

3.4. Πληθυσμός IVF γυναικών - χαρακτηριστικά

Συνολικά, η μελέτη περιλάμβανε 123 γυναίκες που συμμετείχαν σε πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στο εργαστήριο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στον παρακάτω πίνακα (5) φαίνονται τα γενικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στην μελέτη: κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, οι παράμετροι του πρωτοκόλλου διέγερσης ωοθηκών, και οι παράμετροι έκβασης του πρωτοκόλλου.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά των γυναικών της μελέτης

| Χαρακτηριστικά | |
|---|-------------------|
| Ηλικία (years) ¹ | 37.3 ± 5.1 |
| Βάρος (kg) ² | 61.5 (55.1, 70.1) |
| Ύψος (m) ¹ | 1.64 ± 0.06 |
| BMI (kg/m ²) ¹ | 24.0 ± 4.8 |
| FSH (mIU/L) ² | 7.8 (5.8, 10.9) |
| Συνολική δόση FSH (IU) ¹ | 3281.7 ± 1161.2 |
| LH (mIU/L) ² | 5.2 (3.9, 6.8) |
| PRL ² | 11.8 (8.5, 16.5) |
| AMH ² | 5 (1.9, 17) |
| TSH ² | 1.5 (1.1, 2.5) |
| Διάρκεια υπογονιμότητας (years) ² | 3 (2, 6) |
| Αριθμός προηγούμενων προσπαθειών ² | 1 (1, 2) |
| Ημέρες διέγερσης ¹ | 10.2 ± 1.5 |
| E2 (day 5) (pg/ml) ² | 372 (210, 583) |
| E2 (day hCG) (pg/ml) ² | 1544 (920, 2467) |
| Αριθμός ωοθυλακίων ¹ | 6.0 ± 3.1 |
| Αριθμός ωαρίων ² | 5 (3, 8) |
| Ποιότητα ωαρίων ² | 3 (2, 5) |
| Ποσοστό μεταλλάξεων (%) ² | 0.75 (0.62, 0.85) |
| Γονιμοποιημένα ωάρια ² | 3.5 (2, 5) |
| Ποσοστό γονιμοποίησης (%) ² | 0.75 (0.66, 0.85) |
| Λόγος IVF (n, %) | |

| | | |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| | Σαλπινγκικός Παράγοντας | 64 (50.8) |
| | Ανδρικός Παράγοντας | 54 (42.8) |
| | Μικτός | 4 (3.2) |
| | Ανεξήγητη Υπογονιμότητα | 2 (1.6) |
| | Άλλος Παράγοντας | 2 (1.6) |
| Εγκυμοσύνη (n, %) | | |
| | Yes | 16 (13.1) |
| | No | 106 (86.9) |

¹ Mean ± SD

² Median (25th Percentile, 75th Percentile)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συνδυαστική μελέτη των δύο πολυμορφισμών, στον υπό μελέτη πληθυσμό IVF γυναικών. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, προκύπτουν 9 πιθανοί συνδυασμοί, εκ των οποίων δυο συνδυασμοί παρουσιάζουν μηδενική συχνότητα, και ορισμένοι συνδυασμοί ήταν ιδιαίτερα σπάνιοι στον υπο μελέτη ελληνικό πληθυσμό.

Επίσης, ο υπό μελέτη πληθυσμός μελετήθηκε ως εξής: πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση ανάλογα με τον αριθμό των πολυμορφικών αλληλίων που έφεραν οι γυναίκες, 0, 1, 2, 3 ή και 4 πολυμορφικά αλληλία. Η κατανομή αυτή παρουσιάζεται στον πίνακα 7.

Πίνακας 6. Συνδυαστική μελέτη των δύο πολυμορφισμών

| A/A | Συνδυασμός γονοτύπων FSHR+AMHR11 | Συχνότητα | Ποσοστό (%) | Συνδυασμός αλληλομόρφων |
|---------------|---|------------------|--------------------|--------------------------------|
| 1 | Φυσικός Τύπος Ser/Ser + Φυσικός Τύπος | 18 | 14,63414634 | ppxx |
| 2 | Φυσικός Τύπος Ser/Ser + Ετερόλογος Τύπος | 11 | 8,943089431 | ppxX |
| 3 | Φυσικός Τύπος Ser/Ser + Μεταλλαγμένος Τύπος | 0 | 0 | ppXX |
| 4 | Ετερόλογος Τύπος Ser/Asn + Φυσικός Τύπος | 48 | 39,02439024 | pPxx |
| 5 | Ετερόλογος Τύπος Ser/Asn + Ετερόλογος Τύπος | 14 | 11,38211382 | pPxX |
| 6 | Ετερόλογος Τύπος Ser/Asn + Μεταλλαγμένος Τύπος | 1 | 0,81300813 | pPXX |
| 7 | Μεταλλαγμένος Τύπος Asn/Asn + Φυσικός Τύπος | 22 | 17,88617886 | PPxx |
| 8 | Μεταλλαγμένος Τύπος Asn/Asn + Ετερόλογος Τύπος | 9 | 7,317073171 | PPxX |
| 9 | Μεταλλαγμένος Τύπος Asn/Asn + Μεταλλαγμένος Τύπος | 0 | 0 | PPXX |
| Σύνολο | | 123 | 100 | |

Πίνακας 7. Ομαδοποίηση ανάλογα με τον αριθμό των πολυμορφικών αλληλίων

| Αριθμός αλληλομόρφων με πολυμορφισμό | Πιθανός συνδυασμός γονοτύπων | N | % |
|--------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|
| 0 | rrxx | 18 | 14,63414634 |
| 1 | rrxX/pPxx | 59 | 47,96747967 |
| 2 | pPxX/PPxx | 36 | 29,26829268 |
| 3 | pPXX/PPxX | 10 | 8,130081301 |
| Σύνολο | | 123 | 100 |

Για την στατιστική επεξεργασία της συνδυαστικής μελέτης των δυο πολυμορφισμών έγινε περαιτέρω ομαδοποίηση με κριτήριο τον αριθμό των πολυμορφισμών στα αλληλόμορφα και προέκυψαν τρεις ομάδες: ομάδα 0, ομάδα 1 και ομάδα 2-3. Η πρώτη ομάδα περιέχει τον πληθυσμό που δεν φέρει κανένα πολυμορφικό αλληλόμορφο η οποία και θεωρήθηκε ως η βασική (baseline) για την στατιστική επεξεργασία, η δεύτερη ομάδα περιέχει τον πληθυσμό που φέρει μόνο ένα πολυμορφικό αλληλόμορφο ενώ η τρίτη ομάδα περιέχει τον πληθυσμό που φέρει δύο ή και τρία πολυμορφικά αλληλόμορφα. Στους παρακάτω πίνακες (8,9) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη στατιστική συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε. Ο πίνακας 8 δείχνει τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής στατιστικής επεξεργασίας ενώ στον πίνακα 9 βρίσκονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μονοπαραγοντική επεξεργασία των μεταβλητών.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων

| | | | Coefficient | 95% Confidence Interval | p value |
|-------------------------------|---|-------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| AMH | | | | | |
| | | Ηλικία | -0.27 | (-0.63, 0.06) | 0.106 |
| | | BMI | -0.24 | (-0.59, 0.12) | 0.188 |
| | | FSH | -0.72 | (-1.18, -0.26) | 0.002 |
| | | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | | 1 | 5.55 | (0.58, 10.51) | 0.029 |
| | | 2 or 3 | 2.86 | (-2.26, 7.99) | 0.271 |
| Λόγος IVF ¹ | | | | | |
| | Σαλπινγκικός Παράγοντας | Ηλικία | 1.15 | (1.06, 1.26) | 0.001 |
| | | BMI | 0.97 | (0.88, 1.06) | 0.455 |
| | | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | | 1 | 5.77 | (1.42, 23.78) | 0.015 |
| | | 2 or 3 | 5.91 | (1.39, 25.31) | 0.016 |
| | Ανδρικός Παράγοντας (baseline category) | Ηλικία | - | - | - |

| | | | | |
|-------------------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | BMI | - | - | - |
| | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | 1 | - | - | - |
| | 2 or 3 | - | - | - |
| Μικτός | Ηλικία | 1.03 | (0.82, 1.28) | 0.791 |
| | BMI | 0.76 | (0.49, 1.15) | 0.191 |
| | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | 1 | 1.14 | (0.09, 14.55) | 0.916 |
| | 2 or 3 | 0.76 | (0.04, 13.89) | 0.853 |
| Ανεξήγητη Υπογονιμότητα | Ηλικία | 0.84 | (0.48, 1.45) | 0.525 |
| | BMI | 1.29 | (0.98, 1.70) | 0.06 |
| | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | 1 | 0.00000012 | - | 0.994 |
| | 2 or 3 | 0.16 | (0.002, 16.595) | 0.439 |
| Άλλος Παράγοντας | Ηλικία | 1.27 | (0.87, 1.88) | 0.211 |
| | BMI | 1.07 | - | 0.106 |
| | Αρ. πολυμορφισμών | | | |
| | 1 | 0.000000064 | - | 0.994 |
| | 2 or 3 | 0.718 | (0.037, 13.964) | 0.827 |

¹ Multinomial Logistic Regression (Relative Risk Ratio)

² Logistic Regression (Odds Ratio)

Πίνακας 9. Αποτελέσματα μονοπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων

| | Αρ. Πολυμορφισμών | Coefficient | 95% Confidence Interval | p value |
|---|-------------------|-------------|-------------------------|--------------|
| Ηλικία | 1 | 0.88 | (-1.87, 3.63) | 0.529 |
| | 2 or 3 | 0.93 | (-1.91, 3.77) | 0.521 |
| Βάρος | 1 | -1.11 | (-8.43, 6.22) | 0.765 |
| | 2 or 3 | -1.4 | (-8.96, 6.16) | 0.714 |
| Ύψος | 1 | 0.005 | (-0.03, 0.04) | 0.792 |
| | 2 or 3 | -0.008 | (-0.04, 0.03) | 0.653 |
| BMI | 1 | -0.46 | (-3.05, 2.13) | 0.728 |
| | 2 or 3 | -0.11 | (-2.79, 2.56) | 0.934 |
| FSH | 1 | -0.48 | (-2.54, 1.58) | 0.648 |
| | 2 or 3 | -0.23 | (-2.37, 1.91) | 0.833 |
| Συνολική δόση FSH | 1 | 359.5 | (-267.4, 986.4) | 0.258 |
| | 2 or 3 | 346.8 | (-303.3, 996.9) | 0.293 |
| LH | 1 | -0.21 | (-2.57, 2.15) | 0.859 |
| | 2 or 3 | -1.45 | (-3.90, 1.01) | 0.245 |
| PRL | 1 | -0.54 | (-4.56, 3.47) | 0.789 |
| | 2 or 3 | 0.26 | (-3.86, 4.38) | 0.902 |
| AMH | 1 | 5.94 | (0.71, 11.18) | 0.027 |
| | 2 or 3 | 2.44 | (-2.97, 7.85) | 0.374 |
| TSH | 1 | 0.38 | (-0.61, 1.36) | 0.452 |
| | 2 or 3 | -0.31 | (-1.33, 0.72) | 0.553 |
| Διάρκεια υπογονιμότητας | 1 | 0.54 | (-1.96, 3.05) | 0.669 |
| | 2 or 3 | 0.09 | (-2.50, 2.69) | 0.943 |
| Αριθμός προηγούμενων προσπαθειών | 1 | 0.35 | (-0.38, 1.07) | 0.346 |
| | 2 or 3 | -1.4 | (-8.96, 6.16) | 0.714 |
| Ημέρες διέγερσης | 1 | 0.32 | (-0.47, 1.11) | 0.429 |
| | 2 or 3 | 0.36 | (-0.46, 1.18) | 0.386 |
| Αριθμός ωοθυλακίων | 1 | -0.35 | (-2.04, 1.34) | 0.684 |
| | 2 or 3 | -1.02 | (-2.77, 0.73) | 0.25 |

| | | | | | |
|--------------------------------|---|--------|---------------|----------------------|--------------|
| Αριθμός ωαρίων | 1 | -0.006 | (-1.64, 1.62) | 0.994 | |
| | 2 or 3 | -0.8 | (-2.5, 0.89) | 0.349 | |
| Ποιότητα ωαρίων | 1 | -0.17 | (1.49, 1.15) | 0.796 | |
| | 2 or 3 | -0.56 | (-1.91, 0.81) | 0.425 | |
| Ποσοστό μεταλλάξεων | 1 | -0.017 | (-0.11, 0.08) | 0.719 | |
| | 2 or 3 | 0.032 | (-0.07, 0.13) | 0.531 | |
| Γονιμοποιημένα ωάρια | 1 | 0.006 | (-1.26, 1.28) | 0.993 | |
| | 2 or 3 | -0.63 | (-1.26, 1.28) | 0.343 | |
| Ποσοστό γονιμοποίησης | 1 | 0.01 | (-0.08, 0.10) | 0.832 | |
| | 2 or 3 | -0.008 | (-0.11, 0.09) | 0.874 | |
| Λόγος IVF ¹ | | | | | |
| | Σαλπινγκικός Παράγοντας | 1 | 5.92 | (1.50, 23.32) | 0.011 |
| | | 2 or 3 | 6.12 | (1.50, 25.0) | 0.012 |
| | Ανδρικός Παράγοντας (baseline category) | 1 | - | - | - |
| | | 2 or 3 | - | - | - |
| | Μικτός | 1 | 1.04 | (0.09, 12.71) | 0.973 |
| | | 2 or 3 | 0.71 | (0.04, 12.4) | 0.812 |
| | Ανεξήγητη Υπογονιμότητα | 1 | 0.00000006 | | 0.995 |
| | | 2 or 3 | 0.71 | (0.04, 12.43) | 0.812 |
| | Άλλος Παράγοντας | 1 | 0.00000006 | - | 0.995 |
| | | 2 or 3 | 0.71 | (0.04, 12.43) | 0.812 |
| Εγκυμοσύνη ² | | | | | |
| | Ναι | 1 | 1.12 | (0.21, 5.95) | 0.894 |
| | | 2 or 3 | 1.51 | (0.28, 8.09) | 0.628 |
| | Όχι (baseline category) | 1 | - | - | - |
| | | 2 or 3 | - | - | - |

Από όλες τις μελετώμενες παραμέτρους οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που προέκυψαν αφορούσαν στο αίτιο της IVF, καθώς και στα επίπεδα της AMH.

Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία λόγος IVF και συγκεκριμένα σε ότι αφορά τον σαλπινγκικό παράγοντα προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά για τις ομάδες 1 και 2-3, με το p-value να είναι 0,015 και 0,016 αντίστοιχα. Ο σχετικός κίνδυνος που ορίζεται ως το πηλίκο των πιθανοτήτων των γυναικών που έκαναν εξωσωματική λόγω σαλπινγκικού παράγοντα προς αυτές που έκαναν εξωσωματική λόγω ανδρικού παράγοντα είναι 5,8 φορές υψηλότερος σε γυναίκες με 1 πολυμορφισμό σε σχέση με τον αντίστοιχο λόγο σε γυναίκες με κανέναν πολυμορφισμό, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία και το BMI. Αντίστοιχα, ο σχετικός κίνδυνος που ορίζεται ως το πηλίκο των πιθανοτήτων των γυναικών που έκαναν εξωσωματική λόγω σαλπινγκικού παράγοντα προς αυτές που έκαναν εξωσωματική λόγω ανδρικού παράγοντα είναι εξαπλάσιος σε γυναίκες με 2 ή 3 πολυμορφισμούς σε σχέση με τον αντίστοιχο λόγο σε γυναίκες με κανέναν πολυμορφισμό, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία και το BMI.

Επιπλέον, ο σχετικός κίνδυνος που ορίζεται ως το πηλίκο των πιθανοτήτων των γυναικών που

έκαναν εξωσωματική λόγω σαλπιγγικού παράγοντα προς αυτές που έκαναν εξωσωματική λόγω ανδρικού παράγοντα είναι αυξημένος κατά 15% για αύξηση της ηλικίας τους κατά 1 έτος, έχοντας σταθμίσει για τον λόγο που οδήγησε τις γυναίκες στην εξωσωματική και το BMI. Επίσης, ο σχετικός κίνδυνος που ορίζεται ως το πηλίκο των πιθανοτήτων των γυναικών που έκαναν εξωσωματική λόγω ανεξήγητης υπογονιμότητας προς αυτές που έκαναν εξωσωματική λόγω ανδρικού παράγοντα είναι αυξημένος κατά 30% για αύξηση του BMI τους κατά 1 μονάδα, έχοντας σταθμίσει για τον λόγο που οδήγησε τις γυναίκες στην εξωσωματική και την ηλικία (επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 10%).

Σε ότι αφορά τα επίπεδα της AMH φαίνεται πως οι γυναίκες με 1 πολυμορφισμό έχουν κατά μέσο όρο αυξημένη συγκέντρωση ορμόνης AMH στο αίμα τους κατά 5.5 μονάδες σε σύγκριση με τις γυναίκες με κανέναν πολυμορφισμό, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία, το BMI και την FSH. Επιπλέον, οι γυναίκες με κανένα πολυμορφισμό για κάθε μία μονάδα αύξησης της ορμόνης FSH η μέση συγκέντρωση ορμόνης AMH στο αίμα τους αναμένεται να είναι μειωμένη κατά 72%, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία και το BMI.

4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με γνώμονα τον προσδιορισμό και αποσαφήνισμό του πιθανού ρόλου του συνδυασμού δυο πολυμορφισμών (SNP's) που εντοπίζονται σε δυο διαφορετικά γονίδια. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν πολυμορφισμούς που εντοπίζονται στα γονίδια των υποδοχέων των ορμονών AMH και FSH. Η πιο πρόσφατη μελέτη που αφορά σε πολυμορφισμούς των AMH/AMHR II πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες με φυσιολογικούς ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους και κατέδειξε ότι οι γυναίκες που έφεραν τον πολυμορφισμό της AMH Ile 49 Ser εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης την 3^η ημέρα του καταμήνιου κύκλου σε σχέση με αυτές που δεν έφεραν το πολυμορφικό αλληλίο. Το ίδιο υψηλά ήταν τα επίπεδα της οιστραδιόλης και για όσες γυναίκες ήταν ετερόζυγες ή ομόζυγες για τον πολυμορφισμό του υποδοχέα AMHRII, γεγονός που καταδεικνύει ότι η AMH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ευαισθησίας των ωοθυλακίων ως προς την FSH στις ωοθήκες. (Kevenaar, Themmen et al. 2007). Επιπλέον, η πιο πρόσφατη μελέτη για τον FSHR δημοσιεύτηκε το 2017: πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση 377 γυναικών και παρατηρήθηκε άμεση συσχέτιση της ύπαρξης των δυο πολυμορφισμών Thr307Ala και Asn680Ser στο γονίδιο του FSHR με την εμφάνιση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών.

Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει στο παρελθόν τον πιθανό ρόλο που έχουν συνδυασμοί πολυμορφισμών στο γονίδιο της ορμόνης και του υποδοχέα της. Αρχικά ο de Castro και η ομάδα του το 2004 συνδυάζουν για πρώτη φορά την ύπαρξη πολυμορφισμών σε ένα σετ γονιδίων των υποδοχέων FSHR, CYP19, ESR1 και ESR2. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ένας συνδυασμός πολυμορφισμών των υπό μελέτη γονιδίων μπορεί να εξηγήσει μερικώς την πτωχή απάντηση των γυναικών στην ελεγχόμενη διέγερση των πρωτοκόλλων κατά τη διαδικασία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Το 2012 δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μελέτης σε ελληνικό πληθυσμό, όπου συνδυάστηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια των ESR1,

ESR2 και FSHR με στόχο την συσχέτιση τους με τις παραμέτρους μιας προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Από τη μελέτη προέκυψε ότι οι γυναίκες ομόζυγες για τους πολυμορφισμούς στα γονίδια ESR1 και FSHR (γονότυπος CC/AA) ανήκαν στις πτωχές απαντήτριες και παρουσίαζαν μηδενικά ποσοστά κύησης (Anagnostou et al 2012). Στην συνέχεια, 3 χρόνια μετά πραγματοποιήθηκε η συνδυαστική μελέτη δυο πολυμορφισμών που εντοπίζονται στο γονίδιο της ορμόνης AMH και του υποδοχέα της AMHR2 αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης καλύτερη πρόγνωση όσον αφορά στην έκβαση της εξωσωματικής ίσως έχουν οι γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό στο γονίδιο της AMH (Ile49Ser), καθώς φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερες τιμές E2 σε σχέση με αυτές που δε φέρουν τον πολυμορφισμό, γεγονός που είναι αποδεκτό στα πλαίσια της IVF, ενώ από την άλλη όσον αφορά στον πολυμορφισμό του υποδοχέα (-482 A>G) καλύτερη έκβαση παρουσιάζουν οι γυναίκες που δε φέρουν τον πολυμορφισμό, λόγω των στατιστικά σημαντικών διαφορών που καταδεικνύουν στην τιμή E2, τον αριθμό ωοθυλακίων και ωαρίων τους σε σχέση με τις γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό του υποδοχέα (Karagiorga et al. 2015).

Έχοντας σημαντικό ερευνητικό υπόβαθρο από τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου σχεδιάστηκε το πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας όπου αυτή τη φορά μελετήθηκε ο συνδυασμός των πολυμορφισμών σε δυο διαφορετικούς υποδοχείς, AMHR2 και FSHR, που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία.

Η μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των SNP's σε σχέση με παραμέτρους όπως η ωοθηκική διέγερση των υπογόνιμων γυναικών που εισήχθησαν σε πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης, ενώ μελετήθηκε και η κατανομή των γονιδιακών πολυμορφισμών σε γυναίκες χωρίς υπογονιμότητα, με ιστορικό προηγούμενων κυήσεων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο γονότυπος και οι συχνότητες αλληλομόρφων για τους πολυμορφισμούς Ser680Asn του γονιδίου του υποδοχέα FSHR και -482 A>G AMH type II receptor του υποδοχέα της AMH και η κατανομή τους στον ελληνικό πληθυσμό. Η εξέταση του γενετικού υπόβαθρου των υπογόνιμων γυναικών αναμένεται να συμπληρώσει το γενετικό προφίλ των ασθενών που εισέρχονται σε πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης και κατ'

επέκταση να ανοίξει το δρόμο στο πεδίο της φαρμακογενετικής, επιτρέποντας το σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών ανάλογα με το γονιδιακό προφίλ της κάθε ασθενούς.

Η παρούσα μελέτη, που περιλαμβάνει τον συνδυασμό δυο πολυμορφισμών (SNPs) που εντοπίζονται σε δυο διαφορετικούς ορμονικούς υποδοχείς, στον υποδοχέα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSHR) και της αντι-μυλλέριου ορμόνης (AMHR), σε γυναίκες IVF/ICSI και σε ομάδα ελέγχου είναι η πρώτη μελέτη που έγινε για το συνδυασμό αυτών των δυο γονιδιακών τόπων. Από τη μελέτη επιβεβαιώνεται πως η συχνότητα των πολυμορφισμών αυτών δε διαφέρει σε γόνιμες και μη γόνιμες γυναίκες, στον ελληνικό πληθυσμό. Κατόπιν μελέτης όλων των ευρημάτων μπορούμε να καταλήξουμε στο ότι δεν προκύπτει κάποιος συσχετισμός με κλινική σημασία. Σε ότι αφορά τα επίπεδα της AMH φαίνεται πως οι γυναίκες με 1 πολυμορφισμό έχουν κατά μέσο όρο αυξημένη συγκέντρωση ορμόνης AMH στο αίμα τους κατά 5.5 μονάδες σε σύγκριση με τις γυναίκες με κανέναν πολυμορφισμό, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία, το BMI και την FSH. Επιπλέον, οι γυναίκες με κανένα πολυμορφισμό για κάθε μία μονάδα αύξησης της ορμόνης FSH η μέση συγκέντρωση ορμόνης AMH στο αίμα τους αναμένεται να είναι μειωμένη κατά 72%, έχοντας σταθμίσει για την ηλικία και το BMI. Το παράνω αποτέλεσμα φαίνεται να ενισχύει την προηγούμενη μελέτη της Karagiorga et al., χωρίς όμως να προσφέρει κάτι νέο στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Περιορισμοί αυτής της μελέτης ήταν η μικρή ομάδα πληθυσμού IVF και η ασθενής εκπροσώπηση των πολυμορφικών αλληλίων για τον υποδοχέα της AMH.

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, οι παρατηρούμενες συχνότητες των γονότυπων και στις δυο ομάδες ακολουθούν την ισορροπία Hardy-Weinberg, γεγονός που σημαίνει ότι πρόκειται για παμεικτικούς πληθυσμούς και τυχαία δείγματα. Η κατανομή των γονότυπων τόσο του FSHR όσο και του AMHRII δε διαφέρει μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των γυναικών IVF.

Η παρούσα μελέτη δίνει το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών και σε σχέση με τα πρωτόκολλα διέγερσης IVF, ούτως ώστε να επιλέγονται συγκεκριμένα πρωτόκολλα για συγκεκριμένους γονότυπους. Παράλληλα, μπορούν να διερευνηθούν τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, καθώς και οι παράμετροι ωοθηκικής διέγερσης και των 9 διαφορετικών συνδυασμών γονότυπων που μπορούν να προκύψουν από το συνδυασμό των αλληλόμορφων αλλά και σε σχέση με τους γονοτύπους των γονιδίων για τις βασικές ορμόνες FSH και AMH. Τα πορίσματα αυτά σε συνδυασμό και με άλλες γενετικές παραμέτρους, όπως οι πολυμορφισμοί των ESR1 και ESR2 δύνανται να ξεκαθαρίσουν το τοπίο και να συμβάλλουν στην πρόγνωση της καλής ή όχι έκβασης μιας προσπάθειας εξωσωματικής προτού οι γυναίκες εισέλθουν σε κάποιο πρωτόκολλο θεραπείας υπογονιμότητας, με εξέταση συγκεκριμένων γενετικών δεικτών.

Επιπλέον, το παλιότερο trend του genome one analysis έρχεται τώρα να αντικατασταθεί από την ταυτόχρονη παρατήρηση της έκφρασης και της γονοτυπικής ανάλυσης περισσότερων γονιδίων με τις genome-wide association studies-WGAS, που θα δώσουν μια νέα εικόνα των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την φυσιολογική ή μη αναπαραγωγική λειτουργία, ανοίγοντας έτσι το δρόμο σε νέες εξελίξεις τόσο στην ιατρική όσο και στην φαρμακογενετική.

Οι γνώσεις μας για τη δράση των ορμονών αλλά και τη σπουδαιότητα των υποδοχέων τους στη φυσιολογία της ωοθήκης είναι σχετικά πρόσφατες. Εδραιώνοντας τον ρόλο τους και

αποκτώντας μια πιο ξεκάθαρη εικόνα των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, θα μπορέσει ίσως η ερευνητική κοινότητα να ελέγξει την ωοθυλακιογένεση *in vivo*. Μακροπρόθεσμα, θα ενδιέφερε την ιατρική κοινότητα η καθυστέρησης της εκφύλισης των ωοθηκών με την ηλικία.

Στόχος της φαρμακογενετικής είναι μιας νέας γενιάς φαρμάκων, η οποία θα βασίζεται στην εξατομίκευση των πρωτοκόλλων με βάση το γενετικό προφίλ κάθε ζευγαριού, αποσκοπώντας στην επίτευξη του απώτερου στόχου, μιας κλινικής εγκυμοσύνης και την απόκτηση ενός υγιούς τέκνου.

6.Βιβλιογραφία

Aittomaki, K., J. L. Lucena, P. Pakarinen, P. Sistonen, J. Tapanainen, J. Gromoll, R. Kaskikari, E. M. Sankila, H. Lehvaslaiho, A. R. Engel, E. Nieschlag, I. Huhtaniemi and A. de la Chapelle (1995). "Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure." Cell **82**(6): 959-968.

Andersen, C. Y. and A. G. Byskov (2006). "Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid." J Clin Endocrinol Metab **91**(10): 4064-4069.

Arbo, E., D. V. Vetori, M. F. Jimenez, F. M. Freitas, N. Lemos and J. S. Cunha-Filho (2007). "Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills." Hum Reprod **22**(12): 3192-3196.

Arey, B. J., P. E. Stevis, D. C. Deecher, E. S. Shen, D. E. Frail, A. Negro-Vilar and F. J. Lopez (1997). "Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms." Mol Endocrinol **11**(5): 517-526.

Ashrafi, M., T. Madani, A. S. Tehranian and F. Malekzadeh (2005). "Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF." Int J Gynaecol Obstet **91**(1): 53-57.

Ataya, K., M. Tadros and A. Ramahi (1989). "Gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits physiologic ovarian follicular loss in rats." Acta Endocrinol (Copenh) **121**(1): 55-60.

Attisano, L. and J. L. Wrana (1996). "Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily." Cytokine Growth Factor Rev **7**(4): 327-339.

Barnhart, K. and J. Osheroff (1998). "Follicle stimulating hormone as a predictor of fertility." Curr Opin Obstet Gynecol **10**(3): 227-232.

Bedecarrats, G. Y., F. H. O'Neill, E. R. Norwitz, U. B. Kaiser and J. Teixeira (2003). "Regulation of gonadotropin gene expression by Mullerian inhibiting substance." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9348-9353.

Behre, H. M., R. R. Greb, A. Mempel, B. Sonntag, L. Kiesel, P. Kaltwasser, E. Seliger, F. Ropke, J. Gromoll, E. Nieschlag and M. Simoni (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): 451-456.

Broekmans, F. J., J. Kwee, D. J. Hendriks, B. W. Mol and C. B. Lambalk (2006). "A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome." Hum Reprod Update **12**(6): 685-718.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.

Conway, G. S., E. Conway, C. Walker, W. Hoppner, J. Gromoll and M. Simoni (1999). "Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **51**(1): 97-99.

d'Alva, C. B., P. Serafini, E. Motta, M. B. Kohek, A. C. Latronico and B. B. Mendonca (2005). "Absence of follicle-stimulating hormone receptor activating mutations in women with iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome." Fertil Steril **83**(6): 1695-1699.

Daelemans, C., G. Smits, V. de Maertelaer, S. Costagliola, Y. Englert, G. Vassart and A. Delbaere (2004). "Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism." J Clin Endocrinol Metab **89**(12): 6310-6315.

Davis, D., X. Liu and D. L. Segaloff (1995). "Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function." Mol Endocrinol **9**(2): 159-170.

de Koning, C. H., T. Benjamins, P. Harms, R. Homburg, J. M. van Montfrans, J. Gromoll, M. Simoni and C. B. Lambalk (2006). "The distribution of FSH receptor isoforms is related to basal FSH levels in subfertile women with normal menstrual cycles." Hum Reprod **21**(2): 443-446.

Devroey, P., B. C. Fauser and K. Diedrich (2009). "Approaches to improve the diagnosis and management of infertility." Hum Reprod Update **15**(4): 391-408.

Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, P. Kramer, B. Karels, T. R. Kumar, M. M. Matzuk, U. M. Rose, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen (2001). "Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary." Endocrinology **142**(11): 4891-4899.

Durlinger, A. L., P. Kramer, B. Karels, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." Endocrinology **140**(12): 5789-5796.

Durlinger, A. L., J. A. Visser and A. P. Themmen (2002). "Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone." Reproduction **124**(5): 601-609.

Faber, B. M., J. Mayer, B. Cox, D. Jones, J. P. Toner, S. Oehninger and S. J. Muasher (1998). "Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders." Fertil Steril **69**(5): 826-830.

Faddy, M. J. and R. G. Gosden (1995). "A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary." Hum Reprod **10**(4): 770-775.

Fauser, B. C. and A. M. Van Heusden (1997). "Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences." Endocr Rev **18**(1): 71-106.

Ferraretti, A. P., A. La Marca, B. C. Fauser, B. Tarlatzis, G. Nargund, L. Gianaroli and E. w. g. o. P. O. R. Definition (2011). "ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria." Hum Reprod **26**(7): 1616-1624.

Fraisse, T., V. Ibecheole, I. Streuli, P. Bischof and D. de Ziegler (2008). "Undetectable serum anti-Mullerian hormone levels and occurrence of ongoing pregnancy." Fertil Steril **89**(3): 723.e729-711.

Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon and C. Mathieu (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." Methods **25**(4): 386-401.

Greb, R. R., H. M. Behre and M. Simoni (2005). "Pharmacogenetics in ovarian stimulation - current concepts and future options." Reprod Biomed Online **11**(5): 589-600.

Gromoll, J., E. Pekel and E. Nieschlag (1996). "The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene." Genomics **35**(2): 308-311.

Gromoll, J., T. Ried, H. Holtgreve-Grez, E. Nieschlag and T. Gudermann (1994). "Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10." J Mol Endocrinol **12**(3): 265-271.

Gromoll, J. and M. Simoni (2005). "Genetic complexity of FSH receptor function." Trends Endocrinol Metab **16**(8): 368-373.

Grujters, M. J., J. A. Visser, A. L. Durlinger and A. P. Themmen (2003). "Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 85-90.

Gurunath, S., Z. Pandian, R. A. Anderson and S. Bhattacharya (2011). "Defining infertility--a systematic review of prevalence studies." Hum Reprod Update **17**(5): 575-588.

Halpin, D. M., H. M. Charlton and M. J. Faddy (1986). "Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice." J Reprod Fertil **78**(1): 119-125.

Hanevik, H. I., H. T. Hilmarsen, C. F. Skjelbred, T. Tanbo and J. A. Kahn (2010). "Single nucleotide polymorphisms in the anti-Mullerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation." Reprod Biomed Online **21**(5): 616-623.

Hehenkamp, W. J., C. W. Looman, A. P. Themmen, F. H. de Jong, E. R. Te Velde and F. J. Broekmans (2006). "Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation." J Clin Endocrinol Metab **91**(10): 4057-4063.

Houghton, S. G. and F. R. Cockerill, 3rd (2006). "Real-time PCR: overview and applications." Surgery **139**(1): 1-5.

Howe, E., S. Lintern-Moore, G. P. Moore and J. Hawkins (1978). "Ovarian development in hypopituitary Snell dwarf mice. The size and composition of the follicle population." Biol Reprod **19**(5): 959-964.

Hudson, P. L., I. Dougas, P. K. Donahoe, R. L. Cate, J. Epstein, R. B. Pepinsky and D. T. MacLaughlin (1990). "An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development." J Clin Endocrinol Metab **70**(1): 16-22.

Jennings, J. C., S. Mohan, T. A. Linkhart, R. Widstrom and D. J. Baylink (1988). "Comparison of the biological actions of TGF beta-1 and TGF beta-2: differential activity in endothelial cells." J Cell Physiol **137**(1): 167-172.

Josso, N. and N. Clemente (2003). "Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 91-97.

Jun, J. K., J. S. Yoon, S. Y. Ku, Y. M. Choi, K. R. Hwang, S. Y. Park, G. H. Lee, W. D. Lee, S. H. Kim, J. G. Kim and S. Y. Moon (2006). "Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET." J Hum Genet **51**(8): 665-670.

Karande, V., R. Morris, J. Rinehart, C. Miller, R. Rao and N. Gleicher (1997). "Limited success using the "flare" protocol in poor responders in cycles with low basal follicle-stimulating hormone levels during in vitro fertilization." Fertil Steril **67**(5): 900-903.

Katayama, K. P., M. Roesler, C. Gunnarson, E. Stehlik and S. Jagusch (1988). "Short-term use of gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide) for in vitro fertilization." J In Vitro Fert Embryo Transf **5**(6): 332-334.

Keay, S. D., N. H. Liversedge, R. S. Mathur and J. M. Jenkins (1997). "Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation." Br J Obstet Gynaecol **104**(5): 521-527.

Kerkela, E., H. Skottman, B. Friden, K. Bjuresten, J. Kere and O. Hovatta (2007). "Exclusion of coding-region mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes as the cause of ovarian hyperstimulation syndrome." Fertil Steril **87**(3): 603-606.

Kevenaar, M. E., A. P. Themmen, F. Rivadeneira, A. G. Uitterlinden, J. S. Laven, N. M. van Schoor, P. Lips, H. A. Pols and J. A. Visser (2007). "A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity." Hum Reprod **22**(9): 2382-2388.

Kiapekou, E., D. Loutradis, P. Drakakis, E. Zapanti, G. Mastorakos and A. Antsaklis (2005). "Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes." Hormones (Athens) **4**(3): 155-160.

Kiapekou, E., D. Loutradis, E. Patsoula, G. A. Koussidis, V. Minas, R. Bletsas, A. Antsaklis, S. Michalakis and A. Makrigiannakis (2005). "Prolactin receptor mRNA expression in oocytes and preimplantation mouse embryos." Reprod Biomed Online **10**(3): 339-346.

Kiapekou, E., E. Zapanti, G. Mastorakos, P. Beretsos, R. Bletsas, P. Drakakis, D. Loutradis and A. Antsaklis (2006). "Effect of prolactin in the absence of hCG on maturation, fertilization, and embryonic development of in vitro matured mouse oocytes." Ann N Y Acad Sci **1092**: 450-459.

Klinkert, E. R., F. J. Broekmans, C. W. Looman, J. D. Habbema and E. R. te Velde (2005). "The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization." Fertil Steril **83**(3): 811-814.

Klinkert, E. R., E. R. te Velde, S. Weima, P. M. van Zandvoort, R. G. Hanssen, P. R. Nilsson, F. H. de Jong, C. W. Looman and F. J. Broekmans (2006). "FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF." Reprod Biomed Online **13**(5): 687-695.

La Marca, A., V. De Leo, S. Giulini, R. Orvieto, S. Malmusi, L. Giannella and A. Volpe (2005). "Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause." J Soc Gynecol Investig **12**(7): 545-548.

La Marca, A., G. Dondi, G. Sighinolfi, S. Giulini, E. Papaleo, A. Cagnacci and M. J. Faddy (2014). "The ovarian response to controlled stimulation in IVF cycles may be predictive of the age at menopause." Hum Reprod **29**(11): 2530-2535.

La Marca, A., S. Giulini, R. Orvieto, V. De Leo and A. Volpe (2005). "Anti-Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy." Hum Reprod **20**(6): 1569-1572.

La Marca, A., M. Pati, R. Orvieto, G. Stabile, A. Carducci Artensio and A. Volpe (2006). "Serum anti-mullerian hormone levels in women with secondary amenorrhea." Fertil Steril **85**(5): 1547-1549.

La Marca, A., G. Sighinolfi, D. Radi, C. Argento, E. Baraldi, A. C. Artenisio, G. Stabile and A. Volpe (2010). "Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART)." Hum Reprod Update **16**(2): 113-130.

Laiho, M., F. M. Weis, F. T. Boyd, R. A. Ignatz and J. Massague (1991). "Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II." J Biol Chem **266**(14): 9108-9112.

Land, J. A., M. I. Yarmolinskaya, J. C. Dumoulin and J. L. Evers (1996). "High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome." Fertil Steril **65**(5): 961-965.

Lane, A. H. and P. K. Donahoe (1998). "New insights into mullerian inhibiting substance and its mechanism of action." J Endocrinol **158**(1): 1-6.

Laven, J. S., A. G. Mulders, D. A. Suryandari, J. Gromoll, E. Nieschlag, B. C. Fauser and M. Simoni (2003). "Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility." Fertil Steril **80**(4): 986-992.

Lee, M. M., P. K. Donahoe, T. Hasegawa, B. Silverman, G. B. Crist, S. Best, Y. Hasegawa, R. A. Noto, D. Schoenfeld and D. T. MacLaughlin (1996). "Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood." J Clin Endocrinol Metab **81**(2): 571-576.

Loutradis, D., E. Kiapekou, E. Zapanti and A. Antsaklis (2006). "Oocyte maturation in assisted reproductive techniques." Ann N Y Acad Sci **1092**: 235-246.

Loutradis, D., E. Patsoula, V. Minas, G. A. Koussidis, A. Antsaklis, S. Michalas and A. Makrigiannakis (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): 177-184.

Luna, M., L. Grunfeld, T. Mukherjee, B. Sandler and A. B. Copperman (2007). "Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization." Fertil Steril **87**(4): 782-787.

Lussiana, C., B. Guani, C. Mari, G. Restagno, M. Massobrio and A. Revelli (2008). "Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene." Obstet Gynecol Surv **63**(12): 785-795.

Massague, J. (1990). "Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors." J Biol Chem **265**(35): 21393-21396.

Massague, J., J. Seoane and D. Wotton (2005). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**(23): 2783-2810.

Messinis, I. E. (2005). "Ovulation induction: a mini review." Hum Reprod **20**(10): 2688-2697.

Mohamed, K. A., W. A. Davies and H. Lashen (2006). "Antimullerian hormone and pituitary gland activity after prolonged down-regulation with goserelin acetate." Fertil Steril **86**(5): 1515-1517.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Navot, D., Z. Rosenwaks and E. J. Margalioth (1987). "Prognostic assessment of female fecundity." Lancet **2**(8560): 645-647.

Oda, T., Y. Yoshimura, Y. Takehara, S. Kohriyama, Y. Sano, K. Tanabe, T. Kobayashi, Y. Nakamura, T. Ohno and S. Nozawa (1991). "Effects of prolactin on fertilization and cleavage of human oocytes." Horm Res **35 Suppl 1**: 33-38.

Patsoula, E., D. Loutradis, P. Drakakis, L. Michalas, R. Bletsas and S. Michalas (2003). "Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation-stage embryos." Fertil Steril **79**(5): 1187-1193.

Perez Mayorga, M., J. Gromoll, H. M. Behre, C. Gassner, E. Nieschlag and M. Simoni (2000). "Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3365-3369.

Perloe, M., D. P. Levy and E. S. Sills (2000). "Strategies for ascertaining ovarian reserve among women suspected of subfertility." Int J Fertil Womens Med **45**(3): 215-224.

Peters, R. (1969). "The problem of cytoplasmic integration." Proc R Soc Lond B Biol Sci **173**(1030): 11-19.

Picard, C., M. Silvy and J. Gabert (2006). "Overview of real-time RT-PCR strategies for quantification of gene rearrangements in the myeloid malignancies." Methods Mol Med **125**: 27-68.

Piltonen, T., L. Morin-Papunen, R. Koivunen, A. Perheentupa, A. Ruokonen and J. S. Tapanainen (2005). "Serum anti-Mullerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **20**(7): 1820-1826.

Raga, F., F. Bonilla-Musoles, E. M. Casan and F. Bonilla (1999). "Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome." Hum Reprod **14**(6): 1431-1434.

Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1989). "Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta." Am Rev Respir Dis **140**(4): 1126-1128.

Roberts, R., A. Iatropoulou, D. Ciantar, J. Stark, D. L. Becker, S. Franks and K. Hardy (2005). "Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro." Biol Reprod **72**(1): 107-118.

Rombauts, L., A. M. Suikkari, V. MacLachlan, A. O. Trounson and D. L. Healy (1998). "Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle." Fertil Steril **69**(4): 665-669.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.

Salha, O., N. Abusheikha and V. Sharma (1998). "Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation." Hum Reprod Update **4**(6): 816-832.

Salhi, I., S. Cambon-Roques, I. Lamarre, D. Laune, F. Molina, M. Pugniere, D. Pourquier, M. Gutowski, J. Y. Picard, F. Xavier, A. Pelegrin and I. Navarro-Teulon (2004). "The anti-Mullerian

hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand." Biochem J **379**(Pt 3): 785-793.

Schachter, M., S. Friedler, A. Raziel, D. Strassburger, O. Bern and R. Ron-el (2001). "Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase--a function of improved embryo quality." J Assist Reprod Genet **18**(4): 197-204.

Scheffer, G. J., F. J. Broekmans, C. W. Looman, M. Blankenstein, B. C. Fauser, F. H. teJong and E. R. teVelde (2003). "The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age." Hum Reprod **18**(4): 700-706.

Schmierer, B. and C. S. Hill (2007). "TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 970-982.

Schoolcraft, W., T. Schlenker, M. Gee, J. Stevens and L. Wagley (1997). "Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare, growth hormone protocol." Fertil Steril **67**(1): 93-97.

Segev, D. L., Y. Hoshiya, M. Hoshiya, T. T. Tran, J. L. Carey, A. E. Stephen, D. T. MacLaughlin, P. K. Donahoe and S. Maheswaran (2002). "Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 239-244.

Shaker, A. G., R. Fleming, M. E. Jamieson, R. W. Yates and J. R. Coutts (1992). "Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders." Fertil Steril **58**(5): 919-923.

Sharara, F. I., R. T. Scott, Jr. and D. B. Seifer (1998). "The detection of diminished ovarian reserve in infertile women." Am J Obstet Gynecol **179**(3 Pt 1): 804-812.

Simoni, M., J. Gromoll, W. Hoppner, A. Kamischke, T. Krafft, D. Stahle and E. Nieschlag (1999). "Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms." J Clin Endocrinol Metab **84**(2): 751-755.

Simoni, M., J. Gromoll and E. Nieschlag (1997). "The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology." Endocr Rev **18**(6): 739-773.

Smitz, J. E. and R. G. Cortvrindt (2002). "The earliest stages of folliculogenesis in vitro." Reproduction **123**(2): 185-202.

Sowers, M. R., A. D. Eyvazzadeh, D. McConnell, M. Yosef, M. L. Jannausch, D. Zhang, S. Harlow and J. F. Randolph, Jr. (2008). "Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition." J Clin Endocrinol Metab **93**(9): 3478-3483.

Streuli, I., T. Fraise, C. Chapron, G. Bijaoui, P. Bischof and D. de Ziegler (2009). "Clinical uses of anti-Mullerian hormone assays: pitfalls and promises." Fertil Steril **91**(1): 226-230.

Sudo, S., M. Kudo, S. Wada, O. Sato, A. J. Hsueh and S. Fujimoto (2002). "Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene." Mol Hum Reprod **8**(10): 893-899.

Sullivan, E. A., F. Zegers-Hochschild, R. Mansour, O. Ishihara, J. de Mouzon, K. G. Nygren and G. D. Adamson (2013). "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2004." Hum Reprod **28**(5): 1375-1390.

Sundblad, V., V. A. Chiauzzi, M. E. Escobar, L. Dain and E. H. Charreau (2004). "Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF)." Mol Cell Endocrinol **222**(1-2): 53-59.

Surrey, E. S., J. Bower, D. M. Hill, J. Ramsey and M. W. Surrey (1998). "Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization." Fertil Steril **69**(3): 419-424.

Tarlatzis, B. C., L. Zepiridis, G. Grimbizis and J. Bontis (2003). "Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review." Hum Reprod Update **9**(1): 61-76.

ten Dijke, P. and H. M. Arthur (2007). "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 857-869.

Toth, T. L., J. T. Awwad, L. L. Veeck, H. W. Jones, Jr. and S. J. Muasher (1996). "Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist. Use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program." J Reprod Med **41**(5): 321-326.

Tsepelidis, S., F. Devreker, I. Demeestere, A. Flahaut, C. Gervy and Y. Englert (2007). "Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women." Hum Reprod **22**(7): 1837-1840.

van der Steeg, J. W., P. Steures, M. J. Eijkemans, J. D. Habbema, P. G. Hompes, F. J. Broekmans, P. X. Bouckaert, P. M. Bossuyt, F. van der Veen and B. W. Mol (2007). "Predictive value and clinical impact of Basal follicle-stimulating hormone in subfertile, ovulatory women." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2163-2168.

van der Stege, J. G. and P. J. van der Linden (2001). "Useful predictors of ovarian stimulation response in women undergoing in vitro fertilization." Gynecol Obstet Invest **52**(1): 43-46.

van Disseldorp, J., M. J. Faddy, A. P. Themmen, F. H. de Jong, P. H. Peeters, Y. T. van der Schouw and F. J. Broekmans (2008). "Relationship of serum antimullerian hormone concentration to age at menopause." J Clin Endocrinol Metab **93**(6): 2129-2134.

Verberg, M. F., M. J. Eijkemans, N. S. Macklon, E. M. Heijnen, E. B. Baart, F. P. Hohmann, B. C. Fauser and F. J. Broekmans (2009). "The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis." Hum Reprod Update **15**(1): 5-12.

Visser, J. A., F. H. de Jong, J. S. Laven and A. P. Themmen (2006). "Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function." Reproduction **131**(1): 1-9.

Watt, A. H., A. T. Legedza, E. S. Ginsburg, R. L. Barbieri, R. N. Clarke and M. D. Hornstein (2000). "The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization." J Assist Reprod Genet **17**(5): 264-268.

Weenen, C., J. S. Laven, A. R. Von Bergh, M. Cranfield, N. P. Groome, J. A. Visser, P. Kramer, B. C. Fauser and A. P. Themmen (2004). "Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment." Mol Hum Reprod **10**(2): 77-83.

Wilson, C. A., N. di Clemente, C. Ehrenfels, R. B. Pepinsky, N. Josso, B. Vigier and R. L. Cate (1993). "Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily." Mol Endocrinol **7**(2): 247-257.

Wunder, D. M., J. Guibourdenche, M. H. Birkhauser and N. A. Bersinger (2008). "Anti-Mullerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **90**(6): 2203-2210.

Wunsch, A., Y. Ahda, F. Banaz-Yasar, B. Sonntag, E. Nieschlag, M. Simoni and J. Gromoll (2005). "Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor." Fertil Steril **84**(2): 446-453.

Yang, C. Q., K. Y. Chan, H. Y. Ngan, U. S. Khoo, P. M. Chiu, Q. K. Chan, W. C. Xue and A. N. Cheung (2006). "Single nucleotide polymorphisms of follicle-stimulating hormone receptor are associated with ovarian cancer susceptibility." Carcinogenesis **27**(7): 1502-1506.

Yoshimura, Y., Y. Nakamura, H. Yamada, T. Nanno, Y. Ubukata, M. Ando and M. Suzuki (1991). "Gonadotropin-releasing hormone agonists induce meiotic maturation and degeneration of oocytes in the in vitro perfused rabbit ovary." Fertil Steril **55**(1): 177-183.

Zhao, J., M. A. Taverne, G. C. Van Der Weijden, M. M. Bevers and R. Van Den Hurk (2001). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles." Mol Reprod Dev **58**(3): 287-296.

Zhu, L., N. Ohan, Y. Agazie, C. Cummings, S. Farah and X. J. Liu (1998). "Molecular cloning and characterization of Xenopus insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced Xenopus oocyte maturation and expression during embryogenesis." Endocrinology **139**(3): 949-954.