



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΤΩΝ  
ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ  
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΩΡΗ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

**ΠΑΡΓΙΑΝΑΣ ΜΙΧΑΗΛ**

**ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 2 1**







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΤΩΝ  
ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ  
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΩΡΗ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

**ΠΑΡΓΙΑΝΑΣ ΜΙΧΑΗΛ**

**ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 2 1**



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



**Ημερομηνία αίτησης του κου Παργιανά Μιχαήλ:** 10-2-2016

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 786<sup>α</sup>/29-3-2016

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Δαλκαλίτσης Νικόλαος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοσκόπηση του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 12-4-2016

«Πειραματική μελέτη για την ανάδειξη των παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και τη χρήση τους στην πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 955<sup>α</sup>/2-2-2021**

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Δαλκαλίτσης Νικόλαος, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ενδοσκόπηση του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Παπούδου Αλεξάνδρα-Μπάη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 05-03-2021

Ιωάννινα 7-4-2021

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατιστάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας





*Τη διδακτορική διατριβή την αφιερώνω στους γιους μου Αστέριο και Θησέα.*

## ***Ευχαριστίες***

Εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες στον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, επιβλέποντα καθηγητή κ.Νικόλαο Δαλκαλίτση για την ανάθεση της διδακτορικής μου διατριβής.Επίσης θα ήθελα εκ βαθέων να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας κ.Ιωάννη Γεωργίου του οποίου η συμβολή ήταν η πλέον καθοριστική.Το παρόν συγγραφικό έργο θα ήτο αδύνατο να γίνει πραγματικότητα χωρίς τη στήριξη που παρείχε σε όλες τις φάσεις του ερευνητικού προγράμματος.Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ.Μηνά Πασχόπουλο για την εμπιστοσύνη που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια ως μέλος της τριμελούς.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ.Άννα Μπατιστάτου αλλά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ.Αλεξάνδρα-Μπάη Παπούδου,για τη σημαντικότερη επιστημονική υποστήριξη στη διεξαγωγή των πειραματικών μελετών.Στην τελική ανάδειξη των αποτελεσμάτων συνέδραμε καταλυτικά ο Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ.Θεολόγος Μιχαηλίδης τον οποίον και ευχαριστώ,διότι η συνεισφορά του με τη συνεργασία της μεταδιδακτορικής του ερευνήτριας Κυριακής Παπαγεωργίου,ουσιωδώς βοήθησε στην αξιοποίηση των ευρημάτων του ερευνητικού έργου και η στάση του πολλάκις με εμπνύχωνε σε κάθε εμπόδιο που προέκυπτε.Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τη βιολόγο Χρυσούλα Κίτσου καθώς και τον φίλο Ιωάννη Κοσμά,Μαιευτήρα-Γυναικολόγο Διευθυντή Ε.Σ.Υ, του οποίου η συνεργασία και η καθοδήγηση υπήρξε πολύτιμη και συνεχής.

Όλα αυτά τα έτη αποτελούν προσωπικό στήριγμα, η σύζυγος μου την οποία και ευχαριστώ αλλά και οι γονείς μου και η αδερφή μου, των οποίων η παρουσία αποτελεί θεμέλιο λίθο οικοδόμησης αξιών και ήθους τόσο για την προσωπική μου ζωή αλλά και γενικότερα για την επαγγελματική μου σταδιοδρομία.

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Αναπόσπαστο κομμάτι της έρευνας που αφορά την προάσπιση και τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ζωής αποτελεί η ανίχνευση των παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην αναπτυξιακή πορεία του ωοθυλακίου. Η ενεργοποίηση και η ατρησία των ωοθυλακίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αυτών, μια διαδικασία η οποία εξαντλεί τις ωοθηκικές εφεδρείες και η οποία ως κοινή παράμετρος λαμβάνει χώρα κατά την εμμηνόπαυση, την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) αλλά και επί λήψης αντικαρκινικής θεραπείας. Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια μπορεί να παραμείνει αδιάγνωστη για μεγάλο χρονικό διάστημα και σχετίζεται άρρηκτα με μειωμένη γονιμότητα καθώς ο μηχανισμός που συνδέεται με την ΠΩΑ όπως και οι επακόλουθες θεραπείες δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Ως εκ τούτου η ανάδειξη των παθογενετικών μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στα στάδια εξέλιξης του ωοθυλακίου αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα για τη διατήρηση της γονιμότητας, με το καίριο ερώτημα εάν μπορεί να επιτευχθεί η παύση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και η εκ νέου ενεργοποίηση να αποτελεί το ζητούμενο αυτού του ερευνητικού έργου. Ο έλεγχος της ακολουθίας μέσω της αποσιώπησης και επανενεργοποίησης, συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση αυτής της εξελικτικής πορείας. Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκαν τρεις εργασίες και συγκεκριμένα δύο πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα και επιπλέον μία συστηματική ανασκόπηση άλλων ερευνητικών έργων. Στην πρώτη πειραματική μελέτη στοχοποιήθηκαν φαρμακολογικά και τα δύο σύμπλοκα mTOR (Raptor/mTORC1 και Rictor/mTORC2) σε θηλυκούς μύες χρησιμοποιώντας Everolimus, Verapamil και Fisetin είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό και εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα που είχε η θεραπεία στη μία ωοθήκη. Μετά το πέρας της αγωγής έγινε προσπάθεια επανενεργοποίησης της ωοθηκικής λειτουργίας στην εναπομείνουσα ωοθήκη. Για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης διαδικασίας με τη χρήση των αναστολέων mTOR, χρησιμοποιήθηκαν μύες χωρίς γενετική τροποποίηση. Η δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, αφορά μια συστηματική ανασκόπηση η οποία αξιολόγησε άλλες ερευνητικές εργασίες και ανέδειξε τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η πλειοψηφία των μελετών που αναλύθηκε ήταν πειραματικής φύσεως αλλά χρησιμοποιήθηκαν και γυναίκες με ΠΩΑ. Τέλος το ερευνητικό έργο ολοκληρώθηκε με τη διενέργεια μιας δεύτερης πειραματικής μελέτης η οποία εξέτασε τη δράση της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης μεμονωμένα ή συνδυαστικά στην εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου και συγκεκριμένα την επίπτωση αυτών στη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε θηλυκούς μύες και τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν ιστολογική εξέταση, ορμονικό έλεγχο αλλά και τον έλεγχο μέσω ανοσοαποτύπωσης. Τα ευρήματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή μπορούν να αξιοποιηθούν για την κατακράτηση των αρχέγονων ωοθυλακίων, ενθαρρύνοντας το επιστημονικό πεδίο καθώς και τους ασθενείς που επιθυμούν τη διατήρηση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας.

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

### **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>ΓΟΝΑΔΕΣ ΘΗΛΕΟΣ</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1</b>	<b>ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΩΟΘΗΚΩΝ</b>	<b>11</b>
<b>1.1.2</b>	<b>ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΩΟΘΗΚΗΣ</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3</b>	<b>ΩΟΓΕΝΕΣΗ</b>	<b>16</b>
<b>1.1.4</b>	<b>ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ</b>	<b>18</b>
<b>1.1.5</b>	<b>ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ</b>	<b>22</b>
<b>1.1.5.1</b>	<b>ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>ΆΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ – ΥΠΟΦΥΣΗ – ΩΟΘΗΚΕΣ</b>	<b>26</b>
<b>1.2.1</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΠΥΛΑΙΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΜΑΚΡΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ</b>	<b>27</b>
<b>1.2.3</b>	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΒΡΑΧΕΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ</b>	<b>28</b>
<b>1.3</b>	<b>ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ</b>	<b>29</b>
<b>1.3.1</b>	<b>ΒΛΑΣΤΙΚΟ ΚΥΣΤΙΔΙΟ (GV)</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2</b>	<b>ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ</b>	<b>30</b>
<b>1.3.3</b>	<b>ΜΕΤΑΦΑΣΗ I</b>	<b>33</b>
<b>1.3.4</b>	<b>ΜΕΤΑΦΑΣΗ II</b>	<b>33</b>
<b>1.3.5</b>	<b>ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ</b>	<b>34</b>
<b>1.4</b>	<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΓΑΜΕΤΩΝ</b>	<b>34</b>
<b>1.4.1</b>	<b>DNMT1 ΚΑΙ UHRF1 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ</b>	<b>37</b>
<b>1.5</b>	<b>ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ</b>	<b>38</b>

2	<i>ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ</i>	39
2.1	<b>ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ MTOR</b>	39
2.1.1	<b>ΣΥΜΠΛΟΚΑ MTOR</b>	40
2.1.2	<b>ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥ MTORC1</b>	42
2.1.3	<b>ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥ MTORC2</b>	43
2.1.4	<b>ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ TSC/MTOR</b>	44
2.2	<b>Η ΚΙΝΑΣΗ ΑΚΤ</b>	45
2.2.1	<b>Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΚΤ</b>	45
2.2.2	<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤ</b>	46
2.2.3	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PTEN ΣΤΗΝ ΑΚΤ</b>	48
2.2.4	<b>ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/PTEN/ΑΚΤ/FOXO3A</b>	49
2.3	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ</b>	52
2.4	<b>ΣΥΣΤΗΜΑ KIT,KIT-LIGAND</b>	53
2.5	<b>ΚΥΤΟΚΙΝΗ CXCL12</b>	55
2.6	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ</b>	55
2.6.1	<b>FOXL2</b>	55
2.6.2	<b>NOBOX, LHX8 ,SOHLH1,SOHLH2</b>	56
2.7	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</b>	57
2.7.1	<b>ΠΡΩΤΕΪΝΗ GDF9</b>	57
2.7.2	<b>ΠΡΩΤΕΪΝΗ BMP-2</b>	58
2.7.3	<b>ΠΡΩΤΕΪΝΗ P27</b>	59
2.8	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ</b>	60
2.8.1	<b>PTEN</b>	60
2.8.2	<b>FOXO2</b>	60
2.8.3	<b>FOXO3A</b>	61
2.9	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ AMH</b>	61

<b>3</b>	<b><i>ΠΡΟΩΡΗ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ</i></b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>ΟΡΙΣΜΟΣ</b>	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΠΩΑ</b>	<b>63</b>
<b>3.3.1</b>	<b>ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΩΑ</b>	<b>63</b>
<b>3.3.2</b>	<b>ΠΩΑ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>64</b>
<b>3.4</b>	<b>ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	<b>65</b>
<b>3.5</b>	<b>ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b>	<b>66</b>
<b>3.6</b>	<b>ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ MIRNAS</b>	<b>69</b>
<b>3.8</b>	<b>ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ</b>	<b>70</b>
<b>3.8.1</b>	<b>ΓΟΝΙΔΙΟ FMR1</b>	<b>70</b>
<b>3.8.2</b>	<b>ΓΟΝΙΔΙΟ FMR2</b>	<b>70</b>
<b>3.9</b>	<b>ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ Χ ΦΥΛΕΤΙΚΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ</b>	<b>72</b>
<b>3.9.1</b>	<b>ΤΡΙΣΩΜΙΑ ΣΤΟ Χ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ</b>	<b>73</b>
<b>3.9.2</b>	<b>ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ Χ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ</b>	<b>74</b>
<b>3.10</b>	<b>ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ ΤΥΠΟΥ ΙΑ(CDG-ΙΑ)</b>	<b>75</b>
<b>3.11</b>	<b>ΓΑΛΑΚΤΟΖΑΙΜΙΑ</b>	<b>75</b>
<b>3.12</b>	<b>ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ (SYNS1) ΚΑΙ ΕΓΓΥΣ ΣΥΜΦΑΛΑΓΓΙΣΜΟΥ</b>	<b>77</b>
<b>3.13</b>	<b>ΣΥΝΔΡΟΜΟ PERRAULT</b>	<b>77</b>
<b>4</b>	<b><i>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ.</i></b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ</b>	<b>79</b>

4.3	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟΝ ΜΤΟΡ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΥ	80
4.4	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟ	81
<b><i>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i></b>		
5	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	84
6	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	85
6.1	<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ</u> «ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΩΘΗΛΛΑΚΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΑΡΧΕΓΟΝΟ ΣΤΑΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΤΩΝ ΕΒΕΡΟΛΙΜΟΥΣ ΚΑΙ ΒΕΡΑΠΑΜΙΛΗ»	85
6.1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	85
6.1.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	87
6.1.2.1	ΚΥΚΛΟΣ ΟΙΣΤΡΟΥ ΜΥΟΣ	88
6.1.2.2	ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΟΛΠΙΚΟΥ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΣ	88
6.1.3	ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ	88
6.1.4	ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	91
6.1.5	ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	91
6.1.6	ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	92
6.1.7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	92
6.1.8	ΒΑΣΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	93
6.1.8.1	ΜΕΤΡΗΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	93
6.1.8.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	96
6.1.8.3	ΔΙΑΜΕΤΡΟΙ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	97
6.1.8.4	ΔΙΑΜΕΤΡΟΙ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	98
6.1.9	ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ	98
6.1.9.1	ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	98
6.1.9.2	ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΕΥΤΕΡΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	99

6.1.10	ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ	101
6.1.11	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΕ ΚΥΡΙΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΤΟΥ ΜΤΟΡ	101
6.1.12	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ, ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	103
6.1.13	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	106
6.1.14	ΜΟΝΟΠΛΕΥΡΗ ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΣΜΟΣ	107
6.1.15	ΖΩΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	107
6.1.16	ΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	107
6.1.17	ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	108
6.1.18	ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ	109
6.1.19	ΟΡΜΟΝΕΣ	110
6.1.20	ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	111
6.1.21	ΆΛΛΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	112
6.1.22	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ	113
6.2	<u>ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</u> <i>ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΟΩΡΗ ΩΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΜΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ</i>	114
6.2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	114
6.2.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	114
6.2.2.1	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ	114
6.2.2.2	ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	115
6.2.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
6.2.3.1	ΟΡΘΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗ	115
6.2.3.2	PTEN-PI3K-AKT-MTOR	116
6.2.3.3	VEGF	120
6.2.3.4	TGFB, FOXL2 ΚΑΙ FOXO3A	123



<b>6.2.4</b>	<b>ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ</b>	127
<b>6.2.5</b>	<b>ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ ΡΟΦ</b>	129
<b>6.2.6</b>	<b>ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ – ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	131
<b>6.3</b>	<b><u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ</u></b> <i>«ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΡΧΕΓΟΝΩΝ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ ΚΑΙ Η ΑΝΤΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΩΣ ΣΥΝΑΚΟΛΟΥΘΗ ΔΡΑΣΗ»</i>	132
<b>6.3.1</b>	<b>ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ, ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΡΚΕΙΑ</b>	132
<b>6.3.2</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	133
<b>6.3.3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	133
<b>6.3.3.1</b>	<b>ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</b>	134
<b>6.3.3.2</b>	<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ</b>	134
<b>7.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	136
<b>8.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	147
<b>9.</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	150
<b>10.</b>	<b>SUMMARY</b>	151
<b>11.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	152

## ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Γονάδες θήλεος

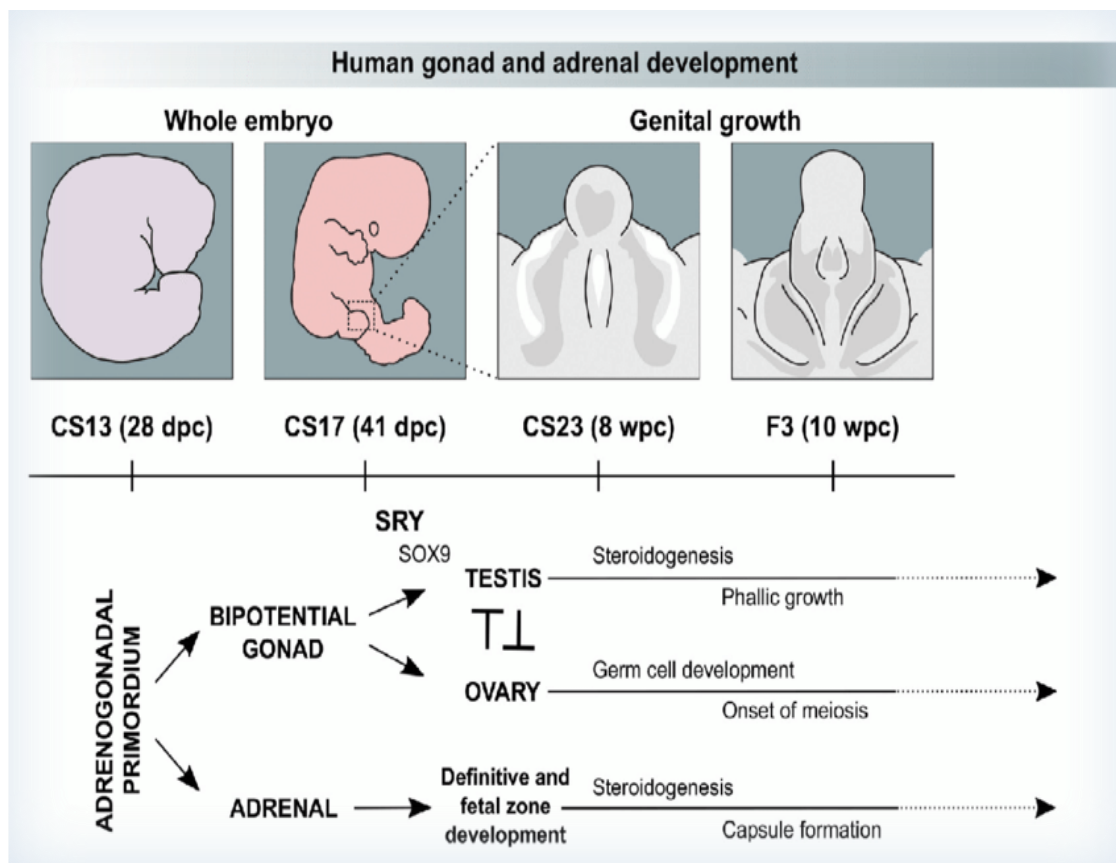
Οι γονάδες (ωοθήκες στις γυναίκες και όρχεις στους άνδρες) εξυπηρετούν δύο βασικές λειτουργίες: παράγουν τα γεννητικά όργανα με τη διαδικασία η οποία είναι γνωστή σαν γαμετογένεση και τις στεροειδικές ορμόνες του φύλου οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των οργάνων αναπαραγωγής και διαφοροποιούν τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Στις γυναίκες, οι γονάδες παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και κατά την περίοδο του τοκετού και της γαλουχίας [61]. Οι ορμόνες του άνδρα είναι γνωστές στη βιβλιογραφία με την ονομασία ανδρογόνα, ενώ αντίστοιχα οι ορμόνες του θήλεος είναι γνωστές σαν οιστρογόνα και προγεστερόνη. Στον άνδρα οι όρχεις παράγουν σπερματοζώαρια συνεχώς όπως επίσης και τεστοστερόνη με ηλικιακή έναρξη την εφηβεία μέχρι το γήρας. Στη γυναίκα, παράγεται σε συντριπτική πλειοψηφία ένα ωάριο κάθε περίπου 28 ημέρες και η έκκριση των ορμονών (οιστρογόνα-προγεστερόνη) γίνεται κυκλικά μέχρι την έναρξη της εμμηνόπαυσης, στην περίπτωση της οποίας ο κύκλος αυτός διακόπτεται [20].

Οι γονάδες ρυθμίζονται λειτουργικά από την πρόσθια υπόφυση και τον υποθάλαμο σε σχέση με τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες. Ο υποθάλαμος διαθέτει ειδικούς νευρώνες οι οποίοι εκκρίνουν την εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών GnRH (δεκαπεπτίδιο που διεγείρει και εκκρίνει δύο γοναδοτροπίνες), την ωχρινοτρόπο ορμόνη LH και τη θυλακιοτρόπο ορμόνη FSH. Το σύνολο των ορμονών που προαναφέρθηκαν παράγονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η GnRH η οποία εκκρίνεται κατά κύματα (ώσεις), με εξαρτώμενο εύρος και συχνότητα που ελέγχεται από τα στεροειδή των γονάδων μέσω ενός συστήματος αρνητικής παλίνδομης ρύθμισης [20].

Οι γοναδοτροπίνες στοχεύουν ξεχωριστά τόσο τους όρχεις όσο και τις ωοθήκες και δεσμεύονται από υποδοχείς που συνδέονται με τις G-πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση και παράγοντας την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (CAMP). Οι γοναδοτροπίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παραγωγής στεροειδικών ορμονών από τις γονάδες και ελέγχουν την σπερματογένεση και την ωοθυλακιογένεση στους άντρες και τις γυναίκες αντίστοιχα. Συνεπώς, οι γονάδες δεν εκκρίνουν μόνο τις απαραίτητες για τη διαφοροποίηση και διατήρηση των χαρακτηριστικών του φύλου ορμόνες, αλλά παράγουν και τους γαμέτες που αναπαράγουν και διαιώνίζουν το ανθρώπινο είδος [149]. Οι γονάδες στα πρώτα στάδια της ζωής του ανθρώπου είναι αδιαφοροποίητες και έχουν ως αρχική καταβολή την αρχέγονη μονάδα. Σε αντίθεση όμως από τα άλλα αρχέγονα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε όρχεις ή ωοθήκες. Η τελική επιλογή εξαρτάται από το φύλο του εμβρύου. Το φύλο εξαρτάται από την ύπαρξη του χρωμοσώματος X στο διπλοειδικό κύτταρο το οποίο θα σχηματιστεί μετά από το συνδυασμό δύο απλοκυττάρων που φέρουν τα ωοκύτταρα το χρωμόσωμα X και το σπερματοζώαριο το χρωμόσωμα X ή

Υ. Με βάση το φύλο, πραγματοποιείται η οργανογένεση σε όρχι ή ωθήκη και μετά την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού αναγνωρίζεται το φύλο [72].

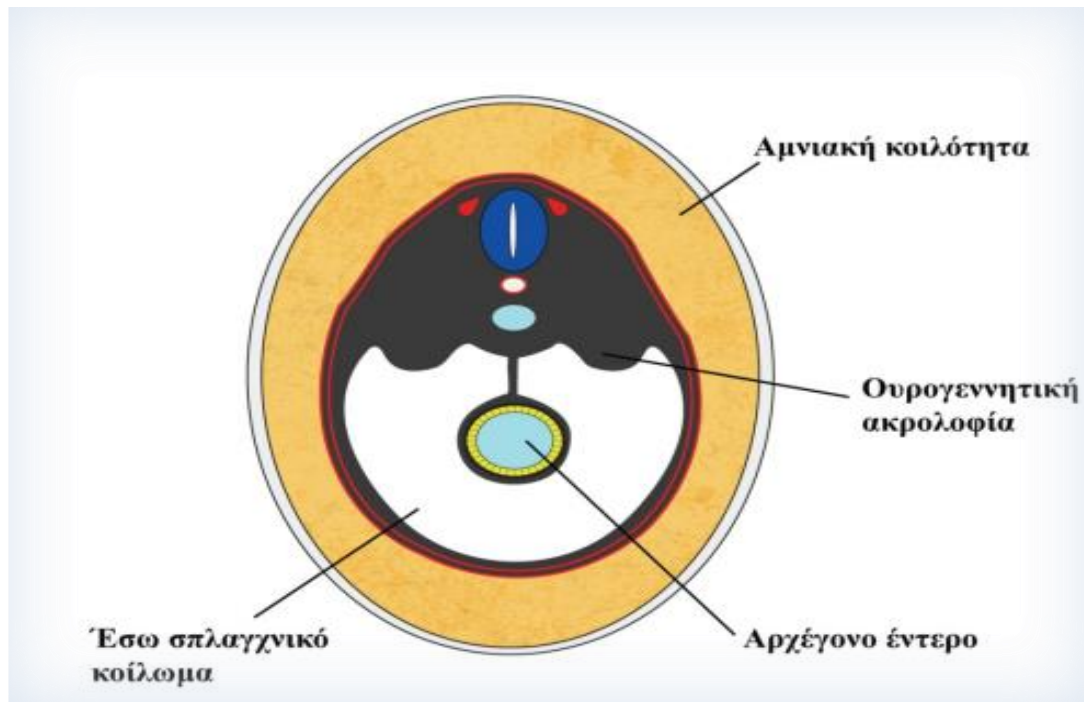
Η ανάπτυξη της αδιαφοροποίητης γονάδας η οποία είναι αμφιδύναμη, αναπτύσσεται μαζί με το ουροποιητικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα από την ουρογεννητική ακρολοφία η οποία έχει καταβολή από το ενδιάμεσο μεσόδερμα και εκτείνεται εκατέρωθεν από τη μέση γραμμή. Η ουρογεννητική ακρολοφία χωρίζεται σε τρία τμήματα: το πρόνεφρο (καταβολή των επινεφριδίων), το μεσόνεφρο (καταβολή της αμφιδύναμης γονάδος) και το μετάνεφρο (καταβολή του μόνιμου νεφρού). Στο έμβρυο, η καταβολή των γονάδων ξεκινάει την εμφάνισή της κατά την τέταρτη εβδομάδα της κύησης και παραμένει σε αυτή την αδιαφοροποίητη κατάσταση μέχρι και την 7<sup>η</sup> εβδομάδα. Τα γονίδια του στεροειδογόνου παράγοντα SF-1 και το γονίδιο του όγκου του Wilm's ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση του ενδιάμεσου μεσοδέρματος και του ουρογεννητικού συστήματος γενικότερα (Εικόνα 1) [125].



Εικόνα 1. Διαφοροποίηση των γονάδων [125]

### 1.1.1 Εμβρυολογία Ωοθηκών

Το γεννητικό σύστημα αναπτύσσεται παράλληλα και σε στενή σχέση με το ουροποιητικό και πολύ συχνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία της εμβρυολογίας σαν ουρογεννητικό. Όπως αναφέρεται η καταβολή και των δύο αυτών συστημάτων είναι το μεσόδερμα και ενώ είναι κοινή και για τα δύο φύλα, διαφοροποιείται κατά την 4<sup>η</sup> με 7<sup>η</sup> εβδομάδα της ζωής του εμβρύου. Κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης, το μεσόδερμα αποτελεί την καταβολή των μεσονεφρών (δύο σε αριθμό). Πιο συγκεκριμένα και κατά την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης δημιουργείται στο μεσοθήλιο του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος μια πάχυνση που αποτελείται από κύτταρα που ονομάζεται μέσω σπλαχνικό κοίλωμα (Εικόνα 2). Η γεννητική ταινία, σε συνδυασμό με το μεσόνεφρο σχηματίζουν την ουρογεννητική ακρολοφία (ή ουρογεννητικό έπαρμα) [108].



Εικόνα 2. Η δημιουργία της γεννητικής ακρολοφίας.

Τα κύτταρα τα οποία αποτελούν το επιθήλιο σε κάθε ακρολοφία σχηματίζουν δακτυλιοειδείς προεξοχές που εισέρχονται στο μεσέγχυμα. Οι προεξοχές ονομάζονται γεννητικές χορδές. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (embryonic germ cells) μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις στην ουρογεννητική ακρολοφία και ενώνονται με τις γεννητικές χορδές. Τα embryonic germ cells σε συνδυασμό με τις

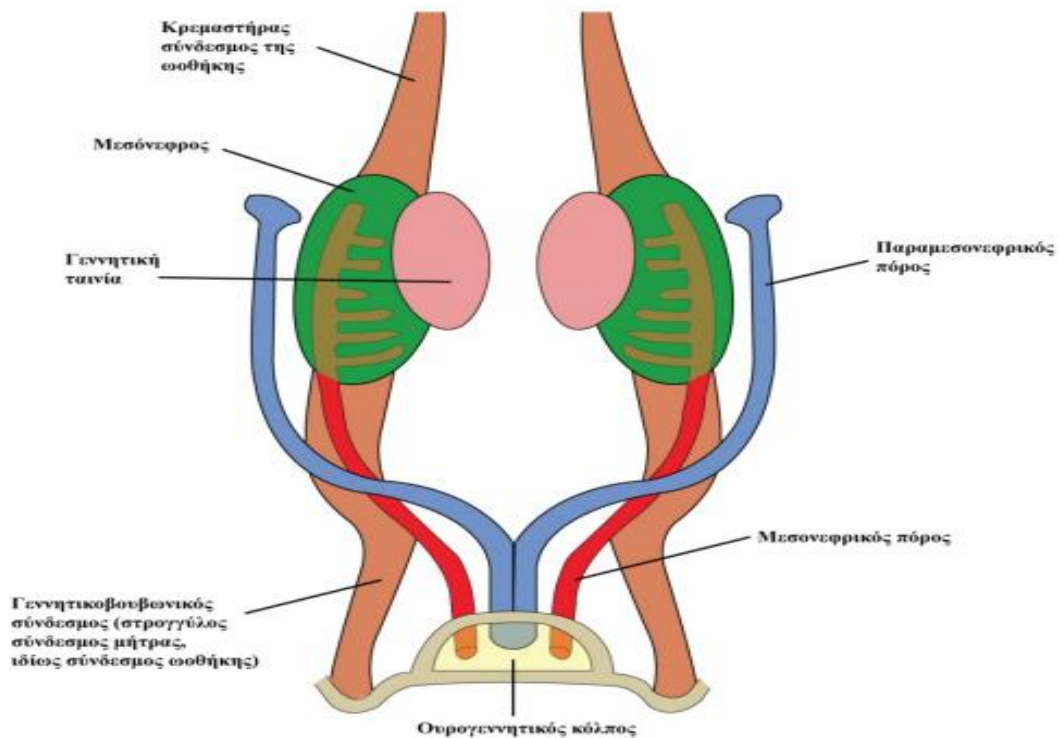
γεννητικές χορδές και το μεσέγγυμα της ακρολοφίας είναι οι γονάδες, που μέχρι την χρονική αυτή στιγμή της κύησης είναι αδιαφοροποίητες, είναι δηλαδή οι ίδιες τόσο στη γυναίκα όσο και στον άντρα. Κατά τη διαφοροποίηση, στο θήλυ έμβρυο οι γεννητικές χορδές οι οποίες βρίσκονται στη κεντρική μοίρα των γονάδων εκφυλίζονται και παραμένουν αναλλοίωτες μόνο οι γονάδες που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του επιθηλίου (φλοιώδης μοίρα ωοθήκης) [12].

Κατά το δεύτερο μήνα της ανάπτυξης του εμβρύου, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα είναι πλέον χρωμοσωμικά καθορισμένα και διαφοροποιούνται. Στο γυναικείο φύλο, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται και δίνουν τα ωογόνα τα οποία σε συνδυασμό με τα επιθηλιακά κύτταρα του έσω σπλαχνικού κοιλώματος, σχηματίζουν τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης ο φλοιός της ωοθήκης έχει μια ομοιόμορφη κατανομή από πρωτογενή ωοθυλάκια τα οποία διαφοροποιούνται με τη διαδικασία της μείωσης σε πρωτογενή ωοκύτταρα. Η μειωτική διαδικασία, δεν ολοκληρώνεται μέχρι και την εφηβεία έως και την ωορρηξία. Στη φάση αυτή της ωορρηξίας, μετά την πρώτη μείωση σε κάθε πρωτογενές ωοκύτταρο σχηματίζεται το δευτερογενές ωοκύτταρο. Ο συνδυασμός των πρωτογενών και των δευτερογενών ωοκυττάρων ονομάζονται άωρα γαμετοκύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα ώριμα γαμετοκύτταρα (ωάρια). Ο αριθμός των ωοθυλακίων υπολογίζεται σε 6-7 εκατομμύρια τους πρώτους 5-6 μήνες της εμβρυικής ζωής και μετά ακολουθεί η προοδευτική μείωση τους σε 1-2 εκατομμύρια στην εφηβεία και 24.000 στην τρίτη δεκαετία της ζωής της γυναίκας [68].

Μέχρι και τον 3<sup>ο</sup> μήνα της εμβρυικής ανάπτυξης, η ωοθήκη παραμένει καθηλωμένη στο μεσόνεφρο, ο οποίος βρίσκεται έξω από την πύελο. Όπως προαναφέρθηκε, τόσο οι μεσόνεφροι όσο και οι γονάδες καλύπτονται από τα κύτταρα του μέσου σπλαγγχικού κοιλώματος. Μέσα από το επιθήλιο του έσω σπλαγγχικού κοιλώματος καθώς και τα μεσεγγυματικά κύτταρα σχηματίζεται το περιτόναιο. Στο αρχικό στάδιο, οι γονάδες και οι μεσονεφροί σχηματίζονται πίσω από το περιτόναιο, ενώ κατά τη συνέχεια της ανάπτυξης του μεσονεφρού το περιτόναιο σπρώχνεται προς τα εμπρός, σχηματίζοντας έτσι μια πτυχή με έκταση μέχρι το διάφραγμα (ονομάζεται διαφραγματικός σύνδεσμος) και μια ουραία περιτοναϊκή πτυχή με έκταση μέχρι και την πύελο (βουβωνικός σύνδεσμος) [42].

Κατά τη συνεχιζόμενη ανάπτυξη του εμβρύου, ο μεσονεφρός εκφυλίζεται και οι περιτοναϊκές πτυχές λεπταίνουν και κρέμονται στο εσωτερικό σπλαγγχικό κοιλώμα που τελικά γίνεται περιτοναϊκή κοιλότητα. Το κοιλιακό αυτό τμήμα συμπεριλαμβάνει τους παραμεσονεφρικούς πόρους (γνωστοί στη βιβλιογραφία και σαν πόροι του Müller) ενώ οι ωοθήκες βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα των πτυχών. Οι περιτοναϊκές αυτές πτυχές ενώνονται στη μέση γραμμή και σχηματίζουν τον πλατέος σύνδεσμο και μάλιστα το τμήμα αυτού που στηρίζει τη μήτρα. Η ωοθήκη διαχωρίζεται από το μεσόνεφρο και μένει συνδεδεμένη μόνο από την περιοχή της πύλης με μια περιτοναϊκή πτυχή που ονομάζεται μεσοωοθήκιο. Από τον τρίτο μήνα της κύησης και μετά, ξεκινά η κάθοδος των ωοθηκών από το ουραίο τμήμα οι οποίες τελικά εγκαθίστανται μέσα στην ελάσσονα πύελο και στον ωοθηκικό βόθρο. Οι περιτοναϊκές αυτές πτυχές

αντικαθίστανται σταδιακά από ινώδη ιστό και σχηματίζουν τους στηρικτικούς συνδέσμους της ωοθήκης :κρεμαστήρας σύνδεσμος της ωοθήκης (από την περιτοναϊκή πτυχή μέχρι το διάφραγμα προς τα επάνω) γεννητικοβουβωνικός σύνδεσμος ο οποίος μετά το σχηματισμό της μήτρας διαχωρίζεται σε δύο μοίρες την άνω και την κάτω (ιδίως και στρογγυλός σύνδεσμος αντίστοιχα). (Εικόνα 3) (Cowart et al., 2013).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των συνδέσμων της ωοθήκης.

Η διαφοροποίηση των ωοθηκών ξεκινάει μία εβδομάδα αργότερα σε σχέση με τη διαφοροποίηση των όρχεων. Η θεωρία η οποία ήταν επικρατέστερη παλαιότερα, υποστήριζε ότι η διαφοροποίηση ήταν μια παθητική διαδικασία, ωστόσο έχει απορριφθεί και πλέον αναγνωρίζεται ότι πρόκειται για μια ενεργή διεργασία που απαιτεί την παρουσία ειδικών διεργασιών ανάπτυξης που γίνονται με συγκεκριμένη αλληλουχία. Κατά την περίπτωση που ο SRY απουσιάζει, η αρχέγονη γονάδα XX ελέγχεται από έναν γενετικό προγραμματισμό που χρησιμοποιεί την τριπλέτα των γονιδίων WNT4, RSPO1 και β-κατενίνη που ανταγωνίζονται τα γονίδια SOX9 και FGF9 που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των ανδρικών γονάδων. Η τριπλέτα των γονιδίων αυτών είναι που προάγει τη διαφοροποίηση της ωοθήκης [25]. Οι ωοθήκες

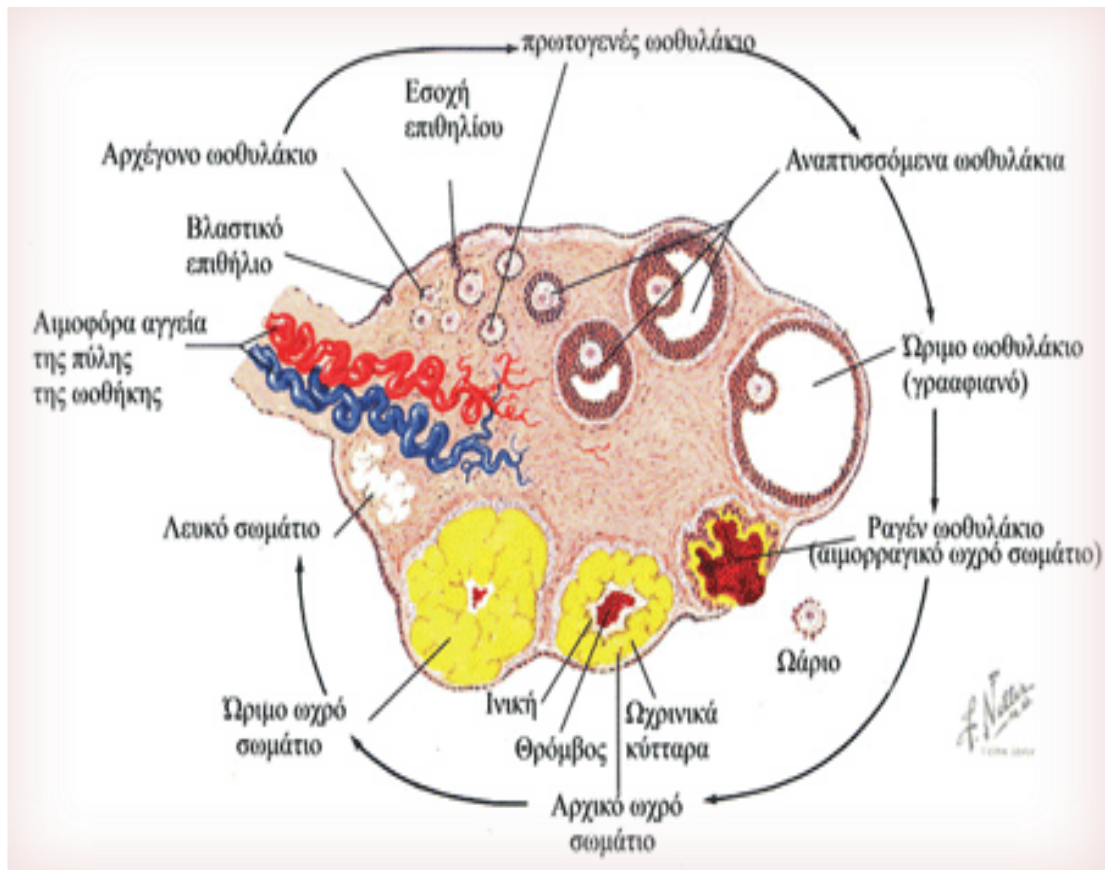
ξεκινούν να διαφοροποιούνται με την έκφραση του RSPO1, που σηματοδοτεί την έκφραση του WNT4. Το WNT4 προκαλεί την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ωοθηκών, τη στεροειδογένεση και τον σχηματισμό των πόρων Müller. Ο συνδυασμός των γονιδίων της β-κατενίνης και του RSPO1 απενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων FGF9 και SOX9 κατά την εμβρυϊκή ζωή, ενώ το γονίδιο FOXL2 επιτελεί την ίδια λειτουργία και μετά τον τοκετό. Το FOXL2 διαδραματίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων της ωοθήκης και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Επομένως, διαπιστώνεται ότι τα δύο αυτά γενετικά μονοπάτια (SOX9 / FGF9 και WNT4 / RSPO1) διαφοροποιούν αντίστοιχα τους όρχεις και τις ωοθήκες ενώ έχουν μια ανταγωνιστική σχέση ως προς την οδό γοναδικής διαφοροποίησης [54].

Στην περίπτωση που υπάρχει απουσία της αντιμυλλέριου ορμόνης (AMH) ή της τεστοστερόνης, αναπτύσσονται με καταβολή οι πόροι του Müller, τα έσω γεννητικά όργανα του θήλεος, σάλπιγγες, μήτρα και τα άνω 2/3 του κόλπου ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται υποστροφή των πόρων του Wolf (Εικόνα 3) [54].

### 1.1.2 Ανατομικά Στοιχεία Ωοθήκης

Οι ωοθήκες είναι οι γεννητικοί αδένες της γυναίκας και εντοπίζονται ανατομικά εκατέρωθεν της μήτρας εντός της πυελικής κοιλότητας. Έχουν λευκό χρώμα, είναι συμπαγείς και έχουν σχήμα ωοειδές. Είναι τα όργανα τα οποία παράγουν τα ωάρια [46]. Το μέγεθος των ωοθηκών ποικίλει και το μέγιστο μέγεθός τους μπορεί να είναι μέχρι 5x3x3 εκατοστά. Το μέγεθός μεταβάλλεται ανάλογα με τη φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στην οποία βρίσκεται η γυναίκα, όπως και από ποια από τις δύο ωοθήκες γίνεται η ωορηξία. Οι ιστοί οι οποίοι καλύπτουν την εξωτερική επιφάνεια της ωοθήκης είναι το βλαστικό επιθήλιο και ο ινώδης χιτώνας, με τα ωοθυλάκια να κυμαίνονται σε αριθμό και να φτάνουν τα 200.000 σε κάθε ωοθήκη. Ακόμα μπορεί να φτάσουν και τα 400 όταν ωριμάζουν πλήρως και ονομάζονται ωοθυλάκια του Graf. Οι ωοθήκες, όταν βρίσκονται σε φάση ωοθυλακιωρηξίας περιέχουν δομές που είναι γεμάτες με υγρό και ονομάζονται ωοθυλάκια. Τα ωοθυλάκια ποικίλουν σε μέγεθος από 1 έως 30 χιλιοστά ανάλογα με τη φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου που βρίσκεται η γυναίκα. Κάθε ένα από αυτά περιέχει ένα μικροσκοπικό ωοκύτταρο και κατά την αναπαραγωγική ηλικία υπάρχουν δύο έως πέντε ωοκύτταρα μέσα στις ωοθήκες [24].



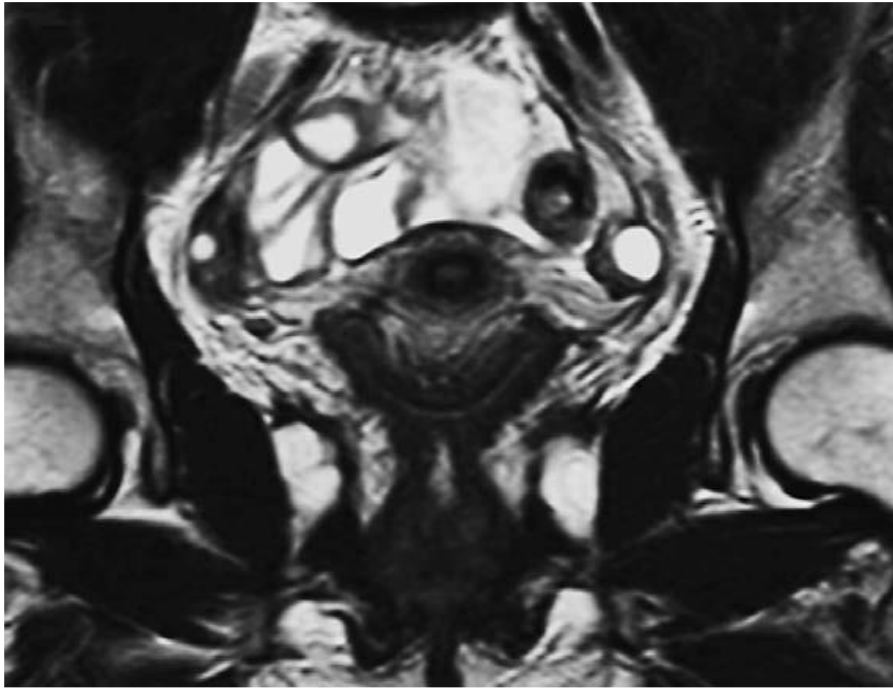


Εικόνα 4. Ανατομία των ωοθηκών [46]

Τα ωοθυλάκια αποτελούνται από ένα ανώριμο κύτταρο το οποίο περιβάλλεται από ένα ή περισσότερα στρώματα καλυπτήριων κυττάρων ή κύτταρα της θήκης. Τα κύτταρα αυτά έχουν θρεπτικό ρόλο ως προς το ωοθυλάκιο και το βοηθούν να ωριμάσει. Όσο το ωοθυλάκιο ωριμάζει, τόσο περιβάλλεται και από περισσότερα κύτταρα-θήκες ενώ λίγο πριν την τελική ωρίμανσή του το ωάριο εξωθείται προς την περιφέρεια του ωοθυλακίου η οποία γεμίζει με υγρό. Κατά την πλήρη ωρίμανση του, το ωοθυλάκιο είναι περίπου 2 cm σε μέγεθος και υπόκειται σε ρήξη (διαδικασία ωοθυλακιορρηξίας). Μετά τη ρήξη του, το ωάριο παραλαμβάνεται από τον σαλπιγγικό κώδωνα [84].

Η ωοθηκική αρτηρία, αποτελεί κλάδο της κοιλιακής αορτής ενώ και οι κλάδοι της μητριαίας αρτηρίας συμβάλλουν επίσης στην αιμάτωση της ωοθήκης. Η ωοθήκη νευρώνεται από το ωοθηκικό πλέγμα καθώς επίσης και με το μητροκολπικό πλέγμα (Εικόνα 5) [84]

Η ωοθήκη έχει δύο σκοπούς: Α) την ωογέννεση δηλαδή την παραγωγή ωαρίων (γαμετών) και Β) την έκκριση των θηλυκών στεροειδών ορμονών δηλαδή των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Από την ωοθήκη εκκρίνεται επιπλέον και η ορμόνη ανασταλίνη (πεπτιδική ορμόνη).



*Εικόνα 5. Ωοθήκες γυναίκας 28 ετών. Φυσιολογικές, στον ωοθηκικό βόθρο. Παρατηρείται το ωοειδές σχήμα και μπορούν εύκολα να εντοπιστούν από την αναγνώριση των ωοθυλακίων.*

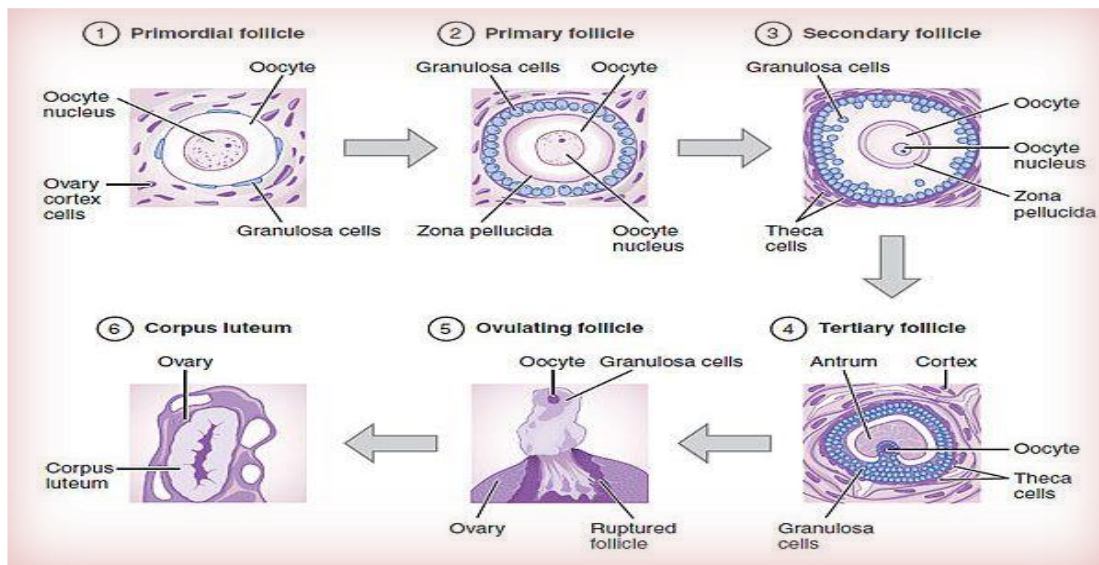
### **1.1.3. Ωογένεση**

Σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, τα ωάρια βρίσκονται μέσα στην ωοθήκη σε ανατομικές δομές οι οποίες ονομάζονται θυλάκια. Η περαιτέρω ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων σε πολλαπλές στοιβάδες, την αύξηση μεγέθους των ωοκυττάρων και τον διαχωρισμό των ωοκυττάρων από τα έσω κοκκιώδη κύτταρα με την διαφανή ζώνη. Η διαφανής ζώνη είναι μια δομή που χαρακτηρίζεται σαν στρώμα γλυκοπρωτεϊνών το οποίο περιβάλλει το ωοκύτταρο. Το ακτινωτό στεφάνι, είναι μια διαφορετική δομή η οποία μοιάζει με δαχτυλίδι, αποτελείται από κοκκιώδη κύτταρα και περιβάλλει τη διάφανη ζώνη. Τα κοκκιώδη κύτταρα έχουν ως βασική ιδιότητα την έκκριση των οιστρογόνων καθώς και μικρή ποσότητα προγεστερόνης κατά το χρονικό διάστημα λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία. Από τα κοκκιώδη κύτταρα εκκρίνεται και η πεπτιδική ορμόνη ανασταλτίνη [130]. Κατά την αύξηση του θυλακίου, σχηματίζεται η θήκη από κύτταρα συνδετικού ιστού. Ο σχηματισμός της θήκης παίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση των οιστρογόνων. Μετά το σχηματισμό αυτόν, τα πρωταρχικά ωοκύτταρα λαμβάνουν την τελική τους μορφή και έχουν διάμετρο 115μm, ενώ στο μέσο των

κοκκιωδών κυττάρων ξεκινάει ο σχηματισμός του άντρου (δομή που περιέχει υγρά των κοκκιωδών κυττάρων) [130].

Σε όλη τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου υπάρχει μια προοδευτική μετάβαση συγκεκριμένων αρχέγονων θυλακίων από προ-κοιλοτικά θυλάκια χωρίς άντρο στα κοιλοτικά. Μετά την έναρξη του κύκλου, περίπου 10-25 από αυτά τα θυλάκια διεγείρονται με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται σε μεγάλα θυλάκια. Τελικά μόνο ένα από αυτά καταφέρνει και ολοκληρώνει τη διαδικασία της ωρίμανσης. Κατά την πρώτη εβδομάδα του κύκλου, το κυρίαρχο θυλάκιο συνεχίζει να αναπτύσσεται ενώ τα υπόλοιπα θυλάκια εκφυλίζονται μέσω της ατρησίας. Το θυλάκιο που τελικά επικρατεί, περιβάλλεται από μια κύστη με λεπτά τοιχώματα μεγέθους περίπου 15-25mm [39]. Μετά από τη μεγέθυνση του μεγαλύτερου και κυρίαρχου ωοθυλακίου τα στρώματα των κοκκιωδών κυττάρων σχηματίζουν ένα είδος λόφου που προβάλλει μέσα στο άντρο και ονομάζεται ωοφόρος δίσκος του θυλακίου. Λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία, το ωάριο διαιρείται μειωτικά για πρώτη φορά και μετατρέπεται σε δευτερογενές ωοκύτταρο. Ο ωοφόρος δίσκος ελευθερώνεται από το τοίχωμα του θυλακίου ώστε το ωοκύτταρο το οποίο περιβάλλεται από αυτόν να επιπλέει ελεύθερα στο υγρό που υπάρχει στο εσωτερικό του άντρου. Στη συνέχεια, το ώριμο θυλάκιο μεγαλώνει σε τέτοιο βαθμό ώστε να εκπίπτει έξω από την ωοθήκη. Το χρονικό σημείο που συμβαίνουν οι παραπάνω διαδικασίες είναι περίπου το ενδιάμεσο (14<sup>η</sup> ημέρα) του μηνιαίου κύκλου [105]. Την απελευθέρωση του υγρού από το άντρο και το ωάριο ακολουθεί η μετατροπή του θυλακικού υλικού που παρέμενε γύρω από το άντρο. Πιο συγκεκριμένα, τα κοκκιώδη κύτταρα μεγεθύνονται και ολόκληρη η δομή η οποία σχηματίζεται (ωχρό σωματίο) αποτελεί τον αδένα που εκκρίνει τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και την ανασταλίνη. Στην περίπτωση που το ωάριο που απελευθερωθεί στις σάλπιγγες δεν γονιμοποιηθεί, το ωχρό σωματίο μεγεθύνεται για να φτάσει στο μεγαλύτερο μέγεθός του σε διάρκεια 10 ημερών και στη συνέχεια ακολουθεί ο εκφυλισμός και η απόπτωσή του. Το γεγονός αυτός προκαλεί την εμμηνορροσία και την αρχή ενός νέου κύκλου. [37]

Ο μηνιαίος κύκλος της γυναίκας χωρίζεται σε δύο επιμέρους φάσεις που έχουν την ίδια περίπου διάρκεια: θυλακική ή παραγωγική φάση κατά την οποία δημιουργείται ένα ώριμο ωοθυλάκιο και ένα δευτερογενές ωοκύτταρο και την ωχρινική ή εκκριτική φάση η οποία ξεκινά την ωοθυλακιορρηξία και καταλήγει στον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου. Η μεταφορά του ωαρίου στον ωαγωγό της σάλπιγγας γίνεται κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας. Στο τέλος των ωαγωγών υπάρχουν κροσσοί με βλεφαροειδές επιθήλιο που με τις κινήσεις του αναρροφά το ωάριο που καταλήγει εντός του ωαγωγού. Στο εσωτερικό του ωαγωγού το ωάριο κινείται με γρήγορες κινήσεις οι οποίες καθοδηγούνται από τις βασικές κινήσεις των κροσσών. Οι κινήσεις αυτές είναι αργές, ώστε το ωάριο να φτάνει στη μήτρα μετά από 4 περίπου ημέρες. Από αυτό γίνεται αντιληπτό ότι η γονιμοποίηση συμβαίνει εντός του ωαγωγού λόγω της σύντομης διάρκειας ζωής του ωαρίου. Η γονιμοποίηση γίνεται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και πιο συγκεκριμένα περίπου 12-15 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. [37]



Εικόνα 6. Εξελικτική πορεία ωοθυλακίου.

#### 1.1.4 Στεροειδείς ορμόνες

Οι ορμόνες είναι χημικές ουσίες οι οποίες παράγονται από τον οργανισμό, συνήθως απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και ρυθμίζουν με τη δράση τους τη λειτουργία συγκεκριμένων κυττάρων ή οργάνων του σώματος. Η δράση τους είναι δράση αγγελιοφόρων, μεταφέρουν δηλαδή πληροφορίες και οδηγίες μεταξύ κυττάρων ώστε να πραγματοποιούνται σωστά οι διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Όσον αφορά της γυναικείες ορμόνες, αυτές είναι περισσότερο σύνθετες σε σχέση με τις αντρικές, αφού έχουν πολυάριθμες δράσεις σε ποικίλα θέματα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας [91].

Οι πιο σημαντικές ορμόνες είναι αυτές οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη των οργάνων αναπαραγωγής, τη ρύθμιση του καταμήνιου κύκλου την αναπαραγωγή και τη γονιμότητα, ενώ οι ίδιες οι ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων και της οστεοπόρωσης. Πολλά από τα συμπτώματα και τα γεγονότα τα οποία αντιμετωπίζει μια γυναίκα στην καθημερινότητά της οφείλονται στις γυναικείες ορμόνες. Τα συμπτώματα αυτά συμπεριλαμβάνουν την ακμή, τη νευρικότητα, την απουσία εμμήνου ρύσεως, τη δυσμηνόρροια, το μεγαλύτερο από το φυσιολογικό σωματικό βάρος και τη δυσκολία απώλειάς του, τη συχνή διούρηση, την οστεοπόρωση και άλλα γεγονότα που επιδρούν στη σωματική αλλά και στην ψυχολογική υγεία των γυναικών [23].

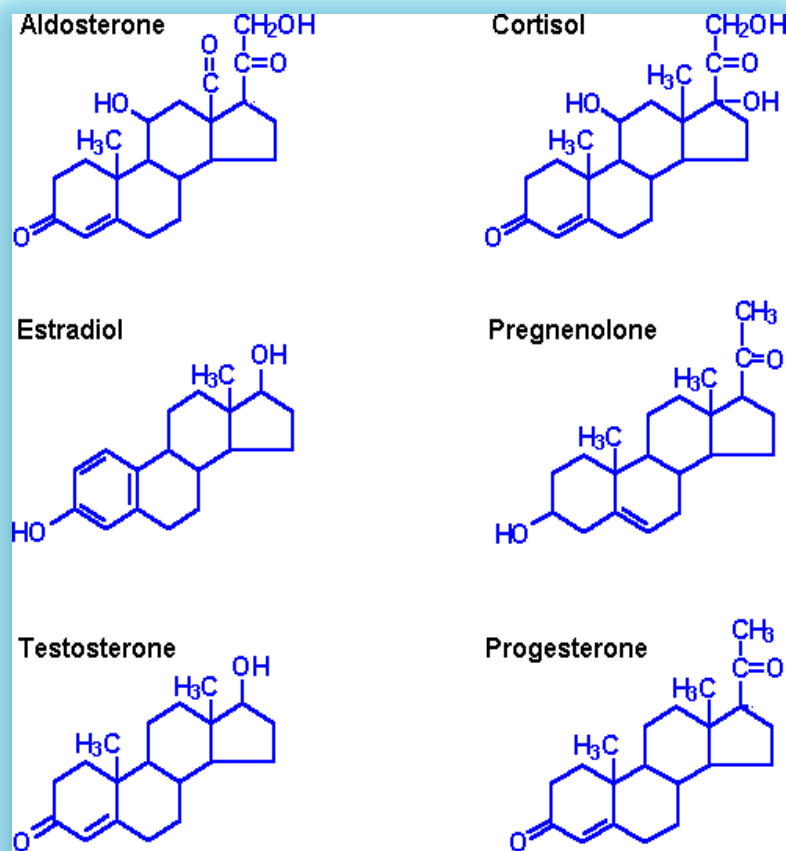
Επομένως γίνεται κατανοητό ότι η ορμονική ισορροπία ειδικά στις γυναίκες, είναι σημαντική και οι σπουδαιότερες ορμόνες οι οποίες επηρεάζουν είναι η οιστραδιόλη, τα οιστρογόνα, η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) και η ινσουλίνη [23].

Τα φυσικά οιστρογόνα στις γυναίκες είναι κυρίως τρία, η οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη. Και οι τρεις αυτές ορμόνες παράγονται αρχικά από τα ανδρογόνα μετά από δράση ορισμένων ενζύμων. Το οιστρογόνο, παράγεται κυρίως από τα πρωτογενή ωοθυλάκια κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του, από τον πλακούντα αλλά και από το ωχρο σωματίο. Η παραγωγή οιστρογόνου από τις ωοθήκες διεγείρεται από τις FSH και LH. Τα οιστρογόνα κυκλοφορούν στο αίμα και των δύο φύλων, ωστόσο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Η ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου (π.χ. μαστοί) προωθείται από τα οιστρογόνα. Η συγκέντρωση και η παραγωγή οιστρογόνων παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην πάχυνση του ενδομητρίου, τη δημιουργία βλέννας στο στόμιο του τραχήλου ώστε να διεισδύουν ευκολότερα τα σπερματοζωάρια καθώς και στη ρύθμιση άλλων γεγονότων στον εμμηνορροϊκό κύκλο. Κατά την έναρξη της έμμηνου ρήσεως παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων και της οιστραδιόλης. Η αύξηση είναι συνεχόμενη μέχρι το μέσο περίπου του εμμηνορροϊκού κύκλου, όπου η οιστραδιόλη φτάνει στα μέγιστα επίπεδα. Η μεγιστοποίηση της τιμής της οιστραδιόλης είναι πολύ σημαντική, επειδή είναι το γεγονός που πυροδοτεί την ωορρηξία. Τα επίπεδα των οιστρογόνων εμφανίζονται μειωμένα, κυρίως σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας από την προεμμηνοπαυσιακή περίοδο και μετά, στο πλαίσιο των ορμονικών αλλαγών που επιτελούνται στο γυναικείο σώμα. Αντίθετα, σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, παρατηρείται συχνά μια πλεονάζουσα συγκέντρωση οιστρογόνων. Το γεγονός αυτό οφείλεται τόσο σε ανισορροπία των ορμονών όσο και στην έκθεση των γυναικών σε οιστρογόνα του περιβάλλοντος, όπως είναι οι ορμόνες που λαμβάνονται μέσω της διατροφής [94].

Η προγεστερόνη είναι μια ορμόνη η οποία παράγεται φυσιολογικά στο γυναικείο σώμα με σκοπό να διασφαλιστεί η δημιουργία ενός μανδύα γύρω από την μήτρα, το ενδομήτριο, το οποίο έχει σκοπό τη διευκόλυνση της εμφύτευσης και της ανάπτυξης του εμβρύου στα τοιχώματά της, από τις πρώτες κιόλας μέρες της εγκυμοσύνης. Μετά την ωορρηξία, η γυναίκα εισέρχεται στη δεύτερη φάση του κύκλου της, όπου παρατηρείται μείωση των οιστρογόνων και αύξηση της προγεστερόνης, η οποία παράγεται από τις ωοθήκες [111]. Η προγεστερόνη μεγιστοποιείται κατά την 21<sup>η</sup> ημέρα του εμμηνορροϊκού κύκλου που έχει διάρκεια περίπου 28 ημέρες. Ο ρόλος της είναι η δημιουργία ιδανικών συνθηκών προκαλώντας την ωρίμανση του ενδομητρίου για να δεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο, χαλαρώνει και ηρεμεί τη μήτρα αποτρέποντας τις συσπάσεις της ενώ καταστρέφονται τα ωοθυλάκια που περισσεύουν και δεν χρειάζονται στο συγκεκριμένο κύκλο. Τέλος, ο ρόλος της είναι η αδρανοποίηση της παραγωγής τόσο της FSH όσο και της LH [111]. Η θυλακοτρόπος και η ωχρινοτρόπος ορμόνη παράγεται από την υπόφυση, ένας αδένας που ενεργοποιείται από το νευρικό σύστημα και τον υποθάλαμο. Περίπου δύο ημέρες πριν ξεκινήσει η έμμηνος ρύση, συμβαίνει ένα ορμονικό φαινόμενο το οποίο οδηγεί στην παραγωγή της FSH. Αυτή η αύξηση της FSH βοηθάει στην έναρξη της παραγωγής των ωοθυλακίων στο εσωτερικό της ωοθήκης και την παραγωγή οιστρογόνων. Σε σχέση με την LH, η ωορρηξία είναι απαραίτητη για να παραχθεί η προγεστερόνη. [119]

Η γοναδοτροπίνη παράγεται στον εγκεφαλικό υποθάλαμο και ρυθμίζει την έκκριση όλων των θηλυκών ορμονών. Ο ρόλος της είναι ο έλεγχος της παραγωγής και των επιπέδων των οιστρογόνων. Τη χρονική στιγμή που μειώνονται τα επίπεδα της προγεστερόνης και των οιστρογόνων (προς το τέλος κύκλου), τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης αυξάνονται, υπάρχει δηλαδή μια αντιστρόφως ανάλογη σύνδεση. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι τα υψηλά επίπεδα προγεστερόνης μειώνουν τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης. [119]

Η τεστοστερόνη αποτελεί επίσης μια σημαντική εκπρόσωπο των στεροειδών ορμονών στο ανθρώπινο σώμα. Εμφανίζεται κυρίως στους άντρες και ευθύνεται για πολλά από τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του αντρικού σώματος ενώ είναι υπεύθυνη για τη λίμπιντο, την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά τόσο από τους άντρες όσο και από τις γυναίκες αλλά και για την μυϊκή αύξηση. Σε ορισμένες, παθολογικές καταστάσεις, οι γυναίκες έχουν υψηλότερα από το φυσιολογικό επίπεδα τεστοστερόνης, όπως για παράδειγμα στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [103].



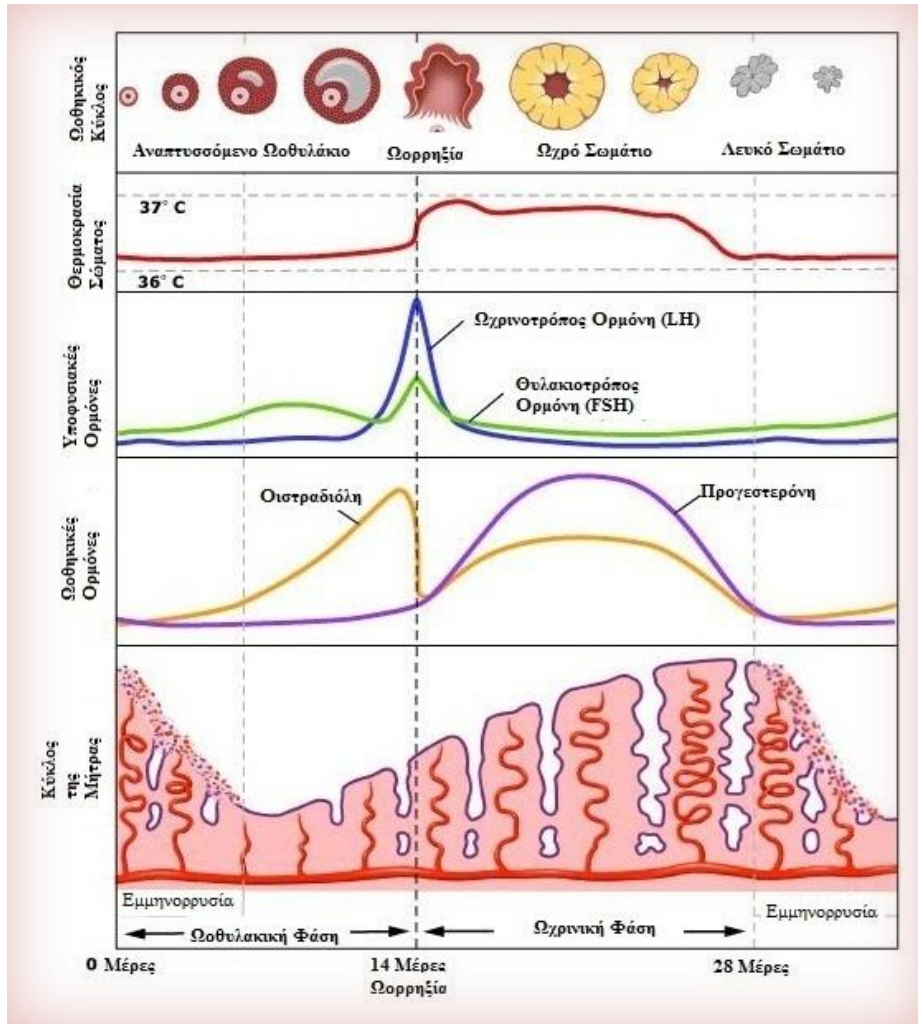
Εικόνα 7. Στεροειδείς ορμόνες [40]

Οι ορμόνες δε δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους, αλλά αποτελούν έναν κυκλικό μηχανισμό ο οποίος αν επηρεαστεί σε κάποιο σημείο του προκαλεί σημαντικές δυσλειτουργίες οι οποίες εκδηλώνονται διαφορετικά σε κάθε γυναίκα. Οι ορμονικές διακυμάνσεις μπορεί να οφείλονται σε διαταραχή της ινσουλίνης, των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, της ωχρινότροπου ή της θυλακιοτρόπου ορμόνης..

Στο πρώτο στάδιο της θυλακικής φάσης οι τιμές της FSH είναι υψηλές, ενώ μειώνονται σταθερά στο υπόλοιπο διάστημα του καταμήνιου κύκλου, εκτός από μια μικρή κορύφωση η οποία παρουσιάζεται στο μέσο του κύκλου. Οι τιμές της LH είναι σχεδόν σταθερές σε όλη τη διάρκεια του κύκλου και κατά τη μεγαλύτερο μέρος της θυλακικής φάσης αλλά υπάρχει μια απότομη αύξησή τους, η οποία είναι γνωστή και ως παλιρροϊκό κύμα LH, 18 ώρες περίπου πριν την ωοθυλακορρηξία. Κατά την ωχρινική φάση ακολουθεί η μείωσή τους. Τα οιστρογόνα, έχουν σταθερά χαμηλές τιμές κατά την πρώτη εβδομάδα της ωχρινικής φάσης ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα αυξάνονται λόγω της ανάπτυξης των ωοθυλακίων που τα εκκρίνουν. Αμέσως μετά, οι τιμές μειώνονται μετά από την κορύφωση της LH, ενώ υπάρχει και μια δεύτερη αύξηση των τιμών της LH, η οποία οφείλεται στην έκκριση του ωχρού σωματίου. Τα επίπεδα της ορμόνης μειώνονται κατά τις τελευταίες ημέρες του κύκλου. Οι τιμές της ανασταλτίνης, αυξάνονται κατά την τελευταία ωχρινική και θυλακική φάση και στη συνέχεια μειώνονται καθώς το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται. Η αύξηση της FSH συμβαίνει όταν τελειώνει ένας εμμηνορρυσιακός κύκλος και ξεκινάει ένας άλλος, διότι είναι υπεύθυνη για την διέγερση και τη μεγέθυνση των ωοθυλακίων [131]. Στις 14 ημέρες, η FSH και LH έχουν διαφορετικές επιδράσεις τόσο στα αναπτυσσόμενα θυλάκια. Η FSH δρα στα κοκκιώδη κύτταρα και τα διεγείρει προκειμένου να παραχθούν τα οιστρογόνα ενώ επίσης διεγείρεται ο σχηματισμός και η μεγέθυνση του άντρου. Η LH δρα στα κύτταρα της θήκης και τα διεγείρει με σκοπό να πολλαπλασιαστούν και να συντεθούν ανδρογόνα που θα μετατραπούν ακολούθως σε οιστρογόνα μέσα στα κοκκιώδη κύτταρα. Στην αρχή της δεύτερης εβδομάδας, έχει ξεκαθαριστεί πιο από τα θυλάκια θα επικρατήσει. Το κοκκιώδες κύτταρο αρχίζει να εκκρίνει τα οιστρογόνα ενώ τα κοκκιώδη κύτταρα έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στις ορμόνες FSH και LH [70].

Τα οιστρογόνα αρχικά δρουν στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και μειώνουν την ποσότητα των παραγόμενων FSH και LH (μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης). Τα κοκκιώδη κύτταρα έχουν επίσης σκοπό την έκκριση της ανασταλτίνης η οποία μειώνει την έκκριση της FSH (μείωση της συγκέντρωσης FSH). Όταν παρουσιάζονται υψηλές τιμές οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος, αυξάνεται η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο (μέσω θετικής ανατροφοδότησης) [70]. Μετά την αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων, η υπόφυση σταματάει να απελευθερώνει FSH ενώ αρχίζει να παράγει LH, η οποία προκαλεί ωοθυλακορρηξία, δηλαδή απελευθέρωση του ωαρίου. Η απότομη αύξηση της LH διεγείρει επίσης και τη μετατροπή των κοκκιωδών κυττάρων αλλά και κυττάρων της θήκης σε ωχρό σωματίο. Όταν τα οιστρογόνα έχουν υψηλές τιμές, δηλαδή στην περίπτωση της αυξημένης προγεστερόνης, οιστρογόνων και

ανασταλτίνης στην ωχρινική φάση του κύκλου, μειώνουν τις τιμές των γοναδοτροπινών. Μετά από τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου παρατηρείται επίσης μείωση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων ενώ οι FSH και η LH αυξάνονται με αποτέλεσμα την ωρίμανση μιας νέας ομάδας ωοθυλακίων. Δηλαδή, ξεκινάει από την αρχή ο καταμήνιος κύκλος της γυναίκας [104].



Εικόνα 8. Η ακολουθία των βασικών ελέγχων εξαρτάται από την έκκριση της GnHR από τα νευρικά κύτταρα του υποθαλάμου (Vander et al., 2011).

## 1.1.5 ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

### 1.1.5.1 Ορμόνες Καταμήνιου Κύκλου

Εξορισμού η έναρξη του καταμήνιου κύκλου οριοθετείται από την πρώτη ημέρα της αιμορραγίας. Ο κύκλος τελειώνει πριν την επόμενη έμμηνο ρύση. Οι καταμήνιος κύκλος έχει συνήθως διάρκεια που κυμαίνεται από 25 μέχρι και 36 ημέρες. Μόνο το



10% με 15% των γυναικών έχουν ακριβή κύκλο 25 ημερών. Επίσης, τουλάχιστον το 20% των γυναικών έχουν ακανόνιστο κύκλο, δηλαδή μικρότερη ή μεγαλύτερη διάρκεια από το φυσιολογικό. Συνήθως, ο κύκλος έχει περισσότερες διακυμάνσεις αμέσως μετά την ηλικία έναρξης (εμμηνόρρηξη) και στην περίοδο πριν την εμφάνιση της εμμηνόπαυσης. Η αιμορραγία κατά την έμμηνο ρύση διαρκεί περίπου 3-7 ημέρες με μέσο όρο τις 5 ημέρες. Ο καταμήνιος κύκλος ρυθμίζεται από ένα ορμονικό σύστημα, τις λουτεϊνικές ορμόνες και τις ορμόνες που ενεργοποιούν το ωοθυλάκιο. Οι ορμόνες αυτές παράγονται στην υπόφυση, προάγουν την ωορρηξία και ενεργοποιούν τα ωάρια ώστε να παράγουν οιστρογόνα και προγεστερόνη. Τα οιστρογόνα και οι προγεστερόνη ενεργοποιούν τη μήτρα και το γυναικείο στήθος και τα προετοιμάζουν για την αναπαραγωγή [10].

Ο καταμήνιος κύκλος έχει τρεις φάσεις:

- Ωοθυλακική
- Ωορρηξία
- Ωχρονοποιητική φάση

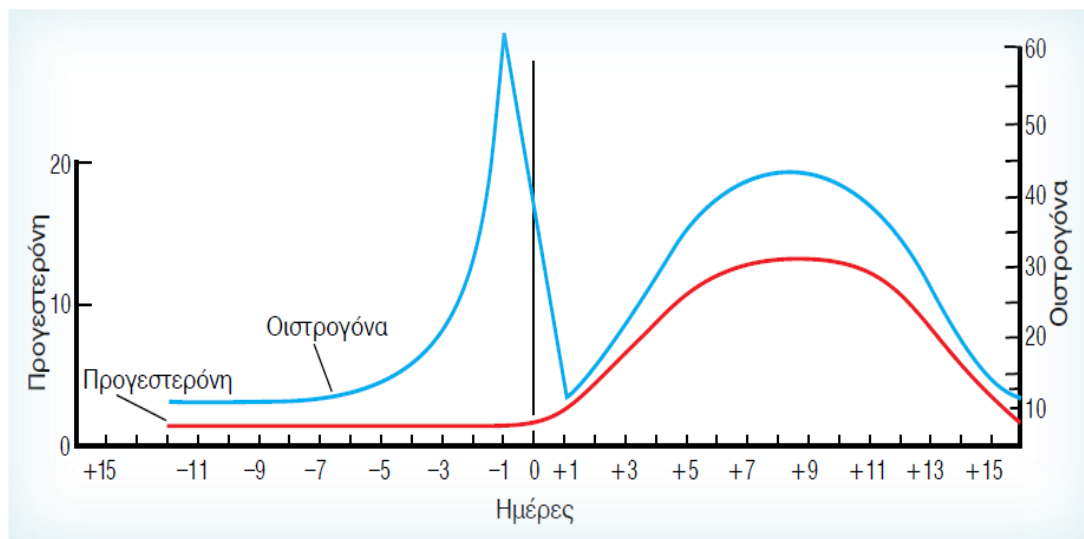
Η ωοθυλακική φάση ξεκινάει κατά την πρώτη ημέρα της αιμορραγίας αλλά το κυριότερο γεγονός της είναι η δημιουργία των ωοθυλακίων στα ωάρια. Κατά την έναρξη της ωοθυλακικής φάσης, το ενδομήτριο είναι γεμάτο με υγρά τα οποία βρίσκονται εκεί για τη θρέψη του εμβρύου. Ωστόσο αν δεν υπάρχει γονιμοποίηση κάποιου ωαρίου τα επίπεδα οιστρογόνου και προγεστερόνης είναι χαμηλά. Σαν αποτέλεσμα, οι ανώτερες στοιβάδες του ενδομητρίου απορρίπτονται και ξεκινάει η έμμηνο ρύση. Περίπου σε αυτό το στάδιο, η υπόφυση αυξάνει την παραγωγή της ορμόνης που προάγει την παραγωγή ωοθυλακίων. Η ορμόνη αυτή ενεργοποιεί τη δημιουργία περίπου 3-30 ωοθυλακίων από τα οποία κάθε ένα περιέχει και ένα ωάριο. Αργότερα κατά τη φάση αυτή, καθώς τα επίπεδα της ορμόνης αυτής μειώνονται, συνεχίζει η ανάπτυξη ενός μόνο ωαρίου. Το ωάριο αυτό ξεκινάει την παραγωγή οιστρογόνου με αποτέλεσμα να διασπά τα υπόλοιπα ωάρια. Τα αυξανόμενα οιστρογόνα ξεκινούν επίσης την προετοιμασία της μήτρας αλλά και ενεργοποιεί την αύξηση της ωχρινότροπου ορμόνης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η φάση αυτή κρατάει 13-14 ημέρες αλλά από τις τρεις φάσεις είναι αυτή που κυμαίνεται περισσότερο. Το τελείωμα της φάσης σηματοδοτεί η απότομη αύξηση της ωχρινότροπου ορμόνης η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ωαρίου και την έναρξη της επόμενης φάσης [11].

Η φάση της ωορρηξίας ξεκινάει όταν αυξάνονται τα επίπεδα της ωχρινότροπου ορμόνης. Η ορμόνη αυτή προκαλεί την αποκόλληση του επικρατέστερου ωοθυλακίου από την επιφάνεια του ωαρίου και τελικά τη ρήξη του. Τα επίπεδα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης αυξάνονται σε λιγότερο βαθμό, με την αύξηση αυτή να είναι άγνωστης μέχρι στιγμής αιτιολογίας. Η φάση της ωορρηξίας διαρκεί συνήθως 16-32 ώρες και τελειώνει περίπου 10-12 ώρες μετά την αύξηση της ωχρινότροπου

ορμόνης. Το ωάριο μπορεί να γονιμοποιηθεί κυρίως έως 12 ώρες μετά από την απελευθέρωσή του, με την αύξηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης να μετράται με την ανίχνευση της στα ούρα. [11]

Η ωχρινοποιητική φάση ξεκινάει αμέσως μετά την ωορρηξία, διαρκεί περίπου 14 ημέρες και τελειώνει πριν την έμμηνο ρύση. Στη φάση αυτή, το ωοθυλάκιο που έχει υποστεί ρήξη κλείνει μετά την απελευθέρωση ενός ωαρίου και διαμορφώνει μια δομή που ονομάζεται ωχρό σωματίο. Το ωχρό σωματίο με τη σειρά του παράγει αυξανόμενες ποσότητες προγεστερόνης.

Εικόνα 9. Καμπύλες Έκκρισης Οιστρογόνων και Προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του Γεννητικού Κύκλου. (Κατρίση ΔΕ.κ.συν., 2007)

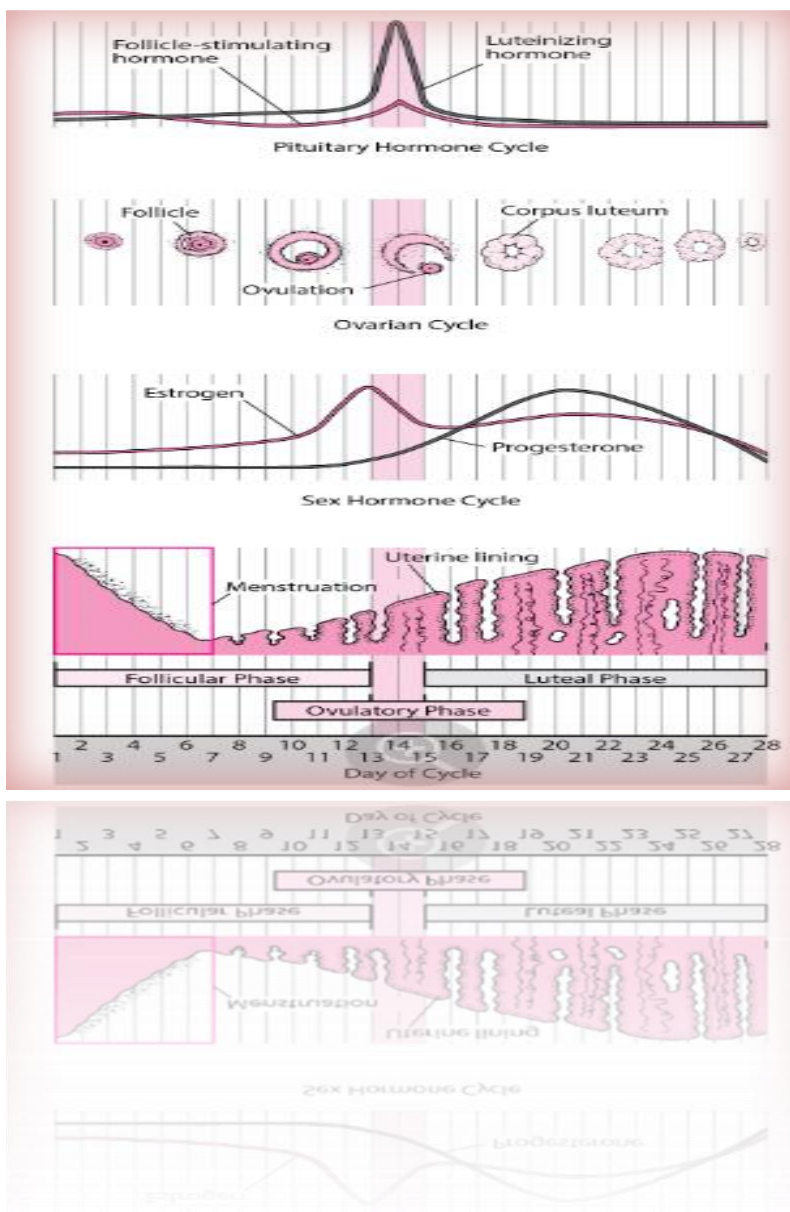


Η προγεστερόνη η οποία παράγεται από το ωχρό σωματίο έχει τις ακόλουθες συνέπειες:

- Προετοιμάζει τη μήτρα για τυχόν εμφύτευση εμβρύου.
- Προκαλεί την πάχυνση του ενδομητρίου, γεμίζοντάς το με υγρό και θρεπτικά συστατικά για τη θρέψη του εμβρύου.
- Προκαλεί πάχυνση στο βλενογόνο του τραχήλου, έτσι ώστε να μην μπορούν να εισέλθουν στη μήτρα βακτήρια ή σπερματοζωάρια.
- Αυξάνει τη θερμοκρασία του σώματος κατά ένα μικρό βαθμό μέχρι την έμμηνο ρύση [99].

Κατά το μεγαλύτερο διάστημα της ωχρινοποιητικής φάσης, τα αυξημένα επίπεδα της προγεστερόνης προκαλούν την διαστολή των θηλών του στήθους. Στην περίπτωση εμφύτευσης εμβρύου, τα κύτταρα γύρω από το αναπτυσσόμενο έμβryo ξεκινούν να παράγουν μια ορμόνη που ονομάζεται χοριακή γοναδοτροπίνη. Η ορμόνη αυτή διατηρεί το ωχρό σωματίο το οποίο συνεχίζει να παράγει προγεστερόνη μέχρι το αναπτυσσόμενο έμβryo να ξεκινήσει την παραγωγή των δικών του ορμονών.

Εικ 10 . Μεταβολές ορμονών κατά τον εμμηνορροϊκό κύκλο [99].



## 1.2. Άξονας Υποθαλάμου- Υπόφυσης – Ωοθηκών

Ο έλεγχος του συστήματος της ανθρώπινης αναπαραγωγής αρχίζει από τον υποθάλαμο μέσω της απελευθέρωσης της ορμόνης γοναδοεκλυτίνης. Σε απόκριση της γοναδοεκλυτίνης, η υπόφυση εκκρίνει της γοναδοτροπίνες (LH και FSH) οι οποίες ανιχνεύονται στην κυκλοφορία του αίματος. Οι δύο αυτές ορμόνες προκαλούν την παραγωγή μιας σειράς στεροειδών ορμονών από τις γονάδες, όπως είναι η προγεστερόνη, η οιστραδιόλη, η ανδροστεριόνη και η τεστοστερόνη. Ο υποθάλαμος, είναι τμήμα του διεγκεφάλου, καταλαμβάνει τα πλάγια τοιχώματα και το έδαφος της τρίτης κοιλίας και περιέχει ένα μικρό αριθμό πυρήνων με πολλές λειτουργίες. Η δομή του περιλαμβάνει την έξω ζώνη με διαμήκεις ίνες της δέσμης του μεσαίου πρόσθιου εγκεφάλου και την έσω ζώνη με την υποδιαίρεση των τεσσάρων περιοχών (προοπτική περιοχή, υπερχιασματική περιοχή, φαιοφυματική και μαστική περιοχή).

Αυτή η ανατομική δομή ζυγίζει 4gr και περιλαμβάνει το 0.4% του όγκου του εγκεφάλου. Η σημαντικότερη από τις λειτουργίες του είναι η σύνδεση του νευρικού με το ενδοκρινικό σύστημα και ο έλεγχος της λειτουργίας των περισσότερων ενδοκρινικών αδένων. Η λειτουργία του μπορεί επίσης να χαρακτηριστεί ως μετατροπή των νευρικών σημάτων σε ορμονικά. Ο υποθάλαμος εκκρίνει ουσίες που μπορούν να χαρακτηριστούν ως κατά βάση ορμόνες και μεταφέρονται στην υπόφυση (πρόσθιος λοβός ή αδενούποφυση) μέσω του πυλαιού συστήματος χωρίς να μπαίνουν στην γενική κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, ο υποθάλαμος συνθέτει ακόμη ένα σύνολο ορμονών στα νευρικά κύτταρα οι οποίες μεταφέρονται στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης από όπου και γίνεται η τελική έκκρισή τους. Η μεταφορά αυτή γίνεται μέσω μιας οδού που αποτελείται από νευράξονες, νευρικές δηλαδή ίνες που μεταφέρουν τις ορμόνες μακριά από το σώμα του νευρικού κυττάρου. Οι ορμόνες αυτές είναι οι εξής:

- ωκυτοκίνη (προάγει τις συσπαστικές κινήσεις της μήτρας κατά τον τοκετό και παίζει σημαντικό ρόλο στο θηλασμό)
- Η αντιδιουρητική ορμόνη ή ADH, ο ρόλος της οποίας είναι ο περιορισμός της αποβολής νερού από τους νεφρούς.

Η υπόφυση είναι ένας ενδοκρινής αδένας έχει σχήμα ωοειδές, μέγεθος περίπου 12mm με βάρος 1gr και ελέγχει τη λειτουργία των περισσότερων αδένων του ανθρώπινου σώματος. Ανατομικά βρίσκεται στη βάση του κρανίου, σε μια εσοχή που ονομάζεται τουρκικό εφίππιο. Η υπόφυση αποτελείται από δύο λοβούς, πρόσθιο και οπίσθιο. Ο πρόσθιος λοβός ονομάζεται και αδενούποφυση, τα αδενικά κύτταρα του οποίου παράγουν ένα πλήθος ορμονών που ελέγχουν σημαντικές λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος όπως:

- Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
- Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
- Ωχρινοποιητική ορμόνη
- Αυξητική ορμόνη

Μέσω του δικτύου αγγείων που αναπτύσσονται κατά το μίσχο της υπόφυσης του πυλαίου συστήματος, οι ορμονικές ουσίες του υποθαλάμου μεταφέρονται στην αδενούποφυση και ρυθμίζουν τη λειτουργία της, προάγοντας εν συνεχεία όπως έχουμε ήδη αναφέρει των κύριο ρόλο των ωοθηκών που είναι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η ωοθήκες παράγουν μια σειρά από ορμόνες με τη ρύθμιση της FSH και της LH. Οι ορμόνες που παράγονται ονομάζονται γοναδοτροπίνες και δεσμεύονται πάνω σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα η LH επιδρά στα κύτταρα της έσω θήκης και προκαλεί την παραγωγή ανδρογόνων ορμονών. Τα ανδρογόνα στη συνέχεια μεταφέρονται εντός των κοκκιωδών κυττάρων τα οποία επιπλέον διαθέτουν και ειδικούς υποδοχείς για την FSH. Η δράση της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αρωματάσης και την αρωματοποίηση των ανδρογόνων ορμονών σε οιστρογόνα (κυρίως οιστραδιόλη).

### 1.2.1 Σύστημα Πυλαίων Αγγείων

Το πυλαίο σύστημα αγγείων αποτελείται από δύο πλέγματα, το υποφυσιακό και το υποθαλαμικό. Το υποθαλαμικό πλέγμα έχει την αρχή του στο τριχοειδικό πλέγμα της μέσης εξοχής και του άνω μίσχου. Ιστολογικά, στη μέση εξοχή συναντώνται οι απολήξεις των νευρώνων της υπόφυσης και τα τριχοειδή αγγεία του συστήματος των πυλαίων φλεβών. Αντίστοιχα, στο υποθαλαμικό πλέγμα κυκλοφορούν μια σειρά από υποθαλαμικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν είτε εκλυτική είτε ανασταλτική δράση, και μεταφέρονται στην αδενούποφυση μέσω μακρών φλεβικών αγγείων και του μίσχου της υπόφυσης. Στην αδενούποφυση τα αγγεία έχουν ένα σχηματισμό που ονομάζεται υποφυσιακό πλέγμα. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της υπόφυσης είναι ότι αιματώνεται περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη περιοχή του ανθρώπινου σώματος. Το πυλαίο σύστημα επιτυγχάνει την ταχεία μεταβίβαση των παραγόντων του υποθαλάμου στα αντίστοιχα κύτταρα της αδενούποφυσης. Επιπλέον, παρατηρείται μια παλίνδρομη ροή του αίματος προς την μέση εξοχή, κάνοντας έτσι πιο εύκολη τη λειτουργική αλληλεπίδραση του υποθαλάμου και της υπόφυσης[3].

### 1.2.2 Το Σύστημα των Μακρών Αγγείων

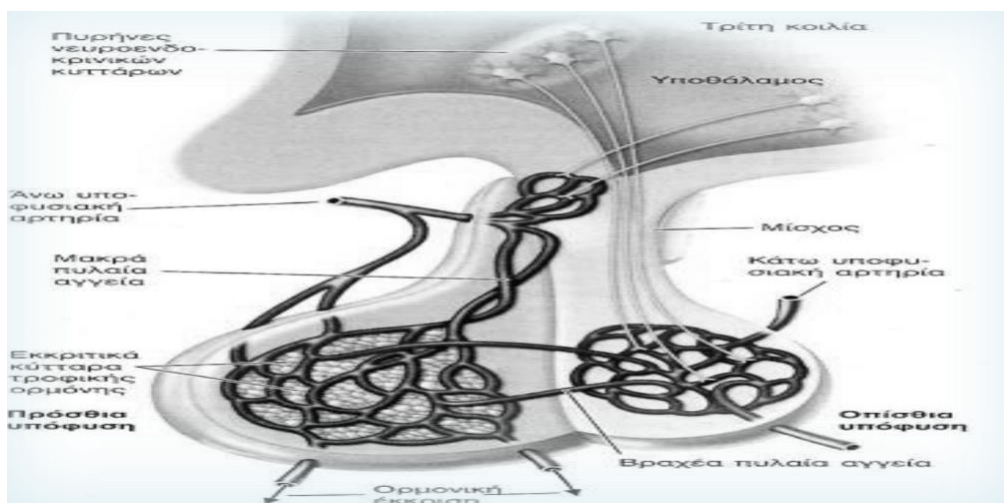
Η υπόφυση αιματώνεται από δύο ζεύγη αρτηριών που προέρχονται από την έσω καρωτίδα. Οι άνω υποφυσιακές αρτηρίες, που είναι το ένα από τα δύο ζεύγη, περικυκλώνουν το άνω τμήμα του μίσχου και χορηγούν αρτηρίδια και τριχοειδή που κατευθύνονται προς την αδενούποφυση, ενώ ταυτόχρονα επεκτείνονται προς τον υποθάλαμο όπου και διευρύνονται σχηματίζοντας το πυλαίο σύστημα. Η πρόσθια υπόφυση είναι ο πιο πλούσιος αγγειοποιημένος ιστός από όλους τους άλλους ιστούς των θηλαστικών, αφού λαμβάνει 0,8 mL/g/min αίματος από το πυλαίο αγγειακό

σύστημα που συνδέει τη μέση εξοχή του υποθάλαμου και τη πρόσθια υπόφυση [143]. Οι άνω υποφυσιακές αρτηρίες σχηματίζουν ένα τριχοειδές δίκτυο στο σημείο που βρίσκονται η μέση εξοχή και ο άνω μίσχος, το υποθαλαμικό πλέγμα. Τα τριχοειδή του πυλαίου συστήματος (υποθαλαμικό πλέγμα) εφάπτονται με τις απολήξεις των νευρώνων της υπόφυσης στη μέση εξοχή. Από το πυλαίο αγγειακό σύστημα μέσω μακρών φλεβικών κολποειδών και μέσω του μίσχου της υπόφυσης, μεταφέρονται διάφοροι υποθαλαμικοί παράγοντες εκλυτικοί ή ανασταλτικοί, στην αδενούπόφυση. Αυτή η γρήγορη μεταφορά των υποθαλαμικών παραγόντων στα κατάλληλα κύτταρα της αδενούπόφυσης εξασφαλίζεται με το πυλαίο σύστημα. Η παλίνδρομη αιματική ροή προς τη μέση εξοχή που έχει παρατηρηθεί, διευκολύνει το μηχανισμό αλληλεπίδρασης τόσο του υποθαλάμου, αλλά και της υπόφυσης. Τελικά, όταν τα μακρά πυλαία αγγεία φτάνουν στην αδενούπόφυση, διασπώνται σε ένα τριχοειδές δίκτυο και επανασυνθέτονται ως φλεβικό κανάλι, σχηματίζοντας το υποφυσιακό πλέγμα [136].

### 1.2.3 Το Σύστημα των Βραχέων Αγγείων

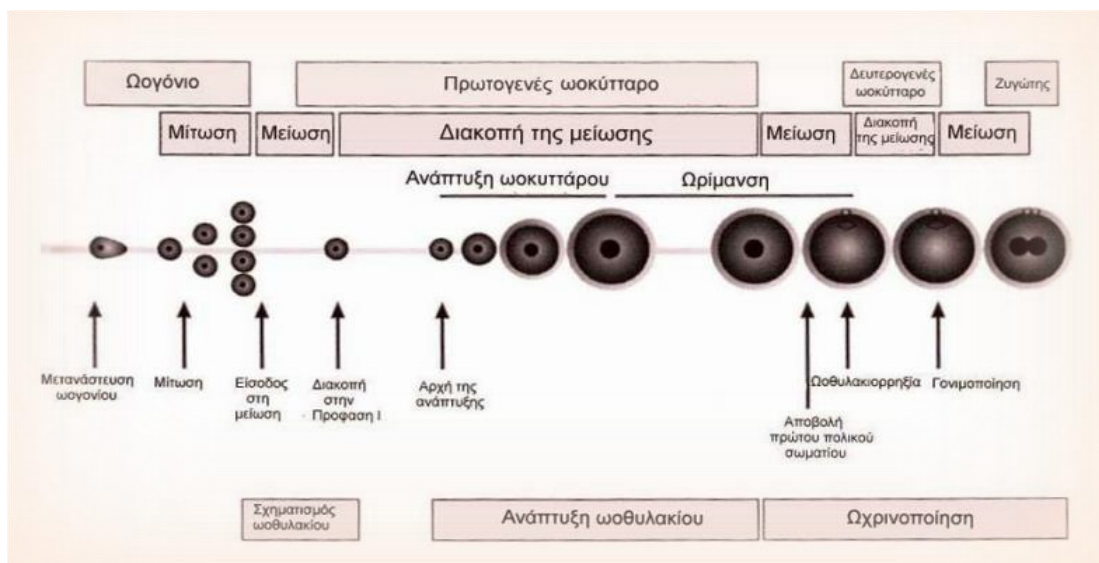
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν τα μακρά πυλαία αγγεία φτάσουν στην πρόσθια υπόφυση σχηματίζουν το υποφυσιακό πλέγμα. Πρόσθετα, η οπίσθια υπόφυση είναι αποτέλεσμα της προέκτασης του υποθαλάμου. Πιο συγκεκριμένα, ο μίσχος της υπόφυσης συνίσταται από αδενούποφυσιακά κύτταρα, πυλαία αγγεία και αμύελους νευράξονες των υποθαλαμικών νευρώνων που διερχόμενοι προς τα κάτω σχηματίζουν τη νευροϋπόφυση [150]. Η νευροϋπόφυση αγγειώνεται από τους άλλους δύο κλάδους της έσω καρωτίδας, τις δύο κάτω υποφυσιακές αρτηρίες. Η κάτω υποφυσιακή αρτηρία περικυκλώνει τον οπίσθιο λοβό δημιουργώντας κλάδους στην περιφέρειά του, αλλά και στον κατώτερο μίσχο. [136]

Εικ 11: Νευρικές και Αγγειακές Συνδέσεις μεταξύ Υποθαλάμου και Υπόφυσης.



### 1.3 Στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου

Τα ωοθυλάκια στα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους, αρχέγονα, πρωτογενή και δευτερογενή βρίσκονται στην ωοθήκη. Ειδικά τα αρχέγονα ωοθυλάκια, αποτελούν την βασική αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης και βρίσκονται στο φλοιό αυτής, ενώ εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ωρίμανση. Η διαδικασία της μείωσης ξεκινάει περίπου την 8<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και διακόπτεται στη φάση που συμβαίνει η πρώτη μιτωτική διαίρεση, όταν δηλαδή τα διπλά χρωμοσώματα κατηγοριοποιούνται ανά ζεύγη. Στη φάση αυτή τα ωκύτταρα ονομάζονται πρωτογενή ωκύτταρα και περιβάλλονται από ένα στρώμα επίπεδων θυλακικών κυττάρων της ωοθήκης. Το σύνολο του συγκεκριμένου σχηματισμού ονομάζεται πρωτογενές ωοθυλάκιο. Το πρωτογενές ωκύτταρο παραμένει ανενεργό μέχρι και την εφηβεία. Η διαδικασία της μείωσης ολοκληρώνεται πριν την ωοθυλακιορρηξία, λόγω αυξημένων επιπέδων της LH, ενώ με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής προκύπτει το δευτερογενές ωκύτταρο ή ωάριο. Κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωκυττάρου δεν διαιρείται σε ίσα μέρη. Η μειωτική διαίρεση συνεχίζεται με την κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου. Καθώς το ωοθυλάκιο ωριμάζει, τα ομόλογα χρωμοσώματα που βρίσκονται σε ζεύγη κατανέμονται ισόποσα σε δύο νέα κύτταρα, τα οποία αν και περιέχουν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων δεν είναι ίσα σε μέγεθος. Το μεγαλύτερο σε μέγεθος κύτταρο είναι το δευτερογενές ωκύτταρο (ωάριο) και παραλαμβάνει ολόκληρο το κυτταρόπλασμα ενώ δεν αναπτύσσεται επιπλέον παρά μόνο στην περίπτωση γονιμοποίησης. Το μικρότερο σε μέγεθος κύτταρο ονομάζεται πολικό σωματίο και έχει ελάχιστη ποσότητα κυτταροπλάσματος. Η μειωτική διαίρεση συνεχίζεται κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου στην οποία περίπτωση σχηματίζονται δύο νέα κύτταρα.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της ωρίμανσης του ωοθυλακίου [51]

### 1.3.1 Βλαστικό Κυστίδιο (GV)

Στο στάδιο της Πρόφασης I, το ανώριμο ωάριο χαρακτηρίζεται από την απουσία του πολικού σωματίου, ωστόσο υπάρχει το βλαστικό κυστίδιο (GV – Germinal Vesicle). Στο συγκεκριμένο στάδιο, ο πυρήνας περιέχει και τα 46 χρωμοσώματα, ενώ σχηματικά έχει το ακανόνιστο σχήμα του ωαρίου με ένα σκουρόχρωμο κέντρο και ένα κοκκιώδες ωόπλασμα. Επιπλέον, παρατηρείται και ένας συμπαγής σχηματισμός κοκκιωδών κυττάρων ωαρίου. Το βλαστικό κυστίδιο είναι τοποθετημένο στο κέντρο, στο ωόπλασμα του πρώιμου ωοκυττάρου και η διάσπασή του σηματοδοτεί τη συνέχιση της διαδικασίας της μείωσης [51].

### 1.3.2 Κυτταρικός κύκλος

Ως κυτταρικός κύκλος ορίζεται το διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μιτωτικών διαιρέσεων. Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις, τη μεσόφαση και την φάση της μίτωσης (Εικόνα 13). Η φάση της μεσόφασης είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στο τέλος της κυτταρικής διαίρεσης και την αρχή της επόμενης. Στη φάση αυτή το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας και γίνεται μεταγραφή γονιδίων και παραγωγή των πρωτεϊνικών προϊόντων, τα οποία βοηθούν στη λειτουργία του κυττάρου. Η μεσόφαση διαχωρίζεται σε τρεις επιπλέον φάσεις:

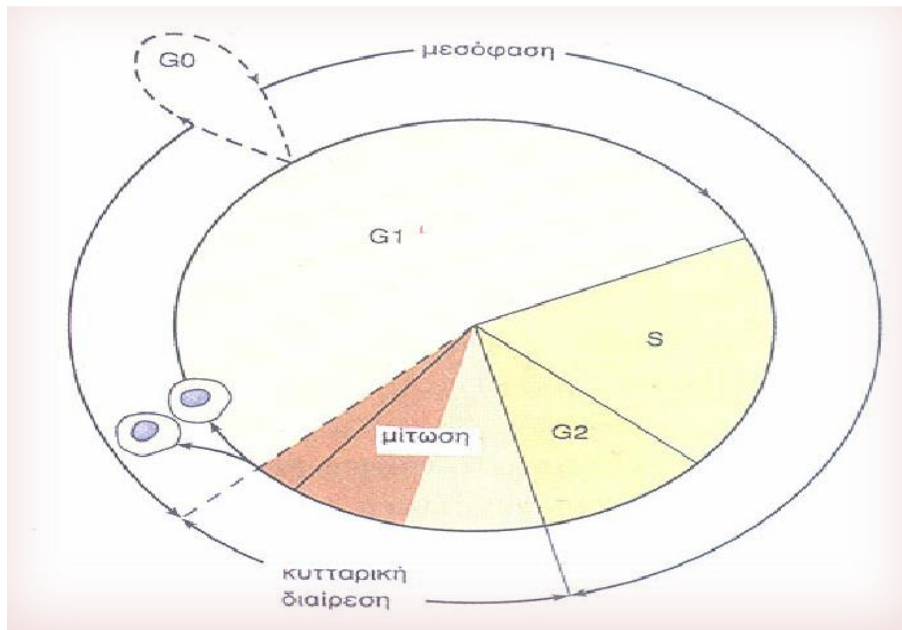
- G1: που είναι το ενδιάμεσο διάστημα ανάμεσα στο τέλος της μίτωσης και τον διπλασιασμό του DNA.
- S: το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο διπλασιάζεται το DNA.
- G2: το χρονικό διάστημα ανάμεσα στη σύνθεση του DNA και την αρχή της μίτωσης [30].

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 13, η μεσόφαση είναι η μεγαλύτερη σε χρονική διάρκεια φάση του κυτταρικού κύκλου.

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία αρχικά υπάγεται στη ρύθμιση από μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών (σερίνη/θρεονίνη) κάθε μια από τις οποίες έχει μια καταλυτική υπομονάδα (κινάση εξαρτώμενη από την κυκλίνη – cyclin dependent kinase, CDK) και μια υπομονάδα ρύθμισης (κυκλίνη). Στα ζωικά κύτταρα η μεταγωγή από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τις κινάσες CDK4 και CDK6 που συνδέονται με μία από τις D-κυκλίνες (D1, D2, D3). Σε μοριακό επίπεδο, στην αρχή της φάσης G1 επιτελούνται οι διαδικασίες που οδηγούν το κύτταρο στην ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης. Η απόκριση των κυκλινών D σε διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες και στη φωσφορυλίωση ρυθμιστικών πρωτεϊνών από το σύμπλοκο G1



κυκλίνη/CDK κινάση είναι τα αρχικά γεγονότα που οδηγούν τη δέσμευση των κυττάρων για διαίρεση. Η κυτταρική αυτή δέσμευση είναι απαραίτητη προκειμένου να προχωρήσει το κύτταρο στη φάση G1. Στο ενδιάμεσο της φάσης G1, η επίδραση εξωτερικών αναπτυξιακών παραγόντων είναι πιθανόν να μειώσει τα επίπεδα συγκέντρωσης της κυκλίνης D μέσα στο κύτταρο και να το οδηγήσει στο να προχωρήσει στη φάση G0 [30].



Εικόνα 13. Ο κυτταρικός κύκλος

Στα ζωικά κύτταρα, οι κυκλίνες E και D σχηματίζουν ενεργά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες CDK, τα οποία είναι απαραίτητα για την μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S. Έχει διαπιστωθεί ότι η υπερέκφραση ή απώλεια της ρύθμισης της κυκλίνης D λειτουργεί σαν θετικός ρυθμιστής στην κυτταρική ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα, σε ινοβλάστες επισπεύδει τη φάση G1 και μειώνει την εξάρτηση των ινοβλαστών από μιτογόνα. Επιπλέον, στα κύτταρα τα οποία εκφράζεται η κυκλίνη D διαρκώς, δημιουργούνται σύμπλοκα D/CDK4, όμως η συγκέντρωση των συμπλόκων αυτών εξαρτάται από την επίδραση μιας σειράς αναπτυξιακών παραγόντων. Η κυκλίνη D βοηθάει για το πέρασμα των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S και συμμετέχει στην προώθηση εξωτερικών ερεθισμάτων για τον πολλαπλασιασμό επιπλέον παραγόντων που είναι απαραίτητοι για τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G0 στη φάση G1 [34].

Η πρωτεΐνη pRb και οι συσχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες, έχουν δράση καταστολής της μετάβασης του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S, πιθανότατα απενεργοποιώντας μια σειρά ρυθμιστικών παραγόντων (οικογένεια μεταγραφικών

παραγόντων E2F, DP-1). Στη φάση G0 και στην αρχή της φάσης G1, ο παράγοντας E2F προσδένεται στην υποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb και απελευθερώνει τον παράγοντα E2F. Ο παράγοντας E2F σχηματίζει μια σειρά συμπλόκων με τις πρωτεΐνες DP-1 και το σύμπλοκο αυτό έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα γονιδίων που εμπλέκονται στη φάση S [26]. Ακόμη ένα σημαντικό σύμπλοκο που παίζει ρόλο στη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S, είναι το σύμπλοκο κυκλίνης E/CDK2. Η ενεργοποίηση και η έκφραση της κυκλίνης E γίνεται μετέπειτα από την ενεργοποίηση και την έκφραση της κυκλίνης D και τα επίπεδά της είναι αυξημένα κατά την αρχή της φάσης G1, ενώ η συγκέντρωσή της μειοτοποιείται κατά τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S. Μετά από τη φάση S η συγκέντρωση της κυκλίνης E μειώνεται σημαντικά. Στη φάση S, αυξάνονται τα επίπεδα της κυκλίνης A μέχρι το κύτταρο να φτάσει στη φάση G2, όπου και η έκφρασή της μειώνεται. Η ενεργοποίηση της κυκλίνης A, καθώς και τα επίπεδά της επηρεάζουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στις φάσεις G2 και M [26].

Η μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση της μίτωσης καθώς επίσης και η έναρξη της ίδιας της μιτωτικής διαδικασίας ρυθμίζεται από τον μιτωτικό παράγοντα MPF. Όσον αφορά την κυκλίνη B, αυτή παρουσιάζει διακυμάνσεις στη συγκέντρωσή της κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύεται κατά τη φάση S, αυξάνεται κατά τη φάση G2 και διασπάται στην ανάφαση. Στον άνθρωπο, όπως και σε όλα τα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές: οι B1, B2 και B3. Οι B1 και B2 κυκλίνες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και η B3 εντοπίζεται στον πυρήνα. Στη φάση G2 οι κυκλίνες B του κυτταροπλάσματος μετατοπίζονται στον πυρήνα, ωστόσο αμέσως μετά η πυρηνική μεμβράνη αποσυντίθεται [34].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο κυτταρικός κύκλος προχωράει συνέχεια και φτάνει στην ολοκλήρωσή του χωρίς καμία διακοπή, όμως υπάρχουν περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε μεταλλάξεις γονιδίων που συμμετέχουν στις λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, στις οποίες τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο κατά τη φάση G1, S και G2. Εάν η βλάβη στα γονίδια μπορεί να αποκατασταθεί από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου ο κύκλος συνεχίζεται, διαφορετικά διακόπτεται. Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις, κάποια κύτταρα να μπορούν να ενεργοποιήσουν την απόπτωση χωρίς να μπορούν να διακόψουν τον κυτταρικό κύκλο ή να εισέλθουν στη φάση G0. Ορισμένα κύτταρα στα οποία επιδρά κάποιος γενοτοξικός παράγοντας, ειδικά αν η επίδραση αυτή συμβεί στην αρχή της φάσης G1, ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται στο μέσο της φάσης αυτής ενώ αν η επίδραση συμβεί κατά το τέλος της βάσης G1 ή κατά την αρχή της φάσης S, αναγκαστικά συμβαίνει επιβράδυνση στη σύνθεση του DNA. Επομένως, σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, υπάρχουν ορισμένα σημεία ελέγχου τα οποία ρυθμίζονται μέσω της απενεργοποίησης ή της ενεργοποίησης των συμπλόκων κυκλίνης CDK [2].

### 1.3.3 Μετάφαση I

Το ενδιάμεσο στάδιο της μετάφασης I χαρακτηρίζεται κυρίως από την απουσία του πολικού σωματιδίου αλλά και του βλαστικού κυστιδίου ενώ έχει ένα εκτεταμένο και μη συμπαγές σχηματισμό από κοκκιώδη κύτταρα. Η πρόφαση της μείωσης I έχει ολοκληρωθεί και το βλαστικό κυστίδιο έχει διασπαστεί, ενώ ο πυρηνίσκος έχει εξαφανιστεί. Στο συγκεκριμένο στάδιο σχηματίζεται η άτρακτος και τα χρωμοσώματα που έχουν προέλθει από τους δύο γονείς, αναμιγνύονται και ταξιδεύουν προς τους πόλους. Κατά το στάδιο της τελόφασης, τα χρωμοσώματα στην ολότητά τους εισέρχονται είτε στο ωάριο είτε στο πολικό σωματίο. Μια διακοπή της διαδικασίας στην μετάφαση I θα μπορούσε να έχει εκλυτικό αίτιο ένα πρόβλημα στο μονοπάτι μεταφοράς του σήματος της μείωσης ή σε οποιαδήποτε σημείο της μειωτικής ατράκτου. Επίσης, ανώμαλος σχηματισμός της μειωτικής ατράκτου έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της μετάφασης I [43].

### 1.3.4 Μετάφαση II

Στη μετάφαση II το ωάριο είναι ώριμο και έτοιμο για τη γονιμοποίηση, είναι ουσιαστικά το στάδιο της τελικής ωρίμανσης του ωαρίου. Στο συγκεκριμένο στάδιο επιτελείται και η πρώτη μειωτική διαίρεση του ωαρίου. Γίνεται κατανομή των ζευγών των χρωμοσωμάτων στα δύο νέα κύτταρα τα οποία δεν έχουν το ίδιο μέγεθος. Το μεγάλο κύτταρο είναι το δευτερογενές ωκύτταρο (ωάριο) το οποίο περιέχει ολόκληρο σχεδόν το κυτταρόπλασμα και δεν εξελίσσεται περισσότερο, παρά μόνο όταν ενεργοποιηθεί με τη γονιμοποίηση. Το μικρότερο κύτταρο είναι το πολικό σωματίο και περιέχει μια μικρή ποσότητα από κυτταρόπλασμα αλλά το μισό αριθμό από τα ομόλογα χρωμοσώματα [51]. Στο πλήρως ώριμο στάδιο της μετάφασης II, υπάρχει ένα μη συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων καθώς επίσης και 23 χρωμοσώματα και ένα πολικό σωματίο στον περιλεκιθικό χώρο αλλά και ένα ομοιογενές και καθαρό κυτταρόπλασμα στο οποίο υπάρχει μια ομαλή κατανομή κυτταρικών οργανιδίων. Τα ανώριμα ωάρια δε γονιμοποιούνται αν λάβουμε υπ' όψιν τον αριθμό των χρωμοσωμάτων τους (46 χρωμοσώματα). Σε μια πιθανή ένωση με ένα σπερματοζώαριο θα προέκυπτε μη φυσιολογικό έμβρυο που θα περιείχε συνολικά 69 χρωμοσώματα. Με ειδική επεξεργασία, τα ανώριμα ωάρια μπορεί να ωριμάσουν σε ειδικές περιπτώσεις εργαστηριακά και να γονιμοποιηθούν (in vitro maturation) [121].

### 1.3.5 Ωρίμανση ωαρίων

Εντός της ωοθηκικού ιστού,κάθε ανεπτυγμένο ωάριο συνεχίζει την ωρίμανση και ανταποκρίνεται στις γοναδοτροπίνες.Η διαδικασία ολοκληρώνεται στο στάδιο της μετάφασης II.Κατά την αρχή της ωρίμανσης των ωαρίων,διαρρηγνύονται τα βλαστικά κυστίδια και γίνεται μια συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων.Τα χρωμοσώματα βρίσκονται στο στάδιο της μετάφασης I,ακολουθεί η μετάβαση στην ανάφαση I και στην τελόφαση I και τα ωοκύτταρα καταλήγουν στο στάδιο της μετάφασης II όπου και είναι έτοιμα για τη γονιμοποίηση.Το ωάριο έχει την ικανότητα σύνθεσης διαφόρων παραγώγων γονιδίων τα οποία επιτρέπουν να γίνονται οι αναπτυξιακές μεταβάσεις και οι διεργασίες που απαιτούνται για τη γονιμοποίηση και την εξέλιξη της εμβρυογένεσης.Η συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων σταματάει να εκφράζεται μετά την διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου και η έκφρασή τους ξεκινάει πάλι με την επόμενη γενιά των ωοκυττάρων.Η αποτυχία της ολοκλήρωσης της μείωσης μπορεί να προέλθει από μία απότομη αύξηση της LH,διαταραχές στο μηχανισμό σηματοδότησης από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται στο εσωτερικό του ωοκυττάρου [17].

Η ωρίμανση του ωαρίου συμπεριλαμβάνει δύο σημαντικές περιόδους οι οποίες καθορίζουν τη λειτουργικότητα του ωαρίου.Η πρώτη περίοδος είναι αυτή κατά την οποία το ωάριο συνεχίζει τη μείωση και καταλήγει στη μετάφαση I (στάδιο πυρηνικής ωρίμανσης). Η δεύτερη περίοδος είναι το διάστημα μεταξύ της μετάφασης II και της τελικής ενεργοποίησης του ωαρίου μετά τη γονιμοποίησή του (στάδιο τελικής κυτταροπλασματικής ωρίμανσης).Η κυταροπλασματική ωρίμανση επιτρέπει στα ωοκύτταρα να συνεχίσουν και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της μείωσης ώστε να αναδιαμορφωθεί και να επανασχηματιστεί η κεφαλή των σπερματοζωαρίων ώστε τελικά να σχηματιστούν οι προπυρήνες και να συνεχιστεί η ανάπτυξη του εμβρύου. Πρέπει να τονιστεί ότι αν και τα ωάρια διαθέτουν την ικανότητα να ολοκληρώσουν την πυρηνική ωρίμανση από την αρχή της ωοθυλακιογένεσης, η κυτταροπλασματική ωρίμανση ολοκληρώνεται ουσιαστικά με το τέλος της ωοθυλακικής ανάπτυξης [67].

### 1.4 Μηχανισμοί μεθυλίωσης του DNA των γαμετών

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας από τους πιο σημαντικούς επιγενετικούς τροποποιητικούς μηχανισμούς οι οποίοι υπάρχουν στους ευκαρυώτες.Εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες.Ένα από τα πιο σημαντικά και ενδιαφέροντα φαινόμενα είναι ότι το μοτίβο μεθυλίωσης του DNA υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές κατά τη γαμετογένεση και την εμβρυογένεση των ανθρώπων.Πιο συγκεκριμένα έχουν προταθεί δύο κύκλοι αναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης του DNA.Κατά την ανάπτυξη των γαμετών το μοτίβο μεθυλίωσης του

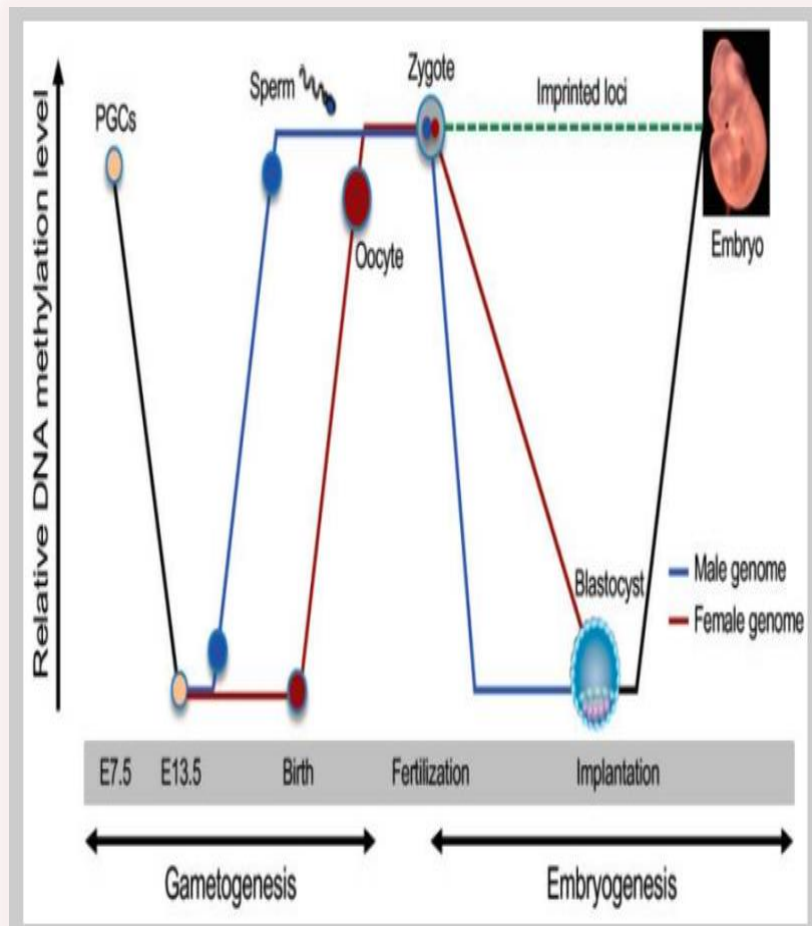
DNA στα πολυδύναμα κύτταρα των γαμετών διαγράφεται και υπάρχει άλλο μοτίβο μεθυλίωσης στα σπερματοζώαρια και στα ωκύτταρα. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη ώστε να απενεργοποιηθεί το X χρωμόσωμα και να αποτυπωθεί το γονιδίωμα. Οι επιγενετικές μετατροπές που συμβαίνουν κατά τη γαμετογένεση δεν ρυθμίζουν μόνο την έκφραση των γονιδίων στους γαμέτες αλλά επηρεάζουν το ζυγωτό, το έμβρυο και τη μεταγεννητική ανάπτυξη [112], [1].

Η δεύτερη φάση επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης συμβαίνει μεταξύ της δημιουργίας της βλαστοκύστης και της γονιμοποίησης. Μετά τη γονιμοποίηση το γονιδιωματικό DNA το οποίο προέρχεται από τον πατέρα απομεθυλιώνεται πριν την έναρξη της αντιγραφής. Αντίστοιχα, το γονιδιωματικό DNA της μητέρας απομεθυλιώνεται παθητικά κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού διαχωρισμού μεταξύ του δικυτταρικού σταδίου και του σταδίου μοριδίου. Τα επίπεδα της μεθυλίωσης στο επίπεδο της προεμφύτευσης είναι συνήθως στο χαμηλότερο επίπεδο και αυξάνονται για να φτάσουν στο μέγιστο επίπεδό τους στο στάδιο σχηματισμού της βλαστοκύστης. Σε ζωικά μοντέλα, η διακοπή της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι καταδικαστική για το έμβρυο (Stefani et al., 2013).

Η μεθυλίωση του DNA (η προσθήκη μιας μεθυλικής στο 5- άκρο της κυτοσίνης, και η δημιουργία μιας 5-μεθυλοκυτοσίνης), είναι μια από τις σημαντικότερες μορφές τροποποίησης του DNA σε πολλούς αλλά όχι όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει κυρίως στα CpG δινοκυκλεοτίδια, τα οποία δημιουργούν ένα συμμετρικό μοτίβο και στις δύο αλυσίδες του DNA. Γενικότερα, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, όπως είναι τα τρανσποζόνια, και οι κεντρομερείς και περικεντρικές επαναλήψεις, μεθυλιώνονται έντονα, τα γονιδιακά σώματα από γονίδια με υψηλό ποσοστό έκφρασης μεθυλιώνονται επίσης, ενώ οι νήσοι CpG (δηλαδή αλληλουχίες μήκους 500-2000 bp πλούσιες σε GC) οι οποίες βρίσκονται συχνά σε περιοχές των υποκινητών δεν υπόκεινται σε μεθυλίωση. Η μεθυλίωση του DNA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των θηλαστικών και εμπλέκεται σε μια ποικιλία από βιολογικές διαδικασίες όπως η ρύθμιση της μεταγραφής, η αποσιώπηση των τρανσποζωνίων, η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και η γενομική αποτύπωση. Οι αποκλίνουσα μεθυλίωση του DNA καθώς και οι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα μεθυλίωσης του DNA σχετίζονται με αναπτυξιακές ανωμαλίες και εμφάνιση καρκίνου [38].

Σαν ένας σταθερός επιγενετικός έλεγχος ο οποίος κληρονομείται μέσα από την κυτταρική διαίρεση, η μεθυλίωση του DNA είναι ένα σημαντικό συστατικό του μηχανισμού κυτταρικής μνήμης η οποία διατηρεί τις κυτταρικές ταυτότητες. Ωστόσο, το επιγονιδίωμα, που συμπεριλαμβάνει τη μεθυλίωση του DNA πρέπει να επαναπρογραμματιστεί σε μια ολοδύναμη κατάσταση η οποία παράγει την επόμενη γενεά. Υπάρχουν δύο κύματα ολικής απομεθυλίωσης και επαναμεθυλίωσης κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των θηλαστικών. Ο ένας κύκλος συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των γαμετών και ο άλλος κύκλος συμβαίνει κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός των γεννητικών κυττάρων συμπεριλαμβάνει τη διαγραφή των μοτίβων μεθυλίωσης των σωματικών κυττάρων και

την επακόλουθη δημιουργία των μοτίβων μεθυλίωσης που είναι ειδικά για τα γεννητικά κύτταρα. Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός στο πρώιμο έμβryo συμπεριλαμβάνει την αφαίρεση όλων των μοτίβων μεθυλίωσης που κληρονομούνται από τους γαμέτες (εξαιρέσεις αποτελούν τα σήματα μεθυλίωσης σε κάποια ρετροτρανσποζόνια) σε στάδια προεμφύτεσης, ενώ κατασκευάζονται νέα στάδια μεθυλίωσης DNA κατά την εμφύτευση του εμβρύου (Εικόνα 14) [75].



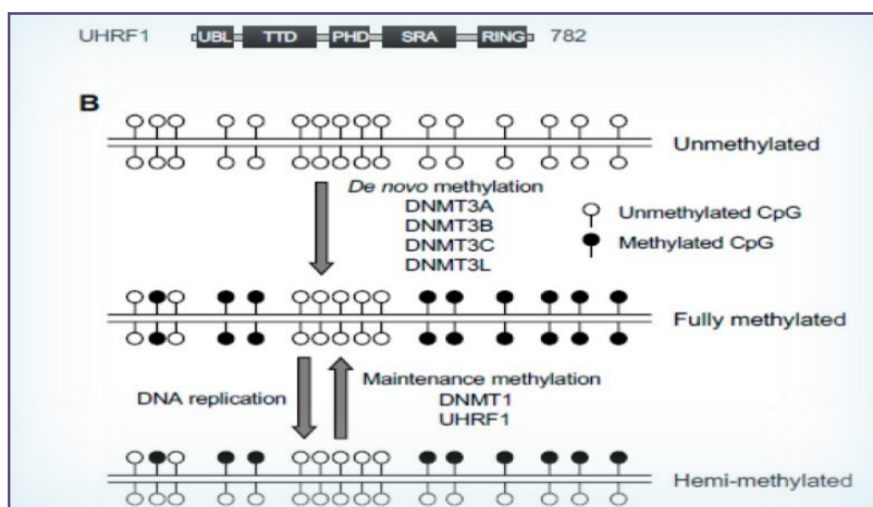
Εικ. 14. Οι δυναμικές αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών.

Οι δυνάδες των βάσεων CpG/CpG είναι μη συμμετρικές. Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί τουλάχιστον δύο καταλυτικές διαδικασίες (η de novo μεθυλίωση για την κατασκευή μοτίβων μεθυλίωσης και η διατήρηση της δραστηριότητας της μεθυλίωσης για την μετατροπή των ημι-μεθυλιωμένων CpG τμημάτων σε πλήρως μεθυλιωμένα κατά την αντιγραφή του DNA).

### 1.4.1. DNMT1 και UHRF1 – Σημαντικά συστατικά για τη διατήρηση του μηχανισμού της μεθυλίωσης

Το πρώτο γονίδιο μεθυλτρανσφεράσης των θηλαστικών, το DNMT1 κλωνοποιήθηκε από κύτταρα μυών. Υπάρχουν αρκετά τμήματα έναρξης της μεταγραφής του και παράγουν τρία ισόμορφα του γονιδίου. Το DNMT1s εκφράζεται στα σωματικά κύτταρα, κωδικοποιεί το πλήρες μήκος της πρωτεΐνης DNMT1 που σχηματίζεται από 1620 αμινοξέα. Το ισόμορφο γονίδιο DNMT1o εκφράζεται εξειδικευμένα στα ωκύτταρα και κωδικοποιεί ένα πρωτεϊνικό προϊόν από το οποίο απουσιάζουν 118 αμινοξέα από το N-άκρο του. Σε σχέση με το DNMT1, το DNMT1o έχει παρόμοια καταλυτική ιδιότητα αλλά φαίνεται να είναι πιο σταθερό. Το ισόμορφο γονίδιο Dnmt1p εκφράζεται πιο εξειδικευμένα στα σπερματοκύτταρα και δεν παράγει κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν. Το ανθρώπινο γονίδιο DNMT1 έχει μια πρωτεΐνη πλήρους μήκους που αποτελείται από 1616 αμινοξέα και η αλληλουχία του είναι παρόμοια με την αλληλουχία του γονιδίου των ποντικών κατά 80% περίπου [21].

Το DNMT1 περιέχει ένα καταλυτικό πεδίο στην C-τελική ομάδα το οποίο φιλοξενεί συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μοτίβα (I-X) για όλες τις μεθυλτρανσφεράσες και ένα μοναδικό ρυθμιστικό πεδίο στην τελική N-ομάδα που είναι υπεύθυνη για αρκετές λειτουργικές ιδιότητες. Τα πεδία αυτά συμπεριλαμβάνουν ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού το οποίο εισάγει την DNMT1 στον πυρήνα, μια περιοχή πρόσδεσης του πυρηνικού αντιγόνου που πολλαπλασιάζει τα κύτταρα και μια περιοχή δάκτυλου ψευδαργύρου που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του μη μεθυλιωμένου DNA (Εικόνα 9). Τα δεδομένα κρυσταλλογραφίας έχουν δείξει ότι λόγω της απουσίας υποστρωμάτων DNA το καταλυτικό κέντρο μπλοκάρει, γεγονός που σημαίνει ότι η N-τελική ρυθμιστική περιοχή έχει αυτό-ρυθμιστικό ρόλο για τη δραστηριότητα του DNMT1 [115].



Εικόνα 15. Ο μηχανισμός μεθυλίωσης του DNA. [115]

## 1.5 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας γενικός όρος βάση του οποίου χαρακτηρίζουμε τους μηχανισμούς της αυτο-αποδόμησης κυτταροπλασματικών συστατικών μέσα στα λυσοσώματα. Η έκβαση της αυτοφαγίας είναι η ίδια, δηλαδή ο πλήρης διαχωρισμός του υποστρώματος στα βασικά συστατικά από τα οποία αποτελείται (τα νουκλεϊκά οξέα στα νουκλεοτίδια και οι πρωτεΐνες στα αμινοξέα). Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται από τα λυσοσωμικά ένζυμα. Αν και υπάρχουν διάφορες παραλλαγές των μηχανισμών αυτών με βάση την εξέλιξη στους τρόπους με τους οποίους τα υποστρώματα φτάνουν στα λυσοσώματα, η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία η οποία έχει συντηρηθεί καλά. Η πορεία της αυτοφαγίας διατηρείται σε όλους τους οργανισμούς από τους πιο απλούς (μύκητες) μέχρι τους πιο πολύπλοκους (άνθρωπο) [76]. Η αυτοφαγία κατηγοριοποιείται ανάλογα με τον τρόπο μεταφοράς του φορτίου και το είδος του φορτίου. Ανάλογα με τον τρόπο μεταφοράς του φορτίου διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες:

- μακροαυτοφαγία
- μικροαυτοφαγία και
- Μεσολαβούμενη από τις πρωτεΐνες – συνοδούς.

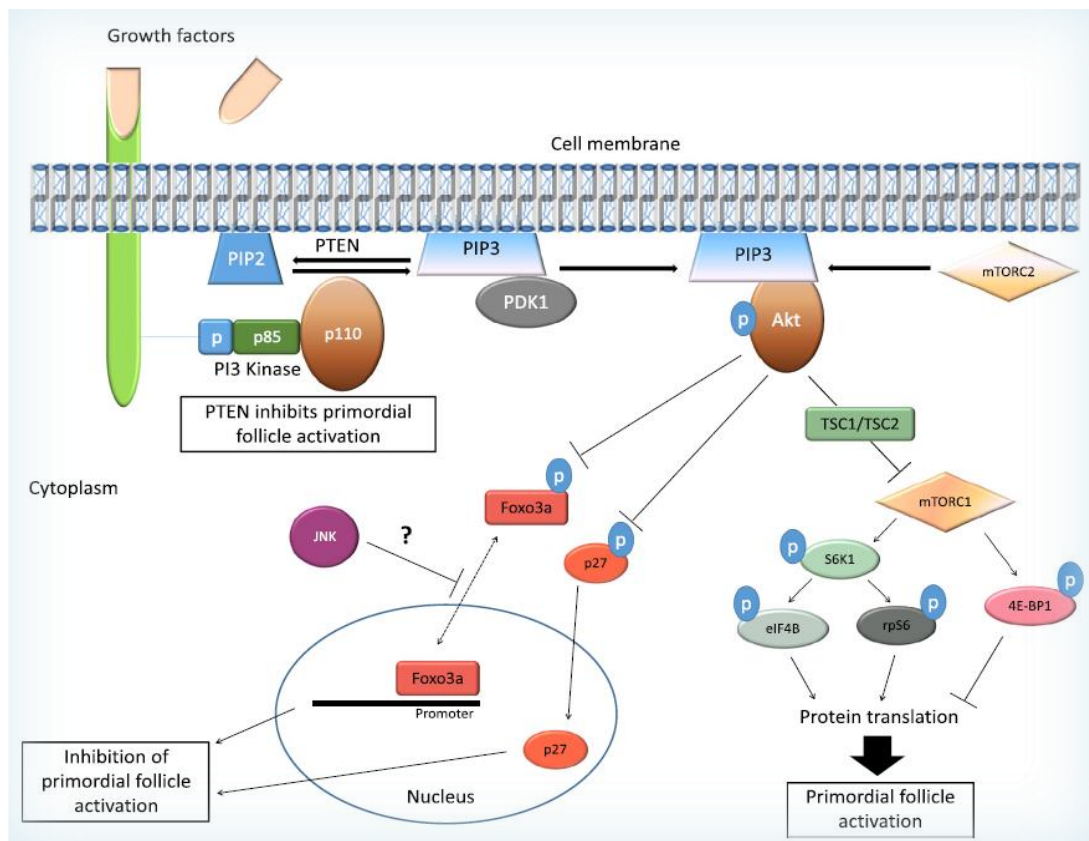
Συνήθως με το γενικό όρο αυτοφαγία εννοούμε τη μακροαυτοφαγία [76]. Η μακροαυτοφαγία έχει σαν έναρξη τη δημιουργία μιας διπλής μεμβράνης, ο φαγοφόρο ή μεμβράνη απομόνωσης. Η μεμβράνη αυτή μετά από την ανάπτυξη της εγκλωβίζει το κυτταρόπλασμα αλλά και διάφορα οργανίδια που πρόκειται να αποδομηθούν. Στη συνέχεια δημιουργεί ένα κυστίδιο, το αυτοφαγόσωμα που συνδέεται με το λυσόσωμα και δημιουργεί το αυτόφαγο-λυσόσωμα. Το αποτέλεσμα της ένωσης αυτής είναι η λύση του αυτοφαγικού σωματιδίου και η αποδόμηση του περιεχομένου του από τα ένζυμα που περιέχονται στο λυσόσωμα. Τα μακρομόρια που προκύπτουν χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για άλλες διεργασίες όπως η πρωτεϊνόςύνθεση και η παραγωγή ενέργειας (ανακύκλωση) [98]. Κατά τη μικρο-αυτοφαγία δεν ακολουθεί σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων αλλά έχουμε παραμόρφωση της λυσοσωμικής μεμβράνης για απ' ευθείας εγκόλπωση το υλικού προς αποδόμηση. Η διαδικασία αυτή εμπλέκεται και στην απομάκρυνση οργανιδίων όταν δεν είναι πια χρήσιμα συνεχίζουν να είναι ενεργά στο εσωτερικό του κυττάρου [98]. Η μεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς αυτοφαγία δεν περιλαμβάνει τη δημιουργία κυστιδίων αλλά αντίθετα, διεξάγεται με την πρόσδεση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών οι οποίες έχουν εκτεθειμένη μια αλληλουχία αμινοξέων, την KFERQ, στις πρωτεΐνες-συνοδούς του κυταροπλάσματος. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται σύμπλοκα που μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη του λυσοσώματος και μέσω ενός λυσοσωμικού υποδοχέα η πρωτεΐνη περνάει στο εσωτερικό του λυσοσώματος για να αποδομηθεί και να ανακυκλωθεί. Στις περιπτώσεις ηρεμίας είναι ενεργή στα περισσότερα κύτταρα, αλλά σε καταστάσεις στρες εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργότητα [98].



## 2 Εμπλεκόμενοι μηχανισμοί ανάπτυξης του ωοθυλακίου

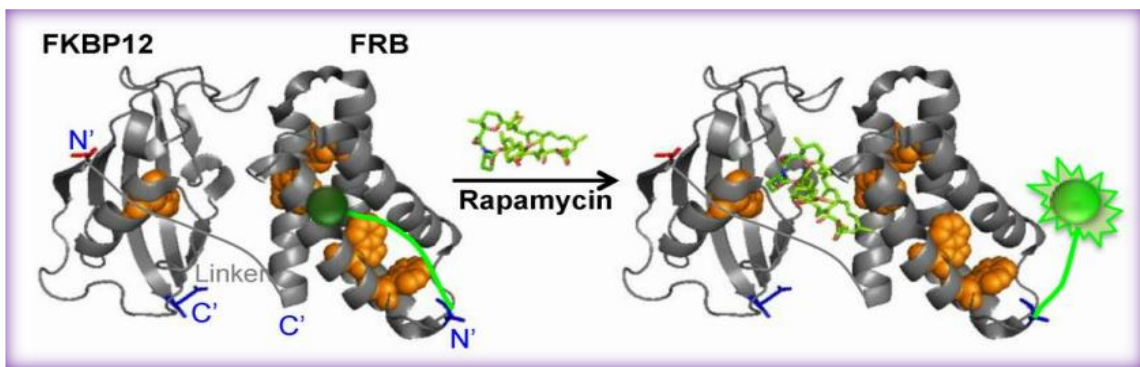
### 2.1 Μονοπάτι σηματοδότησης mTOR

Η ραπαμυκίνη είναι μια λακτόνη με λιποφιλικές και αντιβιοτικές ιδιότητες η οποία παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus*. Έχει ανακαλυφθεί και έχει απομονωθεί αρχικά λόγω της αντιμυκητιακής της δράσης. Αργότερα, διαπιστώθηκαν οι ισχυρές ανοσοκατασταλτικές δράσεις της ραπαμυκίνης καθώς εμποδίζει την ανάπτυξη μετασχηματισμένων κυττάρων *in vitro*. Αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αποτέλεσαν το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού δράσης της. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας οδού που έχει διατηρηθεί εξελικτικά στο πέρασμα των χρόνων και που ο ρόλος της είναι η μεταβίβαση σημάτων αυξητικών παραγόντων, η μεταβίβαση θρεπτικών συστατικών, η ρύθμιση της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου καθώς επίσης και ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων. Ο σημαντικότερος παράγοντας της παραπάνω οδού μεταγωγής σήματος είναι η κινάση TOR, η οποία αναφέρεται και με τα ονόματα FRAP ή RAFT-1.



Εικ. 16. mTOR- Μοριακό Μονοπάτι Ρύθμισης της Ενεργοποίησης του Αρχέγονου Ωοθυλακίου [151]

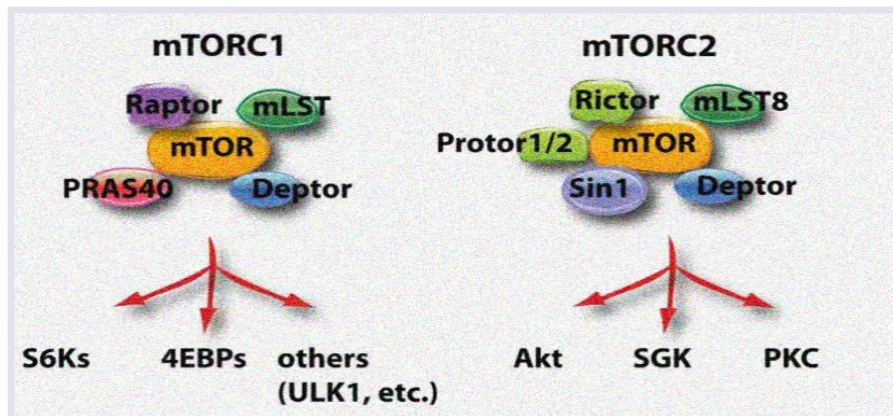
Η απομόνωση και η ταυτοποίηση της κινάσης TOR έγινε κατά τη διερεύνηση των μεταλλάξεων που επαυξάνουν την ανθεκτικότητα στη αντιμυκητιασική δράση της ραπαμυκίνης ως προς την ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου μύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*). Στις έρευνες αυτές, αναγνωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε το προϊόν του γονιδίου FPR1 το οποίο κωδικοποιεί την FKBP12, μια πεπτιδυλ-προπυλ-ισομεράση. Η FKBP12 έχει την ιδιότητα να συνδέεται με την ραπαμυκίνη και στη συνέχεια το σύμπλεγμα που προκύπτει αναστέλλει την κινάση TOR όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 17. Το σύνολο των οργανισμών που έχουν μελετηθεί ως προς το γονιδίωμά τους έχουν ένα γονίδιο TOR με εξαίρεση μια ζύμη η οποία έχει δύο γονίδια τα TOR1 και TOR2 [117], [5].



Εικόνα 17. Σύνδεση της ραπαμυκίνης με την περιοχή TORFBR (Hee – Jin et al., 2015).

### 2.1.1 Σύμπλοκα mTOR

Ο mTor είναι ο πυρήνας δύο πρωτεϊνών οι οποίες έχουν διατηρηθεί στην πορεία της εξέλιξης: των πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων mTORC1 και mTORC2 (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Τα σύμπλοκα των mTOR [88].

Το σύμπλεγμα **mTORC 1** είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην παρουσία της ραπαμυκίνης ενώ αποτελείται από :

- Τον παράγοντα mTOR.
- Μία ρυθμιστική πρωτεΐνη (regulatory associated protein of mTOR).
- Ένα πρωτεϊνικό προσαρμοστή που έχει περίπου το μισό μήκος σε σχέση με το mTOR
- Την πρωτεΐνη G η οποία μοιάζει με β υπομονάδα (b – subunitlikeprotein). Η πρωτεΐνη αυτή είναι γνωστή και ως 8 θνησιγενής πρωτεΐνη και ο ρόλος της είναι η μεταβίβαση ανοδικών σημάτων.
- Υπόστρωμα με μοριακό βάρος 30 kDa το οποίο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε προλίνη.
- Την περιοχή DEP η οποία περιέχει την πρωτεΐνη Deptor που συσχετίζεται και αλληλεπιδρά με τον mTOR (DEP Domain interacting protein) [88].

Αντίστοιχα το σύμπλοκο **mTORC 2** δεν είναι τόσο ανθεκτικό στη ραπαμυκίνη όσο το TORC1 όπως αρχικά είχε ειπωθεί. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από:

- Τον παράγοντα mTOR
- Την πρωτεΐνη Gbl/LST8
- Τον ανεξάρτητο από την ραπαμυκίνη ακόλουθο του mTOR ( mTOR – Rictor)
- Μία πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση που επάγεται από το στρες (mSIN1).
- Την πρωτεΐνη Deptor.

Σε κάθε σύμπλοκο mTOR υπάρχουν δύο αντίγραφα της κάθε υπομονάδας τα οποία διαχωρίζονται σε δύο πρωτομερή. Τα δύο αυτά πρωτομερή ενώνονται και σχηματίζουν μια δομή η οποία μοιάζει με ορθογώνιο και συμπεριλαμβάνει ένα μεγάλο, κεντρικό κοίλο τμήμα. Η ακριβής λειτουργία της συγκεκριμένης κοιλότητας δεν έχει αποσαφηνιστεί, ωστόσο εικάζεται ότι μπορεί να είναι μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης με ανοδικούς ρυθμιστές. Επίσης, αν λάβουμε υπ' όψιν το γεγονός ότι τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, είναι πιθανό ο ορθογώνιος αυτός σχηματισμός να διευκολύνει την προσέγγιση των μεμβρανών [32]. Το πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος των συμπλόκων του mTOR φαίνεται κατά τη ρύθμιση της ομοιόστασης του οργανισμού. Στην απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν τα δομικά συστατικά των συμπλόκων σε μοντέλα ζώων, υπάρχουν μεγάλα ποσοστά εμβρυικής

θνησιμότητας. Επιπλέον, τυχόν απουσία του mTOR ή της πρωτεΐνης Raptor σε βλαστοκύτταρα, έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση φαινοτύπου ο οποίος σχετίζεται με εμβρυική θνησιμότητα κατά το στάδιο της εμφύτευσης. Αντίστοιχα, η απουσία των mLST8, Rictor και mSin προκαλεί πιο ήπια φαινόμενα και λιγότερα ποσοστά εμβρυϊκής θνησιμότητας κατά τα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης E10.5-E11.5 [106].

### 2.1.2 Παράγοντες ρύθμισης και ρόλοι του mTORC1

Ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης Raptor δεν είναι ακόμη γνωστός, όμως το πιο πιθανόν είναι ότι λειτουργεί ως γέφυρα που βοηθάει τη σύνδεση της σηματοδοτικής ακολουθίας της TOR (singaling motif) με την S6K1 (πρωτεϊνική κινάση) και την 4E-BP1. Δηλαδή η Raptor παίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση των υποστρωμάτων της mTOR ώστε να βελτιώνεται η πρόσβαση σε αυτά. Το μόριο της Raptor συνδέει την περιοχή της κινάσης της mTOR με τους στόχους της ώστε να διευκολυνθεί και να πραγματοποιηθεί τελικά η φωσφορυλίωση. Η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις Raptor και mTOR γίνεται από άνω σήματα [56].

Η πρωτεΐνη GβL περιέχει επτά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες WD40 και για το λόγο αυτό έχει μεγάλο μοριακό βάρος (36 kDa), ενώ είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των άνω σημάτων. Επίσης και σε αυτήν την περίπτωση δεν είναι ακόμη γνωστός ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης, όμως είναι γνωστό ότι συνδέεται με την κινάση mTOR και δρα ως σταθεροποιητής ανάμεσα στα μόρια Raptor και mTOR. Εικάζεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λήψη των άνωθεν σημάτων που επιδρούν στο mTORC1 και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο μόριο για να εξασφαλιστεί η λειτουργικότητα της mTOR. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κινάσης της mTOR, ωστόσο σε περιπτώσεις που υπάρχει ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, η αλληλεπίδραση με την mTOR είναι πιο ισχυρή με αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας της και τη μετατροπή της θετικής δράσης σε αρνητική [57].

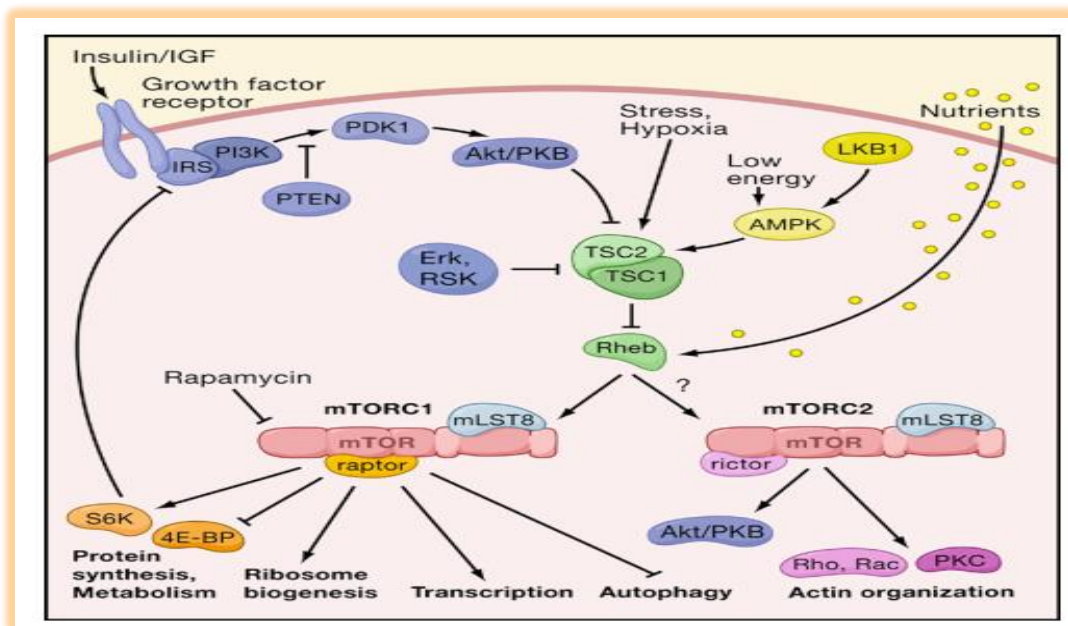
Τα σήματα τα οποία συσχετίζονται με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, με παράγοντες ανάπτυξης, με θρεπτικά συστατικά καθώς και με διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις όπως είναι η ύπαρξη ελευθέρων ριζών οξυγόνου, η υποξία, βλάβες στο γενετικό υλικό και το υπεροσμωτικό περιβάλλον λειτουργούν ως ρυθμιστές για τη σταθερότητα της σύνδεσης ανάμεσα στην mTOR και τη Raptor, με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν και τη συναρμολόγηση των υποστρωμάτων της mTOR [47].

Η ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1, προκαλεί τη βιογένεση των ριβοσωμάτων καθώς και τη μετάφραση και την πρωτεϊνοσύνθεση. Επιπλέον, η ενεργοποίηση αναστέλλει την αυτοφαγία και επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την γενικότερη επιβίωση του κυττάρου. Όλες οι λειτουργίες του παραπάνω συμπλόκου αναστέλλονται από τη ραπαμυκίνη και τα συνθετικά της ανάλογα [47].

### 2.1.3 Παράγοντες ρύθμισης και ρόλοι του mTORC2

Όπως προαναφέρθηκε το σύμπλοκο mTORC2 αποτελείται από 4 τουλάχιστον επιμέρους δομικά στοιχεία: την Rictor, την mTOR, την mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interactive protein 1). Η πρωτεΐνη Rictor παρατηρείται ότι στη δομή του μορίου της δεν έχει καταλυτική δράση. Επιπλέον, δεν είναι γνωστός ακόμη ο ρόλος της mSIN1 στη σηματοδότηση μέσω mTOR. Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε και ένα πέμπτο στοιχείο του οποίου η λειτουργία επίσης δεν είναι γνωστή και έχει ονομαστεί protor-1. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης του mTORC2 δεν είναι αποσαφηνισμένοι, καθώς άγνωστα είναι και τα ακριβή άνωθεν σήματα που πυροδοτούν τους μηχανισμούς αυτούς. Αυτό που είναι δεδομένο είναι ότι το mTORC2 ανταποκρίνεται περισσότερο σε αυξητικούς παράγοντες.

Η λειτουργία του mTORC2 δεν έχει μελετηθεί με την ακρίβεια που έχει μελετηθεί η λειτουργία του mTORC1. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι ενεργοποιεί την Akt, έναν άνωθεν ρυθμιστή της ενεργοποίησης του mTORC1, ενώ λειτουργεί και ως γέφυρα η οποία συνδέει τα δύο σύμπλοκα. Η καταστολή της mTOR ή της Rictor (αλλά όχι της Raptor) έχει αρνητική επιρροή στον ακτινικό πολυμερισμό καθώς και στην ανάπτυξη των κυττάρων. Το mTORC2 δεν επηρεάζεται από την παρουσία της ραπαμυκίνης (Εικόνα 19).

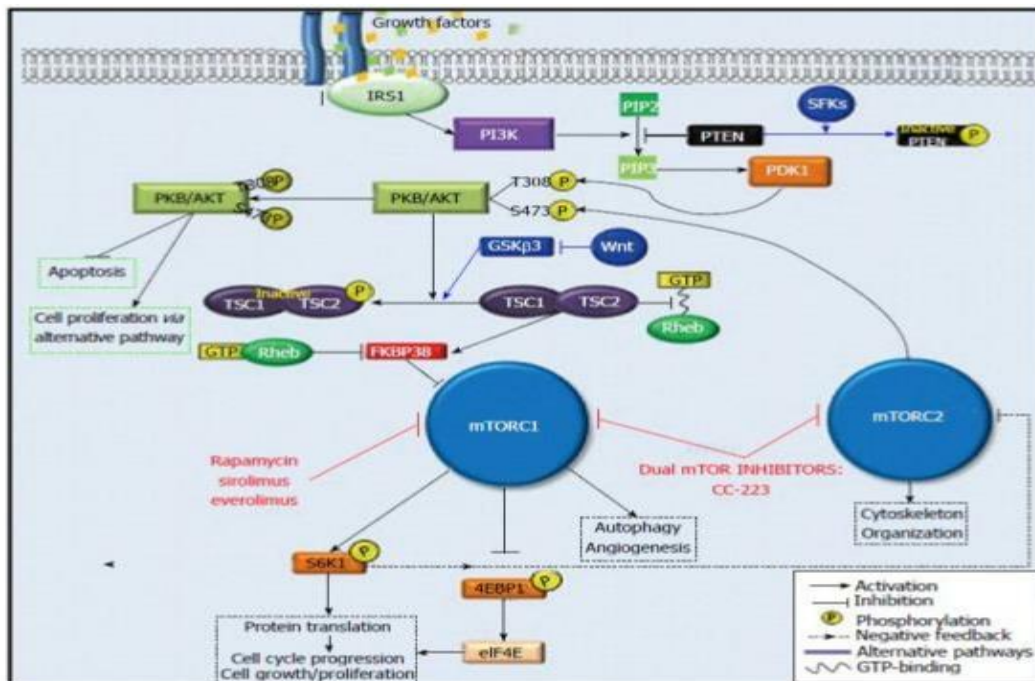


Εικ. 19 Ο mTOR αποτελεί βασικό συστατικό στοιχείο δύο συμπλόκων, του mTOR1 και του mTOR2. Στο παραπάνω σχήμα τα βέλη δηλώνουν την ενεργοποίηση ενώ οι ακίδες την αναστολή [133].

Το mTOR1 είναι ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και επηρεάζει πολλές οδούς των οποίων η λειτουργία είναι ο έλεγχος του μεγέθους του κυττάρου. Το mTOR2 δεν επηρεάζεται από τη ραπαμυκίνη και ο βασικός του ρόλος είναι ο έλεγχος του δικτύου της ακτίνης και του σχήματος του κυττάρου. Και τα δύο σύμπλοκα επηρεάζονται από παράγοντες ανάπτυξης αλλά και από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου (π.χ. παρουσία θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις). Στο παραπάνω σχήμα τα βέλη δηλώνουν την ενεργοποίηση ενώ οι ακίδες την αναστολή [133].

#### 2.1.4 Σηματοδοτικό μονοπάτι Tsc/mTOR

Οι πρωτεΐνες TSC1 και TSC2, προκαλούν τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του ήπατος. Όταν ενεργοποιείται, το σύμπλεγμα TSC1-TSC2 δρα ανασταλτικά ως προς τη λειτουργία του mTORC1. Στην περίπτωση που υπάρχει απώλεια ενός από τους δύο αυτούς πρωτεϊνικούς παράγοντες, ο mTORC1 ενεργοποιείται αυτόνομα. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών όπου υπάρχει απώλεια του TSC1 προκαλείται ηπατική βλάβη λόγω της ενεργοποίησης του mTORC1.



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού Tsc/mTor. (Byles et al., 2013).

Το PTEN και το σύμπλεγμα πρωτεϊνών TSC1/TSC2 δρουν σαν κόμβος ενσωμάτωσης άλλων εναλλακτικών μονοπατιών, για τη ρύθμιση του mTOR. Για παράδειγμα ένα τέτοιο μονοπάτι είναι η ανοδική ρύθμιση του PTEN και του TSC1/TSC2 από τις κινάσες της οικογένειας των Src και Wnt (μονοπάτι Wnt/β κατενίνης).

## 2.2 Η κινάση Akt

Η κινάση Akt ονομάζεται επίσης και κινάση B και είναι μια πρωτεΐνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό την ανάπτυξη και τη γενικότερη επιβίωση του κυττάρου. Η μελέτη της δράσης της πρωτεΐνης έχει δείξει ότι εμπλέκεται σε όλους τους καρκίνους που εμφανίζονται στον άνθρωπο και παίζει ρόλο στην καρκινογένεση μέσω υπερ-ενεργοποίησης.

### 2.2.1 Η πρωτεΐνη Akt

Η κινάση Akt ανήκει στην κατηγορία των ACG κινασών η οποία στους ανθρώπους εκφράζεται από 3 γονίδια: Akt 1, Akt 2 και Akt 3. Κάθε ιστός έχει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των ισομόρφων αυτών γονιδίων. Οι Akt 1 και 2 εκφράζονται περισσότερο στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες και στην καρδιά. Αντίθετα, η Akt 3 εκφράζεται περισσότερο στους όρχεις και τον εγκέφαλο. Η Akt 1 παίζει σπουδαίο ρόλο στα μονοπάτια τα οποία είναι υπεύθυνα για την κυτταρική επιβίωση και λειτουργεί παρεμποδίζοντας τις διαδικασίες απόπτωσης. Επιπλέον, ενεργοποιεί τα μονοπάτια πρωτεϊνικής σύνθεσης και για αυτό το λόγο θεωρείται σαν μια από τις σημαντικότερες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, η Akt σηματοδοτεί τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην υπερτροφία των σκελετικών μυών, αλλά και στην ανάπτυξη των ιστών γενικότερα. Η βασικός της ρόλος, να σταματάει την απόπτωση και να διασφαλίζει την επιβίωση του κυττάρου, αποτελεί ιδιότητα που την έχει αναγνωρίσει ως βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου (Whiteman et al., 2002). Η Akt 2 είναι ένα σηματοδοτικό μόριο το οποίο συμμετέχει στη μετάδοση σήματος και εμπλέκεται στο μεταβολισμό της ινσουλίνης. Επιπλέον, είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταφοράς γλυκόζης. Η Akt 3 δεν έχει πλήρως αποσαφηνισμένο ρόλο, όμως είναι δεδομένο ότι εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο. Σε συγκεκριμένες έρευνες σε ποντίκια, αυτά τα οποία αδυνατούν να εκφράσουν την Akt δεν αναπτύσσουν πλήρως τον εγκέφαλό τους [147].

Η ονομασία Akt δεν έχει προέλευση την λειτουργία της. Το AK στο όνομα είναι το προσωρινό όνομα κατάταξης ενός στελέχους ποντικών το οποίο ανέπτυξε όγκους

στον θύμο αδένα. Το *t* στο όνομα της πρωτεΐνης προέρχεται από την αγγλική λέξη *transform* (μετάλλαξη) και προστέθηκε όταν ανακαλύφθηκε ένας μεταλλασσόμενος ρετροϊός από το στέλεχος Ak. Τα ανθρώπινα ανάλογα των πρωτεϊνών αυτών οι οποίες ανακαλύφθηκαν μεταγενέστερα ονομάστηκαν με τον ίδιο τρόπο [147]. Όσον αφορά τη δομή της Akt και τα τρία ισόμορφα έχουν την ίδια δομή η οποία αποτελείται από μια περιοχή που είναι ομόλογη με την πλεκστρίνη στον N-τελικό άκρο, από μια κεντρική περιοχή η οποία είναι και το καταλυτικό κέντρο και μια ρυθμιστική περιοχή στο C-τελικό άκρο. Και οι τρεις αυτές περιοχές είναι μια φωσφοπρωτεΐνη με συνολικό μοριακό βάρος 56 kDa. Η περιοχή της πλεκστρίνης (PH) συμβάλλει στη δέσμευση της Akt με την πρωτεΐνη PIP3 ενώ η καταλυτική περιοχή έχει μια θρεονίνη (Thr308), του οποίου η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Akt. Η C-τελική περιοχή είναι υδροφοβική και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των κινασών της ομάδας ACG ενώ περιλαμβάνει μια δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης στο αμινοξύ σερίνη (Ser473). Οι δύο αυτές θέσεις φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt [120].

### 2.2.2 Η λειτουργία και η ενεργοποίηση της Akt

Η Akt παίζει όπως προαναφέρθηκε κατέχει σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι ο μεταβολισμός και η κυτταρική επιβίωση. Η συμβολή της Akt στις παραπάνω διαδικασίες έγκειται στην επίδραση της ενεργοποιημένης μορφής της πρωτεΐνης σε πολλά υποστρώματα, σε μόρια δηλαδή πάνω στα οποία μπορεί να δράσει σαν ένζυμο. Στα υποστρώματα της Akt τα οποία φωσφορυλιώνονται στις θέσεις της σερίνης και της θρεονίνης και καθίστανται ανενεργά, περιλαμβάνεται και η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3), το ένζυμο κασπάση 9, η πρωτεΐνη BAD και τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων FKHR (FKHRL1, FKHR και AFX). Μέσω της ρύθμισης της υποκυττάριας κατανομής, η φωσφορυλίωση του υποστρώματος από την Akt το καθιστά ανενεργό. Για παράδειγμα το προ-αποπτωτικό ένζυμο BAD, φωσφορυλιώνεται μέσω της Akt και το γεγονός αυτό προκαλεί την παραμονή στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας τη δράση του. Το ίδιο ένζυμο στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα Bcl-2 και Bcl<sub>xl</sub> των οποίων η ογκοκατασταλτική δράση αναστέλλεται (86).

Με έναν μηχανισμό που μοιάζει με τον προηγούμενο, η κινάση Akt καταστέλλει όλα τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων FKHRL1, FKHR και AFX. Η οικογένεια των παραγόντων αυτών σχετίζεται με τη ρύθμιση της απόπτωσης και είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των προ-αποπτωτικών γονιδίων Fas και Bim. Κατά τη διάρκεια της φωσφορυλίωσης, οι παράγοντες παραμένουν στο κυτταρόπλασμα και εκεί θεωρούνται αδρανείς. Υπάρχουν κυτταρικές σειρές των οποίων η λειτουργία καταστέλλεται συνεχώς μέσω της φωσφορυλίωσής



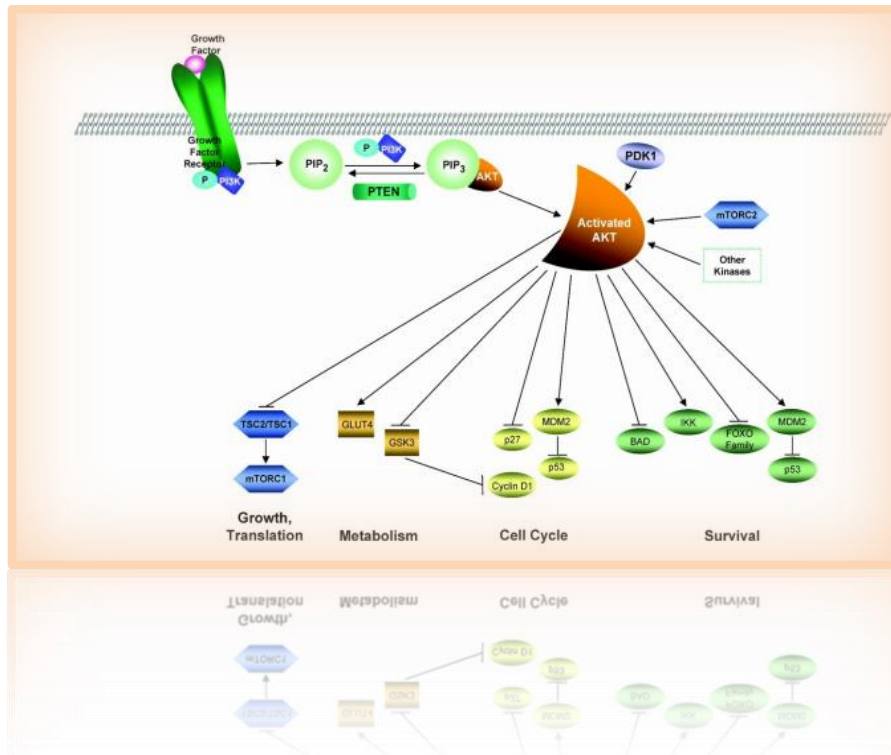
τους από την Akt. Οι παράγοντες αυτοί παραμένουν στο κυτταρόπλασμα αφού δεν μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η λειτουργία και η μεταγραφική δράση των παραγόντων αυτών επανέρχεται με την επαναφορά των FKHR παραγόντων στον πυρήνα. Στην περίπτωση μετάλλαξης και αντικατάστασης των αμινοξέων στα κέντρα φωσφορυλίωσης με το αμινοξύ αλανίνη, οι παράγοντες αυτοί παραμένουν ανεπηρέαστοι από την Akt ωστόσο παραμένουν δραστικοί στον πυρήνα. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό, αν λάβουμε υπ' όψιν ότι οι παράγοντες αυτοί μπορούν να αντικαταστήσουν την PTEN σε κύτταρα που τυχόν τη στερούνται [83].

Στην υποκυττάρια κατανομή υπάρχει ένας αντίστοιχος μηχανισμός ρύθμισης κατά τον οποίο η Akt περιορίζει μέσω φωσφορυλίωσης την p27 (αναστολέας κυκλίνης που εξαρτάται από το κυτταρόπλασμα). Με τον μηχανισμό αυτό της περιοριστικής ρύθμισης, η p27 δεν μπορεί να επιτελέσει τη φυσιολογική της λειτουργία, δηλαδή την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση S. Η ενεργοποίηση της Akt, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3) και πάλι μέσω φωσφορυλίωσης. Ο ρόλος της συνθάσης είναι η πρωτεόλυση της κυκλίνης D, γεγονός που μειώνει τη συγκέντρωσή της και εμποδίζει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή της GSK3 αποφέρει συσσώρευση της κυκλίνης και ανάπτυξη του κυττάρου. Επιπλέον, με τη φωσφορυλίωσή του, καθίσταται ανενεργό το αποπτωτικό ένζυμο κασπάση – 9, ενώ αντίστοιχα η κινάση της θρεονίνης/σερίνης (P70) συνεισφέρει στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου [135], [73].

Η ενεργοποίηση της Akt υπόκειται σε μια σειρά από ρυθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι βασίζονται σε πρωτεΐνες για τη λειτουργία τους (οι πιο σημαντική από τις οποίες είναι η PI3K). Οι διεργασίες αυτές συμπεριλαμβάνουν την αρχική μεταφορά της Akt στη μεμβράνη και τη μετέπειτα φωσφορυλίωσή της. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποιημένη Akt μπορεί να φωσφορυλιώσει μια σειρά από υποστρώματα που ελέγχουν μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών όπως είναι η σύνθεση πρωτεϊνών και γλυκογόνου, η μεταφορά της γλυκόζης, η διαφοροποίηση και η επιβίωση του κυττάρου καθώς επίσης και ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη του κυττάρου.

Η Akt παραμένει ενεργή υπό φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιείται μόνο μέσω διέγερσης μια σειράς υποδοχέων που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (π.χ. υποδοχείς τυροσίνης). Η ενεργοποίηση της Akt μπορεί να συμβεί μέσω της πρόσδεσης μιας κινάσης (PI3K) στους ενεργοποιημένους υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης οι οποίοι βρίσκονται στη μεμβράνη του πλάσματος [148]. Μετά την ενεργοποίηση, η PI3K φωσφορυλιώνει το φωσφολιπίδιο της μεμβράνης PtdIns(3,4) P<sub>2</sub> (διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη) σε PtdIns(3,4,5) P<sub>3</sub> (τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη). Η συσσώρευση του PiP<sub>3</sub> προκαλεί μια μετακίνηση της Akt προς την κυτταρική μεμβράνη όπου και προσδένεται με τη βοήθεια του PH της περιοχής. [148]

Εικ 21. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού σήμανσης του Akt. [148].

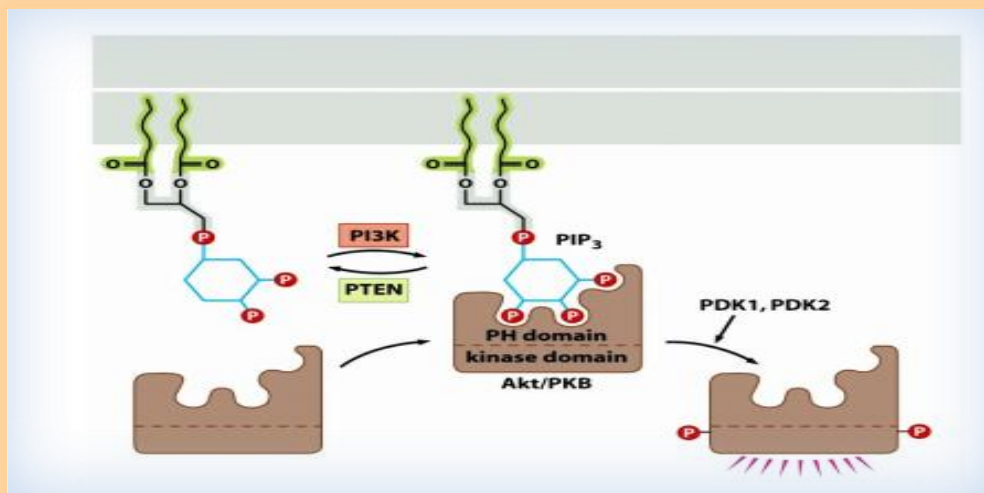


### 2.2.3 Ο ρόλος της PTEN στην Akt

Η ενεργοποίηση της Akt μέσω της PIK3 μπορεί να ρυθμιστεί μέσω του ογκοκαταστολέα PTEN. Η λειτουργία του PTEN είναι ουσιαστικά αντίθετη με τη λειτουργία του PIK3. Πιο συγκεκριμένα, η PTEN ανήκει στην κατηγορία των φωσφατάσων, είναι δηλαδή ένζυμο που αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από άλλα μακρομόρια με διαδικασία που ονομάζεται αποφωσφορλίωση. Το μοριακό βάρος του PTEN είναι 55 kDa και ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών με δράση φωσφατάση της τυροσίνης. Η PTEN βοήθησε πολύ στην κατανόηση των μηχανισμών της ογκογένεσης και μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα ανακαλύφθηκε ένα πολύπλοκο δίκτυο κυτταρικής σηματοδότησης στο οποίο η PTEN ρυθμίζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Οι έρευνες για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη κατέληξαν στο γεγονός ότι δρα σε λιπιδικά και πρωτεϊνικά υποστρώματα, ενώ ο βασικός της στόχος είναι τα λιπίδια της PIP3. Ωστόσο, μεγάλης σημασίας είναι και το γεγονός ότι η PTEN είναι μέλος ενός πολύπλοκου δικτύου μετάδοσης σήματος που επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό από κυτταρικές λειτουργίες [69].

Η PTEN είναι μια φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης με δύο διαφορετικά επίπεδα δράσης. Στο πρώτο επίπεδο δράσης, η περιοχή του μορίου που έχει δράση φωσφατάσης της τυροσίνης, έχει χαρακτηριστικά παρόμοια με τις πρωτεΐνες διπλής εξειδίκευσης που μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν τα αμινοξέα τυροσίνη και θρεονίνη-σερίνη. Η λειτουργική σημασία της περιοχής αυτής φαίνεται από το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων που παρατηρούνται σε όγκους παρουσιάζονται στο εξόνιο 5, που κωδικοποιεί την εν λόγω περιοχή [22].

Στο δεύτερο επίπεδο δράσης, η PTEN δρα μέσω των δύο διαφορετικών υποστρωμάτων. Σε περαιτέρω έρευνες, αποδείχτηκε ότι παρόλο που η PTEN έχει τη δυνατότητα να αποφωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες *in vivo*, ο βασικός βιοχημικός στόχος της είναι τα λιπίδια που υπάρχουν στις πλασματικές μεμβράνες στα οποία δρα ως λιπιδική φωσφατάση και όπως τα περισσότερα ένζυμα χαρακτηρίζεται από υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης [22].



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου του PTEN στην δράση της Akt [22].

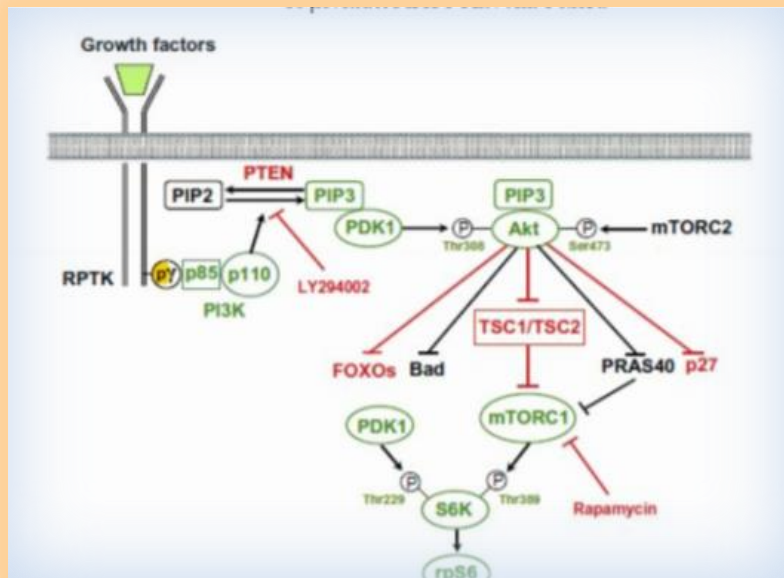
#### 2.2.4 Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/Akt/Foxo3a

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3-Akt-mTOR (mammalian target of rapamycin) είναι ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια τα οποία επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, δρουν ανασταλτικά ως προς την απόπτωση, ενισχύουν την ικανότητα για αγγειογένεση και διεγείρουν τη μετανάστευση και την διείσδυση των κυττάρων. Στην περίπτωση που δεν επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού, το γεγονός αυτό επηρεάζει σημαντικά την καρκινογένεση. Είναι ένα μονοπάτι το οποίο

είναι ιδιαίτερα συντηρημένο εξελικτικά και ρυθμίζει το μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό στους φυσιολογικούς ιστούς και έχει και σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και ανοχή σε φάρμακα σε πολλές περιπτώσεις ανθρώπινου καρκίνου [123]).

Ο κεντρικός άξονας του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι η κινάση mTOR, η οποία διαθέτει έναν πολύ εξειδικευμένο αναστολέα, την ραπαμυκίνη. Το μόριο είναι επίσης γνωστό στη βιβλιογραφία και με άλλες ονομασίες όπως FRAP (FKBP-Rapamycin –Associated Protein), RAFT-1 (Rapamycin and FKBP12 Target), RAPT1 (rapamycintarget) ή SPE (Sirolimus Effect Protein). Η κινάση mTOR ανιχνεύεται σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών όπως οι ζύμες, τα θηλαστικά και ο άνθρωπος. Η αρχική ανακάλυψη του μορίου της mTOR έγινε στον *Saccharomyces cerevisiae*, όπου και έγινε ο διαχωρισμός των δύο γονιδίων TOR, των TOR1 και TOR2. Αντίθετα, όλοι οι υπόλοιποι ευκαρυωτικοί οργανισμοί στους οποίους έχει ανιχνευτεί η mTOR έχουν ένα μόνο γονίδιο (MTOR/FRAP) [29].

Όπως προέκυψε από τις πειραματικές μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ο έλεγχος των μονοπατιών που ελέγχουν τη στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων είναι το ίδιο το ωοθυλάκιο. Στη διαδικασία αυτή εκτός από το μονοπάτι του mTOR, εμπλέκεται και άλλο ένα κύριο μονοπάτι σηματοδότησης το PI3K-PTEN-Akt-Foxo3a, το οποίο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναστολή της πρόωρης ωοθυλακικής ενεργοποίησης. Το μονοπάτι αυτό απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 23.



Εικ.23 Η σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού PI3K-PTEN-Akt-Foxo.

Η κινάση PI3k είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες: μια καταλυτική και μια ρυθμιστική (p110 και p85 αντίστοιχα). Με την παρουσία ενός συνόλου αυξητικών παραγόντων γίνεται ενεργοποίηση του PI3K από την κινάση RPTK και παράγεται PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphatate) στην κυτταρική μεμβράνη. Η PIP3 έχει το ρόλο ενός διακυτταρικού μηνύματος και δίνει θέσεις πρόσδεσης στα μόρια PDK1 και Akt.

Τα μόρια αυτά που προσδένονται και πιο συγκεκριμένα το PDK1, φωσφορυλιώνει την Akt και η Akt καταλύει τη φωσφορυλίωση και τη ρύθμιση των μορίων TSC2, Foxo, p27 και GSK-3. Η φωσφορυλίωση του TSC2 από την Akt αποσταθεροποιεί το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 και ενεργοποιεί τελικά τον καταρράκτη mTORC1 [29]. Τα δεδομένα της λειτουργίας του συγκεκριμένου μονοπατιού, προέκυψαν από μια σειρά μελετών του μορίου PTEN, το οποίο χαρακτηρίζεται σαν λιπιδική φωσφατάση και δρα ως αναστολέας του μονοπατιού PI3K. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K εμπλέκονται μόρια όπως φωσφατάσες, κινάσες αλλά και μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, τη μετανάστευση, την επιβίωση αλλά και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η κινάση PI3K έχει χημική ονομασία phosphatidylinositol 3-OHkinase και έχει δομή ετεροδιμερούς, που αποτελείται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική υπομονάδα. Κύριο ρόλο στο μονοπάτι αυτό παίζει η κινάση PDK1, η οποία ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας AGC (π.χ S6K1 και SGK) καθώς και την Akt μέσω φωσφορυλίωσης της θρεονίνης στη θέση 308. Η Akt είναι ένα μόριο θρεονίνικης/σερινικής κινάσης και έχει πολλά υποστρώματα τα οποία εμπλέκονται στην κατάλυση, φωσφορυλίωση και τελικά στη ρύθμιση των μορίων Foxo1, Foxo3a και Foxo4. Η ρύθμιση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μετακίνηση των μορίων Foxo στο κυτταροπλασματικό χώρο και εν συνεχεία η μετακίνηση αυτή επιφέρει την αναστολή της μεταγραφικής δράσης των παραγόντων Foxo και την προώθηση της απόπτωσης, ενώ επιτελείται και η διακοπή του κυτταρικού κύκλου [96].

Το γονίδιο PTEN είναι ένα γονίδιο με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες το οποίο ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 10. Το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει ανασταλτικά το PI3K με τη μετατροπή του PIP3 σε PIP2. Σε περιπτώσεις που το PTEN δεν εκφράζεται από τα αρχέγονα κύτταρα του ωοθυλακίου, όπως έχουν δείξει μελέτες σε ζωικά μοντέλα, αυτό οδηγεί στην υπέρμετρη αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων και την συνολική ωοθηλακική ενεργοποίηση. Η μεγέθυνση αυτή των ωοκυττάρων προέρχεται από την αυξημένη ενεργοποίηση του μορίου Akt και της αυξημένης φωσφορυλίωσης και επομένως αυξημένης ενεργοποίησης του gpS6 [59].

Φαίνεται δηλαδή ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN-akt-foxo παίζει καθοριστικό ρόλο στα ανώριμα ωοκύτταρα γιατί ελέγχει την έναρξη της μεγέθυνσης του ωοκυττάρου κατά τη στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η ενεργοποίηση του ωοθυλακίου είναι μια διαδικασία μη αναστρέψιμη, ενώ τα ωοθυλάκια τα οποία δεν ωριμάζουν περαιτέρω παθαίνουν ατρησία [59].

Όσον αφορά τη δράση του Foxo3a, αυτή πιθανότατα ασκείται μέσω επαγωγής έκφρασης των αναστολέων των κινάσων των κυκλινών. Το Foxo3a εκφράζεται κυρίως

στο αρχέγονα κύτταρα του ωοθυλακίου ενώ παρατηρείται σημαντική μείωση της έκφρασής του στα πρωτογενή ωοθυλάκια και στις υπόλοιπες ωοθυλακικές μορφές που είναι πιο ώριμες. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την δράση του Fox3a σαν αναστολέα ενεργοποίησης των αρχέγονων κυττάρων του ωοθυλακίου, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκφρασής του αποτελεί προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων. Τέλος, το Foxo3a δρα σαν υπόστρωμα της Akt, της οποίας η δράση ελέγχεται από τα PTEN και PI3K. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η εξάλειψη και των δύο αυτών γονιδίων σε ζωικά μοντέλα (γενετικά τροποποιημένα ποντίκια) δεν έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρόωρη ωοθυλακική ενεργοποίηση (Yang et al., 2012).

### 2.3 Ο ρόλος της ινσουλίνης

Η FSH δεν προωθεί το σχηματισμό του ώριμου ωοθυλακίου από ένα πρώιμο ωοθυλάκιο, αλλά προκαλεί την ωρίμανση των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων που ήδη υπάρχουν. Η αρχική ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλακίου και η έντονη μιτωτική δραστηριότητα των κοκκιωδών κυττάρων δεν οφείλεται στις γοναδοτροπίνες αλλά σε μια σειρά αυξητικών παραγόντων που έχουν αυτοκρινική και παρακρινική δράση. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας, ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών και ο αυξητικός παράγοντας που είναι ανάλογος προς την ινσουλίνη [16].

Τα τελευταία χρόνια πολλές είναι οι μελέτες οι οποίες συνδέουν το ρόλο της ινσουλίνης και του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα (IGF-1) με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ). Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η αντισταθμιστική υπερινσουλιναμία παρατηρούνται σε ένα μεγάλο ποσοστό γυναικών με ΣΠΩ, ιδίως σε αυτές που είναι υπέρβαρες ή παχύσαρκες. Οι καταστάσεις αυτές συμβάλλουν στην υπερανδρογοναιμία με μια σειρά από διαφορετικούς μηχανισμούς:

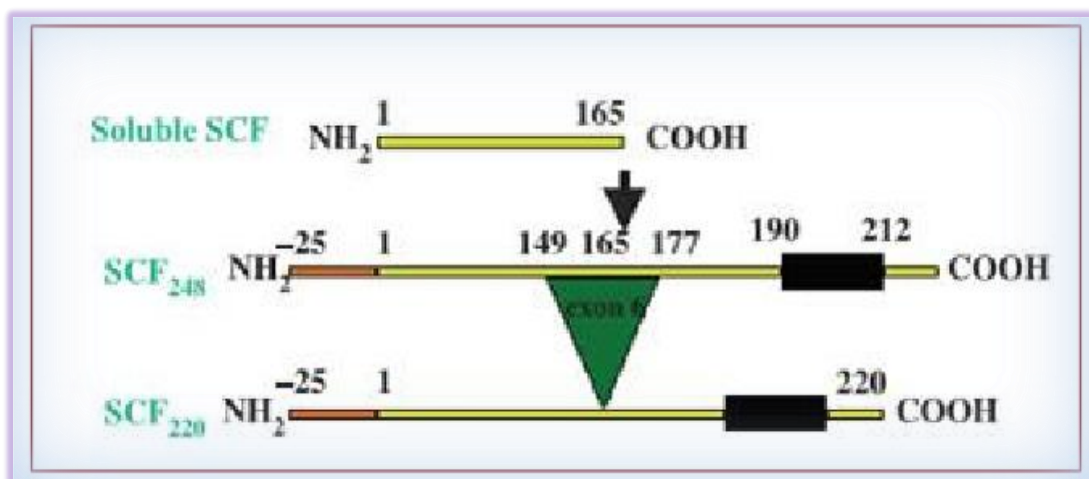
- επηρεάζουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης.
- αυξάνουν τη δεξαμενή των κυκλοφορούντων βιοδιαθέσιμων ανδρογόνων.
- μειώνουν την παραγωγή IGF-BP από το ήπαρ, μια πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει τον παράγοντα IGF-1 και μειώνει την έκφραση του IGF-BP στο ωοθυλάκιο (Chaves et al., 2012).

Η ινσουλίνη αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στο μηχανισμό στεροειδογένεσης, δρώντας κατ' αυτόν τον τρόπο συνεργικά με την LH στην παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης.

Επιπλέον, τόσο η ινσουλίνη όσο και ο παράγοντας σωματομεδίνη C ή αλλιώς ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 ή αυξητικός παράγοντας ομοιάζων στην ινσουλίνη-1 (Insulin-Like Growth Factor-1, IGF-1), αυξάνουν την απαντητικότητα των κυττάρων της θήκης στην LH [152]. Η υπερινουλιναιμία έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης της SHGB από το ήπαρ, αυξάνοντας τα επίπεδα των ανδρογόνων που είναι διαθέσιμα στον οργανισμό γενικότερα αλλά και στα όργανα στόχους ειδικότερα. Η ινσουλίνη έχει επίσης την ιδιότητα να μειώνει την έκφραση της IGF-BP στο ωοθυλάκιο απελευθερώνοντας έτσι περισσότερη ποσότητα IGF-1 η οποία δρα στο σύστημα παραγωγής ορμονών της θήκης. Η συγκεκριμένη δράση θεωρείται σημαντική αφού η σύνδεση του IGF-BP με τον IGF παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του ωοθυλακίου, αν βέβαια υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση της IGF-GB δεσμεύει τον IGF-1 και εμποδίζει τη δημιουργία συνθηκών υπερανδρογοναιμίας σε τοπικό επίπεδο με τη δράση της στα κύτταρα της θήκης [152].

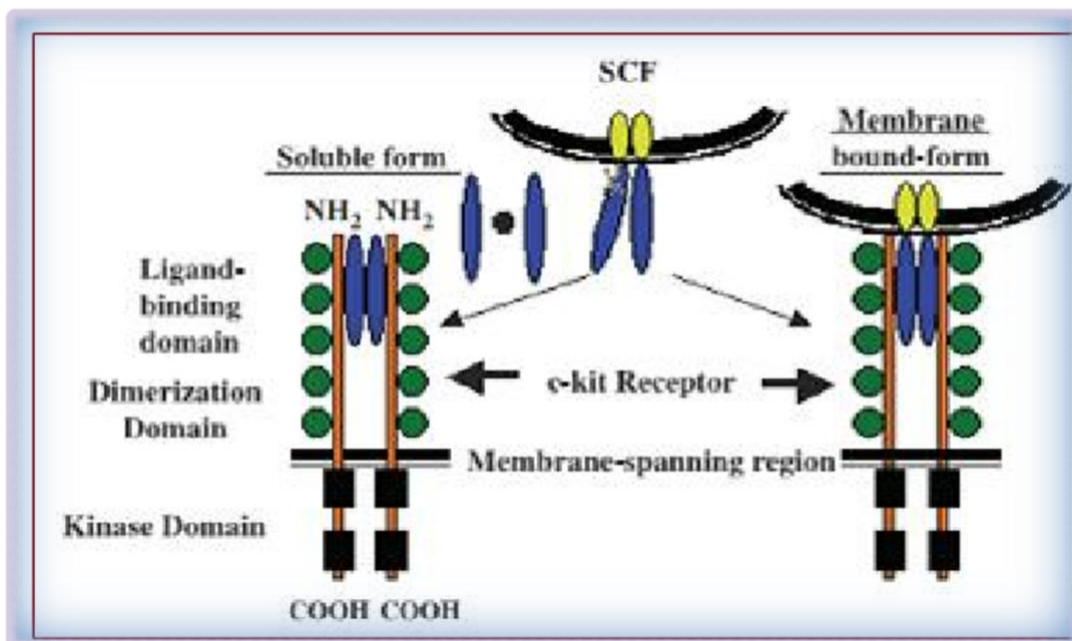
## 2.4 Σύστημα Kit, Kit-ligand

Ο παράγοντας πολυδύναμων κυττάρων (stem cell factor–SCF ή kit ligand) ανήκει στην μοριακή κατηγορία των ανθρώπινων κυτοκινών. Ο παράγοντας αυτός έχει δύο διαφορετικές αλλά εξίσου γνωστές μορφές οι οποίες προκύπτουν μετά το μάτισμα και διαφέρουν κατά ένα εξόνιο (εξόνιο 6). Η μορφή η οποία περιέχει το εξόνιο 6 κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία παράγει ένα διαλυτό μόριο μέσω πρωτεόλυσης, το SsCF το οποίο έχει την ιδιότητα να διμερίζεται εύκολα. Η μορφή στην οποία απουσιάζει το εξόνιο 6, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που μετακινείται και ενσωματώνεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 24) [63].



Εικόνα 24. Δομή του μορίου SCF και οι δύο μορφές του.

Ο κυριότερος ρόλος του SCF είναι η πρόσδεση και η ενεργοποίηση του c-kit υποδοχέα. Ο υποδοχέας αυτός, είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης τύπου III, και προέρχεται από το πρωτο-ογκογονίδιο c-kit. Και οι δύο μορφές του SCF προσδένονται στο C-kit, ωστόσο ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια και ρυθμίζουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Μετά την πρόσδεση του SCF στον c-kit, επάγεται ο διμερισμός και η φωσφορυλίωση του υποδοχέα ενώ ενεργοποιείται ένα σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται η 3-κινάση της φωσφατιδικής ινοσιτόλης και το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (Εικόνα 25).



Εικ 25. Ισομορφές του SCF και η αλληλεπίδρασή τους με τον c-kit

Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί 4 διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα c-kit η οποία διαφέρουν ως προς την ύπαρξη τεσσάρων αμινοξέων στο εξωκυττάριο τμήμα του. Επιπλέον, υπάρχουν και ισομορφές του c-kit οι οποίες διαφέρουν κατά μια σερίνη στην περιοχή και έχουν δράση κινάσης. Ο c-kit μπορεί να κοπεί από αρκετές πρωτεάσες ενώ ο διαλυτός c-kit που προκύπτει μπορεί και ρυθμίζει τη βιοενεργότητα του SCF [45].

Το σύστημα SCF και το σύστημα c-kit παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση και τη γαμετογένεση, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων. Τις περισσότερες φορές, ο SCF και ο υποδοχέας του εκφράζονται από διαφορετικά κύτταρα στο ίδιο μικροπεριβάλλον [63].



## 2.5 Κυτοκίνη CXCL12

Η κυτοκίνη CXCL12, είναι ένας ακόμη αυξητικός παράγοντας ο οποίος αναστέλλει την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η κυτοκίνη καθαυτή, καθώς και ο υποδοχέας της, ο CXCR4, εκφράζεται κυρίως στα αρχέγονα και στα ενεργοποιημένα ωοθυλάκια. Η αλληλεπίδραση της κυτοκίνης και του υποδοχέας της παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση του PGC, όπως έχει αποδειχτεί από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, όπως σε απουσία της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης μειώνεται η ποσότητα του PGC που φτάνει στην ακρολοφία. Επιπλέον, η CXCL12 εμπλέκεται και στο μηχανισμό στρατολόγησης των αρχέγονων ωοθυλακίων. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι ωοθήκες των νεογνών ποντικών καλλιεργούνται παρουσία του CXCL12, τότε εμφανίζεται μεγαλύτερη πυκνότητα στο αρχέγονα ωοθυλάκια και μικρότερος αριθμός από αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια [100].

## 2.6 Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων

### 2.6.1 FoxL2

Ο παράγοντας FoxL2 (forkhead transcription factor) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες στην ανάπτυξη και ωρίμανση του ωοθυλακίου. Ο FoxL2 είναι μέλος της οικογένειας των ηπατοκυττάρων πυρηνικού παράγοντα 3 (FKH/HNF3). Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στη *Drosophila*, ωστόσο σήμερα έχει ανιχνευτεί σε πολλά είδη από μύκητες μέχρι και τον άνθρωπο και είναι σημαντικός ο ρόλος του στην εμβρυογένεση, στη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ογκογένεση. Τα μέλη της οικογένειας FKH/HNF3 χαρακτηρίζονται από ένα πεδίο που διαθέτει έλικα στο οποία προσδένεται το DNA, αλλά παρουσιάζουν διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση βασισμένοι στην τρανσ-ενεργοποίηση συγκεκριμένων πεδίων τους [33]. Ο FoxL2 εκφράζεται στα λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα του κοκκιώδους πυρήνα των μικρών και μεσαίων ωοθυλακίων και για το λόγο αυτό αναμένεται ότι συμμετέχει ενεργά στη διαφοροποίηση και την ομοίωση των κοκκιωδών κυττάρων. Η τελική του καρβόξυλ-ομάδα η οποία είναι πλούσια σε αλανίνη/προλίνη ανιχνεύεται και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση. Αρχικά, ανακαλύφθηκε ότι ο FoxL1 λειτουργούσε σαν καταστολέας του γονδίου ρύθμισης των στεροειδών ορμονών (steroidogenic acute regulatory gene – STAR) και πιο συγκεκριμένα ολόκληρη η καρβόξυλομάδα του FoxL2 λειτουργεί σαν καταστολέας του STAR. Ο STAR είναι επίσης ένας δείκτης της διαφοροποίησης των

κοκκιωδών κυττάρων στα μεγάλα ωοθυλάκια, αλλά δεν είναι δείκτης διαφοροποίησης των μικρών και μεσαίων ωοθυλακικών κυττάρων. Ο Foxl2 προσδένεται στον εκκινητή του ανθρώπινου STAR και καταστέλλει τη δράση του [58].

Ο Foxl2 επίσης, αναστέλει την μεταγραφή της κυκλίνης D2, η οποία ρυθμίζει τις κινάσες 4 και 6 οι οποίες ελέγχουν την πρόοδο της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Τα γεγονότα αυτά, δείχνουν ότι ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας πιθανότατα λειτουργεί ως αναστολέας της ωρίμανσης των κυττάρων του ωοθυλακίου αποτρέποντας την πρόωρη διαφοροποίησή τους η οποία παρατηρείται σε περιπτώσεις μεταλλάξεων του [43].

### 2.6.2 NOBOX, LHX8, SOHLH1, SOHLH2

Ο μεταγραφικός παράγοντας των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων FIGLA (factor in the germ line alpha) είναι ένας παράγοντας της μορφής έλικας-βρόχος-έλικας ο οποίος αρχικά ταυτοποιήθηκε για το ρυθμιστικό του ρόλο στην γονιδιακή έκφραση της διαφανούς ζώνης. Τα θηλυκά ποντίκια που δεν έχουν τον FIGLA έχουν φυσιολογική ανάπτυξη των γονάδων, ωστόσο δεν μπορούν να αναπτύξουν αρχέγονα κύτταρα του ωοθυλακίου μετά τη γέννησή τους, γεγονός που οδηγεί σε μείωση των ωοκυττάρων τους και υπογονιμότητα. Αν και ο FIGLA αναφέρεται πως ρυθμίζει κατασταλτικά ολανδρικά γονίδια ενώ επάγει θηλυκά γονίδια, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί αυτού του έλεγχου δεν είναι ακόμη γνωστοί. Προηγούμενες μελέτες έχουν προσδιορίσει μια σειρά από μεταγραφικούς ρυθμιστές που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ωοκυττάρων και στην πρόωμη ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Οι παράγοντες αυτοί συμπεριλαμβάνουν την ομοιοτική πρωτεΐνη 8 (LIM homeobox protein 8 – Lhx8), τους μεταγραφικούς παράγοντες σπερματογένεσης και ωογένεσης bHLH 1 και 2 (Sohlh1 και sohlh2), το ομοιοτικό γονίδιο ωογένεσης NOBOX) και τον παράγοντα Taf4b (tata-box binding protein factor 4b). Στην παραπάνω κατηγορία ανήκει και ο παράγοντας FIGLA [114].

Οι NOBOX και FIGLA εκφράζονται κυρίως στα θηλυκά γενετικά κύτταρα και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των γυναικείων γεννητικών κυττάρων, χωρίς να επηρεάζουν την ανάπτυξη των ανδρικών γεννητικών κυττάρων. Οι παράγοντες Sohlh1 και Sohlh2 και NOBOX ρυθμίζουν την ωοκυτταρική διαφοροποίηση χωρίς να επηρεάζουν τη μείωση. Η απώλεια των παράγοντα FIGLA φαίνεται ότι εμποδίζει την πρόοδο της μείωσης [126].

## 2.7 Ο ρόλος των πρωτεϊνών

### 2.7.1 Πρωτεΐνη GDF9

Η πρωτεΐνη GDF9 είναι γνωστή και ως αυξητικός τροποποιητικός παράγοντας 9, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1990 και είναι μέλος της οικογένειας του TGF. Ο GDF9 εκφράζεται πρωτίστως στα κύτταρα των ωοθυλακίων και σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ζωικά μοντέλα ποντικών, ο ρόλος του είναι ρυθμιστικός ως προς τη λειτουργία της ωοθήκης. Ανεπάρκεια του αυξητικού παράγοντα, προκαλεί ανικανότητα στην ωρίμανση των ωοθυλακίων, το οποίο ωριμάζει μέχρι το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου, γεγονός που προκαλεί υπογονιμότητα. Η ανεπάρκεια του παράγοντα αυτού στα αρσενικά ποντίκια δεν προκάλεσε μεταβολές στη γονιμότητά τους. Επιπρόσθετα, έρευνες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας GDF9 έχει σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη των κυττάρων της θήκης και στον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της θήκης [134].

Σε ορισμένα θηλαστικά, στα ωοκύτταρα και τα κοκκιώδη κύτταρα εκφράζεται το mRNA και η πρωτεΐνη του GDF9. Ο παράγοντας αυτός εκφράζεται διαφορετικά στα διάφορα είδη (βοοειδή, γάτες, ποντίκια, αρουραίους) είτε στα αρχέγονα είτε στα πρωτογενή ωοθυλάκια. Για παράδειγμα στα πρόβατα, έχει ανιχνευτεί mRNA του GDF9 σε γεννητικά κύτταρα πριν το σχηματισμό του ωοθυλακίου αλλά και σε κύτταρα που δεν είχαν εξελιχτεί πλήρως στην κοκκιώδη μορφή τους [52].

Ο GDF9 είναι συνδεδεμένος με το ομόλογό του μόριο το οποίο είναι το GDF-9B (μορφογενετική οστική πρωτεΐνη) που εκφράζεται επίσης στην ανθρώπινη ωοθήκη πριν το πρωτογενές στάδιο. Σχετικά με τη σηματοδότηση ως προς την παραγωγή του παράγοντα, μπορεί να παραχθεί από τα κοκκιώδη κύτταρα μετά από σηματοδότηση που ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες SMAD2/SMAD3 μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα BMP τύπου II (BMPR2) και του υποδοχέα τύπου I κινάσης που μοιάζει με την ακτιβίνη 5 (ALK5). Ωστόσο δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί οι αλλαγές στο mRNA των κυττάρων της θήκης ALK5 κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων αλλά και το ακριβές σύστημα σηματοδότησης ενδοκυτταρικά, που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα της θήκης [52]. Ο GDF-9 ελέγχει την έκφραση αρκετών γονιδίων των ωαρίων που έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Ο παράγοντας αυτός συνδέεται επίσης με τους ωαρικούς αυξητικούς παράγοντες τύπου BMP, γεγονός που διαπιστώνεται αν λάβουμε υπ' όψιν ότι διαθέτουν τους ίδιους υποδοχείς (BMPRII). Όπως συμπεραίνουμε από τις παραπάνω διαπιστώσεις, οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από το ωάριο διαδραματίζουν αξιόλογο ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων στην προ-κοιλοτική τους μορφή επιδρώντας στα περιβάλλοντα κοκκιώδη κύτταρα και στα κύτταρα θήκης [48].

In vitro μελέτες έδειξαν ότι στα ανθρώπινα ωάρια παρατηρείται η έκφραση των παραγόντων GDF-9 και BMP-15 και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα, ενώ ο GDF-9 ενεργοποιεί την ανάπτυξη των προ-κοιλοτικών ωοθυλακίων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η εμφάνιση της παθολογικής κατάστασης των πολύ-κυστικών ωοθηκών συνδέεται με την δυσλειτουργία στην έκφραση του GDF-9. Οι μελέτες αυτές, κατέληξαν επίσης στο συμπέρασμα ότι ο GDF-9 ο οποίος προέρχεται από το ωάριο δεν μπορεί να αντικατασταθεί για τη μετάβαση του πρωτογενούς σε δευτερογενές ωοθυλάκιο λόγω της ιδιαίτερης ικανότητας που έχει στο να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τον τρόπο διάταξης των κοκκιωδών κυττάρων [48]. Κατά τη φάση ανάπτυξης του ωοθυλακίου με άντρο, οι GDF-9 και BMP-15 παράγονται από το ωάριο και η δράση τους είναι η μορφογενετική διαφοροποίηση και η δημιουργία των διαφορετικών από λειτουργικής πλευράς τύπων κοκκιωδών κυττάρων, αναλόγως με την θέση που αυτά έχουν σε σχέση με το ωάριο. Οι λειτουργικές αυτές διαφορές είναι σημαντικές αν λάβουμε υπ' όψιν ότι στη συγκεκριμένη φάση το ωάριο και τα ωοθυλάκια κύτταρα ετοιμάζονται για τη διαδικασία της ωορρηξίας [109].

Το ωάριο είναι υπεύθυνο για την έκκριση πληθώρας αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που ανήκουν στην οικογένεια του TGF- $\beta$  (μέλος της οποίας είναι και ο GDF-9). Ο GDF-9 υποστηρίζει τη διαφοροποίηση του φαινοτύπου των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ασκεί ευεργετική δράση μαζί με την βοήθεια των BMPs έτσι ώστε τα κύτταρα του δίσκου να ανταποκριθούν άμεσα στο ερέθισμα της ωορρηξίας. Οι μελέτες που έχουν γίνει στα κοκκιώδη κύτταρα ποντικών έδειξε ότι η απελευθέρωση του GDF-9 αυξάνει την παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης, ενώ όταν βρίσκεται σε συνδυασμό με την FSH αναστέλλει την παραγωγή προγεστερόνης [109].

### 2.7.2 Πρωτεΐνη BMP-2

Η πρωτεΐνη BMP-2 είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των TGF-2 πρωτεϊνών. Η αρχική της μορφή γλυκοζυλιώνεται, διασπάται από πρωτεολυτικά ένζυμα και διμερίζεται ώστε τελικά να δώσει τη λειτουργική μορφή της που είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη με c-τελικό άκρο που αποτελείται από 114 αμινοξέα. Η αλληλουχία του πρωτεϊνικού μορίου που προηγείται της κυστίνης έχει δείξει ότι εμπλέκεται στην πρόσδεση της ηπαρίνης [82].

Η BMP-2 προσδένεται αρχικά στους υποδοχείς τύπου I (BMPRI A και I B). Στη συνέχεια στρατολογείται ένας υποδοχέας τύπου II, όπως για παράδειγμα ο BMPRII και φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς τύπου I. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς τύπου I, στη

συνέχεια φωσφορυλιώνουν κάποιες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οι πιο χαρακτηριστικές από τις οποίες είναι οι SMAD1,5 και 8. Υπάρχουν επίσης και οι φωσφορυλιωμένες R-SMADS οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερή συμπλέγματα με τη SMAD-4. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται στον πυρήνα και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη γονιδιακή τους έκφραση [82]. Μια σειρά πειραμάτων που έγιναν στην ανθρώπινη ωοθήκη, εξήγαγε το συμπέρασμα ότι το mRNA του BMP-2 ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρή ποσότητα στα αρχέγονα πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια, ενώ παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά έκφρασης στα κοκκώδη κύτταρα ωοθυλακίων με άντρο. Αντίθετα, στο ωχρό σωματίο, τα ποσοστά έκφρασης ήταν πολύ χαμηλά. Η αποκλειστική έκφραση της BMP-2 στα ωοθυλάκια που περιέχουν άντρο, δείχνει ότι προωθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και αποτρέπει την πρόωμη ωχρινοποίησή τους. Από την άλλη πλευρά, η απουσία της έκφρασης του BMP-2 από το ωχρό σωματίο διευκολύνει την ωχρινοποίηση [82].

Στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, βρέθηκε ότι η BMP-2 έχει την ιδιότητα να αυξάνει τους υποδοχείς της FSH και να αυξάνει επίσης την έκφραση του mRNA της αρωματάσης. Και τα δύο αυτά γεγονότα αυξάνουν την μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη και επομένως υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης. Αντιθέτως, η BMP-2, έχει την ιδιότητα να μειώνει την έκφραση των υποδοχέων της LH αλλά και τη συνολική παραγωγή του ενζύμου STAR μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την προγεστερόνη [14].

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η BMP-2 ελέγχει τη συνθεση των στεροειδών ορμονών στα κοκκώδη κύτταρα ρυθμίζοντας τοπικούς παράγοντες και ενδοκρινικά συστήματα. Η έκφρασή της στα κοκκώδη κύτταρα προάγει επίσης την ωοθυλακική ανάπτυξη και αποτρέπει την πρόωγη ωχρινοποίηση, προκαλώντας την επιτυχή μετάβαση από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο στο ωχρό σωματίο [14].

### 2.7.3 Πρωτεΐνη p27

Η πρωτεΐνη p27 είναι η σύντομη ονομασία του αναστολέα της κινάσης Cdk (cyclin dependent Kinase) και έχει βασική ιδιότητα την κυτταρική αύξηση και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Σε ζωικά μοντέλα και πιο συγκεκριμένα σε ποντίκια, ανιχνεύεται η έκφρασή της στον πυρήνα των ωοκυττάρων καθώς επίσης και στα αρχέγονα και πρωτογενή ωοθυλάκια. Ωστόσο, σε μερικώς ανεπτυγμένα ωοθυλάκια, εκφράζεται ελάχιστα από τα ωοκύτταρα. Ο συγκεκριμένος τρόπος έκφρασης της πρωτεΐνης συνδέεται με το ρόλο της στην αναστολή ωρίμανσης των αρχέγονων

ωοθυλακίων. Τα p27 knockout ποντίκια έχουν την ιδιότητα να διαθέτουν αρχέγονα ωοθυλάκια πρόωρα ενεργοποιημένα, γεγονός που προκαλεί τη μείωση της ωοθυλακικής δεξαμενής. Επομένως ο πιο σημαντικός ρόλος της p27 είναι η διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε ηρεμία. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από το γονίδιο Foxo3a μέσω του μονοπατιού σήμανσης PI3K/Akt, γεγονός που παρατηρείται από το ότι η ταυτόχρονη απώλεια και των δύο μηχανισμών προκαλεί ωοθυλακική ενεργοποίησης [27], [41].

## 2.8 Ο ρόλος των γονιδίων

### 2.8.1 PTEN

Το γονίδιο PTEN ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 10q23 και μπορεί να κωδικοποιήσει μια πρωτεΐνη με λειτουργία κινάση της τυροσίνης. Η δυσλειτουργίες του συγκεκριμένου γονιδίου αποτελούν δείκτη για προκαρκινικές αλλοιώσεις στο ενδομήτριο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PTEN δρα σαν φωσφατάση, τόσο σε λιπίδια όσο και σε πρωτεΐνες και μπορεί να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου της μετάβαση από την φάση G1 στη φάση S. Επίσης στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών του κυττάρου, εμπλέκονται ρυθμιστικοί μηχανισμοί της Akt που πραγματοποιούνται μέσω του PTEN. Πιο συγκεκριμένα η απώλεια του PTEN μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη και διαφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης [74].

### 2.8.2 Foxo12

Ο Foxo12 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο σχεδόν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου όπως για παράδειγμα στη διαφοροποίηση του φύλου, στη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων και στην ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Επίσης, δρα ως αναστολέας της ενεργοποίησης των αρχέγονων ωοθυλακίων και είναι απαραίτητος προκειμένου να αλλάξει τα σχήματα των προκοκκωδών κυττάρων σε κυβοειδή κοκκώδη κύτταρα. Η έλλειψη του συγκεκριμένου παράγοντα επιφέρει την αδυναμία στη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων, ενώ προκαλεί και πλήρη απουσία στα δευτερογενή ωοθυλάκια εξαντλώντας από την ωοθήκη τη δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων. Τέλος, δρα ως ρυθμιστής των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την στεροειδογένεση όπως για παράδειγμα το γονίδιο CYP19A1 το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο της αρωματάσης και το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο STAR [53].

### 2.8.3 Foxo3a

Ο παράγοντας Foxo3a έχει πολλαπλούς ρόλους τόσο στην απόπτωση όσο και στον πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA. Όπως προαναφέρθηκε στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου παίζουν σημαντικό ρόλο τα συμπλέγματα κινασών-κυκλίνης. Ο Foxo3a δρα σαν καταστολέας των κυκλινών D1 και D2 οι οποίες είναι απαραίτητες για τη δημιουργία συμπλεγμάτων που βοηθούν την είσοδο του κυττάρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.

Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα διατηρούνται σε φάση G0 που είναι μια κατάσταση ηρεμίας. Επίσης ο Foxo3a αυξάνει τη μεταγραφή των CDK αναστολέων (p27kip1 και p21Cip1) εμποδίζοντας το κύτταρο να φτάσει στο στάδιο S. Επομένως με την αύξηση της έκφρασης του παράγοντα Foxo3a το κύτταρο υποβοηθείται ώστε να φτάσει στη φάση ηρεμίας [31].

### 2.9 Ο ρόλος της AMH

Η παραγωγή της AMH στην ωοθήκη γίνεται αρχικά από τα κοκκιώδη κύτταρα στα ωοθυλάκια. Η AMH είναι αρχικά μη ανιχνεύσιμη κατά τη γέννηση ενώ αυξάνει μέχρι την ηλικία των τεσσάρων ετών και παραμένει σε σταθερά χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας. Πριν την εφηβεία, η έκκριση της AMH είναι χαμηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες ενώ παρόμοια είναι και τα επίπεδα έκφρασης στην ενήλικη ζωή [77].

Οι ιδιαίτεροι τρόποι έκφρασης της AMH αλλά και του υποδοχέα της στην ωοθήκη μας κάνουν να συμπεράνουμε ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του ωοθυλακίου. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η AMH μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην έναρξη της ωοθυλακικής ανάπτυξης, μια διαδικασία η οποία είναι γνωστή και ως αρχική στράτευση. Έχει επίσης διαπιστωθεί, ότι η AMH ελαχιστοποιεί την απόκριση των επιλέξιμων ωοθυλακίων στην FSH με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιλεγεί το κυρίαρχο ωοθυλάκιο [81].

### **3 Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια**

#### **3.1. Ορισμός**

Η λειτουργία των ωοθηκών διακόπτεται σταδιακά και συμβαίνει κατά τη διάρκεια πολλών ετών και κορυφώνεται κατά την εμμηνόπαυση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η λειτουργία των ωοθηκών σταματάει νωρίτερα από το κανονικό, λόγω φυσικών αιτιών, χημειοθεραπείας ή χειρουργικής επέμβασης. Μάλιστα επισημαίνεται, ότι οι γυναίκες που έχουν αγχώδη εργασία έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εισέλθουν στην εμμηνόπαυση νωρίτερα από το μέσο όρο. Συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό οι γυναίκες αυτές έχουν μικρότερο ηλικιακό μέσο όρο εμμηνόπαυσης [70].

Η πρόωρη ωοθυλακική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία η γυναίκα εισέρχεται στην εμμηνόπαυση αυθόρμητα πριν την ηλικία των 40 ετών. Εξαιτίας της νεαρής ηλικίας και της απροσδόκητης φύσης του γεγονότος, πιθανόν να χρειάζεται εκτός από ορμονική υποστήριξη και ψυχολογική [70].

#### **3.2 Ιστορική αναδρομή**

Η παθολογική κατάσταση της ΠΩΑ αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1930 όταν σε νεαρές γυναίκες με αμηνόρροια βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπίνης στα ούρα. Ωστόσο, το 1940 έγινε για πρώτη φορά η συσχέτιση ανάμεσα στα υψηλά επίπεδα γοναδοτροπίνης των ούρων και τις τυπικές ιστολογικές διαφορές που παρατηρούνται στα ωάρια των εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Στις επόμενες δεκαετίες, ανακαλύφθηκαν πολλά σχετικά με την παθοφυσιολογία, καθώς επίσης και θεραπευτικές παρεμβάσεις που ήταν καθοριστικής σημασίας στο να επιτρέπουν στις γυναίκες με ΠΩΑ να ζήσουν μια σχετικά φυσιολογική ζωή.



### 3.3 Αιτιολογία ΠΩΑ

#### 3.3.1 Ιδιοπαθής ΠΩΑ

Στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις για ΠΩΑ, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της παθολογικής αυτής κατάστασης με υπεργοναδοτροπικό υπογοναδισμό. Πολλές είναι οι υποκείμενες καταστάσεις οι οποίες πιθανόν να δημιουργούν μεγαλύτερο ρίσκο για την εμφάνιση της νόσου (για παράδειγμα το αυξημένο ρίσκο για αορτικό ανεύρισμα στους ασθενείς με σύνδρομο Turner, αυξημένο ρίσκο για αυτοάνωση νεφρική ανεπάρκεια σε ασθενείς με ΠΩΑ, όπως συσχετίζεται και η αυτοάνωση ανεπάρκεια θυρεοειδούς αδένου). Οι πολλαπλές αιτιολογίες τις ΠΩΑ που αναγνωρίζονται μέχρι και σήμερα περιλαμβάνουν γενετικούς, αυτοάνοσους, μολυσματικούς και ιδιοπαθείς παράγοντες. Οι περισσότερες ωστόσο περιπτώσεις ΠΩΑ (περισσότερο από το 90%) είναι ιδιοπαθείς, χωρίς να μπορεί να προσδιοριστεί κάποια συγκεκριμένη αιτία (Πίνακας 1) [80].

#### Πίνακας 1. Αιτιολογίες ΠΩΑ

<b>Αυθόρμητη νόσος</b>
<b>Ιδιοπαθής</b>
<b>Γενετική</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Σύνδρομο Turner (45XO)</li> <li>• Τρισωμία X (47XXX)</li> <li>• Μετάλλαξη του ευαίσθητου X</li> <li>• Γαλακτοσαιμία</li> <li>• Αυτοάνοσο πολυαδενικό σύνδρομο</li> <li>• Μεταλλάξεις ορμονικών υποδοχέων οι οποίες ενεργοποιούν τα ωοθυλάκια</li> <li>• Έλλειψη 17<sup>α</sup>-υδροξυλάσης</li> <li>• Έλλειψη αρωματάσης</li> <li>• Βλεφαροφίμωση, πτώση</li> <li>• Σύνδρομο Bloom</li> </ul>

### 3.3.2 ΠΩΑ με γενετική αιτιολογία

Το μέγεθος του πρωταρχικού συνόλου των ωοθυλακίων, ο ρυθμός της ωοθηλακικής ατρησίας και η ηλικία έναρξης της εμμηνόπαυσης επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες. Με την εφαρμογή πιο εξειδικευμένων τεχνικών γενετικής διάγνωσης, οι γενετικές αιτιολογίες είναι υπεύθυνες για το 20-25% των περιπτώσεων περίπου. Οι πιο συχνές γενετικές αιτιολογίες είναι μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα X. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένοι, πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην τοποθεσία του μακρύ βραχίονα (q) του X χρωμοσώματος ρυθμίζουν την ανάπτυξη των γαμετών. Η πιο κοινή γενετική ανωμαλία η οποία οδηγεί σε ΠΩΑ είναι το σύνδρομο Turner, το οποίο σχετίζεται με πλήρη ή μερική μονοσωμία του X χρωμοσώματος και προσβάλλει περίπου 1 στις 2.500 γυναίκες. Η πιο κοινή χρωμοσωμική σύνθεση είναι 45 XO ή πλήρης έλλειψη του X χρωμοσώματος. Οι γυναίκες με 45XO έχουν προβληματικό σχηματισμό των γονάδων και οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις διαθέτουν ραβδωτές ωοθήκες που αποτελούνται από ινώδη ιστό και περιέχουν λίγα ή καθόλου ωάρια [128].

Η νοητική υστέρηση επί ευαίσθητου X, προκαλείται από το γονίδιο FMR1 το οποίο βρίσκεται στο q τμήμα του χρωμοσώματος X και σχετίζεται με το ΠΩΑ. Το σύνδρομο ευαίσθητου X, που είναι η πιο κοινή αιτία νοητικής υστέρησης προέρχεται από μια κληρονομούμενη μετάλλαξη της επαναλαμβανόμενης τριπλέτας του γονιδίου FMR1. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι μόνο οι γυναίκες με την προ-μετάλλαξη στο γονίδιο έχουν αυξημένο ρίσκο να αναπτύξουν ΠΩΑ, ενώ οι γυναίκες που έχουν πλήρη μετάλλαξη δεν έχουν μεγαλύτερο ποσοστό επικινδυνότητας σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό [113].

Υπάρχουν και άλλες γενετικές ασθένειες οι οποίες αναφέρονται σαν αιτιολογίες για την ΠΩΑ, οι οποίες όμως πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν μόνο στην περίπτωση που υπάρχει οικογενειακό ιστορικό σε αυτές. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί περισσότερη σημασία και στα γονίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία και ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στη λειτουργία των ωαρίων. Η γονιδιακή έκφραση η οποία είναι εξειδικευμένη για τα ωοκύτταρα, είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αρχέγονων ωοθυλακίων και την επακόλουθη διαφοροποίησή τους σε πρωτογενή ωοθυλάκια. Έχει ανακαλυφθεί μια σειρά από μεταλλάξεις οι οποίες συμβαίνουν σε μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων για τη λειτουργία των ωοκυττάρων. Παραδείγματα τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν τα FOXL1, το NOBOX και ο FIGLA [15].

Επιπλέον οι κυτταρογενετικές μελέτες δείχνουν ότι πιθανές αιτιολογίες που συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις, ειδικά αυτές που επηρεάζουν το χρωμόσωμα X, σχετίζονται με την ΠΩΑ. Η πιο συχνή από αυτές τις καταστάσεις είναι η μονοσωμία (X0) αλλά ανιχνεύονται και απαλοιφές, επαναλήψεις και μεταθέσεις, στο X πάντα χρωμόσωμα. Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται κυρίως στις τοποθεσίες του χρωμοσώματος POF1 και POF2. Τέλος, υπάρχουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς των γοναδοτροπίνων, τους υποδοχείς της FSHR και της

LHCGR (luteinizing hormone choriogonadotropin receptor). Η FSH όπως αναλύθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, εκκρίνεται από την υπόφυση και είναι ζωτικής σημασίας στην στρατολόγηση και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Υπάρχουν σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο της FSH οι οποίες σχετίζονται με την αμηνόρροια και δυσλειτουργία των ωοθηκών [132].

Οι διαταραχές του μεταβολισμού οι οποίες οδηγούν σε ΠΩΑ συμπεριλαμβάνουν την έλλειψη της 17-OH και την τυπική γαλακτοζαιμία. Η δεύτερη σχετίζεται με μια μετάλλαξη στο γονίδιο του GALT που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενζύμου γαλακτόζη-1-φωσφατάση ουριδιλιοτρανσφεράση, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γαλακτόζης. Η ΠΩΑ στην περίπτωση αυτή είναι μια μακροπρόθεσμη επιπλοκή η οποία συμβαίνει στο 90% των ασθενών με γαλακτοζαιμία, με πιθανούς μηχανισμούς όπως η τοξικότητα των μεταβολιτών της γαλακτόζης ή η προβληματική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών ή των λιπιδίων μέσα στους ιστούς των ωοθηκών εφ' όρου ζωής [28].

Όσον αφορά τις ιατρογενείς αιτιολογίες αυτές εμπλέκουν ασθενείς που έχουν προβληματική λειτουργία των ιστών των γονάδων, κυρίως ογκολογικούς ασθενείς. Το ρίσκο για την εμφάνιση ΠΩΑ μετά από ογκολογική θεραπεία αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας μετά από την εφηβεία και μπορεί να εμφανιστεί μετά από διάφορα θεραπευτικά σχήματα και με το συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας. Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και η χρήση αλκαλικών παραγόντων είναι περισσότερο γοναδοτοξική κατά την παιδική ηλικία [66].

Υπάρχουν επίσης δύο κύριες μολύνσεις από ιούς οι οποίες εμπλέκονται στην εμφάνιση ΠΩΑ. Η πρώτη περίπτωση είναι ο ιός της παρωτίτιδας που μπορεί να οδηγήσει στην παρωτίτιδα και πιθανή ανεπάρκεια ωοθηκών. Η δεύτερη περίπτωση είναι ο ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας, αλλά και η αντιική θεραπεία αυτού που επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία των ωαρίων [35].

Τέλος, μια πρόσφατη μέτα-ανάλυση δείχνει ότι ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικοί ρύποι και οι τοξίνες παίζουν ρόλο στην παθογένεια του ΠΩΑ. Η επίδραση που έχουν στα ωάρια, μπορεί να προκαλεί διάσπαση με πολλούς τρόπους που πιθανόν να συνυπάρχουν. Τέτοιου είδους παράγοντες είναι η βισφενόλη Α (χρησιμοποιείται στη συσκευασία και ως συστατικό πλαστικών), πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φυτοφάρμακα, διοξίνες και ο καπνός του τσιγάρου [124].

### 3.4 Επιδημιολογικά στοιχεία

Οι πιθανότητες για ΠΩΑ πριν την ηλικία των 40 ετών είναι 1%. Ο επιπολασμός της εμμηνόπαυσης διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και είναι 1:10000 στις γυναίκες ηλικίας 18-25 ετών, 1:1000 στις γυναίκες ηλικίας 25-30 ετών και 1:100 στις γυναίκες

ηλικίας 35-40 ετών. Η ΠΩΑ συνδέεται με οικογενειακό ιστορικό σε ποσοστό περίπου 15% των περιπτώσεων, γεγονός που προδιαθέτει μια γενετική αιτιολογία. Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει διαφορές όσον αφορά τη συχνότητα της ΠΩΑ ανάμεσα σε καυκάσιους, αφρικανικούς, αμερικανικούς και ισπανικούς πληθυσμούς γυναικών [71].

### 3.5 Διάγνωση

Τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΠΩΑ είναι η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, η αμηνόρροια, διαταραχές εμμηνου ρύσεως και τα αυξημένα επίπεδα FSH (>25 UI) τουλάχιστον για 4 μήνες. Η πιο αποδεκτή εξέταση για την ΠΩΑ είναι η αύξηση των επιπέδων FSH.

Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν βοηθητικά στη διάγνωση τα επίπεδα των οιστρογόνων. Ακόμα, στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις για ΠΩΑ συνίσταται η χρωμοσωμική ανάλυση επειδή πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα εμφάνισης γοναδικής νεοπλασίας. Όλες οι γυναίκες και τα πρόσωπα του οικογενειακού περιβάλλοντος είναι σημαντικό να υποβληθούν στην εξέταση ευαίσθητου συνδρόμου X. Επίσης, επειδή η ΠΩΑ είναι μια ασθένεια που έχει αυτοσωμικό υπόβαθρο, είναι απαραίτητο να αποκλειστούν άλλες αυτοάνοσες ασθένειες. [60].

Η συμπτωματολογία της ΠΩΑ διαφέρει κατά πολύ ανάμεσα στους ασθενείς και μπορεί να συμπεριλαμβάνει μειωμένη συγκέντρωση οιστρογόνων καθώς και επιπλέον παθολογικά χαρακτηριστικά που αντανακλούν σημάδια υποκείμενης νόσου (Πίνακας 2). Για κάποιες γυναίκες η αρχική ένδειξη είναι η ανεπάρκεια ωαρίων όπως αυτή αντανακλάται από τις αστάθειες στον καταμήνιο κύκλο. Η πρωτοπαθής αμηνόρροια μπορεί να εμφανίζεται σαν σύμπτωμα στο 10% των περιπτώσεων με ΠΩΑ, ωστόσο στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο καταμήνιος κύκλος καθυστερεί για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Η απώλεια της εμμηνου ρήσεως για περισσότερο από τρεις μήνες σε μη έγκυες και κατά τα άλλα φυσιολογικές γυναίκες απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση και η ΠΩΑ θα πρέπει να είναι ανάμεσα στις ασθένειες που θα διερευνηθούν. Σε άλλες γυναίκες μπορεί να εμφανίζονται συμπτώματα που ομοιάζουν με τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης όπως είναι οι εξάψεις, η μειωμένη λίμπιντο, η κολπική ξηρότητα και η διαταραχές ύπνου (Rebar et al., 2009).

Πιθανά συμπτώματα
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Ακανόνιστος καταμήνιος κύκλος</li> <li>● Ξαφνική έναρξη δευτεροπαθούς αμηνόρροιας</li> <li>● Πρωταρχική αμηνόρροια</li> <li>● Υπογονιμότητα</li> <li>● Συμπτώματα εμμηνόπαυσης (εξάψεις, κολπική ξηρότητα, διαταραχές ύπνου)</li> <li>● Αλλαγές στο χρωματισμό του δέρματος</li> <li>● Λεύκη (αυτοάνοση)</li> <li>● Απώλεια μαλιών/αλοπεκία</li> <li>● Βρογχοκήλη</li> <li>● Κόπωση</li> </ul>

## Πίνακας 2. Κλινικές εκδηλώσεις της ΠΩΑ

### 3.6 Θεραπεία

Αρχικά συστήνεται η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (ΘΟΥ) για τους ασθενείς με ΠΩΑ ώστε να ανακουφιστούν από τα συμπτώματα της ανεπάρκειας των οιστρογόνων, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε έφηβες και τη μείωση του κινδύνου των μακροπρόθεσμων συννοσηροτήτων. Πιο συγκεκριμένα, η ΘΟΥ συνίσταται σε γυναίκες που έχουν ουρογεννητικά και αγγειοκινητικά συμπτώματα καθώς και συμπτώματα σεξουαλικής δυσλειτουργίας. Επιπλέον, η ΘΟΥ μπορεί να δώσει ευεργετικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις ασθενών που έχουν προβλήματα με την υγεία των οστών τους και την υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος. Σε πρόσφατες μελέτες έχει αποδειχτεί ότι η ΘΟΥ με τη μορφή συνδυαστικής θεραπείας (προγεστερόνη και οιστρογόνο) αποκαθιστά την ενδοθηλιακή λειτουργία, μειώνοντας τις επιπτώσεις για ισχαιμική καρδιακή νόσο και καρδιαγγειακή θνησιμότητα, ειδικά σε ασθενείς που έχουν υποστεί αμφοτερόπλευρη σαλπινγωοθηκεκτομή.

Αν και δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η θεραπεία αυτή αυξάνει το προσδόκιμο ζωής, επηρεάζει θετικά την ποιότητα ζωής μέσω της μείωσης των αγγειοκινητικών και καρδιακών συμπτωμάτων [13].

Στη ΘΟΥ χρησιμοποιούνται τρία κυρίως είδη οιστρογόνων :

- 17β-οιστραδιόλη
- Αιθινυλοιστραδιόλη
- Συζευγμένα οιστρογόνα

Δεν υπάρχει κάποια έρευνα η οποία να επιχειρηματολογεί σχετικά με την καλύτερη από τις τρεις θεραπείες. Ωστόσο, η 17β οιστραδιόλη σχετίζεται με τα οφέλη στα οστά (μείωση οστικής απορρόφησης και αύξηση οστικής πυκνότητας). Τα προγεσταγόνα συνήθως χορηγούνται σε συνδυασμό με οιστρογόνα σε περιπτώσεις ύπαρξης μήτρας λόγω κινδύνου εμφάνισης υπερπλασίας του ενδομητρίου. Επίσης, η φυσική προγεστερόνη πιθανόν να συνδέεται με μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, καρκίνου του μαστού και καρκίνου του ενδομητρίου.

Η οδός χορήγησης της θεραπείας είναι συνήθως από το στόμα, διαδερμικά (γέλη ή αυτοκόλλητα), εισπνεόμενα, κολπικά ή ενέσιμα. Η οδός χορήγησης όμως που θα επιλεγεί τελικά, εξαρτάται από την προτίμηση της ασθενούς και από τυχόν επιπλοκές που δημιουργούν άλλοι παράγοντες συννοσηρότητας. Η προτιμώμενη οδός είναι συνήθως η διαδερμική λόγω της αποφυγής του μεταβολισμού των οιστρογόνων από το ήπαρ, αλλά και λόγω της χαμηλής ημερήσιας δόσης, των υψηλών συγκεντρώσεων των οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος και της ταχείας έναρξης και λήξης δράσης της δραστικής ουσίας. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η διαδερμική χορήγηση οιστρογόνων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κινδύνου για ισχαιμία του μυοκαρδίου, καρκίνο του μαστού και θρόμβωση. Η υποδόρια χορήγηση γίνεται στην κατώτερη κοιλιακή χώρα του ασθενή με ενθέματα 20-25 mg, ενώ απαιτείται ο επαναπροσδιορισμός της δόσης κάθε έξι μήνες ανάλογα με την επανεμφάνιση των συμπτωμάτων και τα επίπεδα των οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος. Η κολπική χορήγηση αν και μπορεί να πετύχει υψηλότερα επίπεδα στο ενδομήτριο, γίνεται συμπληρωματικά ως προς την συστηματική χορήγηση [122].

### 3.7 Ο ρόλος των miRNAs

Τα micro ή mi-RNAs είναι μικρά μόρια του RNA (μήκους 18-22 νουκλεοτίδια) που δεν κωδικοποιούνται αλλά ρυθμίζουν γονιδιακά την έκφραση της μεταγραφικής σίγασης των γονιδίων. Επιτελούν τη δράση τους μετά την προσκόλληση στη 3' περιοχή των mRNA στόχων, η οποία μάλιστα μένει αμετάφραστη. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η μετάφραση, προωθείται η αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων και τελικά ορισμένα γονίδια αποσιωπούνται. Η ρύθμιση αυτή, μέσω των miRNAs γίνεται σε περισσότερο από 69% των γονιδίων που έχουν ως τελικά προϊόντα πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ωρίμανση, απόπτωση, διαφοροποίηση και καρκινογένεση. Επίσης, πολλά από τα miRNAs τα οποία διαμεσολαβούν στην επικοινωνία ωοκυττάρου-κοκκιωδών κυττάρων, συμβάλλουν με τον τρόπο αυτό στην ωοθηκική λειτουργία. Για παράδειγμα το miR873, διαδραματίζει αξιόλογο ρόλο στην επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Esteller et al., 2011).

Και στην περίπτωση αυτή, η πλειοψηφία των δεδομένων σχετικά με τη σημασία των miRNAs στην λειτουργία των ωοθηκών προέρχονται από πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Για παράδειγμα, τα ποντίκια με καθολική έλλειψη των γονιδίων Droscha και Dicer (εμπλέκονται στην δημιουργία των ώριμων miRNA και είναι μέλη της οικογένειας της RNA πολυμεράσης III) οδηγούνται σε πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο, γεγονός που πιστοποιεί τον σημαντικό ρόλο των miRNA στην ανάπτυξη. Επιπλέον, η απενεργοποίηση της RNAσής Dicer σε ωοκύτταρα πρόφασης I εμβρυϊκής ωοθήκης επιφέρει διαταραχές στην ωοθυλακιογένεση, υπογονιμότητα και ΠΩΑ. Αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπινους ιστούς δεν έχουν γίνει, ωστόσο υπάρχει μια πρόσφατη μελέτη που αναφέρει ότι σε ασθενείς με ΠΩΑ βρέθηκε αυξημένη πιθανότητα πολυμορφισμού του rs2257082 στο XPO5, που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των miRNA εκτός πυρήνα [93].

Σε μελέτες που αφορούν την έκφραση miRNA στο πλάσμα ασθενών με ΠΩΑ έχουν ανακαλυφθεί διαφορετικά πρότυπα έκφρασης, άλλα περισσότερο και άλλα λιγότερο αυξημένα. Με τα παθογενετικά αίτια της ΠΩΑ έχουν συσχετιστεί τα miR-608, miR-423, miR-290-296, miR-196a, miR-146a, miR-22-3p, miR-27a. Το miR 27a αυξάνει την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων μέσω αρνητικής ρύθμισης της πρωτεΐνης XIAP (X-linked inhibitor protein of apoptosis), ενώ αυξάνει και τη ενεργότητα του ενζύμου κασπάση 3, που δημιουργεί απόπτωση. Επίσης, σε ζωικά μοντέλα και πιο συγκεκριμένα σε ποντίκια, η εισαγωγή αλληλουχίας παρόμοιας με αυτή του miR-27a μέσα στο κοκκιώδη κύτταρά τους οδηγεί σε μείωση του βαθμού ωρίμανσης των ωοκυττάρων, γεγονός που δείχνει ότι το συγκεκριμένο miRNA οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων στοχεύοντας στο SMAD5 που κατόπιν ενεργοποιεί το μονοπάτι FasL-Fas. Επιπλέον, σε γυναίκες με ΠΩΑ αυξάνεται η έκφραση του miR-146a, στο πλάσμα και στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης ΠΩΑ αυξάνεται σε περίπτωση σύνδεσης των miR196a2T και miR146aG [19].

### 3.8 Φυλοσύνδετα γονίδια

Το γονίδιο του εύθραυστου X, είναι μια φυλοσύνδετη διαταραχή στο χρωμόσωμα X, η οποία έχει σύνθετο γενετικό υπόβαθρο και αποτελεί το πιο συχνό νόσημα που κληρονομείται γενετικά και προκαλεί νοητική υστέρηση. Ο επιπολασμός της νόσου είναι 1/4000 στους άντρες και 1/8000 στις γυναίκες. Η πάθηση προκαλείται από μια μετάλλαξη του γονιδίου FMR1 στο χρωμόσωμα Xq27.3 στο μακρύ σκέλος του X χρωμοσώματος και μάλιστα στην περιοχή FRAXA. Τα φυσιολογικά άτομα, στη συγκεκριμένη περιοχή έχουν λιγότερες από 40 επαναλήψεις της αλληλουχίας CGG, ενώ αντίθετα, τα άτομα με 55-200 επαναλήψεις χαρακτηρίζονται ότι έχουν προμετάλλαξη. Ασθενείς που έχουν την αλληλουχία σε συχνότητα μεγαλύτερη των 200 επαναλήψεων έχουν πλήρη μετάλλαξη και εκδηλώνουν το σύνδρομο. Η προμετάλλαξη έχει την ιδιότητα ότι μπορεί να εξελιχτεί σε πλήρη μετάλλαξη μετά το πέρας μιας γενιάς [8].

#### 3.8.1 Γονίδιο FMR1

Η ΠΩΑ αναπτύσσεται περίπου στο 1/3 των γυναικών που έχουν την προμετάλλαξη FMR1, ενώ στο υπόλοιπο ποσοστό εμφανίζονται συμπτώματα ωθηκικής γήρανσης με τον καταμήνιο κύκλο να παραμένει σταθερός. Ο μηχανισμός ανάπτυξης ΠΩΑ στις γυναίκες με FMR1 δεν έχει διευκρινιστεί επακριβώς αλλά πιθανόν να οφείλεται σε μείωση των ωοθυλακίων που βρίσκονται στην δεξαμενή αρχέγονων ωοθυλακίων ή σε επίσπευση της ατρησίας τους. Μια ακόμη θεωρία προσπαθεί να εξηγήσει το γεγονός μέσω της τοξικής δράσης του mRNA που βρίσκεται σε περίσσεια. Η αύξηση των επιπέδων mRNA μπορεί να οδηγήσει σε δέσμευση των ριβοσωμάτων και ανεπάρκειά τους στις απαραίτητες κυτταρικές διεργασίες. Η δράση αυτή μπορεί να επιφέρει επίσπευση της ατρησίας και απόπτωση των ωοθυλακίων [4].

#### 3.8.2 Γονίδιο FMR2

Το γονίδιο FMR2, βρίσκεται στη θέση Xq28 του μακρού σκέλους του X χρωμοσώματος και έχει απόσταση 600 βάσεων περίπου από το FMR1. Όπως και το FMR1 έχει και αυτό μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία CCG στο εξόνιο 1 και συναντώνται περιπτώσεις με προμετάλλαξη και πλήρη μετάλλαξη. Υπάρχουν ελλείμματα του γονιδίου σε γυναίκες αλλά και σε άντρες, ενώ τέτοια ελλείμματα έχουν ανιχνευθεί και σε γυναίκες με ΠΩΑ. Υπάρχουν όμως μελέτες που δεν συσχετίζουν τις



ελλείψεις FMR2 με την ΠΩΑ, επομένως δεν έχει διευκρινιστεί η ακριβής λειτουργία του. [4]

Σχετικά με το γονίδιο BMP15 (Bone Morphogenetic protein 15) αυτό βρίσκεται στη θέση XP1.2 στο βραχύ σκέλος του X χρωμοσώματος. Η παραγόμενη πρωτεΐνη BMP15 είναι μέλος την οικογένειας των TGF αυξητικών παραγόντων και έχει ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες κατά την εμβρυϊκή εξέλιξη, αλλά και κατά την έκφραση των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη BMP15 αναστέλλει την έκφραση του FSH receptor στα κοκκώδη κύτταρα και επομένως και στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων που εξαρτώνται από την FSH. Επιπλέον, αναστέλλει την παραγωγή της προγεστερόνης που εξαρτάται από την FSH και προλαμβάνει την ανεπιθύμητη και πρόωμη ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων. Η απώλεια της δράσης της BMP15 επιφέρει πρόωμη ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων με ένα τρόπο που εξαρτάται από τη δράση [97]. Στον άνθρωπο η πρώτη συσχέτιση του BMP15 με την ΠΩΑ έγινε από τη μελέτη των Di Pasquale et al., οι οποίοι παρουσίασαν την μετάλλαξη του γονιδίου p.Y235C. Έχουν ανιχνευτεί και επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης σε γυναίκες κινεζικής, καυκάσιας και ινδικής καταγωγής οι οποίες πάσχουν από σύνδρομο ΠΩΑ. Η συχνότητα των μεταλλάξεων μπορεί να διακυμαίνεται μεταξύ του 1.5-15% ενώ πολλές από τις μεταλλάξεις αυτές δεν έχουν κάποια έκφραση στο φαινότυπο αλλά εμφανίζονται σε μορφή ετερόζυγη και αφορούν μια προ-πρωτεϊνική περιοχή που καθυστερεί τον πλήρη σχηματισμό και ωρίμανσή της με αποτέλεσμα τη μείωση της βιολογικής δράσης της. Μία από τις μεταλλάξεις φαινοτυπικής έκφρασης (pA180T), αποτελεί πολυμορφισμό του γονιδίου και όχι πραγματική μετάλλαξη διότι ανιχνεύεται και σε υγιείς γυναίκες. Επομένως χρήζει ιδιαίτερης προσοχής η ερμηνεία των ευρημάτων στο γονίδιο της πρωτεΐνης λόγω της πιθανότητας εσφαλμένης εμπειρίας μη λειτουργικών πολυμορφισμών ως μεταλλάξεις [85].

Το γονίδιο του Androgen receptor (AR) βρίσκεται στη θέση Xq12 του μακρού σκέλους του X χρωμοσώματος και κωδικοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση του φύλου καθώς επίσης και στην αναπαραγωγή. Στην περίπτωση της ωοθήκης, το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται στα ωοθυλάκια που αναπτύσσονται και σε μεγαλύτερο ποσοστό στα κοκκώδη κύτταρα. Ο ρόλος του γονιδίου στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και η πιθανότητα να εμπλέκεται στην ΠΩΑ, αξιολογήθηκε και σε αυτή την περίπτωση σε μοντέλα ζώων. Οι μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει μια συσχέτιση ανάμεσα στην επανάληψη της αλληλουχίας των τριών νουκλεοτιδίων CAG στο εξόνιο 1 του AR και με την εμφάνιση ΠΩΑ. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά είναι περιορισμένα και δεν μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως ο ρόλος του AR στην ΠΩΑ.

Αντίστοιχα, το γονίδιο FOXO4 βρίσκεται στη θέση X;13.1 στο μακρύ, επίσης σκέλος του χρωμοσώματος X και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της τάξης O και της οικογένειας Forkhead Transcription Factor. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο στα κοκκώδη κύτταρα και συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/Cdkn1b πράγμα που σημαίνει ότι παίζει κάποιο

ρόλο στη φυσιολογία της ωοθήκης. Σε μια πρόσφατη έρευνα σε γυναίκες με ΠΩΑ από την Ινδονησία, βρέθηκε ένας μόνο πολυμορφισμός στο γονίδιο αυτό, ο IVS2+41T κάτι που δεν μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι σημαντική αιτία της ΠΩΑ [134].

### 3.9 Ανωμαλίες του X φυλετικού χρωμοσώματος

Το σύνδρομο Turner αποτελεί μια από τις συχνότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στους ανθρώπους, ενώ η συχνότητα εμφάνισής του είναι περίπου 1.5% στο σύνολο των συλλήψεων, περίπου 10% στις αυτόματες αποβολές και 1/2500 στις γεννήσεις γυναικών. Ο χαρακτηριστικός γενότυπος ενός ατόμου που πάσχει από σύνδρομο Turner είναι η μερική ή η ολική έλλειψη ενός φυλετικού χρωμοσώματος X, ωστόσο τα άτομα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις δύναται να εμφανίσουν μωσαϊκισμό με φυσιολογική κυτταρική σειρά 45,X/46,XX και ενδιάμεσο φαινότυπο. Σε ένα μικρό ποσοστό ατόμων που φέρουν τη συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία (περίπου 5-10%) έχει βρεθεί και μωσαϊκισμός σε μια δεύτερη κυτταρική σειρά η οποία περιέχει και ένα Y χρωμόσωμα. Η κατηγορία αυτή των ασθενών έχει περίπου 45% πιθανότητες να αναπτύξουν γοναδοβλάστωμα [36]. Τα κυριότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου αναφέρονται παρακάτω: χαμηλό ανάστημα (95-100%), δυσγενεσία γονάδων (85%), χαρακτηριστικά στίγματα (ασπιδοειδής θώρακας, αυχενικό περύγιο, λεμφοίδημα, βλαιοσί αγκώνες, πτώση βλεφάρων), συγγενείς ανωμαλίες εσωτερικών οργάνων (μεσοκοιλιακή επικοινωνία, στένωση του ισθμού της αορτής, διπλοί ουρητήρες, πεταλοειδής νεφρός), ορμονικές διαταραχές (αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα) [36].

Στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Turner, οι ωοθήκες τους αποτελούνται από μια μικρή ποσότητα συνδετικού ιστού καθώς επίσης και ελάχιστα ωοθυλάκια που έχουν υποστεί ατρησία. Ο φαινότυπος ποικίλει ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται πρωτοπαθής αμηνόρροια, σε άλλες περιπτώσεις αναπτύσσονται φυσιολογικά και σε μετέπειτα χρονικό σημείο παρουσιάζουν δευτεροπαθή αμηνόρροια [7].

Ο αρχικός αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων στους ασθενείς με σύνδρομο Turner είναι φυσιολογικός μέχρι την 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης αλλά μετά υπάρχει ανεπάρκεια πολλών γονιδίων στο X χρωμόσωμα που οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των ωοθυλακίων ώστε μέχρι το 10<sup>ο</sup> έτος της ζωής να υπάρχει πλήρης εξάντληση. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός ανάπτυξης της ΠΩΑ είναι η επιταχυνόμενη ατρησία στα αρχέγονα ωοθυλάκια και όχι ο μη φυσιολογικός σχηματισμός τους. Αμφότερα τα δύο σκέλη του χρωμοσώματος X έχουν γονίδια που είναι σημαντικά για τη λειτουργία των ωοθηκών. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές τα ελλείμματα που παρατηρούνται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X είναι και αυτά που είναι υπεύθυνα για τον πλήρη φαινότυπο στο σύνδρομο

Turner. Επιπλέον, υπάρχουν και περιπτώσεις ελλειμμάτων του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος που σχετίζονται με την ΠΩΑ και συνδέονται με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή αμηνόρροια, απουσία δυσμορφικών χαρακτηριστικών και χαμηλό ανάστημα [92].

### 3.9.1 Τρισωμία στο X χρωμόσωμα

Η τρισωμία στο χρωμόσωμα X (47,XXX) χαρακτηρίζεται από την παρουσία ακόμη ενός φυλετικού χρωμοσώματος X σε κάθε κύτταρο. Η τρισωμία είναι η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στις γυναίκες με τη συχνότητα στο γενικό πληθυσμό να φτάνει το 1:1000 στις γεννήσεις γυναικών. Η τρισωμία προκαλείται από την αδυναμία διαχωρισμού των φυλετικών χρωμοσωμάτων κατά την ωογένεση και τελικά η χρωμοσωμική μεταβολή προέρχεται στις περισσότερες περιπτώσεις από τη μητέρα. Τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι τα εξής: υψηλό ανάστημα (80<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση κατά την εφηβεία) μικροκεφαλία (μέση τιμή περιμέτρου κεφαλής μεταξύ 25<sup>ης</sup> και 35<sup>ης</sup> εκατοστιαίας θέσης), κλινοδακτυλία και μυϊκή δυστροφία. Ορισμένοι από τους ασθενείς εμφανίζουν επίσης συγγενείς ανωμαλίες στο γεννητικό και ουροποιητικό σύστημα, καθυστέρηση στην ανάπτυξη ψυχολογικών και κοινωνικών δεξιοτήτων, επιληπτικές κρίσεις νοητική υστέρηση και αισθησιοκινητικές αναπηρίες. Η πλειοψηφία των ατόμων έχουν πολύ ήπια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ή είναι τελείως ασυμπτωματικά και μόνο το 10% των ασθενών περίπου διαγιγνώσκεται με το σύνδρομο συνήθως κατά τον προγεννητικό έλεγχο.

Στις γυναίκες με τρισωμία X δε διαταράσσεται η λειτουργία των ωοθηκών, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζεται ολιγομηνόρροια και ΠΩΑ ή πρώιμη εμμηνόπαυση. Η συχνότητα της ΠΩΑ σε γυναίκες με καρυότυπο 47,XXX δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς. Ο μηχανισμός ο οποίος προκαλεί τελικά την ωοθηκική ανεπάρκεια δεν είναι πλήρως γνωστός ενώ εικάζεται ότι μπορεί να προκύψει από τις αλλαγές που επιτελούνται στη μείωση λόγω της ύπαρξης ενός επιπλέον X χρωμοσώματος ή εξαιτίας της υπερέκφρασης σειράς γονιδίων που ξεφεύγουν από την απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος. Οι γυναίκες που έχουν τρισωμία X έχουν πρόωρη ενεργοποίηση στον άξονα υποθάλαμο, υπόφυση, γονάδες, ενώ έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις FSH, μειωμένες τιμές ινχιπίνης Β, οιστραδιόλης E2, υψηλότερες συγκεντρώσεις LH ορού και μειωμένη ποσότητα ωοθηκών. Οι συγκεκριμένες διαταραχές θεωρείται ότι είναι πολύ πιθανόν να εμπλέκονται στη διαταραγμένη λειτουργία των γονάδων [110]. Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια τόσο ως προς την γονιμότητα αλλά και ως προς τη φαινοτυπική εικόνα των προσβεβλημένων γυναικών. Ασθενείς που έχουν μωσαϊκισμό, εμφανίζουν ηπιότερη εκδήλωση του συνδρόμου και διαφορές στην ωοθηκική λειτουργία. Κατά πάσα πιθανότητα, στον μωσαϊκισμό, η παρουσία των κυττάρων 47,XXX λειτουργεί ως προστασία για την διατήρηση της ωοθηκικής δραστηριότητας [110].

### 3.9.2 Δομικές ανωμαλίες στο X χρωμόσωμα.

Τα γονίδια που περιέχονται τόσο στο βραχύ όσο και στο μακρύ σκέλος του X χρωμοσώματος περιέχουν μια σειρά από γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία των ωοθηκών. Σημαντική είναι επίσης και η περιοχή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος X που είναι ανάμεσα στις περιοχές Xq13.3-Xq27 και η οποία μπορεί να διαχωριστεί στις επιμέρους λειτουργικές περιοχές Xq13.3-Xq21.1 (POF2) και Xq23-q27(POF1).

Οι δομικές αναδιατάξεις του χρωμοσώματος στις συγκεκριμένες περιοχές αναγνωρίζονται σαν αίτια της ΠΩΑ (ελλείμματα, αναδιπλασιασμοί, αναστροφές, χ-αυτοσωμικές αμοιβαίες μετατοπίσεις). Η περιοχή POF2 εμπλέκεται συνήθως σε αμοιβαίες μετατοπίσεις που οδηγούν αρχικά σε ΠΩΑ σε νεαρά κορίτσια (16-21 ετών). Αντίθετα, η περιοχή POF συμμετέχει συχνότερα με ενδιάμεσα ελλείμματα τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση ΠΩΑ σε μεγαλύτερη ηλικία (24-38 έτη). Ο επικρατέστερος μηχανισμός εμφάνισης ΠΩΑ από αυτούς που έχουν προταθεί μέχρι τώρα, είναι οι μεταβολές στη γενετική θέση που επηρεάζει την έκφραση φυλοσύνδετων και αυτοσωμικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την διακοπή της έκφρασής τους. Ιδιαίτερη περίπτωση είναι επίσης και η περιοχή POF1 που έχει αρκετά υποψήφια γονίδια αλλά και το φαινόμενο της γενετικής θέσης που επηρεάζει τα γονίδια αυτά. Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός ο οποίος προκαλεί την ΠΩΑ είναι το λάθος ζευγάρι των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, το οποίο είναι δυνατόν να αναγνωριστεί από τα σημεία ελέγχου και να οδηγήσει τελικά σε αυξημένη απόπτωση των ωοκυττάρων [78] [95].

Οι ακριβείς μηχανισμοί δεν παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο, ωστόσο τα ελλείμματα σε κεντρικές περιοχές στο χρωμόσωμα X, οδηγούν κυρίως σε πλήρη δυσγενεσία των γονάδων ή ΠΩΑ με τη μορφή δευτεροπαθούς αμηνόρροιας, ενώ στην περίπτωση των αντίθετων ελλειμμάτων, ειδικά σε απομακρυσμένες περιοχές, έχουμε διατήρηση της ωοθηκικής λειτουργίας τουλάχιστον μέχρι σε έναν βαθμό. Το 50% περίπου των ατόμων που παρουσιάζουν ελλείμματα στη θέση Xp11 του βραχέους σκέλους εμφανίζει πρωτοπαθή αμηνόρροια, ενώ το υπόλοιπο 50% εμφανίζει δευτεροπαθή αμηνόρροια. Επιπλέον, τυχόν ελλείμματα στη θέση Xq13 έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη δυσγενεσία των γονάδων και την απουσία ανάπτυξης των μαστών. Σε ελλείμματα σε πιο απομακρυσμένες θέσεις υπάρχει φαινότυπος που παραπέμπει σε ΠΩΑ. Όσο πιο απομακρυσμένη είναι η θέση στην οποία εμφανίζονται τα ελλείμματα τόσο πιο ήπιος είναι ο φαινότυπος [107].

Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται μέσω αναδιατάξεων ή μειωμένης έκφρασης στην εμφάνιση ΠΩΑ είναι τα εξής:

- **DIAPH2**
- **XPXNPEP2**
- **DACH2**
- **POF1B**
- **CHM**
- **PGRMC1**
- **COL4A6**
- **NXF5**

Υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες οι οποίες έχουν αναδείξει μια σειρά από αναδιατάξεις στον γονιδίον αυτών σε γυναίκες με ΠΩΑ [64].

### **3.10 Συγγενής διαταραχή της γλυκοζυλίωσης τύπου Ia (CDG-Ia)**

Οι συγγενείς διαταραχές της γλυκοζυλίωσης είναι μια ομάδα σπάνιων και πολυσυστηματικών διαταραχών οι οποίες χαρακτηρίζονται από δυσμορφικές καταστάσεις, επιληπτικές κρίσεις, καρδιακές δυσλειτουργίες, καθυστέρηση της ανάπτυξης, ηπατική ίνωση, διαταραχές πήξης του αίματος και αιμοσφαιρινοπάθειες. Η αιτιολογία του συνδρόμου αυτού είναι η αδυναμία μετατροπής της 6 φωσφορικής μανόζης στην 1 φωσφορική μανόζη που είναι απαραίτητη στη δημιουργία γλυκοπρωτεϊνών.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση δημιουργούνται διάφορες νευρολογικές επιπλοκές αλλά και ΠΩΑ. Το σύνδρομο IO (CDG-Ia) έχει αιτιολογία την παρανοηματική μετάλλαξη του γονιδίου PMM2, το οποίο βρίσκεται στη θέση p13 του χρωμοσώματος 16 και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο [6].

### **3.11 Γαλακτοζαιμία**

Η γαλακτοζαιμία είναι μια σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων η οποία συμβαίνει σε σπάνιες περιπτώσεις και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η συχνότητα ανέρχεται περίπου σε 1 ανά 60.000 γεννήσεις και υπάρχει διαφοροποίηση γεωγραφικά (1/30000-1/40000 στην Ευρώπη,

1/1.000.000 στην Ιαπωνία). Η αιτιολογία της νόσου είναι η έλλειψη τριών διαφορετικών ενζύμων που έχουν ως συνέπεια την εμφάνιση τριών διαφορετικών φαινοτύπων: Ανεπάρκεια του ενζύμου GALT (ουριδυλο-τρανσφεράση της 1-φωσφορικής γλυκόζης).

Η πλήρης απαλοιφή του ενζύμου είναι η σοβαρότερη διαταραχή της νόσου. Είναι πιθανόν να προκαλέσει διαταραχές στην ηπατική και νεφρική λειτουργία και εμφάνιση οφθαλμικών διαταραχών (καταρράκτης) και διαταραχές στην ηπατική και νεφρική λειτουργία. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης ΠΩΑ και νευροαναπτυξιακών διαταραχών. Η μερική ανεπάρκεια μπορεί να διατηρήσει εν μέρει τη λειτουργία του ενζύμου και την εμφάνιση παραλλαγών της νόσου (παραλλαγή Duarte). Στην περίπτωση που οι ασθενείς έχουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο και ένα αλληλόμορφο Duarte (D/G) η ενεργότητα του ενζύμου φτάνει το 5-25% ενώ σε ασθενείς με δύο αλληλόμορφα Duarte, η ενεργότητα του ενζύμου φτάνει περίπου στο 25% της φυσιολογικής. Σε περίπτωση που η ενζυμική ενεργότητα είναι περισσότερη από το 50% της φυσιολογικής, ο φαινότυπος είναι αρκετά ήπιος και υπάρχουν ελάχιστες μακροπρόθεσμες επιπλοκές [55].

Ανεπάρκεια του ενζύμου GALK (γαλακτοκινάση) που είναι το πρωταρχικό ένζυμο στο βιοχημικό μονοπάτι του μεταβολισμού της γλυκόζης με κύρια λειτουργία τη μετατροπή της γαλακτόζης σε 1-φωσφορική γαλακτόζη. Η ανεπάρκεια του GALK έχει μία μόνο επιπλοκή, την ανάπτυξη καταρράκτη. Ανεπάρκεια του ενζύμου GALE (ουριδυνο-διφωσφο-γαλακτόζη-4-επιμεράση). Η βασικότερη λειτουργία του GALE είναι η μετατροπή της ουριδυνο-διφωσφο-γαλακτόζης σε ουριδυνο-διφωσφο-γλυκόζη. Στην πλειοψηφία των ασθενών, η ανεπάρκεια αυτή προκαλεί βλάβη μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια, όμως σε αντίθετη περίπτωση η εικόνα είναι παρόμοια με αυτή της τυπικής γαλακτοζαιμίας. Οι ασθενείς με γαλακτοζαιμία έχουν αυξημένα ποσοστά ανάπτυξης ΠΩΑ, είτε με πρωτοπαθή είτε με δευτεροπαθή αμηνόρροια.

Ωστόσο, δεν είναι σίγουρο ότι όλοι οι ασθενείς με γαλακτοζαιμία θα αναπτύξουν το φαινότυπο ΠΩΑ. Ο κύριος μηχανισμός ανάπτυξης ΠΩΑ σε γυναίκες με γαλακτοζαιμία είναι η τοξική επίδραση των μεγάλων ποσοτήτων μεταβολιτών της γαλακτόζης που συσσωρεύονται στις ωοθήκες. Αυτό οδηγεί σε διαταραχές της ωοθυλακιογένεσης, έχει αυξανόμενη αντίσταση στην δράση των γοναδοτροπινών και επιταχύνει την ωοθυλακική ατρησία. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται από την ανεύρεση φυσιολογικών ωοθηκών, τουλάχιστον ιστολογικά, σε νεογνά ποντίκια με γαλακτοζαιμία [28].

### 3.12 Σύνδρομο πολλαπλής συνοστέωσης (SYNS1) και εγγύς συμφαλαγγισμού (SYM1).

Στο σύνδρομο πολλαπλής συνοστέωσης και εγγύς συμφαλαγγισμού εμπλέκεται το γονίδιο NOG, το οποίο κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο που ενώνεται και απενεργοποιεί μέλη της οικογένειας των TGF-β πρωτεϊνών. Η τοποθεσία του γονιδίου είναι στη θέση q22 του χρωμοσώματος 17 και η έκφρασή του ανιχνεύεται σε πολλούς ιστούς καθώς και στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Οι μεταλλάξεις του NOG συμβάλλουν στην εμφάνιση συνδρόμου πολλαπλής συνοστέωσης (SYNS1) και στο σύνδρομο συμφαλαγγισμού (proximal symphalangism–SYM1).

Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι μια ετερόζυγη μετάλλαξη, η pE48K εντοπίζεται σε γυναίκες με SYM και ΠΩΑ. Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα σε 100 ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ΠΩΑ υπάρχει μια ετερόζυγη μετάλλαξη η pG92E, γεγονός που δείχνει ότι δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση ανάμεσα σε όλες τις μεταλλάξεις του γονιδίου NOG και την ΠΩΑ [62], [65].

### 3.13 Σύνδρομο Perrault

Το σύνδρομο Perrault είναι γενετική διαταραχή η οποία μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και ένα από τα χαρακτηριστικά των ασθενών που την εμφανίζουν είναι η ΠΩΑ καθώς και άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως οι νευρολογικές επιπλοκές και στα δύο φύλα και η επιδεινούμενη νευροαισθητήρια βαρικοΐα. Τα γονίδια τα οποία ευθύνονται για το σύνδρομο ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και η πλειοψηφία τους είναι γονίδια των μιτοχονδρίων τα οποία κωδικοποιούν tRNA συνθετάσες, πριμάσες, ελικάσες ή πρωτεάσες. Οι μεταλλάξεις οι οποίες ανιχνεύονται σε μιτοχονδριακά γονίδια γενικότερα, επιδεινώνουν το οξειδωτικό στρες και εν συνεχεία διεγείρουν την απόπτωση, επιταχύνοντας με τον τρόπο αυτό την απώλεια των ωοθυλακίων.

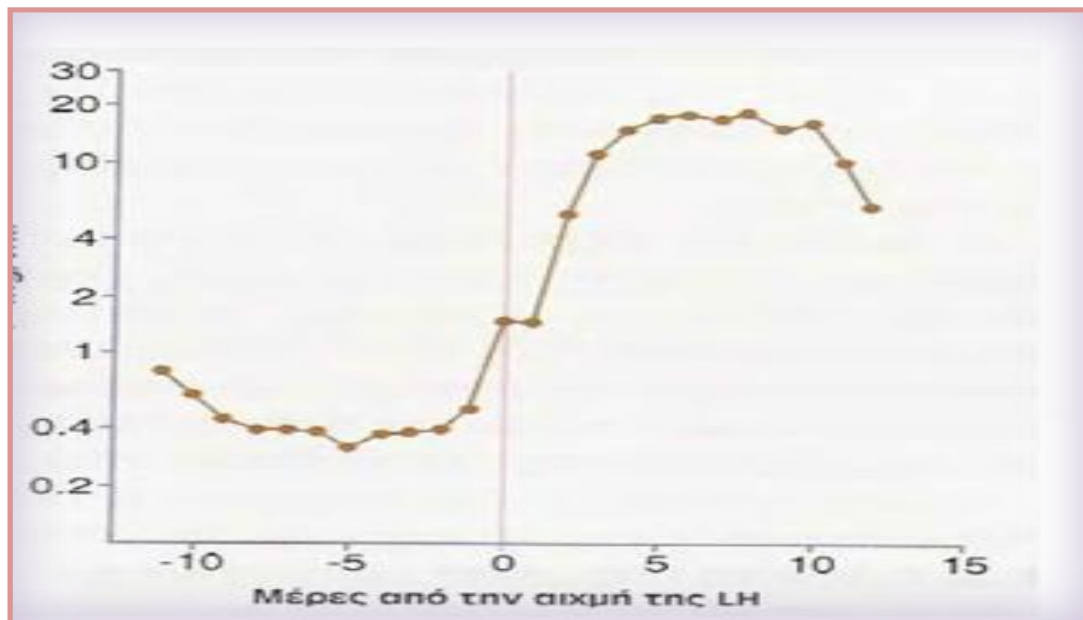
Οι έρευνες αυτές έχουν δείξει ότι γυναίκες που πάσχουν από ΠΩΑ, έχουν ποσοτική μείωση του μιτοχονδριακού DNA των ωοκυττάρων αλλά και σε κύτταρα του αίματος. Μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ανιχνευθεί σε γυναίκες ΠΩΑ οι οποίες είχαν διαγνωστεί με σύνδρομο Perrault είναι οι ομόζυγη μετάλλαξη c.1565>A (p.T522N), οι ετερόζυγες μεταλλάξεις c.1077delT και c.1886C>T (p.Y629M) στο γονίδιο LARS2, οι ετερόζυγες μεταλλάξεις c598C>T (p.T629M) και c.1102G>T (p.V368L) στο γονίδιο HARS2, οι ομόζυγες μεταλλάξεις c.433A>C (π.T1145P) στο γονίδιο CLPP και οι ετερόζυγες μεταλλάξεις p.R391H, p.N585S, W441G και p.V507I στο γονίδιο C10orf2 (θέση 10q24) [89], [90]

## Ο ρόλος της Προγεστερόνης στο Αναπαραγωγικό Σύστημα της Γυναίκας

### 4.1 Βιοχημεία ορμονών και έκκριση προγεστερόνης

Η προγεστερόνη είναι η δεύτερη πιο σημαντική ουσία η οποία εκκρίνεται από τις ωοθήκες. Αντίθετα με τα οιστρογόνα, α οποία εκκρίνονται σε όλη τη διάρκεια του εμμηνορρησιακού κύκλου, η προγεστερόνη παράγεται κυρίως κατά την εκκριτική φάση, και για το λόγο αυτό αποτελεί και έναν δείκτη εκκριτικής ικανότητας του ωχρού σωματιδίου αλλά και της ωορρηξία γενικότερα (Εικόνα 22) [9].

Η έκκριση της προγεστερόνης ξεκινάει λίγο πριν την ωορρηξία από τα κύτταρα του ωοθυλακίου που βρίσκονται στη διαδικασία της ωχρινοποίησης. Μετά το σχηματισμό του ωχρού σωματίου, η προγεστερόνη παράγεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις που φτάνουν τα 15-30 mg ημερησίως σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ωχρού σωματίου. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της ορμόνης παρατηρείται κατά την ωορρηξία. Η συνολική ποσότητα της ορμόνης στο αίμα δεν είναι μεγάλη διότι έχει μικρή ημίσεια ζωή, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύονται στην κυκλοφορία οι μεταβολίτες της. Η προγεστερόνη μεταφέρεται στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας και το μεγαλύτερο ποσό της ορμόνης ανιχνεύεται στο λιπώδη ιστό [9].

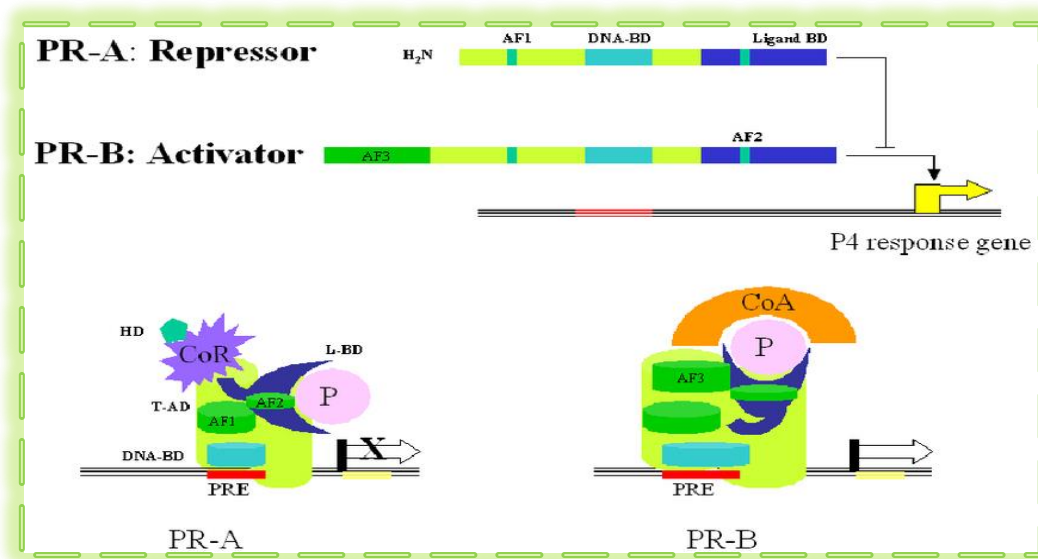


Εικ.26 Καμπύλη της συγκέντρωσης της προγεστερόνης στο αίμα κατά τη διάρκεια του εμμηνορρησιακού κύκλου. Υπάρχει αύξηση της έκκρισης στην 2<sup>η</sup> φάση (ωχρινική).



## 4.2 Μηχανισμός δράσης της προγεστερόνης

Ο υποδοχέας της προγεστερόνης προωθείται αρχικά από τα οιστρογόνα σε επίπεδο μεταγραφής και μειώνεται από τα προγεσταγόνα κατά τη μετάφραση. Οι υποδοχείς της προγεστερόνης διακρίνονται σε δύο τύπους: τους A και B υποδοχείς και οι δύο αυτοί τύποι εκφράζονται από το ίδιο γονίδιο αλλά προκύπτουν από μετάφραση δύο διαφορετικών mRNA που μεταγράφουν διαφορετικές περιοχές αυτού του γονιδίου. Ο κάθε τύπος συνδέεται με πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση του πολυπεπτιδίου σε μια δομή που επιτρέπει τη σύνθεση με ορμόνες και την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η μεταγραφή των μορφών αυτών ρυθμίζεται από δύο διαφορετικούς προωθητές, οι οποίοι ενεργοποιούνται παρουσία οιστρογόνων. Οι αγωνιστές της προγεστερόνης εξουδετερώνουν την ανασταλτική δράση που διαθέτει το καρβοξυτελικό της άκρο και με τον τρόπο αυτό επιτελείται η μεταγραφή του μορίου της. Αντίθετα, οι ανταγωνιστές της προκαλούν μέσω της δομικής αλλαγής της, αύξηση της ανασταλτικής δράσης της και επομένως αναστολή της μεταγραφής. Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι οι δύο υποδοχείς της προγεστερόνης έχουν την ικανότητα ανεξάρτητης ρύθμισης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα ότι τα επίπεδά τους στο ενδομήτριο διαφέρουν κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Η εξειδίκευση των ιστών σε σχέση με την προγεστερόνη επηρεάζεται από το ποιος υποδοχέας και πιο διμερές είναι ενεργά ανά πάσα στιγμή. Στη μεγαλύτερη πλειοψηφία των κυττάρων είναι ενεργός ο υποδοχέας A, ο οποίος αναστέλλει με την ενεργοποίησή του τον υποδοχέα B. Πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι ο υποδοχέας A εμπλέκεται με τη ρύθμιση της δράσης όλων των στεροειδών ορμονών όπου μπορεί να εκφραστεί (Εικόνα 27) [44] [50].



Εικόνα 27. Υποδοχείς προγεστερόνης A και B.

### 4.3 Ο ρόλος της προγεστερόνης στον mTOR και στην εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου

Έχει βρεθεί ότι το μονοπάτι mTOR είναι σημαντικό για την εξέλιξη της ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Η προγεστερόνη έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσης της ροβισωμικής πρωτεΐνης S6 η οποία είναι στόχος της κινάσης mTORC1. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η προγεστερόνη δρα ανασταλτικά στην πορεία εξέλιξης του ωοθυλακίου μέσω της αναστολής του μονοπατιού mTOR.

Συγκεκριμένα η δράση της προγεστερόνης στην γονιδιακή έκφραση είναι πολύπλοκη, με άμεσες συνδέσεις DNA και μη δεσμευτικές λειτουργίες των υποδοχέων προγεστερόνης. Η σχέση της προγεστερόνης με το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR παρατηρείται κυρίως μέσω της δράσης της ορμόνης στα T-κύτταρα. Αν και η περιπλοκότητα της ρύθμισης καθιστά δύσκολη την εντόπιση της ακριβούς δράσης της προγεστερόνης στα T-κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι η οδός mTOR ρυθμίζεται αρνητικά από την προγεστερόνη. [146]

Όπως έχει αναφερθεί, η οδός mTOR αποτελείται από mTORC1 και mTORC2. Η κύρια λειτουργία του mTORC1 είναι η ενεργοποίηση της κινάσης p70 S6 κινάσης και της πρωτεΐνης 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) για τη ρύθμιση της μετάφρασης. Το Rheb είναι ένα βασικό μόριο του mTORC1 το οποίο το ενεργοποιεί [144]. Στα βοηθητικά κύτταρα T, το mTORC1 απαιτείται για την παραγωγή κυττάρων Th1 και Th17 και η καταστολή του ενισχύει την παραγωγή Tregs. Δεδομένα από τη μελέτη των Lee, Lydon και Kim (2012) υποδεικνύουν ότι η προγεστερόνη καταστέλλει τη σηματοδότηση mTORC1, και αυτό συνδέεται με την ενισχυμένη παραγωγή iTregs με προγεστερόνη.

Τα Tregs, ή αλλιώς κύτταρα FoxP3+T, είναι ένα εξειδικευμένο υποσύνολο των κυττάρων CD4+T με ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες. Τα Tregs παράγονται στον θύμο αδένα από τα προγονικά τους T-κύτταρα, ως φυσικά Tregs (nTregs) και από τα NAV κύτταρα, ως επαγόμενα Tregs (iTregs), στην περιφέρεια. Τα iTregs επάγονται στην περιφέρεια σε απόκριση σε διάφορα σήματα που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του TCR, τις κυτοκίνες IL2 και TGFβ1, συνδέτες υποδοχέων πυρηνικών ορμονών και άλλους ιστικούς παράγοντες. Τα Tregs δύναται να παράγουν TGFβ1, IL10 και/ή IL35, ενώ επίσης διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της ανοσιακής ανοχής για την πρόληψη αυτοάνοσων ή φλεγμονωδών ασθενειών. [145]

Πρόσθετα, η ίδια μελέτη απέδειξε ότι η ενισχυμένη έκφραση του Rheb μείωσε τη λειτουργία της προγεστερόνης στη διαφοροποίηση των T-κυττάρων. Επίσης παρείχαν πληροφορίες σχετικά με τους υποδοχείς που εμπλέκονται στην λειτουργία προγεστερόνης στη ρύθμιση των CD4 + T κυττάρων και ταυτοποίησαν μια οδό σηματοδότησης ρυθμιζόμενη από την ορμόνη. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν το ρόλο της προγεστερόνης στην προαγωγή της ανοσολογικής ανοχής και αναγνωρίζουν τη χρησιμότητα της στην παραγωγή του iTregs με υψηλά δυναμικά στη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών. [145]

Ο μηχανισμός που θεωρείται ότι βρίσκεται πίσω από τη σχέση της προγεστερόνης και των Tregs είναι η δυνατότητα της προγεστερόνης να επηρεάζει την παραγωγή των Tregs μέσω καταστολής της οδού mTOR. Παρατηρήθηκε ότι η προγεστερόνη μείωσε τη φωσφορυλίωση της ριβοσωματικής πρωτεΐνης S6, κύριο υπόστρωμα της κινάσης p70S6, που αποτελεί στόχο της κινάσης mTORC1. Πρόσθετα, πιθανολογείται και η ύπαρξη υποδοχέων προγεστερόνης σε αυτή την καταστολή. [145]

Σε μία δεύτερη *in vitro* έρευνα, στην οποία διενεργήθηκε μια ανάλυση έκφρασης γονιδίων των κυττάρων ULTR (immortalized myometrial cell line), επιλεγμένα γονίδια μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) υπέστησαν αγωγή με προγεστερόνη. Παρατηρήθηκε ότι η προγεστερόνη κατέστειλε σημαντικά ορισμένα «συστατικά κλειδιά» της οδού mTOR, επομένως απορρέει το συμπέρασμα ότι η προγεστερόνη δύναται να ρυθμίσει την έκφραση ορισμένων παραγόντων του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR στο ανθρώπινο μυομήτριο. [146]

#### **4.4 Επίδραση προγεστερόνης στο ανθρώπινο μυομήτριο.**

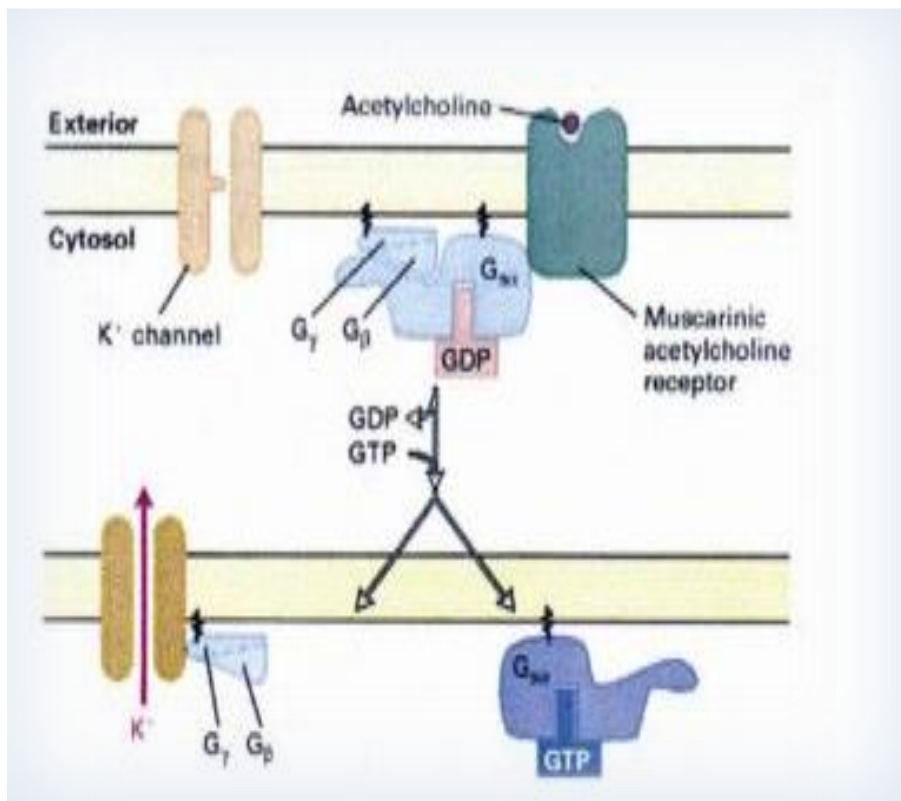
Η προγεστερόνη είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με την οιστραδιόλη μειώνει σημαντικά τον τόνο της συσταλτικής δραστηριότητας του μυομητρίου χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τη συχνότητα των αυτόματων συστολών του. Με την αύξηση της προγεστερόνης, αναστέλλεται η αύξηση του  $Ca^{++}$  στο εσωτερικό του κυττάρου και καταστέλλεται η ανταπόκριση της συστολής του μυομητρίου στο ερέθισμα που λαμβάνει από την προσταγλανδίνη [79].

Η επίδραση της προγεστερόνης στις λείες μυϊκές ίνες είναι πολλαπλή και πιο συγκεκριμένα μπορεί να προκαλέσει μείωση της συσταλτικής δράσης του μυομητρίου με γενομικές ή μη οδούς. Στις γενομικές οδούς ανήκει η δράση της προγεστερόνης στη συσταλτικότητα και η αναστολή ιόντων ασβεστίου μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι περισσότερες δράσεις όμως της προγεστερόνης είναι μέσω ειδικής σύνδεσης των ορμονικών υποδοχέων του πυρήνα με συγκεκριμένες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων. Τα γονίδια αυτά είναι η κονεξίνη 43 της οποίας η έκφραση μειώνεται και η μείωση της δεσμευτικής ικανότητας των υποδοχέων της οξυτοκίνης και τελικά την έκφραση της ιντρελευκίνης -8 στα κύτταρα που υπάρχουν στον τράχηλο και στο σώμα του ενδομητρίου [79].

Ο βιοχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλείται η δράση της προγεστερόνης στο μυομήτριο εμπλέκει τη μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης (απενεργοποιούνται τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια ασβεστίου) και η μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων  $Ca^{++}$ . Η σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της μεμβράνης του μυομητρίου έχει ως αποτέλεσμα μια σειρά από βιοχημικές

μεταβολές οι οποίες διαφοροποιούν την κυτταρική απάντηση στα σήματα που δέχονται εκτός κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τροποποιείται η έκφραση της των πρωτεϊνών G που συνδέονται με τους υποδοχείς της μεμβράνης αλλοιώνοντας έτσι τη λειτουργία τους [87].

Ακόμη υπάρχει ένας τρόπος δράσης της προγεστερόνης και αυτός είναι μέσω της προώθησης εισροής ιόντων  $Ca^{++}$  μετά από την εκπόλωση των κυττάρων ή την παρεμπόδιση της εξώθησης των ιόντων  $Ca^{++}$  από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό μέσω της μεμβράνης. Επιπλέον στο μυομήτριο, ανιχνεύονται κανάλια  $K^+$  τα οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις μεταβολές του  $Ca^{++}$  της κυτταρικής μεμβράνης. Η αύξηση της διέγερσης των καναλιών του  $K^+$  αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και οδηγεί τελικά σε δυναμικό ηρεμίας για το επίπεδο του  $K^+$  και την υπερπόλωση του κυττάρου που δέχτηκε το ερέθισμα (Εικόνα 28) [116].



Εικόνα 28. Η διέγερση των καναλιών  $K^+$  στην μεμβράνη των λείων μυϊκών κυττάρων. Με την σύνδεση της ακετυλοχολίνης ενεργοποιείται η G πρωτεΐνη και παράγονται τα β και γ σύμπλοκα που ενεργοποιούν τελικά τα κανάλια  $K^+$ . Η αύξηση της διαπερατότητας των καναλιών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και την άμβλυση της συσταλτικής δραστηριότητας.

***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## 5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η διατήρηση της αναπαραγωγικής ζωής μέσω αναστολή της διαδικασίας η οποία εξαντλεί το διαθέσιμο απόθεμα των ωοθυλακίων, αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη διάρκεια της γονιμότητας. Η ανάδειξη των παθογενετικών μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα και ως εκ τούτου το καίριο ερώτημα εάν μπορεί να επιτευχθεί η παύση των ωοθυλακίων και η εκ νέου ενεργοποίηση, αναγνωρίζεται ως το ζητούμενο και ο στόχος αυτού του ερευνητικού έργου. Η παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήγαγε και παρουσιάζει τρεις μελέτες: μια πειραματική μελέτη για την αναστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέσω της θεραπείας με εβερόλιμους και βεραπαμίλη, μια πειραματική μελέτη για την επίδραση της προγεστερόνης ή οιστραδιόλης ή συνδυασμού αυτών στην διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και τέλος μια συστηματική ανασκόπηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στην ΠΩΑ.

Η πρώτη πειραματική έρευνα πραγματοποιήθηκε σε θηλυκούς μύες και ανάλυσε την απόκριση των ωοθηκών μετά από την επίδραση φαρμακευτικών ουσιών για την καταστολή της ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Αξιολογήθηκαν τα ευρήματα από την ιστοπαθολογική εξέταση όπως ο αριθμός των αρχέγονων, πρωτογενών, δευτερογενών, ώριμων με άντρο, ωχρών σωματίων, άτρητων ωοθυλακίων και συνδυαστικά με τον ορμονικό έλεγχο και συγκεκριμένα τη μέτρηση της οιστραδιόλης, της προγεστερόνης, της θυλακιοτρόπου ορμόνης, της ωχρινοτρόπου ορμόνης και αντιμυλλέριου ορμόνης καθώς επίσης και με την επιπλέον διενέργεια πρωτεϊνικής ανάλυσης, επιχειρήθηκε στο τελικό σύνολο αυτών ένα συγκεντρωτικό αποτέλεσμα. Ακόμα μετρήθηκαν το βάρος και οι διάμετροι των ωοθηκών τόσο μετά την πρώτη φαρμακευτική παρέμβαση για καταστολή, όσο και μετά τη δεύτερη χορήγηση ουσιών για επανενεργοποίηση. Ο αυξημένος αποπτωτικός θάνατος των αρχέγονων ωοθυλακίων και τελικός η εξάντληση του αποθέματος αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας και των ασθενών που λαμβάνουν αντικαρκινική θεραπεία. Ο έλεγχος της ανάπτυξης του ωοθυλακίου μέσω της παύσης και της εκ νέου ενεργοποίησης συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της εξελικτικής πορείας και στη δυνατότητα πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Εν συνεχεία διενεργήθηκε μια δεύτερη εξ ολοκλήρου νέα πειραματική μελέτη η οποία εξέτασε την αύξηση της κατακράτησης των αρχέγονων ωοθυλακίων από την επίδραση της προγεστερόνης και την αντενέργεια της οιστραδιόλης ως συνακόλουθη δράση. Η επίπτωση αυτών των ορμονών και η συσχέτιση με τη διατήρηση του ωοθυλακικού αποθέματος ήταν το κεντρικό αντικείμενο της μελέτης. Η αξιολόγηση των ευρημάτων επίσης περιελάμβανε ορμονικό έλεγχο, ιστοπαθολογική εξέταση όπως και ανάλυση σε επίπεδο πρωτεϊνών.

Μετά το πέρας των πειραμάτων διεξήχθη και μια τρίτη μελέτη και συγκεκριμένα μία συστηματική ανασκόπηση εκείνων των πειραματικών μελετών που αναλύουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Αξιολογήθηκαν μοριακοί μηχανισμοί και η δράση αυτών στην εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου. Περιγράφηκαν λειτουργίες και άλλων κυττάρων όπως ωοκύτταρα, κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα της θήκης, αναδεικνύοντας επίσης ένα συγκεντρωτικό αποτέλεσμα.

## 6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.1 «Αναστολής της ωοθηλακικής ανάπτυξης σε αρχέγονο στάδιο χωρίς την αύξηση της απόπτωσης με συνδυασμό των Εβερόλιμους και βεραπαμίλη»

( **Pargianas et al.**, Δημοσίευση στο Molecular Biology Reports )

«Follicle inhibition at the primordial stage without increasing apoptosis, with a combination of everolimus, verapamil»

\*Corresponding author: Michail Pargianas, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece

An International Journal on Molecular and Cellular Biology, ISSN 0301-4851

Mol Biol Rep DOI 10.1007/s11033-020-05917-2

#### 6.1.1 Εισαγωγή

Η ενεργοποίηση και η απρησία των ωοθυλακίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αυτών. Μια διεργασία, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εμμηνόπαυση, την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) και κατά την αντικαρκινική θεραπεία. Η μείωση των ωοθυλακίων είναι κοινό χαρακτηριστικό και των τριών αυτών καταστάσεων. Ο παράγοντας mTOR είναι απαραίτητος ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης με τη δραστηριότητα του mTOR να ρυθμίζεται αρνητικά μέσω του ετεροδιμερούς συμπλόκου TSC1/TSC2 που ελέγχεται από την ανασταλτική δράση της Akt. Το σύμπλοκο TSC1 σταθεροποιεί το TSC2 που είναι μια πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPάσης (GAP) για την Rheb, μια μικρή G πρωτεΐνη Ras η οποία έχει δραστηριότητα GTPάσης. Η ενεργοποιημένη Rheb οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής

πρωτεΐνης 70 kDaS6 κινάση 1 (p70s6K) και την ευκαρυωτική έναρξη του πρωτεϊνικού παράγοντα πρόσδεσης 4E (4E-BP1) οι οποίοι είναι σημαντικοί παράγοντες για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής σύνθεσης, την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πολλές έρευνες έχουν γίνει σχετικά με τα αποτελέσματα που έχει η αναστολή του μονοπατιού TSC/mTOR στην αναστολή της ενεργοποίησης των ωοθυλακίων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διακοπή των Tsc1 και Tsc2 μπορεί να ενεργοποιήσουν το σύνολο των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η υπό προϋποθέσεις απαλοιφή του Tsc2 γονιδίου μπορεί να αυξήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR και να ενεργοποιήσει την p70s6k προάγοντας τη μετάφραση, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

Το εβερόλιμους είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους παράγοντες, ο οποίος προκαλεί αναστολή του mTOR και έχει εγκριθεί για πολλές μορφές καρκίνου. Επιπλέον, συγχορήγηση του Verapamil έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων του everolimus, ενώ η συγκέντρωση του Verapamil διπλασιάζεται μετά από μια και μοναδική δόση του everolimus. Αυτή η αλληλεπίδραση φαρμάκου-φαρμάκου μπορεί να ενισχύσει την αναστολή του mTOR in vivo. Επιπλέον, η Βεραπαμίλη προκαλεί κυτταρο-προστατευτική αυτοφαγία σε αρκετές καταστάσεις.

Η φισετίνη (Fisetin) είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές το οποίο μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, στόχευση των μονοπατιών αντι-ανάπτυξης αποτελούν οι αναστολείς του Rictor (mTORC2) και πιθανώς του Raptor (mTORC1). Από μια ποικιλία διαφορετικών μελετών καρκίνου έχει βρεθεί ότι η φισετίνη ρυθμίζει τη σηματοδότηση Akt/mTOR, αναστέλλει τα MAPK και P13K, μειώνει τη φλεγμονή μέσω μείωσης της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) και λειτουργεί με ορθό τρόπο ως συνδυαστική θεραπεία σε πολλές μελέτες. Η μεγάλη διαθεσιμότητα της φισετίνης ειδικά σε φρούτα και επομένως η συχνή κατανάλωση της μέσω διατροφής, αλλά και ο αυξημένος αριθμός μελετών που αναλύουν τα βιολογικά χαρακτηριστικά της, την καθιστούν την καταλληλότερη ουσία για την συγκεκριμένη μελέτη. Υπό την οπτική της ειδικότητας της γυναικολογίας, σημαντική είναι η ανάλυση και η κατανόηση των ευρημάτων, ώστε να δύναται η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη με τη δημιουργία ενός θεραπευτικού εργαλείου για ασθένειες που περιλαμβάνουν ωοθυλακική ενεργοποίηση και ατρησία. Τέτοιες παθολογικές καταστάσεις είναι η ΠΩΑ και η διατήρηση της γονιμότητας μετά από χημειοθεραπεία. Αντίστοιχα μετά από μία υφιστάμενη ωοθηκική αδράνεια θα έπρεπε να καταστεί εφικτή η εκ νέου ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και η ακολουθούμενη ωοθηκική λειτουργία.



Ένα τέτοιο μοντέλο προσομείωσης, αποτελεί η πλήρης διατήρηση της λειτουργίας του ωθητικού κύκλου μέσω παύσης, πριν από την επίτευξη της ωοθυλακικής ενεργοποίησης. Στοχοποιήθηκαν για αυτόν το λόγο στο πείραμα, φαρμακολογικά και τα δύο σύμπλοκα mTOR (Raptor/mTORC1 και Rictor/mTORC2) σε θηλυκούς μύες χρησιμοποιώντας Εβερόλιμους, Βεραπαμίλη και Φισετίνη, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό και αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα που είχε η θεραπεία στην αναστολή της αριστερής ωοθήκης. Μετά τη λήξη της εν λόγω αγωγής έγινε προσπάθεια για επανενεργοποίηση των ωοθυλακίων στην άλλη ωοθήκη με τη χορήγηση FSH. Χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ποντικών χωρίς διαγραφή γονιδίων ή άλλες γενετικές τροποποιήσεις.

Συνοπτικά ο σκοπός της μελέτης ήταν η πειραματική αξιολόγηση της πιθανής παύσης και επανενεργοποίησης των ωοθυλακίων. Παρουσιάζονται ιστολογικές και βιοχημικές αποδείξεις ότι με αυτή τη φαρμακολογική αναστολή, τα ωοθυλάκια παραμένουν στο αρχέγονο στάδιο και μπορεί να επανενεργοποιηθούν για τη γονιμότητα. Αυτό μπορεί να βοηθήσει τις γυναίκες να ελπίζουν σε διατήρηση της γονιμότητας πριν από μια χημειοθεραπεία ή σε περίπτωση ΠΩΑ.

### **6.1.2 Πειραματόζωα**

45 θηλυκοί μύες είδος wistar (22 ημερών βάρους 45-50 gr) διαχωρίστηκαν κατά το χρονικό σημείο του απογαλακτισμού έπειτα από τυχαιοποίηση σε πέντε ομάδες (εννέα ποντίκια σε κάθε ομάδα). Αυτό το καλά μελετημένο μοντέλο ωοθηκικής προσομοίωσης έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Τα ζώα προσέφερε το εργαστήριο ζωικής αναπαραγωγής του πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τα πειράματα έγιναν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αναπαραγωγικής Γενετικής στο τμήμα Γυναικολογίας στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα ζώα κρατούνταν κάτω από συνθήκες ελέγχου, 12 ώρες φωτός 12 ώρες σκοταδιού. Ακολουθήθηκε τυπική διατροφή με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό, ενώ το βάρος τους ήταν σταθερό σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Όλα τα ζώα αντιμετωπίστηκαν σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού της ΕΕ (Directive 2010/63/EU) και εγκρίθηκε από την επιτροπή της εγκατάστασης ζώων του πανεπιστημίου Ιωαννίνων σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εργαστηρίου για την εκτροφή και διαχείριση.

### 6.1.2.1 Κύκλος οίστρου μύος

Ο κύκλος στους μύες διαιρείται σε τέσσερις φάσεις (προοίστρος, οίστρος, μετοίστρος, διοίστρος) και επαναλαμβάνεται κάθε 4 με 5 ημέρες, εκτός αν διακοπεί από κύηση, ψευδοκύηση ή από ανοίστρο. Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου είναι διαφορετική. Είναι πιθανό ωστόσο, να παρατηρηθούν και ανωμαλίες στον κύκλο (παρατεταμένος διοίστρος, οίστρος) λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο προοίστρος αποτελεί το προ-ωοθυλακιωρηκτικό στάδιο κατά το οποίο αρχίζει να αυξάνει η συγκέντρωση των οιστρογόνων. Κατά τη διάρκεια της νύχτας αυξάνουν τα επίπεδα της FSH και της LH και έπεται η απελευθέρωση του ωαρίου συνήθως νωρίς το πρωί. Ο οίστρος αποτελεί τη περίοδο «σεξουαλικής δεκτικότητας» του μύος. Στο στάδιο αυτό τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι υψηλά το πρωί και αρχίζουν να πέφτουν το απόγευμα. Διαρκεί μία μέρα σ' έναν κύκλο 4 ημερών και 2 μέρες σ' έναν κύκλο 5 ημερών. Κατά τον μετοίστρο τα επίπεδα των οιστρογόνων εξακολουθούν να παραμένουν χαμηλά. Το στάδιο αυτό περιγράφει τη μετάβαση από τον οίστρο στη πρώιμη φάση του διοίστρου κατά τη πρώτη μέρα. Στο στάδιο του διοίστρου αρχίζουν πάλι να αυξάνουν τα επίπεδα οιστρογόνων, ενώ οι τιμές FSH και LH εξακολουθούν να είναι χαμηλές. Ο διοίστρος διαρκεί συνήθως 2 μέρες (137,138).

### 6.1.2.2 Εξέταση κοιλιακού επιχρίσματος του μύος

Ο προσδιορισμός της φάσης του αναπαραγωγικού κύκλου μπορεί να επιτευχθεί με κυτταρολογική εξέταση κοιλιακού επιχρίσματος (139), με προσδιορισμό της ηλεκτρικής αντίστασης (140), με βιοχημική ανάλυση των ούρων (141) και με παρατήρηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων (142).

### 6.1.3 Παρεμβάσεις

Οι παρεμβάσεις για κάθε ομάδα απεικονίζονται στο (πίνακας 3). Όλες οι παρεμβάσεις διεκπεραιώθηκαν μέσω υποδόριας ένεσης στην κοιλιακή περιοχή.

- ▶ Η πρώτη ομάδα (ομάδα ελέγχου) έλαβε 0.2 ml αλατόνερο από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα και για 8 εβδομάδες συνολικά.
- ▶ Η δεύτερη ομάδα έλαβε everolimus (αναστολέας του mTOR) σε δόση 1.5mgr/Kg/d από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα συνολικά για 8 εβδομάδες.
- ▶ Η τρίτη ομάδα έλαβε μια συνδυαστική θεραπεία Everolimus (0.75 mgr/kg/d) και Verapamil (2.5 mgr/kg/ κάθε δεύτερη ημέρα) από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα και συνολικά για 8 εβδομάδες.
- ▶ Η τέταρτη ομάδα έλαβε συνδυασμό everolimus(1.5 mgr/Kg/d) και φισετίνη (fisetin) (10 mg/kg κάθε δεύτερη ημέρα) για να ανασταλεί η δράση τόσο του mTOR 1 αλλά και του mTOR 2 από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα και για 8 εβδομάδες συνολικά.
- ▶ Η Πέμπτη ομάδα έλαβε φισετίνη σε δόση 10 mg/kg/d από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα και για συνολικά 8 εβδομάδες.
- ▶ Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκε η αριστερή ωοθήκη κάθε ζώου και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ανάπτυξης και της ατρησίας των ωοθυλακίων.
- ▶ Μετά από 10 ημέρες, τα ζώα δέχτηκαν 35 IU FSH για 4 ημέρες και 35 IU hCG την 5<sup>η</sup> ημέρα. Η χορήγηση FSH για 4 συνεχόμενες ημέρες και η χορήγηση hCG την 5<sup>η</sup> ημέρα αποτελεί πρωτόκολλο για να υπάρχει υπερδιέγερση των ωοθηκών στα ζωικά μοντέλα.
- ▶ Στο τέλος αυτής της θεραπείας, την 6<sup>η</sup> ημέρα αφαιρέθηκε και η δεξιά ωοθήκη.

Πίνακας 3.

Control 8 wks	Everolimus 8wks	Everolimus Plus Verapamil 8wks	Everolimus Plus Fisetin 8wks	Fisetin 8wks
------------------	--------------------	---	---------------------------------------	-----------------

24 h

First assessment of follicular status  
Take left ovary out  
Check for follicular quiescence

10 d

Control Activate with FSH 4d FSH+hCG	Everolimus stop Activate with FSH 4d FSH+hCG	Everolimus plus Verapamil stop Activate with FSH 4d FSH+hCG	Everolimus plus Fisetin stop Activate with FSH 4d FSH+hCG	Fisetin stop Activate with FSH 4d FSH+hC
--	--	---	--	---

24 d

Second assessment of follicular status  
Take right ovary out  
Check for follicular activation

#### 6.1.4 Ιστολογία

Η ιστολογική ανάλυση των ωοθηκών περιγράφηκε αναλυτικά σε προηγούμενη αναφορά. Η αριστερή ωοθήκη από κάθε πειραματική ομάδα σταθεροποιήθηκε σε 4% παραφορμαλδεΐδη, αφυδατώθηκε και ενσωματώθηκε σε παραφίνη. Οι ωοθήκες που ενσωματώθηκαν στην παραφίνη τεμαχίστηκαν σε τμήματα πάχους 8 μm και επεξεργάστηκαν με αιματοξυλίνη και εοσίνη για τη μορφολογική παρατήρηση και την ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Επιλέχτηκαν τυχαία ποντίκια από όλες τις πειραματικές ομάδες και ελέγχθηκε η ωοθυλακική ανάπτυξη σε διαφορετικά στάδια. Ελέγχθηκε η παρουσία ή η απουσία των αρχέγονων, αναπτυσσόμενων (πρωτογενών και δευτερογενών) και των ώριμων (με άντρο) ωοθυλακίων, καθώς και το ωχρό σωματίο και τα άτρητα ωοθηλάκια σε τουλάχιστον τρεις διατομές κάθε ωοθήκης, με κάθε διατομή να απέχει από την επόμενη τουλάχιστον 150 μm για να αποφύγουμε την καταμέτρηση διπλών ωοθυλακίων. Τα ωοθηλάκια κατηγοριοποιήθηκαν με τον εξής τρόπο: αρχέγονα (ένα ωοκύτταρο το οποίο είναι περικυκλωμένο από ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων), πρωτογενή ωοθηλάκια (ένα ωοκύτταρο το οποίο είναι περικυκλωμένο εν μέρει ή τελείως από ένα στρώμα κυβοειδών κοκκιωδών κυττάρων), δευτερεύον ωοθηλάκιο (δύο ή τρία επίπεδα από κοκκιώδη κύτταρα χωρίς ορατό άντρο) και ώριμο ωοθηλάκιο-με άντρο (περισσότερες από τέσσερις στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων). Τα ωοθηλάκια με μη φυσιολογικές δομές, αποδιοργανωμένα κοκκιώδη κύτταρα και τα εκφυλισμένα ωοθηλάκια θεωρούνται άτρητα. Ο ιστός εξετάστηκε ανεξάρτητα από δύο Παθολόγους-ανατόμους χωρίς να υπάρχει γνώση των κλινικών δεδομένων. Εκτιμήθηκε ο συνολικός αριθμός των ωοθυλακίων σε κάθε στάδιο και υπολογίστηκε το ποσοστό του συνόλου των ωοθυλακίων. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 3 φορές.

#### 6.1.5 Ανοσοϊστοχημεία

Τα τμήματα των ωοθηκών που βρίσκονταν σε παραφίνη αποξηράθηκαν στους 60°C για ένα βράδυ. Η ανοσόχρωση των τομών έγινε με το σύστημα BOND χρησιμοποιώντας το BOND Polymer Refine Detection Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Διεξήχθη παρεμπόδιση υπεροξειδάσης για δέκα λεπτά, έγινε τριπλή έκπλυση των ιστών και μετά επώαστηκαν με το κύριο αντίσωμα εναντίον του PCNA (1:1700; SantaCruz #sc-56) για 30 λεπτά. Μετά την τριπλή έκπλυση σε PBS τα τμήματα επώαστηκαν σε πολυμερές για 10 λεπτά και επεξεργάστηκαν με DAB-Chromogen για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια οι ιστοί επαναχρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη για πέντε λεπτά και οι τομές εξετάστηκαν με μικροσκόπιο. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με λογισμικό απεικόνισης (ImageJ).

### 6.1.6 Ορμονική ανάλυση

Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από την σφαγίτιδα φλέβα, αρχικά αμέσως μετά την ανάκτηση της πρώτης ωοθήκης και δευτερευόντως πριν την ανάκτηση του δεύτερης ωοθήκης. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Ο ορός συλλέχτηκε μετά σε σωλήνες 1.5 ml και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση του. Τα επίπεδα προγεστερόνης (PRG) και οιστραδιόλης (E2) προσδιορίστηκαν με χημειοφωταύγεια σε Vitros 5600 Ea αναλυτή. Οι διάμεσοι και εσωτερικοί συντελεστές διακύμανσης όπως παρέχονται από τον κατασκευαστή είναι 13.8 και 8,5% για E2. Επίσης 10.7% and 7.2% για PRG. Η μέτρηση της Anti-Müllerian ορμόνη (AMH) προσδιορίστηκε με μια συστοιχία τύπου II και τα επίπεδά της αναφέρονται σε pmol/L. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στις αναλύσεις είναι περίπου 12.5% και το όριο ανίχνευσης ήταν 0.6 pmol/L.

### 6.1.7 Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση

Τα αρχικά αποτελέσματα συμπεριελάμβαναν τα αρχέγονα και τα άτρητα ωοθυλάκια. Τα δευτερεύοντα αποτελέσματα συμπεριελάμβαναν ωοθυλάκια σε διαφορετικά στάδια όπως πρωτεύοντα, δευτερεύοντα και ωχρά σωμάτια. Έγιναν τρεις παρατηρήσεις για κάθε ωοθήκη προκειμένου να αυξηθεί η αξιοπιστία στον προσδιορισμό του σταδίου της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Στα δευτερεύοντα αποτελέσματα συμπεριλήφθηκαν και οι τιμές της οιστραδιόλης, προγεστερόνης και AMH. Επαναλάβουμε τις μετρήσεις τόσο για την αριστερή όσο και τη δεξιά ωοθήκη. Η δραστηριότητα του mTORC1/2 και ο βαθμός απόπτωσης και αυτοφαγίας προσδιορίστηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης.

Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στις πένετε ομάδες με τυχαίο τρόπο. Η λίστα τυχαιοποίησης βρισκόταν στο δωμάτιο πειραματισμών. Ένας βοηθός, που δεν έλαβε μέρος στη διαδικασία του πειράματος, έκανε την τυχαιοποίηση. Με την πειραματική παρέμβαση ασχολήθηκε μόνο ένα άτομο. Οι παθολόγοι-ανατόμοι τυχαιοποιήθηκαν για την πειραματική ομάδα την οποία εξέτασαν.

Οι υπολογισμοί της δύναμης βασίστηκαν στη μελέτη του Zhang et al., 2013. Οι υπολογισμοί έφτασαν το 80 μέχρι 95% της δύναμης για όλα τα πρωτεύοντα αποτελέσματα. Απαιτήθηκε ένα μέγεθος δείγματος εννέα ζώων για να αποκαλυφθούν οι σημαντικές συμπεριφορές ανάμεσα στα ωοθυλάκια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης. Οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο SPSS 12.0. Όλες οι τιμές του p ήταν δύο άκρων.

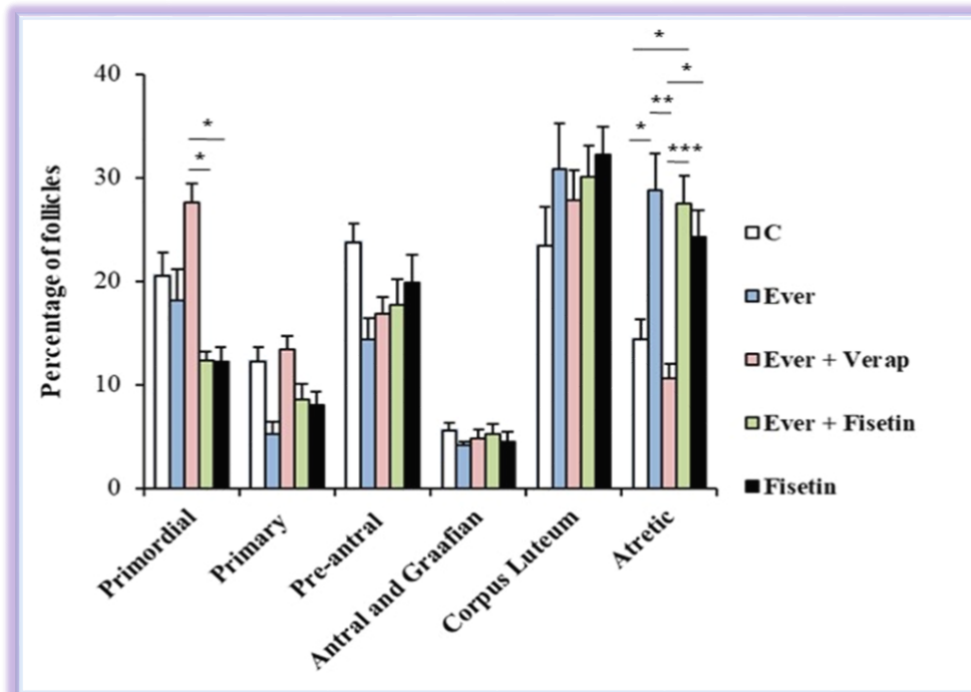
Για τους στατιστικούς υπολογισμούς του αριθμού των ωοθυλακίων. Χρησιμοποιήθηκε η ANOVA και το Tukey Kramer HSD post hoc test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns – not significant). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις  $\pm$  τυπική απόκλιση όπως φαίνεται από στις εικόνες.

### 6.1.8 Βασικά Δεδομένα

Καμία αξιόλογη μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στο σωματικό βάρος μετά τη πρώτη παρέμβαση καθώς και μετά τη δεύτερη παρέμβαση ανάμεσα στις ομάδες.

#### 6.1.8.1 Μέτρηση ωοθυλακίων μετά την πρώτη παρέμβαση

Τα νούμερα εμφανίζονται σε απόλυτους αριθμούς και σε ποσοστά.



Γράφημα 1. Μετρήσεις ωοθυλακίων σε ποσοστά μετά την πρώτη παρέμβαση

Παρατηρήθηκαν παρόμοιοι αριθμοί ανάμεσα στα αρχέγονα ωοθυλάκια στην ομάδα του Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη ( $33.3 \pm 4.53$ ) και την ομάδα Εβερόλιμους μεμονωμένα ( $28 \pm 6.16$ ) (Mean  $\pm$  S.E.M).

Πάρα ταύτα σημαντικά υψηλά επίπεδα αρχέγονων ωοθυλακίων παρατηρήθηκαν στην ομάδα Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη συγκριτικά με την ομάδα Εβερόλιμους και Φισετίνη ( $18.1 \pm 2.57, P=0.043$ ) ή την ομάδα Fisetin ( $15.1 \pm 2.43, P=0.019$ ) (Εικ 29 a,c).

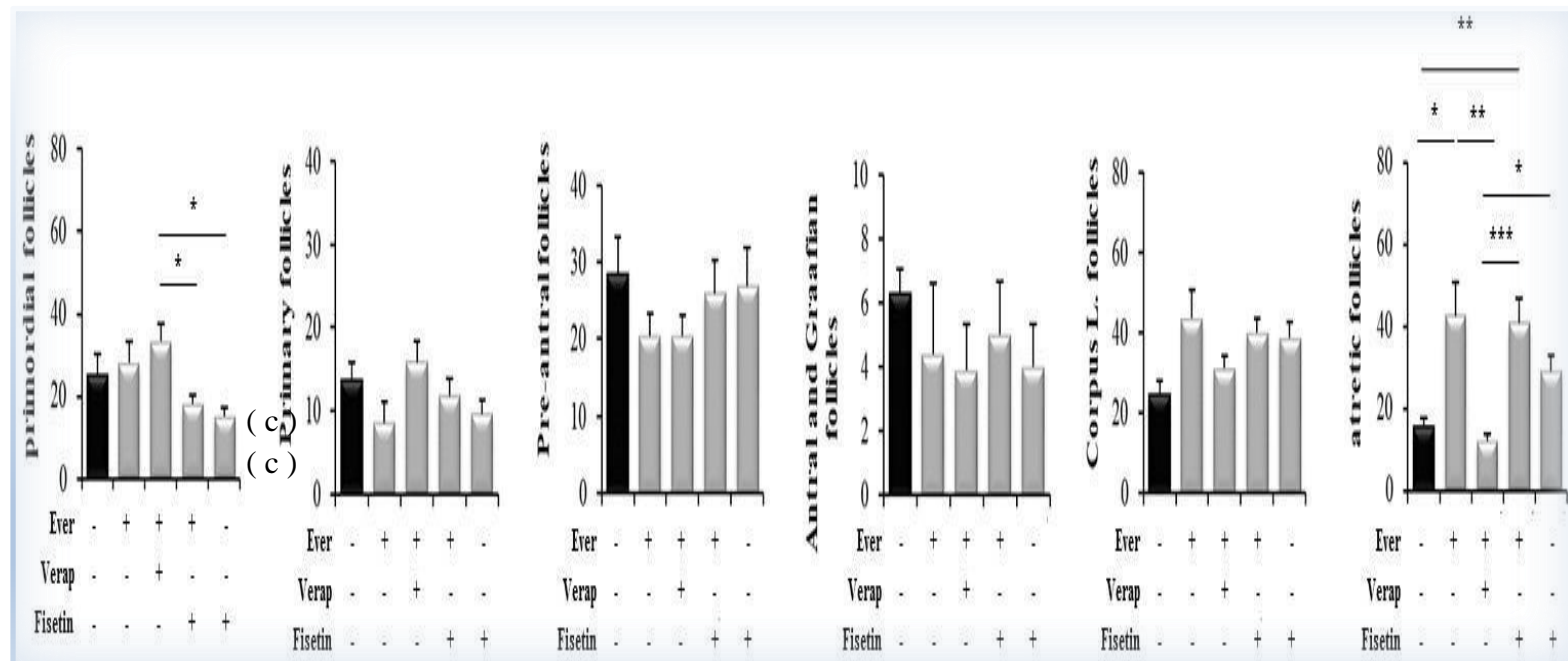
Το πιο σημαντικό όμως είναι η παρατήρηση των μεγάλων διαφορών στον αριθμό των άτρητων ωοθυλακίων στην ομάδα Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη εμφανίζοντας τα μικρότερα επίπεδα αριθμών άτρητων ωοθυλακίων ( $12.16 \pm 1.81, P=0.002$ ) συγκριτικά με την ομάδα everolimus και την ομάδα ελέγχου να έπεται ( $15.66 \pm 2.23, P=0.015$ ) (Εικ.29 a).

Οι άλλες δύο ομάδες η Φισετίνη ( $28.9 \pm 4.05, P=0.044$ ) και η ομάδα Εβερόλιμους και Φισετίνη ( $40.5 \pm 6.83, P=0.0003$ ) εμφάνισαν έναν μεγαλύτερο αριθμό άτρητων ωοθυλακίων συγκριτικά με την ομάδα Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη.

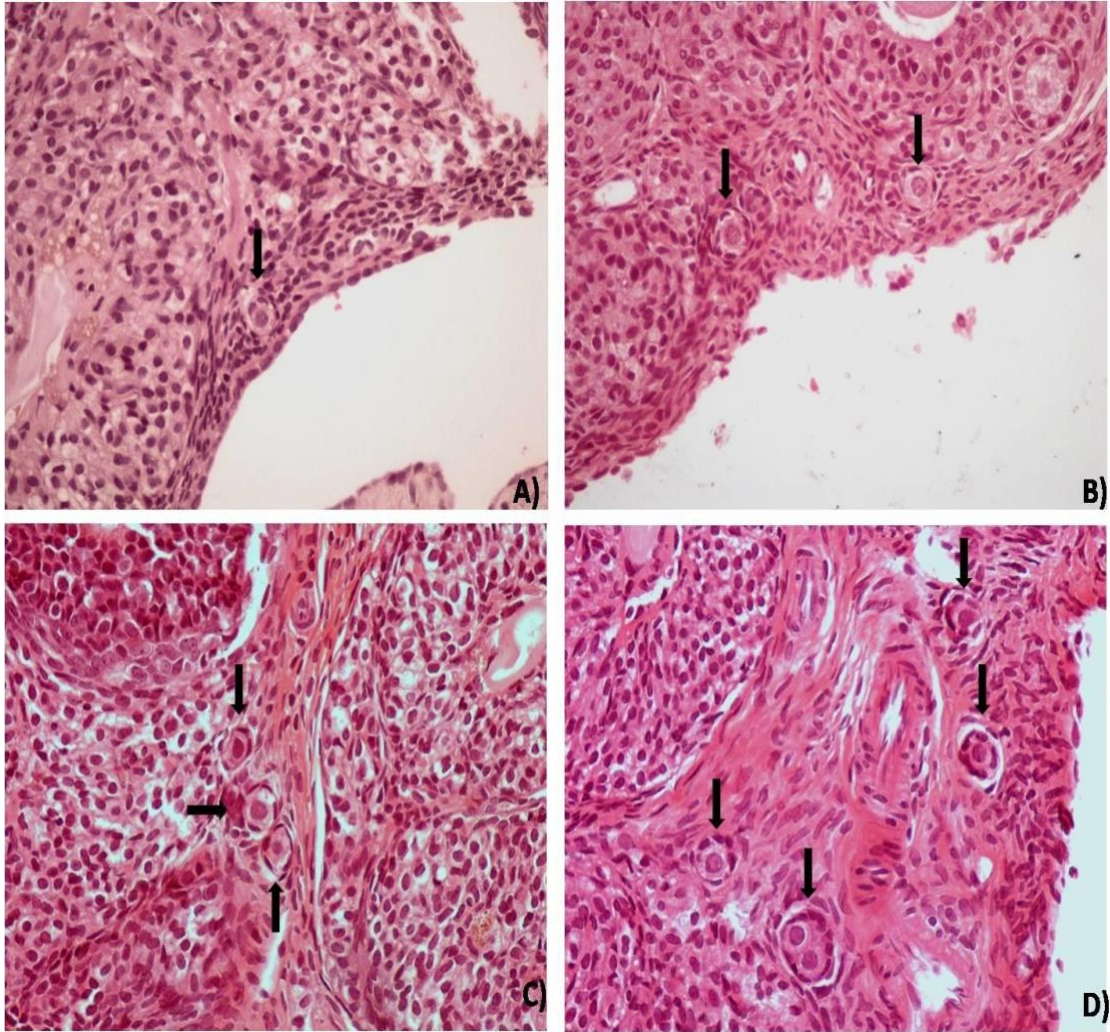
Όσον αφορά το ωχρό σωματιο, η ομάδα ελέγχου εμφάνισε το μικρότερο αριθμό, χωρίς όμως να αγγίζουν οι αριθμοί τη στατιστική σημαντική διαφορά. Μάλιστα ενώ σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες υπήρξαν αυξημένοι αριθμοί ωχρών σωμάτων, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Τελικά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αρχέγονα ( $P=0.209$ ), στα προ-κοιλιακά ( $P=0.624$ ), με άντρο ( $P=0.459$ ) και στα γρααφιανά ωοθυλάκια ( $P=0.665$ ) ανάμεσα στις πέντε ομάδες (Εικ. 29a).

**Εικ.29(a) Μέτρηση ωοθυλακίων σε απόλυτους αριθμούς μετά την πρώτη παρέμβαση.**







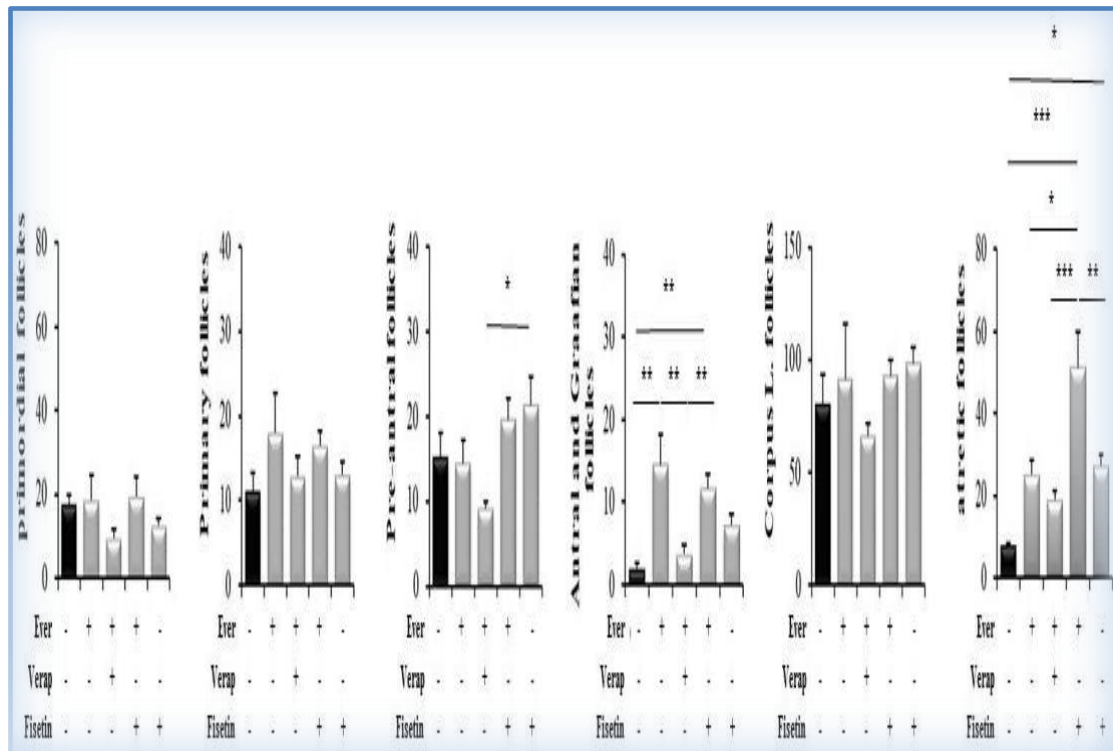
**Εικ.(29c)Μέτρηση ωοθυλακίων μετά την πρώτη και τη δεύτερη(10+4ημFSH)παρέμβαση.**  
 a)Μετά την πρώτη παρέμβαση μία σημαντική αύξηση των αρχέγονων ωοθυλακίων παρατηρήθηκε στην ομάδα εβερόλιμους και βεραπαμίλη ( $33.3\pm 4.53$ ), ενώ τα άτρητα ωοθυλάκια ήταν σημαντικά λιγότερα στην ομάδα εβερόλιμους και βεραπαμίλη ( $12.16\pm 1.81$ ) και την ομάδα ελέγχου ( $15.66\pm 2.23$ ), συγκριτικά με τις άλλες τρεις ομάδες παρεμβάσεις.Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στις άλλες κατηγορίες ωοθυλακίων. b)Μετά τη δεύτερη παρέμβαση,καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ομάδες για τα αρχέγονα ωοθυλάκια ( $P=0.214$ ). Σημαντικά αυξημένος αριθμός άτρητων ωοθυλακίων παρατηρήθηκαν στην ομάδα εβερόλιμους και φισετίνη ( $P=0.00003$ ) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.Η ομάδα εβερόλιμους και βεραπαμίλη εμφάνισε το μικρότερο αριθμό άτρητων ωοθυλακίων ( $18.7\pm 2.5$ ) ανάμεσα στις ομάδες παρεμβάσεις. Αυτή η ομάδα ( $3.8\pm 0.98$ ) μαζί με την ομάδα ελέγχου ( $1.9\pm 0.67$ ) παρουσίασε επίσης το μικρότερο αριθμό ωοθυλακίων με άντρο και γραφιανών ωοθυλακίων,συγκριτικά με την ομάδα εβερόλιμους( $14.5\pm 4.25$ )  
 c)Αντιπροσωπευτικές ωοθήκες των αρχέγονων ωοθυλακίων που επεξεργάστηκαν με αιματοξυλίνη και εοσίνη μετά την πρώτη παρέμβαση: ομάδα A)Ελέγχου, B)Φισετίνη, C)Εβερόλιμους, D)Εβερόλιμους και βεραπαμίλη. Μεγέθυνση X 400

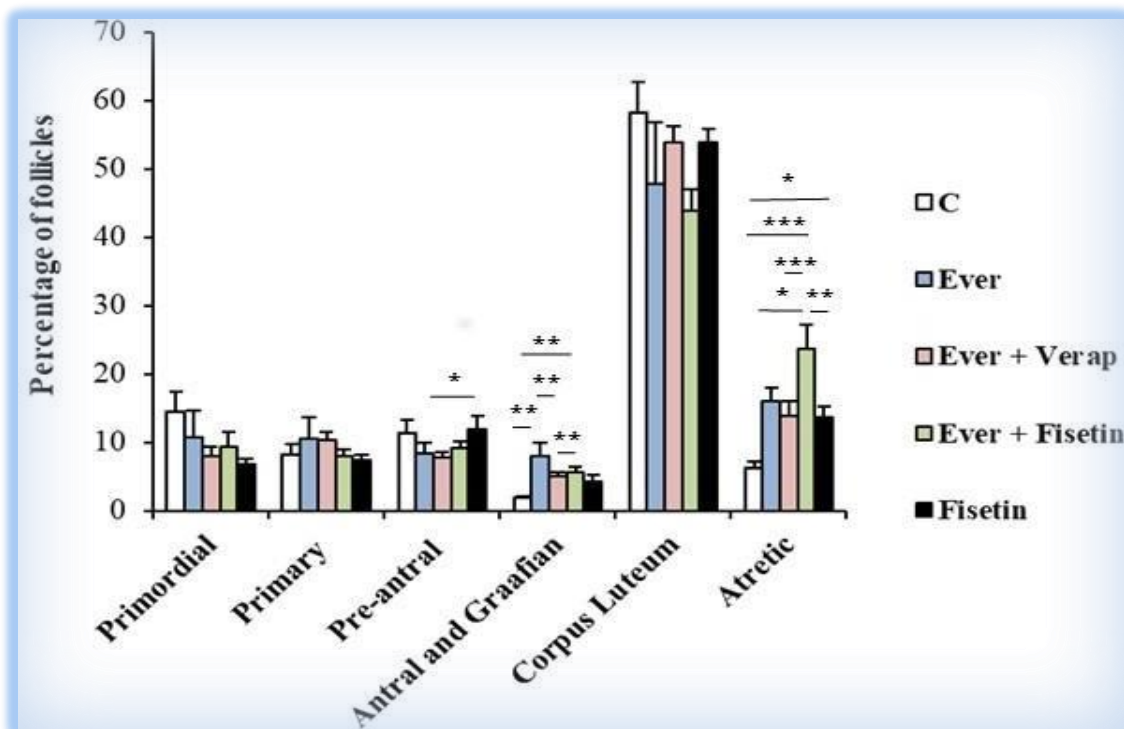
### 6.1.8.2 Μέτρηση ωοθυλακίων μετά τη δεύτερη παρέμβαση

Μετά τη διέγερση των ωοθυλακίων (Εικόνα 29 β) δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις πέντε ομάδες για τα αρχέγονα ( $P=0.214$ ) και τα πρωτογενή ωοθυλάκια καθώς επίσης και για τα ωχρά σωματίδια ( $P = 0,202$ ). Επιπλέον η ομάδα που έλαβε Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη έδειξε σχετικά μικρότερο αριθμό από προ-αντρικά ωοθυλάκια, αλλά αυτό είχε στατιστική σημασία μόνο σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε Fisetin ( $9,2 \pm 0.86$ ,  $P = 0,021$ ).

Πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των άτρητων ωοθυλακίων ( $P=0,0005$ ). Η ομάδα ελέγχου ( $7.7 \pm 0.8$ ,  $P=0,0003$ ) και η ομάδα που έλαβε Βεραπαμίλη και Εβερόλιμους ( $18,7 \pm 2,5$ ,  $P=0,0001$ ) έδειξε σημαντικά μικρότερο αριθμό από αυτά τα ωοθυλάκια σε σχέση με την ομάδα που έλαβε Εβερόλιμους και Φισετίνη. Επιπλέον, η ομάδα Everolimus και Βεραπαμίλη ( $3,8 \pm 0.98$ ,  $P = 0.002$ ) και η ομάδα ελέγχου ( $1,9 \pm 0,67$ ,  $P=0,001$ ), έδειξαν το μικρότερο αριθμό συνδυασμού αντρικών και Graafian ωοθυλακίων σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο Εβερόλιμους.

**Εικ.(29b) Μετρήσεις ωοθυλακίων σε απόλυτους αριθμούς μετά τη δεύτερη παρέμβαση.**





**Γράφημα 2. Μετρήσεις ωοθυλακίων σε ποσοστά μετά τη δεύτερη παρέμβαση.**

### 6.1.8.3 Διάμετροι ωοθυλακίων μετά από την πρώτη παρέμβαση

Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαμέτρους των ωοθυλακίων (πρώτη διάμετρος  $P=0.040$ , δεύτερη διάμετρος  $P=0,0049$ , τρίτη διάμετρος  $P=0,0033$ ).

Η ομάδα Φισετίνη είχε τις μεγαλύτερες διαμέτρους ωοθυλακίων ( $0.50 \pm 0.06 \times 0.39 \pm 0,65 \times 0,26 \pm 0,05$  cm). Αντίθετα, η ομάδα Βεραπαμίλη είχε τις μικρότερες διαμέτρους ( $0,4 \pm 0,07 \times 0,27 \pm 0,05 \times 0,2 \pm 0,02$ ).

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, βρέθηκε στατιστικά σημαντικά περισσότερος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων στην ομάδα Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη σε σχέση με την ομάδα Φισετίνη ( $15,1 \pm 2,43$ ). Επομένως εξετάστηκε αν υπήρχε κάποια σύνδεση ανάμεσα στη διάμετρο των ωοθηκών και τα αρχέγονα ωοθυλάκια.

Η ομάδα Fisetin είχε το μεγαλύτερο μήκος, πλάτος και πάχος ωοθυλακίων ενώ η ομάδα Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη τις μικρότερες παραμέτρους μήκους. Κάνοντας ανάλυση παλινδρόμησης, ανά δύο συσχετίσεις, ανάμεσα στα αρχέγονα ωοθυλάκια που μετρήθηκαν μετά από κάθε παρέμβαση, (δηλαδή την πρώτη διάμετρο σε σχέση με τον αριθμό των πρωταρχικών ωοθυλακίων που μετρήθηκαν σε αυτήν την παρέμβαση), δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (correlation -0,194, significant probability 0,196) στο σύνολο αλλά και για ανάμεσα σε κάθε ομάδα.

Από την παραπάνω στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων δε συσχετίζεται με τη διάμετρο του ωοθυλακίου, αλλά μόνο με την παρέμβαση.

#### **6.1.8.4 Διάμετροι Ωοθυλακίων μετά τη Δεύτερη Παρέμβαση**

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην πρώτη ( $P=0,06$ ) και την τρίτη ( $P=0,031$ ) διάμετρο ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες στη δεύτερη διάμετρο.

Στο σύνολο των ομάδων, οι ομάδες Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη και Εβερόλιμους και Φισετίνη είχαν τις μεγαλύτερες τρεις διαμέτρους.

### **6.1.9 Ορμονικοί Προσδιορισμοί**

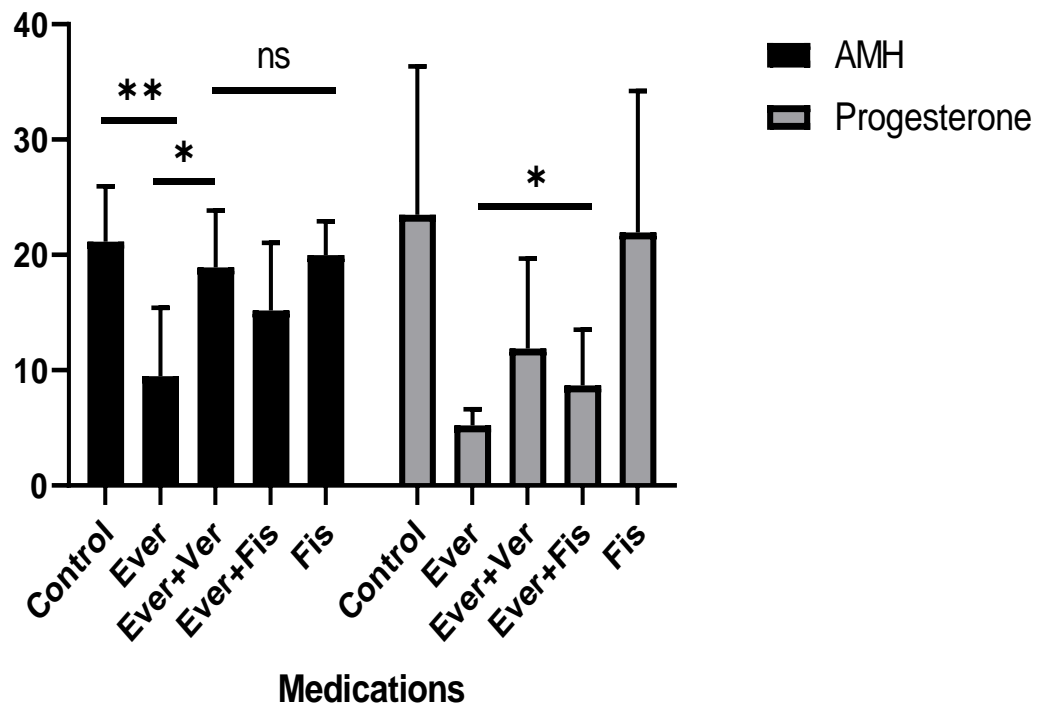
#### **6.1.9.1 Ορμονικές μετρήσεις μετά την πρώτη παρέμβαση**

Τα χαμηλότερα επίπεδα AMH ( $P=0,0001$ ) παρατηρήθηκαν στην ομάδα του Εβερόλιμους ( $9,47 \pm 5,9$ ) pmol/L. Οι άλλες τρεις ομάδες, Εβερόλιμους και Φισετίνη ( $15,18 \pm 5,8$ ) pmol/L, Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη ( $18,9 \pm 4,9$ ) pmol/L και Φισετίνη ( $19,9 \pm 2,9$ ) pmol/L, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσά τους.

Υπήρχαν ωστόσο στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα Εβερόλιμους ( $9,47 \pm 5,9$ ) pmol/L και την ομάδα ελέγχου ( $21,15 \pm 4,8$ ) pmol/L (Γράφημα 3)

Σε σχέση με την προγεστερόνη, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στην ομάδα Εβερόλιμους ( $5,21 \pm 1,3$ ) ng/ml, την ομάδα Εβερόλιμους και Φισετίνη ( $8,6 \pm 4,8$ ) ng/ml και Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη ( $11,88 \pm 7,8$ ) ng/ml ( $P = 0,002$ ) (Γράφημα 3) όταν συγκρίνεται με την ομάδα ελέγχου ( $23,48 \pm 12,8$ ) ng/ml.

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της οιστραδιόλης (pg/ml) ανάμεσα στις ομάδες. ( $P=0,433$ ).



Γράφημα 3. Μετρήσεις ορμονών μετά την πρώτη παρέμβαση.

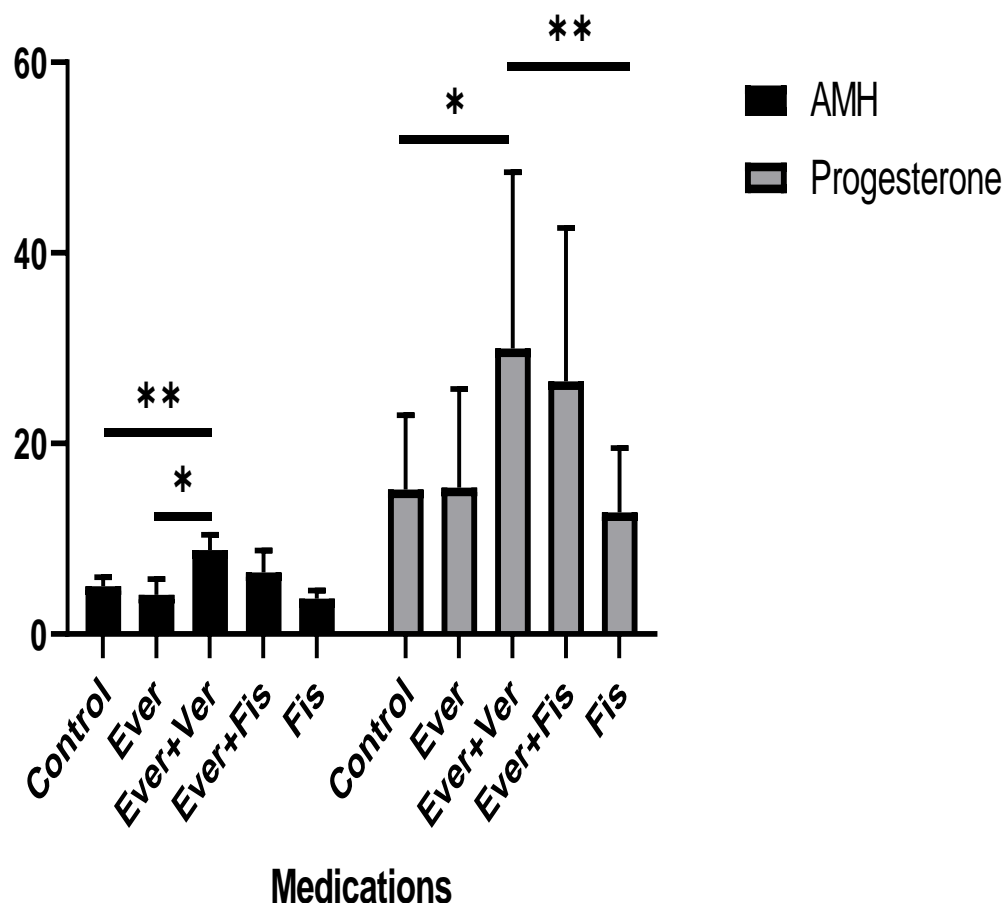
### 6.1.9.2 Ορμονικές μετρήσεις μετά τη δεύτερη παρέμβαση

Βρέθηκαν στατιστικά μεγαλύτερες τιμές AMH στην ομάδα Everolimus και Verapamil ( $8,8 \pm 1,6$ ) pmol/L ( $P < 0,0001$ ). Οι άλλες δύο ομάδες, και πιο συγκεκριμένα η Everolimus και Fisetin ( $6,4 \pm 2,2$ ) pmol/L και η ομάδα ελέγχου ( $5 \pm 0,9$ ) pmol/L δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσά τους. Ωστόσο οι ομάδες που παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές AMH, πιο συγκεκριμένα η ομάδα Everolimus ( $4,1 \pm$

1,6) pmol/L και Fisetin ( $3,7 \pm 0,8$ ) pmol/L είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσά τους (Γράφημα 4.)

Επιπλέον, στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα προγεστερόνης, παρατηρήθηκαν στον ομάδα Everolimus και Verapamil ( $29,9 \pm 18,55$ ) ng/ml σε σχέση με το δείγμα ελέγχου ( $15,1 \pm 7,8$ ) ng/ml και την ομάδα Fisetin ( $12,7 \pm 6,7$ ) ng/ml ( $P = 0,341$ ). Δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της προγεστερόνης ανάμεσα στις άλλες ομάδες, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι η ομάδα Everolimus και Fisetin ( $26,51 \pm 16,12$ ) είχε επίπεδα προγεστερόνης περίπου τα ίδια με τα επίπεδα της ομάδας Everolimus και Verapamil (Γράφημα 4).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα της οιστραδιόλης ανάμεσα σε όλες τις ομάδες (pg/ml) ( $P=0,425$ ).



Γράφημα 4. Ορμονικές μετρήσεις μετά τη δεύτερη παρέμβαση.

### 6.1.10 Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης

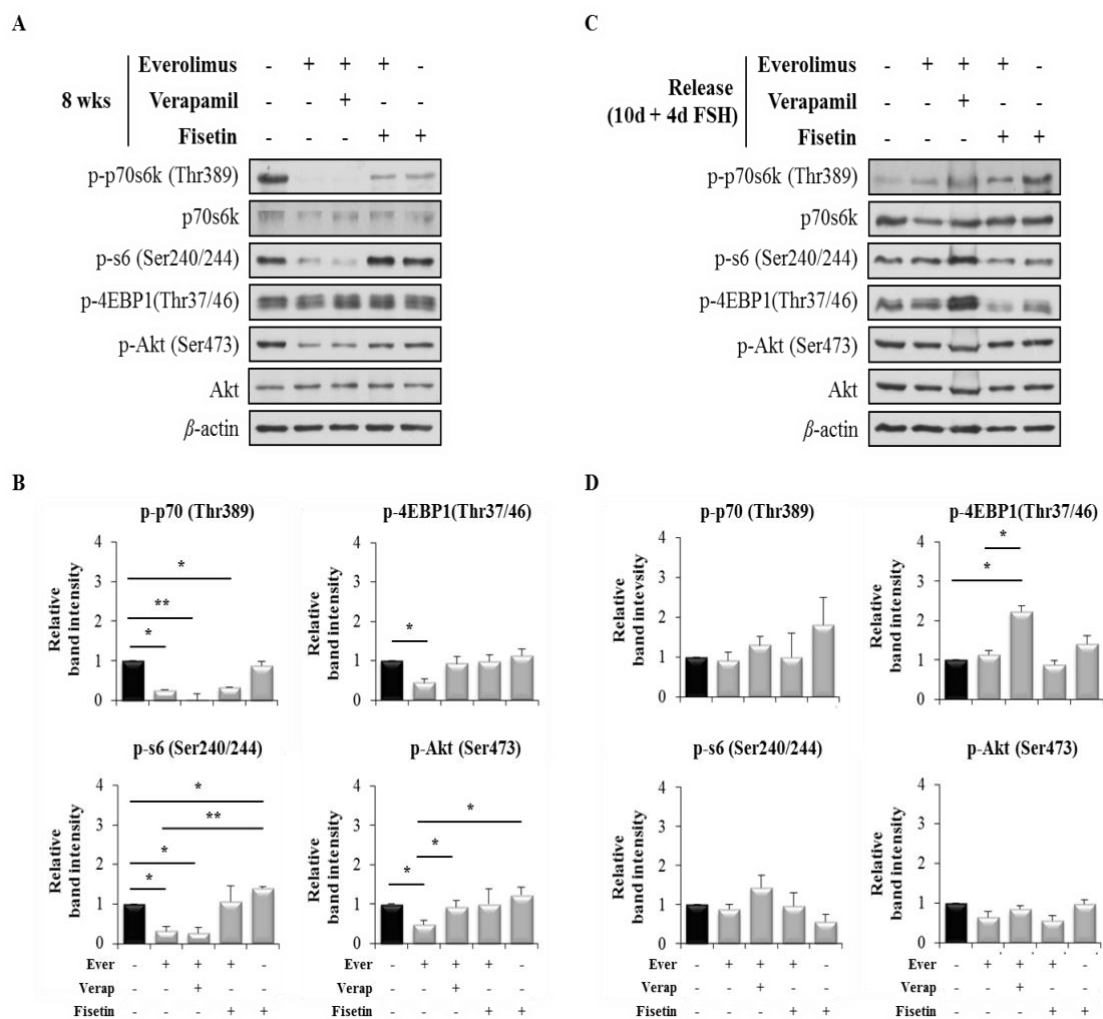
#### 6.1.11 Εκτίμηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας σε κύριους στόχους του mTOR

Εξετάσαμε τη δραστηριότητα του mTORC1/2 στην ωοθήκη μέσω της ανάλυσης Westernblot χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα αντισώματα ως ενεργοποιητές του μονοπατιού. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30 (a, b), η παρουσία Εβερόλιμους μεμονωμένα καθώς και ο συνδυασμός του με Βεραπαμίλη για 8 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της p70s κινάσης μέσω του mTORC1 στην Thr389 (p-p70s6k(Thr3889)). Αυτή η μείωση αναστράφηκε μετά το τέλος της πρώτης παρέμβασης και με την παρουσία της FSH Εικόνα 30(c, d). Αυτή η ανάστροφη ενεργοποίηση του p-p70s6k (Thr389) ήταν πανομοιότυπη με ένα μοτίβο φωσφορυλίωσης των επιπέδων ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (p-rpS6) (Ser240/244) ένας μεταγενέστερος στόχος της p70s6k.

Η παρουσία Φισετίνης επηρέασε ελάχιστα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του p70s6k και δεν επηρέασε ουσιαστικά τη δραστηριότητά της όπως φαίνεται από τη μη μεταβολή των επιπέδων του p-rpS6. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τη διαπίστωση ότι η Φισετίνη αναστέλλει κυρίως και επιλεκτικά τη λειτουργία του μονοπατιού mTORC2 και όχι του mTORC1. Με τον ίδιο τρόπο, τα επίπεδα της phosphor-4E-BP1, ακόμη έναν στόχο του μονοπατιού mTORC1 μειώθηκαν από το Everolimus ενώ ο συνδυασμός με Verapamil εξουδετέρωσε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα Εικόνα 30 (a, c).

Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 αποκαταστάθηκε πλήρως μετά την αφαίρεση του Εβερόλιμους αλλά αυξήθηκε περαιτέρω μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη και τη χορήγηση της FSH (Εικόνα 30 α, d). Η συγκεκριμένη παρατήρηση υποδηλώνει ότι υπάρχει μια σημαντική διέγερση της μετάφρασης κατά την ανάκαμψη από τη θεραπεία με Everolimus και Verapamil. Επιπλέον, σε όλες τις θεραπείες η παρουσία αναστολέων περιορίζει την ενεργοποίηση του mTORC2 και αποκάλυψε τα μειωμένα επίπεδα p-Akt (Ser473), έναν σημαντικό στόχο του mTORC2.

Αυτά τα αποτελέσματα είναι περισσότερο εμφανή στην περίπτωση του Εβερόλιμους και επαναφέρεται μετά από την αφαίρεση των αναστολέων. Τα ευρήματα αυτά, δεν επιβεβαιώνουν μόνο τις ανασταλτική δράση της Φισετίνης στο mTORC2 αλλά υποδηλώνουν επίσης ότι το Everolimus, που είναι γνωστός αναστολέας του μονοπατιού mTORC1 μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του mTORC2 στις ωοθήκες μετά από παρατεταμένη *in vivo* θεραπεία.



**Εικόνα 30. Εκτίμηση των αναστολέων σε κύριους στόχους του mTOR.**

*Effect of the inhibitors on mTOR targets. a* Representative immunoblot of p-p70s6k(Thr389), p-s6, p-4E-BP1(Thr37/46) and p-Akt(Ser473) in the presence of Everolimus alone or in combination with Verapamil or Fisetin for 8 weeks (wks).  $\beta$ -actin was used as loading control. (n=3). *b* Quantification of the results depicted in (a). The band intensity of each protein was normalized with the intensity of  $\beta$ -actin for each sample. *c* Representative immunoblot of the same proteins 14 days (d) after the removal of the inhibitors (including 4 days of FSH stimulation).  $\beta$ -actin was used as loading control. (n=3). *d* Quantification of the results depicted in (c). The band intensity of each protein was normalized with the intensity of  $\beta$ -actin for each sample. wks: weeks, d: days



### 6.1.12 Εκτίμηση της θεραπείας στην απόπτωση, αυτοφαγία και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η θεραπεία με Everolimus μείωσε την έκφραση του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl2, ενώ ο συνδυασμός του Everolimus είτε με Verapamil είτε με Fisetin μετρίασε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα (Εικόνα 31a,b). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να συσχετίζεται με τον υψηλό αριθμό από άτρητα ωσθυλάκια τα οποία μετρούνται στην ομάδα Everolimus.

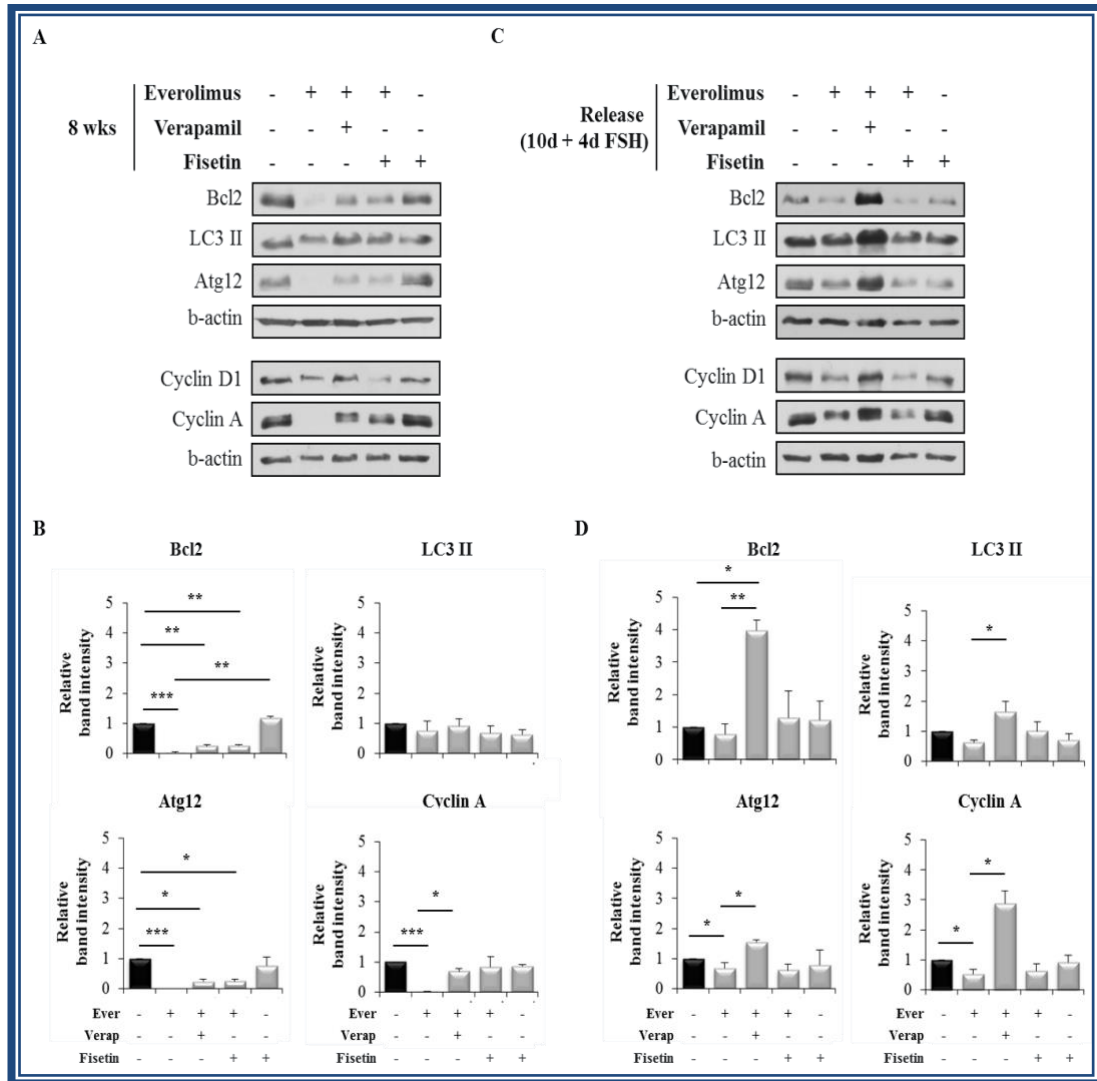
Ενδιαφέρον είναι επίσης και το γεγονός ότι η μείωση του Bcl2 κατά την παρουσία Everolimus συνοδεύεται από μια παρόμοια και επιλεκτική μείωση της Atg12, μια πρωτεΐνη που είναι σημαντική για την έναρξη της αυτοφαγίας, καθώς και της κυκλίνης A που είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κύκλου για τις φάσεις S και G2 (Εικόνα 31a,b).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι από μόνο του το Everolimus αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, αυξάνει την απόπτωση και επηρεάζει την έναρξη της αυτοφαγίας, ενώ η συνδυαστική θεραπεία με τη Βεραπαμίλη ή τη Φισετίνη μετριάζει τα αποτελέσματα αυτά.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο Bcl2 αυξάνεται δραματικά μετά από την αφαίρεση του Everolimus και του Verapamil, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Verapamil έχει ένα ρόλο προστατευτικό (Εικόνα 31 c,d).

Σε αυτήν την περίπτωση η δράση συσχετίστηκε με μια αύξηση του Atg12 αλλά και του LC3-II, ένας διαφορετικός ρυθμιστής-κλειδί της αυτοφαγίας, προτείνοντας έτσι έναν προστατευτικό ρόλο αυτού του μονοπατιού μετά την εκ νέου ενεργοποίηση των ωσθυλακίων που ακολουθεί την αφαίρεση των αναστολέων.

Το γεγονός αυτό συμφωνεί με άλλα ευρήματα που δείχνουν ότι η αυτοφαγία αυξάνεται στα τελικά επίπεδα της ωρίμανσης του ωσθυλακίου. Σχετικά με αυτό μπορούμε επίσης να σημειώσουμε ότι έχει αναφερθεί μια σύνδεση ανάμεσα στο Verapamil και την αυτοφαγία και σε άλλα κυτταρικά μοντέλα.

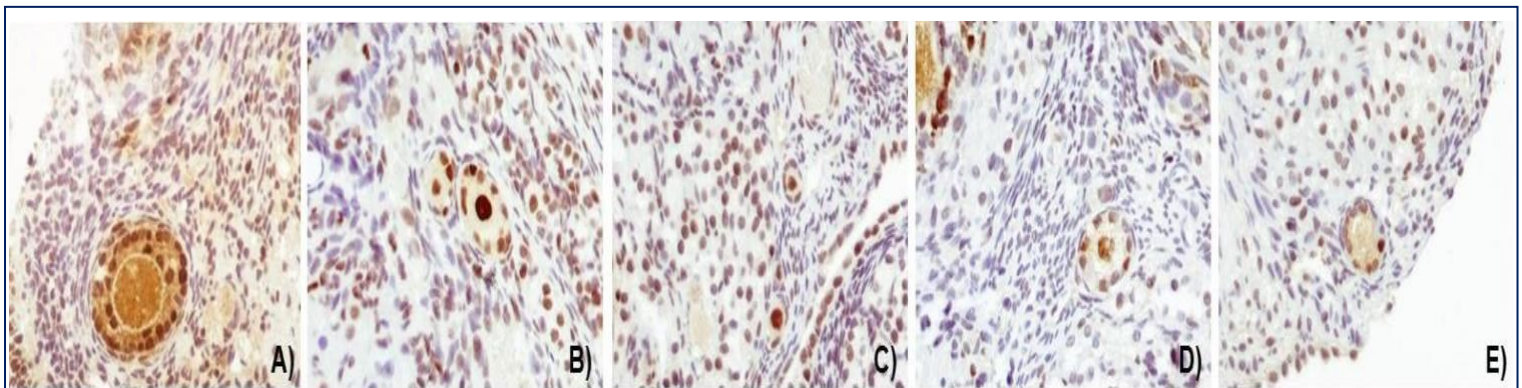
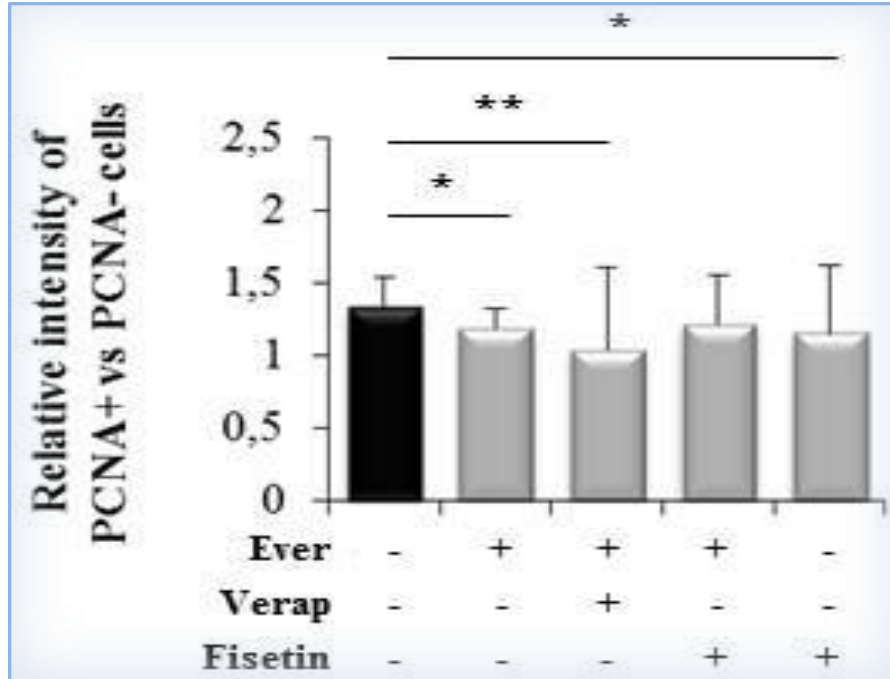


**Εικ.31** Εκτίμηση θεραπείας στην απόπτωση,αυτοφαγία και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Άλλη μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η αφαίρεση του συνδυασμού Everolimus και Verapamil επιπρόσθετα με την κυκλίνη A, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κυκλίνης D1, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάβαση G1/S αποκαλύπτοντας με τον τρόπο αυτό μια διέγερση της προόδου του κυτταρικού κύκλου στην ωσθήκη μετά την επανενεργοποίηση του συνόλου των ωσθυλακίων. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και με την ανοσοϊστοχημική χρώση των τμημάτων της ωσθήκης με το δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA, η έκφραση του οποίου είναι αυξημένη κατά την πρώιμη G1 και S φάση του κυτταρικού κύκλου. Το PCNA διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή και την επισκευή του DNA, ενώ θεωρείται και σαν κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης των ωσθυλακίων.

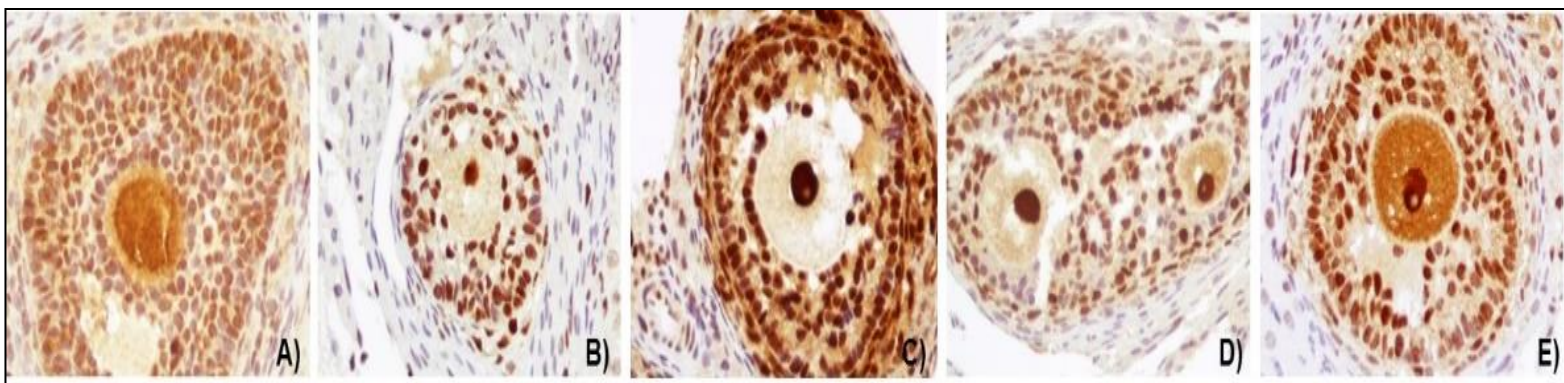
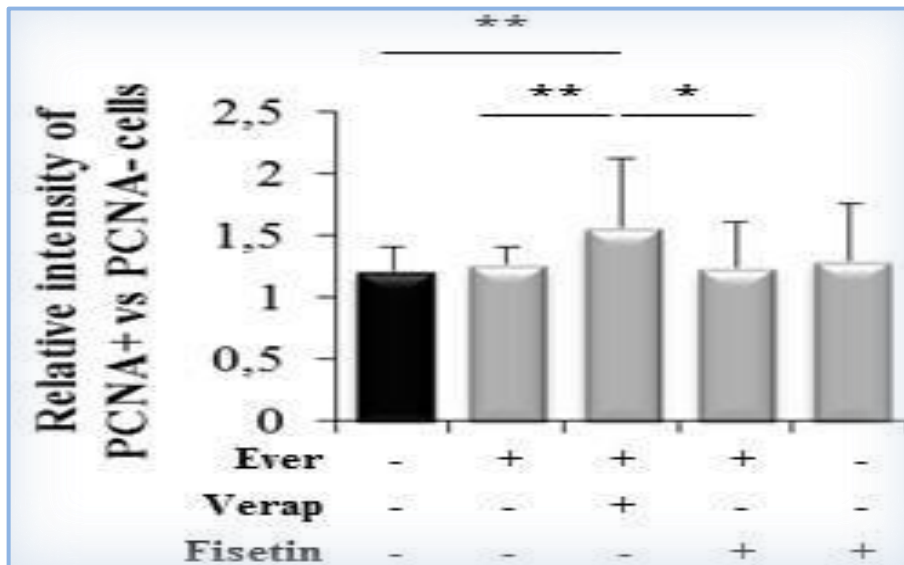
Πράγματι, η ταυτόχρονη παρουσία του Everolimus και Verapamil μείωσε σημαντικά την έκφραση του PCNA στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης (Εικόνα 32α). Επίσης ενδιαφέρον αποτελεί και το γεγονός ότι τα επίπεδα του πιο σημαντικού δείκτη πολλαπλασιασμού στα κοκκιώδη κύτταρα αυξάνονται ανάλογα μετά την απομάκρυνση αυτού του συνδυασμού φαρμακευτικών ουσιών (Εικόνα 32β).

**Εικ.32 α) Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών (PCNA) μετά την πρώτη παρέμβαση**



**Εικ.32α) Ωοθήκες από τις ομάδες μετά την πρώτη παρέμβαση: Control (A), Everolimus (B), Everolimus + Verapamil (C), Everolimus + Fisetin (D) and Fisetin (E). Μεγέθυνση X 600**

Εικ.32 β Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών (PCNA) μετά τη δεύτερη παρέμβαση.



Εικόνα 32 β) Ωοθήκες από τις ομάδες μετά τη δεύτερη παρέμβαση: Control (A), Everolimus (B), Everolimus + Verapamil (C), Everolimus + Fisetin (D) and Fisetin (E). Μεγέθυνση X 600

### 6.1.13 Πλεονεκτήματα της μελέτης

Ο σχεδιασμός αυτής της μελέτης βασίστηκε σε πολλές βασικές έννοιες της βιολογίας των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η χρήση της λίστας τυχαιοποίησης και η χορήγηση των φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε ομάδες ζώων, συμπεριλαμβανομένης μιας ομάδας ελέγχου, αποτελούν πλεονεκτήματα της μελέτης. Οι δύο παθολογοανατόμοι οι οποίοι ήταν υπεύθυνοι της ιστολογικής ανάλυσης δεν γνώριζαν σε ποια ομάδα παρεμβάσεων ανήκαν οι ωοθήκες που εξέταζαν. Κάθε ωοθήκη αποτελούσε και εσωτερικό δείγμα ελέγχου για κάθε ζώο. Η μία ωοθήκη χρησιμοποιούνταν για την εκτίμηση του κύριου ευρήματος και η άλλη ωοθήκη για την εκτίμηση της δυνατότητας ενεργοποίησης μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση.

#### **6.1.14 Μονόπλευρη ωοθηκεκτομή και χρονισμός**

Η μονόπλευρη ωοθηκεκτομή είναι μια ασφαλής τεχνική για την εναπομένουσα ωοθήκη και χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλά πειράματα. Η ασφάλεια έγκειται είτε στον αριθμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων είτε στον αριθμό των ποντικών που γεννούν μετά.

Προς το παρόν, δεν υπάρχει κάποιο κοινά αποδεκτό μοντέλο για το χρονικό σημείο της στρατολόγησης των αρχέγονων ωοθυλακίων μετά την αναστολή του mTOR η οποία ακολουθείται από μονόπλευρη ωοθηκεκτομή και χορήγηση FSH. Σε μια προηγούμενη μελέτη, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον αριθμό των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων στην εναπομένουσα ωοθήκη στις 7, 14 και 42 ημέρες μετά την μονομερή ωοθηκεκτομή. Το ίδιο ισχύει και για τον δείκτη απόπτωσης. Αυτό θεωρείται σαν ένα σταθερό μοντέλο της συμπεριφοράς των αρχέγονων ωοθυλακίων μετά την μονομερή ωοθηκεκτομή. Ακολούθως, επιλέχθηκε ένα ενδιάμεσο διάστημα δέκα ημερών ως επαρκές ενδιάμεσο διάστημα για την ανάρρωση των ζώων από την προηγούμενη λαπαροτομή, χωρίς να αναμένεται σημαντική απώλεια των αρχέγονων ωοθυλακίων.

#### **6.1.15 Ζωικό μοντέλο**

Το ζωικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι καλά εδραιωμένο για ζώα με ωορρηξία και επιτρέπει τη διέγερση των ωοθηκών, γεγονός που είναι σημαντικό στο συγκεκριμένο πείραμα. Εκτιμήθηκαν ζώα τα οποία δεν είχαν γενετικές μεταλλάξεις προκειμένου να παρομοιάσουν την πραγματική ζωή.

#### **6.1.16 Χρονισμός του πειράματος**

Δεν εκτιμήθηκε ο κύκλος του οίστρου επειδή η βασική έκβαση της μελέτης ήταν η αξιολόγηση των αρχέγονων και άτρητων ωοθυλακίων. Για να διασφαλιστεί ότι η αγωγή έχει πλήρη αποτελέσματα, όλα τα ωοθυλάκια θα πρέπει να σταματούν την ανάπτυξή τους σε ένα πρώιμο στάδιο και να μην επιτρέπεται η ανάπτυξή τους στα ακόλουθα στάδια.

Παρατηρείται μία διαφυγή των ωοθυλακίων και των μεταγενέστερων ώριμων δομών. Δεν είναι ξεκάθαρο ποια είναι η διάρκεια της θεραπείας που πρέπει να εφαρμόζεται για τη σημαντική διατήρηση των ωοθυλακίων αλλά και για να επιτευχθεί μείωση ή και απώλεια των συγκεκριμένων δομών. Η διάρκεια της θεραπείας για 8 εβδομάδες ήταν αρκετή για τη δημιουργία θετικών αποτελεσμάτων. Η εξάντληση των ωοθυλακίων σε ποντίκια που δεν έχουν Tsc1 γίνεται στις 12-14 εβδομάδες και σε ποντίκια που δεν έχουν Tsc2 στις 12 εβδομάδες. Ωστόσο, η αναστολή του mTOR, ακόμη και για λιγότερο από 8 εβδομάδες έχει σημαντικές συνέπειες στα αρχέγονα ωοθυλάκια. Στοχεύθηκε μια θεραπεία οκτώ εβδομάδων για να υπάρχει μια εξισορρόπηση της θεωρίας με τις απαιτήσεις σε πρακτικό επίπεδο. Συμπερασματικά περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η ελάχιστη διάρκεια της θεραπείας για την αποτελεσματική απενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR και την επιτυχημένη διατήρηση υψηλών αριθμών αρχέγονων ωοθυλακίων.

#### **6.1.17 Επιλογή φαρμάκου και δοσολογία.**

Όλες οι δόσεις των φαρμάκων αντιστοιχήθηκαν στο βάρος των ζώων από τις συνιστώμενες δόσεις σε ανθρώπους. Αν και η μέθοδος βασίστηκε σε δημοσιευμένη αλλόμετρική κλιμάκωση, σαν αφετηρία χρησιμοποιήθηκε η απλή μέθοδος αναλογίας. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες προκειμένου να βρεθούν τα δεδομένα που θα καθορίσουν την κατάλληλη δόση για ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό σχήμα. Κανένα ζώο δεν κατέληξε κατά τη διάρκεια της αγωγής.

Το Εβερόλιμους χρησιμοποιείται ως αναστολέας του mTOR στη θεραπεία πολλών καρκίνων συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του θυρεοειδή και των νεφρών. Η συγχορήγηση με Βεραπαμίλη ενισχύει τη δραστηριότητά του αυξάνοντας τις φαρμακοκινητικές του παραμέτρους. Οι παράμετροι αυτοί συμπεριλαμβάνουν μια διπλή και τριπλή αύξηση της μέγιστης συγκέντρωσης (Cmax) και μια 3.5 αύξηση της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης - χρόνου (AUC). Η Βεραπαμίλη αποτελεί μέτριας έντασης αναστολέας του CYP3A, ενώ υπάρχουν και αναστολείς μεγαλύτερης έντασης. Η προσθήκη ενός επιπλέον αναστολέα CYP3A σε μια αγωγή με Everolimus θα πρέπει να συνοδεύεται από παρακολούθηση της φαρμακευτικής ουσίας για να προσαρμοστεί η δοσολογία του Everolimus. Από φαρμακοκινητικές μελέτες, αποδείχτηκε ότι οι μεγαλύτερες αυξήσεις την AUC του Everolimus είναι της τάξεως του διπλασιασμού – τετραπλασιασμού. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση του Verapamil διπλασιάζεται μετά από μία δόση Everolimus. Σε μια προηγούμενη μελέτη, μια δόση Everolimus σε 2.5 mgr/kg/d και Verapamil σε 2,5 mgr/kg/d καθημερινά, ήταν καλά ανεκτή όταν χορηγούνταν για 4 διαδοχικές ημέρες. Στο συγκεκριμένο πείραμα, αν λάβουμε υπ' όψιν ότι η χορήγηση έγινε για 8 εβδομάδες για να αποφευχθούν οι

αλληλεπιδράσεις του Verapamil καθώς και η τοξικότητα στα ζώα, αποφασίστηκε να χορηγηθεί Everolimus 0,75 mgr/kg/d και Verapamil 2,5 mgr/kg κάθε δεύτερη ημέρα. Αυτή η στρατηγική έρχεται σε συμφωνία με πολλές συστάσεις σχετικά με τη συγχορήγηση του Verapamil με άλλες φαρμακευτικές ουσίες.

Ακόμη ένα θετικό αποτέλεσμα είναι η προστατευτική δράση του Verapamil στην επιβίωση των κυττάρων και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς με αυτήν τη δράση, παρατηρούμε μια αύξηση στην έκφραση της Bcl2 μετά την αφαίρεση του συνδυασμού Everolimus και Verapamil. Επιπλέον, αυξήθηκε η έκφραση των Atg12 και LC3 II επιλεκτικά, γεγονός που σημαίνει ότι η ενίσχυση της αυτοφαγίας δικαιολογεί τον προστατευτικό ρόλο του Verapamil. Ενδιαφέρον αποτελεί και το γεγονός, ότι η έκφραση του PCNA μιας πρωτεΐνης κλειδί για τον πολλαπλασιασμό και την επισκευή του DNA, αυξήθηκε σημαντικά στην ίδια ομάδα ζώων μετά από την απομάκρυνση του φαρμάκου. Έχει αναφερθεί ότι η PCNA είναι πιο έντονη στα κοκκιώδη κύτταρα, στα πρωτογενή και τα αντρικά ωοθυλάκια και ότι η έκφρασή τους αυξάνεται με την έναρξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων στις ωοθήκες των ποντικών. Επιπλέον, η αυτοφαγία έχει συσχετιστεί θετικά με τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων και την επιλεκτική αποενεργοποίηση γονιδίων που συνδέονται με την αυτοφαγία. Επομένως συνολικά, οι παρατηρήσεις φαίνεται να υποδηλώνουν ότι τα ωοθυλάκια μπορούν να διατηρήσουν τη δυνατότητα να επανακτήσουν την ανάπτυξή τους για δύο εβδομάδες μετά την αφαίρεση του συνδυασμού Everolimus και Verapamil.

Το Everolimus είναι ένας ισχυρός αναστολέας του mTORC1, ενώ το Fisetin θεωρείται αναστολέας του mTORC2 και του μονοπατιού PIK3K/AKT/mTOR. Μία μελέτη προτείνει ότι η Φισετίνη μπορεί να δράσει ως αναστολέας του mTORC1. Σε κάποιες μελέτες για τον καρκίνο, η Fisetin προάγει την απόπτωση μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται ως σχήματα σε χημειοθεραπεία. Ωστόσο, αυτό δε φαίνεται να ισχύει στο διενεργηθέν πείραμα, πιθανότατα διότι εξετάστηκε η δράση του σε υγιείς ιστούς και/ή γιατί η χορήγησή του γίνεται κάθε δεύτερη ημέρα.

#### **6.1.18 Ασφάλεια φαρμακευτικής αγωγής**

Προς το παρόν υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με την ασφάλεια της χορήγησης του Εβερόλιμους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Βασιζόμενοι σε δεδομένα από ανθρώπινα περιστατικά, το Εβερόλιμους πιθανόν να ευθύνεται για τερατογενέσεις. Υπάρχουν μελέτες σε ζωικά μοντέλα που προτείνουν το ίδιο σε συνδυασμό με αυξημένη απόπτωση. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις αυξημένες αποδείξεις,

η προσπάθεια επικεντρώνεται στη βέλτιστη διαχείριση της απόπτωσης της ωοθήκης και στην αύξηση της κατακράτησης των αρχέγονων ωοθυλακίων.

Σε γυναίκες που θέλουν να διατηρήσουν τη γονιμότητά τους, το Εβερόλιμους πιθανόν να εξυπηρετεί και τους δύο σκοπούς, δηλαδή τη δραστηριότητά του κατά των όγκων και τη δράση του στη διατήρηση των ωοθυλακίων. Η ενισχυτική δράση του Verapamil στο Everolimus επιτρέπει τη χρήση του σε μικρότερες δόσεις. Πρέπει να επιτευχθεί μια ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και την ωοθηλακική ατρησία και αυτό πρέπει να αποδειχτεί μέσω μελετών σχετικά με τη δόση των φαρμάκων αυτών. Οι δύο αυτές φαρμακευτικές αγωγές έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση.

Το εβερόλιμους είναι φάρμακο το οποίο έχει εγκριθεί από τον FDA ως αναστολέας του mTOR, με υψηλότερη εκλεκτικότητα στο σύμπλεγμα mTORC1. Έχει δοκιμαστεί σε ασθενείς με εμμηνόπαυση και προχωρημένο στάδιο καρκίνου του μαστού. Η χρήση του κυμαίνεται από κακοήθειες μέχρι και ανοσοκαταστολή σε ασθενείς που πρόκειται να υποστούν μεταμόσχευση. Χρησιμοποιείται επίσης ως συστατικό βιοαπορροφήσιμων υλικών και ενδοστεφανιαίων πρόσθετων στη στεφανιαία καρδιακή νόσο. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση σημαντικών στοιχείων του μονοπατιού mTOR όπως του p70s6k ή του 4E-BP1 έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για την αποτελεσματικότητα του Everolimus στους ασθενείς με νεοπλασίες. Το Verapamil αποτελεί αναστολέα των διαύλων ασβεστίου και χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης καθώς επίσης αξιολογείται και ως αναστολέας αγγειόσπασμου. Προς το παρόν, χρησιμοποιείται στον καρκίνο του μαστού σαν ενισχυτικό, σε συνδυασμό με άλλους αντι-νεοπλασματικούς παράγοντες λόγω της δράσης του ως αναστολέα των P-γλυκοπρωτεϊνών. Η διαθεσιμότητα συγκεκριμένων ιχνηλατών για το Verapamil (PET-τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων), επιτρέπει την επέκταση των παρατηρήσεων και την επικέντρωση των πειραμάτων για την καλύτερη κατανόηση της δράσης του. Αμφότερες οι δύο αυτές φαρμακευτικές αγωγές έχουν χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα.

### 6.1.19 Ορμόνες

Τα επίπεδα AMH μειώνονται άμεσα μετά τη μονόπλευρη ωοθηκεκτομή στους ανθρώπους. Το εν λόγω πείραμα έδειξε ότι υπάρχει μια τάση για μείωση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων μετά τη δεύτερη φαρμακευτική παρέμβαση, η οποία πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση των ωοθυλακίων και την επακόλουθη μείωση της AMH. Τα επίπεδα της προγεστερόνης αυξάνονται μετά τη δεύτερη παρέμβαση, ειδικά στην ομάδα του συνδυασμού Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη.



Ενδιαφέρον αποτελεί και το γεγονός,ότι σύμφωνα με τα δεδομένα η ταυτόχρονη χορήγηση του Verapamil στη συγκεκριμένη ομάδα μετριάζει τα αποτελέσματα που επάγει το Everolimus στον κυτταρικό κύκλο,καθώς επίσης και την απόπτωση και την αυτοφαγία στις ωοθήκες.Επεξηγηματικά το Verapamil διατηρεί σταθερά τα επίπεδα αυτοφαγίας (η οποία συνδέεται με τον ωοθυλακικό πολλαπλασιασμό),ενώ ταυτόχρονα διατηρεί τα επίπεδα απόπτωσης χαμηλά.Αυτό το γεγονός δύναται να επιτρέψει στις ωοθήκες να προσαρμοστούν γρήγορα και να αρχίσουν εκ νέου την αυτοφαγία και τον ωοθυλακικό πολλαπλασιασμό αμέσως μετά τη διακοπή της χορήγησης της FSH,αντανακλώντας με αυτόν τον τρόπο μια φυσιολογική απάντηση στις γοναδοτροπίνες.

Σημαντικό είναι επίσης,ότι οι πειραματικές αυτές αποδείξεις έχουν αποκαλύψει το σπουδαίο ρόλο που παίζει η αυτοφαγία στην ωοθυλακική ανάπτυξη και στη σύνθεση της προγεστερόνης.Για παράδειγμα,τα θηλυκά ποντίκια που έχουν απενεργοποιημένο το γονίδιο της αυτοφαγίας *Beclin1* έχει αποδειχτεί ότι έχουν μικρότερα επίπεδα προγεστερόνης στο αίμα,ενώ η αναστολή του NF-kB από την FSH ή από φαρμακολογικούς αναστολείς αυξάνει την αυτοφαγία και προάγει την έκκριση προγεστερόνης στα κοκκιώδη κύτταρα των χοίρων.

Θα ήταν επομένως ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν η επαγόμενη αυτοφαγία από σχετικές πρωτεΐνες (δηλαδή των LC3-II και ATG12), που παρατηρήθηκαν στις ωοθήκες των μυών στα οποία χορηγήθηκε συνδυασμός Everolimus και Verapamil, συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης γονιδίων που συνθέτουν προγεστερόνη, όπως τα *StaR*, *Cyp11A* και *3β-HSD*.Επιπρόσθετα,θα πρέπει να μελετηθεί και η πιθανή αρνητική ρύθμιση των συμπληρωματικών παραγόντων θήκης,όπως τα μέλη της οικογένειας BMP, τα οποία είναι γνωστά ότι αναστέλλουν την παραγωγή προγεστερόνης που παράγεται από την FSH.

### **6.1.20 Δευτερεύοντα αποτελέσματα**

Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων δεν συσχετίζεται με τη διάμετρο αλλά με την ομάδα παρέμβασης.Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετά την πρώτη παρέμβαση υπήρχε μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων της ομάδας του Verapamil και Everolimus ( $33,3 \pm 4,53$ ) και της ομάδας Fisetin ( $15,1 \pm 2,43$ ) (Εικόνα 29α).Επίσης παρατηρήθηκε το αντίθετο ως προς την τάση για τις τρεις διαμέτρους των ωοθυλακίων (η ομάδα Fisetin παρουσίασε τις πιο μεγάλες διαμέτρους και στις τρεις διαστάσεις που μετρήθηκαν,ενώ η ομάδα everolimus και Verapamil την

πιο μικρή διάμετρο). Ωστόσο η στατιστική ανάλυση δεν εμφάνισε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στο αριθμό των ωοθυλακίων και τις διαμέτρους των ωοθηκών.

Οι μετρήσεις των ωοθυλακίων μετά την δεύτερη παρέμβαση έδειξαν ότι η ομάδα Everolimus και Verapamil είχε το μικρότερο αριθμό προαντρικών και με άντρο ωοθυλακίων. Το συγκεκριμένο εύρημα πρέπει να διευκρινιστεί περαιτέρω. Ο μικρός αριθμός προ-αντρικών και κοιλοτικών ωοθυλακίων μπορεί να αποδοθεί από την παρατεταμένη έκθεση στην αναστολή του mTOR. Σε προηγούμενη μελέτη [153], βρέθηκε ότι η αναστολή της ωοθηκικής σηματοδότησης mTOR με τη χρήση αναστολέων Rapamycin και Torin I καθυστέρησε τη συνάθροιση ωοθυλακίων. Στα πειράματα αυτά, παρατηρήθηκαν μεγάλα, κοιλοτικά ωοθυλάκια στα δείγματα ελέγχου, ενώ οι ωοθήκες που δέχτηκαν θεραπεία αναστολής, τα ωοθυλάκια ήταν σε δευτερογενή στάδιο.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν, ότι η επίδραση της αναστολής του μονοπατιού mTOR στην εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετέπειτα αναστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Επιπλέον στη συγκεκριμένη μελέτη [153], μετά τη μεταμόσχευση των ωοθηκών (στις οποίες είχε χορηγηθεί θεραπεία) στην περινεφρική κάψα των ποντικών που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή, η ωοθυλακική ανάπτυξη σταμάτησε με λιγότερα αντρικά ωοθυλάκια και μεγαλύτερο ποσοστό αρχέγονων ωοθυλακίων. Τα ζώα υπέστησαν ωοθηκεκτομή προκειμένου να αυξηθούν τα επίπεδα ενδογενούς γοναδοτροπίνης, ενώ μία μέρα μετά τη μεταμόσχευση τους χορηγήθηκε 1U FSH I.P ώστε να προαχθεί η πρόωμη ωοθυλακική ανάπτυξη. Είναι επίσης προφανές, ότι τα αποτελέσματα της αναστολής του mTOR παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Εκτός από την καθυστέρηση της ωοθυλακικής ανάπτυξης, οι συγγραφείς δεν παρατήρησαν κάποιες διαφορές ανάμεσα στην απόπτωση των ωοκυττάρων ανάμεσα στις ωοθήκες που έλαβαν θεραπεία και στις ωοθήκες της ομάδας ελέγχου. Είναι σημαντικό να διευκρινίσουμε γιατί η επαγόμενη των γοναδοτροπινών ανάπτυξη των ωοθυλακίων με άντρο μετά από την αναστολή του mTOR δεν είναι πανομοιότυπη με την απόκριση των φυσιολογικών ωοθηκών και για ποιο λόγο η αναστολή της αγγειογένεσης είναι ένας από τους λόγους. Γενικά, χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να προσδιορίσουμε την βέλτιστη θεραπεία για την αποτελεσματική ωοθυλακική ενεργοποίηση μετά την αναστολή του mTOR.

### 6.1.21 Άλλες μελέτες

Προς το παρόν έχει δημοσιευτεί μία μόνο μελέτη η οποία χρησιμοποιεί αναστολείς mTOR1/2 για να προστατεύσουν τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετά από χορήγηση χημειοθεραπευτικών ουσιών. Αν και η βάση είναι η ίδια, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο μελέτες, όπως η διάρκεια της θεραπείας, η

χρήση χημειοθεραπευτικών παραγόντων και η επακόλουθη ατρησία. Η παρούσα μελέτη συνιστά ότι το μονοπάτι mTOR1 είναι πιο σημαντικό από το mTOR2 για τη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Ο στόχος μας ήταν να πετύχουμε τη διατήρηση αρχέγονων ωοθυλακίων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ώστε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικό σχήμα προετοιμασίας για IVF ή για προστασία από τη χημειοθεραπεία.

### 6.1.22 Μελλοντική χρήση

Η ΠΩΑ χαρακτηρίζεται από μείωση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων, αυξημένη ατρησία και προβληματική ωοθυλακική λειτουργία. Ασθένειες όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία υπάρχει περίπτωση να επηρεάζουν αρνητικά το σύνολο των ωοθυλακίων και τη διαδικασία ανάπτυξης τους. Αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και επιμηκύνοντας την περίοδο απενεργοποίησής τους μπορεί να αποφύγουμε την εξάντληση των ωοθυλακίων. Ιδανικά, οι γυναίκες που επιθυμούν να διατηρήσουν τη γονιμότητα τους ή που πρέπει να υποστούν κυτταροτοξικές θεραπείες θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να διατηρήσουν την γονιμότητα τους κρατώντας τα ωοθυλάκιά τους σε μια ανενεργή κατάσταση. Με αυτή την προτεινόμενη πειραματική θεραπεία, δύναται να ελαχιστοποιηθούν τα αποτελέσματα των κυτταροτοξικών φαρμάκων στα αρχέγονα ωοθυλάκια και οι γυναίκες μπορεί να αυξήσουν το χρόνο γονιμότητάς τους. Αυτό το θεραπευτικό σχήμα μπορεί επίπλέον να συνδυαστεί με την έκλυση των ανθρώπινων ωαρίων από αρχέγονα ωοθυλάκια. Επίσης είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες ώστε να είναι δυνατή η επιτυχής διατήρηση των ωοθυλακίων και η επανενεργοποίηση των ωοθυλακίων κατ' αίτηση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας παρέχουν αποδείξεις ότι αυτή είναι μια εφικτή διαδικασία και ενθαρρύνουν την περαιτέρω διερεύνηση. Οι κυτταρογενετικές μελέτες και οι μελέτες γονιμότητας θα είναι απαραίτητες προκειμένου να εκτιμηθεί η ασφάλεια παρόμοιων θεραπευτικών σχημάτων καθώς και τα αποτελέσματα της αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών όπως ο mTOR. Θα πρέπει ακόμα να δημιουργηθεί μια ισορροπία μεταξύ της ατρησίας και της ωοθυλακικής ανάπτυξης ενώ ο ελάχιστος χρόνος για την αδρανή κατάσταση των ωοθυλακίων αλλά και την επανενεργοποίησή τους θα πρέπει επίσης να προσδιοριστεί.

Άλλοι πιθανοί ερευνητικοί στόχοι συμπεριλαμβάνουν αποτελεσματικούς συνδυασμούς φαρμακευτικών αγωγών, αναγνώριση των μονοπατιών σηματοδοτικής μεταγωγής που εμπλέκονται στον κύκλο του ωοθυλακίου και ανάπτυξη αποτελεσματικών κλινικών πρωτοκόλλων για τη βελτιστοποίηση της θεραπείας.

## **6.2 «Εμπλεκόμενα μονοπάτια στην Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια.Μια συστηματική ανασκόπηση πειραματικών μελετών»**

(Pargianas et al., Δημοσίευση: *Current Pharmaceutical Design*,2020,26,1-9)

### **6.2.1 Εισαγωγή**

Η ΠΩΑ είναι ένα σύνδρομο που έχει πολλές συνέπειες στη γυναικεία γονιμότητα αλλά και στη γενικότερη κατάσταση της υγείας της.Πολλοί είναι οι παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την παθογένεια της ΠΩΑ συμπεριλαμβανομένων των ανωμαλιών των σωματικών χρωμοσωμάτων.Οι έρευνες οι οποίες έχουν γίνει σχετικά με την ανάπτυξη και τη φθορά των ωοθυλακίων έχουν αποκαλύψει αρκετά μονοπάτια,όπως αυτά των μονοπατιών της αυτοανοσίας,της απόπτωσης και της αγγειογένεσης.Ωστόσο,δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο πως το κάθε ένα από αυτά τα μονοπάτια επηρεάζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τη γονιμότητα.Τέλος,δεν έχει αναφερθεί θεραπεία για την προστασία των ωοθυλακίων μετά από γοναδοτοξικές θεραπείες.Σε μοντέλα γενετικά τροποποιημένων ζώων,τα οποία έχουν μεταλλαχθεί τεχνητά,έχει αποδειχτεί ότι το απόθεμα των ωοθυλακίων μπορεί τόσο να επιταχυνθεί στην ανάπτυξή του όσο και να εξαντληθεί, δείχνοντας ότι οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι αιτίες για ΠΩΑ.Ωστόσο,δεν είναι ακόμη γνωστή η ύπαρξη ενός μηχανισμού ο οποίος αυξάνει τη μακροβιότητα της αναπαραγωγής.

### **6.2.2 Υλικά και Μέθοδοι**

#### **6.2.2.1 Ανίχνευση και Επιλογή σχετικών Μελετών**

Η παρούσα μελέτη έγινε με την ανάλυση πρωτότυπων μελετών και ανασκοπήσεων που σχετίζονται με την ΠΩΑ.Πραγματοποιήθηκαν αναζητήσεις στη βάση δεδομένων Medline (μέχρι το 2019) χρησιμοποιώντας διάφορους συνδυασμούς όρων όπως: πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια, ωοθηκική ανεπάρκεια, ανάπτυξη ωοθυλακίων, μονοπάτια σχετικά με την ΠΩΑ και γονίδια σχετικά με την ΠΩΑ.Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν έρευνες που είχαν ως δείγμα ανθρώπους.Ωστόσο,έρευνες οι οποίες συμπεριλάμβαναν μελέτες συσχέτισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών με την ΠΩΑ καθώς και αυτές που εστιάζουν σε συγκεκριμένα γονίδια και όχι σε ολοκληρωμένα

μονοπάτια δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Τέλος, ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν δεν αποτέλεσε κριτήριο απόρριψης ερευνών. Συνολικά 58 έρευνες πληρούσαν τα κριτήρια και συμπεριλήφθηκαν στην ανασκόπηση.

### **6.2.2.2 Εξαγωγή Δεδομένων**

Για κάθε μελέτη συλλέχθηκαν πληροφορίες για τους συγγραφείς, το περιοδικό, το έτος δημοσίευσης, τη χώρα, τον τύπο της μελέτης, τον αριθμό δειγμάτων που μελετήθηκαν, το ζώο, τον τύπο του ζώου, τον ιστό και τον τύπο της ασθένειας που εξετάστηκαν, τα κύτταρα που εξετάστηκαν και τα μονοπάτια που συμπεριλήφθηκαν, τα αποτελέσματα και οι πειραματικές τεχνικές. Η εξαγωγή δεδομένων έγινε ανεξάρτητα από δύο ερευνητές και οποιεσδήποτε διαφωνίες επιλύθηκαν μετά από συζήτηση.

### **6.2.3 Αποτελέσματα**

#### **6.2.3.1 Ορθή ωοθυλακική ωρίμανση**

Η ορθή ωοθυλακική ανάπτυξη εξαρτάται από την έκφραση πολλών γονιδίων στο κάθε στάδιο της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Οι Meduri et al. 2008, έδειξαν ότι η μετάλλαξη της FSHR αναστέλλει την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων μετά το πρωτογενές στάδιο και απέδειξαν τη σημασία της κατάλληλης λειτουργίας της FSH και των υποδοχέων της (FSHR) για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου μετά το στάδιο αυτό. Αν και τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την ωοθυλακική ανάπτυξη η οποία είναι ανεξάρτητη από τη γοναδοτροπίνη, πριν το στάδιο προ-άντρου καθώς και το στάδιο αρχόμενου άντρου, η πλήρης και η εν μέρει ενεργοποίηση της FSHR προκαλεί διαφορετικές συνέπειες στην πρόιμη ωοθυλακική ωρίμανση. Η συνολική απενεργοποίηση της FSHR προκαλεί μια πρόιμη ωοθυλακική ωρίμανση με πολλά μικρά ωοθυλάκια στην περίπτωση προεφηβικών ωοθηκών. Η εν μέρει απενεργοποίηση της FSHR μπορεί να διατηρήσει την ωοθυλακική ανάπτυξη μέχρι και το στάδιο προ-άντρου, ενώ η αυξημένη ενεργοποίηση της FSH είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων με άντρο μέχρι την επιλογή τους.

Οι Hasegawa et al., μελέτησαν την ανάπτυξη των ωοθηκών των ποντικών, στις μέρες 7, 10, 13 και 19 με ανάλυση μικροσυστοιχιών. Έδειξαν ότι τα γονίδια ZIP1, ZIP2,

ZIP3, Figla και Kit εκφράζονται σε ωθήκες 7 ημερών ενώ τα γονίδια GDF-9 και BMP-15 εκφράζονται σε ωθήκες 10 ημερών. Επιπλέον, η κινάση MAPK παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωοθηκική λειτουργία.

Οι Calounova et al., έδειξαν ότι η απουσία του γονιδίου SHB σε ποντίκια αυξάνει τις ERK (extracellular- signal regulated kinase) και RSK (ribosomal S6 kinase) σηματοδοτώντας τα ωοκύτταρα και ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των κινασών p38 MAPK. Αυτή η απουσία έχει αρνητικά αποτελέσματα στην ωρίμανση των ωοθυλακίων και οδηγεί σε μη φυσιολογικές μορφολογικά βλαστοκύστες, δυσκολίες στην εμφύτευση και στην περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η SHB ρυθμίζει την φυσιολογική ανάπτυξη των ωαρίων και των ωοθυλακίων ενώ οι διαταραχές στη συγκεκριμένη σήμανση προκαλούν προβληματική μείωση I και πρόωρη ανάπτυξη του εμβρύου.

Οι Devi et al., έδειξαν ότι η αναστολή των γονιδίων ERK1/2 και p38 MAPK μετά την προσθήκη προλακτίνης (homozygous long RPL receptor mice) οδηγεί σε απορρύθμιση της ωοθήκης και σταδιακά σε ΠΩΑ. Επιπλέον, αναφέρουν ότι αρκετές φωσφατάσες MAPK μένουν ανεπηρεάστες και η διπλά εξειδικευμένη φωσφατάση DUDP1 παίζει ένα ρόλο στο γεγονός αυτό. Πράγματι, η αναστολή της DUDP1 κάνει την προλακτίνη να μην επηρεάζει την MAPK. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στη σωστή ανάπτυξη και ωρίμανση του άξονα της υπόφυσης-γοναδικός άξονας είναι η ακεραιότητα του θύμου αδένου.

Τα θηλυκά ποντίκια τα οποία δεν είχαν θύμο αδένου χαρακτηρίζονται από πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Χρησιμοποιώντας γονιδιακή θεραπεία θυμουλίνης (NTGT) οι Reggiani et al., επανέφεραν τα επίπεδα της θυμουλίνης στα ποντίκια αυτά και απέτρεψαν τη μείωση των πρώιμων ωοθυλακίων ενώ η ωοθυλακική ατρησία παρέμεινε στα επίπεδα των ποντικών που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα προγεστερόνης και το ενδομήτριο παρέμειναν σταθερά μεταξύ των δύο ομάδων ενώ τα επίπεδα οιστρογόνου ήταν χαμηλότερα στα ποντίκια της ομάδας ελέγχου αλλά όχι στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε NTGT.

### 6.2.3.2 PTEN-PI3K-AKT-mTOR

Η διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε μια ανενεργή κατάσταση είναι σημαντική στη διατήρηση της διάρκειας της αναπαραγωγικής ηλικίας. Υπάρχει μια συγκεκριμένη λειτουργία σηματοδότησης των PTEN/PI3K-AKT-mTOR ανάλογα με τα στάδια των ωοθυλακίων των ποντικών, η οποία ελέγχει την ενεργοποίηση του ωοθυλακίου. Σε ασθενείς 46,XX με φυσική ΠΩΑ, οι Shibamura et al., εξέτασαν τις μεταλλάξεις στις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου KIT, ενώ οι Hui et al., εξέτασαν τις μεταλλάξεις στο γονίδιο KIT (KITLG) στους ανθρώπους. Και οι δύο

αυτές ερευνητικές ομάδες απέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά δεν αποτελούν κοινή αιτία ΠΩΑ στις γυναίκες της Βορείου Αμερικής.

Επιπλέον, οι Reddy et al., παρήγαγαν ποντίκια με διαγραμμένο γονίδιο PTEN και παρατήρησαν ότι τα ποντίκια αυτά ήταν γόνιμα μέχρι την ηλικία των 12-13 εβδομάδων. Παράλληλα, οι ωοθήκες αυτών των ποντικίων περιείχαν ουσιαστικά μηδενική ποσότητα αρχέγονων ωοθυλακίων και σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό ενεργοποιημένων ωοθυλακίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Από την 16<sup>η</sup> εβδομάδα, οι ωοθήκες εμφάνισαν αφύσικη μορφολογία ενώ από την 12<sup>η</sup> μέχρι και την 20<sup>η</sup> εβδομάδα παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα FSH. Επομένως το PTEN δρα σαν αναστολέας της ενεργοποίησης των ωοθυλακίων, ενώ η υπο-ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση της ενεργοποίησης των ωοθυλακίων και /ή υπερβολική ατρησία η οποία οδηγεί σε ΠΩΑ. Η απάλωση του PTEN προκαλεί ενίσχυση του μονοπατιού PI3K-Akt και αύξηση της έκφρασης τόσο του pS6 αλλά και της φωσφορυλίωσης, χωρίς να προκαλέσει ενεργοποίηση της κινάσης mTOR – p70 S6 (S6K). Επιπλέον, οι Reddy et al., βρήκαν ότι η απάλωση του Pdk1 στα ωοκύτταρα αναστρέφει την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων που προκαλείται από την απώλεια του PTEN ενώ βλέπει τη σήμανση του μονοπατιού PDK1-Akt-S6K1-pS6. Η απάλωση του Pdk1 στα ωοκύτταρα προκαλεί επιταχυνόμενη γήρανση των ωαρίων και ΠΩΑ, όπως και η απάλωση του pS6 στα ωοκύτταρα που και αυτή προκαλεί ΠΩΑ. Επομένως, το ωοκύτταρο το οποίο ρυθμίζει με διάφορους μηχανισμούς την ανάπτυξή του, ελέγχει την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων ενώ το γονίδιο PTEN του ωοκυττάρου δρα ως αναστολέας της συγκεκριμένης διαδικασίας (Reddy et al., 2008). Τέλος, τα ποντίκια τα οποία είχαν έλλειψη σε PTEN, χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα P13K-AKT στα ωοκύτταρά τους καθώς και από φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων, επανέναρξη της μείωσης, ωορρηξία, γονιμοποίηση και γενικότερη γονιμότητα (Jagarlamunid et al., 2009).

Ειδικότερα, το μονοπάτι PI3K το οποίο ενεργοποιείται από το KL-Kit είναι ένα από τα σημαντικότερα PTEN/PI3K-Akt σηματοδοτικά μονοπάτια στα ωοκύτταρα και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων. Οι Brown et al., παρήγαγαν ποντίκια με τη μετάλλαξη Akt1 null, τα οποία είχαν μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα, σημαντικά μειωμένο βάρος ωοθηκών, καθυστέρηση της σεξουαλικής τους ωρίμανσης και παρατεταμένο οίστρο. Οι ωοθήκες των ποντικίων αυτών περιείχαν λιγότερα ωοθυλάκια με άντρο, ωοθυλάκια με πολλαπλά ωοκύτταρα, σημαντικό μειωμένο αριθμό ωοθυλακίων προ άντρου, άντρου, γρααφικών καθώς και αυξημένη ποσότητα άτρητων ωοθυλακίων με εκφυλισμένα ωοκύτταρα. Επιπλέον, το αυξημένο μέγεθος των ωοκυττάρων, τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης, τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα της ωχρινιτρόπου ορμόνης (LH), ο προβληματικός πολλαπλασιασμός των κοκκιωδών κυττάρων, τα υψηλότερα επίπεδα ιχθυμίνης A καθώς και τα χαμηλότερα επίπεδα ιχθυμίνης B, αποτελούν σημαντικές παρατηρήσεις της συγκεκριμένης έρευνας. Παράλληλα, παράγοντες οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των ωοκυττάρων, όπως οι Kitl και Bcl211 βρέθηκαν σημαντικά μειωμένοι (Brown et al., 2010).

Δημιουργώντας ποντίκια με μετάλλαξη TSC1, οι Adhikari et al., παρατήρησαν μια πρόιμη ενεργοποίηση του συνόλου των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η εξάντληση των ωοθυλακίων συμβαίνει μετά από 13-14 εβδομάδες θεραπείας με ραπαμυκίνη η οποία αντέστρεψε με επιτυχία την υπερενεργοποίηση αυτή. Σε σχέση με τα μεταλλαγμένα ποντίκια TSC2, παρατηρήθηκε μια υπερενεργοποίηση του αποθέματος των αρχέγονων ωοθυλακίων και η εξάντληση στην περίπτωση αυτή συνέβη στις 12 εβδομάδες περίπου (Adhikari et al., 2009).

Η αυξημένη δραστηριότητα του mTORC1, καθώς και η υπερ-ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων, βρέθηκε και στα δύο είδη μεταλλαγμένων ζώων. Αναφέρεται επίσης ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Tsc/mTORC1 στα ωοκύτταρα, έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του συνόλου των αρχέγονων ωοθυλακίων στην αδρανή τους κατάσταση, ενώ εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει και στην ενεργοποίηση των επιλεγμένων ωοθυλακίων με τους αναστολείς όγκων TSC1 και TSC2 να αναστέλλουν την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων. Επιπλέον, προτάθηκε το γεγονός ότι τα γονίδια PTEN και TSC1 φαίνεται να καταστέλλουν την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων με παράλληλο, και αλληλεπιδραστικό τρόπο. Ο ρυθμός ανάπτυξης των ωοθυλακίων είναι διαφορετικός στις ωοθήκες που έχουν τη μετάλλαξη PTEN. Η κινητήριος δύναμη της υπερ-ενεργοποίησης των αρχέγονων ωοθυλακίων στην περίπτωση της απαλοιφής των γονιδίων TSC1 και TSC2 στις ωοθήκες, είναι η αυξημένη δραστηριότητα του mTORC1. Αυτό αυξάνει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού S6K1-pS6 το οποίο προάγει την μετάφραση των πρωτεϊνών και την βιογένεση των ριβοσωμάτων στα ωοκύτταρα (Adhikari et al., 2009; 2010).

Μετά την εύρεση των παραπάνω δεδομένων, οι Adhikari et al., χρησιμοποίησαν έναν αναστολέα PTEN σε μια καλλιέργεια ωοθηκών ώστε να ενεργοποιήσουν τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Ειδικότερα, πραγματοποίησαν ωοθηκεκτομή σε ποντίκια ηλικίας τριών ημερών με επακόλουθη χορήγηση της πρώτης ωοθήκης με bpV (HOpic, PTEN αναστολέα) για 24 ώρες, ενώ η δεύτερη ωοθήκη χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα ελέγχου. Βρήκαν ότι οι ωοθήκες στις οποίες είχε χορηγηθεί bpV, ήταν σημαντικά μεγαλύτερες και είχαν περισσότερα ωοθυλάκια σε προ-ωοθυλακιόρρηκτο στάδιο, σε σχέση με αυτά στα οποία δεν είχε γίνει η παρέμβαση. Η απομόνωση ώριμων ωοκυττάρων από τις ωοθήκες στις οποίες είχε χορηγηθεί bpV, η γονιμοποίησή τους και η μεταφορά τους σε ποντίκια δέκτες με ψευδοκύηση κατέληγε στην γέννηση υγιών νεογνών. Η απαλοιφή του PTEN τόσο στα ωοκύτταρα αλλά και στα κοκκιώδη κύτταρα δεν δημιουργεί ωοθηκικούς όγκους. Συμπεράναν επίσης, ότι το PTEN έχει κυτταρικές και ιστολογικές λειτουργίες οι οποίες είναι εξειδικευμένες και δρουν σαν αναστολείς της ενεργοποίησης των αρχέγονων ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα έχει ως στόχο να χρησιμοποιήσει το γονίδιο PTEN σε ωοθήκες από ποντίκια αλλά και από ανθρώπους ως αποτελεσματικό και ασφαλή τρόπο για τη δημιουργία ώριμων ανθρώπινων ωοκυτάρων.

Από την άλλη πλευρά, οι Lu et al., έδειξαν ότι η σημαντικά μειωμένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt και mTOR, σε ωοθήκες με προμετάλλαξη FMR1, δεν επηρεάζουν το σύνολο των πρώιμων ωοθυλακίων. Παράλληλα, το μειωμένο



βάρος της μήτρας και ο μεγάλος αριθμός των ωοθυλακίων, αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της FSH κατά τη χρονική περίοδο των 9-22 εβδομάδων. Συγκεκριμένα, συσχετίστηκε η προ-μετάλλαξη FMR1 με τον φαινότυπο FXPOI και το μονοπάτι Akt/mTOR, γεγονός που μπορεί να το κάνει πιθανό θεραπευτικό στόχο.

Ωστόσο στα κοκκιώδη κύτταρα η κατάσταση είναι διαφορετική. Οι Fan et al., επικεντρώθηκαν στους καταρράκτες σηματοδότησης που λαμβάνουν χώρα μέσα στα κοκκιώδη κύτταρα, και αναφέρουν ότι η LH (μέσω της LHR) ενεργοποιεί το μονοπάτι RAS/ERK  $\frac{1}{2}$  στα προ-ωορρηκτικά ωοθυλάκια, γεγονός που οδηγεί σε ωορρηξία και λουτεϊνοποίηση, ενώ η πρόωρη έκφραση των ενεργοποιημένων KRAS σε μικρά και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση των PO3K, Akt και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η απενεργοποίηση του γονιδίου KRAS συμβάλλει στην προς τα άνω ρύθμιση του ογκοκαταστολέα PTEN, ενώ η μόνιμη έκφραση του KRAS φαίνεται να είναι επιβλαβής και να προκαλεί ΠΩΑ. Μια άλλη συσχέτιση του μονοπατιού Akt με POF, είναι η διαφοροποίηση του προφίλ του miRNA στο πλάσμα αυτής της κατηγορίας ασθενών (Yang et al., 2012). Σε αυτή τη διαφοροποίηση συμπεριλαμβάνονται και διάφορα μονοπάτια όπως για παράδειγμα η σηματοδότηση των οιστρογόνο-υποδοχέων MAPK, του mTOR, του TGF- $\beta$  και του υποδοχέα Wnt. Ανάμεσά τους συμπεριλαμβάνεται και το μονοπάτι Mir-23 το οποίο εμπλέκεται στην απόπτωση που εξαρτάται ή μη από τις κασπάσες, μέσω μείωσης της έκφρασης XIAP στα ανθρώπινα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης και η οποία μπορεί να συμβάλλει στην αιτιολογία της ΠΩΑ.

Οι Sobinoff et al., χρησιμοποίησαν DMBA για να προκαλέσουν σε στάδιο προ άντρου ωοτοξικότητα και επιλεκτική ατρησία ανώριμων ωοθυλακίων. Η ανάλυση με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών έδειξε ότι το DMBA ενεργοποιεί μονοπάτια σήμανσης του ωαρίου και πιο συγκεκριμένα δύο ανοσολογικά μονοπάτια, τέσσερα μονοπάτια που σχετίζονται με την δημιουργία και ανάπτυξη των ωοθυλακίων (mTOR, ILK, EIF2 και VEGF) και ένα μονοπάτι που χρησιμοποιείται στη σύνθεση των αμινοξέων (μεταβολισμός μεθεινίνης). Επιπλέον, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στην Atk1 που ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει δράση του μονοπατιού P13K/Akt. Εκτός από τη σήμανση του mTOR, υπάρχουν αρκετά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην σηματοδότηση ILK (FOX3, HSPA8, CYCLIND1, DNAJB6 και πολλά άλλα) με προς τα άνω ρύθμιση.

Επιπλέον οι Sobinoff et al., εξέτασαν σε ζώα τη χρήση 3-Methylcholeanthrene (μεθυλοχολανθρίνης 3MC), η οποία προκαλεί ΠΩΑ μέσω της εξάντλησης των ωοθυλακίων. Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών προσπάθησε να διειλεκάνει τους πολύπλοκους μηχανισμούς της ωοτοξικότητας και τα συμπληρωματικά φαινόμενα της ατρησίας και της ανώμαλης ενεργοποίησης των αρχέγονων ωοθυλακίων. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες γονιδίων οι οποίες συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φαρμάκων, στον κυτταρικό θάνατο, στις γενετικές ανωμαλίες και στους καρκίνους. Η ατρησία των ωοθυλακίων, η μείωση των αρχέγονων ωοθυλακίων και η ενεργοποίησή τους, φαίνεται βασίζονται στη φωσφορυλίωση των Akt1, pTsc2 και pmTOR(S2448) τα οποία αυξάνονται σημαντικά, ενώ αντίστοιχα σημαντικά μειώνεται το pmTOR

(T2446). Η αναστολή των PI3K σε καλλιέργειες ωοθηκών με 3MC έχει οδηγήσει σε πλήρη ενεργοποίηση των πρώιμων ωοθυλακίων.

Επιπλέον ο υποδοχέας της Λεπτίνης LepRb και η ίδια η λεπτίνη κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των ωοθηκών. Τα ποντίκια Y123F, τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένους υποδοχείς λεπτίνης με την φαινυλαλανίνη να έχει αντικατασταθεί από τρεις τυροσίνες (9Tyr985, Tyr1077 και Tyr 1138), σε ομόζυγη μορφή, φαίνεται ότι έχουν ατροφικές ωοθήκες και μη φυσιολογικά εξαντλημένα ωοθυλάκια (Tu et al., 2015). Σε αυτά τα μοντέλα ποντικών, τα αυξημένα επίπεδα των FSH και LH και E2 στην κυκλοφορία του αίματος παρατηρήθηκαν στην ηλικία των 12 εβδομάδων. Επιπλέον η έκφραση των CYP19A1 και phospho-STAT5 αυξήθηκαν σημαντικά. Αυτές οι διαφορές άρχισαν να παρατηρούνται σε ποντίκια Y123F τεσσάρων εβδομάδων (Tu et al., 2015). Οι συγγραφείς έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται το μονοπάτι σήμανσης JAK2-STAT3/STAT5. Επιπλέον, η ομόζυγη μετάλλαξη του LepR σε θηλυκά ποντίκια Y123F, παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα AMH τόσο στον ορό όσο και στις ωοθήκες, μειωμένα πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια και καθόλου ωχρά σωμάτια (Xia et al., 2009). Επίσης έχει βρεθεί ότι η αυξημένη φωσφορυλίωση της προς τα κάτω ρύθμισης των Akt, mTOR, S6K1, και eIF4B αλλά και η παράλληλη μειωμένη φωσφορυλίωση των IRS-1, IRS-2 και PTEN λαμβάνει χώρα και στις δύο ωοθήκες. Καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της μετάλλαξης του μονοπατιού PTEN/ PI3/ Akt/ mTOR από την μετάλλαξη LepR οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα.

### 6.2.3.3 VEGF

Αρκετά γονίδια έχουν προταθεί ότι συμβάλουν στην ανάπτυξη της ΠΩΑ, όπως το VEGF και ένας από τους υποδοχείς του, ο KDR. Οι Kezele et al. (2005) χρησιμοποίησαν μια συστοιχία γονιδίων που περιέχει 14000 γονίδια για να συγκρίνουν το μεταγράφομα στις ωοθήκες στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης και αναλύθηκαν αρχέγονα και πρωτογενή ωοθυλάκια. Βρέθηκε ότι 148 γονίδια ρυθμίζονται προς τα άνω (όπως η αρωματάση P450 και το γονίδιο της α υποομάδας της ινχιμπίνης), ενώ 50 γονίδια αναστέλλονται μέσω της προς τα κάτω ρύθμισης (όπως ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας II και το σύμπλεγμα κερατίνης 1), στα αρχέγονα και μη συναρμολογημένα ωοθυλάκια. Επίσης περίπου 80 γονίδια ρυθμίζονται αυξητικά (όπως το σύμπλεγμα μεταλοπρωτεΐνης 7 και η καθεψίνη S) και 44 γονίδια αναστέλλονται μέσω της προς τα κάτω ρύθμισης (όπως το γονίδιο της ινχιμπίνης α και της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου) ανάμεσα στα αρχέγονα και τα πρωτογενή ωοθυλάκια. Ανάμεσα στις τρεις αυτές φάσεις, αναγνωρίστηκαν 2332 κοινά γονίδια ενώ 146/95/151 γονίδια αναγνωρίστηκαν στις καταστάσεις των αποσυναρμολογημένων, αρχέγονων και

πρωτογενών ωοθυλακίων αντίστοιχα. Η επιστημονική αυτή ομάδα βάσιζε τα ευρήματα της στην υπάρχουσα θεωρία ότι η ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων και ο ρυθμός μετάπτωσής τους επηρεάζει τον συνολικό αριθμό των πρωτογενών ωοθυλακίων. Μια δυσλειτουργία σε αυτή τη διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη εμμηνόπαυση και/ή σε ΠΩΑ. Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, υπάρχουν αρκετά γονίδια τα οποία ρυθμίζονται αρνητικά ή θετικά με ανάστροφο ή συγχρονισμένο μοτίβο. Η έκφραση του γονιδίου VeGF και της ιντερλευκίνης 1 αυξάνεται μέσω της προς τα άνω ρύθμισης κατά την μετάπτωση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε πρωτογενή. Αυτοί οι παράγοντες πιθανότατα διαδραματίζουν και έναν επιπλέον ρόλο συγχρονισμού, εκτός από το ρόλο που έχουν στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων στη συγκεκριμένη φάση. Επίσης και άλλα γονίδια μπορεί να έχουν διαφορετικούς ρόλους σε κάθε φάση του ωοθυλακίου όπως το MIS το οποίο ρυθμίζεται αυξητικά κατά την συναρμολόγηση του αρχέγονου ωοθυλακίου ενώ επίσης ρυθμίζεται αρνητικά κατά την μετάβαση των ωοθυλακίων στην πρωτογενή φάση. Η περαιτέρω λεπτομερής ανάλυση του φαινομένου αυτού βρίσκεται εκτός των σκοπών της συγκεκριμένης ανασκόπησης.

Οι Zimmermann et al. (2003), εξέτασαν τη συσχέτιση της αγγειογένεσης μέσω του VeGFR-2 με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων μέσω της γοναδοτροπίνης σε θηλυκά ποντίκια χωρίς υπόφυση (hypophysectomized CD1 mice). Σε αυτό αναφέρουν ότι ενδοωθηκικά το μονοπάτι VeGF/VeGFR-2 είναι απαραίτητο στην αγγειογένεση που εξαρτάται από την αγγειοτροπίνη αλλά και στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Με τη χρήση του ουδετεροποιητή VeGFR-2 Ab, οι γοναδοτροπίνες οι οποίες χορηγούνται εξωγενώς δεν μπορούν να οδηγήσουν τα ωοθυλάκια σε ανάπτυξη στην κατάσταση της προωορρηξίας. Συμπεραίνουν ότι η δραστηριότητα του VeGFR-2 είναι απαραίτητη για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων μέσω της γοναδοτροπίνης. Αντίθετα, η αποτρεπτική δράση της VeGFR-2 επεμβαίνει στην κατασκευή του άντρου, την αποτροπή της ατρησίας μέσω της γοναδοτροπίνης και την έκκριση της προγεστερόνης και οιστραδιόλης μέσω της γοναδοτροπίνης.

Οι Nakhuda et al., (2005) χορήγησαν το αντίσωμα E4G10 το οποίο αναστέλλει την VE-cadherin (VE-C) μέσω του μονοπατιού VeGFR-2, σε ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί η υπόφυση και υπέστησαν διέγερση μέσω γοναδοτροπίνης. Εκεί βρέθηκε ότι η VE-C εκφράζεται στην ωοθήκη, ότι ο E4G20 αναστέλλει την αγγειογένεση στην ωοθυλακική και ωχρινική φάση, ότι δεν επηρεάζει το ωχρο σωματίο στην κύηση καθώς και δεν επηρεάζει το αγγειακό σύστημα του νεφρού στην ωοθυλακική και ωχρινική φάση. Αυτό το ανασταλτικό αποτέλεσμα μοιάζει να λειτουργεί μέσω του μονοπατιού αγγειογένεσης.

Σε μελέτη των Joen et al., (2011) οι πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις του VeGF έχουν συσχετιστεί με το ρίσκο για την ανάπτυξη ΠΩΑ στις γυναίκες από την Κορέα. Ειδικότερα η μετάλλαξη VeGF - 115G>A και ο συνδυαστικός γονότυπος - 2578CA+AA/-1154GA+AA καθώς και ο απλότυπος -2578A/-1154A, έχουν συσχετιστεί στατιστικά σημαντικά, με την εμφάνιση ΠΩΑ στις γυναίκες με καταγωγή από την Κορέα, αλλά ο μηχανισμός αυτός δεν μπορεί να γενικευτεί σε άλλους εθνικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, οι Rah και συν. (2013), έδειξαν ότι οι φορείς του αλληλόμορφου

KDRj604C ( j604TC και j604ΨΨ γενότυποι, j604TC+CC/1192GG συνδυαστικός γονότυπος, j604C/1192G/1719T απλότυπος, j604C/1192G απλότυπος, j604C/1719T απλότυπος) είναι σημαντικά πιο επικρατείς στους ασθενείς με ΠΩΑ.Επομένως,τα αλληλόμορφα KDRj604C πιθανά αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΠΩΑ στις γυναίκες από την Κορέα.

Από την άλλη τα γλυκοσίδια τρυπτεριγίου (TG) τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία των φλεγμονοδών και αυτοάνοσων παθολογικών καταστάσεων όπως και στη θεραπεία των όγκων,επιφέρουν αναπαραγωγική τοξικότητα οδηγώντας σε ΠΩΑ.Για να εκτιμηθούν οι θεραπευτικές ιδιότητες του TongmaiDasheng (TMDST- παραγόμενο από 17 παραδοσιακές φαρμακευτικές ουσίες της κινέζικης ιατρικής) στην ΠΩΑ,προκαλούμενη των TG, οι Fu και συν., χρησιμοποίησαν TMDST (σε διάφορες δόσεις) σε σύγκριση με άλλους φαρμακευτικούς παράγοντες.Έτσι βρήκαν ότι ο TMDST αυξάνει την οιστραδιόλη και την αγγειακή ενδοθηλική έκφραση του VEGF,ενώ μειώνει τα επίπεδα TNF-a και της κασπάσης -3.Επιπλέον,η θεραπεία των ζώων με TMDST έχει οδηγήσει σε μεγαλύτερο ωθητικό δείκτη,αυξημένα επίπεδα E<sub>2</sub> και INH-B,γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του TMDST στην αναστολή της αναπαραγωγικής τοξικότητας του TG στα επίπεδα VEGF.Καινούργια δεδομένα σχετικά με τη σχέση της VEGF με την ΠΩΑ μπορεί να καθιερώσουν την αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου παράγοντα και των ισομορφών του ως θεραπευτικό δείκτη,είτε όταν χορηγείται μόνος του είτε σε συνδυασμό με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες.Ο VEGF εκφράζεται σε διάφορα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης και σχετίζεται με τη δυναμική των ωοθυλακίων.Στα σκυλιά,ο VEGF εκφράζεται στα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων με άντρο και στα κοκκιώδη κύτταρα των προ-αντρικών ωοθυλακίων.Σε καλλιέργειες φλοιού των ωοθηκικού ιστού,δεν εκφράζεται στα κοκκιώδη κύτταρα των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων.Ο VEGF προκαλεί μείωση στον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων και ταυτόχρονα αυξάνει τα πρωτογενή ωοθυλάκια τα οποία φτάνουν στα δευτερεύοντα προ -κοιλοτικά στάδια ανάπτυξης μετά από 7 και 14 ημέρες καλλιέργειας (Abdel-Ghani et al., 2014).Είναι γνωστό ότι η AMH στρατολογεί τα αρχέγονα ωοθυλάκια και αναστέλλει την δραστική ωοθυλακική ανάπτυξη προκαλούμενη της FSH.Ωστόσο η AMH επηρεάζεται από την καταστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών και την αναστολή VEGF. Ο VEGF επάγει την έκφραση του AMHR2 στην επιφάνεια απομονωμένων GCs από ώριμα ωοθυλάκια. (Fang *et al*, 2016)

Κατά την μεταμόσχευση ανθρώπινου ομφάλιου λώρου HUCMSC-MVs (μικροκυστίδια τα οποία προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα), σε ποντίκια με ΠΩΑ λόγω χημειοθεραπείας, παρατηρείται μια αύξηση στον αριθμό των ωοθυλακίων (αρχέγονων,αναπτυσσόμενων και προ-ωοθυλακιοωρηκτικών).Επιπλέον,σε αυτά τα ποντίκια παρατηρείται αγγειογένεση στην ωοθήκη και αύξηση των αγγειογενετικών κυτοκινών (συμπεριλαμβανομένων των VEGF, IGF και αγγειογενίνη, Yang et al., 2019).Η έκφραση των επιπέδων της συνολικής AKT, p-AKT αυξάνεται γεγονός που υποδηλώνει αύξηση της αγγειογένεσης μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT.

#### 6.2.3.4 TGFβ, FOXL2 και FOXO3A

Οι Elvin et al. (1999) επικεντρώθηκαν στο ρόλο του GDF-9, ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών TGF-β, στην ωοθυλακιογένεση σε μύες. Σε ποντίκια με έλλειψη GDF-9 δεν ανιχνεύθηκαν κυτταρικοί δείκτες κυττάρων θήκης, τα άθικτα ωοκύτταρα περιείχαν μόνο ένα επίπεδο κοκκιωδών κυττάρων, ενώ τα κοκκιώδη κύτταρα δεν μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν και να υποστούν απόπτωση. Αν και το c-kit mRNA επικεντρώνεται στα ωοκύτταρα και στα διάμεσα κύτταρα θήκης, σε ποντίκια η έλλειψη του GDF-9 βρίσκεται μόνο στα ωοκύτταρα. Επιπλέον, στα ωοθυλάκια με κοκκιώδη κύτταρα προς εκφυλισμό, εκφράζεται η ινχιπίνη A. Συγκεντρωτικά κατέληξαν στο γεγονός ότι ο GDF-9 είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη των κοκκιωδών κυττάρων.

Οι Pangas et al. (2006), συσχέτισαν το SMAD4, ένα μέλος της υποεριοκογένειας των TGFβ, με την πρόωρη ωχρινοποίηση (πρόωρη αύξηση των επιπέδων προγεστερόνης) και οι ανωμαλίες που εμφανίζονται στον ωοφόρο δίσκο. Ειδικότερα τα ποντίκια (specific knockout) SMAD4  $-/-$  χαρακτηρίζονται από σημαντική μείωση της γονιμότητας (σημαντικά λιγότερες γεννήσεις), μείωση των ρυθμών ωορρηξίας, προβλήματα στα προ-ωοθυλακιορρηκτικά θυλάκια και στην επέκταση του ωοφόρου δίσκου, καθώς και από αυξημένα επίπεδα έκφρασης Inh A στα κοκκιώδη κύτταρα του ωοθυλακίου. Αναφέρουν επίσης ότι η απώλεια του SMAD4 επηρεάζει την έκκριση προγεστερόνης και ότι η υπεριοκογένεια TGFβ είναι υπεύθυνη για την καθιέρωση του χρόνου ωχρινοποίησης. Παράλληλα, η υπεριοκογένεια TGFβ συμμετέχει σε αρκετές διαδικασίες στα κοκκιώδη κύτταρα όπως ο πολλαπλασιασμός τους, η διαφοροποίηση και η ρύθμιση της στεροειδογένεσης.

Οι Nilson et al., μελέτησαν τα αποτελέσματα της anti-Mullerian ορμόνης (AMH) στη μετάβαση από αρχέγονα σε πρωτογενή ωοθυλάκια καθώς και σε διάφορους διεγερτικούς παράγοντες. Η ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε ότι η AMH αλλοίωσε τη μεταγραφή 707 γονιδίων. Πολλά από τα μετάγραφα αυτά εμπλέκονται στα μονοπάτια MAPK και TGFβ. Επιπλέον, η AMH αναστέλλει την διεγερτική δράση των KITL, bFGF και KGF στην μετάβαση των ωοθυλακίων. Η AMH πιθανότατα επηρεάζει την μετάβαση αυτή μέσω μείωσης της διαφοροποίησης και της αγγειογένεσης των κυττάρων.

Η σήμανση TGFβ είναι σημαντική για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων. Η σηματοδότηση TGFβ και οι παράγοντες μεταγραφής SMAD2/3 έχουν δείξει ότι υπάρχει ένα μοτίβο έκφρασης εξειδικευμένο για τα κοκκιώδη κύτταρα και τα μικρά ωοθυλάκια. Τα SMAD2/3 εκφράστηκαν στον πυρήνα των αρχέγονων κοκκιωδών κυττάρων αλλά δεν αναγνωρίστηκαν στα ωοθυλάκια που βρίσκονταν σε φάσεις πρώιμης ανάπτυξης (Hardy et al., 2018).

Όταν χορηγείται TGF-β1 (2,5, 12,5, 62,5 μg/kg σωματικού βάρους) για 3 ημέρες σε νεοσσούς πέντε ημερών, η δόση 12,5 μg/kg έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων και τη μείωση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων που αναπτύσσονται. Μετά από αυτή τη θεραπεία με τον TGF-β1, η διάμετρος και μέγεθος των ωοκυττάρων και των ωοθυλακίων μειώθηκαν. Το αρνητικό αποτέλεσμα του TGF-β1 στην πρόωμη ανάπτυξη των ωοθηκών μπορεί να διακοπεί με θεραπεία του αναστολέα SD208, ο οποίος προκαλεί αύξηση της έκφρασης των στεροειδογενετικών ενζύμων και των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κύκλο του κυττάρου. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η TGF-β1 μπορεί να διατηρήσει το σύνολο των γεννητικών κυττάρων περιορίζοντας την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων (Zhou et al., 2019).

Τελικά, η AMH θεωρείται ως ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζει την στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων από το ωοθηκικό εναπόθεμα. Αρχικά, προτάθηκε ότι η ανασυνδυασμένη AMH όταν χορηγείται με χημειοθεραπεία, πιθανά να περιορίζει την εξάντληση των ωοθυλακίων (Sonigo et al., 2019). Οι ίδιοι συγγραφείς χορήγησαν σε ποντίκια κυκλοφωσφαμίδη (Cy) η οποία πυροδοτεί το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K και την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων. Όταν χορηγήθηκε και ανασυνδυασμένη AMH, η αξιολόγηση του συνολικού αριθμού από αρχέγονα ωοθυλάκια έδειξε ότι η απώλεια των PMF επαγόμενη της cyclophosphamide (Cy) αναστέλλεται. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του FOXO3A, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων ήταν σημαντικά μειωμένη (Sonigo et al., 2019). Λαμβάνοντας υπόψιν συνδυαστικά τα αποτελέσματα αυτά, υποστηρίζεται ένας προστατευτικός ρόλος της AMH ενάντια στην απώλεια των ωοθυλακίων επαγόμενη της (Cy). (Sonigo et al., 2019)

Η CPEB είναι μια πρωτεΐνη η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του RNA και ρυθμίζει την μετάφραση μέσω πολυαδενυλίωσης. Οι Racki et al. (2006), χρησιμοποίησαν ποντίκια CPEB και έδειξαν ότι οι ωοθήκες τους διέθεταν ωοθυλάκια με σημαντικά ποσοστά κοκκιωδών κυττάρων με απόπτωση και προοδευτική μείωση στον αριθμό των ωοκυττάρων (οι ωοθήκες εξετάζονται μέχρι τους 10 μήνες ζωής). Τα κοκκιώδη κύτταρα αναπτύχθηκαν με μη συμμετρικό τρόπο ενώ τα ωοκύτταρα χαρακτηρίζονται από διάφορα μη φυσιολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (δηλαδή τριπολικούς άξονες, μονοπολικούς άξονες, πολικά σώματα με συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, πολικά σώματα με ωοκύτταρα στις αντίθετες πλευρές και κακώς σχηματισμένους πυρήνες με ή χωρίς πυρηνικές μεμβράνες). Τα ωοκύτταρα με μειωμένα επίπεδα CPEB, υφίσταντο παθολογική ενεργοποίηση με ανωμαλίες κατά την διαίρεση της ατράκτου. Επιπλέον, η ιστολογική εξέταση έδειξε ότι τα ωοθυλάκια που περιείχαν δύο ωοκύτταρα και μία μόνο στιβάδα κοκκιωδών κυττάρων ή ωοθηκική κύστη. Η CPEB δεσμεύει τα αρκετά ωοκυτταρικά mRNA σε (knockout) ποντίκια και ένα από αυτά, το Gdf9 RNA έχει μειωμένη έκφραση και μικρότερη ουρά poly-(A).

Οι Racki et al, συσχέτισαν τους παρατηρούμενους φαινότυπους των ωοθυλακίων/ωοκυττάρων με τους χαρακτηριστικούς φαινότυπους σε περιπτώσεις ΠΩΑ. Επιπλέον οι Liu et al, πρότειναν ότι η προς τα κάτω ρύθμιση του FOXO3 σε

ωοκύτταρα ποντικών προκαλεί υπογονιμότητα, αναστολή του πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων, μείωση του υποδοχέα της FSH, την προς τα κάτω ρύθμιση του BMP15, της connexin 37 και 43 και τη μείωση του μεγέθους των ωοκυττάρων, ανοθυλακιορρηξία και ωχρινοποίηση των μη διαρηγμένων ωοθυλακίων.

Ωστόσο, τα μονοπάτια Akt, mTOR και MAPK δεν επηρεάζονται. Πρότειναν επίσης ότι η καταστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης της FOXO3, οδηγεί σε εξασθένιση των συνενώσεων (gap junctions) των ωοκυττάρων και κοκκιωδών κυττάρων μέσω αρνητικής ρύθμισης της κονεξίνης 37. Τα αποτελέσματα είναι χαμηλότερη διάμετρος ωοκυττάρων και η κατακράτηση του πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων λόγω αρνητικής ρύθμισης του BMP15 και ακολούθως του Smad μονοπατιού. Σε μια εκτεταμένη έρευνα για το ρόλο του p27 στην ανάπτυξη των ωοθηκών, οι Rajareddy et al., (2007) βρήκαν ότι η απώλεια της p27 στα διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί σε αυξημένο αριθμό ωοθυλακίων, ενεργοποίηση του συνόλου των αρχέγονων ωοθυλακίων και πρόωρη εξάντληση των ωοθηλακίων μέχρι την ηλικία των 12 εβδομάδων. Η αναστολή του Cdk2 και Cdc2 καταστέλλει την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων στα ποντίκια αυτά, ενώ οι p27 και FOXO3 αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

Τέλος, οι Hanrahan et al., (2004), ανακάλυψαν ότι μεταλλάξεις στα γονίδια BMP15 και GDF9 σε πρόβατα σχετίζονται με αυξημένους ρυθμούς ωορρηξίας σε ετερόζυγους φορείς και με στειρότητα σε ομόζυγους φορείς. Για να μελετήσουν περαιτέρω το ρόλο του FOXL2 οι Kim et al. (2010) εξέτασαν πως το γονίδιο FOXL2 ενεργοποιεί την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων και το ρόλο που παίζει η μετάλλαξη του FOXL2 c.402C4G στη δημιουργία όγκων στα κοκκιωδή κύτταρα. Βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο FOXOL2 προκαλούσε ελάχιστο κυτταρικό θάνατο επειδή δεν ήταν ικανό να πυροδοτήσει την πλήρη αποπτωτική σηματοδότηση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, υπογράμμισαν το σημαντικό ρόλο του BAK και την εμπλοκή της κασπάσης 8 στην προς τα άνω ρύθμιση των υποδοχέων απόπτωσης. Ωστόσο, τα μεταλλαγμένα γονίδια FOXOL2 απέτυχαν στο να επιφέρουν απόπτωση μετά από συγκεκριμένα αποπτωτικά ερεθίσματα. Συνοψίζοντας το ρόλο του FOXOL2 στην φυσιολογία των ωοθηκών, οι Caburet και συν., (2012), ανέφεραν ότι το FOXOL2, μέσω συγκεκριμένων στόχων, εμπλέκεται στη δημιουργία ωοθυλακίων, στη ρύθμιση της χοληστερόλης και τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών, της ωοθυλακιορρηξίας, στην φλεγμονή, στην απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων, σε διαδικασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική προσκόλληση. Επιπλέον, το FOXOL2 αποτρέπει την τρανσ-διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων της ωοθήκης σε κύτταρα που μοιάζουν με τα κύτταρα Sertoli. Έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 260 μεταλλάξεις του FOXOL2. Για να καθορίσουν το ρόλο των μεταλλάξεων αυτών, στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της ΠΩΑ, οι Kuo και συν., (2011) εκτέλεσαν πειράματα διαμόλυνσης φορέων και παρατήρησαν ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο FOXOL2 μπορεί να ασκεί κυρίαρχα ένα αρνητικό αποτέλεσμα στην καταστολή του CYP 19 μέσω του FOXL2. Αμφότερα και οι δύο τύποι καθώς και η μετάλλαξη του FOXL2 δύναται να δημιουργήσουν

ομοδιμερή και ετεροδιμερή ενώ μπορούν να συνδέσουν δύο πιθανές περιοχές πρόσδεσης του FOXL-2 (-57 bp περιοχές του CYP19). Οι μεταλλάξεις συνέκφρασης του FOXL2 και η απώλεια της δεσμευτικής δράσης του FOXL2 επηρεάζουν την στερεοειδογένεση και τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Σε γυναίκες, η έκφραση μικρότερων επιπέδων Foxo3a, FoxL2 και p27 mRNA αλλά και χαμηλότερη έκφραση των AMH, PTEN και AMHR2 έχουν παρατηρηθεί σε βιοψίες ωοθηκών από ΠΩΑ (Thanatsis et al., 2019). Επίσης τα τελευταία έτη έχουν προταθεί και θεραπευτικές εφαρμογές όπως η χορήγηση της μελατονίνης η αποτρέπει τα αποτελέσματα της σισπλατίνης σε σηματοδοτικά μονοπάτια και συγκεκριμένα τη φωσφορυλίωση της PTEN, AKT, το GSK3β και το FOXO3a που ευοδώνουν την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων. Ακόμα, αναστέλλει την φωσφορυλίωση και την πυρηνική εξαγωγή του FOXO3a που είναι απαραίτητη προκειμένου ο πυρήνας να διατηρήσει την αδράνεια των αρχέγονων ωοθυλακίων. Επομένως με την αποτροπή της φωσφορυλίωσης των μονοπατιών PTEN/AKT/FOXO3a αποτρέπεται και η απώλεια των ωοθυλακίων (Jangetal., 2016).

Η στοχοποιημένη διακοπή του p27 πραγματοποιείται μέσω της απώλειας του Skp2 και την επακόλουθη συγκέντρωση της p27 πρωτεΐνης, όπως έχει παρατηρηθεί στις ωοθήκες ποντικών. Η γονιμότητα επηρεάζεται ενώ μειώνονται σημαντικά τα ποσοστά εγκυμοσύνης και αυξάνεται η απόπτωση και οι απώλειες των πόρων των ωοθυλακίων. Επίσης παρατηρείται ΠΩΑ και επακόλουθη αναστολή της αναπαραγωγικής δραστηριότητας στα θηλυκά ζώα. Ωστόσο, δεν αναφέρονται άλλες ανωμαλίες στις σάλπιγγες ή στη μήτρα. Η εκτενής συγκέντρωση της p27 αναμένεται επίσης να αναστείλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την παραγωγή λειτουργικών γαμετών, επομένως και τη γονιμότητα.

Οι Lechowska και συν., (2011) μελέτησαν την εμβρυική ανάπτυξη ποντικών των οποίων οι ωοθήκες εμφάνισαν έλλειψη του γονιδίου NOBOX μέσω ανάλυσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στη σύγκριση των ωοθηκών και ωοθηκών με έλλειψη του γονιδίου NOBOX βρέθηκε ότι τα δεύτερα είχαν κύστες βλαστικών κυττάρων που αποτελούνταν από πρώιμα ωοκύτταρα και συνδέονταν μεταξύ τους μέσω ενδοκυτταρικών γεφυρών με χαρακτηριστικές γέφυρες πυκνές σε ηλεκτρόνια. Αν και οι ωοθήκες αρχικά φαίνονταν ανεπηρέαστες, η βαθύτερη εξέταση έδειξε ότι τα σωματικά κύτταρα είχαν ένα περιορισμένο αριθμό από μικρές προβολές οι οποίες δεν εισέβαλαν ωστόσο ανάμεσα στα ωοκύτταρα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συγκυτιακών ωοθυλακίων με πολλές ανωμαλίες που είχαν μη διαιρεμένα συσσωματώματα ωοκυττάρων. Η απουσία φυσιολογικών πρώιμων ωοθυλακίων καθώς και η ύπαρξη συνδέσεων ανάμεσα στα μη διαιρεμένα ωοκύτταρα, έδωσε στα ποντίκια της κατηγορίας αυτής έναν φαινότυπο ΠΩΑ.



#### 6.2.4 Αυτοανοσία

Οι Maity et al., (1997) συσχέτισαν την ωθηκίτιδα μετά από θυρεοειδοεκτομή με ανωμαλία στη λειτουργία των κυττάρων NK. Μετά την εξέταση 110 κινέζων ασθενών, με ιδιοπαθή ΠΩΑ, οι Qin et al., (2011) υπέθεσαν ότι η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία της πολυαλανίνης στο γονίδιο FOXE1, μπορεί να αποτελεί αιτιολογία για το μοριακό υπόβαθρο της ΠΩΑ. Με τους ασθενείς με ΠΩΑ συσχετίστηκαν 3 παραλλαγές του μήκους του γονιδίου FOXE1-πολυαλανίνη και πέντε διαφορετική γονότυποι (14/14, 16/16 και 14/16). Τελικά εξήγαγαν το συμπέρασμα ότι η εμφάνιση της παραλλαγής 14 σε σχέση με το 16 αυξάνει το ρίσκο για την ανάπτυξη ΠΩΑ.

Επιπλέον, οι Dal et al., (2003), συσχέτισαν την ΠΩΑ με το αυτοάνοσο νόσημα του Addison. Σε τρεις διαφορετικές ομάδες (ασθενείς ΠΩΑ με Addison, ασθενείς ΠΩΑ χωρίς Addison και ομάδα ελέγχου, αναλύθηκαν βιοχημικοί δείκτες του ορού του αίματος, τα αυτοαντισώματα παραγωγής ορμονών StCA, τα αυταντισώματα 17α-OH και P450scc και τα αυτοαντισώματα του φλοιού των επινεφριδίων. Η ανάλυση έδειξε ότι στην πλειοψηφία των ασθενών ΠΩΑ με Addison, βρέθηκαν και τα τρία αντισώματα, ενώ στους ασθενείς ΠΩΑ χωρίς Addison καθώς και σε ασθενείς ΠΩΑ χωρίς αυτοάνοσες ασθένειες, βρέθηκαν τα συγκεκριμένα αντισώματα αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Προτάθηκε επίσης το γεγονός ότι οι μετρήσεις των αντισωμάτων ACA/21-OH σε συγκεκριμένους ασθενείς με ΠΩΑ μπορεί να είναι σημαντικός δείκτης στην ανίχνευση της πιθανότητας για τη δημιουργία ΠΩΑ. Η μελέτη των αντισωμάτων ACA, 21-OH, StCA, 17α-OH, P450scc σε ασθενείς με διάφορες μορφές αυτάνοσων νόσων των επινεφριδίων (αυτάνοσο πολυαδενικό σύνδρομο-APS τύπου I, APS τύπου II και ασθενείς με ΠΩΑ και Addison) έδειξε ότι το αυτοαντίσωμα 17α-OH συμβαίνει πιο συχνά στους ασθενείς ΠΩΑ με APS (τύπου I και II) και σε ασθενείς ΠΩΑ χωρίς σύνδρομο Addison. Στις ομάδες ασθενών που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν και τα αυτοαντισώματα StCA, 17α-OH, P450 αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (λιγότερο από 50%). Ως συνέπεια, η μέτρηση των παραπάνω επινεφριδικών αυτοαντισωμάτων μπορεί να είναι αποτελεσματική στη διαφορική διάγνωση της επινεφριδικής ανεπάρκειας.

Οι Pires et al., (2009), μελέτησαν υπογόνιμες γυναίκες οι οποίες δεν είχαν ιστορικό αυτοάνοσων ασθενειών, και επικεντρώθηκαν στην καλά διατηρημένη ανάμεσα στα είδη πρωτεΐνη EP-90, η οποία εκφράζεται σε όλα τα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Η πρωτεομική ανάλυση (φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης και δίδυμη φασματομετρία μάζας), έδειξε ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι ομόλογη με την HSP90b. Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα ανθρώπινου HSP90b, έχει βρεθεί ότι αντιδρά σε εκλουσμένη πρωτεΐνη. Επίσης ορός ο οποίος είναι θετικός σε EP-90, έδειξε ισχυρή ανοσοδραστικότητα στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων και των κυττάρων θήκης. Κατά την εμβρυογένεση, έχει αναγνωρισθεί ότι η EP-90 υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των μη γονιμοποιημένων ωοκυττάρων (μέσω ανοσολογικής χρώσης) σε έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων, σε βλαστοκύστες και σε μορίδια, αλλά όχι σε

μη γονιμοποιημένα ωκύτταρα. Συμπεραίνοντας, αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να εμπλέκεται στην αυτοανοσία του ανθρώπινου ωαρίου και να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην πρόωμη ωθηκική ανεπάρκεια, ενώ οι ίδιες τεχνικές μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη μη επεμβατική διάγνωση της ΠΩΑ.

Επιπλέον, οι Mande et al., (2012), επικεντρώθηκαν σε 3 ανοσοεπικρατή αυτοαντιγόνα που προκαλούν ανεπάρκεια ωθηκών: a-actin-4 (ACTN4), πρωτεΐνη θερμικού σοκ 5 (HSPA5) και τη β ακτίνη (ACTB). Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρεται ότι παίζουν πολλαπλούς και σημαντικούς ρόλους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και στα συστήματα των κυττάρων αυτών, ενώ έχουν εμπλακεί και σε άλλες αυτοάνοσες παθολογικές καταστάσεις. Στην περίπτωση που τα ποντίκια ήταν ανοσοποιημένα με πεπτίδια απέναντι στις τρεις αυτές πρωτεΐνες, παρατηρούνταν μια σημαντική μείωση στην γονιμότητά τους. Η παράταση του διοίστρου μαζί με την καθυστέρηση της κύησης, καθώς και η απορρόφηση του εμβρύου, υποδηλώνουν την ύπαρξη κάποιου αυτοάνοσου μηχανισμού.

Έχουν επίσης παρατηρηθεί, αδύναμη μορφολογία στις ωθήκες, διαφορές στον αριθμό των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων, κατακράτηση ωρίμανσης των ωοθυλακίων στο στάδιο του άντρου και αύξηση σε άτρητα ωοθυλάκια (παρουσία πυκνωτικών ωοκυττάρων). Υπογραμμίζεται η σχέση των τριών αυτών ωθηκικών αντιγόνων στην ωθηκική ανάπτυξη καθώς και ο ρόλος τους σαν στόχος αυτοανοσίας.

Επιπλέον οι Bagavant et al., (1999) ανίχνευσαν τους ανοσολογικούς μηχανισμούς της αυτοάνοσης ασθένειας ωθηκών σε δύο μοντέλα ποντικών. Οι συγγραφείς υπέβαλαν ποντίκια με ΠΩΑ σε θυρεοειδεκτομή την Τρίτη ημέρα. Αν λάβουμε υπ' όψιν ότι η ωθηκική ατροφία περιορίζει τη λειτουργία των ωθηκών, οι ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν στους κύκλους του οίστρου των ποντικών αποδίδονται στην ατροφία των ωθηκών. Η έγχυση του πεπτιδίου ZP3 σε ενεργά ανοσοποιημένα ποντίκια οδήγησε σε στειρότητα, η οποία συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα του πεπτιδίου ZP στον ορό αλλά όχι με φλεγμονή στις ωθήκες. Η μεταφορά των T-κυττάρων που είναι εξειδικευμένα στο Pz3 σε συγγενικά υγιή ποντίκια προκάλεσε σοβαρή ωθηκίτιδα και αυξημένα επίπεδα m-RNA προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Στα ζώα αυτά, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων η οποία προκαλείται από τη γοναδοτροπίνη δεν επηρεάστηκε από την σοβαρή ωθηκίτιδα και την προ-φλεγμονώδη έκφραση των κυτοκινών. Ωστόσο, η μεταφορά των T κυττάρων που προκαλούνταν από την ωθηκίτιδα δεν επηρέασε την στειρότητα. Σε μια άλλη μελέτη, οι Bagavant et al., (2002) εξέτασαν τις συσχετίσεις ανάμεσα στην αυτοανοσία με ΠΩΑ σε ανοσοποιημένα πρωτεύοντα (*Macaca fascicularis*) με το ανθρώπινο πεπτίδιο ZP3. Εκεί παρατήρησαν έναν πολλαπλασιασμό των T κυττάρων χωρίς όμως να ανιχνευτούν ωθηκίτιδα ή διαφορές στις στεροειδείς ορμόνες. Ένα μόνο ζώο παρουσίασε κοκκώδη ωθηκίτιδα, είχε διαταραχές στον καταμήνιο κύκλο και επακόλουθες αλλοιώσεις στη δημιουργία στεροειδών ορμονών.

Οι Fu et al., (2007) εξέτασαν τα αποτελέσματα του στοματικά χορηγούμενου πεπτιδίου της μωρίνης ZP3 σε οξεία αυτοάνοση ωθηκίτιδα. Ο κύκλος οίστρου των ζώων ομαλοποιήθηκε, αυξήθηκαν τα CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> και τα T κύτταρα, μειώθηκαν τα

αυτοαντισώματα ZP ενώ τα ζώα έδειξαν μειωμένη θνησιμότητα λόγω ωοθηκίτιδας. Τελικά, οι Shietal., (2009), απέδειξαν ότι η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή και ανδρογόνα, βελτιώνει τα συμπτώματα της ΠΩΑ μέσω ρύθμισης των επιπέδων AzrAB στον ορό.

Μια μελέτη η οποία συσχέτισε την πρόοδο των αυτάνοσων ασθενειών με την ωοθήκη (Otanieta., 2015), εξέτασε τη λειτουργία των C57BL/6, MRL/MpJ και MRL.MpJ-Fas lpr/lpr στις ωοθήκες των ποντικών. Τα MRL/MpJ ποντίκια είναι επιρρεπή σε αυτοάνοσες ασθένειες, ενώ τα MpJ-Fas lpr/lpr ποντίκια έχουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο Fas που επιταχύνει την έναρξη της ασθένειας. Οι χρώσεις στα ποντίκια MRL- έδειξαν ένα πρώιμο κοιλιακό άνοιγμα, μια μείωση στον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων και των ωχρών σωματίων κατά το χρονικό διάστημα 3-12 μήνες σε σχέση με τα ποντίκια C57BL/6.

### 6.2.5 Γονίδια και χρωμοσώματα POF

Η πρωτεΐνη Xp18, η οποία έχει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στην ωοθήκη, έχει 4 διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες πιθανότατα βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Το αντίστοιχο γονίδιο βρίσκεται στο X χρωμόσωμα (Xq13.3-q26) (Cachotetal., 2003) και στην ΠΩΑ έχει ανιχνευτεί στην ίδια περιοχή. Η συγκεκριμένη επιστημονική ομάδα επικεντρώθηκε στο γονίδιο Xp18 σαν στόχο και τη σύνδεσή του με διάφορα σύνδρομα που προκαλούν δυσλειτουργία ωοθηκών και ειδικά με την ΠΩΑ.

Οι Handa et al., (2005), προσπάθησαν να συσχετίσουν τον τρόπο και την αταξία που παρουσιάζονται σε ασθενείς με σύνδρομο ευαίσθητου X με την ΠΩΑ. Μελέτησαν τη σημαντικότερη αιτία που οδηγεί σε νοητική υστέρηση, το σύνδρομο ευαίσθητου X, την επέκταση της τριπλέτας CGG στα 50 UTR του γονιδίου FMR1. Ανέπτυξαν έναν αριθμό από ισογενής ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν μετάγραφα με διαφορετικό αριθμό CGC επαναλήψεων ώστε να μελετήσουν το αποτέλεσμα της τοξότητας της συγκεκριμένης επανάληψης. Τα πειράματα μικροσυστοιχιών αποκάλυψαν έναν αριθμό από διαδικασίες που επηρεάζονται από την έκφραση της επανάληψη του CGG-RNA. Η πρόσδεση οξυγόνου και η συγκέντρωση  $Ca^{+}$  ελαττώνονταν μέσω της προς τα κάτω ρύθμισης ενώ η δραστηριότητα των συνοδών πρωτεϊνών και η ουβικιτινοποίηση αυξάνονταν μέσω της προς τα άνω ρύθμισης. Επιπλέον, η αύξηση των επαναλήψεων CGG οδήγησε σε αυξημένη ρύθμιση των CYFIP1, της κασπάσης 8, της νευροτενσίνης και του UBE3A, οι οποίες συσχετίζονται με την ασθένεια του Parkinson, τον αυτισμό και τον κινητήριο συντονισμό, την ισοροπία και την καλή κινητικότητα.

Οι Oldenburg et al., συμπέραναν μέσω μιας ανάλυσης σύνδεσης ολόκληρου του γονιδιώματος οικογένειας ΠΩΑ, με δύο ολλανδικές οικογένειες (δέκα άτομα συνολικά)

για δύο γενεές,ότι υπήρχε ένα ξεκάθαρο μοτίβο κληρονομικότητας.Εξετάζοντας 56957 SNPs (single nucleotide polymorphisms) παρατήρησαν ότι υπάρχει ο ίδιο απλότυπος σε όλους τους ασθενείς.Ο απλότυπος αυτός κληρονομήθηκε από τον παππού,ενώ η γιαγιά ανέπτυξε εμμηνόπαυση στην ηλικία των 50 ετών.Ο απλότυπος βασίστηκε σε τρεις γενομικές περιοχές,οι οποίες βρίσκονταν στα χρωμοσώματα 5,14 και 18.Μετά τη χαρτογράφηση των μικροδορυφορικών δεικτών,οι συγγραφείς αναγνώρισαν ότι η πιο σημαντική περιοχή για την ανάπτυξη ΠΩΑ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5. Εξετάζοντας την δεύτερη οικογένεια και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία βρέθηκε ότι μόνο οι θέσεις 5q14, 11-q15 ήταν σημαντικές.Με τον τρόπο αυτό,οι συγγραφείς προσπάθησαν να εξηγήσουν ένα μικρό υποσύνολο από περιπτώσεις ΠΩΑ που δεν οφείλονταν σε κάποιο σύνδρομο με ένα μοτίβο αυτοσωμικής επικρατούσας κληρονομικότητας.

Από την άλλη πλευρά,οι Wangetal.,(2011) προσπάθησαν να συσχετίσουν την ΠΩΑ με τους πολυμορφισμούς CXCL12 σε 111 κινέζους ασθενείς.Αυτοί οι ασθενείς δεν έχουν κληρονομική σχέση μεταξύ τους.Χρησιμοποίησαν 4 SNPs (rs1801157, rs 266978, rs266093 και rs 1029143) το οποίο συσχετιζονταν με ΠΩΑ σε γυναίκες Κινεζικής Han καταγωγής και ένα SNP (rs 4948878) η οποία συσχετίζεται με ΠΩΑ στις καυκάσιες γυναίκες.Στην ανάλυση βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην SNPrs1801157 στις γυναίκες με ΠΩΑ που είναι κινέζικης καταγωγής,γεγονός που δείχνει τη σημασία των γονιδίου CXCL12 για την ΠΩΑ.

Οι Podovano et al.,προσπάθησαν να κατανοήσουν το ρόλο του POF1B,ένα γονίδιο με γνωστή συσχέτιση με την ΠΩΑ,σε πολωμένους επιθηλιακούς ιστούς μέσα στους οποίους υπήρχαν σφιχτές συνδέσεις.Χρησιμοποίησαν το κυτταρικό μοντέλο πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων MDCK,το οποίο επιμολύνθηκε με cDNAs που κωδικοποιούν τα αλληλόμορφα POF1Bκαι R329Q.Τα κύτταρα MDCK τα οποία εκφράζουν τα POF1B και R329Q αλληλόμορφα παρεμπόδισαν τον εντοπισμό του POF1B στις σφιχτές συνδέσεις.Στα κύτταρα αυτά διατηρήθηκε η πολικότητα ενώ παρατηρήθηκαν οι οργανισμοί οι οποίοι είχαν υποστεί μεταλλάξεις.Επιπλέον παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα και αλλοιωμένη οργάνωση της F-ακτίνης, αλλοιωμένη κιλιόγνεση και κυτταρογένεση καθώς και δυναμικά ελαττώματα της ακτίνης.Συμπεραναν έτσι ότι ο εντοπισμός του POF1B σε σφιχτούς δεσμούς παίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του μονοστιβαδικού επιθηλίου μέσω της ρύθμισης της ακτίνης του κυτταροσκελετού.

Τελος, οι Wang et al., (2010) εξέτασαν 124 γυναίκες με ΠΩΑ και 100 φυσιολογικές γυναίκες για να εξετάσουν την ύπαρξη τυχόν μεταλλάξεων στο γονίδιο του αναστολέα της κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη 1B (CDKN1Bή p27) και το αν ο αναστολέας αυτός προκαλεί υπερ-ενεργοποίηση των ωοθυλακίων και τελικά ΠΩΑ.Εντοπίστηκαν μόνο δύο μεταλλάξεις: η rs 6908375 και rs2066827,οι οποίες βρέθηκαν τόσο στις γυναίκες με ΠΩΑ όσο και στις φυσιολογικές γυναίκες.Ωστόσο,οι μεταλλάξεις στα κωδικοποιούμενα εξόνια του γονιδίου CDK1B είναι σπάνια αίτια ΠΩΑ στις Κινέζες γυναίκες.

### 6.2.6 Τοξικότητα – καρκίνος

Οι Tanaka et al.,(2008) εξέτασαν 32 γυναικολογικούς ασθενείς με καρκίνο οι οποίοι είχαν υποστεί συνδυαστική θεραπεία του CPT-11 με χημειοθεραπεία και αποκάλυψαν ότι το CPT-11 προκαλεί ωοθυλακική απώλεια και ωοθηκική ανεπάρκεια, ενώ παρουσιάζονται και συμπτώματα που είναι παρόμοια με το εμμηνοπαυσιακό σύνδρομο Malaise (Malaise – likesymptoms –MMLS) σε προ εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Επιπλέον,οι Mazaud et al.,(2002) απέδειξαν ότι η γ-ακτινοβολία στη μήτρα σε ποντίκια,προκαλεί σοβαρή εξάντληση των ωοκυττάρων,πρόωρο σύνδρομο ωοθηκικής ανεπάρκειας,καθυστέρηση στην ανάπτυξη ωοθυλακίων και αύξηση της FSH μετά από 6 μήνες ζωής.Τα αρχέγονα ωοθυλάκια είναι αυτά που επηρεάζονταν περισσότερο,ενώ μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών των ωοθυλακίων έμεινε σταθερός. Τα πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια,παρέμεναν ανενεργά για περισσότερο χρονικό διάστημα από ότι είναι φυσιολογικό στα ζώα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολίες.Επιπλέον,διαπιστώθηκαν αγνοούμενα μετάγραφα αρωματάσης στο πρώτο κύμα ωοθυλακίων στις ωοθήκες που είχαν υποστεί ακτινοβολίες.Επομένως,η διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου των ποντικών δεν εξαρτάται μόνο από το αρχικό σύνολο του ωοθυλακικού αποθέματος αλλά και από την συνολικό ωοθυλακικό συμπλήρωμα και τη δυναμική των ωοθυλακίων κατά την περίοδο της ανωριμότητας.

Από την άλλη πλευρά,οι Lieman et al.,(2001),εξέτασαν το αποτέλεσμα που είχε η αυξητική ορμόνη (Growth Hormone-GH) σε γυναίκες με ΠΩΑ καθώς και τα αποτελέσματα της θεραπείας με υποδόρια χορήγηση οιστραδιόλης σε συνδυασμό με GH. Η σύγκριση μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών με ΠΩΑ αποκάλυψε ότι αν και η χορήγηση οιστραδιόλης προκαλούσε σημαντικές διαφορές στη μέση συγκέντρωση της ουσίας ανάμεσα στις δύο ομάδες,υπήρχε συσχέτιση και με την ηλικία η οποία επηρέαζε τη συχνότητα και το εύρος της,με την ομάδα με ΠΩΑ να επικρατεί.Οι γυναίκες με ΠΩΑ είχαν υψηλότερα επίπεδα GH και μεγαλύτερο εύρος παλμών σε σχέση με τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.Επιπλέον,παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε διαφορά στον ρυθμό του παλμού ανάμεσα στις δύο ομάδες,ενώ η χορήγηση οιστραδιόλης διαδερμικά δεν επηρέαζε τα επίπεδα της GH και στις δύο ομάδες.

Οι Boerboom και συν.(2005)μελέτησαν το ρόλο της οικογένειας γλυκοπρωτεϊνών Wnt στην ανάπτυξη ωοθυλακίων και κοκκιωδών κυττάρων και βρήκαν ότι οι ωοθήκες από ποντίκια *Catnb(flox(ex3)/+)*, *Amhr2(cre/+)* ηλικίας 6 εβδομάδων είχαν αναπτύξει βλάβες στις ωοθήκες οι οποίες έμοιαζαν με ωοθυλάκια με πλειομορφικά κοκκιώδη κύτταρα.Οι βλάβες αυτές παρέμειναν στο μέγεθος των ωοθυλακίων με άντρο.Τα ποντίκια ήταν στείρα με λίγα ωχρά σωματία ενώ σε προχωρημένη ηλικία ανέπτυσαν όγκους στα κοκκιώδη κύτταρα.

### **6.3 «Αύξηση της κατακράτησης των αρχέγονων ωοθυλακίων από την προγεστερόνη και η αντενέργεια από τη συνακόλουθη δράση της οιστραδιόλης»**

**Ερευνητικά ερωτήματα:** Ο σκοπός της μελέτης είναι να εξετάσουμε τα αποτελέσματα της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης μεμονωμένα ή συνδυαστικά, στη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

**Περίληψη απάντησης:** Η προγεστερόνη αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων ενώ η χορήγηση οιστραδιόλης μεμονωμένα, μειώνει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων και ο συνδυασμός εξουδετερώνει τα αποτελέσματα της χορήγησης προγεστερόνης

**Τι είναι γνωστό:** Η προγεστερόνη αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR (Lee et al., 2012) και διατηρεί τα αρχέγονα ωοθυλάκια (Zheng et al., 2018, Tsuyoshi et al., 2015). Η οιστραδιόλη προωθεί το σχηματισμό και την ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων σε νεογνικές ωοθήκες (Chen et al., 2009, Kezele et al., 2003) αν και δεν είναι γνωστός ο συδυαστικός ρόλος και των δύο ορμονών στην ανεπτυγμένη ωοθήκη.

#### **6.3.1 Σχεδιασμός μελέτης, Μέγεθος και διάρκεια:**

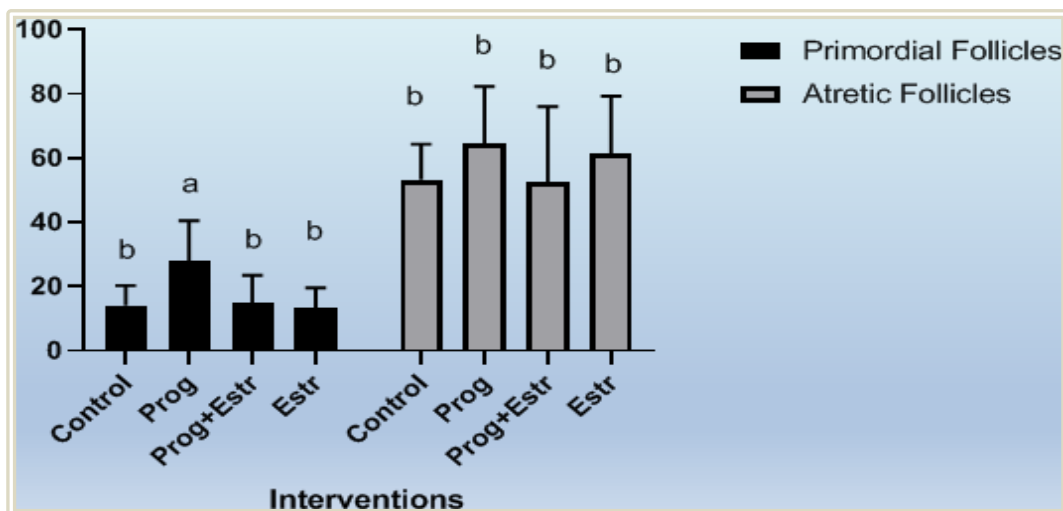
Σε μια τυχαιοποιημένη προ-κλινική μελέτη διαιρέθηκαν σε τέσσερις ομάδες 40 θηλυκοί μύες, είδος Wistar (180-200 gr). Όλα τα ζώα δέχτηκαν την καθορισμένη παρέμβαση από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης και για 20 ημέρες συνολικά. Εξετάστηκαν 8 ζώα από κάθε ομάδα για τα αποτελέσματα που είχε η παρέμβαση και δύο ζώα από κάθε ομάδα ζευγαρώσανε. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ο συνδυασμός προγεστερόνης και οιστραδιόλης για να εξεταστούν τα αποτελέσματά τους στα αρχέγονα ωοθυλάκια διότι υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα για τη συνδυαστική τους δράση.

### 6.3.2 Υλικά και Μέθοδοι:

Στην ομάδα ελέγχου έγιναν ενέσεις καλαμποκέλαιου υποδόρια. Στις άλλες ομάδες έγιναν ενέσεις προγεστερόνης (5mg/ημέρα), οιστραδιόλη (2 mg/kg/ημέρα) και συνδυασμός προγεστερόνης και οιστραδιόλης (5 mg + 2mg/kg/ημέρα). Τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αποτελέσματα μετρήθηκαν στην αριστερή ωοθήκη μετά από μια περίοδο θεραπείας 20 ημερών μέσω ιστολογικής εξέτασης. Μετρήθηκαν επίσης τα επίπεδα AMH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης στον ορό του αίματος στο τέλος των παρεμβάσεων. Οι πρωτεΐνες και το RNA εξήχθησαν από τη δεξιά ωοθήκη για επιπλέον ανάλυση.

### 6.3.3 Αποτελέσματα.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων στην ομάδα της προγεστερόνης ( $27,75 \pm 12,8$ ) ενώ ο αριθμός ήταν μειωμένος στην ομάδα της οιστραδιόλης ( $13,12 \pm 6,4$ ) ( $P=0,0114$ ) (Εικόνα 33). Η ταυτόχρονη χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης μείωσε τα αρχέγονα ωοθυλάκια ( $15 \pm 8,5$ ). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα άτρητα ωοθυλάκια των δύο ομάδων ( $P = 0,2107$ ) και στα πρωτεύοντα, δευτερεύοντα, προαντρικά και γρααφιανά ωοθυλάκια. Όλες οι ομάδες παρέμβασης είχαν σημαντικά λιγότερα αντρικά ωοθυλάκια ( $P = 0,0024$ ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε προγεστερόνη και οιστραδιόλη ( $11,37 \pm 4,65$ ) και η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο οιστραδιόλη ( $13,62 \pm 3,92$ ) είχαν σημαντικά μικρότερο αριθμό ωχρών σωματίων ( $P = 0,0001$ ) σε σχέση με την ομάδα προγεστερόνης ( $35,75 \pm 4,39$ ) και την ομάδα ελέγχου ( $34,37 \pm 8,97$ ).



Εικόνα 33. Επίπεδα αρχέγονων και άτρητων ωοθυλακίων μετά από κάθε παρέμβαση.

### 6.3.3.1 Ορμονική ανάλυση

Τα επίπεδα οιστραδιόλης ήταν σημαντικά αυξημένα στην ομάδες E2 και E2 + P4 σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και την ομάδα που έλαβε μόνο προγεστερόνη (P = 0,0001). Τα επίπεδα της προγεστερόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα (P = 0,0001) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες E2 και E2 + P4. Οι ομάδες οι οποίες έλαβαν E2 + P4 και προγεστερόνη είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα AMH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα που έλαβε μόνο E2 (P=0,0001).

Hormone	Intervention ( n=8)	M±SD	P
E2	Control	10,26 ± 8,27*	0.0001
	P4	9,45 ± 8,15 *	
	E2	365,96 ± 81,49	
	P4+E2	343,21 ± 87,96	
P4	Control	9,3 ± 5,29	0.0001
	P4	1,26 ± 0,38 *	
	E2	22,3 ± 7,63	
	P4+E2	18,33 ± 9,25	
AMH	Control	6 ± 1,74	0.0001
	P4	8,11 ± 1,55	
	E2	3,37 ± 0,68 *	
	P4+E2	9,22 ± 2,18 *	

**Πίνακας 3: Ορμονικά επίπεδα μετά από κάθε παρέμβαση.**

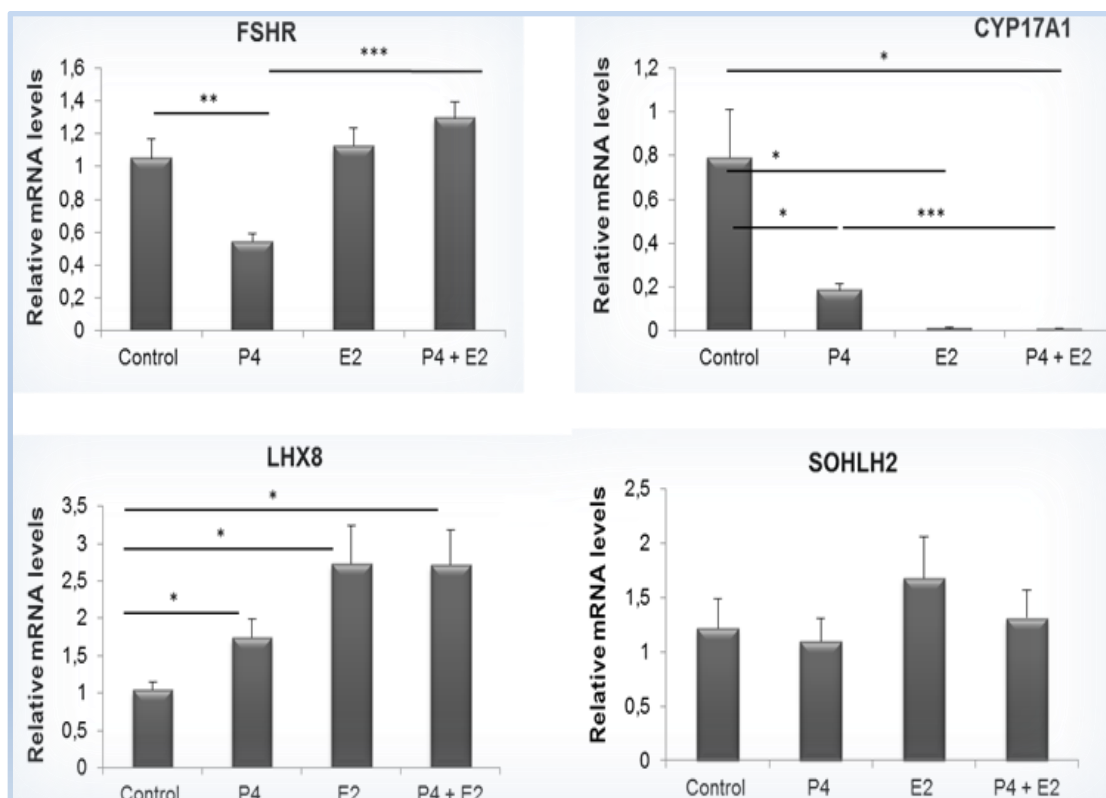
### 6.3.3.2 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψε ότι η χορήγηση προγεστερόνης μείωσε το mRNA του FSHR (Follicle Stimulating Hormone Receptor) (Γράφημα 5) μια παρατήρηση η οποία πιθανόν σχετίζεται με τις ανασταλτικές δράσεις της προγεστερόνης στην παραγωγή FSH (Gilbert et al., 2016). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά αναστρέφονται όταν η προγεστερόνη χορηγείται μαζί με οιστραδιόλη, πιθανότατα λόγω των συνεπειών που έχει η οιστραδιόλη στην έκφραση του FSHR (Ciesiolak et al., 2017). Όπως αναμενόταν, η χορήγηση είτε προγεστερόνης είτε



οιστραδιόλης, μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του CYP17A1 (Κυτόχρωμα P450, οικογένεια 16, υποοικογένεια A, μέλος 1), ένα γονίδιο το οποίο είναι σημαντικό για την σύνθεση των στεροειδών ορμονών. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την ύπαρξη ενός αρνητικού βρόχου ανατροφοδότησης στην σύνθεση οιστρογόνου από τις ωοθήκες (Marsh et al.,2014).

Επιπλέον, και οι δύο ορμόνες, ειδικά η οιστραδιόλη, αυξάνουν τα επίπεδα mRNA του LHX8 (LIMhomeobox 8), ένα γονίδιο που εκφράζεται στα αρχέγονα ωοθυλάκια κατά τα πρώτα στάδια της ωοθυλακικής ενεργοποίησης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η θεραπεία με οιστραδιόλη υποστηρίζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η προγεστερόνη μειώνει τα επίπεδα mRNA του GDF9 (Growth and differentiation factor 9), ένα γονίδιο το οποίο εκφράζεται επιλεκτικά στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τον αυξημένο αριθμό αρχέγονων ωοθυλακίων που παρατηρείται μετά από αυτήν την παρέμβαση (Εικόνα 30). Καμία από τις παρεμβάσεις της συγκεκριμένη έρευνας δεν επηρέασε την έκφραση του γονιδίου SOHLH2 (Spermatogenesis and oogenesis-specific helix-loop-helix transcription factor), το οποίο θεωρείται σαν δείκτης της ανενεργής κατάστασης των ωοθυλακίων και εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό στα εμβρυϊκά στάδια. Τέλος, όταν η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη χορηγήθηκαν ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα στην έκφραση των CYP17A1 και LHX8 ήταν παρόμοια με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο οιστραδιόλη, γεγονός που δείχνει ότι η οιστραδιόλη έχει ένα κυρίαρχο αποτέλεσμα στις συνέπειες της δράσης της προγεστερόνης στις ωοθήκες.



Γράφημα 5. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μετά από κάθε παρέμβαση.

**Περιορισμοί/λόγοι για προσοχή:** Ο χρόνος για την ορμονική παρέμβαση ήταν περίπου 20 ημέρες, γεγονός που μπορεί να δράσει περιοριστικά στην κατανόηση των αποτελεσμάτων της προγεστερόνης στη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

## 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναπαραγωγική ζωή και συγκεκριμένα η προάσπιση και η διατήρηση αυτής της ικανότητας αποτελεί υπέρτατη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. Η έρευνα και η προσπάθεια που καταβάλλεται προσεγγίζει με πρωτοπόρες ερευνητικές εργασίες αυτό το θεμελιώδες ζήτημα για τον άνθρωπο. Οι πειραματικές μελέτες όμως, ακριβώς επειδή κινούνται μέσα σε ενά αχαρτογράφητο επιστημονικό πεδίο, προσπαθούν να δώσουν λύση τόσο στα είδη γνωστά ερωτήματα αλλά και στα νέα που προκύπτουν από την ερευνητική διαδικασία. Η εξάντληση του ωοθυλακικού αποθέματος, αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη διάρκεια της γονιμότητας και η ανάδειξη των παθογενετικών μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα. Αδιαμφισβήτητα το κρίσιμο ερώτημα, κατά πόσο μπορεί να επιτευχθεί η παύση των ωοθυλακίων και η εκ νέου ενεργοποίηση και σε πιο βαθμό, αποτελεί το ζητούμενο και το στόχο αυτού του ερευνητικού έργου.

Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκαν τρεις εργασίες και συγκεκριμένα δύο πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα και μία συστηματική ανασκόπηση άλλων ερευνητικών εργασιών ώστε να δοθεί όχι μία μονόπλευρη αξιολόγηση ευρημάτων, αλλά μία σφαιρική ανάδειξη αποτελεσμάτων των οποίων το συμπέρασμα θα δίνει με σαφήνεια απαντήσεις. Εν προκειμένω είναι γνωστό ότι ο παράγοντας mTOR είναι απαραίτητος ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης και η οδός TSC / mTOR επιδρά στην ταχεία ενεργοποίηση των ωοθυλακίων με τις πρωτεΐνες Tsc 1 και Tsc 2 να έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε αυτήν την υπερενεργοποίηση. Ο mTOR είναι μια 282KDa ενδοκυττάρια σερίνη/θρεονίνη κινάση που δρα ως κεντρικός ρυθμιστής του

κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου. Όταν ενεργοποιείται η βιοχημική οδός mTOR, μπορεί να αυξηθεί ο κίνδυνος πρόκλησης καρκίνου.

Η ενεργοποίηση και η ατρησία των ωοθυλακίων έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια αυτών, μια διεργασία η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εμμηνόπαυση, την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) και την αντικαρκινική θεραπεία. Η μείωση των ωοθυλακίων είναι κοινό χαρακτηριστικό και των τριών αυτών καταστάσεων. Οι γνώσεις αυτές έχουν οδηγήσει στη δημιουργία των αναστολέων mTOR (ραπαμυκίνη και τα ανάλογα της) που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των όγκων, στις μεταμοσχεύσεις οργάνων, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός mTOR (mechanistic target of rapamycin) κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο FRAP1 και η πρωτεΐνη mTOR είναι η βάση για όλα τα συμπλέγματα (mTORC1 και mTORC2) που ενεργοποιούν την πρωτεϊνική σύνθεση, οδηγώντας σε κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό.

Η δραστηριότητα των mTOR συμπλεγμάτων ελέγχεται από την ενεργειακή κατάσταση του ίδιου του κυττάρου, τους αυξητικούς παράγοντες και τις ορμόνες (ιδιαίτερα της ινσουλίνης) και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Η δραστηριότητα του mTOR ρυθμίζεται αρνητικά μέσω του ετεροδιμερούς συμπλόκου TSC1/TSC2 που ελέγχεται από την Akt. Το σύμπλοκο TSC1 σταθεροποιεί το TSC2 που είναι μια πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPάσης (GAP) για την Rheb, μια μικρή πρωτεΐνη Ras η οποία έχει δραστηριότητα GTPάσης. Η ενεργοποιημένη Rheb οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης 70 kDa S6 κινάση 1 (p70s6K) και την ευκαρυωτική έναρξη του πρωτεϊνικού παράγοντα πρόσδεσης 4E (4E-BP1) οι οποίοι είναι σημαντικοί παράγοντες για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής σύνθεσης, την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διακοπή των Tsc1 και Tsc2 μπορεί να ενεργοποιήσουν το σύνολο των αρχέγονων ωοθυλακίων. Η υπό προϋποθέσεις απαλοιφή του Tsc2 γονιδίου μπορεί να αυξήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR και να ενεργοποιήσει την p70s6k, προάγοντας τη μετάφραση, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

Το Everolimus προκαλεί αναστολή του mTOR και έχει εγκριθεί για πολλές μορφές καρκίνου. Η χορήγηση επιπρόσθετα του Verapamil αυξάνει τις φαρμακοκινητικές

παραμέτρους του εβερόλιμους, ενώ η συγκέντρωση της βεραπαμίλης διπλασιάζεται μετά από μια και μοναδική δόση του everolimus. Αυτή η αλληλεπίδραση φαρμάκου-φαρμάκου μπορεί να ενισχύσει την αναστολή του mTOR in vivo. Επιπλέον η βεραπαμίλη προκαλεί κυτταροπροστατευτική αυτοφαγία σε αρκετές καταστάσεις. Όσον αφορά τη φισετίνη (Fisetin), αυτή αποτελεί ένα φυσικό φλαβονοειδές το οποίο μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Από μελέτες για τον καρκίνο έχει βρεθεί ότι η φισετίνη ρυθμίζει τη σηματοδότηση Akt/mTOR, αναστέλλει τα MAPK και P13K, μειώνει τη φλεγμονή μέσω μείωσης της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) και λειτουργεί ως συνδυαστική θεραπεία. Επίσης είναι σημαντική η κατανόηση των ευρημάτων αυτών ώστε οι πληροφορίες να μπορούν να εφαρμοστούν στην κλινική πρακτική και να αποτελέσουν ένα πιθανό θεραπευτικό εργαλείο σε ασθένειες που συμπεριλαμβάνουν ωοθυλακική ενεργοποίηση και ατρησία.

Στην πρώτη πειραματική μελέτη στοχοποιήθηκαν φαρμακολογικά και τα δύο σύμπλοκα mTOR (Raptor/mTORC1 και Rictor /mTORC2) σε θηλυκούς μύες χρησιμοποιώντας Everolimus, Verapamil και Fisetin είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό και εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα που είχε η θεραπεία αυτή στη μία ωοθήκη. Μετά το πέρας της φαρμακευτικής αγωγής έγινε προσπάθεια επανενεργοποίησης των ωοθυλακίων στην άλλη ωοθήκη με τη χορήγηση FSH (follicle stimulating hormone). Για την αξιολόγηση της πιθανής αποσιώπησης και της εκ νέου ενεργοποίησης των ωοθυλακίων με τη χρήση αναστολέων mTOR, χρησιμοποιήθηκαν μύες χωρίς απενεργοποίηση γονιδίων ή άλλων γενετικών τροποποιήσεων. Παρουσιάζονται ιστολογικές και βιοχημικές αποδείξεις ότι με αυτή τη φαρμακολογική αναστολή, τα ωοθυλάκια παραμένουν στο αρχέγονο στάδιο και μπορεί να επανενεργοποιηθούν για τη γονιμότητα. Αυτό μπορεί να βοηθήσει τις γυναίκες να ελπίζουν σε διατήρηση της γονιμότητας πριν από μια χημειοθεραπεία ή σε περίπτωση ΠΩΑ.

Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων και μία μείωση στον αριθμό των άτρητων ωοθυλακίων μετά τη θεραπεία με Verapamil και Everolimus. Δεν υπήρχαν άλλα αρνητικά αποτελέσματα στις

παραμέτρους που εξετάστηκαν συμπεριλαμβανομένων των αρχέγονων, προαντρικών, αντρικών, Graaf ωοθυλακίων και του ωχρού σωματίου. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στα αρχέγονα ωοθυλάκια στην ομάδα του everolimus και verapamil και την ομάδα everolimus μεμονωμένα. Οι άλλες δύο ομάδες η fisetin και η ομάδα everolimus και fisetin εμφάνισαν έναν μεγαλύτερο αριθμό άτρητων ωοθυλακίων συγκριτικά με την ομάδα everolimus και verapamil. Όσον αφορά το ωχρό σωματίο η ομάδα ελέγχου εμφάνισε το μικρότερο αριθμό χωρίς όμως να αγγίζουν οι αριθμοί τη στατιστική σημαντική διαφορά. Μάλιστα ενώ σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες υπήρξαν αυξημένοι αριθμοί ωχρών σωματίων, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, βρέθηκε στατιστικά σημαντικά περισσότερος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων στην ομάδα Everolimus και Verapamil σε σχέση με την ομάδα Fisetin και εξετάστηκε η υπόθεση συσχέτισης ανάμεσα στη διάμετρο των ωοθηκών με τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Η ομάδα Fisetin είχε το μεγαλύτερο μήκος, πλάτος και πάχος ωοθυλακίων ενώ η ομάδα Everolimus και Verapamil τις μικρότερες παραμέτρους μήκους. Κάνοντας ανάλυση παλινδρόμησης, ανά δύο συσχετίσεις, ανάμεσα στα αρχέγονα ωοθυλάκια που μετρήθηκαν μετά από κάθε παρέμβαση, (δηλαδή την πρώτη διάμετρο σε σχέση με τον αριθμό των πρωταρχικών ωοθυλακίων που μετρήθηκαν σε αυτή την παρέμβαση), δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο σύνολο αλλά και ανάμεσα σε κάθε ομάδα.

Από την παραπάνω στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων δε συσχετίζεται με τη διάμετρο του ωοθυλακίου, αλλά μόνο με την παρέμβαση. Επίσης καμία αξιολογη μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στο σωματικό βάρος μετά την πρώτη παρέμβαση καθώς και μετά τη δεύτερη παρέμβαση ανάμεσα στις ομάδες.

Η ανάλυση της ανοσοαποτύπωσης εξετάσε τη δραστηριότητα του mTORC1/2 στην ωοθήκη μέσω της ανάλυσης Western blot χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα αντισώματα σαν ενεργοποιητές του μονοπατιού. Η παρουσία Everolimus μεμονωμένα καθώς και ο συνδυασμός του με Verapamil για 8 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της p70s κινάσης μέσω του mTORC1 στην Thr389 (p-p70s6k(Thr3889)). Αυτή η μείωση αναστράφηκε μετά το τέλος της πρώτης παρέμβασης

και με την παρουσία της FSH. Η εν λόγω ανάστροφη ενεργοποίηση του p-p70s6k (Thr389) ήταν πανομοιότυπη με ένα μοτίβο φωσφορυλίωσης των επιπέδων ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (p-rpS6) (Ser240/244) έναν μεταγενέστερο στόχο της p70s6k.

Η παρουσία Fisetin επηρέασε ελάχιστα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του p70s6k και δεν επηρέασε ουσιαστικά τη δραστηριότητά της όπως φαίνεται από τη μη μεταβολή των επιπέδων του p-rpS6. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τη διαπίστωση ότι η Fisetin αναστέλλει κυρίως και επιλεκτικά τη λειτουργία του μονοπατιού mTORC2 και όχι του mTORC1. Με τον ίδιο τρόπο, τα επίπεδα της phosphor-4E-BP1, ακόμη έναν στόχο του μονοπατιού mTORC1 μειώθηκαν από το Everolimus ενώ ο συνδυασμός με Verapamil εξουδετέρωσε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 αποκαταστάθηκε πλήρως μετά την αφαίρεση του Everolimus αλλά αυξήθηκε περαιτέρω μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με Everolimus και Verapamil και τη χορήγηση FSH.

Η συγκεκριμένη παρατήρηση υποδηλώνει ότι υπάρχει μια σημαντική διέγερση της μετάφρασης κατά την ανάκαμψη από τη θεραπεία με Everolimus και Verapamil. Επιπλέον σε όλες τις θεραπείες, η παρουσία αναστολέων περιόριζε την ενεργοποίηση του mTORC2 και αποκάλυψε τα μειωμένα επίπεδα p-Akt (Ser473), έναν σημαντικό στόχο του mTORC2. Αυτά τα αποτελέσματα είναι περισσότερο εμφανή στην περίπτωση του Everolimus και επαναφέρεται μετά από την αφαίρεση των αναστολέων.

Τα ευρήματα, δεν επιβεβαιώνουν μόνο την ανασταλτική δράση της Fisetin στον mTORC2 αλλά υποδηλώνουν επίσης ότι το Everolimus, που είναι γνωστός αναστολέας του μονοπατιού mTORC1 μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του mTORC2 στις ωοθήκες μετά από παρατεταμένη in vivo θεραπεία. Η αγωγή αυτή με Everolimus, μείωσε την έκφραση του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl2, ενώ ο συνδυασμός του Everolimus είτε με Verapamil είτε με Fisetin μετρίασε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να συσχετίζεται με τον υψηλό αριθμό από άτρητα ωοθυλάκια τα οποία μετρούνται στην ομάδα Everolimus. Ενδιαφέρον είναι επίσης και το γεγονός, ότι η μείωση του Bcl2 κατά την

παρουσία Everolimus συνοδεύεται από μια παρόμοια και επιλεκτική μείωση της Atg12, μια πρωτεΐνη που είναι σημαντική για την έναρξη της αυτοφαγίας, καθώς και της κυκλίνης A που είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κύκλου για τις φάσεις S και G2.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι από μόνο του το Everolimus αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, αυξάνει την απόπτωση και επηρεάζει την έναρξη της αυτοφαγίας, ενώ η συνδυαστική θεραπεία με Verapamil ή Fisetin μετριάξει τα αποτελέσματα αυτά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο Bcl2 αυξάνεται δραματικά μετά από την αφαίρεση του Everolimus και του Verapamil, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Verapamil έχει ένα ρόλο προστατευτικό. Και σε αυτήν την περίπτωση η δράση αυτή συσχετίστηκε με μια αύξηση του Atg12 αλλά και του LC3-II, ένας διαφορετικός ρυθμιστής-κλειδί της αυτοφαγίας, προτείνοντας έτσι έναν προστατευτικό ρόλο αυτού του μονοπατιού μετά την εκ νέου επανενεργοποίηση των ωοθυλακίων που ακολουθεί την αφαίρεση των αναστολέων.

Το γεγονός αυτό συμφωνεί με άλλα ευρήματα που δείχνουν ότι η αυτοφαγία αυξάνεται στα τελικά επίπεδα της ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Σχετικά με αυτο, μπορούμε επίσης να σημειώσουμε ότι έχει αναφερθεί μια σύνδεση ανάμεσα στο Verapamil και την αυτοφαγία και σε άλλα κυτταρικά μοντέλα. Άλλη μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η αφαίρεση του συνδυασμού Everolimus και Verapamil επιπρόσθετα με την κυκλίνη A, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κυκλίνης D1, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάβαση G1/S αποκαλύπτοντας με τον τρόπο αυτό μια διέγερση της προόδου του κυτταρικού κύκλου στην ωοθήκη μετά την επανενεργοποίηση του συνόλου των ωοθυλακίων.

Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και με την ανοσοϊστοχημική χρώση των τμημάτων της ωοθήκης με το δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA, η έκφραση του οποίου είναι αυξημένη κατά την πρόιμη G1 και S φάση του κυτταρικού κύκλου. Το PCNA παίζει σημαντικούς ρόλους στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή, την επισκευή του DNA, ενώ αναγνωρίζεται και ως κεντρικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των ωοθυλακίων.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας παρέχουν αποδείξεις ότι αυτή είναι μια εφικτή διαδικασία και ενθαρρύνουν την περαιτέρω διερεύνηση. Οι κυτταρογενετικές μελέτες και οι μελέτες γονιμότητας θα είναι απαραίτητες προκειμένου να εκτιμηθεί τόσο η ασφάλεια παρόμοιων θεραπευτικών σχημάτων όσο και τα αποτελέσματα της αναστολής απαραίτητων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως ο mTOR. Θα πρέπει να δημιουργηθεί μια ισορροπία μεταξύ της ατρησίας και της ωοθυλακικής ανάπτυξης, ενώ ο ελάχιστος χρόνος για την αδρανή κατάσταση των ωοθυλακίων αλλά και την επανενεργοποίησή τους θα πρέπει να προσδιοριστεί.

Η συστηματική ανασκόπηση με τη σειρά της αξιολόγησε άλλες πειραματικές μελέτες και ανέδειξε τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων όπως για παράδειγμα το μονοπάτι PI3K του οποίου η υπο-ενεργοποίηση μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων και /ή υπέρμετρη ατρησία των αρχέγονων ωοθυλακίων να οδηγήσει σε ΠΩΑ. Όπως αναφέρθηκε η σηματοδότηση Tsc/mTORC1 στα ωοκύτταρα κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του συνόλου των αρχέγονων ωοθυλακίων σε ανενεργή κατάσταση και παράλληλα πυροδοτεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ωοθυλακίων.

Οι παράγοντες TSC1 και PTEN φαίνεται ότι δρουν συνδυαστικά και αναστέλλουν την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων ενώ η απαλοιφή τους ενεργοποιεί το σύμπλεγμα mTORC1 το οποίο ενισχύει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού S6K1-ppS6 και τελικά προάγει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής μετάφρασης και τη ριβοσωμική βιογένεση στα ωοκύτταρα. Η σπουδαιότητα του ρόλου του ωοκυτταρικού PTEN αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες. Ο PTEN παίζει συγκεκριμένους ρόλους στα κύτταρα και στους ιστούς, ενώ η απαλοιφή του PTEN μπορεί να οδηγήσει σε ΠΩΑ. Στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών του κυττάρου, εμπλέκονται ρυθμιστικοί μηχανισμοί της Akt που πραγματοποιούνται μέσω του PTEN. Ως μόριο-κλειδί στη διαδικασία αυτή, το Akt1 είναι απαραίτητο για την κατάλληλη ανάπτυξη των ωοκυττάρων καθώς και για τα υπόλοιπα κοκκιώδη κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια του PTEN μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη και διαφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης (McConechy et al., 2014). Ακόμη, η ΠΩΑ βρέθηκε ότι



συσχετίζεται και με διάφορα γονίδια του X χρωμοσώματος καθώς επίσης και με τις θέσεις 5q14.1-q15 του χρωμοσώματος 5. Τα αντι-ωοθηκικά αντισώματα του ορού μπορεί να προκαλέσουν πολλές περιπτώσεις ΠΩΑ οι οποίες αναφέρονται ως ιδιοπαθείς αλλά και αρκετούς ανοσολογικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε αυτοάνοση ΠΩΑ. Βρέθηκαν τρία αυτοαντιγόνα που εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης: τα ACTN4, HSPA5 και ACTB. Αυτά τα αυτοαντιγόνα μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην πρόγνωση και της αυτοάνοσης ΠΩΑ. Επιπλέον, η κινάση MAPK παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Οι Calounova et al., έδειξαν ότι επί απουσίας του γονιδίου SHB σε ποντίκια, αυξάνει τις ERK (extracellular – signal regulated kinase) και RSK (ribosomal S6 kinase) σηματοδοτώντας τα ωοκύτταρα και ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των κινασών p38 MAPK. Αυτή η απουσία έχει αρνητικά αποτελέσματα στην ωρίμανση των ωοθυλακίων.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στην σωστή ανάπτυξη και ωρίμανση του άξονα της υπόφυσης είναι η ακεραιότητα του θύμου αδένου. Τα θηλυκά ποντίκια τα οποία δεν έχουν θύμο αδένου χαρακτηρίζονται από πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Χρησιμοποιώντας νεογνική γονιδιακή θεραπεία θυμουλίνης (NTGT) οι Reggiani et al., επανέφεραν τα επίπεδα της θυμουλίνης στους εν λόγω μύες και απέτρεψαν τη μείωση των πρώιμων ωοθυλακίων ενώ η ωοθυλακική ατρησία παρέμεινε στα επίπεδα των μυών που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Εκτός αυτών ο ρόλος της P 27 σε knockout ποντίκια ανέδειξε την ιδιότητα να διαθέτουν οι μύες αρχέγονα ωοθυλάκια πρόωρα ενεργοποιημένα, γεγονός που προκαλεί τη μείωση της ωοθυλακικής δεξαμενής

.Επομένως, ο σημαντικός ρόλος της P 27 είναι η διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων στην ηρεμία. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από το γονίδιο Foxo3a μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt, γεγονός που παρατηρείται από το ότι η ταυτόχρονη απώλεια και των δύο μηχανισμών προκαλεί ωοθυλακική ενεργοποίηση (Fotovati, et al., 2011, Hashiguchi et al., 2006).

Πέραν αυτών, στην ωοθυλακική ανάπτυξη ρόλο διαδραματίζει και η AMH η οποία δρα ανασταλτικά στην έναρξη, μια διαδικασία γνωστή και ως αρχική

στρατολόγηση. Επίσης ελαχιστοποιεί την απόκριση των επιλέξιμων ωοθυλακίων στην FSH με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιλεγεί το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Η ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε ότι η AMH αλλοίωσε τη μεταγραφή 707 γονιδίων. Πολλά από τα μετάγραφα αυτά εμπλέκονται στα μονοπάτια MAPK και TGFβ. Επιπλέον, η AMH αναστέλλει την διεγερτική δράση των KITL, bFGF και KGF στην μετάβαση των ωοθυλακίων. Η AMH πιθανότατα επηρεάζει τη μετάβαση μέσω μιας μείωσης της διαφοροποίησης και αγγειογένεσης των κυττάρων. (Nilsson et al., 2011).

Όσον αφορά την BMP-2 βρέθηκε ότι ελέγχει τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών στα κοκκιώδη κύτταρα ρυθμίζοντας τοπικούς παράγοντες και ενδοκρινικά συστήματα. Η έκφρασή της στα κοκκιώδη κύτταρα προάγει επίσης την ωοθυλακική ανάπτυξη και αποτρέπει την πρόωγη ωχρινοποίηση, προκαλώντας την επιτυχή μετάβαση από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο στο ωχρό σωματίο (Cassagrande et al., 2010).

Τέλος, οι Hanrahan et al., (2004), ανακάλυψαν ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια BMP15 και GDF9 σε πρόβατα σχετίζονται με αυξημένους ρυθμούς ωορρηξίας σε ετερόζυγους φορείς και με στειρότητα σε ομόζυγους φορείς. Για να μελετήσουν περαιτέρω το ρόλο του FOXL οι Kim et al., (2011) εξέτασαν πως το γονίδιο FOXL2 ενεργοποιεί την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων και το ρόλο που παίζει η μετάλλαξη του FOXL2 c.402C4G στη δημιουργία όγκων στα κοκκιώδη κύτταρα. Στη μελέτη βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο FOXL2 προκαλούσε ελάχιστο κυτταρικό θάνατο επειδή δεν ήταν ικανό να πυροδοτήσει την πλήρη αποπτωτική σηματοδότηση των κυττάρων. Επιπλέον, υπογράμμισαν τον σημαντικό ρόλο του BAK, την εμπλοκή της κασπάσης 8 και της προς τα άνω ρύθμιση των υποδοχέων απόπτωσης. Συγκεντρωτικά ο κύριος σκοπός της συστηματικής αυτής ανασκόπησης ήταν η κατανόηση των αποτελεσμάτων διαφόρων μονοπατιών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Η πλειοψηφία των μελετών που αναλύθηκε ήταν πειραματικής φύσεως αλλά χρησιμοποιήθηκαν και γυναίκες με ΠΩΑ. Οι συγκεκριμένες πειραματικές μελέτες συνδύασαν τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* πειράματα. Στις παραπάνω αναλύσεις

χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από τεχνικές όπως ιστολογικές αναλύσεις, και πειράματα μικροσυστοιχίων, Western blotting και στατιστικές αναλύσεις.

Ωστόσο είναι απαραίτητο να εξεταστούν και διαφορετικοί παράγοντες, όπως η συσχέτιση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τους παθογενετικούς μηχανισμούς καθώς επίσης και ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί σε πρόωρη ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Εν κατακλείδι, πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για τη συσχέτιση της ΠΩΑ με διάφορα μονοπάτια.

Αναφορικά με την πειραματική μελέτη ανάδειξης του ρόλου της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης στην εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου, περιγράφεται με σαφήνεια ο στατιστικά αυξημένος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων στην ομάδα προγεστερόνης, ενώ αναγνωρίζεται ο μειωμένος αριθμός αυτών στην ομάδα της οιστραδιόλης. Από την άλλη, η ταυτόχρονη χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης μείωσε τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε προγεστερόνη και οιστραδιόλη και η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο οιστραδιόλη είχαν σημαντικά μικρότερο αριθμό ωρών σωματιών σε σχέση με την ομάδα προγεστερόνης και την ομάδα ελέγχου.

Σε επίπεδο ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης η χορήγηση προγεστερόνης μείωσε το mRNA του FSHR πιθανώς διότι σχετίζεται με την ανασταλτική δράση της προγεστερόνης στην παραγωγή FSH. Τα δεδομένα αυτά αναστρέφονται όταν η προγεστερόνη χορηγείται συνδυαστικά με οιστραδιόλη.

Επίσης σημειώνεται χαρακτηριστικά ότι η χορήγηση προγεστερόνης ή οιστραδιόλης μειώνει τα επίπεδα έκφρασης mRNA του CYP17A1. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την ύπαρξη ενός αρνητικού βρόχου ανατροφοδότησης στην σύνθεση οιστρογόνου από τις ωοθήκες (Marsh et al., 2014). Επιπλέον αμφότερες οι δύο ορμόνες και ειδικά η οιστραδιόλη, αυξάνουν τα επίπεδα mRNA του LHX8 (LIM homeobox 8), ένα γονίδιο το οποίο εκφράζεται στα αρχέγονα ωοθυλάκια κατά τα πρώτα στάδια της ωοθυλακικής ενεργοποίησής, γεγονός που υποδηλώνει ότι η θεραπεία με οιστραδιόλη υποστηρίζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Η προγεστερόνη μειώνει τα επίπεδα mRNA του GDF9 και καμία από τις παρεμβάσεις της συγκεκριμένη έρευνας δεν επηρέασε την έκφραση του γονιδίου SOHLH2 το οποίο

θεωρείται δείκτης της ανενεργής κατάστασης των ωοθυλακίων και εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά σε εμβρυϊκά στάδια. Τέλος, όταν η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη χορηγήθηκαν ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα στην έκφραση των CYP17A1 και LHX8 ήταν παρόμοια με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο οιστραδιόλη, γεγονός που δείχνει ότι η οιστραδιόλη έχει ένα κυρίαρχο αποτέλεσμα στις συνέπειες της δράσης της προγεστερόνης στις ωοθήκες.

## 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

**Από την παρατήρηση και την ανάλυση των δεδομένων προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:**

**A) Εκ της πειραματικής μελέτης που αναστέλλει την ωοθηλακική ανάπτυξη σε σε αρχέγονο στάδιο με συνδυασμό των εβερόλιμους και βεραπαμίλη.**

- Σημαντικά υψηλά επίπεδα αρχέγονων ωοθυλακίων παρατηρήθηκαν στην ομάδα εβερόλιμους και βεραπαμίλη. Το σημαντικότερο όμως είναι η παρατήρηση των μεγάλων διαφορών στον αριθμό των άτρητων ωοθυλακίων. Στην ομάδα αυτή, εμφανίζονται τα μικρότερα επίπεδα σε άτρητα ωοθυλάκια.

- Η παρουσία εβερόλιμους μεμονωμένα καθώς και ο συνδυασμός του με βεραπαμίλη για 8 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της p70s κινάσης μέσω του mTORC1 στην Thr389 (p-p70 s6k). Αυτή η μείωση αναστράφηκε μετά το τέλος της πρώτης παρέμβασης και με την παρουσία της FSH.

- Η παρουσία φισετίνης επηρέασε ελάχιστα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του p70 s6k και δεν υπήρξε μεταβολή των επιπέδων του p-tpS6. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τη διαπίστωση ότι η φισετίνη αναστέλλει κυρίως τη λειτουργία του μονοπατιού mTORC2.

- Τα επίπεδα της phosphor-4E-BP1, ακόμη έναν στόχο του μονοπατιού mTORC1, μειώθηκαν από το εβερόλιμους ενώ ο συνδυασμός με βεραπαμίλη εξουδετέρωσε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

- Σε όλες τις θεραπείες, η παρουσία αναστολέων περιορίζει την ενεργοποίηση του mTORC2 και αποκάλυψε τα μειωμένα επίπεδα p-Akt (Ser473), έναν σημαντικό στόχο του mTORC2.

- Τα ευρήματα δεν επιβεβαιώνουν μόνο την ανασταλτική δράση της φισετίνης στο mTORC2 αλλά υποδηλώνουν επίσης ότι το εβερόλιμους δύναται να επηρεάσει τη δραστηριότητα του mTORC2 στις ωοθήκες μετά από παρατεταμένη in vivo θεραπεία.
- Η ταυτόχρονη παρουσία των εβερόλιμους και βεραπαμίλη μειώνει σημαντικά την έκφραση του PCNA στα κοκκιώδη κύτταρα.
- Η βεραπαμίλη έχει ένα θετικό αποτέλεσμα και συγκεκριμένα μια προστατευτική δράση στην επιβίωση των κυττάρων και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.
- Αυξήθηκε η έκφραση των Atg12 και LC3 II επιλεκτικά, γεγονός που σημαίνει ότι η ενίσχυση της αυτοφαγίας δικαιολογεί τον προστατευτικό ρόλο της βεραπαμίλη.
- Η ανάλυση της ενεργοποίησης μορίων– κλειδιών του μονοπατιού mTOR αποκάλυψε μια συνεργιστική δράση των εβερόλιμους και βεραπαμίλη στην αναστολή των αρχέγονων ωοθυλακίων. Τα ευρήματα αυτά σχετίζονται με τη μείωση της δραστηριότητας του mTORC1. Η συγχορήγηση της βεραπαμίλη μπορεί να έχει μια προστατευτική δράση στα κύτταρα αυτά, όπως αποκάλυψε η επαγωγή της αντι-αποπτωτικής και της σχετικής με την αυτοφαγία γονιδιακής έκφρασης.
- Παρουσιάζονται ιστολογικές και βιοχημικές αποδείξεις ότι με αυτή τη φαρμακολογική αναστολή, τα ωοθυλάκια παραμένουν στο αρχέγονο στάδιο και μπορεί να επανενεργοποιηθούν για τη γονιμότητα. Αυτό μπορεί να βοηθήσει τις γυναίκες να ελπίζουν σε διατήρηση της γονιμότητας πριν από μια χημειοθεραπεία ή σε περίπτωση ΠΩΑ.

**B) Από τη συστηματική ανασκόπηση των πειραματικών μελετών που εξετάζουν μονοπάτια που εμπλέκονται στην πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια:**

- Σύμφωνα με τη συστηματική ανασκόπηση κρίνεται απαραίτητο να εξεταστεί περαιτέρω μια σειρά από διαφορετικούς παράγοντες όπως η συσχέτιση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τους παθογενετικούς μηχανισμούς καθώς επίσης και ο

ακριβής μηχανισμός που οδηγεί σε πρόωρη ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

**Γ) Εκ της πειραματικής μελέτης κατακράτησης των αρχέγονων ωοθυλακίων από την προγεστερόνη και την αντενέργεια της οιστραδιόλης.**

- Η χορήγηση προγεστερόνης αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων.
- Η χορήγηση οιστραδιόλης μεμονωμένα μειώνει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων.
- Η συγχορήγηση οιστραδιόλης, συνδυαστικά με την προγεστερόνη, δρα ως αντενέργεια στο αποτέλεσμα της προγεστερόνης.
- Τα ευρήματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην κατακράτηση των αρχέγονων ωοθυλακίων για τη διατήρηση της αναπαραγωγής καθώς και σε ασθενείς με ενδομητριωσικές κύστεις πριν τη χειρουργική αντιμετώπιση η οποία δύναται να προκαλέσει βλάβη στον ωοθηκικό ιστο.

## 9. Περίληψη

**Εισαγωγή:** Η διατήρηση της αναπαραγωγικής ζωής μέσω αναστολή της διαδικασίας η οποία εξαντλεί το διαθέσιμο απόθεμα των ωοθυλακίων, αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη διάρκεια της γονιμότητας. Η ανάδειξη των παθογενετικών μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα, και ως εκ τούτου το καίριο ερώτημα εάν μπορεί να επιτευχθεί η παύση των ωοθυλακίων και η ενεργοποίηση, αποτελεί το ζητούμενο αυτού του ερευνητικού έργου. Ο αυξημένος αποπτωτικός θάνατος των αρχέγονων ωοθυλακίων και τελικός η εξάντληση του αποθέματος αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας και των ασθενών που λαμβάνουν αντικαρκινική θεραπεία. Ο έλεγχος της ανάπτυξης του ωοθυλακίου μέσω της παύσης και της εκ νέου ενεργοποίησης συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση αυτής της εξελικτικής πορείας.

Η πρόωρη ωοθυλακική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) μπορεί να παραμείνει αδιάγνωστη για μεγάλο χρονικό διάστημα και σχετίζεται με μειωμένη γονιμότητα. Ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην ΠΩΑ καθώς και οι επακόλουθες θεραπείες δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Αν και υπάρχουν δεδομένα κυρίως από τη χρήση ζωικών μοντέλων κάτω από διάφορες πειραματικές συνθήκες, τα δεδομένα αυτά παραμένουν κατακερματισμένα.

### **Σκοπός:**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση της υπόθεσης, αν η αναστολή των αρχέγονων ωοθυλακίων και η επακόλουθη ενεργοποίησή τους μπορεί να επιτευχθεί με την παροδική αναστολή του mTOR.

### **Μέθοδοι:**

Στη διδιακτορική αυτή διατριβή παρουσιάζονται τρεις μελέτες, μια συστηματική ανασκόπηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στην ΠΩΑ, μια προκλινική μελέτη για την αναστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέσω της θεραπείας με Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη και μια προκλινική μελέτη για τη θεραπεία με προγεστερόνη ή οιστραδιόλη ή συνδυασμού αυτών στη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.

### **Αποτελέσματα:**

Ο συνδυασμός της θεραπείας με Εβερόλιμους και Βεραπαμίλη μπορεί να αυξήσει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων ενώ μειώνει την ατρησία.

Η αναστολή της ανάπτυξης των αρχέγονων ωοθυλακίων μέσω της χρήσης προγεστερόνης μπορεί να εξουδετερωθεί από την ταυτόχρονη χορήγηση της οιστραδιόλης.



## **10. SUMMARY**

### **Introduction:**

The preservation of reproductive life through inhibition of the process that exhausts the available stock of follicles, is an important condition for the duration of fertility. The emergence of pathogenetic mechanisms involved in the developmental stages of the follicle is the most important factor and therefore the key question of whether follicular cessation and activation can be achieved is the goal of this research project. Increased apoptotic death of primordial follicles and eventual stock depletion is a common feature of premature ovarian failure and patients receiving anticancer therapy. Controlling follicular growth through cessation and reactivation contributes significantly to understanding this evolutionary process. Ovarian Failure (POF) may be undetectable for a long time and is associated with impaired fertility. The mechanisms involved on POF pathogenesis as well as the following treatments are still unclear. Although data exist, mainly produced by the study of animal models in various experimental conditions these data remain fragmented.

### **Aim:**

The aim of the current thesis is to examine if the inhibition of primal follicles and the subsequent activation can be achieved by the transient inhibition of mTOR.

### **Methods:**

We present three studies, a systematic review of the paths involved in POF, a preclinical study for the inhibition of follicular development with treatment with everolimus and verapamil and a preclinical trial for the therapy of progesterone and estradiol or a combination of these two for the retention of primordial follicles.

### **Conclusions:**

The treatment with Everolimus and Verapamil can increase the number of primordial follicles while at the same time atresia is decreased.

The inhibition of follicular development through progesterone therapy can be counteracted by the simultaneous use of estradiol.

## 11. Βιβλιογραφία

1. Allegrucci, C., Thurston, A., Lucas, E., & Young, L. (2005). Epigenetics and the germline. *Reproduction*, 129(2), 137-149.
2. Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. In *Cell Cycle Control* (pp. 29-40). Humana Press, New York, NY.
3. Becker, K. L. (Ed.). (2001). *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins.
4. Bennett, C. E., Conway, G. S., Macpherson, J. N., Jacobs, P. A., & Murray, A. (2010). Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 25(5), 1335-1338.
5. Bjornsti, M. A., & Houghton, P. J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 335-348.
6. Bjursell, C., Stibler, H., Wahlström, J., Kristiansson, B., Skovby, F., Strömme, P., ...& Martinsson, T. (1997). Fine mapping of the gene for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, type I (CDG1): linkage disequilibrium and founder effect in Scandinavian families. *Genomics*, 39(3), 247-253.
7. Bondy, C. A., & Turner Syndrome Consensus Study Group. (2007). Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(1), 10-25.
8. Bretherick, K. L., Fluker, M. R., & Robinson, W. P. (2005). FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Human genetics*, 117(4), 376-382.

9. BROLIN J.,T. LÖWHAGEN,L. SKOOG Immunocytochemical Detection of the Androgen Receptor In Fine Needle Aspirates From Benign and Malignant Human Prostate <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.1992.tb00060.x>
10. Burger, H. G., Dudley, E. C., Robertson, D. M., & Dennerstein, L. O. R. R. A. I. N. E. (2002). Hormonal changes in the menopause transition. *Recent progress in hormone research*, 57, 257-276.
11. Burger, H. G., Hale, G. E., Robertson, D. M., & Dennerstein, L. (2007). A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Human reproduction update*, 13(6), 559-565.
12. Cartault, A., Caula-Legriel, S., Baunin, C., Le Mandat, A., Lemasson, F., Galinier, P., & Pienkowski, C. (2012). Ovarian masses in adolescent girls. In *Pediatric and Adolescent Gynecology* (Vol. 22, pp. 194-207). Karger Publishers.
13. Cartwright, B., Robinson, J., Seed, P. T., Fogelman, I., & Rymer, J. (2016). Hormone replacement therapy versus the combined oral contraceptive pill in premature ovarian failure: a randomized controlled trial of the effects on bone mineral density. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(9), 3497-3505.
14. Casagrande, L., Demarco, F. F., Zhang, Z., Araujo, F. B., Shi, S., & Nör, J. E. (2010). Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of dental research*, 89(6), 603-608.
15. Chapman, C., Cree, L., & Shelling, A. N. (2015). The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. *International journal of women's health*, 7, 799.
16. Chaves, R. N., Duarte, A. B. G., Rodrigues, G. Q., Celestino, J. J., Silva, G. M., Lopes, C. A. P., ... & Lobo, C. H. (2012). The effects of insulin and follicle-simulating hormone (FSH) during in vitro development of ovarian goat preantral

- follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Biology of reproduction*, 87(3), 69-1.
17. Chen, Z. Q., Ming, T. X., & Nielsen, H. I. (2010). Maturation arrest of human oocytes at germinal vesicle stage. *Journal of human reproductive sciences*, 3(3), 153.
  18. Coward, K., & Wells, D. (Eds.). (2013). *Textbook of clinical embryology*. Cambridge University Press.
  19. Dang, Y., Zhao, S., Qin, Y., Han, T., Li, W., & Chen, Z. J. (2015). MicroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 103(3), 802-807.
  20. De Felici, M. (2013). Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In *Oogenesis* (pp. 19-37). Springer, London.
  21. Ding, F., & Chaillet, J. R. (2002). In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14861-14866.
  22. Di Cristofano, A., & Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 100(4), 387-390.
  23. Dowshen, S. (2010). About Human Reproduction. *Updated May*.
  24. Eden, J. (2005). *Polycystic Ovary Syndrome: A woman's guide to identifying and managing PCOS*. Allen & Unwin.
  25. Familiari, G., Makabe, S., & Motta, P. (Eds.). (2012). *Ultrastructure of the Ovary* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.

26. Fei, F., Qu, J., Liu, K., Li, C., Wang, X., Li, Y., & Zhang, S. (2019). The subcellular location of cyclin B1 and CDC25 associated with the formation of polyploid giant cancer cells and their clinicopathological significance. *Laboratory Investigation*, 99(4), 483-498.
27. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K., & Nakayama, K. I. (2011). Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *Journal of anatomy*, 218(6), 668-677.
28. Fridovich-Keil, J. L., Gubbels, C. S., Spencer, J. B., Sanders, R. D., Land, J. A., & Rubio-Gozalbo, E. (2011). Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(2), 357-366.
29. Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K pathway in human disease. *Cell*, 170(4), 605-635.
30. Furuya, T., Kim, M., Lipinski, M., Li, J., Kim, D., Lu, T., ...& Yuan, J. (2010). Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Molecular cell*, 38(4), 500-511.
31. Fu, G., & Peng, C. (2011). Nodal enhances the activity of FoxO3a and its synergistic interaction with Smads to regulate cyclin G2 transcription in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 30(37), 3953-3966.
32. Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., & Loewith, R. (2016). TORC2 structure and function. *Trends in biochemical sciences*, 41(6), 532-545.
33. Georges, A., Auguste, A., Bessiere, L., Vanet, A., Todeschini, A. L., & Veitia, R. A. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of molecular endocrinology*, 52(1), R17-R33.
34. Gong, D., & Ferrell Jr, J. E. (2010). The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Molecular biology of the cell*, 21(18), 3149-3161.

35. Goswami, D., & Conway, G. S. (2007). Premature ovarian failure. *Hormone Research in Paediatrics*, 68(4), 196-202.
36. Gravholt, C. H., Juul, S., Naeraa, R. W., & Hansen, J. (1998). Morbidity in Turner syndrome. *Journal of clinical epidemiology*, 51(2), 147-158.
37. Graziottin, A., & Gambini, D. (2015). Anatomy and physiology of genital organs—women. In *Handbook of Clinical neurology* (Vol. 130, pp. 39-60). Elsevier.
38. Hamidi, T., Singh, A. K., & Chen, T. (2015). Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*, 7(2), 247-265.
39. Hamm, B., & Forstner, R. (Eds.). (2007). *MRI and CT of the female pelvis*. Springer Science & Business Media.
40. Handa, R. J., & Weiser, M. J. (2014). Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(2), 197-220.
41. Hashiguchi, Y., Tsuda, H., Inoue, T., Berkowitz, R. S., & Mok, S. C. (2006). PTEN expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology*, 101(1), 71-75.
42. Healey, A. (2010). Embryology of the female reproductive tract. In *Imaging of gynecological disorders in infants and children* (pp. 21-30). Springer, Berlin, Heidelberg.
43. Heindryckx, B., Lierman, S., Combelles, C. M., Cuvelier, C. A., Gerris, J., & De Sutter, P. (2011). Aberrant spindle structures responsible for recurrent human metaphase I oocyte arrest with attempts to induce meiosis artificially. *Human reproduction*, 26(4), 791-800.

44. Hill, K. K., Roemer, S. C., Churchill, M. E., & Edwards, D. P. (2012). Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 348(2), 418-429.
45. Huansheng, D., Qingjie, P., Hanqiong, Z., Lianjun, Z., Bo, C., & Wenbin, Y. (2011). Estrogen inhibits the early development of mouse follicles through regulating the expression of Kit ligand. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(3), 659-664.
46. Ιατράκης Γ. Μ., Βιβλίο Γυναικολογίας, Εκδόσεις Δεσμός, Αθήνα 2006.
47. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*, 6(11), 1122-1128.
48. Teixeira C Miguel <sup>1</sup>, Luís R Raposo, Nuno P Mira, Artur B Lourenço, Isabel Sá-Correia. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol PMID:19633105 PMCID:PMC2747848 DOI:10.1128/AEM.00845-09
49. Jeong, H. J., Itayama, S., & Ueda, H. (2015). A signal-on fluorosensor based on quench-release principle for sensitive detection of antibiotic rapamycin. *Biosensors*, 5(2), 131-140.
50. Johannessen, M., Fontanilla, D., Mavlyutov, T., Ruoho, A. E., & Jackson, M. B. (2011). Antagonist action of progesterone at  $\sigma$ -receptors in the modulation of voltage-gated sodium channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(2), C328-C337.

51. Jones, G. M., Cram, D. S., Song, B., Magli, M. C., Gianaroli, L., Lacham-Kaplan, O., ...& Trounson, A. O. (2008). Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Human reproduction*, 23(5), 1138-1144.
52. Juengel, J. L., Bodensteiner, K. J., Heath, D. A., Hudson, N. L., Moeller, C. L., Smith, P., ... & McNatty, K. P. (2004). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science*, 82, 447-460.
53. Kalmbach, K., & Liu, K. D. (2012). Female reproductive aging. *Infertility: diagnosis, management and IVF. 1sted. New Delhi: Jaypee brothers medical publishers*, 261-2.
54. Kase, N. G. (2013). The normal human ovary part I: reproductive and endocrine functions. *Altchek's Diagnosis and Management of Ovarian Disorders*, 1.
55. Kelley, R. I., & Segal, S. (1989). Evaluation of reduced activity galactose-1-phosphate uridyl transferase by combined radioisotopic assay and high-resolution isoelectric focusing. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 114(2), 152-156.
56. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163-175.
57. Kim, D. H. (2003). Sarbassov D, Ali SM, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 11, 895-904.
58. Jamieson, S., Butzow, R., Andersson, N., Alexiadis, M., Unkila-Kallio, L., Heikinheimo, M., ...& Anttonen, M. (2010). The FOXL2 C134W mutation is characteristic of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Modern pathology*, 23(11), 1477-1485.



59. Kloet, D. E., & Burgering, B. M. (2011). The PKB/FOXO switch in aging and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1926-1937.
60. Komorowska, B. (2016). Autoimmune premature ovarian failure. *Przegląd menopauzalny= Menopause review*, 15(4), 210.
61. Koopman, P. (2016). The curious world of gonadal development in mammals. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 116, pp. 537-545). Academic Press.
62. Kosaki, K., Sato, S., Hasegawa, T., Matsuo, N., Suzuki, T., & Ogata, T. (2004). Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertility and sterility*, 81(4), 1137-1139.
63. Kubota, Y., Hamakawa, T., Osaga, S., Okada, A., Hamamoto, S., Kawai, N., ...& Yasui, T. (2018). A kit ligand, stem cell factor as a possible mediator inducing overactive bladder. *Neuourology and urodynamics*, 37(4), 1258-1265.
64. Lacombe, A., Lee, H., Zahed, L., Choucair, M., Muller, J. M., Nelson, S. F., ...& Vilain, E. (2006). Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics*, 79(1), 113-119.
65. Laissue, P., Christin-Maitre, S., Bouchard, P., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2007). Mutations in the NOG gene are not a common cause of nonsyndromic premature ovarian failure. *Clinical endocrinology*, 66(6), 900-900.
66. Larsen, E. C., Müller, J., Schmiegelow, K., Rechnitzer, C., & Andersen, A. N. (2003). Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation-and chemotherapy-treated childhood cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(11), 5307-5314.

67. Levran, D., Farhi, J., Nahum, H., Glezerman, M., & Weissman, A. (2002). Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility: case report. *Human Reproduction*, *17*(6), 1604-1609.
68. Lew, R. (2019). Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *55*, 2-13.
69. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., ...& Bigner, S. H. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *science*, *275*(5308), 1943-1947.
70. Lyu, S. W., Kim, J. W., Choi, C. H., Seok, H. H., Yoon, T. K., & Kim, A. (2013). Impact of high basal FSH/LH ratio in women with normal FSH levels on in vitro fertilization outcomes. *Gynecological Endocrinology*, *29*(5), 424-429.
71. Luborsky, J. L., Meyer, P., Sowers, M. F., Gold, E. B., & Santoro, N. (2003). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction*, *18*(1), 199-206.
72. Mamsen, L. S., Brøchner, C. B., Byskov, A. G., & Møllgaard, K. (2013). The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 771-778.
73. Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor–oncprotein network. *Trends in biochemical sciences*, *27*(9), 462-467.
74. McConechy, M. K., Ding, J., Senz, J., Yang, W., Melnyk, N., Tone, A. A., ...& Lee, C. H. (2014). Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Modern Pathology*, *27*(1), 128-134.

75. Messerschmidt, D. M., Knowles, B. B., & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & development*, 28(8), 812-828.
76. Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
77. Mohammad, M. B., & Seghinsara, A. M. (2017). Polycystic ovary syndrome (PCOS), diagnostic criteria, and AMH. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(1), 17.
78. Mumm, S., Herrera, L., Waeltz, P. W., Scardovi, A., Nagaraja, R., Esposito, T., ...& Forabosco, A. (2001).  $\chi$ /Autosomal Translocations in the  $\chi$ q Critical Region Associated with Premature Ovarian Failure Fall within and outside Genes. *Genomics*, 76(1-3), 30-36.
79. Nadeem, L., Shynlova, O., Matysiak-Zablocki, E., Mesiano, S., Dong, X., & Lye, S. (2016). Molecular evidence of functional progesterone withdrawal in human myometrium. *Nature communications*, 7(1), 1-9.
80. Nelson, L. M. (2009). Primary ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 606-614.
81. Nilsson, E. E., Schindler, R., Savenkova, M. I., & Skinner, M. K. (2011). Inhibitory actions of anti-Müllerian hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PloS one*, 6(5), e20087.
82. Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5330-5338.

83. Paez, J., & Sellers, W. R. (2004). PI3K/PTEN/Akt Pathway. In *Signal transduction in cancer* (pp. 145-167). Springer, Boston, MA.
84. Park E. Phillip, Ph D., *Anatomy and Physiology*, Hungry Minds, Inc, New York 2001
85. Patiño, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., ...& Harrison, C. A. (2017). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency reduce expression, activity, or synergy with GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(3), 1009-1019.
86. del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., & Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 278(5338), 687-689.
87. Peters, G. A., Yi, L., Skomorovska-Prokvolit, Y., Patel, B., Amini, P., Tan, H., & Mesiano, S. (2017). Inflammatory stimuli increase progesterone receptor-A stability and transrepressive activity in myometrial cells. *Endocrinology*, 158(1), 158-169.
88. Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., ...& Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137(5), 873-886.
89. Pierce, S. B., Gersak, K., Michaelson-Cohen, R., Walsh, T., Lee, M. K., Malach, D., ...& Levy-Lahad, E. (2013). Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 92(4), 614-620.
90. Pierce, S. B., Chisholm, K. M., Lynch, E. D., Lee, M. K., Walsh, T., Opitz, J. M., ...& King, M. C. (2011). Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase

- HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16), 6543-6548.
91. Price, J., & Leng, G. C. (2012). Steroid sex hormones for lower limb atherosclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
92. Prueitt, R. L., Ross, J. L., & Zinn, A. R. (2000). Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenetic and Genome Research*, 89(1-2), 44-50.
93. Rah, H., Jeon, Y. J., Lee, B. E., Kim, J. O., Shim, S. H., Lee, W. S., ... & Kim, N. K. (2013). Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Menopause*, 20(10), 1067-1073.
94. Rahn, D. D., Carberry, C., Sanses, T. V., Mamik, M. M., Ward, R. M., Meriwether, K. V., ...& Murphy, M. (2014). Vaginal estrogen for genitourinary syndrome of menopause: a systematic review. *Obstetrics and gynecology*, 124(6), 1147.
95. Rizzolio, F., Sala, C., Alboresi, S., Bione, S., Gilli, S., Goegan, M., ...& Toniolo, D. (2007). Epigenetic control of the critical region for premature ovarian failure on autosomal genes translocated to the X chromosome: a hypothesis. *Human genetics*, 121(3-4), 441-450.
96. Roy, S. K., Srivastava, R. K., & Shankar, S. (2010). Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *Journal of molecular signaling*, 5(1), 10.
97. Rossetti, R., Di Pasquale, E., Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., ...& Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human mutation*, 30(5), 804-810.

98. Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, *146*(5), 682-695.
99. Ryu, A., & Kim, T. H. (2015). Premenstrual syndrome: A mini review. *Maturitas*, *82*(4), 436-440.
100. Salomonson, E., Stacer, A. C., Ehrlich, A., Luker, K. E., & Luker, G. D. (2013). Imaging CXCL12-CXCR4 signaling in ovarian cancer therapy. *PloS one*, *8*(1), e51500.
101. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ...& Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology*, *14*(14), 1296-1302.
102. Seisenberger, S., Peat, J. R., Hore, T. A., Santos, F., Dean, W., & Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609), 20110330.
103. Schooling, C. M., Yeung, S. L. A., Freeman, G., & Cowling, B. J. (2013). The effect of statins on testosterone in men and women, a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC medicine*, *11*(1), 57.
104. Shaw, G. A., Dupree, J. L., & Neigh, G. N. (2020). Adolescent maturation of the prefrontal cortex: Role of stress and sex in shaping adult risk for compromise. *Genes, Brain and Behavior*, *19*(3), e12626.
105. Sherwood, L. (2015). *Human physiology: from cells to systems*. Cengage learning.

106. Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D., & Magnuson, M. A. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Developmental cell*, 11(4), 583-589.
107. Simpson, J. L., & Rajkovic, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *American journal of medical genetics*, 89(4), 186-200.
108. Sokkary, N., & Dietrich, J. E. (2018). Ovarian embryology, anatomy, and physiology including normal menstrual physiology. In *Endocrine Surgery in Children* (pp. 319-326). Springer, Berlin, Heidelberg.
109. Spicer, L. J., Aad, P. Y., Allen, D. T., Mazerbourg, S., Payne, A. H., & Hsueh, A. J. (2008). Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biology of Reproduction*, 78(2), 243-253.
110. Stagi, S., Di Tommaso, M., Scalini, P., Lapi, E., Losi, S., Bencini, E., ...& de Martino, M. (2016). Triple X syndrome and puberty: focus on the hypothalamus-hypophysis-gonad axis. *Fertility and sterility*, 105(6), 1547-1553.
111. Stanczyk, F. Z., & Clarke, N. J. (2010). Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 121(3-5), 491-495.
112. Stewart, K. R., Veselovska, L., & Kelsey, G. (2016). Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics*, 8(10), 1399-1413.
113. Sullivan, S. D., Welt, C., & Sherman, S. (2011, July). FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 29, No. 04, pp. 299-307). © Thieme Medical Publishers.

114. Suzuki, H., Ahn, H. W., Chu, T., Bowden, W., Gassei, K., Orwig, K., & Rajkovic, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Developmental biology*, 361(2), 301-312.
115. Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., & Tajima, S. (2011). Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9055-9059.
116. Tan, H., Yi, L., Rote, N. S., Hurd, W. W., & Mesiano, S. (2012). Progesterone receptor-A and-B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 97(5), E719-E730.
117. Tee, A. R., & Blenis, J. (2005, February). mTOR, translational control and human disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 16, No. 1, pp. 29-37). Academic Press.
118. Teixeira Filho, F. L., Baracat, E. C., Lee, T. H., Suh, C. S., Matsui, M., Chang, R. J., ...& Erickson, G. F. (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1337-1344.
119. Toffoletto, S., Lanzenberger, R., Gingnell, M., Sundström-Poromaa, I., & Comasco, E. (2014). Emotional and cognitive functional imaging of estrogen and progesterone effects in the female human brain: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 50, 28-52.
120. Toker, A., & Newton, A. C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8271-8274.



121. Trounson, A., Anderiesz, C., & Jones, G. (2001). Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, *121*(1), 51-75.
122. Uygur, D., Sengül, Ö., Bayar, D., Erdinç, S., Batioğlu, S., & Mollamahmutoglu, L. (2005). Bone loss in young women with premature ovarian failure. *Archives of gynecology and obstetrics*, *273*(1), 17-19.
123. van Dam, T. J., Zwartkruis, F. J., Bos, J. L., & Snel, B. (2011). Evolution of the TOR pathway. *Journal of Molecular Evolution*, *73*(3), 209-220.
124. Vabre, P., Gatimel, N., Moreau, J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Parinaud, J., & Leandri, R. D. (2017). Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environmental Health*, *16*(1), 37.
125. Warr, N., & Greenfield, A. (2012). The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *1*(4), 559-577.
126. Wang, Z., Liu, C. Y., Zhao, Y., & Dean, J. (2020). FIGLA, LHX8 and SOHLH1 transcription factor networks regulate mouse oocyte growth and differentiation. *Nucleic acids research*, *48*(7), 3525-3541.
127. Wang, J., Zhang, W., Jiang, H., & Wu, B. L. (2014). Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*, *370*(10), 972-974.
128. Welt, C. K. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clinical endocrinology*, *68*(4), 499-509.
129. Whiteman, E. L., Cho, H., & Birnbaum, M. J. (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *13*(10), 444-451.

130. Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T., & Vander, A. J. (2008). *Vander's Human physiology: the mechanisms of body function*. Boston: McGraw-Hill Higher Education,.
131. Wira, C. R., Rodriguez-Garcia, M., & Patel, M. V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature Reviews Immunology*, *15*(4), 217-230.
132. Woad, K. J., Prendergast, D., Winship, I. M., & Shelling, A. N. (2013). FSH receptor gene variants are rarely associated with premature ovarian failure. *Reproductive Biomedicine Online*, *26*(4), 396-399.
133. Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471-484.
134. Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., ...& Celeste, A. J. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular endocrinology*, *15*(6), 854-866.
135. Zhou, M., Gu, L., Findley, H. W., Jiang, R., & Woods, W. G. (2003). PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer research*, *63*(19), 6357-6362.
136. Καζάκου ΣΠ. Άξονας Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια και Μεταβολικό Σύνδρομο. Phd thesis. Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Επιστημών Υγείας. 2012.
137. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 1992;131(3):1458-66.

138. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2007;80(2):84-97.
139. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327-39.
140. Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(2):667-70.
141. Achiraman S, Archunan G, Sankarganesh D, Rajagopal T, Rengarajan RL, Kokilavani P, et al. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. *Zoolog Sci*. 2011;28(8):600-5.
142. Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod*. 1973;8(4):491-4.
143. Gardner D, Shoback D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 9<sup>th</sup> edn, 2011. The McGraw-Hill Companies, China.
144. Παπακώστα Ε. Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης στην επαγόμενη από δίαιτα παχυσαρκία. MSc thesis. Πανεπιστήμιο Πατρών Σχολή Επιστημών Υγείας -Τμήμα Ιατρικής. 2015.
145. Lee HJ, Lydon PJ, Kim HC. Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *Eur J Immunol*. 2012;42(10): 2683–2696.
146. Foster AH, Davies J, Pink CR, Turkcigdem S, Goumenou A, Carter RD, Saunders JN, Thomas P, Karteris E. The human myometrium differentially expresses mTOR signalling components before and during pregnancy: evidence for regulation by progesterone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;139.

147. Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest* 2003;112(5):65969. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200318740> PMID: 12952915

148. Bava V, Chanickal N, Sreekanth, Arun Kumar T, Thulasidasan. et al., Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- $\kappa$ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.011>

149. Stefanie Eggers 1, Andrew Sinclair, Mammalian sex determination insights from humans and mice PMID: 22290220, PMCID: PMC3279640 , DOI: 10.1007/s10577-012-9274-3

150. Τσατσούλης Α, Φούντας Α, Λάσπα Ε. Σύγχρονο Εγχειρίδιο Ενδοκρινολογίας. 1st edn, 2015. ΣΔΑΒ, Αθήνα, Ελλάδα

151. Bertoldo JM, Walters AK, Ledger LW, Gilchrist BR, Mermillod P, Locatelli Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;36(5): 491 – 499.

152. Stubbs A, Sharron<sup>1</sup>, Lisa J Webber, Jaroslav Stark et al., Role of Insulin-like growth factors in initiation of follicle growth in normal and polycystic human ovaries. PMID: 23750031, DOI: 10.1210/jc.2013-1378

153. Zhang J, Liu W, Sun X, Kong F, Zhu Y, Lei Y, Su Y, Su Y, Li J (2017) Inhibition of mTOR signaling pathway delays follicle formation in mice. *J Cell Physiol* 232(3):585–595. <https://doi.org/10.1002/jcp.25456>