



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΦΥΛΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ  
(SHBG) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ (CYP19) ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ  
ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ  
ΣΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΘΗΚΩΝ**

**ΠΑΜΠΟΡΑΚΗ ΧΡΗΣΤΙΝΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**

**Νόμιμη κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος : «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)**

**Ημερομηνία αίτησης της κ. Παμποράκη Χρηστίνας: 15-10-2008**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 658<sup>α</sup>/7-4-**

**2009 Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Μέλη

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

Μακρυδήμας Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-6-2009**

*«Ο ρόλος των γονιδίων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) και της αρωματάσης (CYP 19), τη ρύθμιση των επιπέδων των ανδρογόνων της μητέρας και του εμβρύου στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών».*

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 753718-6-2013

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Τσατσούλης Αγαθοκλής, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Καλανταρίδου Σοφία Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοκρινολογία Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μακρυδήμας Γεώργιος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Γιάπρος Βασίλειος Αναπληρωτής Καθηγητής Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Σιώμου Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τίγκας Στυλιανός Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-6-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
Τζαφλίδου Μαργαρίτα Καθηγήτρια  
Ιατρικής Φυσικής



Στους γονείς μου,  
Μανώλη και Ειρήνη,

στον αδελφό μου,  
Πασχάλη,

στους φίλους και συναδέλφους μου,  
Λάμπρο και Στεφανία

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου Μανώλη και Ειρήνη και τον αδελφό μου Πασχάλη καθώς και τους αγαπημένους συναδέλφους και φίλους από τα φοιτητικά μου χρόνια, Λάμπρο Μπάνο και Στεφανία Μαράκα για την αμέριστη αγάπη και συμπαράστασή τους.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω στον καθηγητή Αγαθοκλή Τσατσούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο. Οι σχολαστικές και εύστοχες υποδείξεις του συνετέλεσαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Σημαντική ήταν επίσης η συμβολή των άλλων δύο μελών της τριμελούς επιτροπής, καθηγητή Ιωάννη Γεωργίου και καθηγητή Γεώργιου Μακρυδής στη διαμόρφωση και κρίση της εργασίας. Ακόμα ευχαριστώ θερμά τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους στην αξιολόγηση αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να αναφερθώ στα μέλη της ομάδας του τμήματος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και Μαιευτικής Γυναικολογίας, Λέανδρο Λάζαρο, Μπέτυ Χατζή και Αλεξάνδρα Μπέλλου για την αγάπη τους και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές Graeme Eisenhofer, Jacques Lenders, Stefan Bornstein και Lorenz Hofbauer που ανέλαβαν την εκπαίδευσή μου τους τελευταίους έξι μήνες των σπουδών μου και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν να ξεκινήσω την ειδίκευσή μου στον τομέα της Ενδοκρινολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Δρέσδης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Γενετική και ασθένειες	
1.1 Η σημασία της γενετικής στην ιατρική πρακτική .....	9
1.2 Το ανθρώπινο γονιδίωμα.....	9
1.3 Οι γενετικοί χάρτες.....	10
1.4 Η δομή των γονιδίων και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.....	11
1.5 Η κληρονομικότητα των γενετικών ασθενειών.....	12
1.5.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	13
1.5.2 Μονογονιδιακές διαταραχές.....	14
1.5.3 Πολυπαραγοντικές νόσοι.....	16
1.6 Η έννοια του γενετικού πολυμορφισμού.....	17
1.6.1 Κατηγορίες πολυμορφισμών.....	18
1.6.2 Οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμού (VNTR).....	19
1.7 Μέθοδοι γενετικής ανάλυσης πολυπαραγοντικών νοσημάτων.....	21
1.7.1 Η ανάλυση γενετικής σύνδεσης.....	21
1.7.2 Οι μελέτες συσχέτισης .....	22
2. Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ).....	
2.1 Ορισμός και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.....	24
2.2 Κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.....	26
2.3 Εργαστηριακά ευρήματα του ΣΠΩ.....	29
2.3.1 Βιοχημικοί Δείκτες.....	29
2.3.2 Παθολογοανατομικά ευρήματα.....	30
2.4 Παθοφυσιολογία του ΣΠΩ.....	32
2.5 Μεταβολικές, καρδιαγγειακές συνιστώσες του ΣΠΩ.....	36
2.5.1 Ανοχή στη γλυκόζη και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2.....	36
2.5.2 Καρδιαγγειακή νόσος.....	36
2.5.3 Αγγειακή δυσλειτουργία.....	37
2.6 Υπερπρολακτιναιμία και ΣΠΩ.....	38
2.7 Επινεφριδιακές Διαταραχές και ΣΠΩ.....	38
2.8 Αποφρακτική Άπνοια Ύπνου και ΣΠΩ.....	39

2.9	Συσχέτιση του ΣΠΩ με καρκινοπάθειες.....	39
2.10	Επιπτώσεις του ΣΠΩ στην νευρολογία και την ψυχιατρική.....	40
2.11	Διαφοροδιάγνωση του ΣΠΩ.....	40
2.12	Θεραπεία του ΣΠΩ.....	42
3.	Φυσιολογία της κύησης.....	44
3.1	Ο πλακούντας.....	44
3.2	Το αμνιακό υγρό.....	45
3.3	Η φυλοδεσμευτική σφαιρίνη και οι ορμόνες του φύλου στη κύηση.....	46
3.4	Εμβρυϊκή ωοθήκη και εμβρυϊκά επινεφρίδια.....	47
3.5	Χαρακτηριστικά της κύησης γυναικών με ΣΠΩ.....	48
3.6	Μέθοδοι μελέτης των οργανικών επιδράσεων των στεροειδών στη κύηση.....	49
4.	Εξελικτική θεωρία-ενδομήτριος προγραμματισμός του ΣΠΩ.....	50
4.1	Η θεωρία της ενδομήτριας έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.....	50
4.1.1	Πιθανοί μηχανισμοί έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.....	52
4.2	Πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης ενδομήτριου προγραμματισμού του ΣΠΩ ως συνέπεια έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.....	55
5.	Η φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (SHBG) και το γονίδιο της SHBG.....	59
5.1	Εισαγωγή.....	59
5.2	Η SHBG και οι ορμόνες του φύλου.....	60
5.3	Παράγοντες ρύθμισης των επιπέδων φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης.....	61
5.4	Ο ρόλος της SHBG στο ΣΠΩ.....	61
5.5	Ο (TAAAA) <sub>n</sub> πολυμορφισμός της SHBG.....	62
6.	Η ΑΡΩΜΑΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ (CYP 19).....	64
6.1	Εισαγωγή.....	64
6.2	Αρωματάση και ΣΠΩ.....	64
6.3	Ο πολυμορφισμός (TTTA) <sub>n</sub> της αρωματάσης CYP 19.....	66
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>		
1.	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	67
2.	ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	69
3.	Η διαγνωστική τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.....	72
3.1	Η τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.....	72

3.2 Οι ενδείξεις υποβολής των εγκύων γυναικών στην τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.....	73
3.3 Οι επιπλοκές που μπορεί να προκληθούν από την τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.....	74
4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	75
5. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	75
5.1 Μέθοδος εξαγωγής DNA από τα περιφερικά λεμφοκύτταρα.....	75
5.2 Μέθοδος εξαγωγής DNA από το αμνιακό υγρό.....	76
5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	77
5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	80
5.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	82
5.6 Χρώση νιτρικού αργύρου.....	83
6.ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	85
6.1 Καθορισμός γονοτύπων του πολυμορφισμού (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG.....	85
6.2 Καθορισμός γονοτύπων του πολυμορφισμού (TTTA)n του γονιδίου της αρωματάσης CYP19-9.....	86
7.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	88
8.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
8.1 Μελέτη γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.....	92
8.2 Μελέτη γυναικών που κυοφορούσαν αρρενα έμβρυα.....	99
9.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	107
10.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	115
11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	116
12. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΜΕ ΕΚΤΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....	118
13.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	126



## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

#### **1.1 Η σημασία της γενετικής στην ιατρική πρακτική.**

Η αρχή του προηγούμενου αιώνα χαρακτηρίστηκε από την αποκωδικοποίηση της πλειοψηφίας του γενετικού υλικού. Είχε προηγηθεί, βέβαια, μεγάλη πρόοδος εννοιολογική και τεχνολογική στην προσπάθεια εξερεύνησής του. Ανάμεσα στα επιτεύγματα συγκαταλέγονται η δομή διπλής έλικας του DNA, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (DNA sequencing) και η γένεση των γενετικών χαρτών από την Human Genome Project (HGP). Τα οφέλη αυτού του πλούτου γνώσης είναι βαθιά. Η πλέον αξιοσημείωτη επίπτωση της γενετικής στην ιατρική πρακτική είναι η ενίσχυση στην κατανόηση της αιτιολογίας και παθογένειας των ασθενειών. Εντούτοις, η γενετική έχει αρχίσει να αποκτά ιδιαίτερα σημαντικό και πολλά υποσχόμενο ρόλο στην πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία των ασθενειών.

#### **1.2 Το ανθρώπινο γονιδίωμα.**

Το ανθρώπινο γονιδίωμα χωρίζεται σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα, 22 αυτοσωμικά και το X και Y φυλετικό χρωμόσωμα. Τα κύτταρα του σώματος είναι διπλοειδή, δηλαδή περιέχουν 2 ομόλογα ζεύγη 22 αυτοσωμικών και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων. Τα γεννητικά κύτταρα είναι απλοειδή ως αποτέλεσμα μείωσης και περιέχουν μία σειρά 22 αυτοσωμικών και μία σειρά φυλετικών χρωμοσωμάτων. Το ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι περιέχει περίπου 30,000-40,000 γονίδια, αριθμός μικρότερος από τον αρχικά αναμενόμενο, διαιρούμενο μεταξύ των 23 χρωμοσωμάτων (1, 2). Το γονίδιο είναι μια λειτουργική μονάδα που ρυθμίζεται από τη μεταγραφή και κωδικοποιεί το RNA προϊόν, που συνήθως αλλά όχι πάντα, μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και δραστηριοποιείται εντός ή εκτός κυττάρου. Η ταυτοποίησή του βασίζεται στην έκφρασή του στους διάφορους ιστούς. Ο μικρός αριθμός

γονιδίων δεν ανταποκρίνεται στην πολυπλοκότητα της γενετικής έκφρασης, δεδομένης της ικανότητας ενός και μόνο γονιδίου να παράγει πολλαπλά συγκολλημένα mRNA προϊόντα που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και που με τη σειρά τους υποβάλλονται σε πολλαπλές τροποποιήσεις μετά τη μεταγραφή, μία εκ των οποίων και η φωσφορυλίωση. Το ανθρώπινο απλοειδές γονιδίωμα αποτελείται 3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (bp). Το μήκος του DNA μετριέται σε μονάδες των 1000 βάσεων. Μόνο ένα μέρος του DNA κωδικοποιεί γονίδια. Στην πραγματικότητα, τα γονίδια αποτελούν μόνο το 10-15% του DNA. Το υπόλοιπο αποτελείται από συχνά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, η λειτουργία των οποίων δεν έχει αποσαφηνιστεί. Μόνο το 10% του DNA εκφράζεται και το κάθε γονίδιο θα αναμένονταν να έχει μέσο μήκος περίπου 10 Kb. Πολλά γονίδια είναι περίπου αυτού του μεγέθους, αλλά το εύρος παραμένει αρκετά μεγάλο. Για παράδειγμα, κάποια γονίδια έχουν μήκος μερικές χιλιάδες (bp), ενώ άλλα όπως το DMD gene είναι υπερβολικά μεγάλα (2Mb).

### **1.3 Οι γενετικοί χάρτες.**

Από το 1902 γίνεται προσπάθεια κατασκευής μοριακών γενετικών χαρτών για τους συνήθεις οργανισμούς που μελετώνται στα εργαστήρια γενετικής. Οι γενετικοί χάρτες παρουσιάζουν την κατανομή των γονιδίων κατά μήκος του χρωμοσώματος και τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους. Σκοπός αυτού του εγχειρήματος είναι να διευρυνθεί η γνώση μας για την οργάνωση των γονιδίων στα χρωμοσώματα. Για παράδειγμα, μέσω των γενετικών χαρτών μπορούμε να μάθουμε αν γονίδια με σχετικές λειτουργίες βρίσκονται ή όχι στο ίδιο χρωμόσωμα και ποια η μεταξύ τους απόσταση. Προς την κατεύθυνση χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν αναπτυχθεί 2 κύριες μέθοδοι. Η πρώτη είναι η αλληλούχιση τμημάτων (θραυσμάτων DNA) του υπό μελέτη οργανισμού τα οποία προκύπτουν με κατάλληλη επεξεργασία ενζύμων που κόβουν το DNA σε ειδικές θέσεις. Η δεύτερη είναι η βαλλιστική αλληλούχιση τυχαίων κλώνων (shotgun cloning) μήκους μερικών εκατοντάδων kb που θεωρείται αποτελεσματικότερη και έχει επικρατήσει της πρώτης (3).

#### **1.4 Η δομή των γονιδίων και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.**

Το γονιδίωμα των ανώτερων θηλαστικών μπορεί να κατηγοριοποιηθεί βάση της έως τώρα γνωστής λειτουργικής του ικανότητας. Οι περιβόητες κωδικοποιούσες περιοχές (coding regions) περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες εκείνες του DNA (γονίδια) που καθορίζουν την αλληλουχία των αμινοξέων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν και τον βαθμό έκφρασης του γονιδίου σε οποιοδήποτε ιστό οποιαδήποτε στιγμή. Οι μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA, περιλαμβάνουν αλληλουχίες για τις οποίες δεν έχει έως τώρα καθοριστεί κάποια λειτουργία. Αυτές οι αλληλουχίες εμφανίζονται σε ένα μόνο αντίτυπο ή βρίσκονται σε πολλαπλά αντίτυπα που ονομάζονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Περίπου το 20-30% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στις οποίες δεν έχουν αποδοθεί λειτουργικά χαρακτηριστικά (4).

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων επηρεάζουν σημαντικά και την λειτουργία τους. Η μεταγραφή του γονιδίου καθορίζεται από γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων προκειμένου να τοποθετήσουν την RNA πολυμεράση στον υποκινητή και να συμβάλλουν στη διάνοιξη του DNA, επιτρέποντας τελικά την εκκίνηση της μεταγραφής. Όπως περιγράφεται παρακάτω, μεταλλάξεις στους μεταγραφικούς παράγοντες προκαλούν μεγάλο αριθμό γενετικών διαταραχών. Η έκφραση των γονιδίων επηρεάζεται όμως και από επιγενετικούς παράγοντες όπως η γενετική αποτύπωση (imprinting), κατά την οποία τυχόν μεθυλίωση του DNA ή τροποποιήσεις ιστονών οδηγούν σε γονιδιακή σιώπηση. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το σύνδρομο Prader Willi (υπογοναδισμός, αναπτυξιακή καθυστέρηση, παχυσαρκία) και η οστεοδυστροφία Albright (αντίσταση σε ορμόνες παραθυρεοειδούς, κοντό ανάστημα, βραχυδακτυλία).

### 1.5 Κληρονομικότητα γενετικών ασθενειών.

Ως μετάλλαξη (μεταλλαγή) μπορεί να οριστεί κάθε αλλαγή στην αρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA ανεξαρτήτως λειτουργικών συνεπειών. Κάποιες μεταλλάξεις μπορεί να είναι θανατηφόρες, άλλες επιβλαβείς και άλλες ευεργετικές. Μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν στα κύτταρα γαμετικής σειράς (germ mutation) και μπορούν να κληρονομηθούν στους απογόνους. Εναλλακτικά, μπορεί να συμβούν στα σωματικά κύτταρα (somatic mutation). Οι μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη δημιουργούν άτομα <<μωσαϊκά>>, μια κατάσταση στην οποία οι ιστοί αποτελούνται από κύτταρα διαφορετικής γενετικής σύστασης (κανονικά και μεταλλαγμένα). Οι σωματικές μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν τα γεννητικά κύτταρα, δεν μεταβιβάζονται στους απογόνους και δεν προσφέρονται για γενετική ανάλυση. Οι μεταλλάξεις ποικίλουν όμως και στη δομή. Μπορεί να περιλαμβάνουν ένα ολόκληρο γονίδιο (γονιδιωματικές), μεγάλες αριθμητικά αλλαγές στα χρωμοσώματα (χρωμοσωματικές) ή τέλος μεμονωμένα γονίδια (γονιδιακές). Μεγάλα ελλείμματα ή ενθέσεις πολλών ζευγών βάσεων μπορεί να επηρεάζουν μέρος ή και ολόκληρο το γονίδιο. Αν στα ελλείμματα αυτά εμπλέκονται περισσότερα γονίδια μπορεί να οδηγήσουν σε σύνδρομα παρακείμενων γονιδίων (contiguous gene syndrome). Μεταλλάξεις που αφορούν αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία DNA αναφέρονται ως **σημειακές** (αντικαταστάσεις-Point mutation). Οι συχνότερες μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε ένα γονίδιο είναι εκείνες που μειώνουν ή απαλείφουν τη λειτουργία του γονιδίου και ονομάζονται μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (**loss of function mutations**). Υπάρχουν όμως και μεταλλάξεις που αυξάνουν ή τροποποιούν τη δράση ενός γονιδίου και ονομάζονται μεταλλάξεις αύξησης λειτουργίας (**gain of function mutations**). Μία άλλη κατηγοριοποίηση είναι ανάμεσα σε μεταλλάξεις που επιτελούνται σε επίπεδο DNA και εκείνες που επιτελούνται σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στην πρώτη περίπτωση, οι αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων αναφέρονται ως **μεταπτώσεις** όταν πουρίνη αντικαθίσταται από άλλη πουρίνη (A-G) ή όταν πυριμιδίνη αντικαθίσταται από άλλη πυριμιδίνη (C-T). Αλλαγές από πουρίνη σε πυριμιδίνη ή αντίστροφα, αναφέρονται ως **μεταστροφές**. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, εάν η αλλαγή λαμβάνει χώρα σε περιοχή DNA που κωδικοποιείται και μεταβάλλει ένα

αμινοξύ, τότε ονομάζεται παρανοηματική (**Missense mutation**). Οι μεταλλάξεις αυτές αλλάζουν το νόημα της κωδικοποιούσας αλυσίδας του γονιδίου και συχνά οδηγούν σε ανιχνεύσιμους φαινότυπους. Αν η αλλαγή οδηγεί σε συνώνυμο κωδικό, σ' ένα δηλαδή κωδικό για το ίδιο αμινοξύ τότε ονομάζεται σιωπηλή μετάλλαξη (**silent mutation**). Τέλος, μετάλλαξη χωρίς νόημα (**nonsense mutations**), ονομάζεται μια μετάλλαξη που αλλάζει τον κωδικό ενός αμινοξέος σε κωδικό λήξης της μετάφρασης.

#### 1.5.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η διαταραχή δεν οφείλεται σε ένα μόνο σφάλμα γενετικής πληροφορίας αλλά σε περίσσεια σφαλμάτων ή ακόμη και έλλειψη γονιδίων που περιέχονται σε ολόκληρα χρωμοσώματα ή τμήματα αυτών. Συγκεκριμένα, οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που αφορούν τη δομή των χρωμοσωμάτων ονομάζονται **χρωμοσωματικές αναδιατάξεις** ενώ αυτές που αφορούν τον αριθμό τους ονομάζονται **γονοτυπικές μεταλλάξεις**, (5).

Οι χρωμοσωματικές μεταλλάξεις κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες:

- Ελλείμματα (deletions): όταν λείπει ένα μέρος του χρωμοσώματος και επομένως έχουν χαθεί ένα ή και περισσότερα γονίδια,
- Διπλασιασμοί (duplications): όταν ένα μέρος του χρωμοσώματος υπάρχει δύο ή περισσότερες φορές,
- Αναστροφές (inversions): όταν ένα μέρος του χρωμοσώματος και επομένως τα γονίδια που βρίσκονται σε αυτό είναι τοποθετημένα ανάστροφα,
- Μετατοπίσεις (translocations): όταν ένα μέρος του χρωμοσώματος έχει αλλάξει θέση.

Τις γονοτυπικές μεταλλάξεις τις διακρίνουμε επίσης σε 4 κατηγορίες:

- Χρωμοσωματική σύντηξη (chromosomal fusion): όταν 2 μη ομόλογα χρωμοσώματα ενωθούν και σχηματίσουν ένα χρωμόσωμα,
- Χρωμοσωματική διάσπαση (chromosomal fusion): όταν ένα χρωμόσωμα διασπάται σε δύο,

- Ανευπλοειδείς μεταλλάξεις: όταν συμβαίνει προσθήκη ή αφαίρεση ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων από ολόκληρες χρωμοσωματικές σειρές,
- Απλοειδείς και πολυπλοειδείς μεταλλάξεις: σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μεταλλάξεις με αριθμό σειράς χρωμοσωμάτων διαφορετικό του 2n.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι ποιο συχνές από τις μονογονιδιακές διαταραχές και εκδηλώνονται σε συχνότητα 7 περίπου ανά 1000 γεννήσεις, ενώ είναι υπεύθυνες για τις μισές περίπου αποβολές κατά το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της ζωής του εμβρύου (6).

#### 1.5.2 Μονογονιδιακές διαταραχές.

Οι μονογονιδιακές (single gene disorders) διαταραχές συνηθίζεται να αναφέρονται και ως μεντελικές γιατί προκαλούνται από μεταλλαγμένα γονίδια που κληρονομούνται με απλό μεντελικό τρόπο. Ο τρόπος αυτός κληρονομικότητας γίνεται εύκολα εμφανής στα γενεαλογικά δέντρα όπου όλα τα μέλη της οικογένειας καταγράφονται στα οικογενειακά ιστορικά με τη χρήση καθορισμένων συμβόλων. Σύμφωνα με την μεντελική κληρονομικότητα ένα επικρατές (A) και ένα υπολειπόμενο (α) αλληλίο μπορεί να ακολουθήσουν 3 τρόπους κληρονόμησης: αυτοσωμικό επικρατές, αυτοσωμικό υπολειπόμενο και φυλοσύνδετο. Περίπου 65% των μονογονιδιακών διαταραχών είναι αυτοσωμικοί επικρατείς, 25% αυτοσωμικοί υπολειπόμενοι και μόλις 5% X linked–φυλοσύνδετοι. Οι μονογονιδιακές διαταραχές είναι σπάνιες με συχνότητα που μπορεί να φτάνει στη μέγιστη τιμή 1/500 (7).

Σήμερα, αναγνωρίζονται ως υπαίτια νοσημάτων τόσο πυρηνικά όσο και μιτοχονδριακά γονίδια. Είθισται στη βιβλιογραφία τα νοσήματα που μεταβιβάζονται από μιτοχονδριακά γονίδια να διακρίνονται ως ένας ειδικός τύπος μονογονιδιακής κληρονόμησης. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι 16.5kb και κωδικοποιεί μεταφορικό και ριβοσωμικό RNA και 23 πρωτεΐνες, μέρος της αναπνευστικής αλυσίδας που συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφοριλίωση και την παραγωγή ATP. Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται από τη μητέρα. Οι κληρονομούμενες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις θεωρείται ότι συμμετέχουν σε πολλαπλές εκφυλιστικές διαταραχές που αφορούν κατά κύριο

λόγο το μυϊκό, περιφερικό και νευρικό σύστημα (πχ. Νόσος Parkinson, Alzheimer).

Άλλοι μηχανισμοί πρόκλησης μονογονιδιακών διαταραχών είναι οι διαταραχές της γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting) και η μονογονική δισωμία (uniparental disomy). Σύμφωνα με τον μεντελικό τρόπο κληρονομικότητας, η γονική προέλευση του μεταλλαγμένου γονιδίου είναι ανεξάρτητη από την φαινοτυπική έκφραση. Εντούτοις, υπάρχουν σημαντικές εξαιρέσεις. Σήμερα γνωρίζουμε ότι σε σημαντικό αριθμό γενετικών διαταραχών, η έκφραση ενός νοσηρού φαινοτύπου εξαρτάται από το εάν αυτός έχει κληρονομηθεί από τη μητέρα ή από τον πατέρα. Η διαταραχή γονιδιακής αποτύπωσης, βασίζεται στην κληρονομικότητα και εκλεκτική έκφραση ενός εκ των γονικών αλληλίων. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το σύνδρομο Prader Willi και Angelman. Οι διαταραχές γενετικής αποτύπωσης κερδίζουν συνεχώς έδαφος στον τομέα της ψυχιατρικής και κυρίως σε διαταραχές όπως ο αυτισμός και η σχιζοφρένεια (8).

Ως μονογονική δισωμία (UPD) ορίζεται η παρουσία μιας δισωμικής κυτταρικής σειράς, στην οποία ένα δεδομένο ζεύγος χρωμοσωμάτων κληρονομείται από ένα μόνο γονέα (9). Πρώτος ο Engel υπέθεσε ότι ένα ωάριο με ένα παραπάνω χρωμόσωμα είναι πιθανό να γονιμοποιηθεί από ένα σπερματοζωάριο που έχει χάσει το χρωμόσωμα αυτό (ή αντίστροφα) έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μονογονική δισωμία (10). Όταν η ανάλυση των μοριακών δεικτών έγινε ευρέως διαθέσιμη, βεβαιώθηκε και επίσημα η υπόθεση αυτή (11, 12). Σύμφωνα με μοριακές αναλύσεις, η μονογονική δισωμία μπορεί να εμφανιστεί είτε ως ετεροδισωμία είτε ως ισοδισωμία. Τη μονογονική δισωμία τη συναντάμε συχνά σε συνδυασμό με μωσαϊσμό για μια μεταλλαγμένη χρωμοσωμική σειρά.

Πολλές ασθένειες σχετίζονται και με επέκταση του αριθμού των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων πέρα από ένα επιτρεπτό όριο. Στις εν λόγω μεταλλάξεις το ελαττωματικό γονίδιο έχει περισσότερες επαναλήψεις ενός συγκεκριμένου τρινουκλεοτιδίου σε σχέση με το κανονικό. Οι επαναλήψεις ορισμένες φορές βρίσκονται μεταξύ περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούνται, όπως στο παράδειγμα της νόσου Huntington. Σε άλλες

περιπτώσεις, οι επαναλήψεις μεταβάλλουν ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου. Το μήκος της επανάληψης των νουκλεοτιδίων συχνά σχετίζεται με τη δριμύτητα της νόσου. Όταν δηλαδή ο αριθμός των επαναλήψεων υπερβεί ένα όριο, τότε αυξάνεται η αστάθεια της περιοχής επανάληψης με αποτέλεσμα να αυξάνεται δραματικά ο αριθμός των επαναλήψεων φθάνοντας τη ζώνη κινδύνου (οριακό μοντέλο). Περισσότερα δεδομένα παρατίθενται σε επόμενα κεφάλαια.

### 1.5.3 Πολυπαραγοντικές νόσοι (complex genetic disorders).

Η έκφραση πολλών ασθενειών όπως καρδιοπάθειες, υπέρταση, διαβήτης και ορισμένοι καρκίνοι καθορίζονται από το συνδυασμό του γενετικού υπόβαθρου και του περιβάλλοντος. Ένα νόσημα ονομάζεται πολυγονιδιακό όταν πολλαπλά γονίδια συνεισφέρουν στον φαινότυπο και πολυπαραγοντικό όταν πολλαπλά γονίδια εμπλέκονται και αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι πολυπαραγοντικές διαταραχές τείνουν να επανεμφανίζονται στις οικογένειες αλλά δεν παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά γενεαλογικά πρότυπα των μονογονιδιακών διαταραχών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυπαραγοντικού νοσήματος είναι ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, όπου γενετικοί, διατροφικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται ποικιλοτρόπως στην παθογένεια της νόσου. Οι τρόποι προσέγγισης των πολυπαραγοντικών νοσημάτων είναι πολλαπλοί: (α) Μέσω μελέτης σπάνιων μονογονιδιακών νοσημάτων είναι πιθανό να αντλήσουμε πληροφορίες για την παθογένεια των πολυπαραγοντικών. Παράδειγμα αποτελεί η ταυτοποίηση του απλοτύπου του πυρηνικού παράγοντα nuclear factor (HNFα) που σχετίζεται με την παθογένεια του Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. (β) Μέσω μελετών ταυτοποίησης γονιδίων προδιάθεσης πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Οι μελέτες όμως αυτές απαιτούν μεγάλο αριθμό δειγμάτων και τυχόν θετικά αποτελέσματα μπορεί να επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την εθνικότητα, τον τρόπο στατιστικής ανάλυσης και άλλους παράγοντες. (γ) Τέλος, μια σύγχρονη προσέγγιση βασίζεται στη θεωρία της επίστασης, σύμφωνα με την οποία ένα γονίδιο μπορεί να τροποποιεί ακόμα και να καθορίζει την έκφραση ενός άλλου. Έτσι, ο φαινότυπος που παράγεται είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης διαφορετικών γονιδίων. Μία σύγχρονη ερμηνεία της θεωρίας



αυτής είναι η παραδοχή ότι η κληρονομικότητα δεν βασίζεται μόνο σε μεμονωμένα συνήθεις ή σπάνιες μεταλλάξεις αλλά σε σπάνιους συνδυασμούς κοινών μεταλλάξεων. Για την επαλήθευση της θεωρίας αυτής απαιτείται εισαγωγή νέων στατιστικών και υπολογιστικών μεθόδων που ανιχνεύουν μοτίβα επίστασης κατά μήκος του γονιδιώματος (13-15).

### **1.6 Η έννοια του γενετικού πολυμορφισμού.**

Πολλές γενετικές περιοχές χαρακτηρίζονται από την παρουσία αλληλόμορφων γονιδίων, με αποτέλεσμα τα άτομα ενός πληθυσμού να εμφανίζουν διαφορετικούς φαινοτύπους. Ο γενετικός πολυμορφισμός είναι η εμφάνιση πολλαπλών αλληλόμορφων σε μια γενετική θέση, στην οποία τουλάχιστον δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη από 1% (6). Πολυμορφικές γενετικές θέσεις είναι εκείνες στις οποίες τουλάχιστον το 2% του πληθυσμού παρουσιάζει ετερόζυγο γονότυπο. Ωστόσο, επειδή πολλές πολυμορφικές θέσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αλληλόμορφων, η αναλογία ετερόζυγων σε πολλές περιπτώσεις είναι πολύ μεγαλύτερη. Τα αλληλόμορφα με συχνότητα μικρότερη του 1% ονομάζονται σπάνια αλληλόμορφα. Στην τελευταία κατηγορία σπάνιων αλληλόμορφων γονιδίων ανήκουν οι περισσότερες από τις επιβλαβείς μεταλλάξεις που οδηγούν σε γενετικές νόσους. Περισσότερο από το 1/3 των γενετικών τόπων του ανθρώπου που έχουν μελετηθεί, είναι πολυμορφικοί. Μέχρι σήμερα, έχει ελεγχθεί ηλεκτροφορητικά ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών σε γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή ενζύμων και πρωτεϊνών του ανθρώπου. Το είδος καθώς και η συχνότητα των πολυμορφισμών παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση σε πληθυσμούς ατόμων διαφορετικών ή ακόμα και ίδιων φυλών. Η μεγάλη εξάπλωση των γενετικών πολυμορφισμών υποδηλώνει ότι κάθε άτομο πιθανόν να είναι ετερόζυγο για διαφορετικές γενετικές θέσεις. Επομένως, σ' ένα άτομο είναι δυνατόν να υπάρχουν γενετικές θέσεις στις οποίες υπάρχουν δύο διαφορετικά αλληλόμορφα, κάθε ένα από τα οποία καθορίζει ένα διαφορετικό δομικό γονιδιακό προϊόν. Από τη μελέτη διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων έχει αναφερθεί ότι κάθε άτομο έχει σοβαρή πιθανότητα να είναι ετερόζυγο στο 6% περίπου των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή ένζυμα. Εάν ληφθούν υπόψη οι περιπτώσεις που

αφορούν σιωπηρές μεταλλάξεις που δεν μπορούν να ανιχνευθούν ηλεκτροφορητικά, τότε υπολογίζεται ότι κάθε άτομο είναι πιθανόν ετερόζυγο σε ποσοστό 12%-18% των γενετικών θέσεων του. Ο αριθμός αυτός ονομάζεται μέση ετεροζυγωτία. Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις, οι πολυμορφισμοί δεν συνδέονται άμεσα με μια συγκεκριμένη ασθένεια. Πολύ σπάνια ένας πολυμορφισμός επηρεάζει την έκφραση και σταθερότητα του γονιδίου του. Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών δεν έχει λειτουργική σημασία, δρουν όμως συνεργικά με άλλους γενετικούς πολυμορφισμούς συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Έχει υπολογισθεί ότι δύο οποιαδήποτε αντίγραφα του ανθρώπινου γονιδιώματος διαφέρουν μεταξύ τους στο 1/100 έως 1/500 όλων των νουκλεοτιδικών θέσεων. Με βάση εκτεταμένες αναλύσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές κλωνοποιημένα τμήματα DNA, το συνολικό ποσοστό των πολυμορφικών θέσεων νουκλεοτιδίων (γνωστό και ως δείκτης ετεροζυγωτίας DNA ) υπολογίστηκε ότι είναι 1 ανά 270 ζεύγη βάσεων, για οποιοδήποτε τμήμα DNA στο γονιδίωμα και είναι περίπου 10πλάσιο από αυτό που υπολογίστηκε για τις περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 1/2.500.

#### 1.6.1 Κατηγορίες πολυμορφισμών.

##### A. Σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs).

Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι σημειακοί (SNPs, single nucleotide polymorphisms) και απαντώνται σε συχνότητα περίπου ένας πολυμορφισμός κάθε 1000 ζεύγη βάσεων. Αν και η συχνότητα των πολυμορφισμών είναι φαινομενικά μικρή (99,9% πανομοιότυπο γενετικό υλικό), υπάρχουν στην πραγματικότητα >3 εκατομμύρια διαφορετικές αλληλουχίες μεταξύ δύο μη συγγενικών ατόμων και η πιθανότητα η αλληλουχία σε αυτή τη γενετική θέση να διαφέρει ανάμεσα σε 2 ομόλογα χρωμοσώματα είναι υψηλή (συντά >70-90%). Έως το 2008, ο αριθμός των SNP περιελάμβανε σχεδόν 11 εκατομμύρια σημειακούς πολυμορφισμούς και 3 εκατομμύρια ενθέσεις και ελλείμματα (16-18). Το διεθνές Har Map Project χαρτογράφησε την συχνότητα των αλληλίων και τα

μοντέλα συσχέτισης μεταξύ των κοντινών γενετικών τόπων, φαινόμενο γνωστό και ως μελέτη συσχέτισης, για συνολικά 3,5 εκατομμύρια SNP σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς (17, 18). Μια υποκατηγορία των SNPs είναι οι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs, restriction fragment length polymorphisms) που προκαλούνται από την αντικατάσταση μιας βάσης είτε από έλλειμμα είτε από ένθεση DNA, δημιουργώντας θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα.

1.6.2. Οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμοί (VNTR). Όπως αναφέρθηκε, ορισμένοι πολυμορφισμοί RFLP βασίζονται στην προσθήκη ή αφαίρεση τμημάτων DNA. Μια ειδική κατηγορία τέτοιου τύπου που περιγράφηκε από τους Wyman και White το 1980, είναι οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμοί (VNTRs, variable number of tandem repeats) που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και μπορεί να είναι μινιδορυφορικοί δείκτες (minisatellites), όταν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι 10-60 ζεύγη βάσεων, ή μικροδορυφορικοί (microsatellites), όταν αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δύο ως τεσσάρων νουκλεοτιδίων (19). Ωστόσο, στη νεότερη βιβλιογραφία, ως VNTR είθισται να αναφέρονται οι μινιδορυφορικοί δείκτες ενώ ως short tandem repeats (STRs) οι μικροδορυφορικοί δείκτες.

Όταν ο αριθμός των επαναλήψεων των VNTR ποικίλλει στα διάφορα άτομα τότε ο γενετικός δείκτης θεωρείται πολυμορφικός (20). Η μεγάλη εγγύτητα των πολλαπλών και σχεδόν πανομοιότυπων DNA αλληλουχιών προκαλεί συχνούς ανασυνδυασμούς και φαινόμενα ολίσθησης, δημιουργώντας νέα αλλήλια διαφορετικά στον αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων. Ο άνισος ανασυνδυασμός έχει προταθεί ως εναλλακτικός μηχανισμός αλλά η σημαντικότητά του εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη. Η αστάθειά τους κάνει τους VNTR ιδανικούς για δακτυλικά αποτυπώματα, γονοτυπικό έλεγχο και ιατροδικαστικές αναλύσεις. Λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας και της απλότητας των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, στο παρελθόν θεωρούνταν ως μη λειτουργικές περιοχές DNA (junk DNA) (21). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αλληλούχισης διαφόρων γονιδίων αποκάλυψαν ότι οι

επαναλήψεις αυτές δεν εμφανίζονται μόνο σε ανενεργείς περιοχές αλλά και σε περιοχές εκκινητών ή περιοχές που κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες (22-24). Συγκεκριμένα, οι VNTR είναι συνήθεις στο γονιδίωμα των θηλαστικών και 8% αυτών βρίσκονται σε κωδικοποιησιμες αλληλουχίες (25). Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερα δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση συμμετοχής των VNTR στη διαμόρφωση προδιάθεσης ευρέως φάσματος παθολογικών καταστάσεων. Οι VNTR μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεια ασθενειών όπως η νόσος Huntington, ενώ σε άλλες περιπτώσεις να διαδραματίζουν ρόλο ευεργετικό. Επαναλήψεις που ανιχνεύονται σε συγκεκριμένα γονίδια-κλειδιά προσδίδουν σε αυτά μεταβλητότητα, επιτρέποντάς τους ταχεία προσαρμογή σε νέα εξελικτικά μονοπάτια, διατηρώντας τη χαμηλή αναλογία μετάλλαξης στο υπόλοιπο γονιδίωμα (26). Πρόσφατες αναλύσεις αποδεικνύουν ότι >30% των γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει επαναλήψεις σε εξώνια. Ως εκ τούτου, αν και το σύγχρονο ενδιαφέρον είναι στραμμένο στους SNP πολυμορφισμούς, οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμοί (VNTRs, variable number of tandem repeats) μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην κατανόηση της γενετικής και φαινοτυπικής διαφοροποίησης των οργανισμών (26-28). Οι περισσότερες διαδοχικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι ασταθείς συγκρινόμενες με το υπόλοιπο DNA, η συχνότητα όμως των μεταλλάξεων ποικίλει μεταξύ τους. Η αναλογία μετάλλαξης είναι περίπου 10-10.000 μονάδες υψηλότερα σε σχέση με τις μη επαναλαμβανόμενες περιοχές και κυμαίνονται από  $10^{-3}$  και  $10^{-6}$  για κάθε κυτταρική γενιά (24). Ωστόσο, κάποιοι VNTRs πολυμορφισμοί παρουσιάζουν σταθερότητα ενώ άλλοι, κυρίως microsatellites, εμφανίζουν αναλογία μετάλλαξης  $>10^{-2}$  (29). Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες φαίνεται να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες και η συχνότητα μετάλλαξης μιας επανάληψης να εξαρτάται από τις ενδογενείς της ιδιότητες και την θέση της στο γονιδίωμα. Έτσι, μπορούμε να μελετήσουμε την μεταβλητότητα μιας επαναληπτικής αλληλουχίας από τα βασικά χαρακτηριστικά της (30). Τα RFLP και ιδιαίτερα της κατηγορίας VNTR έχουν αυξήσει σημαντικά τον αριθμό των πολυμορφικών γενετικών δεικτών που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών ατόμων και για την παρακολούθηση της κληρονομικότητας διάφορων περιοχών του γονιδιώματος στα μέλη μιας οικογένειας.

## **1.7 Μέθοδοι γενετικής ανάλυσης πολυπαραγοντικών νοσημάτων.**

Δύο μέθοδοι έχουν περιγραφεί για τη χαρτογράφηση γονιδίων που προκαλούν ή αυξάνουν τον κίνδυνο μιας ασθένειας. Η κλασσική μελέτη ανάλυσης γενετικής σύνδεσης και οι μελέτες συσχέτισης που κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος στον τομέα της γενετικής λόγω της ανάπτυξης των τεχνολογιών αλλά της συμπλήρωσης σχεδόν του Human Genome project.

### 1.7.1 Η ανάλυση γενετικής σύνδεσης (linkage genetic).

Η ανάλυση γενετικής σύνδεσης βασίζεται στην χαρτογράφηση ενός γονιδίου βρίσκοντας την απόστασή του από έναν άλλο γενετικό τόπο στο ίδιο χρωμόσωμα. Τέτοιοι γενετικοί τόποι λέγεται ότι είναι συνδεδεμένοι. Δύο βασικές αρχές διέπουν τη μέθοδο αυτή. Πρώτον, οι γενετικοί τόποι ή τα γονίδια που βρίσκονται πολύ κοντά, έχουν μικρή πιθανότητα να διαχωριστούν κατά τη διαδικασία χιασματυπίας – ανασυνδυασμού και δεύτερον η πιθανότητα ανασυνδυασμού τους είναι συνάρτηση της απόστασης του πολυμορφικού δείκτη και του γενετικού τόπου της ασθένειας (31). Επιπλέον, τα γονίδια με μεγάλη απόσταση μεταξύ τους είναι πιθανότερο να υποστούν ανασυνδυασμό σε σχέση με αυτά που βρίσκονται κοντά. Ο γενετικός δείκτης μελετάται στα μέλη μιας οικογένειας και αντιπαρατίθεται στην παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Τα στοιχεία που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του LOD (logarithm of odds) score. Το LOD score είναι η αναλογία (ratio) της πιθανότητας ο γενετικός τόπος της ασθένειας και ο πολυμορφικός δείκτης (marker loci) να είναι συνδεδεμένοι από το να μην είναι. LOD score +3 (1000/1) είναι γενικά αποδεκτό ως θετική γενετική σύνδεση, ενώ score -2 συμβαδίζει με απουσία σύνδεσης. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ικανότητα εντόπισης γενετικού τόπου υπεύθυνου για μία ασθένεια χωρίς να είναι απαραίτητη προηγούμενη έρευνα για γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ανάγκη μελέτης μεγάλου αριθμού μελών μιας οικογένειας και η αδυναμία καθορισμού του υπεύθυνου γονιδίου από αυτά που βρίσκονται στον γενετικό τόπο.

1.7.2. Οι μελέτες συσχέτισης αλληλόμορφων, έλεγχος ανισορροπίας σύνδεσης και απλότυποι.

Οι μελέτες συσχέτισης αλληλόμορφων αφορούν στην συχνότητα εμφάνισης ενός αλληλόμορφου, εάν δηλαδή είναι αυξημένη ή μειωμένη στα άτομα που πάσχουν από μία συγκεκριμένη ασθένεια σε σχέση με τα άτομα ελέγχου (control). Οι μελέτες συσχέτισης και οι μελέτες γενετικής σύνδεσης διαφέρουν σε αρκετές παραμέτρους. Επί παραδείγματι, οι μελέτες γενετικής σύνδεσης αφορούν τα μέλη μιας οικογένειας ενώ οι μελέτες συσχέτισης συγκρίνουν πληθυσμούς πασχόντων με υγιείς (32). Οι μελέτες συσχέτισης αλληλόμορφων είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην ανίχνευση γονιδίων υποψήφιων (susceptibility genes) για τη συμβολή τους στην πρόκληση πολυπαραγοντικών ασθενειών (33, 34). Όταν αλληλόμορφα σε δύο διαφορετικές θέσεις εμφανίζονται συχνότερα σε συνδυασμό από ότι αναμενόταν (γνωρίζοντας την συνήθη συχνότητα εμφάνισης και ανασυνδυασμού) τότε λέμε ότι βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium). Η πρώτη μελέτη το 1972 εξήγησε σε μεγάλο βαθμό, πώς η συσχέτιση ενός γενετικού δείκτη με την ασθένεια μπορεί να οφείλεται σε παραλλαγή γειτονικού, στενά συνδεδεμένου γονιδίου που οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου μέσω ανισορροπίας σύνδεσης. Η προσέγγιση αυτή κερδίζει συνεχώς έδαφος στην έρευνα, με σύμμαχο την μεγάλη ποικιλία των διαθέσιμων SNPs και την διαθεσιμότητα νέας τεχνολογίας. Οι μελέτες συσχέτισης μπορούν να εφαρμοστούν είτε ως case-control που περιλαμβάνουν ασθενείς που δεν έχουν συγγενική σχέση και υγιείς μάρτυρες, είτε ως οικογενειακού χαρακτήρα (family-based studies) που συγκρίνουν τη συχνότητα εμφάνισης των μεταδιδόμενων ή μη αλληλόμορφων στους πάσχοντες απογόνους. Η πρώτη περίπτωση (case-control), έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης αμφισβήτησης, λόγω της μη ρεαλιστικής υπόθεσης για την ομοιογένεια των πληθυσμών που στην πραγματικότητα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και καταλήγουν σε πολλές περιπτώσεις σε ψευδείς συσχετίσεις (35). Έτσι προέκυψε η ανάγκη εύρεσης νέων εναλλακτικών μεθόδων όπως αυτή της δεύτερης περίπτωσης (family-based studies) προκειμένου να αποφύγουμε τις συνέπειες που προκύπτουν από την ετερογένεια του πληθυσμού μελέτης (36-38). Από την άλλη μεριά, παρά την

πληθυσμιακή ετερογένεια, οι μελέτες case-control παραμένουν ελκυστικές, γιατί δεν απαιτούν στρατολόγηση ως ομάδα ελέγχου επιπλέον μελών με συγγένεια, διαδικασία που εκτός από χρονοβόρα είναι και εξαιρετικά δαπανηρή. Τα τελευταία 6 χρόνια οι μελέτες συσχέτισης έχουν ανιχνεύσει περισσότερες από 1000 γενετικές περιοχές που σχετίζονται με πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών.

## 2. ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΘΗΚΩΝ (ΣΠΩ)

### **2.1 Ορισμός και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.**

Το 1935 οι Stein και Leventhal δημοσίευσαν τα ευρήματά τους για 7 γυναίκες με αμηνόρροια, δασυτριχισμό, παχυσαρκία και χαρακτηριστική εικόνα πολλαπλών κύστεων στις ωοθήκες, μία από τις πρώτες περιγραφές ενός πολύπλοκου φαινομένου-φαινοτύπου (Stain-Leventhal syndrome) γνωστό σήμερα ως σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ). Το σύνδρομο αυτό είναι μια ιδιοπαθής διαταραχή και αποτελεί την συχνότερη αιτία υπερανδρογοναιμίας και ενδοκρινοπάθειας σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (39). Πολλοί είναι οι παράγοντες που συμβάλλουν στην δυσχέρεια της διάγνωσης του ΣΠΩ. Η μεγάλη ετερογένεια στα συμπτώματα και σημεία και η απουσία ακριβούς καθορισμού του, είναι μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα. Πέρασαν περίπου 20 χρόνια μέχρι την πραγματοποίηση της πρώτης διεθνούς διάσκεψης για το ΣΠΩ. Κατά τη διάρκεια των συναντήσεων στο Διεθνές Ινστιτούτο Υγείας στην Bethesda του Maryland (NIH) το 1990 καθορίστηκαν τα κάτωθι διαγνωστικά κριτήρια (η παρουσία και των 2 είναι απαραίτητη):

- Κλινικές ή εργαστηριακές ενδείξεις υπερανδρογοναιμίας,
- χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και αποκλεισμός άλλων διαταραχών.

Ο καθορισμός αυτών των κριτηρίων αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα στην τυποποίηση της διάγνωσης (40). Από τότε ακολούθησε μια σειρά διεθνών συνεδρίων με κοινό παρανομαστή την ανησυχία των επιστημόνων ότι η κλινική έκφραση του συνδρόμου έχει ευρύτερα όρια από αυτά που καθορίστηκαν από τα κριτήρια του 1990 (NIH). Έτσι, το 2003 η διεθνής επιστημονική κοινότητα, the Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group (41), συναίνεσε στην πρόταση διάγνωσης του συνδρόμου, αποκλεισμού άλλων συναφών στη διαφοροδιάγνωση παθήσεων που προκαλούν ακανόνιστους κύκλους εμμήνου ρύσεως και υπερανδρογοναιμία και στον καθορισμό νέων διευρυμένων κριτηρίων, η



παρουσία των οποίων (2 τουλάχιστον εξ' αυτών) κρίνεται απαραίτητη για τη διάγνωση του συνδρόμου:

- Ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια.
- Αυξημένα επίπεδα των ανδρογόνων του πλάσματος (υπερανδρογοναιμία) ή κλινική εικόνα που μαρτυρά υπερανδρογοναιμία.
- μορφολογία πολλαπλών κύστεων στις ωοθήκες όπως αυτή προσδιορίζεται υπερηχογραφικά.

Με αυτά τα κριτήρια είναι δυνατή η αναγνώριση των εξής συνθηκών:

1. Η παρουσία πολλαπλών κύστεων στις ωοθήκες δεν είναι απαραίτητη για τη διάγνωση του συνδρόμου
2. και αντίστροφα, η παρουσία πολλαπλών κύστεων και μόνο δεν είναι αρκετή για την διάγνωση του συνδρόμου.

Το 2006, η Androgen Excess-PCOS Society συνέστησε να ορίζεται το ΣΠΩ (μετά από τον αποκλεισμό άλλων συναφών διαταραχών) από την κλινική και/ή εργαστηριακή εικόνα υπερανδρογοναιμίας, σε συνδυασμό με ολιγομηνόρροια και/ή υπερηχογραφική εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών. Τόσο τα κριτήρια του NIH (1990) όσο και αυτά του 2006 δίνουν ιδιαίτερη βαρύτητα στην παρουσία υπερανδρογοναιμίας που είναι αλληλένδετη με την υπερινσουλιαιμία, παραδοχή που βοηθά στην περαιτέρω κατανόηση της μεταβολικής βάσης του συνδρόμου. Τα κριτήρια του Rotterdam όμως παραμένουν ιδιαίτερα χρήσιμα στην διάγνωση του συνδρόμου σε γυναίκες εθνικοτήτων όπως η Ασιατική όπου η κλινική εικόνα υπερανδρογοναιμίας δεν είναι συνήθης.

Η συχνότητα του ΣΠΩ υπολογίζεται σε 6–8% των γυναικών ανά τον κόσμο (42) και δεν διαφέρει μεταξύ γυναικών καυκάσιας και έγχρωμης φυλής. Στην Ελλάδα εκτιμάται στο 6,8% με παρόμοια συχνότητα και στην Ισπανία (43-45). Υπάρχουν σημαντικές εθνικές και φυλετικές διαφορές όσο αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου, γεγονός που αντανακλά τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο στον φαινότυπο. Έτσι, οι Γιαπωνέζες με ΣΠΩ είναι λιγότερο παχύσαρκες και με μικρότερο βαθμό υπερτρίχωσης σε σχέση με ασθενείς των

ΗΠΑ και της Ιταλίας, αν και τα επίπεδα ανδρογόνων και ο βαθμός αντίστασης στην ινσουλίνη δεν διαφέρουν μεταξύ των πληθυσμών αυτών (46). Επίσης, η υπερανδρογοναιμία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναίμια φαίνεται να εκδηλώνονται δριμύτερα σε γυναίκες της Νότιας Ασίας σε σύγκριση με λευκές γυναίκες της Ευρώπης. Οι Dunaif et al., συνέκριναν ασθενείς καραϊβικής-ισπανικής καταγωγής με καυκάσιες μη ισπανικής καταγωγής και διαπίστωσαν ότι η πρώτη ομάδα παρουσίαζε μεγαλύτερου βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη (47). Τέλος, γυναίκες με ΣΠΩ στις ΗΠΑ εμφάνισαν υψηλότερο BMI από τις Ευρωπαϊκές, γεγονός που εξηγεί το αυξημένο ποσοστό εμφάνισης του συνδρόμου σε συνδυασμό με παχυσαρκία στις Η.Π.Α (48).

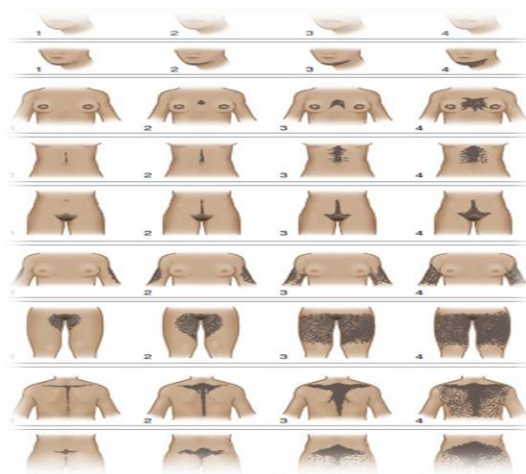
## **2.2 Κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.**

### A. Χρόνια ανωθυλακιορηξία.

Στο ΣΠΩ η ωθητική υπερανδρογοναιμία και υπερινσουλιναίμια προκαλούν χρόνια ανωθυλακιορηξία προκαλώντας διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της θυλακικής και της ωχρινικής φάσης που είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του επικρατούντος ωθυλακίου και του επικρατούντος ωχρού σωματίου. Οι ανωθυλακιορηκτικοί κύκλοι προκαλούν περίπου στο 75% των ασθενών δυσλειτουργική αιμόρροια από τη μήτρα και αποτελούν την κυριότερη αιτία υπογονιμότητας (49). Ακολουθώντας ελεγχόμενη διέγερση ωθηκών για in vitro γονιμοποίηση, παρατηρήθηκε, σε ορισμένες γυναίκες με ΣΠΩ, προβλεπόμενη εμβρυική ανάπτυξη και έκβαση κύησης (50, 51), ενώ σε άλλες διαταραγμένη ανάπτυξη ωαρίων, χωρίς σοβαρές χρωμοσωμικές διαταραχές (52, 53). Γυναίκες με ΣΠΩ, παχυσαρκία, υψηλά επίπεδα υπερανδρογοναιμίας και υπερινσουλιναίμιας είναι επιρρεπείς σε διαταραχές της ωοκυτταρικής ανάπτυξης και παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό αποβολών (54-56). Παράλληλα, γυναίκες της Νοτίου Ασίας με ΣΠΩ που υποβλήθηκαν σε in vitro γονιμοποίηση είχαν μειωμένη πιθανότητα επιτυχίας της κύησης σε σχέση με Ευρωπαϊκές της λευκής φυλής, παραδοχή που ενισχύει την υπόθεση ότι συνδυασμός γενετικών, περιβαλλοντικών και ορμονικών παραγόντων επηρεάζει την ποιότητα του ωοκυττάρου (57).

## B. Υπερανδρογοναιμία.

Η υπερανδρογοναιμία θεωρείται ως *sine qua non* για το ΣΠΩ. Το 80-85% των γυναικών με κλινική υπερανδρογοναιμία πάσχουν από ΣΠΩ (42). Οι δερματικές εκδηλώσεις που προκαλεί, περιλαμβάνουν ανδρικού τύπου αλωπεκία και ακμή. Μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως που πάσχουν από ΣΠΩ (διαγνωσμένο από τα κριτήρια NIH) περίπου το 60% βρέθηκε με υπερτρίχωση (58, 59) η οποία εκτιμάται με το οπτικό σύστημα βαθμολόγησης της υπερτρίχωσης (visual scoring system of hirsutism) (60). Η ακμή επηρεάζει το 15-25% των γυναικών με ΣΠΩ αν και παραμένει αδιευκρίνιστο κατά πόσο η επίπτωση της ακμής είναι αυξημένη σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (61-63). Τέλος, η ανδρικού τύπου αλωπεκία θεωρείται αναγνωρισμένο σύμπτωμα του συνδρόμου με την επίπτωση και αυτής της διαταραχής να παραμένει ασαφής. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε μελέτη 257 ασθενών υπό θεραπεία για συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας μόνο 5% ανέφεραν αλωπεκία (64).



Εικόνα 1. Οπτικό σύστημα βαθμολόγησης της υπερτρίχωσης.

### Γ. Υπερινσουλιναιμία

Η μελανίζουσα ακάνθωση στον αυχένα και τη μασχαλιαία χώρα αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη υπερινσουλιναιμίας. Ως μελανίζουσα ακάνθωση ορίζεται η υπερμελαγχρωματική, βελούδινη πάχυνση του δέρματος με υπερβολικά βαθιές αύλακες σε καμπτικές επιφάνειες παχύσαρκων ατόμων.



Εικόνα 2. Μελανίζουσα ακάνθωση.

### Δ. Παχυσαρκία.

Η ακριβής αιτία εμφάνισης παχυσαρκίας στο ΣΠΩ παραμένει άγνωστη και είναι εμφανής στο 30% των ασθενών. Η παχυσαρκία δεν θεωρείται “ηθικός αυτουργός” στην ανάπτυξη του συνδρόμου, μπορεί όμως να επιδεινώσει τις σχετικές με το σύνδρομο αναπαραγωγικές και μεταβολικές διαταραχές. Συγκεκριμένα, το λιπιδαιμικό προφίλ και ειδικά η σπλαχνικού τύπου παχυσαρκία εκφράζεται στο φαινότυπο από τον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (BMI) και σχετίζεται με την υπερανδρογοναιμία, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την ανοχή στη γλυκόζη και την δυσλιπιδαιμία. Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερανδρογοναιμία στο ΣΠΩ θα μπορούσαν να εκπροσωπούν εν μέρει την δυσλειτουργική αδιπογένεση λόγω διαταραγμένης ικανότητας του περιφερικού λιπώδους ιστού να ανταποκριθεί επαρκώς στην αυξημένη διαιτητική θερμιδική πρόσληψη. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι η προσπάθεια αντιμετώπισης της αντίστασης της ινσουλίνης με απώλεια βάρους, μπορεί να εξομαλύνει τις τιμές των ανδρογόνων και της οιστρονης στο πλάσμα καθώς και άλλων μεταβολικών διαταραχών σε γυναίκες με ΣΠΩ (65, 66). Ωστόσο, ο βαθμός σπλαχνικής παχυσαρκίας δεν μπορεί να εξηγήσει από μόνος του την αντίσταση στην ινσουλίνη στις γυναίκες με ΣΠΩ (67). Έτσι,

ο βαθμός συμμετοχής της παχυσαρκίας στο ΣΠΩ παραμένει ζήτημα αμφιλεγόμενο.

### **2.3 Εργαστηριακά ευρήματα.**

#### 2.3.1 Βιοχημικοί Δείκτες.

Το ΣΠΩ χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια στα εργαστηριακά ευρήματα. Οι κύριες ορμονικές διαταραχές είναι η υπερανδρογοναιμία και η διαταραχή έκκρισης των γοναδοτροπινών. Οι γυναίκες με ΣΠΩ σχεδόν πάντα παρουσιάζουν παρεκκλίσεις στις εργαστηριακές τιμές των γοναδοτροπινών σε σχέση με γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο εμμήνου ρύσεως. Συγκεκριμένα, η απόλυτος τιμή της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και η σχέση της με τα επίπεδα FSH είναι σημαντικά αυξημένη στις γυναίκες με ΣΠΩ (68, 69). Υψηλές συγκεντρώσεις LH μπορεί να παρατηρηθούν περίπου στο 60% των ασθενών (70), ενώ η αναλογία  $LH/FSH > 2$  συχνό εργαστηριακό εύρημα (έως και 95%) αποτελεί σημαντικό βοηθητικό εργαλείο στη διάγνωση του συνδρόμου (69). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές των συγκεντρώσεων των γοναδοτροπινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου και εκκρίνονται με παλμικές ώσεις στην κυκλοφορία, μια απλή μέτρηση της ωχρινοτρόπου (LH) και της θυλακιότροπου (FSH) ορμόνης θα ήταν μικρής διαγνωστικής ευαισθησίας. Έτσι, η μέτρηση των επιπέδων LH θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δευτερεύουσα παράμετρος σε περιπτώσεις αδύνατων γυναικών με ΣΠΩ καθώς και στον ερευνητικό τομέα.

Η υπερανδρογοναιμία αποτελεί την πλέον συχνή διαταραχή του συνδρόμου αν και τα επίπεδα των ανδρογόνων όπως συμβαίνει και με την LH μπορεί να είναι εντός φυσιολογικών ορίων (71). Η βιοδιαθεσιμότητα και η κάθαρση της τεστοστερόνης επηρεάζεται από την φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (SHBG) τα επίπεδα της οποίας στο ΣΠΩ είναι χαμηλά με αποτέλεσμα το επίπεδο των βιολογικά ενεργών ανδρογόνων να είναι υψηλό. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι οι εργαστηριακές τιμές της ελεύθερης τεστοστερόνης στις γυναίκες είναι συχνά ανακριβείς. Αυτή η παράμετρος μπορεί να ξεπεραστεί από ταυτόχρονες μετρήσεις της ολικής τεστοστερόνης, της SHBG και της βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης. Η βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη περιλαμβάνει την ελεύθερη τεστοστερόνη και αυτή που είναι συνδεδεμένη με χαλαρούς

δεσμούς με την αλβουμίνη και θεωρείται το ενεργό ποσό τεστοστερόνης. Έτσι, μία ασθενής μπορεί να έχει φυσιολογικές τιμές τεστοστερόνης, χαμηλές SHBG και υψηλές τιμές βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης με συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας, όπως ακμή και υπερτρίχωση. Αντίθετα, άλλες ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν υψηλές τιμές ολικής τεστοστερόνης και υψηλές SHBG αλλά φυσιολογικές τιμές βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντική η συνδυαστική μέτρηση της ολικής, βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης και της SHBG. Οι παραπάνω μετρήσεις δεν βοηθούν μόνο στην διάγνωση του ΣΠΩ αλλά και στον αποκλεισμό άλλων συναφών παθήσεων με παρόμοιο φαινότυπο. Επί παραδείγματι, η τεστοστερόνη είναι συνήθως υψηλή στο ΣΠΩ και ειδικά η βιοδιαθέσιμη, ενώ στο σύνδρομο Cushing ή στην υποφυσιακή ανεπάρκεια είναι χαμηλή. Έτσι, συχνά στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι επίπεδα τεστοστερόνης άνω των 31ng/dl είναι ενδεικτικότερα για ΣΠΩ ενώ κάτω των 31ng/dl για σύνδρομο Cushing.

### 2.3.2 Παθολογοανατομικά ευρήματα.

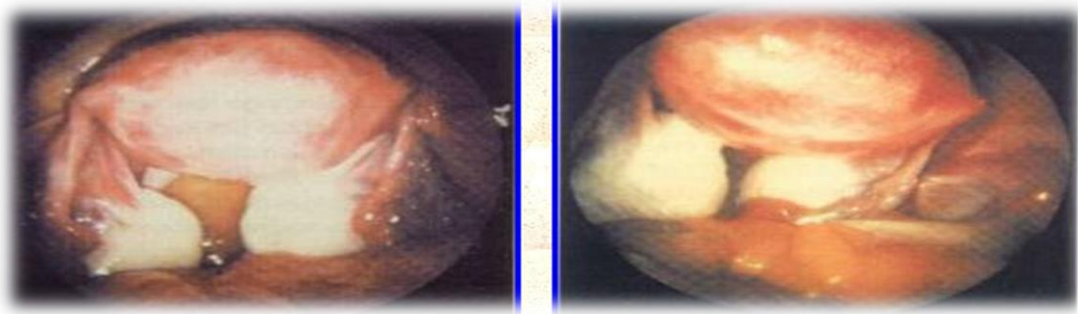
Μακροσκοπικά και οι δύο ωοθήκες ή σπανιότερα η μία, είναι συνήθως στρογγυλεμένες και 2 έως 5 φορές μεγαλύτερες του φυσιολογικού μεγέθους ενώ ο όγκος τους μπορεί να φτάσει και 3 φορές αυτόν των υγιών μαρτύρων. Περιστασιακά, οι ωοθήκες μπορεί να είναι φυσιολογικού μεγέθους. Πολλαπλές μικρές φλοιώδεις κύστες είναι συνήθως εμφανείς κάτω από την επιφάνεια των στυλινών και σκληρωτικών ωοθηκών, ενώ η εξέταση των τμημάτων της ωοθηκικής επιφάνειας αποκαλύπτει έναν λεπτό, λευκό, με μορφολογία κάψουλας φλοιό και πολλαπλές υποκείμενες θυλακικές κύστες σε διάφορα στάδια ατρησίας ιδίου μεγέθους, συνήθως μικρότερες του 1εκ. σε διάμετρο. Συχνά είναι εμφανής μια κεντρική ζώνη ομοιογενούς στρώματος χωρίς στοιχεία ωορρηξίας (*corpora lutea* or *corpora albicantia*). Λήψη ιστού από ωοθήκες είναι εξαιρετικά σπάνια δεδομένου της ανίχνευσης των ωοθηκικών ευρημάτων με τη μέθοδο του υπερηχογραφήματος. Έτσι, το σύνδρομο ορίζεται υπερηχογραφικά σύμφωνα με την αναθεώρηση των κριτηρίων διάγνωσης του 2003 (41) από την παρουσία και περιφερική συστοιχία πολλαπλών (τουλάχιστον 8) μικρών ωοθηκικών κύστεων (2-8 mm) σε κάθε ωοθήκη και αυξημένο ωοθηκικό στρώμα σχετικό με τον αριθμό των κύστεων (72). Σύμφωνα την παραδοχή αυτή, η κυκλική διάταξη των

ωοθυλακίων που παλαιότερα θεωρούνταν απαραίτητη δεν λαμβάνεται πλέον υπόψη. Τα παραπάνω κριτήρια αρκεί να παρουσιάζονται στην μία ωοθήκη. Αν υπάρχει ένδειξη ωοθυλακίου μεγαλύτερο από 10mm ή ωχρού σωματίου, η εξέταση θα πρέπει να επαναληφθεί στον επόμενο κύκλο. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος συνίσταται για τις γυναίκες με τακτικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους στην αρχή της ωοθηκικής φάσης (3-5<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου) ενώ για τις γυναίκες με oligo/αμηνόρροια σε τυχαίο χρόνο είτε μεταξύ 3<sup>ης</sup>-5<sup>ης</sup> ημέρας μετά το πέρας της αιμορραγίας που προκαλείται από την χορηγούμενη προγεστερόνη (41). Θα πρέπει να υπενθυμιστεί ότι η μακροσκοπική/υπερηχογραφική χαρακτηριστική ωοθηκική μορφολογία δεν είναι απαραίτητη για τη διάγνωση του συνδρόμου καθώς τα ευρήματα αυτά παρατηρούνται στο 20% των υγιών γυναικών (73).

Στα μικροσκοπικά ευρήματα, ο επιφανειακός φλοιός είναι ινώδης, υποκυτταρικός, ομοιάζει με κάψουλα και μπορεί να περιέχει εξέχοντα λεπτού τοιχώματος αγγεία. Προεξοχές ινώδους στρώματος εκτείνονται από την επιφανειακή στην βαθύτερη στιβάδα του φλοιού και στο μυελό. Οι κύστεις επενδύονται κυρίως από υπερπλαστικά, διευρυμένα, γεμάτα λιποσταγονίδια κύτταρα θήκης, περιγραφή που οδήγησε στον όρο κυστική υπερθήκωση. Η παρουσία κοκκιωδών κυττάρων είναι λιγότερο εμφανής και χωρίς στοιχεία ωχρινοποίησης. Σημεία ωορρηξίας συχνά απουσιάζουν, ωστόσο ωχρά σωματίδια έχουν περιγραφεί σε περίπου 30% των μη τυπικών περιπτώσεων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το βαθύτερο στρώμα του φλοιού και του μυελού μπορεί να είναι έως και 5 φορές μεγαλύτερο σε όγκο και στο 80% των περιπτώσεων περιέχει ωχρινοποιημένα κύτταρα στρώματος και σπανιότερα εστίες λείου μυϊκού ιστού. Τέλος, φωλιές κυττάρων Leydig μπορεί να εμφανίζονται συχνότερα και σε μεγαλύτερο αριθμό σε γυναίκες με ΣΠΩ σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες.



Εικόνα 3. Τυπικές υπερηχογραφικές εικόνες των ωθηκών στο ΣΠΩ. Διακρίνονται τα μικρά θυλάκια με την περιφερική διάταξη, καθώς και η αύξηση του στρώματος.



Εικόνα 4. Τυπικές εικόνες ΣΠΩ με λαπαροσκόπηση.

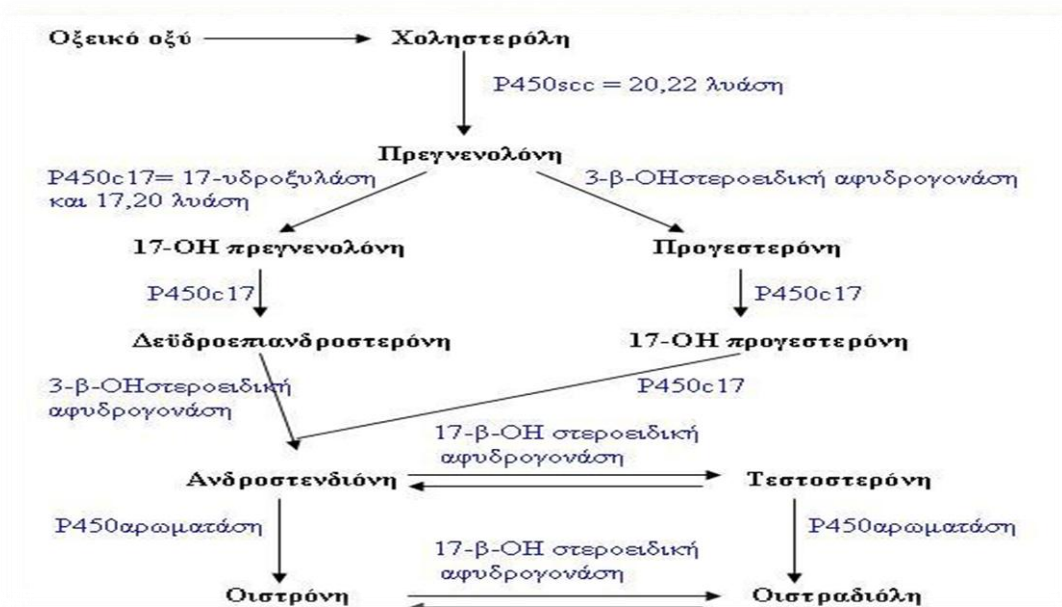
#### **2.4 Παθοφυσιολογία του ΣΠΩ.**

Η παθογένεια του ΣΠΩ δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αν και έχει γίνει πλέον αποδεκτή η υπόθεση ότι όλο το φάσμα των διαταραχών του ΣΠΩ δεν οφείλεται σε έναν και μόνο αιτιολογικό παράγοντα.

Στο ΣΠΩ σε περίπου 80% των γυναικών, σε απάντηση στην υπερδιέγερση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), προκαλείται υπερπλασία του στρώματος και των κυτάρων θήκης των ωθηκών που συνθέτουν με αυξημένο ρυθμό ανδρογόνα μέσω της οδού βιοσύνθεσης στεροειδών (74). Αρχικά, η LH ρυθμίζει τα πρώτα βήματα της οδού με τη μεταφορά της χοληστερόλης στα



μιτοχόνδρια από την οξεία ρυθμιστική της στεροειδογένεσης πρωτεΐνη (StAR) και τη μετατροπή της σε πρεγνενολόνη με τη βοήθεια του ενζύμου αποκοπής της πλάγιας αλυσού της χοληστερόλης (cholesterol side chain cleavage enzyme, P450). Στη συνέχεια η πρεγνενολόνη μέσω της οδού των  $\Delta^5$ -στεροειδών μετατρέπεται σε 17-κετοστεροειδική δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Σημαντικό ρόλο σε αυτό το βήμα διαδραματίζει το κυτόχρωμα P450c17, που έχει δράσεις 17 $\alpha$ -υδροξυλάσης και 17,20 λυάσης απαραίτητες για τη σύνθεση ανδροστενεδιόνης. Παράλληλα, η πρεγνενολόνη μέσω της οδού των  $\Delta^4$ -στεροειδών, μετατρέπεται σε ανδροστενεδιόνη και εν συνεχεία με τη διαδικασία της αρωματοποίησης από την 17 $\beta$ -υδροστεροειδική αφυδρογονάση (αρωματάση του κυτοχρώματος P-450) μετατρέπεται, κυρίως στο λιπώδη ιστό, σε οιστρόνη και σε μικρότερο βαθμό σε τεστοστερόνη.



Εικόνα 5. Η κύρια οδός βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών στην ωθήκη.

Ενώ η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της σύνθεσης 17 $\alpha$ -υδροξυπρογεστερόνης και ανδροστενεδιόνης στα κύτταρα θήκης, η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της δράσης της αρωματάσης των κοκκιωδών κυττάρων, καθορίζοντας με αυτό τον

τρόπο το ποσό των οιστρογόνων που συντίθεται από τις πρόδρομες ανδρογονικές ουσίες. Ως αποτέλεσμα, η LH προάγει την προσφορά πρόδρομων ουσιών και τον σχηματισμό ανδρογόνων απουσία της FSH, ενώ η δράση της FSH αναστέλλεται απουσία της LH λόγω μειωμένου υποστρώματος για αρωματοποίηση. Τα αυξημένα ανδρογόνα καθώς και σε ορισμένους ασθενείς η αυξημένη έκκριση ανασταλίνης, ενός μη στεροειδικού πεπτιδίου που παράγεται από τα κοκκιώδη κύτταρα, αναστέλλουν την έκκριση της FSH με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του συστήματος αρωματάσης (που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της FSH) και την επακόλουθη μείωση της ωθηκικής παραγωγής οιστρογόνων.

Η συχνότητα έκκρισης της GNRH φαίνεται να καθορίζει εν μέρει τη σύνθεση τόσο της LH όσο και της FSH. Η ταχείας συχνότητας παλμικές ώσεις της GNRH καταλύουν την μεταγραφή της β-υποομάδας της ωχρινοτρόπου ορμόνης σε βάρος της β-υποομάδας της θυλακιοτρόπου, ενώ αντίθετα, βραχείας συχνότητας παλμικές ώσεις της GNRH καταλύουν την μεταγραφή της β-υποομάδας της θυλακιοτρόπου ορμόνης που μειώνει την συχνότητα της ωχρινοτρόπου ορμόνης σε όφελος της θυλακιοτρόπου. Επειδή οι γυναίκες με ΣΠΩ φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένες τιμές ωχρινοτρόπου ορμόνης, προκύπτει ότι η παλμική συχνότητα της GNRH πιθανά επιταχύνεται στο σύνδρομο. Δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί εάν αυτό οφείλεται σε συγγενή δυσλειτουργία της GNRH παλμικής γεννήτριας ή στα πολύ χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης λόγω απουσίας ωθυλακιορηξιών. Από τη στιγμή που οι προγεστίνες επιβραδύνουν την GNRH γεννήτρια παλμών (pulse generator), τα χαμηλά επίπεδα προγεστίνων στο πλάσμα γυναικών με ΣΠΩ είναι πιθανό να οδηγήσουν σε αύξηση παλμικότητας της GNRH, αυξάνοντας τα επίπεδα της ωχρινοτρόπου ορμόνης και υπερπαραγοντας ωθηκικά ανδρογόνα. Η υπόθεση αυτή δεν μπορεί να εξηγήσει όλη την παθογένεια του ΣΠΩ, ούτε την εμφάνιση του συνδρόμου σε ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα LH. Επιπλέον, παρόμοιες διαταραχές έκκρισης γοναδοτροπινών παρατηρούνται και σε άλλες υπερανδρογοναιμικές καταστάσεις, όπως στη συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων (75).

Η ινσουλίνη διαδραματίζει επίσης άμεσο και έμμεσο ρόλο στην παθογένεια της υπερανδρογοναιμίας στο ΣΠΩ καθώς: (α) δρα σε συνέργεια με την

ωχρινοτρόπο ορμόνη για την ενίσχυση της παραγωγής ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης, (β) αναστέλλει την ηπατική σύνθεση της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό της τεστοστερόνης που βρίσκεται αδέσμευτη στην κυκλοφορία. Καθώς οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν τυπικά υπερινσουλιναίμια, οι συγκεντρώσεις ελεύθερης τεστοστερόνης είναι συχνά υψηλές. Σφάλμα στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης φαίνεται να υπάρχει τόσο στα λιποκύτταρα όσο και στο μυϊκό ιστό, δύο βασικούς ιστούς στόχους στη δράση της (76, 77), ενώ αντίθετα οι ωοθήκες εξακολουθούν να ανταποκρίνονται στην δράση της ινσουλίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ. (γ) Τέλος, τόσο η ινσουλίνη όσο και ο IGF-1 αυξητικός παράγων διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος και την παραγωγή ανδρογόνων από αυτά. Με αυτό τον τρόπο (αλλά και μέσω της περιφερικής αρωματοποίησης) η υπερινσουλιναίμια αυξάνει τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανδρογόνων στις ασθενείς με ΣΠΩ. Η προκληθείσα υπερανδρογοναιμία με τη σειρά της μπορεί να αυξήσει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Το γεγονός ότι το μόριο της ινσουλίνης όσο και ο υποδοχέας της δεν εμφανίζουν δομικές ανωμαλίες στο ΣΠΩ, θέτει την υπόθεση ότι η αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης, οφείλεται σε βλάβη του μηχανισμού μετάδοσης του ινσουλινικού σήματος μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της (78, 79). Ένα πιθανό μηχανισμό θα μπορούσε να αποτελέσει η αυξημένη φωσφορυλίωση της σερίνης αντί της τυροσίνης του ινσουλινικού υποδοχέα (80).

Συμπερασματικά, πολλαπλοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στη διαίωνιση του ΣΠΩ. Σύμφωνα με τον Taylor “υπάρχουν τέτοιες συσχετίσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ έκκρισης γοναδοτροπίνης, ινσουλίνης και ανδρογόνων που είναι σχεδόν ακατόρθωτο να μπορέσει να καθορίσει η επιστημονική κοινότητα τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης του συνδρόμου στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών”.

## **2.5 Μεταβολικές καρδιαγγειακές συνιστώσες του ΣΠΩ.**

Οι επιπτώσεις του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών εκτείνονται πέρα του άξονα αναπαραγωγής. Οι ασθενείς που πάσχουν παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακών ανωμαλιών όμοιων με αυτών που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί έκπληξη καθώς το ΣΠΩ και το μεταβολικό σύνδρομο εμφανίζουν το ίδιο κύριο παθογενετικό υπόβαθρο, την αντίσταση στην ινσουλίνη. Επίσης, το ΣΠΩ μπορεί να θεωρηθεί ως μέρος του μεταβολικού συνδρόμου. Το *σύνδρομο ΧΧ* έχει προταθεί σαν επαρκής όρος που υπογραμμίζει αυτή την σχέση (81).

### 2.5.1 Ανοχή στη γλυκόζη και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔ2).

30-40% των γυναικών με ΣΠΩ παρουσιάζουν διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη ενώ 10% πάσχουν από ΣΔ τύπου 2 ήδη από την τέταρτη δεκαετία της ζωής τους, με την ηλικία και την αύξηση του σωματικού βάρους να επιδεινώνουν σταδιακά το γλυκαιμικό τους προφίλ (82). Μετά-ανάλυση 35 εργασιών αποκαλύπτει ότι το ΣΠΩ σχετίζεται με 2,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο διαταραχής ανοχής στη γλυκόζη (IGT) και 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης ΣΔ τύπου 2. Μελέτες της Dunaif et al., αποκαλύπτουν ότι γυναίκες με ΣΠΩ παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην ινσουλίνη σε σχέση με μη πάσχουσες γυναίκες για αντίστοιχες τιμές BMI και κατανομής λιπιδίου ιστού, ενώ μεταξύ των γυναικών με ΣΠΩ, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία φαίνεται να είναι σοβαρότερες στις παχύσαρκες ασθενείς. Τέλος, αντίσταση στην ινσουλίνη παρατηρείται περίπου στο 50-70% των γυναικών με ΣΠΩ και στο 95% των παχύσαρκων γυναικών με το σύνδρομο (83, 84).

### 2.5.2 Καρδιαγγειακή νόσος.

Προδιάθεση για μακροαγγειακές παθήσεις και θρομβώσεις σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, λόγω πιθανά διαταραχής των ινωδολυτικών μηχανισμών, έχει περιγραφεί σε αρκετές μελέτες (85, 86) Επίσης, εργασίες μεταξύ γυναικών με ΣΠΩ και υγιών μαρτύρων με αντιστοιχία ως προς το BMI, ανέδειξαν την σχέση του ΣΠΩ με πολλούς παράγοντες

κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου όπως υπερτριγλυκεριδαιμία, αυξημένα επίπεδα της VLDL και της LDL χοληστερόλης και χαμηλά επίπεδα της HDL (87, 88). Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερανδρογοναιμία φαίνεται να επιδεινώνουν περαιτέρω το λιπιδαιμικό προφίλ και κυρίως τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης (89). Η τεστοστερόνη, μειώνει την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα κοιλιακά λιποκύτταρα ενώ η αντίσταση στην ινσουλίνη εξασθενεί την αντι-λιπολυτική της δράση.

### 2.5.3 Αγγειακή Δυσλειτουργία.

Το μεταβολικό σύνδρομο συνοδεύεται από φλεγμονώδη αθηρωματική θρομβωτική αντίσταση στην ινσουλίνη που αυξάνει τους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες, διαταράσσει την ενδοθηλιακή λειτουργία και προκαλεί υποκλινική αθηροσκλήρυνση (90, 91). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβαίνει στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρυνσης (92) και η παρουσία της σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (93, 94). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε γυναίκες με ΣΠΩ συγκρινόμενες με υγιείς της ίδιας ηλικίας και συσχέτιση της διαταραχής αυτής κατά κύριο λόγο με την υπερανδρογοναιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (95-97). Κατά συνέπεια, οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν στις μετρήσεις αυξημένο πάχος έσω χιτώνα στις καρωτίδες, μεγαλύτερη ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αγγείων και μεγαλύτερη επίπτωση υποκλινικής αγγειακής νόσου σε σχέση με τις μη πάσχουσες γυναίκες, μετά από προσαρμογή για την ηλικία και το BMI. Οι Shaw et al., επιβεβαίωσαν ότι οι γυναίκες που πάσχουν από το σύνδρομο εμφανίζουν περισσότερα καρδιαγγειακά επεισόδια σε σχέση με τις υγιείς, διαφορά που μεγαλώνει ακόμα περισσότερο αν συμπεριληφθούν οι περιπτώσεις αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (98). Τέλος, οι θεραπείες με μετφορμίνη ή πιογλιταζόνη για 6 μήνες φαίνεται να βελτιώνουν την αγγειακή λειτουργία (99). Αν και όλα τα παραπάνω θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι η νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις είναι αυξημένη σε γυναίκες με ΣΠΩ, η υπόθεση αυτή δεν έχει μέχρι σήμερα τεκμηριωθεί.

## **2.6 Υπερπρολακτιναιμία και ΣΠΩ.**

Η υπερπρολακτιναιμία που περιστασιακά εμφανίζεται στο ΣΠΩ μπορεί να προκαλείται από αδένωμα της υπόφυσης ή να σχετίζεται με υπερπλασία των εκκριτικών κυττάρων λόγω υπερπλασίας του στρώματος. Η υπερπρολακτιναιμία είτε μέσω απευθείας επίδρασης στα κύτταρα που εκκρίνουν γοναδοτροπίνη είτε έμμεσα μέσω άλλων μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της αναλογίας LH/FSH και της έκκρισης DHES από τα επινεφρίδια. Χαρακτηριστικά, σε ορισμένους ασθενείς υπό θεραπεία με βρωμοκρυπτίνη παρατηρείται επαναφορά του καταμήνιου ωοθηκικού κύκλου λόγω μείωσης των επιπέδων ανδρογόνων που αναστρέφουν την υπερπρολακτιναιμία.

## **2.7 Επινεφριδιακές διαταραχές.**

Η συνεισφορά των επινεφριδίων σε ανδρογόνα είναι ενισχυμένη στις μισές περίπου περιπτώσεις ασθενών με ΣΠΩ. Η πιθανότερη εκδοχή για την πρόκληση της επινεφριδιακής υπερανδρογοναιμίας είναι η ενζυματική διαταραχή της στεροειδογένεσης (δεδομένου τόσο οι ωοθήκες όσο και τα επινεφρίδια έχουν κοινό το αρχικό τμήμα της βιοσύνθεσης στεροειδών). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται η άποψη της πιθανής συμβολής της κορτιζόλης στην παθογένεια του ΣΠΩ. Συγκεκριμένα, ο αυξημένος περιφερικός μεταβολισμός της κορτιζόλης είτε λόγω αυξημένης αδρανοποίησής της (μέσω αυξημένης δραστηριότητας της 5<sup>α</sup>-αναγωγάσης) είτε μέσω μειωμένης μετατροπής της από την κορτιζόνη (μέσω διαταραχής της 11βHSD) οδηγεί σε αντισταθμιστική αύξηση της έκκρισης της ACTH (μέσω ελάττωσης του αρνητικού feedback) προκειμένου να διατηρηθούν φυσιολογικά τα επίπεδα της κορτιζόλης εις βάρος των επινεφριδιακών ανδρογόνων (100-102). Τα αυξημένα επίπεδα επινεφριδιακών ανδρογόνων επιδεινώνουν την υπεροιστρογοναιμία και κατά επέκταση την σχέση LH/FSH. Η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη σε ορισμένους ασθενείς με ΣΠΩ, βελτιώνει τη σχέση LH/FSH και οδηγεί σε επαναφορά της ωορρηξίας. Οι επινεφριδιακές διαταραχές ωστόσο, αποτελούν δευτερογενείς παράγοντες στο ορμονικό

περιβάλλον του συνδρόμου και οι ωθηκές παραμένουν ο κύριος παράγοντας πρόκλησης υπερανδρογοναιμίας.

### **2.8 Αποφρακτική άπνοια ύπνου.**

Πρόσφατες μελέτες δηλώνουν ότι η παρουσία της αποφρακτικής άπνοιας ύπνου στο ΣΠΩ είναι πιο συχνή από ότι αναμενόταν και δεν μπορεί να εξηγηθεί αποκλειστικά και μόνο από την παχυσαρκία. Σε τρεις μελέτες, η πλειονότητα των περιπτώσεων με άπνοια ύπνου δεν συσχετιζόνταν με τον δείκτη μάζας σώματος ενώ παρά τη βελτίωση του BMI ο κίνδυνος υπνικής διαταραχής αυξήθηκε. Η αντίσταση στην ινσουλίνη λοιπόν, φέρεται ως ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για την αποφρακτική άπνοια ύπνου σε σύγκριση με άλλους παράγοντες όπως η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος ή η συγκέντρωση τεστοστερόνης στο πλάσμα (103, 104).

### **2.9 Συσχέτιση του ΣΠΩ με καρκινοπάθειες.**

Το 1957 οι Jackson and Dockerty ανέφεραν συχνότητα 27% ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου σε γυναίκες με ΣΠΩ, υπόθεση που μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην υπερινσουλιναμία και εν μέρει στην εμμένουσα διέγερση του ενδομητρίου από οιστρογόνα και κυρίως την οιστρόνη χωρίς να αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση του ενδομητρίου από την δράση της προγεστερόνης μετά την ωορρηξία (105, 106). Οι καρκίνοι του ενδομητρίου είναι σχεδόν πάντα 1<sup>ου</sup> βαθμού αδενοκαρκινώματα που περιορίζονται στο ενδομήτριο ή διεισδύουν επιφανειακά στο μυομήτριο. Είναι σπάνια θανατηφόρα και πολλά από αυτά είναι αναστρέψιμα σε θεραπεία με προγεστερόνη ή πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας. Η υπερπρολακτιναιμία είναι παρούσα περίπου στο 25% και η γαλακτόρροια στο 13% των ασθενών με ΣΠΩ. Μερικοί ασθενείς με υπερπρολακτιναιμία πάσχουν από υποφυσιακό αδένωμα και για αυτό το λόγο η αξονική τομογραφία του τουρκικού επιπέδου είναι απαραίτητη στις περιπτώσεις αυτές. Ο καρκίνος του μαστού και των ωθηκών έχουν επίσης σχετιστεί με το ΣΠΩ ποικιλοτρόπως (107) καθώς παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η υπογονιμότητα η ορμονική θεραπεία της

υπογονιμότητας είναι τόσο συνήθεις στο ΣΠΩ που δύσκολα μπορούν να απομονωθούν και να θεωρηθούν ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για αυτούς τους τύπους καρκίνων. Παρά ταύτα, δεν υπάρχουν επισήμως συστάσεις που να προτείνουν την συχνότερη παρακολούθηση των γυναικών με ΣΠΩ για τους καρκίνους που περιγράφηκαν.

### **2.10 Επιπτώσεις του ΣΠΩ στη νευρολογία και την ψυχιατρική.**

Γυναίκες με ΣΠΩ παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση σε διαταραχές διάθεσης όπως κατάθλιψη (26-40%), αγχώδης διαταραχή (11,6%) και βουλιμία (binge-eating) (23,3%) (108, 109). Η παχυσαρκία στις γυναίκες με ΣΠΩ αυξάνει τον κίνδυνο κατάθλιψης ενώ η αντίσταση στην ινσουλίνη βελτιώνεται με την αντικαταθλιπτική θεραπεία (110, 111). Παράλληλα, τα επίπεδα ανδρογόνων φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο κατάθλιψης στο ΣΠΩ. Επίσης, οι γυναίκες που πάσχουν από επιληψία βρίσκονται υπό αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαταραχών αναπαραγωγής, συμπεριλαμβανομένου του ΣΠΩ, συμπέρασμα που ενισχύει την υπόθεση ότι κοινές υποθαλαμικές-υποφυσιακές-ωοθηκικές διαταραχές πηγάζουν τόσο από την επιληψία per se όσο και από την θεραπεία αυτής με βαλπροϊκό (112, 113).

### **2.11 Διαφορική διάγνωση του ΣΠΩ.**

Εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών που μοιάζει με αυτή του συνδρόμου έχει παρατηρηθεί σε κορίτσια προεφηβικής ηλικίας καθώς και τα πρώτα χρόνια από την έναρξη των εμμηνορυσιακών κύκλων. Ομοίως, παρόμοια εικόνα μπορεί να παρουσιάσουν γυναίκες με πρωτοπαθή υποθυρεοειδισμό κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους. Η μέτρηση της TSH ως εξέταση ρουτίνας στον αποκλεισμό θυρεοειδικής δυσλειτουργίας σε ασθενείς με υπερανδρογοναιμία έχει περιορισμένη διαγνωστική αξία αν ληφθεί υπόψη ότι η επίπτωση της διαταραχής αυτής δεν είναι μεγαλύτερη από αυτή του γενικού πληθυσμού. Ωστόσο, δεδομένου ότι ο έλεγχος της θυρεοειδικής λειτουργίας είναι προτεινόμενος σε όλες τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, περιλαμβάνεται και στον έλεγχο των γυναικών με υπερανδρογοναιμία (41).



Υπερηχογραφικές μελέτες αποκάλυψαν ότι γυναίκες με κανονικούς ωοθυλακιορηκτικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους και στοιχεία υπερανδρογοναιμίας τόσο ήπια που δεν γίνονται αντιληπτά από τις ίδιες, μπορεί να εμφανίσουν υπερηχογραφικά εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών παρόμοια με εκείνη γυναικών με εμφανείς κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου, με μόνη εξαίρεση ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν επιπλέον το στοιχείο της 'corpora lutea and albicantia'. Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι τα όρια μεταξύ του συνδρόμου και του φυσιολογικού δεν είναι πάντα διακριτά. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει επιπλέον, μεγάλο εύρος διαταραχών που προκαλούν χρόνια ανωοθυλακιορηξία και σκληρωτικές πολυκυστικές ωοθήκες με ανώμαλη απελευθέρωση γοναδοτροπινών. Η εικόνα σκληρών κυστικών ωοθηκών δεν αποτελεί συγκεκριμένη μορφολογική έκφραση χρόνιας ανωοθυλακιορηξίας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αλλά μπορεί να συνοδεύει παθήσεις όπως:

- Cushing σύνδρομο, συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων (συνηθέστερα έλλειψη 21-υδροξυλάσης-NCAH ή 11-β-υδροξυλάσης) και ωχρινοποιητικούς όγκους επινεφριδίων. Ο αποκλεισμός της υπερπλασίας επινεφριδίων λόγω έλλειψης 21-υδροξυλάσης μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση βασικών πρωινών επιπέδων 17-υδροξυπρογεστερόνης, με cut off τιμές κυμαινόμενες από 2-3 ng/ml (114).
- Συγγενείς διαταραχές υποθαλάμου-υπόφυσης (πχ. υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός που αποκλείεται μετά από μετρήσεις της FSH και E<sub>2</sub> του πλάσματος)
- Ωοθηκικές αλλοιώσεις που παράγουν μεγάλα ποσά οιστρογόνων και ανδρογόνων και υφίστανται περιφερική αρωματοποίηση σε εξωαδενικές θέσεις όπως: όγκοι κοκκιωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης, όγκοι του Brenner, κυστικά τερατώματα, όγκοι του Krukenberg και μη νεοπλασματικές βλάβες όπως υπερπλασία κυττάρων Leydig και υπερθήκωση του στρώματος.

Στα πλαίσια της διαφορικής διάγνωσης θα πρέπει να αποκλείονται η υπερπρολακτιναιμία με μέτρηση της προλακτίνης, με την προειδοποίηση, ότι πολλές ασθενείς με υπερανδρογοναιμία μπορεί να εμφανίζουν επίπεδα προλακτίνης στα ανώτερα φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα. Τέλος, σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από σοβαρή αντίσταση στην ινσουλίνη όπως το σύνδρομο HAIRAN (υπερανδρογοναιμία –αντίσταση στην ινσουλίνη– μελανίζουσα ακάνθωση) θα πρέπει να αποκλείονται όταν υπάρχουν κλινικές ενδείξεις-υποψίες (115).

### **2.12 Θεραπεία του ΣΠΩ.**

Η θεραπεία του συνδρόμου κατευθύνεται προς τη διακοπή του αυτό-διδαιωνιζόμενου κύκλου. Μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους όπως μείωση της έκκρισης των ωοθηκικών ανδρογόνων (με σφηνοειδή εκτομή ή με τη χορήγηση από του στόματος αντισυλληπτικών δισκίων), μείωση της περιφερικής σύνθεσης των οιστρογόνων (με τη μείωση του σωματικού βάρους) ή επαγωγή της έκκρισης της FSH [χορήγηση κλομφαίνης, ανθρώπινης εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (hMG) ή GNRH με φορητή αντλία έγχυσης ή κεκαθαρμένης FSH –ουροφολιτροπίνης]. Η προσπάθεια απώλειας σωματικού βάρους είναι απαραίτητη για όλες τις ασθενείς και ιδιαίτερα τις παχύσαρκες και αυτές με προβλήματα υπογονιμότητας (116-119). Βελτίωση του ΣΒ κατά λίγα μόνο γραμμάρια μπορεί να μειώσει τον μεταβολικό κίνδυνο, να ομαλοποιήσει τον κύκλο και να βελτιώσει τα συμπτώματα που προκύπτουν από την υπερανδρογοναιμία (120-122). 5-10% απώλεια βάρους επαρκεί για την επαναφορά της γονιμότητας στο 55-100% των περιπτώσεων εντός 6 μηνών (118). Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τα κλινικά ευρήματα και τις ανάγκες της ασθενούς.

Αν η γυναίκα δεν είναι παχύσαρκτη και δεν επιθυμεί εγκυμοσύνη, μπορεί να προκληθεί περιοδική έμμηνος ρύση με τη χορήγηση οξικής μεδρόξυπρογεστερόνης για 10 ημέρες μηνιαίως. Η θεραπεία αυτή αποτρέπει την ανάπτυξη υπερπλασίας του ενδομητρίου.

Αν η γυναίκα εμφανίζει υπερτρίχωση και δεν επιθυμεί εγκυμοσύνη, η παραγωγή ανδρογόνων από την ωθήκη μπορεί να κατασταλεί με χορήγηση από του στόματος αντισυλληπτικών δισκίων που περιέχουν συνδυασμό οιστρογόνων και προγεστερόνης. Η χορήγηση αυτών των δισκίων έχει επίσης ένδειξη και σε παρατεταμένη ή μεγάλου βαθμού εμμηνορρυσία.

Εάν η γυναίκα επιθυμεί εγκυμοσύνη πρέπει να γίνει επαγωγή της ωοθυλακιορρηξίας. Τα φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των ινσουλινοευσαιθητοποιητών, όπως είναι η μετφορμίνη και οι θειαζολιδινεδιόνες, βελτιώνουν τη γονιμότητα των γυναικών με ΣΠΩ. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι αν και η αγωγή με μετφορμίνη χαίρει αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα δεν έχει αναγνωριστεί ακόμα ως επίσημη αγωγή στο ΣΠΩ (123). Η κλομιφαίνη επάγει την ωοθυλακιορρηξία στα  $\frac{3}{4}$  των περιπτώσεων (124, 125). Εναλλακτικά, η επαγωγή της ωοθυλακιορρηξίας μπορεί να γίνει με hMG, ουροφολλιτροπίνη ή γοναδορελίνη. Η χορήγηση αναλόγων GnRH πριν τη χρήση hMG, ουροφολλιτροπίνης ή γοναδορελίνης μπορεί να βελτιώσει τον ρυθμό ωορρηξίας και να επιτευχθεί εγκυμοσύνη. Οι γυναίκες με ΣΠΩ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ωθηκικής υπερδιέγερσης μετά από θεραπεία με γοναδοτροπίνες και εμφανίζουν επίσης αυξημένα ποσοστά αποβολών. Μια εναλλακτική θεραπεία αποτελεί η αφαίρεση ωθηκικού ιστού (drilling) με laser ή καυτηρίαση κατά τη διάρκεια λαπαροσκόπησης όταν δεν είναι αποτελεσματική η ορμονική θεραπεία. Ωστόσο η επέμβαση αυτή σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ωθηκικών συμφύσεων (126).

### 3.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

#### **3.1 Ο Πλακούντας.**

Ο πλακούντας επιτρέπει ενδομήτρια κύηση, εμβρυική ανάπτυξη και διατήρηση του εμβρύου μέσω τροποποίησης της μητρικής ανοσολογικής απάντησης. Η πλακούντια λειτουργία περιλαμβάνει τη θρέψη, την αναπνοή, την έκκριση και απέκκριση. Ο πλακούντας αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο, ο φθαρτός προέρχεται από το ενδομήτριο που διαμορφώνεται ειδικά κατά τη διάρκεια της κύησης και το δεύτερο η τροφοβλάστη προέρχεται από το έμβρυο και αποτελείται από δύο λειτουργικά τμήματα: ένα εσωτερικό στρώμα την κυτταροτροφοβλάστη και ένα εξωτερικό την συγκιτιοτροφοβλάστη. Και τα δύο στρώματα παράγουν πεπτίδια και πρωτεϊνικές ορμόνες, ενώ οι στεροειδικές ορμόνες προέρχονται μόνο από την συγκύτιοτροφοβλάστη. Ο πλακούντας παράγει 3 κύρια οιστρογόνα: την οιστραδιόλη, την οιστρόνη και την οιστριόλη. Και τα τρία οιστρογόνα περιλαμβάνουν τον ίδιο βασικό πυρήνα οιστράνης που αποτελείται από 18 άνθρακες. Σε μη έγκυες γυναίκες οι ωοθήκες παράγουν το μεγαλύτερο μέρος των οιστρογόνων. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο στην κύηση όπου οι ωοθήκες παράγουν ελάχιστα οιστρογόνα και ήδη μετά την 7<sup>η</sup> εβδομάδα, κύρια πηγή παραγωγής τους είναι ο πλακούντας, όπου τα εμβρυικής και μητρικής προέλευσης C-19 στεροειδή της κυκλοφορίας και συγκεκριμένα τα DHEAS χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή τους σε ανδροστενδιόνη και τεστοστερόνη και εν συνεχεία, μέσω περιφερικής αρωματοποίησης, σε οιστρόνη και οιστραδιόλη. Τα επίπεδα DHEAS του πλάσματος στην κύηση μπορεί να είναι 50% χαμηλότερα, λόγω αυξημένου ρυθμού μετατροπής τους σε οιστραδιόλη-17β από τον πλακούντα και την αυξημένη υδροξυλίωση τους στο μητρικό ήπαρ. Κατά την κύηση, το έμβρυο προστατεύεται από τα μητρικά ανδρογόνα με τη βοήθεια της αρωματάσης του πλακούντα, που μετατρέπει ταχέως την ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη, την 16υδροξυ τεστοστερόνη σε οιστριόλη, και την τεστοστερόνη σε οιστραδιόλη (127). Μελέτες σε πειραματόζωα αποκάλυψαν ότι η υπερέκκριση στα μητρικά ανδρογόνα πυροδότησε τον προγραμματισμό του ΣΠΩ, πιθανόν λόγω υπέρβασης του ανώτατου ορίου

συγκέντρωσης της SHBG στο πλάσμα και της μειωμένης δράσης της αρωματάσης του πλακούντα (128, 129). Η υπόθεση αυτή παρουσιάζεται αναλυτικά σε παρακάτω κεφάλαια.

### **3.2 Το αμνιακό υγρό.**

Η δομή της αμνιακής κοιλότητας ολοκληρώνεται την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Ο όγκος του αμνιακού υγρού καθορίζεται από 3 στοιχεία: τις μετακινήσεις ύδατος και ουσιών που διέρχονται μέσω της μεμβράνης, την εμβρυική ρύθμιση του ισοζυγίου υγρών (παραγωγή και κατάποση ούρων) και τις μητρικές επιδράσεις στην διαπλακουντιακή μετακίνηση υγρών. Στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης το αμνιακό υγρό ανανεώνεται εξ' ολοκλήρου σε τρεις ώρες περίπου, ενώ από το έμβρυο καταπίνονται περίπου 20cc αμνιακού υγρού την ώρα. Μέχρι ενός σημείου, το αμνιακό υγρό σε αρχικό στάδιο κύησης αποτελείται από μητρικό ορό, ενώ σε μετέπειτα στάδια της κύησης, σημαντική είναι η συμβολή των ούρων που πρωτοεμφανίζονται στην κύστη του εμβρύου την 12<sup>η</sup> εβδομάδα. Πολλές μελέτες, στηρίζουν την υπόθεση ότι το αμνιακό υγρό δίνει επαρκή αντιπροσώπευση του εμβρυικού περιβάλλοντος σε ανδρογόνα (130, 131). Στη βάση αυτή και εξαιτίας της ανίχνευσης εμβρυικών κυττάρων από τις τρεις εμβρυικές στιβάδες στο αμνιακό υγρό (132-134) διατυπώθηκε η υπόθεση ότι κατά την κύηση η αμνιακή κοιλότητα και κατά συνέπεια το αμνιακό υγρό, δέχονται κύτταρα από το έμβρυο και πιθανά από τον πλακούντα, τα κύτταρα του οποίου είναι κυρίως μεσεγχυματικά αρχέγονα εμβρυικής προέλευσης και σε μικρότερη αναλογία εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα (<1% στο αμνιακό υγρό). Λόγω των κινδύνων που σχετίζονται με την αμνιοπαρακέντηση και οι γυναίκες που υποβάλλονται σε αυτή σχετίζονται συνήθως με αυξημένου κινδύνου κυήσεις, οι μετρήσεις των ανδρογόνων στο αμνιακό υγρό δεν είναι εφικτές στις περισσότερες μελέτες.

### **3.3 Η φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (SHBG) και οι ορμόνες του φύλου στην κύηση.**

Δεν υπάρχουν σαφείς πληροφορίες για την παραγωγή και ρύθμιση της SHBG στο έμβρυο, αλλά οι συγκεντρώσεις της στο εμβρυικό και νεογνικό πλάσμα είναι περίπου 50 φορές μικρότερες από εκείνες του μητρικού πλάσματος κατά τη διάρκεια της κύησης (135). Τα αυξημένα επίπεδα SHBG στο πλάσμα, οφείλονται εν μέρει στις αυξημένες συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης. Στη βιβλιογραφία, η παρουσία της SHBG στο αμνιακό υγρό αναγνωρίστηκε το 1972, ενώ σύμφωνα με την ίδια μελέτη τα επίπεδα της SHBG στο αμνιακό υγρό δεν φαίνεται να διαφέρουν ανάμεσα στα δύο φύλα (136). Η SHBG του αμνιακού υγρού είναι πανομοιότυπη με αυτή του μητρικού πλάσματος ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα και την ικανότητα σύνδεσης με τα στεροειδή. Η προέλευση της SHBG δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά γενικά θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες στο αμνιακό υγρό προέρχονται κατά κύριο λόγο από το μητρικό χώρο και εισέρχονται από το αμνιοχώριο. Έχει βρεθεί επίσης, ότι όταν η δεσμευτική ικανότητα της SHBG στο αμνιακό υγρό είναι μεγάλη τότε παρατηρούνται μεγάλες συγκεντρώσεις τεστοστερόνης άσχετα με το στάδιο της κύησης. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό καθορίζονται κυρίως από την SHBG. Έτσι, η μητρικής προέλευσης SHBG δεσμεύει την τεστοστερόνη που διαχέεται με μεγαλύτερη ευκολία στο αμνιακό υγρό (137).

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης έχει περιγραφεί αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων κάποιων ανδρογόνων (135). Η συγκέντρωση τεστοστερόνης αυξάνεται το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης με περεταίρω αυξητικές ώσεις κατά την πορεία της (138), ενώ η ανδροστενεδιόνη μειώνεται σταδιακά (135). Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί, ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης η αύξηση των κυκλοφορούντων ανδρογόνων δεν οδηγεί σε αρρενοποίηση του εμβρύου. Το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί εν μέρει στα αυξημένα επίπεδα της οιστραδιόλης, της προγεστερόνης και της SHBG κατά τη διάρκεια της κύησης που εμπλέκονται στην βιολογική ενεργότητα των ανδρογόνων (139) και εν μέρει στη δράση της αρωματάσης του πλακούντα που μετατρέπει ταχέως την ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη και την 16-υδροξυτεστοστερόνη σε οιστρόλη. Ωστόσο, η απουσία αρρενοποίησης δεν

αποκλείει την έκθεση των εμβρύων αυτών σε περίσσεια ανδρογόνων κατά την ενδομήτριο ζωή. Την υπόθεση αυτή ενισχύει η μελέτη του Eisner, σύμφωνα με την οποία η πρόκληση υπερανδρογοναιμίας σε εμβρυικά πειραματόζωα, ανεξάρτητα από την εβδομάδα κύησης, επηρέασε (perturbs) την ομοιόσταση ινσουλίνης –γλυκόζης, επιτείνοντας την λειτουργία των παγκρεατικών β κυττάρων και μειώνοντας την ευαισθησία τους στην ινσουλίνη (140). Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, μπορεί να υποθέσει κανείς ότι τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων επιδρούν στην φυσιολογία του εμβρύου. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην τεστοστερόνη σε μητρικό και εμβρυικό πλάσμα (141), υποδεικνύοντας ότι η τεστοστερόνη διέρχεται τον πλακούντα. Η σχέση αυτή δεν φαίνεται να είναι αμφίδρομη καθώς δεν αντικατοπτρίζεται καθαρά το εμβρυικό ορμονικό περιβάλλον στον ορό της μητέρας, δεδομένου των παρόμοιων επιπέδων τεστοστερόνης στο μητρικό πλάσμα ανάμεσα στα θήλεα και άρρενα έμβρυα (139, 142).

### **3.4 Εμβρυική ωοθήκη και εμβρυικά επινεφρίδια.**

Περιορισμένη είναι η γνώση σχετικά με τη δράση των εμβρυικών ωοθηκών κατά την κύηση. Η ωοθηκική εμβρυική στεροειδογένεση δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί, αν και τα στεροειδή ένζυμα και συγκεκριμένα P450c17 και P450scc ανιχνεύονται από τις αρχές του δευτέρου τριμήνου της κύησης (143, 144). Η πιθανότητα τα αυξημένα μητρικά ανδρογόνα να προκαλούν μείωση της LH και αυτή με τη σειρά της να καταστέλλει τα εμβρυικά ωοθηκικά ανδρογόνα σε κύηση γυναικών με ΣΠΩ είναι μάλλον απίθανη, αν ληφθεί υπόψη ότι μέρος της κυκλοφορίας των εμβρυικών ωοθηκικών στεροειδών είναι ανεξάρτητη από τις γοναδοτροπίνες και οι υποδοχείς LH δεν ανιχνεύονται στις ωοθήκες κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης (144).

Τα εμβρυικά επινεφρίδια είναι επίσης, δραστήρια στην μήτρα, παράγοντας σημαντικές ποσότητες DHEAS. Τα DHEAS στο εμβρυικό επινεφρίδιο ενεργοποιούνται από την πλακούντια σουλφατάση προς παραγωγή DHEA, που εν συνεχεία μεταβολίζεται από τον πλακούντα προς παραγωγή ανδροστενεδιόνη. Η ανδροστενεδιόνη με αρωματοποίηση μετατρέπεται σε οιστρόνη ή τεστοστερόνη (και αυτή με τη σειρά της μέσω αρωματοποίησης σε

οιστραδιόλη). Συμπερασματικά, τόσο τα επίπεδα οιστρογόνων όσο και ανδρογόνων εξαρτώνται από την πλακούντια και επινεφριδιακή στεροειδογένεση. Διαταραχή αυτής της στεροειδογένεσης μπορεί να συμβάλλει στον προγραμματισμό του συνδρόμου στα έμβρυα γυναικών με ΣΠΩ.

### **3.5 Χαρακτηριστικά της κύησης γυναικών με ΣΠΩ.**

Οι γυναίκες που πάσχουν από ΣΠΩ συχνά υπόκεινται σε αυξημένη έκθεση σε ανδρογόνα και υπερινσουλιναίμια κατά την κύηση, παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την έκβασή της. Οι γυναίκες αυτές παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας, εξαιτίας του αυξημένου BMI αλλά και των συχνά πολλαπλών κυήσεων που οφείλονται σε προηγηθείσες θεραπείες υπογονιμότητας (145, 146). Γυναίκες με ΣΠΩ ακόμα και κατά την πρώτη κύηση, βρίσκονται υπό αυξημένο κίνδυνο διαβήτη κύησης και πρόωρο τοκετό (145-149), με αποτέλεσμα τα νεογνά των μητέρων με ΣΠΩ να νοσηλεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα στην μονάδα εντατικής θεραπείας και να παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο νεογνικής θνησιμότητας (145). Το βάρος γέννησης των νεογνών γυναικών με ΣΠΩ φαίνεται να είναι στις περισσότερες μελέτες φυσιολογικό για την ηλικία κύησης μετά από αντιστοίχιση με το BMI της μητέρας (150, 151). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι πρόσφατη μελέτη κοόρτης αναδεικνύει διπλάσιο κίνδυνο σε παιδιά που γεννηθήκαν μικρά για την ηλικία κύησης να παρουσιάσουν χαρακτηριστικά του ΣΠΩ στην ενήλικη ζωή (152). Συμπερασματικά, το βάρος γέννησης, είτε ως εύρημα αντιπροσωπευτικό της αντίστασης στην ινσουλίνη είτε της υπερέκκρισης στα εμβρυικά ανδρογόνα παραμένει αδιευκρίνιστο.



### **3.6 Μέθοδοι μελέτης των οργανικών επιδράσεων των στεροειδών στην κύηση.**

Σε μελέτες υγιών ανθρώπων, χρησιμοποιήθηκαν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την μέτρηση των προγεννητικών στεροειδών ορμονών. Θεωρητικά, η καλύτερη μέθοδος είναι η μέτρηση των επιπέδων των στεροειδών ορμονών στο εμβρυικό πλάσμα κατά τη περίοδο αύξησης των επιπέδων της τεστοστερόνης. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τους κινδύνους στους οποίους εκτίθεται το έμβryo, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί πρακτικά να είναι ευρέως εφαρμόσιμη. Σε αρκετές εργασίες, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ομφαλίου λώρου τα οποία όμως αντικατοπτρίζουν τα περιγεννητικά μόνο επίπεδα των ορμονών. Άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει τη λήψη μητρικού πλάσματος που παρουσιάζει όμως και αυτή αδυναμίες καθώς οι ορμονικές διαφορές των γυναικών που κυοφορούν θήλεα με αυτές που κυοφορούν άρρενα δεν είναι εμφανείς στο μητρικό πλάσμα ούτε ανιχνεύεται η αύξηση έκκρισης της τεστοστερόνης που παρατηρείται στα άρρενα έμβρυα την 16<sup>η</sup> με 20<sup>η</sup> εβδομάδα (135,139,153, 154).

Τέλη της δεκαετίας του 1990, προτάθηκε η ιδέα μελέτης του αμνιακού υγρού που λαμβάνεται κατά το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης ως ένα παράθυρο μελέτης των επιδράσεων των στεροειδών στο ενδομήτριο περιβάλλον του εμβρύου (155). Σύμφωνα με μελέτες, τα στεροειδή του αμνιακού υγρού από το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο και έπειτα προέρχονται κυρίως από εμβρυικά ούρα (130, 131). Επίσης, στα άρρενα έμβρυα παρατηρείται σαφής αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό κατά τη 16<sup>η</sup>-18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (130, 155). Τα παραπάνω στοιχεία, συνηγορούν στη θεώρηση του αμνιακού υγρού ως αξιόπιστη πηγή μέτρησης στεροειδών ορμονών εμβρυικής προέλευσης. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται η αδυναμία προσδιορισμού ακριβούς προέλευσης των στεροειδών ορμονών και ο κίνδυνος προσμίξεων από τον ομφάλιο λώρο και τον πλακούντα. Τέλος, δεν θα πρέπει να παραληφθεί, η μεθοδολογική ερευνητική δυσχέρεια που προκύπτει καθώς σε αμνιοπαρακέντηση υποβάλλονται κυρίως γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, με τις νεότερες να μην συμμετέχουν σε αντιπροσωπευτικά ποσοστά, απαραίτητα για την εξαγωγή γενικών και ασφαλών συμπερασμάτων.

#### 4. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΘΕΩΡΙΑ-ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών παραμένει μια αινιγματική διαταραχή με ασαφή αιτιολογία. Οι ερευνητές επισημαίνουν τον καθοριστικό ρόλο γενετικών, διατροφικών και ορμονικών παραγόντων και θέτουν την χρονική έναρξη του συνδρόμου πιθανά στην εμβρυική ζωή. Σε αρκετές μελέτες, προτείνεται η υπόθεση της *εξελικτικής θεωρίας*, σύμφωνα με την οποία η αιτιοπαθογένεια του ΣΠΩ σχετίζεται με τον ενδομήτριο προγραμματισμό του (156). Η θεωρία της εμβρυικής ευπλαστότητας κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ανάπτυξης βασίζεται στην ικανότητα του εμβρύου να προσαρμόζεται σε ερεθίσματα που δέχεται από το ενδομήτριο περιβάλλον, επάγοντας δομικές και λειτουργικές αλλαγές στους ιστούς που πιθανά οδηγούν σε προγραμματισμό ανάπτυξης του ΣΠΩ και κατ' επέκταση σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του συνδρόμου στην ενήλικη ζωή. Οι συνέπειες των εμβρυικών προσαρμογών, δομικές ή λειτουργικές, μπορεί να μην γίνουν αντιληπτές πριν την ενήλικη ζωή. Κρίσιμα στάδια ενδομήτριας ανάπτυξης θεωρούνται οι χρονικές περίοδοι όπου επιτελούνται διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαίρεσης, οι περίοδοι λειτουργικής ωρίμανσης του εμβρύου καθώς και η πρώιμη νεογνική ηλικία.

##### **4.1 Η θεωρία της ενδομήτριας έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.**

Η υπόθεση της ενδομήτριας έκθεσης στα ανδρογόνα έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς ανάλυσης και ενισχύεται συνεχώς από κλινικές και εργαστηριακές μελέτες (157-161). Η αυξημένη έκθεση σε ανδρογόνα κατά την ενδομήτριο ζωή φαίνεται να προγραμματίζει την μόνιμη έκφραση φαινοτύπου όμοιου με αυτόν του ΣΠΩ (141,162-165).

Κατάλληλα για τις μελέτες των μεταβολικών και αναπαραγωγικών επιπτώσεων της έκθεσης σε περίσσεια ανδρογόνων φαίνεται να είναι οι προγεννητικά αρρενοποιημένοι Rhesus πίθηκοι, καθώς εμφανίζουν παρόμοια χρονολογικά πρότυπα αναπαραγωγικής λειτουργίας και ανάπτυξης με τους

ανθρώπους (166). Στα πειραματόζωα αυτά, οι ΣΠΩ-φαινότυποι μπορούν να προκληθούν μετά από έγχυση 10-15mg προπριονικής τεστοστερόνης στο ενδομήτριο περιβάλλον θηλέων εμβρύων για 15-35 ημέρες, ξεκινώντας από την 40<sup>η</sup>-60<sup>η</sup> ή την 100<sup>η</sup>-115<sup>η</sup> ημέρα κύησης και επιτυγχάνοντας επίπεδα τεστοστερόνης όμοια με αυτά των αρρένων εμβρύων (167). Οι Rhesus πίθηκοι που εκτέθηκαν σε περίσσεια ανδρογόνων στην ενδομήτριο ζωή εμφάνισαν στην ενήλικη ζωή χαρακτηριστικά ωοθηκικής και επινεφριδιακής υπερανδρογοναιμίας και ωοθηκική δυσλειτουργία με διογκωμένες πολυκυστικές ωοθήκες, με αποτέλεσμα τη μείωση των καταμήνιων κύκλων περίπου στο 50% (144, 166, 168-170).

Αρκετές μελέτες χρησιμοποιούν ως μοντέλα-πρότυπα πρόβατα εδώ και αρκετά χρόνια. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της ανάπτυξής τους είναι κατάλληλος, ενώ η ωοθηκική διαφοροποίηση και η νευροενδοκρινολογία του καταμήνιου κύκλου εμφανίζουν ομοιότητες με αυτές των ανθρώπων (171). Τα στοιχεία αυτών των ερευνών, αποκαλύπτουν ότι η ενδομήτρια έκθεση προβάτων σε τεστοστερόνη, προκάλεσε υπερέκκριση της LH λόγω αρνητικής παλίνδρομης υποθαλαμικής ρύθμισης, επιμένουσες κύστες, συχνή ανωοθυλακιορρηξία και αντίσταση στην ινσουλίνη, ιδίως στις περιπτώσεις προβάτων με ενδομήτριο περιορισμό της ανάπτυξης (growth restriction) και αντισταθμιστική αύξηση του βάρους τους μετά τη γέννα (141, 165, 172).

Σύμφωνα με κλινικές έρευνες, οι έγκυες γυναίκες με ΣΠΩ και αυξημένες συγκεντρώσεις ανδρογόνων στο πλάσμα κατά τη μεσότητα της κύησης παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υπερέκθεσης του εμβρύου σε ανδρογόνα (173). Συγκεκριμένα, σε πρόσφατη μελέτη αναδείχτηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ολικής τεστοστερόνης στο πλάσμα της μητέρας κατά την 18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και των συγκεντρώσεων της AMH (δείκτη των αναπτυσσόμενων σε αριθμό ωοθηκικών κύστεων) και της FSH (αρνητική συσχέτιση) στην εφηβεία, υποστηρίζοντας την πιθανότητα τα ανδρογόνα της μητέρας είτε τα οιστρογόνα μέσω της περιφερικής αρωματοποίησης, να επηρεάζουν την ωοθηκική λειτουργία των απογόνων τους (174, 175). Τα παραπάνω στοιχεία, ενισχύουν την πιθανότητα, τα κορίτσια γυναικών με ΣΠΩ να έχουν αυξημένη δεξαμενή ωοθυλακίων ήδη από την περίοδο που ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη είναι ακόμη

ανενεργός (174). Παρά τα πειστικά πειραματικά και κλινικά δεδομένα πρόσφατη μελέτη κοόρτης απέτυχε να αποδείξει οποιαδήποτε σχέση μεταξύ ενδομήτριας έκθεσης σε ανδρογόνα κατά την κύηση και το ΣΠΩ σε υγιή πληθυσμό έφηβων κοριτσιών (176).

#### 4.1.1 Πιθανοί μηχανισμοί έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.

- Διαταραχή στον μητροπλακουντιακό φραγμό.

Το έμβρυο προστατεύεται από τα ανδρογόνα της μητέρας μέσω αυξημένων επιπέδων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) που παρατηρούνται στην κύηση και δεσμεύουν τα ανδρογόνα και μέσω της δραστηριότητας της αρωματάσης του πλακούντα που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Ο προστατευτικός αυτός μηχανισμός μπορεί να διαταραχθεί εάν η παραγωγή της SHBG ή/και της αρωματάσης είναι χαμηλότερη από τα φυσιολογικά επίπεδα λόγω γενετικών ή άλλων επιδράσεων. Μελέτες συσχέτισης σε Ελληνίδες με ΣΠΩ προτείνουν το γονίδιο της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης και το γονίδιο της αρωματάσης CYP19-9 ως υποψήφια γονίδια συσχέτισης με το σύνδρομο. Πρόσφατα, περιγράφηκε η συσχέτιση ενός πολυμορφισμού στην περιοχή του εκκινητή του γονιδίου της SHBG [του SHBG(TAAAA)<sub>n</sub>] με το ΣΠΩ και μειωμένα επίπεδα SHBG (177, 178), ενώ το γονίδιο της αρωματάσης έχει προταθεί ως γενετικός τροποποιητής του φαινοτύπου του συνδρόμου (179, 180). Συγκεκριμένα, ο VNTR πολυμορφισμός του γονιδίου της αρωματάσης [του CYP19 (TTTA)<sub>n</sub>] σχετίστηκε με τη δραστηριότητα της αρωματάσης και αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων σε γυναίκες με ΣΠΩ. Ως εκ τούτου, πιθανολογείται ότι τα έμβρυα γυναικών φορέων των πολυμορφικών γονοτύπων πιθανά εκτίθενται σε αυξημένο κίνδυνο έκθεσης σε περίσσεια ανδρογόνων.

- Εμβρυική υπερέκκριση ανδρογόνων.

Μια άλλη εστία υπερέκκρισης ανδρογόνων θα μπορούσε να αποτελέσει η εμβρυική ωοθήκη (και/ή εμβρυικά επινεφρίδια). Ορισμένες μελέτες συνάδουν με την υπόθεση ότι η εμβρυική ωοθήκη είναι γενετικά προδιατεθειμένη να εκκρίνει υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων από το φυσιολογικό και να επιδρά

στα κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης όπως η εμβρυική ζωή, η πρώιμη νηπιακή ηλικία κατά την οποία ενεργοποιείται παροδικά ο υποθαλαμο-υπόφυσιτικός άξονας. Η υπερέκκριση ανδρογόνων σε αυτά τα στάδια της ανάπτυξης, μπορεί να οδηγήσει στον προγραμματισμό μεταβολικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών του ΣΠΩ. Στοιχεία μελετών των ανθρώπινων εμβρυικών ωοθηκών υποδεικνύουν ότι μηχανισμός παραγωγής και δράσης των ανδρογόνων στην ωοθήκη είναι παρόν στην εμβρυική ζωή. Συγκεκριμένα, η πρωτεϊνική έκφραση του κυτοχρώματος P450c17, ένζυμο κλειδί στην παραγωγή ανδρογόνων, έχει καταγραφεί στα ωοθυλάκια των εμβρυικών ωοθηκών (144) καθώς και αφθονία ανδρογονικών υποδοχέων κατά την μορφοποίηση των ωοθυλακίων στην εμβρυική ωοθήκη (181).

- Μεταβολές στον εμβρυικό άξονα υποθαλάμου–υπόφυσης-ωοθηκών.

Μεταβολές στην ανάπτυξη και λειτουργία του εμβρυικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών μπορεί να συνεισφέρουν στην ενδομήτρια έκθεση του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων. Συγκεκριμένα, αυξημένες συγκεντρώσεις LH και ανδρογόνων παρατηρήθηκαν σε πρόωρα θήλαα νεογνά (25<sup>ης</sup>-29<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης) και σύμφωνα με τον συγγραφέα, η προσωρινή αυτή αρρενοποίηση προκλήθηκε πιθανά από την ασυνήθιστα υψηλή ώση της LH που με τη σειρά της προκάλεσε αυξημένες συγκεντρώσεις ανδρογόνων (182). Θα μπορούσε λοιπόν να υποτεθεί, ότι η υπερέκθεση σε ανδρογόνα οδήγησε πιθανά σε μακροπρόθεσμες αλλαγές στην ωοθηκική λειτουργία και φυσιολογία ωστόσο, η παρακολούθηση των πληθυσμών αυτών στο μέλλον θα βοηθήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

- Γενετικοί παράγοντες

Οι γενετικοί παράγοντες πιθανά επηρεάζουν την ενδομήτρια έκθεση σε περίσσεια ανδρογόνων. Εκτός των γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τον εμβρυοπλακουντιακό φραγμό, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη οικογενή παράγοντα ρύθμισης της παραγωγής ανδρογόνων στο ΣΠΩ (183, 184). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί μελέτη οικογενειών με ΣΠΩ όπου οι μισές αδελφές των γυναικών με το σύνδρομο ήταν πάσχουσες με τρόπο που συνάδει στον αυτοσωμικό επικρατές τύπο κληρονομικότητας (30, 185).

Παράλληλα, οι Yildiz et al., το 2003 δημοσίευσαν αποτελέσματα αυξημένης επίπτωσης σε εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη, Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και δυσλιπιδαιμίας στους πατεράδες και /ή αδελφούς των γυναικών με ΣΠΩ (186). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν στοιχεία που ενισχύουν την γενετική βάση του συνδρόμου, προς το παρόν κανένα συγκεκριμένο γονίδιο ή ομάδα γονιδίων δεν εμφανίζεται με σταθερό ρυθμό στους διαφορετικούς πληθυσμούς. Χαρακτηριστικά, ενώ ο VNTR πολυμορφισμός στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της ινσουλίνης αρχικά σχετίστηκε με το ΣΠΩ σε αρκετές μελέτες (187), η συσχέτιση δεν κατάφερε να επιβεβαιωθεί από μετέπειτα μελέτες σε μεγαλύτερες πληθυσμιακές ομάδες (188). Υπάρχουν αντικειμενικές δυσκολίες στην προσπάθεια ανεύρεσης γονιδίων που συμβάλουν στην ανάπτυξη του ΣΠΩ όπως η μεγάλη ποικιλία στο φαινότυπο του συνδρόμου και η μεγάλη ετερογένεια των μελετών, ιδιαίτερα όταν τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται δεν είναι ίδια. Επίσης, δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένος ανδρικός φαινότυπος και η διαταραχή εκφράζεται κλινικά μόνο σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας.

Έως τώρα έχουν μελετηθεί περίπου 100 υποψήφια γονίδια, μεταξύ αυτών γονίδια που ρυθμίζουν τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών και γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε νέες μελέτες εξετάζονται συνεχώς νέα υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με ΣΠΩ και ένας σημαντικός αριθμός εξ' αυτών φαίνεται να συμβάλλουν έστω και σε περιορισμένο βαθμό στον φαινότυπο του συνδρόμου (189-191). Η γενετική βάση του συνδρόμου έχει ήδη επανεξεταστεί σε αρκετές μελέτες τύπου-review. Τα γονίδια που μελετώνται για πιθανή συσχέτισή τους με το σύνδρομο μπορούν να ομαδοποιηθούν αδρά σε 4 κατηγορίες (192, 193):

- Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση των γοναδοτροπινών (πχ. γονίδιο του υποδοχέα της GNRH, γονίδιο του υποδοχέα της LH κτλ.),
- γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και δράση των ανδρογόνων (πχ. hsd17b6, CYP19, CYP11A1, CYP17, CYP21 κτλ.),
- γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης (πχ. γονίδιο αδιπονεκτίνης ADIPOQ, PPARγ κτλ.),

- γονίδια που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση (πχ. γονίδιο της φολλιστατίνης) και
- γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία και την ενεργειακή ομοιόσταση.

#### **4.2 Πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης ενδομήτριου προγραμματισμού του ΣΠΩ ως συνέπεια έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.**

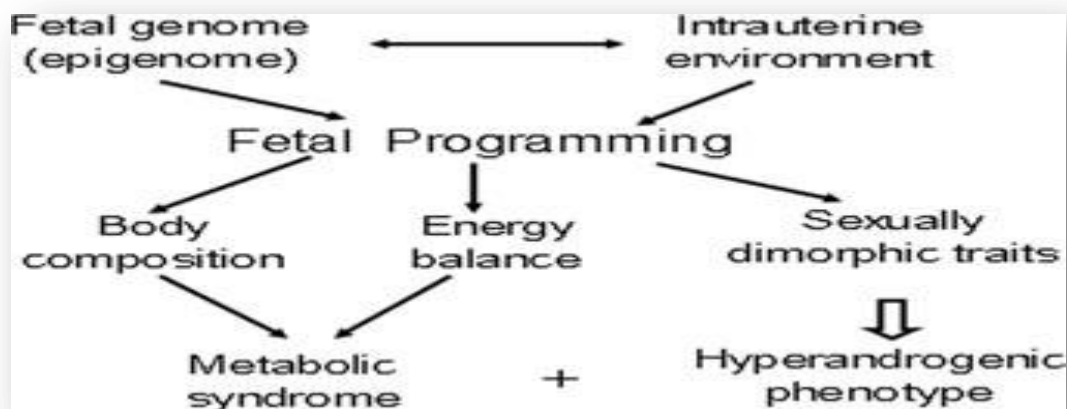
##### 1<sup>η</sup> Υπόθεση

Ο ενδομήτριος προγραμματισμός του συνδρόμου από υπερέκθεση του εμβρύου στα ανδρογόνα πιθανά σχετίζεται με το φαινόμενο του φυλετικού διμορφισμού. Οι ιστοί που μπορεί να δρουν ως ισχυροί μεταγραφικοί παράγοντες, υπό την επίδραση περίσσειας ανδρογόνων κατευθύνονται σε έναν περισσότερο ανδρικό φαινότυπο αναφορικά με τα αναπαραγωγικά νευροενδοκρινολογικά και μεταβολικά μονοπάτια. Η 8<sup>η</sup> έως 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης θεωρείται καθοριστική για τη σεξουαλική διαφοροποίηση γιατί κατά την περίοδο αυτή τα άρρενα έμβρυα παρουσιάζουν κορυφαία αύξηση στα επίπεδα τεστοστερόνης (με μεγαλύτερα αυτά της 16<sup>ης</sup> εβδομάδας). Παράδειγμα αποτελεί ο φαινότυπος θηλυκών τρωκτικών, όπου μετά την καταστολή της αρωματάσης και την επακόλουθη πρόκληση υπερανδρογοναιμίας, εμφάνισαν στις ωοθήκες τους κύτταρα θήκης όμοια με τα κύτταρα Leydig (194).

##### 2<sup>η</sup> Υπόθεση

Σύμφωνα με άλλη εναλλακτική υπόθεση, οι επιγενετικοί παράγοντες θεωρείται ότι εμπλέκονται στον ενδομήτριο προγραμματισμό του συνδρόμου. Ο όρος 'επιγενετικοί παράγοντες' αναφέρεται σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων προσκληθείσες από περιβαλλοντικούς παράγοντες χωρίς αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Παράδειγμα τροποποίησης του DNA αποτελεί η μεθυλίωση των κατάλοιπων κυτοσίνης εντός CpG δινουκλεοετιδίων στους εκκινητές των γονιδίων (195). Οι επιγενετικές αλλαγές πιθανά να κληρονομούνται από τη μία γενιά στην άλλη, ανεξάρτητα από επιπλέον περιβαλλοντική τροποποίηση, δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο από

μητέρα σε κόρη, εξηγώντας εν μέρει και την οικογενή εμφάνιση του συνδρόμου (196). Πιθανόν, επιγενετικά φαινόμενα να προκαλούνται και από την ενδομήτρια έκθεση στα ανδρογόνα. Ένα πιθανό μονοπάτι θα μπορούσε να είναι η ενίσχυση της παραγωγής του μετατρεπτικού παράγοντα (TGF), μιας β ρυθμιστικής πρωτεΐνης εξωκυττάριας ουσίας που έχει τη δυνατότητα να διαταράσσει την ωθητική διαφοροποίηση προκαλώντας φαινότυπο πολυκυστικών ωθηκών (197). Η υπόθεση αυτή είναι αρκετά ελκυστική καθώς η έκθεση σε ανδρογόνα αυξάνει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών (198) ενώ και άλλα μέλη της οικογένειας της TGF-β συμπεριλαμβανομένης της (AMH) αντιμυλλέριου ορμόνης φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση της CYP 17 ενός κύριου ενζύμου στην παραγωγή ανδρογόνων (199).



Εικόνα 6. Επιγενετικά φαινόμενα και μηχανισμοί φυλετικού δυσμορφισμού εμπλέκονται πιθανά στον ενδομήτριο προγραμματισμό του ΣΠΩ.

### 3<sup>η</sup> Υπόθεση

Η σχέση υπερινσουλιναιμίας και παχυσαρκίας οδήγησε στην θεμελίωση μιας νέας υπόθεσης, με σκοπό την ερμηνεία της προέλευσης του ΣΠΩ και ονομάζεται θεωρία της επεκτασιμότητας του λιπώδους ιστού (adipose expandability theory) (200, 201). Η θεωρία αυτή περιγράφει πως η ανάπτυξη



αντίστασης της ινσουλίνης που προκαλείται από παχυσαρκία, καθορίζεται από την ικανότητα του ατόμου να επεκτείνει τη λιπώδη μάζα με τη μορφή αποθηκευμένων λιπιδίων αντί της απόλυτης ποσότητας λίπους κάθε αυτής (202, 203). Πρόσφατα, οι Ibanez et al., χρησιμοποίησαν την παραπάνω υπόθεση για να εξηγήσουν πως ο φαινότυπος του ΣΠΩ μπορεί να είναι αποτέλεσμα παραγόντων όπως η παχυσαρκία, η περιορισμένη ανάπτυξη και η ενδομήτρια έκθεση στα ανδρογόνα (200). Συγκεκριμένα, η πρώιμη διαταραχή στην ανάπτυξη πιθανά οδηγεί σε αυθόρμητη προσπάθεια επανάκτησης βάρους νωρίς στην νηπιακή ηλικία, διαδικασία που προδιαθέτει στον περιορισμό επέκτασης του υποδόριου λίπους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το υποδόριο λίπος σχετίζεται με τη ρύθμιση των ελεύθερων λιπαρών οξέων που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση του μεταβολικού συνδρόμου. Συνεπώς, η περιορισμένη ικανότητα επέκτασης του υποδόριου λίπους και η αποτυχία ασφαλούς αποθήκευσής του, οδηγούν μακροπρόθεσμα σε αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερανδρογοναιμία και τελικά σε φαινότυπο ΣΠΩ (200). Βασισμένη στην ίδια θεωρία είναι και η άποψη ότι εφόσον η πλειοψηφία της επέκτασης του λιπώδους ιστού στα έμβρυα πραγματοποιείται υποδέρια, τυχόν περιορισμός στην επαρκή επέκταση του λιπώδους ιστού σε κρίσιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης θα μπορούσε να οδηγήσει σε μακροπρόθεσμη πρόκληση αντίστασης στην ινσουλίνη όταν η ημερήσια διαιτητική πρόσληψη ξεπεράσει τις ανάγκες του οργανισμού (201). Η κατάσταση αυτή είναι εμφανής σε περιπτώσεις νεογνών μικρών για την ηλικία κύησης (IUGR), όπου παρατηρείται αντισταθμιστική προσπάθεια κάλυψης της ελλιπούς ανάπτυξης- 'catch up growth' (204, 205). Επιγραμματικά, σύμφωνα με την ανωτέρω υπόθεση, ο περιορισμός της ανάπτυξης στην εμβρυϊκή ζωή σε συνδυασμό με την προσπάθεια επανάκτησής της κατά την νηπιακή ηλικία πιθανά οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, σπλαχνική παχυσαρκία (206, 207), αύξηση των επιπέδων της ανδροστενεδιόνης και ελάττωση των επιπέδων της SHBG στην παιδική ηλικία προδιαθέτοντας στην πρόκληση του ΣΠΩ (208, 209).

Η ενδομήτρια έκθεση σε περίσσεια ανδρογόνων θα μπορούσε να σχετιστεί με την υπόθεση της επέκτασης λιπώδους ιστού. Πρόσφατες μελέτες σε τρωκτικά υποστηρίζουν ότι η περίσσεια ανδρογόνων υποκινεί την διαφοροποίηση και

τον πολλαπλασιασμό των προ-λιποκυττάρων με διαφορετικό τρόπο στην κάθε αποθήκη λίπους (210). Επίσης, η *in vitro* θεραπεία των προ-λιποκυττάρων της επιδιδυμίδας με τεστοστερόνη και διυδροτεστοστερόνη (DHT) ανέστειλε την δράση της glyceraldehydes3-3phosphate dehydrogenase (GAPDH0, adipose-ειδικό ένζυμο) (211), ενώ η τεστοστερόνη κατέστειλε την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και της λιπιδικής πρόσληψης από τα λιποκύτταρα (212). Τα παραπάνω στοιχεία συνάδουν με την μελέτη του Singh το 2006, σύμφωνα με την οποία τα δύο υποψήφια ανδρογόνα, η τεστοστερόνη και η DHT, αναστέλλουν την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων μέσω μοριακών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση του ανδρογονικού υποδοχέα AR με την β-κατενίνη και την ενεργοποίηση του μονοπατιού σήματος Wnt μέσω ενεργοποίησης του TCF4 (213). Θα μπορούσε επομένως να υποτεθεί ότι η ενδομήτρια έκθεση του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων κατά τη διάρκεια κρίσιμων σταδίων ανάπτυξης μειώνει την λιπογένεση. Έτσι, λιγότερα πρόδρομα λιποκύτταρα είτε μικρότερα λιποκύτταρα είναι διαθέσιμα για την επέκταση του λιπώδους ιστού του εμβρύου, η οποία κατά 90% πραγματοποιείται υποδόρια. Η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του υποδόριου λίπους συμβάλει πιθανά στον περιορισμό και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η υπόθεση ενισχύεται περαιτέρω από στοιχεία μελετών σε πρόβατα που εκτέθηκαν κατά την εμβρυϊκή ζωή σε περίσσεια ανδρογόνων και παρουσίασαν χαμηλό βάρος γέννησης (214). Νεογέννητα αγόρια, λόγω έκθεσης σε υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων στην εμβρυϊκή ζωή, παρουσίασαν λιγότερη ποσότητα λίπους σε σχέση με τα νεογέννητα θήλεα (215), ενώ μελέτες σε νεογνά με ενδομήτρια διαταραχή ανάπτυξης, έδειξαν ότι η υποδόρια αύξηση λίπους περιορίστηκε περαιτέρω στην προσπάθεια ανάκτησης μάζας (216). Έτσι, σύμφωνα με τη θεωρία της επέκτασιμότητας του λιπώδους ιστού, η δυνατότητα ασφαλούς αύξησης της μάζας τους είναι περιορισμένη και μακροπρόθεσμα είναι πιθανή η πρόκληση λιποτοξικότητας και η εμφάνιση ΣΠΩ-φαινοτύπου.

## 5.Η ΦΥΛΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΣΦΑΙΡΙΝΗ (SHBG) ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ SHBG

### **5.1 Εισαγωγή.**

Η ύπαρξη της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης προτάθηκε το 1958 κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της Daughaday αναφορικά με τη συνδεσιμότητα της τεστοστερόνης στο πλάσμα και αποδείχθηκε ευθαρσώς το 1966 από τους Mercier et al.. Η φυλοδεσμευτική σφαιρίνη είναι μία ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη μεταφοράς στο πλάσμα και στους ανθρώπους κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, της SHBG, τοποθετημένο στο χρωμόσωμα 17p13.1 (217). Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στα ανδρογόνα, τεστοστερόνη και διυδροτεστοστερόνη, (DHT) από ότι στην οιστραδιόλη (218, 219). Ο διμερισμός της ανθρώπινης φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης και οι θέσεις σύνδεσης των στεροειδών είναι διακριτές ενώ παράλληλα και τα δύο μονομερή εντός του ομοδιμερικού συγκροτήματος εμφανίζουν ίδια ενεργότητα και ικανότητα σύνδεσης με στεροειδή. Τα επίπεδα της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης βρίσκονται υπό την επίδραση φυλετικού δυμορφισμού, με αυτά των γυναικών να είναι δύο φορές υψηλότερα σε σύγκριση με των ανδρών (220). Ο τρόπος δράσης της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης πιθανά διαφοροποιείται κατά την κύηση, τη νεογνική ηλικία και την εφηβεία. Πιο αναλυτικά, η ανθρώπινη φυλοδεσμευτική σφαιρίνη είναι παρούσα στο εμβρυικό αίμα και στο αμνιακό υγρό κατά τη μεσότητα της κύησης (217). Τα επίπεδα της μητρικής SHBG αυξάνονται έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, παραμένοντας σταθερά στη μετέπειτα πορεία της (221, 222). Στα νεογνά, πιθανά εξαιτίας της μεταγεννητικής ωρίμανσης των ορμονών του θυρεοειδούς, η SHBG αυξάνεται στα αγόρια όσο και στα κορίτσια (223), ενώ παραμένει σε σταθερά επίπεδα κατά τη μέση παιδική ηλικία (224).

Η λειτουργία της θεωρήθηκε αρχικά ότι περιοριζόταν στην ρύθμιση των ελεύθερων στεροειδών του φύλου στους ιστούς στόχους. Σύμφωνα με την υπόθεση 'των ελευθέρων ορμονών', μόνο τα στεροειδή που δεν είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν και διαχέονται παθητικά στους ιστούς στόχους. Η δίοδος των ελεύθερων στεροειδών ορμονών σε συγκεκριμένους ιστούς στόχους πιθανά επηρεάζεται και από άλλους

παράγοντες, όπως η αγγειοβρίθεια των ιστών, η αιματική ροή, η κυτταρική σύνθεση και η περιεκτικότητα του κυττάρου σε λίπος (225). Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η SHBG συμμετέχει στην στοχευόμενη μεταφορά των συνδεδεμένων σε αυτή στεροειδών μέσω μηχανισμών ενδοκύττωσης είτε ακόμα ότι δρά η ίδια ως πρωτεΐνη σύνδεσης για υποδοχείς του πλάσματος με προοπτική σήμανσης (226-228).

## **5.2 Η SHBG και οι ορμόνες του φύλου.**

Ένα πολύ μικρό ποσοστό των βιολογικά ενεργών στεροειδών ορμονών βρίσκονται ελεύθερα στο πλάσμα. Στην περίπτωση της κορτιζόλης το ποσοστό είναι περίπου 5-10% ενώ για την τεστοστερόνη και οιστραδιόλη κυμαίνεται μεταξύ 1 και 3%. Η τεστοστερόνη συνδέεται εν μέρει με αλβουμίνη με την οποία έχει χαμηλή συγγένεια αλλά υψηλή ικανότητα σύνδεσης. Μικρή ποσότητα της τεστοστερόνης συνδέεται και με την CBG (corticosteroid binding globulin), ωστόσο το κύριο κλάσμα της συνδέεται στο πλάσμα με την SHBG, με συνδεσιμότητα αντιστρέψιμη στους 37°C. Αντίθετα, η οιστραδιόλη συνδέεται με μικρότερη συγγένεια στην SHBG και μεγαλύτερη με αλβουμίνη σε σύγκριση με την τεστοστερόνη, ενώ δεν συνδέεται σημαντικά στην CBG. Ισχύει λοιπόν, ο κανόνας ότι όσο πιο ισχυρό το ανδρογόνο τόσο καλύτερη η σύνδεση με την φυλοδεσμευτική σφαιρίνη. Έτσι, η διυδροτεστοστερόνη συνδέεται 3 φορές ισχυρότερα από την τεστοστερόνη και σε μερικά συστήματα θεωρείται ισχυρότερο ανδρογόνο, ενώ η Δ4-ανδροστενδιόνη ως ασθενέστερο ανδρογόνο χρησιμοποιεί μόνο το 4% της συνδεσμικής ικανότητας. Τέλος, ενώ η οιστραδιόλη ως βιολογικά ενεργό οιστρογόνο συνδέεται με την SHBG, τα ασθενέστερα οιστρογόνα, οιστριόλη και οιστρόνη, δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη ικανότητα σύνδεσης.

### **5.3 Παράγοντες ρύθμισης των επιπέδων φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης.**

Η ρύθμιση των συγκεντρώσεων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης θεωρήθηκε αρχικά υπό τον έλεγχο των στεροειδών ορμονών του φύλου (221). Από το 1968, επικρατεί η άποψη ότι η αύξηση των ανδρογόνων προκαλεί μείωση των επιπέδων της SHBG, ενώ η περίσσεια οιστρογόνων αύξηση των επιπέδων της (229, 230). Ωστόσο, σήμερα έχει εδραιωθεί η άποψη της πολυπαραγοντικής ρύθμισης της SHBG. Ορμόνες όπως η αυξητική, ο αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (IGF)-1 και η ινσουλίνη, έχουν προταθεί ως πιθανοί ρυθμιστές της (231-233). Η ινσουλίνη φαίνεται να έχει ανασταλτική επίδραση. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια HepG2 κυττάρων ηπατοβλαστώματος αποκάλυψε ότι η ινσουλίνη δρα ως ισχυρός αναστολέας της βασικής παραγωγής φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (234, 235). Επιπλέον, αναστολή στη δράση της ινσουλίνης από διαζοξίδη οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα SHBG, υποδεικνύοντας την ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής της από την ινσουλίνη (236). Πρόσφατες μελέτες παρέχουν νέα δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η ινσουλίνη εμφανίζει περιορισμένη δυνατότητα μείωσης της ηπατικής παραγωγής της SHBG και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-6 και ο TNF- $\alpha$ , συνεισφέρουν έμμεσα, μέσω της μείωσης των επιπέδων του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα (HNF-4), στην μείωση της έκφρασης της σφαιρίνης στο ήπαρ παχύσαρκων ατόμων. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν εν μέρει την αύξηση της παραγωγής της SHBG στο πλάσμα από τις θυρεοειδικές ορμόνες που ως γνωστό αυξάνουν τα επίπεδα του HNF-4 στο ήπαρ (237).

### **5.4 Η ρόλος της SHBG στο ΣΠΩ.**

Τα χαμηλά επίπεδα της SHBG σε γυναίκες με ΣΠΩ θεωρείται ότι αντανακλούν μεταβολικές διαταραχές. Ένας πιθανός μηχανισμός θεωρείται η μείωση της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης από υψηλά επίπεδα ινσουλίνης με επακόλουθη αύξηση των ελεύθερων επιπέδων ανδρογόνων στην κυκλοφορία (238). Η παραπάνω υπόθεση στηρίζεται σε στοιχεία γυναικών με ΣΠΩ και ιδιαίτερα σε υπέρβαρων και παχύσαρκων, που εμφάνισαν αντίσταση στην ινσουλίνη και αντισταθμιστική υπερινσουλιναίμια (239-241). Συγκεκριμένα, γυναίκες με ΣΠΩ και υπερινσουλιναίμια παρουσίασαν μείωση της SHBG σε ηπατικό επίπεδο.

Χαρακτηριστική είναι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ΣΔ τύπου 2 σε γυναίκες με ΣΠΩ, που οδήγησε στον πρόσφατο καθορισμό του συνδρόμου, από το Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη και την Αμερικάνικη Διαβητολογική Ένωση, ως σημαντικού παράγοντα συσχέτισης με τη νόσο (242). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε μελέτη του Lemieux, γυναίκες με ΣΠΩ που υποβλήθηκαν σε λαπαροσκοπικό ωθητικό καυτηριασμό, αποκατέστησαν τα επίπεδα ανδρογόνων και φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης χωρίς όμως αντίστοιχη αποκατάσταση της ευαισθησία στην ινσουλίνη (238, 243).

Αρκετές είναι και οι αναφορές σε γενετικές μεταλλάξεις στις ρυθμιστικές και κωδικοποιούσες αλληλουχίες της ανθρώπινης SHBG, που πιθανά επηρεάζουν την παραγωγή και/ή τη λειτουργία της (244). Χαρακτηριστικά, ο σημειακός πολυμορφισμός που ανιχνεύθηκε στο εξώνιο 8 (rs6259), σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (245) και του ενδομητρίου (246), ενώ οι φορείς των αλληλόμορφων AA ή AG σχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα SHBG και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ τύπου 2 (247). Αντίστοιχα, φορείς των αλληλίων CC ή CT του πολυμορφισμού rs6257 στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου της SHBG σχετίστηκαν με χαμηλότερα επίπεδα SHBG, υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και ΣΔ τύπου 2 (247, 248). Άλλα παραδείγματα αποτελούν ο σημειακός πολυμορφισμός rs6258 που προκαλείται από την υποκατάσταση της Σερίνης 156 σε Προλίνη (249) και φαίνεται να μειώνει την συνδεσμική ικανότητα της τεστοστερόνης στην SHBG και ο σημειακός πολυμορφισμός rs179941 στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της SHBG που σχετίστηκε πρόσφατα με τη ρύθμιση των επιπέδων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης.

### **5.5 Ο (TAAAA)<sub>n</sub> πολυμορφισμός της SHBG.**

Ο εκτενέστερα μελετημένος πολυμορφισμός της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης είναι ο πεντανουκλεοτιδικός microsatellite πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> στον εκκινητή του γονιδίου της. Οι Hageveen et al., το 2001 ταυτοποίησαν την παρουσία του, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ότι τα μεγάλα αριθμού επαναλήψεων (long) αλληλία μειώνουν τη μεταγραφική δραστηριότητα της σφαιρίνης in vitro. Μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ, αποκάλυψαν υψηλότερη

συχνότητα εμφάνισης των αλληλίων με περισσότερες των 8 επαναλήψεων (long) και χαμηλότερα επίπεδα SHBG στους φορείς των γονοτύπων αυτών (177, 178, 250, 251). Έτσι, ο πολυμορφισμός (TAAAA) πιθανά συνδέει τη γενετική βάση με την εξελικτική θεωρία του ΣΠΩ. Συγκεκριμένα, στοιχεία σε κορίτσια στην εφηβική ηλικία με πρώιμη εμμηναρχή και χαρακτηριστικά συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, αποκάλυψαν συσχέτιση των μεγάλου αριθμού επαναλήψεων αλληλίων (>8 επαναλήψεις) με βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ μετά από ετήσια θεραπεία με μεθορμίνη (252). Μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, φορείς των μεγάλου αριθμού επαναλήψεων αλληλίων (>8 επαναλήψεις), εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ελεύθερης τεστοστερόνης ενώ μεταξύ εκείνων που υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειογραφία, οι φορείς των μεγάλου αριθμού επαναλήψεων αλληλίων αλληλίων σχετίστηκαν με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (253). Πρόσφατα, η παρουσία μικρού αριθμού επαναλήψεων αλληλίων (<8) στους άνδρες, σχετίστηκε με την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου αν και δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και των επιπέδων της SHBG στο πλάσμα (254). Αν και οι μελέτες in vitro έδειξαν ότι το αλληλίο με 6 επαναλήψεις είχε την χαμηλότερη μεταγραφική δραστηριότητα (177), οι κλινικές μελέτες εμφάνισαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (250, 251, 255, 256). Η ασυμφωνία μεταξύ εργαστηριακών και κλινικών μελετών μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από το ότι η αδρανοποίηση του αλληλίου με 6 επαναλήψεις στην μεταγραφή του γονιδίου της SHBG εξαρτάται από την παρουσία της SP1 θέσης σύνδεσης που σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργήσει ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής. Συμπερασματικά, το καθαρό αποτέλεσμα της μεταγραφής εξαρτάται από την αφθονία των παραγόντων που συνθέτουν το συγκρότημα της θέσης σύνδεσης SP1 (257).

## 6. Η ΑΡΩΜΑΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ (CYP 19)

### **6.1 Εισαγωγή.**

Η αρωματάση είναι μέλος της οικογένειας ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (subfamily 19) και καταλύει τη μετατροπή των C-19 ανδρογόνων σε C-18 οιστρογόνα (258). Είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ ανδρογόνων και οιστρογόνων στα δύο φύλα, βρίσκεται υπό την θετική επίδραση της FSH και συναντάται σε διαφορετικούς ιστούς όπως τα επινεφρίδια, οι μύες, ο πλακούντας, το δέρμα, ο λιπώδης ιστός και το νευρικό σύστημα. Η δομή της αρωματάσης αποτελείται από 12 μείζονες α-έλικες (A-L) και 10 β-σκέλη (1-10) κατανεμημένα σε ένα μείζων και τρία ελάσσονα φύλλα και έχει την χαρακτηριστική δομή του κυτοχρώματος P450 (259). Το γονίδιο της αρωματάσης βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 15 στην θέση 15;21.1 και είναι μεγέθους 130Kb (260). Τα 10 εξώνιά του, εννέα εκ των οποίων κωδικοποιούνται, τοποθετούνται σε απόσταση 30Kb μεταξύ τους (261). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι το mRNA της αρωματάσης που εκφράζεται στον λιπώδη ιστό, τις ωοθήκες, το εμβρυικό ήπαρ και τον εγκέφαλο παρουσιάζει διαφορές στο αμετάφραστο εξώνιο I σε σχέση με το mRNA της αρωματάσης του πλακούντα (262-266). Αυτός ο τύπος mRNA αρωματάσης εντοπίζεται αποκλειστικά στον πλακούντα και είναι τροφοβλαστικής φύσης.

### **6.2 Αρωματάση και ΣΠΩ.**

Η αρωματάση του πλακούντα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενδομήτρια προστασία του θήλεος εμβρύου από υπερέκθεση στα ανδρογόνα μέσω της διαδικασίας αρωματοποίησής τους σε οιστρογόνα. Συνεπώς, ανεπαρκής δράση της αρωματάσης πιθανά επιτρέπει την έκθεση των θηλέων εμβρύων σε περίσσεια ανδρογόνων. Αρκετές μελέτες συνηγορούν υπέρ αυτής της υπόθεσης. Συγκεκριμένα, έχει ήδη αναφερθεί πως η καταστολή της λειτουργίας της αρωματάσης στα θήλαα τρωκτικά (rodents) προκάλεσε μεταβολή του λόγου ανδρογόνων/οιστρογόνων υπέρ των ανδρογόνων, ενώ οι ωοθήκες τους χαρακτηρίστηκαν από αυξημένο διάμεσο ιστό και παρουσία



κυττάρων θήκης όμοιων με τα κύτταρα Leydig (196). Επίσης, ασθενείς με έλλειψη αρωματάσης, λόγω σπάνιας απώλειας λειτουργίας της, παρουσίασαν μετατροπή της ισορροπίας ανδρογόνων–οιστρογόνων προς την πλευρά των ανδρογόνων με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των ωθηθικών κυττάρων θήκης προς έναν φαινότυπο υπερανδρογοναιμίας (267-269) και σε ανοσοιστοχημικές μελέτες σε πολυκυστικές ωθήκες δεν ανιχνεύτηκε επαρκής ποσότητα αρωματάσης στα θυλάκια (270).

Η ανεπαρκής δράση της αρωματάσης μπορεί να οφείλεται σε πολυμορφισμούς του γονιδίου CYP19-9 που δρουν με τη σειρά τους σαν γενετικοί μετατροπείς υπερανδρογοναιμίας προγραμματίζοντας την ανάπτυξη του συνδρόμου στην ενήλικη ζωή. Περιγραφές προηγούμενων μελετών σχετικά με μεταλλάξεις στο γονίδιο της αρωματάσης απέδειξαν ότι παραλλαγές σε αυτό το μονοπάτι βιοσύνθεσης οιστρογόνων μπορεί πράγματι να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του ΣΠΩ (267, 270, 271-273). Οι ως τώρα περιγραφόμενες μεταλλάξεις της αρωματάσης βρίσκονται στα εξώνια 5 (269) 9 (269, 272) και 10 (271) και στα όρια μεταξύ ιντρονίων και εξώνιων 3 (273) και 6 (267). Αν και παλαιότερες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν κάποια συσχέτιση μεταξύ της CYP 19 και του ΣΠΩ πιθανά λόγω χαμηλής στατιστικής δύναμης (274-276), νεότερες ερευνητικές εργασίες σε SNP πολυμορφισμούς που ανήκουν σε κωδικοποιούσες περιοχές, αποδεικνύουν την ύπαρξη μικρότερων και συνηθέστερων μεταλλάξεων της αρωματάσης που σχετίζονται με διακυμάνσεις στον κίνδυνο εμφάνισης του συνδρόμου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη που ανέδειξε την ισχυρή σχέση ανάμεσα στον SNP50 της CYP 19 και την υπερέκκριση ανδρογόνων σε κορίτσια με πρώιμη έναρξη της εφηβείας και λειτουργική υπερανδρογοναιμία (277). Εργασίες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα για τον παραπάνω πολυμορφισμό που βρίσκεται σε ιντρόνιο, ενισχύοντας την υπόθεση ότι μεταλλαγές σε ιντρόνια μπορεί να σχετίζονται με ρυθμιστικές αλληλουχίες (277, 278). Τέλος, ο Arg264Cys πολυμορφισμός του CYP 19 (rs700519) γονιδίου φαίνεται να επηρεάζει την δράση της αρωματάσης διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου (279).

### **6.3 Ο πολυμορφισμός (TTTA)<sub>n</sub> της αρωματάσης CYP 19.**

Ο μικροδορυφορικός VNTR πολυμορφισμός στο 4<sup>ο</sup> ιντρόνιο του γονιδίου της αρωματάσης πιθανά συμμετέχει στην πρόκληση σειράς ασθενειών στις γυναίκες όπως καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου, οστεοπόρωση και άλλες παθήσεις που σχετίζονται με την ισορροπία οιστρογόνων/ανδρογόνων (280-283). Οι υπόνοιες αυτές ενισχύθηκαν από πρόσφατη μελέτη σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες γενικού πληθυσμού, όπου τα μικρού αριθμού επαναλήψεων (TTTA)<sub>n</sub> αλληλία (short) στο 4<sup>ο</sup> ιντρόνιο του γονιδίου CYP19, σχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και κοιλιακή παχυσαρκία (284). Επόμενο βήμα, αποτέλεσε η συσχέτιση του (TTTA)<sub>n</sub> πολυμορφισμού του CYP 19 γονιδίου με την υπερανδρογοναιμία στο ΣΠΩ. Συγκεκριμένα, γυναίκες με ΣΠΩ και σοβαρή υπερανδρογοναιμία φαίνεται να είναι συχνότερα φορείς των short CYP 19(TTTA)<sub>n</sub> αλληλίων σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες που φέρουν συχνότερα τα μεγάλου αριθμού επαναλήψεων (long) αλληλία (179). Επιπλέον, γυναίκες ομόζυγες ως προς τα short αλληλία εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων και αυξημένο λόγο LH/FSH σε σύγκριση με γυναίκες άλλων γονότυπων. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προσδίδουν στο γονίδιο CYP 19 πιθανό γενετικό ρόλο στην εξελικτική θεωρία του συνδρόμου.

## B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ενδομήτριος ζωή είναι μια περίοδος που χαρακτηρίζεται από διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η λειτουργική ωρίμανση των συστημάτων του οργανισμού. Οι διαδικασίες αυτές επηρεάζονται από αλλαγές στο διατροφικό και ορμονικό ενδομήτριο περιβάλλον. Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι διαταραχές στην εμβρυική ανάπτυξη σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιομεταβολικών παθήσεων στην ενήλικη ζωή. Αξίζει να σημειωθεί ότι το χαμηλό βάρος γέννησης έχει σχετιστεί με πρόωμη ήβη στα κορίτσια, συνοδευόμενη από υπερανδρογοναιμία στην εφηβεία. Τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν στην διατύπωση της υπόθεσης του ενδομήτριου προγραμματισμού ασθενειών, σύμφωνα με την οποία ορισμένες παθήσεις προγραμματίζονται κατά την ενδομήτρια ζωή λόγω αλλαγών που επιτελούνται στο ενδομήτριο περιβάλλον. Αρκετές μελέτες παραθέτουν στοιχεία υπέρ της υπόθεσης του ενδομήτριου προγραμματισμού του ΣΠΩ λόγω έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων. Όπως έχει αναφερθεί, μελέτες σε πειραματόζωα όπως πρόβατα, πιθήκους και τρωκτικά έδειξαν ότι τα θήλεα έμβρυα που είχαν εκτεθεί σε περίσσεια ανδρογόνων κατά την ενδομήτριο ζωή εμφάνισαν αργότερα φαινότυπο όμοιο με αυτόν του ΣΠΩ, με παρουσία ωθηκικής δυσλειτουργίας, υπερανδρογοναιμίας, πολυκυστικών ωοθηκών και περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης. Επιπλέον, σε κλινικές μελέτες, γυναίκες με συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων εμφάνισαν χαρακτηριστικά ΣΠΩ στην εφηβεία, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις γυναίκες με συγγενή ανεπάρκεια φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης ή αρωματάσης παρουσίασαν ορισμένα φαινοτυπικά γνωρίσματα του συνδρόμου κατά την ενήλικη ζωή.

Οι πιθανές αιτίες υπερανδρογοναιμίας κατά την διάρκεια της κύησης δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, η εμφάνιση υπερανδρογοναιμίας στη μητέρα σε συνδυασμό με μειωμένη δράση της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης και/ή της αρωματάσης του πλακούντα παρέχουν ένα πιθανό μηχανισμό που μπορεί να είναι εν μέρει γενετικά προκαθορισμένος. Πράγματι, πρόσφατες

μελέτες συσχέτισης υποδεικνύουν ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί γονιδίων που καθορίζουν είτε την διαθεσιμότητα είτε τη δράση των ανδρογόνων στους ιστούς-στόχους, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και εμφάνιση φαινοτύπου όμοιο με του ΣΠΩ. Σε αυτούς τους πολυμορφισμούς συγκαταλέγονται και ο πολυμορφισμός  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG καθώς και ο πολυμορφισμός  $(TTTA)_n$  του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19 που πιθανά συμβάλλουν στην έκθεση του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων.

Σκοπός της μελέτης είναι η κατανόηση της γενετικής βάσης μεταβολικών ασθενειών, όπως αυτή του ΣΠΩ, μέσω της διερεύνησης της πιθανής σχέσης των γονιδίων της SHBG και της αρωματάσης CYP 19 με τις ορμόνες του αμνιακού υγρού και τα επίπεδα των ανδρογόνων του πλάσματος των εγκύων γυναικών. Στόχος μας είναι επίσης η διερεύνηση της πιθανής σχέσης των ορμονών του αμνιακού υγρού με το βάρος γέννησης των νεογνών, προκειμένου να τεκμηριωθεί περαιτέρω, η πιθανή επίδραση των *in utero* ορμονικών αλλαγών στον προγραμματισμό ασθενειών που εμφανίζονται κατά την ενήλικη ζωή.

## 2. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό μελέτης αποτέλεσαν 199 έγκυες γυναίκες με καταγωγή από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου, εκ των οποίων 103 κυοφορούσαν θήλαα έμβρυα και 96 άρρενα. Οι γυναίκες προσελήφθησαν από το τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων όπου προσήλθαν για να υποβληθούν σε αμνιοπαρακέντηση λόγω ηλικίας (>35 ετών) κατά την 16<sup>η</sup> έως 21<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Η εβδομάδα κύησης καθορίστηκε με βάση την τελευταία έμμηνο ρύση και την μέτρηση υπερηχογραφικά του κεφαλοουριαίου μήκους (CRL) (285). Όλες οι εξεταζόμενες υποβλήθησαν σε λεπτομερή λήψη ιατρικού ιστορικού (ατομικού, γυναικολογικού, οικογενειακού) με πλήρη καταγραφή σωματομετρικών χαρακτηριστικών όπως ύψος, βάρος σώματος, αρτηριακή πίεση, περίμετρος λαιμού και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI, Body Mass Index) από τον τύπο:

$$\text{BMI} = \frac{\text{ύψος (Kg)}}{\text{βάρος σώματος}^2(\text{m})}$$

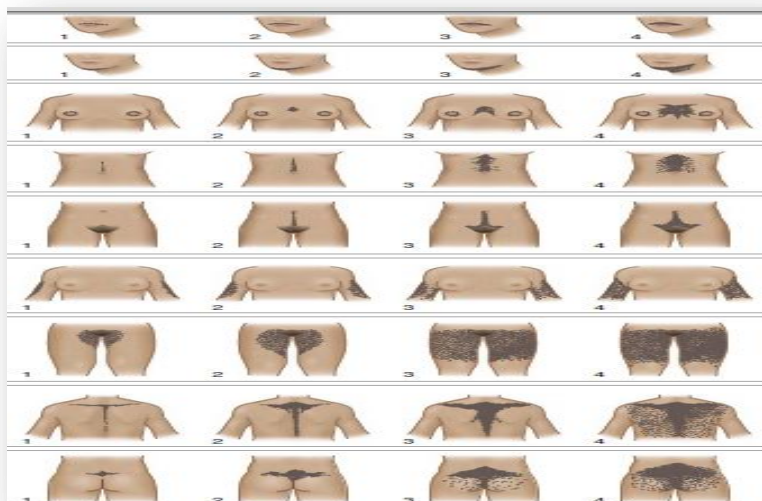
Ελήφθησαν δείγματα αίματος και 10 ml αμνιακού υγρού για την μέτρηση της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG), της τεστοστερόνης (T) και της οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>). Επίσης, υπολογίστηκε ο λόγος τεστοστερόνη/φυλοδεσμευτική σφαιρίνη στο μητρικό πλάσμα και στο αμνιακό υγρό. Τα δείγματα μητρικού πλάσματος ελήφθησαν αμέσως μετά την αμνιοπαρακέντηση. Τόσο τα δείγματα μητρικού αίματος όσο και του αμνιακού υγρού αποθηκεύτηκαν στους -20°C και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των περιφερικών λευκοκυττάρων και των αμνιακών κυττάρων, με σκοπό τη γενετική ανάλυση. Όλες οι ασθενείς ενημερώθηκαν για το περιεχόμενο της μελέτης προ της συμμετοχής τους. 75 εκ των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη γέννησαν στην Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου. Καταγράφηκαν το ακριβές βάρος γέννησης των νεογνών καθώς και η ακριβής εβδομάδα κύησης που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός.

ΗΚ	A. πρόωρα (νεογνά με ΗΚ < 37 εβδομάδες) B. τελειόμηνα (νεογνά με ΗΚ 37-41 <sup>6/7</sup> εβδομάδες) Γ. προτασιακά (νεογνά με ΗΚ ≥ 42 εβδομάδες)
ΒΓ	A. χαμηλού βάρους γέννησης (ΧΒΓ) με ΒΓ < 2500g B. πολύ χαμηλού βάρους γέννησης (ΠΧΒΓ) με ΒΓ < 1500g Γ. εξαιρετικά πολύ χαμηλού βάρους γέννησης (ΕΠΧΒΓ) με ΒΓ < 1000g
Σύμφωνα με ΗΚ κ το ΒΓ	A. κανονικά για την ΗΚ νεογνά (ΒΓ: 10 <sub>η</sub> -90 <sub>η</sub> εκ. θέση για την ΗΚ) B. μικρά για την ΗΚ νεογνά (ΒΓ < 10 <sub>η</sub> εκ. θέση για την ΗΚ) Γ. μεγάλα για την ΗΚ νεογνά (ΒΓ > 90 <sub>η</sub> εκ. θέση για την ΗΚ)

Πίνακας 1. Ταξινόμηση νεογνών σύμφωνα με την ηλικία κύησης (ΗΚ), το βάρος γέννησης (ΒΓ) και το βάρος σε σχέση με την ηλικία κύησης.

Όσο αφορά τα στοιχεία από το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών της μελέτης, 53 γυναίκες ανέφεραν προ της κύησης διάγνωση του ΣΠΩ σύμφωνα με τα κριτήρια του Rotterdam (41). Τα κριτήρια αυτά είναι: διαταραχές εμμήνου ρύσεως (παρουσία ολιγομηνόρροιας ή αραιομηνόρροιας), κλινική ή βιοχημική διαπίστωση υπερανδρογοναιμίας, μορφολογικά χαρακτηριστικά πολυκυστικών ωοθηκών σε υπερηχογράφημα. Οι 53 αυτές γυναίκες πληρούσαν τουλάχιστον 2 εκ των παραπάνω κριτηρίων βάση του ατομικού και γυναικολογικού τους ιστορικού. Οι υπόλοιπες 146 γυναίκες ανέφεραν ιστορικό φυσιολογικού καταμήνιου κύκλου (28-30 ημέρες), απουσία υπερτρίχωσης και άλλων σημείων υπερανδρογοναιμίας, απουσία

γαλακτόρροιας ή θυρεοειδικής δυσλειτουργίας. Ως κλινική υπερανδρογοναιμία ορίστηκε η κλινική διαπίστωση υπερτρίχωσης (Ferriman Gallwey score >8), ακμής ή αλωπεκίας και/ή αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων. Το Ferriman Gallwey score, είναι μια μέθοδος εκτίμησης της τρίχωσης του σώματος σύμφωνα με την οποία ελέγχεται η ύπαρξη και η πυκνότητα της τρίχωσης σε 9 θέσεις του σώματος με κλίμακα από το μηδέν έως το τέσσερα. Ο βαθμός μηδέν υποδηλώνει την πλήρη απουσία τρίχωσης. Άθροισμα μεγαλύτερο από οκτώ βαθμούς υποδηλώνει υπερτρίχωση. Τέλος, καμία εκ των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη λάμβανε φαρμακευτική θεραπεία, ούτε σχετίζονταν με παθήσεις όπως συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων, υπερπρολακτιναιμία ή σύνδρομο Cushing.



Εικόνα 7: Ferriman-Gallwey score.

### 3.Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΑΜΝΙΟΠΑΡΑΚΕΝΤΗΣΗΣ

Από την προηγούμενη δεκαετία είναι γεγονός, η υπό άμεσο και συνεχή υπερηχογραφικό έλεγχο είσοδος βελόνας εντός της ενδομήτριας κοιλότητας, κατευθυνόμενης στον επιθυμητό στόχο με απόλυτη ακρίβεια. Η αμνιοπαρακέντηση αποτελεί πλέον τη συνηθέστερη προγεννητική διαγνωστική τεχνική.

#### **3.1 Τεχνική.**

Πριν την αμνιοπαρακέντηση των γυναικών της μελέτης, έγινε προετοιμασία των ασθενών με υπερηχογραφικό έλεγχο για την εκτίμηση του εμβρύου, της θέσης του πλακούντα και του κατάλληλου σημείου για παρακέντηση, έτσι ώστε να υπάρχει αρκετό αμνιακό υγρό. Ακολούθησε αντισηψία του δέρματος και υπό συνεχή υπερηχογραφικό έλεγχο, βελόνα (10cm 22 Gauge) κατευθύνθηκε στην περιοχή με αρκετό αμνιακό υγρό, αποφεύγοντας έτσι τον πλακούντα και το έμβρυο. Σε ορισμένες περιπτώσεις που ήταν αδύνατο να αποφευχθεί ο πλακούντας, επιλέχθηκε το πιο λεπτό τμήμα του, αποφεύγοντας την έκφυση του ομφαλίου λώρου. Η αμνιοπαρακέντηση εκτελούνταν συνήθως από δύο χειριστές. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι εκτέλεσης αλλά πάντα απαιτούνται τουλάχιστον 3 χέρια: ένα για να κρατά την κεφαλή του υπερηχογραφήματος, ένα για την βελόνα, ένα ή δύο για τη σύριγγα και την απόσυρση του αμνιακού υγρού. Στις περισσότερες περιπτώσεις και σε αυτή τη μελέτη, ο κύριος χειριστής κρατούσε την κεφαλή του υπερήχου και την βελόνα στο ίδιο χέρι ενώ ο βοηθός προσάρμοζε τη σύριγγα αναρροφώντας το υγρό (286). Η σωστή τοποθέτηση της βελόνας και της κεφαλής του υπερηχογραφήματος είναι μείζονος σημασίας. Ένα από τα κύρια σημεία της τεχνικής ήταν η τοποθέτηση του στόχου στο μέσο της οθόνης του υπερήχου παράλληλα με την προσπάθεια διατήρησης της κεφαλής του υπερήχου κάθετα. Όταν ο στόχος οριοθετούνταν στη μέση της οθόνης, η βελόνα εισέρχονταν πλάγια της κεφαλής με απόσταση 3 εκατοστών και γωνία 45°, με κατεύθυνση προς τον στόχο. Σε όλη τη διαδικασία ο χειριστής έπρεπε να έχει οπτική ολόκληρης της βελόνας από την οθόνη του υπερήχου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αμνιοπαρακέντηση προτιμάται να γίνεται την 16<sup>η</sup> έως 21<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης γιατί τότε υπάρχει αρκετό αμνιακό υγρό μέσα στη μήτρα και



μπορεί να ληφθεί αρκετή ποσότητα υγρού (20-30 ml) χωρίς να δημιουργείται κίνδυνος για την υγεία του εμβρύου. Αν και η πρώιμη αμνιοπαρακέντηση εφαρμόζεται σε ορισμένα κέντρα, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η αμνιοπαρακέντηση που εκτελείται μεταξύ 9<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης σχετίζεται με μεγαλύτερο εμβρυικό κίνδυνο σε σύγκριση με την αμνιοπαρακέντηση μέσου τριμήνου (287, 288). Οι γυναίκες της μελέτης μας προσήλθαν για αμνιοπαρακέντηση κυρίως λόγω ηλικίας (>35). Ωστόσο, αναφέρονται παρακάτω και οι υπόλοιπες ενδείξεις και οι πιθανές επιπλοκές που μπορεί να προκληθούν από την υποβολή στην τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.

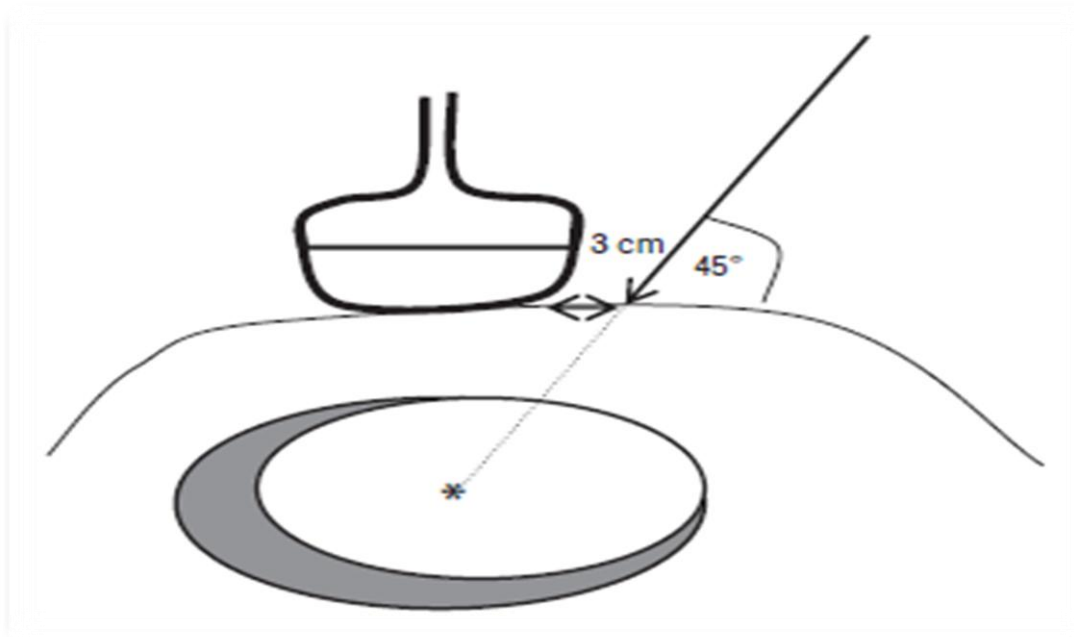
### **3.2 Ενδείξεις υποβολής των εγκύων γυναικών στην τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.**

Η τεχνική της αμνιοπαρακέντησης πραγματοποιείται με σκοπό:

- Τον προσδιορισμό του καρυότυπου του εμβρύου για αποκλεισμό τρισωμίας και κυρίως τρισωμίας 21. Η πιθανότητα τρισωμίας αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας και είναι κοινή πρακτική να γίνεται αμνιοπαρακέντηση σε γυναίκες άνω των 35 ετών, ενώ για τις υπόλοιπες υποψήφιες μητέρες πραγματοποιείται όταν ο κίνδυνος για σύνδρομο Down είναι μεγαλύτερος από 1/250 στη βιοχημική εξέταση. Ο συνδυασμός αμνιοπαρακέντησης και triple screen (μέτρηση οιστριόλης, β-hCG και α-FP) ανιχνεύει το 65% των εμβρύων με τρισωμία 21.
- Τη λήψη εμβρυικού αίματος και καθορισμό του τύπου του και την ανίχνευση εμβρυικής αιμολυσίας σε RH-ευαισθητοποιημένες κυήσεις.
- Την αξιολόγηση της ωριμότητας του εμβρυικού πνεύμονα σε περιπτώσεις αναλογίας λεκιθίνης σφίγγομυελίνης μεγαλύτερη ή ίση του 2,5 και την ανίχνευση της παρουσίας της φωσφατίδουλογλυκερόλης.

### 3.3 Επιπλοκές που μπορεί να προκληθούν από την τεχνική της αμνιοπαρακέντησης.

Η αμνιοπαρακέντηση μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο. Για περισσότερα από 20 χρόνια η αμνιοπαρακέντηση θεωρούνταν υπεύθυνη για την κατά 1% αύξηση του κινδύνου απώλειας του εμβρύου ενώ παρόμοιο ποσοστό παρουσιάζει και ο κίνδυνος αποτυχίας της καλλιέργειας των κυττάρων του αμνιακού υγρού (289). Το ποσοστό αυτό επιβεβαιώθηκε από ερευνητική ομάδα στη Δανία που κατέγραψε για περισσότερες από 32.000 αμνιοπαρακεντήσεις στη διάρκεια 11 χρόνων, συνολικό ποσοστό κινδύνου 1,4%. Η αμνιοπαρακέντηση δεν θεωρείται επικίνδυνη διαδικασία για τις μητέρες. Ωστόσο, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος για σοβαρές επιπλοκές όπως ο κίνδυνος λοιμώξεων.



Εικόνα 8. Η τεχνική της αμνιοπαρακέντησης σχηματικά.

#### 4.ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η ολική τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη στο μητρικό πλάσμα και το αμνιακό υγρό μετρήθηκαν με Chemluminescent Microparticle Immunoassay σε Dxi800 Beckmann Counter Immunonlyser (Abbott Laboratory). Τα CVs ήταν 7% για την ολική τεστοστερόνη και 10% για την οιστραδιόλη. Οι συγκεντρώσεις της SHBG μετρήθηκαν στο πλάσμα και το αμνιακό υγρό με Chemiluminescent Immunometric method (IMMULITE 2000 Immunoanalyser, DPC, CA, USA) Τα CVs ήταν 9% και 5,5% αντιστοίχως.

#### 5.ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Το γενετικό υλικό των γυναικών απομονώθηκε από τα περιφερικά λευκοκύτταρα μετά από φυγοκέντρηση του μητρικού αίματος και από τα αμνιακά κύτταρα μετά από φυγοκέντρηση του αμνιακού υγρού. Η παραγωγή αντιγράφων της SHBG(*TAAAA*)<sub>n</sub> επαναλαμβανόμενης περιοχής του εκκινητή της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης και της CYP19-9(*TTTA*)<sub>n</sub> επαναλαμβανόμενης περιοχής της αρωματάσης επιτεύχθηκε με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και ακολούθησε χρώση νιτρικού αργύρου. Ο αριθμός των (*TAAAA*)<sub>n</sub> και των (*TTTA*)<sub>n</sub> αντιστοίχως έγινε με σύγκριση γνωστού μεγέθους προϊόντων PCR και ο αριθμός των επαναλήψεων τους ταυτοποιήθηκε με ανάλυση αλληλουχίας (sequencing).

##### **5.1. Μέθοδος εξαγωγής DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα.**

Για την απομόνωση DNA από τα περιφερικά λευκοκύτταρα χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα της εγκύου. Το αίμα συλλέγεται σε δοχεία που περιέχουν EDTA ως αντιπηκτικό, περίπου 10 λεπτά πριν από την έναρξη της διαδικασίας της αμνιοπαρακέντησης. Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 750μl αίματος και προστίθενται 750μl TKM και 25μl IGEPAL για τη λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μετά από ανάδευση το μείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 10.000 στροφές/δευτερόλεπτο. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα πλένεται με 500μl TKM και μετά από

καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 sec στις 10.000 στροφές/δευτερόλεπτο. Αυτή η διαδικασία του <<πλυσίματος των λευκών αιμοσφαιρίων>> επαναλαμβάνεται για 3-4 φορές μέχρι να εξαλειφθεί πλήρως το σκούρο χρώμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στο καθαρό ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων προστίθενται 200μl TKM και 15μl SDS 10% και μετά από καλή ανάδευση τοποθετείται για τουλάχιστον 5 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 55°C προκειμένου να γίνει λύση των λευκών αιμοσφαιρίων. Στη συνέχεια, προστίθενται 80μl διαλύματος χλωριούχου νατρίου 6M για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί και πάλι καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 12.000 στροφές/δευτερόλεπτο. Μετά τη φυγοκέντρηση μεταφέρεται προσεκτικά το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA, και προστίθενται 750μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης θερμοκρασίας -20°C. Μετά από προσεκτική ελαφρά ανάδευση η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια νερού από το διαλυμένο DNA το οποίο αποκτά μορφή βλεννώδους υλικού και απομονώνεται με τη βοήθεια του ρύγχους μιας πιπέτας και διαλύεται σε 50 μl TE. Με τη μορφή αυτή φυλάσσεται για όσο διάστημα χρειαστεί στους 4°C.

Η σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του DNA είναι η εξής:

- TKM 10mM Tris -HCl (pH=7,6) , 10mM KCL, 2mM EDTA, 4mM MgCl<sub>2</sub>
- IGEPAL (Sigma)
- SDS Sodium dodecyl sulphate 10% (Sigma)
- TE 10mM Tris-HCl (pH=7,8), 1mM EDTA (Ph=8)

## **5.2 Μέθοδος εξαγωγής εμβρυικού DNA από το αμνιακό υγρό.**

Κατά την αμνιοπαρακέντηση λαμβάνονται 10ml αμνιακού υγρού το οποίο φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές/δευτερόλεπτο για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης κρατείται σε erpendorf στους -80°C με σκοπό τον βιοχημικό έλεγχο, ενώ από τα κύτταρα γίνεται απομόνωση του DNA.

Όλα τα δείγματα καθώς και το διάλυμα έκλουσης ΑΕ, πρέπει να έχουν εξισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου 15-25°C. Το υδατόλουτρο ρυθμίζεται στους 56°C. Στα ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης AW1 και AW2 επειδή λαμβάνονται ως συμπυκνώματα πρέπει προ της χρήσης τους να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης (96-100%). Εάν σχηματιστεί ίζημα στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης AL, διαλύεται με επώαση στους 56°C. Από κάθε δείγμα λαμβάνεται το ίζημα-κύτταρα αμνιακού υγρού μετά από φυγοκέντρηση του αμνιακού υγρού στις 15.000 στροφές/δευτερόλεπτο για 5 λεπτά. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 20μl πρωτεάσης και 200ml διαλύματος AL. Μετά από ανάδευση το μείγμα τοποθετείται για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 56°C. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προστίθενται 200μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης για τον τερματισμό της δράσης της πρωτεάσης. Μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 δευτερόλεπτο στις 10.000 στροφές/δευτερόλεπτο. Το μείγμα τοποθετείται ανά 700 μl στην κολώνα καθαρισμού και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000/δευτερόλεπτο για 1 λεπτό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να περάσει όλο το μείγμα από τον ηθμό της κολώνας. Στον ηθμό της κολώνας κατακρατείται το DNA, το οποίο όμως δεν είναι καθαρό. Στη συνέχεια προστίθενται 500μl διαλύματος AW1 για τον καθαρισμό του DNA και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8.000 στροφές/δευτερόλεπτο. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για το διάλυμα AW2 αλλά αυτή τη φορά η φυγοκέντρηση γίνεται στις 13.000 στροφές/δευτερόλεπτο για 3 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, στον ηθμό περιέχεται διαλυμένο το DNA. Στη συνέχεια, προστίθενται 80μl αποσταγμένου νερού ΑΕ στον ηθμό και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές/δευτερόλεπτο για 2 λεπτά.

### **5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πρωτοεμφανίστηκε το 1985 και προκάλεσε επανάσταση στον τρόπο ανάλυσης του DNA και πλέον αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της μοριακής βιολογίας και γενετικής. Ουσιαστικά, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος η οποία δίνει τη δυνατότητα παραγωγής πολλών αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. Η ειδικότητα της μεθόδου παρέχεται

μέσω των PCR (primers) εκκινητών που επιλέγονται για συγκεκριμένες κάθε φορά αλληλουχίες. Το DNA ενισχύεται με γεωμετρική πρόοδο μετά από πολλαπλούς κύκλους αποδιάταξης, αποδίδοντας μεγάλη ευαισθησία στη μέθοδο. Έτσι, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση πολύ μικρών δειγμάτων DNA, τόσο από μονήρη κύτταρα όσο και από μια μεγάλη ποικιλία ιστικών πηγών όπως για παράδειγμα το περιφερικό αίμα, βιοψίες, χειρουργικά δείγματα ή ακόμα και κύτταρα από τρίχες και σίελο. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί βασικό συστατικό της μοριακής διαγνωστικής. Παρέχει την ικανότητα ενίσχυσης του DNA (ή και του RNA) με σκοπό την ανεύρεση μεταλλάξεων, την ενίσχυση πολυμορφικών ή ακόμα και δι-τρι νουκλεοτιδιακών επαναληπτικών αλληλουχιών ή/και την γονοτυπική ανάλυση σημειακών πολυμορφισμών, επιτρέποντας πολλαπλά πολυμορφικά αλληλία να ανιχνεύονται στις μελέτες συσχέτισης ή γενετικής σύνδεσης. Αναλυτικότερα, η PCR αποτελείται από τρία στάδια:

1. Στάδιο αποδιάταξης του DNA (denaturation).

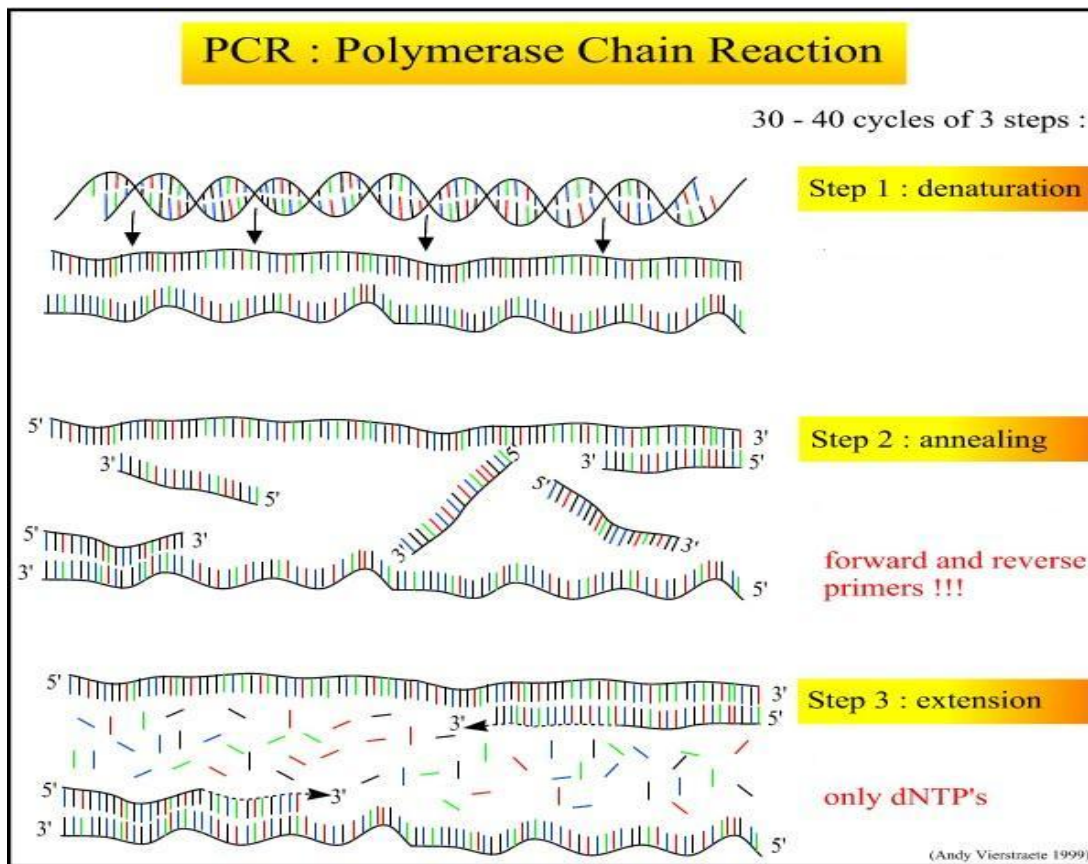
Η αντίδραση επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (92-96°C για 30-60 δευτερόλεπτα). Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν της δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και το DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνο.

2. Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές (annealing).

Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με μείωση της θερμοκρασίας στους 35°C με 70°C για 20-60 δευτερόλεπτα. Επιτυγχάνεται υβριδισμός των εκκινητών (primers) στα αντίστοιχα σημεία των ανοικτών αλυσίδων του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων τα οποία απομονώνουν την αλληλουχία του DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου καθώς και η συγκέντρωση των εκκινητών είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της αντίδρασης.

### 3.Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης νέου DNA (extension).

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών σε θερμοκρασία 70-72°C για 60-180 δευτερόλεπτα. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase). Πρόκειται για ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο που μιμείται τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του κυτταρικού πυρήνα διπλασιάζουν το DNA προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει σε μίτωση και μπορεί να συνθέσει περίπου 2.000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από το DNA, το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ιόντα μαγνησίου, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων δεοξυριβοτριφωσφωρικών νουκλεοτιδίων [dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, DTTP] (Promega) και Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, Life Technologies, USA) με το συνοδό ρυθμιστικό διάλυμά της. Σε μια τυπική PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30-40 φορές. Η διαδικασία είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό περισσότερων από  $2^{30}$  ή 1 δισεκατομμυρίου ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια, μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Στο διάλυμα προστίθεται παραφινέλαιο σαν επικάλυψη για προστασία από την εξάτμιση καθώς στη συνέχεια θα εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις PCR είναι αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής PTC-100 (Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc, USA). Η ανάλυση των PCR προϊόντων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.



Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

#### 5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

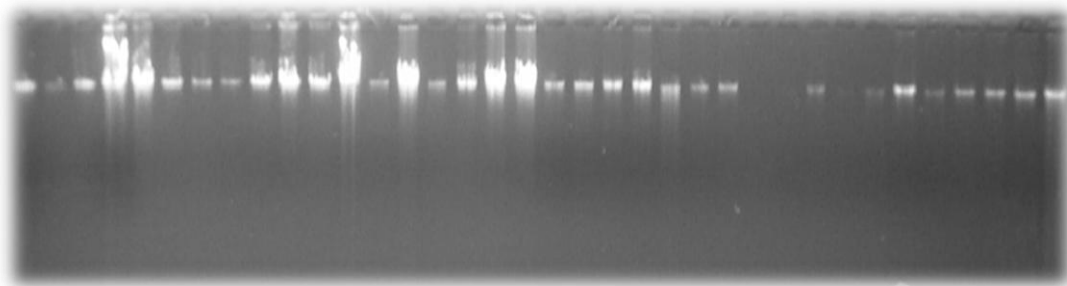
Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης είναι εμπλουτισμένη με 0,5% mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διαλυμα TBE (89 Mm Tris-HCl, 89Mm Boric acid, 2.5% EDTA Ph=8.0). Η ταχύτητα κίνησης και επομένως η απόσταση που διανύουν μέσα σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

- το μοριακό βάρος του DNA (αντιστρόφως ανάλογη),
- τη συγκέντρωση της αγαρόζης (μικρή συγκέντρωση αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA ενώ μεγαλύτερη συγκέντρωση χρησιμοποιείται για τα μικρά τμήματα,
- τη διαμόρφωση του DNA (γραμμικό, κυκλικό),



- τη διαφορά του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος (volt) η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη της τάσης και η δυνατότητα διαχωρισμού ελαττώνεται όταν αυξάνεται η τάση του ρεύματος.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2%. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η HORIZON 11-14 (GIBRO BRL, USA). Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε ανάγνωση και φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ενζύμων σε υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι αυτό που δίνει έντονο χρώμα φθορισμού όταν είναι συνδεδεμένο σε DNA .



Εικόνα 10. Η παρουσία των ηλεκτροφορητικών ενζύμων σε υπεριώδες φως.

### **5.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.**

Η ταυτοποίηση του  $(TAAAA)_n$  πολυμορφισμού της SHBG και του  $(TTTA)_n$  πολυμορφισμού της CYP 19 έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Για την κατασκευή της πηκτής πολυακρυλαμιδίου ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Αρχικά γίνεται καθαρισμός των τζαμιών που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του πηκτώματος σχολαστικά με σφουγγάρι και απορροπαντικό. Ξεμπλέκονται με αποσταγμένο νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, βρέχονται με αιθανόλη και αφήνονται να στεγνώσουν. Η πολύ καλή και σχολαστική καθαριότητα είναι απαραίτητη καθώς αποτρέπει τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την έγχυση του διαλύματος πολυακρυλαμιδίου. Ανάμεσα στα τζάμια τοποθετούνται οι 2 ταινίες πλάτους 2cm και πάχους 1mm (spacers) που αφήνουν τον απαραίτητο χώρο μεταξύ των τζαμιών για τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Τοποθετείται επίσης ειδική ταινία στεγανοποίησης προκειμένου να μην γίνει διαφυγή του διαλύματος ακρυλαμιδίου πριν αυτό πολυμεριστεί. Τα τζάμια συγκρατούνται με ειδικούς σφιγκτήρες γίνεται η έγχυση του διαλύματος ακρυλαμιδίου προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για τη δημιουργία θέσεων όπου θα τοποθετηθούν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η ολοκλήρωση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου ολοκληρώνεται σε 1-2 ώρες. Όταν ο πολυμερισμός ολοκληρωθεί απομακρύνεται το χτένι και η ειδική ταινία στεγανοποίησης. Τα τζάμια με το πήκτωμα στερεώνονται στην ειδική βάση και βυθίζονται στο διάλυμα TBE της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή V20-CDC (UK). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για περίπου 20 ώρες σε τάση 55-60 Volt. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης απομακρύνονται τα τζάμια και με προσοχή αφαιρείται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προκειμένου να ακολουθήσει η χρώση με νιτρικό άργυρο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι τα εξής:

- Ακρυλαμίδη και N´N´-methylene-bis-acrylamide σε αναλογία 29:1
- TBE: 89Mm Tris-HCl ,89Mm Boric acid ,2.5Mm EDTA p H=8.0
- APS: ammonium persulfate 20%
- TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine 2%

Προετοιμάζονται 50 ml πηκτής πολυακρυλαμιδίου 12% ως εξής:

- 15ml διαλύματος acrylamide /bis-acrylamide
- 35ml TBE 1X
- 286μl APS
- 57μl TEMED

Τα APS και TEMED είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

### **5.6 Χρώση νιτρικού αργύρου.**

Για τη χρώση του νιτρικού αργύρου χρειάζονται τα εξής διαλύματα:

#### **Διάλυμα σταθεροποίησης**

- 40ml αιθανόλη extra pure (99,7-100%)
- 2ml οξικό οξύ
- Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 400ml

#### **Διάλυμα νιτρικού αργύρου 1‰**

#### **Διάλυμα εμφάνισης**

- 800ml φορμαλδεΐδη 37%
- 3gr NaOH (extra pure)
- 0,02gr Sodium Borohydride (NaBH<sub>4</sub>)
- Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 200ml

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Αρχικά η πηκτή πολυακρυλαμιδίου βυθίζεται σε 200 ml από το διάλυμα σταθεροποίησης και αφήνεται για 3 λεπτά. Απομακρύνεται το διάλυμα και προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα σταθεροποίησης (200ml) για άλλα 3 λεπτά.
2. Αφαιρούμε το προηγούμενο διάλυμα και προσθέτουμε 200ml διαλύματος νιτρικού αργύρου για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.
3. Αφαιρούμε το διάλυμα νιτρικού αργύρου και ξεπλένουμε με δισαπεσταγμένο νερό και αποστειρωμένο νερό. Προσθέτουμε το τελευταίο διάλυμα, το διάλυμα εμφάνισης, το οποίο προηγουμένως έχουμε αναδεύσει και θερμάνει στους 100°C και το αφήνουμε μέχρι την εμφάνιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφορητικές ζώνες του πολυμορφισμού  $(TAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG.

## 6. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

### **6.1 Ο καθορισμός των γονοτύπων του πολυμορφισμού (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG.**

Συνθήκες αντίδρασης PCR

**Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης:** Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl 1X Ph=8,4)	
dNTPS (ισομοριακό δείγμα Datp, Dctp, Dgtp, Dttp)	0,2mM
Ιόντα Μαγνησίου (MgCl <sub>2</sub> )	1 mM
Εκκινητής 1 (forward)	10pmol
Εκκινητής 2 (reverse)	10pmol
Taq DNA Πολυμεράση	1,25U
Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	μέχρι τελικού όγκου 25μl

#### **Αλληλουχία εκκινητών**

Εκκινητής 1: 5'-GCT TGA ACT CGA GAG GCA G-3'

Εκκινητής 2: 5'-CAG GGC CTA AAC AGT CTA GCA GT-3'

#### **Πρόγραμμα κυκλοποίησης**

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά.

Ακολουθεί:

- Αποδιάταξη (denaturing): 95°C για 30 δευτερόλεπτα
- Υβριδισμός (annealing): 60°C για 30 δευτερόλεπτα
- Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 169 ζεύγη βάσεων (το αλληλόμορφο με τις 8 TAAAA επαναλήψεις). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται με πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και ακολουθεί χρώση με νιτρικό άργυρο. Ο αριθμός των (TAAAA)<sub>n</sub> επαναλήψεων γίνεται με σύγκριση με γνωστού μεγέθους προϊόντα PCR των οποίων ο αριθμός επαναλήψεων ταυτοποιείται με ανάλυση αλληλουχίας (sequencing).

## **6.2 Ο καθορισμός των γονοτύπων του πολυμορφισμού (TTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CY P19-9.**

Συνθήκες αντίδρασης PCR

**Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης:** Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 2μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl 1X Ph=8,4)	
dNTPS (ισομοριακό δείγμα Datp, Dctp, Dgtp, Dttp)	0,2mM
Ιόντα Μαγνησίου (MgCl <sub>2</sub> )	2 mM
Εκκινητής 1 (forward)	15pmol
Εκκινητής 2 (reverse)	15pmol
Taq DNA Πολυμεράση	1,25U

Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

μέχρι τελικού  
όγκου 25μl

### **Αλληλουχία εκκινητών**

Εκκινητής 1: 5'-GTT TGA CTC CGT GAG TTT GA -3'

Εκκινητής 2: 5'-CAA CTC GAC CCT TCT TTA TG -3'

### **Πρόγραμμα κυκλοποίησης**

Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά.

Ακολουθεί:

- Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 30 δευτερόλεπτα
- Υβριδισμός (annealing): 53°C για 30 δευτερόλεπτα
- Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 128 ζεύγη βάσεων (το αλληλόμορφο με τις 9 *TTTA* επαναλήψεις). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται με πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και ακολουθεί χρώση με νιτρικό άργυρο. Ο αριθμός των (*TTTA*)<sub>n</sub> επαναλήψεων γίνεται με σύγκριση με γνωστού μεγέθους προϊόντα PCR των οποίων ο αριθμός επαναλήψεων ταυτοποιείται με ανάλυση αλληλουχίας (sequencing).

## 7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των γονοτυπικών διαφορών και των διαφορών στη συχνότητα των αλληλόμορφων έγινε με  $\chi^2$  τεστ. Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το Kolmogorov-Smirnov test. Η ανάλυση των διαφορών των συνεχών μεταβλητών μεταξύ των γονοτύπων έγινε με Student t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές (για δύο ομάδες) και με one-way ANOVA (για τρεις ομάδες). Η χρήση μη παραμετρικών μεθόδων (Mann Whitney U test και Kruskal Wallis analysis of variance) έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο της ανεξάρτητης επίδρασης των μελετημένων γονοτύπων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression analysis). Ο βαθμός γραμμικής συσχέτισης μεταξύ διαφόρων μεταβλητών προσδιορίστηκε υπολογίζοντας το συντελεστή συσχέτισης  $r$  του Pearson (Pearson's correlation coefficient) για κανονικά κατανομημένες μεταβλητές. Όλα τα αποτελέσματα των συνεχών μεταβλητών καταγράφονται ως μέση τιμή  $\pm$  S.D. Ως στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε η τιμή του  $p \leq 0,05$ . Όλες οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο Statistical Software Package IBM (SPSS, Chicago, IL, USA, version 20).



## 8.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις 199 γυναίκες που έλαβαν μέρος στην μελέτη, 103 κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα και 96 αρρενα ενώ 53 γυναίκες ανέφεραν πρότερη της κύησης διάγνωση του ΣΠΩ με βάση τα κριτήρια του Rotterdam 2004 (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group) (πίνακας 1).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΧΩΡΙΣ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΣΠΩ	146
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΣΠΩ	53
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΚΥΟΦΟΡΟΥΝ ΘΗΛΕΑ ΕΜΒΡΥΑ	103
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΚΥΟΦΟΡΟΥΝ ΑΡΡΕΝΑ ΕΜΒΡΥΑ	96

Πίνακας 1. Αναφορά υποομάδων του πληθυσμού μελέτης.

### **Κλινικά και βιοχημικά ευρήματα.**

Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην συγκέντρωση της SHBG στο μητρικό πλάσμα ήταν αναμενόμενη καθώς κατά την διάρκεια της κύησης η SHBG αυξάνεται και πιθανά η αύξηση αυτή ενισχύεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στο πλάσμα. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών με ιστορικό ΣΠΩ παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ γυναικών χωρίς ιστορικό ΣΠΩ ['non PCOS'] και αυτών με ιστορικό ΣΠΩ ['PCOS'] (πίνακας 4). Οι 'PCOS' γυναίκες εμφάνισαν, όπως αναμενόταν, υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης και οιστραδιόλης στο πλάσμα ( $p=0,022$  και  $p<0,001$  αντίστοιχα) σε σχέση με τις 'non PCOS'. Αν και

τα επίπεδα της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης στο πλάσμα των 'PCOS' γυναικών ήταν χαμηλότερα από αυτά των υπόλοιπων γυναικών, η διαφορά δεν άγγιξε τα στατιστικώς σημαντικά επίπεδα.

	Mean±SD
ΗΛΙΚΙΑ (έτη)	33,99±4,59
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24,68±3,96
BMI προ κύησης (Kg/m <sup>2</sup> )	23,67±4,14
ΠΕΡΙΜΕΤΡΟΣ ΛΑΙΜΟΥ (cm)	36,84±8,08
ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (mmHg)	108,14±17,61
ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (mmHg)	68,84±7,58
ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΗΣ (w)	17,85±2,57
ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ (γρ)	3110±495,45
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (ng/dl)	0,41±0,24
ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (pmol/l)	8,92±11,64
SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (nmol/l)	383,36±137,62

Πίνακας 2. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά γυναικών της μελέτης.

‘PCOS’ ΓΥΝΑΙΚΕΣ	Mean±SD
ΗΛΙΚΙΑ (έτη)	33,60±4,66
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25,54±4,09
BMI προ κύησης(Kg/m <sup>2</sup> )	24,29±4,11
ΠΕΡΙΜΕΤΡΟΣ ΛΑΙΜΟΥ (cm)	36,62±6,80
ΣΥΣΤΟΛΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (mm/Hg)	109,65±17,78
ΔΙΑΣΤΟΛΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (mm/Hg)	70,36±8,21
ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΗΣ (w)	17,71±2,41
ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ (γρ)	3151,04±292,41
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (ng/dl)	0,53±0,28
ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (pmol/l)	13,93±20,11
SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (nmol/l)	363,95±122,99

Πίνακας 3. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά γυναικών με αναφορά ιστορικού ΣΠΩ.

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	Mean±SD	P value
ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	1.‘non PCOS’	7,21 ± 5,74	p=0,022
	2.‘PCOS’	13,93 ± 20,11	
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	1.‘non PCOS’	0,38 ± 0,22	p<0,001
	2.‘PCOS’	0,53 ± 0,28	
SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	1.‘non PCOS’	394,01 ± 144,03	ns
	2.‘PCOS’	363,95 ± 122,99	

Πίνακας 4. Σύγκριση βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ ‘non PCOS’ και ‘PCOS’ γυναικών.

Βάση βιβλιογραφικών δεδομένων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μητρικό πλάσμα δεν αντικατοπτρίζει καθαρά το εμβρυικό ορμονικό περιβάλλον αφού δεν καθίσταται σαφής η διαφορά των επιπέδων τεστοστερόνης ανάμεσα στις κυήσεις γυναικών με θήλεα και στις κυήσεις με άρρενα έμβρυα (140, 143). Πολλές μελέτες στηρίζουν την υπόθεση ότι το αμνιακό υγρό δίνει ακριβέστερη αντιπροσώπευση του εμβρυικού περιβάλλοντος σε ανδρογόνα. Για τους παραπάνω λόγους, η μελέτη των ορμονών στο αμνιακό υγρό και της σχέσης τους με τους γονότυπους των γονιδίων της SHBG και της αρωματάσης CYP 19 πραγματοποιήθηκε έπειτα από κατηγοριοποίηση του πληθυσμού μελέτης σε γυναίκες που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα και εκείνες που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα.

### **8.1. Μελέτη γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.**

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών με θήλεα έμβρυα.

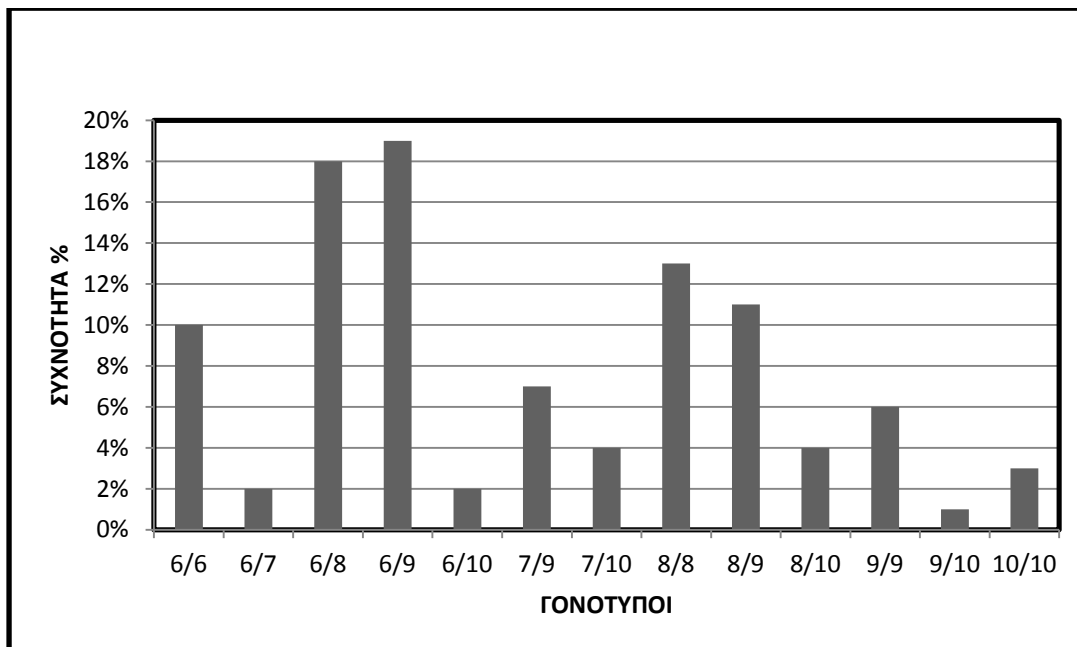
ΥΠΟΚΑΤΗΓΟΡΙΑ: Γυναίκες που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα	Mean±SD
SHBG ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ ΣΕ (nmol/l)	15,86±7,72
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (nmol/l)	0,18±,12
ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (pmol/l)	0,79±3,37
ΛΟΓΟΣ T/SHBG ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ	0,06±0,10

Πίνακας 5. Μέτρηση ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.

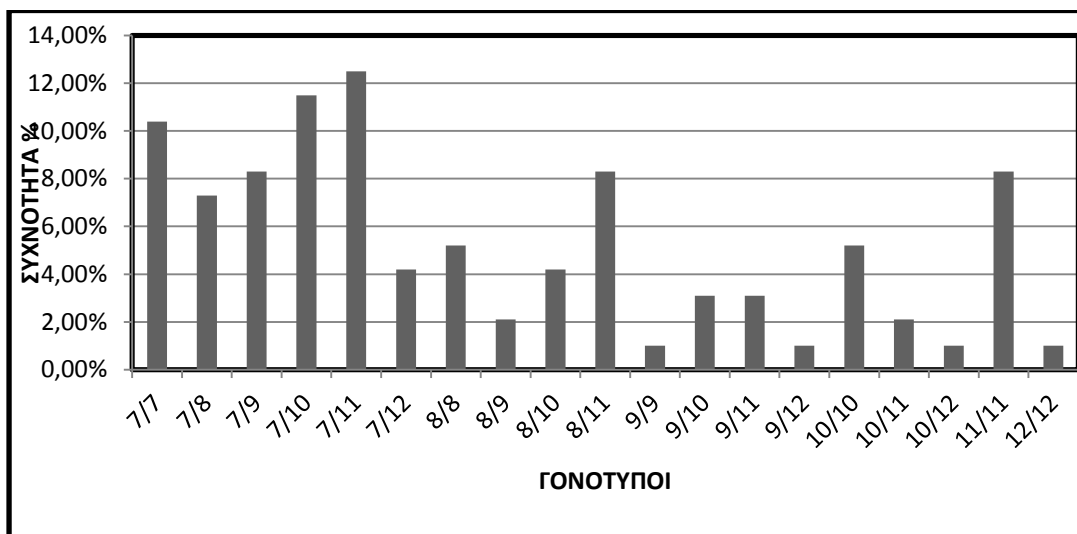
### **Πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG και (TTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19-9.**

Ταυτοποιήθηκαν πέντε αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με 6-10 TAAAA επαναλήψεις και 6 αλληλόμορφα του γονιδίου της αρωματάσης με 7-12 TTTA επαναλήψεις αντίστοιχα. Στα σχήματα 1 και 2 παρατίθενται οι κατανομές των

αλληλόμορφων  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG και των αλληλόμορφων  $(TTTA)_n$  του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19. Για το γονίδιο της SHBG τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παρουσίασε ο γονότυπος 6/9 ενώ για το γονίδιο της αρωματάσης CYP 19, ο γονότυπος 7/11.



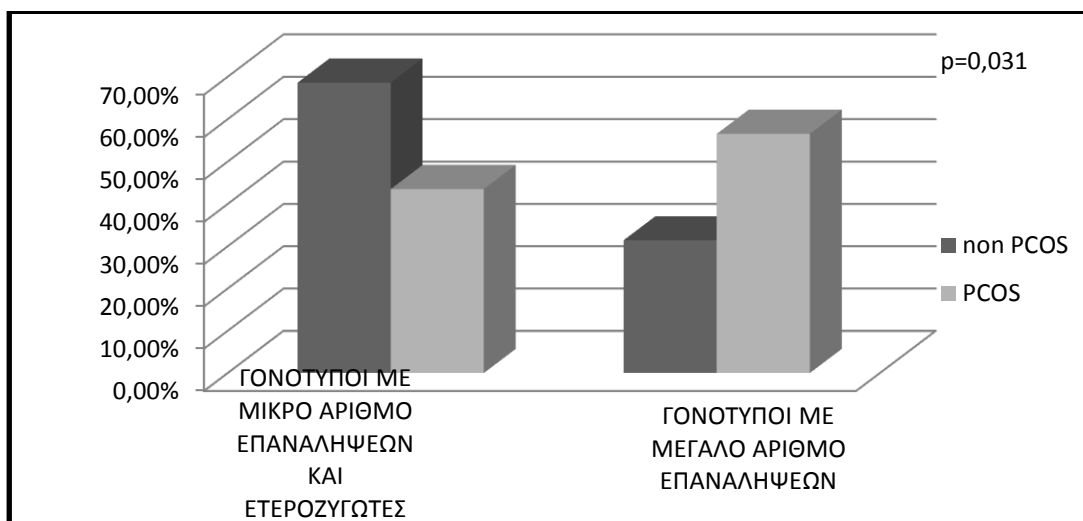
Σχήμα 1. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG στις γυναίκες που κιοφορούσαν θήλεα έμβρυα.



Σχήμα 2. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού  $(TTTA)_n$  του γονιδίου της αρωματάσης στις γυναίκες που κιοφορούσαν θήλεα έμβρυα.

**Κατανομή των αλληλόμορφων (TAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG και των αλληλόμορφων (TTT)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19 μεταξύ ‘non PCOS’ και ‘PCOS’ γυναικών που κυοφορούσαν θήλα έμβρυα.**

Η κατανομή των αλληλόμορφων του γονιδίου της SHBG διέφερε στις ‘PCOS’ και τις ‘non PCOS’ γυναίκες. Πιο συγκεκριμένα, οι γονότυποι του πολυμορφισμού (TAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (8/8, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10, 10/10) εμφανίστηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στις ‘PCOS’ γυναίκες, ενώ οι ‘non PCOS’ ήταν συχνότερα φορείς ετεροζυγτών (6/9, 6/10, 7/9, 7/10) και των γονότυπων με μικρό αριθμό επαναλήψεων (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8) (σχήμα 3). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p=0,031$ ) και έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα παλαιότερων εργασιών (254). Όσο αφορά την κατανομή των αλληλόμορφων του γονιδίου της αρωματάσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ‘PCOS’ γυναίκες και τις ‘non PCOS’.

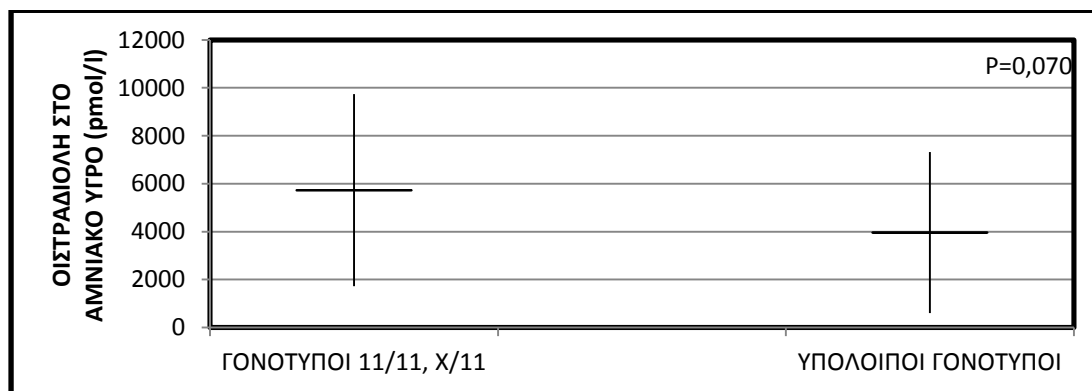


Σχήμα 3. Διαφορές στην κατανομή των (TAAA)<sub>n</sub> αλληλόμορφων του γονιδίου της SHBG ανάμεσα στις ‘non PCOS’ και τις ‘PCOS’ έγκυες γυναίκες που κυοφορούσαν θήλα έμβρυα.

**Η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου της αρωματάσης με τα επίπεδα των ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών με θήλεα έμβρυα.**

Το mRNA της αρωματάσης του πλακούντα ανιχνεύεται αποκλειστικά στον πλακούντα και είναι τροφοβλαστικής προέλευσης. Για το λόγο αυτό για την γενετική ανάλυση του γονιδίου της αρωματάσης απομονώθηκε DNA από το αμνιακό υγρό των θηλέων εμβρύων.

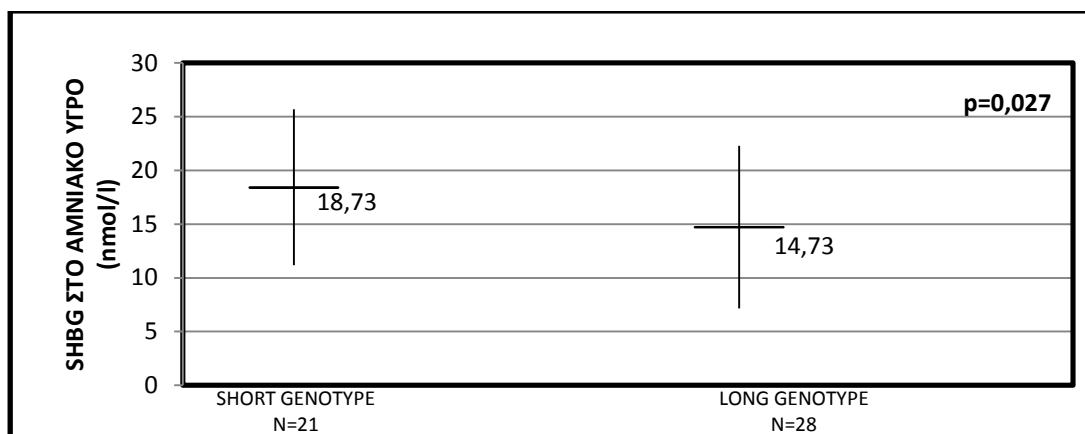
Από τη μελέτη των γονοτύπων της αρωματάσης, παρατηρήθηκε η τάση τα θήλεα έμβρυα που έφεραν ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο 11 (X/11, 11/11) να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό, υποδηλώνοντας ότι το αλληλόμορφο με αριθμό επαναλήψεων 11 πιθανά σχετίζεται με μεγαλύτερη δραστηριότητα της αρωματάσης στα θήλεα έμβρυα. Παρά ταύτα, η διαφορά αυτή κυμάνθηκε σε στατιστικά μη σημαντικά επίπεδα ( $p=0,070$ ).



Σχήμα 4. Σχέση των γονότυπων του πολυμορφισμού (*TTTA*)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19 με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.

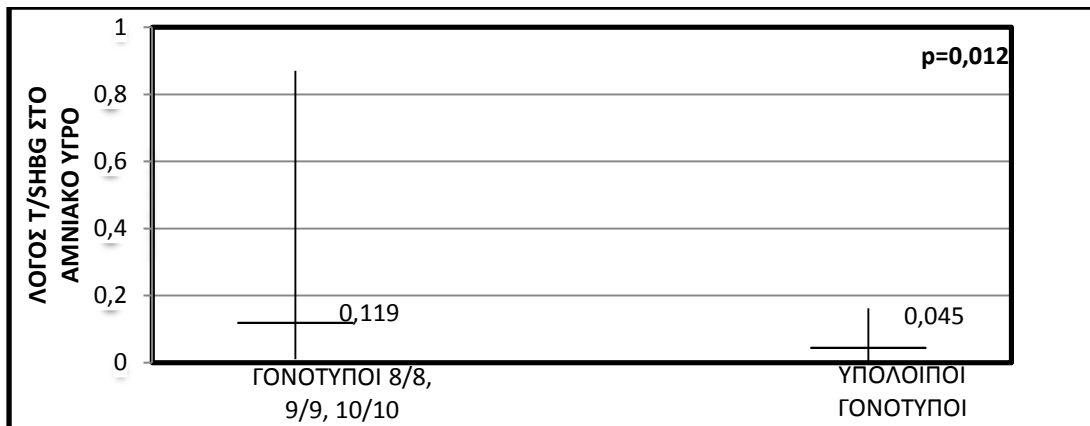
**Η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα της SHBG και ανδρογόνων στο αμνιακό υγρό γυναικών με θήλεα έμβρυα.**

Μελετήθηκε επίσης, η σχέση του πολυμορφισμού  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα των μητέρων που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα καθώς και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό. Οι γυναίκες που έφεραν γονότυπους με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (8/8, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10, 10/10) εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα SHBG στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τις γυναίκες φορείς γονοτύπων με μικρό αριθμό επαναλήψεων (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8) ( $p=0,027$ ). Η διαφορά αυτή ήταν ανεξάρτητη από το BMI και την εβδομάδα κύησης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση (Σχήμα 5). Επιπλέον, στις γυναίκες ομόζυγες για τα  $(TAAAA)$  αλληλόμορφα 8/8, 9/9 και 10/10 ο λόγος T/SHBG στο αμνιακό υγρό ήταν μεγαλύτερος από εκείνο των υπόλοιπων γυναικών  $p=0,012$  (Σχήμα 6). Το αποτέλεσμα ήταν ανεξάρτητο του BMI της μητέρας και την εβδομάδα κύησης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση.



Σχήμα 5. Σχέση των γονότυπων του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα της SHBG στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.





Σχήμα 6. Σχέση των γονότυπων του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG με τον λόγο T/SHBG στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυφορούσαν θήλεα έμβρυα.

#### **Σύγκριση των ορμονικών επιπέδων στο πλάσμα και το αμνιακό υγρό.**

Συγκρίνοντας τα επίπεδα των ορμονών στο πλάσμα της μητέρας και το αμνιακό υγρό, παρατηρήθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων της τεστοστρόνης στο μητρικό πλάσμα και το αμνιακό υγρό καθώς και μεταξύ των επιπέδων της SHBG στο μητρικό πλάσμα και το αμνιακό υγρό [( $r=0,367$ ,  $p<0,001$ ) ( $r=0,472$ ,  $p<0,001$ )] (πίνακας 6.A). Επιπλέον, καταγράφηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της SHBG και του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό ( $r= -0,297$ ,  $p=0,010$ ) (πίνακας 6.B). Οι παραπάνω συγκρίσεις ήταν ανεξάρτητες του BMI της μητέρας και της εβδομάδας κύησης που πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση.

<b>A. ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ-ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ</b>	
<b>T (nmol/l)</b>	r= 0,367 P< 0,001
<b>SHBG (nmol/l)</b>	r= 0,472 P< 0,001
<b>E<sub>2</sub></b>	r= 0,106 P= 0,322
<b>B. SHBG ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ</b>	
<b>ΛΟΓΟΣ T/SHBG ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ</b>	r= -0,297 P= 0,010

Πίνακας 6. A. Συσχετίσεις ορμονών στο αμνιακό υγρό και το μητρικό πλάσμα.  
B. Συσχέτιση της SHBG και του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό.

### **Σχέση μεταξύ SHBG του πλάσματος και του βάρους γέννησης των θηλέων νεογνών.**

Καταγράφηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της SHBG του πλάσματος και του βάρους γέννησης των θηλέων νεογνών και αρνητική συσχέτιση του λόγου T/SHBG του πλάσματος με το βάρος γέννησης των θηλέων νεογνών μετά από έλεγχο για την εβδομάδα κύησης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση, την εβδομάδα κύησης κατά την έναρξη του τοκετού και το BMI της μητέρας (πίνακας 7).

B.	ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ
SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	r= 0,492 p= 0,002
ΛΟΓΟΣ T/SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	r= -0,451 p= 0,004

Πίνακας 7. Συσχέτιση των επιπέδων της SHBG και του λόγου T/SHBG στο μητρικό πλάσμα και του βάρους γέννησης των θηλέων νεογνών.

### **8.2 . Μελέτη γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα.**

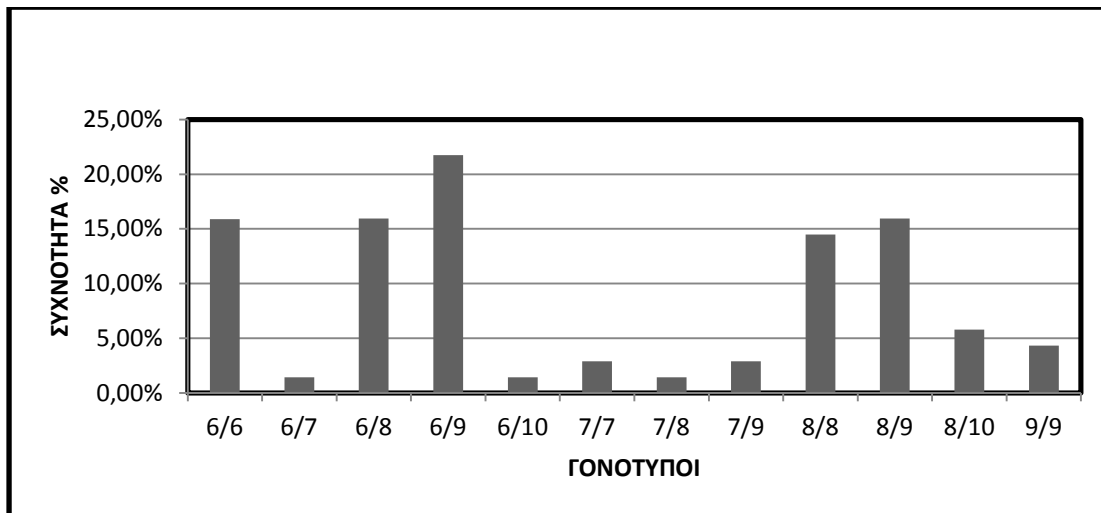
Μελετήθηκαν οι γυναίκες με άρρενα έμβρυα με σκοπό την συμβολή στην κατανόηση της πιθανής συμβολής των υποψήφιων γονιδίων της SHBG και της αρωματάσης CYP 19 στην πρόκληση υπερανδρογοναιμίας στο ενδομήτριο περιβάλλον και πιθανά στον προγραμματισμό μεταβολικών διαταραχών. Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών με άρρενα έμβρυα.

	Mean±SD
SHBG ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (nmol/l)	14,56±7,927
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (nmol/l)	0,43±0,18
ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (pmol/l)	0,43±0,29
ΛΟΓΟΣ T/ΟΙΣΤΑΡΔΙΟΛΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ	135,25±86,03

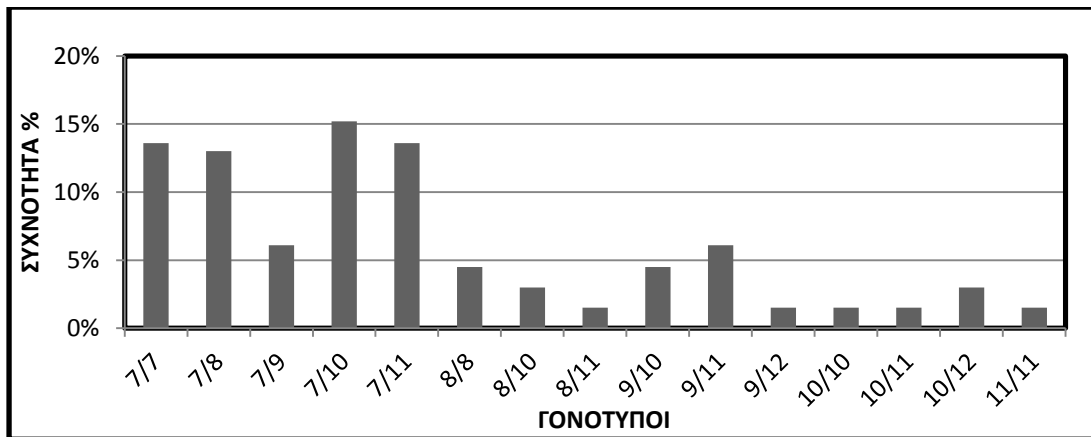
Πίνακας 8. Μέτρηση ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα.

**Πολυμορφισμός (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG και (TTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19-9.**

Ταυτοποιήθηκαν πέντε αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με 6-10 TAAAA επαναλήψεις και 6 αλληλόμορφα του γονιδίου της αρωματάσης με 7-12 TTTA επαναλήψεις αντίστοιχα. Στα σχήματα 7 και 8 παρατίθενται οι κατανομές των αλληλόμορφων (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG και των αλληλόμορφων (TTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19-9 αντίστοιχα. Για το γονίδιο της SHBG, τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παρουσίασε ο γονότυπος 6/9 ενώ για το γονίδιο της αρωματάσης CYP 19 ο γονότυπος 7/10 στις γυναίκες που κυφορούσαν άρρενα έμβρυα.



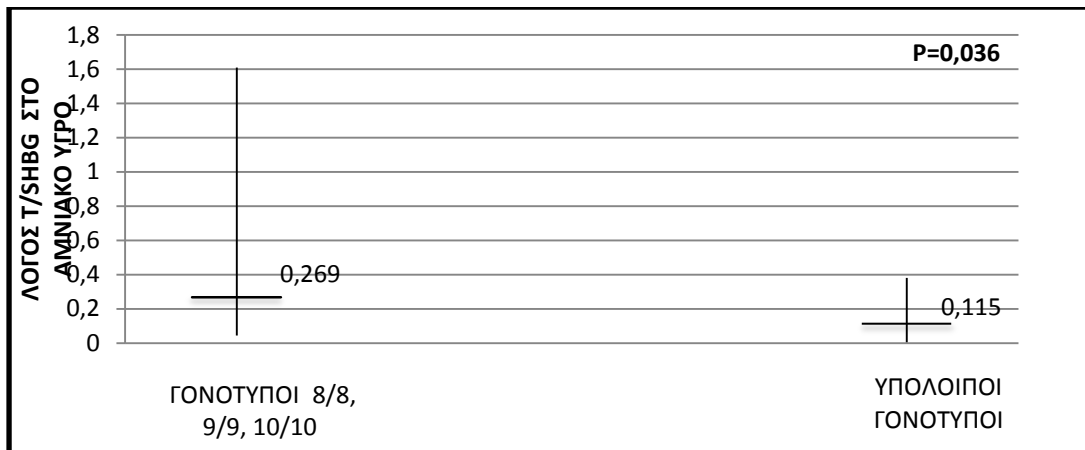
Σχήμα 7. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού (TAAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG.



Σχήμα 8. Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού  $(TTTA)_n$  του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19.

**Η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG  $(TAAAA)_n$  με τα επίπεδα των ανδρογόνων στο αμνιακό υγρό γυναικών με άρρενα έμβρυα.**

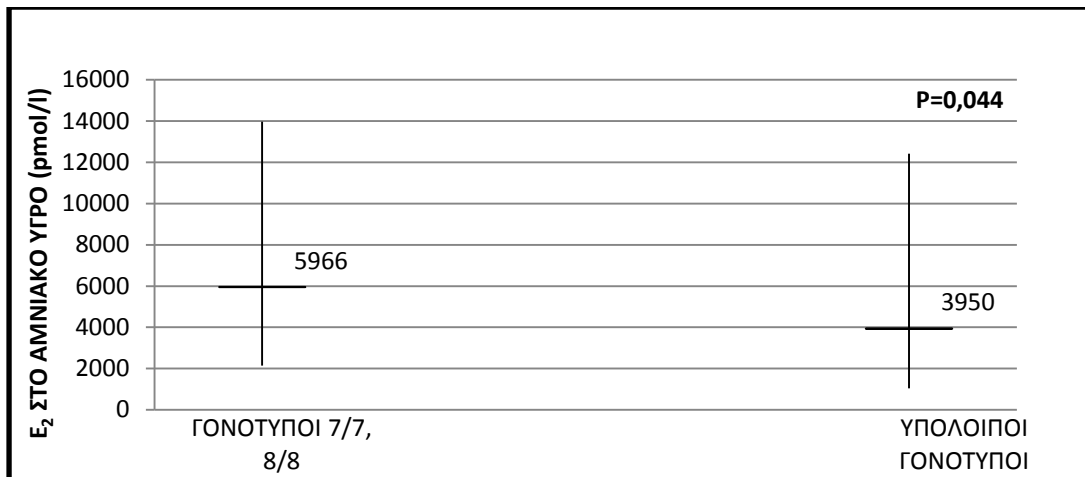
Μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα των μητέρων που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό. Οι γυναίκες που έφεραν γονότυπους 8/8, 9/9 και 10/10 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τις γυναίκες φορείς των υπόλοιπων γονοτύπων ( $p=0,036$ ) (Σχήμα 9). Η διαφορά αυτή ήταν ανεξάρτητη από το BMI της μητέρας και την εβδομάδα κύησης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση.



Σχήμα 9. Σχέση των γονότυπων του πολυμορφισμού  $(TAAAA)_n$  του γονιδίου της SHBG με τον λόγο T/SHBG στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα.

**Η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου της αρωματάσης με τα επίπεδα των ορμονών στο αμνιακό υγρό γυναικών με άρρενα έμβρυα.**

Μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού  $(TTTA)_n$  του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19 με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα των μητέρων που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό. Στα άρρενα έμβρυα που έφεραν τους γονότυπους 7/7 και 8/8 εμφανίστηκαν υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τα έμβρυα άλλων γονότυπων. Το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό και ανεξάρτητο από το BMI της μητέρας και την εβδομάδα κύησης που πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση ( $p=0,044$ ) (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Σχέση των γονότυπων του πολυμορφισμού ( $TTTA$ )<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυφορούσαν άρρενα έμβρυα.

#### **Σύγκριση των ορμονικών επιπέδων στο πλάσμα και το αμνιακό υγρό.**

Από τη σύγκριση των επιπέδων των ορμονών διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της τεστοστερόνης στο μητρικό πλάσμα και το αμνιακό υγρό και μεταξύ των επιπέδων της SHBG μεταξύ στο μητρικό πλάσμα και το αμνιακό υγρό [(r=0,303, p=0,015), (r=0,307, p=0,024)] (πίνακας 9). Οι παραπάνω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από έλεγχο για το BMI της μητέρας και την εβδομάδα κύησης που πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση.

---

**AMNIOTIC FLUID – MATERNAL SERUM**


---

	$r= 0,303$
<b>T(nmol/l)</b>	$P= 0,015$
	$r= 0,307$
<b>SHBG(nmol/l)</b>	$P= 0,024$

---

Πίνακας 9. Συσχετίσεις ορμονών στο αμνιακό υγρό και το μητρικό πλάσμα.

Η SHBG του αμνιακού υγρού είναι μητρικής προέλευσης. Επίσης, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στην τεστοστερόνη του μητρικού και εμβρυικού πλάσματος (142). Τα παραπάνω στοιχεία έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της σύγκρισης των επιπέδων των ορμονών τόσο στις κυήσεις με θήλεα έμβρυα όσο και σε εκείνες με άρρενα έμβρυα που πραγματοποιήθηκαν στη δική μας μελέτη. Πράγματι, η τεστοστερόνη του πλάσματος διέρχεται από τον πλακούντα. Θέλοντας να διαλευκάνουμε αν η σχέση αυτή είναι αμφίδρομη, δηλαδή αν μετακινούνται εμβρυικές ορμόνες προς το μητρικό πλάσμα, συγκρίναμε τα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα ανάμεσα στις γυναίκες με άρρενες κυήσεις και εκείνες που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα (πίνακας 10). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συγκέντρωση της τεστοστερόνης στα άρρενα έμβρυα αυξάνεται κατά την 16<sup>η</sup>-21<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Αν μετακίνηση ορμονών ήταν αμφίδρομη, θα έπρεπε να αντικατοπτρίζεται στο μητρικό πλάσμα η διαφορά στα επίπεδα τεστοστερόνης μεταξύ θηλέων και αρρένων κυήσεων. Όμως, τα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα των γυναικών με θήλεα και άρρενα έμβρυα στην δική μας μελέτη, ήταν παρόμοια. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με παλαιότερα αποτελέσματα (140, 143) και ενισχύουν την υπόθεση ότι ενώ επιτυγχάνεται μετακίνηση της τεστοστερόνης από το πλάσμα προς το εμβρυικό περιβάλλον, η μετακίνηση δεν είναι αμφίδρομη.



	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	Mean±SD	P value
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ (ng/dl)	1. ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΚΥΟΦΟΡΟΥΣΑΝ	0,42 ± 0,25	ns
	2. ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΚΥΟΦΟΡΟΥΣΑΝ ΘΗΛΕΑ ΕΜΒΡΥΑ	0,41 ± 0,24	

Πίνακας 10. Σύγκριση επιπέδων τεστοστερόνης στο πλάσμα μεταξύ γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και εκείνων που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το αμνιακό υγρό δίνει ακριβέστερη αντιπροσώπευση του εμβρυϊκού περιβάλλοντος σε ανδρογόνα σε σύγκριση με το μητρικό πλάσμα καθώς από την 12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης το αμνιακό υγρό παράγεται κυρίως από τον εμβρυϊκό νεφρό (131, 132). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, συμφωνούν με τις παραπάνω μελέτες αφού καταφέρνουν να αντικατοπτρίσουν το εμβρυϊκό ορμονικό περιβάλλον και ενισχύουν την άποψη ότι η μέτρηση τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο μέτρησης προγεννητικών στεροειδών ορμονών (πίνακας 11).

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	Mean±SD	P value
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ (ng/dl)	1. ΑΡΡΕΝΑ ΕΜΒΡΥΑ	0,43 ± 0,18	P< 0,001
	2. ΘΗΛΕΑ ΕΜΒΡΥΑ	0,18 ± 0,12	

Πίνακας 11. Σύγκριση επιπέδων τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό μεταξύ αρρένων και θηλέων εμβρύων.

**Σχέση μεταξύ SHBG του πλάσματος και του βάρους γέννησης των αρρένων νεογνών.**

Καταγράφηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της SHBG του πλάσματος και του βάρους γέννησης των αρρένων νεογνών και αρνητική συσχέτιση του λόγου T/SHBG του πλάσματος με το βάρος γέννησης των αρρένων νεογνών μετά από έλεγχο για την εβδομάδα κύησης κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η αμνιοπαρακέντηση, την εβδομάδα κύησης κατά την έναρξη του τοκετού και το BMI της μητέρας (πίνακας 7).

<b>B.</b>	<b>ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ</b>
<b>SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ</b>	r= 0,654
	p= 0,004
<b>ΛΟΓΟΣ T/SHBG ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ</b>	r= -0,491
	p= 0,039

Πίνακας 7. Συσχέτιση των επιπέδων της SHBG και του λόγου T/SHBG στο μητρικό πλάσμα και του βάρους γέννησης των αρρένων νεογνών.

## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην μελέτη αυτή διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος των γονιδίων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) και της αρωματάσης (CYP 19), στη ρύθμιση των επιπέδων των ανδρογόνων της μητέρας και του εμβρύου στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος δύο VNTR πολυμορφισμών, του πολυμορφισμού (TAAAA)<sub>n</sub> της SHBG και του πολυμορφισμού (TTTA)<sub>n</sub> της CYP 19 στην έκθεση των θηλέων εμβρύων σε περίσσεια ανδρογόνων και πιθανά στον ενδομήτριο προγραμματισμό του ΣΠΩ.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ορμονών στο πλάσμα και το αμνιακό υγρό των εγκύων γυναικών της μελέτης. Τα επίπεδα της SHBG και της οιστραδιόλης στο μητρικό πλάσμα βρέθηκαν σαφώς αυξημένα, όπως αναμενόταν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, καθώς οι ορμόνες αυτές φαίνεται να προστατεύουν το έμβρυο κατά την κύηση από τα ανδρογόνα της μητέρας. Το αμνιακό υγρό που λαμβάνεται κατά το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης θεωρείται αξιόπιστο παράθυρο μελέτης των εμβρυικών στεροειδών καθώς από την 12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης παράγεται κυρίως από τον εμβρυικό νεφρό (131, 132). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, συμφωνούν με την παραπάνω υπόθεση, καθώς το αμνιακό υγρό αντικατοπτρίζει το εμβρυικό ορμονικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα ήταν υψηλότερα από αυτά των γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα ( $p < 0,001$ ). Έτσι, ενισχύεται η άποψη ότι η μέτρηση τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο μέτρησης προγεννητικών στεροειδών ορμονών.

Αντικείμενο μελέτης έχει αποτελέσει στο παρελθόν η ικανότητα των στεροειδών ορμονών του πλάσματος να διαχέονται στο αμνιακό υγρό. Στη μελέτη μας, η θετική συσχέτιση των ορμονών μεταξύ του μητρικού πλάσματος και του αμνιακού υγρού για την SHBG, T και E<sub>2</sub> αντίστοιχα ενίσχυσε την υπόθεση μετακίνησης των ορμονών προς το αμνιακό υγρό τόσο στις κυήσεις με θήλεα όσο και με άρρενα έμβρυα. Τα αποτελέσματα μας ευθυγραμμίζονται με αυτά των Gitau et al., όπου για πρώτη φορά αναδείχθηκε η θετική συσχέτιση της τεστοστερόνης στο αμνιακό υγρό και στο πλάσμα (141).

Αντίθετα, τα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα μεταξύ των γυναικών με θήλεα και άρρενα έμβρυα στη μελέτη μας ήταν παρόμοια. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με παλαιότερα αποτελέσματα (139-142) και ενισχύουν την υπόθεση ότι ενώ επιτυγχάνεται μετακίνηση της τεστοστερόνης από το πλάσμα προς το εμβρυϊκό περιβάλλον, η μετακίνηση δεν είναι αμφίδρομη.

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της SHBG του πλάσματος και του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό προσθέτει νέα δεδομένα στην υπόθεση προστασίας του εμβρύου από τα ανδρογόνα της μητέρας μέσω της δράσης της SHBG. Έτσι, η υπερανδρογοναιμία σε συνδυασμό με τη μειωμένη δράση της SHBG και/ή της αρωματάσης του πλακούντα θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανό μηχανισμό έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να καθορίζεται εν μέρει γενετικά. Πράγματι, μελέτη των πολυμορφισμών (*TAAAA*)<sub>n</sub> της SHBG καθώς και του πολυμορφισμού (*TTTA*)<sub>n</sub> της αρωματάσης CYP 19 αποκάλυψε σημαντικά στοιχεία προς την κατεύθυνση αυτή. Αρχικά, μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού (*TAAAA*)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό μητέρων που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα. Οι γυναίκες που έφεραν γονότυπους με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (8/8, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10, 10/10) εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα SHBG στο αμνιακό υγρό σε σύγκριση με γυναίκες που έφεραν γονότυπους με μικρό αριθμό επαναλήψεων (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8) ( $p=0,040$ ). Επιπλέον, στις γυναίκες ομόζυγες για τα αλληλόμορφα 8/8, 9/9 και 10/10, ο λόγος T/SHBG στο αμνιακό υγρό ήταν μεγαλύτερος από εκείνο των υπολοίπων γυναικών ( $p=0,012$ ). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη συσχέτισης του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα της SHBG και τον λόγο T/SHBG στο αμνιακό υγρό. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας επιβεβαιώνουν τη λειτουργική σημασία του πολυμορφισμού (*TAAAA*)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG in vivo όπως και προηγούμενες μελέτες (178, 257). Έτσι, τα αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό *TAAAA* επαναλήψεων πιθανότατα ελαττώνουν τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου της SHBG. Ωστόσο, in vitro πειράματα αναδεικνύουν το αλληλόμορφο με τις έξι επαναλήψεις ως αυτό με τη μικρότερη μεταγραφική ικανότητα. Η ασυμφωνία μεταξύ εργαστηριακών και κλινικών μελετών μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από το ότι η αδρανοποίηση του αλληλίου με 6

επαναλήψεις στην μετάφραση του γονιδίου της SHBG, εξαρτάται από την παρουσία της SP1 θέσης σύνδεσης που σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να λειτουργήσει ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής. Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα της μεταγραφής εξαρτάται από την αφθονία των παραγόντων που συνθέτουν το συγκρότημα της θέσης σύνδεσης SP1.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού (*TTTA*)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP 19 με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό μητέρων που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα. Το mRNA της αρωματάσης του πλακούντα ανιχνεύεται αποκλειστικά σε αυτόν και είναι τροφοβλαστικής προέλευσης. Έτσι, για την γενετική ανάλυση του γονιδίου της αρωματάσης απομονώθηκε DNA από το αμνιακό υγρό των θηλέων εμβρύων. Από τη μελέτη των γονοτύπων της αρωματάσης παρατηρήθηκε η τάση τα θήλεα έμβρυα που έφεραν ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο 11 (X/11, 11/11) να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό, υποδηλώνοντας ότι οι θηλυκοί φορείς των γονοτύπων χωρίς το αλληλίο με αριθμό επαναλήψεων 11, πιθανά σχετίζονται με χαμηλότερη δραστηριότητα της αρωματάσης και κατά συνέπεια με υψηλότερο κίνδυνο ενδομήτριας έκθεσης σε περίσσεια ανδρογόνων. Παρά ταύτα, η διαφορά αυτή κυμάνθηκε σε στατιστικά μη σημαντικά επίπεδα ( $p=0,070$ ).

Αξίζει να αναφερθεί, ότι πιθανά οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί δρουν συνεργικά ως προς τον προγραμματισμό του ΣΠΩ, επιδρώντας στην βιοδιαθεσιμότητα των ανδρογόνων και την αρωματοποίηση αντίστοιχα. Πράγματι, τα αποτελέσματα της μελέτης των Xita et al., αποκάλυψαν ότι η υποομάδα γυναικών με ΣΠΩ με μεγάλου αριθμού επαναλήψεων *TAAAA* SHBG αλληλία και μικρού αριθμού επαναλήψεων *TTTA* CYP 19 αλληλία παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης και DHEAS και τα χαμηλότερα επίπεδα SHBG σε σύγκριση τις γυναίκες άλλων γονοτυπικών συνδυασμών (290). Δυστυχώς, στη δική μας μελέτη ο μικρός αριθμός του πληθυσμού των αντίστοιχων υποομάδων δεν επέτρεψε την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι σημαντικά για αρκετούς λόγους. Πρώτον, υποστηρίζεται η συμβολή των γενετικών παραγόντων στην έκθεση του θήλεος εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων μέσω της μειωμένης δράσης της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης. Δεύτερον, η συμβολή των γονοτύπων με αυξημένο αριθμό επαναλήψεων στην πρόκληση ενδομήτριας υπερανδρογοναιμίας δίνει γενετική εξήγηση στην εξελικτική θεωρία για την παθογένεια του συνδρόμου (developmental origin hypothesis). Η θεωρία αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Abbott et al., και βασίστηκε σε εργαστηριακές και κλινικές παρατηρήσεις (156). Μελέτες σε πειραματόζωα, έδειξαν σαφώς ότι η υπερέκθεση σε ανδρογόνα κατά την ενδομήτριο ζωή οδήγησε σε εμφάνιση κλινικών χαρακτηριστικών όμοιων με αυτά του ΣΠΩ, στη μετέπειτα ζωή. Συγκεκριμένα, ΣΠΩ φαινότυπο ανέπτυξαν πειραματικά μοντέλα *rhesus* πιθήκων (156, 291) και θήλεα πρόβατα (292, 293) μετά από έγχυση υψηλών δόσεων τεστοστερόνης στην ενδομήτριο ζωή. Τα πειραματόζωα αυτά εμφάνισαν υπερέκκριση ωχρινοτρόπου ορμόνης, υπεραπάντηση της ωθηκικής στεροειδογένεσης στην χοριακή γοναδοτροπίνη όπως επίσης διαταραχή της έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης, υπερανδρογοναιμία, ανωθυλακιορρηξία, πολυκυστικές ωθήκες και κεντρικού τύπου παχυσαρκία (294-296). Κλινικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν τη θεωρία του Abbott et al.. Συγκεκριμένα, γυναίκες με συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων ή συγγενείς εμβρυικούς ανδρογονοπαραγωγούς όγκους, παρουσίασαν κάποια χαρακτηριστικά φαινότυπου ΣΠΩ, όπως αυξημένες συγκεντρώσεις της βασικής LH και αυξημένη απάντηση της LH και 17-υδροξυπρογεστερόνης στην έγχυση GNRH στα θήλεα νεογνά (297).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα εργασιών που σχετίζονται με τη διερεύνηση της ενδομήτριας έκθεσης των εμβρύων σε περίσσεια ανδρογόνων και τον προγραμματισμό του ΣΠΩ, είναι συχνά αντικρουόμενα. Αρχικά παρουσιάστηκαν στοιχεία μελετών σύμφωνα με τα οποία τα ανδρογόνα του άρρενος εμβρύου επηρεάζουν πιθανά το θήλυ δίδυμο έμβρυο (298). Ωστόσο, σε επόμενη μελέτη, γυναίκες με δίδυμο αδελφό, δεν παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του ΣΠΩ, σε σχέση με γυναίκες με δίδυμη αδελφή. Βέβαια, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο επιπολασμός του ΣΠΩ (3-4%) στην δεύτερη

μελέτη ήταν μικρότερος από του γενικού πληθυσμού, παράγοντας που πιθανά περιορίσει την αξιοπιστία της μελέτης (299). Επίσης, πρόσφατη μελέτη των Hickey et al., αποκάλυψε ότι κορίτσια εφηβικής ηλικίας που διαγνώστηκαν με ΣΠΩ, δεν εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων στον ομφάλιο λώρο (176). Στα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης εργασίας συγκαταλέγονται η ελλιπής γνώση για την ακρίβεια με την οποία το αίμα ομφαλίου λώρου αντικατοπτρίζει την έκθεση του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων και τα προβλήματα στη διάγνωση του ΣΠΩ την χρονική περίοδο της εφηβείας. Λίγο αργότερα, καταγράφηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της τεστοστερόνης του μητρικού πλάσματος κατά την 18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, και την συγκέντρωση της AMH στην εφηβεία, ενισχύοντας περαιτέρω την υπόθεση ότι τα επίπεδα ανδρογόνων στο πλάσμα της μητέρας επηρεάζουν την ωοθηκική λειτουργία των θηλέων τέκνων στη μετέπειτα ζωή (300). Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης στο φλεβικό αίμα ομφαλίου λώρου θηλέων νεογνών μητέρων με ΣΠΩ (301). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ο πολυμορφισμός (TAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG αποτελεί συνδετικό κρίκο με την εξελικτική θεωρία που μόλις περιγράφηκε. Όπως σε προηγούμενες εργασίες έτσι και στη δική μας, οι γυναίκες με ΣΠΩ ήταν συχνότερα φορείς των αλληλόμορφων με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων σχετίστηκαν με μειωμένα επίπεδα SHBG και αυξημένα επίπεδα T/SHBG στο αμνιακό υγρό, δίνει τη δυνατότητα να υποθέσουμε πως τα θήλεα έμβρυα γυναικών με ΣΠΩ βρίσκονται έμμεσα υπό αυξημένο κίνδυνο έκθεσης σε ανδρογόνα κατά την εμβρυϊκή ζωή όπου γίνεται και ο προγραμματισμός της διαφοροποίησης των ιστών.

Έχουν προταθεί πολλοί πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης ενδομήτριου προγραμματισμού του ΣΠΩ ως συνέπεια έκθεσης του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων. Οι επιγενετικοί παράγοντες θεωρούνται ως ένας πιθανός μηχανισμός. Ένα μονοπάτι θα μπορούσε να αποτελέσει η ενίσχυση της παραγωγής του μετατρεπτικού παράγοντα (TGF), μιας β ρυθμιστικής πρωτεΐνης εξωκυττάριας ουσίας που έχει τη δυνατότητα να διαταράσσει την

ωοθηκική διαφοροποίηση προκαλώντας φαινότυπο πολυκυστικών ωοθηκών (302). Η υπόθεση αυτή είναι αρκετά ελκυστική καθώς η έκθεση σε ανδρογόνα αυξάνει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών (198) ενώ άλλα μέλη της οικογένειας της TGF- $\beta$  συμπεριλαμβανομένης της (AMH) αντιμυλλέριου ορμόνης ρυθμίζουν την έκφραση της CYP 17, ενός κύριου ενζύμου στην παραγωγή ανδρογόνων (199). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πρόσφατη μελέτη των Ning Xu et al., σε rhesus πιθήκους προσδιορίστηκε συγκεκριμένη τροποποίηση του επιγενώματος στα νεογνά και τους ενήλικες πιθήκους. Συγκεκριμένα, μεθυλίωση γονιδίων σύμφωνα με δεδομένα σε νεογνά και ενήλικες πιθήκους σχετίστηκε με την παραγωγή του μετατρεπτικού παράγοντα (TGF) που όπως αναφέρθηκε εμπλέκεται στην παθογένεια του ΣΠΩ (303-307). Δεδομένου ότι οι επιγενετικοί παράγοντες συμμετέχουν στους μηχανισμούς ενδομήτριου προγραμματισμού μεταβολικών διαταραχών (195), και ότι το ίδιο το ΣΠΩ σχετίζεται με μεταβολικές διαταραχές όπως ο ΣΔ τύπου 2 και η υπέρταση (308, 309), θα μπορούσε να υποθεθεί πως η έκθεση του εμβρύου σε περίσσεια ανδρογόνων προγραμματίζει την ανάπτυξη και άλλων μεταβολικών διαταραχών.

Στα πλαίσια αυτά, διερευνήθηκαν και οι γυναίκες του πληθυσμού μελέτης που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού (TAAA)<sub>n</sub> του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό μητέρων που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα. Οι γυναίκες που έφεραν γονότυπους 8/8 και 9/9 του πολυμορφισμού (TAAA)<sub>n</sub> της SHBG, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τις γυναίκες φορείς των υπόλοιπων γονοτύπων ( $p=0,036$ ). Μελετήθηκε επίσης, η σχέση του πολυμορφισμού (TTTA)<sub>n</sub> του γονιδίου της αρωματάσης CYP19 με τα επίπεδα ορμονών στο πλάσμα των μητέρων που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και με τα επίπεδα ορμονών στο αμνιακό υγρό. Στα άρρενα έμβρυα που έφεραν τους γονότυπους 7/7 και 8/8 εμφανίστηκαν υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τα έμβρυα φορείς άλλων γονοτύπων. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που υποστηρίζει την πιθανότητα η υπερανδρογοναιμία της μητέρας σε συνδυασμό με μειωμένη δραστικότητα της SHBG και/ή της αρωματάσης να συμβάλλουν στην παρουσία περιβάλλοντος



υπερανδρογοναιμίας στα άρρενα έμβρυα και πιθανά τον ενδομήτριο προγραμματισμό μεταβολικών διαταραχών. Εργαστηριακές μελέτες σε rhesus αρσενικούς πιθήκους ευθυγραμμίζονται με την υπόθεση αυτή, καθώς οι πίθηκοι που εκτέθηκαν στην εμβρυική ζωή σε περίσσεια ανδρογόνων, εμφάνισαν αντίσταση στην ινσουλίνη και αυξημένη έκκριση ινσουλίνης μετά από φόρτιση με γλυκόζη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά καθώς είναι η πρώτη φορά που γενετικοί παράγοντες σχετίζονται με την πρόκληση υπερανδρογοναιμίας στο ενδομήτριο περιβάλλον αρρένων εμβρύων. Η συμβολή των γονοτύπων στην πρόκληση ενδομήτριας υπερανδρογοναιμίας θα μπορούσε να δώσει γενετική εξήγηση στην εξελικτική θεωρία και άλλων διαταραχών, εκτός του ΣΠΩ, στα πλαίσια του μεταβολικού συνδρόμου.

Πρόσφατα περιγράφηκε μία νέα υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει περαιτέρω τον ενδομήτριο προγραμματισμό μεταβολικών διαταραχών. Η υπόθεση αυτή ονομάζεται θεωρία της επεκτασιμότητας του λιπώδους ιστού (adipose expandability theory). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η διαταραχή της ανάπτυξης και η αντιδραστική προσπάθεια επανάκτησης του βάρους νωρίς στη μετανεογνική ζωή (catch up growth), προδιαθέτει σε περιορισμό επέκτασης του υποδόριου λίπους που μακροπρόθεσμα οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερανδρογοναιμία και φαινότυπο όμοιο με αυτό του ΣΠΩ (200). Η ενδομήτρια έκθεση στα ανδρογόνα θα μπορούσε να σχετιστεί με την υπόθεση επεκτασιμότητας του λιπώδους ιστού. Συγκεκριμένα, η τεστοστερόνη και η δευδροτεστοστερόνη, φαίνεται να αναστέλλουν την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων από προλιποκύτταρα σε λιποκύτταρα. Έτσι, η ενδομήτρια έκθεση στα ανδρογόνα θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη ανάπτυξη του υποδόριου λίπους σε κρίσιμο στάδιο της ανάπτυξης. Η υπόθεση ενισχύεται περαιτέρω από στοιχεία μελετών σε πρόβατα που εκτέθηκαν κατά την εμβρυική ζωή σε περίσσεια ανδρογόνων και παρουσίασαν χαμηλό βάρος γέννησης (214). Νεογέννητα αγόρια, λόγω έκθεσης σε περίσσεια ανδρογόνων στην εμβρυική ζωή, παρουσίασαν λιγότερη ποσότητα λίπους σε σχέση με τα νεογέννητα θήλεα (215), ενώ μελέτες σε νεογνά με ενδομήτρια διαταραχή ανάπτυξης, έδειξαν ότι η υποδóρια αύξηση λίπους περιορίστηκε περαιτέρω στην προσπάθεια ανάκτησης μάζας (216). Επίσης, το χαμηλό βάρος γέννησης έχει σχετιστεί σε

επιδημιολογικές μελέτες με την ανάπτυξη ΣΔ τύπου 2 και καρδιομεταβολικές διαταραχές στην ενήλικη ζωή (310). Κορίτσια που γεννήθηκαν μικρά για την ηλικία κύησης (SGA) είχαν την τάση να παρουσιάζουν υπερινσουλιναίμια και κεντρική παχυσαρκία στην παιδική ηλικία (152), να μειώνουν τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας στην εφηβεία (311) και να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου κατά την ενήλικη ζωή (312).

Στα πλαίσια της περαιτέρω διερεύνησης αυτής της υπόθεσης καταγράψαμε το βάρος γέννησης και την ακριβή ημερομηνία τοκετού των νεογνών που συμμετείχαν στη μελέτη. Παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της SHBG του πλάσματος και του βάρους γέννησης και αρνητική συσχέτιση του λόγου T/SHBG του πλάσματος με το βάρος γέννησης των νεογνών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ σε παλαιότερη μελέτη σύγκρισης γυναικών με ΣΠΩ με και χωρίς αντίσταση στην ινσουλίνη δεν βρέθηκε διαφορά στο βάρος γέννησης των νεογνών (313), σε μελέτη μεταξύ γυναικών με ΣΠΩ και υγιών μαρτύρων, οι πρώτες εμφάνισαν μεγαλύτερη επίπτωση γέννησης μικρών για την ηλικία κύησης νεογνών σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες (147). Οι μελέτες αυτές σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της δικής μας εργασίας υποστηρίζουν ότι πιθανά τα ανδρογόνα, σε μεγαλύτερο βαθμό από την ινσουλίνη, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Έτσι, οι δύο θεωρίες, αυτή της ενδομήτριας έκθεσης σε περίσσεια ανδρογόνων και αυτή της δυνατότητας επέκτασης του λιπώδους ιστού πιθανά αποτελούν τμήμα ενός ενιαίου μηχανισμού ικανού να προγραμματίζει αλλαγές στο ενδομήτριο περιβάλλον που οδηγούν σε εμφάνιση ασθενειών στην ενήλικη ζωή.

## 9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η παρουσία πολυμορφικών γονοτύπων σχετίζεται με μειωμένη λειτουργικότητα του εμβρυοπλάκουντιακού φραγμού κατά την 16<sup>η</sup> με 21<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα της SHBG στο μητρικό πλάσμα και υψηλά επίπεδα του λόγου T/SHBG σχετίζονται με χαμηλό βάρος γέννησης θηλέων και αρρένων νεογνών αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η παρουσία ενδομήτριας υπερανδρογοναιμίας σε συνδυασμό με την παρουσία πολυμορφικών γονοτύπων θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον ενδομήτριο προγραμματισμό μεταβολικών διαταραχών, όπως του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, στις γυναίκες.

## 10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε η πιθανή συμβολή του αριθμού επαναλήψεων (TAAAA)ν των αλληλόμορφων της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) και του αριθμού των επαναλήψεων (TTTA)ν των αλληλόμορφων της αρωματάσης στην έκθεση των εμβρύων σε περίσσεια ανδρογόνων.

**Μέθοδοι:** Ο πληθυσμός που μελετήθηκε αφορά 199 έγκυες γυναίκες, 103 που κυοφορούσαν θήλεα και 99 που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα. Οι γυναίκες του πληθυσμού μελέτης επεβλήθησαν σε αμνιοπαρακέντηση την 16<sup>η</sup> με 21<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, λόγω ηλικίας (μεγαλύτερες των 35 ετών). Ελήφθησαν δείγματα αμνιακού υγρού και μητρικού πλάσματος, από όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα της SHBG, της ολικής τεστοστερόνης (T) και οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>). Το DNA απομονώθηκε από τα περιφερικά λευκοκύτταρα και τα αμνιακά κύτταρα. Ο γονοτυπικός προσδιορισμός των πολυμορφισμών SHBG(TAAAA)ν και CYP 19-9 (TTTA)ν πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για 75 γυναίκες του υπό μελέτη πληθυσμού, καταγράφηκε το βάρος γέννησης των θηλέων νεογνών τους.

**Αποτελέσματα:** Οι υγιείς γυναίκες που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα και έφεραν γονοτύπους του γονιδίου της SHBG με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (8/8, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10, 10/10), εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα SHBG στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τις γυναίκες φορείς γονοτύπων με μικρό αριθμό επαναλήψεων (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8) ( $p=0,027$ ). Επιπλέον, εκ των γυναικών αυτών, οι ομόζυγες για τα (TAAAA) αλληλόμορφα 8/8, 9/9 και 10/10 παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό σε σύγκριση με τις ετερόζυγες και τις φορείς γονοτύπων με μικρό αριθμό επαναλήψεων (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8) ( $p=0,016$ ). Οι υγιείς γυναίκες που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και έφεραν γονοτύπους 8/8, 9/9 και 10/10 του γονιδίου της SHBG εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα του λόγου T/SHBG στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τις γυναίκες φορείς των υπόλοιπων γονοτύπων ( $p=0,036$ ). Τα άρρενα έμβρυα φορείς των γονοτύπων 7/7 και 8/8 του γονιδίου

της CYP19 παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης στο αμνιακό υγρό σε σύγκριση με τα άρρενα έμβρυα φορείς άλλων γονοτύπων. Παρατηρήθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ μητρικού πλάσματος και αμνιακού υγρού για τα επίπεδα της SHBG [κυήσεις θηλέων ( $r=0,472$ ,  $p<0,001$ ), κυήσεις αρρένων ( $r=0,303$ ,  $p=0,0150$ )] της ολικής τεστοστερόνης [κυήσεις θηλέων ( $r=0,367$ ,  $p<0,001$ ), κυήσεις αρρένων ( $r=0,307$ ,  $p=0,024$ )] αντίστοιχα. Τέλος, το βάρος γέννησης των θηλέων και αρρένων νεογνών αντίστοιχα, σχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα της SHBG [( $r=0,492$ ,  $p=0,002$ ), ( $r=0,054$ ,  $p=0,004$ )] και αρνητικά με τον λόγο T/SHBG [( $r=-0,451$ ,  $p=0,004$ ), ( $r=-0,491$ ,  $p=0,039$ )] στο στο μητρικό πλάσμα.

**Συμπέρασμα:** Η παρουσία πολυμορφικών γονοτύπων σχετίζεται με μειωμένη λειτουργικότητα του εμβρυοπλακουντιακού φραγμού κατά την 16<sup>η</sup> με 21<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα της SHBG στο μητρικό πλάσμα και υψηλά επίπεδα του λόγου T/SHBG σχετίζονται με χαμηλό βάρος γέννησης θηλέων και αρρένων νεογνών αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η παρουσία ενδομήτριας υπερανδρογοναιμίας σε συνδυασμό με την παρουσία πολυμορφικών γονοτύπων θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον ενδομήτριο προγραμματισμό μεταβολικών διαταραχών, όπως του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, στις γυναίκες.

## 11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΜΕ ΕΚΤΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

**Title: The role of the sex hormone-binding globulin (SHBG) and the aromatase in the regulation of the androgen levels of the mother and the fetus in the polycystic ovarian syndrome (PCOS).**

**Pamporaki Christina**

**INTRODUCTION**

Prenatal period is a time of rapid cellular proliferation and differentiation as well as functional maturation of various organ systems. These processes are very sensitive to changes in the nutritional and hormonal intrauterine environment. Epidemiological and clinical studies have shown that impaired fetal growth is associated with an increased risk of cardiometabolic diseases in adult life. Importantly, low birth weight has been associated with early adrenarche in girls followed by hyperisnulinemic androgen excess in adolescence. These observations have led to the concept of fetal origins of adult diseases.

In this context, evidence has accumulated in support of the hypothesis of fetal programming of metabolic disorders by androgen excess. Indeed, studies in non-human primates as well as in sheep and rodents have convincingly shown that exposure of the female fetus to androgen excess may lead to the development of PCOS-like phenotypic traits in adult life. These features include ovulatory dysfunction, hyperandrogenism, multifollicular ovaries, as well as visceral adiposity and hyperisnulinemism. This concept is further supported by clinical observations that women with congenital adrenal hyperplasia or congenital adrenal virilizing tumors, developed features characteristic of PCOS in adulthood despite the normalization of androgen excess after birth. Rare cases of women with congenital SHBG and P450 aromatase deficiencies have been reported to develop some of the phenotypic traits of PCOS in adult life.

Brothers of women with PCOS have also presented an increased prevalence of hyperandrogenemia, insulin resistance and metabolic syndrome.

Experimental studies have shown that prenatally androgenized rhesus monkeys presented impaired insulin secretion and insulin resistance later in life, similarly to the prenatally androgenized female rhesus monkeys. These findings are consistent with the hypothesis that some metabolic abnormalities in PCOS are heritable and not sex specific.

The potential sources of gestational hyperandrogenism, to account for the developmental programming of metabolic disorders in humans, are not well understood. However, maternal hyperandrogenism in association with reduced placental SHBG and/or aromatase activity can provide a plausible mechanism and this may in part be genetically determined. Indeed, recent genetic association studies have indicated that common variants of genes determining androgen activity (AR gene polymorphisms) or genes that influence the availability of androgens to target tissues (SHBG and CYP19 gene polymorphisms), are associated with the PCOS phenotype and increased androgen levels. We hypothesized, therefore, that these genetic variants may provide the genetic link to prenatal androgenization in human.

The present study comes as a further step in this line and was set to examine the association of the  $(TAAAA)_n$  polymorphism in the SHBG gene and of the  $(TTTA)_n$  polymorphism in the CYP19-9 gene with amniotic fluid SHBG, androgen and estradiol levels in pregnant women carrying female and male fetuses respectively. The aim was to elucidate further the possible role of SHBG and/or aromatase in fetal programming by androgen excess.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

The study population consisted of 199 consecutive pregnant women of Greek origin, 103 carrying female and 93 carrying male fetuses. These women attended the Maternity Unit of the University Hospital of Ioannina, Greece, for routine amniocentesis because of age (older than 35 years) between the 16<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> weeks of gestation. The length of gestation was determined by the last menstrual period and ultrasonic measurement of crown-rump length (CRL). A detailed personal and gynecological history was taken and the body

mass index (BMI) of each patient before pregnancy and at the time of amniocentesis was recorded. Blood samples from the mother and 10 ml of amniotic fluid were collected for genetic analysis and hormonal measurements. Maternal blood samples were collected immediately following the amniocentesis. 99 of the women enrolled in the study population went into labor in our Hospital. The exact birth weight of their neonates was retrieved.

### **Hormonal assays**

Total testosterone (T) and estradiol (E<sub>2</sub>) levels of the serum and the amniotic fluid were determined by chemiluminescent micropracticle immunoassay on Dxi800 Beckman Counter Immunolyser (Abbott Laboratory). The CV values were for total testosterone 7% and for estradiol 10%. SHBG concentrations from serum and amniotic fluid were measured by chemiluminescent immunometric method (IMMULITE 2000 Immunoanalyser, DPC, Los Angeles, CA, USA). The CV values were 9% and 5.5% respectively.

### **Genotype analysis**

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leucocytes and amniotic stem cells. Amplification of the SHBG (*TAAAA*)<sub>n</sub> repeat region within the *Alu* sequence in the SHBG promoter and of the CYP19 (*TTTA*)<sub>n</sub> repeat region in the CYP19 gene were accomplished by PCR with a forward primer (5'-GCTTGA<sup>ACTCGAGAGGCAG</sup>-3') and a reverse primer (5'-CAGGGCCTAAACAGTCTAGCAGT-3') for the SHBG (*TAAAA*)<sub>n</sub> polymorphism and a forward primer (5'-GTTTGACTCCCTGAGTTTGA-3') and a reverse primer (5'-CAACTCGACCCTTCTTTATG-3') for the CYP19 (*TTTA*)<sub>n</sub> polymorphism. Amplified products were separated by 12% PAGE followed by silver staining and the number of repeats of each allele was determined. The number of *TAAAA* and of *TTTA* repeats in every particular allele was analyzed by sequencing the appropriate PCR products. A quality control assessment of the PCR method was done by random sampling and sequencing of the PCR products and duplication of the PCR assays. All samples were run in duplicate along with positive and negative controls.



## **Statistical analysis**

Data were analyzed with the SPSS statistical package in Windows version 20.0, (SPSS, Chicago, IL, USA). All continuous parameters were checked for normal distribution by Kolmogorov-Smirnov test. Differences in continuous parameters between genotypes were assessed with the t-test for independent groups and were confirmed with the non-parametric Mann-Whitney test. Stepwise multiple regression analysis was performed to find the independent impact of genotypes on biochemical parameters. Correlation's analysis was applied using Pearson's correlation coefficient. Chi-square test was used to compare the frequencies in genotypes as well as the frequencies in short and long genotypes for maternal SHBG genes between two different groups of pregnant women. All results are reported as mean  $\pm$ S.D. In all tests the level of significance was designated as  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Association of maternal SHBG polymorphisms with amniotic fluid SHBG and androgen levels in women carrying female fetuses.**

Women carrying female fetuses with long (TAAAA) allele genotypes (8/8, 8/9, 8/10, 9/9, 9/10, 10/10) had lower SHBG levels in the amniotic fluid compared to those with short allele genotypes (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8), ( $p=0.027$ ). The difference was independent of the gestational week at which amniocentesis took place. Women with long allele genotypes tended to have higher ratio T/SHBG in the amniotic fluid in comparison to those with short allele genotypes (6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8). However, the difference failed to reach statistical significance after adjustment for the week of gestation at which amniocentesis took place ( $p=0.080$ ). Women homozygous for the long allele genotypes (8/8, 9/9 and 10/10) had significantly higher T/SHBG ratio in amniotic fluid, compared to those carrying other genotypes ( $p=0.012$ ). The difference was independent of the gestational week at which amniocentesis took place.

**Association of fetal CYP19-9 polymorphisms with amniotic fluid SHBG and androgen levels.**

Female fetuses with at least one allele with 11 repeats (11/11, 11/X) tended to have higher levels of estradiol ( $E_2$ ) in amniotic fluid, compared with female fetuses carrying with other genotypes. However, the difference failed to reach statistical significance after adjustment for the week of gestation at which amniocentesis took place ( $p=0.070$ ).

**Association of maternal SHBG polymorphisms with amniotic fluid SHBG and androgen levels in women carrying male fetuses.**

Women carrying male fetuses, homozygous for the long allele genotypes (8/8, 9/9, 10/10) had higher ratio T/SHBG in amniotic fluid, compared to those carrying other genotypes ( $p=0.036$ ). The difference was independent of the gestational week at which amniocentesis took place.

**Association of fetal CYP19-9 polymorphisms with amniotic fluid SHBG and androgen levels.**

Male fetuses with 7/7 and 8/8 allele genotypes had higher levels of estradiol ( $E_2$ ) in amniotic fluid, compared to male fetuses carrying other genotypes ( $p=0.044$ ). The difference was independent of the gestational week at which amniocentesis took place.

**Relation between maternal and amniotic fluid hormonal levels.**

Comparing hormonal measurements between serum and amniotic fluid of women carrying female fetuses, a positive correlation was found between serum and amniotic fluid T ( $r=0.476$ ,  $p<0.001$ ) and SHBG ( $r=0.416$ ,  $p<0.001$ ) levels, respectively. Moreover, a negative correlation between the SHBG levels and the ratio of T/SHBG in amniotic fluid was observed ( $r= -0.476$ ,  $p<0.001$ ). The above measurements were controlled for BMI and the gestational week in which amniocentesis took place.

Comparing hormonal measurements between serum and amniotic fluid of women carrying male fetuses, a positive correlation was found between serum and amniotic fluid T ( $r=0.303$ ,  $p=0.015$ ) and SHBG ( $r=0.307$ ,  $p=0.024$ )

levels, respectively. The above measurements were controlled for BMI and the gestational week in which amniocentesis took place.

### **Relation between birth weight and maternal hormonal levels.**

Comparing serum hormonal measurements and the birth weight of the female neonates, the birth weight was positively correlated with the maternal SHBG ( $r=0.492$ ,  $p=0.002$ ) and negatively with the maternal T/SHBG ratio ( $r=-0.451$ ,  $p=0.004$ ). The above measurements were controlled for BMI, the gestational week in which amniocentesis took place and the week of partum.

Comparing serum hormonal measurements and the birth weight of the male neonates, the birth weight was positively correlated with the maternal SHBG ( $r=0.654$ ,  $p=0.004$ ) and negatively with the maternal T/SHBG ratio ( $r=-0.491$ ,  $p=0.039$ ). The above measurements were controlled for BMI, the gestational week in which amniocentesis took place and the week of partum.

## **DISCUSSION**

It is well documented that nutritional and hormonal alterations in the intrauterine environment can have long term impact on chronic metabolic disorders in later life. In support of this concept, we investigated the possible synergistic effect of the SHBG ( $TAAAA$ )<sub>n</sub> and the CYP19-9 ( $TTTA$ )<sub>n</sub> polymorphisms in the exposure of the female fetus to androgen excess.

It was previously shown that pregnant women with PCOS exhibit a significant increase in testosterone concentrations during pregnancy. High maternal testosterone can modify the energy homeostasis and thus decrease nutrient supplies to the placenta and the fetus. Alternatively, it may modify placental function and reduce the capacity for transport of nutrients to the fetus. Since testosterone is liposoluble steroid and according to our findings serum and amniotic concentrations correlate positively, one could expect androgens to cross the placenta and exert a direct effect on fetal growth and/or energy homeostasis. However, SHBG and/or placental aromatase when efficiently active, protect the fetus from androgen over exposure.

In the present study, women carrying female fetuses with long SHBG (TAAAA) allele genotypes presented lower SHBG levels in the amniotic fluid compared to those with short allele genotypes. There was also a tendency among women with the long allele SHBG genotypes to present higher levels of T/SHBG in the amniotic fluid compared to those with the short allele genotypes. Similar results were presented in women carrying male fetuses. Those homozygous for the long allele SHBG genotypes (8/8, 9/9 and 10/10) presented higher T/SHBG ratio in the amniotic fluid, compared to those carrying other genotypes. Importantly, regarding the aromatase activity, male fetuses with the 7/7 and 8/8 genotypes presented higher estradiol levels in the amniotic fluid compared to those carrying other genotypes, implying that these two particular genotypes may provide a more efficient aromatase activity.

Thus, maternal hyperandrogenism in association with the presence of particular polymorphic genotypes may synergistically contribute to the exposure of the developing fetus to androgen excess. We also investigated the association of the circulating endogenous androgens on fetal growth restraint known to be a major risk factor for diabetes and cardiometabolic disorders in adult life. Lower serum SHBG and higher T levels between the 16<sup>th</sup> -21<sup>th</sup> weeks of gestation, a developmentally crucial period for fetal growth, were associated with lower birth weight of male and female neonates respectively.

Different mechanisms to account for growth restraint and intrauterine programming have been suggested. As androgens are potent inhibitors of adipogenic differentiation of preadipocytes into adipocytes, prenatal androgen excess may lead to reduced fetal subcutaneous adipogenesis within a critical window of development. Therefore, the exhaustion of the capacity to expand subcutaneous adipose tissue in a metabolically safe way may lead to metabolic complications. Indeed, small for gestational age (SGA) girls were shown to underexpand their adipose tissue not only before birth but also during the postnatal phase of catch-up growth, when they prioritized the recovery of fat-free mass. In addition, male neonates, due to exposure of higher androgen levels during fetal life, presented decreased adipose tissue

in comparison to female neonates. High testosterone levels were also associated with decreased activity and expression of eNOS, which may in turn alter endothelium-dependent vascular responses, leading to endothelial dysfunction and high blood pressure later in life. These mechanisms can explain the inverse associations between birth weight, systolic blood pressure, cardiovascular diseases and mortality.

A limitation of our study includes the absence of ethnic heterogeneity in the study population, implying that these polymorphisms remain to be confirmed in populations with other genetic backgrounds. The study population was also limited to women older than 35 years. Our strength, on the other hand, lies on the evaluation of the fetal hormones in the amniotic fluid and not in umbilical cord. Amniotic fluid is considered to give a more acute representation of the fetal androgen environment and of the testosterone level differences between male and female fetuses in comparison to umbilical cord blood hormonal measurements. In addition, we observed the fetal hormonal profiling between 16<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> weeks of gestation, a period crucial for fetal growth and development.

In conclusion, the presence of polymorphic genotypes is associated with lower SHBG and higher T/SHBG levels in the amniotic fluid. Moreover, lower birth weight is associated with lower SHBG and higher T/SHBG levels during the 16<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> week of gestation. Thus, maternal hyperandrogenism in association with the presence of polymorphic genotypes may provide a genetic link to the developmental origin of metabolic disorders and in particular to that of PCOS in women.

## 12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 409:860.
2. Wolfsberg TG, Mc Entyre J, Schuler GD, et al. Guide to the draft human genome. 2001 *Nature* 409:824-26.
3. Xue Y, Cartwright A, Altschuler DL, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010. 28 467:1061-73.
4. Craig Fowler. Macro Mini Micro Satellite VNTR Polymorphism: Theory and Application State Forensic Services Adelaide.
5. Γεώργιος Γιανόπουλος Γενετική Εκδ. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο 2000.
6. Thomson MW, McInnes RR, Willard HF. Ιατρική γενετική Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
7. Guttmacher AE, Collins FS, et al. Genomic medicine –a primer. *N Engl J Med.* 2002 347:1512-20.
8. Haig D. Genomic imprinting and the evolutionary psychology of human kinship. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 108 2:10878-85.
9. Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays.* 2000 22:452-9.
10. Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet.* 1980 6:137-43.
11. Spence J, Perciaccante R, Greig G, et al. Uniparental disomy as a mechanism of human genetic disease. *Am J Hum Genet.* 1998 42:217-26.
12. Voss R, Ben-Simon E, Avital A, et al. Isodisomy of Chromosome 7 in a patient with Cystic Fibrosis: Could uniparental disomy be common in humans? *Am J Hum Genet.* 1989 45:373-38.
13. Moore JH, Williams SM. Epistasis and its implications for personal genetics. *Am. J. Hum. Genet.* 2009 85:309–20.
14. Phillips PC. Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Rev. Genet* 2008 9:855–67.
15. Tyler AL, Asselbergs FW, Williams SM, et al. Shadows of complexity: what biological networks reveal about epistasis and pleiotropy. *Bioessays* 2009 31:220–27.
16. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001 409:928–33.

17. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005 437:1299–320.
18. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007 449:851–61.
19. Wan QH, Wu H, Fujihara T, et al. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*. 2004 14:2165-76.
20. Jeffreys Aj, Wilson V, Thein SL. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature* 1985 314:67-73.
21. Orgel LE, Crick FH, et al. Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature* 1980 284:604–7.
22. O’Dushlaine CT, Shields DC. Tools for the identification of variable and potentially variable tandem repeats. *BMC Genomics* 2006 7: 290.
23. Thomas EE. Short, local duplications in eukaryotic genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005 15:640–44.
24. Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, et al. Intragenic tandem repeat generate functional variability. *Nat. Genet.* 2005 37:986–90.
25. Wren JD, Forgans E, Fondon JW, et al. Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. *Am J Hum Genet.* 2000 67:345–56.
26. Rando OJ, Verstrepen KJ, et al. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 2007 128:655–68.
27. Caburet S, Cocquet J, Variman D, et al. Coding repeats and evolutionary “agility.” *Bioessays* 2005 27:581–87.
28. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science.* 2007 315:848-53.
29. Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. 2004 *Nat. Rev. Genet.* 5:435–45.
30. Richard GF, Dujon B. Molecular evolution of minisatellites in hemiascomycetous yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 2006 23:189–202.
31. Seminara SB, Crowley WF. Genetic approaches to unraveling reproductive disorder: examples of bedside to bench research in the genomic era. *Endocrine Reviews* 2002 23:382-92.
32. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nature* 2001 2:91-99.
33. Morton NE, Collins A. Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *Proceedings of the National Academy of Science* 1998 95:11389-93.

34. Risch N, Teng J. The relative power of family based and case control designs for linkage disequilibrium studies of complex human diseases. I. DNA pooling. *Genome Research* 1998 8:1273-88.
35. Li, CC. Population subdivision with respect to multiple alleles. *Ann Hum Gen.* 1972 33:23-29.
36. Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risks: An easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Gen.* 1987 51:227-33.
37. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin –dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Gen.* 1993 52:506-16.
38. Curtis D. Use of siblings as controls in case control studies. *Ann Hum Gen.* 1997 61:319-33.
39. Legro RS, Driscoll D, Straus III F, et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Nat Acad USA* 1998 95:14956-60.
40. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovarysyndrome; towards a rational approach. Scientific, Inc. Boston 1992 377-84.
41. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) *Hum Reprod.* 2004 19:41-7.
42. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009 91: 456-88.
43. Diamanti Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos. Hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 84:4006-11.
44. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the south eastern United States a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 83:3078-82.
45. Asuncion M, Calvo RM, Millan JL, et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucausian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 85:2434-38.
46. Carmina E, Koyama T, Chang L, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol.* 1992 167:1807-12.



47. Dunaif A, Sorbara L, Delson R, et al. Ethnicity and polycystic ovary syndrome are associated with independent and additive decreases in insulin action in Caribbean-Hispanic women. *Diabetes* 1993 42:1462-68.
48. Carmina E, Legro RS, Stamets K, et al. Difference in body weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Hum Reprod*. 2003 18:2289-93.
49. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Positions statement criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: and Androgen Excess Society guideline. 2006 *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4237-45.
50. Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, et al. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod*. 1995 10:2125-35.
51. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, et al. A meta analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod*. 2006 1:13-21.
52. Hwang JL, Seow KM, Lin YH, et al. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod*. 2005 20:1261-65.
53. Sengoku K, Tamate K, Takuma N, et al. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod*. 1997 12:474-7.
54. Chang PL, Lindheim SR, Lowre C, et al. Normal ovulatory women with polycystic ovaries have hyperandrogenic pituitary ovarian responses to gonadotropin releasing hormone-agonist testing. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 85:995-1000.
55. Cano F, Garcia-Velasco JA, Millet A, et al. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J. Assist. Reprod. Genet*. 1997 14:254-261.
56. Tian L, Shen H, Lu Q, et al.. Insulin resistance increases the risk of spontaneous abortion after assisted reproduction technology treatment. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2007 92:1430-33.
57. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet. Gynecol. Surv*. 2008 63:39-48.
58. Ferriman D, Purdie AW. The aetiology of oligomenorrhoea and/or hirsuties: a study of 467 patients. *Postgrad Med*. 1983 59:17-20.
59. Falsetti L, Eleftheriou G. Hyperinsulinemia in the polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrine and echographic study in 240 patients. *Gynecol Endocrinol*. 1996 10:319-326.

60. Yildiz BO, Bolour S Woods K, et al. Visually scoring hirsutism. *Hum. Reprod.* 2010 16:51-64.
61. Cunliffe WJ, Gould DJ. Prevalence of facial acne vulgaris in late adolescence and in adults. *Br Med J.* 1979 1:1109–10.
62. Galobardes B, Davey Smith G, Jefferys M, et al. Has acne increased? Prevalence of acne history among university students between 1948 and 1968. The Glasgow Alumni Cohort Study. *Br J Dermatol.* 2005 152:824–25.
63. Johnson MT, Roberts J. Skin conditions and related need for medical care among persons 1–74 years. United States, 1971–1974. *Vital Health Stat* 1978 11:1–72.
64. Azziz R, Woods KS, Reyna R, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 89:453-62.
65. Chang RJ, Nakaruma RM, Judd HL, et al. Insulin resistance in non obese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1983 57:356-59.
66. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989 38:1165-74.
67. Carmina E, Bucchieri S, Esposito A, et al. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92:2500-05.
68. Fauser BC, Pache TD, Lamberts SW, et al. Serum bioactive and immunoreactive LH and FSH levels in women with cycle abnormalities, with or without PCOD. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 73:811–7.
69. Taylor AE, McCourt B, Martin K, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 82:2248–56.
70. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, et al. New approaches to PCOS and other forms of anovulation. *Obstet Gynecol Surv.* 2002 57:755–67.
71. Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol.* 1989 30:459-70.
72. Balen AH, Laven JS, Tan SL, et al. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod* 2003 9:505-14.
73. Polson DW, Adams J, Wadsworth J, et al. Polycystic ovaries- common finding in normal women. *Lancet* 1988 1: 870-72.
74. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS, et al. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 2004 60:1-17.

75. Levin JH, Carmina E, Lobo RA, et al. Is the inappropriate gonadotropin secretion of patients with polycystic ovarian syndrome similar to that of patients with adult onset congenital adrenal hyperplasia? *Fertil Steril*. 1991 56: 635-40.
76. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997 18:774-800.
77. Dunaif A, Wu X, Lee A, et al. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 281:392-9.
78. Conway GS, Avey C, Rumsby G. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1994 9:1681-83.
79. Talbot JA, Bicknell EJ, Ranjhowa M, et al. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J. Clin Endocrinol Metabol*. 1996 81:1979-83.
80. Dunaif A, Xia J, Bool C. Excessive insulin receptor derine phosphorylation in cultured fibroblasts and skeletal; muscle: a potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin. Invest*. 1995 96: 801-10.
81. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome. Syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab*. 2003 14:365-70.
82. Boudreaux MY, Talbott EO, Kip KE, et al. Risk of T2DM and impaired fasting glucose among PCOS subjects: results of an 8 year follow up. *Curr Diab. Rep* 2006 6:77-83.
83. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the pycystic ovary syndrome using the homeostasis model assesmet. *Fertil Steril*. 2005 83:1454-60.
84. Carmina, E, Lobo R. Use of fasting blood to assess te prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004 82:661-65.
85. Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ, et al. Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*. 199237:119-25.
86. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, et al. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 87:3871-75.
87. Rizzo M, Berneis K. Lipid tiad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J. Atheroscler Thromb*. 2005 12:237-39.
88. Wild RA. Long term health consequences of PCOS. 2005 *Hum. Reprod*. 8:231-39.

89. Essah PA, Nestler JE, Carmina E. Differences in dyslipidemia between American and Italian women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2008 31:35-41.
90. Cascella T, Palomba S, De Sio I, et al. Visceral fat is associated with cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2008 23:153-59.
91. Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, et al. Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 86:4666-73.
92. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004 109:27–32.
93. Shimbo D, Grahame-Clarke C, Miyake Y, et al. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multiethnic cohort. *Atherosclerosis* 2007 192:197–203.
94. Rossi R, Nuzzo A, Origliani G, et al. Prognostic role of flow-mediated dilation and cardiac risk factors in post-menopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2008 51:997–1002.
95. Paradisi G, Steinberg HO, Hampfling A, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 2001 103:1410–5.
96. Tarkun I, Arslan BC, Canturk Z et al. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 89:5592–6.
97. Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou SN, et al. Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90:5088–95.
98. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Azziz R, et al. Postmenopausal women with a history of irregular menses and elevated androgen measurements at high risk for worsening cardiovascular event free survival: results from the National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 93:1276-84.
99. Naka KK, Kalantaridou SN, Kravariti M, et al. Effect of the insulin sensitizers metformin and pioglitazone on endothelial function in young women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized study *Fertil Steril.* 2011 95:203-9.
100. Stewart PM, Shackleton CH, Beastall GH, et al. 5 $\alpha$ -Reductase activity in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1990 335:431-33.
101. Chin D, Shackleton CH, Prasad VK, et al. Increased 5 $\alpha$ -reductase and normal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase metabolism of C19 and C21 steroids in

a young population with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000 13:253-59.

102. Robin A, Thakkar H, Taylor N, et al. Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *N Engl J Med.* 1994 330:460-65.

103. Vgontzas AN, Legro RS, Bixler EO, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with obstructive sleep apnea and daytime sleepiness: role of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 86:517-20.

104. Fogel RB, Malhorta A, Pillar G, et al. Increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 86:1175-80.

105. Gadducci A, Gargini A, Palla OC, et al. Polycystic ovary syndrome and gynecological cancers: is there a link? *Gynecol. Endocrinol.* 2005 20:200-8.

106. Navaratnarajah R., Pilay OC, Hardiman P, et al. Polycystic ovary syndrome and endometrial cancer. *Semin Reprod Med.* 2008 26:62-71.

107. Balen A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum Reprod.* 2001 17:522-25.

108. Hollinrake E., Abreu A, Maifeld M, et al. Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2007 87:1369-76.

109. Kerchner A., Lester W, Stuart SP, et al. Risk of depression and other mental health disorders in women with polycystic ovary syndrome: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 2009 91:207-12.

110. Okamura F, Tashiro A, Utumi A, et al. Insulin resistance in patients with depression and its changes during the clinical course of depression: minimal model analysis. *Metabolism* 2000 49:1255-60.

111. Rasgon NL, Rao RC, Hwang S, et al. Depression in women with polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical correlates. *J. Affect. Disord.* 2003 74:229-304.

112. Joffe H, Soares CN, Petrillo LF, et al. Valproate is associated with new-onset oligoamenorrhea with hyperandrogenism in women with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006 59:1078-86.

113. Rasgon NL, Reynolds MF, Elman S, et al. Longitudinal evaluation of reproductive function in women treated for bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2005 89:217-25.

114. Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, et al. Screening for 21-hydroxylase deficient non-classic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril.* 1999 72:915-25.

115. Moller DE, Cohen O, Yamaguchi Y, et al. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 1994 43:247–55.
116. Saleh AM, Khalil HS. Review of nonsurgical and surgical treatment and the role of insulin-sensitizing agents in the management of infertile women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004 83:614–21.
117. Laven JSEM, Imani B, Eijkemans MJC, et al. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv*. 2002 57:755–67.
118. Homburg R. Management of infertility and prevention of ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*. 2004 18:773–88.
119. Al-Azemi M, Omu FE, Omu AE, et al. The effect of obesity on the outcome of infertility management in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2004 270:205–10.
120. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, et al. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992 36:105–11.
121. Clark AM, Ledger W, Galletly C, et al. Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod*. 1995 10:2705–12.
122. Crosignani PG, Colombo M, Vegetti W, et al. Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Hum Reprod*. 2003 18:1928–32.
123. Muth S, Norman J, Sattar N, et al. Women with polycystic ovary syndrome (PCOS) often undergo protracted treatment with metformin and are disinclined to stop: indications for a change in licensing arrangements? *Hum Reprod*. 2004 19:2718–20.
124. Tan SL, Fahri J, Homburg R, et al. Induction of ovulation in clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome with pulsatile GnRH. *Obstet Gynecol*. 1996 88:221–26.
125. Li TC, Saravelos H, Chow MS, et al. Factors affecting the outcome of laparoscopic ovarian drilling for polycystic ovarian syndrome in women with anovulatory infertility. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998 105:338–44.
126. Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, et al. Laparoscopic “drilling” by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 15:CD004143.

127. Kragie L. Aromatase in primate pregnancy: a review. *Endocr Res.* 2002 28:121–128
128. Hoffman LK, Ehrmann DA. Cardiometabolic features of polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 4:215–22.
129. Demissic M, Lasic M, Foecking EM, et al. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 295:262–68.
130. Judd HL, Robinson JD, Young PE, et al. Amniotic fluid testosterone levels in midpregnancy. *Obstet. Gynecol.* 1976 48:690–692.
131. Schindler AE. *Hormones in Human Amniotic Fluid.* Springer-Verlag, Heidelberg. 1982 2–4.
132. Milunsky A. Amniotic fluid cell culture. In Milunsky A (ed) *Genetic Disorder of the Fetus.* New York: Plenum Press. 1979 75-84.
133. Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods cell Biol.* 1982 26:11-34.
134. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull.* 1983 39:348-54.
135. Rivarola MA. Testosterone, androstenedione and dhydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: concentration and protein binding. *J Clin Endocrinol Metab.* 1968 28:34-40.
136. Caputo MJ, Hosty TA. The presence of the sex binding globulin in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1972 113:804-11.
137. Hammond GL, Leinonen P, Bolton NJ, et al. Measurement of sex hormone binding globulin in human amniotic fluid:its relationship to protein and testosterone concentrations, and fetal sex. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1983 18:377-84.
138. Bammann BL, Coulam CB, Jiang NS. Total and free testosterone during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 137:293–98.
139. Forest MG, Ances IG, et al. Percentage binding of testosterone, androstenedione and dehydroisoandrosterone in plasma at the time of delivery. *J Clin Endocrinol.* 1971 32:417-25.
140. Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, et al. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 85:1206-10.
141. Gitau R, Adams D, Fisk NM, et al. Fetal plasma testosterone correlates positively with cortisol. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005 90: 166-9.
142. Van de Beek C, Thijssen JH, Cohen-Kettenis PT, et al. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid and maternal and umbilical cord serum:

what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? *Horm Behav.* 2004 46:663-9.

143. Steiner RA, Clifton DK, Spies HG, et al. Sexual differentiation and feedback control of luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Biol Reprod.* 1976 15:206–12.

144. Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, et al. Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril.* 2002 77:167–72.

145. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, et al. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2006 12:673-88.

146. Mikola M, Hiilesmaa V, Halttunen M, et al. Obstetric outcome in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001 16:226-29.

147. Sir Petermann T, Hitchfeld C, Maliqueo M, et al. Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* 2005 20:2122-26.

148. Urman B, Sarac E, Dogan L, et al. Pregnancy in infertile PCOD patients. Complications and outcome. *J Reprod Med.* 1997 42:501-05.

149. Weerakiet S, Srisombut C, Rojanasakul A, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2004 19:134-40.

150. Legro RS, Roller RL, Dodson WC, et al. Associations of birth weight and gestational age with reproductive and metabolic phenotypes in women with polycystic ovarian syndrome and their first-degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 95:789-99.

151. Sadrzadeh S, Klip WA, Brokmans FJ, et al. Birth weight and age menarche in patients with polycystic ovary syndrome or diminished ovarian reserve, in a retrospective cohort. *Hum Reprod.* 2003 18:2225-30.

152. Melo AS, Vieira CS, Barbieri MA, et al. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Hum Reprod.* 2010 25:2124-31.

153. Glass AR, Klein T. Changes in maternal serum total and free androgen levels in early pregnancy : lack of correlation with fetal sex. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1980 140:656-60.

154. Meulenberg PMM, Hofman JA. Maternal testosterone and fetal sex. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991 39:51-54.

155. Finegan JA, Bartleman B, Wong PY, et al. A window for the study of prenatal sex hormone influences on postnatal development. *J Genet Psychol.* 1989 150:101-12.



156. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, et al. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod.* 2005 11: 357–74.
157. Dumesic DA, Schram RD, Abbott DH. Early origins of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil develop.* 2005 17:349–60.
158. Xita N, Tsatsoulis A. Fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 91:1660–66.
159. Abbott D, Padmanabhan V, Dumesic D. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;17.
160. Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2009 24:1548–55.
161. Nisenblatt V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 16:224–31.
162. Turhan NO, Seckin NC, Rybar F, et al. Assessment of glucose tolerance and pregnancy outcome of polycystic ovary patients *Int J Gynecol Obstet.* 2003 81:163-68.
163. Gartsen SM, Jacobsen G, Romundstad P. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth. *Eur J Endocrinol.* 2006 155:365-70.
164. Steckler T, Wang T, Bartol FF et al. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 2005 146:3185-93.
165. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow W, Fisher SJ, et al. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997 277:1669-72.
166. Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, et al. The prenatally androgenized female rhesus monkey as a model for polycystic ovarian syndrome. IN: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D (eds). *Androgen Excess Disorders in women.* Philadelphia, PA: Lippincott-Raven. 1997 369-82.
167. Resko JA, Buhl AE, Phoenix CH. Treatment of pregnant rhesus macaques with testosterone propionate: observations on its fate in the fetus. *Biol Reprod.* 1987 37:1185-91.
168. Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, et al. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90:6630-37.

169. Abott DH, Dumesic DA, Eisner JR, et al. Insights into the development of PCOS from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab.* 1998 9:62-67.
170. Padmanabhan V, Evans N, Taylor JA, et al. Prenatal exposure to androgens leads to the development of cystic ovaries in sheep. *Biol Reprod.* 1998 56:194.
171. Padmanabhan V, Sarma HN, Savabieasfahani M, et al. Developmental reprogramming of reproductive and metabolic dysfunction in sheep: native steroids vs. environmental steroid receptor modulators. *Int J Androl.* 2010 2:394-404.
172. Glueck CJ, Goldenberg N, Oranikoff J, et al. Height, weight and motor-social development during the first 18 months of life in 126 infants born to 109 mothers with polycystic ovary syndrome who conceived on and continued metformin through pregnancy. *Hum Reprod.* 2004 19:1323-30.
173. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, et al. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod.* 2002 17:2573–79.
174. Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, et al. Increased anti-mullerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 91:3105–09.
175. Hart R, Doherty DA, Norman RJ, et al. Serum antimullerian hormone (amh) levels are elevated in adolescent girls with polycystic ovaries and the polycystic ovarian syndrome (pcos). *Fertil Steril.* 2010 94:1118–21.
176. Hickey M, Sloboda DM, Atkinson HC, et al. The relationship between maternal and umbilical cord androgen levels and polycystic ovary syndrome in adolescence: a prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 94:3714–20.
177. Hogeveen KN, Talika M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)<sub>n</sub> repeat element within an Alu sequence *J Biol Chem.* 2001 276:36383-90.
178. Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H, et al. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 89:917-924.
179. Xita N, Lazaros L, Georgiou I, et al. CYP19 gene: a genetic modifier of polycystic ovary syndrome phenotype. *Fertil Steril.* 2010 94:250-4.
180. Hao CF, Zhang N, Qu Q, et al. Evaluation of the association between the CYP19 Tetranucleotide (TTTA)<sub>n</sub> polymorphism and polycystic ovarian syndrome(PCOS) in Han Chinese women. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010 31:370-4.

181. Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, et al. Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 96:1754-62.
182. Greaves G, Hunt R, Zacharin MR. Transient anomalies in genital appearance in some extremely preterm female infants may be the result of foetal programming causing a surge in I h and the over activation of the pituitary–gonadal axis. *Clin Endocrinol.* 2008 69:763–68.
183. Yildiz BO, Goodarzi MO, Guo X, et al. Heritability of dehydroepiandrosterone sulfate in women with polycystic ovary syndrome and their sisters. *Fertil Steril.* 2006 86:1688–93.
184. Goodarzi MO, Antoine HJ, Azziz R. Genes for enzymes regulating dehydroepiandrosterone sulfonation are associated with levels of dehydroepiandrosterone sulfate in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92:2659–64.
185. Legro RS., Bentley-Lewis R, Driscoll D, et al. Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002 87:2128–33.
186. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, et al. Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 88:2031-6.
187. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997 349:986–90.
188. Powell BL, Haddad L, Bennett A, et al. Analysis of multiple data sets reveals no association between the insulin gene variable number tandem repeat element and polycystic ovary syndrome or related traits. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2005 90:2988–93.
189. Ubranek M, Spielman R. Genetic analysis of candidate genes for the polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2002 9:492-501.
190. Roldan B, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. Genetic basis of metabolic abnormalities in polycystic ovary syndrome: implications for therapy. *Am J Pharmacogenomics* 2004 4:93-107.
191. Carmina E. Genetic and environmental aspect of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2003 26:1151-9.
192. K Sproul, Jones MR, Mathur R, et al. Association study of four key folliculogenesis genes in polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 2010 117:756-60.

193. Jones MR, Wilson SG, Mulli BH, et al. Polymorphism of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2007 13:237-41.
194. Britt KL, Finfdlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol*. 2002 175:269-76.
195. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004 20:63-8.
196. Xita N, Tsasoulis A. Fetal origins of metabolic syndrome *Ann N Y Acad Sci*. 2010 1205:148-55.
197. Abbott DA, Dumesic DA. Fetal androgen excess provides a developmental origin for polycystic ovary syndrome. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2009 4:1–7.
198. Jiang F, Wang Z. Identification of androgen-responsive genes in the rat ventral prostate by complementary deoxyribonucleic acid subtraction and microarray. *Endocrinology* 2003 144:1257–65.
199. Laurich VM, Trbovich AM, O’Neil FH, et al. Mullerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome p450 17 alpha hydroxylase/c(17–20) lyase in RNA in a mouse Leydig cell line independent of camp responsive element binding protein phosphorylation. *Endocrinology* 2002 143:3351–60.
200. Zegher F, Ibanñez L. Early origins of polycystic ovary syndrome: hypotheses may change without notice. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 94:3682–85.
201. de Zegher F, Lopez-Bermejo A, Ibanñez L. Adipose tissue expandability and the early origins of pcos. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 20:418–23.
202. Tan CY, Vidal-puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans*. 2008 036:935–40.
203. Virtue S, Vidal-puig A. It’s not how fat you are, it’s what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 2008 6:e237.
204. Ibánñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, et al. Pubertal metformin therapy to reduce total, visceral, and hepatic adiposity. *J Pediatr*. 2010 156:98–102.
205. Ibánñez L, Sebastiani G, Diaz M, et al. Low body adiposity and high leptinemia in breast-fed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr*. 2010 156:145–47.
206. Verkauskiene R, Beltrand J, Claris O, et al. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age. *Eur J Endocrinol*. 2007 157:605–12.
207. Dulloo AG. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008 22:155–71.

208. Ibánñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, et al. Abdominal fat partitioning and high-molecular-weight adiponectin in short children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 94:1049–52.
209. Ibánñez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, et al. Low-birth weight children develop lower sex hormone binding globulin and higher dehydroepiandrosterone sulfate levels and aggravate their visceral adiposity and hypoadiponectinemia between six and eight years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 94:3696–99.
210. Garcia E, Lacasa M, Agli B, et al. Modulation of rat preadipocyte adipose conversion by androgenic status: involvement of C/EBPs transcription factors. *J Endocrinol.* 1999 161:89–97.
211. Dieudonne MN, Pecquery R, Levene MC, et al. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Endocrinology* 2000 141:649–56.
212. Ramirez ME, Mcurry MP, Wiebke GA, et al. Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism* 1997 46:179–85.
213. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 2006 147:141–54.
214. Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, et al. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005 289:801–6.
215. Ibánñez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, et al. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-1 at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 93:2774–78.
216. Ibánñez L, Sebastiani G, Diaz M, et al. Low body adiposity and high leptinemia in breastfed infants born small-for-gestational-age. *J Pediatr.* 2009 156:145–7.
217. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod.* 2011 85:431–41.
218. Petra PH. The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991 40:735–53.
219. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1974 3:9–96.

220. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 53:58–68.
221. Kerlan V, Nahoul K, Martelot MT, et al. Longitudinal study of maternal plasma bioavailable testosterone and androstenediol glucuronide levels during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 40: 263–67.
222. O’Leary P, Boyne P, Flett P, et al. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. *Clin Chem.* 1991 37:667–72.
223. Leger J, Forest MG, Czernichow P, et al. Thyroid hormones influences sex steroid binding protein levels in infancy: study in congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 71:1147–50.
224. Sorensen K, Andersson AM, Skakkebaek NE, et al. Serum sex hormone binding globulin levels in healthy children and girls with precocious puberty before and during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92:3189-96.
225. Hammond GL. Access of reproductive steroids to target tissues. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2002 29:411–23.
226. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, et al. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005 122:751–62.
227. Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, et al. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 69:481–5.
228. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, et al. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol.* 2002 175:113–20.
229. Pearlman WH, Crépy O. Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. *J Biol Chem.* 1967 242:182-9.
230. Murray MA, Anderson DC, Bancroft JH, et al. Proceedings: Sex-hormone-binding globulin, luteinizing hormone and testosterone in man: effects of oestrogen and cyproterone acetate. *J Endocrinol.* 1973 59:xxi-xxii.
231. Schoultz B, Carlstrom K. On the regulation of sex hormone binding globulin: a challenge of a lod dogma and outlines of an alternative mechanism. *Journal of Steroid Biochemistry and molecular Biology* 1989 32:327-34.
232. Holly JM, Cotteril AM, Jemmotr RC, et al. Inter-relations between growth hormone, insulin, insulin like growth factor –I (IGF-I), IGF-binding protein-1 (IGFBP-I) and sex hormone binding globulin in acromegaly. *Clin Endocrinol.* 1991 34:275-80.
233. Oscarsson J, Lindstedt G, Lundberg PA, et al. Continuous subcutaneous infusion of low dose growth hormone decreases serum sex hormone –binding

globulin and testosterone concentrations in moderately obese middle-aged men. *Clin Endocrinol*. 1996 44:23-29.

234. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of production and secretion of sex hormone-binding globulin in HepG2 cell cultures by hormones and growth factors. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1995 80:160-164.

235. Plymate SR, Matej LA, Friedl K. Inhibition of sex hormone binding globulin production in the human hepatoma (HepG2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1988 67:460-64.

236. Pasquali R, Casimirri F, De Lasio R, Mesini P, et al. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 80:654-58.

237. Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex-hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Mol Endocrinol*. 2009 43:19-27.

238. Escobar-Morreale HF, Asunción M, Calvo RM, et al. Receiver operating characteristic analysis of the performance of basal serum hormone profiles for the diagnosis of polycystic ovary syndrome in epidemiological studies. *Eur J Endocrinol*. 2001 145:619-24.

239. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, et al. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 26:883-96.

240. Bremer AA, Miller WL. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil Steril*. 2008 89:1039-48.

241. Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickmn MG, et al. Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 82:1421-25.

242. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. *Diabet Med*. 2004 24:451-463.

243. Lemieux S, Lewis GF, Ben-Chetrit A, et al. Correction of hyperandrogenemia by laparoscopic ovarian cautery in women with polycystic ovarian syndrome is not accompanied by improved insulin sensitivity or lipid-lipoprotein levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 84: 4278-82.

244. Stone J, Folkerd E, Doody D, et al. Familial correlations in postmenopausal serum concentrations of sex steroid hormones and other mitogens: a twins and sisters study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 94:4793-4800.

245. Zhang B, Beeghly-Fadiel A, et al. Evaluation of functional genetic variants for breast cancer risk: results *Am J Epidemiol*. 2011 173:1159-70.

246. Xu WH, Zheng W, Cai Q, et al. The Asp(327)Asn polymorphism in the sex hormone-binding globulin gene modifies the association of soy food and tea intake with endometrial cancer risk. *Nutr Cancer*. 2008 60:736.
247. Ding EL, Song Y, Manson JE, et al. Sex hormone binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med*. 2009 361:1152-63.
248. Thompson DJ, Healey CS, Baynes C, et al. Identification of common variants in the SHBG gene affecting sex hormone-binding globulin levels and breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 17:3490–98.
249. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, et al. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest*. 2002 109:973–81.
250. Haiman CA, Riley SE, Freedman ML, et al. Common genetic variation in the sex steroid hormone –binding globulin (SHBG) gene and circulating SHBG levels among postmenopausal women: the Multiethnic Cohort. *J Clin Endocrinol*. 2005 90:2198-04.
251. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikiyriakidou A, et al. Association of the (TAAAA)n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 88: 5976-80.
252. Díaz M, López-Bermejo A, Petry CJ, et al. Efficacy of metformin therapy in adolescent girls with androgen excess: relation to sex hormone-binding globulin and androgen receptor polymorphisms. *Fertil Steril*. 2010 94:2800-3.
253. Alevizaki M, Saltiki K, Xita N, et al. The importance of the (TAAAA)n alleles at the SHBG gene promoter for the severity of coronary artery disease in postmenopausal women. *Menopause*. 2008 15:461-8.
254. Xita N, Milionis HJ, Galidi A, et al. The (TAAAA)n polymorphism of the SHBG gene in men with the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 119:126-8.
255. Eriksson AI, Lorentzon M, Mellstrom D, et al. SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 91: 5029-37.
256. Vanbillemont G, Bogaert V, De Bacquer D, et al. Polymorphisms of the SHBG gene contribute to the interindividual variation of sex steroid hormone blood levels in young, middle-aged and elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009 70:303-10.
257. Li L, He S, Sun JM, et al. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 1006-14.



258. Petry CJ, Ong KK, Michelmore KF, et al. Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. *Hum Reprod.* 2005 20:1837-43.
259. Hong Y, Li H, Yuan YC, et al. Molecular characterization of aromatase. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 1155:112-20.
260. Gharani N, Waterworth DM, Batty S, et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Human Molecular Genetics* 1997 6:397-402.
261. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, et al. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 86:219-24.
262. Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, et al. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol.* 1991 5:2005–2013.
263. Mahendroo MS, Means GD, Mendelson CR, et al. Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *J. Biol Chem.* 1991 266:11276–281.
264. Harada N. A unique aromatase (P-450AROM) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 189:1001–07.
265. Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 90:11312–16.
266. Honda S, Harada N, Takagi Y. Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 98:1153–60.
267. Harada N, Ogawa H, Shozu M, et al. Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental aromatase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1992 51:666-72.
268. Ito Y, Fisher CR, Cinte FA, et al. Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 90:11673–7.
269. Belgorosky A, Pepe C, Marino R, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterozygote for two new point mutations of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 88:5127–31.

270. Takayama K, Fukaya T, Sasano H, et al. Immunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 1996 11:1387–92.
271. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, et al. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 78:1287–92.
272. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 80:3689–98.
273. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, et al. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 82:1739–45.
274. Gharani N, Waterworth DM, Baty S, et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet.* 1997 6:397–402.
275. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96:8573–8.
276. Soderlund D, Canto P, Carranza-Lira S, et al. No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2005 20:965–9.
277. Sowers MR, Wilson AL, Kardia SR, et al. Aromatase gene (CYP19) polymorphisms and endogenous androgen concentrations in a multiracial/multiethnic, multisite study of women at midlife. *Am J Med.* 2006 119:23-30.
278. Jin JL, Sun J, Ge HJ, et al. Association between CYP19 gene SNP rs2414096 polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chinese women. *BMC Med Genet.* 2009 10:139.
279. Wang H, Li Q, Wang T, et al. A common polymorphism in the human aromatase gene alters the risk for polycystic ovary syndrome and modifies aromatase activity in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2011 17:386-91.
280. Lapidus L, Helgesson Ö, Merk C, et al. Adipose tissue distribution and female carcinomas. A 12 year follow up of the participants in the population study of women in Gothenburg Sweden. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998 12:361-68.
281. Berstein LM, Imyaninov EN, Syspitsin EN, et al. CYP19 gene polymorphism in endometrial cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001 127:135-38.

282. Baxter SW, Choong DYH, Eccles DM, et al. Polymorphic variation in CYP 19 and the risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2001 22:347-49.
283. Latil AG, Azzouzi R, Cancel GS, et al. Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. *Cancer* 2001 92:1130-37.
284. Baghaei F, Rosmond R, Westberg L, et al. The CYP19 gene and associations with androgens and abdominal obesity in premenopausal women. *Obes Res*. 2003 11:578-85.
285. Daya S. Accuracy of gestational age estimation by means of fetal crown-rump length measurement. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 168: 903–08.
286. Alfirevic Z, Walkinshaw SA, Kilby MD. Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling - Green-top Guideline No. 8. 2010 RCOG
287. The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet* 1998 351:42.
288. Brumfield CG, Lin S, Conner W, et al. Pregnancy outcome following genetic amniocentesis at 11–14 versus 16–19 weeks' gestation. *Obstet Gynecol*. 1996 88:114.
289. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling. A systematic review. *Obstet Gynecol*. 2007 110:687–94.
290. Xita N, Georgiou I, Lazaros L, et al. The synergistic effect of sex hormone-binding globulin and aromatase genes on polycystic ovary syndrome phenotype. *Eur J Endocrinol*. 2008 158:861-5.
291. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S, et al. Developmental origin of polycystic ovary syndrome—a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002 174:1–5.
292. Unsworth WP, Taylor JA, Robinson JE. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: the effect of prenatal androgens on the development of estrogen positive feedback and ovarian cycles in the ewe. *Biol Reprod*. 2005 72:619–27.
293. Forsdike RA, Hardy K, Bull L, et al. Disordered follicle development in ovaries of prenatally androgenized ewes. *J Endocrinol*. 2007 192:421–28.
294. Abbott DH, Zhou R, Bird IM, et al. Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocr Dev*. 2008 13:145–58.

295. Bruns CM, Baum ST, Colman RJ, et al. Prenatal androgen excess negatively impacts body fat distribution in a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Int J Obes*. 2007 31:1579–85.
296. Hart R, Sloboda DM, Doherty DA, et al. Circulating maternal testosterone concentrations at 18 weeks of gestation predict circulating levels of antimüllerian hormone in adolescence: A prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2010 94:1544–47.
297. Phocas I, Chryssikopoulos A, Sarandakou A, et al. A contribution to the classification of cases of non-classic 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Gynecol Endocrinol*. 1995 9:229–38.
299. Kuijper EA, Vink JM, Lambalk CB, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in women from opposite-sex twin pairs. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 94:1987–90.
298. Lummaa V, Pettay JE, Russell A. Male twins reduce fitness of female co-twins in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 104:10915–20.
300. Hart R, Sloboda DM, Doherty DA, et al. Circulating maternal testosterone concentrations at 18 weeks of gestation predict circulating levels of antimüllerian hormone in adolescence: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2010 94:1544-7.
301. Barry JA, Kay AR, Navaratnarajah R, et al. Umbilical vein testosterone in female infants born to mothers with polycystic ovary syndrome is elevated to male levels. *J Obstet Gynaecol*. 2010 30:444–46.
302. Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA, et al. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am J Primatol* 2009 71:776–84.
303. Xu N, Kwon S, Abbott DH, et al. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in prenatally androgenized rhesus monkeys. *PLoS*. 2011 6:27286.
304. Jones MR, Wilson SG, Mullin BH, et al. Polymorphism of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2007 13:237–241.
305. Raja-Khan N, Kunselman AR, Demers LM, et al. A variant in the fibrillin-3 gene is associated with TGF-beta and inhibin B levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010 94:2916–19.
306. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, et al. Thirty seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96:8573–78.
307. Urbanek M, Sam S, Legro RS, et al. Identification of a polycystic ovary syndrome susceptibility variant in fibrillin-3 and association with a metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 92:4191–98.

308. Moran LJ, Misso ML, Wild RA, et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2010 16:347–63.
309. Elting MW, Korsen TJM, Bezemer PD, et al. Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. *Hum Reprod.* 2001 16:556–60.
310. Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol (Lond)* 2003 547:5–10.
311. Ibánñez L, Potau N, Ferrer A, et al. Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 87:3391–93.
312. Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, et al. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 2005 48:849–855.
313. Bjercke S, Dale PO, Tanbo T, et al. Impact of insulin resistance on pregnancy complications and outcome in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2002 54:94-8.