



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΜΟΝΑΔΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ
ΕΜΒΡΥΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΩΘΗΚΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ
ΩΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ

ΓΚΑΛΙΔΗ ANNA
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΜΟΝΑΔΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ
ΕΜΒΡΥΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΩΘΗΚΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ
ΩΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ**

ΓΚΑΛΙΔΗ ΑΝΝΑ

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2010

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ Γκαλίδη Άννας: 13-2-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 577^α/4-4-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας

Μέλη

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλανταρίδου Σοφία Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής –γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-7-2006

«Μελέτη γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 687^α/8-6-2010

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας -Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλανταρίδου Σοφία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογία Ενδοκρινολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

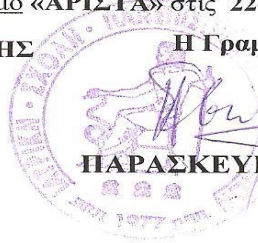
Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-6-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Η Γραμματέας της Σχολής

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

*Στους γονείς μου, Ζήση και Καλλιόπη,
και στην αδερφή μου, Ευγενία*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της εργασίας, τον Καθηγητή κ. Γεωργίου Ιωάννη για την εμπιστοσύνη του, την αμέριστη βοήθεια και τις παρατηρήσεις του τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Το άρτιο επιστημονικό του υπόβαθρο γύρω από τα σύγχρονα θέματα της Ιατρικής Γενετικής και όχι μόνο αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για τη μελλοντική μου πορεία. Επιπλέον, η δυνατότητα που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα τα τελευταία χρόνια και το ουσιαστικό ενδιαφέρον για την επιτυχή έκβαση αυτής της διατριβής, υπήρξαν για μένα πολύτιμη παρακαταθήκη.

Ένα θερμό ευχαριστώ στα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. Τσατσούλη Αγαθοκλή και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Καλανταρίδου Σοφία, των οποίων οι συμβουλές για την εξέλιξη της εργασίας και οι εύστοχες παρατηρήσεις τους συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στη Δρ Βιολόγο κ. Χατζή Ελισάβετ και τη Δρ. Βιολόγο Μπούμπα Ιωάννα, διότι από την αρχή στήριξαν θερμά αυτή την προσπάθεια. Τις ευχαριστώ για την πολύτιμη συνεισφορά τους καθόλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας και τις συμβουλές τους τόσο σε θεωρητικό επίπεδο όσο και σε δυσκολίες, που αντιμετωπίστηκαν στο πειραματικό μέρος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο και τον Λέκτορα κ. Καπώνη Απόστολο για τη συμβολή τους στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων από τη μονάδα της Υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία και την ειλικρινή φιλία, που μας έδωσε αυτό το διάστημα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην αδερφική μου φίλη και συνάδελφο κ. Ορφανίδου Τιμόκλεια. Η ανταλλαγή απόψεων γύρω από τα σύγχρονα θέματα της Γενετικής, το ειλικρινές ενδιαφέρον της, αλλά και η ψυχολογική υποστήριξη της με βοήθησαν ουσιαστικά, ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές αυτής της προσπάθειας.

Ειλικρινά δε βρίσκω λόγια να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ζήση και Καλλιόπη, και την αδερφή μου Ευγενία, που δε σταματούν ποτέ να με στηρίζουν με αστείρευτη δύναμη κι ενθαρρύνουν κάθε μου προσπάθεια. Είναι δίπλα μου πάντα κι αποτελούν σημαντικό λόγο να αγωνίζομαι και να προσπαθώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
A.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	4
A.3 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ- ΩΟΓΕΝΕΣΗ	8
A.3.1 Η ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ.....	10
A.3.2 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΝΤΡΟΥ	12
A.3.3 Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	15
A.3.4 ΑΤΡΗΣΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ.....	17
A.3.5 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ	18
A.3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	19
A.3.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ	21
A.3.8 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ	23
A.4. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	25
A.4.1 ΤΟ ΑΡΧΕΓΟΝΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ	25
A.4.2 ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ.....	26
A.4.3 ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ	28
A.4.4 ΤΟ ΓΡΑΦΙΑΝΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ	29
A.5 ΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ	31
A.5.1 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ	31
A.5.2 Η ΣΧΕΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	33
A.5.3. ΣΧΕΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΚΗΣ	34
A.5.4 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	34
A.5.4.1 Κοκκώδη κύτταρα και οιστρογόνα	34
A.5.4.2 Κοκκώδη κύτταρα και ανδρογόνα.....	35
A.5.4.3 Κοκκώδη κύτταρα και προγεστερόνη	35

A.6. ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ	36
A.6.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΓΑΛΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ	36
A.6.1.1 ADAM28 (A Disintegrin And Metalloprotease 28)	36
A.6.1.2 SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1) ή οστεοποντίνη (OPN, osteopontin) ...	38
A.6.1.3 INSIG1 (Insulin-induced gene 1).....	40
A.6.1.4 ITGAM (Integrin alpha M)	42
A.6.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΓΑΛΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ.....	43
A.6.2.1 SLC27A6 (Solute Carrier family member 6)	43
A.6.2.2 NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1).....	46
A.6.2.3 SOX4 [<u>S</u> RY (Sex determining region Y) - <u>box</u> 4]	46
A.6.2.4 NPY1R (Neuropeptide Y Receptor Y1)	48
A.6.2.5 MLLT10/AF10 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10)	50
A.7 ΦΥΛΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΦΑΙΡΙΝΗ (SHBG).....	51
A.8 ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ	54
A.9 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	57
A.9.1 ΚΥΚΛΟΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.....	58
A.9.1.1 Ανάλογα εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH analogues)	59
A.9.1.1.1 Φυσική GnRH (ή LHRH ή LRF)	59
A.9.1.1.2 Αγωνιστές GnRH (GnRH agonists)	60
A.9.1.1.3 Ανταγωνιστές GnRH (GnRH antagonists)	62
A.9.1.2 Γοναδοτροπίνες για την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλάκιων: FSH, LH και hCG	62
A.9.1.2.1 Ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (hMG, human Menopausal Gonadotropins)	63
A.9.1.2.2 Η FSH στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.....	64
A.9.1.2.3 Η LH και hCG στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	65

A.10 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	67
A.10.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAY ANALYSIS)	67
A.10.2 REAL-TIME PCR	72
A.10.2.1 Αρχή της μεθόδου	72
A.10.2.2 Χημείες Real-Time PCR	74
A.10.2.2.1 Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης	74
A.10.2.2.2 Ειδικά συστήματα ανίχνευσης	76
A.10.2.2.2.1 Taqman probes	76
A.10.2.2.2.2 Molecular Beacons.....	78
A.10.2.2.2.3 Scorpions.....	79
A.10.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης	80
A.10.2.3.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	80
A.10.2.3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση	80
A.11 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	82
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	84
B.1 ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	85
B.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΙΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	86
B.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	86
B.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	87
B.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	87
B.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	88
B.6.1 Προετοιμασία του εμβρυικού ορού βοοειδούς ως συστατικό του θρεπτικού μέσου.....	88
B.6.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου (full medium).....	89
B.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (RNA) ΑΠΟ ΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ	89
B.7.1 Προετοιμασία για την απομόνωση RNA	89
B.7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA για δείγματα με αριθμό $\leq 5 \times 10^5$ κυττάρων..	90
B.7.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA για δείγματα με αριθμό $\leq 1 \times 10^7$ κυττάρων..	92
B.8 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RNA	93

B.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ RNA.....	95
B.10 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ RNA ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ DNA.....	96
B.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	100
B.12 REAL TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	102
B.12.1 Real-time RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης της SHBG στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης.....	102
B.12.2 Σύνθεση cDNA.....	104
B.12.3 Real-time PCR.....	105
B.13 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ	107
B.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	107

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	109
Γ.2 ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (qPCR)	112
Γ.2.1 qPCR σε μεμονωμένα δείγματα, που συμπεριλήφθηκαν στα αθροισμένα δείγματα, για τα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με μικροσυστοιχίες.....	112
Γ.2.2 qPCR σε μεμονωμένα δείγματα, που δε συμπεριλήφθηκαν στα αθροισμένα δείγματα, για τα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με μικροσυστοιχίες.....	113
Γ.2.3 qRT- PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της SHBG στα κοκκώδη κύτταρα σε σχέση με το μέγεθος του ωοθυλακίου	114
Γ.3 ΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ SHBG ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	116

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....

Ε.ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

E.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	129
E.2 SUMMARY	132

ΣΤ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ.....	134
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	136

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία της αναπαραγωγής είναι προφανώς απαραίτητη για την επιβίωση των ειδών και χιλιάδες «φυλετικά» γονίδια έχουν συντηρηθεί κατά την εξέλιξη. Ο πολλαπλασιασμός των ειδών απαιτεί την αλληλεπίδραση των γαμετών των δύο φύλων- του ωοκυττάρου και του σπερματοζωαρίου- για το σχηματισμό του ζυγωτού, το πρώτο κύτταρο, το οποίο μετά από διαδοχικές διαιρέσεις οδηγεί στην ανάπτυξη του εμβρύου. Η ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος στον άνθρωπο προδιαγράφεται από την εμβρυική ζωή, κατά την οποία ξεκινά ο σχηματισμός των μελλοντικών γονάδων και των γεννητικών οδών (genital tracts). Τα γεννητικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με την επίδραση αυτοκρινών, παρακρινών κι ενδοκρινών παραγόντων, που ελέγχονται τόσο από τις γονάδες όσο και από άλλους ιστούς ή άλλα όργανα (Matzuk et Lamb, 2008).

Τις τελευταίες δεκαετίες με τη μελέτη της γενετικής πειραματόζων και του ανθρώπου, αλλά και με τη βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών (microarray technology), γίνεται φανερό πως η επιτυχία της αναπαραγωγικής διαδικασίας απαιτεί το συντονισμό μεγάλου αριθμού γονιδίων. Η βασική έρευνα έχει δώσει απαντήσεις για τη λειτουργία των γονιδίων αυτών και παράλληλα έχει διερευνήσει σημαντικά τους μηχανισμούς, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τη λειτουργία και τη ρύθμιση του αρσενικού και του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν σκοπό να διαφωτίσουν το διαχρονικό πρόβλημα της υπογονιμότητας, που απασχολεί ερευνητές και κλινικούς, καθώς είναι αρκετά συχνό και στη σύγχρονη εποχή. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας περίπου το 15% των ζευγαριών αντιμετωπίζει δυσκολίες από τη σύλληψη μέχρι την επιτυχή έκβαση της κύησης με τα δύο φύλα να ευθύνονται κατά το ήμισυ για το πρόβλημα της υπογονιμότητας. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technologies, ART), που κατά τη διάρκεια αυτών των τριάντα χρόνων εξελίσσονται και βελτιώνονται συνεχώς με σκοπό τόσο την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας όσο και τη γέννηση υγιών απογόνων.

Η πρόοδος στην κατανόηση της διαδικασίας της αναπαραγωγής τον 21^ο αιώνα οφείλεται σημαντικά στη δημιουργία πάνω από 400 μοντέλων πειραματόζων με μεταλλάξεις, που δίνουν συγκεκριμένους αναπαραγωγικούς φαινότυπους αλλά και την ελπίδα για τη δημιουργία αναγεννητικών γοναδικών στελεχιαίων κυττάρων. Επίσης, την τελευταία δεκαετία αναρίθμητες μελέτες έχουν γίνει για τη συσχέτιση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών με την ανθρώπινη υπογονιμότητα με στόχο την

κατανόηση των μοριακών μηχανισμών τόσο του θηλυκού όσο και του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος.

Τα γονίδια, τα βιοχημικά μονοπάτια και οι μηχανισμοί, που εμπλέκονται στην ωοθυλακιόγένεση από το στάδιο του αρχέγονου ωοθυλάκιου μέχρι το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και για αυτό έχουν μελετηθεί αρκετά χωρίς ωστόσο να αποσαφηνίζεται ο ρόλος τους. Αν επιτευχθεί η κατανόηση της σχέσης της ωοθυλακικής ανάπτυξης με την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τότε είναι πιθανό τα τελευταία να αποτελέσουν μοριακούς δείκτες, που να βοηθήσουν ή/και να διευκολύνουν τις συνεχώς εξελισσόμενες τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

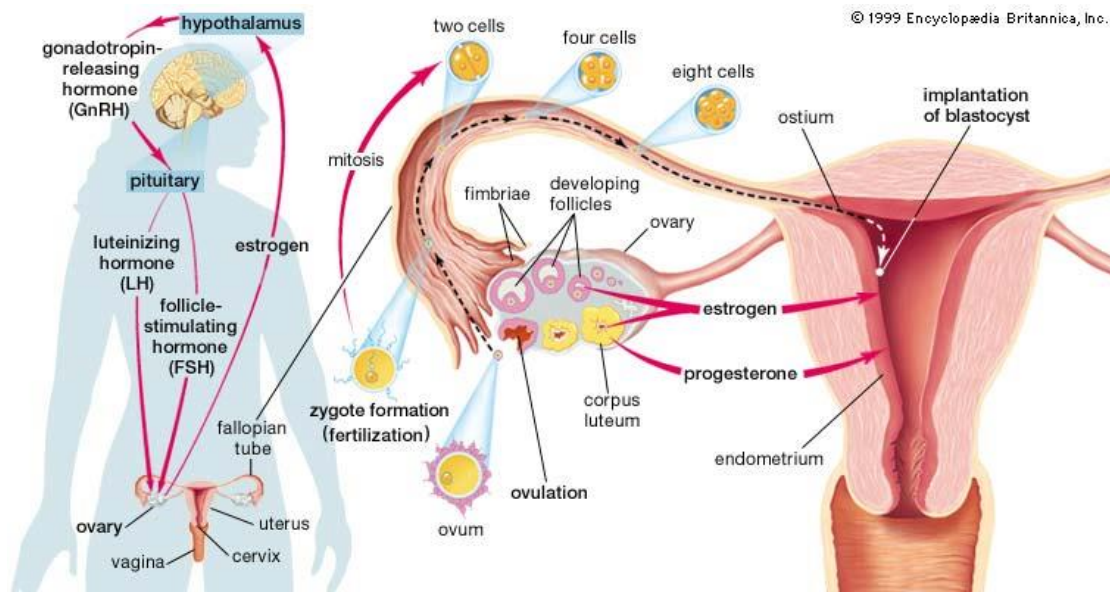
A.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Οι ωοθήκες αποτελούν τους αναπαραγωγικούς αδένες του θηλυκού ατόμου και μαζί με τους ωαγωγούς (σάλπιγγες) και τη μήτρα εντοπίζονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα, όπου βρίσκονται σε ζεύγη με αμφίπλευρη συμμετρία. Το σώμα της ωοθήκης ονομάζεται φλοιός της ωοθήκης ή στρώμα, όπου διακρίνονται αναπτυσσόμενα, ώριμα και ατρητικά ωοθυλάκια (Εικ. Α1). Ο φλοιός της ωοθήκης περιβάλλεται από ένα ανθεκτικό στρώμα συνδετικού ιστού, που είναι γνωστό ως tunica albuginea. Το εξωτερικό περίβλημα είναι το germinal epithelium, που παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα. Εκτός από το φλοιό η ωοθήκη αποτελείται από τον μυελό και την πύλη, που περιέχουν διάσπαρτα κύτταρα, τα οποία παράγουν στεροειδείς ορμόνες. Οι ωοθήκες και η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι δυνατόν να γίνουν ορατές με την υπερηχογραφία.

Ο φυσιολογικός ρόλος των ωοθηκών στον άνθρωπο είναι η παραγωγή των φυλετικών στεροειδών – οιστραδιόλη και προγεστερόνη- που συντονίζουν τη λειτουργία του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος (Findlay, 1994). Κατά την αναπαραγωγική ηλικία η κύρια ρυθμιστική μονάδα στην ωοθήκη είναι το ωοθυλάκιο, το οποίο αποτελείται από το αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο και τα σωματικά κύτταρα, που το περιβάλλουν. Οι δυο τύποι σωματικών κυττάρων του ωοθυλακίου είναι τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells) και τα κύτταρα θήκης (theca cells). Οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων αποτελούν τις θέσεις σύνθεσης και δράσης των ορμονών, που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων είναι υπεύθυνος σε μεγάλο βαθμό για την ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου (dominant follicle) και την επιλογή του τελικά σε κάθε έμμηνο κύκλο.

Στον άνθρωπο η περιοδικότητα της ωρίμανσης και της ωοθυλακιορρηξίας ονομάζεται γεννητικός κύκλος και παρατηρείται περίπου κάθε 28 ημέρες από την εφηβεία μέχρι την εμμηνόπαυση.

Εικ. Α1 Δομή της ωοθήκης και ορμονικός κύκλος κατά την ωοθυλακιορρηξία



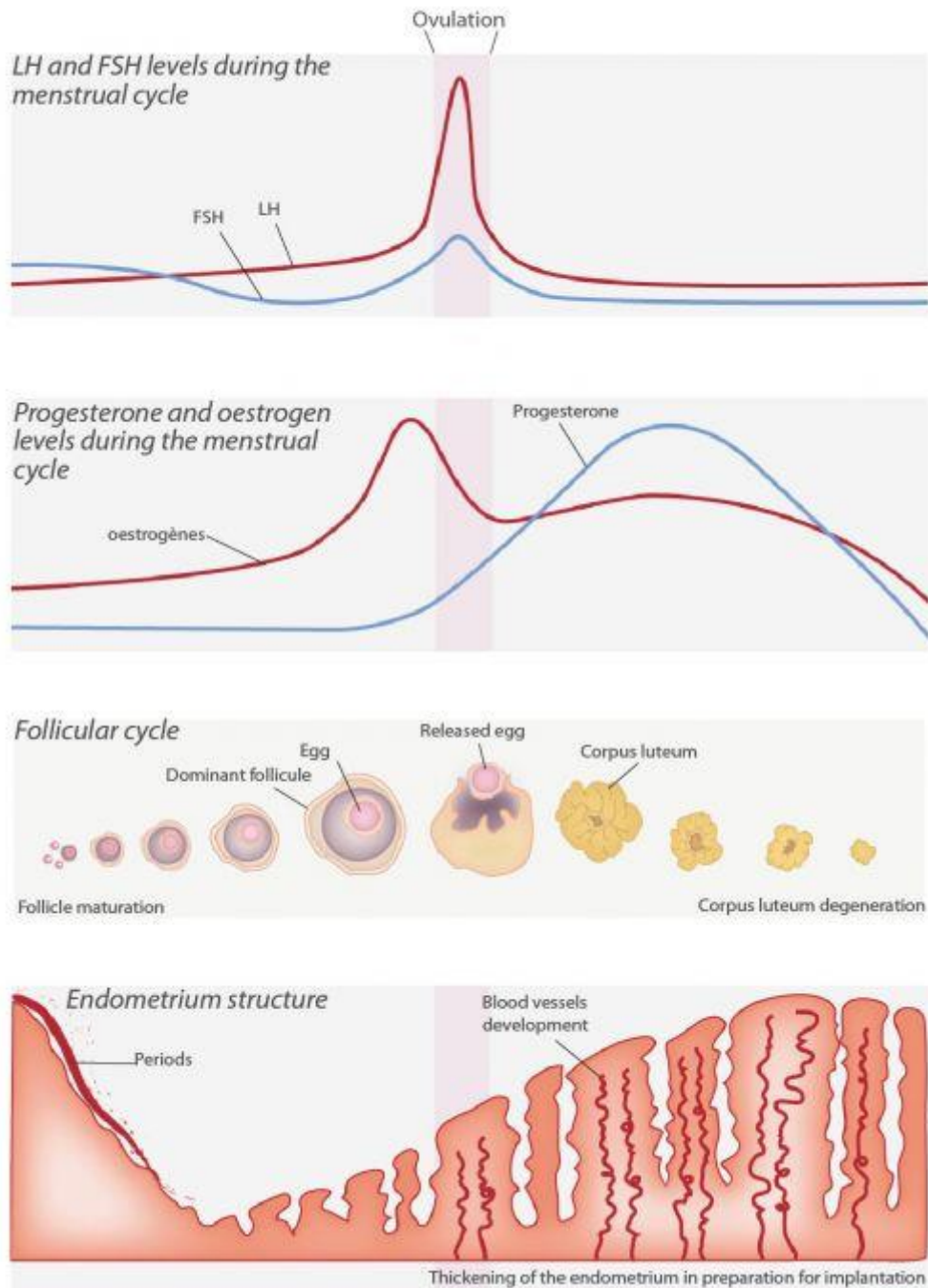
Διακρίνεται σε δύο φάσεις: την ωοθυλακική ή παραγωγική φάση και την ωχρινική ή εκκριτική φάση, οι οποίες στο μέσο περίπου του κύκλου χωρίζονται από την ωοθυλακιορρηξία (ovulation). Η ρύθμιση του γεννητικού κύκλου εξαρτάται από την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH), η οποία εκκρίνεται από τον υποθάλαμο στην υποθαλαμο-υποφυσιακή πυλαία κυκλοφορία κατά ώσεις. Η ορμόνη αυτή ελέγχει την έκκριση των δύο γοναδοτροπινών- την ωοθυλακιοτρόπο (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και την ωχρινοτρόπο (Luteinizing Hormone, LH) ορμόνη- από την υπόφυση. Η FSH και η LH προκαλούν την τελική ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλακίου. Πριν την εφηβεία οι τιμές της FSH και LH είναι αρκετά χαμηλές λόγω της ελάχιστης έκκρισής τους από την υπόφυση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην καταστολή της έκκρισης εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin –Releasing Hormone, GnRH) (Messinis, 2006). Η πρώτη ένδειξη της επανεργοποίησης του συστήματος υποθαλάμου υπόφυσης παρατηρείται με την αυξημένη παλμικότητα (pulsatility) των γοναδοτροπινών, που οδηγεί σε επανεργοποίηση και της GnRH (Apter et al, 1993). Τα επίπεδα των γοναδοτροπινών στην κυκλοφορία αυξάνουν βαθμιαία κατά την εφηβεία, διεγείρουν την ωρίμανση του ωοθυλακίου και τη σύνθεση οιστρογόνου στις ωοθήκες. Οι τιμές της οιστραδιόλης είναι πολύ χαμηλές αρχικά, αυξάνουν βαθμιαία μέχρι την εφηβεία και διεγείρουν την ανάπτυξη του ενδομητρίου, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση του πρώτου έμμηνου κύκλου (Grumbach 1975).

Η ωοθυλακική φάση αρχίζει με την έμμηνο ρύση, διαρκεί μέχρι την ωοθυλακιορρηξία και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του επικρατούντος

ωοθυλακίου. Κατά την ωοθυλακιορρηξία το ωοκύτταρο απελευθερώνεται από το θυλάκιο (cumulus expansion), ενώ έπειτα ξεκινά η ωχρινική φάση (Καλανταρίδου Σ, Τσατσούλης Α). Κατά τη φάση αυτή το θυλάκιο- χωρίς το ωοκύτταρο- μετατρέπεται στο ωχρο σωματίο (corpus luteum) (Εικ. Α2). Πρόκειται για μια ενδοκρινή δομή, που παράγει κατά κύριο λόγο προγεστερόνη αλλά και κάποια ποσά οιστρογόνου, προετοιμάζοντας τα κύτταρα της μήτρας για ενδεχόμενη γονιμοποίηση του ωαρίου (Erickson et al, 2001). Οι ορμόνες, που παράγονται από το ωχρο σωματίο καταστέλλουν την παραγωγή των γοναδοτροπινών, οι οποίες όμως είναι απαραίτητες για την επιβίωση του. Καθώς οι τιμές των γοναδοτροπινών μειώνονται συνεχώς, το ωχρο σωματίο ατροφεί (Losos et al, 2002). Η αποδόμηση του ωχρού σωματίου συμβαίνει με τη δραματική μείωση των τιμών της προγεστερόνης και οιστρογόνου. Η μείωση των τιμών των ωθητικών ορμονών ευθύνεται στη συνέχεια για την αύξηση των επιπέδων της FSH, γεγονός απαραίτητο για τη στρατολόγηση των ωοθυλακίων για τον επόμενο κύκλο. Η συνεχής πτώση των επιπέδων οιστρογόνου και προγεστερόνης σηματοδοτεί το τέλος της ωχρινικής φάσης (Weschler 2002). Αν δεν πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση το ωχρο σωματίο αποικοδομείται μέσα σε 8-10 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία, η κάλυψη του τοιχώματος της μήτρας απορρίπτεται, προκαλώντας την έμμηνο ρύση κι έτσι ξεκινά ένας νέος κύκλος. Αν επιτευχθεί σύλληψη παράγεται χοριακή γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotropin, hCG) μετά την εμφύτευση, που είναι δομικά αντίστοιχη με την LH κι έτσι προστατεύεται το ωχρο σωματίο από την αποδόμησή του (luteolysis) (Losos et al, 2002). Τότε, το ωχρο σωματίο συνεχίζει να παράγει προγεστερόνη τις πρώτες 8-12 εβδομάδες της κύησης, ενώ έπειτα το ρόλο αυτό αναλαμβάνει ο πλακούντας (Glade Curtis 1999)

Είναι επομένως φανερό πως η ενδοκρινής λειτουργία των ωθηκών είναι άρρηκτα δεμένη με την ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

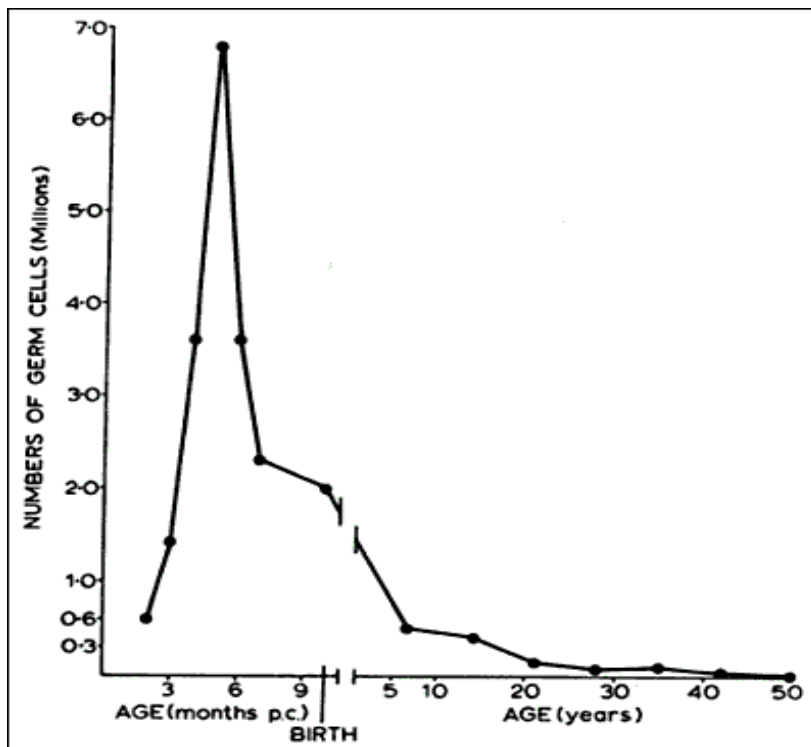
Εικ. Α2 Διάγραμμα έμμηνου κύκλου, όπου φαίνεται η έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση, η έκκριση οιστρογόνου και προγεστερόνης από την ωθήκη, η κατάσταση του ωοθυλακίου στην ωθήκη και οι μεταβολές στο επιθήλιο της μήτρας.



A.3 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ- ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Στον άνθρωπο η αύξηση της ηλικίας του αναπαραγωγικού συστήματος ευθύνεται για τη βαθμιαία μείωση τόσο στην ποιότητα όσο και στην ποσότητα των ωοθυλακίων (te Velde et al, 2002). Κατά τον τέταρτο μήνα της εμβρυικής ανάπτυξης οι ωοθήκες περιέχουν περίπου $6-7 \times 10^6$ ωοκύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από ένα στρώμα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων, σχηματίζοντας έτσι το αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicle). Ο αριθμός αυτός μειώνεται ραγδαία λόγω της απόπτωσης, με αποτέλεσμα κατά τη γέννηση να έχουν απομείνει περίπου $1-2 \times 10^6$ ωοκύτταρα (Markstrom et al, 2002). Μετά τη γέννηση ο ρυθμός μείωσης των ωοθυλακίων επιβραδύνεται, με αποτέλεσμα κατά την εμμηναρχή να παρατηρούνται περίπου 300000-400000 ωοθυλάκια (Εικ. A3). Περίπου 400 ωοθυλάκια ωριμάζουν και συμμετέχουν στην ωορρηξία κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας. Από τη γέννηση μέχρι την εμμηνόπαυση ~99,98% των ωοθυλακίων αρχίζει να αναπτύσσεται, αλλά ποτέ δεν ολοκληρώνει την ανάπτυξή του λόγω ατρησίας, που συμβαίνει εξαιτίας ανεπαρκούς δράσης της FSH (Hillier 1994).

Εικ. A3 Μεταβολές του αριθμού των γεννητικών κυττάρων σε συνάρτηση με την ηλικία του θηλυκού ατόμου



Καθόλη τη διάρκεια των αναπαραγωγικών χρόνων ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων μειώνεται σταθερά κατά περίπου 1000 ωοθυλάκια ανά μήνα, ενώ μετά

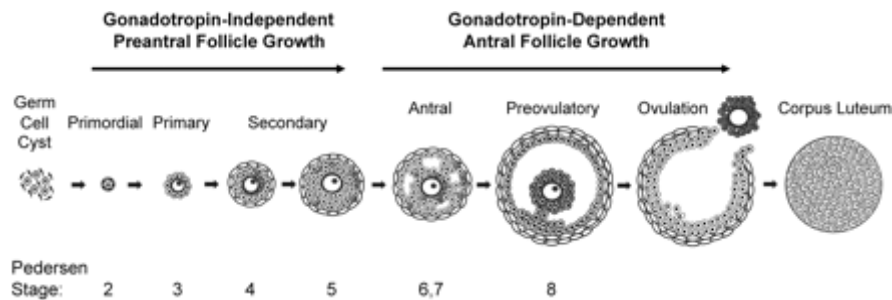
την ηλικία των 37 χρόνων η μείωση επιταχύνεται. Κατά την εμμηνόπαυση παρατηρούνται λιγότερο από 1000 εναπομείναντα ωοθυλάκια (Faddy et al, 1996).

Ο σχηματισμός του ωοθυλακίου σηματοδοτεί την αρχή της ωοθυλακιόγένεσης (folliculogenesis). Το αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicle), που αποτελείται από ένα μικρό γεννητικό κύτταρο (germ cell) περιβαλλόμενο από ένα στρώμα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων, αρχίζει να αναπτύσσεται και να διαφοροποιείται, οπότε σχηματίζεται το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο. Το τελευταίο ωριμάζει και απελευθερώνει *in vivo* το ωκύτταρο κατά την ωορρηξία. Το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα πλήρως ανεπτυγμένο ωκύτταρο, από εκατομμύρια κοκκώδη κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από ένα στρώμα κυττάρων θήκης (τόσο έσω όσο κι έξω κύτταρα). Τα κοκκώδη κύτταρα εσωκλείουν το άντρο, μια κοιλότητα, που είναι γεμάτη με ωοθυλακικό υγρό (follicular fluid), μίγμα πρωτεϊνών, ορμονών, cAMP και άλλων μορίων (Αναγνωστοπούλου-Μπέη, 1993).

Στις γυναίκες η ωοθυλακιόγένεση είναι μια μακράς διάρκειας διαδικασία, που απαιτεί συνολικά 12 μήνες για τη μετάβαση από το αρχέγονο στο ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο. Η ωοθυλακιόγένεση χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη, που αποτελεί την ανεξάρτητη φάση από τη δράση των γοναδοτροπινών (gonadotropin-independent phase) χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του ωοκυττάρου, καθώς και τη απουσία του άντρου. Η φάση αυτή ρυθμίζεται από παράγοντες ανάπτυξης, που παράγονται τοπικά μέσω αυτοκρινών/παρακρινών μηχανισμών. Η δεύτερη, που είναι εξαρτώμενη από τις γοναδοτροπίνες (gonadotropin-dependent phase) χαρακτηρίζεται από τη θεαματική αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου (περίπου μέχρι τα 25 mm), με αποτέλεσμα το τελευταίο να παίρνει την τελική του μορφή, όπου και χαρακτηρίζεται ως Γραφιανό ωοθυλάκιο (Graafian follicle) (Εικ. A4). Στη δεύτερη αυτή φάση η ρύθμιση πραγματοποιείται από τη θυλακιοτρόπο (Follicle-Stimulating Hormone, FSH) και την ωχρινοποιητική (Luteinising-Hormone, LH) ορμόνη, καθώς και από παράγοντες ανάπτυξης.

Εικ. A4 Κύρια στάδια ωοθυλακιόγένεσης . Τα ωοθυλάκια σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της κύησης του θηλυκού ατόμου κ το στάδιο μέχρι την εμφάνιση του άντρου είναι ανεξάρτητο από τις γοναδοτροπίνες. Στην εφηβεία η εκκρινόμενη FSH από την υπόφυση προωθεί περαιτέρω τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων κι ενισχύει την επιβίωσή τους. Μια απότομη αύξηση της γοναδοτροπίνης LH έχει ως αποτέλεσμα την ωοθυλακιόρρηξία, δηλ την απελευθέρωση του ωοκυττάρου από το υπόλοιπο επικρατές ωοθυλάκιο. Έπειτα τα κοκκώδη και τα κύτταρα θήκης, που απομένουν, διαφοροποιούνται, για να σχηματίσουν το ωχρο σωματίο. Συνήθως το όνομα του ωοθυλακίου αλλάζει ανάλογα με το στάδιο, που βρίσκεται κάθε φορά. Ένα διαφορετικό σύστημα κατηγοριοποίησης προτείνεται, κατά το οποίο καθορίζονται βάσει του μεγέθους του ωοκυττάρου και του αριθμού των κοκκωδών κυττάρων (Pedersen T, Peters H

1968 Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 17:555-557).



Η ωοθυλακιόγνεση περιλαμβάνει τέσσερα στάδια ανάπτυξης: 1. τη στρατολόγηση (recruitment) του αρχέγονου ωοθυλάκιου., 2. την ανάπτυξη ωοθυλακίου πριν την εμφάνιση άντρου, 3. την επιλογή και ανάπτυξη του γραφιανού ωοθυλακίου και 4. την ατρησία ωοθυλακίου.

A.3.1 Η ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΩΘΥΛΑΚΙΟΥ (FOLLICULAR RECRUITMENT) ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ

Ο όρος στρατολόγηση έχει συχνά χρησιμοποιηθεί, για να περιγράψει δύο σημαντικές αλλά διακριτές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης (Meijs et al, 1990; Gosden et al 1983; Gougeon et al 1990; Rombauts et al 1998). Οι διαδικασίες αυτές ονομάζονται αντίστοιχα αρχική (initial recruitment) και κυκλική στρατολόγηση (cyclic recruitment). Κατά την αρχική στρατολόγηση παράγοντες των ωοθηκών ή/και άλλοι άγνωστοι μέχρι στιγμής, διεγείρουν μερικά αρχέγονα ωοθυλάκια να αρχίσουν την ανάπτυξη, ενώ τα υπόλοιπα ωοθυλάκια μένουν αδρανή για μήνες ή για χρόνια. Η αρχική στρατολόγηση πιστεύεται πως είναι μια συνεχής διαδικασία, η οποία ξεκινά αμέσως μετά το σχηματισμό του ωοθυλακίου και πολύ πριν την έναρξη της εφηβείας. Αμέσως μετά το ωοκύτταρο αναπτύσσεται μέχρι το στάδιο της πρόφασης I. Αντίθετα η κυκλική στρατολόγηση αρχίζει μετά την έναρξη της εφηβείας και είναι το αποτέλεσμα της αύξησης της FSH στην κυκλοφορία σε κάθε κύκλο, κατά τη διάρκεια του οποίου μια ομάδα ωοθυλάκιων διασώζεται από την ατρησία (McGee et al, 2000). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ωοθυλάκιων επιβιώνει από την ατρησία. Τα ωοκύτταρα αυτών των ωοθυλάκιων έχουν ήδη ολοκληρώσει την ανάπτυξή τους, έχει σχηματιστεί η διαφανής ζώνη (zona pellucida) και είναι έτοιμα για την επανέναρξη της μείωσης (Trounson et al, 1998; Tsafri et al 1997)

Οι μηχανισμοί, που ελέγχουν την αρχή της ανάπτυξης του ωοθυλάκιου είναι αρκετά δύσκολο να ερευνηθούν, επειδή η αρχική στρατολόγηση του ωοθυλάκιου είναι μια διαδικασία, που χαρακτηρίζεται από την αργή ανάπτυξη ενός αριθμού μικρών ωοθυλάκιων σε μια εκτεταμένη περίοδο χρόνου (Hirshfield 1989). Τα ωοθυλάκια, που δε διεγείρονται για περαιτέρω ανάπτυξη, φαίνεται να είναι κάτω από τον έλεγχο ανασταλτικών παραγόντων της ανάπτυξης (Wandji et al, 1996). Μείωση της έκφρασης των ανασταλτικών παραγόντων ή/και αύξηση των παραγόντων διέγερσης επιτρέπουν την έναρξη της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Υψηλά ποσοστά FSH στον ορό σχετίζονται θετικά με την αρχική στρατολόγηση, που συμβαίνει τόσο στα πρώτα όσο και στα μετέπειτα στάδια της αναπαραγωγικής ζωής (McGee et al, 2000). Επιπλέον, υψηλά ποσοστά LH/ hCG μειώνουν τον αριθμό των ωοθυλάκιων, από την περιοχή, όπου παραμένουν χωρίς να αναπτύσσονται. Σε διαγονιδιακούς επίμυες υπερέκφραση της LH, που δρα για μεγάλο χρονικό διάστημα, έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των αρχέγονων ωοθυλάκιων σε σχέση με δείγματα ελέγχου (Flaws et al, 1997). Παρόλα αυτά, η FSH και η LH δεν είναι δυνατόν να ασκούν δράση στα αρχέγονα ωοθυλάκια, καθώς οι υποδοχείς των γοναδοτροπινών δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί στα κύτταρα αυτά (Rannikki et al, 1995;Sokka et al, 1990;Dunkel et al, 1994;O'Shaughnessy et al, 1997;Oktay et al, 1997). Αν και τα ωοθυλάκια δεν έχουν λειτουργικούς υποδοχείς της FSH μέχρι το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλάκιου, τα προ-κοκκώδη κύτταρα και τα αρχέγονα ωοθυλάκια αποκρίνονται σε ενεργοποιητές των μονοπατιών, που συμμετέχει το c-AMP, ενώ παρατηρείται αυξημένη έκφραση της αρωματάσης και των υποδοχέων της FSH (Ahmed et al, 1986).

Σημαντικός είναι και ο ρόλος του ωοκυττάρου στην αρχική στρατολόγηση των ωοκυττάρων. Οι παράγοντες, που απαιτούνται για την επικοινωνία του ωοκυττάρου με τα κοκκώδη κύτταρα, πιθανόν παίζουν καίριο ρόλο στην αρχική στρατολόγηση. Ο προσδέτης kit (kit ligand) εκφράζεται στα κοκκώδη των αναπτυσσόμενων ωοθυλάκιων, ενώ το μόριο c-kit, ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης έχει βρεθεί στο ωοκύτταρο και στα κύτταρα θήκης. Μεταλλάξεις σε ποντικούς δείχνουν να εμποδίζουν την παραγωγή διαλυτής μορφής του προσδέτη kit, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του ωοθυλάκιου να μη συνεχίζεται πέραν του πρωτογενούς ωοθυλάκιου (Bedell et al, 1995;Kuroda et al, 1988;Huang et al, 1993). Στον άνθρωπο βέβαια μεταλλάξεις του c-kit δε φαίνεται να επηρεάζουν την ικανότητα γονιμοποίησης του θηλυκού ατόμου (Ezoe et al, 1995).

Επιπλέον, ουσιαστικό ρόλο στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλάκιου φαίνεται να έχει και ο διαφοροποιητικός παράγοντας ανάπτυξης 9 (Growth Differentiation Factor-9, GDF-9). Πρόκειται για μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, που

ανήκει στην υπεροικογένεια των μετασχηματικών παραγόντων ανάπτυξης β (Transforming Growth Factors- β , TGF- β). Ο GDF-9 εκφράζεται στα ωκύτταρα των πρωτογενών και μεγαλύτερων ωθυλάκιων, όχι όμως και στα αρχέγονα ωθυλάκια (Aaltonen et al, 1999; Elvin et al, 1999). Επειδή ο προσδέτης kit και ο GDF-9 υπερεκφράζονται στα δευτερογενή ωθυλάκια, φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη του ωθυλάκιου πριν την εμφάνιση του άντρου.

A.3.2 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΘΥΛΑΚΙΟΥ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΝΤΡΟΥ

Κατά την εμβρυογένεση τα πρωτογενή βλαστικά κύτταρα εγκαθίστανται μέσα στην αναπτυσσόμενη γονάδα, όπου σχηματίζουν τα ωγόνια. Τα τελευταία μετά από επαναλαμβανόμενες μιτωτικές διαιρέσεις πολλαπλασιάζονται κι έτσι αυξάνει ραγδαία ο αριθμός τους. Τα ωγόνια πολλαπλασιάζονται από το δεύτερο μέχρι τον έβδομο μήνα της κύησης και δίνουν τελικά περίπου 7×10^6 γεννητικά κύτταρα, που μπαίνουν στη φάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης.

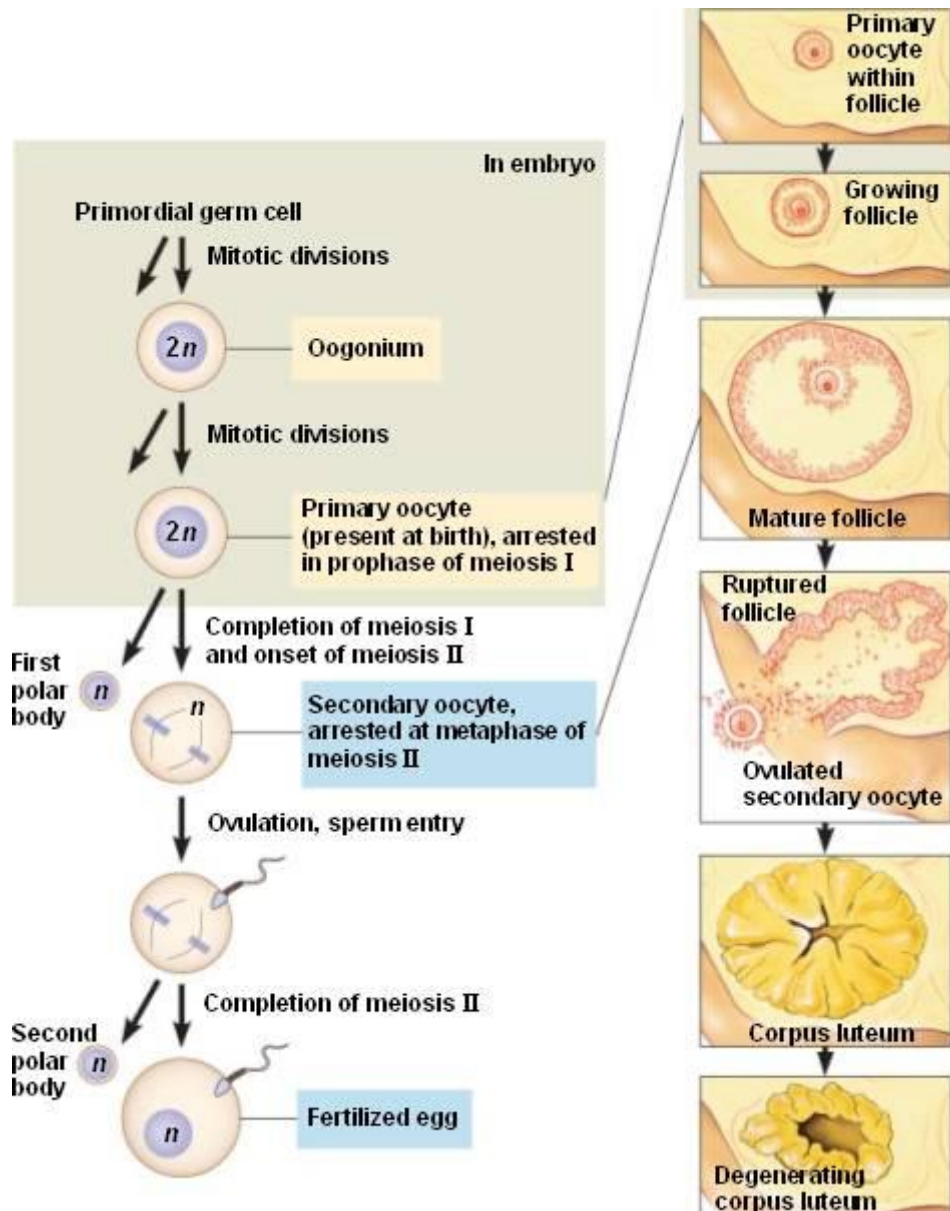
Η ανάπτυξη από το στάδιο του αρχέγονου ωθυλακίου μέχρι λίγο πριν την εμφάνιση του άντρου διαρκεί περίπου 85 ημέρες, ενώ η ωρίμανση του σε προ-ωθυλακιόρρηκτικό ωθυλάκιο διαρκεί περίπου 14 ημέρες (Gougeon, 1986). Επομένως, η ωρίμανση του ωθυλάκιου, που επιλέγεται κατά την ωθυλακιόρρηξία σε ένα έμμηνο κύκλο έχει ξεκινήσει τουλάχιστον δύο κύκλους πιο πριν. Κάποια από τα αρχέγονα ωθυλάκια στρατολογούνται να αναπτυχθούν περαιτέρω αμέσως μετά το σχηματισμό τους στην εμβρυική ωοθήκη. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι τα ωθυλάκια να εξαντληθούν μετά την εμμηνόπαυση. Η στρατολόγηση των αρχέγονων ωθυλακίων συμβαίνει κατά τη διάρκεια των πρώτων τριών δεκαετιών της ζωής μιας γυναίκας με ένα σχετικά σταθερό ρυθμό. Από τη στιγμή που το απόθεμα των ωθηκών αποτελείται από ~ 25000 ωθυλάκια, γεγονός που παρατηρείται κατά μέσο όρο στα $37,5 \pm 1,2$ έτη, ο ρυθμός στρατολόγησης των ωθυλακίων σχεδόν διπλασιάζεται (Faddy et al, 1992). Στο αρχέγονο ωθυλάκιο αρχίζουν να παρατηρούνται αλλαγές, όπως η αλλαγή του σχήματος των κοκκωδών κυττάρων από επίπεδο σε κυβοειδές. Επίσης παρατηρείται έναρξη στη μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών στρωμάτων κοκκωδών κυττάρων γύρω από το ωκύτταρο αλλά και την ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους του ωκυττάρου. Το ωθυλάκιο σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης ονομάζεται πρωτογενές ωθυλάκιο (primary oocyte) (Macklon NS et al, 1998). Στα πρωτογενή ωθυλάκια το DNA διπλασιάζεται τα ομόλογα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν και ανάμεσα στις χρωματίδες τους δημιουργούνται χιάσματα. Στο σημείο αυτό η πρόφαση της μείωσης I αναστέλλεται στο στάδιο της διπλοταινίας και

το ωοκύτταρο λέγεται ότι βρίσκεται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (Germinal Vesicle, GV) (Cecconi et al, 2004). Το διάστημα της αναστολής της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες mRNA, θρεπτικών στοιχείων, πρωτεϊνών, καθώς και άλλα συστατικά κι οργανίδια. Τα αποθέματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης.

Με την έναρξη της εφηβείας, και κατά τη διάρκεια κάθε έμμηνου κύκλου σε μια ομάδα ωοκυττάρων συμπληρώνεται η 1^η μειωτική διαίρεση, το πρωτογενές ωοθυλάκιο αποκτά ένα ακόμη στρώμα κοκκωδών κυττάρων (Macklon et al, 1998), με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το δευτερογενές ωοθυλάκιο (secondary follicle) και το πρώτο πολικό σωματίο (first polar body), στο οποίο περιλαμβάνεται ο απλοειδής πυρήνας, που προκύπτει από τη μείωση. Η μείωση επομένως επαναρχίζει κατά την ωορρηξία και προχωρεί μέχρι τη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Το ωοθυλάκιο παραμένει σε αυτή τη φάση μέχρι τη γονιμοποίηση, μετά την οποία ολοκληρώνεται η 2^η μειωτική διαίρεση με το σχηματισμό του 2^{ου} πολικού σωματίου (Εικ. Α5) Η φάση μεταξύ της πρόφασης I και της μετάφασης II της μείωσης αποτελεί την περίοδο ωρίμανσης του ωοκυττάρου και χαρακτηρίζεται κυρίως από τη διάλυση του πυρηνικού φακέλου, τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, το σχηματισμό της ατράκτου και την παραγωγή του πρώτου πολικού σωματίου, όπως προαναφέρθηκε. Η ωρίμανση δεν αποτελεί απλά συνέχεια της μείωσης, καθώς κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου συμβαίνουν πολυάριθμες αλλαγές, που είναι απαραίτητες, για να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση. Η ικανότητα ολοκλήρωσης της μείωσης εξαρτάται από το μέγεθος του ωοκυττάρου αλλά και την τιμή της διαμέτρου το ωοθυλακίου (Tounson et al, 2001).

Κατά το σχηματισμό του δευτερογενούς ωοθυλακίου το στρώμα του διαφοροποιείται σε έσω (theca interna) κι έξω (theca externa) κύτταρα θήκης (Erickson, 1985), ενώ το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται επιπλέον από την έκφραση των υποδοχέων της LH στα έσω κύτταρα θήκης (Channing et al, 1973). Στα κοκκώδη κύτταρα αρχίζει η έκφραση των υποδοχέων της FSH κι αρχίζει η εμφάνιση του άντρου (Gougeon A, 1993; Oktay et al, 1997). Στο στάδιο αυτό τα περισσότερα ωοθυλάκια υφίστανται ατρησία, ενώ ελάχιστα από αυτά κάτω από τον έλεγχο της κυκλικής δράσης των γοναδοτροπινών μετά την εφηβεία, φτάνουν στο προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο. Τότε το ωοθυλάκιο ονομάζεται Γραφιανό και αποτελεί την κύρια πηγή οιστρογόνων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας.

Εικ 5 Στάδια ωρίμανσης του ωοκυττάρου



Αν και, όπως αναφέρθηκε (Εικ. Α4), το στάδιο πριν την εμφάνιση του άντρου είναι ανεξάρτητο της δράσης των γοναδοτροπινών, ο σχηματισμός του άντρου απαιτεί τη διέγερση από την FSH, που ξεκινά όταν η διάμετρος του ωοθυλάκιου είναι ~ 0.25 mm (Aittomaki et al, 1995). Η FSH διεγείρει τη διαίρεση των κοκκωδών κυττάρων και προκαλεί το σχηματισμό των γλυκοζαμινογλυκανών, απαραίτητα συστατικά του ωοθυλακικού υγρού, που περιέχεται στο άντρο (Hillier et al, 1991). Τα κοκκώδη κύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα του θηλυκού ατόμου, που έχουν υποδοχείς της FSH στην επιφάνειά τους. Η δέσμευση της FSH στους υποδοχείς της ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση και την κυκλική πρωτεϊνική κινάση η εξαρτώμενη από το AMP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική έκφραση

γονιδίων, που απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων (Richards, 1994). Γονίδια, που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και αποκρίνονται στην FSH είναι: η αρωματάση (P450arom), το κυτόχρωμα P450, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση οιστρογόνου (Simpson et al, 1994), το P450scc, ο υποδοχέας της LH (Segaloff et al, 1993), αρκετοί παράγοντες ανάπτυξης και οι πρωτεΐνες πρόσδεσής τους, όπως οι παράγοντες ανάπτυξης τύπου ινσουλίνης (IGFs, Insulin-like Growth Factors) και οι πρωτεΐνες πρόσδεσης των παραγόντων ανάπτυξης τύπου ινσουλίνης (IGFBPs, Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) (Giudice, 1992; Adashi et al, 1991; Hernandez et al, 1992) πρωτεολυτικά ένζυμα και αναστολείς, που εμπλέκονται στο μηχανισμό διάρρηξης του ωοθυλακίου (follicular rupture) κατά την ωορρηξία, όπως ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator, TPA) και ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitor, PAI) (Tsafiriri et al, 1994), καθώς και τοπικά ρυθμιστικά πεπτιδία, όπως η ανασταλίνη, ακτιβίνη και φολλιστατίνη (Findlay, 1993).

A.3.3 Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

Συνήθως μόνο ένα από τα ωοθυλάκια, που διεγέρθηκαν να συνεχίσουν μέχρι το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο της ανάπτυξης συνήθως επιβιώνει και επιλέγεται να εκκρίνει οιστρογόνο στα τελευταία στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Το ωοθυλάκιο αυτό που καταφέρνει να επιλεγεί σε κάθε ωορρηξία του έμμηνου κύκλου ονομάζεται επικρατές ωοθυλάκιο (dominant follicle). Η ικανότητα του επικρατούντος ωοθυλακίου να αρχίσει έγκαιρα τη σύνθεση οιστρογόνου είναι καθοριστική για την επιβίωσή του. Καθώς τα επίπεδα της FSH αυξάνονται, το ένζυμο P450arom, που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των οιστρογόνων, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα κοκκώδη κύτταρα.

Τα ωοθυλάκια, που είναι περισσότερο ευαίσθητα στην FSH, είναι αυτά που δέχονται το σήμα να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους πέρα από το στάδιο της ανάπτυξης του άντρου και το πρώτο (δηλ αυτό με τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην FSH) και αρχίζει να εκκρίνει οιστραδιόλη. Στο σημείο αυτό η FSH διεγείρει τα κοκκώδη κύτταρα να συνθέσουν ανασταλίνη. Αν και τόσο η οιστραδιόλη όσο και η ανασταλίνη μπορούν να ρυθμίσουν αρνητικά την έκκριση της FSH από την υπόφυση, αποδεικνύεται πως η οιστραδιόλη είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης FSH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης στους ωοθηκικούς κύκλους τόσο στον άνθρωπο όσο και στα υπόλοιπα πρωτεύοντα. Έτσι τα επίπεδα της FSH στο αίμα μειώνονται σημαντικά με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να υποστηρίξει τα άλλα

επιλεγμένα ωοθυλάκια, με αποτέλεσμα αυτά να μη φτάνουν στο ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο και να υπόκεινται σε ατρησία.

Στη μέση περίπτωση της ωοθυλακικής φάσης το επικρατές ωοθυλάκιο διακρίνεται, καθώς είναι το μεγαλύτερο υγιές ωοθυλάκιο σε κάθε ωοθήκη. Σε αυτό το σημείο το επικρατές ωοθυλάκιο εξαρτάται από τη δράση της LH. Οι υποδοχείς της LH βρίσκονται στα κύτταρα της θήκης κι εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα κάτω από τη διέγερση της FSH. Έτσι το επικρατές ωοθυλάκιο παράγει αυξημένα ποσά ανδροστενεδιόνης κι επομένως οιστραδιόλης σε απόκριση στην LH. Η παρακρινής σηματοδότηση σε αυτό το ωοθυλάκιο φαίνεται να συμμετέχει στην επιλεκτική αύξηση της σύνθεσης ανδρογόνων υπό την επίδραση της LH. Η LH *in vitro* διεγείρει συντονισμένα τη δράση της αρωματάσης και τη σύνθεση της ανασταλίνης στα κοκκώδη κύτταρα του επικρατούντος ωοθυλακίου και η ανασταλίνη προάγει τη σύνθεση των ανδρογόνων στα κύτταρα θήκης υπό την επίδραση της LH. Έτσι η ανασταλίνη πιθανόν να συμμετέχει στο παρακρινές σύστημα, το οποίο οδηγεί στη αυξημένη έκκριση οιστρογόνου από το επικρατές ωοθυλάκιο.

Παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον το γεγονός πως το μέγεθος του ωοθυλακίου επηρεάζει την επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου. Συγκεκριμένα, σε ωοθυλάκια με διάμετρο < 10 mm το ένζυμο της αρωματάσης εκφράζεται ελάχιστα και παράλληλα τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της οιστραδιόλης εμφανίζονται πολύ χαμηλά (Hillier 1985; van Dessel et al, 1996; Brailly et al, 1981). Βέβαια, η παραγωγή οιστραδιόλης διεγείρεται άμεσα *in vitro* με την προσθήκη FSH σε καλλιεργητικό υλικό (Erickson et al, 1975; Hillier et al, 1980; Mason et al, 1994). Είναι δύσκολο όμως να εξηγηθεί πως τα επίπεδα οιστραδιόλης παραμένουν χαμηλά παρόλη τη διέγερση, που προκαλείται σε μέγιστο βαθμό από την FSH στα πρώτα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης (van Santbrink et al, 1995). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η αποικοδόμηση των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος, όπου το οιστρογόνο υπάρχει σε αφθονία. Επομένως, το ωοθυλάκιο, που επιλέγεται ως επικρατές είναι εκείνο, που εμφανίζει τη μέγιστη ευαυσθησία στην FSH. Το ωοθυλάκιο εκείνο μάλλον, όταν στρατολογείται, πρέπει να βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο της ανάπτυξης συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα ωοθυλάκια (Fauser et al, 1997). Πράγματι, η απόκριση καλλιεργούμενων κοκκωδών κυττάρων (που απομονώνονται από ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων) στην FSH φαίνεται πως εξαρτάται από το μέγεθος του ωοθυλακίου. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως η παραγωγή οιστραδιόλης γίνεται ως επί το πλείστον σε ωοθυλάκια με μεγαλύτερο μέγεθος (Erickson et al, 1975; Hillier et al, 1980; Mason et al, 1994; Brailly et al, 1981).

A.3.4 ΑΤΡΗΣΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι περιορισμένος ο αριθμός των ωοθυλάκιων, που ωριμάζουν και φτάνουν μέχρι το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας με απώτερο στόχο τη γονιμοποίηση. Τα περισσότερα σταματούν την ανάπτυξη λίγο μετά το σχηματισμό του άντρου και τελικά υφίστανται ατρησία (atresia). Τα ωοθυλάκια, που δε γίνονται ατρητικά, θα επιλεγούν ως επικρατή και θα μετασχηματιστούν σε ωχρό σωματίο κατά την ωοθυλακιορρηξία. Η ατρησία συμβαίνει λόγω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή αλλιώς της απόπτωσης των σωματικών κυττάρων του ωοθυλάκιου και του ωοκυττάρου (Chun et al, 1998). Η απόπτωση, είναι μια διαδικασία, που απαιτεί ενέργεια και είναι γενετικά προγραμματισμένη. Παρατηρείται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς και είναι μορφολογικά διακριτή από τη διαδικασία της νέκρωσης. Η απόπτωση επιτρέπει την ασφαλή απόρριψη των κυττάρων, όταν έχουν ολοκληρώσει τη βιολογική τους δράση (Quirk et al, 2004).

Η κατανόηση των φυσιολογικών μηχανισμών, που οδηγούν σε ατρησία του ωοθυλάκιου, αποτελεί προτεραιότητα κατά την μελέτη του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, καθώς είναι πιθανόν να ανακαλυφθούν οι παράγοντες, που επιτρέπουν σε ένα ωοθυλάκιο να ωριμάσει, ώστε να είναι ικανό να γονιμοποιηθεί. Η ωοθυλακική ανάπτυξη εξαρτάται άμεσα από την παρουσία παραγόντων επιβίωσης, που προάγουν την ανάπτυξη ενώ παράλληλα προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση. Αυτοί οι παράγοντες παράγονται από την ωοθήκη, όπως οι γοναδοτροπίνες FSH και LH. Απουσία των παραγόντων ανάπτυξης ενεργοποιούνται στο ωοθυλάκιο ενδογενή μονοπάτια απόπτωσης, που οδηγούν σε ατρησία (Quirk et al, 2004). Συγκεκριμένα, λόγω αύξησης της συγκέντρωσης της FSH στην αρχή του έμμηνου κύκλου, ένα ωοθυλάκιο παράγει αυξημένα ποσά οιστρογόνου και οδηγείται έτσι στην ωρίμανση στο μέσο περίπου του κύκλου (Hussein 2005). Στη συνέχεια, η μείωση της έκκρισης FSH ως μηχανισμός ανάδρασης, έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση των ωοθυλάκιων, που δεν ωριμάζουν και μετατρέπονται σε ατρητικά (Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991).

Αν και τα σήματα, οι υποδοχείς και τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια, που οδηγούν τα κοκκώδη κύτταρα στην απόπτωση δεν είναι πλήρως γνωστά, είναι πιθανό πως: i) πολλά μόρια εμπλέκονται (όπως κασπάσες, TNF, TVB, Par-4, p53, c-Myc, IFN, ενδοθηλίνες), ii) συμμετέχουν τόσο παράγοντες επιβίωσης (όπως γοναδοτροπίνες, IGF-I, IL-1 β , EGF, TGF- α , bcl-2) αλλά και ατρετογενείς παράγοντες (όπως TGF- β , IL-6, ανδρογόνα, κασπάσες, αντιγόνα Fas και TNF) (Driancourt et al., 1998; Tilly, 2001; Jiang et al., 2003) και iii) το αποτέλεσμα βασίζεται στην ισορροπία και συνεργασία των παραπάνω μορίων. Επίσης, οι δεσμευτικές πρωτεΐνες του

αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης- 2,4 και 5 (IGFBP-2,4,5, insulin-like growth factor binding proteins- 2,4,5) συμμετέχουν στη διαδικασία της ατρησίας, καθώς εκφράζονται στα ατρητικά ωοθυλακία. Ειδικά η IGFBP-4 είναι αναστολέας της παραγωγής οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα μετά από πρόκληση της FSH (Mason et al, 1998). Στα κοκκώδη κύτταρα υγιών γραφικών ωοθυλακίων και ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων του ωχρού σωματίου εκφράζεται μια πρωτεΐνη της IGFBP-4, η οποία είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος που σχετίζεται με την κύηση (PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein-A) (Hourvitz et al, 2000). Επομένως, φαίνεται πως η PAPP-A ελέγχει την επιβίωση του επικρατούντος ωοθυλακίου αναστέλλοντας την IGFBP-4, που αποτελεί ανταγωνιστή της FSH (Erickson et al, 2001).

A.3.5 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ (OVULATION)

Ωοθυλακιόρρηξια είναι το γεγονός, που συμβαίνει στο μέσο του κύκλου, περίπου τη 14^η ημέρα, όταν ένα δευτερογενές ωοθυλάκιο απελευθερώνεται στην επιφάνεια της ωοθήκης και περνά στον ωαγωγό, όπου ενδέχεται να γονιμοποιηθεί. Αποτελεί επίσης το τελικό στάδιο της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ωοθυλακίου και σηματοδοτεί την αρχή του σχηματισμού του ωχρού σωματίου.

Η ωοθυλακιόρρηξια διεγείρεται από την αύξηση των επιπέδων της LH (LH surge), η οποία προκαλεί την απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου από το ωοθυλάκιο. Αυτή η αύξηση στα επίπεδα της γοναδοτροπίνης προκαλείται από υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης στην κυκλοφορία, που παράγονται από το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο. Η ωοθυλακιόρρηξια μπορεί επίσης να προκληθεί από εξωγενή ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), που δίνεται ως υποκατάστατο της LH. Επιπλέον, τα επίπεδα της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό αυξάνουν σημαντικά μετά την αύξηση των επιπέδων της LH και είναι πιθανό πως η αύξηση της προγεστερόνης πριν την ωοθυλακιόρρηξια να απαιτείται για τη διάρρηξη του ωοθυλακίου.

Η αύξηση των επιπέδων της LH προκαλεί άμεση απόκριση των κοκκωδών κυττάρων, που ερμηνεύεται με την αναστολή της μίτωσης (δηλ τη διακοπή της ωοθυλακικής ανάπτυξης) αλλά και την αυξημένη έκφραση του P450_{sc}, του κυριότερου ενζύμου, που απαιτείται για τη σύνθεση της προγεστερόνης. Επιπλέον, παρατηρείται μια σειρά πρωτεολυτικών γεγονότων στο προ-ωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ωαρίου 36 ώρες αργότερα. Η βιοχημική βάση της ωοθυλακιόρρηξιας, η οποία χαρακτηρίζεται και ως φλεγμονώδης απόκριση, είναι η ενεργοποίηση διαφόρων συστημάτων δευτέρων μηνυμάτων στα κύτταρα θήκης και στα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία οδηγούν σε

υπεραιμία της ωοθήκης. Επιπλέον, προκαλείται τοπική αύξηση της δραστηριότητας πρωτεολυτικών ενζύμων, που μειώνουν την αντοχή στον εφελκυσμό (tensile strength) του τοιχώματος του ωοθυλακίου.

Οι αλλαγές, που προκαλούνται μετά από την πρόκληση από το σύστημα LH/hCG κι οδηγούν στη διάρρηξη του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του ωοκυττάρου κατά την ωορρηξία, συμβαίνουν λόγω της δράσης τριών συστημάτων σηματοδότησης: 1. της κυκλικής AMP και της πρωτεϊνικής κινάσης A- εξαρτώμενης από την κυκλική AMP, 2. της πρωτεϊνικής κινάσης C-εξαρτώμενης από το ασβέστιο και 3. του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (arachidonic acid) σε προσταλαγδίνες και λευκοτριενικά (leukotrienes). Η απόκριση του ωοθυλακίου στο σύστημα LH/hCG έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή προσταλαγδινών, λευκοτριενικών, κυτοκινών, PAF(Platelet Activating Factor) και μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Οι προσταλαγδίνες, που παράγονται τοπικά φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διάρρηξη του ωοθυλακίου, καθώς ευθύνονται για την διαπερατότητα των αγγείων. Έτσι ασκείται πίεση στο εσωτερικό του ωοθυλακίου, όταν το ωοθυλακικό υγρό διαρρέει μέσω του ωοθυλακικού περιβλήματος, που αρχίζει να διαρρηγνύεται μερικώς. Η σταδιακή μείωση στην αντοχή της ελαστικότητας του ωοθυλακικού περιβλήματος οδηγεί τελικά στην πλήρη διάρρηξη του ωοθυλακίου. Έπειτα, το ωοκύτταρο, που περιβάλλεται από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, απελευθερώνεται από το θυλάκιο και μεταφέρεται στην επιφάνεια της ωοθήκης. Συμπερασματικά, σε απόκριση στις γοναδοτροπίνες το επικρατές Γραφιανό ωοθυλάκιο απελευθερώνει το ώριμο ωοκύτταρο με στόχο τη γονιμοποίηση του ενώ τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης μετατρέπονται σε ωχρο σώματιο (Fausser et al, 1997)

A.3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

Η απόκριση των ωοθηκών στις γοναδοτροπίνες ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γυναικών (Beretsos et al, 2009). Αυτή ακριβώς η διαφορετική απόκριση έχει εμπνεύσει την έρευνα και τον καθορισμό των παραγόντων, που εμπλέκονται (Loutradis D et al, 2007). Είναι γνωστό πως η FSH δρα συνεργατικά με την LH για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου: συνοπτικά η FSH παίζει πρωταρχικό ρόλο στη στρατολόγηση, επιλογή κι επικράτηση του ωοθυλακίου, καθώς η LH συμμετέχει στην ωρίμανσή του αλλά και στην ωοθυλακιωρρηξία (Ferraretti et al, 2004).

Όπως αναφέρθηκε, η ωοθυλακιωρρηξία προκαλείται στο μέσο περίπου του κύκλου από την εκρηκτική αύξηση της LH, η οποία προκαλείται από τα υψηλά ποσοστά οιστραδιόλης στην κυκλοφορία, που παράγονται από το προ-ωοθυλακιωρρηκτικό ωοθυλάκιο. Αυτή η αύξηση στην LH έχει ως αποτέλεσμα τη

συνεχή έκφραση γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα. Τα προϊόντα της έκφρασης αυτών των γονιδίων είναι υπεύθυνα για την έναρξη της ωχρινοποίησης και της μειωτικής ωρίμανσης του ωοκυττάρου, αλλά και για τη διάρρηξη του ωοθυλάκιου κατά την ωοθυλακιορρηξία (Conti et al., 1998; Richards et al., 1998).

Η επαγωγική δράση της FSH στην ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε παραλλαγές μηχανισμών, μέσω των οποίων τα κοκκώδη κύτταρα αποκρίνονται στις γοναδοτροπίνες κι άλλους εξωκυτταρικούς παράγοντες (Hillier 2001). Η σηματοδότηση επιτυγχάνεται μέσω Ca^{2+} /υδρόλυσης ινοσιτολικών λιπιδίων και μονοπατιών, που συμμετέχουν οι τυροσινικές κινάσες (Morris et al., 1995; Lamm et al., 1999), αλλά ο κύριος ρυθμιστής είναι η cAMP (Richards et al., 1998)

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων ωρίμανσης των κοκκωδών κυττάρων, που επάγεται από την FSH, η LH επηρεάζει περισσότερο από την FSH το σχηματισμό cAMP *in vitro* (Yong et al., 1992a,b; Richards et al., 1998). Αυτό υποδηλώνει πως ο υποδοχέας της LH (LHR) παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον FSHR ή ότι ο LHR είναι πιο αποτελεσματικός για την παραγωγή cAMP. Η ωοθυλακιορρηξία, που επηρεάζεται από την LH, προκαλεί την έκφραση γονιδίων, που αποκρίνονται στην cAMP, με αποτέλεσμα την τελική διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων και της διάρρηξης του ωοκυττάρου. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-1 β , ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης-1 β (interleukin-1 β R) (Adashi 1998b) και η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) (Morris and Richards 1995), παράγοντες αγγειογένεσης, όπως ο VEGF (Ravindranath et al, 1992), αλλά και πρωτεάσες απαραίτητες για την αναδόμηση των ιστών (tissue remodeling) (Liu et al, 1998). Η αύξηση των επιπέδων της LH κατά την ωοθυλακιορρηξία προκαλεί την παραγωγή του ενζύμου 11 β HSD1 και ταυτόχρονα το 11 β HSD2 υποεκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλάκιου (Tetsuka et al., 1997, 1999b). Τη δράση της LH στην έκφραση του γονιδίου, που κωδικοποιεί το 11 β HSD1 στα κοκκώδη κύτταρα μιμείται *in vitro* η ιντερλευκίνη-1 β (Tetsuka et al., 1999a). Επίσης η LH καταστέλλει την διαίρεση των κοκκωδών κυττάρων (Yong et al., 1992a). Έτσι με τη συμβολή των προ/αντιφλεγμονωδών, αγγειογενείς και προτεολυτικές αλλαγές, που οδηγούν σε διάρρηξη του ωοθυλάκιου, το ωοθυλάκιο σταματά να αναπτύσσεται, ωχρινοποιείται και ξεκινά η παραγωγή προγεστερόνης (Hillier 2001).

A.3.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Μια από τις πιο εντυπωσιακές ανακαλύψεις των περασμένων ετών είναι ότι η ωοθυλακιογένεση ελέγχεται και από παράγοντες ανάπτυξης, που εκκρίνονται από το ωοκύτταρο (Ericson et al, 2000; Matzuk, 2000). Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε παράγοντες ανάπτυξης στο ωοκύτταρο: ο αυξητικός παράγοντας ανάπτυξης- 9 (GDF-9, Growth Differentiation Factor-9) (McGrath et al, 1995), η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη- 15 (BMP-15, Bone Morphogenetic Protein- 15) (Dube et al, 1998; Laitinen et al, 1998), η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη- 6 (BMP-6, Bone Morphogenetic Protein- 6) (Lyons et al, 1989), ο μετατρεπτικός παράγοντας ανάπτυξης β2 (TGF-β2, Transforming Growth Factor- β2) (Schmid et al, 1994) και ο παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών-8 (FGF-8, Fibroblast Growth Factor- 8) (Valve et al, 1997).

Αυτό, που έχει αποδειχτεί, είναι πως οι GDF-9 και BMP-15 εκφράζονται μόνο στο ωοκύτταρο (Erickson 2000b), ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF-β και αποτελούν απαραίτητα μόρια για την ομαλή διεξαγωγή της ωοθυλακιογένεσης. Μελέτες σε ποντικούς, που έχουν υποστεί μόνιμη αδρανοποίηση (knockout mice) στα γονίδια GDF-9 και BMP-15, έδειξαν πως η ωοθυλακιογένεση μπλοκάρεται στο στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλάκιου πριν το σχηματισμό του άντρου (Dong et al, 1996). Συνεπώς, δεν παρατηρούνται Γραφιανά ωοθυλάκια, ωοθυλακιόρρηξια ή επιτυχής κύηση. Επίσης, μεταλλάξεις του BMP-15 έχουν συνδεθεί με τη γυναικεία υπογονιμότητα.

Οι δύο παράγοντες ανάπτυξης GDF-9 και BMP-15, αν και εκφράζονται μόνο στο ωοκύτταρο, δρουν στα κοκκώδη κύτταρα. Ο φυσιολογικός ρόλος του GDF-9 είναι η διέγερση του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων κατά την φάση της ανάπτυξης του ωοθυλάκιου, που είναι ανεξάρτητη από τη δράση των γοναδοτροπινών, ιδιαίτερα στο στάδιο, που οδηγεί στο σχηματισμού του δευτερογενούς ωοθυλάκιου (Elvin et al, 1999a). Επίσης, αναφέρεται πως ο παράγοντας BMP-15 πιθανώς επηρεάζει τη μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων *in vitro* (Otsuka et al, 2000). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως οι δύο αυτοί παράγοντες ανάπτυξης επιφέρουν αλλαγές στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, μια διαδικασία, που επηρεάζεται από τη δράση της FSH (Vitt et al, 2000; Hayashi et al, 1999; Otsuka et al, 2000). Οι Vitt et al, έδειξαν πως ο GDF-9 παρεμποδίζει την σύνθεση των υποδοχέων της LH, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στα κοκκώδη κύτταρα, διαδικασίες, που προκαλούνται από την FSH. Ο παράγοντας BMP-15 μειώνει την παραγωγή της προγεστερόνης, που προκαλείται από την FSH, σε μη διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Αντίθετα δεν επηρεάζεται η παραγωγή οιστραδιόλης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως η FSH προωθεί

επιλεκτικά την παραγωγή οιστραδιόλης και όχι της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Otsuka et al, 2000). Επιπλέον, ο παράγοντας BMP-15 παρεμποδίζει πιθανώς την έκφραση των υποδοχέων της FSH. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει πως αυτοί οι ωοκυτταρικοί παράγοντες ανάπτυξης είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της δράσης της FSH κατά την ωοθυλακιόγένεση (Erickson et al, 2001).

Υπάρχουν ακόμη ενδείξεις πως ο GDF-9 σχετίζεται άμεσα με τη ρύθμιση του σταδίου διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων του επικρατούντος ωοθυλακίου, δηλαδή διεγείρει την έκφραση της υαλουρονικής συνθετάσης 2 (HAS2, hyaluronan synthase 2), της κυκλο-οξυγενάσης-2 (COX-2, cyclo-oxygenase-2), και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης StAR (steroid acute regulatory protein) (Elvin et al, 1999b). Η δράση των HAS2 και COX-2, που προκαλούνται από τον GDF-9 φαίνεται να σχετίζεται με τη διάρρηξη του ωοθυλακίου (cumulus expansion) και την παραγωγή προγεστερόνης, αντίστοιχα (Elvin et al, 1999b).

Έχει επίσης παρατηρηθεί σε ζωικά μοντέλα knockout σε Gdf-9 πως ο σχηματισμός των κυττάρων θήκης παρουσιάζει δυσκολίες (Dong et al, 1996), ενώ ρόλος του Bmp-15 στην ανάπτυξη των κυττάρων θήκης παραμένει αδιευκρίνιστος. Γενικά, ο ρόλος του γονιδίου BMP-15 στον άνθρωπο είναι άγνωστος. Πρόσφατα όμως περιγράφηκε μετάλλαξη στο γονίδιο BMP-15 σε δύο αδερφές με το σύνδρομο της πρώιμης ωοθηκικής ανεπάρκειας (Di Pasquale et al, 2004). Επίσης οι Shimasaki et al, χρησιμοποιώντας συνθετική ανθρώπινη BMP-15, έδειξαν πως η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων. Συγκεκριμένα φαίνεται πως προκαλεί την μιτωτική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό στα κοκκώδη κύτταρα. Επιπλέον, το γονίδιο Bmp-15 προκαλεί στα κοκκώδη κύτταρα πειραματοζώων την έκφραση του kit ligand, ένας παράγοντας απαραίτητος στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου (Otsuka et al, 2002). Διαδοχικά ο kit ligand καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης Bmp-15 από τα ωοκύτταρα. Έτσι φαίνεται να υπάρχει μια αρνητική παλίνδρομη αλληλορύθμιση (negative feedback loop) (Moore et al, 2005). Είναι λοιπόν εμφανές πως η δράση του BMP-15 είναι απαραίτητη για την ομαλή πορεία της ωοθυλακιόγένεσης. Συμπερασματικά, το ωοκύτταρο μέσω των παραγόντων, που εκφράζονται σε αυτό είναι βέβαιο πως επηρεάζει την ενεργοποίηση ή την καταστολή λειτουργικών γονιδίων, από το ανώριμο στάδιο του ωοθυλακίου μέχρι εκείνο του επικρατούντος ωοθυλακίου και ρυθμίζει τελικά σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα γονιμοποίησης.

A.3.8 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ

Στην ανθρώπινη ωοθήκη η μείωση ξεκινά στο τέλος του πρώτου τριμήνου του θηλυκού εμβρύου και τα ωοκύτταρα περνούν από τα στάδια της λεπτοταινίας, ζυγοταινίας και παχυταινίας της πρόφασης της μειωτικής διαίρεσης I πριν τη διακοπή της στο στάδιο της διπλοταινίας. (Picton et al, 1998). Τα ωοκύτταρα στο στάδιο της διπλοταινίας είναι μεγαλύτερα από τα ωογόνια κι έχουν περισσότερα κυτταροπλασματικά συστατικά. Το κυριότερο όμως είναι πως σε αυτά έχει πραγματοποιηθεί γενετικός ανασυνδυασμός (Barlow and Hultén [1998](#)).

Η απόκριση του ωοθυλάκιου στην εκκρινική αιχμή της LH έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αρχικά οιστρογόνου κι έπειτα προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα, αλλά και την παραγωγή υαλουρονικού οξέος, που οδηγεί στη διάρρηξη του ωοθυλάκιου και την λήξη της επικοινωνίας του ωοκυττάρου με τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (Anderson et al, 1976). Η απώλεια αυτή της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας ίσως λειτουργεί ως ερέθισμα για την επανέναρξη της μείωσης στα ώριμα ωοθυλάκια *in vivo*, καθώς μειώνεται η συγκέντρωση του cAMP στο ωοκύτταρο. Στη συνέχεια απενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση A- εξαρτώμενη από το cAMP και μειώνεται η ανασταλτική επίδραση των πουρινών στη διακοπή της μείωσης του ωοκυττάρου. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν ταυτόχρονα με τη διάρρηξη της πυρηνικής μεμβράνης του ωοκυττάρου, καθώς το κύτταρο προχωρά στη μετάφαση κι ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση με την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου.

Η διακοπή της μείωσης στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα και η επανέναρξή της μετά από την εκκρινική αιχμή της γοναδοτροπίνης λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία μπορεί να εξηγηθεί με την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (Whitaker 1996; Dekel 1997; Sagata 1997; Fulka et al, 1998). Η πυρηνική ωρίμανση στα θηλαστικά επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής του παράγοντα προαγωγής της ωρίμανσης (MPF, Maturation Promoting Factor) στο ωόπλασμα. Η σημασία του MPF στη διακοπή της μειωτικής διαίρεσης αποδεικνύεται μέσω της πρώιμης συνέχισης της μείωσης στον πυρήνα του ωοκυττάρου του αρχέγονου ωοθυλάκιου μετά από σύντηξη με κύτταρα, που παρουσίαζαν υψηλά ποσά του MPF (Kono et al, 1996). Οι δράσεις του MPF εκτός από τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD) είναι η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, ο σχηματισμός της ατράκτου και η παραγωγή του πρώτου πολικού σωματίου, με την οποία και συμπληρώνεται η πρώτη μειωτική διαίρεση. Ο MPF αποτελείται από δύο πρωτεΐνες: μια πρωτεΐνη 34 Kd, ομόλογη με την πρωτεΐνη του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης (*cdc2*) και την κυκλίνη B. Για την ενεργοποίηση του p34^{cdc2} απαιτείται αποφωσφορυλίωση. Αντίθετα, η κυκλίνη B απαιτεί

φοσφορυλίωση για την ενεργοποίησή της. Πιστεύεται πως αποτελεί υπόστρωμα για το p39^{mos}, ένα προϊόν του ογκογονιδίου Mos, το οποίο εκφράζεται νωρίς κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου κι εξαφανίζεται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Η δραστηριότητα του MPF είναι περιορισμένη στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου, αυξάνεται κατά το στάδιο GVBD και είναι σε υψηλά επίπεδα στη μετάφαση I και II. Τα ωοκύτταρα προκειμένου να συνεχίσουν τη μείωση χρειάζονται την παρουσία του p39^{mos}, καθώς και τη συσσώρευση υποστρωμάτων του MPF. Εντούτοις, η διάρρηξη της πυρηνικής μεμβράνης είναι γνωστό πως αναστέλλεται λόγω της δράσης της PKA. Οπότε η μείωση του ενδοκυτταρικού cAMP, που συμβαίνει σε απόκριση της εκκριτικής αιχμής της LH μειώνει τη δραστηριότητα της PKA. Η p39^{mos} τότε συμμετέχει στην ενεργοποίηση του MPF, πιθανώς μέσω φωσφορυλίωσης της κυκλινής.

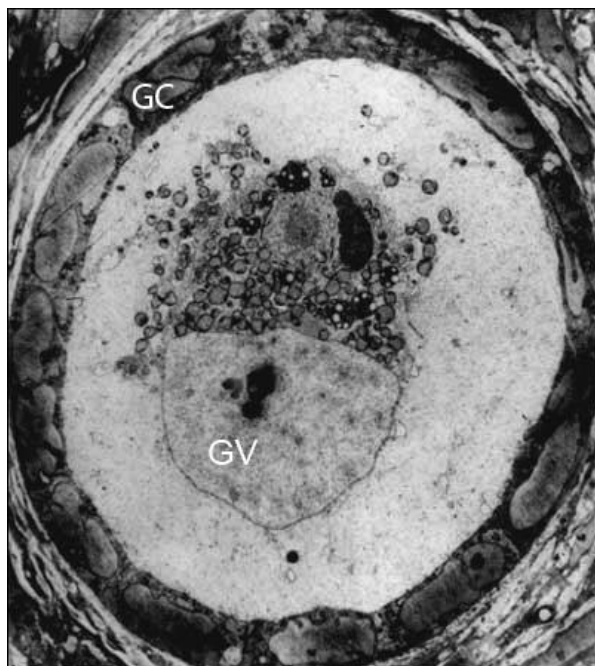
A.4 ANATOMIA ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΥ

A.4.1 ΤΟ ΑΡΧΕΓΟΝΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟ (PRIMORDIAL FOLLICLE)

Το αρχέγονο ωθυλάκιο αποτελεί τη θεμελιώδη αναπαραγωγική μονάδα της ωθήκης, διότι από αυτό ξεκινά ουσιαστικά η ωθυλακιογένεση και με τη στρατολόγησή του φτάνει μέχρι το επικρατές ωθυλάκιο.

Το αρχέγονο ωθυλάκιο περιλαμβάνει ένα μικρό ωκύτταρο (με διάμετρο ~ 25μm), η ανάπτυξη του οποίου έχει σταματήσει προσωρινά μέχρι την ήβη στην πρόφαση I. Αποτελείται επίσης από ένα μονό στρώμα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων, τα οποία άπτονται του ωκυττάρου και μια βασική μεμβράνη (Εικ. Α6). Λόγω της παρουσίας της μεμβράνης αυτής, τα κοκκώδη κύτταρα και το ωκύτταρο δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον, το οποίο δεν επιτρέπει την άμεση επαφή και επικοινωνία με άλλα κύτταρα. Στα αρχέγονα ωθυλάκια δεν παρατηρείται τροφοδότηση μέσω της κυκλοφορίας και για αυτό έχουν περιορισμένη συνεργασία με το ενδοκρινές σύστημα (Reynolds 1950).

Εικ. Α6 Το αρχέγονο ωθυλάκιο. Το ωκύτταρο με το GV περιβάλλεται από ένα μονό στρώμα κοκκωδών κυττάρων (GC), ενώ και τα δύο περιβάλλει η βασική μεμβράνη.



Όπως έχει αναφερθεί, όλα τα αρχέγονα ωθυλάκια έχουν σχηματιστεί ήδη από την εμβρυική ζωή. Ο αριθμός των αρχέγονων ωθυλάκιων στην ωθήκη μιας γυναίκας ορίζει την ωθητική της επάρκεια (ovarian reserve).

Μερικά από τα αρχέγονα ωθυλάκια επιλέγονται να συνεχίσουν στα επόμενα στάδια της ωθυλακιογένεσης αρκετά νωρίς, δηλαδή σχεδόν αμέσως από τη δημιουργία τους στις ωθήκες του θηλυκού εμβρύου. Η αλλαγή του σχήματος των κοκκωδών κυττάρων σε κυβοειδές και η μιτωτική τους δραστηριότητα αποτελούν τα

πρώτα σήματα για τη στρατολόγηση των ωοθυλάκιων. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν ταυτόχρονα με την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Η στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλάκιων είναι μια διαδικασία, που συμβαίνει με ένα σχετικά σταθερό ρυθμό τις τρεις πρώτες δεκαετίες κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας. Ταυτόχρονα, ο ρυθμός απώλειας των ωοθυλακίων, που δεν αναπτύσσονται λόγω της ατρησίας, συνεχώς επιταχύνεται. Συνεπώς, ελαττώνεται δραματικά το απόθεμα των ωοθηκών σε ωοθυλάκια, που σημαίνει πως μειώνεται η δυναμική της γονιμότητας μετά την ηλικία των 30 χρόνων, ενώ αυτή η μείωση είναι πιο αισθητή μετά την ηλικία των 35 χρόνων (Hansen K et al, 2008; Schwartz D et al, 1982).

Η επικοινωνία του ωοκυττάρου με τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης επιτυγχάνεται κυρίως μέσω παραγόντων ανάπτυξης, με σημαντικότερους κάποια από τα μέλη της οικογένειας TGF- β (Transforming Growth Factors- β), όπως είναι τα μόρια GDF-9, BMP-15, ακτιβίνες, αλλά και η AMH (Anti-Mullerian Hormone, γνωστή και ως MIS, Mullerian Inhibiting Substance) (Raftery 1999). Σε ποντικούς η AMH έχει ανασταλτική δράση στη στρατολόγηση των ωοθυλακίων (Durlinger et al, 1991; Durlinger et al, 2001), ενώ στον άνθρωπο έχει μελετηθεί ως δείκτης της ωοθηκικής επάρκειας (ovarian reserve) και παρουσιάζει υψηλές τιμές σε γυναίκες με PCOS (Fallat et al, 1997; Pigny et al. 2003; La Marka et al, 2004; Laven et al, 2004).

A.4.2 ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ (PRIMARY FOLLICLE)

Το πρωτογενές ωοθυλάκιο ορίζεται από την εμφάνιση ενός μονού στρώματος κοκκωδών κυττάρων, που περικλείουν το ωοκύτταρο. Τα κύρια γεγονότα ανάπτυξης, που συμβαίνουν στο πρωτογενές ωοθυλάκιο είναι η έκφραση του υποδοχέα της FSH, η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του ωοκυττάρου.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πρωτογενούς ωοθυλάκιου τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς της FSH. Αυτή η έκφραση είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του ωοθυλάκιου πριν την εμφάνιση του άντρου. Υψηλές τιμές της FSH στο πλάσμα επιταχύνει την ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλάκιου.

Επιπλέον, η ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλάκιου συνοδεύεται από αξιοσημείωτες αλλαγές στο ωοκύτταρο. Η διάμετρος του ωοκύτταρου πριν την εμφάνιση του άντρου αυξάνεται από 25 μ m σε 120 μ m. Αυτή η υπερβολική ανάπτυξη συμβαίνει παρατηρείται λόγω της επανεργοποίησης του γονιδιώματος του ωοκυττάρου. Στο στάδιο αυτό κάποια γονίδια, που εκφράζονται στο ωοκύτταρο, μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ωοκυττάρου. Για παράδειγμα, εκφράζονται τα γονίδια, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες (ZP-1, ZP-2 και ZP-3) της διαφανούς ζώνης (zona pellucida), μια γλυκοπρωτεϊνική μεμβράνη, που περιβάλλει τη μεμβράνη του ωοκυττάρου. Η

πρωτεΐνη ZP-3 είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του σπερματοζωαρίου και την έναρξη της ακροσωμικής αντίδρασης. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες, που εκφράζονται στο ωοκύτταρο του πρωτογενούς ωοθυλάκιου είναι το GDF-9 και το BMP-15, δύο μόρια που ανήκουν στην υπερικογένεια των TGF- β , ο ρόλος των οποίων στη διαφοροποίηση του ωοθυλάκιου είναι κρίσιμος και έχει αναφερθεί παραπάνω (McGrath et al, 1995; Dube et al, 1998; Laitinen et al, 1998).

Ένα επίσης σημαντικό γεγονός, που συμβαίνει στο στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλάκιου είναι η δημιουργία χασμοσυνδέσεων (gap junctions) ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα κοκκώδη κύτταρα. Αυτές οι συνδέσεις είναι ενδοκυτταρικά κανάλια, που αποτελούνται από πρωτεΐνες, που ονομάζονται χασμοσυνδεΐνες (connexins). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέουν άμεσα γεινιάζοντα κύτταρα, επιτρέποντας έτσι τη διάχυση ιόντων, μεταβολιτών και μόρια μεταγωγής σήματος όπως το cAMP και το ασβέστιο. Μετά τη στρατολόγηση των ωοθυλάκιων συντίθεται η Connexin 37 (Cx37) από το ωοθυλάκιο και σχηματίζει συνδέσεις με τα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ωοθήκες ποντικών, που δεν εκφράζουν Cx37, παρουσιάζουν απόλυτη έλλειψη ωοθυλακικής ανάπτυξης. Πιστεύεται πως τα κοκκώδη μέσω των χασμοσυνδέσεων μεταφέρουν προϊόντα, που χρησιμεύουν για την προστασία και τη θρέψη των ωοκυττάρων. Επίσης αυτά τα θρεπτικά συστατικά, που προέρχονται από τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα όχι μόνο για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, αλλά και την επανέναρξη της μείωσης από το στάδιο της πρόφασης I. Το ωοκύτταρο γίνεται ικανό να συνεχίσει τη μειωτική διαίρεση πριν την εμφάνιση του άντρου του ωοθυλάκιου. Παρόλα αυτά τα πλήρως ανεπτυγμένα ωοθυλάκια σπάνια μπορούν να προχωρήσουν στη μειωτική ωρίμανσή τους κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Αυτό έχει οδηγήσει στη σκέψη για την ύπαρξη ενός μηχανισμού, που παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης. Στο μηχανισμό αυτό φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο το μόριο cAMP. Η επαγωγή σήματος του υποδοχέα FSH στα κοκκώδη κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του cAMP, το οποίο μπορεί να διαχέεται μέσω των συνδέσεων Cx37 στο ωοκύτταρο και να συσσωρεύεται σε υψηλές τιμές στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου (Simon et al, 1997). Εκεί φαίνεται να παρεμποδίζει τη συνέχιση της μείωσης και την ωρίμανση του ωοθυλακίου.

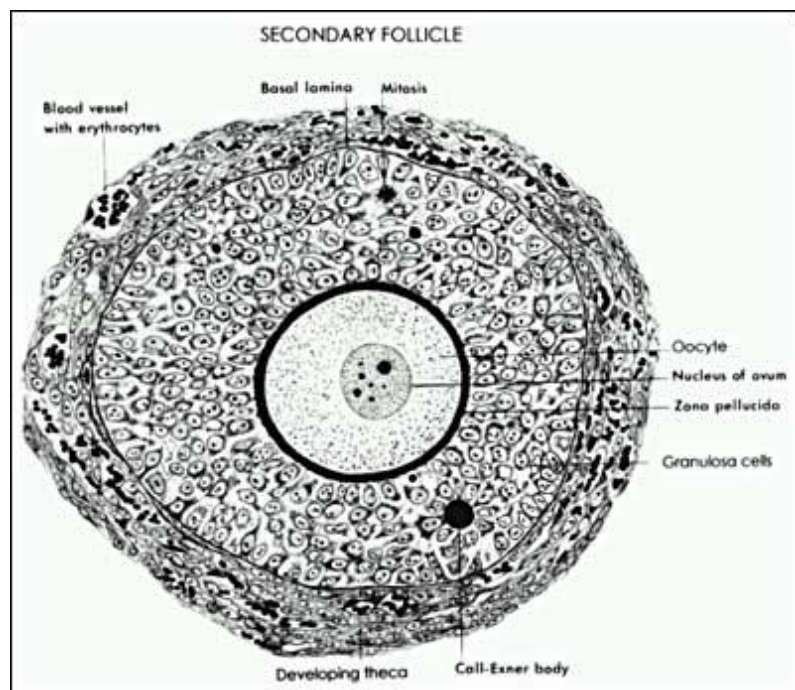
A.4.3 ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟ (SECONDARY FOLLICLE)

Καθώς προχωρά η ανάπτυξη του ωθυλάκιου, παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη δομή του, όταν φτάνει τελικά να σχηματιστεί το δευτερογενές ωθυλάκιο. Οι κυριότερες αλλαγές περιλαμβάνουν τη συσσώρευση κοκκωδών κυττάρων, που πολλαπλασιάζονται συνεχώς, και την εμφάνιση των κυττάρων θήκης.

Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του δευτερογενούς ωθυλάκιου αρχίζει με την εναπόθεση ενός δεύτερου στρώματος κοκκωδών κυττάρων, των οποίων η δομή και η μορφολογία αλλάζει αρκετά. Στο στάδιο του δευτερογενούς ωθυλάκιου παρατηρείται η δημιουργία μεγάλων συνδέσεων μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων μετά τη στρατολόγηση των ωθυλάκιων. Κύριος παράγοντας για την εμφάνιση αυτών των συνδέσεων αποτελεί η πρωτεΐνη Cx43, η οποία εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα.

Επιπλέον, η εμφάνιση του δευτερογενούς ωθυλάκιου χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη των κυττάρων θήκης. Κατά τη μετάβαση από το πρωτογενές στο δευτερογενές ωθυλάκιο μερικά επίπεδα κυττάρων τύπου στρώματος εμφανίζονται γύρω από τη βασική μεμβράνη (basal lamina). Οι Erickson et al, 2003 έδειξαν σε μελέτες σε αρουραίους πως κάποια από τα κύτταρα θήκης εκφράζουν λειτουργικούς δείκτες διαφοροποίησής τους, όπως το Bmp-4. Αυτό υποδηλώνει πως τα κύτταρα θήκης αναπτύσσονται νωρίς κατά την ωθυλακιογένεση, κατά πάσα πιθανότητα κατά τη μετάβαση από το πρωτογενές στο δευτερογενές ωθυλάκιο. Καθώς αναπτύσσεται το δευτερογενές ωθυλάκιο, εμφανίζονται δύο στρώματα κυττάρων θήκης: ένα στρώμα έσω κυττάρων θήκης, που στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ενδιάμεσα κύτταρα θήκης κι ένα έξω κυττάρων θήκης, που διαφοροποιούνται σε λεία μυϊκά κύτταρα. Η ανάπτυξη αυτών των κυττάρων συνοδεύεται από το σχηματισμό πολυάριθμων αγγείων, πιθανόν μέσω της αγγειογένεσης, επομένως, αρχίζει πλέον να κυκλοφορεί αίμα γύρω από το ωθυλάκιο. Μέσω της κυκλοφορίας μεταφέρονται στο ωθυλάκιο θρεπτικά συστατικά και γοναδοτροπίνες, ενώ παράλληλα απομακρύνονται από αυτό προϊόντα του μεταβολισμού του. Με την ολοκλήρωση του σταδίου της ωθυλακιογένεσης πριν το σχηματισμό του άντρου ένα πλήρως αναπτυγμένο δευτερογενές ωθυλάκιο αποτελείται από πέντε διακριτές δομικές μονάδες: ένα πλήρως αναπτυγμένο ωκύτταρο, που περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη (zona pellucida), αρκετά στρώματα κοκκωδών κυττάρων, τη βασική μεμβράνη (basal lamina), ένα στρώμα έσω (interna) κι ένα έξω (externa) κι ένα σύστημα τριχοειδών αγγείων για την επικοινωνία του ωκύτταρου τόσο με το υπόλοιπο ωθυλάκιο όσο και με άλλους εξωκυττάρους παράγοντες (Εικ. Α7).

Εικ. Α7 Δευτερογενές ωοθυλάκιο. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός πλήρως αναπτυγμένου ωοκυττάρου, που περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη (zona pellucida), 5-8 στρώματα κοκκωδών κυττάρων, τη βασική μεμβράνη (basal lamina), ένα στρώμα έσω (interna) κι ένα έξω (externa) κυττάρων θήκης με πολλά αιμοφόρα αγγεία.



Α.4.4 ΤΟ ΓΡΑΦΙΑΝΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ (GRAAFIAN FOLLICLE)

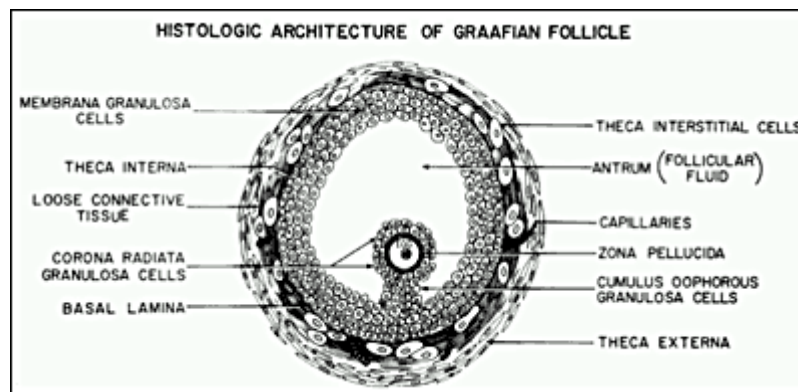
Το Γραφιανό ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας κοιλότητας, του άντρου (antrum), που περιέχει το ωοθυλακικό υγρό. Το ωοθυλακικό υγρό περιλαμβάνει εκκρινόμενες ουσίες και παραπροϊόντα του μεταβολισμού του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων (Edwards, 1974). Αποτελεί επίσης το μέσο εκείνο μέσω του οποίου διέρχονται ρυθμιστικά μόρια από και προς το μικροπεριβάλλον του ωοθυλάκιου.

Η δομή και η οργάνωση του Γραφιανού ωοθυλάκιου παραμένει η ίδια ανεξάρτητα της ανάπτυξης και του σταδίου του έμμηνου κύκλου (Erickson 2000a). Το μέγεθος του Γραφιανού ωοθυλάκιου καθορίζεται σημαντικά από το μέγεθος του άντρου, το οποίο με τη σειρά του καθορίζεται από τον όγκο του ωοθυλακικού υγρού. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του ωοθυλάκιου επίσης συμμετέχει στον καθορισμό του μεγέθους του ωοθυλάκιου. Σε ένα επικρατές ωοθυλάκιο καθώς το άντρο αρχίζει να γεμίζει με ωοθυλακικό υγρό, παρατηρείται πως τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης πολλαπλασιάζονται με ταχύτετους ρυθμούς. Επομένως η αυξημένη συσσώρευση ωοθυλακικού υγρού και ο ταχύτετος ρυθμός πολλαπλασιασμού των σωματικών κυττάρων του ωοθυλάκιου ευθύνονται για τη

θεματική ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλάκιου κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου.

Στο Γραφιανό ωοθυλάκιο τα κοκκώδη κύτταρα και το ωοθυλάκιο έχουν αυστηρά καθορισμένο σχήμα αλλά και θέση μέσα στο ωοθυλάκιο. Αυτή οργάνωση έχει αποτέλεσμα να εμφανίζονται τέσσερις τύποι κοκκωδών κυττάρων: τα μεμβρανικά (membrana), αυτά που περιβάλλουν το άντρο(periantral), τα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου (cumulus oophorus), και τα κοκκώδη του ακτινωτού στέφανου (corona radiata) (Εικ. Α8).

Εικ. Α8. Το Γραφιανό ωοθυλάκιο. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση του άντρου, την παρουσία τεσσάρων τύπων πολυάριθμων κοκκωδών κυττάρων και κύτταρα έσω κι έξω θήκης.



Όλα τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς της FSH κατά την ανάπτυξη του Γραφιανού ωοθυλάκιου- εντούτοις κάθε τύπος από τους παραπάνω, που αναφέρθηκαν, επηρεάζεται από τη θέση του να εκφράσει σε απόκριση στη διέγερση από την FSH. Για παράδειγμα, τα μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν P450arom και υποδοχείς της LH ενώ τα κοκκώδη κύτταρα των άλλων τριών τύπων όχι. (Erickson 2000b).

Τα κύτταρα της έξω θήκης του Γραφιανού ωοθυλάκιου περιλαμβάνουν ομοκεντρικά τοποθετημένα λεία μυϊκά κύτταρα, μαζί με νεύρα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Erickson 2000a). Τα κύτταρα της έσω θήκης αποτελούνται από μεγάλα επιθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των στεροειδών στο ωοθυλάκιο. Τα κύτταρα της έσω θήκης διαθέτουν υποδοχείς της LH και της ινσουλίνης και σε απόκριση σε αυτές παράγουν υψηλά επίπεδα ανδρογόνων, κυρίως την ανδροστενεδιόνη (androstenedione) (Erickson 1993). Τέλος, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ένα σύστημα τριχοειδών αγγείων, που διευκολύνουν την επικοινωνία του Γραφιανού ωοθυλάκιου.

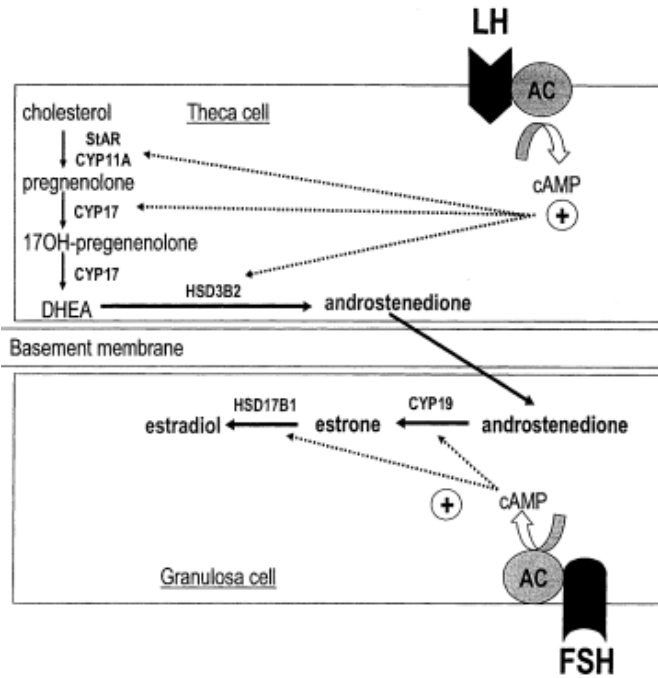
A.5 TA ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ (GRANULOSA CELLS)

Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του ωοθυλάκιου και αλλά και την κύρια πηγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης στην ωοθήκη (Amsterdam et al, 1998). Επίσης, όπως έχει αποδειχτεί από τα παραπάνω έχουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του ωοθυλάκιου, το σχηματισμό του ωχρού σωματίου και τη λειτουργία του. Τα κοκκώδη κύτταρα αναπτύσσουν μια στενή σχέση με το ωοκύτταρο, τροφοδοτώντας το με απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξή του, αλλά και απομακρύνοντας άχρηστα παραπροϊόντα. Από την άλλη παράγοντες, που εκφράζονται στο ωοκύτταρο, είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων. Τέλος, για την ομαλή ανάπτυξη του ωοθυλάκιου τα κοκκώδη κύτταρα αναπτύσσουν επικοινωνία με τα κύτταρα θήκης, τα οποία κατεξοχήν παράγουν ανδρογόνα στην ωοθήκη.

A.5.1 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ.

Οι φυλετικές στεροειδείς ορμόνες συμβάλλουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών ιστών αλλά και είναι απαραίτητες στη διαδικασία της αναπαραγωγής (Drummond A, 2006). Συντίθενται χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα χοληστερόλη, προγεστίνες, ανδρογόνα και οιστρογόνα (Sanderson, 2006). Η βιοσύνθεση των στεροειδών στην ωοθήκη χαρακτηρίζεται από τη συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων με τα κύτταρα θήκης κάτω από τον έλεγχο των γοναδοτροπινών FSH και LH. Για το λόγο αυτό ο φυσιολογικός αυτός μηχανισμός παραγωγής οιστραδιόλης ονομάζεται «υπόθεση δύο κυττάρων- δύο γοναδοτροπινών (two gonadotropin- two cell hypothesis) (Εικ. Α9). Οι υποδοχείς της LH και το ένζυμο CYP17, που μετατρέπει την προγνενολόνη και προγεστερόνη σε διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA, dehydroepiandrosterone) και ανδροστενεδιόνη αντίστοιχα, εκφράζονται αρχικά στα κύτταρα θήκης. Αντίθετα, οι υποδοχείς της FSH και η αρωματάση, που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα εκφράζονται κυρίως στα κοκκώδη κύτταρα (Jamnongjit et al, 2006).

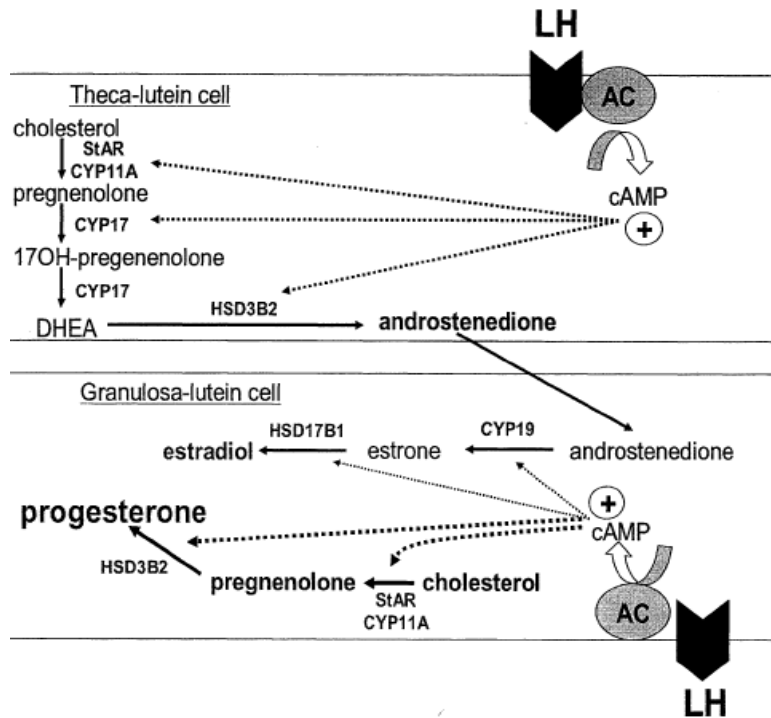
Εικ. Α9 Βιοσύνθεση στεροειδών στην ωοθήκη. Στα κύτταρα θήκης υπό την επίδραση της LH, η χοληστερόλη μετατρέπεται σε προγνενολόνη, που μεταβολίζεται μέχρι την παραγωγή του ανδρογόνου. Το μοντέλο των δύο κυττάρων –δύο γοναδοτροπινών συνεχίζει με την μεταφορά των ανδρογόνων στα κοκκώδη κύτταρα, όπου υπό την επίδραση της FSH αρωματίζονται σε οιστρογόνα. AC, adenylate cyclase; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; CYP11A, cholesterol side-chain cleavage; CYP17, 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase; HSD3B2, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II; HSD17B1, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I; CYP19, aromatase.



Τα κύτταρα θήκης παράγουν προγεστερόνη και ανδρογόνα από χοληστερόλη σε υψηλές τιμές, που λειτουργούν ως πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση οιστρογόνου στα κοκκώδη κύτταρα. Η ανδροστενεδιόνη και η τεστοστερόνη διαχέονται σε γειτονικά κοκκώδη κύτταρα, όπου μετατρέπονται σε οιστραδιόλη μέσω της δράσης της αρωματάσης (CYP19, συμβολίζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την αρωματάση) και της 17β-HSD (κυρίως οι τύποι 1 και 7), που ευνοεί τη μετατροπή της οιστρονής σε οιστραδιόλη (Luu-The, 2001; Mindnich et al., 2004). Στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο, κατά τη διάρκεια του οποίου το ωοθυλάκιο ωριμάζει, η σύνθεση του οιστρογόνου αυξάνει βαθμιαία εξαιτίας της υπερέκφρασης της αρωματάσης λόγω της δράσης της LH και της FSH.

Μετά την εκκριτική αιχμή της LH (LH surge), είναι γνωστό πως το ωοθυλάκιο περνά στην ωχρινική φάση και μετατρέπεται σε ωχρο σωματίο, το οποίο παράγει μεγάλα ποσά προγεστερόνης. Συγκεκριμένα, στο στάδιο αυτό παρατηρείται αυξημένη έκφραση των ενζύμων της στεροειδογένεσης, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης, που προέρχεται από τα ανδρογόνα, τα οποία παράγονται στα κύτταρα θήκης (Εικ. Α10). Μετά τη έκθεση στις γοναδοτροπίνες τα κοκκώδη κύτταρα ωχρινοποιούνται και είναι ικανά να συνθέτουν μεγάλα ποσά προγνεολόνης και προγεστερόνης από χοληστερόλη (Havelock et al, 2004; Wood et al, 2002). Η μείωση στη συνέχεια της συγκέντρωσης της LH και κατά συνέπεια της συγκέντρωσης της αρωματάσης έχει σα τελικό αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή οιστρογόνου (Fitzpatrick et al, 1997).

Εικ. Α10 Παραγωγή στεροειδών σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης.



A.5.2 Η ΣΧΕΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου εκκρίνουν διάφορους παράγοντες ανάπτυξης, οι οποίοι είτε ενισχύουν είτε εξασθενούν τη δράση των γοναδοτροπινών στην ωοθήκη μέσω ενός παρακρινούς/ ενδοκρινούς μηχανισμού (Canipari, 2000). Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν: την ορμόνη GnRH, τους παράγοντες IGF, τον παράγοντα ανάπτυξης της εκλυτικής ορμόνης (GRF, Growth hormone-realising factor), τον επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης (EGF, epidermal growth factor), ο ανασταλτικός παράγοντας των πόρων του Muller (MIS, Muller Inhibiting Substance) την ακτιβίνη, την ανασταλτίνη, τη φολλιστατίνη, και αρκετούς άλλους παράγοντες (Meunier et al, 1989; Nakamura et al, 1990; Schwall et al, 1990; Zolti et al, 1990; Bagnato et al, 1992; Clayton et al, 1992; Brannstrom et al, 1994, Singh et al, 1995; Gras et al, 1996; Jasper et al, 1996). Οι παράγοντες αυτοί συμμετέχουν ενεργά στην ωρίμανση του ωαρίου. Ιδιαίτερα ο EGF/TGF- α φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό των ωαρίων, που φτάνουν ως τη μετάφαση II (Gomez et al, 1993). Επίσης, η προγεστερόνη, που παράγεται στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο επηρεάζει την ποιότητα των ώριμων ωοκυττάρων κατά τη γονιμοποίηση (Lindheim et al, 1998; Fanchin et al, 1997; Urman et al, 1999).

Έχει ήδη αναφερθεί η δράση των GDF-9 και BMP-15, δύο παραγόντων ανάπτυξης, που εκφράζονται από το ωοκύτταρο και ότι η συμβολή τους στην ωοθυλακιογένεση είναι καθοριστική.

A.5.3. ΣΧΕΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΚΗΣ

Παρατηρείται επικοινωνία μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, που πραγματοποιείται με τη βοήθεια παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης, που παράγονται και από τους δύο τύπους κυττάρων.

Σε ωοθυλάκια πριν την εμφάνιση του άντρου, όπου τα κύτταρα θήκης αρχίζουν να διαφοροποιούνται, εκκρίνονται και παράγοντες, όπως οι TGF- β , που στέλνουν σήμα στα κοκκώδη πως τα κύτταρα θήκης είναι έτοιμα να ξεκινήσουν τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων. Στη συνέχεια, από τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνονται παράγοντες, όπως οι TGF- β και η ακτιβίνη, που παρεμποδίζουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης (Magoffin 2005). Αυτός ο παρακρινής μηχανισμός είναι απαραίτητος, διότι η υπερβολική συγκέντρωση ανδρογόνων σχετίζεται με την υπογονιμότητα και τη διακοπή της ανάπτυξης του ωοθυλάκιου. Για το λόγο αυτό τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο CYP19 της αρωματάσης, που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα.

Στο στάδιο του επικρατούντος ωοθυλάκιου τα κοκκώδη κύτταρα εκτός από την έκφραση του CYP19 αρχίζουν να εκκρίνουν αρκετά υψηλά ποσά παράγοντες πρόκλησης, όπως ο αυξητικός παράγοντας- τύπου ινσουλίνης I (IGF-I, Insulin-like Growth Factor I) και η ανασταλίνη B, και λιγότερο η ακτιβίνη και ο TGF- β (Magoffin 2005).

A.5.4 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

A.5.4.1 Κοκκώδη κύτταρα και οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα είναι ορμόνες της ωοθήκης, που παράγονται από τα αναπτυσσόμενα προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια. Η συγκέντρωσή του στον ορό αυξάνει κατά το μέσο της ωοθυλακικής φάσης και αποτελεί δείκτη του σχηματισμού του επικρατούντος ωοθυλάκιου. Τα οιστρογόνα, όπως αναφέρθηκε, συντίθενται από ανδρογόνα μέσω της δράσης της αρωματάσης στα κοκκώδη κύτταρα και εκκρίνονται στο ωοθυλακικό υγρό, όπου τα επίπεδά τους είναι περίπου 1000 φορές υψηλότερα συγκρινόμενα με εκείνα της κυκλοφορίας.

Η παραγωγή οιστρογόνου λοιπόν είναι το χαρακτηριστικό σημείο της προ-ωοθυλακιορρηκτικής φάσης και αντανακλά την έκφραση του CYP19 υπό τη διέγερση της FSH. Τα οιστρογόνα δρουν μέσω της σύνδεσής τους στους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β (ER α , β , estrogen receptor α , β). Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον ER β , ενώ ο ER α εκφράζεται σε άλλα σημεία. Ποντικοί knockout στο γονίδιο ER α είναι υπογόνιμοι. Αντίθετα, οι ποντικοί knockout στο γονίδιο ER β είναι γόνιμοι και παρουσιάζουν φυσιολογική φυλετική συμπεριφορά.

Παρόλα αυτά, τα νεογνά είναι λιγότερα και μικρότερα σε μέγεθος συγκρινόμενα με εκείνα του αγρίου τύπου (wild type).

Κατά το προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς της LH, που η λειτουργία τους συνδέεται με τη δραστηριότητα της αρωματάσης. Επομένως, τόσο η παραγωγή ανδρογόνων στα κύτταρα θήκης όσο και η μετατροπή τους σε οιστρογόνα στα κοκκώδη κύτταρα ρυθμίζονται άμεσα από την LH. Το οιστρογόνο, που παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα, θεωρείται ότι ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία των κυττάρων θήκης και πιθανόν να συμμετέχει στην καταστολή της σύνθεσης ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης κατά το μέσο του κύκλου (Leung, 1980; Erickson 1985).

A.5.4.2 Κοκκώδη κύτταρα και ανδρογόνα

Έχει αναφερθεί πως τα ανδρογόνα συντίθενται στα κύτταρα θήκης υπό την επίδραση της LH. Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχείς των ανδρογόνων (AR, androgen receptor) με την εμφάνιση του άντρου στο ωοθυλάκιο. Η κύρια δράση του AR στα κοκκώδη κύτταρα είναι η υπερέκφραση του cAMP. Κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου η μεταγραφή του γονιδίου AR και τα επίπεδα της πρωτεΐνης AR μειώνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων στις γοναδοτροπίνες και να καθυστερεί η ωχρινοποίησή τους.

A.5.4.3 Κοκκώδη κύτταρα και προγεστερόνη

Η προγεστερόνη παράγεται σε υψηλές τιμές σε διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα μέσω της πρόκλησης από την FSH του CYP11A, του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε προγνενολόνη. Οι υποδοχείς της προγεστερόνης (PR, progesterone receptors) δεν εμφανίζονται στα κοκκώδη κύτταρα μέχρι την έναρξη της δράσης των γοναδοτροπινών. Οι PR εκφράζονται προσωρινά πριν την ωοθυλακιορρηξία κι έπειτα στο ωχρό σωματίο.

A.6. ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΩΘΥΛΑΚΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ

A.6.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΓΑΛΩΝ ΩΘΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ

A.6.1.1 ADAM28 (A Disintegrin And Metalloprotease 28)

Η οικογένεια των ADAMs αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που έχουν τόσο ιδιότητα δισιντεγκρίνης όσο και μεταλλοπρωτεΐνάσης. Πάνω από 30 μέλη της οικογένειας ADAM έχουν ανιχνευτεί σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών αλλά και οργανισμών, από το *Schizosaccharomyces rombe* μέχρι τον άνθρωπο (Εικ. A11). Η ιδιότητα ως δισιντεγκρίνη των ADAMs έγκειται στην προσκόλληση των κυττάρων, όπως συμβαίνει στη σύντηξη του ωαρίου με το σπερματοζωάριο, καθώς και το σχηματισμό των μυοσωληναρίων. (Haidl et al, 2002). Πάνω από τα μισά μέλη αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών εκφράζονται στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών, όπως στους όρχεις και την επιδιδυμίδα (Oh et al, 2005). Η ιδιότητα της μεταλλοπρωτεάσης είναι κυρίως πρωτεολυτική και καταλυτικός μηχανισμός απαιτεί την παρουσία ενός μετάλλου. Οι περισσότερες μεταλλοπρωτεάσες χρησιμοποιούν ψευδάργυρο, ενώ κάποιες άλλες κοβάλτιο.

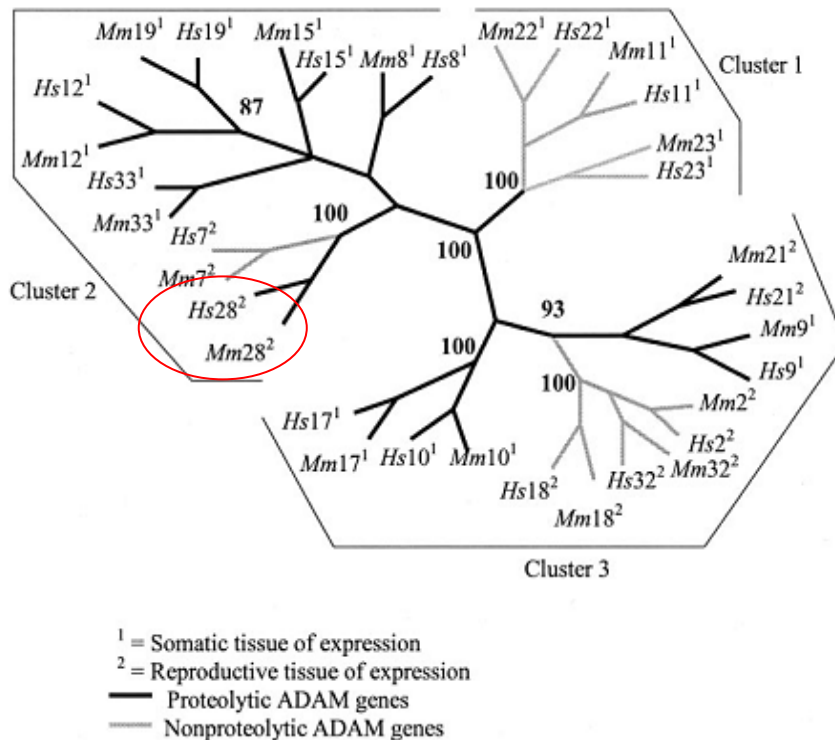
Έχουν αναφερθεί δύο υποομάδες μεταλλοπρωτεασών:

- Οι μεταλλοεξωπεπτιδάσες (metalloexopeptidases)
- Οι μεταλλοενδοπεπτιδάσες (metalloendopeptidases). Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες ADAM

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ADAM μοιράζονται πολλές συντηρημένες δομές κατά την εξέλιξη, όπως: μεταλλοπρωτεάση, δισιντεγκρίνη, τύπου επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGF-like, epidermal growth factor-like), περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και κυτταροπλασματικούς τόπους (Oh et al, 2005). Εμφανίζουν αλληλουχική ομολογία με πεπτιδία, που περιέχονται στο δηλητήριο των φιδιών (SVMPs, snake venom metalloproteases) (Howard et al, 2000), καθώς και με πρωτεΐνες, που περιέχουν μια ή περισσότερες περιοχές μεταλλοπρωτεάσης, δισιντεγκρίνης και εκείνες, που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ADAM παρουσιάζουν τουλάχιστον δύο λειτουργίες. Μια από αυτές είναι ότι λειτουργούν ως μόρια προσκόλλησης των κυττάρων (Oh et al, 2005). Επίσης, οι πρωτεΐνες ADAM, που περιέχουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία, που ενεργοποιεί την

περιοχή της μεταλλοπρωτεΐνάσης, έχει και δραστικότητα πρωτεΐνάσης. Η αλληλουχία, που απαιτείται για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης είναι η HEXGHXXGXCHD στην οποία οι ιστιδίνες συνδέονται με τον ψευδάργυρο, ενώ το γλουταμινικό οξύ αποτελεί την καταλυτική περιοχή.

Εικ. Α11 Φυλογενετική σχέση των μελών της οικογένειας ADAM. Hs=Human sapiens, Mm=Mus musculus, 1=έκφραση σε σωματικούς ιστούς, 2=έκφραση σε αναπαραγωγικούς ιστούς. Στον κύκλο απεικονίζεται το ADAM28 στον άνθρωπο και σε μύες.



Οι πρωτεΐνες ADAM, που παρουσιάζουν δραστικότητα προσκόλλησης των κυττάρων ή δραστικότητα πρωτεΐνάσης, βρέθηκε ότι συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες (Wolfsberg et al, 1995; Blobel CP, 1997; Black et al, 1998; Primakoff et al, 2000; Seals et al, 2003). Οι πρωτεΐνες ADAM, που έχουν μελετηθεί περισσότερο σχετικά με την αναπαραγωγή είναι οι ADAM1a (fertilin- α isoform a), ADAM2 (fertilin- β) και ADAM3 (cyritestin). Μελέτες με knockout ποντικούς αποκάλυψαν πως υπάρχει είτε άμεση είτε έμμεση σχέση των ADAMs με διάφορα στάδια κατά τη διάρκεια του φαινομένου της αναπαραγωγής. Το ετεροδιμερές ADAM1a/ADAM2 εμπλέκεται στη ρύθμιση ή στην εντόπιση ειδικές πρωτεΐνες του σπέρματος, όπως είναι η ADAM3, που συμμετέχει στην προώθηση του σπέρματος στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, τη διείσδυση του σπέρματος στο στρώμα των σωματικών κυττάρων του ωοθυλάκιου, καθώς και στη σύνδεση του

σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη του ωοθυλάκιου. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται πως τα μόρια αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αναπαραγωγής (Cho et al, 1998; Shamsadin et al, 1999).

Το γονίδιο ADAM28 αποτελεί σχετικά νέο μέλος της οικογένειας ADAM. Το πρωτεϊνικό προϊόν έχει πρωτεολυτικές ιδιότητες, ιδιότητες προσκόλλησης των κυττάρων, αλλά και αυτοκαταλυτική δραστικότητα (Primakoff et al, 2000; Blobel et al, 2005). Το γονίδιο ADAM28 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8p21.2 κι εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα, στα λεμφοκύτταρα και στα τύπου δενδριτικά κύτταρα (Evans JP, 2001). Το χαρακτηριστικό του ADAM28 είναι μια συντηρημένη περιοχή, που αποτελείται από διαφορετικά τμήματα με ξεχωριστή λειτουργία, όπως μια αμινοτελική αλληλουχία σηματοδότησης (N-terminal signal sequence), μια πρόδρομη περιοχή, μια περιοχή μεταλλοπρωτεάσης (MP) και μια περιοχή τύπου δισιντεγκρίνης, μια περιοχή τύπου επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης, μια διαμεμβρανική και μια κυτταροπλασματική περιοχή.

Το ADAM28 φαίνεται πως συμμετέχει σε μια σειρά σημαντικών βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, της διάχυσης των πρωτεϊνών, της νευρογένεσης, της ανάπτυξης των μυών (Howard et al, 2000), αλλά και την ανάπτυξη των δοντιών (Zhao et al, 2006; Zhao et al, 2009). Επίσης, έχει διαπιστωθεί υπερέκφραση του γονιδίου ADAM28 σε καρκινώματα του πνεύμονα (non-small cell lung carcinomas), καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Από τα παραπάνω προκύπτει πως το ADAM28 φαίνεται να εμπλέκεται στη συνεργασία των κυττάρων μεταξύ τους (cell- cell interactions), αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα και τα στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (cell- matrix interactions), αλλά και σε άλλες διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η κινητικότητα των κυττάρων (Ohtsuka et al, 2006; Mitsui et al, 2006). Πρόσφατα, βρέθηκε πως το ADAM28 είναι δυνατόν να προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω της σηματοδότησης από IGF, καθώς το σύστημα IGF, έχει ουσιαστικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την απόπτωση (Mochizuki et al, 2004). Με βάση τα παραπάνω το ADAM28 είναι πιθανό να έχει λειτουργικό ρόλο στην οργανογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Zhao et al, 2009).

A.6.1.2 SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1) ή οστεοποντίνη (OPN, osteopontin)

Η οστεοποντίνη είναι μια φωσφορυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη, που εκκρίνεται στους οστεοβλάστες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των οστών. Θεωρείται πως διευκολύνει τη σύνδεση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών στον εξωκυττάριο χώρο (extracellular matrix), επιτρέποντας τους να επιτελούν τη λειτουργία τους κατά

τη διάρκεια της οστεογένεσης (Beck et al, 2000). Το γονίδιο της αποτελείται από 7 εξόνια και τοποθετείται στο χρωμόσωμα 4 στο μακρύ άκρο. Το πρωτεϊνικό μόριο αποτελείται από ~300 αμινοξέα, από τα οποία περίπου το 30-36% είναι ασπαριγινικό ή γλουταμινικό όξύ.

Η SPP1 (Gene ID: 6696) συνδέεται με υποδοχείς ιντεγκρινών, όπως οι α4β1, α9β1 και α9β4, που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα. Αυτοί οι υποδοχείς συμμετέχουν σε διαδικασίες κυτταρικής προσκόλλησης, μετακίνησης, αλλά κι επιβίωσης αυτών των κυττάρων. Η SPP1 εκφράζεται επίσης σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά κύτταρα, καθώς και T και B κύτταρα. Η SPP1 φαίνεται να δρα ως ρυθμιστής των κυττάρων αυτών με διάφορους τρόπους (Wang et al, 2008). Αρχικά, παρουσιάζει χημειοτακτικές ιδιότητες, που επιτρέπουν στα κύτταρα να φτάσουν στις περιοχές φλεγμονής. Επίσης δρα ως πρωτεΐνη προσκόλλησης των κυττάρων, που σχετίζεται με τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους, αλλά και την επούλωση των πληγών. Επιπλέον, η SPP1 προωθεί την ενεργοποίηση των κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκίνης, καθώς προωθεί την επιβίωση των κυττάρων ρυθμίζοντας την απόπτωση (Wang et al, 2008). Η SPP1 αποτελεί έναν αντι- αποπτωτικό παράγοντα, που παρεμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο των μακροφάγων, των T κυττάρων, αλλά και των ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν εκτίθενται σε περιβάλλον επικίνδυνο για την επιβίωσή τους (Denhardt et al, 2001; Standal et al, 2004).

Η εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1, γνωστή και ως οστεοποντίνη (OPN, osteopontin) βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια πολλών επιθηλιακών κυττάρων (Siiteri et al, 1995; Cancel et al, 1999; Sodek et al, 2000) και θεωρείται πως συμμετέχει σε πολυάριθμες λειτουργίες, καθώς η υπερέκφρασή της σχετίζεται με διάφορες διεργασίες. Η οστεοποντίνη μπορεί να δράσει ως κυτταροκίνη, να δεσμεύσει ασβέστιο, οδηγώντας στην υπόθεση πως η SPP1 έχει φυσιολογικό ρόλο στην παρεμπόδιση του σχηματισμού κρυστάλλων των ούρων αλλά και σε άλλα βιολογικά υγρά. Επιπλέον, η οστεοποντίνη πιθανώς εκφράζεται σε ιστούς, όταν τα επίπεδα των φωσφορικών αλάτων αυξάνονται πάνω από τα φυσιολογικά όρια. Αυτή η αύξηση πιθανώς συμβαίνει, όταν η φυσιολογική ρύθμιση των φωσφορικών αλάτων διαταράσσεται. Αυτό μπορεί να συμβεί κατά την καταστροφή ιστού ή την καρδιακή, αγγειακή και νεφρική ανεπάρκεια.

Επίσης, η SPP1 κατευθύνει την παραγωγή της IL-17 (Steinman L, 2007) και υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών (Schorge et al, 2004), του πνεύμονα, του στομάχου, το μελάνωμα και το μεσοθηλιωμα .

Η SPP1 σχετίζεται ακόμη με την αναπαραγωγή, καθώς έχει παρατηρηθεί τόσο στο αντρικό όσο και στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Συγκεκριμένα η SPP1 εκφράζεται στους όρχεις και την επιδιδυμίδα και αποτρέπει την πρόωμη ενεργοποίηση της κινητικότητας του σπέρματος καθώς και την ικανότητα γονιμοποίησης μέσω της αλληλεπίδρασης με ιντεγκρίνες (Siiteri et al, 1995; Cancel et al, 1999; Luedtke et al, 2002). Η παρουσία του mRNA του SPP1 σε επιδιδυμίδα και όρχεις, φαίνεται να παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση στους όρχεις κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης ή/και στην ωρίμανση της επιδιδυμίδας (Siiteri et al, 1995). Η πρωτεΐνη SPP1 έχει προταθεί ως μοριακός δείκτης για την ανδρική υπογονιμότητα (Braundmeier and Miller D, 2001). Το γονίδιο SPP1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βελτίωσης της ποιότητας του σπέρματος (Lin et al, 2006).

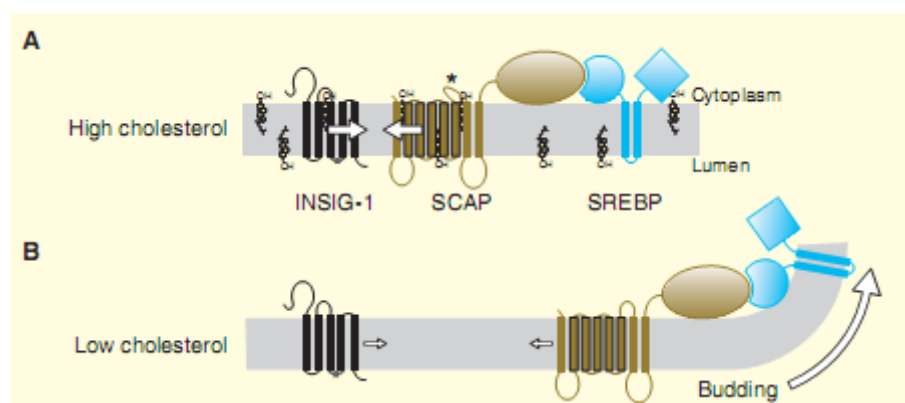
Στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα η πρωτεΐνη SPP1 εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στους αδένες της μήτρας (uterine glands) στην εξωτερική επιφάνεια του luminal epithelium και στην κυτταροτροφοβλάστη (Young et al, 1990; Omigbodun et al, 1997; Apparao et al, 2001). Πολύ ενδιαφέρουσα εμφανίζεται η πρόταση του Hao et al για τη λειτουργία του SPP1 σε έμβρυα χοίρων. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το SPP1 πιθανόν βελτιώνει την ανάπτυξη των εμβρύων, που προέρχονται από κύκλους IVF με το να μειώνει το ρυθμό της απόπτωσης των εμβρύων. Επίσης, η SPP1 αποτελεί το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, που υπερεκφράζεται στη μήτρα (Hao et al, 2008). Ακόμη, η SPP1 μάλλον συνδέεται μέσω ιντεγκρινών στους ιστούς με σκοπό την προώθηση της προσκόλλησης των κυττάρων, του πολλαπλασιασμού τους και της επικοινωνίας τους με το εξωτερικό περιβάλλον (Graessmann et al, 2007). Η SPP1 φαίνεται να συνδέεται στην επιφάνεια των υποδοχέων/ιντεγκρινών κι έπειτα να προκαλεί την κυτταρική διαφοροποίηση κι επιβίωση του εμβρύου. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η SPP1 φαίνεται να έχει αντι-αποπτωτικό ρόλο, όταν εκφράζεται στα κύτταρα, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει και την πορεία της ανάπτυξης των ωοθυλάκιων. Αυτό ενισχύεται με το γεγονός πως η SPP1 εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης μεγάλων ωοθυλάκιων με σχηματισμένο άντρο στα βοοειδή (Skinner et al, 2008).

A.6.1.3 INSIG1 (Insulin-induced gene 1)

Η ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης δεν έχει μόνο κλινικές εφαρμογές, αλλά έχει συμβάλει σημαντικά στην ανακάλυψη βασικών κυτταρικών διαδικασιών, που σχετίζονται με τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης (Loewen et al, 2002). Για τη χοληστερόλη τα SREs (sterol regulatory elements) αποτελούν στόχο μια οικογένειας τριών μεταγραφικών παραγόντων, των SREBPs (Sterol regulatory element binding proteins).

Το γονίδιο INSIG1, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q36, είχε αρχικά περιγραφεί ως ένα μετάγραφο, που επηρεάζεται από την ινσουλίνη κι ονομαζόταν CL-6 (Diamond et al, 1993). Αργότερα, επωνομάστηκε INSIG1, μετά την κλωνοποίηση και τον προσδιορισμό του στο χρωμόσωμα 7q36 (Peng et al, 1997). Το γονίδιο INSIG1 φαίνεται να συμμετέχει στο μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης (feedback regulation) της κυτταρικής χοληστερόλης (Yang et al, 2002; Radhakrishnan et al, 2007). Οι INSIG είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Sever et al, 2004). Οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBPs βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο κι ελέγχουν τη σύνθεση της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων. Όταν τα κυτταρικά επίπεδα της χοληστερόλης ελαττώνονται οι SREBPs δεσμεύουν SCAPs (SREBP cleavage- activating proteins), ώστε να μεταφερθούν στο σύστημα Golgi, όπου υφίστανται πρωτεόλυση (Brown et al, 1999). Τα τμήματα, που περιέχουν τα αμινοτελικά άκρα μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων, όπως το INSIG1 (Horton et al, 2003), που εμπλέκεται στη σύνθεση χοληστερόλης και λιπαρών οξέων. Όταν τα επίπεδα της χοληστερόλης στα κύτταρα είναι αυξημένα, η SCAP δεσμεύεται στο INSIG1, παρεμποδίζοντας έτσι η μεταφορά του συμπλόκου SCAP/ SREBP στο σύστημα Golgi και τελικά δε συντίθεται χοληστερόλη και λιπαρά οξέα (Horton et al, 2002; Goldstein et al, 2006) (Εικ. A12).

Εικ. A12 Το INSIG1 ρυθμίζει τη μεταφορά των SREBPs από το ενδοπλασματικό δίκτυο Golgi. Α. Παρουσία χοληστερόλης το INSIG1 αλληλεπιδρά με τη SCAP. Το σύμπλοκο INSIG1- SCAP-SREBP παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Β. Απουσία χοληστερόλης το INSIG1 εμφανίζει μειωμένη συγγένεια για το SCAP



Στα ωοθυλάκια η παραγωγή των στεροειδών πραγματοποιείται, όπως έχει αναφερθεί, με τη συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης, όπου η χοληστερόλη μεταβολίζεται σε ανδρογόνα αρχικά και στη συνέχεια σε οιστρογόνα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα ανδρογόνα ρυθμίζουν τη

σηματοδότηση SREBP μέσω της πρόκλησης αλλαγών στο πρότυπο έκφρασης του INSIG1 και του ομολόγου του INSIG2, τα οποία πιθανώς υπόκεινται στη ρύθμιση των ανδρογόνων (Heemers et al, 2008). Με την εφαρμογή μεθόδου προστασίας της ριβονουκλεάσης (Ribonuclease Protection Assay, RPA) σε RNA, που απομονώθηκε από κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του προστάτη LNCaP, φαίνεται πως τα ανδρογόνα επηρεάζουν διαφορετικά την έκφραση των INSIG1 και INSIG2. Ενώ τα ανδρογόνα αυξάνουν τα επίπεδα mRNA του INSIG1, τα επίπεδα mRNA του INSIG2 μειώνονται δραματικά παρουσία ανδρογόνων. Επίσης είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως ενίσχυση του γονιδίου SCAP σε συνδυασμό με την απουσία του INSIG1 έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση των ωοθηκών κινέζικων χάμστερ στις στερόλες (Lee et al, 2007).

Επιπλέον, τα δύο ομόλογα INSIG1 και INSIG2 ασκούν αναδραστική ρύθμιση στη σύνθεση της χοληστερόλης μέσω της σύνδεσής τους με το ένζυμο HMG CoA reductase, που αναστέλλει τη χοληστερογένεση (DeBose-Boyd, 2008). Υπερέκφραση του γονιδίου INSIG1 σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων τόσο στο ήπαρ όσο και στο πλάσμα διαβητικών αρουραίων (Zucker diabetic fatty rats) (Takaishi et al, 2004). Επιπλέον, σε INSIG1 ή INSIG2 knockout ποντικούς αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα τόσο της χοληστερόλης όσο και των τριγλυκεριδίων, γεγονός που γίνεται πιο δραματικό όταν οι ποντικοί είναι knockout και για τα δύο γονίδια INSIG (Engelking et al, 2005). Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι το γονίδιο INSIG1 συμμετέχει ενεργά στον έλεγχο και τη ρύθμιση της ομοιόστασης των λιπιδίων. Καθώς τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν θέσεις μεταβολισμού της χοληστερόλης και παραγωγής στεροειδών στη συνέχεια, η υπερέκφραση του INSIG1 σε αυτά μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση πως στα ωοθυλάκια με μεγαλύτερο μέγεθος πιθανόν να ευνοείται περισσότερο η στεροειδογένεση.

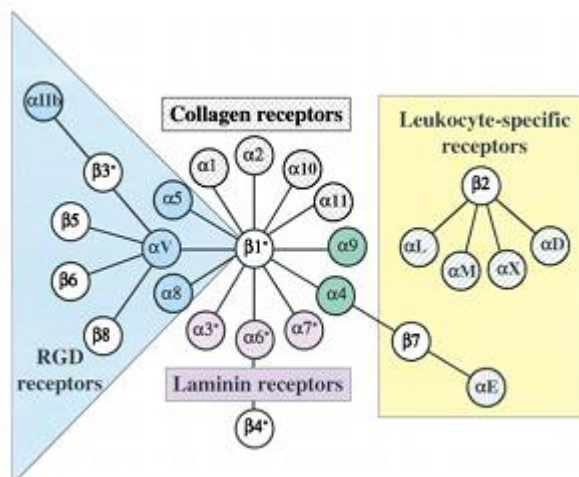
A.6.1.4 ITGAM (Integrin alpha M)

Το γονίδιο ITGAM κωδικοποιεί την αλυσίδα α M της ετεροδιμερούς ιντεγκρίνης-α- M- β-2 ($\alpha_M\beta_2$). Η πρωτεϊνική υπομονάδα ITGAM είναι γνωστή και ως Mac-1 (macrophage-1 antigen) ή CR3 (complement receptor 3) (Solovjon et al, 2005), καθώς και ως CR3A και CD11β (cluster of differentiation molecule 11 β) (Elghetany et al, 2004). Το γονίδιο της ITGAM βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16p11.2. Η δεύτερη αλυσίδα της $\alpha_M\beta_2$ είναι η ιντεγκρίνη- υπομονάδα β_2 , γνωστή και ως CD18 (Larson et al, 1990).

Η $\alpha_M\beta_2$ εκφράζεται στην επιφάνεια πολλών λευκοκυττάρων, που συμμετέχουν στη μη ειδική άμυνα (innate immune system), όπως τα μονοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK)

(Solonjon et al, 2005). Επίσης, συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονής, ρυθμίζοντας την προσκόλληση και τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων κι εμπλέκεται σε διάφορες ανοσολογικές διεργασίες, όπως η φαγοκυττάρωση, ο χημειοτακτισμός και κυτταρική ενεργοποίηση (Solonjon et al, 2005). Η υπομονάδα α (ITGAM) της $\alpha_M\beta_2$ σχετίζεται άμεσα με την προσκόλληση και την εξάπλωση των κυττάρων, αλλά δε μπορεί να πάρει μέρος στην κυτταρική μετανάστευση χωρίς τη συμμετοχή της υπομονάδας β_2 (CD18). Οι δύο υπομονάδες της ιντεγκρίνης CD11b/CD18 συνεργάζονται και φαίνεται πως έχουν σπουδαίο ρόλο στη δέσμευση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και στη σύντηξή τους. Συγκεκριμένα, η ιντεγκρίνη του ωαρίου CD11b/CD18 και το μόριο CD46 του σπερματοζωαρίου αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια, που διευκολύνουν την ακροσωμική αντίδραση και κατά συνέπεια τη σύντηξη του ωαρίου με το σπερματοζωάριο (Fabryova et al, 2009).

Εικ. Α13 Η οικογένεια των υποδοχέων ιντεγκρίνης. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες με δύο υπομονάδες α και β . Στην εικόνα απεικονίζονται οι υπομονάδες, που υπάρχουν στα θηλαστικά και οι σχέσεις μεταξύ των υπομονάδων α και β . Έχουν παρατηρηθεί 8 β υπομονάδες, που σχετίζονται με 18 α υπομονάδες και σχηματίζουν 24 διαφορετικές ιντεγκρίνες.



A.6.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΓΑΛΩΝ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΡΡΗΘΙΑΣ

A.6.2.1 SLC27A6 (Solute Carrier family member 6)

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας μεταφοράς των λιπαρών οξέων, την πρωτεΐνη FATP6 (Fatty Acid Transporter, member 6). Οι FATPs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που οδηγούν στην αύξηση της πρόσληψης των λιπαρών οξέων μακρίων αλυσίδων (Long Chain Fatty Acids, LCFA) στα κύτταρα.

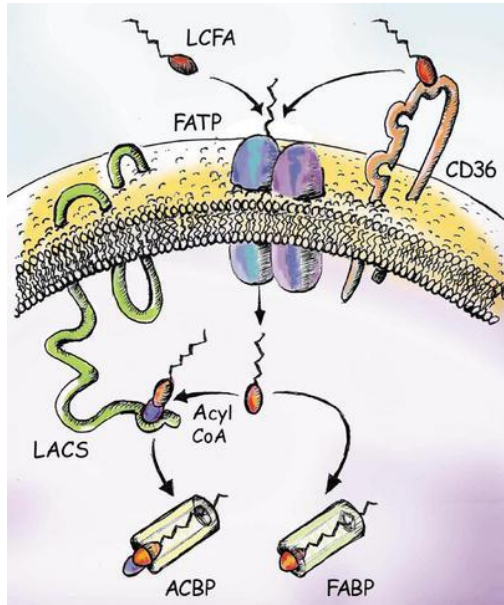
Στον άνθρωπο, οι FATPs ανήκουν σε μια οικογένεια έξι ομόλογων πρωτεϊνών, τις hsFATP1-6, οι οποίες έχουν βρεθεί σε όλους τους ιστούς, που χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα (Stahl, 2003).

Οι FATPs έχουν ένα εξωκυτταρικό ανινοτελικό άκρο, ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο εμφανίζεται στο εσωτερικό των κυττάρων (Stahl et al, 2003; Pohl et al, 2004; Doege et al 2006; Milger et al, 2006). Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών περιέχουν ένα τμήμα, που βρίσκεται σε όλα τα ένζυμα που εξαρτώνται από το ATP. Τα ένζυμα αυτά σχηματίζουν αδενυλιωμένα ενδιάμεσα, τα οποία σχετίζονται άμεσα με τη δραστηριότητά τους (Stahl et al, 2003; Pohl et al, 2004; Doege et al 2006).

Οι FATPs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, όπου παρατηρείται υψηλή πρόσληψη λιπαρών οξέων και μεταβολισμός των λιπιδίων με κάθε μέλος της οικογένειας να εκφράζεται σε διαφορετικό ιστό (Πίνακας A1). Τα επίπεδα του mRNA ή/και των πρωτεϊνών FATP ρυθμίζονται από ορμόνες (π.χ. η ινσουλίνη), παράγοντες φλεγμονής, όπως η ενδοτοξίνη, ο TNF α , και IL-1, και από ενεργοποιητές, όπως ο υποδοχέας PPAR (peroxisome proliferators activated receptor) α ή γ (Stahl et al, 2003; Pohl et al, 2004; Doege et al 2006; Schaiff et al, 2005)

Η πρωτεΐνη FATP6 εκφράζεται κυρίως στην καρδιά κι συγκεκριμένα στο σαρκοίλημα, όπου περιορίζεται σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης, που γειτνιάζουν με μικρά αγγεία (Gimelo et al, 2003). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η πρωτεΐνη FATP6 εκφράζεται στα θυλάκια του τριχωτού της κεφαλής (Schmuth et al, 2005). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας FATP, η FATP6 είναι υπεύθυνη για την αυξημένη πρόσληψη των LCFA (Εικ. A14) καθώς και για την αυξημένη δραστηριότητα της άκυλο-CoA συνθετάσης (acyl-CoA synthetase), όταν υπερεκφράζεται στα κύτταρα (Doege et al 2006). Η λειτουργία της FATP6 δεν είναι ιδιαίτερα γνωστή (Gimeno et al, 2007).

Εικ. A14 Μοντέλο πρόσληψης λιπαρών οξέων από τα κύτταρα. Εξωκυτταρικά LCFAs δεσμεύονται στα σύμπλοκα FATP κι έπειτα μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Εναλλακτικά, τα LCFAs μπορούν να δεσμεύονται αρχικά στο CD36, μια πρωτεΐνη που διευκολύνει την πρόσδεση των LCFAs στις FATPs. Στο εσωτερικό των κυττάρων δεσμεύονται στο συνένζυμο A (CoA) μέσω της LACS (Long Chain Fatty-Acyl-CoA Synthetase), εμποδίζοντας την εκροή τους, ενώ οι πρωτεΐνες δέσμευσης λιπαρών οξέων (FABPs) δρουν ως ενδοκυτταρικό μέσο των λιπαρών οξέων.



Πίνακας. A1 SLC27A6 πρωτεΐνες μεταφοράς λιπαρών οξέων (FATPs)

Human gene name	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/coupling ions	Tissue distribution and cellular/subcellular expression	Link to disease	Human gene locus	Sequence accession ID	Splice variants and their specific features
SLC27A1	FATP1		Long-chain fatty acids	Unknown	Adipose tissue, muscle, brain, heart	Unknown	19p13.1		Unknown
SLC27A2	FATP2	VLACS	Long-chain fatty acids	Unknown	Kidney cortex, liver	Unknown	15q21.2	NM_003041	Unknown
SLC27A3	FATP3		Long-chain fatty acids	Unknown	Lung, multiple organs	Unknown	1q21.1	NM_024330	Unknown
SLC27A4	FATP4		Long-chain fatty acids	Unknown	Intestine, brain, adipose tissue, muscle	Unknown	9q34	NM_005094	Unknown
SLC27A5	FATP5	VLCS-H2	Long-chain fatty acids	Unknown	Liver	Unknown	19q13.4	NM_012254	Unknown
SLC27A6	FATP6	VLCS-H1	Long-chain fatty acids	Unknown	Heart	Unknown	5q23		Unknown

A.6.2.2 NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1)

Το μόριο προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων (neural cell adhesion molecule, NCAM) παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διαδικασίες, που συμβαίνουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, η πλαστικότητα των συνάψεων (synaptic plasticity) και η ανάπτυξη της μνήμης. Το μόριο αυτό ανήκει σε μια υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών και στα θηλαστικά εκφράζεται σε τρεις κύριες ισομορφές, το όνομα των οποίων σχετίζεται άμεσα με το μοριακό τους μέγεθος (NCAM-120, NCAM-140, NCAM-180 (Soroka et al, 2008; Povlsen et Dittlensen 2008) Αυτές οι ισομορφές προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου.

Τα NCAMs βρέθηκαν αρχικά στο νευρικό σύστημα, αλλά έπειτα και σε ενδοκρινή κύτταρα, που παράγουν ορμόνες και στεροειδή. Έχει επίσης βρεθεί το NCAM-140 και το NCAM mRNA στην ωοθήκη αρουραίων, ενώ παράλληλα το NCAM φαίνεται να εκφράζεται σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, καθώς και ωχρινοποιημένα κύτταρα *in vitro* (Mayerhofer et al, 1994). Έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη διαφορά στο βαθμό ανοσοδραστικότητας του NCAM. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα, που περιβάλλουν το ωοθυλακικό υγρό εμφανίζουν περισσότερη δραστικότητα σε σχέση με τα τοιχικά κοκκώδη κύτταρα. Επίσης, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε καλλιέργεια, τα κύτταρα χάνουν το NCAM όσο διαρκεί η διαδικασία της προσκόλλησης και της εξάπλωσής τους. Εντούτοις, τα κύτταρα εκφράζουν NCAM ξανά, όταν αποκολλώνται από το μονό στρώμα. Αυτό που μπορεί κάποιος να παρατηρήσει είναι το διαφορετικό εναλλακτικό μάτισμα. Οι NCAMs ανήκουν σε μια οικογένεια ανοσοσφαιρινών, και βρίσκονται ως πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που συμμετέχουν ενεργά στην προσκόλληση των κυττάρων. Το μόριο NCAM1 είναι ευρέως γνωστό ως ευαίσθητος διαγνωστικός δείκτης νευροενδοκρινικών όγκων και μικρών καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα.

A.6.2.3 SOX4 [SRY (Sex determining region Y) - box 4]

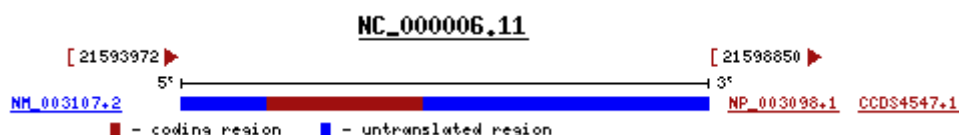
Τα γονίδια SOX ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, που στον άνθρωπο παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυονική ανάπτυξη (Maschhoff et al 2003). Συμμετέχουν επίσης και σε άλλες διαδικασίες, όπως ο καθορισμός του φύλου, η ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, του κρυσταλλοειδούς χιτώνα του οφθαλμού, η καρδιακή ανάπτυξη, η χονδρογένεση αλλά και η αιματοποίηση (Wegner et al 1999). Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός πως μεταλλάξεις στα γονίδια SOX είναι υπεύθυνες για πολλές διαταραχές στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του γονιδίου SRY και SOX9 οδηγούν σε φυλετική αντιστροφή (sex reversal) και γοναδική δυσγενεσία (gonadal

dysgenesis)(Berta et al, 1990). Μεταλλάξεις του SOX9 ευθύνονται για την καμππομελική δυσπλασία, που χαρακτηρίζεται από βράχυνση και κάμψη των μακρών οστών (Wagner et al, 1994), ενώ μεταλλάξεις του SOX10 σχετίζονται με το σύνδρομο Waardenburg- Hirschsprung (Pingault et al, 1998). Επιπλέον, το SOX3 φαίνεται να σχετίζεται με σύνδρομα, που προκαλούν διανοητική καθυστέρηση και σχετίζονται με το χρωμόσωμα X.

Όλες οι πρωτεΐνες SOX εμφανίζουν ομολογία με περιοχές δέσμευσης DNA, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία των μη ιστονικών πρωτεϊνών HMG (High- Mobility Group) των χρωμοσωμάτων (Wegner et al 1999). Δύο ομάδες των πρωτεϊνών HMG έχουν περιγραφεί λεπτομερώς. Η πρώτη περιλαμβάνει πρωτεΐνες, που δεσμεύουν DNA ανεξάρτητα της αλληλουχίας, όπως η πρωτεΐνη HMG-1, ο παράγοντας δέσμευσης UBG (ubiquitous binding factor) και ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας MT-TF1 (mitochondrial transcription factor 1). Η δεύτερη ομάδα δεσμεύει DNA και εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία. Μέλη αυτής της κατηγορίας ο παράγοντας των T- κυττάρων, TCF-1 (T Cell Factor-1), Στον άνθρωπο η οικογένεια των SOX αποτελείται από είκοσι μεταγραφικούς παράγοντες και υποδιαιρείται στις ομάδες A-H.

Η SOX4 είναι μια πρωτεΐνη 47 kDa, που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το οποίο περιέχει μόνο ένα εξόνιο και είναι συντηρημένο σε μεγάλο βαθμό στα σπονδυλωτά (Εικ. A15).

Εικ. A15 Γονίδιο SOX4 (GeneID: 6659, Entrez Gene, NCBI)



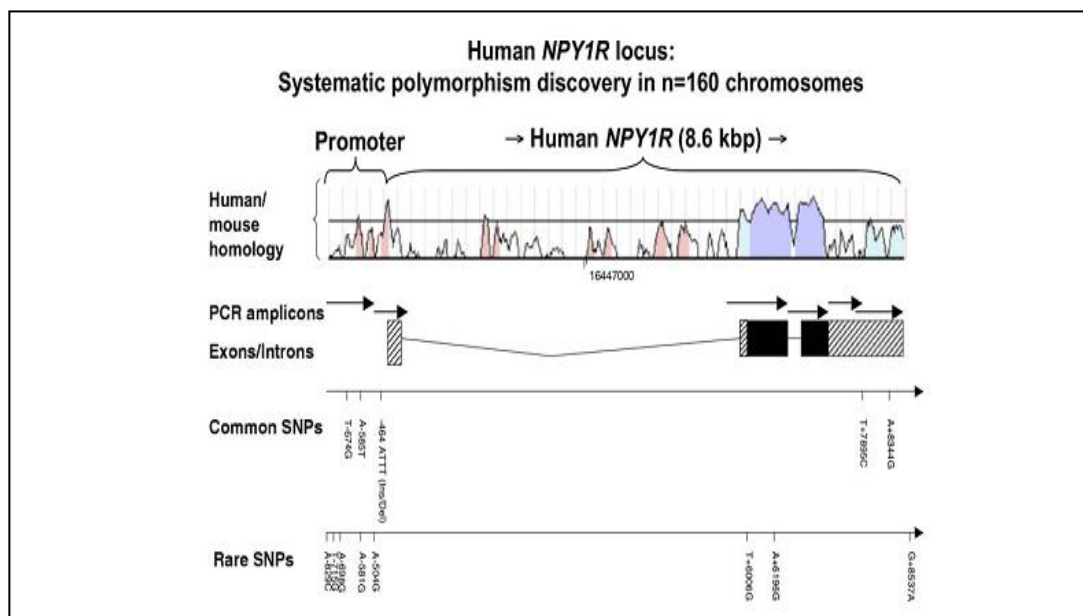
Στην πραγματικότητα, παρουσιάζεται ομολογία 88% μεταξύ του *Homo Sapiens* και *Fugu rubripes* στο αμινοτελικό άκρο του παράγοντα SOX4-T-cell factor (TCF) (Liu et al, 2006). Σε ενήλικους ποντικούς το γονίδιο SOX4 εκφράζεται στην ωοθήκη, τους όρχεις, το θύμο αδέν, καθώς και σε κυτταρικές σειρές ποντικών από T και B λεμφοκύτταρα (van de Wetering M et al, 1993). Έχει βρεθεί πως η ικανότητα των πρώιμων B-λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται, μειώνεται αισθητά σε ποντικούς που είναι knockout για το γονίδιο SOX4 (Schilham et al, 1996). Επίσης, εκφράζεται στη μήτρα και το μαστό και η λειτουργία του ελέγχεται ορμονολογικά από την προγεστερόνη και την οιστραδιόλη (Hunt et al, 1999).

Στον άνθρωπο το γονίδιο SOX4 εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και η έκφρασή του αυξάνεται μέσω των προγεστινών οδηγώντας σε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του SOX4 (Graham et al, 1999). Επιπλέον, το γονίδιο αυτό υπερεκφράζεται σε μυελοβλαστώματα (Lee et al, 2002) και σε καρκινικά κύτταρα το πνεύμονα (Friedman et al, 2004). Το γονίδιο SOX4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου, καθώς μετά από αναλύσεις με μικροσυστοιχίες βρέθηκε να υπερεκφράζεται και σε καρκινικούς ιστούς του προστάτη συγκρινόμενα με δείγματα από καλοήθειες στον προστάτη (Dhanasekaran et al, 2001; Rhodes et al, 2002; Ernst et al, 2002; Lapointe et al, 2004; Luo et al 2001; Magee et al, 2001; Welsh et al, 2001).

A.6.2.4 NPY1R (Neuropeptide Y Receptor Y1)

Το NPY (Neuropeptide Y) απαντάται σε μεγάλη αφθονία στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών και παίρνει μέρος σε σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες τόσο του κεντρικού όσο και του περιφερικού νευρικού συστήματος, όπως η καρδιοαγγειακή ομοιόσταση (az-Cabiale et al, 2006), η έκκριση ορμονών (Deltondo et al, 2008), η αρτηριακή πίεση (Michalkiewicz et al, 2005), η πρόσληψη τροφής (Beck B et al, 2008) η απόκριση κάτω από συνθήκες πίεσης και η διαχείριση των συναισθημάτων (Zhou et al, 2008). Η οικογένεια των υποδοχέων του NPY έχει πολλά μέλη. Σε αντίθεση με τις ισομορφές Y_2 , Y_4 , Y_5 και Y_6 ο υποδοχέας Y_1 (NPY1R) παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τη σύνδεσή του με το NPY (Wang et al, 2009). Το γονίδιο, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα NPY1R βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4q31.3-q32 (Eva et al, 2006). Στον άνθρωπο πολυμορφισμοί του γονιδίου NPY1R έχουν συσχετιστεί με τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (Εικ. A16)

Εικ. A16 Οι πολυμορφισμοί του NPY1R με τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (Wang et al, J Am CollCardiol 2009;54:944–54).



Ο υποδοχέας NPY1R ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων, που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptor superfamily). Η σύνδεσή του με το NPY οδηγεί στη μεταγωγή του σήματος σε ένα ενδοκυτταρικό σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο δεσμεύει GTP (Herzog et al, 1992). Στη συνέχεια αυτό το σύμπλοκο των G πρωτεϊνών δρα, ενεργοποιώντας συστήματα δεύτερων μηνυμάτων, όπως η μείωση του κυκλικού AMP και η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Strosberg, 1991).

Η πρωτεΐνη, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα NPY1R, αποτελείται από 384 αμινοξέα. Ο NPY1R είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων NPY, που έχει κλωνοποιηθεί. Εμφανίζει τρεις θέσεις γλυκοσυλίωσης στο αμινοτελικό άκρο, που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην έκφραση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς δεν παρατηρείται έκφραση, όταν απουσιάζουν αυτές οι τρεις θέσεις γλυκοσυλίωσης (Robin-Jagerschmidt et al, 1998). Εκφράζεται κυρίως στον υποθάλαμο, στο λιπώδη ιστό και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Οι υποδοχείς τύπου Y₁ επηρεάζουν λειτουργίες, όπως η πρόσληψη τροφής και η αγγειοσυστολή (Lindner et al, 2008).

Σε πολλά είδη, όπως και στον άνθρωπο, η μη σωστή ισορρόπηση της πρόσληψης ενέργειας (negative energy balance) μπορεί να οδηγήσει σε κατάσταση υπογοναδοτροφισμού, μέσω ενός μηχανισμού, που καταστέλλει την παλμική απελευθέρωση της GnRH (Acosta-Martinez et al, 2006). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως το NPY (κύριος ρυθμιστής της συμπεριφοράς για την πρόσληψη τροφής) (Blomqvist et al, 1997) ενεργοποιείται από σήματα, τα οποία προειδοποιούν για μειωμένη διαθεσιμότητα καυσίμων (για παράδειγμα μειωμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, λιπαρών οξέων, λεπτίνης και ινσουλίνης), η οποία έχει τελικά ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση NPY στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (paraventricular nucleus, PVN) και την απελευθέρωση του NPY με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η απελευθέρωση της GnRH. Επίσης μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν πως το NPY δρα μέσω του υποδοχέα του NPY1R για να αυξήσει την απελευθέρωση της LH. Η έκφραση του υποδοχέα εξαρτάται αρκετά και από τις τιμές των στεροειδών ορμονών στην κυκλοφορία και συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA του NPY1R στον υποθάλαμο αυξάνονται παρουσία υψηλών τιμών οιστραδιόλης. Από την άλλη φαίνεται πως σε θηλαστικά η έκφραση του υποδοχέα δεν επηρεάζει την έκκριση της LH, που διεγείρεται από την GnRH.

A.6.2.5 MLLT10/AF10 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia (trithorax homolog, *Drosophila*); translocated to, 10)

Το γονίδιο MLLT10 ή αλλιώς γνωστό και με την ονομασία AF10 βρίσκεται στο χρωμόσωμα [10p12.31](#) είναι ένα από τα λίγα partner γονίδια του MLL, το οποίο αναδιατάσσεται με ένα τρίτο γονίδιο στην περίπτωση λευχαιμίας. Το MLLT10 κωδικοποιεί πρωτεΐνη, που αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα, καθώς φαίνεται πως παίζει ρόλο στη μεταγραφική αποσιώπηση (heterochromatin-mediated transcriptional silencing). Η πρωτεΐνη MLLT10 έχει ένα αμινοτελικό άκρο, που είναι πλούσιο σε κυστεΐνη, έχει μια περιοχή που λειτουργεί με το μοντέλο του φερμουάρ της λευκίνης (leucine zipper), ένας μεταγραφικός μηχανισμός κι ένα καρβοξυτελικό άκρο, πλούσιο σε γλουταμίνη. Οι αναδιατάξεις (rearrangements) στο γονίδιο MLL (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q23) συμβαίνουν περίπου στο 5-10% της οξείας λεμφοειδούς και μυελώδους λευχαιμίας και δε μπορούν να διαγνωστούν εύκολα τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες.

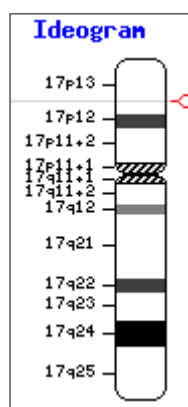
Το γονίδιο MLLT10 δεν έχει συσχετιστεί μέχρι σήμερα στη διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης, τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτήν. Έχει βρεθεί όμως πως εκφράζεται σε όρχεις ποντικών και βρίσκεται στον πυρήνα αλλά και το κυτταρόπλασμα (Cai Y et al, 2002).

A.7 ΦΥΛΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΦΑΙΡΙΝΗ (SHBG)

Η φυλοδεσμευτική σφαιρίνη είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ και αποτελεί την κύρια φυλοδεσμευτική σφαιρίνη στο ανθρώπινο πλάσμα. Ο ρόλος της SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) είναι καθοριστικός μιας και συνδέει τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα και ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητά τους στους ιστούς-στόχους. Συγκεκριμένα, η SHBG δεσμεύει πάνω από το 98% των στεροειδών ορμονών στο αίμα, συμπεριλαμβανομένου της 5α-διυδροτεστοστερόνης (DHT), της τεστοστερόνης και της ανδροστεναδιόλης με μεγάλη συγγένεια και οιστραδιόλη και οιστρόνη με μικρότερη συγγένεια.

Οι συγκεντρώσεις των ανδρογόνων και των οιστρογόνων επηρεάζουν τη σύνθεση της SHBG. Υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης, για παράδειγμα, οδηγούν σε μείωση της παραγωγής SHBG, ενώ υψηλά επίπεδα οιστρογόνων προωθούν την παραγωγή της πρωτεΐνης.

Τα αρσενικά και θηλυκά παιδιά έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις SHBG έως την αρχή της εφηβείας, αλλά αργότερα τα επίπεδα της SHBG αρχίζουν να μειώνονται με ταχύτερο ρυθμό στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά άτομα. Τα επίπεδα της SHBG είναι υψηλότερα στις γυναίκες από ότι στους άντρες εξαιτίας του υψηλότερου λόγου οιστρογόνων/ ανδρογόνων, που παρατηρείται στις γυναίκες. Επίσης ιδιαίτερα υψηλά εμφανίζονται τα επίπεδα της SHBG κατά τη διάρκεια των τελευταίων εβδομάδων της κύησης, καθώς και σε γυναίκες, που λαμβάνουν αντισυλληπτικά χάπια.



Το γονίδιο της SHBG είναι ένα αυτοσωμικό γονίδιο 4kb, που αποτελείται από 8 εξόνια, τα οποία διακόπτονται από 7 μικρά ιντρόνια, και βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p13-p12).

Επιπλέον το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί και την ανδρογονοδεσμευτική πρωτεΐνη (ABP), που παράγεται στους όρχεις.

Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης αποτελείται από 373 αμινοξέα και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε μονομερές περιλαμβάνει μια θέση Ο-γλυκοσυλίωσης στη θρεονίνη 7 και δύο θέσεις Ν-γλυκοσυλίωσης στις περιοχές στις θέσεις Asn-351 και Asn-

367(Cousin et al, 1998).

Τα επίπεδα της SHBG είναι χαμηλά σε άτομα που κινδυνεύουν να εμφανίσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακή νόσο, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), ιδιοπαθή υπερτρίχωση, οστεοπόρωση και καρκίνο του μαστού. Γυναίκες στην περίοδο της εμμηνόπαυσης, που εμφανίζουν καρκίνο του μαστού είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και χαμηλότερα επίπεδα SHBG σε σχέση με εμμηνόπαυσιακές γυναίκες, που παραμένουν υγιείς.

Γυναίκες, που εκτίθενται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε φυλετικές ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα, είναι περισσότερο πιθανό να εμφανίσουν καρκίνο του μαστού. Όταν τα επίπεδα της SHBG, που δεσμεύει οιστραδιόλη και περιορίζει τη βιολογική της δραστηριότητα, είναι υψηλά, μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου του μαστού (Forsti et al, 2002).

Στις γυναίκες οι συγκεντρώσεις της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας των κατασταλτικών και μη κατασταλτικών παραγόντων. Τα οιστρογόνα είναι οι ορμόνες, που διεγείρουν την παραγωγή SHBG, ενώ τα ανδρογόνα, η ινσουλίνη, τα υψηλά επίπεδα σωματικού λίπους, και ο παράγοντας κατανομής σωματικού λίπους δρουν ανασταλτικά.

Η εμμηνόπαυση χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις των φυλετικών στεροειδών στο αίμα, κυρίως από την αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων της οιστραδιόλης. Μελέτη, που έγινε σε προεμμηνοπαυσιακές και εμμηνοπαυσιακές γυναίκες χωρίς διαβήτη, δυσλειτουργίες του θυρεοειδή ή σχετικές καρδιαγγειακές, νεφρικές και ηπατικές δυσλειτουργίες έδειξε πως οι εμμηνοπαυσιακές γυναίκες εμφάνισαν σημαντική μείωση των επιπέδων οιστραδιόλης και τεστοστερόνης. Δεν υπήρχε όμως σημαντική διαφορά στα επίπεδα της SHBG στον ορρό ανάμεσα στις δύο κατηγορίες των γυναικών, που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης. Επίσης, οι τιμές της SHBG σχετίζονται θετικά με τις συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και αρνητικά με τις συγκεντρώσεις ινσουλίνης, και τεστοστερόνης. Τέλος, τα επίπεδα της SHBG μειώνονται με την αύξηση του λόγου περιφέρειας/ισχίων (WHR) κυρίως στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι παράγοντες, που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της SHBG στο αίμα είναι πιθανόν να αλλάζουν, όταν οι γυναίκες περνούν στην περίοδο της εμμηνόπαυσης. Από τα παραπάνω φαίνεται η σπουδαιότητα της οιστραδιόλης ως ρυθμιστή της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης.

Η SHBG τυπικά θεωρείται μια φυλοδεσμευτική πρωτεΐνη του πλάσματος ηπατικής προέλευσης, αλλά πρόσφατα αποδείχτηκε ότι μπορεί να επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες σε πολλούς ιστούς, που αποκρίνονται σε στεροειδή. Χαρακτηριστικά mRNA, που κωδικοποιεί την SHBG εκφράζεται στην ωοθήκη και σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, που προέρχονται από δείγματα γυναικών, που υποβλήθηκαν σε κύκλους IVF. Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν την πρώτη ένδειξη για ύπαρξη τόσο του SHBG mRNA όσο και της SHBG πρωτεΐνης στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου και αποδεικνύουν την έκφραση της πρωτεΐνης σε αυτά τα κύτταρα. Επίσης, αποκαλύπτουν το ρόλο της SHBG στην τοπική ρύθμιση της λειτουργίας της ωοθήκης.

Τα επίπεδα της SHBG ποικίλλουν ανάμεσα στα άτομα και εξαρτώνται τόσο από ορμονικούς, μεταβολικούς αλλά και γενετικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, ένας

πεντανουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (TAAAA)_n (οι επαναλήψεις του ποικίλουν από 6-11) στο 5' άκρο του υποδοχέα της SHBG φαίνεται να επηρεάζουν την μεταγραφική του δραστηριότητα *in vitro*. Οι Xita et al, 2003 και οι Cousin et al, 2004 έδειξαν πως γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS, polycystic ovary syndrome) φέρουν αλληλόμορφα με περισσότερες επαναλήψεις του πολυμορφισμού TAAAA σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα και πως τα αλληλόμορφα αυτά σχετίζονται με χαμηλά ποσοστά της SHBG στον ορό. Επίσης, ο ίδιος πολυμορφισμός φαίνεται να σχετίζεται με την ηλικία της εμμηναρχής, που εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των φυλετικών στεροειδών, που συνδέονται στην SHBG και μεταφέρονται στους ιστούς στόχους. Έτσι, γονότυποι με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων φαίνεται να σχετίζονται με καθυστερημένη εμμηναρχή ($13,24 \pm 1,15$ έτη), σε αντίθεση με γονότυπους με μικρότερο αριθμό επαναλήψεων ($12,67 \pm 1,15$ έτη, $P= 0,018$).

A.8 ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ (FOLLICULAR FLUID, FF)

Το ωοθυλακικό υγρό (FF) εξασφαλίζει ένα πολύ σημαντικό μικροπεριβάλλον για τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. Η κοιλότητα, που το περιέχει, το άντρο, γεμίζει από συστατικά, που μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας, αλλά και από προϊόντα του μεταβολισμού των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης (Fortune, 1994). Επομένως κάποια βιοχημικά χαρακτηριστικά του FF πιθανόν να καθορίζουν την ποιότητα του ωοκυττάρου, καθώς και την ικανότητα του τελευταίου να γονιμοποιηθεί με επιτυχία και να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός υγιούς εμβρύου (Revelli et al, 2009). Επίσης, η ανάλυση των συστατικών του FF ίσως παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολικές αλλαγές στον ορό του αίματος, καθώς τα βιοχημικά συστατικά, που κυκλοφορούν στο αίμα, πιθανώς να αντανακλούνται στη σύνθεση του FF (Leroy et al, 2004).

Το FF είναι εύκολα διαθέσιμο, καθώς αναρροφάται μαζί με το ωοκύτταρο τη στιγμή της ωοληψίας. Για τη μελέτη όμως της σύστασής του και τη συσχέτισή του με την ποιότητα του ωοκυττάρου, είναι προτιμότερο η απομάκρυνση κάθε ωοθυλάκιου να γίνεται ξεχωριστά για το καθένα από αυτά. Κάτι τέτοιο όμως είναι δύσκολο τόσο για την ασθενή όσο και για τον κλινικό, αφού απαιτούνται περισσότερες λήψεις, που μπορεί να οδηγήσουν σε αιμορραγία.

Τα συστατικά, που περιέχονται στο ωοθυλακικό υγρό μπορούν να ομαδοποιηθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπως: ορμόνες (γοναδοτροπίνες, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, τεστοστερόνη), αυξητικοί παράγοντες, αντι-αποπτωτικοί παράγοντες, πρωτεΐνες, διάφορα πεπτίδια και άλλα (Revelli et al, 2009). Από τις ορμόνες κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι γοναδοτροπίνες, των οποίων η ενδο-ωοθυλακική συγκέντρωση επηρεάζεται από τα επίπεδα στην κυκλοφορία. Σε κύκλους IVF τα επίπεδά τους στον ορό καθορίζονται από το ποσό των εξωγενώς χορηγούμενων γοναδοτροπινών και από το βαθμό της καταστολής της υπόφυσης (δηλαδή της μειωμένης έκκρισής τους ενδογενώς).

Υψηλές συγκεντρώσεις της FSH, hCG και LH στο FF φαίνεται πως σχετίζονται τόσο με την ωρίμανση των ωοκυττάρων όσο και με την ικανότητα των τελευταίων να γονιμοποιηθούν. Αυτό επιβεβαιώνεται και από ανοσοϊστοχημικές μελέτες, όπου στα ωοκύτταρα, που τελικά γονιμοποιούνται, τα κοκκώδη κύτταρα, που τους περιβάλλουν συνδέονται περισσότερο με την hCG σε σύγκριση με αυτά, που δε γονιμοποιούνται. Επίσης, παρατηρούνται υψηλά ποσοστά της LH σε ωοθυλάκια, των οποίων τα ωοκύτταρα γονιμοποιούνται μετά από κύκλους IVF.

Είναι λοιπόν εμφανές πως οι γοναδοτροπίνες έχουν κυρίαρχο ρόλο στην έκκριση διαφόρων ουσιών από τα κοκκώδη κύτταρα (π.χ. το υαλουρονικό οξύ) και στη συνέχεια επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Επιπλέον, φαίνεται να δρουν συνεργιστικά με την E_2 στην επιτάχυνση της ωρίμανσης του κυτταροπλάσματος του ωοκυττάρου, μέσω της έκκρισης κυκλικού cAMP, και ελέγχουν τη μείωση του ωοκυττάρου. Υψηλά επίπεδα των γοναδοτροπινών βελτιώνουν τις παραπάνω διαδικασίες και οδηγούν σε καλύτερης ποιότητας ωοκυττάρων, εμβρύων, καθώς και σε αυξημένα ποσοστά επιτυχημένων κύσεων με μεθόδους τεχνητής υπογονιμότητας.

Είναι επίσης γνωστό πως μια άλλη ορμόνη, η οιστραδιόλη, σχετίζεται θετικά με τη σωστή ανάπτυξη του ωοθυλάκιου και προστατεύει το ωοθυλάκιο από την ατρησία. Επιπρόσθετα, η οιστραδιόλη προάγει την κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου με το να επιτρέπει την είσοδο ασβεστίου από το εξωτερικό περιβάλλον στο ωοκύτταρο και να ελέγχει τη περιοδική μεταβολή των ιόντων Ca^{2+} . Υψηλές τιμές της E_2 , όπως και του λόγου E_2/P στο FF αποτελούν ένδειξη της ωρίμανσης του ωοκυττάρου και κάποιες μελέτες τα συσχετίζουν θετικά με την πιθανότητα επιτυχίας κύησης, ενώ κάποιες άλλες όχι.

Το ίδιο αμφιλεγόμενα είναι επίσης τα αποτελέσματα για το ρόλο των επιπέδων της προγεστερόνης (P) στο FF. Έχει βρεθεί πως υψηλές συγκεντρώσεις της P (ή χαμηλός λόγος E_2/P) στο FF μπορούν να συσχετιστούν θετικά με την εμφύτευση και τελικά με την κύηση. Αυτό συμπεραίνεται από το γεγονός πως υψηλές συγκεντρώσεις της P δείχνουν πως προωθείται η ωχρινοποίηση του ωοθυλάκιου, μειώνεται η δράση της αρωματάσης οδηγώντας τελικά στην ωρίμανση του ωοθυλάκιου. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες αναφέρεται πως ωοκύτταρα, που προέρχονται από ωοθυλάκια, που παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις της P, δε γονιμοποιούνται φυσιολογικά και οδηγούν σε έμβρυα με πολλαπλούς προπυρήνες. Επομένως, γίνεται εμφανές πως η κατάλληλη συγκέντρωση της P στο ωοθυλάκιο έχει θετικά αποτελέσματα στα χαρακτηριστικά του ωοκυττάρου, ενώ η υπερβολική τιμή της έχει αρνητικές επιδράσεις στην ποιότητα του ωοκυττάρου.

Υψηλά ποσοστά τεστοστερόνης στο FF σχετίζονται με χαμηλής ποιότητας ωοκύτταρα και συγκεκριμένα με ωοκύτταρα, που παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά φυσιολογικών κυτταρικών διαιρέσεων μετά τη γονιμοποίηση. Ο λόγος E_2/T είναι υψηλός σε ωοθυλάκια, που τελικά γονιμοποιήθηκαν και οδήγησαν σε κύηση. Αντίθετα χαμηλός λόγος E_2/T στο FF έχει συσχετιστεί με πρώιμη ωοθυλακική ατρησία, η οποία επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα του ωοκυττάρου και περιορίζει στο ελάχιστο την πιθανότητα γονιμοποίησης κι επιτυχούς κύησης. Ενώ υψηλές τιμές ανδρογόνων στο ενδο-ωοθυλακικό περιβάλλον οδηγούν σε ατρησία, είναι απαραίτητη η παρουσία τους σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις για την κατάλληλη ωοθυλακική ανάπτυξη.

Έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο πως οι IGFs και οι γοναδοτροπίνες ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, τη στεροειδογένεση και την ατρησία *in vivo*. Παράλληλα, διεγείρουν την παραγωγή οιστραδιόλης από καλλιεργούμενα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Ο ρόλος των IGFs και των γοναδοτροπινών παρεμποδίζεται από την IGFBP-4, ενώ ενισχύεται από την πρωτεάση της IGFBP-4, η οποία διασπά την IGFBP-4 κι έτσι δε συνδέεται στις IGFs. Πρόσφατα, έχει βρεθεί πως αυτή η πρωτεάση της IGFBP-4 στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό είναι η πρωτεΐνη A του πλάσματος, που σχετίζεται με την κύηση (PAPP-A, pregnancy associated plasma protein- A). Η PAPP-A είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που προέρχεται από την τροφοβλάστη και είναι ανιχνεύσιμη στην κυκλοφορία της μητέρας αμέσως μετά την εμφύτευση. Τα επίπεδα της PAPP-A στον ορό είναι υψηλά σε πολύδυμες κυήσεις και σε γυναίκες στην πρώτη τους εγκυμοσύνη. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα της PAPP-A έχουν συσχετιστεί με βλάβες στην ανάπτυξη του πλακούντα και με μη φυσιολογική εμφύτευση. Σήμερα τα επίπεδα της PAPP-A και της ελεύθερης β-hCG στον ορό της μητέρας σε συνδυασμό με την αυχενική διαφάνεια και την ηλικία της μητέρας χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ανευπλοειδίας κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (Kwik et Morris, 2003). Η PAPP-A εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα και φαίνεται να επιτελεί κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, αλλά και στην ατρησία του. Κάποιες μελέτες θεωρούν πως συμμετέχει και στην επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου. Οι Mous et al, 2009 κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η συγκέντρωση της PAPP-A στον ορό είναι ανεξάρτητη από την συγκέντρωσή της στο ωοθυλακικό υγρό.

A.9 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία σύλληψης μετά από 12 μήνες ελεύθερων σεξουαλικών επαφών (Evers, 2002; Zegers-Hochschild et al., 2006). Η υπογονιμότητα σήμερα αντιμετωπίζεται με τη βοήθεια των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ανάλογα με την αιτία, που προκαλεί την υπογονιμότητα (Steinberg et al, 1998). Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή έχει αναπτυχθεί τα τελευταία 30 χρόνια (Septoe et al, 1978) και είναι ένας γενικός όρος, που αναφέρεται στις μεθόδους, που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση προβλημάτων υπογονιμότητας (Jones et al, 2008). Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η τεχνητή γονιμοποίηση (*in vitro fertilization, IVF*) και η ενδοωαριακή έγχυση του σπερματοζωαρίου (ICSI, Intra Cytoplasmic Sperm Injection).

Η τεχνητή γονιμοποίηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το ωάριο γονιμοποιείται από το σπερματοζωάριο έξω από τη μήτρα, *in vitro*. Η IVF αποτελεί την πιο επιτυχημένη θεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών υπογονιμότητας (Altmae et al, 2007). Πρόκειται για επεμβατική μέθοδο, όπου η ωορρηξία ελέγχεται ορμονολογικά και υπερηχογραφικά. Ακολουθεί η ωοληψία, η απομάκρυνση δηλαδή των ωαρίων από τις ωοθήκες, με τη βοήθεια της διακολλητικής υπερηχογραφίας και στη συνέχεια η γονιμοποίησή των ωαρίων από το σπέρμα σε καλλιεργητικό μέσο. Το γονιμοποιημένο ωάριο μεταφέρεται στη μήτρα με σκοπό την εμφύτευση. Η IVF ακολουθείται για την αντιμετώπιση της γυναικείας υπογονιμότητας κυρίως λόγω προβλημάτων απόφραξης των σαλπίγγων, που έχουν ως αποτέλεσμα την αποτυχία γονιμοποίησης *in vivo*.

Τις τελευταίες δεκαετίες η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή απεδείχθη ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αντιμετώπιση όλων των αιτιών της υπογονιμότητας συμπεριλαμβανομένου και του ανδρικού παράγοντα. Ιδιαίτερα όμως για τον τελευταίο το ποσοστό γονιμοποίησης ωαρίων είναι μόλις 20-30% σε αντίθεση με το ποσοστό γονιμοποίησης του σαλπιγγικού παράγοντα, που είναι 60-70% (Tournaye et al, 1992). Σε περιπτώσεις, που το σπερματοζωάριο αδυνατεί να γονιμοποιήσει το ωάριο μόνο του εφαρμόζεται η μικρογονιμοποίηση, που σημαίνει ενδοωαριακή έγχυση του σπερματοζωαρίου (ICSI), κατά την οποία ένα σπερματοζωάριο ενίεται με πολύ λεπτή βελόνα στο εσωτερικό του ωαρίου. Η ICSI αποτελεί λύση στο πρόβλημα της χαμηλής συγκέντρωσης και κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.

Ένας κύκλος IVF συνήθως ξεκινά με τη χορήγηση φαρμάκων για τη διέγερση της ανάπτυξης περισσότερων ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Τα πρωτόκολλα της ωοθηκικής διέγερσης που ακολουθούνται, διαρκούν μερικές βδομάδες ανά κύκλο (Fauser et al, 1999). Στις περισσότερες περιπτώσεις χορηγούνται ενέσιμες μορφές

σκευασμάτων γοναδοτροπινών (κυρίως ανάλογα FSH) με σκοπό τη διέγερση της ανάπτυξης πολλών ωοθυλακίων (Macklon et al, 2000). Τα διεγερμένα ωοθυλάκια ωριμάζουν με τη χορήγηση ανθρώπινης ή ανασυνδυασμένης χοριακής γοναδοτροπίνης, μια διαδικασία, που ονομάζεται ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση (Controlled Ovarian Hyperstimulation, COH). Η επιτυχία επίτευξης της κύησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα της COH, που ερμηνεύεται από την ποιότητα και την ποσότητα των ωαρίων, που λαμβάνονται (Altmae et al, 2007). Η απόκριση των ωοθηκών στη διέγερσή τους με FSH ποικίλλει κι συσχετίζεται αρνητικά από την αυξημένη ηλικία της γυναίκας, καθώς βαίνουν συνεχώς μειούμενα τα ωοθηκικά αποθέματα (ovarian reserve) (Kligman et al, 2001). Μια πρόωμη αύξηση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) στον ορό, που θεωρείται επιζήμια για το αποτέλεσμα της IVF, παρεμποδίζεται με την ταυτόχρονη χορήγηση αγωνιστή της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH, Gonadotropin-Releasing Hormone), που συχνά ξεκινά στον προηγούμενο κύκλο ή με τη χορήγηση GnRH ανταγωνιστών, που χορηγούνται στη διάρκεια της διέγερσης με γοναδοτροπίνες. Τέλος, επανάληψη της ωρίμανσης του ωοκυττάρου επιτυγχάνεται με τη χορήγηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (human Chorionic Gonadotropin, hCG) στα τελευταία στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης (Macklon et al, 2000).

A.9.1 ΚΥΚΛΟΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Στις πρώτες προσπάθειες αντιμετώπισης της υπογονιμότητας με IVF (Stephoe et al, 1978) ένα ώριμο ωοθυλάκιο από φυσιολογικό κύκλο γονιμοποιούνταν *in vitro* κι ένα έμβρυο μεταφερόταν στη μήτρα (Lenton et al, 1992; Pelinck et al, 2002). Οι φυσιολογικοί κύκλοι στην IVF δεν προτιμούνται, καθώς τα ποσοστά επιτυχίας είναι αρκετά χαμηλά (7,2% ανά κύκλο) (Pelinck et al, 2002). Επιπλέον, τα ποσοστά επιτυχίας ανά κύκλο IVF σχετίζονται και με τον αριθμό των εμβρύων, που μεταφέρονται (Pandian et al, 2004) κι επομένως με τον αριθμό των ωαρίων, που απομονώνονται (Liu H et al, 1992; Vandervorst et al 1998). Το ζητούμενο για τους κύκλους της IVF είναι η πρόκληση της «πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας» (superovulation) δηλαδή η αύξηση του αριθμού των ώριμων ωαρίων περίπου στα 10-20 ωάρια ανά κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χορήγηση εξωγενώς ανασυνδυασμένης ή εμμηνοπαυσιακής FSH. Η φυσιολογική ισορροπία των ορμονών διαταράσσεται με την πρόσληψη εξωγενών ορμονών σε κύκλους πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας και σε κύκλους, που χορηγούνται GnRH αγωνιστές, ενώ η χορήγηση GnRH ανταγωνιστών έχει αποδειχθεί πως απαιτείται και μετά την εμφύτευση.

Ποικίλες εξωγενείς ορμόνες χρησιμοποιούνται από διάφορα πρωτόκολλα, για να αυξήσουν τη στρατολόγηση των ωοθυλακίων, να υποστηρίξουν την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων και να συγχρονίσουν την ωρίμανσή τους. Οι υπερβολικές τιμές των ορμονών αυτών μπορούν να οδηγήσουν σε πρόωμη ωοθυλακιορρηξία και διακοπή του κύκλου πρόκλησης. Κρίνεται απαραίτητη η στενή παρακολούθηση της ασθενούς για το πώς αποκρίνεται στην ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση (COH, Controlled Ovarian Hyperstimulation), καθώς υπάρχει ο κίνδυνος ανάπτυξης του συνδρόμου ωοθηκικής υπερδιέγερσης (OHSS, ovarian hyperstimulation syndrome) (Delvigne et al, 2003).

Η διέγερση των ωοθηκών για λήψη πολλών ωαρίων εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα, διότι όσο περισσότερα ωοθυλάκια ωριμάσουν τόσο περισσότερα ωοθυλάκια παραλαμβάνονται κι επομένως περισσότερα ωοθυλάκια θα γονιμοποιηθούν. Η διέγερση των ωοθηκών γίνεται με κιτρική κλομιφένη, κιτρική κλομιφένη και εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (HMG) ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) και διάφορους συνδυασμούς αυτών των ορμονών με ή χωρίς τη χρήση GnRH αγωνιστών.

Στις συμβατικές μεθόδους τεχνητής γονιμοποίησης ακολουθούνται δύο είδη πρωτόκολλων: το μακρύ και το βραχύ πρωτόκολλο. Η θεραπεία, που χρησιμοποιείται και στα δύο πρωτόκολλα είναι η ίδια, όμως διαφέρουν η δοσολογία και η περίοδος χορήγησης. Από το ιστορικό της γυναίκας (ηλικία, απόκριση στην αγωγή και το αποτέλεσμα προηγούμενων κύκλων IVF) κρίνεται συνήθως η επιλογή του κατάλληλου πρωτόκολλου. Τα διαφορετικά πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούνται στην COH περιγράφονται παρακάτω.

A.9.1.1 Ανάλογα εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH analogues)

Τα ανάλογα της GnRH χρησιμοποιούνται σε κύκλους IVF, ώστε να απενεργοποιήσουν τον άξονα υπόφυση- ωοθήκη να παράγει τις ορμόνες σε κάθε κύκλο. Έτσι, όλα τα γεγονότα από τη στρατολόγηση των ωοθυλακίων μέχρι την ωοθυλακιορρηξία μπορούν να βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο των εξωγενών ορμονών (van Loenen et al, 2002).

A.9.1.1.1 Φυσική GnRH (ή LHRH ή LRF)

Προτιμάται ο όρος GnRH, επειδή πρόκειται για ένα δεκαπεπτίδιο, που ρυθμίζει την έκκριση αμφοτέρων των γοναδοτροπινών., δηλαδή της FSH και της LH. Η GnRH εκκρίνεται από τον υποθάλαμο και μεταφέρεται με τα πυλαία αγγεία στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης πριν πάει στους περιφερειακούς ιστούς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής

της GnRH είναι 8 min και η δράση της στην υπόφυση γίνεται κατά ώσεις, άρα και η έκκριση της FSH/ LH γίνεται κατά ώσεις, αν και τα στεροειδή των γονάδων και μη στεροειδείς παράγοντες, όπως η ινχιμπίνη δρουν επίσης πάνω στην έκκριση της FSH/LH. Επειδή η GnRH έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και η χορήγηση πρέπει να γίνεται κατά ώσεις με ειδική αντλία ανακαλύφθηκαν τα GnRH ανάλογα, τα οποία διακρίνονται σε αγωνιστές κι ανταγωνιστές.

A.9.1.1.2 Αγωνιστές GnRH (GnRH agonists)

Η χορήγηση GnRH προκαλεί παύση της έκκρισης των FSH και LH λόγω εξαφάνισης των υποδοχέων στην υπόφυση (downregulation). Οι αγωνιστές της GnRH χρησιμοποιούν αυτόν τον μηχανισμό, για να καταστείλλουν την απελευθέρωση των ενδογενών FSH και LH. Οι αγωνιστές της GnRH είναι συνθετικά παράγωγα της GnRH με μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής και παρατεταμένη σύνδεση με τους υποδοχείς στην υπόφυση. Η χρησιμοποίηση των αγωνιστών της GnRH στους κύκλους IVF έχει βελτιώσει τα αποτελέσματα της τεχνικής. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση στους ρυθμούς αποτυχίας ενός διεγερμένου κύκλου λόγω της μείωσης του ποσοστού πρώιμης ωοθυλακιορρηξίας από 20% σε λιγότερο από 2%.

Τις πρώτες 2-3 ημέρες μετά τη χορήγηση αγωνιστών παρατηρείται μια αυξημένη έκκριση γοναδοτροπινών FSH/LH, γνωστή ως flare effect, η οποία στη συνέχεια διακόπτεται και τελικά η ωοθήκη αδρανοποιείται για 7-14 ημέρες. Η διάρκεια της απενεργοποίησης της υπόφυσης σχετίζεται άμεσα με τη διάρκεια χορήγησης και τη δόση των αγωνιστών. Στο «μακρύ» πρωτόκολλο (long protocol) (Εικ 11) οι αγωνιστές της GnRH χορηγούνται σε καθημερινή βάση αρχίζοντας από το μέσο της ωχρινικής φάσης (mid-luteal phase) του προηγούμενου κύκλου για τουλάχιστον 10 ημέρες μέχρι επιτευχθεί πλήρως καταστολή της υπόφυσης – ωοθηκών, όπως αυτό πιστοποιείται από την εκμηδένιση των επιπέδων της οιστραδιόλης (<20pg/mL). Ακολούθως προστίθεται η χορήγηση της hMG παράλληλα με αυτή του αναλόγου της GnRH μέχρι τη χορήγηση της hCG.

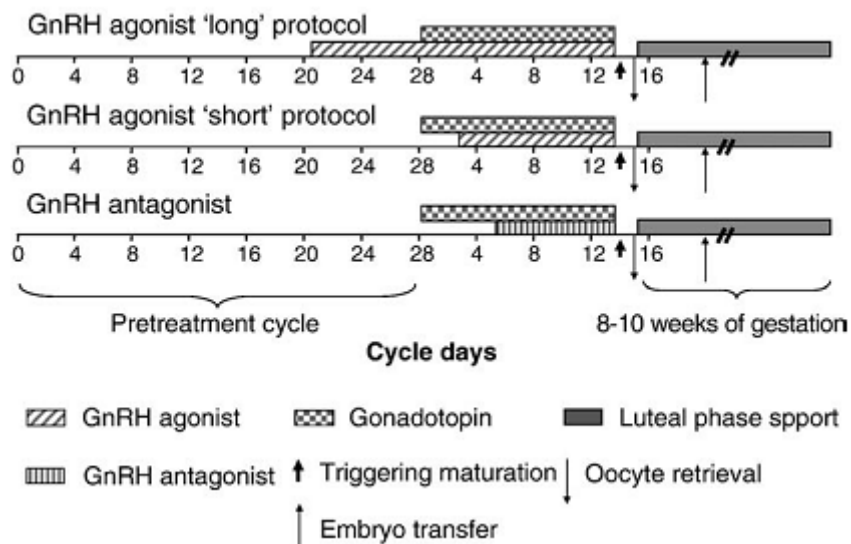
Στο «βραχύ» πρωτόκολλο (short protocol) η λειτουργία της υπόφυσης καταστέλλεται στα τελευταία στάδια της ωοθυλακικής φάσης από αγωνιστές της GnRH. Η καταστολή αρχίζει περίπου τη 2^η-3^η ημέρα ενός κύκλου IVF και συνεχίζεται μέχρι τη διέγερση της ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Η hMG χορηγείται 2-3 ημέρες αργότερα. Το πλεονέκτημα αυτού το πρωτόκολλου σε σχέση με το μακρύ είναι πως μειώνεται η απαιτούμενη δοσολογία της hMG.

Χρησιμοποιείται ακόμη και το «υπερ-βραχύ» πρωτόκολλο, που στηρίζεται στην ίδια αρχή με το βραχύ. Η μόνη διαφορά είναι ότι το ανάλογο GnRH χορηγείται

για μικρότερο χρονικό διάστημα (3-5 ημέρες περίπου) όσο δηλαδή διαρκεί η «αγωνιστική» του δράση. Σε αυτό το πρωτόκολλο χορηγείται μόνο στην αρχή το ανάλογο, για την εκμετάλλευση του φαινομένου του “flare effect” από τη δράση του συνεχίζοντας μετά μόνο με γοναδοτροπίνες. Τα περισσότερα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούν περισσότερο τα δύο πρώτα πρωτόκολλα.

Στις διάφορες μελέτες δε φαίνεται να υπάρχει υπεροχή του βραχέως σε σχέση με το μακρύ πρωτόκολλο. Φαίνεται πάντως πως η επιλογή του ενός ή του άλλου πρωτόκολλου θα πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με την περίπτωση της ασθενούς. Για παράδειγμα στο «βραχύ» πρωτόκολλο ανταποκρίνονται καλύτερα γυναίκες με εν γένει πτωχή απόκριση στην ωθητική διέγερση (poor responders). Αντίθετα σε γυναίκες με πολυκυστικές ωθήκες, ιδιαίτερα αυτές με αυξημένα επίπεδα LH, το «μακρύ» πρωτόκολλο φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα. Το μακρύ πρωτόκολλο πάντως προτιμάται περισσότερο από τους ειδικούς, καθώς θεωρείται πως μειώνει τα ποσοστά αποτυχίας των κύκλων IVF, ενώ παράλληλα επιτρέπει τη λήψη μεγαλύτερου αριθμού ωοκυττάρων σε κάθε κύκλο. Επίσης, το μακρύ πρωτόκολλο θεωρείται πιο κατάλληλο για τη διαχείριση του κύκλου χωρίς πολλά απρόοπτα καθώς και για τον προγραμματισμό της ωοληψίας.

Εικ. A17. Τυπικά πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούνται σε κύκλους IVF



A.9.1.1.3 Ανταγωνιστές GnRH (GnRH antagonists)

Οι ανταγωνιστές της GnRH (συνθετικά παράγωγα της GnRH) συνδέονται ανταγωνιστικά στους υποδοχείς της GnRH και χρησιμοποιούνται αντί των αγωνιστών. Σε αντίθεση με τους αγωνιστές οι ανταγωνιστές της GnRH συνδέονται αμέσως και ανταγωνιστικά στους υποδοχείς της GnRH στην υπόφυση. Μέσα σε 8-24 ώρες μετά την πρώτη δόση η συγκέντρωση της LH μειώνεται περίπου κατά 51-84% και η συγκέντρωση της FSH κατά 17-42%. Η ισχυρή σύνδεση του ανταγωνιστή με τον υποδοχέα της GnRH έχει ως αποτέλεσμα την άμεση αλλά αναστρέψιμη μείωση των τιμών της FSH και LH χωρίς να παρατηρείται αυξημένη έκκρισή τους τις πρώτες μέρες, όπως συμβαίνει με τους αγωνιστές (Εικ. Α17). Λόγω της άμεσης δράσης των ανταγωνιστών χορηγούνται για πολύ μικρότερο διάστημα από εκείνο, που απαιτείται με τη χορήγηση αγωνιστών.

Οι ανταγωνιστές της GnRH χορηγούνται στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης ενός κύκλου IVF, για να παρεμποδιστεί η εκκριτική αιχμή της LH. Οι εξωγενείς γοναδοτροπίνες χορηγούνται καθημερινά μέχρι την ωρίμανση του ωοθυλακίου. Τα πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούν ανταγωνιστές, παρουσιάζουν μειωμένο κόστος σε σύγκριση με εκείνα των αγωνιστών, καθώς η ζήτηση των εξωγενών γοναδοτροπινών είναι μειωμένη στα πρώτα. Παρόλα αυτά πιστεύεται πως τα πρωτόκολλα με ανταγωνιστές συνδέονται περισσότερο με χαμηλά ποσοστά αποτυχίας συγκρινόμενα με εκείνα των αγωνιστών. Θεωρείται πως υψηλές δόσεις των ανταγωνιστών μπορεί να επηρεάζουν σημαντικές διαδικασίες, όπως την ωοθυλακιογένεση, την εμφύτευση και την ανάπτυξη του ενδομητρίου. Ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS, Polycystic Ovarian Syndrome) κινδυνεύουν περισσότερο να εμφανίσουν OHSS, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα με αγωνιστές. Έτσι μάλλον υπόκεινται σε κύκλους πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας, όπου χρησιμοποιούνται ανταγωνιστές GnRH.

A.9.1.2 Γοναδοτροπίνες για την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλάκιων: FSH, LH και hCG

Για τη διέγερση πολλαπλών ωοθυλακίων ανά κύκλο IVF απαιτείται η χρήση εξωγενών γοναδοτροπινών. Η φυσιολογική δράση των ορμονών για την απελευθέρωση ενός ωοθυλακίου υπερκαλύπτεται από την επέμβαση με υψηλές συγκεντρώσεις FSH. Οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών, που παρατηρούνται σε έναν διεγερμένο κύκλο IVF, έχουν ως αποτέλεσμα την πρόωρη ενεργοποίηση της στρατολόγησης του ωοθυλακίου, καθώς και την ανάπτυξη περισσότερων του ενός ωοθυλακίου. Επίσης, σε κάθε κύκλο IVF λόγω των αυξημένων επιπέδων FSH και ιοτρογόνων παρατηρείται πρόωρη έκρηξη της LH, η οποία προλαμβάνεται από τη

χορήγηση αναλόγων της GnRH, που καταστέλλουν τη λειτουργία της υπόφυσης. Η παρεμπόδιση της έκκρισης της LH επιτρέπει την πρόσληψη εξωγενών γοναδοτροπινών μέχρι την ανάπτυξη του επιθυμητού αριθμού ωοθυλάκιων. Σε πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούν γοναδοτροπίνες είναι απαραίτητη η εκτενής παρακολούθηση της ωοθυλακικής ανάπτυξης, ώστε να αποφευχθεί η πρόωγη ή η καθυστερημένη συλλογή των ωαρίων. Επίσης, η δόση των γοναδοτροπινών είναι εξατομικευμένη σε συνδυασμό με τα επίπεδα των ορμονών στην κυκλοφορία, για να αποτραπεί ο κίνδυνος εμφάνισης OHSS (Davis et al, 1995).

Οι γοναδοτροπίνες κυρίως χορηγούνται ως ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (hMGs, human Menopausal Gonadotropins), που περιλαμβάνουν FSH, LH και hCG. Εναλλακτικά, καθαρή FSH λαμβάνεται από δείγματα ούρων μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ή παράγεται μέσω ανασυνδυασμένης τεχνολογίας και χορηγείται με τη συμμετοχή ή όχι της δράσης της LH (Muasher et al, 2006).

A.9.1.2.1 Ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (hMG, human Menopausal Gonadotropins)

Η διακοπή του οιστρογονικού μηχανισμού ανάδρασης σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται υψηλά επίπεδα FSH και LH, που εκκρίνονται στα ούρα και αποτελούν την κύρια πηγή των hMGs (Corsan et al, 1991). Οι FSH και LH είναι τυποποιημένες σε κλινικά δείγματα και παρουσιάζουν διαφορές με τις hMGs λόγω της μοριακής ετερογένειας, που διαφοροποιεί την μέθοδο παρασκευής ή σύνθεσης (Olivares et al, 2000).

Οι hMGs παρασκευάζονται έτσι ώστε οι FSH και LH να έχουν περίπου ίσα ποσά IU (International Units) ανά μονάδα όγκου. Επειδή η βιοδραστικότητα της FSH υπερκαλύπτει τη δράση της LH σε σκευάσματα καθαρής hMG, προστίθεται hCG, προερχόμενη από δείγματα ούρων εγκύων γυναικών, ως υποκατάστατο της LH με σκοπό να επιτευχθεί η επιθυμητή ισοτιμία στις δράσεις των FSH και LH. Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη είναι υπεύθυνη για τη δραστικότητα της LH σε αυτά τα σκευάσματα (Stokman et al, 1993; van de Weijer et al, 2003). Σε σκευάσματα, που περιέχουν hCG, θα παρατηρηθεί αύξηση στη δραστικότητα της LH, εξαιτίας του παρατεταμένου χρόνου ημίσειας ζωής της hCG. Καθώς η δραστικότητα της LH μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη του ωοθυλάκιου στα τελευταία κυρίως στάδια, που αυξάνει και το μέγεθός του, αυτό το χαρακτηριστικό πιθανόν να παρουσιάζει φαρμακοδυναμικές επιπτώσεις και να ενισχύεται ο κίνδυνος πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας και OHSS (Janat-Amsbury M et al 2009).

Η χορήγηση της hMG αρχίζει τη δεύτερη ή τρίτη ημέρα ενός κύκλου IVF και συνεχίζεται σε καθημερινή βάση μέχρι τα ωοθυλάκια να φτάσουν στο επιθυμητό

μέγεθος (ελάχιστη διάμετρος > 15mm). Υψηλές δόσεις χορηγούνται κυρίως στην αρχή, για να αυξήσουν τη στρατολόγηση των ωοθυλάκιων.

A.9.1.2.2 Η FSH στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Η απομάκρυνση της LH με πολυκλωνικά αντισώματα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός βιολογικά καθαρού σκευάσματος ουρικής FSH (ή αλλιώς ουροφολλιτροπίνης (urofollitropin)) αλλά χωρίς να αποφευχθεί εντελώς η πρόσμιξη με πρωτεΐνες των ούρων (Giudice et al, 1994). Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικά για την FSH είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή εμμηνοπαυσιακής FSH μεγάλης καθαρότητας (Highly Purified, HP). Αυτά τα σκευάσματα περιέχουν < 0,1 IU LH και < 5% μη αναγνωρισμένων πρωτεϊνών των ούρων. Επίσης, η ειδική δραστηριότητα της FSH αυξάνεται από 100-150 IU/mg πρωτεΐνης στα καθαρά σκευάσματα μέχρι περίπου 10000 IU/mg πρωτεΐνης στο προϊόν μεγάλης καθαρότητας.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε στην παραγωγή σκευασμάτων ανασυνδυασμένης FSH (recombinant FSH, rFSH). Αυτό πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή γονιδίων, που κωδικοποιούν τις υπομονάδες α και β της FSH σε φορείς, που διαμόλυναν κυτταρικές σειρές από ωοθήκες κινέζικων χάμστερ (Howles et al, 1996).

Οι δύο ανασυνδυασμένες FSH είναι γνωστές στο εμπόριο ως φολλιτροπίνη α και φολλιτροπίνη β. Η δομή και των δύο είναι ταυτόσημη με εκείνη της FSH, που παράγεται από την υπόφυση. Αν και ονομάζονται φολλιτροπίνη α και β, καθεμία αποτελείται από μια α και μια β γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα. Αυτές οι αλυσίδες συνδέονται μη ομοιοπολικά αλλά σχηματίζουν ηλεκτροστατικούς και υδροφοβικούς δεσμούς. Η μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση, καθώς και η διαδικασία καθαρισμού των δύο αυτών σκευασμάτων δεν είναι ταυτόσημες (Olijve et al, 1996) με αποτέλεσμα τη διαφορετική σύστασή τους και την παρουσία διαφορετικών ισοηλεκτρικών συμπαραγόντων. Οι μικρές διαφορές στη δομή τους δεν έχει αποδείξει διαφορές και στην κλινική εφαρμογή τους.

Στα σκευάσματα ανασυνδυασμένης FSH η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση της ποσότητας της πρωτεΐνης (μάζα σε mg) και δε μετράται η βιολογική δραστηριότητα, όπως συμβαίνει με την ουρική FSH. Έτσι ενεργότητα της ουρικής FSH με τιμή 75 IU αντιστοιχεί σε 5.0-5.5 mg ανασυνδυασμένης FSH (ASRM Practice Committee, 2008).

A.9.1.2.3 Η LH και hCG στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Τα βέλτιστα επίπεδα της δραστικότητας της LH, που απαιτούνται για την ωοθυλακιόγνεση, αποτελούν αντικείμενο διαμάχης, καθώς οι υποδοχείς της LH, που εξαρτώνται από την FSH, είναι παρόντες στα κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλάκιων (Filicori et al, 2002; Shoham Z, 2002). Η ωοθυλακιόγνεση φαίνεται να ευνοείται με την απουσία του κατώτερου επιπέδου της LH, ενώ η ατρησία των ωοθυλακίων συμβαίνει, αν ξεπεραστεί το οριακό επίπεδο της LH (Shoham Z, 2002). Όπως, έχει αναφερθεί, ελλοχεύει πάντα ο κίνδυνος της πρόωρης ωοθυλακιόρρηξίας εξαιτίας της αυξημένης δραστικότητας της LH. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως σκευάσματα με hMG παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στους ρυθμούς βιώσιμων κυήσεων και στην ποιότητα των εμβρύων σε σχέση με εκείνα, που περιέχουν rFSH. Με βάση τα παραπάνω υποδηλώνεται ο καθοριστικός ρόλος της δραστικότητας της LH, η οποία απουσιάζει σε σκευάσματα, που περιέχουν μόνο FSH. Για αυτό πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούν καθαρή FSH συχνά συμπληρώνουν τη δραστικότητα της LH με τη μορφή της hCG ή ανασυνδυσμένης LH (rLH), καθώς τα ωοθυλάκια ωριμάζουν.

Χαμηλές δόσεις hCG (50-200 IU/d) επίσης χρησιμοποιούνται για ωοθυλακιόγνεση μαζί με την FSH. Επειδή ο χρόνος ημίσειας ζωής της hCG είναι αρκετά μεγάλος (~ 30 h) και θεωρητικά αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης OHSS, δημιουργήθηκε η ιδέα για την παρασκευή της ανασυνδυσμένης LH. Η α- lutropin είναι η πρώτη και η μόνη μορφή ανθρώπινης ανασυνδυσμένης LH, που αναπτύχθηκε για να χρησιμοποιηθεί με την α- follitropin (rFSH), η οποία χρησιμοποιείται για τη διέγερση της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Η ανασυνδυσμένη LH είναι διαθέσιμη για κλινική εφαρμογή από το 1993 σε σκευάσματα των 75 IU. Το προϊόν αυτό ενισχύει την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, όταν χορηγείται σε συνδυασμό με FSH σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, που χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία της LH (The European Recombinant Human LH Study Group, 1998). Η ταυτόχρονη χρήση των ανασυνδυσμένων FSH και LH μπορεί να ωφελήσει συγκεκριμένες υποομάδες γυναικών με φυσιολογική ανάπτυξη των γονάδων τους, όπως για παράδειγμα εκείνες, που δεν αποκρίνονται στη θεραπεία μόνο με ανασυνδυσμένη FSH, εκείνες, που είναι ≥ 35 χρόνων, εκείνες, που παρουσιάζουν υποέκφραση της LH ή/και εκείνες, που χρειάζονται υπερβολικές ποσότητες εξωγενούς α- follitropin.

Η χοριακή γοναδοτροπίνη χορηγείται για την ενεργοποίηση των τελευταίων σταδίων της ωρίμανσης του ωοθυλακίου, δηλαδή την άρση της διακοπής της μειωτικής διαίρεσης στην πρόφαση I και τη συνέχιση της διαδικασίας μέχρι το στάδιο της μετάφασης II. Για την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης απαιτούνται περίπου

36 ώρες (Stephoe PC, 1970). Η χοριακή γοναδοτροπίνη μπορεί να απομονωθεί από τα ούρα έγκυων γυναικών ή να παρασκευαστεί σε ανασυνδυασμένα σκευάσματα. Τα σκευάσματα αυτά της hCG περιέχουν 250 µg προϊόντος, που αντιστοιχεί σε 5000-6000 IU hCG (ASRM Practice Committee, 2008).

A.10 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

A.10.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAY ANALYSIS)

Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, που ποικίλλουν, αλλά κι αυξάνονται με το πέρασμα των χρόνων (Shoemaker et al, 1996; Cronin et al, 1996; Sapolsky et al, 1996). Οι κυριότερες εφαρμογές των μικροσυστοιχιών είναι ο καθορισμός της γονιδιακής έκφρασης, η ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών, η γονοτύπηση, ο καθορισμός της οργάνωσης των γονιδίων, καθώς και η ανάλυση αλληλουχιών DNA, που μέχρι τώρα δεν είχαν χαρακτηριστεί (Maskos et al, 1993; Guo et al, 1994; Lipshutz et al, 1995; Drobyshev et al, 1997). Νέες εφαρμογές αρχίζουν με γρήγορο πλέον ρυθμό να προτείνονται, όπως η ανακάλυψη νέων μεταγράφων (από κωδικές και μη κωδικές περιοχές), νέων ρυθμιστικών αλληλουχιών, αλλά και ο χαρακτηρισμός λειτουργικών τόπων στο RNA μετάγραφο (Dalma-Weiszhauz D et al, 2006).

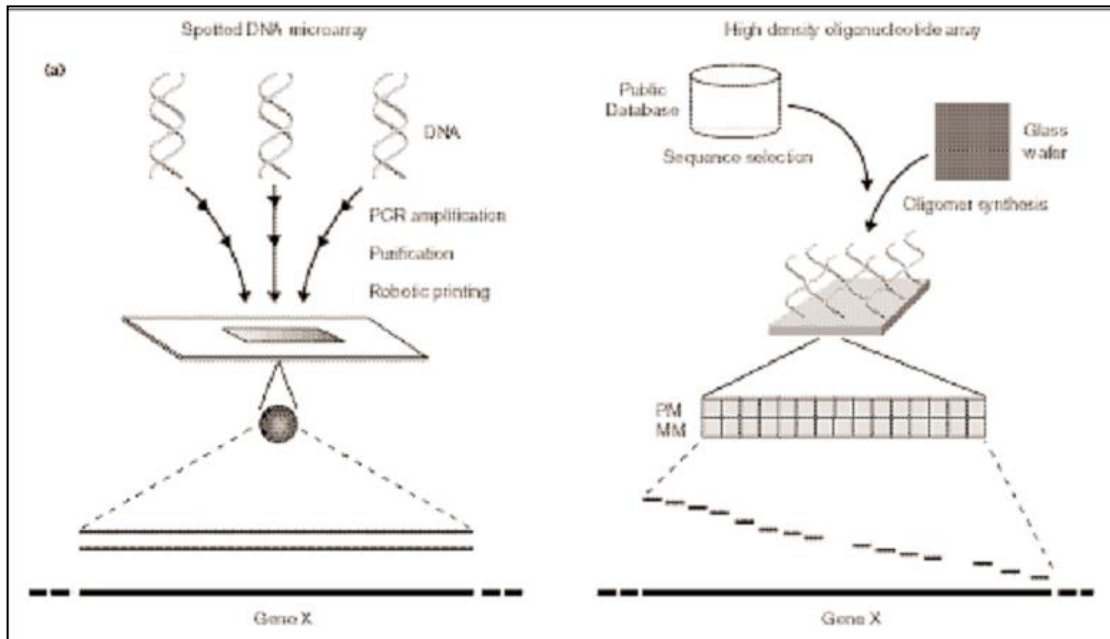
Οι μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays) αποτελούν πλέον σημαντικό εργαλείο της βιολογίας και της Ιατρικής, καθώς επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε μια μονή συστοιχία υβριδοποίησης (Harrington et al, 2000). Η σύγκριση διαφόρων προτύπων γονιδιακής έκφρασης έχει βοηθήσει στην κατανόηση της σχέσης ανάμεσα στη σύσταση του RNA και της βιολογικής λειτουργίας. Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες υπήρξε αρωγός στην ανακάλυψη γενετικών μονοπατιών, των οποίων η πορεία αλλάζει σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως ο καρκίνος (Armstrong et al., 2002; Huang et al., 2004; Yeoh et al., 2002) ή η πολλαπλή σκλήρυνση (Steinman et al, 2003). Κάθε συστοιχία αποτελείται από χιλιάδες διαφορετικά τμήματα DNA (κυρίως προϊόντα PCR ή ολιγονουκλεοτίδια), τα οποία έχουν προσδεθεί σε σταθερή επιφάνεια, όπως για παράδειγμα το γυαλί. Το RNA ή το DNA, που προέρχεται από το μεταφορικό RNA (mRNA), σημαίνεται με φθορίζουσες χρωστικές, υβριδοποιείται σε συμπληρωματικό DNA στη συστοιχία κι έπειτα ανιχνεύεται μετά από σάρωση με laser.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση με μικροσυστοιχίες (Lipshutz et al, 1999; Duggan et al, 1999; Eisen 1999; Bowtell 1999) με κυριότερες: 1. τις τυπωμένες cDNA μικροσυστοιχίες (spotted cDNA microarrays) και 2. τις ολιγονουκλεοτιδικές συστοιχίες υψηλής πυκνότητας (high density oligonucleotide microarrays), που συχνά αναφέρονται και ως μικροσυστοιχίες με την τεχνολογία chip. Η δεύτερη μέθοδος έχει αναπτυχθεί κυρίως από την εταιρεία Affymetrix. Οι διαφορές ανάμεσα τους αφορούν στα είδη των ανιχνευτών, που χρησιμοποιούνται, καθώς και στην τεχνολογία, με την οποία έχει κατασκευαστεί η μικροσυστοιχία (Lee 2004).

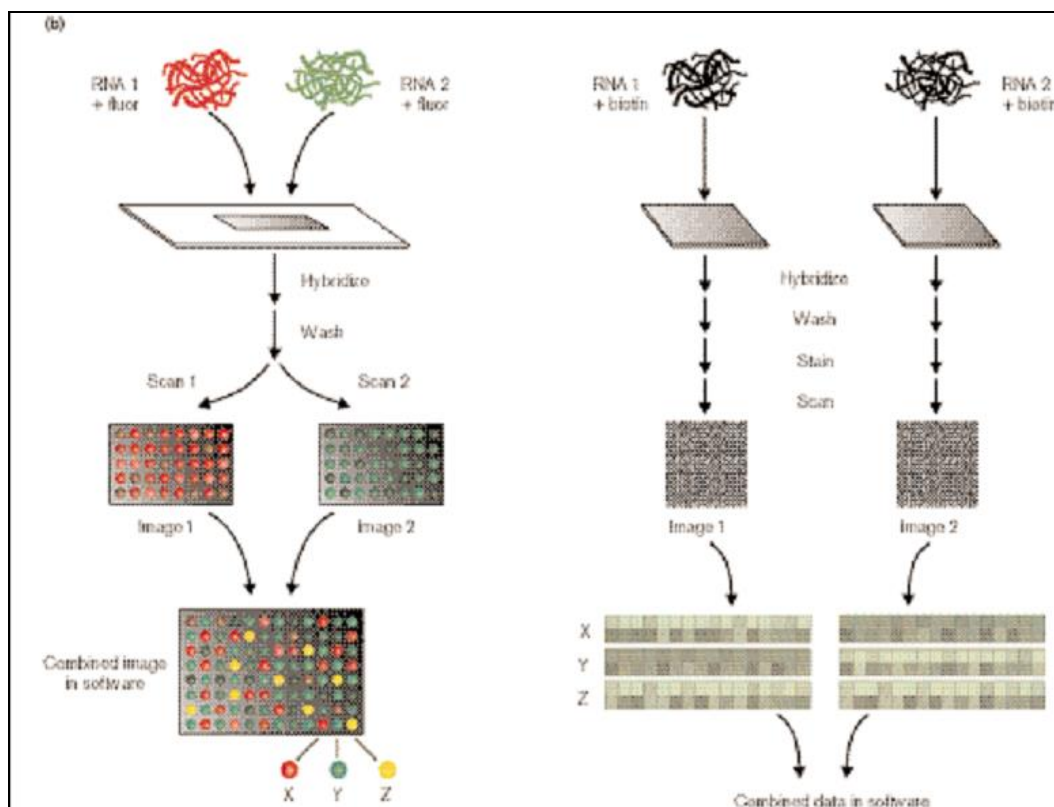
Στις τυπωμένες μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται αλληλουχίες DNA μονής ή διπλής αλυσίδας, που προσδένονται σε υάλινες επιφάνειες (Scheda et al, 1996; De Risi et al, 1997). Τα γονίδια, τα οποία εξετάζονται, παρουσιάζονται ως μονά τμήματα DNA με μήκος μερικών εκατοντάδων ζεύγη βάσεων. Τα δείγματα DNA, που υβριδοποιούνται στη συστοιχία, έχουν συνήθως σημειωθεί με τη βοήθεια ανιχνευτών (probes), που αποτελούν νουκλεοτίδια σημασμένα με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική. Η σήμανση των δειγμάτων πραγματοποιείται μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή του μεταφορικού RNA (Eisen 1999). Χρωστικές με διαφορετικά μήκη κύματος (συνήθως οι Cy3- και Cy5-dUTP) χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των δειγμάτων cDNAs από το δείγμα αναφοράς και το εξεταζόμενο δείγμα. Έπειτα, τα σημασμένα δείγματα αναμιγνύονται πριν την υβριδοποίησή τους στη συστοιχία. Η έκφραση ενός συγκεκριμένου μετάγραφου στα δύο δείγματα καθορίζεται από την ένταση του σήματος, που ανιχνεύεται από τις δύο χρωστικές και υπολογίζοντας το λόγο των σημάτων (Harrington et al, 2000).

Στις ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες με την τεχνολογία των chip (π.χ Human GeneChip arrays, Affymetrix) ομάδες από ολιγομερή συνθέτονται *in situ* σε υάλινη επιφάνεια, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας (Chee et al, 1996; Lockhart et al, 1996). Τα γονίδια, που εξετάζονται, αντιπροσωπεύονται ταυτόχρονα από 15-20 διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια με περίπου 25 βάσεις, που λειτουργούν ως ανιχνευτές συγκεκριμένων αλληλουχιών. Επίσης, στη συστοιχία με τη χρήση της τεχνολογίας GeneChip, το ευκαρυωτικό mRNA μετατρέπεται σε βιοτινυλιωμένο cRNA από cDNA με τη βοήθεια oligo-dT-εκκινητές (primers) (Lockhart et al, 1996). Το δείγμα ελέγχου υβριδοποιείται σε ξεχωριστή συστοιχία από το εξεταζόμενο δείγμα.

Εικ. A18. Διαφορές ανάμεσα στις τυπωμένες DNA μικροσυστοιχίες και τις ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας. (a) για τις τυπωμένες DNA συστοιχίες χρησιμοποιούνται ενισχυμένα τμήματα DNA, τα οποία προέρχονται από γονιδιωματικό ή cDNA κι έχουν «τυπωθεί» σε υάλινες επιφάνειες. Κάθε κουκκίδα (spot) στην υάλινη επιφάνεια αντιστοιχεί σε γειτονικά τμήματα γονιδίου μερικών εκατοντάδων βάσεων ή περισσότερων. Οι ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες ακολουθούν μι μέθοδο συνδυαστικής χημικής σύνθεσης, που εξαρτάται από την εκπομπή φωτός, για την παραγωγή χιλιάδων διαφορετικών ολιγομερών ανιχνευτών. Τα γονίδια παρουσιάζονται με τη μορφή 15-20 διαφορετικών ολιγομερών ζευγών (PM, perfectly matched, MM, mismatched) στη συστοιχία.



Εικ Α18(β) Στη συστοιχία έκφρασης της πλατφόρμας των τυπωμένων μικροσυστοιχιών το mRNA από το εξεταζόμενο δείγμα (δείγμα 1) και το δείγμα ελέγχου (δείγμα 2) σημαίνεται με διαφορετικές χρωστικές, υβριδοποιείται με το DNA, που έχει προσδεθεί στην υάλινη επιφάνεια κι έπειτα σαρώνεται. Οι χρωματιστές τελείες x, y και z στο τέλος της εικόνας αντιστοιχούν σε υποθετικά γονίδια, που τα επίπεδα έκφρασης είναι αυξημένα στο δείγμα 1 (x), αυξημένα επίπεδα στο δείγμα 2 (y) και δεν παρουσιάζει διαφορά ανάμεσα στα δείγματα 1 και 2 (z). Στη συστοιχία έκφρασης με την τεχνολογία GeneChip, το RNA σημαίνεται σε μια διαδικασία δύο βημάτων ενίσχυσης για την παραγωγή βιοτινυλιωμένο cRNA. Μετά την υβριδοποίηση το βιοτινυλιωμένο cRNA, που έχει προσδεθεί στη συστοιχία, σημαίνεται με χρωστική, που περιέχει αβιδίνη (avidin) κι ανιχνεύεται με σάρωση μέσω laser. Ομάδες ζευγών ολιγονουκλεοτιδίων για υποθετικά γονίδια με αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο δείγμα 1 (x), με αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο δείγμα 2 (y) και παρόμοια επίπεδα ανάμεσα στα δείγματα 1 κι 2 (z) παρουσιάζονται στο τέλος της εικόνας.

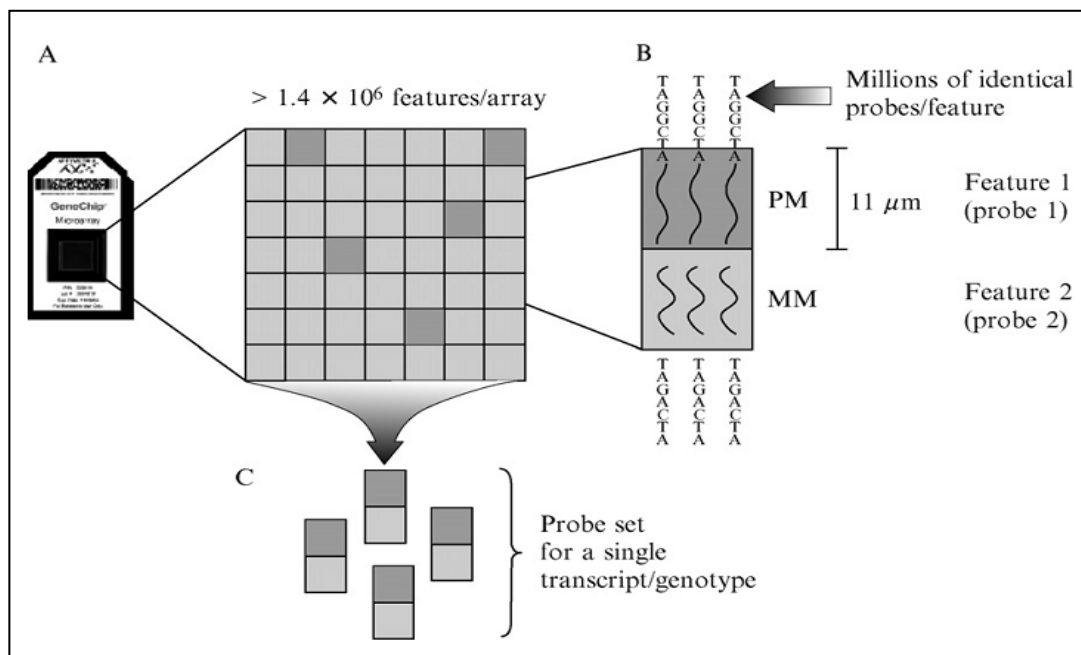


Έχει παρατηρηθεί πως για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, προτιμάται η μικροσυστοιχία, που περιέχει το chip (Schena 1996). Ένα πλεονέκτημα της χρήσης μικροσυστοιχιών για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης είναι ότι η τεχνική αυτή εστιάζει στα λειτουργικά (εκφραζόμενα) τμήματα του γονιδιώματος. Αυτό το στοιχείο είναι απαραίτητο σε πολύπλοκα συστήματα, όπως το ανθρώπινο γονιδίωμα, στο οποίο ο λόγος του αριθμού των περιοχών DNA, που κωδικοποιούνται προς σε αυτές, που δεν κωδικοποιούνται είναι μικρός (Rowen, L et al, 1997). Επειδή οι αλληλουχίες, που κωδικοποιούν γονίδια, αφορούν περίπου στο 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος, η ανάλυση των μετάγραφων, που στηρίζεται στην υβριδοποίηση μειώνει την πολυπλοκότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος κατά περίπου 30 φορές (Schena 1998).

Ένα πλεονέκτημα ακόμη στη χρήση της τεχνολογίας GeneChip έναντι των άλλων τεχνικών μικροσυστοιχιών είναι πως χαρακτηρίζεται από την αφθονία των ανιχνευτών. Πολλά ανεξάρτητα ολιγονουκλεοτίδια έχουν σχεδιαστεί, για να υβριδοποιούνται σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου μορίου RNA (Hardiman 2004). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό αυτής της τεχνολογίας είναι πως οι ανιχνευτές στις ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες συντίθενται απευθείας πάνω στην επιφάνεια των μικροσυστοιχιών. Κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύεται στη μικροσυστοιχία από ένα σύνολο διαφορετικών 25μερών ανιχνευτών, σχεδιασμένων έτσι ώστε να

αντιστοιχίζονται ακριβώς σε αυτό το γονίδιο. Τα 25μερή αυτά αποκαλούνται ανιχνευτές πλήρους υβριδοποίησης (Perfect Match-PM) και είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να αναγνωρίζουν τμήματα του 3' άκρου του γονιδίου. Εκτός από τους ανιχνευτές πλήρους υβριδοποίησης, για κάθε γονίδιο υπάρχει και μία σειρά ανιχνευτών που αποκαλούνται ανιχνευτές ατελούς υβριδοποίησης (Mismatch-MM). Ο ανιχνευτής ατελούς υβριδοποίησης σχεδιάζεται ακριβώς όπως ο ανιχνευτής πλήρους υβριδοποίησης, με τη μόνη διαφορά πως το κεντρικό του νουκλεοτίδιο έχει αντικατασταθεί από κάποιο άλλο. Η χρησιμοποίηση των ανιχνευτών ατελούς υβριδοποίησης είναι να παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης της μη ειδικής υβριδοποίησης, που συνεισφέρει στο σήμα του ανιχνευτή. Τα σύνολα των ανιχνευτών πλήρους και ατελούς υβριδοποίησης για κάθε γονίδιο συνιστούν όλο το σύνολο των ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές πλήρους και ατελούς υβριδοποίησης κάθε συνόλου ανιχνευτών ενσωματώνονται σε έναν αλγόριθμο, με βάση τον οποίο αφαιρούνται οι τιμές υβριδοποίησης των ανιχνευτών ατελούς υβριδοποίησης από αυτές των ανιχνευτών πλήρους υβριδοποίησης, έτσι ώστε να καθοριστεί η ακριβής ένταση του σήματος για κάθε σύνολο ανιχνευτών. Ένα σύνολο ανιχνευτών συνήθως αποτελείται από 16 έως 20 ζευγάρια ανιχνευτών (πλήρους και ατελούς υβριδοποίησης) (Hardiman 2004). Η συνήθης μέθοδος ιχνηθέτησης στόχων στις *in situ* ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες αποτελεί η ιχνηθέτηση με μεταγραφή *in vitro* (*in vitro* transcription – IVT) (Lee 2004).

Εικ. A19 Χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για τις ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες υψηλής πυκνότητας.



Η επιλογή των ανιχνευτών για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης υπαγορεύεται από το σκοπό, που πραγματοποιείται αυτή η ανάλυση. Για παράδειγμα, οι ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση γνωστών αλλά και νέων μετάγραφων, για τον προσδιορισμό διαφορετικά ματισμένων μετάγραφων αλλά και θέσεων πολυαδενυλίωσης. Με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής τα γονίδια, που ενδιαφέρουν, επιλέγονται από γνωστές βάσεις δεδομένων, στις οποίες είναι καταγεγραμμένες οι αλληλουχίες των βάσεων των γονιδίων. Τέτοιες βάσεις είναι οι GeneBank, dbEST και UniGene (Dalma et al, 2006).

A.10.2 REAL-TIME PCR

A.10.2.1 Αρχή της μεθόδου

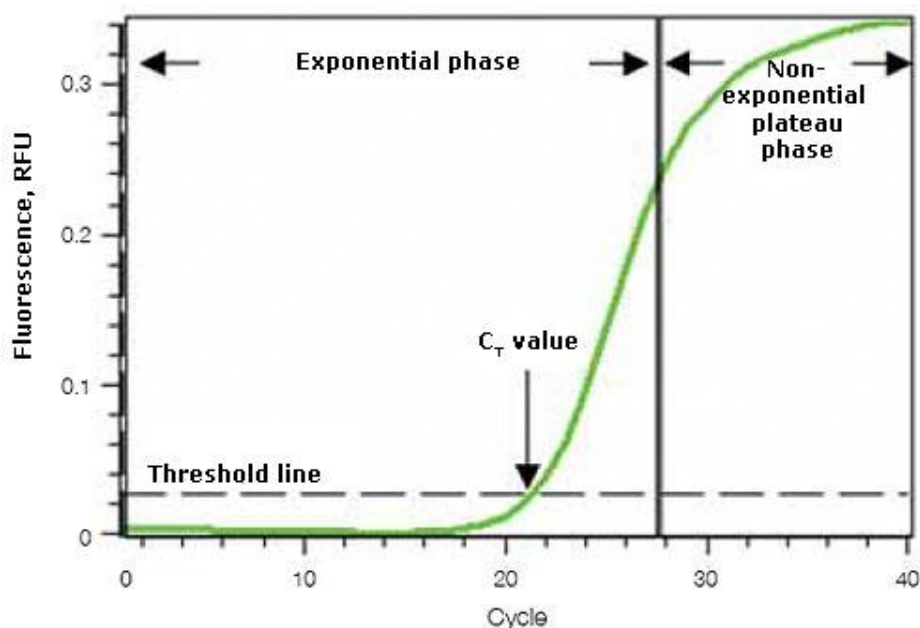
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) είναι μια μοριακή τεχνική κατά την οποία πραγματοποιείται λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp). Για την ενίσχυση αυτή, εκτός από το DNA, που λειτουργεί ως υπόστρωμα της αντίδρασης, χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών, οι εκκινήτες (primers), που είναι συμπληρωματικοί σε συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων. Σε κάθε κύκλο της ενίσχυσης οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται (denaturation step) με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας, για την πρόσδεση των εκκινήτων σε μια από τις δύο αλυσίδες του DNA (υβριδισμός, annealing step). Τέλος, πραγματοποιείται σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Συγκεκριμένα, η DNA πολυμεράση συμμετέχει στην επιμήκυνση των εκκινήτων, ώστε να παραχθούν πολλά αντίγραφα της αλληλουχίας.

Η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας ευαίσθητης, γρήγορης κι αξιόπιστης μεθόδου, της ποσοτικής PCR (quantitative PCR, qPCR). Η ποσοτική PCR διακρίνεται σε δύο είδη: την τελικού σημείου (end-point) και την πραγματικού χρόνου (real-time) PCR. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από μειωμένη αποδοτικότητα της αντίδρασης, καθώς η κατανάλωση των αντιδρώντων και η συσσώρευση αναστολέων οδηγούν στη μείωση της αξιοπιστίας της ποσοτικοποίησης. Ενώ στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, στη real-time PCR η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης με τη βοήθεια κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (Εικ. Α20). Στην εκθετική φάση (exponential phase) η απόδοση της αντίδρασης είναι 100%, καθώς σε κάθε κύκλο το προϊόν διπλασιάζεται και τα υλικά της αντίδρασης (πολυμεράση, εκκινητές, dNTPs) βρίσκονται σε περίσσεια. Στη συνέχεια τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται αναστολείς. Τότε η αντίδραση βρίσκεται στη γραμμική φάση, όπου παρατηρείται μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης. Κάποια στιγμή η αντίδραση της ενίσχυσης σταματά και η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Κατά την εκθετική φάση η πρώτη σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος σχετίζεται με την αρχική ποσότητα του υποστρώματος- στόχου. Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα τόσο πιο σύντομα θα παρατηρηθεί σημαντική αύξηση του φθορισμού. Μια σημαντική παράμετρος της ποσοτικοποίησης κατά τη real-time PCR αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle). Η τιμή C_t αντικατοπτρίζει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης, που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από εκείνη του μη- ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_t σχετίζεται αρνητικά με την αρχική ποσότητα του υποστρώματος, δηλαδή όσο πιο μικρή είναι η τιμή C_t τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al, 2005).

Εικ. Α20 Καμπύλη ενίσχυσης. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής C_t , ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.



A.10.2.2 Χημείες Real-Time PCR

Για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real-Time PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μη ειδικά ή τα ειδικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση, όπου ανήκει η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I, ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται κυρίως TaqMan probes, Molecular Beacons, Scorpions. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανίχνευσης με ειδικά συστήματα είναι ότι επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών (Bustin, 2000)

A.10.2.2.1 Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA (dsDNA). Η γνωστή και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική αυτής της κατηγορίας είναι η SYBR green I (Εικ. A21). Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η χρήση της χρωστικής SYBR green I αποτελεί την πιο απλή και οικονομική περίπτωση για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR σε αντιδράσεις πραγματικού χρόνου. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης αυτής της χρωστικής είναι ότι η SYBR green I είναι οικονομική, εύχρηστη και αρκετά ευαίσθητη. Επίσης, καθώς δεσμεύεται σε δίκλινη αλληλουχία DNA δεν είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός ανιχνευτών (probes) για κάθε συγκεκριμένο στόχο, που μελετάται. Αυτή η ιδιότητα της SYBR green I να δεσμεύεται σε κάθε δίκλινη αλληλουχία DNA αποτελεί ταυτόχρονα και μειονέκτημα της χρωστικής. Έτσι λοιπόν μπορεί να συνδέεται με ευκολία σε διμερή των εκκινητών (primer dimers) αλλά και σε μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να μην εκτιμάται σωστά η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος. Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί με το βέλτιστο σχεδιασμό των εκκινητών, ώστε η ανίχνευση των προϊόντων PCR με τη χρωστική SYBR green I να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα.

Εικ. A21 Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Η χρωστική φθορίζει (1), όταν συνδέεται σε δίκλινο μόριο DNA. Όταν το DNA αποδιατάσσεται (2), η χρωστική δεν είναι λειτουργική και το ποσό του φθορισμού ελαττώνεται αισθητά. Κατά την επέκταση (extension) (3) οι εκκινητές υβριδοποιούνται και το προϊόν αρχίζει να παράγεται. Όταν τελειώσει ο

πολυμερισμός η χρωστική SYBR green I δεσμεύεται στο δίκλωνο προϊόν, φθορίζει και το ποσό αυτού του φθορισμού είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προϊόντος.

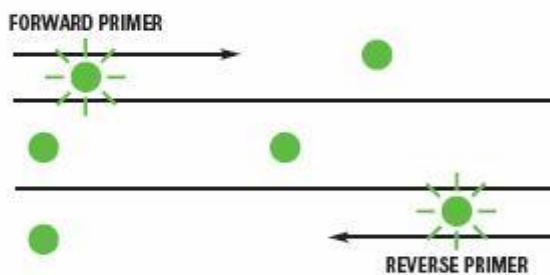
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



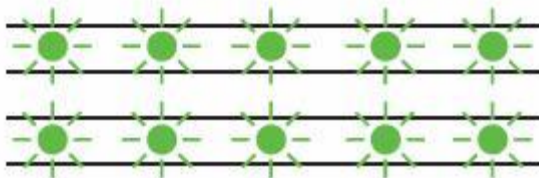
2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. **Polymerization completed:** When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.



A.10.2.2.2 Ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης ο ανιχνευτής, που χρησιμοποιείται είναι ειδικός για την αλληλουχία-στόχο. Οι ανιχνευτές έχουν τη δυνατότητα σήμανσης με διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, των οποίων τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής διευκολύνουν τον διαχωρισμό τους. Ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι που ανήκουν στη συγκεκριμένη κατηγορία αποτελούν οι Taqman probes, Molecular beacon probes και Scorpions.

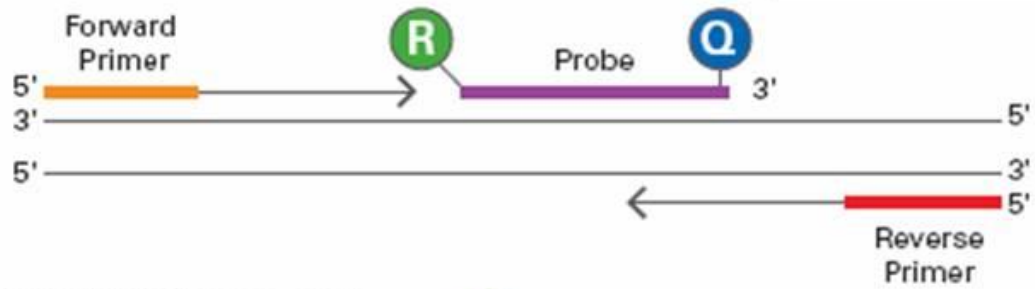
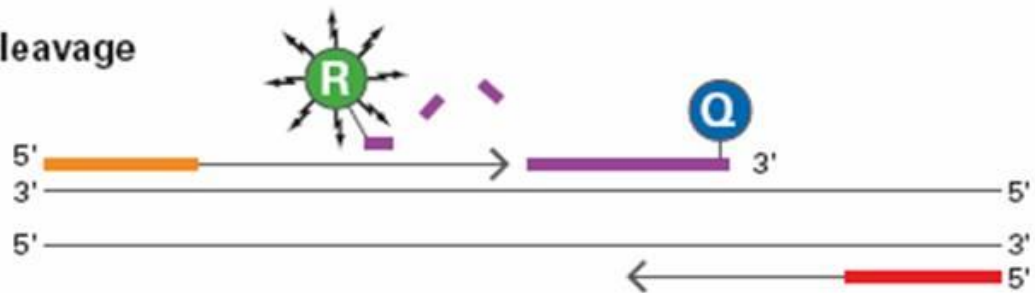
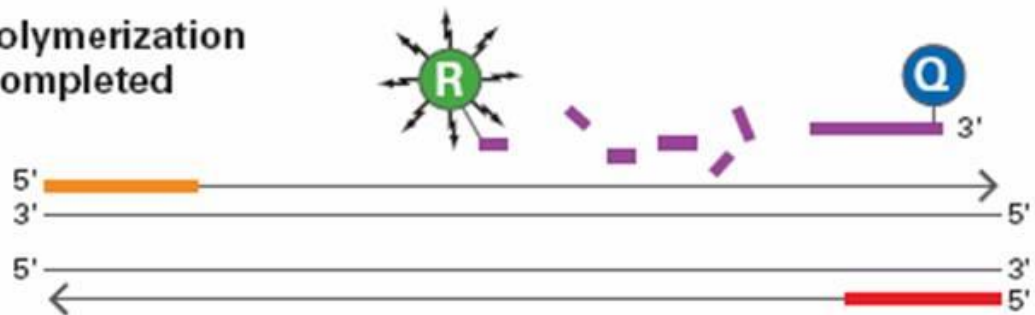
A.10.2.2.2.1 Taqman probes

Οι ανιχνευτές TaqMan (Taqman probes) εξαρτώνται από τη δράση της 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, που χρησιμοποιείται για την υδρόλυση του ανιχνευτή. Οι Taqman probes είναι ολιγονουκλεοτίδια, που φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο τους και μια άλλη χρωστική στο 3' άκρο τους, που απορροφά κι εξουδετερώνει το σήμα, που προέρχεται από την πρώτη. Αυτοί οι ανιχνευτές έχουν σχεδιαστεί, ώστε να υβριδοποιούνται σε μια εσωτερική περιοχή του PCR προϊόντος. Στην ανενεργή μορφή τους δεν παρατηρείται φθορισμός. Ο πολυμερισμός, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR, έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή του άκρου του ανιχνευτή από την πολυμεράση και τελικά τη διακοπή της αλληλοεξουδετέρωσης του σήματος. Έτσι παρατηρείται παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου αυξάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, καθώς αυξάνονται τα φθορίζοντα άκρα του ανιχνευτή που απελευθερώνονται. Η αύξηση της έντασης του φθορισμού είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος (Εικ. A22). Παρόλο που η σύνθεση των ανιχνευτών αυτών δεν είναι οικονομικά συμφέρουσα, η ανίχνευση των αναμενόμενων προϊόντων είναι πολύ εκλεκτική και αξιόπιστη, καθώς χρησιμοποιείται συγκεκριμένος ανιχνευτής για συγκεκριμένη αλληλουχία.

Εικ. A22 Αρχή της μεθόδου με Taqman probes. Η 5'-νουκλεάση της DNA πολυμεράση υδrolύει τον ανιχνευτή, και απελευθερώνει τη φθορίζουσα χρωστική που βρίσκεται στο 5' άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.

Polymerization

R = Reporter
Q = Quencher

**Strand Displacement****Cleavage****Polymerization Completed**

A.10.2.2.2 Molecular Beacons

Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα, τα οποία αφού αναδιπλωθούν, αποκτούν μια δομή που αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και ένα μονόκλωνο βρόγχο. Επιπλέον, η αλληλουχία του βρόγχου είναι συμπληρωματική προς μια εσωτερική περιοχή της ενισχυόμενης αλληλουχίας-στόχου.

Στο 5' άκρο, τα ολιγονουκλεοτίδια, φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική, ενώ στο 3' άκρο τους φέρουν ένα άλλο μόριο χρωστικής, που εξουδετερώνει το φθορίζον σήμα που παράγεται από την πρώτη. Η εξουδετέρωση του σήματος συμβαίνει όταν τα ολιγονουκλεοτίδια βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Τότε αυτά σχηματίζουν μια δομή βρόγχου-μίσχου και τα δύο μόρια χρωστικής βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο. Στο σημείο αυτό παρατηρείται μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) κι έτσι αποτρέπεται ο φθορισμός. Κατά τη διάρκεια της PCR, ο ανιχνευτής προσδένεται ειδικά στο προϊόν, αφού η αλληλεπίδραση μεταξύ ανιχνευτή-στόχου είναι θερμοδυναμικά πιο ευνοϊκή από την δομή βρόγχου-μίσχου του ανιχνευτή. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης οδηγεί στην απομάκρυνση των δύο μορίων χρωστικών και στην αδυναμία μεταφοράς ενέργειας μεταξύ τους μέσω FRET, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (Εικ. A23).

Οι Molecular beacons ανιχνευτές είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις ανίχνευσης πολλαπλών αλληλουχιών στόχων (multiplex reactions) χρησιμοποιώντας χρωστικές, που φθορίζουν σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Εικ. A23 Αρχή της μεθόδου Molecular Beacon. Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και ένα μονόκλωνο βρόγχο. Τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου είναι πολύ κοντά το ένα στο άλλο και αποτρέπεται η παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης απομακρύνει τις δύο χρωστικές, δεν παρατηρείται το φαινόμενο FRET και κατά συνέπεια να συμβαίνει παραγωγή φθορισμού.

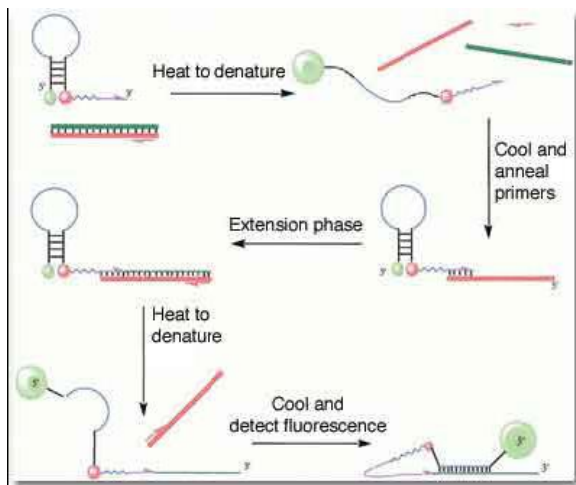
Molecular Beacon



A.10.2.2.2.3 Scorpions

Με αυτόν τον τύπο ανιχνευτή η ανίχνευση του προϊόντος πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου. Αυτός ο ανιχνευτής παρουσιάζει εικόνα βρόγχου-μίσχου, όταν δεν υβριδοποιείται. Και σε αυτή την περίπτωση ο ανιχνευτής φέρει μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο και μια άλλη χρωστική στο 3' άκρο, που εξουδετερώνει το φθορίζον σήμα, που παράγεται από την πρώτη. Η χρωστική στο 3' άκρο του μίσχου συνδέεται με μια αλληλουχία, που είναι συμπληρωματική στο προϊόν ενίσχυσης του εκκινητή. Αυτή η αλληλουχία συνδέεται στο 5' άκρο ενός ειδικού εκκινητή μέσω ενός μη ενισχυόμενου μονομερούς. Μετά την επέκταση του εκκινητή Scorpion, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται, μέσω του βρόγχου, στον ίδιο κλώνο του προϊόντος που επιμήκυνε. Η υβριδοποίηση αυτή συνεπάγεται την απομάκρυνση των δύο χρωστικών και την παραγωγή φθορισμού (Εικ. A24).

Εικ. A24 Αρχή της μεθόδου Scorpions.



A.10.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

A.10.2.3.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση χαρακτηρίζεται από μια πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος RNA γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων mRNAs. Με τη μέθοδο αυτή επιτρέπεται ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων ανά κύτταρο, της συγκέντρωσης ολικού RNA ή την ποσότητα μιας μονάδας ενός ιστού.

Αν και η χρήση πρότυπης καμπύλης προερχόμενης από γνωστά δείγματα RNA χρησιμοποιείται για τον ακριβή υπολογισμό των αντιγράφων άγνωστων δειγμάτων mRNAs, εντούτοις, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η σταθερότητα των μορίων RNA μπορεί να ποικίλει και να επηρεάζει με τον τρόπο αυτό την τελική ανάλυση.

Αυτός ο τρόπος ποσοτικοποίησης χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του ιϊκού ή βακτηριακού φορτίου σε βιολογικά υγρά. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση αλλαγών στην έκφραση mRNAs, σε περίπτωση απουσίας κατάλληλων ενδογενών γονιδίων-ελέγχου (housekeeping genes), τα οποία θα χρησιμοποιούνταν για την κανονικοποίηση. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης εξωτερικών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, για την ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων, αποτελεί η αδυναμία εντοπισμού και διόρθωσης πιθανών αναστολέων που επηρεάζουν την πορεία της αντίδρασης. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας κάποιο εσωτερικό δείγμα-ελέγχου (control), όπως για παράδειγμα ένα συνθετικό νουκλεϊνικό τμήμα που πολλαπλασιάζεται σε παράλληλη αντίδραση με τα δείγματα προς ανάλυση (Συμεωνίδου 2008).

A.10.2.3.2 Σχετική ποσοτικοποίηση

Στη σχετική ποσοτικοποίηση οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA, ενός κατάλληλου ενδογενούς συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου-ελέγχου (internal control). Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των Ct τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς (π.χ. RNA από φυσιολογικό ιστό στη περίπτωση εξέτασης

παθολογικού δείγματος). Οι τιμές Ct του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[\Delta\Delta]Ct}$, όπου $[\Delta\Delta]Ct = [\Delta]Ct_{\text{δείγματος}} - [\Delta]Ct_{\text{αναφοράς}}$. Η $[\Delta]Ct_{\text{δείγματος}}$ είναι η κανονικοποιημένη τιμή Ct για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου συστατικής έκφρασης, ενώ η τιμή $[\Delta]Ct_{\text{αναφοράς}}$ είναι η, αντίστοιχα, κανονικοποιημένη τιμή Ct για το δείγμα αναφοράς. Για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. (Livak and Schmittgen, 2001; Συμεωνίδου 2008).

A.11 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ωοθυλακιογένεση αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία κατά την οποία τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται μέσω των σταδίων του αρχέγονου, του πρωτογενούς, του δευτερογενούς ωοθυλάκιου και του ωοθυλακίου πριν την εμφάνιση του άντρου. Όσα από τα ωοθυλάκια δεν υφίστανται ατρησία συνεχίζουν στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο, από το οποίο τελικά το επικρατές ωοθυλάκιο (με διάμετρο περίπου 20 mm) επιλέγεται για την ωοθυλακιορρηξία. Κατά την ωοθυλακιορρηξία τα ώριμα (προ-ωοθυλακιορρηκτικά) ωοθυλάκια αποκρίνονται στην εκκριτική αιχμή της LH, διαρρηγνύονται και απελευθερώνουν το ώριμο ωοκύτταρο, ώστε αυτό να γονιμοποιηθεί.

Εντούτοις, συχνά παρατηρούνται προβλήματα υπογονιμότητας με τα αίτια να αφορούν και στα δύο φύλα, ώστε να είναι αδύνατη η γονιμοποίηση του ωοκυττάρου. Για το λόγο αυτό ακολουθούνται πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, κατά τα οποία γίνεται κυρίως πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας, γονιμοποίηση των ωαρίων κι εμφύτευση των εμβρύων.

Κατά τη διάρκεια είτε του φυσιολογικού είτε του προκλητού κύκλου, εκτός από την ωρίμανση του ωοκυττάρου, συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές στα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου (κοκκώδη και κύτταρα θήκης). Τα κοκκώδη κύτταρα εμφανίζονται νωρίς κατά την ωοθυλακιογένεση και από το αρχέγονο ωοθυλάκιο μέχρι το προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο διαφοροποιούνται όσον αφορά στο σχήμα, το μέγεθος και τον αριθμό τους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή ο ρόλος των κοκκωδών κυττάρων σε όλη την πορεία της ωοθυλακιογένεσης είναι σημαντικός, καθώς αλληλεπιδρούν στενά με το ωοκύτταρο. Επίσης, στα κοκκώδη κύτταρα διαφορετικά γονίδια εκφράζονται σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται και ο ρόλος τους κατά την ωοθυλακιογένεση.

Μετά από πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας τα προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια διαφέρουν σε μέγεθος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρά (5-10 mm) και μεγάλα ωοθυλάκια (>18 mm). Σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της διαφοράς του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα κοκκώδη κύτταρα του προ-ωοθυλακιορρηκτικού σταδίου σε σχέση με το μέγεθος του ωοθυλακίου. Πολλές μελέτες προσπαθούν να δώσουν απαντήσεις για τις αλλαγές, που παρατηρούνται στην γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων κατά την ωοθυλακική ανάπτυξη τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο. Προέκυψε λοιπόν το ερώτημα για το ποια είναι η σχέση της έκφρασης των γονιδίων λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία, ποιοι είναι οι παράγοντες, που υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων σε σχέση με εκείνα των μικρών ωοθυλακίων του προ-ωοθυλακιορρηκτικού σταδίου κι αντίστροφα και ποια είναι τελικά η σημασία της

δράσης αυτών των γονιδίων το χρονικό διάστημα, που απαιτείται, ώστε ένα ωοθυλάκιο με διάμετρο 5-10 mm να υπερβεί το φράγμα των 18 mm και να οδηγηθεί στην ωοθυλακιορρηξία. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε αρχικά καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων και απομόνωση RNA από τα κύτταρα. Ακολούθησε ανάλυση με μικροσυστοιχίες, μέθοδος που αποτελεί εργαλείο έρευνας πρώτης γραμμής για την αποκάλυψη νέων γονιδίων. Τέλος, έγινε επαλήθευση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν δείγματα γυναικών, που υποβλήθηκαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι παράγοντες υπογονιμότητας, που διαγνώστηκαν σε αυτά τα δείγματα, αφορούσαν σε σαλπιγγικό παράγοντα, σε ενδομητρίωση και σε ανδρική υπογονιμότητα. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στη μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ενώ η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, καθώς και στο εργαστήριο Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Οι γυναίκες, που συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα, υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενη ωθητική διέγερση για τις μεθόδους IVF/ICSI με μακρύ πρωτόκολλο διέγερσης ωθηκών με αγωνιστές GnRH. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από τη μέση του κύκλου χορηγήθηκε σε καθημερινή βάση 20IU αγωνιστή GnRH (leuprolide, Daronda, Abbott, Hellas). Στη συνέχεια χορηγήθηκε ανασυνδυασμένη FSH (rFSH, Gonal-F, Merk-Serono, Geneva, Switzerland) 14 ημέρες μετά τη θεραπεία με τον αγωνιστή και, όταν η τιμή της E_2 στον ορό είναι μικρότερη από 100 pmol/L, ενώ παράλληλα το πάχος του ενδομητρίου είναι μικρότερο από 5 mm. Η αρχική δόση της rFSH είναι 150IU και προσαρμόζεται στο κάθε άτομο από την 6^η ημέρα του κύκλου ανάλογα με τις τιμές της E_2 και τη διάμετρο του ωθυλακίου, η οποία μετρείται υπερηχογραφικά. Έπειτα, χορηγούνται 10000IU ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG, pregnyl Organon, Oss, The Netherlands), όταν ο μέσος όρος της διαμέτρου τουλάχιστον τριών ωθυλακίων είναι μεγαλύτερος των 16 mm και η συγκέντρωση της E_2 στο πλάσμα είναι μεγαλύτερη από 1500 pmol/L. Η ωληψία πραγματοποιείται 36 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG μέσω της διακολπικής οδού με τη βοήθεια της υπερηχογραφίας. Τα ωθυλάκια, που περιέχονται στο ωθυλακικό υγρό, κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες ανάλογα με τη διάμετρό τους. Έτσι, χωρίζονται σε μεγάλα ωθυλάκια, όταν η διάμετρός του είναι ≥ 18 mm και σε μικρά ωθυλάκια, όταν η διάμετρός τους είναι < 12 mm. Από τα δείγματα του ωθυλακικού υγρού, που συλλέγεται, το ωκύτταρο χρησιμοποιείται για τη γονιμοποίησή του, οπότε σε αυτά μένει το υπόλοιπο θυλάκιο, στο οποίο εμπεριέχονται τα κοκκώδη κύτταρα, που μας ενδιαφέρουν για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Το πρώτο βήμα για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα μετά από πρόκληση ωθυλακιορρηξίας, είναι η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών.

B.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΙΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Το ωοθυλακικό υγρό ,που συλλέγεται, φυγοκεντρείται για 10 min στις 1000 rpm.
- Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erpendorfs , σε κάθε ένα από τα οποία αναγράφεται ο αντίστοιχος κωδικός.
- Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο, χωρίς επέμβαση στο ίζημα, στο οποίο περιέχονται τα κοκκώδη κύτταρα. Το υπερκείμενο αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των ορμονών.
- Σε ένα φιαλίδιο (tube) 15 mL προστίθενται 3 mL φικόλη (ficoll), ώστε να διαχωριστούν τα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα από την καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων (η φικόλη συντηρείται στους 4°C , ενώ όταν χρησιμοποιείται, πρέπει να έχει θερμοκρασία γύρω στους 37°C και να είναι στο σκοτάδι).
- Συνήθως για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται δυο φιαλίδια με φικόλη. Σε κάθε ένα από αυτά προστίθεται υλικό ίδιου τύπου (ένα φιαλίδιο με κοκκώδη κύτταρα, που προέρχονται από μεγάλα ωοθυλάκια και το άλλο με τα αντίστοιχα από τα μικρά ωοθυλάκια)
- Στο ίζημα προστίθεται τόση ποσότητα PBS ώστε να προκύπτει τελικός όγκος 4 mL.
- Ακολουθεί ανάδευση του ιζήματος κ ο συνολικός όγκος των 4 mL προστίθεται αργά στη φικόλη, ώστε να μην προκύψει ανάδευση.
- Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 2000rpm για 1h.

B.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε πολυτριβλία των 6 θέσεων (6-well plates). Σε κάθε τριβλίο προστίθεται 475 μL PBS, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37°C , καθώς και 25 μL φιβρονεκτίνης (fibronectin). Η φιβρονεκτίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που ρόλος της στην καλλιέργεια είναι η μονιμοποίηση των κυττάρων.
- Γίνεται ανάδευση και τα τριβλία τοποθετούνται στον κλίβανο (37°C) για 30 min τουλάχιστον.
- Σε ένα φιαλίδιο 15 mL, στο οποίο αναγράφεται ο κωδικός του δείγματος και ο τύπος των ωοθυλακίων, προστίθεται η ενδιάμεση στιβάδα. Σε αυτήν προστίθενται 10 mL PBS, ώστε να απομακρυνθεί η φικόλη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 1000 rpm.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται μετά την επιπλέον προσθήκη 10 mL PBS.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 1000 rpm. Το ίζημα μετά τις πλύσεις δεν πρέπει να εμφανίζει κόκκινο χρώμα, ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση των κυττάρων με στοιχεία του αίματος.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται.
- Στο ίζημα προστίθενται 2,5-3 mL θρεπτικό μέσο (full medium), το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37°C και ακολουθεί ανάδευση και επαναϊώρηση του ιζήματος.
- Με μια πιπέτα πραγματοποιείται καλή ανάδευση, ώστε να μην προκύπτουν συσσωματώματα. Η πλάκα με τα πολυτριβλία αναδεύεται προς κάθε κατεύθυνση, ώστε τα κύτταρα να κατανεμηθούν ομοιόμορφα στο τριβλίο.
- Τα τριβλία εισάγονται στον κλίβανο, όπου παραμένουν για 24h. Η σωστή ανάπτυξη των κυττάρων προϋποθέτει τις κατάλληλες συνθήκες, δηλαδή επώαση στους 37°C και 5% CO₂.

B.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (την επόμενη μέρα)

- Το PBS και το θρεπτικό υλικό προθερμαίνονται στους 37°C.
- Τα τριβλία εξέρχονται από τον κλίβανο και αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από την προηγούμενη μέρα.
- Προστίθενται γύρω στα 3 mL PBS και ακολουθεί ανάδευση, ώστε να απομακρυνθούν τα λευκά αιμοσφαίρια από την καλλιέργεια.
- Μετά την πλύση προστίθενται 2.5 mL θρεπτικού μέσου, ακολουθεί ανάδευση και η πλάκα ελέγχεται στο μικροσκόπιο. Αν η καλλιέργεια δεν έχει καθαρίσει, ακολουθεί ακόμη μια πλύση με θρεπτικό μέσο (όταν οι καλλιέργειες γίνονται σε 24-well plate προστίθενται 0,5 mL θρεπτικού μέσου).

B.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Η συλλογή των κυττάρων γίνεται την 3^η μέρα μετά τη συλλογή των δειγμάτων και την καλλιέργεια.
- Αρχικά απαιτείται παγωμένο PBS
- Για την αποκόλληση των κυττάρων από τη βάση του τριβλίου χρησιμοποιείται ένα ειδικό εργαλείο, το οποίο, πριν την αποκόλληση βυθίζεται σε απεσταγμένο νερό (dsH₂O) κι έπειτα στο παγωμένο PBS.
- Αφαιρείται το full medium από την καλλιέργεια και προστίθενται περίπου 4mL παγωμένου PBS, ώστε να καθαρίσουν τα κύτταρα από τυχόν παραπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων ή άλλα άχρηστα μόρια.

- Αφαιρείται ο παραπάνω όγκος και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα, αν μετά από τον έλεγχο στο μικροσκόπιο, φαίνεται πως δεν έχουν καθαρίσει τα κύτταρα.
- Σε κάθε τριβλίο (αν έχει γίνει καλλιέργεια σε παραπάνω από ένα τριβλίο) προστίθενται 200μL PBS.
- Με το ειδικό εργαλείο για την αποκόλληση των κυττάρων ξύνεται η βάση του τριβλίου, ενώ η πλάκα του πολυτριβλίου είναι ανασηκωμένη.
- Τα κύτταρα συγκεντρώνονται και μεταφέρονται σε ένα erpendorf 1,5 mL.
- Προστίθενται άλλα 200μL PBS, ώστε να συλλέγουν τα κύτταρα, που τυχόν απέμειναν στο τριβλίο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 3 min.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα, που περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα, φυλάσσεται στους -80°C, μέχρι την απομόνωση RNA από αυτά.

B.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα περισσότερα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν έτοιμα διαλύματα με συγκεκριμένη συγκέντρωση. Υπήρχαν όμως κι άλλα, συγκεκριμένα το θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών, που απαιτεί την παρασκευή του στο χώρο του εργαστηρίου.

B.6.1 Προετοιμασία του εμβρυικού ορού βοοειδούς ως συστατικό του θρεπτικού μέσου

Ο εμβρυικός ορός βοοειδούς (FBS, fetal, bovine serum) χρησιμοποιείται συχνά ως συμπληρωματικό συστατικό του θρεπτικού μέσου των κυτταρικών καλλιιεργειών, καθώς περιέχει αναπτυξιακούς παράγοντες, ορμόνες, θρεπτικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους, και αρκετά άλλα απαραίτητα συστατικά. Πριν την προσθήκη του FBS στο καλλιιεργητικό μέσο είναι απαραίτητη η παρακάτω διεργασία:

- Τοποθετείται η φιάλη, που περιέχει τον ορό σε υδατόλουτρο στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Για την απενεργοποίηση διάφορων τυχαίων παραγόντων, όπως ιούς και μυκόπλασμα ο ορός μεταφέρεται σε υδατόλουτρο για 20 min σε θερμοκρασία 56°C .
- Πριν ανοιχτεί η φιάλη, που περιέχει τον FBS, αποστειρώνεται το καπάκι με αιθανόλη.
- Αφού ανοιχτεί, ο όγκος του ορού, που συνήθως είναι περίπου 500 mL, μοιράζεται σε φιαλίδια με το καθένα να περιέχει 45 mL από τον ορό. Τα φιαλίδια αυτά συντηρούνται στους -20°C .

- Όταν κάθε φιαλίδιο χρησιμοποιείται, συντηρείται στους 4°C.

B.6.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου (full medium)

Το θρεπτικό μέσο, που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων, περιέχει τα παρακάτω συστατικά με τους αντίστοιχους όγκους.

DAPCO medium	44,25 mL
Εμβρυικός ορός βοοειδούς (fetal bovine serum)	5 mL
Αντιμυκητιακό (Fungizone)	0,5 mL
Αντιβακτηριακό (Penicillium)	0,25 mL
Συνολικός όγκος	50 mL

B.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (RNA) ΑΠΟ ΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως προαναφέρθηκε τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πολυτριβλία των 6 τριβλίων. Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa σε τέτοια πολυτριβλία ο μέγιστος αριθμός τους φτάνει περίπου το 1×10^6 (Πίνακας Β1).

Πίνακας Β1. Περιοχή ανάπτυξης και αριθμός κυττάρων HeLa

Πολυτριβλία	Περιοχή ανάπτυξης (cm ³)	Αριθμός κυττάρων
96	0,32-0,6	$4-5 \times 10^4$
48	1	1×10^5
24	2	$2,5 \times 10^5$
12	4	5×10^5
6	9,5	1×10^6

Η απομόνωση RNA από κοκκώδη κύτταρα, που κάλυπταν μέχρι το 50% της συνολικής επιφάνειας του τριβλίου, πραγματοποιήθηκε με RNeasy Micro Kit (QIAGEN). Σύμφωνα με αυτό, η απομόνωση RNA είναι εφικτή, όταν το υλικό δεν ξεπερνά τα 5×10^5 κύτταρα.

B.7.1 Προετοιμασία για την απομόνωση RNA

Μετά τη συλλογή των κυττάρων συστήνεται η άμεση λύση τους με κατάλληλο διάλυμα, ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης. Με το διάλυμα λύσης των κυττάρων επιτυγχάνεται η απενεργοποίηση

διαφόρων τύπων RNάσης και άλλων πρωτεϊνών, η παρουσία των οποίων οδηγεί σε κατακερματισμό του RNA.

Είναι γνωστό πως το RNA είναι αρκετά ευαίσθητο μακρομόριο στις περιβαλλοντικές συνθήκες και απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή τόσο κατά το χειρισμό όσο και κατά τη μεταφορά και την αποθήκευσή του. Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο χώρο, αλλά τα κύτταρα έπρεπε να μεταφερθούν, ώστε να απομονωθεί το RNA.

Για την ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων προτείνονται δυο τρόποι. Ο πρώτος είναι τα κύτταρα να πελετοποιούνται (pelleted cells), να αποθηκεύονται μέχρι τη μεταφορά τους σε υγρό άζωτο (περίπου -196°C), να μεταφέρονται σε ξηρό πάγο (-78.5°C) και να αποθηκεύονται τελικά σε θερμοκρασία -80°C . Εναλλακτικά, στα κύτταρα μπορεί να προστεθεί σε θερμοκρασία δωματίου το RNAProtect Cell Reagent, ένα διάλυμα, που συμβάλλει στη σταθεροποίηση του RNA. Συγκεκριμένα, προστίθενται 300μL RNAProtect Cell Reagent (Qiagen) σε πελετοποιημένα κύτταρα και αυτά επαναιωρούνται πλήρως με ανάδευση με vortex. Μετά την προσθήκη του διαλύματος αυτού τα δείγματα είναι δυνατόν να μεταφερθούν από ένα εργαστήριο σε ένα άλλο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τελικά αποθηκεύονται στους 30°C για 1 ημέρα, σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) για περίπου 7 ημέρες, στους $2-8^{\circ}\text{C}$ για 1 μήνα ή αποθηκεύεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -20°C . Για τη μεταφορά των δειγμάτων αυτής της μελέτης ακολουθήθηκαν και οι δυο παραπάνω τρόποι. Αν έχει προστεθεί στα δείγματα το παραπάνω διάλυμα, τότε πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου για την απομόνωση του RNA, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 min στα $5000 \times g$. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο με μια πιπέτα και συνεχίζεται το πρωτόκολλο απομόνωσης του RNA, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

B.7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA για δείγματα με αριθμό $\leq 5 \times 10^5$ κυττάρων

- Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος λύσης (RLT buffer). Στο RLT buffer είναι απαραίτητο να προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME), μια χημική ουσία που ελαχιστοποιεί τις ριβονουκλεάσες κατά τη λύση των κυττάρων. Πολυάριθμοι δισουλφιδικοί δεσμοί καθιστούν τις ριβονουκλεάσες πολύ σταθερά ένζυμα. Η β-μερκαπτοαιθανόλη μειώνει το ποσοστό δημιουργίας των παραπάνω δεσμών και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες μη αντιστρεπτά. Έτσι οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες δε μπορούν να κατακερματίσουν πλέον το RNA (προστίθενται 10μL β-ME/ 1mL buffer RLT).

Σε κάθε δείγμα προστίθενται 350 μL μίγματος RLT buffer και β -ME.

Ακολουθεί ανάδευση χρησιμοποιώντας πιπέτα ή vortex.

- Το προϊόν της λύσης μεταφέρεται σε μια στήλη (QIAshredder spin column), η οποία τοποθετείται σε φιαλίδιο συλλογής (collection tube) των 2 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα.
- Προστίθενται 350 μL 70 % αιθανόλης στο φιαλίδιο συλλογής (collection tube) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και όχι φυγοκέντρηση.
- Το δείγμα, συμπεριλαμβανομένων και τυχόν κατακρημνίσεων, μεταφέρεται σε άλλη στήλη (Rneasy MinElute spin column). Φυγοκεντρείται για 15s στις 10000rpm. Με προσοχή απορρίπτεται το εναιώρημα, που προκύπτει, διότι το φιαλίδιο επαναχρησιμοποιείται.
- Προστίθενται 350 μL buffer RW1 στη στήλη με σκοπό την πλύση της επιφάνειάς της. Φυγοκεντρείται για 15s στις 10000rpm. Με προσοχή απορρίπτεται το εναιώρημα, που προκύπτει.
- Προστίθενται 10 μL Dnase I σε 70 μL buffer RDD. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή του φιαλιδίου, καθώς η Dnase I μετουσιώνεται ιδιαιτέρως εύκολα.
- Προστίθενται 80 μL του μίγματος της Dnase I ακριβώς στο κέντρο της στήλης και η επώαση διαρκεί 15min στους 20-30°C.
- Προστίθενται 350 μL Buffer RW1 στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15s στις 10000rpm. Απορρίπτεται τόσο το εναιώρημα όσο και το φιαλίδιο συλλογής.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συλλογής των 2 mL και σε αυτή προστίθενται 500 μL διαλύματος RPE. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s στις ≥ 10000 rpm για πλύση της μεμβράνης της στήλης. Απορρίπτεται το εναιώρημα.
- Προστίθενται 500 μL 80% αιθανόλης στην στήλη, που φυγοκεντρείται για 2 min στις ≥ 10000 rpm για πλύση της μεμβράνης της στήλης. Απορρίπτεται το εναιώρημα μαζί με το φιαλίδιο συλλογής.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συλλογής των 2mL. Με ανοικτό το καπάκι της στήλης ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στη μέγιστη ταχύτητα. Απορρίπτεται τόσο το εναιώρημα όσο και το φιαλίδιο.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συλλογής του 1,5 mL. Στο κέντρο ακριβώς της στήλης προστίθενται 14 μL νερό, που είναι απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (RNase- free water). Το καπάκι της στήλης κλείνεται ήπια και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min σε μέγιστη ταχύτητα. Το υλικό, που εκλούεται, περιέχει το RNA.

B.7.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA για δείγματα με αριθμό $\leq 1 \times 10^7$ κυττάρων

Η απομόνωση RNA από κοκκώδη κύτταρα, που κάλυπταν πάνω από το 50% της συνολικής επιφάνειας του τριβλίου, πραγματοποιήθηκε με RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Σύμφωνα με αυτό, η απομόνωση RNA είναι εφικτή, όταν το υλικό δεν ξεπερνά τα 5×10^7 κύτταρα.

- Για πελετοποιημένα κύτταρα προστίθεται ο κατάλληλος όγκος του διαλύματος RLT Plus (Πίνακας B2.) και το ίζημα, στο οποίο περιέχονται τα κύτταρα, διαλυτοποιείται με ανάδευση είτε με πιπέτα είτε με vortex. Σημείωση: στο buffer RLT Plus οπωσδήποτε έχει προστεθεί β -ME (10 μ L β -ME/1 mL RLT Plus).

Πίνακας B2. Κατάλληλος όγκος Buffer RLT Plus ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων

Αριθμός πελετοποιημένων κυττάρων	Όγκος Buffer RLT Plus
$< 5 \times 10^6$	350 μ L
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600 μ L

- Για την ομογενοποίηση του δείγματος αυτό μεταφέρεται σε μια στήλη (QIAshredder spin column) και φυγοκεντρείται για 2 min σε μέγιστη ταχύτητα.
- Το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρεται σε άλλη στήλη (gDNA Eliminator spin column) και φυγοκεντρείται για 30 s στις ≥ 10000 rpm. Απορρίπτεται η στήλη όχι όμως το φιαλίδιο συλλογής με το περιεχόμενό του.
- Προστίθενται (350 μ L ή 600 μ L) 70% αιθανόλης στο εναιώρημα και ακολουθεί ήπια ανάδευση με πιπέτα.
- Το δείγμα, που ο όγκος του δεν πρέπει να ξεπερνά τα 700 μ L, μεταφέρεται σε στήλη (RNeasy spin column) και φυγοκεντρείται για 15 s στις ≥ 10000 rpm. Απορρίπτεται το εναιώρημα.
- Στη στήλη προστίθενται 700 μ L διαλύματος RW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s στις ≥ 10000 rpm. Απορρίπτεται το εναιώρημα.
- Στη στήλη προστίθενται 500 μ L διαλύματος RPE για την πλύση της μεμβράνης της στήλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 s στις ≥ 10000 rpm. Απορρίπτεται το εναιώρημα.
- Επαναλαμβάνεται το παραπάνω στάδιο αλλά η φυγοκέντρηση γίνεται για 2 min στις ≥ 10000 rpm.

- Η στήλη τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συλλογής 2 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min σε μέγιστη ταχύτητα.
- Η στήλη τοποθετείται σε φιαλίδιο 1,5 mL και στο κέντρο της προστίθενται 30-50 μL νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες. Για την έκλουση του RNA πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 min στις ≥ 10000 rpm.

Το RNA, που απομονώνεται από τα κύτταρα ανεξάρτητα της ποσότητάς του, αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του. Τα παραπάνω δύο πρωτόκολλα αναφέρονται σε απομόνωση RNA από κύτταρα τα οποία ήταν πελετοποιημένα και αποθηκευμένα στους -80°C . Όπως προαναφέρθηκε, σε κάποια κύτταρα είχε προστεθεί RNAProtect Cell Reagent. Σε αυτήν την περίπτωση όλο το δείγμα μεταφέρεται σε ένα φιαλίδιο και φυγοκεντρείται για 5 min στις 8000 rpm. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα χρησιμοποιείται, όπως παραπάνω.

B.8 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA έγινε στον αναλυτή Agilent 2100 Bioanalyzer με τη βοήθεια της τεχνολογίας lab-on-a-chip. Εκτός από την ποιότητα στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ποιότητας του RNA αρχικά μέσω προσομοίωσης ηλεκτροφόρησης καθώς και τον αριθμό RIN (RNA Integrity Number).

Ο αριθμός αυτός προκύπτει βάσει της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, του λόγου των ριβοσωμικών ζωνών (απαιτείται $28\text{S}/18\text{S} = \sim 2$) καθώς και της παρουσίας ή απουσίας προϊόντων αποδόμησης του RN RIN A. Ο αριθμός RIN αποτελεί απαραίτητο εργαλείο, που καθορίζει ποια δείγματα είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν σε επόμενες μελέτες, όπως ανάλυση με μικροσυστοιχίες (microarray analysis), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) και ποια δείγματα θα εξαιρεθούν λόγω κακής ποιότητας. Η τιμή του αριθμού RIN κυμαίνεται μεταξύ 1-10. Συγκεκριμένα, αν η τιμή είναι 1, το RNA είναι πλήρως αποδομημένο ενώ, αν είναι 10, η ποιότητα του RNA είναι βέλτιστη.

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA χρησιμοποιήθηκε το Agilent RNA 6000 Nano Kit. Το πρωτόκολλο για την ποσοτικοποίηση του RNA είναι το παρακάτω:

Ετοιμασία της γέλης (gel):

1. Προστίθενται 550 μL RNA 6000 Nano gel matrix σε μια στήλη.
2. Ακολουθείται φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

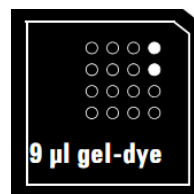
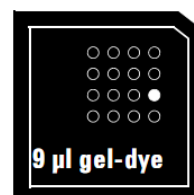
3. Σε φιαλίδια 0,5 mL απαλλαγμένα από ριβονουκλεάσες προστίθενται 65 μL του gel, που προκύπτει.

Ετοιμασία μίγματος γέλης-χρωστικής (Gel-Dye Mix)

1. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιούνται αφήνονται να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.
2. Η χρωστική RNA 6000 Nano dye concentrate αναδεύεται στο vortex για 10s.
3. Προστίθεται 1 μL χρωστικής σε 65 μL του gel, που έχει ετοιμαστεί στην προηγούμενο στάδιο.
4. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex, ώστε να αναδευτεί πλήρως το gel με τη χρωστική.
5. Το μίγμα χρωστικής-gel είναι τελικά έτοιμο για χρήση μετά από φυγοκέντρηση για 10 min στις 14000 rpm.

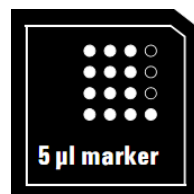
Φόρτωση του μίγματος γέλης-χρωστικής στο chip

1. Ένα καινούριο chip τοποθετείται στη βάση, πάνω στην οποία στερεώνεται ένα έμβολο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
2. Προστίθενται 9 μL από το μίγμα γέλης-χρωστικής στο κατάλληλο πηγαδάκι.
3. Έπειτα κλειδώνει η βάση, που περιέχει το chip και πιέζεται το έμβολο για 30s.
4. Προστίθενται άλλα 9 μL στα κατάλληλα πηγαδάκια. Το υπόλοιπο μίγμα απορρίπτεται.



Φόρτωση του RNA 6000 Nano Marker

1. Προστίθενται 5 μL από το RNA 6000 Nano Marker σε όλα τα πηγαδάκια, που είναι κατάλληλα για τα δείγματα, καθώς και στο πηγαδάκι για το ladder. Σε κάθε πηγαδάκι, που δε χρησιμοποιείται από δείγμα προστίθενται 6 μL από το RNA 6000 Nano Marker.



Φόρτωση του ladder και των δειγμάτων

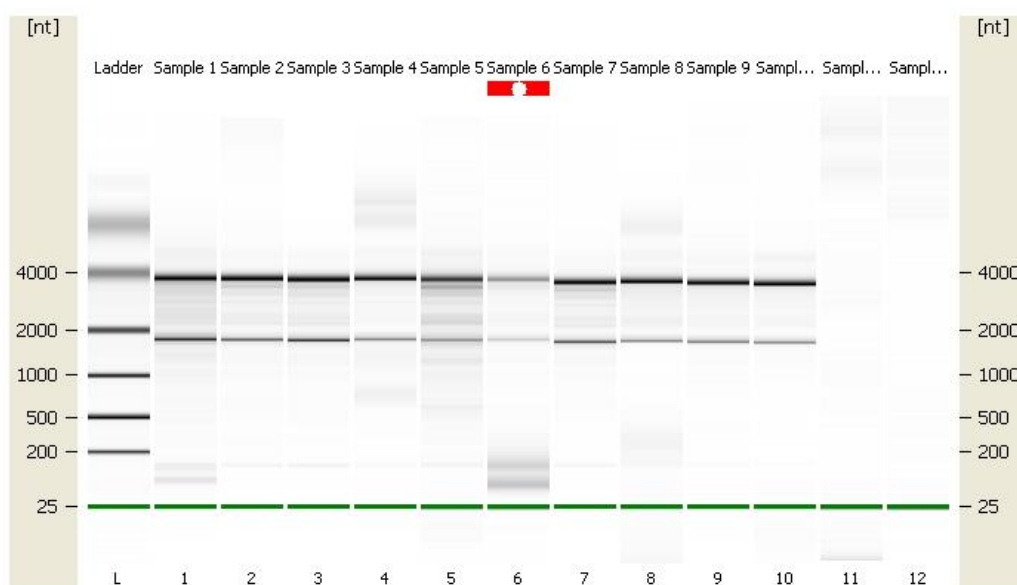
1. Προστίθενται 1 μL από το RNA 6000 ladder στο κατάλληλο πηγαδάκι.
2. Προστίθεται 1 μL δείγματος σε κάθε ένα από τα 12 πηγαδάκια. Προστίθεται 1 μL από RNA 6000 Nano Marker σε κάθε πηγαδάκι, που δε χρησιμοποιείται.

3. Το chip μεταφέρεται σε ειδικό vortex κι αναδεύεται για 1 min στις 2400rpm.
4. Τέλος, μεταφέρεται προσεκτικά το chip στο Agilent 2100 bioanalyzer, όπου πραγματοποιείται η ανάλυση.

B.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ RNA

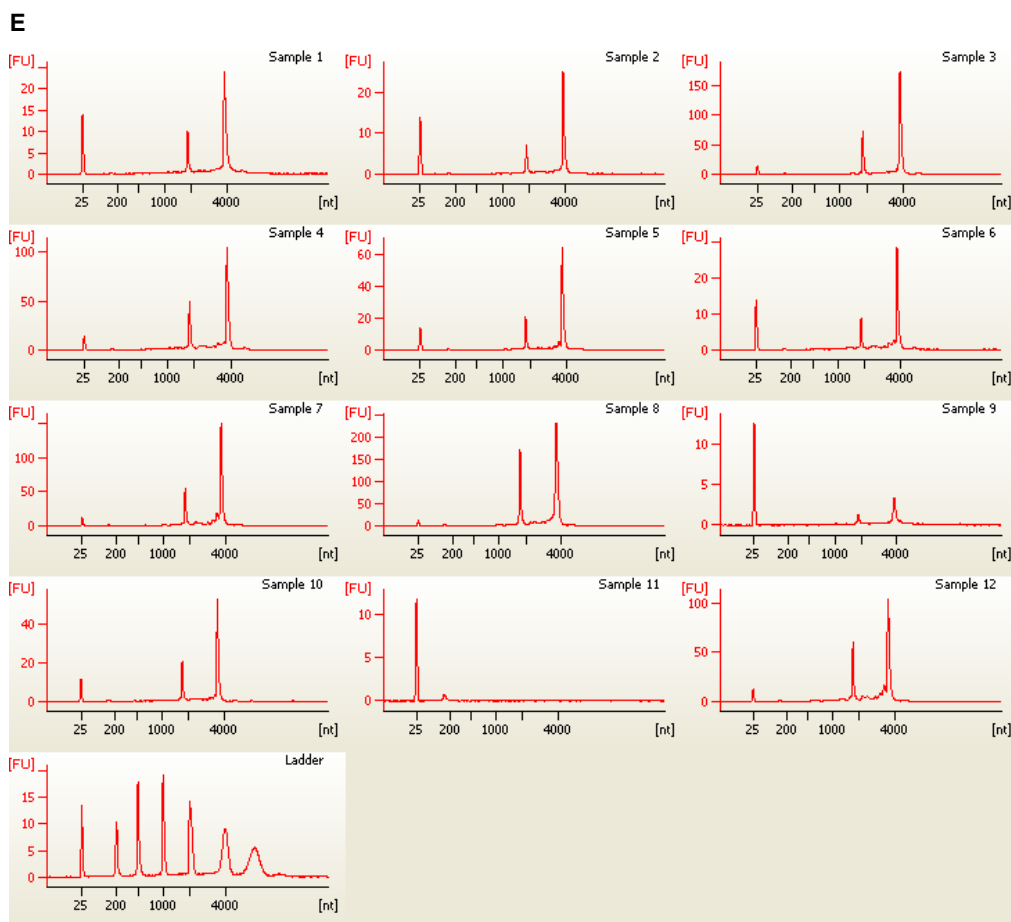
Καθώς το RNA, που απομονώθηκε, θα χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με μικροσυστοιχίες, η ποιότητά του απαιτείται να είναι άριστη. Σε ευκαρυωτικά δείγματα η ποιότητα του RNA ελέγχεται και με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, όπου η ζώνη του 28S rRNA είναι απαραίτητο να εμφανίζει διπλάσια ένταση σε σχέση με την 18S (Εικ. B1). Ο λόγος 2:1 (28S:18S) είναι μια καλή ένδειξη ότι το RNA είναι πλήρως ανέπαφο. Σε περίπτωση που το RNA έχει μερικώς ή πλήρως αποδομηθεί (degraded RNA), εμφανίζονται στη γέλη μικρού μοριακού βάρους ζώνες ανάμεσα στις ζώνες, που αντιστοιχούν στο 28S και 18S rRNA.

Εικ B1. Προσομοίωση γέλης αгарόζης για δείγματα RNA από το Agilent 2100 Bioanalyzer.



Η ποιότητα του RNA μπορεί επίσης να ελεγχθεί από το ηλεκτροφορόγραμμα, που προκύπτει από το λογισμικό του αναλυτή (Εικ. B2).

Εικ B2. Ηλεκτροφορόγραμμα. Για τα δείγματα (Sample1-12) η πρώτη κορυφή αναφέρεται στον marker, ενώ αυτές, που ακολουθούν στο 18S και στο 28S ριβοσωμικό RNA. Επίσης, μια επιτυχημένη πειραματική πορεία φαίνεται κ από το ηλεκτροφορόγραμμα του ladder, στο οποίο εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές 7 κορυφές.



Τα δείγματα RNA, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση με μικροσυστοιχίες, θα πρέπει να παρουσιάζουν ευδιάκριτες τις δύο ζώνες 18S και 28S rRNA, ενώ ο λόγος μετά από φωτομέτρηση των δειγμάτων σε ακτινοβολία 260 και 280nm απαιτείται να είναι $A_{260}/A_{280} > 1,8$. Τέλος ο αριθμός RIN κάθε δείγματος θα πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη του 8, ώστε να μπορέσει να συμπεριληφθεί στην ανάλυση με μικροσυστοιχίες.

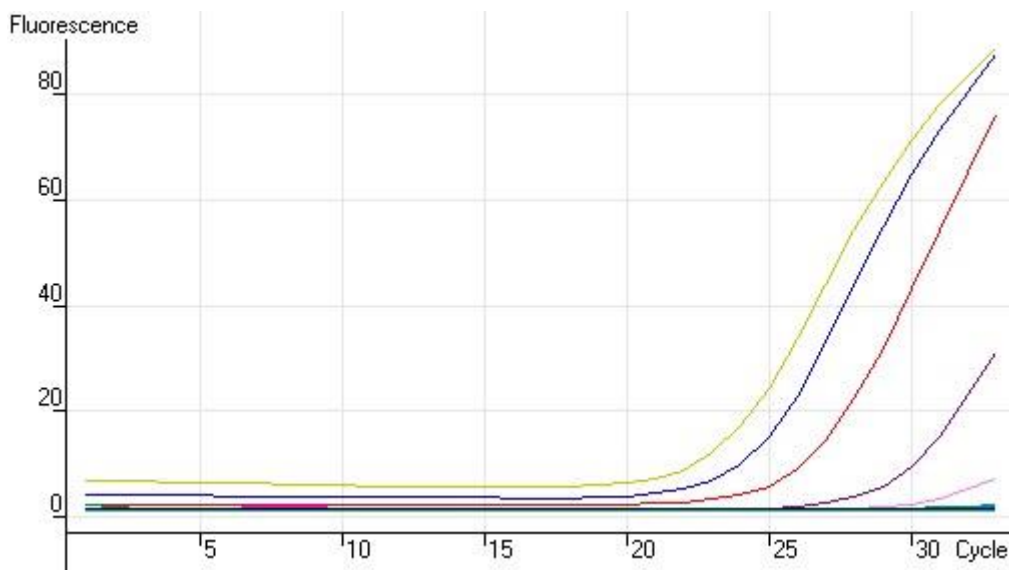
B.10 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ RNA ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ DNA

Όσα από τα δείγματα RNA κρίθηκαν κατάλληλα τόσο για την ποιότητα όσο και για την ποσότητα τους για περαιτέρω επεξεργασία είναι απαραίτητο να ελεγχθούν για τυχόν επιμόλυνση με DNA. Αυτό επιβάλλεται, αφού τα δείγματα, που συλλέχθηκαν, θα αναλυθούν με μικροσυστοιχίες.

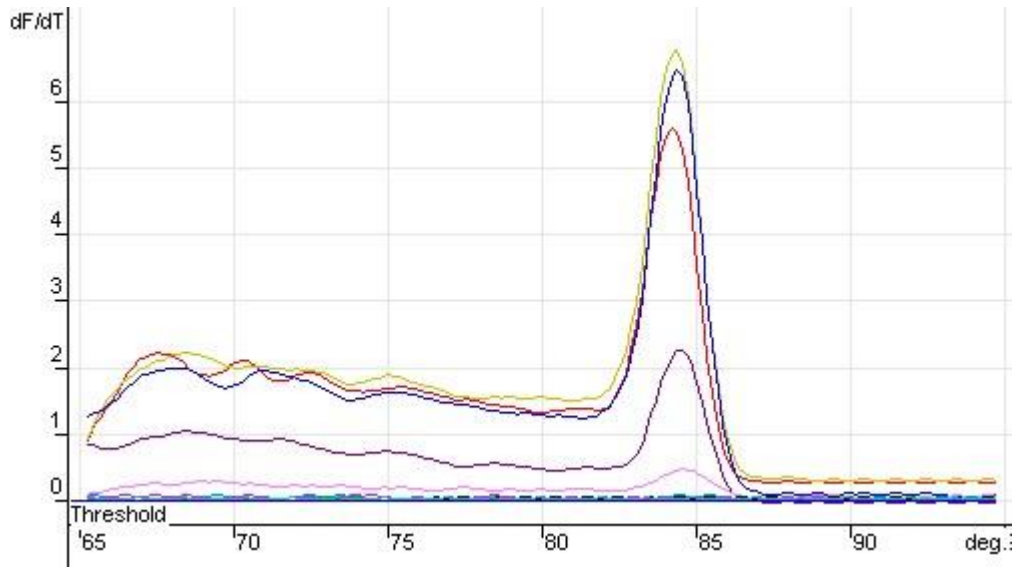
Ο έλεγχος πραγματοποιείται με real time PCR στον κυκλοποιητή Rotor-Gene 3000 (Corbett). Η ανίχνευση των DNA τμημάτων γίνεται με τη χρωστική SYBR green, που προσδένεται σε δίκλωνο DNA. Το σύμπλεγμα DNA-χρωστικής, που προκύπτει, απορροφά στο μπλε φάσμα ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) και εκπέμπει στο πράσινο φάσμα ($\lambda_{\max} =$

522 nm). Για την αντίδραση απαιτείται μια πρότυπη καμπύλη, που προκύπτει από διαδοχικές αραιώσεις δείγματος RNA γνωστής συγκέντρωσης.

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης περιλαμβάνει ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης στους 95°C για 5 min. Ακολουθούν 33 κύκλοι, σε καθέναν από τους οποίους αντιστοιχεί ένα στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 15 s κι ένα στάδιο υβριδισμού (annealing) στους 61°C για 15sec. Ακολουθεί ένα στάδιο στους 40°C για 1 min. Το ζεύγος των εκκινήτων, που χρησιμοποιήθηκε ήταν: forward(5'-3'):TCT/CCT/CCC/CAG/CCC/CAC/TCC και reverse(5'-3'):ACT/CCC/CGG/CAA/CCT/GAT/ACC/C.

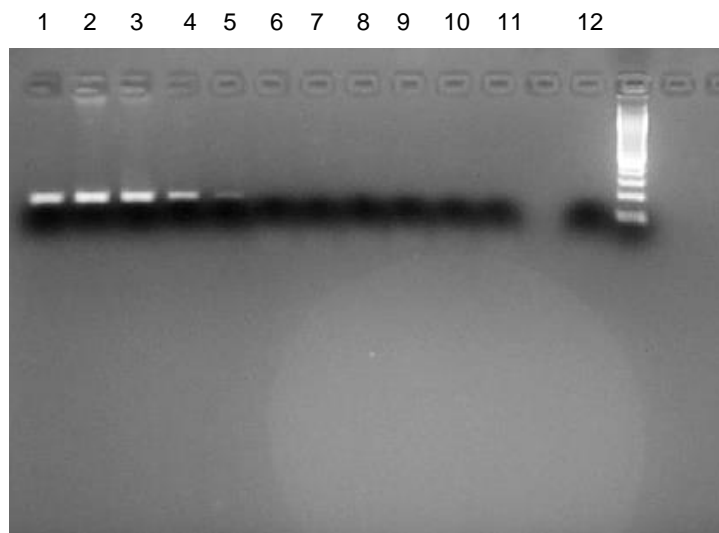


Με το τέλος της κυκλοποίησης ακολουθεί μελέτη της καμπύλης του σημείου τήξης του προϊόντος (Melting Curve Analysis) σε ένα εύρος από 65-95°C (Εικ). Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός του προϊόντος της PCR, καθώς και η διαφοροποίηση ανάμεσα σε ειδικό και μη ειδικό προϊόν (π.χ διμερή των ανιχνευτών). Το προϊόν ενίσχυσης του DNA (εάν υπήρχε) μεγέθους 160 bp παρουσιάζει $T_m = 82^\circ\text{C}$ (Εικ. Β3).

Εικ B3. Καμπύλη σημείου τήξης του προϊόντος (melting curve analysis)

Η παρουσία ή μη DNA στα δείγματα RNA μετά το τέλος της PCR ελέγχθηκε και σε γέλη αγαρόζης 2%.

Εικ B4. Έλεγχος επιμόλυνσης με DNA μετά από real-time PCR. 1-5: διαδοχικές αραιώσεις DNA γνωστής συγκέντρωσης(1. 10ng, 2. 50ng, 3. 25ng, 4. 1ng, 5. 0,1ng), 6-11:δείγματα RNA, 12: τυφλό δείγμα (blank).



Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, τα δείγματα στις θέσεις 1-5 αποτελούν τα δείγματα DNA, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την πρότυπη καμπύλη, ενώ τα 6-11 είναι δείγματα RNA, τα οποία ελέγχθηκαν, όπως και όλα τα δείγματα της μελέτης για την παρουσία ή μη DNA (Εικ. B4). Μόνο τα δείγματα RNA, τα οποία δεν

παρουσίασαν επιμόλυνση με DNA, συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση με μικροσυστοιχίες.

B.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ποιοι είναι οι μηχανισμοί και τα προϊόντα εκείνα, που προάγουν τη σωστή ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου, ώστε να φτάσει στο στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας κι τελικά να γονιμοποιηθεί και αν το μέγεθος του επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Ως πρώτο βήμα λοιπόν είναι η διαφορετική έκφραση των γονιδίων ανάμεσα σε μικρά και μεγάλα ωοθυλάκια. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με την ανάλυση με μικροσυστοιχίες, που αποτελεί μια τεχνική, η οποία παρέχει ένα τεράστιο όγκο πληροφορίας όσον αφορά στη γενετική έκφραση ενός εξεταζόμενου δείγματος. Επίσης είναι πολύ χρήσιμο εργαλείο, διότι με τα αποτελέσματα του προφίλ της γενετικής έκφρασης σε κάποιο δείγμα ανακαλύπτονται γονίδια, που πριν δεν είχαν συσχετιστεί με το συγκεκριμένο δείγμα. Πρέπει οπωσδήποτε να επισημανθεί πως η πληροφορία, που προκύπτει από την ανάλυση με μικροσυστοιχίες δε δίνει όλες τις απαντήσεις. Πρόκειται για μια απλή και γρήγορη μέθοδο, που αποκαλύπτει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, από τα οποία κάποια μπορούν να επιλεγούν για περαιτέρω ανάλυση.

Από τα δείγματα, που συλλέχτηκαν έγινε εξαγωγή ολικού RNA από κοκκώδη κύτταρα, που προέρχονται τόσο από μικρά όσο και από μεγάλα ωοθυλάκια. Για την ανάλυση με μικροσυστοιχίες όμως απαιτούνται συνολικά 5μg RNA. Καθώς μετά από τη μέτρηση των δειγμάτων η συγκέντρωση του RNA κυμαινόταν από 20-300ng/μL, επιλέχτηκε να ενωθούν τα δείγματα κάθε κατηγορίας και να προκύψουν τελικά δύο δείγματα. Στο 1^ο ομαδοποιήθηκε RNA, που προερχόταν από κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων, ενώ στο 2^ο ομαδοποιήθηκε RNA, που προερχόταν από κοκκώδη κύτταρα μικρών ωοθυλακίων. Το καθένα από τα δύο ομαδοποιημένα δείγματα αποτελούνταν από 16 επιμέρους δείγματα. Το RNA από κάθε ομαδοποιημένο δείγμα σημάνθηκε σύμφωνα με το πρότυπο πρωτόκολλο για την One-Cycle cDNA σύνθεση της εταιρείας Affymetrix.

Τα δείγματα, που συμμετέχουν στην ανάλυση με μικροσυστοιχίες, υφίστανται αρχικά μια επεξεργασία. Συγκεκριμένα, το ολικό RNA μεταγράφεται αντιστρόφως σε cDNA διπλής έλικας χρησιμοποιώντας ένα oligo-(dT) εκκινήτη, που περιέχει τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Στη συνέχεια το cDNA μεταγράφεται *in vitro* σε cRNA, που σημαίνεται με βιοτινυλιωμένα νουκλεοτίδια. Το cRNA τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια και υβριδοποιείται στο Affymetrix GeneChip. Ακολουθεί πλύση και χρώση με ένα μίγμα φυκοερυθρίνης- στρεπταβιδίνης. Τα σημασμένα δείγματα από κοκκώδη κύτταρα υβριδοποιούνται στην πλατφόρμα Human Genome U133 2.0 Plus array (Affymetrix), η οποία αναλύει την έκφραση περισσότερων των 50000 γονιδίων. Κάθε μετάγραφο αντιπροσωπεύεται και εξετάζεται από μια ή περισσότερες ομάδες ανιχνευτών (probe sets). Κάθε ομάδα ανιχνευτών αποτελείται από 11 ζευγάρια

ανιχνευτών. Κάθε ζευγάρι περιέχει ένα 25μερή ολιγονουκλωτιδικό ανιχνευτή, που ταιριάζει τέλεια στο στόχο και έναν που δεν ταιριάζει απόλυτα, ώστε να διορθώνεται η μη ειδική υβριδοποίηση. Η μικροσυστοιχία σαρώνεται από το σαρωτή GeneChip 3000 Scanner (Affymetrix) και η ένταση της υβριδοποίησης για κάθε ολιγονουκλεοτίδιο αποθηκεύεται ως ψηφιακό αρχείο. Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο MAF (Microarray Facility, VIB, Leuven, Belgium).

B.12 REAL TIME PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.

B.12.1 Real-time RT PCR για τον έλεγχο της έκφρασης της SHBG στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης.

Όπως έχει αναφερθεί στο προηγούμενο μέρος, οι Forges et al, 2005 ανέφεραν πως mRNA, που κωδικοποιούσε για την SHBG, εκφράζεται στις ωοθήκες, καθώς επίσης και σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία προέρχονται από δείγματα γυναικών, που υποβλήθηκαν σε μεθόδους αντιμετώπισης προβλημάτων υπογονιμότητας. Σε προηγούμενη μελέτη Forges et al, 2004 είχε αποδειχτεί ανοσοϊστοχημικά πως η SHBG είναι παρούσα σε διάφορα μέρη του ωοθυλακίου κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων της ωοθυλακιογένεσης. Για το λόγο αυτό η μελέτη ξεκίνησε με το ερώτημα, αν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση του γονιδίου της SHBG ανάμεσα σε μικρά και μεγάλα ωοθυλάκια. Επιλέχτηκε να πραγματοποιηθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου (real-time RT PCR) για ένα ζεύγος ειδικών εκκινήτων, που ενισχύει την αλληλουχία που εκτείνεται από το εξόνιο 1 έως το εξόνιο 2 (SHBG 1-2) (Πίνακας B3.)

Πίνακας B3 . Τα ζεύγη των εκκινήτων για τις δύο διαφορετικές αλληλουχίες του γονιδίου της SHBG.

SHBG 1-2 forward (5'-3')	TGC/TGC/TGT/TGC/TGC/TGT/TGC/TAC
SHBG 1-2 reverse (5'-3')	TCT/TGT/CCT/GGG/CCA/TTG/CTG/AG

Η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SuperScript III Platinum SYBR Green One step qRT-PCR kit (Invitrogen). Συγκεκριμένα η αντίδραση για κάθε δείγμα περιελάμβανε τα παρακάτω.

SuperScript III RT/PlatinumTaq Mix	0,5μL
2X SYBR Green Reaction Mix	10 μL
Forward primer, 10 μM	1μl
Reverse primer, 10 μM	1μL
RNA	5 μL
DEPC-treated water	μέχρι 20 μL

Το 2X SYBR Green Reaction Mix περιέχει SYBR Green I, MgSO₄, dNTPs και διάφορους σταθεροποιητές. Το SuperScript III RT/Platinum Taq Mix περιέχει την SuperScript III αντίστροφη μεταγραφάση, που είναι μια M-MLV αντίστροφη

μεταγραφάση, η οποία συνθέτει cDNA σε θερμοκρασία 42-60°C. Επειδή το ένζυμο αυτό δεν εμποδίζεται από ριβοσωμικό και μεταφορικό RNA, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA από ολικό RNA. Η Platinum Taq πολυμεράση είναι μια ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση, που κάνει σύμπλοκο με ένα αντίσωμα, το οποίο εμποδίζει την δραστικότητα του ενζύμου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι συνθήκες για την ενίσχυση των cDNA προϊόντων φαίνονται στον Πίνακα Β4.

Πίνακας Β4. Συνθήκες PCR για το γονίδιο της SHBG

	SHBG 1-2
Αντίστροφη μεταγραφή	60°C 20min
Αρχική αποδιάταξη	94°C 2 min
Αποδιάταξη	94°C 30 sec
Υβριδισμός	64°C 30 sec
Επιμήκυνση	72°C 30 sec
Μέτρηση φθορισμού προϊόντων	85°C 10 sec

Τα 4 τελευταία στάδια στον Πίνακα 4 επαναλαμβάνονται για 36 κύκλους. Το τελευταίο στάδιο της κυκλοποίησης (η μέτρηση φθορισμού των προϊόντων) είναι απαραίτητο, για να ελαχιστοποιηθεί η μέτρηση φθορισμού διμερών των εκκινητών (primer dimers) ή να μειωθεί ο θόρυβος από την ενίσχυση μη ειδικών τμημάτων. Αυτό επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό, διότι η θερμοκρασία αυτή είναι υψηλότερη από το σημείο τήξης (T_m) των ανεπιθύμητων προϊόντων και χαμηλότερη από το T_m της αλληλουχίας στόχου.

Ο έλεγχος της αποδοτικότητας της ενίσχυσης και της κανονικοποίησης των τιμών Ct έγινε μέσω μιας πρότυπης καμπύλης, που περιελάμβανε δείγματα RNA με συγκεντρώσεις, που κυμαίνονταν από 0,01-100 ng/μL. Η απόδοση της αντίδρασης αποτελεί σημαντικό δείκτη αξιοπιστίας και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Όταν η απόδοση είναι 100% (ή αλλιώς 1), η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, όταν είναι 90%, η ποσότητα του DNA αυξάνεται από 1 σε 1,9 φορές σε κάθε κύκλο ενώ αντίστοιχα αν είναι 80% και 70 %, η ποσότητα του DNA αυξάνεται κατά 1,8 και 1,7 φορές. Η βέλτιστη τιμή της απόδοσης κυμαίνεται από 0,9-1,1. Το RNA, που χρησιμοποιήθηκε για την πρότυπη καμπύλη, ήταν ηπατικής προέλευσης, καθώς το ήπαρ είναι ένας ιστός, όπου υπερεκφράζεται η SHBG. Η ποσότητα του RNA των δειγμάτων, που συμμετέχουν στις αντιδράσεις, είναι 100ng. Σε κάθε αντίδραση εκτός από τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης και τα RNA δείγματα από τα κοκκώδη κύτταρα (που ήταν προς ανάλυση), συμπεριλαμβανόταν πάντοτε ένα

δείγμα, που δεν περιείχε RNA (NTC, non-template control). Μετά το τέλος της κυκλοποίησης ακολουθούσε μελέτη της καμπύλης του σημείου τήξης του προϊόντος, με την οποία καθορίζεται η καθαρότητα του προϊόντος και αποκλείονται διμερή των εκκινητών ως πιθανά προϊόντα. Τα προϊόντα της PCR ελέγχονται και σε γέλη αγαρόζης 2%, για να επιβεβαιωθεί από το μέγεθος του προϊόντος πως πρόκειται για αυτό.

B.12.2 Σύνθεση cDNA .

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen). Σύμφωνα με αυτό το παράγεται η πρώτη αλυσίδα cDNA για χρήση σε qRT-PCR δύο βημάτων (two-step). Για τη σύνθεση του cDNA ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα

1. Η αντίδραση για κάθε δείγμα αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

2x RT Reaction Mix	10μL
RT Enzyme Mix	2 μL
RNA (μέχρι 1μg)	x μL
DEPC-treated water	μέχρι 20 μL

2. Αναμιγνύονται όλα τα συστατικά κι επωάζονται στους 25°C για 10 min.
3. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 30 min.
4. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με επώαση στους 85°C για 5 min και τα δείγματα μεταφέρονται άμεσα σε πάγο.
5. Προστίθεται 1 μL *E. coli* Rnase H και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 min.

Τα δείγματα, αν δε χρησιμοποιηθούν άμεσα, αποθηκεύονται στους -20°C. Το 2x RT Reaction Mix περιέχει oligo(dT)₂₀, τυχαία εξαμερή, MgCl₂ και dNTPs σε ένα μέσο, που είναι κατάλληλο για qRT-PCR. Το RT Enzyme Mix περιέχει την SuperScript III Reverse Transcriptase, που είναι μια εκδοχή της M-MLV RT. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA σε θερμοκρασία, που κυμαίνεται από 42-60°C, είναι σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες και δίνει μεγάλα ποσά cDNA και περισσότερα προϊόντα πλήρους μεγέθους σε σχέση με άλλες αντίστροφες μεταγραφάσες. Τέλος, η RNase H χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του υποστρώματος RNA στο μόριο cDNA:RNA μετά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας. Αυτό έχει δείξει πως αυξάνει την ευαισθησία της qRT-PCR.

B.12.3 Real-time PCR

Μετά τη σύνθεση cDNA ακολουθεί real-time PCR για κάθε γονίδιο, που έχει επιλεχτεί από την ανάλυση με μικροσυστοιχίες, με σκοπό να επαληθευτεί το αποτέλεσμα των μικροσυστοιχιών. Συγκεκριμένα, η αντίδραση για κάθε δείγμα περιελάμβανε τα παρακάτω:

20x probe mix	1 μL
2x TaqMan GeneExpression Master Mix	10 μL
cDNA	5 μL
DEPC-treated water	μέχρι 20 μL

Το 2x TaqMan GeneExpression Master Mix (ABI) είναι το πιο κατάλληλο για ανάλυση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Περιλαμβάνει AmpliTaq Gold DNA Polymerase UP (Ultra Pure), AmpErase UNG, Uracil-DNA Glycosylase (UDG), dNTPs με dUTP και άλλα απαραίτητα συστατικά. Το UDG και το dUTP αποτρέπουν την επανενίσχυση προϊόντων PCR από προηγούμενες αντιδράσεις, που ενδέχεται να επιμολύνουν τα νέα δείγματα. Το dUTP χρησιμοποιείται, για να επιβεβαιωθεί, πως οποιοδήποτε τμήμα DNA θα περιλαμβάνει ουρακίλη, ενώ το UDG απομακρύνει τα κατάλοιπα ουρακίλης από μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. με τον τρόπο αυτό οποιοδήποτε τμήμα DNA, που περιέχει dU, αποκλείεται να λειτουργήσει ως εκμαγείο σε επόμενες αντιδράσεις PCR.

Το 20x probe mix είναι διαφορετικό για κάθε γονίδιο, που εξετάζεται (ADAM28, SPP1, INSIG1, ITGAM, NCAM1, NPY1R, SLC27A6, SOX4, MLLT10). Περιέχει την αλληλουχία των ανιχνευτών (probes) και των εκκινητών (primers). Ο ανιχνευτής για όλα τα παραπάνω γονίδια σημανθεί στο 5' άκρο με τη φθορίζουσα χρωστική FAM. Τα probe mixes πρέπει να επιλέγονται έτσι, ώστε να καλύπτουν τα σημεία ένωσης των εξονίων, με σκοπό να μην ανιχνεύεται γονιδιωματικό DNA. Ο σχεδιασμός των ανιχνευτών κι εκκινητών έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς κακής ποιότητας σχεδιασμός θα επηρεάσει αρνητικά την ποσοτικοποίηση, καθώς τα αποτελέσματα θα είναι αναξιόπιστα. Για το λόγο αυτό τα probe mixes, προέρχονται από μια βάση δεδομένων, που έχει δημιουργήσει η Applied Biosystems και περιέχει έτοιμα και καλής ποιότητας probe & primers mixes (Πίνακας B5) για κάθε γονίδιο, που αναζητάται.

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στην γονιδιακή ποσοτική ανάλυση αποτελεί ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων βελτιώνεται με τη χρησιμοποίηση ενός σταθερού ενδογενούς παράγοντα ελέγχου, που διορθώνει τυχόν διακυμάνσεις από δείγμα σε δείγμα, καθώς και λάθη στην

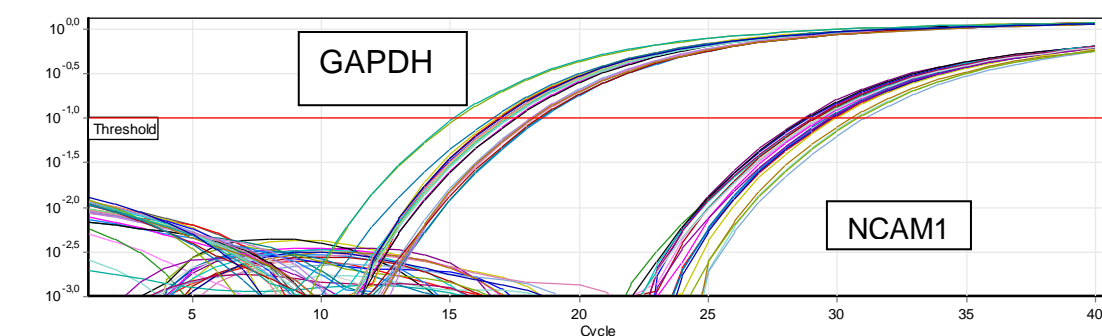
ποσοτικοποίηση κάθε δείγματος. Σε αυτήν την ανάλυση το γονίδιο αναφοράς (reference gene ή housekeeping gene), που επιλέχτηκε ήταν το GAPDH, καθώς βρίσκεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και η σύνθεση του mRNA του φαίνεται να είναι σταθερή στους διάφορους ιστούς. Ο ανιχνευτής για το GAPDH έχει σημειωθεί στο 5' άκρο επίσης με τη φθορίζουσα χρωστική FAM.

Πίνακας B5 . Τα 20x probe mixes για κάθε γονίδιο από την Applied Biosystems.

	ΓΟΝΙΔΙΑ	PROBE ID
Γονίδια, που υπερεκφράζονται στα μεγάλα ωοθυλάκια	ADAM28	Hs00248020_m1
	SPP1	Hs00960942_m1
	INSIG1	Hs00175767_m1
	ITGAM	Hs00355885_m1
Γονίδια, που υποεκφράζονται στα μεγάλα ωοθυλάκια	NCAM1	Hs00941821_m1
	NPY1R	Hs00168565_m1
	SLC27A6	Hs00204034_m1
	SOX4	Hs00268388_m1
	MLLT10	Hs00946148_m1
Ενδογενές γονίδιο	GAPDH	Hu GAPDH

Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν 2min στους 50°C (για την ενεργοποίηση του ενζύμου AmpErase UNG), 10min στους 95°C (για την ενεργοποίηση του ενζύμου AmpliTaq Gold DNA Polymerase) κι ακολουθούν 40 κύκλοι, που περιλαμβάνουν αποδιάταξη στους 95°C για 15s και υβριδισμό και μέτρηση του φθορισμού των προϊόντων στους 60°C για 60s. Σε κάθε αντίδραση το κάθε δείγμα ελέγχεται για την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου στόχου σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς (Εικ B5). Τα δείγματα, που πήραν μέρος στην ανάλυση, μετρήθηκαν εις διπλούν (duplicate).

Εικ B5. Στην αντίδραση αυτή κάθε δείγμα ελέγχεται για την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου στόχου σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς. Π.χ. ελέγχεται η έκφραση του NCAM1 σε σχέση με το GAPDH.



B.13 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΡΜΟΝΩΝ

Δείγματα ωοθυλακικού υγρού και ορού από γυναίκες με μικρά και μεγάλα ωοθυλάκια χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των ορμονών. Η συγκέντρωση της SHBG μετρήθηκε με το ELISA kit (SHBG-ELISA kit, Biosource, Biosource Europe S.A.-Rue de l'Industrie, 8-B-1400 Nivelles- Belgium). Ο συντελεστής απόκλισης, όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή είναι < 7,9% για την SHBG. Τα δείγματα, που πήραν μέρος στην ανάλυση, μετρήθηκαν εις διπλούν.

Η ολική τεστοστερόνη, η οιστραδιόλη, η LH και η FSH μετρήθηκαν με τον Abbott-ARCHITECT Immunoanalyser (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Ο συντελεστής απόκλισης, όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή είναι < 8,0% για την τεστοστερόνη, < 7,4% για την οιστραδιόλη, < 4,1% για την LH και < 4,6% για την FSH. Ο δείκτης ελεύθερων ανδρογόνων (FAI, free androgen index) υπολογίζεται με τον τύπο ολική τεστοστερόνη/ SHBG x 100.

B.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση όσον αφορά στη διαφορά έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό REST 2009 (Relative Expression Software Tool 2009). Πρόκειται για ένα εργαλείο, που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από ποσοτικές αντιδράσεις PCR. Η ανάλυση ή η ποσοτικοποίηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, ώστε να κανονικοποιήσει τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων στόχων (GOI, genes of interest) σε διαφορετικά δείγματα. Το λογισμικό REST 2009 εφαρμόζει ένα μαθηματικό μοντέλο, το οποίο λαμβάνει υπόψη τις διαφορετικές αποδόσεις των PCR αντιδράσεων για το γονίδιο στόχο και το γονίδιο αναφοράς. Το τεστ υπόθεσης ($P(H_1)$) αντιπροσωπεύει την πιθανότητα της υπόθεσης ότι η διαφορά ανάμεσα στα δείγματα και στα δείγματα ελέγχου να υφίσταται μόνο τυχαία.

Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το Kolmogorov-Smirnov τεστ. Η ανάλυση των διαφορών μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών έγινε με t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές, αλλά και με το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test. Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται ως μέση τιμή \pm SD. Ως στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε η τιμή $P < 0,05$. Οι αναλύσεις, που δεν αφορούν στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγιναν με το στατιστικό πακέτο Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (version 14.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες είχε ως στόχο την αποκάλυψη των γονιδίων εκείνων, που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλάκιων, που μπαίνουν στη φάση της ωοθυλακιορρηξίας μετά από πρόκληση της κι αν το μέγεθος του ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλάκιου επηρεάζει την έκφραση αυτών των γονιδίων. Με τη βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών και χρησιμοποιώντας το δείγμα με τα μεγάλα ωοθυλάκια ως το εξεταζόμενο δείγμα και το δείγμα με τα μικρά ωοθυλάκια ως το δείγμα ελέγχου ελέγχθηκαν ταυτόχρονα πάνω από 48000 γονίδια. Έχουν περιγραφεί πολλές στρατηγικές, για να ορίσουν πότε ένας ανιχνευτής της συστοιχίας δείχνει υπερέκφραση ή υποέκφραση κάποιου παράγοντα στο εξεταζόμενο δείγμα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Ο πιο απλός τρόπος είναι να χαρακτηριστεί ένας ανιχνευτής «σημαντικός» είναι να διαφέρει η έκφρασή του τουλάχιστον δύο φορές ανάμεσα στα δείγματα της ανάλυσης. Ο όρος, που χρησιμοποιείται, για να δηλώσει αυτή τη διαφορά, είναι γνωστός ως fold change και δηλώνει πόσες φορές η έκφραση του σήματος ενός γνωστού μετάγραφου αυξάνεται ή μειώνεται συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου.

Μετά την ανάλυση προέκυψε πως στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων υπερεκφράζονται περισσότερο από 3 φορές (3 fold up) 76 γονίδια και ESTs (Expressed sequence tags, μικρές υποαλληλουχίες μιας μεταγραφόμενης DNA αλληλουχίας), ενώ 5 γονίδια υποεκφράζονται (3 fold down). Τα γονίδια χωρίστηκαν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους (Πίνακας Γ1), ώστε να διευκολυνθεί η ανάλυση.

Πίνακας Γ1. Τα περισσότερα γονίδια, που υπερεκφράζονται (up regulated) ή υποεκφράζονται (down regulated) στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλάκιων και πως κατηγοριοποιούνται σε σχέση με τη λειτουργία τους. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια, που επιλέχτηκαν, ώστε να επαληθευτεί το αποτέλεσμα της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες.

ΓΟΝΙΔΙΑ	FOLD	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
CD32	3.38	Ανοσοσφαιρίνες
BLAME	3.68	
AIF1	3.84	
FCGR2A	3.38	
GPNMB	5.62	Γλυκοπρωτεΐνες
C1QA	3.66	Συμπληρωματικοί παράγοντες
C1QB	5.18	
EPB41L3	4.02	Δομικός ρόλος της μεμβράνης

HAMP	3.22	Ορμόνες/ ανάπτυξης/ παράγοντες παράγοντες	παράγοντες ρυθμιστικοί
FYB	4.10	Μεταγραφικοί παράγοντες	
SOX4	-3.26		
MLLT10	-3.78		
TFEC	3.26		
ERG2			
NPY1R	-3.4	Υποδοχείς/ σήματος	μεταβίβαση
MS4A4A	4.8		
SYK	3.78		
MSR1	3.22		
FPRL2	4.68		
EVI2A	3.5		
CSF2RB	3.24		
NCAM1	-3.88	Κυτταρική σηματοδότηση κυττάρων	πρόσφυση/
ITGAM	3.24		
SPP1	3.28		
SLC27A6	-4.5	Μεταβολικός ρόλος	/καταβολικός
KYNU	3,26		
CHI3L1	4,84		
INSIG1	3.98		
ACP5	4,46		
HMGCS1	3,84		
TDO2	3,68		
SAMSN1	3,44	Adaptor	
ADAM28	3.58	Πρωτεόλυση	
CTSH	3,38		
CTSS	3,86		

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών θα πρέπει να επαληθευτούν με ποσοτική PCR. Από τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν να εξεταστούν αρχικά τα γονίδια, που υποεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων και στη συνέχεια 4 από τα γονίδια, που υπερεκφράζονται (Πίνακας Γ2). Από τα γονίδια, που υπερεκφράζονται επιλέχθηκαν εκείνα, που έχει βρεθεί ότι

εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και που φαίνεται να σχετίζονται με την αναπαραγωγή.

Πίνακας Γ2. Τα γονίδια, για τα οποία θα επαληθευτεί το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών στη διάφορα έκφρασης ανάλογα με το μέγεθος του ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου.

ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ	ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ
ADAM28	SLC27A6
SPP1	NCAM
INSIG1	NPY1R
ITGAM	SOX4
	MLLT10

Γ.2 ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (qPCR)

Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε qPCR χρησιμοποιώντας για το κάθε γονίδιο το κατάλληλο TaqMan probe. Ως υπόστρωμα στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε cDNA τόσο από τα μεμονωμένα δείγματα, που αποτέλεσαν τα αθροισμένα (pooled) δείγματα, στα οποία έγινε η ανάλυση με μικροσυστοιχίες όσο και άλλα με μονωμένα δείγματα. Ακολούθησε σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantitation), με την οποία καθορίζονται οι αλλαγές στα επίπεδα του mRNA ενός γονιδίου σε διαφορετικά δείγματα σε σχέση με τα επίπεδα του RNA ενός γονιδίου αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση δεν απαιτεί δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις, που θα αποτελέσουν την καμπύλη αναφοράς, αλλά οι υπολογισμοί γίνονται με τη σύγκριση των τιμών C_i σε συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού. Όπως έχει αναφερθεί τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το ειδικό για τη γονιδιακή έκφραση στατιστικό πρόγραμμα REST 2009.

Γ.2.1 qPCR σε μεμονωμένα δείγματα, που συμπεριλήφθηκαν στα αθροισμένα δείγματα, για τα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με μικροσυστοιχίες.

Αρχικά η επεξεργασία έγινε για τα μεμονωμένα δείγματα (11 δείγματα με RNA από μεγάλα ωθυλάκια και 7 δείγματα από μικρά ωθυλάκια), που αποτέλεσαν τα δύο αθροισμένα δείγματα. Προκύπτει λοιπόν πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 3,329, P=0,028), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=3,084, P=0,044) και το ITGAM (fold=4,295, P=0,009) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας Γ3).

Πίνακας Γ3. Αποτελέσματα μετά από ποσοτική qPCR για τα γονίδια, που φαίνεται πως υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωθυλακίων και τα οποία περιλαμβάνονταν στα αθροισμένα δείγματα. REF: reference gene, TRG: target gene. Η έκφραση δείχνει πόσες φορές κατά μέσο όρο ένα γονίδιο υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΤΥΠΟΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ	P
GAPDH	REF	0,95	1,000	NS
ADAM28	TRG	0,95	3,329	0,028
SPP1	TRG	0,95	3,084	0,044

INSIG1	TRG	0,95	3,128	0,067
ITGAM	TRG	0,95	4,295	0,009

Επιπλέον, στα παραπάνω δείγματα ελέγχθηκε, αν υποεκφράζονται τα γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων. Από αυτά βρέθηκε πως υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1 (fold= -4.120, P=0,001), ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια SLC27A6, NPY1R, SOX4 και MLLT10 (Πίνακας Γ4).

Πίνακας Γ4. Αποτελέσματα μετά από ποσοτική qPCR για τα γονίδια, που φαίνεται πως υποεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων και τα οποία περιλαμβάνονταν στα αθροισμένα δείγματα. REF: reference gene, TRG: target gene. Η έκφραση δείχνει πόσες φορές κατά μέσο όρο ένα γονίδιο υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΤΥΠΟΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ	P
GAPDH	REF	0,95	1,000	NS
SLC27A6	TRG	0,95	-4,814	NS
NCAM1	TRG	0,95	-4,120	0.001
NPY1R	TRG	0,95	-3,386	NS
SOX4	TRG	0,95	-1,101	NS
MLLT10	TRG	0,95	-1,006	NS

Γ.2.2 qPCR σε μεμονωμένα δείγματα, που δε συμπεριλήφθηκαν στα αθροισμένα δείγματα, για τα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με μικροσυστοιχίες.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες σε δείγματα, που δε συμμετείχαν σε αυτήν την ανάλυση. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε qPCR σε 20 cDNA δείγματα, που προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων και σε 19 cDNA δείγματα, που προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα μικρών ωοθυλακίων. Προκύπτει λοιπόν πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 2,192, P=0,038), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=2,899, P=0,037) και το ITGAM (fold=2,875, P=0,045) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας Γ5).

Πίνακας Γ5. Αποτελέσματα μετά από ποσοτική qPCR για τα γονίδια, που φαίνεται πως υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων και τα οποία δεν περιλαμβάνονταν στα αθροισμένα δείγματα. REF: reference gene, TRG: target gene. Η έκφραση δείχνει πόσες φορές κατά μέσο όρο ένα γονίδιο υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΤΥΠΟΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ	P
GAPDH	REF	0,95	1,000	NS
ADAM28	TRG	0,95	2,192	0.038
SPP1	TRG	0,95	2.899	0.037
INSIG1	TRG	0,95	2.572	0.063
ITGAM	TRG	0,95	2.875	0.045

Επιπλέον, στα παραπάνω δείγματα ελέγχθηκε, αν υποεκφράζονται τα γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων. Από αυτά βρέθηκε πως υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1 (fold= -1.959, P=0,024) και το γονίδιο SLC27A6 (fold= -2.294, P= 0,027) ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια NPY1R, SOX4 και MLLT10 (Πίνακας Γ6).

Πίνακας Γ6. Αποτελέσματα μετά από ποσοτική qPCR για τα γονίδια, που φαίνεται πως υποεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων και τα οποία δεν περιλαμβάνονταν στα αθροισμένα δείγματα.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΤΥΠΟΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ	P
GAPDH	REF	0,95	1,000	NS
SLC27A6	TRG	0,95	-2.294	0.027
NCAM1	TRG	0,95	-1.959	0.024
NPY1R	TRG	0,95	-1,028	NS
SOX4	TRG	0,95	-1,6	NS
MLLT10	TRG	0,95	-1,028	NS

Γ.2.3 qRT- PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ SHBG ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ.

Για να διαπιστωθεί η διαφορά έκφρασης του γονιδίου της SHBG στα κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων, πραγματοποιήθηκε one-step qRT-PCR χρησιμοποιώντας SYBR green. Για κάθε δείγμα υπολογιζόταν η συγκέντρωση του RNA του γονιδίου της SHBG με βάση μια πρότυπη καμπύλη και η απόδοση της αντίδρασης (E, efficiency) έπρεπε να κυμαίνεται ανάμεσα σε $0,95 < E < 1,1$. Στον

πίνακα Γ7 απεικονίζεται πως δεν προκύπτει διαφορά στην έκφραση της SHBG στα κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων.

Πίνακας Γ7. Real time RT-PCR για το γονίδιο της SHBG

	Μικρά ωοθυλάκια	Μεγάλα ωοθυλάκια	P
Αριθμός δειγμάτων	21	33	
SHBG RNA(ng/mL)	0.72±0.40	0.63±0.37	NS

Γ.3 ΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ SHBG ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΥ.

Σε προ- ωθυλακιορρηκτικά ωχρινοποιημένα ωθυλάκια μελετήθηκε η σχέση του μεγέθους του ωθυλακίου με τις συγκεντρώσεις της SHBG, E₂, T, LH και FSH. Τα επίπεδα της SHBG του ωθυλακικού υγρού σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της SHBG στον ορό (r=0,411, P<0,001) και με τον ολικό αριθμό των ωθυλακίων (r=0,202, P<0,02). Ακόμη, τα επίπεδα της SHBG στον ορό σχετίζονται θετικά με τον ολικό αριθμό των ωθυλακίων (r=0,266, P<0,001). Οι συγκεντρώσεις τόσο της SHBG όσο και των ορμονών την ημέρα της ωληψίας απεικονίζονται στον Πίνακα Γ8. Οι συγκεντρώσεις της SHBG και της τεστοστερόνης ήταν υψηλότερες στα μικρά ωθυλάκια σε σύγκριση με τις τιμές τους στα μεγάλα ωθυλάκια. Η συγκέντρωση της E₂ ήταν υψηλότερη στα μεγάλα ωθυλάκια, αλλά η διαφορά σε σχέση με τα μικρά ωθυλάκια δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο λόγος E₂/ολική τεστοστερόνη ήταν σημαντικά υψηλότερη στα μεγάλα ωθυλάκια σε σχέση με τα μικρά ωθυλάκια (P<0,044). Οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών LH και FSH δε διέφεραν ανάμεσα στα μικρά και τα μεγάλα ωθυλάκια.

Πίνακας Γ8. Συγκεντρώσεις των ορμονών στο ωθυλακικό υγρό την ημέρα της ωληψίας σε σχέση με το μέγεθος του ωθυλακιορρηκτικού ωθυλακίου.

	Μεγάλα ωθυλάκια	Μικρά ωθυλάκια	P
SHBG (nmol/l)	85,85±34,88	102,9±35	P<0,028
E2 (nmol/l)	1816,23± 1192,66	1493,32±494,64	NS
T	18,75± 7,326	24,54±7,518	P<0,018
LH	0,4952± 0,281	0,683±0,162	NS
FSH	6,46 ±4,13	6,75±5,399	NS
FAI	18,033±14,03	23,035±8,63	P<0,039
E2/T	90,14± 38,49	67,68±30,12	P<0,044

Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο ± τυπική απόκλιση

Η σύγκριση έγινε με t-test. P< 0,05 θεωρείται το αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό. NS:non-significant, δηλ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

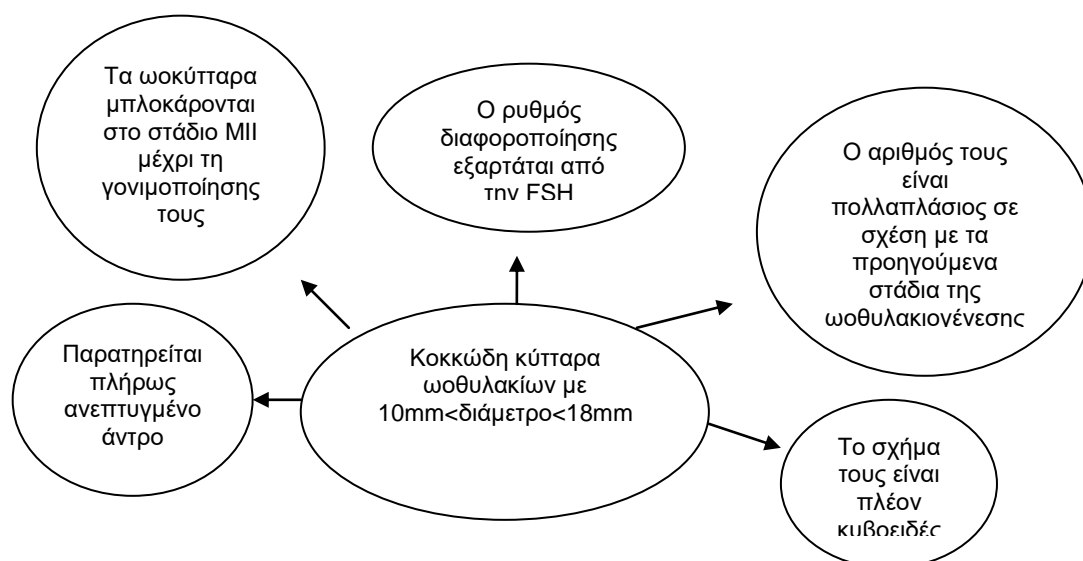
Η ωοθυλακιόγνεση είναι μια μακράς διάρκειας διαδικασία, που αρχίζει από την εμβρυική ζωή του θηλυκού ατόμου. Κύριος στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων από τα αρχέγονα κύτταρα μέχρι το στάδιο της ωοθυλακιόρρηξιας, όπου συνήθως ένα ώριμο και καλής ποιότητας ωοθυλάκιο απελευθερώνει το ωοκύτταρο από τα θυλακιακά κύτταρα (κυρίως κοκκώδη και κύτταρα θήκης), με σκοπό να γονιμοποιηθεί. Συχνά όμως παρατηρούνται προβλήματα υπογονιμότητας, που ανάλογα με τις αιτίες αντιμετωπίζονται με κάποια από τις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα, που εφαρμόζονται κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, προκαλείται ωοθυλακιόρρηξια, με αποτέλεσμα να ωριμάζουν αρκετά ωοθυλάκια.

Η ελεγχόμενη ωοθηκική υπερδιέγερση (COH) εφαρμόζεται συχνά κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς αυξάνει τον αριθμό των ωοκυττάρων, που αναπτύσσονται. Από αυτά τα ωοκύτταρα λίγα είναι εκείνα, που θα γονιμοποιηθούν και θα οδηγήσουν σε βιώσιμα έμβρυα. Η κατανόηση διαδικασιών, όπως η επιλογή, η ωοθυλακική ανάπτυξη και η ωοθυλακιόρρηξια έχει βοηθήσει στην ανάπτυξη των μεθόδων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ο σχεδιασμός της αγωγής έχει ως στόχο την ωρίμανση περισσότερων από ένα (όπως συμβαίνει κατά το φυσιολογικό κύκλο) ωοθυλάκια (Rosen et al, 2008). Αυτά τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται με διαφορετικό ρυθμό, με αποτέλεσμα τα προ-ωοθυλακιόρρηκτικά ωοθυλάκια να διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους. Έτσι στο στάδιο πριν την ωοθυλακιόρρηξια είναι δυνατόν να παρατηρούνται τόσο μικρά (5-10 mm) όσο και μεγάλα (≥ 18 mm) ωοθυλάκια. Τα ωοθυλάκια, που ωριμάζουν και φτάνουν στο προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο, διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους τόσο στα διαφορετικά άτομα όσο και από το ίδιο άτομο. Η χορήγηση hCG, που προσομοιάζει την εκκριτική αιχμή της LH, είναι το τελευταίο γεγονός, που καθορίζει την ωρίμανση του ωοθυλάκιου (Rosen et al, 2008). Η χορήγηση της hCG καθορίζεται από το μέγεθος του επικρατούντος ωοθυλάκιου ή το μέγεθος των ωοθυλακίων, που έχουν διεγερθεί και βρίσκονται στο προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο. Πολλές μελέτες έχουν υποστηρίξει πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα, που προέρχονται από μεγάλα ωοθυλάκια υπερτερούν (όσον αφορά στη γονιμοποίηση και την ποιότητα του εμβρύου) έναντι των ωοκυττάρων μικρότερων ωοθυλακίων (Ectors et al, 1997; Miller et al 1996). Παρόλα αυτά η ύπαρξη συσχέτισης της ικανότητας του ωοκυττάρου να γονιμοποιηθεί με το μέγεθος του ωοθυλακίου μετά από πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Για παράδειγμα, ενώ κάποιες μελέτες υποστηρίζουν πως ο μειωμένος ρυθμός γονιμοποίησης και η κακή ποιότητα του εμβρύου, που παρατηρείται σε ωοκύτταρα από μικρότερα ωοθυλάκια είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με ICSI (Bergh et al, 1998), κάποιες άλλες μελέτες υποστηρίζουν

πως η γονιμοποίηση του ωοκυττάρου είναι ανεξάρτητη από το μέγεθος του ωοθυλακίου, από το οποίο προέρχεται (Salha et al, 1998).

Τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται και ανάλογα με το μέγεθός τους, τη διαφοροποίηση των ωοθυλακικών κυττάρων και το σχηματισμό του άντρου κατηγοριοποιούνται σε αρχέγονα, πρωτοταγή, δευτεροταγή κι τέλος ώριμα Γραφιάνα ωοθυλάκια στο προωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο. Καθώς τα ωοκύτταρα αναπτύσσονται, υφίστανται σημαντικές αλλαγές στη δομή τους κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιόγένεσης. Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου περιλαμβάνει δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται αργά και ο ρυθμός ανάπτυξης του ωοθυλακίου είναι άρρηκτα δεμένος με τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Στη δεύτερη και τελική φάση ανάπτυξης του ωοθυλακίου ο ρυθμός ανάπτυξής του ωοθυλακίου επιταχύνεται και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση και μεγέθυνση του άντρου. Επίσης, συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων (Εικ. Δ1). Αυτή η φάση της ωοθυλακικής ανάπτυξης εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες. Η FSH παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων όσο και στην επιβίωσή τους. Η LH προκαλεί τη στεροειδογένεση στα κύτταρα θήκης και οδηγεί σε τελική ωρίμανση των κοκκωδών κυττάρων του προ- ωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου (Monniaux et al, 1997).

Εικ. Δ1 Τα χαρακτηριστικά των κοκκωδών κυττάρων των ωοθυλακίων στο στάδιο λίγο πριν και κατά την ωοθυλακιόρρηξία.



Τα κοκκώδη κύτταρα, που περιβάλλουν το ωοκύτταρο αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του ωοθυλάκιου και συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του τελευταίου. Τα κοκκώδη κύτταρα αναπτύσσουν αμοιβαία συνεργασία με το ωοκύτταρο κατά την ωοθυλακιογένεση (Buccione et al, 1990;Errig et al, 2002;Senbon et al, 2003). Επίσης, αναπτύσσουν επικοινωνία με τα κύτταρα θήκης, μαζί με τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή φυλετικών στεροειδών. Επειδή ο ρόλος των κοκκωδών κυττάρων κατά την ωοθυλακιογένεση είναι πολύ σημαντικός, παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα αυτά για την κατανόηση συγκεκριμένων αλλαγών, που συμβαίνουν στο ωοθυλάκιο (Hamel et al, 2008). Έτσι κάποιες ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει για παράδειγμα τις επιδράσεις της FSH στη μεταγραφική ρύθμιση ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων (Sassoon et al, 2003;Perman et al, 2006), ενώ άλλες μελέτες έχουν ερευνήσει το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των κοκκωδών κυττάρων σε διάφορα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης καθώς και σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων στο ωοκύτταρο τόσο στον άνθρωπο (MacKenzie et al, 2004;Zhang et al, 2005; Assou et al, 2006) όσο και σε ποντικούς (Hernandez-Gonzalez et al, 2006). Επίσης, οι Hamel et al, 2008 μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα σε σχέση με την ικανότητα του ωοκυττάρου να γονιμοποιηθεί.

Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα την ημέρα της ωοληψίας μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας. Η διέγερση των ωοθηκών έχει ως στόχο την ωρίμανση πολλών ωοθυλακίων σε ένα κύκλο. Τα ωοθυλάκια αυτά διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους, με αποτέλεσμα να προκύπτουν τόσο μικρά (5-10 mm) όσο και μεγάλα (>18 mm) ωοθυλάκια. Οι γυναίκες με PCOS εμφανίζουν συχνά μικρότερα σε μέγεθος ωοθυλάκια, ενώ έχει παρατηρηθεί πως ο αριθμός των μικρών ωοθυλακίων με εμφάνιση άντρου μειώνεται με την ηλικία και αυτή η μείωση μπορεί να είναι ενδεικτική για το απόθεμα των ωοθηκών (Haadsma et al, 2007). Στα δείγματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε πως γυναίκες χωρίς ενδοκρινολογικές ανωμαλίες (π.χ. PCOS) μετά από ωοθηκική διέγερση εμφάνιζαν μόνο μικρά ωοθυλάκια, ενώ κάποιες άλλες μόνο μεγάλα ωοθυλάκια. Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις θεώρησαμε πως τα γονίδια, που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλάκιου σε σχέση με το μέγεθός του μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας την ημέρα της ωοληψίας παρουσιάζουν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος και η λειτουργία τους στον άνθρωπο. Αυτή η διδακτορική διατριβή είναι η πρώτη προσπάθεια να αποκαλυφθεί το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης στα κοκκώδη κύτταρα των ώριμων ωοθυλακίων λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία σε συνάρτηση με το μέγεθος των ωοθυλακίων.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων από μικρά (διάμετρος ωοθυλάκιου <math><12\text{mm}</math>) και μεγάλα (διάμετρος ωοθυλάκιου >18 mm) ωοθυλάκια. Ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κοκκώδη κύτταρα και τα δείγματα των δύο παραπάνω ομάδων συνενώθηκαν και αποτέλεσαν δύο αθροισμένα (pooled) δείγματα, ένα για κάθε ομάδα. Για να εκτιμηθεί η διαφορά της έκφρασης γονιδίων ανάμεσα σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλάκιων, πραγματοποιήθηκε αρχικά ανάλυση με μικροσυστοιχίες, καθώς είναι μια δυναμική τεχνική, που πληροφορεί για την διαφορά έκφρασης χιλιάδων γονιδίων (Bednar 2000) (συνήθως πάνω από 50000 γονίδια) ανάμεσα στα εξεταζόμενα δείγματα, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους ανιχνευτές για κάθε γονίδιο σε μια μονή συστοιχία υβριδοποίησης (Harrington et al, 2000). Στην επεξεργασία των δειγμάτων προέκυψαν δυσκολίες, που αφορούσαν κυρίως στη μικρή ποσότητα RNA, που απομονώθηκε από τα κοκκώδη κύτταρα και στο μικρό αριθμό δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων από μικρά ωοθυλάκια. Η μικρή σχετικά ποσότητα RNA, που απομονώθηκε οδήγησε στη συνένωση δειγμάτων της ίδιας κατηγορίας (μικρά ή μεγάλα ωοθυλάκια), καθώς για την ανάλυση με μικροσυστοιχίες, απαιτείται από κάθε δείγμα ποσότητα RNA ίση περίπου με 5μg.

Η ανάλυση όμως με μικροσυστοιχίες δεν είναι αρκετή, για να οδηγηθεί ένας ερευνητής σε οριστικά αποτελέσματα. Η επιστημονική πρακτική καθιστά απαραίτητη την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτή της μεθόδου με μια πιο ευαίσθητη μέθοδο, όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) (Chuaqui et al, 2002). Αν και τα δεδομένα από ανάλυση με μικροσυστοιχίες είναι πλέον περισσότερο αξιόπιστα (Luzzi et al, 2003), αυτό δε συμβαίνει στο σύνολο των αναλύσεων (Harbig et al, 2005), με αποτέλεσμα να απαιτείται πάντα η επιβεβαίωση με RT-PCR. Από την ανάλυση με μικροσυστοιχίες ένα γονίδιο υπερεκφράζεται σε ένα δείγμα, όταν η έκφραση ενός γονιδίου σε ένα δείγμα διαφέρει περισσότερο από 2-3 φορές (fold change >2-3) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Το ανάλογο συμβαίνει όταν ένα γονίδιο υποεκφράζεται στο υπό μελέτη υλικό.

Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων RNA από κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων πραγματοποιήθηκε για πάνω 50000 γονίδια. Το εξεταζόμενο δείγμα αποτέλεσαν τα κοκκώδη κύτταρα από μεγάλα ωοθυλάκια, ενώ αντίστοιχα τα κοκκώδη κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων αποτέλεσαν το δείγμα ελέγχου. Βρέθηκε πως στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων τη χρονική στιγμή της ωοληψίας υπερεκφράζονται 76 γονίδια κι ESTs, ενώ υποεκφράζονται 5 γονίδια. Τα γονίδια, που υπερεκφράστηκαν ή

υποεκφράστηκαν στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων αρχικά κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη λειτουργία τους.

Επιλέχθηκαν να επιβεβαιωθούν με RT-PCR τα υποεκφραζόμενα γονίδια, δηλαδή τα γονίδια, που υπερεκφράζονται στα μικρά ωοθυλάκια, ώστε να εκτιμηθούν οι παράγοντες, που ουσιαστικά δεν επιτρέπουν στα μικρά ωοθυλάκια να αυξηθούν περαιτέρω σε μέγεθος και πιθανόν να επηρεάζουν και την ωριμότητα των ωοθυλακίων, καθώς μελέτες, που αφορούν στην υπογονιμότητα υποστηρίζουν πως η ανάπτυξη πολλών μικρών ωοθυλακίων καθιστά αμφίβολα τα αποτελέσματα της πρόκλησης ωοθυλακιόρρηξίας, δυσκολεύει το χειρισμό τους και συχνά οδηγεί σε OHSS (Blankstein et al., 1987; Navot et al., 1988). Από τα γονίδια, που φαίνεται πως υποεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, το SLC27A6 κωδικοποιεί παράγοντες μεταφοράς λιπαρών οξέων στα κύτταρα, το NCAM1 συμμετέχει στην κυτταρική πρόσφυση, το NPY1R ανήκει σε υποδοχείς, που λειτουργούν ως επαγωγείς συστημάτων, ενώ τα SOX4 και MLLT10 ανήκουν σε οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες για τα γονίδια, που υπερεκφράζονται έγινε για 4 γονίδια, που από μελέτες έχει προταθεί πως συμμετέχουν με κάποιο ρόλο στη αναπαραγωγική διαδικασία. Επίσης, τα γονίδια αυτά με βάση τη λειτουργία τους επιλέχθηκαν από παρόμοιες κατηγορίες με τα γονίδια, που υποεκφράζονται. Έτσι τα SPP1 και ITGAM, όπως και το ADAM28 συμμετέχουν στην πρόσδεση μεταξύ των κυττάρων, ενώ το INSIG1 κωδικοποιεί μεμβρανικές πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της χοληστερόλης..

Επομένως, τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής επαληθεύτηκαν με real-time qRT-PCR για 4 γονίδια, που υπερεκφράζονται (ADAM28, SPP1, INSIG1, ITGAM) και 5 γονίδια, που υποεκφράζονται (NCAM1, NPY1R, SLC27A6, SOX4, MLLT10) στα κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων. Η ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου γίνεται με ειδικούς ανιχνευτές TaqMan (TaqMan probes) για κάθε γονίδιο. Ο ανιχνευτής για όλα τα παραπάνω γονίδια έχει σημειωθεί στο 5' άκρο με τη φθορίζουσα χρωστική FAM. Τα probe mixes πρέπει να επιλέγονται έτσι, ώστε να καλύπτουν τα σημεία ένωσης των εξονίων, με σκοπό να μην ανιχνεύεται γονιδιωματικό DNA. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. Αρχικά η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε για τα μεμονωμένα δείγματα (11 δείγματα με RNA από μεγάλα ωοθυλάκια και 7 δείγματα από μικρά ωοθυλάκια), που αποτέλεσαν τα δύο αθροισμένα (pooled) δείγματα. Προκύπτει λοιπόν πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 3,329, P=0,028), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=3,084, P=0,044) και το ITGAM (fold=4,295, P=0,009) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων

ωοθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Επιπλέον, στα παραπάνω δείγματα ελέγχθηκε, αν υποεκφράζονται τα γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων. Από αυτά βρέθηκε πως υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1 (fold=-4.120 P=0,001), ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια SLC27A6, NPY1R, SOX4 και MLLT10.

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες σε δείγματα, που δε συμμετείχαν σε αυτήν την ανάλυση. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε qPCR σε 20 cDNA δείγματα, που προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων και σε 19 cDNA δείγματα, που προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα μικρών ωοθυλακίων. Προκύπτει λοιπόν πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 2,192, P=0,038), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=2,899, P=0,037) και το ITGAM (fold=2,875, P=0,045) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Επιπλέον, στα παραπάνω δείγματα ελέγχθηκε, αν υποεκφράζονται τα γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων. Από αυτά βρέθηκε πως υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1 (fold=-1.959, P=0,024) και το γονίδιο SLC27A6 (fold=-2.294 P= 0,027) ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια NPY1R, SOX4 και MLLT10.

Επιβεβαιώνεται επομένως πως το γονίδιο ADAM28 υπερεκφράζεται τόσο στα δείγματα, που συμπεριλήφθηκαν στα αθροισμένα δείγματα της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες όσο και σε εκείνα, που εξετάστηκαν μετά από αυτή την ανάλυση. Το γονίδιο ADAM28 εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, όπως συμβαίνει με τα κοκκώδη κύτταρα και το ωοθυλάκιο, και συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Ohtsuka et al, 2006). Πιθανόν η έκφραση του ADAM28 να προκαλεί τον πολλαπλασιασμό περισσότερων κοκκωδών κυττάρων, με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου. Επίσης, παίζει ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την απόπτωση (Mochizuki et al, 2004), μια διαδικασία, που στα ωοθυλάκια οδηγεί στην επιλογή ενός μόνο ωοθυλακίου κατά την ωοθυλακιόρρηξη του φυσιολογικού κύκλου με την ατρησία των άλλων ανώριμων. Υπερέκφρασή του στα μεγάλα ωοθυλάκια ίσως να σημαίνει πως τα προφυλάσσει από την ατρησία και πιθανόν να συμμετέχει στην ωρίμανση του ωοθυλακίου.

Οι Hao et al πρότειναν πως το Spp1 σε χοίρους βελτιώνει την ανάπτυξη των των εμβρύων, που προέρχονται από κύκλους IVF με το να μειώνει το ρυθμό απόπτωσης των εμβρύων. Καθώς τα μεγάλα ωοθυλάκια φαίνεται να λειτουργούν πιο

σωστά μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας, πιθανόν η υπερέκφραση του SPP1 στα μεγάλα ωοθυλάκια να συμβάλλει στην καλύτερη ποιότητα και των ανθρώπινων εμβρύων μετά από κύκλους IVF. Επίσης, η υπερέκφραση του SPP1 σε κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων ενισχύεται με τη μελέτη του Skinner et al, 2008, όπου το Spp1 υπερεκφράζεται σε κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων σε βοοειδή. Το γονίδιο SPP1 εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα σε υψηλά επίπεδα και συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του ωοθυλακίου μετά την εμφάνιση του άντρου (Skinner et al, 2008).

Επιπλέον προκύπτει πως υπερεκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων και η ιντεγκρίνη ITGAM, που σχετίζεται άμεσα με την προσκόλληση κι εξάπλωση των κυττάρων. αποτελείται από δυο υπομονάδες, που συνεργαζόμενες φαίνεται πως παίρνουν μέρος στη σύντηξη του ωαρίου με το σπερματοζώαριο (Fabryona et al, 2009). Επομένως, καθώς το ITGAM υπερεκφράζεται σε κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων, προκύπτει πως τα ωοκύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων πιθανόν να γονιμοποιούνται πιο εύκολα σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια, όπου δεν παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου ITGAM.

Είναι γνωστό πως η LH συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη ενός αναπαραγωγικά ικανού προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου με το να διεγείρει τη μετατροπή της χοληστερόλης αρχικά σε ανδρογόνα σε κύτταρα θήκης κι έπειτα σε οιστρογόνα κάτω από τον έλεγχο της FSH. Τα κοκκώδη κύτταρα των δευτερογενών ωοθυλακίων εκφράζουν υποδοχείς LH κι επιτρέπουν στα μεγαλύτερα ωοθυλάκια να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους και να επικρατήσουν έναντι των μικρών ωοθυλακίων, στα οποία απουσιάζουν οι υποδοχείς της LH (Campbell et al., 1999). Οι Heemers et al έδειξαν πως τα ανδρογόνα επηρεάζουν την έκφραση του INSIG1, καθώς παρουσία τους αυξάνονται τα επίπεδα mRNA του INSIG1. Δεν παρατηρείται τελικά υπερέκφραση του γονιδίου INSIG1 τόσο στα αθροισμένα δείγματα όσο και στα δείγματα, που εξετάστηκαν μεμονωμένα. Πιθανόν στα μεγάλα ωοθυλάκια έχουν μειωθεί τα επίπεδα των ανδρογόνων και κατεπέκταση δεν παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου INSIG1.

Επιπλέον, στα κοκκώδη κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο το NCAM1. Πρόκειται για ένα μόριο, που φαίνεται πως έχει κυρίαρχο ρόλο σε διεργασίες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί πως εκφράζεται σε κύτταρα ωοθήκης αρουραίων και βοειδών, ενώ παράλληλα εκφράζεται σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα και ωχρινοποιημένα κύτταρα (Mayerhofer et al, 1994). Φαίνεται πως συμμετέχει στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους (στα κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων).

Έχει επομένως συσχετιστεί με τη συμμετοχή του στη διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου στην ανθρώπινη ωοθήκη.

Ακόμη, το γονίδιο SLC27A6 υπερεκφράζεται στα μικρά ωοθυλάκια λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, που συναντάται σε ιστούς, που χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα. Η λειτουργία του δεν είναι ιδιαίτερα γνωστή. Για να κατανοηθεί ο ρόλος της έκφρασης τόσο του NCAM όσο και του SLC27A6 στα κοκκώδη κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων, θα χρειαστεί περισσότερη μελέτη, καθώς το ερώτημα για τη λειτουργία τους τόσο αυτών όσο και των υπόλοιπων γονιδίων στο αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο και στο ωχρο σωματίο έχει κλινική σημασία. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά όσο αφορά στην υποέκφραση των άλλων γονιδίων (NPY1R, SOX4, MLLT10) στα μεγάλα ωοθυλάκια του προ-ωοθυλακιορρηκτικού σταδίου. Το γεγονός πως δεν επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο RT-PCR τα αποτελέσματα της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες για όλα τα γονίδια μπορεί να θεωρηθεί ως ένα βαθμό αναμενόμενο. Και αυτό, γιατί η ανάλυση με μικροσυστοιχίες δείχνει ταυτόχρονα τη διαφορά στην έκφραση πολλών γονιδίων, ενώ η RT-PCR χρησιμοποιεί ανιχνευτές για συγκεκριμένο γονίδιο σε κάθε αντίδραση.

Επίσης, μελετήθηκε η διαφορά έκφρασης ανάμεσα σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων για το γονίδιο της SHBG με real time qRT-PCR. Το γεγονός πως δεν προκύπτει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου της SHBG επαληθεύει το αποτέλεσμα της μικροσυστοιχιών, καθώς δεν προέκυψε διαφορά για το γονίδιο αυτό. Τέλος, σε προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια μελετήθηκε η σχέση του μεγέθους του ωοθυλακίου με τις συγκεντρώσεις της SHBG, E_2 , T, LH και FSH στο ωοθυλακικό υγρό και τον ορό γυναικών, που υποβλήθηκαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα επίπεδα της SHBG του ωοθυλακικού υγρού σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της SHBG στον ορό ($r=0,411$, $P<0,001$) και με τον ολικό αριθμό των ωοθυλακίων ($r=0,202$, $P<0,02$). Ακόμη, τα επίπεδα της SHBG στον ορό σχετίζονται θετικά με τον ολικό αριθμό των ωοθυλακίων ($r=0,266$, $P<0,001$). Οι συγκεντρώσεις της SHBG και της τεστοστερόνης ήταν υψηλότερες στα μικρά ωοθυλάκια σε σύγκριση με τις τιμές τους στα μεγάλα ωοθυλάκια. Η συγκέντρωση της E_2 ήταν υψηλότερη στα μεγάλα ωοθυλάκια, αλλά η διαφορά σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο λόγος E_2 /ολική τεστοστερόνη ήταν σημαντικά υψηλότερος στα μεγάλα ωοθυλάκια σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια ($P<0,044$). Οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών LH και FSH δε διέφεραν ανάμεσα στα μικρά και τα μεγάλα ωοθυλάκια.

Η σύσταση του ωοθυλακικού υγρού αποτελεί ένα μικροπεριβάλλον, στο οποίο αναπτύσσεται το ωοκύτταρο, ενώ παράλληλα παρουσιάζει το βαθμό

ωρίμανσης του ωοθυλάκιου. Επομένως, κάποια συστατικά του ωοθυλακικού υγρού πιθανόν να αποτελούν δείκτες ωριμότητας και καλής ποιότητας του ωοθυλακίου. Το ωοθυλακικό υγρό στον άνθρωπο είναι δείκτης των εκκριντικών δραστηριοτήτων και μεταβολισμού των κυττάρων του ωοθυλακικού υγρού. Τα φυλετικά στεροειδή στο ωοθυλάκιο φαίνεται να λειτουργούν ως τοπικοί ρυθμιστές της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων, αλλά και της ωρίμανσης του ωοκυττάρου.

Αν και ο ρόλος των φυλετικών στεροειδών στο στάδιο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων πριν την εμφάνιση του άντρου παραμένει ασαφής, έχει προταθεί πως τα ανδρογόνα πιθανόν να επηρεάζουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Έχει βρεθεί πως τα ανδρογόνα προωθούν τον πολλαπλασιασμό τόσο των κοκκωδών όσο και των κυττάρων θήκης και παρεμποδίζουν την απόπτωση. Έχει επίσης προταθεί πως από τη στιγμή που η SHBG δεσμεύει τεστοστερόνη και απενεργοποιεί τη δράση των ανδρογόνων, πιθανόν μειωμένα επίπεδα ανδρογόνων να βελτιώνουν την ποιότητα του ωοκυττάρου. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε πως η συγκέντρωση της τεστοστερόνης είναι μειωμένη στα μεγάλα ωοθυλάκια συγκριτικά με τα επίπεδα στα μικρά ωοθυλάκια. Αν και δεν εκτιμήθηκε η ποιότητα των ωοκυττάρων κατά την ωοληψία, έχει συσχετιστεί θετικά το μέγεθος του ωοθυλακίου με την ωρίμανση του ωοκυττάρου μετά από πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας. Επίσης, παρατηρήθηκε πως ο λόγος οιστραδιόλης/ τεστοστερόνης είναι αυξημένος στα μεγάλα ωοθυλάκια. Η συσχέτιση ανάμεσα στην ωρίμανση του ωοκυττάρου και τη χαμηλή συγκέντρωση της τεστοστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό φαίνεται αναμενόμενη, καθώς η ατρησία των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων συχνά σχετίζεται με τον εκφυλισμό των κοκκωδών κυττάρων και με αυξημένο το λόγο τεστοστερόνης οιστραδιόλης.

Στην διδακτορική αυτή διατριβή προσεγγίστηκε η διαφορά έκφρασης των γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα ανάμεσα σε μικρά και μεγάλα ωοθυλάκια του προ-ωοθυλακιόρρηκτικού σταδίου. Θελήσαμε να ερευνήσουμε το γονιδιακό προφίλ μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα καθώς και το ποιοι είναι οι μηχανισμοί, που τελικά οδηγούν ένα ωοθυλάκιο να έχει το κατάλληλο μέγεθος πριν την ωοθυλακιόρρηξια. Φαίνεται τελικά πως υπερεκφράζονται αρκετά γονίδια στα μεγάλα ωοθυλάκια σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια με διαφορετικές λειτουργίες. Οι παράγοντες, που εξετάστηκαν και παρουσιάζουν διαφορά στην έκφραση τους σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων, συμμετέχουν κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, που όπως φαίνεται είναι απαραίτητες για την ομαλή ωοθυλακική ανάπτυξη και τη λειτουργία της ωοθήκης. Τα γονίδια, που υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων μετά από πρόκληση, πιθανόν, αν επιβεβαιωθούν και από άλλες μελέτες, να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως

κατάλληλοι δείκτες για την ικανότητα ενός ωοθυλακίου να γονιμοποιηθεί. Οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ADAM28 και SPP1, έχει βρεθεί πως εκκρίνονται στον ορό. Μια ενδιαφέρουσα προοπτική με άμεση εφαρμογή θα ήταν η μέτρηση των επιπέδων ADAM28 και SPP1 στον ορό, γεγονός, που μπορεί να λειτουργήσει ως μη επεμβατική μέθοδος για την παρουσία μεγάλων ωοθυλακίων. Τα τελευταία χρόνια στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή γίνεται προσπάθεια μείωσης του αριθμού των μικρών ωοθυλακίων στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο με κατάλληλη αγωγή. Τα αποτελέσματα λοιπόν αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να βοηθήσουν ως αυτήν την κατεύθυνση. Η ανάλυση λοιπόν του ανθρώπινου μεταγραφώματος των κοκκωδών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου αποτελεί πλέον μια πηγή, που συσχετίζει την γονιδιακή έκφραση με την ωοθυλακική ανάπτυξη και ταυτοποιεί νέους ρυθμιστικούς παράγοντες, που μπορεί να μελετηθούν περαιτέρω. Στη μελέτη αυτή επιλέχτηκαν κάποιοι παράγοντες με βάση τη λειτουργία τους. Για να δοθούν περισσότερες απαντήσεις χρειάζεται να μελετηθούν γονίδια με διαφορετική λειτουργία, που θα βοηθήσουν περισσότερο στην κατανόηση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσε να προταθεί η μελέτη στη διαφορά έκφρασης μεταξύ ανώριμων ωοθυλακίων (που βρίσκονται στο στάδιο GV) κι ώριμων ωοθυλακίων και σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Επίσης, θα μπορούσε να μελετηθεί η διαφορά στην έκφραση γονιδίων σε κάθε στάδιο της ωοθυλακιογένεσης, ώστε να κατανοηθεί πλήρως η πολύπλοκη διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης.

Συνοπτικά, η μελέτη αυτή φαίνεται να αποσαφηνίζει τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο συγκριτικά με το μέγεθος του ωοθυλακίου. Πρόκειται για μια μελέτη, στην οποία χρειάστηκε να αντιμετωπιστούν ορισμένες δυσκολίες, όπως ο μικρός αριθμός μικρών ωοθυλακίων, δυσκολίες στην καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων από μικρά ωοθυλάκια, η μικρή ποσότητα RNA κάθε δείγματος, η τυχόν επιμόλυνση δειγμάτων με DNA και αρκετά άλλα. Στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο υπερεκφράζονται αρκετά γονίδια στα μεγάλα ωοθυλάκια σε σχέση με εκείνα, που υποεκφράζονται. Στο στάδιο λοιπόν πριν την ωοθυλακιορρηξία στα κοκκώδη κύτταρα εκφράζονται γονίδια, που εμπλέκονται στην κυτταρική πρόσφυση, τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους, καθώς και τη μεταφορά λιπαρών οξέων για την πρόσληψή τους από τα κύτταρα. Απαιτείται βέβαια περαιτέρω μελέτη με ίσως περισσότερα δείγματα, για να εξηγήσει πως η έκφραση των γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται με το μέγεθος του ωοθυλακίου μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας.

Ε.ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

E.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Σκοπός: Η ωοθυλακιογένεση είναι μια διαδικασία μακράς διάρκειας, που έχει ως στόχο το σχηματισμό του ωοθυλάκιου, το οποίο περιλαμβάνει, το θηλυκό γαμέτη, το ωοκύτταρο. Μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας ωριμάζουν αρκετά ωοθυλάκια, τα οποία στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους. Τα γονίδια, που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα, που περιβάλλουν το ωοκύτταρο, του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλάκιου σε σχέση με το μέγεθός του μετά από πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας παρουσιάζουν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος και η λειτουργία τους.

Υλικά και μέθοδοι: Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων από μικρά (διάμετρος ωοθυλάκιου < 12mm) και μεγάλα (διάμετρος ωοθυλάκιου > 18 mm) ωοθυλάκια. Ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κοκκώδη κύτταρα και τα δείγματα των δύο παραπάνω ομάδων αθροίστηκαν και αποτέλεσαν δύο αθροισμένα δείγματα, ένα για κάθε ομάδα. Για να εκτιμηθεί η διαφορά της έκφρασης γονιδίων ανάμεσα σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλάκιων, πραγματοποιήθηκε αρχικά ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής επαληθεύτηκαν με real-time qPCR για 4 γονίδια, που υπερεκφράζονται (ADAM28, SPP1, INSIG1, ITGAM) και 5 γονίδια, που υποεκφράζονται (NCAM1, NPY1R, SLC27A6, SOX4, MLLT10) στα κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλάκιων. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. Επίσης, μελετήθηκε η διαφορά έκφρασης ανάμεσα σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων για το γονίδιο της SHBG με real time qRT-PCR. Τέλος, σε προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια μελετήθηκε η σχέση του μεγέθους του ωοθυλακίου με τις συγκεντρώσεις της SHBG, E₂, T, LH και FSH στο ωοθυλακικό υγρό και τον ορό γυναικών, που υποβλήθηκαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Αποτελέσματα: Από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών προέκυψε πως υπερεκφράζονται (3 φορές πάνω) 76 γονίδια και ESTs και υποεκφράζονται (3 φορές κάτω) 5 γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων για τα γονίδια, που τελικά επιλέχτηκαν να μελετηθούν, πραγματοποιήθηκε αρχικά για τα μεμονωμένα δείγματα, που αποτέλεσαν τα δύο αθροισμένα δείγματα. Προκύπτει λοιπόν πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 3,329, P=0,028), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=3,084, P=0,044) και το ITGAM (fold=4,295, P=0,009) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Επίσης, βρέθηκε πως υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1

($P=0,001$), ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια SLC27A6, NPY1R, SOX4 και MLLT10. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροσυστοιχίες για δείγματα, που δε συμμετείχαν σε αυτήν την ανάλυση έδειξε πως τα γονίδια ADAM28 (fold= 2,192, $P=0,038$), η οστεοποντίνη SPP1 (fold=2,899, $P=0,037$) και το ITGAM (fold=2,875, $P=0,045$) υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, ενώ η έκφραση του γονιδίου INSIG1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Επίσης, υποεκφράζεται το γονίδιο NCAM1 (fold= -1,959, $P=0,024$) και το γονίδιο SLC27A6 (fold= -2,294, $P= 0,027$) ενώ το αποτέλεσμα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών δεν επαληθεύεται για τα γονίδια NPY1R, SOX4 και MLLT10. Για το γονίδιο της SHBH δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά έκφρασης ανάμεσα σε κοκκώδη κύτταρα μικρών και μεγάλων ωοθυλακίων. Αντίθετα, τα επίπεδα της SHBG του ωοθυλακικού υγρού σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της SHBG στον ορό ($r=0,411$, $P<0,001$) και με τον ολικό αριθμό των ωοθυλακίων ($r=0,202$, $P<0,02$). Ακόμη, τα επίπεδα της SHBG στον ορό σχετίζονται θετικά με τον ολικό αριθμό των ωοθυλακίων ($r=0,266$, $P<0,001$). Οι συγκεντρώσεις της SHBG και της τεστοστερόνης ήταν υψηλότερες στα μικρά ωοθυλάκια σε σύγκριση με τις τιμές τους στα μεγάλα ωοθυλάκια. Η συγκέντρωση της E_2 ήταν υψηλότερη στα μεγάλα ωοθυλάκια, αλλά η διαφορά σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο λόγος E_2 / ολική τεστοστερόνη ήταν σημαντικά υψηλότερος στα μεγάλα ωοθυλάκια σε σχέση με τα μικρά ωοθυλάκια ($P<0,044$). Οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών LH και FSH δε διέφεραν ανάμεσα στα μικρά και τα μεγάλα ωοθυλάκια.

Συμπεράσματα: Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του ωοθυλακίου και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του. Επιπλέον, παρουσιάζουν στενή σχέση με το ωοκύτταρο και αλληλεπιδρούν με αυτό μέχρι την ωρίμανσή του. Επομένως, εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η αποκάλυψη νέων γονιδίων, των οποίων η έκφραση να διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος του ωοθυλακίου. Φαίνεται λοιπόν πως σε μεμονωμένα δείγματα των αθροισμένων και μη δειγμάτων προκύπτει διαφορά της έκφρασης στα ίδια γονίδια (ADAM28, ITGAM, SPP1, NCAM1), ενώ δεν προκύπτει για τα γονίδια INSIG1, NPY1R, SOX4, MLLT10. Αντίθετα, για το SLC27A6 επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα των μικροσυστοιχιών στα δείγματα, που δε συμμετείχαν στην ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Επίσης, το γεγονός πως δεν προκύπτει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου της SHBG επαληθεύει το αποτέλεσμα της μικροσυστοιχιών, καθώς δεν προέκυψε διαφορά για το γονίδιο αυτό. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της SHBG και της τεστοστερόνης ήταν υψηλότερες στα μικρά ωοθυλάκια σε σύγκριση με τις τιμές τους στα μεγάλα ωοθυλάκια. Τα γονίδια, που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη ήταν

τα γονίδια, που υποεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα μεγάλων ωοθυλακίων. Η ωοθυλακιογένεση αποτελεί μια μακράς διάρκειας διαδικασία, για την οποία υπάρχουν ακόμη αναπάντητα ερωτήματα. Ωστόσο, το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς για την επιτυχία των μεθόδων της τα ωοθυλάκια πρέπει να είναι πλήρως ανεπτυγμένα και καλής ποιότητας. Σε αυτό το στάδιο φαίνεται λοιπόν να εκφράζονται γονίδια, που εμπλέκονται περισσότερο στην κυτταρική πρόσφυση, τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους, καθώς και τη μεταφορά λιπαρών οξέων για την πρόσληψη από τα κύτταρα.

E.2 SUMMARY

STUDY OF GENE EXPRESSION IN OVARIAN GRANULOSA CELLS AFTER OVULATION INDUCTION

Anna Galidi

Aim: Folliculogenesis is a long time process that drives to form the follicle that contains the female gamete, the oocyte. After ovulation induction many follicles can mature. The size of the follicles which reach the preovulatory stage may differ. The genes that have been expressed in granulosa cells of the preovulatory follicle in terms of its size have been yet unknown.

Materials and methods: After granulosa cell culture RNA was isolated by small (follicle diameter <12mm) and large (follicle diameter > 18mm) follicles. The isolated RNA from each sample was pooled into two groups. The first contained RNA from large follicles and the second one from small follicles. Microarray analysis was performed in order to investigate new genes that are expressed in the preovulatory stage and to estimate the different gene expression between large and small follicles. The microarray analysis results were confirmed using quantitative real-time PCR for four upregulated genes (ADAM28, SPP1, INSIG1, ITGAM) and five downregulated genes (NCAM1, NPY1R, SLC27A6, SOX4, MLLT10) in granulosa cells of large follicles. GAPDH was used as a reference gene. The different expression of SHBG gene between large and small follicles has been also studied using qRT-PCR as well as the correlation of follicle size with the serum and follicular fluid SHBG, E₂, T, LH and FSH concentrations.

Results: The microarray analysis results suggest that 76 genes and ESTs are upregulated (3-fold up) and 5 genes are downregulated (3-fold down) in granulosa cells of large pre-ovulatory follicles. The microarray analysis results for the selected genes were firstly confirmed for the samples represented in pooled samples. ADAM28 (fold= 3,329, P=0,028), osteopontin SPP1 (fold=3,084, P=0,044) and ITGAM (fold=4,295, P=0,009) were indeed upregulated in granulosa cells of large follicles. INSIG1 different expression between large and small follicles was not confirmed. Additionally, NCAM1 seems to be downregulated in granulosa cells of large follicles contrary to SLC27A6, NPY1R, SOX4 and MLLT10. ADAM28 (fold= 2,192, P=0,038), SPP1 (fold=2,899, P=0,037) and ITGAM (fold=2,875, P=0,045) upregulation in granulosa cells of large follicles was confirmed in individual samples that were not represented in pooled samples contrary to INSIG1. NCAM1 (fold= -

1,959, $P=0,024$) and SLC27A6 (fold= -2,294, $P= 0,027$) seem to be downregulated in individual non pooled samples. The different expression of NPY1R, SOX4 and MLLT10 between large and small follicles was not confirmed. SHBG gene expression was not also differed between large and small follicles. Reversely, follicular fluid SHBG levels correlated positively with serum SHBG levels ($r=0,411$, $P<0,001$) and with total number of follicles ($r=0,202$, $P<0,02$). In addition, serum SHBG levels correlated positively with the total number of follicles ($r=0,266$, $P<0,001$). SHBG and testosterone concentrations were higher in small follicles and decreased in the large ones. The concentration of E_2 was higher in large follicles but the difference compared to small follicles was not statistically significant. The ratio E_2 /total testosterone was significantly higher in large compared to small follicles ($P<0,044$). LH and FSH concentrations did not differ between the two groups.

Discussion: Granulosa cells represent the main cell type of the follicle and regulate the follicle development and function. Granulosa cells communicate directly with the oocyte until its maturation.. The RNA was pooled into two groups (large and small follicles) as RNA quantity over 5 μ g required for microarray analysis. The microarray results were confirmed using real-time qPCR for pooled and non pooled samples. For both groups ADAM28, ITGAM, SPP1, NCAM1 have been upregulated in granulosa cells of large follicles contrary to INSIG1, NPY1R, SOX4, MLLT10. SLC27A6 has been downregulated in granulosa cells of large follicles for just non pooled samples. In addition, SHBG expression in granulosa cells has not been differed between small and large follicles that confirmed the microarray analysis results. In summary the folliculogenesis is a long time process that has not been clear yet. However, the assisted reproductive technologies focus on the preovulatory stage as follicles should be fully grown and matured in order to be fertilized successfully. In this stage many genes may be expressed in granulosa cells with main function the cell adhesion and intercellular lipid acid transmission.

ΣΤ. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

ADAM28: A Disintegrin And Metalloprotease 28

AMH: Anti- Mullerian Hormone

AR: Androgen Receptor

ART: Assisted Reproductive Technologies

BMP-15: Bone Morphogenetic

C_t: threshold cycle

COH: Controlled Ovarian Hyperstimulation

E₂: Estradiol

EGF: Epidermal Growth Factor

FATP6: Fatty Acid Transporter member 6

FBS: Fetal Bovine Serum

FF: Follicular Fluid

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GDF-9: Growth Differentiation Factor 9

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone

GV: Germinal Vesicle

GVBD: Germinal Vesicle Breakdown

hCG: human Chorionic Gonadotropin

HMG: Human Menopausal Gonadotropin

IGF: Insulin-like Growth Factor

IGFBPs: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins

ICSI, Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IL: Interleukin

INSIG1: Insulin-induced gene 1

ITGAM: Integrin alpha M

IU: International Unit

IVF: in vitro fertilization

LCFA: Long Chain Fatty Acids

LH: Luteinizing Hormone

MLLT10: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10

MMPs: Matrix Metalloproteinases

NCAM1: Neural Cell Adhesion Molecule 1

NPY1R: Neuropeptide Y Receptor Y1

OHSS: Ovarian Hyperstimulation Syndrome
OPN: Osteopontin
PAF: Platelet-Activating Factor
PBS: Phosphate Buffer Solution
PAPP-A: Pregnancy- Associated Plasma Protein-A
PCOS: Polycystic Ovary Syndrome
PPAR: peroxisome proliferators activated receptor
PR: Progesterone Receptors
qPCR: quantitative polymerase chain reaction
RIN: RNA Integrity Number
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
SCAPs: SREBP cleavage- activating proteins
SHBG: Sex Hormone Binding Globulin
SLC27A6: Solute Carrier family member 6
SOX4: SRY (Sex determining region Y) - box 4
SPP1: Secreted Phosphoprotein 1
SREs: Sterol Regulatory Elements
SREBPs: Sterol regulatory element binding proteins
T: Testosterone
TGF- β : Transforming Growth Factors- β
TPA: Tissue Plasminogen Activator
 β -ME: β - mercaptoethanol

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2744–2750

Acosta-Martinez M, Horton T, Levine J Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2006;18(2):48-50

Adashi EY Clomiphene citrate: mechanisms and sites of action—a hypothesis revisited. *Fertil Steril* 1984;42:331–343

Adashi E, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT, Leroith D, Rosenfeld R Insulin-like growth factors: the ovarian connection *Hum Reprod* 1991;6:1213-1219

Adashi EY The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 1998;39:13–19.

Adashi, E.Y.. The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process: an evolving hypothesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998b;140:77–81

Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 1986;118:1682–1689

Aittomaki K, Lucena JLD, Pakarinen P et al, Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hybergonadotropic ovarian failure *Cell* 1995;82:959-968

Amsterdam A, Dantes A, Hosokawa K, Schere-Levy C, Kotsuji F, and Aharoni D Steroids and aging: Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells *Steroids* 1998;63:341-318

Aletsee-Ufrecht, M.C., Langley, K., Gratzl, O. and Gratzl, M. 1990 *FEBS Lett.* 272, 4549.

Altmae S, Haller K, Peters M, Hovatta O, Karro H et al, Allelic estrogen receptor 1 (ESR1) gene variants predict the outcome of ovarian stimulation in *in vitro* fertilization 2007 *Molec Human Reprod* 13(8):521-526

Anderson E, Abertini D Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary *J Cell Biol* 1976;71:680-686

Andreu-Vieyra C, Lin YN, Matzuk MM. Mining the oocyte transcriptome. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:136–143

Apter, D., T.L. Butzow, G.A et al Gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 1993;76: 940–94

ASRM Practice Committee, Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives, *Fertil Steril* 2008;90(3):13-20

az-Cabiale Z, Parrado C, Rivera A, et al. Galanin-neuropeptide Y (NPY) interactions in central cardiovascular control: involvement of the NPY1 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 2006;24:499–508.

Bagnell, C. 2005. "Animal Reproduction". Rutgers University Department of Animal Sciences.

Barlow AL, Hultén MA Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 1998;6:350–358

Beck B, Max JP. Neuropeptide Y in the arcuato-paraventricular pathway and diet selection in the vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull* 2008;76:454–7

Beck GR, Zerler B, Moran Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression 8352–8357 *PNAS* 2000;97(15): 8352–8357

Bedell MA, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ DNA rearrangements located over 100 kb 59 of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev* 1995;9:455–470

Bednar M DNA microarray technology and application *Med Sci Monit* 2000;6(4):796-800

Beretsos P, Partsinevelos G, Arabatzi E, Drakakis P, Mavrogianni D, Anagnostou E, Stefanidis K, Antsaklis A, Loutradis E, Loutradis D "hCG priming" effect in controlled ovarian stimulation through a long protocol *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;7:91

Bergh C, Broden H, Lundin K, Hamberger L. Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles. *Hum Reprod* 1998;13:1912–5

Blankstein, J., Shalev, J., Saadon, T., Kukia, E.E., Rabinovici, J., Pariente, C., Lunenfeld, B., Serr, D.M. and Mashiach, S. (1987) Ovarian hyperstimulation syndrome: prediction by number and size of preovulatory ovarian follicles. *Fertil. Steril.*, 47, 597-602.

Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signaling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:32–43

Blomqvist, A.G. and Herzog, H. Y-receptor subtypes – how many more? *Trends Neurosci.* 1997;20:294–298

Bowtell DDL: Options available-from start to finish-for obtaining expression data by microarray. *Suppl Nat Genet* 1999;21:25-32

Brailly S, Gougeon A, Milgrom E, Bomsel-Helmreich O, Papiernik E Androgens and progestins in the human ovarian follicle: differences in the evolution of preovulatory, healthy nonovulatory, and atretic follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:128–134

Branigan EF, Estes MA Minimal stimulation IVF using clomiphene citrate and oral contraceptive pill pretreatment for LH suppression. *Fertil Steril* 2000;73:587–590

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11041-11048

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

Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34:597-601.

Campbell, B.K., Dobson, H., Baird, D.T. and Scaramuzzi, R.J. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 1999;117:355-367.

Canipari R Oocyte- granulosa cell interactions *Human Reproduction* 2000;6(3):279-289

Cecconi S, Ciccarelli C, Barberi M, Macchiarelli G, Capinari R Granulosa cell-oocyte interactions *Europ Jour of Obst & Gyn* 2004;115S:S19-S22

Channing CP, Kammerman S Characteristics of gonadotropin receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation *Endocrinology* 1973;92:531-540

Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS, Fodor SPA: Accessing genomic information with high-density arrays. *Science* 1996; 274:610-614

Cho C, Bunch D.O., Faure J.-E., Goulding E.H., Eddy E.M., Primakoff P., Myles D.G., Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin b, *Science* 1998;281:1857–1859.

Cho C, Ge H., Branciforte D., Primakoff P., Myles D.G, Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin b / sperm: evidence for C-terminal modification a/b dimerization, and lack of essential role of fertilin a in sperm–egg fusion, *Dev. Biol.* 2002;222:289–295

Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ et al, Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments *Nature Genet* 2002;32(Suppl):509-514

Chun, S.-Y. and A. J. W. Hsueh. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J. Reprod. Immunol.* 1998;39:63–75.

Clemens, J.W., Robker, R.L., Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S., Richards, J.S.,. Hormone induction of progesterone receptor (PR) messenger ribonucleic acid and activation of PR promoter regions in ovarian granulosa cells: evidence for a role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate but not estradiol. *Mol. Endocrinol.* 1998;12:1201–1214.

Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F.J., Shitsukawa, K., Tsafri, A.,. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998;145:9–14.

Corsan G, Kemmann E, The role of superovulation with menotropins in ovulatory infertility: a review, *Fertil. Steril.* 1991;55 (3):468–477.

Cousin P, Dechaud H, Grenot C., Lejeune H., Pugeat M., Human Variant Sex Hormone- Binding Globulin (SHBG) with an Additional Carbohydrate Chain Has a Reduced Clearance Rate in Rabbit, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998;83:235-240

Cronin, M. T. et al. *Hum. Mutat.* 1996;7:244–255

Dalma- Weiszhausz D, Warrington J, Tanimoto E, and Miyada CG The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview *Methods in Enzymology* 2006;410:3-28

Davis O.K., Rosenwaks Z, In vitro fertilization, in: E.Y. Adashi, J.A. Rock, Z. Rosenwaks (Eds.), *Reproductive endocrinology, surgery, and technology*, 1 ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, NY, 1995.

Daya S Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in invitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Databases syst Rev* 2000; CD001299

DeBose-Boyd, R. A. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 2008;18:609-621

De Risi JL, Iyer VR, Brown PO: Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278:680-686

Dekel, N., 1997. Protein phosphorylation:dephosphorylation in the meiotic cell cycle of 4. mammalian oocytes. *Rev. Reprod.* 1997;1:82–88

Deltondo J, Por I, HuW, et al. Associations between the human growth hormone-releasing hormone- and neuropeptide-Y-immunoreactive systems in the

human diencephalon: a possible morphological substrate of the impact of stress on growth. *Neuroscience* 2008;153:1146–52.

Delvigne A, Rozenberg S Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum Reprod Update* 2003;9:77–96

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.* 2001;107(9):1055–61

Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75:106–111

Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1976–1979

Diamond, R. H., K. Du, V. M. Lee, K. L. Mohn, B. A. Haber, D. S. Tewari, and R. Taub. Novel delayed-early and highly insulin-induced growth response genes. Identification of HRS, a potential regulator of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* 1993;268:15185-15192

Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006; 119:408–415

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412:822–6

Doerge H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:259–268.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531–5

Driancourt MA, Fair T and Reynaud K [Oocyte apoptosis: when, how, why?]. *Contracept Fertil Sex* 1998;26:522–527

Drobyshev A, Moligina N, Shik V, Pobedimskaya D, Yershov G, Mirzabekov A: Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of α -thalassemia mutations. *Gene* 1997; 188: 45–52

Drummond A The role of steroids in follicular growth *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006;4:16-27

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998;12:1809–17.

Duffy, D.M., Molskness, T.A., Stouffer, R.L. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in luteinized granulosa cells of rhesus monkeys are regulated in vitro by gonadotropins and steroids. *Biol. Reprod.* 1996;54:888–895

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM: Expression profiling using cDNA microarrays. *Suppl Nat Genet* 1999, 21:10-14

Dunkel L, Tilly JL, Shikone T, Nishimori K, Hsueh AJW Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors b and a. *Biol Reprod* 1994;50:940–948

Durlinger A, Kramer P, Karels B et al Control of primordial follicle recruitment by anti- Mullerian hormone in the mouse ovary 1991;140:5789-5796

Durlinger A, Gruijters M et al anti- Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary *Endocrinology* 2001;142:4891-4899

Ectors, F.J., Vanderzwalmen, P., Van Hoeck, J. et al. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1997;12:2002–2005

Edwards RG Follicular fluid *Journal of Reproduction and Fertility* 1974;37:189-219

Eisen MB, Brown PO: DNA arrays for analysis of gene expression. In *Methods in Enzymology: cDNA Preparation and Characterization*. vol 303. Edited by Weissman SM. Academic Press; 1999:179-205

Elghetany TM, and Lacombe F Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress *Journal of Leukocyte Biology* 2004;75:157-162

Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999a;13:1018–34

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999b; 13:1035–1048

Engelking, L. J., G. Liang, R. E. Hammer, K. Takaishi, H. Kuriyama, B. M. Evers, W. P. Li, J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2005. Schoenheimer

effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest.* 2005;115: 2489-2498.

Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, et al. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 1997;12:127-32

Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2890-2894

Erickson GF, Hsueh AJW, Quigley ME, Rebar RW, Yen SSC Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:514-519

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C The ovarian androgen producing cells: A review of structure/ function relationships *Endocrine Reviews* 1985;6:371-399

Erickson GF Normal regulation of ovarian androgen production *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1993;11:307-312

Erickson GF The graafian follicle: A functional definition In Adashi EY *Ovulation : Evolving Scientific and Clinical Concepts* Springer-Verlaag New York 2000a pp31-48

Erickson GF, Shimasaki S The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000b;11:193-198

Erickson GF and Shimasaki S The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors *Fertil Steril* 2001;76:943-949

Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, et al. Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* 2002;160:2169-80

Eva C, Serra M, Mele P, Panzica G, Oberto A. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:308-39

Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: Insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 2001;23:628-39.

Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002;360:151-159.

Ezoe K, Holmes SA, Ho L, Bennett CP, Bologna JL, Brueton L, Burn J, FalabellaR, Gatto EM, IshiiN, MossC, PittelkowMR Novel mutations and deletions of the KIT (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am J Hum Genet* 1995;56:58-66

Fabryova K, Simon M Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *Gen Physiol Biophys* 2009;28(1):1-7

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A et al, Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Human Reprod* 1992;7:1342-1346

Faddy MJ, Gosden RG, A model confirming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women *Hum Reprod* 1996;11:1484-1486

Fallat M, Siow Y et al A Mullerian inhibiting substance in follicular fluid and serum- *Fertil Steril* 1997;67:962-965

Fanchin R, Righini C, Olivernnes F, Ferreira AL, de Ziegler D, Frydman R. Consequences of premature progesterone elevation on the outcome of in vitro fertilization: insights into a controversy. *Fertil Steril* 1997;68:799–805

Fausser B, Van Heusden A Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences *Endocr Rev* 1997;18:71-106

Fausser B, Devroey P, Yen S et al Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Hum. Reprod* 1999;14:2681-2686

Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, D'Angelo A, Farfalli V, Montanaro N: Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril* 2004;82(6):1521-1526

Filicori M., Cognigni G.E, Tabarelli C., Pocognoli P., Taraborrelli S., Spettoli D., et al., Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87 (3):1156–1161.

Findlay JK An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis *Biol Reprod* 1993;48:15-23

Findlay JK Molecular biology of the female reproductive system Academic Press pp 1-5

Fitzpatrick, S. L., Carlone, D. L., Robker, R. L., and Richards, J. S. Expression of aromatase in the ovary: Down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 1997;62:197–206.

Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* 1997;57:1233–1237

Foghi, A., Teerds, K.J., van der Donk, H., Moore, N.C., Dorrington, J. Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on bcl-2 and interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Endocrinol.* 1998;157:489–494.

Forsti A, Jin Q., Grzybowska E., Soderberg M., Zientek H., Sieminska M. et al Sex hormone- binding globulin polymorfisms in familial and sporadic breast cancer, *Carcinogenesis* 2002;**23**(8):1315-1320

Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50:225-232.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78:135–163

Friedman R, Bangur C, Zasloff E, et al. Molecular and immunological evaluation of the transcription factor SOX-4 as a lung tumor vaccine antigen. *J Immunol* 2004;172:3319–27.

Fulka, J. Jr., First, N.L., Moor, R.M., Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 1998;4:41–49

Gaddy-Kurten, D., Tsuchida, K., Vale, W.,. Activins and the receptor serine kinase superfamily. *Recent Prog. Horm. Res.* 1995;50:109–129.

Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Lodish HF, Stahl A Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein *J Biol Chem* 2003 278(18):16039-44

Gimeno RE Fatty acid transport proteins *Curr Opin Lipidol* 2007;18:271–276.

Giudice L, Insulin- like groeth factors and ovarian follicular development *Endocr Rev* 1992;13:641-669

Giudice E, Crisci C, Eshkol A, Papoian R Composition of commercial gonadotropin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterization of non- gonadotropin proteins *Hum Reprod* 1994;9:2291-9

Glade B. Curtis "Week 4". *Your Pregnancy Week by Week.* 1999 Element Books

Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd, and M. S. Brown. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 2006;124: 35-46

Gomez E, Tarin J, Pellicer A Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 1993;60:40-46

Gosden RG, Laing SC, Felicio LS, Nelson JF, Finch CE Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging 57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1983;28:255–260

Gougeon A Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results *Hum Reprod* 1986;1:81-87

Gougeon A, Testart J Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 1990;54:848–852

Gougeon A. Dynamics of human follicle growth. A morphologic perspective In Adashi EY Leung PCK editors The ovary New York Raven Press 1993:21-39

Graham JD, Hunt SM, Tran N, Clarke CL. Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators. *J Mol Endocrinol* 1999;22:295–304

Greenwald, G., and Roy, S.. Follicular development and its control. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. Neill, Eds.), 1994 pp. 629–724. Raven Press, New York.

Grumbach, M.M.. Onset of puberty. In *Puberty*. S.R. Berenberg, H.E. Stenfert & B.V. Kroese, 1975 Ed.:1–21, Leiden, Netherlands.

Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM: Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5456–5465.

Haidl I, Huber G, Eichmann K An ADAM family member with expression in thymic epithelial cells and related tissues *Gene* 2002;283:163-170

Hamel M, Dufort I, Robert C et al, Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with the competent oocytes *Human Reproduction* 2008;23(5):1118-27

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* 2008;23:699-708

Harbig J, Sprinkle R, Enkemann A sequence- based identification of the genes detected by probesets on the Affymetrix U133 plus 2.0 array *Nucleic Acids Research* 2005;33(3):

Hardiman G Microarray platforms – comparisons and contrasts *Pharmacogenetics* 2004;5(5):487-502

Harrington C, Rosenow C and Retief J Monitoring gene expression using DNA microarrays, *Current Opinion in Microbiology* 2000;3:285-291

Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:67–78.

Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, Van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999;140:1236–44.

Heemers H, Verhoeven G, Swinnen J Androgen Activation of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein Pathway: Current Insights *Mol Endocrinol*, October 2006;20(10):2265–2277

Herzog H, Hort Y, Ball H, Hayes G, et al Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992;89:5794-5798

Hillier SG, van der Boogaard AMJ, Reichert Jr LE, van Hall EV Intraovarian sex steroid hormone interactions and the regulation of follicular maturation: aromatization of androgens by human granulosa cells in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1980;50:640-647

Hillier SG Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. Oxf Rev Reprod Biol 1985;7:168-222

Hillier SG, Cellular basis of follicular endocrine function In Hillier SG (ed) Ovarian Endocrinology Oxford: Blackwell Scientific Publications 1991:25-72

Hillier SG Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. In Findlay JK molecular biology of the female reproductive system. London: Academic Press 1994:1-37

Hillier SG Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development Molecular and Cellular Endocrinology 2001;179:39-46

Hirshfield AN Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. Biol Reprod 1989;41:309-316

Hofmann GE, Bergh PA, Guzman I et al Pretreatment luteinization is not eliminated by pituitary desensitization with leuprolide acetate in women undergoing gonadotropin stimulation who demonstrated premature luteinization in a prior gonadotropin only cycle. Hum Reprod 1993;8:695-698

Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002;109:1125-1131

Horton, J. D., I. Shimomura, S. Ikemoto, Y. Bashmakov, and R. E. Hammer. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. J Biol Chem. 2003;278: 36652-36660

Hourvitz A, Widger AE, Teixeira Filho FL, Chang RJ, Adashi EY, Erickson GF. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:4916-19

Howard L, Maciewicz R, Blobel C Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28 Biochem J 2000;348:21-27

Howard L, Zheng Y, Horrocks M, Maciewicz R, Blobel C Catalytic activity of ADAM28 FEBS Letters 2001;498:82-86

Howles CM Genetic engineering of human FSH (Gonal-F) Hum Reprod Update 1996;2:172-91

Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. Dev Biol 1993;157:100–109

Hughes FM, Jr and Gorospe WC Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinology 1991; 129:2415–2422.

Huirne J.A, Lambalk C.B, van Loenen A.C., Schats R., Hompes P.G., Fauser B.C, et al. Contemporary pharmacological manipulation in assisted reproduction, Drugs 2004;64(3):297–322

Hunt SM, Clarke CL. Expression and hormonal regulation of the Sox4 gene in mouse female reproductive tissues. Biol Reprod 1999;61:476–81.

Hussein M, Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms Human Reprod Update 2005;11(2):162-178

Jamnongjit M and Hammes R Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise them Cell Cycle. 2006 June ; 5(11): 1178–1183.

Janát-Amsbury M, Gupta K, Kablitz C, Peterson M Drug delivery for in vitro fertilization: Rationale, current strategies and challenges Advanced Drug Delivery Reviews 2009;61:871–882

Jiang MR, Li YC, Yang Y and Wu JR c-Myc degradation induced by DNA damage results in apoptosis of CHO cells. Oncogene 2003;22:3252–3259.

Jones G, Cram D, Song B, Kokkali G, Pantos K, Trounson A, Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocyst Hum Repr 2008:1-12

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biol Reprod 2002;67:1777–1789.

Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. Hum Reprod Update 2005;11:144–161

Karstrom-Encrantz, L., Runesson, E., Bostrom, E.K., Brannstrom, M., Selective presence of the chemokine growth-regulated oncogene alpha (GROalpha)

in the human follicle and secretion from cultured granulosa — lutein cells at ovulation. *Mol. Hum. Reprod.* 1998;4:1077–1083.

Kavacs P, Matyas S, Bernard A et al Comparison of clinical outcome and costs with CC + Gonadotropins and GnRH a + Gonadotropins during IVF/ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:197–202

Kerin JF The advantages of a gonadotropin releasing hormone agonist in conjunction with gonadotropins for controlled ovarian hyperstimulation in IVF and Gift. *Arch Gynecol obstet* 1989;246(Suppl):S45–S52

Kligman I, Rosenwaks Z, Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders *Fertil Steril* 2001;76:1185-1190

Kono, T., Obata, Y., Yoshimzu, T., Kakahara, T., Carroll, J., Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat. Genet.* 1996;13:91–94.

Kossowska-Tomaszczuk K, de Geyter C, de Geyter M, Martin I et al, The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles 2009;27:210-219

Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Sl^t mice. *Dev Biol* 1988;126:71–79

La Marka A, Orvieto R et al Mullerian inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics *Fertil Steril* 2004;82:970-972

Lahr, G., Mayerhofer, A., Bucher, S., Barthels, D., Wille, W. and Gratzl, M. 1993 *Endocrinology* 132, 1207-1217.

Laitinen, M., Ristimäki, A., Honkasalo, M., Narko, K., Paavonen, K., Ritvos, O., 1997. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997;138:4748–4756.

Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 1998;78:135–40

Lamm, M.L., Rajagopalan-Gupta, R.M., Hunzicker-Dunn, M. Epidermal growth factor-induced heterologous desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in a cell-free membrane preparation is associated with the tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 1999;140:29–36.

Langley, O.K., Aletsee, M.C. and Gratzl, M. (1987) *FEBS Lett.* 220, 108-112.

Langley, O.K., Aletsce-Ufrecht, M.C., Grant, N.J. and Gratzl, M. 1989 J. Histochem. Cytochem. 37, 781-791.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:811–6.

Larson R, Springer T Structure and function of leukocyte integrins. Immunol Rev 1990;114:181–217

Laven J, Mulders A et al Anti- Mullerian hormone serum concentrations in normo-ovulatory and anovulatory women of reproductive age J Clin Endocr Metab 2004;89:318-323

le Cotonnec J,. Porchet H, Beltrami V, Khan A., Toon S., Rowland M., Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). I. Comparative pharmacokinetics with urinary human FSH, Fertil. Steril. 1994;61(4):669–678.

Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. J Neurooncol 2002;57:201–14.

Lee M.T. 2004, Analysis of microarray gene expression data, Kluwer Academic, Boston.

Lee P, Liu P, Li W, De Bose-Boyd R Amplification of the gene for SCAP, coupled with Insig-1 deficiency, confers sterol resistance in mutant Chinese hamster ovary cells Journal of Lipid Research 2007;48:1944-1955

Lenton E, I.D. Cooke, M. Hooper, H. King, A. Kumar, N. Monks, et al., In vitro fertilization in the natural cycle, Baillieres Clin.Obstet.Gynaecol. 1992;6(2):229–245.

Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology 2004;62:1131-1143.

Leung P, Armstrong D Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle Ann Rev Physiol 1980;42:71-82

Lindheim SR, Chang PL, Vidali A, Ferin M, Sauer MV. The utility of serum progesterone and inhibin A for monitoring natural-cycle IVF-ET. Assis Reprod Genet 1998;15:538–41

Lindner D, Stichel J, Beck- Sickinger G Molecular recognition of the NPY hormone family by their receptors Nutrition 2008;24:907–917

Lipshutz RJ, Morris D, Chee M et al: Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. Biotechniques 1995; 19: 442–447.

Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ: High density synthetic

Liu H, Lai Y, Davis O et al Improved pregnancy outcome with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) stimulation is due to the improvement in oocyte quantity rather than quality *J. Assist. Reprod. Genet.* 1992;9(4):338–344

Liu, K., Wahlberg, P., Ny, T. Coordinated and cell-specific regulation of membrane oligonucleotide arrays. *Suppl Nat Genet* 1999;21:20-24 type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology* 1998;139:4735–4738.

Liu P, Ramachandran S, Seyed M, Scharer C, Laycock N, Dalton W, Williams H, Karanam S, Datta M, Jaye D and Moreno C, Sex-determining Region Y box 4 is a transforming oncogene cancer cells, *Cancer Res* 2006; 66: (8) 4011-4019.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996, 14:1675-1680

Loewen C, Levine T Cholesterol Homeostasis: Not Until the SCAP Lady INSIGs *Current Biology* 2002;12:R779–R781

Losos, Jonathan B.; Raven, Peter H.; Johnson, George B.; Singer, Susan R. *Biology*. New York: McGraw-Hill.2002 pp. 1207–09.

Loutradis D, Drakakis P, Vomvolaki E, Antsaklis A: Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(12):597-611

Lunenfeld B Treatment of anovulation by human gonadotropins. *J Int Fed Gyn Obs* 1963;1:153

Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol *2001;265:175-182*

Luo J, Duggan DJ, Chen Y, et al. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 2001;61:4683–8

Luu-The, V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2001;76:143–151

Luzzi V, Mahadevappa M, Raja R et al Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification and high density oligonucleotide microarray analysis *J Mol Diagn* 2003;5:9-14

Lyons KM, Pelton RW, Hogan BLM. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor- β -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* 1989;3:1657–68

Macklon NS, Fauser BC. Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas* 1998;30:181-188

Macklon NS, Fauser BC. Regulation of follicle development and novel approaches to ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update* 2000;6(4):307-312

Magee JA, Araki T, Patil S, et al. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:5692–6.

Magoffin D. Ovarian theca cell. *The International J Biochem Cell Biology* 2005;37:1344-1349

Markstrom E et al. Survival factors resulting ovarian apoptosis- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002;123:23-30

Maskos U. Southern EM: A novel method for the analysis of multiple sequence variants by hybridization to oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:2267–2268.

Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RML, Margara R, Franks S. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1355–1360

Mason HD, Cwyfan-Hughes S, Holly JM, Franks S. Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:284–7.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S-I et al. Effects of Steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991;353:750-752

Matzuk M. Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:61–6

Matzuk M et Lamb D. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 2008 14(11):1197-1213

Mayerhofer, A., Lahr, G. and Gratzl, M. *Endocrinology* 1991;129:792-800.

Mayerhofer, A., Seidl, K., Lahr, G., Bitter-Suermann, D., Christoph, A., Barthels, D., WiNe, W. and Gratzl, M. *Biol. Reprod.* 1992;47:656--664.

Mayerhofer A, Lahr G, Frrhlich U, Zienecker R, Sterzik K, Gratzl M. Expression and alternative splicing of the neural cell adhesion molecule NCAM in human granulosa cells during luteinization. *FEBS Letters* 346 1994;207-212

Mayerhofer, A., Dissen, G.A., Parrott, J.A., Hill, D.F., Mayerhofer D., Garfield, R.E., Costa, M.E., Skinner, M.K., Ojeda, S.R. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 1996;37:62–5670.

McGee E, Hsueh A Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles *Endocrine Reviews* 2000;21(2):200-214

McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995;9:131–6

McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 2004; 128:379–386

McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:57–66

Meijs-Roelofs HM, van Cappellen WA, van Leeuwen EC, Kramer P Short- and long-term effects of an LHRH antagonist given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat. *J Endocrinol* 1990;124:247–253

Messinis I From Menarche to Regular Menstruation *Endocrinological Background Ann. N.Y Acad. Sci* 2006;1092:49-56

Michalkiewicz M, Zhao GQ, Jia Z, Michalkiewicz T, Racadio MJ. Central neuropeptide Y signaling ameliorates N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester hypertension in the rat through a Y1 receptor mechanism. *Hypertension* 2005;45:780–5

Milger K, Herrmann T, Becker C, et al. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci* 2006; 119:4678–4688.

Miller KF, Goldberg JM, Falcone T Follicle size and implantation of embryos from in vitro fertilization *Obstet Gynecol.* 1996 Oct;88(4 Pt 1):583-6.

Mindnich, R., Moller, G., and Adamski, J The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004;218:7–20.

Mitsui Y, Mochizuki S, Kodama T, Shimoda M, Ohtsuka T, Shiomi T, et al. ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res* 2006;66:9913–20

Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T, Fujii Y, Okada Y. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:79–84

Moore RK Shimasaki S, Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15 Mol Cellular Endocr 2005;234:67-73

Morris, J.K., Richards, J.S., Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization in vitro by A-kinase and C-kinase pathways. Endocrinology 1995;136:1549–1558

Muasher SJ, Abdallah RT, Hubayter ZR Optimal stimulation protocols for in vitro fertilization, Fertil. Steril. 2006;86 (2):267–273

Murphy B Models of ovulation Biology of reproduction 2000;63:2-11

Natraj, U., Richards, J.S. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. Endocrinology 1993;133:761–769

Navot, D., Relou, A., Birkenfeld, A., Rabinowitz, R., Brzezinski, A. and Margalioth, E.J. (1988) Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. Am. J. Obstet. Gynecol., 159, 210-215.

Nishimura H., Cho C., Branciforte D.R., Myles D.G, Primakoff P., Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin b, Dev. Biol. 2001;233:204–213

Nishimura H., Kim E., Nakanishi T., Baba T., Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface, J. Biol. Chem. 2004;279:34957–34962

O’Shaughnessy PJ, McLelland D, McBride MW Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. Biol Reprod 1997;57:602–608

Oh J, Woo J, Choi E, Kim T, Cho B, Park Z, Kim Y, Kim D, Cho C Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28 Biochemical and Biophysical Research Communications 2005;331:1374-1383

Ohtsuka T, Shiomi T, Shimoda M, Kodama T, Amour A, Murphy G, et al. ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. Int J Cancer 2006;118:263–73

Oktay K, Briggs D, Gosden RG Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3748–3751

Olijve W, de Boer W, Mulders JW et al, Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) *mol Hum Reprod* 1996;2:371-82

Olivares A, Cardenas M., Timossi C., Zarinan T., Diaz-Sanchez V., Ulloa-Aguirre A., Reactivity of different LH and FSH standards and preparations in the world health organization matched reagents for enzyme-linked immunoassays of gonadotrophins, *Hum. Reprod.* 2000;15(11):2285–2291

Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000;275:39523–8

Otsuka F, Shimasaki S A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:8060-8065

Pandian Z, Bhattacharya S, O. Ozturk, G.I. Serour, A. Templeton, Number of embryos for transfer following in-vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection, *Cochrane Database Syst. Rev.* (4) (2004) CD003416

Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D., Cis-regulatory elements conferring cyclic 3',5'-adenosine monophosphate responsiveness of the progesterone receptor gene in transfected rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995;136:5430–5437.

Parrott, J.A., Skinner, M.K.,. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 1998a;139:2240–2245.

Parrott, J.A., Skinner, M.K.,. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology* 1998b;139:228–235.

Pelinck M, A. Hoek, A.H.M. Simons, M.J. Heineman, Efficacy of natural cycle IVF:a review of the literature, *Hum. Reprod. Updat.* 2002;8(2):129–13

Peluso, J.J., 1997. Putative mechanism through which N-cadherin-mediated cell contact maintains calcium homeostasis and thereby prevents ovarian cells from undergoing apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 1997;54:847–853.

Peng, Y., E. J. Schwarz, M. A. Lazar, A. Genin, N. B. Spinner, and R. Taub. Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. *Genomics.* 1997;43: 278-284

Picton H, Briggs D, Dosden R The molecular basis of oocyte growth ana development *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998;145:27-37

Peng C, Ohno T, Khorasheh S and Leung PC Activin and follistatin as local regulators in the human ovary. *Biol Signals* 1996;5:81–89.

Pohl J, Ring A, Hermann T, Stremmel W. Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1686:1–6.

Povlsen G, Ditlevsen D The neural cell Adhesion Molecule NCAN and lipid Rafts 2008

Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000;16:83–7

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA Ovarian follicular growth and atresia : The relationship between cell proliferation and survival *J. Anim Sci* 2004;82(E. Suppl.):E40-E-52

Radhakrishnan, A., Y. Ikeda, H. J. Kwon, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 6511-6518

Rafferty L, Sutherland D TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads *Dev Biol* 1999;210:251-268

Rannikias, Zhang FP, Huhtaniemi IT Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1995;107:199–208

Ravindranath, N., Little-Ihrig, L., Phillips, H.S., Ferrara, N., Zeleznik, A.J. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992;131:254–260.

Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M and Rinaudo P Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;7:40-53

Reynolds, L.P., Redmer, D.A.,. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.* 1998;76: 1671–1681.

Reynolds SRM The vasculature of the ovary and ovarian function. *Recent Progress in Hormone Research* 1950;5:65

Richards, J.S., Russell, D.L., Robker, R.L., Dajee, M., Alliston, T.N.,. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998;145:47–54.

Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:4427–33

Richards JS and Midgley Jr Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod* 1976;14:82–94.

Richards JS Hormonal control of gene expression in the ovary *Endocr Rev* 1994;15:725-751

Richards, J.S., Russell, D.L., Robker, R.L., Dajee, M., Alliston, .N.,. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998;145:47–54.

Robin-Jagerschmidt C, Sylte I, Bihoreau C, Hendricksen L, Calvet A, Dahl SG, Benicourt C. The ligand binding site of NPY at the rat Y1 receptor investigated by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Mol Cell Endocrinol* 1998;139:187–98

Rombauts L, Suikkari AM, MacLachlan V, Trounson AO, Healy DL 1998 Recruitment of follicles by recombinant human folliclestimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 69:665–669

Ronen-Fuhrmann, T., Timberg, R., King, S.R., Hales, K.H., Hales, D.B., Stocco, D.M., Orly, J. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1998;139:303–315.

Rosen M, Shen S, Dobson A, et al, A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence *Fertility and Sterility* 2008;90(3):684-690

Rosenberg E, Coleman J, Damani M, Garcia CR Clinical effect of post menopausal gonadotropin. *J Clin Endocr Metab* 1962;23:181-9

Rowen, L., Mahairas, G. and Hood, L. *Science* 1997;278:605–607

Sagata, N., What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bio. Essays* 1997;19:13–21

Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L, et al. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Hum Reprod* 1998;13:1901–6

Sanderson JT The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals *Toxicological sciences* 2006;94(1):3-21

Sapolsky, R. J. and Lipshutz, R. J. *Genomics* 1996;33:445–456

Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4267–4275.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1996, 270:467-470.

Schena M, Heller R, Theriault T, Konrad K, Lachenmeier E and Davis R
Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics TIBTECH
July 1998;16:301-306

Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996;380:711–4

Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK, Bilbe G. Expression of TGF- β s and TGF- β type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF- β 2 message in oocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;201:649–56

Schmuth M, Ortegon AM, Mao-Qiang M, et al. Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages. *J Invest Dermatol* 2005; 125:1174–1181.

Schorge J, Drake R, Lee H, Skates S, Rajanbabu R, Miller D, Kim J, Cramer D, Berkowitz R, and Mok S Osteopontin as an Adjunct to CA125 in Detecting Recurrent Ovarian Cancer

Schwartz D, Mayaux MJ Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. N Engl J Med* 1982;306:404-406

Segaloff DL, Ascoli M, The lutropin/ chorionic gonadotropin receptor *Endocr Rev* 1993;14:1324-1347

Sever N, Lee P, Song P, Rawson R, and DeBose-Boyd R Isolation of Mutant Cells Lacking Insig-1 through Selection with SR-12813, an Agent That Stimulates Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(41):43136–43147, 2004

Shamsadin R., Adham I.M., Nayernia K., Heinlein U.A., Oberwinkler H., Engel W., Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile, *Biol. Reprod.* 1999;61:1445–1451

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004;25:72–101

Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M. and Davis, R. W. (1996) *Nat. Genet.* 14, 450–456

Shoham Z., The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation, *Fertil. Steril.* 2002;77(6):1170–1177

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD et al, Aromatase cytochrome P450 the enzyme responsible for estrogen biosynthesis *Endocr Rev* 1994;15:342-355

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development Hum Reprod Update 2005;11(5):461-471

Skinner MK, Schmidt M, Savenkova MI, Sadler-Riggelman I, Nilsson E Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development. Mol Reprod Dev. 2008;75(9):1457-72

Sokka T, Huhtaniemi I Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neo-natal rat ovary. J Endocrinol 1990;127:297–303

Solovjov D, Pluskota E, Plow E Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2". *J Biol Chem* 2005;280(2):1336–45

Soroka V, Kasper C, Poulsen F Structural biology of NCAM Neurochem Res 2008

Stahl A, A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). Pflugers Arch. 2003 Jul

Standal T, Borset M, Sundan A Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* 2004; 26 (3):79–84

Steinberg E, Holtz P, Sullivan E, Villar C Profiling assisted reproductive technology: outcomes and quality of infertility management Fertil Steril 1998;69(4):617-623

Steinman L (February 2007). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage". *Nat. Med.* 2007;13(2): 139–45

Steinman L. and Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis Nat. Rev. Immunol. 2003;3:483–492.

Stephoe PC, Edwards RG Laparoscopic recovery of pre-ovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotropins. Lancet 1970;1:683-9

Stephoe PC, Edwards RG, Birth after the reimplantation of a human embryo Lancet 1978;2:366

Stokman P.G., de Leeuw R., van denWijngaard H.A., Kloosterboer H.J., Vemer H.M., Sanders A.L., Human chorionic gonadotropin in commercial human menopausal gonadotropin preparations, Fertil. Steril. 1993;60 (1):175–178

Strosberg, A. D.Eur. J. Biochem. 1991;196:1-10.

Takaishi, K., L. Duplomb, M. Y. Wang, J. Li, and R. H. Unger. Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:7106-7111

Tavaniotou A, Albano C, Van Steirteghem A et al The impact of LH concentration on the clinical outcome of IVF cycles in patients receiving two regimen

of clomiphene citrate/gonadotropin/0.25 mg cetorelix. *Reprod Biomed Online* 2003;6:421–426

te Velde ER, Pearson PL, The variability of female reproductive ageing *Hum Reprod Update* 2002;8:141-154

Tetsuka, M., Thomas, F.J., Thomas, M.J., Anderson, R.A., Mason, J.I., Hillier, S.G.,. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:2006–2009

Tetsuka, M., Haines, L.C., Milne, M., Simpson, G.E., Hillier, S.G.,. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression by LH and interleukin-1beta in cultured rat granulosa cells. *J. Endocrinol* 1999a;163:417–423.

Terranova, P.F., Rice, V.M., Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997;37:50–63.

Tetsuka, M., Milne, M., Simpson, G., Hillier, S.G., Expression of 1β-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biol.Reprod.* 1999b. ;60:330–335.

Tilly JL Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:838–848.

Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL and Hsueh AJ Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799–2801

The European Recombinant Human LH Study Group_ Recombinant Human Luteinizing Hormone (LH) to Support Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-Induced Follicular Development in LH- and FSH-Deficient Anovulatory Women: A Dose-Finding Study *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, May 1998; 83: 1507-1514.

Tournaye H, Devroy P, Camus et al, Comparison of in vitro fertilisation in male and tubal infertility : a 3-year survey *Hum Reprod* 1992;7:212-22

Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C Oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998;3:52–62

Trounson A, Anderiesz C, Jones G, Maturation of human oocytes in vitro and their development competence *Reproduction* 2001;121:51-75

Tsafriiri A, Dekel N Molecular mechanisms in ovulation In Findlay JK molecular biology of the female reproductive system. London: Academic Press 1994:207-258

Tsafri A Follicular development: impact on oocyte quality. In: Fauser BCJM (ed) FSH Action and Intraovarian Regulation. Parthenon Press, New York, 1997:pp 83–105

Urman B, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Isiklar A, Balaban B. Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Fertil Steril* 1999;72:975–9.

Valve E, Penttila TL, Paranko J, Haärkönen P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;232:173–7

van de Weijer B.H., Mulders J.W., Bos E.S, Verhaert P.D., van den Hooven H.W., Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from murine (menotropin). Identification of some of its major impurities, *Reprod. Biomed. Online* 2003;7(5):547–557

van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 1993;12:3847–54

van Dessel HJHM, Schipper I, Pache TD, van Geldorp H, De Jong FH, Hop WCJ, Fauser BCJM Normal human follicle development: an evaluation of correlations with oestradiol, androstenedione and progesterone levels in individual follicles. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44:191–198

van Loenen A.C., Huirne J.A., Schats R, Hompes P.G., Lambalk C.B., GnRH agonists, antagonists, and assisted conception, *Semin. Reprod. Med.* 2002;20(4):349–364

van Santbrink EJP, van Dessel HJHM, Hop WC, De Jong FH, Fauser BCJM Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995;64:37–43

Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K et al Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes, *Hum. Reprod.* 1998;13(11):3169–3176

Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000;62:370–7

Vlodavsky I, Brown KD and Gospodarowicz D A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. *J Biol Chem* 1978;253:3744–3750.

Wagner T, Wirth J Meyer J et al, Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX-9 Cell 1994;79:1111-1120

Wandji SA, Pelletier G and Sirard MA Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. Biol Reprod 1992;47:807–813.

Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. Biol Reprod 1996;55:942–948

Wang KX, Denhardt DT Osteopontin: role in immune regulation and stress responses *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6): 333–4

Wang L, Rao F, Zhang K, Mahata M et al, Neuropeptide Y Receptor NPY1R Journal of the American College of Cardiology 2009;54(10):944-954

Weigert M, Krischker U, Pohl M, Poschalko G et al Comparison of stimulation with clomiphene citrate in combination with recombinant follicle stimulating hormone and recombinant LH to stimulation with a gonadotropin releasing hormone agonist protocol: a prospective, randomized study. Fertil Steril 2002;78:34–39

Wegner From head to toes Q the multiple facets of Sox proteins Nucleic Acids Res 1999;27:1409-1420

Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. Cancer Res 2001;61:5974–8

Weschler, Toni Taking Charge of Your Fertility (Revised ed.). New York: HarperCollins. 2002 pp. 361–2

Whitaker, M.,. Control of meiotic arrest. Rev. Reprod. 1996;1:127–135.

Williams SC, Gibbons WE, Muasher SJ et al Minimal ovarian hyperstimulation for IVF using sequential clomiphene citrate and gonadotropin with or without the addition of a gonadotropin releasing hormone antagonist. Fertil Steril 2002;78:1068–1072

Winzeler EA, Schena M, Davis RW: Fluorescence-based expression monitoring using microarrays. In Methods in Enzymology: Expression of Recombinant Genes in Eukaryotic Systems, vol 306. Edited by Glorioso J, Schmidt MC. Academic Press: London; 1999:3-18.

Wolfsberg TG, Primakoff P et al, ADAM, a novel family of membrane proteins containing

Wood JR, Strauss JF 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. Rev Endocr Metab Disord 2002;3:33–46.

Yang, T., P. J. Espenshade, M. E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 2002;110: 489-500

Yong, E.L., Baird, D.T., Hillier, S.G.. Mediation of gonadotrophin-stimulated growth and differentiation of human granulosa cells by adenosine-3',5'-monophosphate: one molecule two messages. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* , 1992a;37:51–58

Yong, E.L., Baird, D.T., Yates, R., Reichert, L.E. Jr, Hillier, S.G., Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*1992b;74:842–849.

Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, Sullivan E. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod* 2006;21:1968–1970.

Zhao Z, Wen L, Jin M, Deng Z, Jin Y ADAM28 participates in the regulation of tooth development *Archives of Oral Biology* 2006;51:996—1005

Zhao Z, Liu H, Jin Y, Lingling E Influence of ADAM28 on biological characteristics of human dental follicle cells *Archives of Oral Biology* 2009;54:835–845.

Zhou ZF, Zhu GS, Hariri AR, et al. Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion. *Nature* 2008;452:997–1001

Αναγνωστοπούλου-Μπέη Ανδρονίκη Βιολογία Ανάπτυξης *Art of text* 1993;pp32-33

Καλανταρίδου Σ, Τσατσούλης Α Κύκλος ζωής ωοθυλακίου- Ωοθυλακιορρηξία- Οιστρογόνα και υποδοχείς Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική & Ενδοκρινολογική Κλινική Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σελ 1-5.

Συμεωνίδου Ιωάννα Ελένη Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς 2008, Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής, σελ 34-42