



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΤΣΙΑΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΓΑΘΟΚΛΗΣ ΤΣΑΤΣΟΥΛΗΣ**

**Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΑΡΧΗΣ ΣΕ ΕΦΗΒΕΣ
ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΟΝΙΤΣΑΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΩΑΝΝΑ Ν. ΣΤΑΥΡΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.

ΑΙΤΗΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 5-10-1999

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 393α/23-11-1999

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Αγαθοκλής Τσατσούλης Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

ΜΕΛΗ:

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Ιωάννης Δημολιάτης Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής

ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 467α/2-4-2002

ΜΕΛΗ ΝΕΑΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Αγαθοκλής Τσατσούλης Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Ιωάννης Ιωαννίδης Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής

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

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 19-5-2000

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 12-4-2005

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ:

Επαμεινώνδας Τσιάνος Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αγαθοκλής Τσατσούλης Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Ευάγγελος Παρασκευαΐδης Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Κωνσταντίνος Μπουραντάς Καθηγητής Παθολογίας

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

Ιωάννης Ιωαννίδης Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής

Σοφία Καλανταρίδου Επίκουρος Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Γεώργιος Φιλίππου Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

«Άριστα»

Η Γραμματέας της Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Εμμηναρχή ονομάζεται η εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως. Χαρακτηρίζει την έναρξη της εφηβείας στην οποία συμβαίνουν οι μεγαλύτερες μεταβολές στη σεξουαλική ωρίμανση και τη φυσική ανάπτυξη του σώματος της γυναίκας. Πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία, η οποία απαιτεί αλληλένδετη δράση των οιστρογόνων, της FSH, LH και της προγεστερόνης.

Πολλοί παράγοντες στο παρελθόν έχουν συσχετιστεί με την εμμηναρχή. Η κοινωνική τάξη, η άσκηση, οι διαιτητικοί παράγοντες, και τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά είναι μερικοί από αυτούς. Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος της κληρονομικότητας έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης και η « γενετική υπόθεση» φέρεται να έχει πλέον σημαντικές βάσεις. Παρόλα αυτά ελάχιστες είναι οι πληροφορίες για τους γενετικούς δείκτες που πιθανά να εμπλέκονται.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης τεσσάρων διαφορετικών πολυμορφισμών των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β, καθώς και της πιθανής συνεργικής τους δράσης, με την ηλικία εμμηναρχής. Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων βασίστηκε στη σκέψη ότι η δράση των οιστρογόνων, που αποτελούν τις κυρίαρχες ορμόνες του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, ασκείται σε κυτταρικό επίπεδο με τη βοήθεια των οιστρογονικών υποδοχέων α και β.

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν κορίτσια ηλικίας 12-19 ετών, κάτοικοι της Κόνιτσας και των γύρω χωριών. Η λήψη του ιστορικού, η κλινική εξέταση και η λήψη των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκαν στο Γυμνάσιο και τα Λύκεια της περιοχής. Ο προσδιορισμός των γονιδίων και των πολυμορφισμών έγινε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Θέλοντας να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής θα πρέπει να σταθώ στους καθηγητές μου, τον κ. Α. Τσατσούλη, τον κ. Ι. Ιωαννίδη και τον κ. Ι. Γεωργίου. Χάρη στη βοήθεια και την υπομονή τους ολοκληρώθηκε αυτή η εργασία.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά που συμμετείχαν στη μελέτη καθώς και τους καθηγητές τους. Χωρίς τη συνεργασία και την υπομονή τους δε θα ήταν δυνατή η συγκέντρωση του υλικού για την εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βιολόγο κ. Α. Χατζηκυριακίδου και τον Ιατρό κ. Θ. Τρικαλινό για τη βοήθεια τους.

Για τους γονείς μου οι λέξεις είναι πολύ φτωχές για να εκφράσουν την ευγνωμοσύνη που νιώθω απεναντί τους, καθώς στάθηκαν πάντα με αυτοθυσία δίπλα μου.

Το ίδιο ισχύει και για το συζυγό μου Χρήστο, που με στήριξε σε όλους τους τομείς όλα αυτά τα χρόνια που χρειάστηκαν για να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ

- 1. Ολοκλήρωση
- 1.1. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.2. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.3. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.4. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.5. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.6. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 1.7. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.1. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.2. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.3. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.4. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.5. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ
- 2.6. Ολοκλήρωση σύμφωνα με την ΕΠΙΣΕ

Στο Χρήστο και στη Βάσω

ΚΑΘΕΣΤΩΣ

A. ΖΩΝΕΣ ΤΗΣ ΨΑΡΕΙΑΣ

- α. ΖΩΝΕΣ ΤΗΣ ΨΑΡΕΙΑΣ
- A.1. Ζώνη Α
- A.2. Ζώνη Β
- A.3. Ζώνη Γ
- A.4. Ζώνη Δ
- A.5. Ζώνη Ε
- A.6. Ζώνη ΣΤ
- A.7. Ζώνη Ζ
- A.8. Ζώνη Η
- A.9. Ζώνη Θ
- A.10. Ζώνη Ι
- A.11. Ζώνη Κ
- A.12. Ζώνη Λ
- A.13. Ζώνη Μ
- A.14. Ζώνη Ν
- A.15. Ζώνη Ξ
- A.16. Ζώνη Ο
- A.17. Ζώνη Π
- A.18. Ζώνη Ρ
- A.19. Ζώνη Σ
- A.20. Ζώνη Τ
- A.21. Ζώνη Υ
- A.22. Ζώνη Φ
- A.23. Ζώνη Χ
- A.24. Ζώνη Ψ
- A.25. Ζώνη Ω
- A.26. Ζώνη Ω

Στους γονείς μου

B. ΑΝΑΓΝΩΣΤΗΡΙΟ

- B.1. Αναγνώριση λέξεων
- B.2. Αναγνώριση λέξεων
- B.3. Αναγνώριση λέξεων
- B.4. Αναγνώριση λέξεων

Γ. ΕΠΙΣΕ

1. ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑ

- 1.1. Πρωτοβάθμια
- 1.2. Πρωτοβάθμια

2. ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1. Εισαγωγή	9
1.1. Φυσιολογική ήβη στα θήλεα	9
1.2. Ανάπτυξη των ωοθυλακίων	10
1.3. Ορμονικές μεταβολές στην παραγωγική φάση	11
1.4. Ωοθυλακιόρρηξία	12
1.5. Εμμηναρχή-Ιστορική αναδρομή	14
1.6. Παράγοντες που σχετίζονται με την εμμηναρχή	14
1.7. Βιολογική δράση των οιστρογόνων	16
2. Οιστρογονικός υποδοχέας	17
2.1. Ιστορική αναδρομή	17
2.2. Δομή των οιστρογονικών υποδοχέων	17
2.3. Μηχανισμός δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων	19
2.4. Διαφορές στη δομή των υποδοχέων	22
2.5. Ιστική κατανομή των ERα και ERβ	24
2.6. Ο ρόλος των υποδοχέων στις ωθήκες-Πειραματικά μοντέλα	26
2.7. Γονίδιο του ERα	27
2.8. Γονίδιο του ERβ	27
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	29
4. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
4.1. Ομάδα μελέτης	29
4.2. Γενετικός έλεγχος	29
4.2.α. Εξαγωγή DNA	30
4.2.β. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	30
4.2.γ. Πολυμορφισμοί περιορισμού μήκους θραύσματος (RFLPs)	31
4.2.δ. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης	31
4.3. Γονοτυπικοί προσδιορισμοί για τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς ..	32
4.3.α. Καθορισμός γονοτύπων του γονιδίου του ERα	32
4.3.β. Καθορισμός γονοτύπων του γονιδίου του ERβ	33
4.4. Στατιστική ανάλυση δεδομένων	37
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
5.1. Χαρακτηριστικά συμμετεχόντων	38
5.2. Κατανομή γονοτύπων	38
5.3. Εμμηναρχή και γονότυποι	40
5.4. Συνέργεια μεταξύ των πολυμορφισμών και των δύο γονοτύπων	42
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	
7.1. Περίληψη στα Ελληνικά	47
7.2. Περίληψη στα Αγγλικά	50
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	52

9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ	
9.1. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΑΓΓΛΙΚΩΝ ΟΡΩΝ	53
9.2. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ	55
9.3. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ, ΣΧΗΜΑΤΩΝ	55
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Φυσιολογική ήβη στα θήλεα

Εμμηναρχή ονομάζεται η εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως. Είναι το πρώτο σημείο της σεξουαλικής ωριμότητας της γυναίκας. Χαρακτηρίζει την έναρξη της εφηβείας η οποία ολοκληρώνεται με την πλήρη ανάπτυξη των σωματικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών της. Στην περίοδο αυτή συμβαίνουν οι μεγαλύτερες μεταβολές στη σεξουαλική ωρίμανση και τη φυσική ανάπτυξη του σώματος.

Η φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία εξαρτάται από την αλληλεπίδραση παραγόντων που εκκρίνονται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και την ωοθήκη (Εικόνα 1). Κατά την αναπαραγωγική ηλικία, η κύρια ρυθμιστική μονάδα στην ωοθήκη είναι το ωοθυλάκιο. Το ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα ωάριο, το οποίο περιβάλλεται από στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων, που βρίσκονται κοντά στο ωάριο και από στιβάδες κυττάρων της θήκης, που περιβάλλουν εξωτερικά τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας. Οι εξελικτικές διαδικασίες που εμφανίζει το ωοθυλάκιο, όταν αρχίσει η λειτουργία των ωοθηκών στην εποχή της ήβης, επαναλαμβάνονται κυκλικά κάθε 28 ημέρες, μέχρι την ηλικία της εμμηνόπαυσης. Η αρχή και το τέλος του κυκλικού αυτού διαστήματος, που ονομάζεται γεννητικός κύκλος, καθορίζεται χρονικά από την εμφάνιση της εμμηνορροίας. Ο γεννητικός κύκλος διακρίνεται σε δύο φάσεις, την παραγωγική και την εκκριτική φάση, οι οποίες χωρίζονται από την ωοθυλακιόρρηξη, που πραγματοποιείται στο μέσο του κύκλου. Φυσιολογικά, σε κάθε κύκλο, αναπτύσσεται ένα ωοθυλάκιο (επικρατούν ωοθυλάκιο).

Ωάρια ανιχνεύονται στις εμβρυϊκές ωοθήκες από την 16^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής. Αν και κατά τον πέμπτο μήνα της εμβρυϊκής ζωής υπάρχουν επτά εκατομμύρια, περίπου, ωοθυλάκια, η μεγάλη πλειοψηφία τους υπόκειται σε ατρησία με απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Κατά τη γέννηση υπάρχουν μόνο ένα έως δύο εκατομμύρια ωοθυλάκια και, τελικά, κατά την ήβη υπάρχουν μόνο 500.000 ωοθυλάκια, περίπου. Ο ρυθμός ατρησίας των ωοθυλακίων είναι σταθερός μετά την ήβη, περίπου 1000 ωοθυλάκια ανά γεννητικό κύκλο, και αυξάνεται μετά τα 35 έτη. Τελικά υπο φυσιολογικές συνθήκες, μόνο 400 περίπου ωοθυλάκια φτάνουν μέχρι το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο και καταλήγουν σε ωοθυλακιόρρηξη. Ο γεννητικός κύκλος ρυθμίζεται από την υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), η οποία εκκρίνεται από τον υποθάλαμο στην υποθαλαμο-υποφυσιακή πυλαία κυκλοφορία κατά ώσεις. Στη συνέχεια, υπό τον έλεγχο της GnRH, τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης εκκρίνουν κατά ώσεις τη θυλακιότροπο (follicle stimulating hormone-FSH) και την ωχρινότροπο ορμόνη (Luteinizing hormone-LH). Οι γοναδοτροπίνες προκαλούν την τελική ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλακίου, την ωοθυλακιόρρηξη και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου.

Η παραγωγική φάση, η οποία αρχίζει με την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως και διαρκεί μέχρι την ωοθυλακιόρρηξη, χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου, ενώ η εκκριτική φάση χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του ωχρού σωματίου. Η μέση διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου είναι 28 ημέρες, ενώ μπορεί να κυμαίνεται από 22 έως 35 ημέρες. Η παραγωγική φάση έχει μέση διάρκεια 14 ημέρες, μπορεί, όμως, να κυμαίνεται από οκτώ έως 21 ημέρες. Η εκκριτική φάση έχει διάρκεια 14 ημέρες.

1.2. Ανάπτυξη των ωοθυλακίων (ωοθυλακιογένεση)

Στη διάρκεια της εμβρυϊκής και της παιδικής ζωής, τα ωοθυλάκια βρίσκονται στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης τους (αρχέγονα, πρωτογενή και δευτερογενή) και η ανάπτυξη τους εξαρτάται μόνο από τοπικούς παράγοντες. Τα τελικά στάδια της ωρίμανσης τους, ύστερα από την ήβη, εξαρτώνται κυρίως από τις γοναδοτροπίνες. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια περιέχουν ωάρια που βρίσκονται στο στάδιο της διπλοταινίας (diplotene) της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Τα ωοθυλάκια αυτά είτε ωριμάζουν, με μια πολύπλοκη διαδικασία που ονομάζεται ωοθυλακιογένεση ή γίνονται άτρητα. Η διαδικασία της ωρίμανσης ενός ωοθυλακίου απαιτεί συνολικά 12 μήνες (Gougeon, 1986). Το αρχικό στάδιο, που δεν εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες (gonadotropin-independent stage), διαρκεί περίπου 300 ημέρες, ενώ το τελικό στάδιο, που εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες (gonadotropin-dependent stage), διαρκεί περίπου 50 ημέρες.

Μέχρι σήμερα είναι άγνωστοι οι παράγοντες που καθορίζουν πότε ένα πρωτογενές ωοθυλάκιο θα επιλεγεί (follicle recruitment) για να μπει σε διαδικασία ωρίμανσης. Φαίνεται, πάντως, ότι το γονίδιο για τον ανασταλτικό παράγοντα του όγκου του Wilms (Wilms' tumor inhibitory factor-WTI), που εκφράζεται στα αρχέγονα ωοθυλάκια, αναστέλλει την έναρξη της περαιτέρω ανάπτυξής τους (Hsu et al 1995).

Στα ωοθυλάκια που θα επιλεγούν, αρχίζουν να εκφράζονται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor-EGF), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (transforming growth factor- α , TGF- α), ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) και ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-II (insulin-like growth factor-II, IGF-II), καθώς και οι υποδοχείς τους. Έτσι, μετά την επιλογή του, στο αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicle) παρατηρείται αύξηση του μεγέθους του ωαρίου και πολλαπλασιασμός των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρωτογενούς ωοθυλακίου.

Στη συνέχεια, το ωοθυλάκιο διαφοροποιείται περαιτέρω και σχηματίζονται τα κύτταρα της έσω και της έξω θήκης (δευτερογενές ωοθυλάκιο). Στο δευτερογενές ωοθυλάκιο εμφανίζονται δύο στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο και μία στιβάδα από κύτταρα της θήκης που περιβάλλουν εξωτερικά το ωοθυλάκιο. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υποδοχέων της LH στην έσω θήκη (Macklon et al 1998). Επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας και των κυττάρων της θήκης, καθώς και μεταξύ των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας και του ωαρίου είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική εξέλιξη του ωοθυλακίου.

Το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, στη συνέχεια, εμφανίζει μια κοιλότητα, που περιέχει ωοθυλακικό υγρό (άντρο) και τότε ονομάζεται ώριμο ωοθυλάκιο (Graafian follicle). Τα περισσότερα από τα ωοθυλάκια αυτού του σταδίου υπόκεινται σε ατρησία, μία διαδικασία που χαρακτηρίζεται από απόπτωση των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας (Hsueh et al 1994). Στα ωοθυλάκια που δεν υπόκεινται σε ατρησία, η FSH διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας, την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα και την έκφραση του υποδοχέα της LH (Richards et al 1994), ενώ η LH διεγείρει τα κύτταρα της θήκης για την παραγωγή ανδρογόνων.

Το ώριμο ωοθυλάκιο περιέχει οκτώ έως δέκα στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων. Μέχρι αυτό το στάδιο, η εξελικτική πορεία του ωοθυλακίου εξαρτάται κυρίως από τοπικούς παρακρινείς και αυτοκρινείς μηχανισμούς και όχι από την επίδραση των

υποφυσιακών ορμονών (Hisaw et al 1947). Η περαιτέρω ανάπτυξη του άντρου, δηλαδή της κοιλότητας που περιέχει το ωοθυλακικό υγρό, εξαρτάται από τη δράση της FSH. Η φάση αυτή είναι μία σύνθετη διαδικασία που εξαρτάται από την έκφραση διαφορετικών γονιδίων.

Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας αποτελούν τον κύριο στόχο της δράσης της FSH. Έτσι με την επίδρασή της, υπόκεινται σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (Richards et al 1995) και σχηματίζουν τον ωοφόρο δίσκο (cumulus cells). Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας του ωοφόρου δίσκου συνθέτουν υαλουρονικό οξύ και άλλες γλυκοζαμίνες και προκαλούν περαιτέρω διεύρυνση του άντρου (cumulus expansion). Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιτρέπει κατά την ωοθυλακιορρηξία την απελευθέρωση του ωαρίου μαζί με τον ωοφόρο δίσκο, γεγονός που διευκολύνει τη σύλληψη του ωαρίου από τους κροσσούς της σάλπιγγας και επιτρέπει τη γονιμοποίηση του από ένα σπερματοζώαριο.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το ωάριο είναι ο κύριος ρυθμιστής των γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας υπό την επίδραση της FSH. Η δράση αυτή του ωαρίου καθορίζεται με την παραγωγή διαφόρων αυξητικών παραγόντων. Στην τελική ωρίμανση του πυρήνα του ωαρίου σημαντικό ρόλο παίζουν τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, η ανασταλίνη, η ακτιβίνη, η φολλιστατίνη κ.α.

1.3.Ορμονικές μεταβολές στην παραγωγική φάση

Μεταξύ εφηβείας και εμμηνόπαυσης, η ωοθήκη παρουσιάζει μία κυκλική λειτουργία υπό τον έλεγχο του υποθαλάμου και της υπόφυσης (Kalandaridou et al 2002). Η συχνότητα της έκκρισης της είναι υψηλότερη κατά την παραγωγική φάση (μία αιχμή κάθε 90 λεπτά), σε σύγκριση με την εκκριτική φάση (μία αιχμή κάθε δύο έως τέσσερις ώρες στην αρχή της εκκριτικής φάσης, κάθε τέσσερις έως έξι ώρες στο μέσον της εκκριτικής φάσης και κάθε οκτώ έως 12 ώρες στο τέλος της εκκριτικής φάσης). Η ωοθήκη ανταποκρίνεται στη δράση των γοναδοτροπινών με την παραγωγή ενός ώριμου ωοθυλακίου, το οποίο υπόκειται σε ωοθυλακιορρηξία. Μετά την απελευθέρωση του ωαρίου σχηματίζεται το ωχρο σωματίο. Κατά μέσο όρο, ο κύκλος αυτός διαρκεί 28 ημέρες.

Οι τελευταίες 15 ημέρες της ανάπτυξης του ωοθυλακίου εξαρτώνται από την κυκλική αύξηση της FSH. Στην αρχή της παραγωγικής φάσης, η αύξηση των επιπέδων της FSH επιτρέπει σε ένα έως 15 ωοθυλάκια που έχουν άντρο (antral follicles) τη δυνατότητα να μετατραπούν σε επικρατούντα, αν και, σε φυσιολογικό κύκλο, ένα μόνο ωοθυλάκιο θα γίνει προ-ωοθυλακιορρηκτικό.

Η αύξηση της FSH είναι αποτέλεσμα της μείωσης των επιπέδων της οιστραδιόλης και της ανασταλίνης-α του προηγούμενου κύκλου. Η αύξηση των επιπέδων της FSH σηματοδοτεί την ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου (FSH threshold level). Αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οιστρογόνων από τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας του επικρατούντος ωοθυλακίου, τα οποία στη συνέχεια προκαλούν μείωση των επιπέδων της FSH, μέσω της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Η δράση της FSH στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας προκαλεί αύξηση του μεγέθους του άντρου, πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, παραγωγή 17β-οιστραδιόλης και έκφραση των υποδοχέων της LH. Η έκφραση των υποδοχέων της LH στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας, όταν το ωοθυλάκιο βρίσκεται σε προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο, έχει ως σκοπό την προετοιμασία του επικρατούντος ωοθυλακίου για τη δράση της εκκριτικής αιχμής της LH, με αποτέλεσμα την ωοθυλακιορρηξία.

Η σύνθεση και η έκκριση της FSH ρυθμίζεται από τη GnRH, την οιστραδιόλη, τις ανασταλτίνες α και β και τις ακτιβίνες. Όπως είναι γνωστό η οιστραδιόλη είναι στεροειδής ορμόνη και αποτελεί το κύριο οιστρογόνο που παράγεται από την ωοθήκη, ενώ οι ακτιβίνες και οι ανασταλτίνες είναι διμερείς γλυκοπρωτεΐνες. Η παραγωγή οιστραδιόλης αυξάνεται όταν στα ωοθυλάκια σχηματίζεται το άντρο και επιλέγονται για περαιτέρω ανάπτυξη. Τα υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης παρατηρούνται στο προ-ωθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.

Στα ώριμα ωοθυλάκια, η LH έχει συνεργιστική δράση με την FSH. Τα κύτταρα της θήκης διεγείρονται από την LH για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδροστενδιόνη και τεστοστερόνη από τα ένζυμα P450 (cytochrome P450 side chain cleavage oxidase-P450sc) και 3β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση (3β-hydroxysteroid dehydrogenase). Στη συνέχεια, κάτω από την επίδραση της FSH, η αρωματάση στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας μετατρέπει την ανδροστενδιόνη και την τεστοστερόνη σε οιστρόνη και 17β-οιστραδιόλη, αντίστοιχα. Η αρωματάση (P450arom), δηλαδή το ένζυμο που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα, ρυθμίζεται από το γονίδιο CYP19.

Η παραγωγή οιστρογόνων εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας που εκφράζουν την αρωματάση, την ποσότητα των ανδρογόνων και τα επίπεδα της FSH. Η συγκέντρωση της 17β-οιστραδιόλης εξαρτάται από τη διάμετρο του επικρατούντος ωοθυλακίου.

Το τέλος της παραγωγικής φάσης εξαρτάται κυρίως από την LH. Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη φάση που αναπτύσσεται το επικρατούν ωοθυλάκιο, η LH διεγείρει τη στεροειδογένεση στα κύτταρα της θήκης. Αυτή η δράση της LH αυξάνεται από παρακρινική δράση της ανασταλτίνης που παράγεται στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας και από τη μεγάλη βιοδραστικότητα του συστήματος των IGFs, λόγω της μικρής ποσότητας των δεσμευτικών τους πρωτεϊνών. Η μεγάλη παραγωγή των ανδρογόνων και η υψηλή δραστηριότητα της αρωματάσης έχει ως αποτέλεσμα τα μεγάλα επίπεδα των οιστρογόνων που παράγονται από το προωθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.

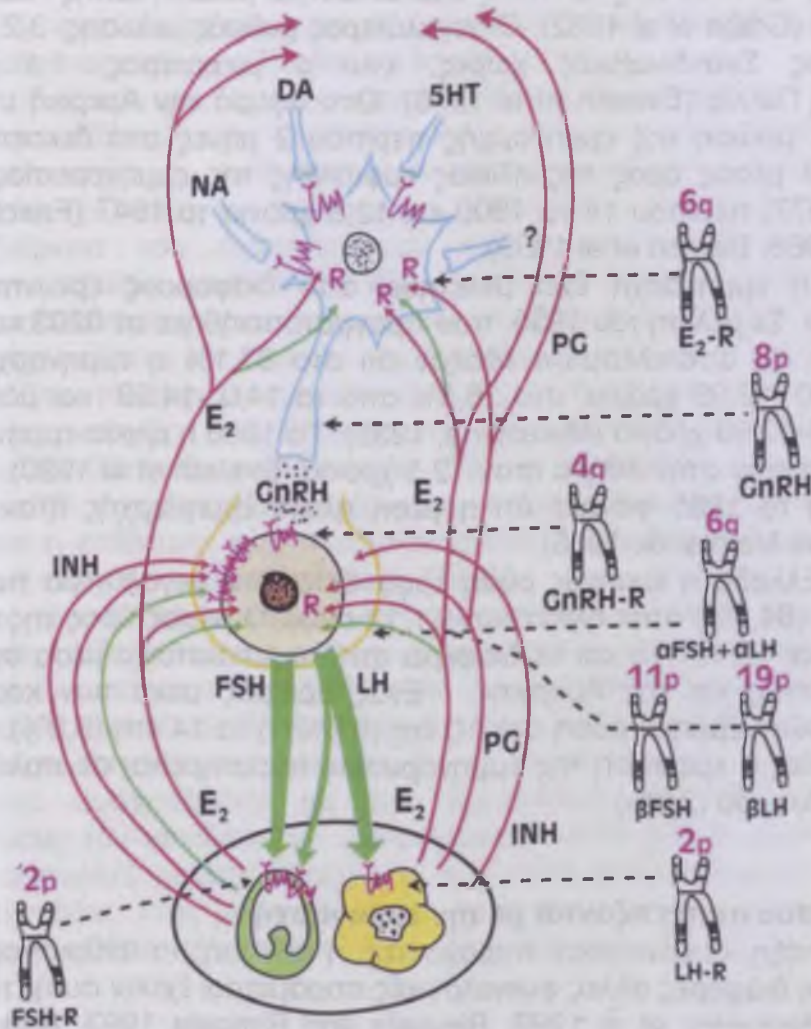
Εκτός από την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης, η LH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακιορρηξία. Η ωοθυλακιορρηξία, δηλαδή η απελευθέρωση του ωαρίου, σηματοδοτείται από οιστρογονοεξαρτώμενη εκκριτική αιχμή της LH στο μέσο του κύκλου.

1.4.Ωοθυλακιορρηξία

Η ωοθυλακιορρηξία σηματοδοτείται από την εκκριτική αιχμή της LH και πραγματοποιείται 36 ώρες αργότερα. Κατά την ωοθυλακιορρηξία, τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας του ωοφόρου δίσκου απελευθερώνονται μαζί με το ωάριο στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Η εκκριτική αιχμή της LH αποτελεί μία περίπτωση «νευροενδοκρινικής μεταβολής». Έτσι, ενώ η οιστραδιόλη προκαλεί αρνητική επίδραση στην έκκριση της FSH και της LH στο μεγαλύτερο μέρος της παραγωγικής φάσης, η αυξανόμενη παραγωγή οιστρογόνων από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο στο μέσον του κύκλου, και συγκεκριμένα όταν η στάθμη της οιστραδιόλης υπερβεί ορισμένα όρια (συνήθως άνω των 250-450 pg/ml) και διατηρηθεί υψηλή επί ένα ή δύο 24ώρα, η δράση της ορμόνης γίνεται θετική και προκαλεί την απελευθέρωση μεγάλων εκκριτικών αιχμών της LH. Η εκκριτική αιχμή της LH είναι η συνισταμένη δύο κυρίως επιδράσεων των αυξανόμενων επιπέδων των οιστρογόνων στον άξονα «υποθάλαμος- υπόφυση» 1)αυξημένης ανταπόκρισης των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης στη GnRH, και 2) αύξησης των υποδοχέων της GnRH (Buffer et al 1998). Τέλος, φαίνεται ότι και η

αύξηση της προγεστερόνης παίζει κάποιο ρόλο στην εκκριτική αιχμή της LH, καθώς αύξηση της προγεστερόνης παρατηρείται 12 έως 40 ώρες πριν από την εκκριτική αιχμή.

Η εκκριτική αιχμή της LH προκαλεί τη συνέχιση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, την έναρξη της νεοαγγείωσης του τοιχώματος του ωοθυλακίου και την ωοθυλακιόρρηξη (Buffer et al 1998, Anasti et al 1998).



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του λειτουργικού κυκλώματος και της αλληλεπίδρασης των παραγόντων που ρυθμίζουν την κυκλική ορμονική και αναπαραγωγική λειτουργία των ωοθηκών. Το κύκλωμα απαρτίζεται από τον παλμοδότη της GnRH και τους νευρομεταβιβαστές, την GnRH, τις υποφυσιακές γοναδοτροφίνες, τις ωοθηκικές ορμόνες και σε κάθε επίπεδο τους τοπικούς παράγοντες (οιστρογονικούς υποδοχείς, υποδοχείς της FSH, LH κ.τ.λ.) που δρουν τροποποιητικά.

1.5. Εμμηναρχή - Ιστορική αναδρομή

Οι αρχαιότερες αναφορές όσο αφορά την εμμηναρχή συναντώνται στα συγγράμματα του Αριστοτέλη (Amundsen et al 1969)

Παρατηρήσεις των τελευταίων 150 χρόνων έδειξαν μία τάση για μείωση του μέσου όρου της ηλικίας εμφάνισης της εμμηνορυσίας τόσο στην Ευρώπη όσο και την Αμερική. Η τάση αυτή κυμαινόταν από μία μέγιστη τιμή, γύρω στα 17 χρόνια στη Νορβηγία του 1840, στα 13 χρόνια στην Ευρώπη του 1960 (Tanner 1966). Σε μία ανασκόπηση, η οποία περιελάμβανε 218 αναφορές σχετικά με την εμμηναρχή στην Ευρώπη, από το 1795 έως το 1981, διαπιστώθηκε μείωση αυτής κατά 2-3 μήνες ανά δεκαετία (Grage et al 1982). Ο μεγαλύτερος ρυθμός μείωσης, 3,2 μήνες παρατηρήθηκε στις Σκανδιναβικές χώρες, ενώ ο μικρότερος, 1,1 μήνες παρατηρήθηκε στη Γαλλία (Eveleth et al 1976). Όσο αφορά την Αμερική υπήρχε επίσης η τάση για μείωση της εμμηναρχής περίπου 2 μήνες ανά δεκαετία τον τελευταίο αιώνα. Ο μέσος όρος της ηλικίας εμφάνισης της εμμηνορυσίας ήταν 14,75 χρόνια το 1877, περίπου 14 το 1900 και 12,8 χρόνια το 1947 (Frisch et al 1971, Cone et al 1968, Damon et al 1969).

Στην Ελλάδα η εμμηναρχή έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές τα τελευταία 60 χρόνια. Σε μελέτη του 1935, που πραγματοποιήθηκε σε 6203 κορίτσια από όλη τη χώρα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο 37,1% η εμμηναρχή είχε συμβεί από τα 13,0 -13,99 χρόνια, στο 26,5% από τα 14,0 -14,99 και μόνο στο 18,6% από τα 12,0-12,99 χρόνια (Maiaspina, 1935). Το 1980 η ηλικία εμμηναρχής για κορίτσια που ζούσαν στην Αθήνα ήταν 12,5 χρόνια (Eveleth et al 1990). Σε μία πανελλήνια μελέτη το 1985 φάνηκε ότι η μέση ηλικία εμμηναρχής ήταν 12,59 χρόνια (Mantzagrioti-Meimaridi, 1985).

Σήμερα στην Ελλάδα η έμμηνος ρύση εμφανίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων (84,7%) στην ηλικία των 11-13 ετών. Ο μέσος όρος της ηλικίας εμφάνισης της είναι $12,1 \pm 1,15$ και δε διαφέρει από τον αντίστοιχο μέσο όρο των κρατών της Ευρώπης και της Αμερικής. Ένας αριθμός μόνο των κοριτσιών εμφανίζουν την πρώτη έμμηνο ρύση στα 10 έτη (6,6%) ή τα 14 έτη (5,8%). Πέραν από αυτές τις ηλικίες η εμφάνιση της εμμηνορυσίας παρατηρείται σε πολύ μικρό ποσοστό του πληθυσμού (2,9%).

1.6. Παράγοντες που συσχετίζονται με την εμμηναρχή

Η κοινωνική τάξη, οι διαιτητικοί παράγοντες, η άσκηση, τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, και διάφορες άλλες φυσιολογικές παράμετροι έχουν συσχετιστεί με την εμμηναρχή (Merzenich et al 1993, Rimpela and Rimpela 1993, Burke et al 1992, Stanton et al 1992, Dare et al 1992, Elizondo 1992, Stark et al 1989, Meyer et al 1990, Frisch et al 1980, Vandenbroucke et al 1982, Garn and LaVelle 1983, Forbes, 1992). Πολλοί ερευνητές συσχέτισαν την εμμηναρχή με το σωματικό βάρος (Meyer et al 1990, Merzenich et al. 1993, Stark et al 1989). Παρόλα αυτά η έναρξη της εμμηνορυσίας δεν εξαρτάται από την επίτευξη ενός συγκεκριμένου σωματικού βάρους όπως είχε διατυπωθεί από τον Frisch το 1970 (Hypothesis of critical body weight) (Garn and LaVelle 1983, Garn et al. 1983, Stanton et al. 1992). Αντιθέτως, η πρώιμη εμμηναρχή έχει συσχετιστεί με μειωμένο σωματικό βάρος στις ενήλικες γυναίκες (Garn et al. 1986, Sherman et al. 1981).

Ο ρόλος της κληρονομικότητας στην εμμηναρχή έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια, και η "γενετική υπόθεση" φαίνεται να έχει πλέον σημαντικές βάσεις. Οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε τρία κυρίως επίπεδα: α) μελέτες

διδύμων, β) μελέτες οικογενειών (μητέρας-κόρης, μεταξύ αδερφών), και γ) αναζήτηση γενετικών δεικτών.

Τρεις μεγάλες μελέτες σε ενήλικες διδύμους από την Αυστραλία, τη Μεγάλη Βρετανία και τη Νορβηγία (Treolar and Martin 1990, van den Akker et al 1987, Golden 1981) με αναδρομική εκτίμηση της ηλικίας της εμμηναρχής έδειξαν ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν ρόλο σε ποσοστό μεγαλύτερο από 60%. Παλαιότερες και πιο μικρές μελέτες σε διδύμους είχαν δείξει αρχικά το ρόλο των γενετικών παραγόντων (Sklad 1977, Fischbein 1977, Gedda and Brenci 1975, Sharma 1983). Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύονται από τις συσχετίσεις που βρέθηκαν στις ηλικίες εμμηναρχής μεταξύ αδερφών και μητέρων-θυγατέρων, όπως περιγράφεται από τους Treolar και Martin (1990).

Κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα μάλιστα φάνηκε να αλλάζει η αναλογία στην επίδραση των περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, τόσο που με τον καιρό η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων να ελαχιστοποιείται. Η τάση για μείωση του μέσου όρου της ηλικίας εμμηναρχής κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα υποστηρίζει το παραπάνω συμπέρασμα (Wyshak and Frisch 1982, Eveleth and Tanner 1990). Η βελτίωση των κοινωνικοοικονομικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης και της βελτίωσης της διατροφής φαίνεται να είναι οι σημαντικότεροι από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έτσι για παράδειγμα στη Φιλανδία υπήρχε μια τάση για μείωση της ηλικίας της εμμηναρχής στη δεκαετία του '60 η οποία δε συνεχίστηκε στη δεκαετία του '80 (Rimpela and Rimpela 1993). Τα κορίτσια που γενήθηκαν τη δεκαετία του '70 στη Φιλανδία μεγάλωσαν σε μια κοινωνία με άριστο βιοτικό επίπεδο. Έτσι η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων ήταν ελάχιστη σε σχέση με αυτή των γενετικών (Stark et al. 1989).

Ελάχιστες είναι οι πληροφορίες για τους γενετικούς δείκτες που εμπλέκονται στην εμμηναρχή. Τα τελευταία χρόνια κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου του μεταβολισμού των οιστρογόνων (CYP gene polymorphisms) έχουν συσχετιστεί με την έναρξή της (Lai et al., 2001, Ambrosone et al., 2002, Kadlubar et al., 2003). Σε μία τελευταία μελέτη μάλιστα φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου των οιστρογόνων συσχετίζονται με την εμμηναρχή, σε αντίθεση με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα α (Gorai Itsuo et al 2003). Αν και πολλές μελέτες έδειξαν ότι η λεπτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της εφηβείας, ένας μόνο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με την εμμηναρχή, κι αυτός όχι σαν ανεξάρτητος παράγοντας (Comings et al., 2001).

1.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Είναι γνωστό ότι η βιολογική δράση των οιστρογόνων, ασκείται σε πολλούς ιστούς του σώματος. Ιδιαίτερα ευαίσθητοι, όμως είναι το γεννητικό σύστημα και οι ιστοί, οι οποίοι συμβάλουν στην εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτήρων. Κάτω από τη δράση της οιστραδιόλης, του σημαντικότερου οιστρογόνου, το γεννητικό σύστημα του θήλεος και οι ιστοί αυτοί εμφανίζουν θεαματικές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές. Έτσι για παράδειγμα στο ενδομήτριο και στο μυομήτριο η οιστραδιόλη προκαλεί υπερπλασία. Στους αδένες του τραχήλου και στις σάλπιγγες αύξηση της έκκρισης των αδένων. Στους μαστούς ανάπτυξη του μαζικού αδένα. Στο ωοθυλάκιο διέγερση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας και αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της FSH. Στον υποθάλαμο και την υπόφυση ασκεί παλίνδρομη ρυθμιστική επίδραση, η οποία επηρεάζει την έκκριση των γοναδοτροπινών και της GnRH.

Η δράση της οιστραδιόλης σε όλους τους παραπάνω στόχους ασκείται σε κυτταρικό επίπεδο με τη βοήθεια των οιστρογονικών υποδοχέων α και β (ER α , ER β), ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Οι ER ζ παίζουν ουσιαστικά το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα. Υπάρχουν πολλά γονίδια, των οποίων πιστεύεται ότι ρυθμίζεται η έκφραση τους από την οιστραδιόλη. Ορισμένα από αυτά, που έχουν μέχρι στιγμής ανακαλυφθεί, είναι τα ακόλουθα:

- Cell Cycle Progression-related genes. Πρόκειται για γονίδια που έχουν σχέση με τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Η οιστραδιόλη επάγει την έκφραση τους, πραγματοποιώντας έτσι τον σημαντικότερο ρόλο της, που είναι η πρόκληση κυτταρικής υπερπλασίας (Charpentier et al., 2000).
- Inhibin α and Inhibin β B genes (γονίδιο της ανασταλτίνης α και γονίδιο της ανασταλτίνης β B) (Charpentier et al., 2000). Η ανασταλτίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται από μια α και β υπομονάδα. Η σύνθεση κάθε υπομονάδας ελέγχεται από χωριστό γονίδιο. Η στάθμη της στο αίμα είναι σταθερή μέχρι την εποχή της ωορρηξίας κατά την οποία παρουσιάζει μια εκκριτική αιχμή ακολουθούμενη από μείωση και στη συνέχεια σημαντική αύξηση κατά την ωχρινική φάση. Η δράση της είναι η αναστολή της έκκρισης της FSH στο επίπεδο της υπόφυσης, καθώς και η τοπική παρακρινική δράση στις ωοθήκες. Η έκφραση του γονιδίου της ανασταλτίνης α και β ρυθμίζεται, από την FSH και από την οιστραδιόλη.
- Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του θερμικού shock (HSPs=Heat Shock Proteins) (HSPCB, HSPCA, HSPD1, HSPA10, FKBP4 genes). Οιστρογονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκτέθηκαν σε αγωγή με οιστραδιόλη εμφάνισαν έκφραση των HSPCA και HSPCB γονιδίων που προηγουμένως δεν υφίσταται, και αύξηση της έκφρασης των υπολοίπων (Charpentier et al., 2000).
- Οιστρογονοεπαγόμενα γονίδια (Estrogen-induced genes), E2IG1, E2IG2, E2IG3, E2IG4, E2IG5 genes. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε οιστρογονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα του μαστού τα οποία εκτέθηκαν σε οιστραδιόλη (Charpentier et al., 2000).
- Ογκογονίδια (Tumor associated genes) Σε οιστρογονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκτέθηκαν σε οιστραδιόλη παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης ορισμένων ογκογονιδίων, όπως των RFP, D52L1, TFF1, CAV1, NDKA και άλλων (Charpentier et al., 2000).

2. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

2.1. Ιστορική αναδρομή

Πριν από 30 χρόνια οι Jensen και Jacobsen (Jensen et al 1962) κατέληξαν στο συμπέρασμα, βασιζόμενοι στην ειδική σύνδεση της οιστραδιόλης (E_2) στη μήτρα, ότι η βιολογική δράση των οιστρογόνων ρυθμίζεται μέσω κάποιου πρωτεϊνικού υποδοχέα. Επί 24 χρόνια αυτή η πρωτεΐνη μελετήθηκε εκτενώς σε διάφορα εργαστήρια (Chamnes et al 1972, Gorski et al 1984), και το 1986 δύο ομάδες ανακοίνωσαν την κλωνοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER) (Green et al). Μέχρι το 1995 υποθέταμε ότι υπήρχε μόνο ένας ER, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για τη ρύθμιση όλων των φυσιολογικών και φαρμακολογικών επιδράσεων των φυσικών και συνθετικών οιστρογόνων κι αντιοιστρογόνων. Το 1995 έγινε μία ανακάλυψη, η οποία πιστεύεται ότι ήταν επαναστατική για τη θεραπευτική χρησιμοποίηση των οιστρογόνων. Βρέθηκε ότι υπάρχει και δεύτερος υποδοχέας των οιστρογόνων που ονομάστηκε ERβ (Kuiper et al 1996), ο οποίος εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και έχει ποικίλου βαθμού συγγένεια με τα οιστρογόνα. Η ανεύρεση δεύτερου υποδοχέα και η πιθανή ύπαρξη και άλλων, εξηγεί τη δράση των οιστρογόνων σε ιστούς στους οποίους δεν είχε διαπιστωθεί ο κλασικός οιστρογονικός υποδοχέας, ο οποίος τώρα τηρεί την ονομασία ERα.

2.2. Δομή των οιστρογονικών υποδοχέων

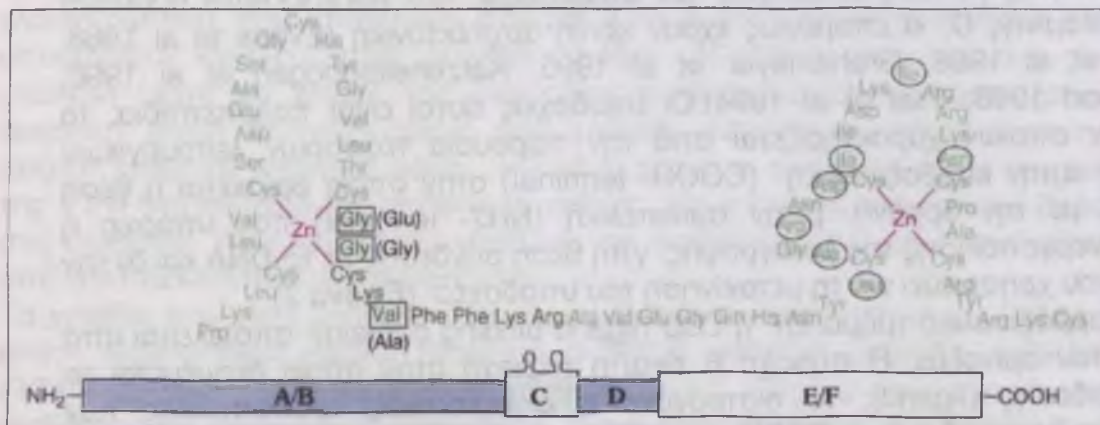
Ο ERα και ο ERβ ανήκουν στην υπεροικογένεια των ενδοκυτταρικών υποδοχέων μαζί με τους υποδοχείς των στεροειδών, των θυρεοειδικών ορμονών και της βιταμίνης D, κι επομένως έχουν κοινή αρχιτεκτονική (Evans et al 1988, Giguene et al 1988, Grohemeyer et al 1995, Katzenellenbogen et al 1996, Mangelsdorf 1998, Tsai et al 1994). Οι υποδοχείς αυτοί είναι πολυπεπτίδια, το μόριο των οποίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων λειτουργικών περιοχών: α) την καρβοξυτελική ($COOH$ - terminal) στην οποία βρίσκεται η θέση σύνδεσης με την ορμόνη, β) την αμινοτελική (NH_2 - terminal) που υπάρχει η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, γ) τη θέση σύνδεσης με το DNA και δ) την περιοχή που χρησιμεύει για τη μετακίνηση του υποδοχέα (Εικόνα 2).

Το καρβοξυτελικό τμήμα E/F ή LBD (ligand binding domain) αποτελείται από 250 περίπου αμινοξέα. Η περιοχή E είναι η περιοχή στην οποία δεσμεύεται το μόριο σύνδεσης (ligand), το οιστρογόνο ή ο εκλεκτικός τροποποιητής των οιστρογονικών υποδοχέων SERM (selective estrogen receptor modulator). Η περιοχή μέσω της οποίας γίνεται η σύνδεση ονομάζεται θέση λειτουργικής ενεργοποίησης 2 (AF-2: activation function site) (Danielian et al 1998). Στην περιοχή αυτή βρίσκεται επίσης και η μία από τις δύο περιοχές των ERs που προκαλούν ενεργοποίηση των μεταγραφικών λειτουργιών, η TAF-2 (transcriptional activation function 2). Η περιοχή F περιλαμβάνει και την έλικα 12, που είναι υπεύθυνη για τη διαφορετική διαμόρφωση του υποδοχέα. Τα αμινοξέα του τμήματος E/F, όταν απουσιάζει η ορμόνη που δεσμεύει, έχουν διάταξη που αδρανοποιεί τον υποδοχέα, που τον εμποδίζει δηλαδή να συνδεθεί με το DNA. Όταν ύστερα από τη σύνδεση με την ορμόνη αρθεί η αδρανοποίηση, ενεργοποιούνται οι άλλες περιοχές του υποδοχέα και ασκείται η δράση του ορμονοϋποδοχειακού συμπλέγματος (Tsai et al 1994).

Το αμινοτελικό τμήμα, A/B έχει ιδιότητες μεταγραφικού παράγοντα. Δρά στην περιοχή του ενισχυτή του DNA και προάγει τη μεταγραφή του mRNA, το οποίο αποτελεί το στόχο της δράσης της ορμόνης (Krans et al 1995). Η αλληλεπίδραση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, οιστρογόνοαπαντητικών στοιχείων, HRE(Hormone Responsive Elements), πραγματοποιείται στη θέση λειτουργικής ενεργοποίησης 1 (AF-1:activation function site) (Berry et al 1990). Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών λειτουργιών προκαλείται μέσω της περιοχής TAF-1 (transcriptional activation function 1). Πειράματα έδειξαν ότι έλλειψη της περιοχής A/B σε υποδοχείς της προγεστερόνης και των γλυκοκορτικοειδών μειώνει δραματικά τη μεταγραφή.

Η θέση σύνδεσης με το DNA, C (DBD:DNA binding domain) βρίσκεται στο μέσο της αμινοξικής αλυσίδας του υποδοχέα, εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα στους υποδοχείς της υπεροικογένειας, και έχει μεγάλη φυλογενετική διατήρηση. Αποτελείται από 66-68 αμινοξέα που περιέχουν σε ορισμένες θέσεις κυστεΐνες, οι οποίες συνδέονται με μόρια ψευδαργύρου και σχηματίζουν τους δακτύλους ψευδαργύρου (zinc fingers). Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου και η μεταξύ τους περιοχή είναι τα σημεία του υποδοχέα που εξασφαλίζουν τη σύνδεση του με αντίστοιχες θέσεις του DNA, που βρίσκεται στην περιοχή του ενισχυτή (enhancer), και ονομάζονται ορμονοαπαντητικά στοιχεία (HRE:Hormone Responsive Elements) (Hard et al 1993, Schwade et al 1993).

Το μικρό ενδιάμεσο τμήμα D, μεταξύ της περιοχής που συνδέει την ορμόνη και της περιοχής που συνδέει τον υποδοχέα με το DNA θεωρείται ότι περιέχει διάταξη που ευνοεί τη μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα.



Εικόνα 2. Ο οιστρογονικός υποδοχέας αποτελείται από τέσσερις λειτουργικές περιοχές: α)την καρβοξυτελική (COOH-terminal) στην οποία βρίσκεται η θέση σύνδεσης με την ορμόνη, β)την αμινοτελική (NH₂-terminal) που υπάρχει η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, γ)τη θέση σύνδεσης με το DNA, C και δ)την περιοχή D που χρησιμεύει για τη μετακίνηση του υποδοχέα. Οι χαρακτηριστικοί δάκτυλοι ψευδαργύρου (Zinc Fingers) της περιοχής C των υποδοχέων, με την οποία ο υποδοχέας συνδέεται με τα ειδικά HRE (Hormone Responsive Elements) του DNA και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η περιοχή με έντονο πράσινο αποτελείται από αμινοξέα που αναγνωρίζουν τα HRE και τα οποία εάν αντικατασταθούν, αλλάζουν την εξειδίκευση του υποδοχέα.

2.3. Μηχανισμός δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα κοντά στη μεμβράνη και έχουν χημική συγγένεια προς την οιστραδιόλη, την οιστρόνη, την οιστριόλη και άλλες ουσίες με παρεμφερή χημική δομή τις οποίες συνδέουν ταχύτατα. Εντός του κυττάρου είναι συνδεδεμένοι με τις πρωτεΐνες του θερμικού shock (HSP=Heat Shock Proteins), οι οποίες εμποδίζουν τους υποδοχείς να ενεργοποιήσουν το DNA του πυρήνα.

Η ένωση της οιστραδιόλης, με τους υποδοχείς της τους απελευθερώνει από τις πρωτεΐνες του θερμικού shock και το ορμονοϋποδοχειακό σύμπλεγμα που δημιουργήθηκε, είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα, πλησιάζει ως διμερές μόριο σε ειδικές θέσεις του DNA, τα ορμονοαπαντητικά στοιχεία (HRE), τα οποία βρίσκονται κοντά στο γονίδιο που θα εκφράσει την ορμονική δράση. Η σύνδεση του διμερούς με τα στοιχεία αυτά λειτουργεί ως ενισχυτής (enhancer), ο οποίος με τη βοήθεια της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής του υποδοχέα κινητοποιεί το μεταγραφικό μηχανισμό του DNA. Το ειδικό mRNA που δημιουργείται μεταφέρει την εντολή στα ριβοσώματα για την αντιγραφή του κώδικα και τη σύνθεση των πρωτεϊνών που εκφράζουν τη βιολογική δράση της οιστραδιόλης (Εικόνα 3). Η δράση των στεροειδών που δρουν με το μηχανισμό αυτό είναι ανάλογη με τη συγγένεια που έχουν προς τους υποδοχείς τους και το χρόνο που παραμένουν ενωμένοι με αυτούς στον πυρήνα. Μετά τη δράση στον πυρήνα, το σύμπλεγμα υποδοχέας-οιστρογόνο διασπάται και ένα μεγάλο μέρος του οιστρογόνου μεταβολίζεται, πιθανώς ενδοπυρηνικά και ο υποδοχέας ξαναεισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Σε αντίθεση με τη δέσμευση, η διάσπαση του συμπλέγματος απαιτεί αρκετές ώρες.

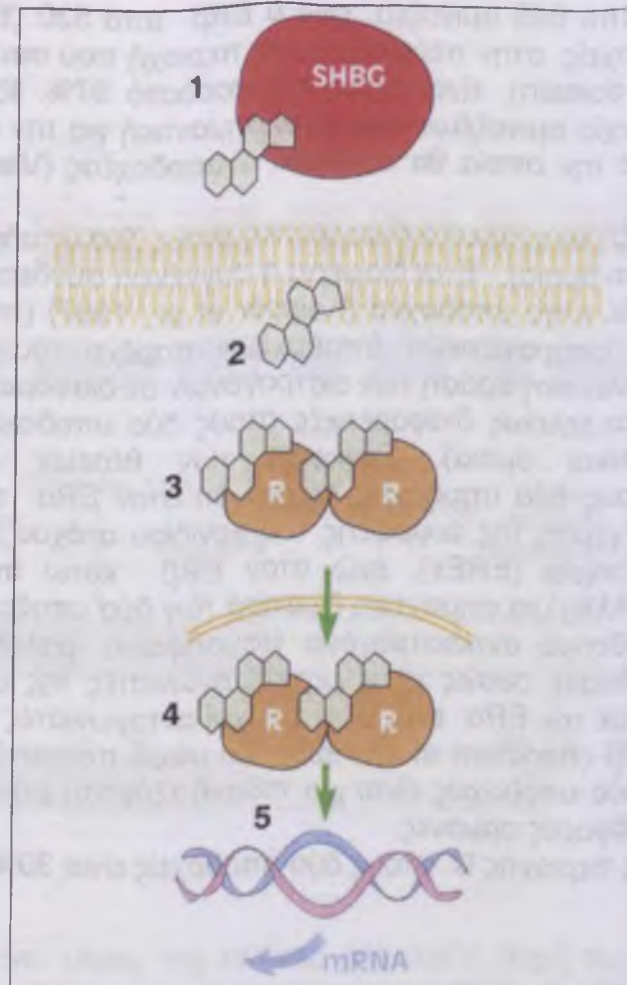
Ο μεταβολισμός της οιστραδιόλης γίνεται από την 3β-υδροξυ-δευδρογενάση, η οποία τη μετατρέπει σε οιστρόνη. Με τη μορφή της οιστρόνης, η οιστραδιόλη εξέρχεται από τον πυρήνα και το κύτταρο. Ο υποδοχέας επανεισερχόμενος στο κυτταρόπλασμα προστίθεται στους άλλους υποδοχείς που υπάρχουν και αυξάνει τον αριθμό τους και την απαντητικότητα του κυττάρου στην ορμονική δράση. Η πορεία του υποδοχέα προς τον πυρήνα μαζί με το οιστρογόνο και η επιστροφή του, που ονομάστηκε ανακύκλωση του υποδοχέα, συνοδεύεται και από ανάλογες αυξομειώσεις της απάντησης του κυττάρου στη συνεχιζόμενη ορμονική δράση. Κατά τη φάση της απουσίας των υποδοχέων από το κυτταρόπλασμα και όσο διαρκεί αυτή, η απάντηση στο ορμονικό ερέθισμα είναι ελαττωμένη, ενώ η επιστροφή των υποδοχέων συνεπάγεται μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της ορμονικής δράσης. Εκτός από την ανακύκλωση των υποδοχέων που χρειάζεται 6-8 ώρες και αυξάνει το δυναμικό των κυτταροπλασματικών υποδοχέων, παρατηρείται σύνθεση νέων οιστρογονικών υποδοχέων μέσα σε 24 ώρες κάτω από τη δράση των οιστρογόνων.

Η χρονική σειρά με την οποία εξελίσσονται τα γεγονότα που αναφέρθηκαν έχει σημασία για την εκδήλωση της ορμονικής δράσης. Η σύνδεση της οιστραδιόλης με τον υποδοχέα και η μεταβασή τους στον πυρήνα γίνεται σε λιγότερο από ένα λεπτό. Το αποτέλεσμα της ενδοπυρηνικής δράσης εκδηλώνεται σε δύο φάσεις. Στις πρώτες 5-6 ώρες παρατηρείται σύνθεση RNA και πρωτεϊνών και αργότερα, μετά 24 ώρες, σημειώνεται αύξηση και πολλαπλασιασμός του κυττάρου. Δεν είναι βέβαιο εάν η αρχική διέγερση στον πυρήνα είναι αρκετή για να προκαλέσει όλη τη σειρά των μεταβολών ή χρειάζεται επανειλημμένη διέγερση ή παρατεταμένη παραμονή του συμπλέγματος στον πυρήνα, για να εξασφαλιστεί το σύνολο των δράσεων. Το σημείο αυτό έχει μεγάλη σημασία για την επιλογή του είδους του

οιστρογόνου και της συχνότητας χορήγησης κατά την εφαρμογή της οιστρογονοθεραπείας. Η οιστραδιόλη σε σχέση με την οιστρόνη και το μεταβολικό τους προϊόν την οιστριόλη έχει μεγάλη συγγένεια και χρόνο παραμονής στον υποδοχέα. Γι' αυτό το λόγο αποτελεί το βιολογικά ισχυρότερο οιστρογόνο του οργανισμού.

Για πολλά χρόνια πιστεύαμε ότι ο μοναδικός μηχανισμός δράσης μέσω του οποίου τα οιστρογόνα επηρεάζουν τη μεταγραφή των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων είναι η άμεση σύνδεση των οιστρογονικών υποδοχέων με τα ορμονοαπαντητικά στοιχεία (HREs=hormone receptor elements) του DNA, ο μηχανισμός δηλαδή που περιγράψαμε παραπάνω. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο ERα και ο ERβ μπορούν επίσης να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων έμμεσα, μέσω της οδού AP-1 (activating protein-1), όπου το σύμπλεγμα υποδοχέας-ορμόνη συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες-μεταγραφικούς παράγοντες.

Ο τρίτος κυτταρικός μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων, στον οποίο, ενδεχομένως, ενέχονται υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη, δεν αφορά στο DNA, αλλά ενεργοποιεί συστήματα ενδοκυττάρων αγγελιοφόρων, όπως, για παράδειγμα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) ή της κινάσης MAP, και η δράση αυτή εκδηλώνεται ταχύτατα. Ο παραπάνω μηχανισμός απαντάται, κυρίως, στα νευρικά κύτταρα και στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων (Kelly et al 2001).



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση της κυτταρικής δράσης της οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη κυκλοφορεί συνδεδεμένη με την SHBG (1), το ελεύθερο όμως κλάσμα της (2) διέρχεται ως λιποδιαλυτό, εισέρχεται στα κύτταρα και όταν συναντήσει τον υποδοχέα της (R) συνδέεται με αυτόν (3). Η ένωση αυτή ενεργοποιεί τον υποδοχέα, ο οποίος αφού διμεριστεί, οδεύει στον πυρήνα (4) και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας στο DNA για την έκφραση της κυτταρικής δράσης της οιστραδιόλης (5).

2.5. Διαφορές στη δομή των υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς των οιστρογόνων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ο ERα και ο ERβ. Είναι διαφορετικές πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι υποδοχείς είναι περιοχές με διαφορετικές λειτουργίες.

Ο ERα αποτελείται από 595 αμινοξέα, ενώ ο ERβ από 530 (Εικόνα 4). Τα αμινοξέα στους δύο υποδοχείς, στην περιοχή C, την περιοχή που συνδέεται με το DNA (DBD:DNA binding domain), είναι όμοια σε ποσοστό 97%. Ιδιαίτερος το σημείο P box, μία αλληλουχία αμινοξέων που είναι σημαντική για την αναγνώριση του τμήματος του DNA με την οποία θα συνδεθεί ο υποδοχέας (Vanacker et al 1999).

Η περιοχή E/F ή (LBD) είναι αρκετά διαφορετική στους δύο υποδοχείς (μόνο το 55% των αμινοξέων είναι όμοια). Έτσι διαφέρει η συγγένεια σύνδεσης τόσο των οιστρογόνων με τον κάθε τύπο υποδοχέα (Kuipffer et al., 1997) (πίνακας 1). Η ύπαρξη επομένως δύο οιστρογονικών υποδοχέων παρέχει τουλάχιστον μία εξήγηση όσο αφορά την εκλεκτική δράση των οιστρογόνων σε διάφορους ιστούς.

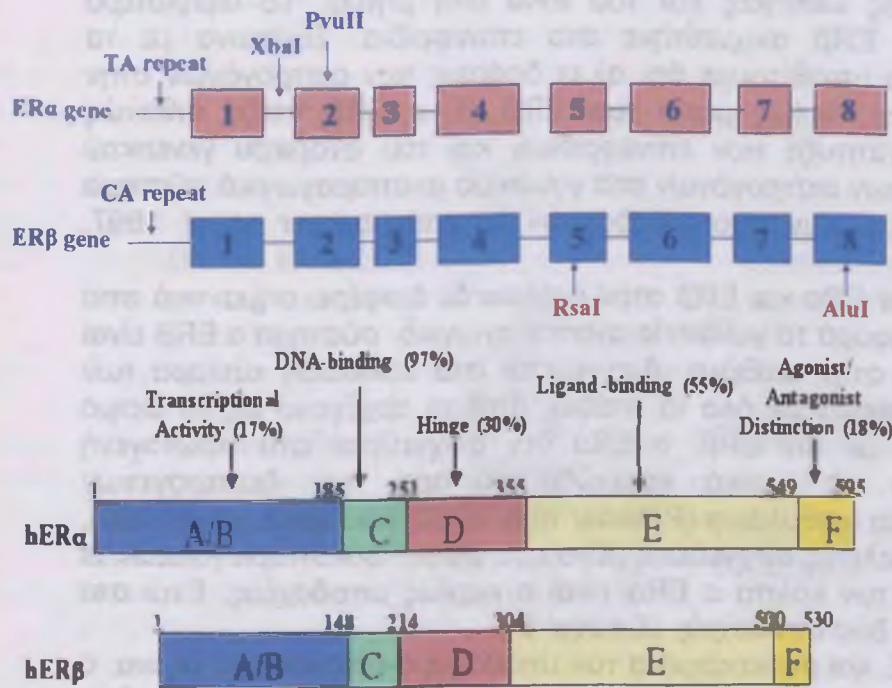
Οι περιοχές A/B είναι τελείως διαφορετικές στους δύο υποδοχείς (μόνο το 17% των αμινοξέων είναι όμοια). Σύγκριση των θέσεων λειτουργικής ενεργοποίησης (AF-1) στους δύο υποδοχείς δείχνει ότι στον ERα η θέση αυτή είναι πολύ ενεργή στη διέγερση της έκφρασης του γονιδίου στόχου από ποικίλα οιστρογονοαπαντητικά στοιχεία (EREs), ενώ στον ERβ κάτω από τις ίδιες συνθήκες είναι αμελητέα. Άλλη μια σημαντική διαφορά των δύο υποδοχέων είναι η απαντησή τους στα συνθετικά αντιοιστρογόνα (ταμοξιφαίνη, ραλοξιφαίνη, ICI-164,384). Οι προαναφερθείσες ουσίες είναι μερικοί αγωνιστές της οιστραδιόλης (E2) όταν αλληλεπιδρούν με τον ERα ενώ είναι φτωχοί ανταγωνιστές της E2 όταν αλληλεπιδρούν με τον ERβ (Barkhem et al 1998). Το μικρό ποσοστό ομοιότητας της A/B περιοχής στους δύο υποδοχείς είναι μία πιθανή εξήγηση για τις διαφορές στην απάντησή τους σε διάφορες ορμόνες.

Τέλος η ομοιότητα της περιοχής D στους δύο υποδοχείς είναι 30%.

Πίνακας 1. Συγγένεια σύνδεσης διαφόρων μορίων με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs).

Μόριο σύνδεσης	ERα	ERβ
17β-οιστραδιόλη	100	100
17α-οιστραδιόλη	58	11
οιστριόλη	14	21
οιστρόνη	60	37
ταμοξιφένη	4	3
ραλοξιφένη	69	16
γενιστεΐνη (φυτοοιστρογόνο)	4	87

τιμές από 0 ως 100: υψηλότερες τιμές υποδηλώνουν μεγαλύτερη συγγένεια



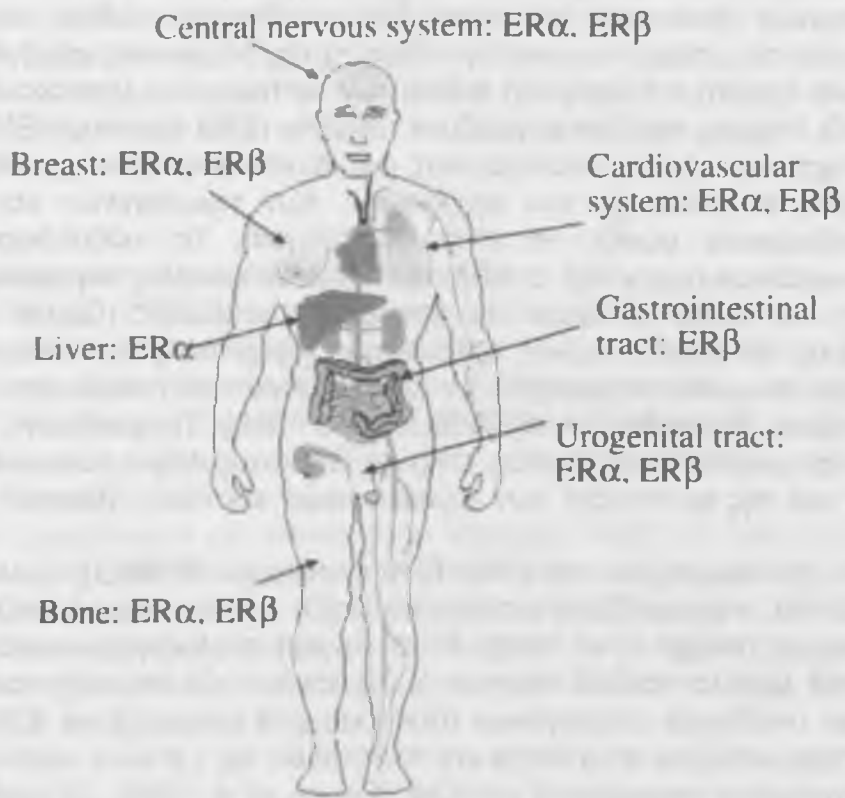
Εικόνα 4. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η δομή των γονιδίων ERα και ERβ, καθώς και οι θέσεις των πολυμορφισμών XbaI, PvuII και AluI, RsaI που μελετήσαμε. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται οι διαφορές στη δομή των ERα και ERβ. Ο ERα αποτελείται από 595 αμινοξέα ενώ ο ERβ από 530. Η περιοχή C είναι όμοια σε ποσοστό 97%, η περιοχή E είναι όμοια σε ποσοστό 55%, η περιοχή A/B σε ποσοστό μόνο 17%, ενώ η περιοχή D 30%.

2.6. Ιστική κατανομή των ERα και ERβ

Η δράση των οιστρογόνων μέσω των ERα και ERβ στην ανάπτυξη του γενετικού συστήματος αρχίζει από την εμβρυϊκή ζωή. Έχουν ανιχνευθεί ERα σε ιστούς μήτρας εμβρύου από τη 15 εβδομάδα κύησης (Glatzstein et al 1995). Σε διάφορους ιστούς εμβρύων που μελετήθηκαν, η έκφραση των ERβ ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν συγκρίθηκε με τους ERα. Όσο αφορά την κατανομή τους ο ERβ ανιχνεύτηκε σε μεγάλες ποσότητες στους όρχεις, ενώ στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών εμβρύων ανιχνεύτηκαν και οι δύο υποδοχείς, με επικράτηση του ERβ στις ωθήκες και του ERα στη μήτρα. Το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης του ERβ ανιχνεύτηκε στα επινεφρίδια. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα υποθέτουμε ότι: α) οι δράσεις των οιστρογόνων στην εμβρυϊκή ζωή ρυθμίζονται κυρίως μέσω των ERβ, β) ο ERβ παίζει πιθανώς σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των επινεφριδίων και του ανδρικού γενετικού συστήματος, γ) η δράση των οιστρογόνων στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα γίνεται με τη βοήθεια και των δύο υποδοχέων (Brandenberger et al 1997, Takeyana et al 2001).

Η ιστική κατανομή των ERα και ERβ στον ενήλικα δε διαφέρει σημαντικά από αυτή του εμβρύου. Όσο αφορά το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα ο ERβ είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας στην ωθήκη. Ανιχνεύεται στα κοκκιώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων σε όλα τα στάδια, από το αρχέγονο ως το ώριμο ωοθυλάκιο. Σε αντίθεση με τον ERβ, ο ERα δεν ανιχνεύεται στα πρωτογενή ωοθυλάκια παρά μόνο σε μερικά κοκκιώδη κύτταρα των δευτερογενών ωοθυλακίων και στα ώριμα ωοθυλάκια (Pelletier et al 2000, Saunders et al 2000), ενώ σύμφωνα με άλλες μελέτες ανιχνεύεται μόνο στα ώριμα ωοκύτταρα (Suzuki et al 1994). Στη μήτρα και τον κόλπο ο ERα είναι ο κυρίως υποδοχέας. Ενώ στο μαστό ανιχνεύονται και οι δύο υποδοχείς (Εικόνα 5).

Όσο αφορά το Κ.Ν.Σ. και συγκεκριμένα τον υποθάλαμο-υποφυσιακό άξονα, ο οποίος ρυθμίζει την ενδοκρινική ομοιοστασία του σώματος συναντώνται και οι δύο υποδοχείς. Συγκεκριμένα στον υποθάλαμο κυρίαρχος είναι ο ERβ και στην υπόφυση ο ERα (Shughue et al 1997, Mitcher et al 1998).



Εικόνα 5. Κατανομή των ER α και ER β σε διάφορους ιστούς.

2.7. Ο ρόλος των υποδοχέων στις ωοθήκες –Πειραματικά μοντέλα

Η δράση των οιστρογόνων, όπως προαναφέρθηκε, ασκείται μέσω της σύνδεσης τους με τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β. Όσο αφορά το γεννητικό κύκλο της γυναίκας, τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στο συγχρονισμό της ωρίμανσης των ωοθυλακίων με τη μεσοκυκλική αιχμή των γοναδοτροπινών και την προετοιμασία της μήτρας για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τα τελευταία χρόνια η δράση των οιστρογόνων έχει αποσαφηνιστεί με τη δημιουργία πειραματικών μοντέλων, στα οποία δεν εκφράζονται τα γονίδια του ERα και του ERβ, καθώς και του ενζύμου της αρωματάσης (knockout mouse models). Έτσι, έγινε δυνατή η μελέτη της δράσης των οιστρογόνων σε πειραματόζωα, στα οποία δεν μπορεί να υπάρξει επίδραση των ενδογενών και εξωγενών οιστρογόνων (knockout για τους δύο υποδοχείς), καθώς και σε πειραματόζωα στα οποία μπορεί να φανεί η επίδραση της εξωγενούς χορήγησης, χωρίς όμως να είναι δυνατή η παραγωγή ενδογενών οιστρογόνων (knockout για την αρωματάση). Οι επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERα (ERα knockout -ERKO), παρουσιάζουν στειρότητα, έχουν υποπλαστική μήτρα και υπεραιμικές ωοθήκες (Couse et al 1999). Η ανάπτυξη των αρχέγονων, των πρωτογενών και των δευτερογενών ωοθυλακίων μοιάζει να είναι φυσιολογική. Τα ωοθυλάκια δεν φτάνουν σε προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο και γίνονται μεγάλες αιμορραγικές κύστεις, με μικρή ποσότητα κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας (Couse et al 1999). Παρόλα αυτά, σε νέους επίμυες η εξωγενής χορήγηση γοναδοτροπινών μπορεί να οδηγήσει σε ωοθυλακιορρηξία, αν και σε μικρότερο βαθμό από τους φυσιολογικούς επίμυες (Rosenfeld et al 2000, Couse 1999). Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται σε μεγαλύτερης ηλικίας επίμυες, πιθανώς λόγω των υψηλών επιπέδων της LH και της ανάπτυξης των αιμορραγικών κύστεων (Korach et al 1994).

Οι επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERβ (ERβ knockout - BERKO), μολονότι εμφανίζουν γονιμότητα, παρουσιάζουν ωοθυλακιορρηξία λιγότερο συχνά από τους φυσιολογικούς επίμυες (Krege et al 1998). Η ιστολογική ανάλυση των ωοθηκών τους δείχνει αρκετά μεγάλο αριθμό άτρητων ωοθυλακίων. Οι επίμυες που δεν εκφράζουν κανέναν υποδοχέα οιστρογόνων (συνδυασμένα knockout για ERα και ERβ, ERαβKO) παρουσιάζουν στειρότητα και τα επίπεδα της LH είναι υψηλότερα από τα δύο προηγούμενα πειραματικά μοντέλα (Couse et al 1999). Οι ωοθήκες τους παρουσιάζουν δομές που μοιάζουν με τα σπερματικά σωληνάρια και τα κύτταρα Sertoli των όρχεων (Couse et al 1999).

Συμπερασματικά, η μελέτη των πειραματικών αυτών μοντέλων έδειξε ότι τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα για τα τελικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης.

2.8. Γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α

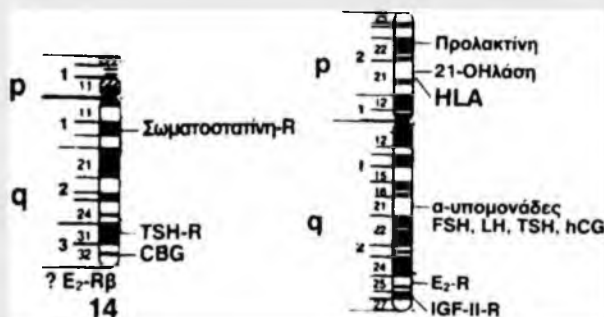
Το γονίδιο του ERα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην περιοχή 6q24-27 (Εικόνα 6). Το μεγεθός του είναι 140kb. Περιλαμβάνει 8 εξόνια με διαφορετικά μεγέθη το καθένα (684bp, 191bp, 117bp, 336bp, 139bp, 134bp, 184bp, 4537bp αντίστοιχα) σε σύνολο 6322bp (Ponglikitmongkol et al 1988).

Η έκφραση του γονιδίου του ERα παράγει μία πρωτεΐνη, μεγέθους 66kb (595 αμινοξέα), τον οιστρογονικό υποδοχέα α. Κάθε εξόνιο του γονιδίου του ERα κωδικοποιεί συγκεκριμένη περιοχή του οιστρογονικού υποδοχέα α. Η περιοχή A/B κωδικοποιείται κατά το μεγαλύτερο μέρος της από το εξόνιο 1. Η περιοχή C (DNA binding domain) κωδικοποιείται από τα εξόνια 2, 3 και ένα τμήμα του εξονίου 4. Η περιοχή D κωδικοποιείται από τμήμα του εξονίου 4. Η περιοχή E (hormone binding domain) κωδικοποιείται από τμήμα του εξονίου 4, τα εξόνια 5,6,7, και τμήμα του 8. Τμήμα του εξονίου 8 κωδικοποιεί και την περιοχή F, η οποία δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του υποδοχέα. Επίσης στο εξόνιο 8 ανήκει μία μεγάλη περιοχή η οποία δε μεταγράφεται (3' untranslated region) και εκτείνεται από το 2021 έως το 6322 νουκλεοτίδιο.

2.9. Γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β

Το γονίδιο του ERβ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και συγκεκριμένα στην περιοχή 14q22-24 (Εικόνα 6). Το μεγεθός του είναι περίπου 40 kb, όμοιο με τα αντίστοιχα γονίδια των ERα και β στα ψάρια. Είναι κατά πολύ μικρότερο από το γονίδιο του ERα (Enmark et al 1997). Περιλαμβάνει 8 εξόνια. Το γονίδιο του ERβ κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, μεγέθους περίπου 125kb (530 αμινοξέα), τον οιστρογονικό υποδοχέα β.

Στο ίδιο χρωμόσωμα και κοντά στην περιοχή 14q22-24 που εντοπίζεται το γονίδιο του ERβ βρίσκεται και το προσφάτως ανακαλυφθέν γονίδιο, που συσχετίζεται με πρώιμη έναρξη της νόσου Alzheimer (Tang et al 1996). Επίσης η περιοχή αυτή του χρωμοσώματος συχνά ενέχεται στον άνθρωπο με αυξημένη συχνότητα νεοπλασιών στους νεφρούς και ινομυωμάτων στη μήτρα (Li et al 1996, Turc-Carel et al 1988).



6

Εικόνα 6. Τα χρωμοσώματα 14 και 6 και οι θέσεις 14q22-24, 6q24-27 που βρίσκονται τα γονίδια του ERβ και του ERα αντίστοιχα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν οι ακόλουθοι:

- η διερεύνηση της επίδρασης τεσσάρων διαφορετικών πολυμορφισμών των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β στην ηλικία εμμηναρχής. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι XbaI, PvuII και AluI, RsaI για τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β αντίστοιχα.
- η μελέτη της πιθανής συνεργικής δράσης των πολυμορφισμών αυτών στην ηλικία εμμηναρχής.

4. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης μας αποτέλεσαν 150 κορίτσια ηλικίας 12-19 ετών. Τα κορίτσια ήταν κάτοικοι της κωμόπολης της Κόνιτσας και των γύρω χωριών, μιας ορεινής περιοχής με αγροτικό πληθυσμό. Ο συνολικός πληθυσμός της επαρχίας δεν ξεπερνά τις 11.000. Τα περισσότερα χωριά έχουν λιγότερους από 200 κατοίκους και τυπικά λιγότερους από 50 σε αναπαραγωγική ηλικία. Γάμοι μεταξύ ατόμων από το ίδιο χωριό (inbreeding) είναι πολύ κοινότυπο στις περιοχές αυτές, με αποτέλεσμα οι κοινωνίες αυτές να παραμένουν για πολλές γενιές κλειστές. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο πληθυσμός που επιλέξαμε να είναι ομοιογενής προκειμένου η πολιτισμική και πληθυσμιακή ετερογένεια να ελαχιστοποιηθεί, εφόσον τοπικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ηλικία της εμμηναρχής (Rimpelā and Rimpelā, 1993 ; Morabia and Costanza 1998).

Η μελέτη έλαβε χώρα στο Γυμνάσιο και στα δύο Λύκεια της περιοχής (Γενικό Λύκειο και Τεχνικό Επαγγελματικό Λύκειο). Τοπικοί φορείς, μαθητές, γονείς και καθηγητές ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους. Οι μαθήτριες συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο που αφορούσε στοιχεία από το ατομικό και το οικογενειακό τους αναμνηστικό. Πληροφορίες για την εμμηναρχή ελήφθησαν μέσω συνεντεύξεων με τις νεαρές έφηβες και με τις μητέρες τους και σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω ημερολογίων.

Σε κάθε κορίτσι έγινε καταγραφή σωματομετρικών στοιχείων (ύψους και βάρους) και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (body mass index, BMI). Στη συνέχεια ελήφθη δείγμα αίματος για το γενετικό έλεγχο.

4.2. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο καθορισμός των γονοτύπων έγινε με ανάλυση του γενετικού υλικού που εξήχθη από κάθε άτομο. Η ανάλυση έγινε σε συγκεκριμένα τμήματα του DNA τα οποία εκλεκτικά απομοιρώθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Τα προϊόντα της PCR αποτελούν τμήματα των μελετούμενων υποψηφίων γονιδίων τα οποία περιέχουν το πολυμορφικό σημείο. Όλοι οι μελετηθέντες πολυμορφισμοί ήταν πολυμορφισμοί ενός μόνο νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs), και μελετήθηκαν με τη μέθοδο των πολυμορφισμών περιορισμού μήκους

θραύσματος (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs) με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

4.2.α. Εξαγωγή DNA

Το DNA εξήχθη από λευκοκύτταρα περιφερικού τύπου. Σε 1 ml περιφερικού αίματος προστέθηκε 1ml διαλύματος TKM και 25 μl NP-40. Μετά από ανάδευση το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 3000 στροφές/sec. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα πλύθηκε με 0,5 ml TKM και μετά από καλή ανάδευση, ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 min στις 3000 στροφές/sec. Αυτή η διαδικασία του «πλουσίματος των λευκών αιμοσφαιρίων» επαναλαμβάνεται για τρεις έως τέσσερις φορές, μέχρι να εξαλειφθεί πλήρως το σκούρο ίζημα των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια, στο καθαρό ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων προστέθηκαν 200 μl TKM και 15 μl SDS 10%. Το μίγμα επωάστηκε για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο 55°C και στη συνέχεια προστέθηκαν 75 μl διαλύματος NaCl 6M και έγινε φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές/sec για 5 min. Μετά τη φυγοκέντρωση, μεταφέρθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο το οποίο περιείχε διαλυμένο το DNA και προστέθηκαν 750 ml απόλυτης αιθανόλης που φυλάσσεται στους -20°C. Μετά από προσεκτική ελαφρά ανάδευση, η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια νερού από το διαλυμένο DNA το οποίο αποκτά μορφή επιπλέοντος βλεννώδους υλικού, το οποίο απομονώθηκε με το ρύγχος μιας πιπέτας και διαλύθηκε σε 50 μl διαλύματος TE. Με τη μορφή αυτή φυλάχτηκε στους 4°C. Η σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA, όπως και τις αντιδράσεις που ακολούθησαν παρατίθεται στο παράρτημα, στο τέλος του κεφαλαίου (σελίδα).

4.2.β. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ο ειδικός πολλαπλασιασμός του DNA έγινε με PCR. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιεί πολλαπλούς κύκλους από αποδιάταξη (denaturing) του «καλουπιού» του DNA, σύνδεση των εκκινητών στα αντίστοιχα σημεία των ανοικτών αλύσεων του DNA και επέκτασή τους (annealing) με σκοπό τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών του γενετικού υλικού. Αυτή η διαδικασία είναι εκθετική, αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο, χρησιμοποιούνται ως νέα «καλούπια» για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με τις παραπάνω αρχές η PCR αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για τη μελέτη των νουκλεϊκών οξέων. Κατά κανόνα, 20-30 κύκλοι δημιουργούν αρκετό προϊόν, ώστε να μπορεί να απεικονιστεί σε πηκτώμα κεχρωσμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR ήταν τύπου DNA thermocycler PTC-100 (Peltier-Effect Cycling. MJ Research, Inc. USA). Συγκεκριμένα διάλυμα που περιέχει 1μl DNA (από το διαλυμένο εξαχθέν DNA, διαλυμένο σε TE), 1 μονάδα ανασυνδυασμένης DNA πολυμεράσης, νουκλεοτίδια, τους εκκινητές για το συγκεκριμένο τμήμα του υπό μελέτη γονιδίου, ιόντα μαγνησίου και ρυθμιστικό διάλυμα υπόκειται σε διαδοχικούς κύκλους ραγδαίας μεταβολής θερμοκρασίας που αντιστοιχούν στα διαφορετικά στάδια πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου τμήματος του DNA: την αποδιάταξη (denaturing) που συνίσταται σε άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA, ώστε να πάρει θέση η πολυμεράση και να ελευθερωθεί το «καλούπι» όπου θα σχηματιστεί νέα έλικα, την επανασύνδεση (annealing), δηλαδή τη συγκρότηση νουκλεοτιδίων στην ανοικτή έλικα με αποτέλεσμα από μία διπλή έλικα να προκύψουν δύο νέες και

τέλος, την επέκταση (extension), οπότε επιτυγχάνεται σταθεροποίηση των παραπάνω διεργασιών πριν τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού.

Μετά την PCR γινόταν δοκιμαστική ηλεκτροφόρηση 5μl του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης εμπλουτισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, για να διαπιστωθεί εάν η αντίδραση ήταν επιτυχής. Αυτό επιβεβαιωνόταν με την παρουσία ζωνών του αναμενόμενου, ανάλογα με το πολλαπλασιαζόμενο τμήμα, μοριακού βάρους.

4.2.γ. Πολυμορφισμοί περιορισμού μήκους θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs)

Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής διερεύνησης του DNA χρησιμοποιούνται οι ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction endonucleases). Αυτές είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες τεσσάρων ή περισσότερων νουκλεοτιδίων όπου και κατατέμνουν το DNA, παράγοντας θραύσματα των οποίων το μέγεθος είναι ακριβώς καθορισμένο. Τα θραύσματα αυτά διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε τα μικρότερα ταξιδεύουν μακρύτερα στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγαλύτερα τμήματα. Πέρα από τις άλλες εφαρμογές της, αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση SNPs. Κατά τη διερεύνηση συγκεκριμένου πολυμορφισμού, το περιοριστικό ένζυμο επιλέγεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ύπαρξη ή όχι του πολυμορφικού σημείου να σηματοδοτείται από την ύπαρξη ή όχι σημείου περιορισμού. Έτσι, ανάλογα με τον ηλεκτροφορητικό σχηματισμό είναι δυνατό να αναγνωριστούν οι γονότυποι ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού.

Τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με ειδικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.2.δ. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης

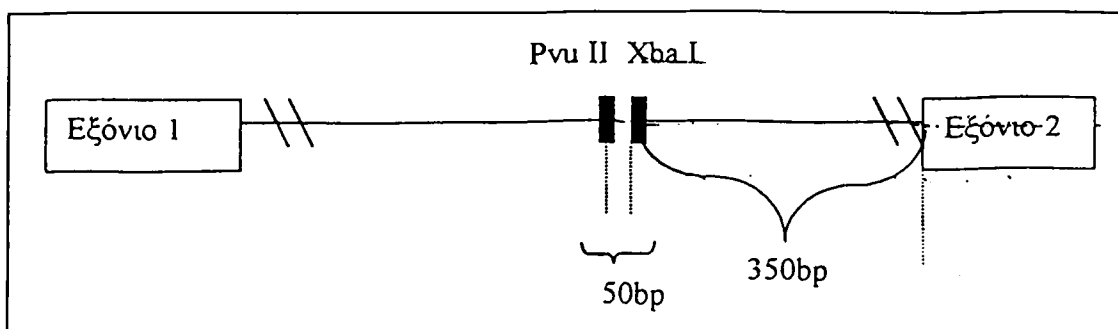
Τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης για κάθε πολυμορφισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε πυκνότητα 0,5 μg/ml, για την ακόλουθη ανάγνωση και φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδες φως. Το μέσο διάλυσης της αγαρόζης ήταν το TBE. Ως πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης ΦΧ 174/Hae III (Promega).

4.3. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΕΛΕΤΗΘΕΝΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ

4.3.α. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α

Το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην περιοχή 6q24-27. Το μέγεθος του είναι περίπου 140kb και περιλαμβάνει 8 εξόνια (Mathurose Ponglikitmongol et al., 1988).

Για το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α μελετήθηκαν δύο σημεία περιορισμού: το XbaI και το PvuII. Και τα δύο αυτά σημεία βρίσκονται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου. Κατά την αντίδραση PCR πολλαπλασιάστηκε περιοχή του γονιδίου που περιελάμβανε μέρος του ιντρονίου 1 και του εξονίου 2. Λόγω της πολύ στενής γειτνίασης των δύο σημείων περιορισμού, απόσταση μόλις περίπου 50 bp μεταξύ τους (εικόνα 7) για τον καθορισμό των δύο πολυμορφισμών έγινε μόνο μία αντίδραση PCR και χρησιμοποίηση ενός μόνου ζευγαριού εκκινητών: forward: 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3', που αντιστοιχεί σε περιοχή του ιντρονίου 1 περίπου 1300kb από το εξόνιο 2 και reverse: 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3' που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 692-797 στο εξόνιο 2 σε απόσταση 8 νουκλεοτιδίων από το ιντρόνιο 1.



Εικόνα 7. Τμήμα του γονιδίου που περιέχει τα δύο σημεία περιορισμού για τα ένζυμα PvuII και XbaI. Το XbaI βρίσκεται σε απόσταση περίπου 50bp από το PvuII. Και τα δύο βρίσκονται στο ιντρόνιο 1, περίπου 350bp πριν το εξόνιο 2.

Το τμήμα του γονιδίου που πολλαπλασιάστηκε είχε μέγεθος περίπου 1.3kb. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο PvuII έδινε, σε περίπτωση ύπαρξης του σημείου περιορισμού, 2 θραύσματα μεγέθους 0.85 και 0.45 kb αντίστοιχα. Παρομοίως η πέψη με το XbaI έδινε, επί υπάρξεως του σημείου περιορισμού 2 θραύσματα μεγέθους 0.9 και 0.4kb.

Σημείο κοπής της καθεμιάς
από τις συμπληρωματικές
έλικες του DNA από το:

PvuII	και το XbaI
CAG ↓ CTG	T ↓ CTAG A
GTC ↑ GAC	A ↑ GATC T

Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50 μl που περιείχε :

Buffer 5 μl
 Mg²⁺ 4 μl
 DNTPs 5 μl
 Primer 1 1 μl (συγκέντρωση 10 pmol/μl)
 Primer 2 1 μl (συγκέντρωση 10 pmol/μl)
 Taq DNA
 Polymerase 0,2 μl
 H₂O 32,8 μl
 DNA 1 μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° 2 min

94° 1min, 62° 1min, 72° 1min30sec x 33 κύκλους

72° 10min

Τα προϊόντα PCR επωάστηκαν στους 37° C με 10 μονάδες ενζύμου XbaI (Gibco, BRL) για 12 ώρες και με 5 μονάδες PvuII (Biolands, Inc. New England) για 2 ώρες, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε αγαρόζη metaPhor και πυκνότητα (Ultra-Pure 0.8%, MetaPhor 2.2%). Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προκύπτουν απεικονίζονται στις εικόνες 8 και 9. Οι γονότυποι που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία είναι PP/Pp/pp για το PvuII και XX/Xx/xx για το XbaI, με τα κεφαλαία γράμματα να αντιστοιχούν στην απουσία του σημείου περιορισμού.

4.3.β. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β

Το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και συγκεκριμένα στην περιοχή 14q22-24. Το μέγεθος του είναι περίπου 40kb και περιλαμβάνει 8 εξόνια (Enmark Eva et al., 1997).

Για το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β μελετήθηκαν δύο σημεία περιορισμού: το RsaI και το AluI. Το RsaI βρίσκεται στο εξόνιο 5 και το AluI στο εξόνιο 8 (Rosenkranz k. et al., 1998). Για τον καθορισμό των δύο πολυμορφισμών έγιναν δύο αντιδράσεις PCR. Για τον RsaI χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών: forward: 5'-TCT TGC TTT CCC CAG GCT TT-3' και reverse: 5'-ACCTGT CCA GAA CAA GAT CT-3' (Sundarrajan C. et al., 2001). Το τμήμα του γονιδίου που πολλαπλασιάστηκε είχε μέγεθος 156bp. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο RsaI έδινε σε περίπτωση ύπαρξης του σημείου περιορισμού 2 θραύσματα με μεγέθη 125bp και 31bp.

Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

Buffer	2.5μl	
Mg ²⁺	0.5μl	Σημείο κοπής της καθεμιάς
DNTPs	2.5μl	από τις συμπληρωματικές
Primer 1	0.33μl	έλικες του DNA από το RsaI
Primer 2	0.77μl	
H ₂ O	17.15μl	5'-GT ↓ AC-3'
TaqDNA		3'-CA ↑ TG-5'
Polymerase	0.25μl	
DNA	1μl	

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° C 5min

94° C 30sec, 55° C 30sec, 72° C 1min30sec x30κύκλους

72° C 10min

Τα προϊόντα επωάστηκαν στους 37°C με 10 μονάδες ενζύμου RsaI (Invitrogen) για 12 ώρες (πίνακας 2). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε αгарόζη metaphor και πυκνότητα 2% (Ultra-Pure 0.8%, Metaphor 2.2%). Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα απεικονίζονται στην εικόνα 10. Οι γονότυποι που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία είναι RR/Rr/rr, με τα κεφαλαία γράμματα να αντιστοιχούν στην απουσία του σημείου περιορισμού.

Για τον AluI χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινήτων: forward: 5'-CAC CTG CTG CTG GAG ATG CT-3', και reverse: 5'-AAT GAG GGA CCA CAC AGC A-3' (Carmel k. et al., 2001). Το τμήμα του γονιδίου που πολλαπλασιάστηκε είχε μέγεθος 234 bp. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο AluI έδινε σε περίπτωση ύπαρξης του σημείου περιορισμού 2 θραύσματα μεγέθους 169bp και 65bp.

Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

Buffer	2.5μl	
Mg ²⁺	0.5μl	Σημείο κοπής της καθεμιάς
DNTPs	2.5μl	από τις συμπληρωματικές
Primer 1	0.53μl	έλικες του DNA από το AluI
Primer 2	1.43μl	
H ₂ O	16.29μl	5'-AG ↓ CT-3'
TaqDNA		3'-TC ↑ GA-5'
Polymerase	0.25μl	
DNA	1μl	

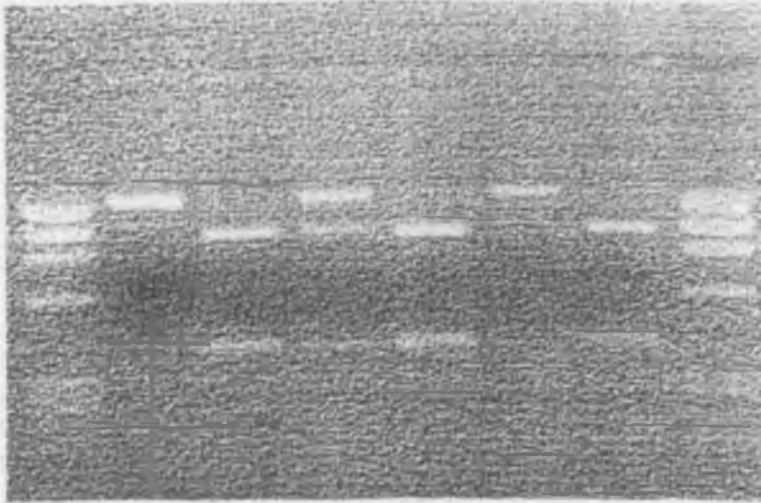
Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° C 5min

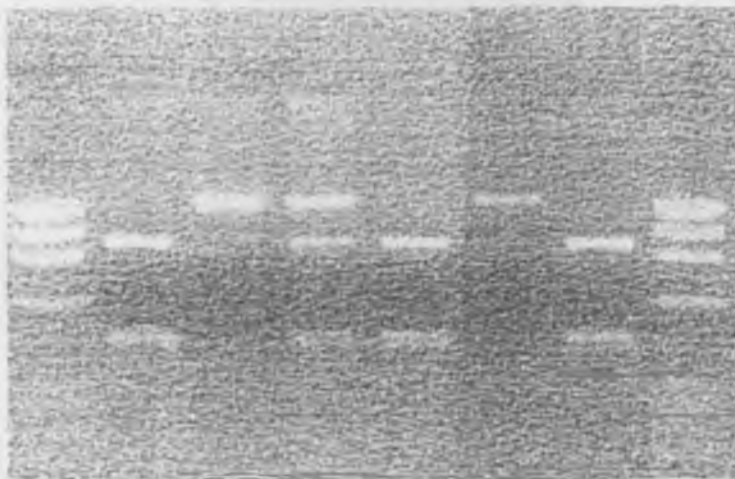
94° C 30sec, 56° C 30sec, 72° C 1min30sec x30κύκλους

72° C 10 min

Τα προϊόντα επωάστηκαν στους 37° C με 10 μονάδες ενζύμου AluI (Invitrogen) για 12 ώρες (πίνακας 2). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε σε αгарόζη metaphor και πυκνότητα 2% (Ultra-Pure 0.8%, Metaphor 2.2%). Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προκύπτουν απεικονίζονται στην εικόνα 11. Οι γονότυποι που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία είναι AA/Aa/aa με τα κεφαλαία γράμματα να αντιστοιχούν στην απουσία του σημείου περιορισμού.



Εικόνα 8. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού XbaI του γονιδίου ERα.



Εικόνα 9. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού PvuII του γονιδίου ERα.



Εικόνα 10. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού RsaI του γονιδίου ERβ.



Εικόνα 11. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού AluI του γονιδίου ERβ.

4.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση), όπου η κατανομή ήταν κανονική και σαν διάμεσες τιμές (με τεταρτημόρια Q1, Q3) όπου η κατανομή ήταν μη κανονική.

Το t-test και η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση αναλύσεων και συγκρίσεων μεταξύ των μέσων τιμών. Το χ^2 test με τη διόρθωση κατά Yates χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των ποσοστών μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων. Τροποποιημένες αναλύσεις, στηριζόμενες σε σωματομετρικά στοιχεία πραγματοποιήθηκαν με βάση το δείκτη μάζας σώματος (BMI). Επίσης, έλαβαν χώρα αναλύσεις εξαιρώντας ζεύγη συγγενών.

Η μελέτη είχε 80% ισχύ ανίχνευσης διαφοράς 0,5 ετών στην ηλικία εμμηναρχής, με $p=0,05$, μεταξύ συγκρινόμενων ομάδων κοριτσιών με αναλογία 2:1 και με τυπική απόκλιση στην ηλικία εμμηναρχής 1,2 έτη.

Σαν όριο σημαντικότητας θεσπίστηκαν οι τιμές του $p<0,05$ ενώ όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα SPSS 11.0.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Χαρακτηριστικά συμμετεχόντων

Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μελετήσαμε φαίνονται στον πίνακα 3. Η ηλικία των συμμετεχόντων κυμαινόταν από 12 έως 19 (ενδοτεταρτημοριακό εύρος 15.21-18.47). Το ύψος, το βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος είναι αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού της αντίστοιχης ηλικίας της περιοχής.

Πίνακας 3. Γενικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μελετήθηκε

Ηλικία*, (έτη)	16,87(15.21-18.47)
Ηλικία εμμηναρχής*, (έτη)	13(12.00-13.75)
Ύψος, (cm)	161,74(5.80)
Βάρος, (kg)	54.17(10.36)
Δείκτης μάζας σώματος (BMI), (kg/m ²)	20.68(3.62)

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές \pm SD, εκτός από αυτές των παραμέτρων που φέρουν αστερίσκο(*) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR).

5.2. Κατανομή γονοτύπων

Η συχνότητα των γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό χωριστά φαίνεται στον πίνακα 4.

Η κατανομή των γονοτύπων δεν πληρούσε την ισορροπία των Hardy-Weinberg για τους πολυμορφισμούς XbaI, PvuII και AluI ($p=0.01$, $p=0.001$ και $p=0.001$) αντίστοιχα. Για τους XbaI και PvuII οι ομοζυγώτες xx, rr ήταν περισσότεροι (over-represented) και οι ετεροζυγώτες λιγότεροι (under-represented). Η έλλειψη της ισορροπίας των Hardy-Weinberg αποδεικνύει ότι πρόκειται για μια κλειστή κοινωνία με απόλυτα ισχυρή γονιδιακή μετατόπιση η οποία οφείλεται στη σύζευξη, το γάμο ατόμων από το ίδιο χωριό (inbreeding), κάτι το οποίο συνέβαινε πολύ συχνά σ' αυτές τις περιοχές με αποτέλεσμα να παραμένουν κλειστές για πολλές γενιές (Rousset and Raymond 1995, Vogel and Motulsky 1997). Για τον AluI ενώ βρέθηκαν ετεροζυγώτες Aa, δε βρέθηκαν ομοζυγώτες aa. Όπως αναφέρθηκε πρόκειται για ένα σχετικά ομοιογενή πληθυσμό, όπου πιθανά το αλληλόμορφο a του πολυμορφισμού AluI άρχισε να εμφανίζεται πρόσφατα, με αποτέλεσμα να μην έχουν εμφανιστεί ακόμη ομοζυγώτες για την πολυμορφική θέση. Το παραπάνω είναι πιθανά αποτέλεσμα εισβολής ξένου πληθυσμού. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι τα λάθη που οφείλονται στον ανθρώπινο παράγοντα, αν και δυο ανεξάρτητοι ερευνητές διάβασαν τα αποτελέσματα στη γέλη αγαρόζης, και περίπου 20% των δειγμάτων επαναλήφθηκαν προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί οποιαδήποτε πιθανότητα για λάθος. Διαπιστώθηκε ισχυρή ανισοκατανομή σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του γονιδίου του ERa. Έτσι η σχέση μεταξύ των γονοτύπων xx και rr ήταν ισχυρά σημαντική (συντελεστής συσχέτισης χ^2 $p<0.001$).

Η κατανομή των γονοτυπικών συχνοτήτων για τους πολυμορφισμούς του ERa ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια με αυτή που έχει περιγραφεί και σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς. Αναλυτικότερα στην παρούσα ομάδα μελέτης η συχνότητα των αλληλίων για τους πολυμορφισμούς του ERa ήταν: για τον XbaI

το αλληλίο X είχε συχνότητα 43.4% , και για τον PvuII το αλληλίο P είχε συχνότητα 53.4%, έναντι 32-44% και 41-50% αντίστοιχα για άλλους Καυκάσιους λαούς (Ioannidis JPA et al., 2001). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συχνότητες των X και P αλληλίων διαφέρουν σημαντικά στους Ασιάτες (13-26% και 38-43% αντίστοιχα).

Για το γονίδιο του ER β η συχνότητα για το αλληλίο R για τον πολυμορφισμό RsaI ήταν 100% έναντι 94-99% που έχει περιγραφεί σε Γερμανούς, Σλοβένους και Άγγλους (Rosenkranz K. et al., 1998, Barbara A. et al., 2002, Eastwood H. et al., 2002). Για τον AluI έχει περιγραφεί μια ποικιλία συχνοτήτων για το αλληλίο A από 37-64% σε μελέτες από Άγγλους και Γερμανούς και μάλιστα με σημαντική διαφορά συχνοτήτων στην ίδια χώρα (Rosenkranz K. et al., 1998, Jean-Charles L. et al., 2001, Eastwood H. et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα του αλληλίου A ήταν 72%.

Πίνακας 4. Συχνότητα των γονοτύπων για τους μελετούμενους πολυμορφισμούς

		Αριθμός	Αναλογία %
Οιστρογονικός υποδοχέας α			
XbaI	XX	35	24.1
	Xx	56	38.6
	Xx	54	37.2
PvuII			
PvuII	PP	51	35.2
	Pp	53	36.6
	Pp	41	28.3
Οιστρογονικός υποδοχέας β			
RsaI	RR	145	100
	Rr	-	-
	Rr	-	-
AluI	AA	65	44.8
	Aa	80	55.2
	aa	-	-

5.3. Εμμηναρχή και γονότυποι

Στην ανάλυση όπου έγινε σύγκριση των γονοτύπων με την ηλικία εμμηναρχής διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα:

Η εμμηναρχή ήρθε περίπου 0.5 χρόνια αργότερα στα κορίτσια με ΧΧ γονότυπο (ομοζυγωτών χωρίς την αντικατάσταση) για τον πολυμορφισμό ΧbaI, από ότι στα κορίτσια με Χx ή xx γονότυπο (ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών φερόντων την αντικατάσταση). Η διαφορά ήταν σημαντική στη σύγκριση που έγινε μεταξύ των ΧΧ και Χx, xx ($p=0.017$). Η διαφορά δεν ήταν σημαντική όταν και οι τρεις γονότυποι συγκρίθηκαν μεταξύ τους ($p=0.057$) (πίνακας 5). Όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος η διαφορά στην ηλικία εμμηναρχής μεταξύ των ΧΧ ομοζυγωτών με τους φέροντες τους άλλους γονότυπους ήταν 0.57 χρόνια ($P=0.021$).

Για τον PvuII φάνηκε να υπάρχει παρόμοια τάση για αργότερη ηλικία εμμηναρχής στα κορίτσια με γονότυπο PP όταν συγκρίθηκαν με τους Pp και pp. Η διαφορά όμως δεν ήταν σημαντική ($p=0.21$), καθώς και όταν συγκρίθηκαν και οι τρεις γονότυποι μεταξύ τους ($p=0.45$). Όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος η διαφορά στην εμμηναρχή μεταξύ των PP ομοζυγωτών με τους φέροντες τους άλλους γονοτύπους ήταν 0.26 χρόνια ($P=0.26$).

Επειδή οι πολυμορφισμοί ΧbaI και PvuII συνδέονται άμεσα, μελετήθηκαν συγχρόνως ως προς την επίδραση τους στην εμμηναρχή. Η διαφορά μάλιστα ήταν ακόμη μεγαλύτερη όταν συγκρίθηκαν οι απλότυποι PX (πίνακας 6). Κατά μέσο όρο, οι PX ομοζυγώτες ($n=34$) είχαν περίπου 8 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους ετεροζυγώτες και τα άτομα που δεν έφεραν τον συνδυασμό των PX αλληλίων ($p=0.006$). Δεν παρατηρήθηκε καμμία διαφορά στην εμμηναρχή συγκρίνοντας τους PX ετεροζυγώτες ($n=56$, μέση ηλικία εμμηναρχής 12.76 χρόνια SD 1.17) με τα άτομα που δεν έφεραν τον συνδυασμό των PX αλληλίων ($n=55$, μέση ηλικία εμμηναρχής 12.76 χρόνια SD 1.34). Η παραπάνω σύγκριση ισχύει με την προϋπόθεση ότι οι 43 PpXx είναι ετεροζυγώτες (φέρουν δηλαδή τους συνδυασμούς PX και pX αλληλίων), δεδομένης της ισχυρής ανισοκατανομής σύνδεσης μεταξύ των ΧbaI και PvuII πολυμορφισμών. Η ηλικία εμμηναρχής ήταν επίσης παρόμοια μεταξύ των 43 PpXx ατόμων (μέση τιμή 12.82 χρόνια SD 1.16) και των 13 "βέβαιων" PX ετεροζυγωτών, PPXx και PpXX (μέση τιμή 12.54 χρόνια SD 1.21). Επομένως η γενετική επίδραση περιορίζεται στους ομοζυγώτες PX χωρίς φανερή ένδειξη για δόσοεξαρτώμενη επίδραση (dose-response effect). Ακόμη κι όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος η διαφορά παρέμεινε σημαντική μεταξύ των ομοζυγωτών PX και όλων των άλλων ($p=0.008$).

Σημαντική φαίνεται να είναι η επίδραση του AluI πολυμορφισμού στην εμμηναρχή. Οι ομοζυγώτες AA είχαν 0.57 χρόνια αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους Aa ετεροζυγώτες ($p=0.005$). Η διαφορά παρέμεινε σημαντική όταν έγινε προσαρμογή για τον δείκτη μάζας σώματος ($p=0.006$) (πίνακας 6)

Πίνακας 5. Συγκρίσεις μεταξύ διαφόρων γονοτύπων με την ηλικία εμμηναρχής

Μέση τιμή (SD) p-value για τη σύγκριση		
	Ομοζυγωτών που δε	Όλων των
	φέρουν τον πολυμορφισμό	ομάδων
XbaI πολυμορφισμός		0.017
XX	13.36 (1.24)	
Xx	12.80 (1.14)	
xx	12.75 (1.35)	
PvuII πολυμορφισμός		0.21
PP	13.09 (1.29)	
Pp	12.80 (1.19)	
Pp	12.85 (1.33)	
A1uI πολυμορφισμός		0.005
AA	13.23 (1.23)	
Aa	12.64 (1.25)	
Aa	-	
RsaI πολυμορφισμός		
RR	-	
Rr	-	
Rr	-	

Πίνακας 6. Απλότυποι για τους XbaI και PvuII πολυμορφισμούς και σύγκριση αυτών με την ηλικία εμμηναρχής

n (%)	Ηλικία εμμηναρχής	p-value για τις συγκρίσεις
μέση τιμή (SD)		
Απλότυποι		0.006
PPXX	34 (23.4)	13.43 (1.18)
PPXx	12 (8.3)	12.76 (1.25)
PPxx	5 (3.4)	
PpXX	1 (0.7)	
PpXx	43 (29.7)	
Ppxx	9 (6.2)	
ppXx	1 (0.7)	
ppxx	40 (27.6)	

5.4. Συνέργεια μεταξύ των πολυμορφισμών των δύο γονοτύπων

Δεδομένου ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς α και β αλληλεπιδρούν (Cowley S.M. et al 1997)), μελετήθηκαν συγχρόνως οι πολυμορφισμοί και των δύο γονιδίων, για πιθανή συνεργική επίδραση στην ηλικία εμμηναρχής.

Κορίτσια που δεν έφεραν καμία από τις πολυμορφικές θέσεις που μελετήσαμε, είχαν δηλαδή γονότυπο PPXXAA, είχαν 4 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με ετεροζυγώτες, οι οποίοι έφεραν 2-5 κεφαλαία αλλήλια, και 11 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με ετεροζυγώτες, οι οποίοι έφεραν 1 κεφαλαίο αλλήλιο (πίνακας 7). Η μείωση της ηλικίας εμμηναρχής με την αύξηση των αλληλίων για τις πολυμορφικές θέσεις, είναι πιθανά ένδειξη για δοσοεξαρτώμενη επίδραση. Η διαφορά ήταν σημαντική όταν συγκρίθηκαν και οι τρεις ομάδες μεταξύ τους ($\rho=0.042$), και παρέμεινε σημαντική μετά από προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος ($\rho=0.034$).

Πίνακας 7. Συγκρίσεις των γονοτύπων των πολυμορφισμών XbaI, PvuII, A1uI των γονιδίων ER α και ER β με την ηλικία εμμηναρχής.

	N	Ηλικία εμμηναρχής	p(value) για τις συγκρίσεις	
			Μέση τιμή (SD)	όλων των ομάδων, για BMI
			0.042	0.034
Ομάδα 1	22	1.27		
Ομάδα 2	94	1.23		
Ομάδα 3	29	1.28		

Ομάδα 1(ομοζυγώτες PPXXAA)

Ομάδα 2 (ετεροζυγώτες 2-5 κεφαλαία αλλήλια)

Ομάδα 3 (ετεροζυγώτες 1 κεφαλαίο αλλήλιο, ppxxAa)

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β με την ηλικία εμμηναρχής σε κορίτσια ηλικίας 12 εως και 19 ετών, που ήταν κάτοικοι της επαρχίας Κόνιτσας του Νομού Ιωαννίνων. Η απόφαση του να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β στο συγκεκριμένο πληθυσμό, στηρίχτηκε στις ακόλουθες σκέψεις.

Πρώτα απ'όλα, η συγκεκριμένη επαρχία απαρτίζεται από χωριά τα οποία παρέμεναν για πολλά χρόνια απομονωμένα, με αποτέλεσμα οι κοινωνίες αυτές να παραμένουν για πολλές γενιές κλειστές. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο πληθυσμός που επιλέξαμε να είναι ομοιογενής, προκειμένου η πολιτισμική και πληθυσμιακή ετερογένεια να ελαχιστοποιηθεί, εφόσον τοπικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ηλικία της εμμηναρχής (Rimpelä and Rimpelä 1993, Morabia and Constanza 1998). Επιπλέον τα κορίτσια αυτής της ηλικιακής ομάδας είναι περισσότερο κοντά στην ηλικία της εμμηναρχής, με αποτέλεσμα η καταγραφή των στοιχείων να γίνει με μεγάλη ακρίβεια.

Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων βασίστηκε αρχικά στη σκέψη ότι τα οιστρογόνα είναι οι κυρίαρχες ορμόνες που δρουν στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο συγχρονισμό της ωρίμανσης των ωοθυλακίων με τη μεσοκυκλική αιχμή των γοναδοτροπινών, και την προετοιμασία της μήτρας για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Όσο αφορά την εμμηναρχή πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία, η οποία απαιτεί αλληλένδετη δράση των οιστρογόνων, της FSH, LH και της προγεστερόνης. Η εμφάνιση της πραγματοποιείται όταν η υπόφυση και ο υποθάλαμος αποκτήσουν ευαισθησία στη θετική παλίνδρομη διέγερση της οιστραδιόλης, η δράση της οποίας ασκείται μέσω της σύνδεσης τους με τους ERα και ERβ.

Ο δεύτερος λόγος που μας οδήγησε στη μελέτη των οιστρογονικών υποδοχέων ERα και ERβ είναι η σημαντική ιστική κατανομή τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, η οποία επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατες βιοχημικές και ιστολογικές μελέτες (Pelletier and El-Alfly, 2000). Συγκεκριμένα ο ERβ είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας στην ωοθήκη. Ανιχνεύεται στα κοκκιώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων σε όλα τα στάδια, από το αρχέγονο ως το ώριμο ωοθυλάκιο. Σε αντίθεση με τον ERβ, ο ERα δεν ανιχνεύεται στα πρωτογενή ωοθυλάκια παρά μόνο σε μερικά κοκκιώδη κύτταρα των δευτερογενών ωοθυλακίων και στα ώριμα ωοθυλάκια (Pelletier et al 2000, Saunders et al 2000), ενώ σύμφωνα με άλλες μελέτες ανιχνεύονται μόνο στα ώριμα ωοκύτταρα (Suzuki et al 1994). Στη μήτρα και τον κόλπο ο ERα είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας.

Ένας τρίτος λόγος που μας οδήγησε στη συγκεκριμένη επιλογή ήταν ότι σε μελέτες πειραματικών μοντέλων, στα οποία δεν εκφράζονται τα γονίδια του ERα και του ERβ, κι επομένως και οι αντίστοιχοι υποδοχείς, επηρεάζονται τα στάδια της ωοθυλακιογένεσης. Ετσι επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERα (ERα knockout- ERKO) παρουσιάζουν στειρότητα, έχουν υποπλαστική μήτρα και υπεραιμικές ωοθήκες (Couse et al 1999). Η ωοθυλακιογένεση σταματά στα δευτερογενή ωοθυλάκια, τα οποία γίνονται κυστικά και αιμορραγικά τρεις εβδομάδες μετά τη γέννηση, και υπάρχουν αυξημένα επίπεδα LH. Ενώ επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERβ (ERβ knockout- BERKO), μολονότι εμφανίζουν γονιμότητα, παρουσιάζουν

ωοθυλακιορρηξία λιγότερο συχνά από τους φυσιολογικούς επίμυες (Krege et al 1998). Επίμυες που δεν εκφράζουν κανέναν υποδοχέα οιστρογόνων (knockout για ERα και ERβ-ERαβΚΟ) παρουσιάζουν στειρότητα και τα επίπεδα της LH είναι υψηλότερα από τα δύο προηγούμενα πειραματικά μοντέλα (Couse et al 1999). Οι ωοθήκες τους παρουσιάζουν δομές που μοιάζουν με τα σπερματικά σωληνάρια και τα κύτταρα Sertoli των όρχεων (Couse et al 1999).

Στο παρόν εγχείρημα, διερευνήθηκε η επίδραση τεσσάρων διαφορετικών πολυμορφισμών των γονιδίων ERα και ERβ, με την ηλικία εμμηναρχής. Στην ανάλυση όπου έγινε σύγκριση των γονοτύπων των πολυμορφισμών με την ηλικία εμμηναρχής διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα:

Για τον XbaI, οι ομοζυγώτες XX, καθώς και οι ομοζυγώτες για τον απλότυπο PX φάνηκε να έχουν μια μέτρια καθυστέρηση στην ηλικία της εμμηναρχής. Συγκεκριμένα η διαφορά ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από 0.5 χρόνια για τους ομοζυγώτες XX όταν συγκρίθηκαν με τους Xx και xx και περίπου 8 μήνες για τους PX, όταν συγκρίθηκαν οι απλότυποι μεταξύ τους. Για τον PvuII η επίδραση δεν ήταν ξεκάθαρη. Φάνηκε να υπάρχει μια τάση για αργότερη εμμηναρχή στα κορίτσια με PP γονότυπο όταν συγκρίθηκαν με τους Pp και pp, χωρίς στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα από τη μεταξύ τους σύγκριση. Η τάση μάλιστα που παρατηρήθηκε μπορεί να αντικατοπτρίζει απλά την ισχυρή ανισοκατανομή σύνδεσης του PvuII με τον XbaI. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι δεν παρατηρήθηκε καμία τάση για δοσοεξαρτώμενη επίδραση στην ηλικία εμμηναρχής.

Μελέτες που ενισχύουν τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι ομοζυγώτες XX προστατεύονται από τον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου (Andersen et al 1994, Weiderpass E. et al 2000). Επίσης για τους ομοζυγώτες PP φαίνεται να υπάρχει μια προστατευτική επίδραση όσο αφορά τον καρκίνο του ενδομητρίου (Weiderpass et al 2000). Είναι άγνωστο βέβαια εάν τα παραπάνω είναι αποτελέσματα διαφορετικής αθροιστικής έκθεσης σε οιστρογόνα, η οποία μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα οιστρογόνων, σε διαφορετική έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, σε διαφορετική διάρκεια έκθεσης σε οιστρογόνα ή σε συνδυασμό όλων των παραπάνω. Εκτός από τους πολυμορφισμούς XbaI και PvuII του γονιδίου του ERα, πολυμορφισμοί των ενζύμων του μεταβολισμού των στεροειδών έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του μαστού. Ένας από αυτούς μάλιστα, ο CYP17, έχει συσχετιστεί με την ηλικία εμμηναρχής (Haiman et al 1999). Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η καθυστερημένη εμμηναρχή μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση στον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου, σαν αποτέλεσμα του μειωμένου χρόνου έκθεσης των ιστών στόχων στα οιστρογόνα (Hsieh et al 1990). Στην παρούσα μελέτη οι ομοζυγώτες XX έχουν καθυστερημένη εμμηναρχή ενώ φαίνεται να προστατεύονται από τον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου (Andersen et al 1994, Weiderpass et al 2000).

Οι πολυμορφισμοί XbaI και PvuII έχουν επίσης εμπλακεί σε νοσήματα στα οποία ο χρόνος έκθεσης στα οιστρογόνα θεωρείται δυνητικά σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη 102 μαθητών από την Ιαπωνία, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) σε ομοζυγώτες XX (Kikuchi et al 2000). Υψηλά επίπεδα LDL έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα, ενώ η έκθεση σε οιστρογόνα φαίνεται να δρα προστατευτικά, μειώνοντας τα επίπεδα της LDL. Οι παπαπάνω πολυμορφισμοί έχουν επίσης συσχετιστεί με την οστική πυκνότητα, και τον κίνδυνο για οστεοπόρωση. Τα αποτελέσματα βέβαια από πρόσφατες μελέτες δεν είναι σύμφωνα εάν ο απλότυπος Px (Albagha et al 2001), ή κάποιος

άλλοι πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης με τους XbaI και PvuII, εμπλέκονται στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας.

Στη μελέτη μας η επίδραση του AluI πολυμορφισμού, του γονιδίου του ERβ, ήταν επίσης σημαντική στην εμμηναρχή. Οι ομοζυγώτες AA είχαν 0.57 χρόνια αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους Aa ετεροζυγώτες. Ο πολυμορφισμός RsaI δε βρέθηκε σε κανένα από τα δείγματα της μελέτης μας.

Οι πολυμορφισμοί AluI και RsaI έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της εμμήνου ρύσεως. Συγκεκριμένα σε μια case-control μελέτη, η επίπτωση των ομόζυγων για τους πολυμορφισμούς RsaI και AluI ήταν υψηλότερη σε γυναίκες με διαταραχές του κύκλου από ότι σε υγιείς (Sandarrajian et al 2001). Ιδιαίτερα υψηλή μάλιστα ήταν η συχνότητα του πολυμορφισμού RsaI σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες (PCOS). Η νευρογενής ανορεξία (anorexia nervosa) είναι επίσης ένα από τα νοσήματα, που έχουν συσχετιστεί με τον παραπάνω πολυμορφισμό (Rosenkranz et al 1998, Eastwood et al 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι στα θυλαστικά τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων έχουν ανορεξιογόνο δράση. Με την έναρξη της εφηβείας τα επίπεδα των οιστρογόνων αυξάνονται δραματικά. Ο υποθαλαμο-υποφυσιακός άξονας, μέσω των ERα και ERβ, είναι πολύ ευαίσθητος στις αλλαγές αυτές που συμβαίνουν και πιθανά να εμπλέκεται στο μηχανισμό της νευρογενούς ανορεξίας.

Ο βιολογικός μηχανισμός με τον οποίο οι πολυμορφισμοί XbaI, PvuII και AluI, μπορούν να επηρεάσουν την ηλικία της έναρξης της εμμηναρχής είναι άγνωστος. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πολυμορφισμοί που μελετήσαμε είναι σημειακοί (RFLPs: restriction fragments length polymorphisms). Τα σημεία περιορισμού για τον XbaI και PvuII βρίσκονται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου του ERα. Σε μερικά γονίδια στο πρώτο ιντρόνιο υπάρχουν κάποιες ρυθμιστικές αλληλουχίες, θέσεις σύνδεσης δηλαδή για στοιχεία, που ρυθμίζουν το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου (Bornstein et al 1987, Gasch et al 1989), κι επομένως και τη σύνθεση της πρωτεΐνης (Laurie and Stam 1994). Εναλλακτικά, η συσχέτιση που παρατηρήσαμε μπορεί να αντικατοπτρίζει απλά την ανισοκατανομή σύνδεσης με άλλους λειτουργικούς πολυμορφισμούς

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη διεθνώς που απευθύνει το ερώτημα της δράσης, αλλά και συνέργειας των τεσσάρων συγκεκριμένων πολυμορφισμών στην ηλικία της εμμηναρχής. Συγκεκριμένα, από τη μελέτη μας φάνηκε ότι κορίτσια με γονότυπο PPXXAA, είχαν εμμηναρχή 4 μήνες αργότερα όταν συγκρίθηκαν με τους ετεροζυγώτες οι οποίοι έφεραν από 2-5 κεφαλαία αλλήλια. Ενώ είχαν 11 μήνες καθυστερημένη εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους ετεροζυγώτες οι οποίοι έφεραν 1 μόνο κεφαλαίο αλλήλιο, είχαν δηλαδή γονότυπο ppxxAa. Η τάση για μείωση της εμμηναρχής με την αύξηση των αλληλίων για τις πολυμορφικές θέσεις είναι πιθανά ένδειξη για δόσοεξαρτώμενη επίδραση.

Αδιαφορώντας για τον ακριβή μηχανισμό, και υποθέτοντας ότι οι πολυμορφισμοί των γονιδίων του ERα και ERβ μπορούν να αλλάξουν τη βιολογική δράση των οιστρογόνων σε κυτταρικό επίπεδο, αυτό θα επηρέαζε την ωρίμανση του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα, η οποία καθορίζει την έναρξη της εμμηναρχής. Είναι γνωστό ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς α και β βρίσκονται σε διάφορες περιοχές του υποθαλάμου (Nilsson and Gustafsson et al 2000). Έχει αποδειχθεί ότι η οιστραδιόλη επάγει την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone) από τον υποθάλαμο αυξάνοντας κατά 3-5 φορές τους υποδοχείς της στα γοναδοτρόπα κύτταρα. Είναι προφανές ότι πιθανή έλλειψη ή δεισλειτουργία των οιστρογονικών υποδοχέων α και β θα μείωνε τη θετική παλίνδρομη δράση της οιστραδιόλης στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα, προκαλώντας ελάττωση στη συχνότητα και το εύρος των

εκκριτικών κυμάτων της GnRH, κι επομένως διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας (Couse et al 1999). Στη βιβλιογραφία σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμορφισμών AluI και XbaI, PvuII έχουν περιγραφεί στη νόσο του Alzheimer (Lambert et al 2001).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός AluI του ERβ, ο XbaI και πιθανώς ο PvuII του ERα μπορεί ν'αποτελούν γενετικούς παράγοντες της ηλικίας εμμηναρχής. Ο RsaI πολυμορφισμός του ERβ, είναι σπάνιος στον πληθυσμό που μελετήσαμε. Πολυμορφισμοί και των δύο γονιδίων πιθανώς ασκούν συνεργική επίδραση στην ηλικία εμμηναρχής.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

7.1. Περίληψη στα Ελληνικά

Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΑΡΧΗΣ ΣΕ ΕΦΗΒΕΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΟΝΙΤΣΑΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β με την ηλικία εμμηναρχής σε κορίτσια ηλικίας 12 εως και 19 ετών, που ήταν κάτοικοι της επαρχίας Κόνιτσας του νομού Ιωαννίνων. Η απόφαση του να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και β (ERα, ERβ) στο συγκεκριμένο πληθυσμό, στηρίχτηκε στις ακόλουθες σκέψεις.

Πρώτα από όλα, η συγκεκριμένη επαρχία απαρτίζεται από χωριά τα οποία παρέμεναν για πολλά χρόνια απομονωμένα, και οι κοινωνίες αυτές ήταν για πολλές γενιές κλειστές. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο πληθυσμός που επιλέξαμε να είναι ομοιογενής, προκειμένου η πολιτισμική και πληθυσμιακή ετερογένεια να ελαχιστοποιηθεί, εφόσον τοπικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ηλικία της εμμηναρχής.

Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων βασίστηκε αρχικά στη σκέψη ότι τα οιστρογόνα είναι οι κυρίαρχες ορμόνες που δρουν στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Όσο αφορά την εμμηναρχή πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία, η οποία απαιτεί αλληλεπίδραση των οιστρογόνων, της FSH, LH και της προγεστερόνης. Η εμφάνιση της πραγματοποιείται όταν η υπόφυση και ο υποθάλαμος αποκτήσουν ευαισθησία στη θετική παλίνδρομη διέγερση της οιστραδιόλης. Η δράση των οιστραδιόλης ασκείται μέσω της σύνδεσης της με τους ERα και ERβ.

Ο δεύτερος λόγος που μας οδήγησε στη μελέτη των ERα και ERβ είναι η σημαντική ιστική κατανομή τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, η οποία επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατες βιοχημικές και ιστολογικές μελέτες. Συγκεκριμένα ο ERβ ανιχνεύεται στα κοκκιώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων σε όλα τα στάδια, από το αρχέγονο ως το ώριμο ωοθυλάκιο, σε αντίθεση με τον ERα ο οποίος ανιχνεύεται κυρίως στα ώριμα ωοθυλάκια.

Ένας τρίτος λόγος που μας οδήγησε στη συγκεκριμένη επιλογή ήταν ότι σε μελέτες πειραματικών μοντέλων, στα οποία δεν εκφράζονται τα γονίδια του ERα και του ERβ, κι επομένως και οι αντίστοιχοι υποδοχείς, επηρεάζονται τα στάδια της ωοθυλακιόγένεσης. Έτσι επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERα (ERα knockout-ERKO) παρουσιάζουν στειρότητα, έχουν υποπλαστική μήτρα και υπεραιμικές ωοθήκες, ενώ επίμυες που δεν εκφράζουν τον ERβ (ERβ knockout-BERKO), μολονότι εμφανίζουν γονιμότητα, παρουσιάζουν ωοθυλακιόρρηξία λιγότερο συχνά από τους φυσιολογικούς επίμυες. Επίμυες που δεν εκφράζουν κανένα υποδοχέα οιστρογόνων (knockout για ERα και ERβ, ERαβKO) παρουσιάζουν στειρότητα και οι ωοθήκες τους παρουσιάζουν δομές που μοιάζουν με τα σπερματικά σωληνάρια και τα κύτταρα Sertoli των όρχεων.

Το υλικό της μελέτης μας αποτέλεσαν 150 κορίτσια ηλικίας 12-19 ετών, κάτοικοι της κωμόπολης της Κόνιτσας και των γύρω χωριών. Η μελέτη έλαβε χώρα στο Γυμνάσιο και τα δύο Λύκεια της περιοχής. Οι μαθήτριες συμπλήρωσαν

ερωτηματολόγιο που αφορούσε στοιχεία από το ατομικό και το οικογενειακό τους αναμνηστικό. Πληροφορίες για την εμμηναρχή ελήφθησαν μέσω συνεντεύξεων με τις νεαρές έφηβες και με τις μητέρες τους και σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω ημερολογίων. Σε κάθε κορίτσι έγινε καταγραφή σωματομετρικών στοιχείων και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος. Ελήφθη δείγμα αίματος για το γονιδιακό έλεγχο.

Ο καθορισμός των γονοτύπων έγινε με ανάλυση DNA που εξήχθη από λευκοκύτταρα περιφερικού τύπου. Η ανάλυση έγινε σε συγκεκριμένα τμήματα του DNA, τα οποία εκλεκτικά πολλαπλασιάστηκαν και απομονώθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Τα προϊόντα της PCR αποτέλεσαν τμήματα των γονιδίων ERα και ERβ τα οποία περιείχαν το πολυμορφικό σημείο. Όλοι οι μελετηθέντες πολυμορφισμοί ήταν SNPs, δηλαδή πολυμορφισμοί ενός μόνο νουκλεοτιδίου και μελετήθηκαν με τη μέθοδο των πολυμορφισμών περιορισμού μήκους θραύσματος (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs) με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης για κάθε πολυμορφισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης.

Για το γονίδιο του ERα μελετήθηκαν δύο σημεία περιορισμού, το XbaI και το PvuII, ενώ για το γονίδιο του ERβ το AluI και RsaI. Για τον καθορισμό των πολυμορφισμών αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR, ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα XbaI, PvuII και AluI, RsaI για τα δύο γονίδια αντίστοιχα. Οι γονότυποι που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία ήταν PP/Pp/pp, XX/Xx/xx για τον PvuII και τον XbaI αντίστοιχα, και AA/Aa/aa, RR/Rr/rr για τον AluI και RsaI αντίστοιχα, με τα κεφαλαία γράμματα να αντιστοιχούν στην απουσία του σημείου περιορισμού.

Η κατανομή των γονοτυπικών συχνοτήτων για τους πολυμορφισμούς των ERα και ERβ όπως προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια με αυτή που έχει περιγραφεί και σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς. Για το γονίδιο του ERα η συχνότητα για το αλληλίο X ήταν 43.4%, και για το αλληλίο P ήταν 53.4%, για τους πολυμορφισμούς XbaI και PvuII αντίστοιχα. Για το γονίδιο του ERβ η συχνότητα για το αλληλίο R ήταν 100% και για το αλληλίο A ήταν 72%, για τους πολυμορφισμούς RsaI και AluI αντίστοιχα.

Η μέση ηλικία εμμηναρχής ήταν 12.9 ± 1.2 χρόνια. Όταν έγινε σύγκριση των γονοτύπων με την ηλικία εμμηναρχής τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα: Η εμμηναρχή ήρθε περίπου 0.5 χρόνια αργότερα στα κορίτσια με XX γονότυπο (ομοζυγωτών χωρίς την αντικατάσταση) από ότι σε κορίτσια με Xx ή xx γονότυπο (ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών φερόντων την αντικατάσταση). Η διαφορά ήταν σημαντική στη σύγκριση μεταξύ των XX και Xx, xx ($p=0.017$), ενώ δεν ήταν σημαντική ($p=0.057$) όταν και οι τρεις ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Για τον PvuII φάνηκε να υπάρχει παρόμοια τάση για αργότερη ηλικία εμμηναρχής στα κορίτσια με γονότυπο PP όταν συγκρίθηκαν με τους Pp και pp. Η διαφορά δεν ήταν όμως σημαντική ($p=0.21$). Όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος, η διαφορά μεταξύ των XX ομοζυγωτών και των άλλων ατόμων ήταν 0.057 χρόνια ($p=0.021$), ενώ η διαφορά μεταξύ των PP ομοζυγωτών και των Pp, pp ατόμων ήταν 0.26 χρόνια ($p=0.26$).

Επειδή οι πολυμορφισμοί XbaI και PvuII συνδέονται άμεσα, μελετήθηκαν συγχρόνως ως προς την επίδραση τους στην εμμηναρχή. Η διαφορά μάλιστα ήταν ακόμη μεγαλύτερη όταν συγκρίθηκαν οι απλότυποι PX. Κατά μέσο όρο, οι PX ομοζυγώτες είχαν περίπου 8 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους ετεροζυγώτες και τα άτομα που δεν έφεραν το συνδυασμό των PX αλληλίων.

Δεν παρατηρήθηκε καμμία διαφορά στην εμμηναρχή συγκρίνοντας τους PX ετεροζυγώτες (PpXx, PPXx) (μέση ηλικία εμμηναρχής 12.76 χρόνια SD 1.17) με τα άτομα που δεν έφεραν το συνδυασμό των PX αλληλίων (PPxx, PpXX, Ppxx, ppXx, ppxx) (μέση ηλικία εμμηναρχής 12.76 χρόνια SD 1.34). Η παπαπάνω σύγκριση ισχύει με την προϋπόθεση ότι οι PpXx είναι ετεροζυγώτες (φέρουν δηλαδή τους συνδυασμούς PX και px αλληλίων), δεδομένης της ισχυρής ανισοκατανομής σύνδεσης μεταξύ των και πολυμορφισμών. Η ηλικία εμμηναρχής ήταν επίσης παρόμοια μεταξύ των PpXx ατόμων (μέση τιμή 12.82 χρόνια SD 1.16) και των βέβαιων PX ετεροζυγωτών, PPXx κα PpXX (μέση τιμή 12.54 χρόνια SD 1.21). Επομένως η γενετική επίδραση περιορίζεται στους ομοζυγώτες PX χωρίς φανερή ένδειξη για δόσοεξαρτώμενη επίδραση (dose-response effect). Ακόμη κι όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος η διαφορά παρέμεινε σημαντική μεταξύ των ομοζυγωτών PX και όλων των άλλων ($\rho=0.008$).

Σημαντική φέρεται να είναι η επίδραση του AluI πολυμορφισμού στην εμμηναρχή. Οι ομοζυγώτες AA είχαν 0.57 χρόνια αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με τους ετεροζυγώτες Aa ($\rho=0.005$). Η διαφορά παρέμεινε σημαντική όταν έγινε προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος ($\rho=0.006$). Ο RsaI πολυμορφισμός δε βρέθηκε σε κανένα από τα άτομα που μελετήθηκαν.

Δεδομένου ότι ο ERα και ο ERβ αλληλεπιδρούν, μελετήθηκαν συγχρόνως οι πολυμορφισμοί και των δύο γονιδίων, για πιθανή συνεργική δράση στην ηλικία εμμηναρχής. Κορίτσια που δεν έφεραν καμμία από τις πολυμορφικές θέσεις που μελετήσαμε, είχαν δηλαδή γονότυπο PPXXAA, είχαν 4 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με ετεροζυγώτες, οι οποίοι έφεραν 2-5 κεφαλαία αλλήλια, και 11 μήνες αργότερα εμμηναρχή όταν συγκρίθηκαν με ετεροζυγώτες, οι οποίοι έφεραν 1 κεφαλαίο αλλήλιο, είχαν δηλαδή γονότυπο Aaxxpp. Η μείωση της ηλικίας εμμηναρχής με την αύξηση των αλληλίων για τις πολυμορφικές θέσεις, είναι πιθανά ένδειξη για δόσοεξαρτώμενη επίδραση. Η διαφορά ήταν σημαντική όταν συγκρίθηκαν και οι τρεις ομάδες μεταξύ τους ($\rho=0.042$), και παρέμεινε σημαντική μετά από προσαρμογή για το δείκτη μάζας σώματος ($\rho=0.034$).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός AluI του ERβ, ο XbaI και πιθανώς ο PvuII του ERα μπορεί να αποτελούν γενετικούς παράγοντες της ηλικίας εμμηναρχής. Ο RsaI πολυμορφισμός του ERβ είναι σπάνιος στον πληθυσμό που μελετήσαμε. Πολυμορφισμοί και των δύο γονιδίων πιθανώς ασκούν συνεργική επίδραση στην ηλικία εμμηναρχής.

7.2. Περίληψη στα Αγγλικά

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS OF THE ESTROGEN RECEPTOR GENE WITH THE AGE OF MENARCHE IN ADOLESCENT FEMALES FROM THE REGION OF KONITSA

The present study evaluated the correlation between polymorphisms of the estrogen receptor α and β genes with the age of menarche in girls 12 to 19 years, from the region of Konitsa, prefecture of Ioannina. The decision to study these polymorphisms in the specific population was based on the following.

First, the region has many isolated villages made up of communities which have been closed for many generations. As a result the population chosen was homogeneous, taking into consideration that regional and environmental factors seem to play a role in the age of menarche.

The decision to choose estrogen receptor genes was based on the fact that estrogens are the predominant hormones acting on the female genitalia. Menarche is a complicated procedure, requiring the interaction of estrogens, FSH, LH and progesterone. It is initiated when the pituitary and the hypothalamus become sensitive to the positive feedback of estradiol. The action of estrogens is performed through their linkage with the estrogen receptors α and β .

Biochemical and histological studies demonstrate the presence of the two estrogen receptor subtypes, ER α and β in the human reproductive tissues. In ovaries, ER β was detected in granulosa cells of growing follicles, whereas ER α was poorly expressed, being located in the theca interna and interstitial cells. In the uterus, the reverse situation was found, with high expression of ER α in epithelial, stromal and muscle cells and very low expression of ER β .

Mice lacking estrogen receptors alpha and beta ER α β KO were generated to clarify the roles of each receptor in the physiology of estrogen target tissues. Ovaries of adult ER α β KO females exhibit follicle transdifferentiation to structures resembling seminiferous tubules of the testis, including Sertoli-like cells. Therefore, loss of both receptors leads to an ovarian phenotype that is distinct from that of the individual ERKO mutants, which indicates that both receptors are required for the maintenance of germ and somatic cells in the postnatal ovary.

We performed genotyping for ER α and β gene polymorphisms in a cohort of 145 healthy adolescent females from the region of Konitsa in North- Western Greece, a mountainous area with closed, rural population. Information on menarche was obtained through interviews with the adolescents and their mothers and through diaries. Informed consent was obtained for genotyping. Menarche information was collected independently from genotype information.

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard procedures. Specific DNA amplification was performed by PCR (polymerase chain reaction). PCR products were analyzed for RFLPs using restriction enzymes. Enzyme digestion products underwent electrophoresis on agarose gel and the separation patterns were photographed under ultraviolet illumination. The resulting genotypes for XbaI, PvuII and AluI, RsaI restriction sites were characterized as XX/Xx/xx, PP/Pp/pp and AA/Aa/aa, RR/Rr/rr respectively, with the capital letters indicating the absence of the restriction site.

In general, menarche occurred 0.5 years later in girls with the XX genotype than in girls with the Xx or xx genotype. The difference was significant for the comparison of XX versus Xx and xx ($p=0.017$, $p=0.057$ when all three genotypes were compared by ANOVA). There appeared to be a similar trend for later onset of menarche among girls grouped by Pvull genotype with the PP genotype, when compared with Pp or pp, but the difference did not reach formal significance ($p=0.21$). After adjusting for body mass index, the difference between XX homozygotes and the other subjects was 0.57 years ($p=0.021$). The difference between PP homozygotes and other subjects was still not significant (0.26 years, $p=0.26$).

The difference was even larger when we considered the PX haplotype. On average, PX homozygotes had 8 months delay in menarche compared with PX heterozygotes and subjects without the PX allele combined. Separation of PX heterozygotes from subjects without the PX allele is not as straightforward as there is uncertainty about whether the PpXx individuals are all PX heterozygotes (carrying the PX and px alleles), or if some have no PX allele at all (i.e. they carry two Px alleles). Assuming the PpXx individuals to be PX heterozygotes, there was no difference in the age of menarche between the group of PX heterozygotes (mean 12.76 years, SD 1.17), and subjects without any PX allele (mean 12.76 years, SD 1.34). The mean age of menarche was similar between the PpXx individuals (mean 12.82 years, SD 1.16) and the certain PX heterozygotes (mean 12.54 years, SD 1.21). Thus the genetic effect was limited to PX homozygosity and there was no apparent evidence of a dose-response effect. Finally, the difference between PX homozygotes and other subjects was still 0.67 years ($p=0.008$).

Menarche occurred 0.57 years later on average in girls with AA genotype than in girls with Aa genotype. The difference was significant for the comparison of AA vs Aa ($p=0.005$). After adjusting for body mass index the difference was still significant ($p=0.006$). The RsaI polymorphism was not found in any of the females tested.

As it has been postulated that ER α and ER β may interact we investigated whether variation at both loci may have a combined effect on the age of menarche. A genotype analysis was carried out for each of the SNPs studied. The girls carried out the genotype AAXXPP had 4 months delay in menarche when compared with heterozygotes carrying 2-5 capital letters, and 11 months later menarche when compared with the girls bearing the genotype combination Aaxxpp. The difference was significant when all three groups were compared ($p=0.042$). There appeared to be a trend for earlier onset of menarche for the girls carrying one or more p,x,a alleles. Thus the genetic effect was larger for the girls with the most p,x,a alleles, we could talk for a dose response effect. After adjusting for body mass index the difference between the girls with genotype combination AAXXPP and the other subjects was still significant ($p=0.034$).

In conclusion, our results show that AluI polymorphism of ER β , XbaI and probably Pvull of ER α might be genetic factors for the age of menarche. RsaI polymorphism of ER β is rare in the population we studied. Polymorphisms of both genes probably have synergistic effect on the age of menarche.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Περιγραφή αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το γονοτυπικό προσδιορισμό των μελετούμενων κοριτσιών.

A) Εξαγωγή DNA

TKM: 10mM Tris-HCl, Ph=7.6, 10mM KCl, 2mM EDTA, 4mM MgCl₂

TE: 10mM Tris-HCl, Ph=7.8, 1mM EDTA, Ph=8

NP-40: Nonylphenoxy Polyethoxy Ethanol (Sigma)

SDS: Sodium dodecyl sulphate (Sigma)

B) Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

TBE: 89mM Tris-HCl, 89mM Boric Acid, 2,5mM EDTA

Γ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Buffer: 50mM KCl, 20mM Tris-HCl, Ph=8.4, 2mg/ml BSA

d-NTPs: 2m (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Promega)

Ιόντα Mg (MgCl₂): 1.5mM

Taq DNA πολυμεράση: 1 μονάδα (Gibco, BRL)

Γενομικό DNA: 300-500mg

Πίνακας 2. Συνθήκες πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και πυκνότητες και σύνθεση των πηκτωμάτων αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση, για καθένα από τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς.

	PvuII	XbaI	AluI	RsaI
Buffer (μl)	2	2	2	2,5
Ενζυμο (μl)	0,5	1	1,5	1
PCR (μl)	10	10	7,5	10
H₂O (μl)	7,5	7	16,29	17,15
Θερμοκρασία (°C)	37	37	37	37
Χρόνος επώασης	2ώρες	18ώρες	12	12
Πήκτωμα αγαρόζης %	2	2	2	2
Ultra Pure	0,8	0,8	0,8	0,8
NuSieve 3:1	0	0	0	0
Metaphore	2,2	2,2	2,2	2,2

9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

9.1. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΑΓΓΛΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

AF-2 = θέση λειτουργικής ενεργοποίησης 2 (activation function site 2)

AP-1 = λειτουργική πρωτεΐνη 1 (activating protein 1)

BERKO = επίμυες που δεν εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα β (estrogen receptor β knockout mouse)

BMI = δείκτης μάζας σώματος (body mass index)

Bp = ζεύγη βάσεων (base pairs)

cAMP = κυκλικό αδενομονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο (cyclic AMP)

CAV1, D52L1, NDKA, RFP, TFF1 genes = οικογονίδια

CYP19 gene = γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των ενζύμων που μεταβολίζουν τα οιστρογόνα

COOH-terminal = καρβοξυτελική

DBD = περιοχή σύνδεσης με το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA binding domain)

DNA = δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, γενετικό υλικό (deoxyribonucleic acid)

E₂ = οιστραδιόλη

E21G1, E21G2, E21G3, E21G4, E21G5 genes = οιστρογονοεπαγόμενα γονίδια

EGF= επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor)

ERα = οιστρογονικός υποδοχέας α (estrogen receptor α)

ERβ = οιστρογονικός υποδοχέας β (estrogen receptor β)

ERαKO = επίμυες που δεν εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα α (estrogen receptor α knockout mouse)

ERαβKO = επίμυες που δεν εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα α και β (estrogen receptor αβ knockout mouse)

FSH = ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (follicle stimulating hormone)

GABA = γ-αμινοβουτυρικό οξύ

GnRH = εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (Gonadotropin releasing hormone)

HRE = ορμονοαπαντητικά στοιχεία (hormone responsive elements)

HSPs = πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (heat shock proteins)

HSPCB, HSPCA, HSPD1, HSPA10, FKBP4 genes = γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ

IGF-1 = αυξητικός παράγοντας 1 που μοιάζει με την ινσουλίνη (insulin like growth factor-1)

IGF-II = αυξητικός παράγοντας II που μοιάζει με την ινσουλίνη (insulin like growth factor-II)

Kb = kilo bites

LBD =περιοχή σύνδεσης (ligand binding domain)

LDL = χαμηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεΐνη (low density lipoprotein)

LH = ωχρινότροπος ορμόνη (luteinizing hormone)

Min = λεπτά (minutes)

NH₂-terminal = αμινοτελική

PCOS = σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovaries syndrome)

PCR = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction)

P450 arom = P450 αρωματάση (P450 aromatase)

P450scc = ειδική οξειδάση του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450 side chain cleavage oxidase)

RFLPs = πολυμορφισμοί περιορισμού μήκους θραύσματος (restriction fragment length polymorphisms)

SD = σταθερή απόκλιση (standard deviation)

Sec = δευτερόλεπτα (seconds)

SERM = εκλεκτικός τροποποιητής του οιστογονικού υποδοχέα (selective estrogen receptor modulator)

SHBG =

φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (sex-hormone binding globulin)

SNPs = πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms)

TAF-1 = μεταγραφική λειτουργική ενεργοποίηση 1 (transcriptional activation function 1)

TAF-2 = μεταγραφική λειτουργική ενεργοποίηση 2 (transcriptional activation function 2)

TGF-α = μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας α (transforming growth factor-α)

WTI = ανασταλτικός παράγοντας του όγκου του Wilms (Wilms' tumor inhibitory factor)

9.2. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

Κ.Ν.Σ. = κεντρικό νευρικό σύστημα

9.3. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ

Πίνακας 1 = σελίδα 22

Πίνακας 2 = σελίδα 52

Πίνακας 3 = σελίδα 39

Πίνακας 4 = σελίδα 40

Πίνακας 5 = σελίδα 42

Πίνακας 6 = σελίδα 42

Πίνακας 7 = σελίδα 43

Εικόνα 1 = σελίδα 13

Εικόνα 2 = σελίδα 18

Εικόνα 3 = σελίδα 21

Εικόνα 4 = σελίδα 23

Εικόνα 5 = σελίδα 25

Εικόνα 6 = σελίδα 27

Εικόνα 7 = σελίδα 32

Εικόνα 8 = σελίδα 35

Εικόνα 9 = σελίδα 35

Εικόνα 10 = σελίδα 36

Εικόνα 11 = σελίδα 36

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Albagha O.M., McGuigan F.E., Reid D.M. and Ralston S.H. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J. Bone Mineral Res* 2001, 16:128-134.
2. Ambrosone B.C., Moysish B.K., Furberg H. Freudenheim I.J., Bowman D.E., Ahmed S. GRAHAM s., Vena E.J. and Shields G.P. CYP17 genetic polymorphism, breast cancer, and breast cancer risk factors. *Breast Cancer Res* 2003, 5:R45-R51.
3. Amundsen D.W., Jean Diers C. The age of menarche in classical Greece and Rome. *Human Biol.* 1969, 41 (1):125-32.
4. Anasti JN, Kalandaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson Im. Human follicle fluid vascular endothelial growth factor levels correlate with luteinization in spontaneously developing follicles. *Human Reprod.* 1998, 13:1144-1147.
5. Andersen T.I., Heimdal K.R., Skrede M., Tveit K., Berg K. and Borresen A. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Human Genetics* 1994, 94:665-670.
6. Arko B., Preželj J., Komel R., Kocijancic A., Marc Janja. No major effect of estrogen receptor beta gene RsaI polymorphism on bone mineral density and response to alendronate therapy in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 81:147-152.
7. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J-A, and Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists.
8. Berry M, Metzger D, and Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context depend agonistic activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 1990, 9:2811-2818.
9. Bornstein P., McKay J., Morishima J.K., Devarayalu S. And Gelinas R.E. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1(I)$ collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84:8869-8873.
10. Brandenberger A.W, Tee M.K, Lee J.Y, Chao V, and Jaffe R.B. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997, 82:3509-3512.
11. Buffet CN, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers Neuroendocrinol.* 1998, 19:151-186.
12. Burke GL, Savage PJ, Manolio TA et al. Correlates of obesity in young black and white women: The CARDIA study. *Am J Public Health* 1992, 82:1621-1625.

13. Danielian PS, White R, Lees JA, and Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 1992, 11:1025-1033.
14. Carmel Kealey, Alison Reynolds, Lesley Mynett-Johnson, Eileen Claffey and Patrick McKeon. No evidence to support an association between the oestrogen receptor beta gene and bipolar disorder. *Psychiatric Genetics* 2001, 11:223-226.
15. Couse J.F., Hewitt S.C., Bunch D.O., Sar M., Walker V.R., Davis B.J., Korach K.S. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 1999, 17:2328-2331.
16. Couse J.F., Korach K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999, 20:358-417.
17. Chamness GC, and McGuire WL. Estrogen receptor in the rat uterus. Physiological Forms and artifacts. *Biochemistry* 1972, 11:2466-2472.
18. Charpentier H. A., Bednarek K.A., Daniel L. R., Hawkins A.K., Laflin J.K., Gaddins S., MacLeod C.M., Aldaz M. Effects of estrogen on global gene expression: Identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Research* 2000, 60:5977-5983.
19. Comings E.D., Gade R., Muhleman D., Peters R.W. and MacMurray. The LEP gene and age of menarche:maternal age as a potential cause of hidden stratification in association studies. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001, 73:204-210.
20. Cone TE Jr. Physical growth and maturation. In: Cooke RE, Levin S, eds. *The biological basis of pediatric practice*. New York: McGraw-Hill 1968, 1338-1347.
21. Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology* 1999, 140:5855-5865.
22. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors a and b. *Science* 1999, 286:2328-2331.
23. Couse JF, Korach KS. Reproductive phenotype in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol* 1999, 60:143-148.
24. Cowley S.M., Hoare S., Mosselman S. AND Parkers M.G. Estrogen Receptors α and β form heterodimers on DNA. *The Journal of Biology Chemistry*. 1997, 272:19858-19862.
25. Damon A, Damon ST, Reed RB, Valadian I. Age at menarche of mothers and daughters with a note on accuracy of recall. *Hum Biol* 1969, 41:161-175.
26. Dare FO, Ogunniyi SO, and Makinde OO. Biosocial factors affecting menarche in a mixed Nigeria population. *Central Afr J Med* 1992, 38:77-81.

27. Eastwood H., Brown K.M.O., Markovic D., Pieri L.F. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol. Psych.* 2002, 7:86089.
28. Elizondo S. Age at menarche: Its variation to linear and ponderal growth. *Ann Hum Biol* 1992, 19:197-199.
29. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld, and Gustafsson Jan-Åke. Human estrogen receptor β gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Jornal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:4258-4265.
30. Evans RM. The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science* 1988,240:889-895.
31. Eveleth PB, Tanner JM. Worldwide variation in human growth. Cambridge: Cambridge University Press, 1976, 213-219, 260-261.
32. Eveleth PB, Tanner JM. Worldwide variation in human growth, 2nd edn Cambridge: Cambridge University Press 1990.
33. Fischbein S. Onset of puberty in MZ and DZ twins. *Acta Genet Med Gemellol* 1977, 26:151-158.
34. Forbes GB. Body size and composition of perimenarcheal girls. *Am J Dis Child* 1992, 146:63-66.
35. Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and hypothesis of menarche. *Arch Dis Child.* 1971, 46:695-701.
36. Frisch RE, Wyshak G, and Vincent L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *New Engl J Med* 1980, 303:17-19.
37. Garn SM. and LaVelle M. Reproductive histories of low weight girls and women. *Am J Clin Nutr* 1983, 37:862-866.
38. Garn SM, LaVelle M, and Pilkington JJ. Comparisons of fatness in premenarcheal and postmenarcheal girls of the same age. *J Pediatr* 1983, 103:328-331.
39. Garn SM, LaVelle M, Rosenberg KR et al. Maturational timing as a factor in female fatness and obesity. *Am J Clin Nutr* 1986, 43:879-883.
40. Gasch A., Hinz U. and Renkawitz-Pohl R. Intron and upsteam sequences regulate expression of *Drosophila* beta 3-tubulin gene in the visceral and somatic musculature, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86:3215-3218.
41. Gedda L, and Brenci G. Twins as a natural test of chronogenetics. *Acta Genet Med Gemellol.* 1975, 24:15-30.
42. Giguere V, Yang N, Segni P, and Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 1988, 331:91-94.

43. Glatzstein IZ, Yeh J. Ontogeny of the estrogen receptor in the human fetal uterus. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1995, 80:958-964.
44. Golden WL. Reproductive histories in Norwegian twin population: Evaluation of the maternal effect in early spontaneous abortion. *Acta Genet Med Gemello* 1981, 30:91-165.
45. Gorai I., Tanaka K., Inada M., Morinaga H., Uchiyama Y., Kikuchi R., Chaki O. Hirahara F. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor- α gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese woman. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2003, 88:799-803.
46. Gorski J, Welshons W, and Sakai D. Remodeling the estrogen receptor model. *Mol cell Endocrinol.* 1984, 36:11-15.
47. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reprod.* 1986, 1:81-87.
48. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, and Chambon P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to vertebrate. *Nature.* 1986, 320:134-139.
49. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, and Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986, 231:1150-1154.
50. Haiman C.A., Hankinson S.E., Spiegelman D., Colditz G.A., Willet WC., Speizer F.E., Kelsey K.T. and Hunter D.J. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res* 1999, 59:1015-1020.
51. Hard T, and Gustafsson J-A. Structure and function of the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor and other members of the nuclear receptor supergene family. *Acc Chem Res* 1993, 26:644-650.
52. Hisaw FL. Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol Rev.* 1947, 27:95-119.
53. Hsieh C.C., Trichopoulos D., Katsouyanni K. and Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case control study. *Int. J. Cancer* 1990, 4:796-780.
54. Hsu SY, Kudo M, Chun SY, Haluska FG, Housman DE, Hsueh AJW. Wilm's tumor protein WTI as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin a gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 1995, 9:1357-1366.
55. Hsueh AJ, Billing H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Re.*, 1994, 15:707-724.

56. Ioannidis J.P.A., Ntzani E.E., Tricalinos T.A. and Contopoulos-Ioannidis D.G. Replication validity of genetic association studies. *Nature Genet.* 2001, 29:306-309.
57. Jensen EV, and Jacobsen HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res* 1962, 18:387-414.
58. Kadlubar F.F., Berkowitz G.S., Delongchamp R.R., Wang C., Green B.L., Tang G., Lamba J., Schuetz E., Wolff M.S. The CYP3A41B is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Bioark Prev* 2003, 12:327-331.
59. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87:2481-2494.
60. Katzenellenbogen JA, and Katzenellenbogen BS. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 1996, 3:529-536.
61. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001, 12:152-156.
62. Kikuchi T., Hashimoto N., Kawasaki T. and Uchiyama M. Association of serum low-density lipoprotein metabolism with oestrogen receptor gene polymorphisms in healthy children. *Acta Paediatr.* 2000, 89:42-45.
63. Koradh KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 1994, 266:1524-1527.
64. Kraus WL, McInerney EM, and Katzenellenbogen BS. Ligand-dependent transcriptionally productive association of the amino- and carboxy-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:12314-12318.
65. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:15677-15682.
66. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson J-A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:5925-5930.
67. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien KAJ, Enmark Eva, Haggblad J, Nilsson S, and Gustafsson Jan-Ake. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 1997, 138:863-870.
68. Lai J., Vesprini D., Chu W., Jernström H. and Narod A.S. CYP gene polymorphisms and early menarche. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2001, 74:449-457.

69. Lambert J-C., Harris J.M., Mann David, Lemmon Helen, Coates J., Cumming A., St-Clair D., Lendon C. Are the estrogen receptors involved in Alzheimer's disease? *Neuroscience Letters* 2001, 306:193-197.
70. Laurie C.C. and Stam L.F. The effect of an intronic polymorphism on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1994, 138:379-385.
71. Li JJ, Li SA. Estrogen carcinogenesis in the hamster kidney: a hormone driven multistep process. *Prog Clin Biol Res* 1996, 394:255-267.
72. Macklon NS, Fauser BCIM. Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas*. 1998, 30:181-188.
73. Malaspina H. The commencement of menstruation in Greek girls. *Proceedings of the Academy of Athens*. 1935, 10:70-81.
74. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schotz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1998, 83:835-839.
75. Mantzagrioti-Meimaridi M. Anthropometric study of child and adolescent population, 1981. *Institute of Child Health, Athens*. 1985.
76. Merzenich H, Boeing H, Wahrendorf J. Dietary fat and sports activity as determinants for age at menarche. *Am J Epidemiol* 1993, 138:217-224.
77. Meyer FJ, Moisan D, Marcoux et al. Dietary and physical determinants of menarche. *Epidemiology* 1990, 1:377-381.
78. Mitchner NA, Garliack C, Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. *Endocrinology*. 1998, 139:3976-3983.
79. Morabia A. and Constanza, M.C. International variability in ages at menarche, first livrbirth, and menopause. *World Health Organization Collaborative Study on Neoplasia and Steroid Contraceptives*. *Am. J. Epeimiol.* 1998, 148:1195-205.
80. Nilsson S. and Gustafun J.A. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Br. Cancer Res.* 2000, 5:360-366.
81. Ponglikitmongkol Mathurose, Green Stephen and Chambon Pierre. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *The EMBO Journal* . 1988, 5:3385-338.
82. Pelletier G, and El-Alfly M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors and in the human reproductive organs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000, 85:4835-3840.
83. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 1994, 15:725-751.

84. Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res.* 1995, 50:223-254.
85. Rimpelä AH, and Rimpelä MK. Towards an equal distribution of health? Socioeconomic and regional differences of the secular trend of the age of menarche in Finland from 1979 to 1989. *Acta Paediat* 1993, 82:87-90.
86. Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, et al. Gonadotrophin induction of ovulation and corpus luteum formation in young estrogen receptor- α knockout mice. *Biol Reprod* 2000, 62:599-605.
87. Rosenkranz K., Hinney A., Ziegler A., Hermann H., Fichter M., Mayer H., Siegfried W., Young J.K., Remschmidt H., Hebebrand J. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic probands. *Journ of Clin. Endocrinol. And Metad.* 1998, 83:4524-4527.
88. Rousset F. and Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 1995, 140:1413-1419.
89. Saunders P, Miller MR, Williams K, Macpherson S, Harkiss D, Anderson R.A, Orr B, Groome N.P, Scobie G, and Fraser H. M. Differential expression of estrogen receptor and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biology of reproduction.* 63:1098-1111.
90. Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, and Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993, 75:567-578.
91. Sharma JC. The genetic contribution to pubertal growth and development studied by longitudinal growth data on twins. *Ann Hum Biol* 1983, 10:163-171.
92. Sherman B, Wallace R, Bean J et al. Relationship of body weight to menarcheal and menopause age: implications for breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52:488-493.
93. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor α and β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997, 388:507-525.
94. Sklad M. The rate of growth and maturing of twins. *Acta Genet Med Gemelloi.* 1977, 26:221-237.
95. Stanton WR, Kelly JL, Bunyan DA. Expected gain in body mass and onset of the menarche. *Aust NZ J Obstet Gynecol* 1992, 32:338-340.
96. Sundarajan C., Liao W.X., Roy A.C., Ng S.C. Association between estrogen receptor- β gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *Journal of Endocrinology and metabolism* 2001, 86:135-139.

97. Suzuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and estrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroid enzymes. *Hum Reprod.* 1994, 9:1589-1595.
98. Stark O, Peckham CS, and Moynihan C. Weight and age at menarche. *Arch Dis Child* 1989, 64:383-387.
99. Junji T, Suzuki t, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, and Sasano H. Expression and cellular localization of estrogen receptors α and β in the human fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001, 86:2258-2268.
100. Tang M-X, Jacobs D, Stern Y, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimers disease. *Lancet* 1996, 348:429-432.
101. Tanner JM. The secular trend towards earlier physical maturation. *T. Soc. Geneesk.* 1966,44:524-539.
102. Treolar SA and Martin NG. Age at menarche as a fitness trait: Nonadditive genetic variance detected in a large twin sample. *Am J Hum Genet* 1990, 47:137-148.
103. Tsai MJ, and O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994, 63:451-486.
104. Turc-Carel C, Dal Cin P, Boghosian L, Terk-Zakarian J, Sandberg AA. Consistent breakpoints in region 14q22-24 in uterine leiomyoma. *Can Genet Cytogen* 1988, 32:25-31.
105. Vanacker JM, Retterson K, Gustafsson J-A, and Laudet V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J* 1999, 18:4270-4279.
106. Van den Akker OBA, Stein GS, Neale MC et al. Genetic and environmental variation in menstrual cycles: Histories of two British twin samples. *Acta Genet Med Gemellol* 1987, 36:541-548.
107. Vandenbroucke JP, A van Laar, Valkenburg HA. Synergy between thinness and intensive sports activity in delaying menarche. *Br Med J* 1982, 284:1907-1908.
108. Weiderpass E., Person I., Melhus H., Wedren S., Kindmark A. and Baron J.A. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 2000, 21:623-627.
109. Wyshak G, and Frisch RE. Evidence for a secular trend in age of menarche. *New Engl J Med* 1982, 306:1033-1035.

