

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ.Ε. ΛΩΛΗΣ

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ
ΓΙΑ ΞΕΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΕΛΛΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1997



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345797



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ.Ε. ΛΩΛΗΣ

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΘΥΛΑΚΙΩΝ
ΓΙΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΕΛΛΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1997



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



Τριμελής Επιτροπή

1. Δημήτριος Ε. Λώλης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
2. Ιωάννης Γεωργίου, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
3. Κωνσταντίνος Ζηκόπουλος, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Επταμελής Επιτροπή

1. Δημήτριος Ε. Λώλης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
2. Γρηγόριος Αντωνιάδης, Καθηγητής Μικροβιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
3. Νίκη Αγνάντη, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
4. Αγαθοκλής Τσατσούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
5. Ευάγγελος Παρασκευαΐδης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
6. Ιωάννης Γεωργίου, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
7. Κωνσταντίνος Ζηκόπουλος, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. Ε. ΛΩΛΗΣ

Ιωάννινα 23 Σεπτεμβρίου 1997
Αριθμ. Πρωτ. 2

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Έγινε σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την διδακτορική διατριβή της Βιολόγου κ. Μαγδαληνής Κωνσταντέλλη στις 23 Σεπτεμβρίου 1997 και ώρα 13:00 στην Αίθουσα Σεμιναρίων της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΑΡΟΝΤΑ ΜΕΛΗ

1. Δημήτριος Ε. Λώλης, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γρηγόριος Αντωνιάδης, Καθηγητής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
3. Αγαθοκλής Τσατσούλης, Αν. Καθηγητής Παθολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Ευάγγελος Παρασκευαΐδης, Επ. Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κωνσταντίνος Ζηκόπουλος, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Ιωάννης Γεωργίου, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΑΠΟΝΤΑ ΜΕΛΗ

Νίκη Αγνάντη, Καθήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΘΕΜΑ: «Η συμβολή του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων στην ωρίμανση των ωοθυλακίων για εξωσωματική γονιμοποίηση»

Προσήλθε η κ. Μαγδαληνή Κωνσταντέλλη η οποία ανέπτυξε το θέμα της διατριβής της, έγιναν ερωτήσεις και απεχώρησε.



Στη συνέχεια έγινε συζήτηση για την πρωτοτυπία και την ουσιαστική συμβολή της διατριβής στην Επιστήμη.

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής απένειμαν στην υποψήφια διδάκτορα τον βαθμό «Άριστα» με την ευχή η υποψήφια να συνεχίσει το ερευνητικό της έργο με την ίδια επίδοση και αποδοτικότητα. Μετά από αυτό τελείωσε η σύσκεψη και υπογράφεται το παρόν.

ΤΑ ΜΕΛΗ

1. Δημήτριος Ε. Λώλης

2. Γρηγόριος Αντωνιάδης

3. Αγαθοκλής Τσατσούλης

4. Ευάγγελος Παρασκευαΐδης

5. Κωνσταντίνος Ζηκόπουλος

6. Ιωάννης Γεωργίου



ΣΤΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΜΟΥ Δ.Ε.ΛΩΛΗ
με σεβασμό και εκτίμηση



ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ

με αγάπη



Πρόλογος

Η Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημητρίου Ε. Λώλη, κατά το διάστημα 1994-1997.

Το θέμα αφορά την συμβολή του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων στην ωρίμανση των ωοθυλακίων για Εξωσωματική Γονιμοποίηση. Ο πληθυσμός που μελετήθηκε προέρχεται από γυναίκες που συμμετείχαν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στο κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ θερμά:

- Τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Λώλη που μου παρείχε την δυνατότητα και τα μέσα για την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Το οργανωτικό του πνεύμα και η αγάπη του για επιστημονική πρόοδο με ενέπνευσαν και με ενδυνάμωσαν ώστε να δώσω το καλύτερο δυνατόν σ' αυτήν την προσπάθεια. Τον ευχαριστώ επίσης για την παραχώρηση στοιχείων από το βιβλίο του "Γυναικολογία και Μαιευτική".
- Τον Λέκτορα Ιωάννη Γεωργίου, μέλος της τριμελούς επιτροπής, ο οποίος, ως βιολόγος έπαιξε τον πιο καθοριστικό ρόλο κατά την διάρκεια διεξαγωγής αυτής της μελέτης: μου ανέθεσε το θέμα και μου παρείχε όλη την απαραίτητη προσοχή και καθοδήγηση στην εφαρμογή των τεχνικών στο εργαστηριακό μέρος, στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ιδιαίτερα στη δόμηση της συζήτησης, θέτοντας εύστοχα ερωτήματα και παρατηρήσεις και εξασκώντας γόνιμη συναδελφική κριτική.
- Τον Λέκτορα Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, επίσης μέλος της τριμελούς, για την συμβολή του στο κλινικό μέρος της ερευνητικής διαδικασίας. Τον ευχαριστώ που έθεσε στη διάθεσή μου βιβλία και συγγράμματα για τη συγγραφή του γενικού μέρους.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΩΣ, ευχαριστώ τις γυναίκες του πληθυσμού μελέτης, καθώς και του πληθυσμού ελέγχου, που τόσο πρόθυμα και με τόσο κέφι, έδωσαν το αίμα τους, με την ελπίδα να βρεθεί κάτι μέσα απ' αυτή την έρευνα που θα βοηθήσει στο δύσκολο πρόβλημα της στειρότητας.

Ελπίζω να δικαίωσα τις προσδοκίες τους.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A: Ανδρογόνα
ACT: Ενεργοποιητίνη
ACTH: Φλοιοτρόπος Ορμόνη
AR: Υποδοχέας Ανδρογόνων
br: ζεύγη βάσεων
c AMP: κυκλικό AMP
E: Οιστρογόνα
EGF: Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας
ERE: Στοιχεία Απόκρισης στα Οιστρογόνα
ESR: Υποδοχέας Οιστρογόνων
ET: Εμβρυομεταφορά
FSH: Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη
FSP: Φολλιστατίνη
GF: Αυξητικοί Παράγοντες
GH: Αυξητική Ορμόνη
GnRH: Εκλυτική Ορμόνη των Γοναδοτροπινών
GR: Υποδοχέας Γλυκοκορτικοστεροειδών
h CG: ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη
h MG: ανθρώπινη Εμμηνοπαυσιακή Γοναδοτροπίνη
HRE: Στοιχεία Απόκρισης στις Ορμόνες
HRG: Γονίδια Απόκρισης στις Ορμόνες
IGF: Ινσουλινοτρόπος Αυξητικός Παράγοντας
IL: Ιντερλευκίνη
INH: Ανασταλτίνη
IVF: Εξωσωματική Γονιμοποίηση
Kb: κιλο-βάσεις
LH: Ωχριοτρόπος Ορμόνη
LIF: Ανασταλτικός Παράγοντας Λευχαιμίας
m RNA: αγγελιαφόρο RNA
NLS: Αλληλουχία Εντοπισμού του Πυρήνα
P: Προγεστερόνη
PCO: Πολυκυστικές ωθήκες
PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PGE₂: Προσταγλανδίνη E₂
PR: Υποδοχέας Προγεστερόνης
PRL: Προλακτίνη
SHBG: Φυλοδεσμευτική Σφαιρίνη
TGF: Αυξητικός Παράγοντας Μετασχηματισμού
TR: Υποδοχέας Θυρεοειδικών Ορμονών
UV: Υπεριώδης ακτινοβολία
VDR: Υποδοχέας της βιταμίνης D



B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 31
B.1. ΥΛΙΚΟ	σελ. 32
B.2.	
ΜΕΘΟΔΟΣ	σελ. 33
B.2.1. ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 35
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ	
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ	
ΩΟΛΗΨΙΑ	
B.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 38
B.2.2.1. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA	
B.2.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR AMPLIFICATION)	
B.2.2.3. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ	
B.2.2.4. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ	
B.2.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΓΙΑ ΤΗΝ	
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ PvuII και BstUI.	
B.2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΓΙΑ ΤΗΝ	
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (TA) _n .	
B.2.2.7. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΣΥΓΚΡΙΘΗΚΑΝ	
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ. 52
Γ.1. Συχνότητες αλληλομόρφων και γονότυπων στις ομάδες.	
Γ.2. Συχνότητες Απλότυπων.	
Γ.3. Συγκρίσεις παραμέτρων μεταξύ των ομάδων	
(ωοθυλ., ωάρια, λόγος αυτών).	
Γ.4. Κυήσεις.	
Γ.5. Γενετική προδιάθεση.	
Γ.6. Στατιστική μελέτη γενετικής σύνδεσης της δινουκλεοτιδικής	
επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (TA) _n με τον πολυμορφισμό PvuII.	
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ. 59
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ. 74
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (στην Ελληνική).....	σελ. 75



ΠΕΡΙΛΗΨΗ (στην Αγγλική).....σελ. 76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑσελ. 78
Αλληλουχία βάσεων από το “Human m RNA for estrogen receptor”.
Αλληλουχία βάσεων από το “H. Sapiens 5’ flanking region for estrogen receptor (breast) gene”.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ. 82



Εισαγωγή

Στην εργασία αυτή γίνεται προσπάθεια για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία να μελετηθούν πολυμορφισμοί του γονιδίου του Υποδοχέα των Οιστρογόνων (ESR) σε σχέση με την ωρίμανση των ωοθυλακίων κατά την διέγερση των ωοθηκών για Εξωσωματική Γονιμοποίηση.

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας γύρω από την ωρίμανση των ωοθυλακίων, γίνεται φανερό ότι τα οιστρογόνα και ο υποδοχέας τους παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολύπλοκο μηχανισμό της μετατροπής του πρωτογενούς ωοθυλακίου σε ώριμο, ωορρηκτικό ωάριο.

Θα μελετηθεί η επίπτωση της γενετικής ποικιλομορφίας του υποδοχέα στην ωρίμανση των ωοθυλακίων σε διεγερμένο κύκλο, ορίζοντας σαν "δείκτη απόκρισης" των ωοθηκών, τον λόγο των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τα ωάρια που λαμβάνονται κατά την ημέρα της ωοληψίας.

Η εκτίμηση του δείκτη απόκρισης και η σχέση του με τους πολυμορφισμούς θα βοηθήσει στην κατανόηση του φαινομένου της γενετικής προδιάθεσης στην υπογονιμότητα και θα δώσει έναν προγνωστικό παράγοντα στη στειρώση.

Αυτή η μελέτη είναι ουσιαστικά η βάση για μια ευρύτερη έρευνα της επίδρασης των πολυμορφισμών και μεταλλάξεων του υποδοχέα των οιστρογόνων στην ωρίμανση των ωοθυλακίων.

Η κατανόηση του μηχανισμού της δράσης του υποδοχέα των οιστρογόνων είναι δυνατόν να συμβάλει στο μέλλον στην γονιδιακή θεραπεία ατόμων με σοβαρές μεταλλάξεις του υποδοχέα.



Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



A.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

A.1.1. Φυσιολογία της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και της ωρίμανσης του ωαρίου.

Το ωοθυλάκιο ως αναπαραγωγική μονάδα του θήλεος οργανισμού, αναπτύσσεται και ωριμάζει στην ωοθήκη κάτω από την επίδραση των γοναδοτροπινών που εκκρίνονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, δια μέσου ενός πολύπλοκου μηχανισμού στον οποίο σημαντικό ρόλο παίζει η παραγωγή και απελευθέρωση εκκριντικών ορμονών από την ωοθήκη (Λώλης, 1997).

Ξεκινώντας από την ενδομήτριο ζωή, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται στο τέλος της τρίτης με αρχές τετάρτης εβδομάδας και είναι κύτταρα που μετακινούνται από το ενδόδερμα του λεκιθικού ασκού, με ενεργητικές αμοιβαδοειδείς κινήσεις προς την αρχέγονη γονάδα. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (primordial germ cells) είναι διαυγή κύτταρα, με πολύ πρωτόπλασμα και μεγάλο βαθυχρωματικό πυρήνα. Ο αριθμός τους είναι περίπου δύο έως τρεις εκατοντάδες. Όταν φτάσουν στην αρχέγονη γονάδα, περιβάλλονται από μια σειρά επιθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από το επιθήλιο του σπλαχνικού κοιλώματος (Coelomic epithelium) του εμβρύου. Στο τέλος της έκτης με αρχές της έβδομης εβδομάδας της κυήσεως, η αδιαφοροποίητη γονάδα αποτελείται από φλοιώδη και μυελώδη ουσία και περιέχει γεννητικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα (που θα γίνουν αργότερα κοκκώδη), και μεσεγχυματικά κύτταρα (που θα γίνουν κύτταρα της θήκης). Αμέσως μετά την μετανάστευση τους στην αρχέγονη γονάδα, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, δίνοντας έτσι τις πρόδρομες μορφές των ωαρίων, τα ωογόνια. Με συνεχή πολλαπλασιασμό τα ωογόνια φτάνουν τα 4-6 εκατομμύρια περί την εικοστή εβδομάδα της κυήσεως και αυτό είναι το μέγιστο γεννητικό υλικό για την θηλυκή γονάδα, καθώς από δω και πέρα ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων θα αρχίσει να ελαττώνεται με τον μηχανισμό της ατρησίας και θα συνεχίσει μέχρις ότου εξαντληθεί όλο το γεννητικό υλικό κατά την εμμηνόπαυση. Σ' αυτή την φάση της εμβρυϊκής ζωής αρχίζει ασύγχρονα και η μετατροπή των ωογόνιων σε αρχέγονα ωοθυλάκια με



την διαδικασία της μειωτικής διαίρεσης που σταματά στο στάδιο της πρόφασης (διπλοταινίας) της μειωτικής διαίρεσης I, μέχρις ν' αρχίσει ο ωοθηκικός κύκλος κατά την διάρκεια της εφηβείας. Όταν αρχίζει η ωρίμανση του πυρήνα των γεννητικών κυττάρων, η αρχέγονη γονάδα (που θα διαμορφωθεί σε ωοθήκη) περιέχει ανάμικτα, ωογόνια και ωοθυλάκια κοντά στην επιφάνειά της που αποτελεί τον φλοιό. Στη φάση αυτή αρχίζει η αγγείωση της ωοθήκης, με νεόπλαστα αγγεία που προέρχονται από τα βαθύτερα στρώματα της εσωτερικής περιοχής της ωοθήκης, δηλαδή από την μυελώδη μοίρα της ωοθήκης.

Η ωρίμανση λοιπόν των ωοθυλακίων αρχίζει τον τέταρτο μήνα της εμβρυϊκής ζωής, με την διαδικασία της μείωσης, με πρώτο στάδιο τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Πιστεύεται ότι η μείωση προκαλείται από κάποια ουσία άγνωστης χημικής σύνθεσης που πιθανότατα παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα. Στα κοκκώδη κύτταρα επίσης πιστεύεται ότι οφείλεται και η παραγωγή του αναστολέα της μείωσης των ωαρίων (OMI: oocyte meiotic inhibitor) που σταματά την ωρίμανση των ωοθυλακίων στην πρόφαση I (Tsafriri et al., 1982) μέχρι την εμμηναρχή.

Από τα 6.000.000 γεννητικά κύτταρα στον 4^ο μήνα της εμβρυϊκής ζωής, με τον μηχανισμό της ατρησίας, απομένουν μόνον 2.000.000 μέχρι την γέννηση, και η καταστροφή τους συνεχίζεται μέχρι την έναρξη της ήβης όπου ο αριθμός των ωοθυλακίων που έχει διασωθεί από την ατρησία φτάνει τις 200.000 - 300.000 περίπου. Από αυτά, μόνον τα 400 το πολύ ωοθυλάκια στη ζωή μιας γυναίκας θα φτάσουν σε πλήρη ωρίμανση και θα απελευθερωθούν για γονιμοποίηση.

A.1.2. Στάδια ωοθυλακίου - ωαρίου

Με την έναρξη της ήβης, αρχίζει η ωρίμανση των ωοθυλακίων από το στάδιο του αρχέγονου σε πρωτογενές, δευτερογενές και προωορρηκτικό ωοθυλάκιο, από το οποίο και απελευθερώνεται το ωάριο στις σάλπιγγες.



Τα αρχέγονα ωοθυλάκια αποτελούνται από ένα ωοκύτταρο διαμέτρου 15μ, μια στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων και από τη βασική μεμβράνη που τα χωρίζει από τον διάμεσο συνδετικό ιστό (Baker, 1976).

Με την έναρξη της λειτουργίας του ωοθηκικού κύκλου, αρχίζει η διαδικασία της στρατολόγησης (Di Zegera and Hodgen 1981), όπου επιλέγεται ένας μικρός αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων (ανάλογα με τον αριθμό των ωοθυλακίων που παραμένουν μέσα στις ωοθήκες) για να συνεχίσουν την ωρίμανσή τους (Lintern - Moore, 1979). Από αυτά, με τον μηχανισμό της ατρησίας, μόνο το ένα (κυρίαρχο ωοθυλάκιο) θα φτάσει στην απελευθέρωση ενός ώριμου ωαρίου στο μέσον του κύκλου. Ο μηχανισμός της στρατολόγησης βρίσκεται στην ωοθήκη και είναι ανεξάρτητος από τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης ή τα στεροειδή των επινεφριδίων, ενώ εξαρτάται άμεσα από τους υποδοχείς της FSH του ωοθυλακίου (Lunenfeld et al., 1970, Peters et al., 1973).

Μετά την στρατολόγηση, επάγεται σημαντική αύξηση παραγωγής του RNA και των ριβοσωματίων με αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα ωοκύτταρα (Lintern - Moore et al., 1978). Παράλληλα, αρχίζουν ν' αναπτύσσονται σύνδεσμοι ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα κοκκώδη κύτταρα που ονομάζονται χασματικές συνάψεις (gap junctions) οι οποίες πιστεύεται ότι λειτουργούν σαν υπόστρωμα για ηλεκτρική και βιοχημική σύνδεση μεταξύ των κυττάρων. Οι συνάψεις αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου στην ορμονική διέγερση μέσω ταχείας ανταλλαγής ουσιών και ορμονικών μηνυμάτων μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών αλλά και των κοκκωδών μεταξύ τους (Anderson and Albertini, 1976). Διευκολύνουν επίσης την μεταφορά ιόντων και ενώσεων μικρού μοριακού βάρους όπως της κυκλικής Μονοφωσφορικής Αδενοσίνης (c AMP). Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την εντυπωσιακή αύξηση του μεγέθους του ωοκυττάρου που μόλις φτάσει τα 150-200μ μεταναστεύει από τον φλοιό της ωοθήκης στον μυελό όπου και γίνεται η σύνθεση και έκκριση των συστατικών της διαφανούς ζώνης και ολοκληρώνεται η διαφοροποίηση του ωοκυττάρου όταν αυτό βρίσκεται στο στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου. Επίσης σ' αυτό το στάδιο, εμφανίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων ειδικοί υποδοχείς της FSH, που ανέρχονται σε 1500 περίπου, αριθμός που μένει σταθερός σ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης του



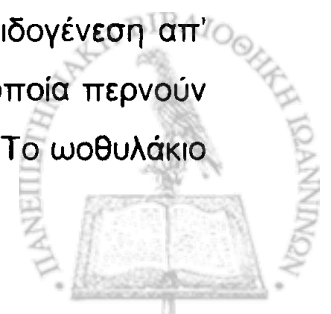
ωοθυλακίου (Nimrod et al., 1976). Ακολουθεί η εμφάνιση των υποδοχέων των οιστρογόνων (Richards, 1980) και της τεστοστερόνης (Schreiber and Ross 1976). Τα οιστρογόνα αυξάνουν την μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών καθώς επίσης συμβάλλουν στην αύξηση των υποδοχέων της FSH και αργότερα της LH. Σχετικά με την τεστοστερόνη, ο ρόλος της στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη, αυτό όμως που έχει δειχθεί πειραματικά είναι ότι τα αυξημένα ανδρογόνα εμποδίζουν την ωρίμανση των ωοθυλακίων (Louvet, 1975).

Μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του πρωτογενούς ωοθυλακίου επιτελούνται διάφορα φαινόμενα: Πολλαπλασιάζονται τα κοκκώδη κύτταρα δημιουργώντας ένα πολύστιβο στρώμα που περιβάλλει συμμετρικά το ωάριο. Μεσεγγυματικά κύτταρα μεταναστεύουν στην βασική μεμβράνη (Hisaw, 1974) για ν' αναπτυχθούν αργότερα σε έσω και έξω θήκη. Ινοβλάστες κοντά στη βασική μεμβράνη αναπτύσσονται σε διάμεσα κύτταρα θήκης που διαφοροποιούνται σε κύτταρα που συνθέτουν ανδροστενδιόνη. Τέλος, δημιουργείται ένα ανεξάρτητο αγγειακό δίκτυο (Basset, 1943). Εδώ τοποθετείται και η εμφάνιση του άντρου που είναι ο χώρος γύρω από το ωοκύτταρο που περιβάλλεται από κοκκώδη. Το άντρο περιέχει υγρό πλούσιο σε οιστρογόνα, που ονομάζεται ωοθυλακικό υγρό.

Ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση του δευτερογενούς ωοθυλακίου εξαρτάται αποκλειστικά από την FSH και την LH, αντίθετα από το πρωτογενές του οποίου η εξέλιξη κατευθύνεται κυρίως από ενδοωοθηκικούς παράγοντες.

Μέσω των αγγείων της θήκης, η FSH φθάνει στο ωοθυλάκιο και συνδέεται με τους υποδοχείς της στη μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή επάγει την σύνθεση του c AMP (Marsh, 1975) που με τη σειρά του επάγει την παραγωγή οιστρογόνων ενεργοποιώντας τα αρωματικά ένζυμα στο σύστημα της αρωματάσης, δια του οποίου τα ανδρογόνα μετατρέπονται σε οιστρογόνα (Erickson et al., 1985). Τα οιστρογόνα υποβοηθούν την δράση του c AMP (Darbon et al., 1984), δίνοντας στα κοκκώδη τη δυνατότητα ν' ανταποκριθούν στις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις της FSH στο ωοθυλακικό υγρό.

Η LH δρα πάνω στα κύτταρα της θήκης προκαλώντας στεροειδογένεση απ' αρχής και μάλιστα προς την κατεύθυνση των ανδρογόνων τα οποία περνούν στα κοκκώδη κύτταρα και αρωματοποιούνται προς οιστρογόνα. Το ωοθυλάκιο



που θα επιτύχει την κυριαρχία των οιστρογόνων στο μικροπεριβάλλον του θα κυριαρχήσει ανάμεσα στα άλλα, τα οποία και θα εκφυλισθούν με τον μηχανισμό της ατρησίας, ενώ αυτό, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (dominant follicle), θα φθάσει σε πλήρη ωρίμανση και ωοθυλακιορρηξία (Hodgen, 1982). Υποδοχείς της LH στα κοκκώδη εμφανίζονται στο προωορρηκτικό στάδιο της ανάπτυξης του ωοθυλακίου σαν αποτέλεσμα της δράσης της FSH και των E.

Μπαίνοντας στην παραγωγική φάση του ωοθηκικού κύκλου, παρατηρείται μια αύξηση της FSH που είναι το σήμα για να προχωρήσει το ωοθυλάκιο στην ωρίμανσή του. Η αύξηση αυτή μπορεί να συμβεί και μια ή δύο μέρες πριν το τέλος του προηγούμενου κύκλου και είναι το αποτέλεσμα της άρσης της κατασταλτικής δράσης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στον υποθάλαμο και την υπόφυση λόγω της ελάττωσης παραγωγής των στεροειδών από το ωχρό σωματίο. Σε συνεργασία με τα οιστρογόνα, η FSH αυξάνει τον αριθμό των υποδοχέων της στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των κοκκωδών (Richards, 1979). Αυτό προάγει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων που παράγονται από τη θήκη, πράγμα που αυξάνει τα οιστρογόνα που με τη σειρά τους προκαλούν περισσότερες διαιρέσεις κοκκωδών κυττάρων. Έτσι αυξάνονται οι υποδοχείς της FSH που με την επίδραση της FSH προκαλούν εντονότερη αρωματοποίηση κ.λ.π. Μ' αυτόν τον τρόπο αυξάνεται το ωοθυλακικό υγρό δημιουργώντας ένα ειδικό περιβάλλον για κάθε ωάριο. Η FSH ανιχνεύεται στο ωοθυλακικό υγρό, μόνον όταν τα οιστρογόνα υπερτερούν των ανδρογόνων. Η υπεροχή των οιστρογόνων ως προς τα ανδρογόνα στο ωοθυλακικό υγρό, δίνει μια ένδειξη ότι πρόκειται για ένα υγιές ωοθυλάκιο που πρόκειται να φτάσει στην πλήρη ωρίμανση. Στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCO), είναι χαρακτηριστικό ότι η υπερέκκριση ανδρογόνων οδηγεί τα περισσότερα ωοθυλάκια σε ατρησία, με αποτέλεσμα την ελάττωση της γονιμότητας.

Η επιλογή του ωοθυλακίου που θα φτάσει στην ωοθυλακιορρηξία και θα γίνει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, γίνεται μεταξύ της 5^{ης} και 7^{ης} μέρας του κύκλου. Θα είναι αυτό που βρίσκεται στο πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, με το μεγαλύτερο μέγεθος, καλύτερη αιμάτωση, μεγαλύτερο αριθμό κοκκωδών και ετγομένως μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων που μετατρέπουν γρηγορότερα το ανδρογονικό μικροπεριβάλλον σε οιστρογονικό και έτσι το καθιστούν κυρίαρχο



σε σχέση με τα άλλα ωοθυλάκια που εκφυλίζονται με την ατρησία (di Zerega et al., 1980).

Από την ημέρα της επιλογής του, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο γίνεται η κύρια πηγή των παραγόμενων οιστρογόνων που φθάνουν στα μέγιστα 34 - 36 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία (Pauestein et al., 1978, Young and Jeffe, 1981). Όσο αυξάνουν τα οιστρογόνα, τόσο η δράση της FSH επικεντρώνεται στη δημιουργία υποδοχέων της LH. Έτσι, η LH αυξάνει με βραδύ ρυθμό στην αρχή και κατόπιν με αυξανόμενη ταχύτητα ώσπου φτάνει στο μέγιστο της τιμής της δίνοντας το μεσοκυκλικό κύμα της, παράλληλα με την μικρότερη αιχμή της FSH, στο μέσον του κύκλου (Moghissi et al., 1972). Για να προκληθεί το μεσοκυκλικό κύμα της LH, πρέπει τα οιστρογόνα να έχουν ξεπεράσει τα 300 pg/ml και να παραμείνουν στα επίπεδα αυτά για περίπου 50 ώρες. (Hoff et al., 1983). Περίπου 10 -12 ώρες μετά την μεσοκύκλια αιχμή της LH, και 36 ώρες μετά την αιχμή των E, γίνεται η ωοθυλακιορρηξία και ταυτόχρονα ολοκληρώνεται και η πρώτη μειωτική διαίρεση του ωαρίου αποβάλλοντας το πρώτο πολικό σωματίο. Το δεύτερο πολικό σωματίο και επομένως η πλήρης ωρίμανση του ωαρίου γίνεται μετά την γονιμοποίησή του, στη λήκυθο της σάλπιγγας.

Η μετάβαση ενός ανώριμου ωοθυλακίου από το στάδιο του αρχέγονου μέχρι την ωοθυλακιορρηξία, ολοκληρώνεται μέσα σε έναν ωοθηκικό κύκλο στον άνθρωπο, ενώ στα ζώα διαρκεί 80 - 85 ημέρες (Gouson, 1981), όσο δηλαδή και η ωρίμανση του σπέρματος.



A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ.

Η μελέτη της φυσιολογίας ανάπτυξης των ωοθυλακίων οδήγησε στη διαπίστωση ότι διάφορες ορμόνες, και κυρίως οι ορμόνες της υπόφυσης (FSH, LH), παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ωοθυλακίων *in vivo*. Η προοπτική της δυνατότητας της *in vitro* επίδρασης των ορμονών αυτών, οδήγησε πολλά ερευνητικά κέντρα σε εκτενείς μελέτες με πολύ θετικά αποτελέσματα. Έτσι, το 1986, οι Roy and Greenwald, προσθέτοντας FSH και LH σε υγρό καλλιέργειας ανώριμων ωοθυλακίων ποντικού, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι υποφυσιακές ορμόνες επιδρούν *in vitro* ακόμα και στα πρωτογενή ωοθυλάκια, πριν δηλαδή εμφανιστεί το άντρο (Roy and Greenwald, 1986). Επίσης, άλλες μελέτες των ιδίων καθώς και άλλων, απέδωσαν διεγερτική επίδραση των ορμονών της υπόφυσης, στην ρύθμιση της σύνθεσης του DNA και στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων της θήκης στα ωοθυλάκια του ποντικού (Roy and Greenwald 1988, Roy and Greenwald 1986, Hartshorne et al., 1994, Gosden et al., 1993). Το 1993, οι Roy and Tracy επιβεβαιώνουν την θετική επίδραση της FSH στην ωρίμανση ωοκυττάρων ανθρώπου (Roy and Tracy 1993).

Αντίθετα, τα στεροειδή δεν φαίνεται να έχουν καμιά επίδραση στην σύνθεση του DNA όταν επιδρούν εξωγενώς σε καλλιέργειες ωοθυλακίων, η οιστραδιόλη μάλιστα παρατηρήθηκε ότι προκάλεσε ατρησία στα ωοθυλάκια όταν προστέθηκε στο καλλιεργητικό υλικό τους (Roy and Greenwald 1989), αλλά όλα αυτά είναι ακόμα υπό μελέτη.

Άλλοι παράγοντες που μελετήθηκαν είναι:

Ανασταλτίνη (Inhibin). Γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στα κοκκώδη κύτταρα. Αναστέλλει την έκκριση της FSH χωρίς να επιδρά στην LH, αυξάνει την παραγωγή των Ανδρογόνων (A), και της Προγεστερόνης (P). Η δράση της στην ωρίμανση των ωοθυλακίων είναι ανασταλτική (W.S.O. et al., 1989).

Ενεργοποιητίνη (Activin). Έχει παρόμοια δομή με την Ανασταλτίνη αλλά αντίθετη λειτουργία. Αυξάνει την έκκριση της FSH στην υπόφυση. Μειώνει την έκκριση και σύνθεση των αυξητικών ορμονών (GH). Εμποδίζει την βασική φλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH) και την σύνθεση και έκκριση της προλακτίνης (PRL). Ρυθμίζει την διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων και την



ωρίμανση των ωοθυλακίων. Μειώνει την παραγωγή των A και της P. Από προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι συμβάλλει στην ωρίμανση των ωοθυλακίων *in vitro* (είτε απογυμνωμένα είτε σε σύμπλεγμα με τα κοκκώδη), αυξάνοντας την έκκριση της FSH. Η δράση της αναστέλλεται από το cAMP (Itch et al., 1990).

Φολλιστατίνη (Follistatin, FSP). Πρωτεΐνη συγγενής με την INH με την οποία και έχει ίδια δράση αλλά διαφορετική δομή. Αναστέλλει την έκκριση της FSH στην υπόφυση, αυξάνει την παραγωγή της P. Δεν έχει επίδραση στα A και στην τεστοστερόνη (T) . Ρυθμίζει διάφορες δράσεις της ACT σε διάφορους ιστούς π.χ. σε καλλιέργειες κυττάρων ποντικού, εξουδετερώνει την ενεργοποιητική επίδραση της ACT, συμπεριλαμβάνοντας την έκφραση της FSH και LH και την παραγωγή της INH και της P (Itch et al., 1990).

Αυξητικοί Παράγοντες (Growth Factors: TGF, EGF, IGF): Οι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Έχουν μιτογενετική δράση, επάγοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των διαιρούμενων κυττάρων κατά την εμβρυϊκή περίοδο και καταλήγοντας στη σύνθεση DNA και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε συστήματα κυτταρικών καλλιεργειών, αυξάνουν *in vitro* την μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων. Η τελική βιολογική δράση τους εξαρτάται από την φύση του κυττάρου στόχου στο οποίο δρουν μέσω υποδοχέων. Πιστεύεται ότι έχουν αυτοκρινή ή παρακρινή ρυθμιστικό ρόλο στην δράση των στεροειδών.

Ο Ινσουλινοτρόπος Αυξητικός Παράγοντας (Insulin-like growth factor, IGF) έχει μιτωτική δράση στα κοκκώδη κύτταρα (Adashi et al., 1985). Ο IGF-1 αυξάνει τα E και τις προσταγλανδίνες (PGE₂) που παράγονται λόγω FSH στα κοκκώδη κύτταρα (Rabinovici et al., 1990).

Από τους Αυξητικούς Παράγοντες Μετασχηματισμού (Transforming growth factor, TGF), ο TGF-α έχει θετική δράση στην ωρίμανση των ωοθυλακίων ενώ ο TGF-β αρνητική (Tsafiriri et al., 1989). Συγκεκριμένα, ο TGF-α μιμείται την δράση της LH προάγοντας την ωρίμανση των ενδοωοθυλακικών ωοκυττάρων. Αντίθετα, ο TGF-β δεν προάγει την ωρίμανση, καταστέλλει μάλιστα κι αυτήν που προκλήθηκε λόγω της LH.



Ο Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας (Epidermal growth factor, EGF) έχει μιτωτική δράση στα κοκκώδη (Gospodarowicz et al., 1979). Υπάρχει μια άμεση και κυκλική σχέση ανάμεσα στον EGF και τα E. Βρέθηκε ότι τα E επάγουν την σύνθεση του EGF και των υποδοχέων του προκειμένου να εκφράσουν την μιτογενετική τους δράση στην αύξηση και διαφοροποίηση του ενδομήτριου (Watson et al. 1996, Ignar-Trowbridge et al., 1992). Σε διάφορες εκκριτικές λειτουργίες της μήτρας, ο EGF μπορεί να υποκαταστήσει τα E. Τα αποτελέσματα της δράσης του EGF προφανώς ρυθμίζονται εν μέρει και από τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ESR) και κατά προέκταση, ο EGF ρυθμίζει την αύξηση των ESR.

Κυτοκίνες: Είναι προϊόντα των λευκοκυττάρων. Από τις ιντερλευκίνες, η IL-1 θα μπορούσε να είναι ένας από τους παράγοντες αύξησης του εμβρύου, που παράγονται από το ίδιο το έμβρυο. Επίσης θα μπορούσε να ενεργοποιήσει τον ανοσοκατασταλτικό παράγοντα εμποδίζοντας την απόρριψη του εμβρύου από την μητέρα. Η IL-2 είναι γνωστό ότι προκαλεί το "vascular leak syndrome", ένα σύνδρομο που ομοιάζει με το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (OHSS), δίνοντας μια συσχέτιση ανάμεσα στην συγκέντρωση της IL-2 και του OHSS.

Τέλος, ο Ανασταλτικός Παράγοντας Λευχαιμίας (Leucaemia Inhibiting Factor, LIF) βρίσκεται στο ψηλότερο επίπεδο στην μεσοκύκλια φάση και παίζει σημαντικό ρόλο στην αναχαίτιση της διαφοροποίησης των κυττάρων του εμβρύου και στην εμφύτευση. Έχει αναφερθεί ότι αυξάνει in vitro την ανάπτυξη των εμβρύων πριν την εμφύτευση. Βρέθηκε ότι συγκαλλιέργεια προεμβρύων με κύτταρα που εκφράζουν τον LIF, αυξάνει την ανάπτυξή τους στο στάδιο της βλαστοκύστης.



Λειτουργική σύνδεση των παραγόντων ωρίμανσης με τα οιστρογόνα

Από προηγούμενες μελέτες φαίνεται ότι, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μεταξύ των περισσότερων παραγόντων που έχουν αναφερθεί ότι είναι σημαντικοί για την ωρίμανση των ωοθυλακίων, τα E και ο υποδοχέας τους παίζουν ένα συνδετικό ρόλο επηρεάζοντας είτε τη σύνθεση είτε τη δράση των παραγόντων αυτών. Οποιαδήποτε λοιπόν αλλαγή στη λειτουργία του υποδοχέα των E θα έχει αντίκτυπο και σε κάποιους άλλους παράγοντες και, κατά προέκταση, στην ωρίμανση των ωοθυλακίων.

Ειδικότερα, όσον αφορά τις "Σχετικές με την Ανασταλτίνη πρωτεΐνες" (Inhibin Related Proteins), τα E αυξάνουν την έκφραση του mRNA της INH (Turner et al., 1989) και ρυθμίζουν την έκφραση του mRNA της FSP (Bauer-Dantoin et al., 1996). Η ACT προάγει την σύνθεση των E (Hillier and Miro, 1993).

Στους αυξητικούς παράγοντες EGF και TGF- α τα E έχουν επαγωγική δράση (Vignon et al., 1986).

Η επίδραση των E στην IL-6 που παράγεται από τους οστεοβλάστες και από τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών είναι κατασταλτική, παρατηρήθηκε μάλιστα αύξηση της IL-6 που επάγεται από αυτά τα δύο είδη κυττάρων του σκελετικού συστήματος, σε ποντίκια που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή (Bellido et al., 1993).



A.3. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

A. 3. 1. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Ο κύριος ρόλος των οιστρογόνων είναι η ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος και των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου του θήλεος. Κατά δεύτερο λόγο, η δράση τους επεκτείνεται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και οργάνων εκτός του γεννητικού συστήματος, όπως π.χ. στο σκελετικό σύστημα, στο μαστό κλπ, πράγμα που καθιστά απαραίτητη την εκτενέστερη μελέτη τους.

Πιο αναλυτικά, πέρα από την κλασσική δράση των Ε που είναι στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας, η επίδρασή τους επισημαίνεται και στον κόλπο (συμβάλλουν στην διαμόρφωση του κολπικού επιθηλίου), στον τράχηλο (αυξάνουν την παραγωγή της τραχηλικής βλέννας), στο ενδομήτριο (αυξάνουν το πάχος του ενδομητρίου κάνοντάς το υποδεκτικό για την εμφύτευση του γονιμοποιηθέντος ωαρίου), στο μυομήτριο, στις σάλπιγγες, στην ωοθήκη (προκαλούν αύξηση του μεγέθους της), στην ανάπτυξη και ωρίμανση του κυρίαρχου ωοθυλακίου (συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και συντελούν στην δημιουργία των υποδοχέων της FSH πάνω στα κοκκώδη), στον αναπαραγωγικό κύκλο (δίνουν το σήμα στο σύστημα υποθαλάμου - υπόφυσης για την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών), στην γονιμότητα, στην εγκυμοσύνη και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η δράση τους έχει εντοπιστεί και σε άλλα συστήματα του οργανισμού όπως στον μαστό (προκαλούν εναπόθεση λίπους και ανάπτυξη των ιστών του υποστρώματος του μαστού καθώς και ανάπτυξη των πόρων και των κυψελίδων του μαζικού αδένου), και σε νευροενδοκρινείς ιστούς στους οποίους τα Ε διεγείρουν μια ποικιλία από ειδικές αποκρίσεις. Μεγάλη πτώση των Ε κατά την διάρκεια της εμμηνόπαυσης που συνδέεται με οστεοπόρωση και καρδιαγγειακές παθήσεις, έχει υποδείξει ότι τα Ε επιδρούν προστατευτικά στο σκελετικό σύστημα (αυξάνουν την οστεοβλαστική δραστηριότητα των οστών), και στο καρδιαγγειακό σύστημα (αυξάνουν την εναπόθεση λίπους στον υποδόριο ιστό καθώς και την αγγείωση του δέρματος). Τα Ε παίζουν σημαντικό ρόλο από την πρώτη ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς διαπιστώθηκε



η ύπαρξη m RNA του υποδοχέα των E σε καλλιεργητικό υγρό προεμβρύων στο στάδιο των 2 κυττάρων και βλαστοκύστεων.

A.3.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Η ωρίμανση των ωοθυλακίων περιλαμβάνει την μετατροπή των ανώριμων πρωτογενών ωοθυλακίων σε ώριμα, γονιμοποιήσιμα ωάρια. Η αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου, μετά την πρώτη μειωτική διαίρεση, και ο σχηματισμός της δεύτερης μιτωτικής ατράκτου, είναι η πιστοποίηση ότι η ωρίμανση έχει ολοκληρωθεί και το ωάριο είναι ικανό και έτοιμο για γονιμοποίηση. Ουσιαστικά η ωρίμανση ολοκληρώνεται στη φάση της γονιμοποίησης όπου και αποβάλλεται το δεύτερο πολικό σωματίο κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου.

Η κλασική μελέτη του Hackeloeer (Hackeloeer et al., 1979) έδειξε ότι η ποσότητα των E που παράγονται από ένα ωοθυλάκιο αυξάνει, καθώς αυτό ωριμάζει. Τα E παράγονται κατά κύριο λόγο από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (κατά 95%) και από το ωχρο σωματίο, στη διάρκεια της παραγωγικής φάσης κυρίως, για να προάγουν την πρόκληση ενός επαρκώς υποδεκτικού ενδομητρίου για την εμφύτευση του εμβρύου. Η παραγωγή τους ρυθμίζεται από ένα σύνολο παραγόντων που συνεργάζονται ώστε να γίνεται αποτελεσματικά η στεροειδογένεση. Το σήμα έναρξης για την παραγωγή και έκκριση E δίνεται από το c AMP (Robinson et al., 1968, βραβείο Νόμπελ στον Sutherland).

Τα E δρουν πάνω στην υπόφυση και στον υποθάλαμο προκαλώντας την συγχρονισμένη απελευθέρωση των γοναδοτροπινών πριν την ωορρηξία. Τα E και η FSH συνεργάζονται στην ωοθήκη ώστε να αυξήσουν τον αριθμό των υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα κι αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων (Goldenberg et al., 1972, Richards et al., 1976; Ireland and Richards, 1978.)

Η ενίσχυση του συστήματος της αρωματάσης που διεγείρεται από την FSH και την LH, η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών και του cAMP σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων προκαλείται από τα οιστρογόνα (Adashi



and Hsueh, 1982; Welsh et al., 1983). Τα οιστρογόνα εμποδίζουν την ατρησία ενώ τα ανδρογόνα την ενισχύουν (Louvet et al., 1975).

Από διάφορες μελέτες πάνω στην εξωσωματική γονιμοποίηση, βρέθηκε ότι υψηλά επίπεδα E στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται με την ωρίμανση των ωοθυλακίων, την γονιμοποίηση, την διαίρεση του ζυγωτού και την εγκυμοσύνη. Επίσης βρέθηκε ότι στις περιπτώσεις όπου προέκυπτε εγκυμοσύνη, το πάχος του ενδομητρίου την μέρα της h CG ήταν αξιοσημείωτα υψηλότερο συγκριτικά με τις περιπτώσεις όπου η εγκυμοσύνη δεν επιτυγχανόταν παρά την άριστες κατά τα άλλα συνθήκες. Η μέτρηση του πάχους του ενδομητρίου θεωρείται μάλιστα καλύτερος δείκτης, από ότι η μέτρηση των E του πλάσματος, για την πιστοποίηση της ορμονικής επάρκειας στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Η επίδραση των E πάνω στο ενδομήτριο έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές, φαίνεται μάλιστα ότι η διαμόρφωση ενός επαρκώς υποδοκτικού ενδομητρίου είναι η πιο σημαντική δράση τους (Schoham and Schachter 1996).

A.3.3. ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ

Τα E επιτελούν τη δράση τους πάνω στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού όχι άμεσα, αλλά μέσω ειδικών υποδοχέων υψηλής δεσμευτικής συγγένειας. Οι υποδοχείς αυτοί, (Estrogen Receptors, ESR), δεσμεύουν τα E με ενεργό τρόπο και αφού μετατραπούν σε ένα ενεργοποιημένο σύμπλοκο, επιδρούν στο κύτταρο-στόχο προάγοντας την παραγωγή της πρωτεΐνης που ζητείται. Μόλις ολοκληρωθεί η δράση των οιστρογόνων το σύμπλοκο αποσυνδέεται. Υποδοχείς οιστρογόνων ESR έχουν εντοπιστεί παντού: στον ουρογεννητικό σωλήνα (Mc Ewen, 1976), στις σάλπιγγες (Press et al., 1986), στο ενδομήτριο (Press et al., 1984, 1988; Lessey et al., 1988; Garcia et al., 1988), στο σώμα της μήτρας και στον τράχηλο (Scharl et al., 1988), στον μαστό, στον εγκέφαλο, στον υποθάλαμο και στην υπόφυση (Mc Ewen, 1976) κ.λ.π.



A.3.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Μελέτες πάνω στον μηχανισμό δράσης των στεροειδών ορμονών, οδήγησαν το 1959 τους Glascock and Hoekstra και το 1960 τους Jensen and Jacobson στην διαπίστωση ότι οι στεροειδείς ορμόνες προσλαμβάνονται από τους ιστούς στόχους με ειδικό τρόπο και μάλιστα χωρίς να απαιτείται μεταβολισμός της ενεργού ορμόνης (τουλάχιστον στα ανώριμα ζώα). Τα πειράματα έγιναν με ραδιενεργά σημασμένη ορμόνη σαν δείκτη, και έδειξαν ότι οι ιστοί στόχοι προσλαμβάνουν και κατακρατούν φυσιολογικά ποσότητες της ορμόνης (παρά το χαμηλό βαθμό συγκέντρωσης στο αίμα), μέσω ειδικών υποδοχέων, πρωτεϊνικής φύσεως.

Δεσμευτικές πρωτείνες βρέθηκαν στο κυτταρόπλασμα όλων των κυττάρων στόχων και για όλες τις στεροειδείς ορμόνες και ταξινομούνται ανάλογα με τον βαθμό συγγένειας με την ορμόνη σε μη ειδικές, που βρίσκονται σε μεγάλες σχετικά ποσότητες όμως έχουν χαμηλή συγγένεια με την ορμόνη, και σε ειδικές (υποδοχείς) που έχουν υψηλή δεσμευτική συγγένεια, υψηλή εξειδίκευση και την δυνατότητα να επηρεάζουν την λειτουργία του κυττάρου με την ενεργοποίηση τους (Pertschuk et al., 1980, Chamness et al., 1980).

Απομόνωση καθαρών υποδοχέων στεροειδών επετεύχθη νωρίς στη δεκαετία του 1980 με την ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων υψηλής συγγένειας. Παρά το γεγονός ότι αυτά τα μόρια βρίσκονται στα κύτταρα σε μικρά ποσά, διαχωρίστηκαν με μεθόδους περιορισμένης πρωτεόλυσης, στο τμήμα του υποδοχέα που δεσμεύεται με την ορμόνη, και σ' εκείνο που είναι υπεύθυνο για την δέσμευση στο DNA του κυττάρου στόχου (Evans, 1988).



A.4. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΑ

Ο Υποδοχέας των Οιστρογόνων (ESR) είναι ένωση πρωτεϊνικής φύσεως, δια μέσου της οποίας τα οιστρογόνα επιτελούν την δράση τους. Ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων, την οικογένεια των Πυρηνικών Υποδοχέων (Nuclear Receptor Family), μαζί με τον υποδοχέα της προγεστερόνης, (PR), τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), των ανδρογόνων (AR), της βιταμίνης D (VDR), και της θυρεοτρόπου ορμόνης (TR). Όπως όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου (σε αντίθεση με τους μεμβρανικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου στόχου).

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη και κατακράτηση των Ε στους ιστούς στόχους και για τη μεταφορά της ορμόνης στον πυρήνα του κυττάρου στόχου όπου και διεγείρουν την μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων που στοχεύει η ορμόνη. Είναι στόχο-εξαρτώμενοι, πράγμα που σημαίνει ότι τα γονίδια τα οποία μεταγράφονται λόγω της δράσης των οιστρογόνων, εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου στο οποίο δρα η ορμόνη. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από την έκφραση των γονιδίων αυτών θα επιδράσουν με τη σειρά τους στην κυτταρική λειτουργία επηρεάζοντας την συμπεριφορά των κυττάρων στόχων.

Η ενεργοποίηση μάλιστα του συμπλέγματος του υποδοχέα με την ορμόνη, δεν γίνεται με τον ίδιο ρυθμό στους διάφορους ιστούς στόχους, γεγονός που αντανακλά πιθανώς την ανομοιογένεια της απόκρισης των διαφόρων ιστών στόχων στα στεροειδή (Linkie, 1977).



ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Το γονίδιο του ESR στον άνθρωπο, βρίσκεται στο 6q24-q27 χρωμόσωμα. Εκτείνεται σε παραπάνω από 140 κιλοβάσεις (kb) και χωρίζεται σε 8 εξώνια (exons) και 8 εσώνια (introns). Το cDNA (complementary DNA, το τμήμα του γενομικού DNA που μεταγράφεται σε mRNA) ορίζει μια αλληλουχία από 6.322 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη από 595 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 66.182.

Η δομή του υποδοχέα συνίσταται από έξι τμήματα (Fuqua et al., 1993): τα A,B,C,D,E και F. Οι περιοχές A και B είναι οι λιγότερο προστατευμένες και παρουσιάζουν μια δομική λειτουργία ενεργοποίησης της μετάφρασης των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων (Tora et al., 1989, Boquel et al., 1989). Είναι υπεύθυνες για το μοριακό βάρος του υποδοχέα και μαζί με την F περιοχή αποτελούν τα ρυθμιστικά τμήματα του υποδοχέα.

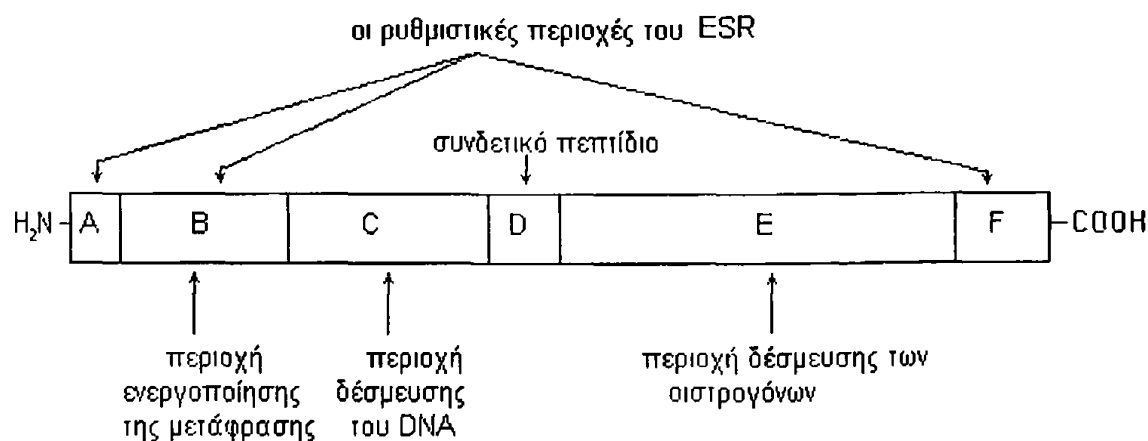
Η C περιοχή είναι πολύ καλά προστατευμένη και αποτελεί το τμήμα με το οποίο έρχεται σε επαφή ο υποδοχέας με το DNA του πυρήνα (DNA binding region), δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της μεταγραφής των ειδικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, το τμήμα αυτό είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του συμπλόκου ορμόνης - υποδοχέα με μια αλληλουχία ρυθμιστικού DNA από το DNA του κυττάρου στόχου, που καλείται Στοιχείο Απόκρισης στα Οιστρογόνα (Estrogen Response Element, ERE) και αυτή η σύνδεση παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση καθώς κάθε υποδοχέας αναγνωρίζει τα δικά του ERE. Αυτή η υψηλή εξειδίκευση εξασφαλίζει ακρίβεια δράσης ώστε τα σήματα των εξωκυτταρικών ορμονών να μεταφέρονται με τους υποδοχείς στα συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Επίσης, στην άκρη της C περιοχής, εντοπίζεται και μια Αλληλουχία Εντοπισμού του Πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS) από τον υποδοχέα (Mader et al., 1989, Chambraud et al., 1990). Η D περιοχή αποτελεί το συνδετικό πεπτίδιο μεταξύ των περιοχών C και E, που αποτελούν τις περιοχές σύνδεσης με το DNA και την ορμόνη αντίστοιχα. Ο ρόλος της περιοχής αυτής δεν είναι καλά γνωστός.

Τέλος, η E περιοχή είναι το τμήμα του υποδοχέα που συνδέεται με την ορμόνη (ligand binding region) και συμβάλλει στην σταθερότητα του διμερισμού της ορμόνης με τον υποδοχέα (Kumar and Chambon 1988, Fawell



et al., 1990) . Συμπληρωματικά, περιέχει μια λειτουργία ενεργοποίησης της μετάφρασης που επάγεται από τα οιστρογόνα και που συνεργάζεται με την A/B περιοχή (Tora et al., 1989). Η περιοχή αυτή σχηματίζει έναν υδρόφοβο φάκελο (Green et al. 1986), η δομή του οποίου εξασφαλίζεται από τα κοινά αμινοξέα των υποδοχέων, ενώ τα διαφορετικά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την ειδική σύνδεση του κάθε υποδοχέα με την αντίστοιχη ορμόνη. Ακόμη, μια σειρά άλλων λειτουργιών όπως ο διμερισμός του υποδοχέα (Fawell 1990) και η αλληλεπίδραση με τις heat - shock proteins αποδίδονται στην περιοχή αυτή.

Σχηματική παράσταση της δομής του Υποδοχέα των Οιστρογόνων ESR



Σχήμα 1: Απεικονίζονται οι λειτουργικές περιοχές A,B,C,D,E και F του Υποδοχέα των Οιστρογόνων ESR και ο ρόλος τους στη δράση των Οιστρογόνων.



ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Συγκριτική ανάλυση και πειράματα πάνω στις μεταλλάξεις του υποδοχέα έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση τριών λειτουργικών περιοχών:

- την -COOH τελική περιοχή όπου δεσμεύεται η ορμόνη,
- την μεσαία περιοχή όπου δεσμεύεται το DNA και
- την -NH₂ τελική περιοχή όπου εντοπίζεται η ενεργοποίηση της μετάφρασης.

Η αλληλεπίδραση των τριών περιοχών μεταξύ τους είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μετάφρασης των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων.

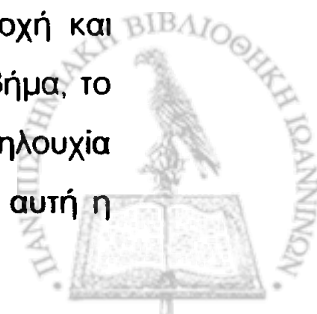
Μετά την σύνδεση των E με τον υποδοχέα, το σύμπλοκο ορμόνης - υποδοχέα συνδέεται με το DNA του κυττάρου στόχου. Η σύνδεση στο DNA γίνεται σε χρωμοσωμικές πρωτεΐνες - υποδοχείς που δεν ανήκουν στην τάξη των ιστονών.

Το γεγονός της δέσμευσης του συμπλέγματος στο DNA οδηγεί στην επαγωγή ή καταστολή ενός περιορισμένου αριθμού γονιδίων (περίπου 50-100 σε κάθε κύτταρο), των οποίων η επιλογή επιτυγχάνεται χάριν της διαφοροποίησης των κυττάρων: επειδή η δομή της χρωματίνης σε κάθε τύπο κυττάρου είναι μοναδικά οργανωμένη, διαφορετικές ομάδες γονιδίων θα' ναι προσιτές στο σύμπλεγμα, σε κάθε περίπτωση (Evans, 1988).

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες (π.χ. υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης, EGF κ.λ.π.) επιδρούν στη βιολογία των κυττάρων προκαλώντας αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Αναλυτικά αυτή η διαδικασία φαίνεται σαν μια σειρά από βήματα:

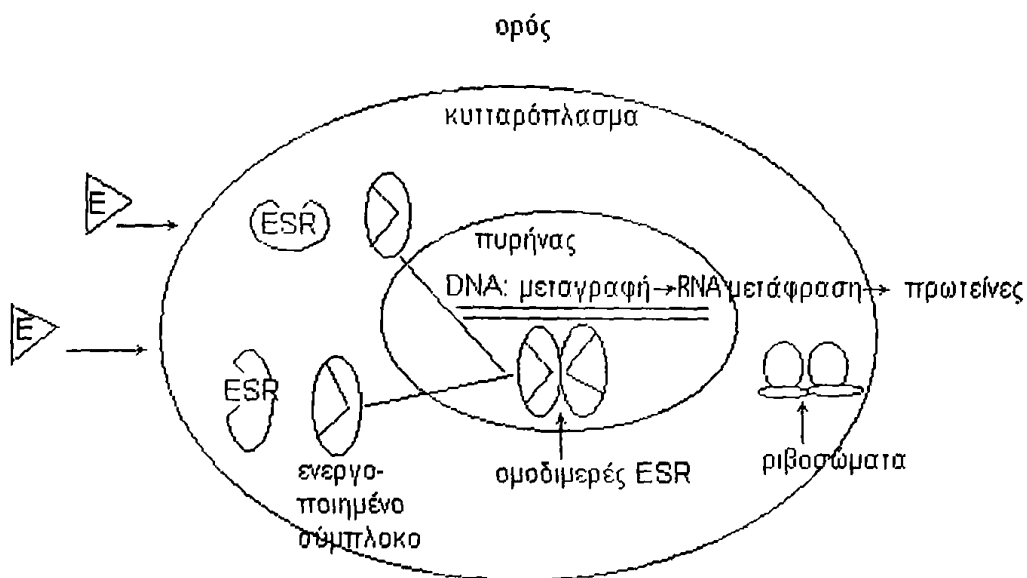
Αρχικά, τα E μετά την έκκρισή τους κυκλοφορούν για λίγα λεπτά στο αίμα, είτε ελεύθερα είτε συνδεδεμένα με ειδικές πρωτεΐνες (SHBG, αλβουμίνη). Όταν φθάσουν στο κύτταρο στόχο διέρχονται παθητικά από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου στόχου (σαν λιποδιαλυτές ενώσεις που είναι), και αφού ενωθούν με τους υποδοχείς τους μπαίνουν στον πυρήνα. Η ένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα γίνεται στην ορμονοδεσμευόμενη περιοχή και προάγει την μορφοποίηση ενός σταθερού ομοδιμερούς. Στο δεύτερο βήμα, το διμερές το ενεργοποιημένο από την ορμόνη, αντιδρά με μια αλληλουχία ρυθμιστικού DNA από το DNA του κυττάρου στόχου, το ERE, και αυτή η



σύνδεση προάγει την μεταγραφή των γονιδίων των εξαρτώμενων από τα E σε mRNA. Τέλος, το σύμπλεγμα του διμερούς με το ERE προάγει την διαμόρφωση του συμπλέγματος έναρξης της μετάφρασης των γονιδίων αυτών στα ριβοσωμάτια, κυρίως συλλέγοντας μεταφραστικούς παράγοντες και / η σταθεροποιώντας την αντίδραση των παραγόντων αυτών με τον επαγωγέα (promoter) των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων. Μόλις η ορμόνη επιτελέσει τον σκοπό της, το διμερές αποσυνδέεται. Ο χρόνος διαχωρισμού είναι σταθερός για κάθε ορμόνη (στην οιστραδιόλη είναι 6 ώρες).

Παράγοντες που επηρεάζουν την μετατόπιση του συμπλέγματος στον πυρήνα εκτός από την θερμοκρασία, φαίνεται πως είναι η ιονική ισχύς και η ενζυμική ενεργοποίηση.

Σχηματική παράσταση της δράσης του ESR



Σχήμα 2: Απεικονίζεται ο τρόπος δράσης του ESR: Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ορμόνης (E) και υποδοχέα (ESR) σχηματίζει ομοδιμερές και προάγει τη μεταγραφή του ορμονοεξαρτώμενου γονιδίου σε mRNA που με τη σειρά του θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη.



Στοιχεία Απόκρισης στις Ορμόνες (Hormone Response Elements, HRE)

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των ορμονικών υποδοχέων οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας ομάδας γονιδίων που ανταποκρίνονται στις ορμόνες (Hormone Responsive Genes) και που είναι οι περιοχές σύνδεσης του συμπλόκου ορμόνης - υποδοχέα με το DNA του κυττάρου στόχου. Αυτές οι αλληλουχίες του ρυθμιστικού DNA που απαιτούνται για την ορμονική ενεργοποίηση της μεταγραφής ονομάστηκαν Hormone Responsive Elements. Η δραστηριότητά τους εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία της ορμόνης και συμπεριφέρονται σαν επαυξηντές της μεταγραφής χάριν στα βραχεία cis-acting τμήματα (μεγέθους περίπου 20 bp) που διαθέτουν. Οι πρώτες σχετικά μελέτες έγιναν για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοστεροειδών και ακολούθησαν τα ανδρογόνα, οιστρογόνα, αλατοκορτικοστεροειδή, προγεστερόνη κλπ.

Διμερισμός του υποδοχέα

Η ένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα από μόνη της δεν καθιστά το σύμπλοκο ικανό για δράση καθώς πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί.

Έχει βρεθεί ότι στη φυσική τους κατάσταση οι ελεύθεροι υποδοχείς των στεροειδών, είναι συνδεδεμένοι με heat-shock proteins σ' ένα σύμπλοκο που εμποδίζει την ένωση του υποδοχέα με το DNA του κυττάρου στόχου (O. Malley 1990). Φαίνεται λοιπόν ότι η ένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα προκαλεί διάσπαση αυτού του συμπλόκου (Chambraud et al. 1990). Εν τούτοις, αυτό δεν είναι αρκετό καθώς, διάφορα ανάλογα των E που έχουν μικρή ή και καθόλου επίδραση στην μεταγραφή, προκαλούν τον αποχωρισμό και επιτρέπουν τους υποδοχείς να ενωθούν με το DNA. Για την μετατροπή του ανενεργού υποδοχέα σε βιοχημικά λειτουργικό χρειάζεται και ο διμερισμός τους. Αποτέλεσμα του διμερισμού είναι η αύξηση της συγγένειας των υποδοχέων με το DNA (Fawell et al. 1990). Μετά τον διμερισμό του ο υποδοχέας είναι πια έτοιμος και βιοχημικά λειτουργικός ώστε να αντιδράσει με τα ERE των γονιδίων-στόχων διεγείροντας την έκφρασή τους (Yamamoto, 1985).



Πρωτεΐνες που επάγονται ή καταστέλλονται από τα οιστρογόνα.

Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης των E είναι η ρύθμιση της μεταγραφής ειδικών γονιδίων που εκφράζεται με την σύνθεση και παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Τα E ρυθμίζουν την σύνθεση αρκετών ειδικών πρωτεϊνών (Ciocca et al., 1983). Η πιο γνωστή και σημαντική είναι η επαγωγή της σύνθεσης του υποδοχέα της P από τα E (Pertschuk et al., 1980). Επίσης η βιοσύνθεση των PGE₂ και του cAMP σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων προάγεται από τα οιστρογόνα.

Αυξητικοί παράγοντες όπως ο EGF και ο TGF- α επάγονται από τα E (Dietel, 1987, Vignon et al., 1986). Τα E αυξάνουν την έκφραση του m RNA της INH και ρυθμίζουν την έκφραση του m RNA της FSP (Bauer-Dantoin et al., 1996, Turner et al., 1989).

Η παραγωγή διαφόρων ενζύμων επίσης ρυθμίζεται από τα E: η DNA-πολυμεράση, η δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η γαλακτική δεϋδρογονάση, η γαλακτοσουλ-τρανσφεράση, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, η κινάση της θυμιδίνης κ.λ.π. (Helle and Krohn, 1986, Adams and McGuire, 1985).

Η παραγωγή και έκφραση του bcl-2, ο οποίος είναι ένας αναστολέας της απόπτωσης, ρυθμίζεται από τα E (Osborn et al., 1996).

Δύο ειδικές πρωτεΐνες που η σύνθεσή τους επάγεται από τα E είναι οι γλυκοπρωτεΐνες 24K (με μοριακό βάρος 24.000) και 52K (με μοριακό βάρος 52.000) που αρχικά ανιχνεύθηκαν στο κυτταρόπλασμα καλλιεργούμενων MCF-7 κυττάρων ανθρώπινου καρκίνου μαστού (Ciocca et al., 1983, Vignon et al., 1986).

Η 24K πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί στο κυτταρόπλασμα κυττάρων θετικών για υποδοχείς E και P, και πιθανώς να αποτελέσει σημαντικό δείκτη των όγκων που ανταποκρίνονται στα E. Κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, εμφανίζεται αργά στην παραγωγική φάση και ελαττώνεται μετά την ωορρηξία επηρεάζοντας πιθανότατα διάφορες λειτουργίες (Ciocca et al., 1983).

Η 52K πιστεύεται ότι δρα σαν μιτογόνο παράγοντας των MCF-7 κυττάρων σε καλλιέργειες, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι τα E διεγείρουν την ανάπτυξη



των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω αυτής, ίσως σε συνδυασμό με κάποιες άλλες πρωτεΐνες οι οποίες δρουν σαν αυτοκρινείς και πιθανώς παρακρινείς παράγοντες (Vignon et al., 1986).

Παράδειγμα κατασταλτικής επίδρασης των E είναι η IL-6 που παράγεται από τους οστεοβλάστες και από τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών. Σ' αυτή την περίπτωση, τα E ελαττώνουν την παραγωγή της IL-6, γι' αυτό και παρατηρείται αύξηση της ιντερλευκίνης μετά από αφαίρεση των ωοθηκών (Bellido et al., 1993).

A.4.1. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Ο κύριος ρόλος του υποδοχέα των οιστρογόνων (ESR) είναι η ρύθμιση της οιστρογονικής δράσης στα κύτταρα στόχους. Αυτό επιτυγχάνεται προάγοντας (ή καταστέλλοντας) την μετάφραση των γονιδίων των εξαρτώμενων από τα E (Yamamoto, 1985).

Πιστεύεται επίσης ότι είναι ένας ποσοτικός αυτοκρινής ρυθμιστής της δράσης των E στα κοκκώδη κύτταρα, καθώς ο ρόλος τους στην παραγωγή των κοκκωδών φαίνεται να είναι ζωτικός: παροχή εξωγενών E σε ανώριμα θηλυκά ποντίκια μετά από υποφυσεκτομή, έδειξε ότι τα E διεγείρουν την αύξηση της συγκέντρωσής τους στα κοκκώδη κύτταρα (Richards, 1975). Δεν είναι ακόμη γνωστό, αν αυτή η δράση των E αντικατοπτρίζει καινούργια σύνθεση υποδοχέων ή σχετίζεται με την αντιατρητική δράση των E.

Παροχή αναστολέως του υποδοχέα, (π.χ. Tamoxifen), κατά την μετωρρηκτική περίοδο, παρεμποδίζει την εγκυμοσύνη στα ποντίκια. Αν δοθεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ελαττώνεται η διάρκεια της κύησης και ο αριθμός των γεννήσεων (Lehger et al., 1990).

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τέλος, είναι ένας ικανός ρυθμιστής της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ιστού της μήτρας και βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην πλειοψηφία των πρωτογενών καρκίνων του μαστού, (μπορεί μάλιστα να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός παράγοντας).

Ένας αριθμός από πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις του υποδοχέα έχουν περιγραφεί και η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου του υποδοχέα έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του μαστού, τις καθ' ἑξιν εκτρώσεις, οστεοπόρωση



και αντίσταση στην οιστρογονική θεραπεία (Fuqua et al., 1993; Lehrer et al., 1993; Sano et al., 1995; Yaich et al., 1992; Taylor et al., 1992; Castagnoli et al., 1987; Andersen et al., 1994; Tora et al., 1989; Wolf and Jordan, 1994; Smith et al., 1994).

A.4.2. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Έχει ήδη αποδειχθεί ότι τα Ε συμβάλλουν στη δημιουργία και ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, συχνά μάλιστα φαίνεται ότι μερικοί καρκίνοι εξαρτώνται από τα Ε για να αναπτυχθούν. Γι' αυτό και ένας τρόπος αντιμετώπισης της νόσου είναι να περιοριστούν τα Ε, ή και να κατασταλούν τελείως από τον οργανισμό. Αυτό επιτυγχάνεται παρέχοντας ουσίες που δεσμεύουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων με αποτέλεσμα να περιορίζεται η δράση των Ε και να σταματά η εξέλιξη του όγκου (Osborn et al., 1996). Η απόσυρση των Ε από τον οργανισμό έχει το μειονέκτημα ότι προάγει την απόπτωση, πιθανώς μειώνοντας την παραγωγή και έκφραση του bcl-2, ο οποίος είναι ένας αναστολέας της απόπτωσης που ρυθμίζεται από τα Ε. Ήδη μελετώνται διάφοροι αντιοιστρογονικοί παράγοντες που να έχουν μεν κατασταλτική δράση στα Ε όσον αφορά τον όγκο, να μην αναστέλλουν όμως την δράση των Ε στα άλλα κύτταρα στόχους.

Το γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων (ESRG) είναι ένα από τα υποψήφια γονίδια για ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού καθώς και των ωοθηκών. Είναι ενδεικτικό ότι έχει βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες στην πλειοψηφία των πρωτογενών καρκίνων μαστού. Η ύπαρξη των ESR πάνω από ένα ορισμένο ποσοστό χρησιμοποιείται σήμερα σαν προγνωστικός δείκτης για την ανταπόκριση του οργανισμού σε ενδοκρινή θεραπεία (Schmutzler et al., 1991). Πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις του γονιδίου φαίνεται πως έχουν άμεση σχέση με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού (Lehrer et al., 1990, Lehrer et al., 1993, Andersen et al., 1994).



A.4.3. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Είναι πια ευρέως γνωστό ότι η ανεπάρκεια των Ε οδηγεί σε οστεοπόρωση τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ειδικότερα, από το 1988 που αποκαλύφθηκε ότι όχι μόνον οι οστεοβλάστες, αλλά και οι οστεοκλάστες φέρουν υποδοχείς οιστρογόνων, επιβεβαιώθηκε ότι τα Ε επιδρούν άμεσα στον μεταβολισμό των οστών.

Μελέτες πάνω σε δίδυμα (Slemenda 1991), έδειξαν ότι η ποσότητα της οστικής μάζας είναι κληρονομικός χαρακτήρας. Πιθανότατα λοιπόν, και η ετερογένεια του μεταβολισμού των οστών να οφείλεται σε γενετική ποικιλομορφία.

Μελέτες πάνω σε «knock out» ποντίκια, (ποντίκια δηλαδή που φέρουν μεταλλάξεις που καταλήγουν σε κωδικόνιο λήξης απενεργοποιώντας τον υποδοχέα), έδειξαν ότι η οστική πυκνότητα των «knock out» ποντικών είναι κατά 20-25% χαμηλότερη από τον φυσιολογικό τύπο (Kogach et al., 1994).

Ενδεικτικό της σημασίας του ESR για το σκελετικό σύστημα είναι μια μετάλλαξη του υποδοχέα των οιστρογόνων (C→T στο κωδικόνιο 157) που βρέθηκε σε άνδρα 28 ετών, η οποία σε ετεροζυγωτία είχε επικρατούσα έκφραση στο φαινότυπο, προσδίδοντας βαριάς μορφής οστεοπόρωση, αντίσταση στα Ε και αυξημένη οστική απορρόφηση (Sano et al., 1995).

Θα ήταν χρήσιμο να συσχετιστεί ο ESR με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR), καθώς και οι δύο υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των οστών. Ήδη, από μια προοπτική μελέτη που έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (Πρώτο βραβείο στο 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας σαν προφορική ανακοίνωση, Γεωργίου και συν., 1997), φαίνεται ότι ο συνδυασμός των δύο μειονεκτικών υποδοχέων, του ESR και του VDR, έχει εμφανή επίπτωση στο σκελετικό σύστημα του πληθυσμού μελέτης, δίνοντας υψηλότερες τιμές οστεοκαλσίνης και χαμηλότερες οστικής πυκνότητας, επομένως έντονη προδιάθεση για οστεοπόρωση.



A.5. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

A.5.1. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Κατά την θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η απάντηση των ωοθηκών στην διέγερση με γοναδοτροπίνες παρουσιάζει ποικιλότητα ως προς τον αριθμό των ωοθυλακίων που ωριμάζουν κάθε φορά καθώς και ως προς τον αριθμό των ωαρίων που λαμβάνονται κατά την ωοληψία. Η πιθανότητα ότι η διαφορετική απόκριση οφείλεται στην ποικιλότητα έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων, λόγω μεταλλάξεων, πολυμορφισμών κ.λ.π., δεν έχει ακόμα ερευνηθεί.

Όπως έχει ήδη λεχθεί, η καλή κατάσταση του υποδοχέα είναι ένας παράγοντας καθοριστικός για την αποτελεσματικότητα της δράσης της ορμόνης. Είναι επίσης γνωστό ότι οι πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την σταθερότητα και την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιούν, μέσω της δράσης τους στην πρωτεΐνη που παράγεται. Όσον αφορά τους ESR, έχει βρεθεί από εργασίες που έχουν γίνει, ότι διάφοροι πολυμορφισμοί τους σχετίζονται με προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, καθ' ἕξιν εκτρώσεις, οστεοπόρωση κ.λ.π. Επί πλέον ο ESR συμμετέχει στη γονιδιακή ρύθμιση κρίσιμων ιστοειδικών γονιδίων του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και σχηματίζει ετεροδιμερή με υποδοχείς άλλων ορμονών, όπως, για παράδειγμα, με τον υποδοχέα της βιταμίνης D.

Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα είναι καινούργιο πεδίο έρευνας και δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που να συσχετίζουν πολυμορφισμούς με νοσήματα. Πολυμορφισμοί που έχουν εντοπιστεί είναι ο PvuII (στο εσώνιο 1), ο BstUI (στο εξώνιο 1), ο XbaI (στα εξώνια 2 και 5), ο StyI (στο εξώνιο 2), ο AluI (στο εξώνιο 3), ο Hind III (στο εξώνιο 4) κ.λ.π.

Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τρεις πολυμορφισμοί του υποδοχέα, ο πολυμορφισμός PvuII (που μελετήθηκε σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού), η σιωπηλή μετάλλαξη BstUI (που μελετήθηκε κι' αυτή σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού καθώς επίσης και με το φαινόμενο των καθ' ἕξιν εκτρώσεων), και η μικροδορυφορική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία TA (που συσχετίστηκε με οστεοπόρωση).

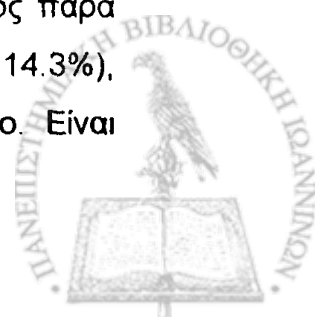


A.5.2. ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΓΝΩΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ PvuII

Ο πολυμορφισμός αυτός μελετήθηκε κυρίως στον καρκίνο του μαστού (Andersen et al., 1994, Yaich et al., 1992). Βρίσκεται στο εσώνιο 1, στις 0.4 κιλοβάσεις πάνω από το εξώνιο 2, και είναι μια γονιδιακή μετάλλαξη T→C στην 5^η θέση της αλληλουχίας (restriction site) CAGCTG. Η θέση του στο εσώνιο περιορίζει την επίδραση του στην έκφραση του ESR, εν τούτοις δεν μπορούμε να αγνοήσουμε την πιθανότητα να συνδέεται με άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου οι οποίες έχουν επίδραση στον υποδοχέα. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την ανάμειξη του PvuII στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Ο Hill αναφέρει ότι στον πληθυσμό που μελέτησε βρήκε μεγάλο ποσοστό ESR αρνητικών όγκων να σχετίζονται με ένα από τα δύο αλληλόμορφα του PvuII. Αντίθετα ο Yaich αναφέρει ότι δεν βρήκε στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δύο αλληλόμορφα του PvuII συγκρίνοντας τον δικό του πληθυσμό με έναν πληθυσμό ελέγχου, και ο Andersen συμφωνεί με τον Yaich και συμπληρώνει ότι εντοπίζει στατιστική διαφορά μόνο σε ασθενείς με πρωτογενείς όγκους αρνητικούς ως προς τους υποδοχείς της προγεστερόνης (οι οποίοι ως γνωστόν βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο των E). Το θέμα βέβαια πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο. Η συχνότητά του στον πληθυσμό είναι μεγάλη.

A.5.3. ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΓΝΩΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ BstUI

Βρίσκεται στο εξώνιο 1, στο αμινο-τελικό άκρο της B-περιοχής του γονιδίου του υποδοχέα (είναι η περιοχή που προάγει την μετάφραση των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων). Περιλαμβάνει δύο γειτονικές σημειακές μεταλλάξεις, μία στο κωδικόνιο 86 (από αλανίνη σε βαλίνη, που είναι επίσης υδρόφοβο αμινοξύ) και μια σιωπηλή μετάλλαξη (η αλλαγή της βάσης δεν αλλάζει το αμινοξύ), στο κωδικόνιο 87 (Andersen et al., 1994, Schmutzler et al., 1991, Lehrer et al., 1993, Lehrer et al., 1990). Καθώς δεν επιφέρει αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων, αντιμετωπίζεται σαν πολυμορφισμός παρά σαν μετάλλαξη. Έχει πολύ χαμηλή συχνότητα στον γενικό πληθυσμό (14.3%), πράγμα που υποδεικνύει ότι δεν είναι ένα απλό υπερέχον γονίδιο. Είναι



ενδεικτικό ότι σε πληθυσμό γυναικών άνω των 50 ετών με γενικά καλή υγεία και ιστορικό χωρίς γυναικολογικά προβλήματα ή καρκίνους, το ποσοστό κατέβηκε στο 9.4%. Βρέθηκε ότι γυναίκες με όγκους θετικούς ως προς τον ESR, που έφεραν την μετάλλαξη αυτή, παρουσίαζαν αυξημένο ποσοστό καθ' έξιν εκτρώσεων. Αυτό υποδεικνύει ότι αυτή η μορφή του γονιδίου σχετίζεται με διαφοροποιημένη λειτουργία του. Επίσης βρέθηκε ότι η παρουσία του σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα ESR στον όγκο. Περίπου 70% των γυναικών ESR+ που φέρουν το αλληλόμορφο παρουσίασαν καθ' έξιν εκτρώσεις. Δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στις πλήρεις εγκυμοσύνες ανά γυναίκα.

A.5.4. ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΓΝΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ (TA)_η.

Είναι ένας μικροδορυφόρος που βρίσκεται 1174 ζεύγη βάσεων πάνω από το εξώνιο 1, στην γενωμική περιοχή του γονιδίου του υποδοχέα.

Εχει μελετηθεί από τον Sano σε σχέση με την οστεοπόρωση (Sano et al., 1995), σε μια συγκριτική μελέτη ανάμεσα στον αριθμό των επαναλήψεων των TA και σε βιοχημικούς δείκτες μεταβολισμού των οστών (οστική πυκνότητα, οστεοκαλσίνη, ουρική πυριδινολίνη, ουρική δεοξυπυριδινολίνη). Βρέθηκε ότι ένας συγκεκριμένος γονότυπος των TA, αυτός με τις 12 επαναλήψεις, επιφέρει χαμηλότερη οστική πυκνότητα (στη σπονδυλική στήλη αλλά και σε όλο το σώμα) και υψηλότερους βιοχημικούς δείκτες, και επομένως προκαλεί αύξηση στην απώλεια οστικής μάζας καθώς και στην οστική απορροφητικότητα (resorption) μετά την εμμηνόπαυση. Η οστική μάζα είναι κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό σύμφωνα με μελέτες που έγιναν πάνω σε δίδυμα (Slomenda 1991), επομένως η ποσότητά της καθώς και η ετερογένεια του μεταβολισμού των οστών να οφείλεται εν μέρει στην γενετική ποικιλομορφία του ESR.

Η διαφορά στον οστικό μεταβολισμό σε σχέση με το (TA)₁₂, υποδεικνύει διαφορά στον τρόπο απόκρισης του ESR σε ορμονική διέγερση, γι' αυτόν τον λόγο ο πολυμορφισμός αυτός συμπεριλήφθη στη μελέτη.



A.6. ΣΚΟΠΟΣ

Οι μέχρι σήμερα μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει γενετική σύνδεση ανάμεσα στα ανθρώπινα νοσήματα και στα γονίδια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το γονίδιο του υποδοχέα AT₁ της αγγειοτενσίνης που συνδέεται με την υπέρταση και το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D που συνδέεται με την οστεοπόρωση. Παρά το ότι τα περισσότερα κληρονομούμενα χαρακτηριστικά είναι πολυπαραγοντικά, επηρεάζονται δηλαδή από περισσότερα του ενός γονίδια, η απόδειξη της γενετικής σύνδεσης ενός γονιδίου με ένα συγκεκριμένο νόσημα καθιστά το γονίδιο υποψήφιο αιτιολογικό παράγοντα της νόσου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης των οιστρογόνων και των υποδοχέων τους στην ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων μετά από διέγερση των ωοθηκών με γοναδοτροπίνες για Εξωσωματική Γονιμοποίηση και Εμβρυομεταφορά.

Η διερεύνηση του γονιδίου του υποδοχέα και η συσχέτιση της γενετικής ποικιλομορφίας του με την ωρίμανση των ωοθυλακίων είναι ενδεικτική και για την προδιάθεση στην υπογονιμότητα. Κατ' επέκταση, στη μελέτη θα διερευνηθεί και ο ρόλος του ESR στη στειρώση.

Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου με γονιδιακή ανάλυση σημειακών και μικροδορυφορικών πολυμορφισμών και θα συγκριθούν οι συχνότητες των αλληλόμορφων, των απλοτύπων και των γονοτύπων τους στον πληθυσμό των γυναικών της ομάδας μελέτης καθώς και στον γενικό πληθυσμό. Επίσης θα διερευνηθεί η ύπαρξη γενετικής σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών και θα αξιολογηθεί η παρουσία τους σαν διαγνωστικός παράγοντας στην εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης για γονιμότητα.

Γενικότερα, σκοπός της μελέτης είναι η συμβολή στην βαθύτερη κατανόηση της λειτουργικότητας του υποδοχέα, ώστε να διευκρινιστεί από την πλευρά της γενετικής η συμμετοχή των υποδοχέων των οιστρογόνων στην ωρίμανση των ωοθυλακίων.



B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



B.1. ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της έρευνας αποτελείται από δύο πληθυσμούς γυναικών, τον πληθυσμό μελέτης, που είναι γυναίκες με πρόβλημα υπογονιμότητας, στις οποίες ερευνάται η επίδραση της παρουσίας των πολυμορφισμών που επιλέχθηκαν, και τον πληθυσμό ελέγχου που θα χρησιμεύσει σαν βάση για να γίνουν οι στατιστικές συγκρίσεις.

α) Πληθυσμός μελέτης: Περιλαμβάνει 100 γυναίκες 25-40 ετών που υπεβλήθησαν σε διαδικασία Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF) και Εμβρυομεταφοράς (ΕΤ) στο Κέντρο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του νοσοκομείου Ιωαννίνων. Οι γυναίκες συμμετείχαν στο πρόγραμμα για δύο τουλάχιστον κύκλους ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο βαθμός ποικιλομορφίας απόκρισης των ωοθηκών. Περιπτώσεις με ενδομητρίωση, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCO), και μονήρη ωοθήκη αποκλείστηκαν από την μελέτη. Συμπληρωματικά, περιπτώσεις που παρουσιάζουν περισσότερο από 50% απόκλιση στον αριθμό ωοθυλακίων και ωαρίων ανάμεσα στους δύο κύκλους αποκλείστηκαν επίσης, καθώς και όσες είχαν φτωχή ανταπόκριση στις γοναδοτροπίνες ή, αντίθετα, υπερδιέγερση ωοθηκών. Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν μόνο γυναίκες με ανεξήγητη στειρώση ή σαλπιγγικό παράγοντα. Όλες είχαν φυσιολογική εμμηνορρυσία και ήταν υγιείς.

β) Πληθυσμός ελέγχου: Περιλαμβάνει 100 γυναίκες μεταξύ 20-35 ετών, με φυσιολογικό κύκλο έμμηνου ρήσης και καλή υγεία. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν να έχουν ένα τουλάχιστον παιδί, σαν επιβεβαίωση της γονιμότητάς τους. Η επιλογή τους ήταν τυχαία, από τις λεχωίδες της Μαιευτικής Κλινικής.

Και οι δύο πληθυσμοί προέρχονται από την Βορειοδυτική Ελλάδα για τη διατήρηση της ομοιογένειας στις ομάδες μελέτης μας όσον αφορά την κληρονομικότητα του γενετικού υλικού, και για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας στην σύγκριση των αποτελεσμάτων.



B.2. ΜΕΘΟΔΟΣ

Το ειδικό μέρος της μελέτης αποτελείται από δύο σκέλη:

1. Το κλινικό μέρος. Οι γυναίκες του πληθυσμού μελέτης υποβάλλονται σε δύο τουλάχιστον κύκλους Εξωσωματικής Γονιμοποίησης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

α) Διέγερση ωοθηκών με το Πρωτόκολλο Πολλαπλής Ωοθυλακιορρηξίας για την ταυτόχρονη ωρίμανση πολλών ωοθυλακίων.

β) Αναρρόφηση των ώριμων ωοθυλακίων και συλλογή των ωαρίων την μέρα της ωοληψίας.

γ) Γονιμοποίηση των ωαρίων με επαρκή ποσότητα αποδεδειγμένα γόνιμου σπέρματος.

δ) Εμβρυομεταφορά.

ε) Πιστοποίηση κύησης στις 14 ημέρες από την μέρα της εμβρυομεταφοράς, με μέτρηση της hCG και υπερηχογραφική εξέταση.

Ο αριθμός των αναρροφούμενων ωοθυλακίων, όπως και ο αριθμός των ωαρίων που συλλέγονται, καταγράφονται σε κάθε κύκλο και υπολογίζεται ο λόγος τους. Ο λόγος των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τον αριθμό των λαμβανόμενων ωαρίων ορίζεται ως "δείκτης απόκρισης" των ωοθηκών και αντικατοπτρίζει την δυνατότητα πρόσληψης φυσιολογικής ποσότητας γοναδοτροπινών και επομένως την φυσιολογική ωρίμανσή τους. Αν η ωρίμανση των ωοθυλακίων εξελίχθηκε φυσιολογικά, ο λόγος αυτός θα είναι ίσος (ή σχεδόν ίσος) με τη μονάδα. Όταν ο λόγος είναι μεγαλύτερος της μονάδας, (τα ωάρια δηλαδή που συλλέχθηκαν είναι λιγότερα από τα ωοθυλάκια που αναρροφήθηκαν), επισημαίνει την ύπαρξη ενός αριθμού ωοθυλακίων που δεν αναπτύχθηκαν φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της διέγερσης, πιθανότατα λόγω κακής πρόσληψης γοναδοτροπινών, με αποτέλεσμα να εκφυλισθούν σε κυστικά - ατρητικά ωοθυλάκια.

Ο αριθμός των αναρροφούμενων ωοθυλακίων, ο αριθμός των λαμβανομένων ωαρίων και ο λόγος αυτών (ο δείκτης απόκρισης των ωοθηκών), καθώς και ο αριθμός των κυήσεων θα χρησιμεύσουν σαν παράμετροι σύγκρισης των αποτελεσμάτων.



Συμπληρωματικά, καταγράφηκε η ποσότητα της hMG που δόθηκε για τη διέγερση των ωοθηκών, καθώς και η διάρκεια παροχής της. Τέλος, το πάχος του ενδομητρίου μετρήθηκε την μέρα της hCG, και δόθηκε κι αυτό για στατιστική ανάλυση.

2. Το εργαστηριακό μέρος. Την μέρα της συλλογής των ωαρίων γίνεται λήψη περιφερικού αίματος από τις γυναίκες, για μοριακή ανάλυση του γενετικού υλικού τους και εντοπισμό των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ESR.

Η γενετική ανάλυση περιλαμβάνει:

- α) Εξαγωγή DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος.
 - β) Πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων τμημάτων του DNA που περιέχουν τους πολυμορφισμούς της μελέτης, με την μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR).
 - γ) Πέψη με περιοριστικό ένζυμο.
 - δ) Ανίχνευση των πολυμορφισμών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.
- Σ' αυτό το στάδιο καταγράφονται οι γονότυποι καθώς και οι απλότυποι των γυναικών ως προς τους πολυμορφισμούς και κατατάσσονται σε ομάδες.

Η ομαδοποίηση των γονότυπων και των απλοτύπων, καθώς και των αλληλομόρφων ως προς τους πολυμορφισμούς, δίνει τις άλλες παραμέτρους για τις στατιστικές μελέτες.

Οι γυναίκες του πληθυσμού ελέγχου δεν συμμετέχουν σε πρόγραμμα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης και χρησιμεύουν μόνο για να οριστεί η «φυσιολογική» συχνότητα των πολυμορφισμών, μετρώντας την σε πληθυσμό της ίδιας περιοχής που δεν παρουσιάζει πρόβλημα υπογονιμότητας.

Όλο το κλινικό μέρος, από την υπερηχογραφική εξέταση των ωοθυλακίων μέχρι την αναρρόφηση και συλλογή των ωαρίων τη μέρα της ωοληψίας, καθώς και όλο το εργαστηριακό μέρος, από την ανάλυση του DNA μέχρι την εύρεση και ομαδοποίηση των πολυμορφισμών, διεξήχθη από τα ίδια άτομα για τον περιορισμό απόκλισης των αποτελεσμάτων λόγω του προσωπικού παράγοντα.



B.2.1. ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ

Σε όλες τις γυναίκες που συμμετείχαν στο πρόγραμμα εφαρμόστηκε το κλασσικό, «μακρύ πρωτόκολλο», γιατί αποδεδειγμένα έχει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ποιότητα των λαμβανόμενων ωαρίων (Λώλης, 1995).

Η διαδικασία αρχίζει την πρώτη μέρα της επόμενης εμμήνου ρήσεως, με παροχή αναλόγων των γοναδοτροπινών για την παύση του φυσιολογικού κύκλου, μέχρις ότου τα οιστρογόνα του αίματος πέσουν στα 30 pg/ml οπότε ξεκινά ο διεγερμένος κύκλος πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Ο τεχνητός κύκλος διέγερσης των ωοθηκών επιτυγχάνεται με παροχή εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (hMG), μέχρις ότου τρία τουλάχιστον ωοθυλάκια υπερβούν τα 18 mm στον υπέρηχο, και η στάθμη της οιστραδιόλης στο αίμα ξεπεράσει τα 200 pg/ml/ωοθυλάκιο. Τότε χορηγείται χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) για την ωρίμανση των ωαρίων, και 36 ώρες μετά, γίνεται η ωοληψία.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ

Πριν ξεκινήσει η διέγερση των ωοθηκών γίνεται ένα κολπικό υπερηχογράφημα για τον αποκλεισμό ύπαρξης κύστης. Περιπτώσεις με κυστικά μορφώματα διαμέτρου > 12mm αποκλείονται.

GnRH ανάλογο: Έναρξη χορήγησης την πρώτη μέρα της εμμήνου ρήσεως. Το ανάλογο ενεργεί σαν ισχυρό ανασταλτικό της παραγωγής γοναδοτροφινών από τον οργανισμό, και λαμβάνεται σταθερά σε όλη την διάρκεια της θεραπείας. Δίνεται με την μορφή ενέσεων (μία εφάπαξ υποδόρια ένεση ημερησίως). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ενέσεις οξικής λευπρολίδης (Dagonda 2.8ml), παρέχοντας υποδορίως 20 μονάδες, σε σύριγγα ινσουλίνης των 100 μονάδων, καθημερινά. Την 14^η μέρα από την έναρξη λήψης του ανάλογου γίνεται μέτρηση της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος. Αν τα επίπεδα της οιστραδιόλης E₂ είναι κάτω από 30 pg/ml (100 pmol/l), αρχίζει η ενδομυϊκή χορήγηση της hMG (μέρα 1). Στο 20% των



περιπτώσεων χρειάστηκε η επιπλέον χορήγηση της οξικής λευπρολίδης για μία ακόμη βδομάδα.

hMG: (Pergonal 75IU, Humegon 75IU). Κι' αυτό το φάρμακο είναι ενέσιμο. Περιέχει τις ίδιες ορμόνες που παράγει φυσιολογικά η υπόφυση του εγκεφάλου προκειμένου να διεγερθούν οι ωοθήκες και να ξεκινήσει η ωρίμανση των ωαρίων. Στην εξωσωματική γονιμοποίηση, για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, η σταθερή ημερήσια δόση είναι 3 αμπούλες της hMG (225 IU) καθημερινά. Χορηγείται ενδομυϊκά.

hCG: (Pregnyl 5000 IU, Profasi 5000 IU). Η ένεση αυτή γίνεται για την ωρίμανση των ωαρίων και μοιάζει με την ορμόνη LH που εκκρίνεται στη μέση ενός φυσιολογικού κύκλου, 36 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία. Χορηγείται σε εφάπαξ ενδομυϊκή δόση των 5000 μονάδων. Κριτήρια χορήγησης είναι η ύπαρξη τριών τουλάχιστον ωοθυλακίων > 18 mm και η στάθμη της E_2 στο αίμα > 200 pg/ml/ωοθυλάκιο. Πριν την χορήγηση της hCG λαμβάνεται δείγμα αίματος για μέτρηση των E_2 , LH, και P_4 .

Υπερηχογραφήματα: Έναρξη την μέρα 8 από την έναρξη χορήγησης της hMG, και στη συνέχεια ανά δύο μέρες, ή καθημερινά, ανάλογα με τον αριθμό και το μέγεθος των ωοθυλακίων που αναπτύσσονται.



ΩΟΛΗΨΙΑ

Μετά την πάροδο 36 ωρών από την χορήγηση της hCG, ορίζεται η μέρα και ώρα της ωοληψίας.

Η λήψη των ωαρίων γίνεται από τον υπεύθυνο ιατρό, με τη βοήθεια του κολπικού υπέρηχου (CAPASEE, TOSHIBA) και βελόνας των 32 cm (IVF needle, ROCKET MEDICAL).

Τα ωοθυλάκια αναρροφώνται από την ωοθήκη με την συσκευή αναρρόφησης (ROCKET), και τα ωάρια μαζί με το ωοθυλακικό υγρό τους μεταφέρονται μέσω της βελόνας, με ειδική σύνδεση, σε σωλήνες των 10 ml (Sterile Tube, CORNING), και δίνονται στο υπεύθυνο βιολόγο για τον εντοπισμό τους.

Μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, (Lamin Air, HOLTEN), το περιεχόμενο των σωλήνων μεταφέρεται προσεκτικά σε ειδικά τριβλία διαμέτρου 60 mm (Tissue Culture Dish, CORNING), και τα ωάρια εντοπίζονται και απομονώνονται από το ωοθυλακικό υγρό τους, με την χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου (NIKON).

Στη συνέχεια, με πιπέττες Pasteur, τα ωάρια μεταφέρονται σε καλλιεργητικό υλικό (IVF culture medium, MEDICULT), και φυλάσσονται σε κλίβανο επώασης (Incubator, NAPCO), ρυθμισμένο στις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας των ωαρίων (θερμοκρασία 37°C και σύσταση αέρα 5% σε διοξείδιο του άνθρακα).

Επακολουθεί Γονιμοποίηση με ικανό αριθμό σπερματοζωαρίων από γόνιμο σπέρμα και μετά από 48 ώρες, Εμβρυομεταφορά του σχηματισθέντος προεμβρύου.

Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας τηρείται υψηλός βαθμός καθαριότητας στις συσκευές καθώς και στο προσωπικό που συμμετέχει, και αποστείρωσης στα υλικά που χρησιμοποιούνται.

Εδώ γίνεται και η καταγραφή του αριθμού των ωοθυλακίων που αναρροφούνται καθώς και του αριθμού των ωαρίων που εντοπίζονται στο μικροσκόπιο και υπολογίζεται ο λόγος τους.



B.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Δείγματα περιφερικού αίματος, λαμβάνονται από όλες τις γυναίκες του πληθυσμού μελέτης καθώς και από εκείνες του πληθυσμού ελέγχου, για εξαγωγή DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Τα τμήματα του γονιδίου που περιέχουν τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς PvuII, BstUI και (TA)_n πολλαπλασιάζονται με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR amplification) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Yaich et al. (1992) για τον πολυμορφισμό PvuII, Andersen et al. (1994) για τον πολυμορφισμό BstUI και Sano et al., (1995) για τον μικροδορυφορικό πολυμορφισμό (TA)_n.

Το προϊόν πολλαπλασιασμού των πολυμορφισμών PvuII και BstUI, πέπτεται με περιοριστικά ένζυμα για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών στα πολυμερισμένα τμήματα του DNA. Η πέψη γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών των περιοριστικών ενζύμων για την επίτευξη της πλήρους δράσης τους, η οποία εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και την τελική σύσταση του διαλύματος όπου γίνεται η αντίδραση. Ο (TA)_n πολυμορφισμός δεν υποβάλλεται σε πέψη ενζύμου.

Οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για τους πολυμορφισμούς PvuII και BstUI, ενώ ο (TA)_n πολυμορφισμός σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Το προϊόν της ηλεκτροφόρησης συγκρίνεται με γνωστό δείκτη (marker), υπολογίζοντας τα Μοριακά Βάρη ανάλογα με την κινητικότητά τους στο πήγμα, και γίνεται η διάγνωση της πέψης του ενζύμου (κατά προέκταση, της παρουσίας, ή μη, του πολυμορφισμού) όσον αφορά τους πολυμορφισμούς PvuII και BstUI, και η μέτρηση των επαναλήψεων TA όσον αφορά τον (TA)_n πολυμορφισμό.

Τα δείγματα κατατάσσονται σε ομάδες για τις στατιστικές συγκρίσεις.



B.2.2.1. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA

Το προς μελέτη γενετικό υλικό λαμβάνεται από περιφερικό αίμα (2.5 ml αίμα σε αντιπηκτικό EDTA), για την απομόνωση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Πειραματική διαδικασία

Από κάθε δείγμα λαμβάνεται 1 ml αίματος σε ειδικά σωληνάρια (erppendorf) των 2 ml, και προστίθεται διάλυμα TKM, και απορρυπαντικό NP-40, για την λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ακολουθούν πλύσεις του δείγματος με TKM, μέχρι της πλήρους απομάκρυνσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το ίζημα.

Στο ίζημα προστίθενται TKM και SDS, για να γίνει η λύση των μεμβρανών των λευκών αιμοσφαιρίων με επώαση στους 55 °C για πέντε λεπτά, και στη συνέχεια, κεκορεσμένο διάλυμα NaCl για να κατακρημνισθούν οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση.

Το ίζημα απομακρύνεται και στο υπερκείμενο προστίθεται απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (EtOH) θερμοκρασίας -20°C, για να απομακρυνθούν τα μόρια του νερού από το μόριο του DNA.

Το καθαρό πλέον DNA διαλύεται σε TE, ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 200-400 ng/μl.

Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες ώστε να γίνει πλήρης και ομοιόμορφη διάλυση του DNA στο TE.

Φυλάσσεται στους 4°C.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

TKM: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM KCl, 2 mM EDTA και 4 mM MgCl₂.

NP-40: Nonylphenoxy Polyethoxy Ethanol (Sigma).

SDS: Sodium dodecyl sulfate, 10% (Sigma).

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) και 1 mM EDTA (pH 8.0).



B.2.2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR AMPLIFICATION)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι η τεχνική με την οποία μπορούμε να αποκτήσουμε πολλά αντίγραφα τμήματος του μορίου του DNA χρησιμοποιώντας πολύ μικρή ποσότητα υποστρώματος. Η αντίδραση στηρίζεται στην χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase), που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, και που επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών χωρίς να μετουσιώνεται.

Η αντίδραση γίνεται σε βήματα. Αρχικά οριοθετείται το τμήμα που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί με την χρήση ειδικών εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως 15-30 βάσεων) με αλληλουχία συμπληρωματική με την μία από τις δύο αλυσίδες του DNA.

Ακολουθεί κυκλική επανάληψη τριών διαδοχικών φάσεων όπου: αποδιατάσσεται το DNA στην υψηλή θερμοκρασία (ανοίγουν οι κλώνοι του), γίνεται η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA και τέλος, με εκμαγείο τις μονές αλυσίδες του DNA και υλικό τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που υπάρχουν στο διάλυμα της αντίδρασης, συντίθεται το τμήμα του DNA που ζητείται, βασιζόμενο στην επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών. Το προϊόν που προκύπτει από τον κύκλο αυτόν είναι ένα δίκλωνο, μικρό τμήμα DNA, που τα άκρα του καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών.

Η επανάληψη αυτού του κύκλου αυξάνει την συγκέντρωση των νέων μορίων εκθετικά. Στο τέλος της αντίδρασης, η περιεκτικότητα του τμήματος αυτού στο διάλυμα είναι πολύ μεγάλη.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή QUATRO TC-40 (QUATRO BIOSYSTEM Ltd, UK).



Πειραματική διαδικασία

Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης γίνεται ένα μείγμα που αποτελείται από τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Παρέχεται από την προμηθευτική εταιρία μαζί με την DNA πολυμεράση.

Ιόντα μαγνησίου, σε συγκεκριμένη ποσότητα, για την αποτελεσματικότερη δράση του ενζύμου. Η βέλτιστη ποσότητα των ιόντων στο μείγμα, βρίσκεται με τιτλοποίηση.

Τους δυο εκκινήτες (primers) για την οριοθέτηση του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

Δεοξυριβονουκλεοτίδια (d ATP, d TTP, d CTP, d GTP), για υλικό δόμησης των νέων τμημάτων του DNA (PROMEGA).

DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) σαν ένζυμο πολυμερισμού (Gibco BRL).

Το προς ανάλυση γενομικό DNA.

Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Στο μείγμα προστίθεται παραφινέλαιο (mineral oil) σαν επικάλυψη, για την προστασία του προϊόντος από την εξάτμιση, καθώς αυτό εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια στους 0°C, μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο, και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα.

Τα προϊόντα PCR διατηρούνται σε θερμοκρασία -20 °C.



Πρωτόκολλο πολυμερισμού του τμήματος του γενομικού DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό RvuII με τη μέθοδο PCR.

Σύνθεση της αντίδρασης και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων:

buffer : 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl

d NTP s : 0.2 mM από κάθε d NTP.

Mg⁺⁺ : 4 mM

primer P₁ : 30 pmol

primer P₂ : 30 pmol

Taq : 1.5 μονάδες

H₂O : Μέχρι τελικού όγκου 50 μl.

DNA : 200-400 ng

Προσθέτουμε δύο σταγόνες λάδι.

Αλληλουχία των εκκινητών:

P₁ : 5'- CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC -3'

P₂ : 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'

Το τμήμα του DNA που αντιγράφουν περιλαμβάνει 1300 βάσεις.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης:

Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2 λεπτά.

Ακολουθεί:

Αποδιάταξη (denaturation) 94 °C για 1 λεπτό

Επανασύνδεση (annealing) 62 °C για 1 λεπτό

Επέκταση (extension) 72 °C για 1.5 λεπτό

Η αποδιάταξη, επανασύνδεση και επέκταση επαναλαμβάνονται για 33 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο επέκτασης που είναι στους 72 °C για 10 λεπτά.



Πρωτόκολλο πολυμερισμού του τμήματος του γενομικού DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό BstUI με τη μέθοδο PCR.

Σύνθεση της αντίδρασης και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων:

buffer : 20 mM Tris HCl (p H 8.4), 50 mM KCl

d NTP s : 0.2 mM από κάθε d NTP

Mg⁺⁺ : 1.5 mM

primer B₁ : 25 pmol

primer B₂ : 25 pmol

Taq : 1.5 μονάδες (Gibco BRL)

H₂O : Μέχρι τελικού όγκου 50 μl

DNA : 200-400 ng

Προσθέτουμε λάδι.

Αλληλουχία των εκκινήτων:

B₁ : 5'-CGC GCA GGT CTA CGG TCA G-3'

B₂ : 5'-GCT GCG GCG GCG GGT GCA-3'

Το τμήμα του DNA που αντιγράφουν περιλαμβάνει 143 βάσεις.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης:

Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2 λεπτά.

Ακολουθεί:

Αποδιάταξη (denaturation) 94 °C για 1 λεπτό

Επανασύνδεση (annealing) 58 °C για 1 λεπτό

Επέκταση (extension) 72 °C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, επανασύνδεση και επέκταση επαναλαμβάνονται για 32 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο επέκτασης που είναι 10 λεπτά στους 72 °C.



Πρωτόκολλο πολυμερισμού-ενίσχυσης του τμήματος του γενωμικού DNA που περιέχει την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n με τη μέθοδο PCR.

Πριν από το μείγμα της αντίδρασης, γίνεται σήμανση του ενός από τους δύο εκκινητές με $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ και τη βοήθεια της Πολυνουκλεοτιδικής Κινάσης (ΠΚ). Η ΠΚ καταλύει τη μεταφορά μιας τελικής φωσφορικής ομάδας ATP στο 5'-OH άκρο του DNA με αποτέλεσμα τη σήμανση του εκκινητή.

Διάλυμα σήμανσης: Περιλαμβάνει 2μl ΠΚ buffer, 1μl T₁ (ο ένας από τους εκκινητές της αντίδρασης PCR που ακολουθεί), 1μl T₄ΠΚ, 2 μl $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ και 14 μl H₂O. Το μείγμα επωάζεται στους 37 °C, για 1 ώρα, πριν χρησιμοποιηθεί.

Σύνθεση της αντίδρασης και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων:

buffer : 10 mM Tris HCl (p H 8.3), 50 mM KCl

d NTP s : 0.4 mM από κάθε d NTP

Mg⁺⁺ : 1.5 mM

primer T₁ : 5 pmol

primer T₂ : 5 pmol

Taq : 1 μονάδα

gelatin : 0.001%

H₂O : Μέχρι τελικού όγκου 10 μl

DNA : 100 ng

Προσθέτουμε λάδι.

Αλληλουχία των εκκινητών:

T₁ : 5'-GACGCATGATATACTTCACC-3'

T₂ : 5'-GCAGAATCAAATATCCAGATG-3'

Το τμήμα του DNA που αντιγράφουν περιλαμβάνει 160-194 βάσεις ανάλογα με τις επαναλήψεις του δινουκλεοτιδίου TA.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης:

Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2 λεπτά.

Ακολουθεί:

Αποδιάταξη (denaturation) 94 °C για 2 λεπτά

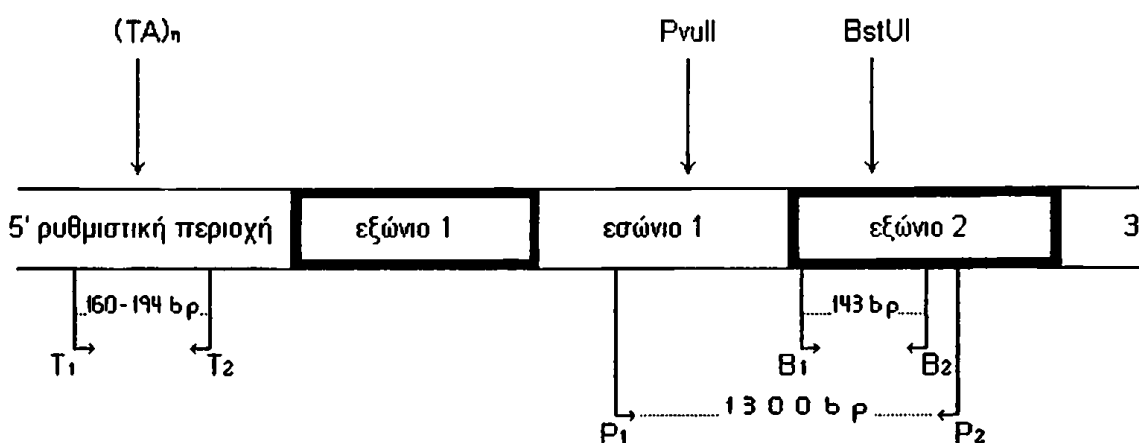


Επανασύνδεση (annealing) 58 °C για 1 λεπτό

Επέκταση (extension) 74 °C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, επανασύνδεση και επέκταση επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο επέκτασης που είναι 10 λεπτά στους 72 °C.

Σχηματική Παράσταση των πολυμορφισμών πάνω στο γονίδιο του ESR.



Σχήμα 3: Απεικονίζεται η θέση των πολυμορφισμών PvuII, BstUI και (TA)_n πάνω στο γονίδιο του υποδοχέα ESR, καθώς και των τμημάτων DNA που αντιγράφονται με την τεχνική PCR για την παρατεταμένη ανάλυση των εν λόγω πολυμορφισμών.



Β.2.2.3. ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Το προϊόν της αντίδρασης PCR πέπτεται με περιοριστικό ένζυμο, σύμφωνα με τις ειδικές συνθήκες που χρειάζεται για την πλήρη δράση του. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ενδονουκλεάσες που διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις των αλυσίδων του DNA, σε συγκεκριμένες θέσεις που τις αναγνωρίζουν λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν.

Στη διάρκεια της πέψης, το ένζυμο θα κόψει το DNA εκεί όπου υπάρχει ο πολυμορφισμός, και αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να διακρίνουμε (μέσω ηλεκτροφόρησης), αν το τμήμα του DNA φέρει ή όχι τον πολυμορφισμό. Αν το δείγμα είναι αρνητικό, θα διακρίνουμε ένα κλάσμα ενώ αν είναι θετικό, τουλάχιστον δύο.

Έτσι:

- το ένζυμο PvuII κόβει το τμήμα του DNA που αντιγράφηκε με τους εκκινητές P₁ και P₂ και που περιλαμβάνει 1300 βάσεις, σε δύο κλάσματα με 850 και 450 βάσεις. Τα κλάσματα αυτά ανιχνεύονται εύκολα σε πηκτή αγαρόζης 2%.
- Το ένζυμο BstUI κόβει σε δύο θέσεις, δίνοντας κλάσματα των 2, 54 και 87 βάσεων τα οποία ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 4%, ειδική για κλάσματα πολύ μικρού μεγέθους.
- Ο πολυμορφισμός (TA)_n, δεν υφίσταται πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Η αλληλουχία των επαναλαμβανόμενων TA ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία.

Πειραματική διαδικασία

Για την πέψη του DNA, γίνεται ένα διάλυμα που περιλαμβάνει τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Παρέχεται από την προμηθευτική εταιρία μαζί με το ένζυμο.

Ένζυμο. Η ποσότητα του ενζύμου πρέπει να είναι η κατάλληλη, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας. Το ένζυμο διατηρείται στους -20 °C καθώς είναι πολύ ευαίσθητο στην θερμοκρασία, γι' αυτό και η μεταφορά του



στο μείγμα της αντίδρασης πρέπει να γίνεται στον ελάχιστο χρόνο ώστε να μη μειωθεί η δραστηρότητά του. (N.E. Biolabs, USA).

Το προϊόν PCR που παρασκευάστηκε για την πέψη από το αντίστοιχο ένζυμο.

Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Πρωτόκολλο πέψης του τμήματος του γενωμικού DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό PvuII με το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.

Σύνθεση της αντίδρασης:

buffer : 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiotreitol
(pH 7.9)

PvuII : 3 μονάδες

Προϊόν PCR : 10 μl

H₂O : μέχρι τελικού όγκου 20 μl

Η πέψη γίνεται στους 37 °C για 2 ώρες.

Θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου PvuII πάνω στην αλληλουχία του τμήματος του DNA:

5'...CAG ^ CTG...3'

3'...GTC ^ GAC...5'

Πρωτόκολλο πέψης του τμήματος του γενωμικού DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό BstUI με το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.

Σύνθεση της αντίδρασης:

Πρωτόκολλο συνθηκών πέψης με το περιοριστικό ένζυμο:

buffer : 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiotreitol
(pH 7.9)

BstUI : 4 μονάδες

προϊόν PCR: 10 μl

H₂O : μέχρι τελικού όγκου 20 μl

Η πέψη γίνεται στους 60 °C για 2 ώρες.



Θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BstUI πάνω στην αλληλουχία του τμήματος του DNA:

5'...CG ^ CG...3'

3'...GC ^ GC...5'

B.2.2.4. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Ο διαχωρισμός των κλασμάτων του DNA για τους πολυμορφισμούς PvuII και BstUI ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, μετά την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα, έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος εντοπισμού, διαχωρισμού και προσδιορισμού τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, και βασίζεται στην αρχή ότι το μόριο του DNA παρουσιάζει αρνητικό φορτίο (φωσφορικές ρίζες), επομένως, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς τον θετικό πόλο.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE, (είναι το ίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα που θα γίνει η ηλεκτροφόρηση), και σε συγκεκριμένη πυκνότητα, (ανάλογα με τον πολυμορφισμό που θα αναλυθεί) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Το εκμαγείο της πηκτής τοποθετείται στο ψυγείο, αφού προσαρμοστεί το ειδικό κτένι για την δημιουργία των φρεατίων.

Μετά τον βρασμό, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε περιεκτικότητα 10%, και αφήνεται να κρυώσει μέχρι την θερμοκρασία των 60°C. Η διαλυμένη αγαρόζη εκχύνεται στο εκμαγείο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει. Στη συνέχεια, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου αφαιρείται το κτένι και απελευθερώνονται τα φρεάτια στα οποία θα προστεθούν τα προϊόντα πέψης των ενζύμων.



Τα δείγματα προετοιμάζονται με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης (Blue/Orange, PROMEGA), και φορτώνονται στα φρεάτια. Παράλληλα, φορτώνεται και το δείγμα του δείκτη (marker) και η ηλεκτροφόρηση αρχίζει με εφαρμογή σταθερής τάσης 80 Volt.

Όταν οι χρωστικές προχωρήσουν αρκετά, το πήγμα εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για να διαβαστούν οι ζώνες του DNA που, λόγω φθορισμού των χρωστικών είναι ευδιάκριτες, και φωτογραφίζεται.

Διάλυμα TBE (Tris-Borate): 89 mM Tris-HCL, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA pH 8.0.

Χρωστική Blue/Orange (Loading Dye 6x): 10% Ficoll 400, 0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol FF, 0.4% Orange G, 10mM Tris HCl pH 7.5, 50mM EDTA.

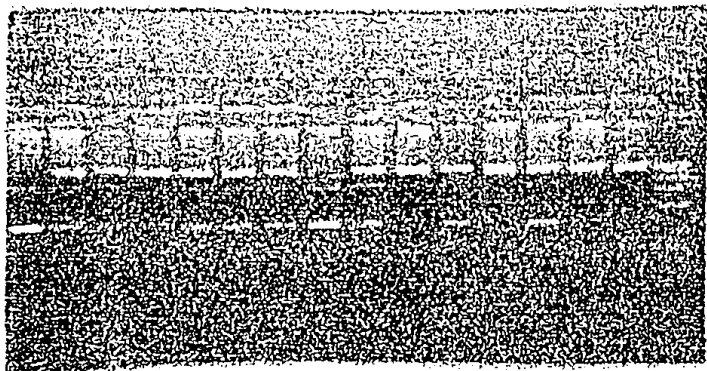
B.2.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ PvuII και BstUI.

Τα τμήματα χωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος καθώς κινούνται μέσα στην πηκτή παράλληλα προς την κίνηση του ρεύματος. Η συγκέντρωση της αгарόζης είναι 2% για το ένζυμο PvuII ενώ για το ένζυμο BstUI χρησιμοποιήθηκε 4% Metaphor αгарόζη, ειδική για μικρού μοριακού βάρους ολιγονουκλεοτίδια (MetaPhor TM, FMC, USA).

Δείκτης για τον εντοπισμό των μοριακών βαρών ήταν το πλασμίδιο ΦΧ 174/ Hae III. Η παρατήρησή των ζωνών έγινε εύκολα λόγω της χρώσης της πηκτής με το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο ενώνεται με τα τμήματα του DNA και δίνει φωτεινό σήμα όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως.



Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού PvuII



Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού BstUI



B.2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (TA)_n.

Ο πολυμορφισμός (TA)_n ανιχνεύτηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 5% που περιείχε 7M ουρία, και τα τμήματα του DNA μετρήθηκαν, μετά την ξήρανση της πηκτής, με αυτοραδιογραφία.

Πριν την ηλεκτροφόρηση, το προϊόν PCR θερμαίνεται για 3 λεπτά στους 94°C και στη συνέχεια τοποθετείται στον πάγο για 5 λεπτά ώστε να ανοίξουν οι αλυσίδες. Κατόπιν φορτώνεται σε κάθετη ηλεκτροφόρηση, σε πηκτική ακρυλαμιδίου που έχει ήδη θερμανθεί στους 50 °C, και όταν οι χρωστικές προχωρήσουν αρκετά, η πηκτική αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στεγνώσει για 1 ώρα στους 80 °C. Τοποθετείται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας για 24 ώρες και την επόμενη μέρα, αφού εμφανιστεί το φιλμ, υπολογίζεται ο αριθμός των επαναλήψεων με σύγκριση των μοριακών βαρών σε κλιμακωτό δείκτη αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (sequence ladder).



B.2.2.7. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΣΥΓΚΡΙΘΗΚΑΝ

Οι γυναίκες χωρίστηκαν σε ομάδες σύμφωνα:

Με τους γονοτύπους τους :

PP ομόζυγη θετική ως προς τον πολυμορφισμό PvuII, Pρ ετερόζυγη και ρρ ομόζυγη αρνητική (φυσιολογικός τύπος).

BB ομόζυγη θετική ως προς τον πολυμορφισμό BstUI, Bβ ετερόζυγη και ββ φυσιολογικός τύπος.

Με τους απλοτύπους τους:

P-B φέρει και τους δύο πολυμορφισμούς, P-β φέρει μόνον τον PvuII, ρ-B φέρει μόνον τον BstUI, και ρ-β φυσιολογικός τύπος.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (TA)_n, μελετήθηκε μόνο σε σχέση με τον συχνό πολυμορφισμό PvuII και έγινε ανάλυση της γενετικής σύνδεσης των αλληλόμορφων των (TA)_n με τον γονότυπο και τα αλληλόμορφα του PvuII.

Μέθοδοι στατιστικής διερεύνησης.

- Για τις στατιστικές συγκρίσεις των τιμών του αριθμού των ωοθυλακίων, αριθμού ωαρίων και του λόγου αυτών, ανάμεσα στις ομάδες IVF και ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U τεστ.
- Για τη σύγκριση των γονότυπων ESR μεταξύ των γυναικών IVF και ελέγχου καθώς και οι κλινικές εγκυμοσύνες ανάμεσα στις τρεις ομάδες γονοτύπων του πολυμορφισμού PvuII, χρησιμοποιήθηκε το Chi-square τεστ.
- Chi-square τεστ χρησιμοποιήθηκε και στη στατιστική μελέτη των γονοτυπικών ομάδων PP, Pρ και ρρ ως προς τη γενετική προδιάθεση του πληθυσμού στον πολυμορφισμό PvuII.
- Τέλος, για την σύγκριση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών TA με τους γονότυπους του πολυμορφισμού PvuII χρησιμοποιήθηκε το T-τεστ.

Το κατώτερο όριο σημαντικότητας σε όλες τις στατιστικές συγκρίσεις ήταν $p < 0.05$.



Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ

Αφού καταγράφηκαν όλες οι μετρήσεις των παραμέτρων, υπολογίστηκαν τα ποσοστά και οι συχνότητες τους στις ομάδες των γυναικών μελέτης και ελέγχου και συγκρίθηκαν μεταξύ τους σε μια στατιστική ανάλυση, δίνοντας τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Γ.1. Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων στις ομάδες.

Συγκρίθηκαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα στην ομάδα IVF και την ομάδα ελέγχου. Οι συχνότητες των PvuII θετικών (P), και αρνητικών (p) ESR αλληλομόρφων, δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα IVF και την ομάδα ελέγχου. Το ίδιο και οι συχνότητες των BstUI θετικών (B) και αρνητικών (b) αλληλομόρφων. Το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν ανευρέθησαν σε υψηλότερη συχνότητα στον πληθυσμό IVF σημαίνει ότι από μόνοι τους δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν υπογονιμότητα (Πίνακας 1).

Τα ίδια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην σύγκριση των γονοτύπων: οι συχνότητες των γονοτύπων δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις δυο ομάδες. (Πίνακας 1).

Είναι αξιοσημείωτο ότι κανένας BB γονότυπος δεν βρέθηκε στην ομάδα ελέγχου ενώ μόνον ένας βρέθηκε στην ομάδα IVF. Πιθανότατα ο πολυμορφισμός αυτός σε ομοζυγωτία να είναι καθοριστικός για τη υπογονιμότητα, αυτό όμως χρειάζεται να μελετηθεί σε ευρύτερο πληθυσμιακό δείγμα λόγω της σπανιότητάς του πολυμορφισμού.

Η σύγκριση των συχνοτήτων των δύο αλληλομόρφων του κάθε γονιδίου στην κάθε ομάδα, δείχνει ότι ο πολυμορφισμός PvuII είναι συχνός (γύρω στο 50%), ενώ ο πολυμορφισμός BstUI σπάνιος, έχει δηλαδή συχνότητα μικρότερη του 10%.

Ο πληθυσμός της μελέτης αυτής βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy - Weinberg, και για τον πολυμορφισμό PvuII και για τον BstUI.



Γ.2. Συχνότητες Απλοτύπων.

Οι απλότυποι ρ-β, Ρ-β, ρ-Β και Ρ-Β παρατηρήθηκαν σε παραπλήσιες συχνότητες και στις δύο ομάδες σύγκρισης, με εξαίρεση τον Ρ-Β που βρέθηκε μόνο στην ομάδα IVF και μάλιστα σε πολύ χαμηλή συχνότητα. (Πίνακας 2). Πιθανότατα, η συνύπαρξη των δύο μειονεκτικών πολυμορφισμών στο ίδιο χρωμόσωμα να είναι καθοριστική για υπογονιμότητα, χρειάζεται όμως και αυτό να ερευνηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Γ.3. Συγκρίσεις παραμέτρων μεταξύ των ομάδων (ωοθυλ., wάρια, λόγος αυτών).

Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τις μέσες τιμές, τις σταθερές αποκλίσεις, και το εύρος τιμών των ωοθυλακίων, ωαρίων, και του λόγου των ωοθυλακίων προς τα wάρια σε κάθε ομάδα γονοτύπων του ΡνυII. (Πίνακας 3).

Δεν υπήρχε στατιστική διαφορά ανάμεσα στα ωοθυλάκια και στα wάρια όταν συγκρίθηκαν μόνο τους στις ομάδες των γονοτύπων. Ο αριθμός των ωοθυλακίων που ωριμάζουν εξαρτάται από την ηλικία της γυναίκας, και ειδικότερα, από την περιεκτικότητα των ωοθηκών σε ωοκύτταρα ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη ή μη των πολυμορφισμών.

Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μόνον μεταξύ των λόγων των ωοθυλακίων προς τα wάρια: η διαφορά ήταν σημαντική ανάμεσα στους γονοτύπους ρρ και Ρρ ($p < 0.05$) και ρρ και ΡΡ ($p < 0.01$) αλλά όχι ανάμεσα στους Ρρ και ΡΡ (γράφ. 1). Το γεγονός ότι οι γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό, έστω και σε ετεροζυγωτία, παρουσιάζουν υψηλότερους δείκτες απόκρισης από αυτές του φυσιολογικού γονότυπου, είναι ενδεικτικό ότι ο πολυμορφισμός ΡνυII συσχετίζεται με την εξέλιξη ενός αριθμού ωοθυλακίων σε κυστικά - ατρητικά και επομένως, με την ωρίμανση των ωοθυλακίων. Από το γράφημα 1 μάλιστα, φαίνεται ότι είναι φαινοτυπικά επικρατής του φυσιολογικού, καθώς η μέση τιμή του ετερόζυγου γονότυπου βρίσκεται κοντά στον ομόζυγο ΡΡ ενώ με τον ρρ παρουσιάζει στατιστική διαφορά.

Αντίστοιχες στατιστικές συγκρίσεις των παραμέτρων δεν έγιναν για τον ΒstUI λόγω της σπανιότητάς του.



Γ.4. Κυήσεις

Στατιστική μελέτη του αριθμού των κυήσεων ανάμεσα στις ομάδες των γονότυπων σε σχέση με τον πολυμορφισμό PvuII, έδειξε ότι στις γυναίκες PP που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία, προέκυψαν σημαντικά λιγότερες κυήσεις (μόνο 3 σε ένα σύνολο 37 κυήσεων). Αυτό το αποτέλεσμα παρουσιάζει στατιστική διαφορά όταν συγκρίνεται η ομάδα PP με τις δύο άλλες ομάδες γονότυπων ($p < 0.05$). (Πίνακας 4). Ήταν δε όλες, κάτω των 35 ετών.

Γ.5. Γενετική προδιάθεση

Όπως έχει ήδη λεχθεί, ο λόγος των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τα ωάρια που συλλέγονται τη μέρα της ωοληψίας, παριστά το μέτρο ωρίμανσης των ωοθηκών και επομένως τον βαθμό κανονικότητας πρόσληψης των απαραίτητων ορμονών, επομένως και των E, από τα ωοθυλάκια. Θεωρητικά, αυτός ο λόγος πρέπει να είναι ίσος με τη μονάδα, πράγμα που σημαίνει ότι όλα τα ωοθυλάκια προσέλαβαν την κατάλληλη ποσότητα ορμονών για την ωρίμανση τους. Υψηλοί λόγοι δείχνουν μεγάλο αριθμό κυστικών - ατρητικών ωοθυλακίων.

Θέτοντας σαν όριο τον λόγο 2, που σημαίνει ότι από τα αναρροφούμενα ωοθυλάκια συλλέχθηκαν τα μισά ωάρια, η στατιστική σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες του PvuII σε σχέση με τον αριθμό των γυναικών της κάθε ομάδας που έχουν λόγο άνω του 2, έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα :

- Στις γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία (PP), το ποσοστό ήταν 68%.
- Στις ετερόζυγες γυναίκες (Pp), το ποσοστό ήταν 59%.
- Στις γυναίκες του φυσιολογικού τύπου (pp), το ποσοστό ήταν 33%.

Σε όλες τις ομάδες λοιπόν, υπάρχει ένα ποσοστό όπου εμφανίζεται το φαινόμενο της ατρησίας, είναι ενδεικτικό όμως ότι το ποσοστό των γυναικών που φέρουν τον πολυμορφισμό, έστω και σε ετεροζυγωτία, είναι σημαντικά υψηλότερο (γράφ. 2). Αξιοσημείωτο δε είναι, ότι το ποσοστό των ετερόζυγων γυναικών πλησιάζει περισσότερο στο ποσοστό των PP γυναικών παρά στο ποσοστό των pp του φυσιολογικού τύπου, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι η



φαινοτυπική έκφραση του πολυμορφισμού PvuII επικρατεί του φυσιολογικού τύπου. Στατιστική ανάλυση των τριών ομάδων ως προς τη γενετική προδιάθεση, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες PP και pp καθώς και στις Pp και pp ($p < 0.001$) ενώ δεν υπάρχει ανάμεσα στις PP και Pp.

Γ.6. Στατιστική μελέτη γενετικής σύνδεσης της δινουκλεοτιδικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (TA)_n με τον πολυμορφισμό PvuII.

Ο αριθμός των επαναλήψεων (TA)_n που βρέθηκαν στον πληθυσμό των γυναικών IVF κυμαίνονται από 12 έως 27 (γράφ. 3). Χωρίστηκαν αδρά σε δύο κατηγορίες, από 12-18 και από 19-27, θεωρώντας την πρώτη ομάδα ως ομάδα του μικρού αριθμού επαναλήψεων και τη δεύτερη ως ομάδα του μεγάλου αριθμού επαναλήψεων. Επιλογή των ομόζυγων ομάδων (PP και pp) του πολυμορφισμού PvuII και σύγκριση των γονοτύπων με τις αντίστοιχες επαναλήψεις (TA)_n, έδειξε ισχυρή γενετική σύνδεση των δύο πολυμορφισμών. Στο γράφημα 3 φαίνεται η κατάταξη του αριθμού των επαναλήψεων του πολυμορφισμού (TA)_n σε σχέση με τον πολυμορφισμό PvuII: οι ομόζυγες PP γυναίκες που φέρουν τον πολυμορφισμό βρίσκονται στην ομάδα του μικρού αριθμού επαναλήψεων ενώ οι ομόζυγες pp γυναίκες συναντώνται στην ομάδα του μεγάλου αριθμού επαναλήψεων.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την μελέτη του Sano: ο μειονεκτικός γονότυπος που φέρει προδιάθεση για οστεοπόρωση βρίσκεται στην περιοχή με τον μικρό αριθμό επαναλήψεων TA.

Σύγκριση του αριθμού των επαναλήψεων TA μεταξύ των δύο ομάδων απλοτύπων P και p είχε εξαιρετικά σημαντικό στατιστικό αποτέλεσμα $p < 0.00001$, κι αυτό επιβεβαιώνει την γενετική σύνδεση μεταξύ των πολυμορφικών δεικτών (TA)_n και PvuII.



ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ

Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν:

- Στην σύγκριση των λόγων ωοθυλακίων προς ωάρια ανάμεσα στις ομάδες των γονότυπων του πολυμορφισμού PvuII. Οι γυναίκες που φέρουν τον φυσιολογικό γονότυπο παρουσιάζουν λόγο ωοθυλ./ ωάρια σημαντικά μικρότερο από αυτές που φέρουν τον πολυμορφισμό έστω και κατά το ήμισυ (σε ετεροζυγωτία).
- Στους απλότυπους: Η παντελής έλλειψη του απλότυπου P-B στον πληθυσμό των γυναικών ελέγχου και το πολύ μικρό ποσοστό της στην ομάδα IVF είναι ενδεικτική ότι αυτός ο συνδυασμός πιθανότατα να λειτουργεί κατασταλτικά στην ικανότητα για γονιμοποίηση και ίσως επηρεάζει και άλλους τομείς στο αναπαραγωγικό σύστημα.
- Στις κυήσεις: Ο μικρός αριθμός κυήσεων στην ομάδα PP δείχνει ότι, αν και είναι πολυμορφισμός, ο PvuII έχει επίδραση στην γονιμότητα και πιθανότατα και στην εμφύτευση. Μια εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι πιθανώς ο PvuII να έχει γενετική σύνδεση με κάποιο γονίδιο και επομένως να επηρεάζει την δυνατότητα κυήσεως έμμεσα.
- Στην σύγκριση ανάμεσα στον πολυμορφισμό PvuII και τον αριθμό των επαναλήψεων των (TA)_n: Φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή γενετική σύνδεση ανάμεσα σ' αυτά τα δύο τμήματα του γονιδίου και αυτό είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να έχει ευρύτερη σημασία.
- Στη γενετική προδιάθεση των ομάδων PP, Pp και pp των γυναικών της ομάδας IVF στον πολυμορφισμό PvuII, καθώς και στην φαινοτυπική έκφρασή του.

Μη σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα ήταν:

- ◆ Η σύγκριση των αλληλομόρφων και των γονοτύπων μεταξύ των ομάδων μελέτης και ελέγχου, που δείχνει ότι οι πολυμορφισμοί δεν είναι καθοριστικοί στην εμφάνιση της στέρωσης από μόνοι τους.
- ◆ Η σύγκριση του αριθμού των αναρροφούμενων ωοθυλακίων ανάμεσα στις ομάδες των γονοτύπων που δείχνει ότι οι πολυμορφισμοί δεν παίζουν ρόλο στον αριθμό των ωοθυλακίων που ωριμάζουν σ' έναν κύκλο μετά



από διέγερση με γοναδοτροπίνες. Το ίδιο ισχύει και για τον αριθμό των λαμβανομένων ωαρίων μετά την ωοληψία.

- ◆ Το ESR B αλληλόμορφο, που αναλύθηκε με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου BstUI, δεν βρέθηκε να έχει επίδραση στον αριθμό των ωοθυλακίων, ωαρίων, και των λόγων των ωοθυλακίων προς τα ωάρια συγκρινόμενα μόνα τους ή σε συνδυασμό με τον PvuII. Άλλωστε, αυτό το αλληλόμορφο ήταν σπάνιο σε ομοζυγωτία και επίσης σπάνια βρέθηκε στον ίδιο απλότυπο με έναν θετικό PvuII αλληλόμορφο.
- ◆ Η σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες γονοτύπων του PvuII, όσον αφορά τον λόγο της στέρωσης της γυναίκας (σαλπιγγικός παράγοντας ή ανεξήγητη στειρότητα), επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική.
- ◆ Η ποσότητα της hMG που χορηγήθηκε για την διέγερση των ωοθηκών, καθώς και η διάρκεια της παροχής της hMG μέχρι την μέρα της συλλογής των ωαρίων.
- ◆ Το πάχος του ενδομητρίου δεν παρουσίασε καμιά στατιστική διαφορά, παρόλο που, σύμφωνα με την γνώση ότι η δράση των οιστρογόνων έχει ιδιαίτερη επίδραση στο ενδομήτριο και στην ικανότητα εμφύτευσης, ήταν αναμενόμενο ότι η ποικιλομορφία του υποδοχέα των οιστρογόνων θα παρουσίαζε επίπτωση στον φαινότυπο του ενδομητρίου. Πιθανότατα, ο μειονεκτικός υποδοχέας να υπερκαλύπτεται από κάποιο άλλο γονίδιο του οποίου η επίδραση είναι περισσότερο επικρατής στο ενδομήτριο. Η μέτρηση του ενδομητρίου που ελήφθη για στατιστική ανάλυση, ήταν αυτή της μέρας της hCG, δύο μέρες δηλαδή πριν την ωοληψία.



ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Ποσοστιαίες αναλογίες Αλληλομόρφων και Γονοτύπων σε κάθε πολυμορφισμό, στην ομάδα IVF και στην ομάδα ελέγχου.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ				ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ					
	IVF		ΕΛΕΓΧΟΥ		IVF			ΕΛΕΓΧΟΥ		
PvuII	ρ	P	ρ	P	ρρ	Pρ	PP	ρρ	ρP	PP
	53	47	51	49	33	43	24	27	48	25
BstUI	β	B	β	B	ββ	βB	BB	ββ	βB	BB
	92	8	91	9	85	14	1	82	18	0



ΠΙΝΑΚΑΣ II: Σύγκριση απλοτύπων ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και IVF.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ	IVF	ΕΛΕΓΧΟΥ
ρ - β	100	93
P- β	92	98
ρ -B	6	9
P-B	2	0



ΠΙΝΑΚΑΣ III: Μέσες τιμές (χ), σταθερές αποκλίσεις (sd), και εύρος τιμών των ωθυλακίων (range), ωαρίων και των λόγων των ωθυλακίων προς τα ωάρια σε κάθε έναν από τους τρεις γονότυπους του Pnull.

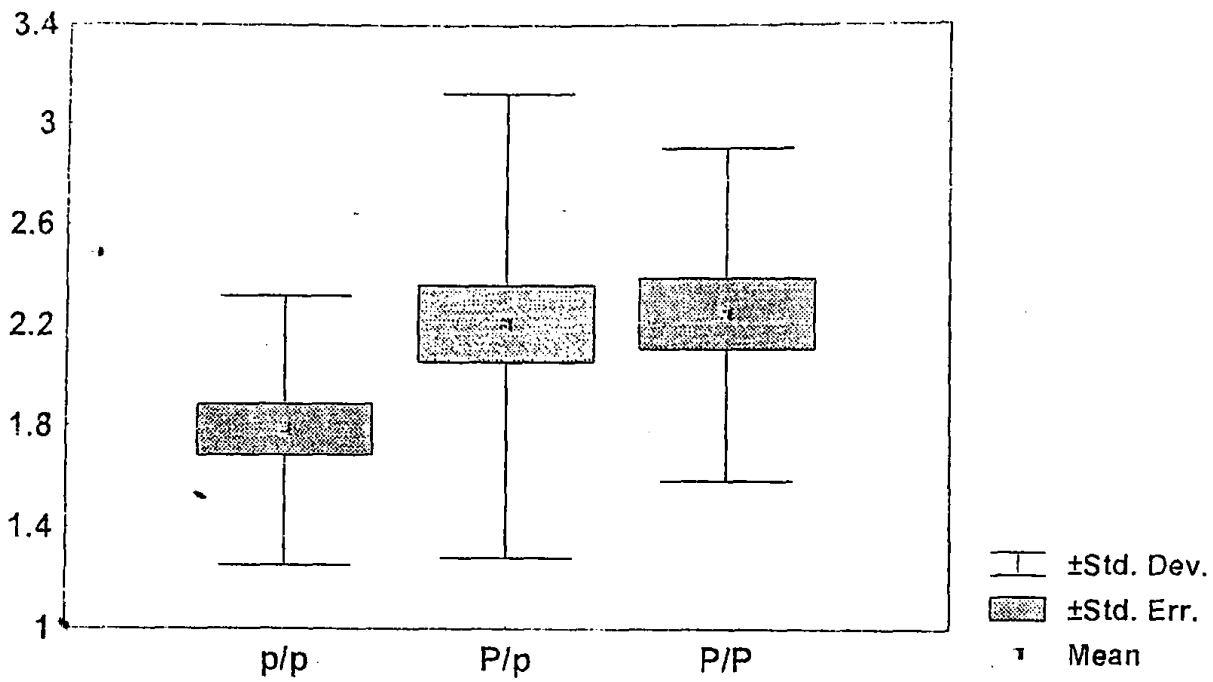
PvuII	pp			Pp			PP		
	Ωοθ.	Ωάρ.	Λογος	Ωοθ.	Ωάρ.	Λόγος	Ωοθ.	Ωάρ.	Λόγος
\bar{X}	13.2	7.8	1.78	13.1	6.6	2.2	13.5	6.7	2.24
SD	5.04	3.2	0.53	6.25	3.6	0.92	5.8	3.9	0.65
ΕΥΡΟΣ	6-22	3-15	1.1-2.7	4-23	1-15	1-3.1	4-24	1-15	1.2-3.2
N	33			43			24		



ΠΙΝΑΚΑΣ IV: Κυήσεις στην ομάδα IVF ανάλογα με τον RvuII γονότυπο.

RvuII Γονότυποι	IVF κυήσεις	
	n	%
ρρ	17	46%
Rρ	17	46%
PP	3	8%
Σύνολο	37	100%

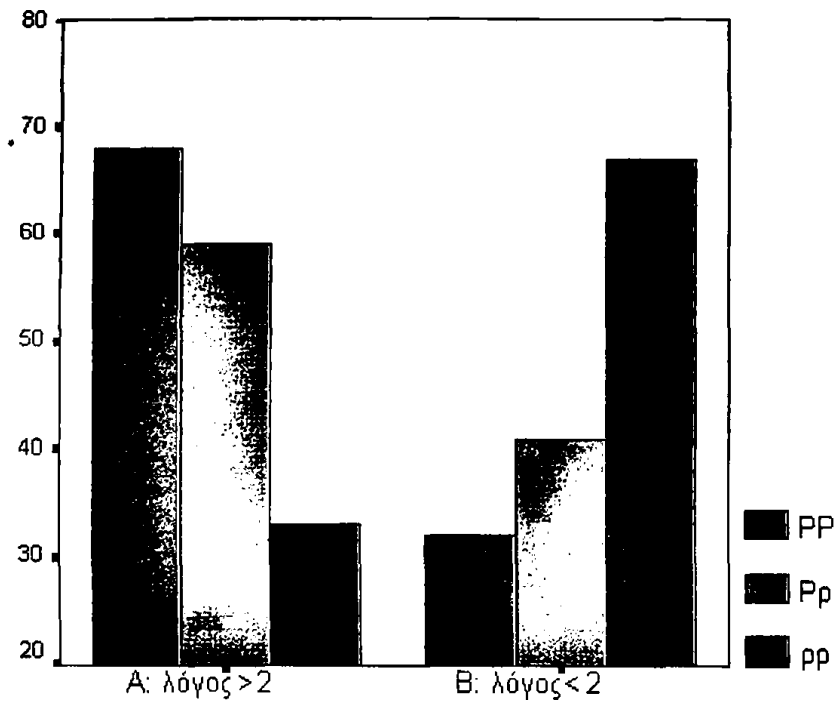




Γράφημα 1: Μέσες τιμές και διακυμάνσεις των λόγων ωθηλακίων προς ώρα σε κάθε ομάδα γονοτύπων του Pnull.



Σχηματική παράσταση της γενετικής προδιάθεσης του πολυμορφισμού RnuII στον πληθυσμό των γυναικών IVF.



Γράφημα 2: Απεικονίζεται η γενετική προδιάθεση και η φαινοτυπική έκφραση του πολυμορφισμού RnuII στον πληθυσμό των γυναικών IVF, σύμφωνα με τον δείκτη απόκρισης των ωθηκών.

Οριζόντιος άξονας: Α: Γυναίκες με λόγο μεταξύ ωθυλακίων και ωαρίων >2

Β: Γυναίκες με λόγο μεταξύ ωθυλακίων και ωαρίων <2

Κατακόρυφος άξονας: Ποσοστό % των γυναικών στον πληθυσμό IVF.

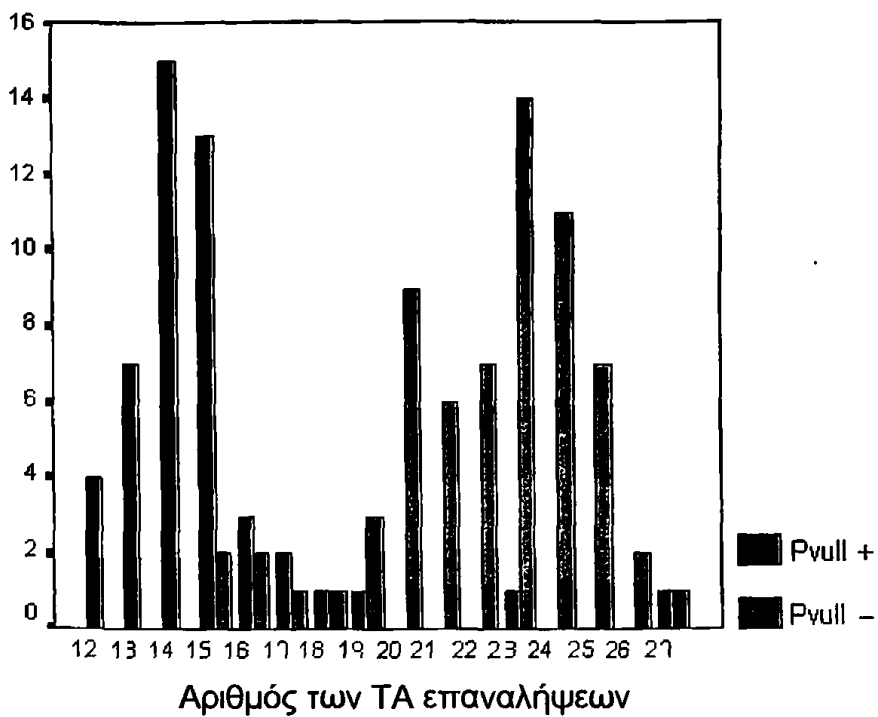
Κόκκινο : Ομόζυγες γυναίκες PP που φέρουν τον πολυμορφισμό.

Πράσινο: Ετερόζυγες γυναίκες Pp.

Μπλε : Ομόζυγες γυναίκες pp αγρίου τύπου.



Σχηματική απεικόνιση της γενετικής σύνδεσης ανάμεσα στον πολυμορφισμό RvuII και τη δινουκλεοτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n.



Γράφημα 3: Απεικονίζεται η κατανομή των γυναικών του πληθυσμού IVF σε σχέση με τον αριθμό των επαναλήψεων TA.

Οριζόντιος άξονας, ο αριθμός επαναλήψεων TA.

Κατακόρυφος άξονας, ο αριθμός των γυναικών.

Κόκκινο : Ομόζυγες γυναίκες PP που φέρουν τον πολυμορφισμό.

Πράσινο: Ομόζυγες γυναίκες rr φυσιολογικού τύπου.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Εξωσωματική Γονιμοποίηση

Η μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης άνοιξε καινούργιους ορίζοντες στην έρευνα για την κατανόηση και επίλυση του προβλήματος της στειρότητας.

Από την αρχή της εφαρμογής της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στη στειρώση, έγινε αναγκαία η μελέτη όλων των συνθηκών, παραγόντων και μηχανισμών που συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου.

Έτσι, η δομή και λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος του ανθρώπου, η παραγωγή και ωρίμανσή των γαμετών (ωαρίων, σπερματοζωαρίων), το ορμονικό περιβάλλον κατά την διάρκεια του φυσιολογικού αναπαραγωγικού κύκλου (καθώς και του διεγερμένου για την Εξωσωματική Γονιμοποίηση), και ο μηχανισμός της γονιμοποίησης, αποτέλεσαν πεδία επισταμένης μελέτης και έρευνας (Edwards et al., 1984).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, την στεροειδογένεση, και την ωρίμανση των ωαρίων είναι από τους πρώτους που θεωρήθηκαν σημαντικοί (Testart et al., 1983; Fowler et al., 1978).

Ωρίμανση των ωοθυλακίων

Η διερεύνηση του μηχανισμού της ωρίμανσης των ωοθυλακίων *in vivo* έχει μεγάλη πρακτική σημασία. Καθώς η θεραπεία της στειρώσης με Εξωσωματική Γονιμοποίηση στηρίζεται (όσον αφορά τον γυναικείο παράγοντα) στην λήψη ωοθυλακίων που ωριμάστηκαν με ορμόνες, είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός ωρίμανσης ώστε να ληφθούν υπ' όψιν όλοι οι παράγοντες που τον επηρεάζουν και να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Σημαντική επίσης είναι η συμβολή αυτής της έρευνας στην επίτευξη της ωρίμανσης των ωοθυλακίων *in vitro*. Με το θέμα αυτό ασχολούνται σήμερα πολλά εμβρυολογικά εργαστήρια. Ήδη το 1996 σημειώθηκε η πρώτη επιτυχία από τον Erpzig (Erpzig and O' Brien, 1996) στον ποντικό: πρωτογενές ωοθυλάκιο ωρίμασε στο εργαστήριο, και μετά από επιτυχή γονιμοποίηση και εμφύτευση, κατέληξε στην γέννηση ενός υγιούς μικρού.

Ο περιορισμένος αριθμός των ωαρίων στη φύση, κάνει την ωρίμανση των ωοθυλακίων *in vitro* ιδιαίτερα σημαντική:



Παρέχει την δυνατότητα αξιοποίησης των ωοθυλακίων από τις ωοθήκες των θηλυκών εμβρύων, που για οποιοδήποτε λόγο πρέπει να αποβληθούν. Αυτό θα' ναι κυριολεκτικά μια πηγή ωαρίων, καθώς, όπως αναφέρθηκε ήδη στο γενικό μέρος, ο αριθμός των ωοθυλακίων στην ενδομήτριο ζωή ανέρχεται σε 6.000.000. Τα ωοθυλάκια αυτά, καθώς και τα ωοθυλάκια των γυναικών που υφίστανται υστερεκτομή, μπορούν, μετά από διαδικασία ωρίμανσης στο εργαστήριο, να διατεθούν στις γυναίκες που δεν μπορούν να παράγουν δικά τους ωάρια και που έχουν κατά τα άλλα ένα ικανό αναπαραγωγικό σύστημα ώστε να τεκνοποιήσουν.

Πέρα από την αξιοποίηση ωαρίων που διαφορετικά θα χάνονταν, η ωρίμανση ανώριμων ωοθυλακίων στο εργαστήριο θα μπορούσε να απαλλάξει τις γυναίκες που υποβάλλονται σε κύκλο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης από την διέγερση των ωοθηκών (ταυτόχρονη ωρίμανση πολλών ωαρίων).

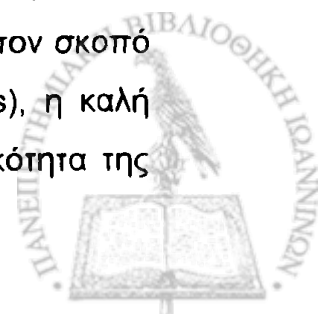
Σε μια προσπάθεια συμμετοχής σ' αυτό το τόσο σημαντικό επιστημονικό έργο, προσεγγίστηκε το θέμα από την γενετική πλευρά του. Έτσι, αναζητώντας μέσα στη βιβλιογραφία τους παράγοντες που έχουν ήδη μελετηθεί, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ένας κοινός παρονομαστής, που είτε άμεσα είτε έμμεσα, επηρεάζει και συμβάλλει αποφασιστικά. Ο κοινός αυτός παρονομαστής είναι τα οιστρογόνα.

Οιστρογόνα και ωρίμανση των ωοθυλακίων

Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα είναι μια ορμόνη καθοριστική για το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Μελέτες με μετρήσεις της οιστραδιόλης E_2 έχουν δείξει ότι υπάρχει άμεση επίδραση των E πάνω στην ωρίμανση των ωοθυλακίων (Fowler et al., 1977). Υψηλές τιμές της E_2 στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκαν με την λήψη γονιμοποιήσιμων ωαρίων (Fishel et al., 1983), μολονότι αυτό έχει αμφισβητηθεί (Messinis and Templeton 1987).

Υποδοχείς των Οιστρογόνων

Τα Οιστρογόνα δρουν είτε άμεσα πάνω στα κύτταρα στόχους προάγοντας την παραγωγή διαφόρων ουσιών, είτε έμμεσα ρυθμίζοντας την δράση άλλων γονιδίων (όπως π.χ. το γονίδιο της προγεστερόνης). Επιτελούν δε τον σκοπό τους μέσω των υποδοχέων τους, των ESR (Estrogen Receptors), η καλή κατάσταση των οποίων είναι αποφασιστική για την αποτελεσματικότητα της



δράσης της ορμόνης. Ο ρόλος των υποδοχέων στην καλή λειτουργία των οιστρογόνων είναι σημαντικός και επομένως οποιαδήποτε μεταβολή στην δομή ή στην δράση τους είναι καθοριστική. Είναι ενδεικτικό ότι παροχή αναστολέως του υποδοχέα, (π.χ. Tamoxifen), κατά την μετωορρηκτική περίοδο, παρεμποδίζει την εγκυμοσύνη στα ποντίκια. Αν δοθεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ελαττώνεται η διάρκεια της κύησης και ο αριθμός των γεννήσεων (Lehner et al., 1990).

Πιθανότατα, η διαφωνία για την επίδραση των E στην ωρίμανση των ωοθυλακίων να οφείλεται στην γενετική ποικιλομορφία του υποδοχέα. Μια καινούρια μελέτη (Kuiper et al., 1996), αναφέρει ότι έχει εντοπιστεί μια καινούργια μορφή του γονιδίου του υποδοχέα σε κύτταρα του προστάτη του ποντικού, που ονομάστηκε ER-β για να διαχωρίζεται από τον ESR με τον οποίο παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομολογία (95% στην περιοχή C του γονιδίου). Εκτός λοιπόν από τις μεταλλάξεις και τους πολυμορφισμούς, υπάρχουν ίσως κι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των υποδοχέων και κατά προέκταση την δράση των οιστρογόνων.

Εκτίμηση της υπογονιμότητας

Καθώς η στειρώση είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, η εφαρμογή των θετικών ερευνητικών αποτελεσμάτων στην καθημερινή πράξη προϋποθέτει ακριβή διάγνωση της αιτίας που την προκαλεί. Η κατά το δυνατόν ακριβέστερη εκτίμηση του προβλήματος και η επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας, είναι αποφασιστικής σημασίας στην καθοδήγηση του υπογόνιμου ζευγαριού. Σημαντική επίσης είναι και η θεώρηση της πιθανότητας επίτευξης κύησης στη συγκεκριμένη χρονική περίοδο, που προϋποθέτει συνεκτίμηση ατομικών, βιολογικών και ψυχολογικών παραγόντων.

Μέχρι σήμερα έχουν εφαρμοστεί διάφορες μέθοδοι εκτιμήσεως της πιθανότητας κύησης των υπογόνιμων γυναικών.

Αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος εμπειρίας και διαίσθησης, που αν και δεν έχει σταθερά αποτελέσματα στις εκτιμήσεις της πιθανότητας για σύλληψη, εν τούτοις όμως, είναι η συνήθης πρακτική.

Σημαντικότερη είναι η μέθοδος των δημοσιευμένων προγνωστικών μοντέλων αναφοράς. Με αυτή τη μέθοδο, οι πιθανότητες κύησης υπολογίζονται με βάση



τους ισχυρότερους προγνωστικούς παράγοντες. Αυτά τα μοντέλα δίνουν αδρή εκτίμηση της πιθανότητας, με γενική αλλά όχι ειδική εφαρμογή για τον συγκεκριμένο πληθυσμό που μελετάται.

Ειδικότερη είναι η μέθοδος των αξιολογημένων προγνωστικών μοντέλων. Με αυτή τη μέθοδο, κάθε υπογόνιμο ζευγάρι θεωρείται ότι ανήκει σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό στον οποίο έχουν αξιολογηθεί, ένας προς έναν, όλοι οι προγνωστικοί παράγοντες.

Προγνωστικοί δείκτες

Κατά καιρούς έχουν επινοηθεί διάφορα προγνωστικά μοντέλα για την ομαδοποίηση των υπογόνιμων ζευγαριών μέσα σ' έναν συγκεκριμένο, υπογόνιμο πληθυσμό. Μεταξύ των παραγόντων που έχουν μέχρι σήμερα χρησιμοποιηθεί στα προγνωστικά μοντέλα, είναι η ηλικία, η αιτία της στέρωσης, η διάρκεια της στέρωσης και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ένα προγνωστικό μοντέλο θα πρέπει να περιλαμβάνει τον ιδεατό συνδυασμό των παραγόντων οι οποίοι έχουν στατιστικά σημαντική συνάφεια με την πιθανότητα της σύλληψης.

Έχουν αναφερθεί διάφορα προγνωστικά μοντέλα από κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε χώρες όπως ο Καναδάς, η Φινλανδία, η Ολλανδία.

Το κυριότερο προγνωστικό μοντέλο που έχει επινοηθεί από την ανάλυση των στοιχείων υπογόνιμων ζευγαριών αναφέρεται από τον Comhaire (Comhaire, 1987). Πρόκειται για μια διεθνή μελέτη που περιλαμβάνει 8350 υπογόνιμα ζευγάρια από 33 κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συν 4059 από αναφορές σε βιβλία. Όλα τα ζευγάρια είχαν πάνω από 12 μήνες διάρκεια στέρωσης και η αιτιολογία ήταν σαλπινγικός παράγοντας, συγκέντρωση του σπέρματος, ηλικία της γυναίκας, διάρκεια στέρωσης και ενδομητρίωση.

Ο Υποδοχέας των Οιστρογόνων σαν υποψήφιος παράγοντας πρόγνωσης

Στη δική μας μελέτη απομονώσαμε τον ESR ως έναν υποψήφιο παράγοντα γενετικής προδιάθεσης στην υπογονιμότητα, ο οποίος εφαρμόστηκε σαν βιολογικός προγνωστικός παράγοντας στον πληθυσμό της περιοχής μας.



Ο παράγοντας αυτός επιλέχτηκε διότι εντοπίζεται σε όλο το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας (υποθάλαμος, υπόφυση, ωθήκες, ενδομήτριο κ.λ.π.) και έχει αποδειχθεί ήδη στα πειραματόζωα, ότι η έλλειψή του επηρεάζει την γονιμότητα και των δύο φύλων (Kogach, 1994).

Επίσης, ο παράγοντας αυτός μελετήθηκε σ' έναν συγκεκριμένο από άποψη γεωγραφικής εντόπισης πληθυσμό (Βορειοδυτική Ελλάδα) για να εξασφαλίσουμε την ομοιογένεια των υπόλοιπων γενετικών παραγόντων.

Τα κριτήρια επιλογής ή αποκλεισμού των περιπτώσεων που μελετήθηκαν, καθώς και η αξιολόγηση του αποτελέσματος της θεραπείας, ήταν όμοια με τα προγνωστικά μοντέλα που προαναφέρθηκαν.

Για τους λόγους αυτούς, τα αποτελέσματά μας εκφράζουν έναν συγκεκριμένο πληθυσμό σύμφωνα με την μέθοδο των αξιολογημένων προγνωστικών μοντέλων, αλλά αξιοποιούν και συνεκτιμούν τα χαρακτηριστικά προηγούμενων επιλεγμένων προγνωστικών μοντέλων, τα οποία θεωρούνται σήμερα ως τα πλέον αξιόπιστα διεθνώς.

Παράγοντες πρόγνωσης

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολλοί παράγοντες πρόγνωσης από τους οποίους οι σημαντικότεροι είναι:

α) Κλινικοί παράγοντες:

Που αφορούν τη γυναίκα: παθολογία των σαλπίγγων, ενδομητρίωση, σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών, διάρκεια στέρωσης, ηλικία της γυναίκας, ιδιοπαθής στέρωση, κύστες ωθηκών.

Που αφορούν τον άνδρα: ποιότητα του σπέρματος (συγκέντρωση-κινητικότητα-μορφολογία των σπερματοζωαρίων), αντισπερματικά αντισώματα, ακροσωμική αντίδραση, ιστορικό ουρηθρίτιδας.

β) Εργαστηριακοί προγνωστικοί δείκτες:

Αποτελέσματα του τεστ μετά τη συνουσία (post-coital test), ορμονικός έλεγχος γοναδοτροπινών και στεροειδών, δείκτες ωριμότητας σπερματοζωαρίων όπως η χρωμομυκίνη CMA₃ (Lolis et al., 1996) κ.λ.π.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία των προγνωστικών μοντέλων, ένας γενετικός παράγοντας πρόγνωσης (Georgiou et al., 1997).



Στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης της συσχέτισης του φαινότυπου με τον γονότυπο

Η ανεύρεση των γονιδίων που επηρεάζουν τον κίνδυνο στα σύνθετα ή πολυπαραγοντικά νοσήματα επαφίεται στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του φαινότυπου με τον γονότυπο.

Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες στατιστικές μέθοδοι, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης, η μελέτη συσχέτισης και η μη παραμετρική στατιστική. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σύγχρονης προσέγγισης είναι η συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου της βιταμίνης D με την οστική πυκνότητα. Αυτές οι μελέτες είναι κυρίως μελέτες συσχέτισης, παρ' όλα αυτά και άλλες στατιστικές προσέγγισης έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των γονιδίων που καθορίζουν την οστική πυκνότητα.

Η μέθοδος γενετικής σύνδεσης εφαρμόζεται κυρίως στις Μεντελιανές μονογονιδιακές διαταραχές και χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η συχνότητα του νοσήματος, η διεισδυτικότητα και ο τρόπος κληρονομησης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ο στατιστικός προσδιορισμός της γενετικής σύνδεσης γίνεται μέσω υπολογισμού του λόγου της πιθανότητας να υπάρχει γενετική σύνδεση μεταξύ του νοσήματος και του γονιδιακού δείκτη, προς την πιθανότητα να μην υπάρχει γενετική σύνδεση. Ο δεκαδικός λογάριθμος αυτού του λόγου ονομάζεται LOD score και είναι εκτιμητής γενετικής σύνδεσης όταν είναι >3 .

Στην περίπτωση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, η προσέγγιση αυτή είναι αμφισβητούμενη ως προς την ισχύ της, λόγω του μη Μεντελιανού μοντέλου κληρονομησης και του αγνώστου αριθμού των γονιδίων που αλληλεπιδρούν.

Μελέτη συσχέτισης

Η συχνότερη προσέγγιση για την ταυτοποίηση της γενετικής επίδρασης στα πολυπαραγοντικά νοσήματα είναι η σύγκριση της συχνότητας των αλληλομόρφων ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού ή ενός υποψήφιου γονιδίου μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού που πάσχουν και αυτών που δεν πάσχουν.



Η διαφορά της μελέτης συσχέτισης από την ανάλυση γενετικής σύνδεσης που περιγράφηκε προηγουμένως είναι πολύ σημαντική. Στις μελέτες συσχέτισης εξετάζεται η διαφορά των συχνοτήτων ενός αλληλόμορφου μεταξύ των πασχόντων και μη, ενώ για την ανάλυση γενετικής σύνδεσης απαιτούνται μοριακοί δείκτες με χαρτογραφημένη εντόπιση στο γένωμα και στενή μεταξύ τους σύνδεση η οποία δεν επιτρέπει ανασυνδυασμούς. Η συσχέτιση δεν προϋποθέτει ότι το συγκεκριμένο αλληλόμορφο ευθύνεται για την εκδήλωση του φαινότυπου αλλά καθορίζει τον κίνδυνο να νοσήσουν τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο που συσχετίζεται με το νόσημα. Στην ανάλυση αυτή πρέπει να αποφεύγονται πληθυσμοί με επιμειξίες είτε πληθυσμοί στους οποίους το αλληλόμορφο που συσχετίζεται έχει ακραία συχνότητα (πολύ μεγάλη ή πολύ μικρή).

Για τη σωστή εφαρμογή της ανάλυσης συσχέτισης θα πρέπει ο υπό εξέταση πληθυσμός να βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy - Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$). Αν η συχνότητα των αλληλομόρφων αποκλίνει από την ανωτέρω αρχή τότε ο πληθυσμός δεν είναι γονιδιακά ισορροπημένος και αποκλείεται για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ο πληθυσμός της μελέτης αυτής βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy - Weinberg, και για τον πολυμορφισμό PvuII και τον BstUI.

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων

Όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στον υποδοχέα των οιστρογόνων. Οι μεταλλάξεις είναι συνήθως εμφανείς μεταλλαγές του γενετικού υλικού και συνδέονται κυρίως με έκδηλες παθολογικές καταστάσεις, ενώ οι πολυμορφισμοί, επειδή δεν καταλήγουν σε αλλαγή αμινοξέος στη δομή της πρωτεΐνης που παράγεται, συνήθως περνούν απαρατήρητοι.

Λόγω του ότι οι μεταλλάξεις είναι σπάνιες, έγινε προσπάθεια σύνδεσης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων με σημειακούς πολυμορφισμούς του γονιδίου του ESR. Έτσι βρέθηκε ότι υπάρχει γενετική σύνδεση ανάμεσα σε δύο πολυμορφισμούς του ESR και τον καρκίνο του μαστού (Andersen et al., 1994). Σε σημειακούς πολυμορφισμούς αποδόθηκε επίσης και το φαινόμενο



των καθ' ἑξιν εκτρώσεων σ' έναν πληθυσμό γυναικών της Καυκάσιας φυλής, εγκατεστημένο στη Νέα Υόρκη (Lehner et al., 1993).

Σε μια σύγχρονη μελέτη, ένας μικροδορυφορικός δινουκλεοτιδικός πολυμορφισμός συσχετίστηκε με οστεοπόρωση στον πληθυσμό της Ιαπωνίας (Sano et al., 1995).

Για όλους αυτούς τους λόγους, αποφασίστηκε να γίνει συνδυαστική ανάλυση του συχνότερου πολυμορφισμού PvuII (που συνδέθηκε με καρκίνο μαστού) με τον σπάνιο πολυμορφισμό BstUI (που ενέχεται επίσης σε καρκίνο μαστού καθώς και στις καθ' ἑξιν εκτρώσεις), και τον μικροδορυφορικό δινουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (TA)_n (που συνδέθηκε με οστεοπόρωση).

Μηδενική μετάλλαξη στο γονίδιο του ESR

Την επιλογή μας να μελετήσουμε τον ESR ενίσχυσαν και τα πειράματα αποκλεισμού του ESR (knock out) στα ποντίκια. Από τα πειράματα αυτά έγινε φανερό ότι, ενώ η έλλειψη του ESR σε ομοζυγωτία δεν επιφέρει τον θάνατο, προκαλεί εν τούτοις στείρωση και στα δύο φύλα. Ειδικότερα, τα θηλυκά ποντίκια που είχαν έλλειψη του ESR, παρουσίαζαν κυστικές και αιμορραγικές ωθήκες (πιθανότατα λόγω της υπερβολικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες που οφείλεται στην απουσία του αρνητικού ανάδρομου μηχανισμού που ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα) και παρουσίαζαν την εικόνα παρατεταμένης θεραπείας με αντιοιστρογόνα. Επίσης, ιστολογικά παρασκευάσματα της ωθήκης αυτών των πειραματόζωων, έδειξε απουσία του ωχρού σωματίου και διακοπή της ανάπτυξης των ωθυλακίων πριν διαμορφωθούν σε ωορρηκτικά στο στάδιο της ωθυλακιορρηξίας. Παροχή εξωγενών γοναδοτροπινών έδειξε να ξεπερνά αυτό το στάδιο, κατέληξε όμως στην ανάπτυξη μη ζωντανών (κυστικών - ατρητικών) ωθυλακίων. Η απουσία του ESR οδήγησε επίσης σε απουσία ανάπτυξης ενδομήτριου ιστού στην παραγωγική φάση (Kogach, 1994).

Μειονεκτικός υποδοχέας και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι υπάρχει και στον άνθρωπο ομοιότητα κατ' αναλογία με τα πειράματα που προαναφέρθηκαν για δύο λόγους:



α) Ο πολυμορφισμός PvuII συνδέεται με αυξημένο λόγο ωοθυλακίων / ωάρια, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο χαμηλός αριθμός των ωαρίων που λαμβάνουμε σε σχέση με τα ωοθυλάκια που αναρροφώνται, οφείλεται στην παρουσία στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού κυστικών - ατρητικών ωοθυλακίων.

β) Ανάλογο φαινόμενο θα πρέπει επίσης να επισυμβαίνει και στο ενδομήτριο, διότι οι κυήσεις των γυναικών με τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία βρέθηκαν ότι είναι στατιστικά σημαντικά λιγότερες από τις άλλες κατηγορίες γονοτύπων. Συμπληρωματικά, είναι σημαντικό να δειχθεί σ' αυτήν τη μελέτη, ότι ο σπάνιος απλότυπος P-B (που περιέχει και τους δύο μειονεκτικούς πολυμορφισμούς), ήταν παρών μόνο στην ομάδα IVF και όχι στην ομάδα ελέγχου ούτε στις εγκυμοσύνες που προέκυψαν από IVF. Το γεγονός ότι το αλληλόμορφο B βρέθηκε να συνδέεται με το P μόνο σε δύο ασθενείς από την ομάδα IVF της μελέτης, δείχνει το εξελικτικό μειονέκτημα για γονιμοποίηση αυτού του συνδυασμού.

Το γεγονός του P-B απλότυπου δεν θα μπορούσε να συγκριθεί με άλλους πληθυσμούς καθώς η αναφορά απλοτύπων απουσιάζει από την βιβλιογραφία. Άλλωστε, η σπανιότητά του οφείλεται εν μέρει και στην σπανιότητα του BB γονότυπου που επίσης είναι παρών μόνο στην ομάδα IVF. Είναι ενδεικτικό ότι σε μεγαλύτερο δείγμα (τριακοσίων ατόμων) Κορεατών, ο πολυμορφισμός B δεν βρέθηκε καθόλου (Han et al., 1996). Αυτό φαίνεται και στην μελέτη του πολυμορφισμού αυτού σε πληθυσμό της Νέας Υόρκης από τον Lehner σε σχέση με τις καθ' έξι εκτρώσεις (Lehner et al., 1993).

Ο ESR σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας

Ένα αξιοσημείωτο επίσης εύρημα είναι ότι οι γυναίκες του μειονεκτικού υποδοχέα που έμειναν έγκυες ήταν λίγες και ήταν όλες κάτω των 35 ετών.

Μέχρι σήμερα, οι αναφορές στη βιβλιογραφία που συσχετίζουν την αναπαραγωγική ανεπάρκεια, είτε με την μορφή του υπογοναδισμού είτε με τη μορφή της πρόωρης εμμηνόπαυσης, είναι περιορισμένες.

Οι υποδοχείς των γοναδοτροπινών και συγκεκριμένα της FSH ενέχονται σε ορισμένες μορφές υπογοναδισμού ανθεκτικές στις γοναδοτροπίνες (Aittomaki



et al., 1995). Επίσης πρόσφατα συσχετίσθηκαν οι προμεταλλάξεις του γονιδίου FMR-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο ευθραύστου X, με πρόωρη εμμηνόπαυση στο 25% των φορέων των προμεταλλάξεων (Partington et al., 1996). Σε άλλη μελέτη οικογενούς, πρόωρης εμμηνόπαυσης, χωρίς ιστορικό διανοητικής καθυστέρησης, βρέθηκε ότι η μία στις τρεις οικογένειες είχε γυναίκες με προμετάλλαξη του FMR-1.

Οι μελέτες αυτές δεν έχουν ολοκληρωθεί ακόμη και δεν είναι γνωστό αν οι μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου ευθύνονται για πτωχή ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας ή στη στερωση γυναικών άνω των 30 ετών.

Γενετικός παράγοντας

Στη δική μας μελέτη, ο ESR αναδεικνύεται σε επιβαρυντικό παράγοντα ο οποίος πιθανόν να έχει ακόμα μεγαλύτερη σημασία αν συσχετισθεί και με άλλες περιπτώσεις που οφείλονται σε γονίδια. Καθώς η δράση των οιστρογόνων ξεκινά από την εμβρυϊκή ηλικία, και μάλιστα ακόμα νωρίτερα από τη φάση του προεμβρύου, η γενετική ποικιλομορφία στο γονίδιο του υποδοχέα ESR θα μπορούσε να προκαλέσει ποικιλία αποκρίσεων των ωοθηκών στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των ωοθυλακίων.

Θα μπορούσε επίσης να επιφέρει ποικιλομορφία και στον ρυθμό ατρησίας των γεννητικών κυττάρων κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας, επηρεάζοντας έμμεσα την γονιμότητα.

Γενετική προδιάθεση

Ο υπολογισμός της γενετικής προδιάθεσης είναι σχετικά απλός όσον αφορά τις μονογονιδιακές νόσους, αυτές δηλαδή που οφείλονται στη δυσλειτουργία ενός γονιδίου, το οποίο επιφέρει άμεσες αλλαγές του φαινότυπου. Δυστυχώς όμως, τα περισσότερα νοσήματα (και χαρακτήρες) είναι πολυπαράγοντικά, επηρεάζονται δηλαδή από περισσότερα του ενός γονίδια. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, τα γονίδια που συμβάλλουν στην έκφραση ενός νοσήματος ή χαρακτήρα δεν είναι καθοριστικά από μόνα τους, αλλά συμβάλλουν έμμεσα στην γενετική προδιάθεση σε συνεργασία με άλλους παράγοντες (διατροφικούς, περιβαλλοντικούς κ.λ.π.).



Η υπογονιμότητα, ανεξάρτητα από την αιτία, είναι ένα σύνθετο νόσημα χωρίς συγκεκριμένη γενετική αιτία και χωρίς να ακολουθεί Μεντελιανό τρόπο κληρονομής. Οφείλεται σε πολλούς παράγοντες μερικοί από τους οποίους είναι επίκτητοι, όπως η απόφραξη σαλπίνγων ή η μονήρης ωοθήκη στη γυναίκα, μερικοί όμως είναι γενετικοί. Έτσι, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών έχει ήδη προταθεί σαν γενετικός παράγοντας κινδύνου στην στέρωση (Franks, 1996). Γενετική επίδραση έχει επίσης περιγραφεί και στην εμφάνιση της ενδομητρίωσης (Coxhead and Thomas, 1993).

Τα αποτελέσματα της μελέτης, εκτός του ότι συμβάλλουν στην πρόγνωση του αποτελέσματος της θεραπείας για γονιμότητα, συμβάλλουν επίσης και στην κατανόηση του φαινομένου της γενετικής προδιάθεσης στην υπογονιμότητα. Θα μπορούσαμε γενικά να ορίσουμε σαν γενετική προδιάθεση, τη συσχέτιση μιας παθολογικής κατάστασης με ένα γονίδιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το γονίδιο του ESR δεν συνδέεται με γενετική προδιάθεση για υπογονιμότητα από μόνο του. Αυτό φαίνεται από τις όμοιες συχνότητες των αλληλόμορφων και των γονότυπων που μελετήσαμε στην ομάδα ελέγχου και IVF.

Παρά το γεγονός αυτό, ο γονότυπος του ESR φαίνεται ότι είναι, για τους λόγους που αναλύθηκαν προηγούμενα, ισχυρός προδιαθεσικός παράγοντας, όταν ισχύουν ήδη τα κριτήρια για τον χαρακτηρισμό ενός ζεύγους ως υπογόνιμο.

Το ερώτημα που θα πρέπει να απαντηθεί από τα στοιχεία αυτά, είναι αν και κατά πόσον ο ESR είναι υποψήφιο γονίδιο για τη στέρωση από μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα γονίδια και παράγοντες που δεν έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί.

Από τα αποτελέσματά μας είναι προφανές ότι ο ESR έχει σημαντικό ρόλο ανάμεσα στους γενετικούς παράγοντες, αλλά τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη οδηγούν στο συμπέρασμα ότι επιβαρύνει την υπογονιμότητα μόνον όταν η στέρωση είναι ήδη γεγονός. Στην παρούσα μελέτη, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ESR δεν επηρεάζουν καθοριστικά την έκφραση του υποδοχέα, φαίνεται όμως πως συσχετίζονται με την απάντηση των ωοθηκών στις γοναδοτροπίνες, καθώς βρέθηκε ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς και τον λόγο των ωοθυλακίων προς τα ωάρια. Στην



ταυτόχρονη ωρίμανση πολλών ωοθυλακίων μετά από διέγερση των ωοθηκών με γοναδοτροπίνες, ο λόγος των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τα ωάρια που λαμβάνονται την ημέρα της ωοληψίας είναι ενδεικτικός για την ικανότητα να γονιμοποιηθούν. Φυσιολογικά, αυτός ο λόγος πρέπει να είναι γύρω στη μονάδα, αν η ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων έγινε με τη σωστή πρόσληψη ορμονών από το κάθε ωοθυλάκιο. Υψηλοί λόγοι δείχνουν την ύπαρξη πολλών κυστικών-ατρητικών ωοθυλακίων. Αυτό υποδεικνύει μειωμένη ή υπερβολική πρόσληψη οιστρογόνων, οπότε και τα ωοθυλάκια που στρατολογούνται σε τέτοιο περιβάλλον θα έχουν μειωμένες πιθανότητες φυσιολογικής ανάπτυξης και ωρίμανσης.

Σαν αποτέλεσμα, φαίνεται ότι οι γυναίκες που φέρουν τους πολυμορφισμούς δίνουν μικρότερους αριθμούς ωαρίων σε σχέση με τα αναρροφούμενα ωοθυλάκια. Αυτό είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Μια υπόθεση είναι ότι η ύπαρξη των πολυμορφισμών επιφέρει μια ενδογενή ανεπάρκεια στον υποδοχέα ESR να μεταδώσει την οιστρογονική δράση και αυτή η τροποποιημένη δράση θα έχει επίπτωση σε όλους τους μηχανισμούς όπου εμπλέκονται τα οιστρογόνα.

Στη μελέτη αυτή, ο συχνός πολυμορφισμός PvuII εμφανίζεται στον φαινότυπο κατά 68% στις ομόζυγες γυναίκες, που σημαίνει ότι το 70% περίπου των γυναικών με γονότυπο PP εμφανίζουν ποσοστό κυστικών - ατρητικών ωοθυλακίων μεγαλύτερο του 2. Το ποσοστό στις ετερόζυγες γυναίκες είναι 59% , ενώ στις γυναίκες που δεν τον φέρουν παρουσιάζεται σ' ένα ποσοστό μόλις 33%. Στο γράφημα 2 γίνεται εμφανής η φαινοτυπική έκφραση του PvuII ανάμεσα στις γονοτυπικές ομάδες PP, Pp και pp.

Το γεγονός ότι εμφανίζεται σε ποσοστό άνω του 50% στις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας δείχνει ότι έχει επικρατούσα επίδραση στον φαινότυπο. Αυτό φαίνεται και από τη στατιστική ανάλυση ανάμεσα στις τρεις ομάδες PP, Pp και pp σε σχέση με το ποσοστό της γενετικής προδιάθεσης: υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες PP και pp και Pp και pp ($p < 0.001$) ενώ δεν υπάρχει ανάμεσα στις PP και Pp.

Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η γενετική προδιάθεση του πολυμορφισμού PvuII στον πληθυσμό είναι σημαντική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός παράγοντας αν συνδυαστεί και με άλλες παραμέτρους.



Ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι η χαμηλή παρουσία ενός συγκεκριμένου γονότυπου (του PP), στις κήσεις που προέρχονται από IVF. Επομένως, ο συνδυασμός του γονότυπου PP με την γενετική προδιάθεση (λόγος ωοθυλακίων / ωάρια >2) και την ηλικία (άνω των 35 ετών) μπορεί να μας δώσει έναν προγνωστικό παράγοντα όσον αφορά την έκβαση της IVF και την επίτευξη της κύησης.

Καθόσον οι πολυμορφισμοί PvuII και BstUI είναι απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων, η απλώς μια ποικιλία στον αριθμό των επαναλήψεων στην περίπτωση του δινουκλεοτιδίου TA, δεν καταλήγουν σε αλλαγές αμινοξέων στην διάταξη της πρωτεΐνης και επομένως δεν εμφανίζονται άμεσα στον φαινότυπο. Πιθανότατα, οι πολυμορφισμοί και οι συνεπαγόμενοι απλότυποί τους να συνδέονται γενετικά με μεταλλάξεις, ή διαφοροποιημένες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου, και σε συνέργια να επηρεάζουν την δράση του υποδοχέα καθοριστικά.

Όσον αφορά τη δινουκλεοτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία TA, φαίνεται πως υπάρχει γενετική σύνδεση με τον πολυμορφισμό PvuII, καθώς είναι αρκετά ξεκάθαρη η ομαδοποίηση των TA επαναλήψεων σε αντιστοιχία με τους ομόζυγους γονότυπους του PvuII (12-18 επαναλήψεις συναντώνται στην ομάδα PP, ενώ 19-27 στον φυσιολογικό τύπο pp). Κατά προέκταση, ο χαμηλός αριθμός επαναλήψεων συνδέεται με υψηλούς λόγους ωοθυλακίων προς ωάρια, και επομένως μεγαλύτερα ποσοστά ατρητικών ωοθυλακίων, ενώ ο υψηλός αριθμός επαναλήψεων με χαμηλούς λόγους.

Προοπτικές μελέτες που απορρέουν από τα συμπεράσματα

Από τα δεδομένα που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα, μπορούν να ξεκινήσουν παρεταίρω έρευνες για τη διαπίστωση τυχόν σχέσεων των πολυμορφισμών του γονιδίου του ESR με άλλες παθολογικές περιπτώσεις όπως ενδομητρίωση, υπερπλασία ενδομητρίου, καρκίνο του μαστού, οστεοπόρωση κ.λ.π.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα στην ενδομητρίωση δείχνουν ότι υπάρχει πολύ υψηλό ποσοστό του πολυμορφισμού PvuII (σε έναν πληθυσμό 40 γυναικών, μόνο 4 ήταν αγρίου τύπου), και χαμηλός αριθμός επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου TA (πράγμα αναμενόμενο λόγω της γνωστής γενετικής



σύνδεσης των δύο πολυμορφισμών, που όμως δρα και σαν επιβεβαίωση στα μέχρι τώρα αποτελέσματα).

Θα ήταν επίσης χρήσιμο να μελετηθεί ο συνδυασμός του υποδοχέα με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς με τους οποίους κάνει ετεροδιμερή. Μέχρι στιγμής, έχει γίνει μια προοπτική μελέτη στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (Γεωργίου και συν., 1997), πάνω στο ετεροδιμερές του ESR με τον υποδοχέα της βιταμίνης D, τον VDR, σε σχέση με τον μεταβολισμό των οστών. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο συνδυασμός των δύο μειονεκτικών υποδοχέων, του ESR και του VDR, έχει εμφανή επίπτωση στο σκελετικό σύστημα του πληθυσμού μελέτης, δίνοντας υψηλότερες τιμές οστεοκαλσίνης και χαμηλότερες οστικής πυκνότητας. (Η μελέτη αυτή έλαβε το πρώτο βραβείο στο 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, σαν προφορική ανακοίνωση).

Θα ήταν επίσης ωφέλιμο να μελετηθεί και σε ανδρικό πληθυσμό: αν υπάρχει σχέση με oligo-ή azoospermia, τότε ο υποδοχέας θα παίζει ρόλο στην σπερματογένεση και κατά προέκταση, στην ανδρική στέρωση.

Τέλος, θα ήταν καλό να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά και σε άλλους πληθυσμούς, καθώς ο πληθυσμός της Ηπείρου είναι ένας αρκετά αμιγής πληθυσμός.

Η βαθύτερη μελέτη του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος θα διαφωτίσει τα αίτια διαφόρων δυσλειτουργιών και θα βοηθήσει στην πρόληψη ή και την κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση τους. Το επόμενο βήμα είναι η ανακάλυψη αρχικά ενός διαγνωστικού παράγοντα όσον αφορά την γονιμότητα σε σχέση με τον υποδοχέα, και μακροπρόθεσμα, όταν η διαγονιδιακή θεραπεία γίνει πραγματικότητα, η αντιμετώπιση διαφόρων μορφών στέρωσης δια μέσου της αποκατάστασης των ελαττωματικών αυτών γονιδίων.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή παρουσιάζει στοιχεία που δείχνουν ότι η γενετική ποικιλομορφία του ESR γονιδίου επιφέρει ποικιλομορφία στο περιεχόμενο των ωοθυλακίων μετά από διέγερση με γοναδοτροπίνες και πιθανότατα επιδρά και στην εμφύτευση. Κάποιοι σπάνιοι γονότυποι και απλότυποι του ESR φαίνεται να συμβάλλουν σε μειονεκτική γονιμότητα, στο μέτρο μιας μη αποτελεσματικής ρύθμισης των οιστρογόνων στο ενδομήτριο και στην ωρίμανση των ωοθυλακίων.

Έτσι:

- Το γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων (ESRG) σχετίζεται με την στέρωση. Η ύπαρξη διαφόρων μειονεκτικών πολυμορφισμών ασκεί επιβαρυντική δράση στην ωρίμανση των ωοθυλακίων, συμβάλλοντας έμμεσα στην υπογονιμότητα.
- Η ύπαρξη του μειονεκτικού γονότυπου (PP) για τον πολυμορφισμό PvuII, επιφέρει μεγαλύτερο αριθμό κυστικών-ατρητικών ωοθυλακίων.
- Η παρουσία του απλότυπου που περιλαμβάνει τους δύο πολυμορφισμούς PvuII και BstUI είναι πολύ σπάνιος και παρών μόνο στην ομάδα IVF.
- Ο αριθμός των κυήσεων των γυναικών που φέρουν τον πολυμορφισμό PvuII σε ομοζυγωτία είναι σημαντικά χαμηλότερος.
- Υπάρχει ισχυρή γενετική σύνδεση ανάμεσα στον πολυμορφισμό PvuII και την διουκλεοτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n.
- Η γενετική προδιάθεση που καθορίζεται από τον πολυμορφισμό PvuII είναι σημαντική (σε περιπτώσεις ομοζυγωτίας PP, το ποσοστό προδιάθεσης είναι περίπου 70%), ενώ η φαινοτυπική έκφραση του πολυμορφισμού δείχνει ότι επικρατεί του φυσιολογικού τύπου.
- Ο συνδυασμός τριών παραγόντων, του γονότυπου PP, της φαινοτυπικής έκφρασης του πολυμορφισμού (λόγος ωοθυλακίων / ωάρια >2) και της ηλικίας (άνω των 35 ετών), δίνει έναν προγνωστικό παράγοντα όσον αφορά την έκβαση της IVF και την επίτευξη της κύησης.

Οι μειονεκτικοί πολυμορφισμοί του ESR δεν φαίνεται να επιφέρουν στέρωση από μόνοι τους, αλλά αν η στέρωση ήδη υπάρχει, η γενετική ποικιλομορφία θα μπορούσε να χρησιμεύσει για την πρόγνωση της απόκρισης των ωοθηκών



και την πιθανότητα εγκυμοσύνης παρόλο που αυτό χρειάζεται διερεύνηση σε ευρύτερο πληθυσμιακό δείγμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την λειτουργικότητα των γονιδίων με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η δράση τους και κατά προέκταση οι μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχουν.

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν τρεις πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων (ESR): ένας συχνός (ο RvuII), ένας σπάνιος (ο BstUI), και μια μικροδορυφορική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n.

Η μελέτη διεξήχθη σε γυναίκες που υπέστησαν διέγερση ωοθηκών με γοναδοτροπίνες για Εξωσωματική Γονιμοποίηση και Εμβρυομεταφορά.

Συγκρίθηκαν οι γονότυποι και απλότυποι των γυναικών ως προς τους πολυμορφισμούς RvuII και BstUI, με τον λόγο των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τα ωάρια που ελήφθησαν τη μέρα της ωοληψίας και διευκρινίσθηκε η σχέση του πολυμορφισμού RvuII μετρώντας τις κυήσεις σε κάθε γονότυπο. Διερευνήθηκε γονιδιακή συσχέτιση ανάμεσα στον συχνό πολυμορφισμό RvuII και την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n και τέλος, μελετήθηκε η γενετική προδιάθεση του πληθυσμού στον πολυμορφισμό RvuII.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι:

α) Ο πολυμορφισμός RvuII επηρεάζει τον λόγο των αναρροφούμενων ωοθυλακίων προς τα ωάρια. β) Ο απλότυπος που περιλαμβάνει και τους δύο πολυμορφισμούς RvuII και BstUI είναι πολύ σπάνιος και ανευρέθη μόνο στον πληθυσμό IVF και καθόλου στον πληθυσμό ελέγχου. γ) Το ποσοστό των κυήσεων ήταν σημαντικά χαμηλότερο στις γυναίκες που ήταν ομόζυγες ως προς τον πολυμορφισμό RvuII. δ) Υπάρχει γονιδιακή συσχέτιση ανάμεσα στον συχνό πολυμορφισμό RvuII και την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA)_n. ε) Η γενετική προδιάθεση του πολυμορφισμού RvuII στον πληθυσμό είναι ισχυρή και μάλιστα επικρατεί του φυσιολογικού τύπου.

Συμπερασματικά, η γενετική ποικιλομορφία του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων (ESR) συμβάλλει στην διαφοροποίηση της απόκρισης των



ωοθηκών στην διέγερση με γοναδοτροπίνες κατά την θεραπεία με Εξωσωματική Γονιμοποίηση. Πιθανότατα επηρεάζει και την εμφύτευση καθώς υπάρχει συσχέτιση με τον αριθμό των κυήσεων.

SUMMARY

Maturation of follicles is a mechanism depending on many factors. Estrogens have an important role in follicular development.

Estrogen act through proteinic molecules, the Estrogen Receptors, the genetic condition of which is essential for the mediation of Estrogen's activity. Mutations and polymorphisms have a great influence in the condition and function of genes, affecting their action and probably the mechanisms that they are involved.

In humans, several polymorphisms and mutations in the ESR gene have been identified. Experimental evidence have shown that mice lacking estrogen receptor (ESR) gene, are infertile with cystic ovaries and follicular arrest.

This study is a prospective analysis of three polymorphisms in the ESR gene: a common one (PvuII), a rare one (BstUI) and a microsatellite (TA)_n repeat polymorphism.

During IVF procedure, ovaries' stimulation concludes in multiple maturation of follicles giving a number of oocytes the day of egg collection. The ratio between the number of follicles attrieved, to the number of oocytes collected, presents the "stimulation index" and reflects the ratio of the normally matured follicles: Ratios higher than 1 imply the existence of cystic-atretic follicles.

Materials and methods

Analysis was carried out on DNA samples from women undergoing ovarian stimulation for IVF, and controls, having at least one birth. DNA was extracted from blood samples and PCR amplification was followed by electrophoresis for the assesment of the polymorphisms. The (TA)_n polymorphism was located by the autoradiography procedure, while the two others, PvuII and



BstUI, by agarose gel electrophoresis, after digestion by the corresponding restriction enzymes.

Comparisons were done between:

1. The three Pvull and BstUI genotypes, concerning the mean numbers of follicles and oocytes and the mean ratios of follicles to oocytes harvested in, at least, two consecutive cycles.
2. The Pvull and BstUI haplotype combination.
3. The number of pregnancies in every group of the Pvull polymorphism.
4. The three Pvull genotypes and the numbers of the TA repeats.
5. The genetic predisposition of the Pvull polymorphism.

Results

1. Significantly lower ratios were identified in the group lacking Pvull polymorphism, compared to the groups with heterozygous or homozygous Pvull polymorphism ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).
2. The haplotype including the Pvull and the BstUI polymorphisms was very rare and found only in the IVF group.
3. There is a very significant genetic linkage between the Pvull polymorphism and the TA repeats.
4. The number of pregnancies was significantly lower in the group of patients having Pvull in homozygosity ($p < 0.05$).
5. The genetic predisposition of the Pvull polymorphism on the IVF group was very high (68% at the PP women, 59% at the Pp and 33% at the pp group).

Discussion

In conclusion, genetic variability of the ESR gene is essential for the Estrogen activity and affect ovarian response to gonadotropins, in terms of the percentage of cystic-atretic follicles per cycle of IVF. ESR gene status possibly affects implantation since there is an effect in the number of pregnancies, in women carrying the disadvantageous genotypes.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχία βάσεων από το "Human m RNA for oestrogen receptor".

NID: g31233, GENBANK.

Αυτή η αλληλουχία περιλαμβάνει όλο το c DNA του γονιδίου του υποδοχέα που αποτελείται από 6.322 νουκλεοτίδια και 8 εξώνια. Προέκυψε με κλωνοποίηση κυττάρων MCF-7 από καρκίνο του μαστού. Διακρίνουμε το τμήμα του DNA που ορίζεται από τους εκκινητές του πολυμορφισμού BstUI πάνω στο εξώνιο 1, ενώ λίγο παρακάτω, βλέπουμε τον εκκινητή P₂ του πολυμορφισμού PvuII στο εξώνιο 2. Ο εκκινητής P₁, δεν φαίνεται, καθώς εντοπίζεται στο εσώνιο 1 που δεν περιλαμβάνεται στο c DNA.

```

1 gagttgtgcc tggagtgatg tftaagccaa tgtcagggca aggcaacagt ccttggccgt
61 cctccagcac ctttgaatg catatgagct cgggagacca gtacttaag ttggaggccc
121 gggagcccag gagctggcgg agggcgttcg tcctgggagc tgcacttgct ccgtcgggtc
181 gccggcttca ccggaccgca ggctcccggg gcagggccgg ggccagagct cgcgtgtcgg
241 ccggacatgc gctgcgtcgc ctctaaccctc gggctgtgct cttttccag gtggccccgc
301 ggtttctgag cttctgccc tgcggggaca cggctgcac cctgcccgcg gccacggacc
361 atgacatga cctccacac caaagcatct gggatggccc tactgcatca gatccaaggg
421 aacgagctgg agcccctgaa ccgtccgcag ctcaagatcc cctggagcg gccctgggc
481 gaggtgtacc tggacagcag caagcccgcg gtgtacaact accccgaggg cgccgcctac
      [→B1 .....]
541 gagttcaacg ccgcggccgc cgccaa'cgcg caggtctaag gtcagaccgg cctcccctac
601 ggccccgggt ctgaggctgc ggcgttcggc tccaacggcc tggggggttt cccccactc
661 aacagcgtgt ctccgagccc gctgatgcta ctgaccgcg cgccgcagc't gtcgccttc
      ..... B2 ←]
721 ctgcagcccc acggccagca ggtgccttac tacctggaga acgagcccag cggctacacg
----- primer P2 ←]
781 gtgcgcgagg ccggcccgcg ggcattctac aggccaaat't cagataatcg acgccagggt
841 ggcagagaaa gattggccag taccaatgac aagggaagta tggctatgga atctgccaag
901 gagactcgtc actgtgcagt gtgcaatgac tatgcttcag gctaccatta tggagtctgg
961 tcctgtgagg gctgcaaggc ctcttcaag agaagtatc aaggacataa cgactatag
1021 tgtccagcca ccaaccagtg caccattgat aaaaacagga ggaagagctg ccaggcctgc
1081 cggctccgca aatgctacga agtgggaatg atgaaagggtg ggatacgaaa gaccgaaga
1141 ggagggagaa tgttgaacaa caagcgcag agagatgatg gggagggcag gtgaagtg
1201 gggctcgtg gagacatgag agctgccaac ctttggccaa gcccgctcat gatcaaagc
1261 tctaagaaga acagcctggc ctgtccctg acggccgacc agatggtcag tgccttgtg
1321 gatgctgagc ccccatact ctattccgag tatgatccta ccagaccctt cagtgaagct
1381 tcgatgatgg gcttactgac caacctggca gacagggagc tggttcacat gatcaactgg
1441 gcgaagaggg tgcaggcctt tgtggatttg accctccatg atcaggtcca cttctagaa
1501 tgtgcctggc tagagatcct gatgattggt ctgctcggc gctccatgga gcaccagtg
1561 aagctactgt ttgctcctaa cttgctctg gacaggaacc agggaaaatg ttagagggc
1621 atggtgagaa tcttcgacat gctgctggct acatcatctc ggtfccgcat gatgaatctg
1681 caggagagag agtttgtgtg cctcaaatct attatttgc ttaattctgg agtgtacaca
1741 tttctgtcca gcaccctgaa gtctctggaa gagaaggacc atatccaccg agtctggac

```



1801 aagatcacag acactttgat ccacctgatg gccaaaggcag gcctgaccct gcagcagcag
 1861 caccagcggc tggcccagct cctcctcctc ctctcccaca tcaggcacat gagtaacaaa
 1921 ggcatggagc atctgtacag catgaagtgc aagaacgtgg tggccctcta tgacctgctg
 1981 ctggagatgc tggacgccc aacgctacat gcgcccacta gccgtggagg gccatccgtg
 2041 gaggagacgg accaaagcca ctggccact gcgggctcta ctcatcgca ttccctgcaa
 2101 aagtattaca tcaggggga ggcagagggt ttccctgcca cagtctgaga gctccctggc
 2161 tcccacacgg tlcagataat cctgctgca tttaccctc atcatgcacc actttagcca
 2221 aattctgtct cctgcataca ctccggcatg catccaacac caatggcttt ctagalagt
 2281 ggccattcat ttgctgtc agttcttagt ggcacatctt ctgtctctg ttgggaacag
 2341 ccaaagggat tccaaggcta aatctttgta acagctctct tcccccttg ctatgtact
 2401 aagcgtgagg attcccgtag ctcttcacag ctgaactcag tctatgggtt ggggctcaga
 2461 taactctgtg catttaagct actgttagag acccaggcct ggagagtaga cattttgcct
 2521 ctgataagca cttttaaat ggctctaaga ataagccaca gcaaagaatt taaagtggct
 2581 cctttaattg gtgacttga gaaagctagg tcaaggggtt attatagcac cctctgtat
 2641 tctatggca atgcatcctt ttatgaaagt ggtacacctt aaagcttta tatgactga
 2701 gcagagtatc tgggtattgt caatcactt cccctatag gaatacaagg gccacacag
 2761 ggaaggcaga tcccctagt ttggcaagact tttttaact tgataactg cagattcaga
 2821 gtgtcctgaa gctctgccc tggcttccg gcatgggtt ccagtttaatt catgcctccc
 2881 atggacctat ggagagcaac aagttgatct tagttaagtc tccctatag agggataagt
 2941 tctgatttt tgttttatt ttgtgttac aaaagaaagc cctcccctc tgaacttga
 3001 gtaaggtcag ctccaggacc tgtccagtg ggcactgtac ttggatctc ccggcgtgtg
 3061 tgtgccttac acaggggtga actgttact gtgggtatgc atgatgaggg taaatggtag
 3121 ttgaaaggag caggggccct ggtgttgc attagccctgg gccatggagc tgaacagtac
 3181 ttgtgcagga ttgtgtggc tactagagaa caagagggaa agtagggcag aaactggata
 3241 cagttctgag cacagccaga ctgtctcagg tggccctgca caggctcag ctacctagga
 3301 acattcctg cagacccgc attgccttg ggggtgcctt gggatccctg gggtagcca
 3361 gctcttattc attcccagc gtggccctgg ttggaagaag cagctgcaa gtttagaca
 3421 gctgttcc tacaattggc ccagcacctt ggggcacggg agaagggagg ggaccgttg
 3481 tgtcactact caggctgact ggggcctgg cagattact atgccctgg tggtttagag
 3541 ataatccaaa atcaggggtt ggttgggga agaaaatcct cccctcct ccccgcccc
 3601 gttccctacc gctccactc ctgccagctc atttcttca atttcttg acctataggc
 3661 taaaaaagaa aggctcattc cagccacagg gcagcctcc ctgggcttt gcttctag
 3721 cacaattatg ggttacttcc ttttctta caaaaaagaa tgtttgattt cctctgggtg
 3781 acctattgt ctgtaattga aaccctattg agaggtagt tctgtttag ccaatgacc
 3841 aggtagctgc tgggcttct ctggtagt ctgtttgga aaagtggatt tcatcattt
 3901 ctgattgccc agttaagtga tcaccaaagg actgagaatc tgggagggca aaaaaaaaaa
 3961 aaaaagtttt tatgtcact taaattggg gacaattta tlatctgtg ttaaggatat
 4021 gcttaagaac ataattctt tttgtctgtt ttttaagaa gcacctagt ttgttaaga
 4081 agcacctat atagtataat atatatttt ttgaaattac attgctgtt tatcagaca
 4141 ttgaatgtag taattctgt ctggattaa ttgactggg ttaacatgca aaaaccaagg
 4201 aaaaatattt agtttttt tttttttg tatactttc aagctacctt gcatgtata
 4261 cagtcattta tgcctaaagc ctgggtatta ttcatltaa tgaagatcac atttcatc
 4321 aactttgta tccacagtag acaaaatagc actaatccag atgcctattg ttggatattg
 4381 aatgacagac aatctatgt agcaaagatt atgcctgaaa aggaaaatta ttcagggcag
 4441 ctaatttgc tttaccaaa atatcagtag taatatttt ggacagtagc taatgggtca
 4501 gtgggttctt tttatgttt atacttagat tttctttaa aaaaattaa ataaaacaaa
 4561 aaaaatttct aggactagac gatglaatac cagctaaagc caaacaatta tacagtggaa
 4621 ggtttacat tattcalcca atgttttct attcatgta agatactact acatttgaag
 4681 tgggcagaga acatcagatg attgaaatgt tggccaggg gctccagca actttggaaa



4741 tctctttgta ttttacttg aagtgccact aatggacagc agatatttc tggctgatgt
 4801 tggattggg ttaggaaca tgattaaaa aaaaaactct tgcctctgct tccccact
 4861 ctgaggcaag tfaaatgta aaagatgta tttatctgg gggctcaggt atgggggga
 4921 agtggattca ggaatctgg gaatggcaa tatattaaga agagtattga aagatttg
 4981 aggaaaatgg ttaattctgg gtgtcacca aggttcagta gaggccact ctgccctgga
 5041 gaccacaaat caactagct ctttacagc ctttctaaa atggcagctt cagttctaga
 5101 gaagaaagaa caacatcagc agtaaagtcc atggaatagc tagtggctg tgttcttt
 5161 cgccattgcc tagctggccg taatgattct ataatgcat catgcagcaa ttatgagagg
 5221 ctaggctc acaaagagaag accctatcaa ttaggttgc aaaatctaac ccctaaggaa
 5281 gtgcagctt tgattgatt tccctagtaa cctgcagat atgttaacc aagccatagc
 5341 ccatgcctt tgaggctga acaataagg gactactga taattactt tgatcacat
 5401 taagggttc tcacctgaa atctataca ctgaaatggc cattgattta ggccactggc
 5461 ttgagttact cttcccctg catgacactg attacaaata ctttctatt catacttcc
 5521 aattatgaga tggactgtg gtactgggag tgactactaa caccatagta atgtctaata
 5581 ttcacaggca gatctgctg gggaagctag ttatgtgaaa ggcaataaaa gtcatacagt
 5641 agctcaaaag gcaaccataa ttctcttgg tgcaagtct gggagcgtga tctagattac
 5701 actgcacat tccaagta atcccctgaa aactactct caactggagc aatgaactt
 5761 tggcccaaa tatccatct ttacagtagc ttaattatgc tctgttcca actgcattc
 5821 cttccaatt gaattaaagt gtggcctct ttttagtcat taaaattgt tttctaagta
 5881 atgctgcct ctattatggc actcaattt gcactgtct ttgagattc aagaaaaatt
 5941 tctattcatt ttttgcac caattgtgcc tgaacttta aaatatgaa atgctgcat
 6001 gttccaaacc catcgtcagt gtgtgtgtt agagctgtc accctagaaa caacatact
 6061 gtccatgag cagggtcctg agacacagac cctttgcat tcacagagag gtcattggtt
 6121 atagagactt gaattaataa gtgacattat gccagttct gttctctac aggtgataaa
 6181 caatgcttt tgigactac atactctca gttagagct ctgtttat gggaaaaggc
 6241 tcaaatgcca aattgtgtt gatggattaa tatgccctt tggcagtgca tactattact
 6301 gatgtgactc ggtttgtc cagcttctt ttgttaatg aaacacactt gtaaactct
 6361 tttgacttt gaaaaagaat ccagcgggat gctcgagcac ctgtaaacaa ttttctcaac
 6421 ctattgatg tcaataaaa gaattaaact

Αλληλουχία βάσεων από το “H. Sapiens 5’ flanking region for estrogen receptor (breast) gene”.

NID: g31201, GENBANK.

Είναι ένα τμήμα του c DNA του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων, που προέκυψε από κλωνοποίηση με lambda EMBL III, κυτάρων όγκου από καρκίνο του μαστού. Διακρίνουμε το τμήμα που ορίζεται από τους εκκινητές του πολυμορφισμού (TA)_n, που βρίσκεται πάνω από το εξώνιο 1, γύρω στις 1174 βάσεις. Παρακάτω, πάνω στο εξώνιο 1, βλέπουμε την αλληλουχία των βάσεων από το τμήμα του DNA που ορίζεται από τους εκκινητές του πολυμορφισμού BstUI.



1 ggatccatgt gaacgccact gggaaatgag agacctcgtt cccaatcacg gtcagtgcaa
 61 ctcgaaagcc taaaatcagt taaaacaaa ggtatctacc tttatctat gttcatatcc
 121 taggctttta ataatacgtata ttttcacat gtttacagaa agcagtcaac tgagctatcc
 181 atggaaaggt ttgtgggttt ggtaacgaa gtgaggagta ttacatttca gctggaaaca
 241 catccctaga atgcaaaaac atttattcca aagtctgggt tcttggtgca atcggaggca
 301 tggcaatgcc tctgttcaga gactgggggc tagggccagt aaggcatttg atccacatgt
 361 atcccagaag gcttttattg ttaaattata ttctttcgga aaaaccaccc atgtcctatt
 421 ttgtaaactt gatatccata cacttttgac tggcattcta ttttagccgt aagactatga
 481 ttacagcaa gcctgtttt cctctgtctt ggggtggcag cagaaagcat agggfacttt
 541 ccagcctcca agggtagggg caaaggggct ggggtttctc tccccagta cagctttctc
 601 tggctgtgcc acactgtctc ctgtgagcag acagcaagtc tcccctcact cccactgcc
 661 atcatccag cgctgtgcag tagcccagct gcgtgtctgc cgggaggggc tgccaagtgc
 721 cctgcctact ggctgtctc cgaatccctg ccattccacg cacaacaca tccacacact
 781 ctctctgctt agttcacaca ctgagccatc gcacatgcga gcacattcct tcttctctc
 841 tcaactctc ggcccttgac ttctacaagc ccatggaaca ttctggaaa gacgttctg
 901 atccagcagg gtaggctgtt ttgattct ctctctgtag ctttagcatt ttgagaaagc
 961 aacttacctt tctggctagt gtctgtatcc tagcagggag atgaggattg ctgttctcca
 1021 tgggggtatg tgtgtctc cttttctt caggactgtt aggattctt gtgccattg
 1081 catataattt ggcaggttca ctttttaa gagccctatg aagtgtttt tgcattgtt
 1141 taaaaaggc attgaaaat tgaagtgtg atttatggaa attaatcat ctgtaaaaaa
 1201 ttgctttgga aagtaatgat tgctggccat aaagggaaat atctgcgatg cacctaattg
 1261 gttttaacc ctttattgc tgacaatcta tagtcaata tgctaaactc gattttggct
 1321 tcagctacat ttgcatattg tccaacaatg gtctatttt gtaagaatta gataaaatgt
 1381 atacttgata taaaatagtc aaaaatgtaa ctcttagtaa cagtaagctt ggcattttaga
 1441 tagaccatga accacttctg cagatactct gttgggtgtt tgggatagca attaaaacaa
 1501 agtattgata gttgatcag agtctattag gctgcagcaa aggaagtta ttcaaaagta
 [→ primer T₁]
 1561 taaactatcc aagattata'g acgcatgata tacttcacct atttttgtc tcttaatat
 1621 gtatatatat atatatatat atatatatat acacatatat gtgtgtgtgt atgtgcgtgt
 1681 gcatgtttaa ctttaattc agttaaanaac tttttctat ttgttttca tctggatatt
 1741 tgattctgc,a taccctagcc caagtgaacc gagaagatcg agttgtagga ctaaaggata
 -.primer T₂ ←]
 1801 gacatgcaga aatgcatttt aaaaatctgt tagctggacc agaccgacaa tgaacataa
 1861 ttgcaaaagc ttgggtcgt gacctgaggt taigtgtgt atgaaaaggt cacattttat
 1921 attcagtttt ctgaagtttt ggttgcaata ccaacctgtg gaaggcatga acacccatgt
 1981 gcgcctaac caaaggttt tctgaatcat cttcacatg agaattccta atgggacaa
 2041 gtacagtact gttgtccaac ataaacacac aagtcaggct gagagaatct cagaaggttg
 2101 tggagggttc tatctacttt gggagcattt tgcagaggaa gaaactgagg tcttggcagg
 2161 ttgcattctc ctgatggcaa aatgcagctc ttctatatg tataccctga atctccgcc
 2221 cttcccctc agatgcccc tctcagttcc cccagctgct aaatatagct gtctgtggct
 2281 ggctgcgtat gcaaccgcac acccattct atctgcccta tctcggttac agtgtagtcc
 2341 tccccagggt catcctatgt acacactacg ttttctagc caacgaggag ggggaatcaa
 2401 acagaaagag agacaaacag agatatactg gagtctggca cggggacat gcagcac
 2461 attagagaaa gccggcccc ggtaccgtct ttccggttla ttttaagccc agtcttccct
 2521 gggccacctt tagcagatcc tctgtcgcac ccgccccctg gccgtgaaac tcagcctcta
 2581 tccagcagcg acgacaagta aagtaaagtt caggaagct gctcttggg atgctcaaat
 2641 cgagtgtgc ctggagtgt gtttaagcca atgtcagggc aaggcaacag tccctggccc



2701 tctccagca ccttgtaat gcatatgagc tgggagacc agtactaaa gttggaggcc
 2761 cgggagccc'a ggagctggcg gagggcgffc gtctgggac tgcacttgc cccgtcgggt
 2821 cgccggctt caccggacc gcaggctccc ggggcagggc cggggccaga gctcgcgtgt
 2881 cggcgggaca tgcgctgctg cgccttaac ctgggctgt gctcttttc caggfggccc
 2941 gccggttct gagcctctg cctgcgggg acacggtctg cacctgccc gcggccacgg
 3001 accatgacca tgaccctcca caccaagca tctgggatgg ccctactgca tcagatcaa
 3061 gggaacgagc iggagccct gaaccgtccg cagctcaaga tcccctgga gcggcccctg
 3121 ggcgaggtgt acctggacag cagcaagccc gccgtgtaca actaccccga gggcggccc
 [→primer B₁
 3181 tacgagttca acgccgggc cgccgcaa'c ggcaggtct acggtcagac cggcctccc
 3241 tacggcccc ggtctgaggc tgcggcgttc ggtccaacg gcctggggg ttccccca
 3301 ctcaacagcg tgtctccgag cccgctgatg ctactgcacc cgccggcga gc,tgtgcc
 primer B₂ ←]



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adashi, E.Y., Hsueh, A.J. (1982) Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle- stimulating hormone in cultured granulosa cells. *J. Biol.Chem.*, 257, 6077-6083.
2. Adashi E., Resnik C., D' Ercole A., et al (1985) Insuline - like growth factors as antraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.* 6: 400-420.
3. Aittomaki K., de la Chapelle et al (1995) Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Causes Hereditary Hypergonadotropic Ovarian Failure. *Cell*, 82: 959-968.
4. Andersen T.I., Heindal, K.R., Skrede, M., Tveit, K., Berg, K., Borresen, A.L. (1994) Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum. Genet.*, 94: 665-670.
5. Anderson E., Albertini D. (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells, in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.* 71:680-686.
6. Baker T., Wai Sum O. (1976) Development of the ovary and oogenesis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 3: 3-26.
7. Basset D. (1943) The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat.* 73: 291-303.
8. Bauer-Dantoin A.C., Weiss J., Jameson J.L. (1996) Gonadotropin-releasing hormone regulation of pituitary follistatin gene expression during the primary follicle-stimulating hormone surge. *Endocrinology* 137 (5): 1634-1639.
9. Bellido T., Girasole G., Passeri G., Xiao- Peng Yu., Mocharla H., Jilka R., Notides A. and Manolagas S. (1993) Demonstration of Estrogen and Vitamin D receptors in bone marrow - derived stromal cells: up regulation of the estrogen receptor by 1.25-dihydroxyvitamin -D₃. *Endocrinology* 133(2): 553-562.
10. Bocquel M.T., Jumar V., Stricker C., Chambon P., Gronemeyer H. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 2581-2595.
11. Castagnoli A., Maestri, I., Bernardi, F., Del Senno, L. (1987) PvuII RFLP inside the human estrogen receptor gene. *N.A.R.*, 15, p. 866.
12. Chambraud B., Berry M., Redeuilh G., Chambon P., Baulieu E-E. (1990) *Biol. Chem.* 265, 20686 - 20691.
13. Chamness G.C., Mercer W.D., McGuire W.L. (1980) Are histochemical methods for estrogen receptor valid? *J. Histochem. Cytochem.* 28 (8): 792-798.
14. Ciocca D.R., Asch R.H., Adams D.J., McGuire W.L. (1983) Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 (3): 496-499.



15. Comhaire F.H. (1987) Simple model and empirical method for estimation of spontaneous pregnancies in couples consulting for infertility. *Int. J. Androl.* , 10: 671-680.
16. Coxhead D., Thomas E.J. (1993) Familial inheritance of endometriosis in a British population: A case control study. *J. Obstet. Gynaecol.* 13, 42-44.
17. Cummins J.M., Yovich, J.M., Edinsinghe, W.R., & Yovich, J.L. (1989) Pituitary down-regulation using leuprolide for the intensive ovulation management of poor prognosis patients having in-vitro fertilization (IVF) related treatments. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer.* 6, 345-352.
18. Darbon J., Knecht M., Ranta T., et al (1984) Hormonal regulation of cyclic AMP dependent protein kinase in cultured ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 259: 14778-14782.
19. De M., Sanford T.R., Wood G.W. (1993) Expression of interleukin 1, interleukin 6 and tumour necrosis factor α in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 97; 83-89.
20. Dietel M. (1987) What's new in receptor mediated growth promotion of normal and malignant cells? *Pathol Res Pract* 182 (3): 431-442.
21. Di Zegera G. S, Marut E. L., Turner C.K., Hodgen G.D. (1980) Assymetrical ovarian function during recruitment and selection of the dominant follicle in the menstrual cycle of the rhesus monkeys. *J. Clin. Endo. Metab.* 51: 698.
22. Di Zegera G., Hodgen G. (1981) Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocrine Reviews* 2: 27-36.
23. Edwards R.G., Fishel, S.B., Cohen, J., Fehilly, C.B., Purdy, J.M., Slater, J.M., Steptoe, P.C., Webster, J.M. (1984) Factors influencing the success of in Vitro Fertilization for Alleviating Human Infertility. *J. In Vitro Fert. Embr.Transfer*, 1 (1), 3-23.
24. Erickson G., Magoffin D., Dyer C., Hofeditz M. (1985) The ovarian androgen producing cells: A review of structure/ function terationships. *Endocr. Rev.* 6: 371-399.
25. Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854): 889-895.
26. Fawell SE., Lees JA., White R., Parker MG. (1990) *Cell* 60, 953-962.
27. Fishel S.B., Edwards, R.G., Walters, D.E. (1983) Follicular steroids as a prognosticator of successful fertilization of human oocyte in vitro. *J. Endocrinol.*, 99, 335-344.
28. Fowler R.E., Chan, S.T.H., Walters, D.E., Edwards, R.G., Steptoe, P.C. (1977) Steroidogenesis in human follicles approaching ovulation as judged from assay of follicular fluid. *J. Endocrinol.*, 72, 259-271.
29. Fowler R.E., Edwards, R.G., Walters, D.E., Chan, S.T.H., Steptoe, P.C. (1978) Steroidogenesis in preovulatory follicles of patients given human menopausal and chorionic gonadotrophins as judged by the



- radioimmunoassay of steroids in follicular fluid. *J. Endocrinol.*, 77, 161-169.
30. Franks S. (1996) The genetics of polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* 11, Abstract n. 137.
 31. Fuqua S.A.W., Chamness, G.C., Wc Guire, W.L. (1993) Estrogen Receptor Mutations in Breast Cancer. *J. Cell. Biochem.*, 51, 135-139.
 32. Georgiou I., Konstantelli M., Syrrou M., Messinis I.E., Lolis D.E. (1997) Oestrogen Receptor Gene Polymorphisms and Ovarian Stimulation for IVF. *Hum. Reprod.* 12(7); 1430-1433.
 33. Goldenberg R.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. (1972) Estrogen and follicle-stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90, 1492-1498.
 34. Gosden R.G., Boland N.I., Spears N., Murray A.A., Chapman M., Wade J.C., Zohdy N.I., Brown N. (1993) The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reprod. Med. Rev.* 2; 129-152.
 35. Gouson A. Rate of follicular growth in the human ovary. In: Rolland R., Van Hull E.V., Hillier S.G., McNatty K.P., Schomaker J. (eds) (1981) *Follicular maturation and ovulation*. Excerpta Medica. Amsterdam pp. 155-163.
 36. Greene G.L., Press M.F. (1986) Structure and dynamics of the estrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* 24 (1): 1-7.
 37. Hackeloer B.J., Fleming R., Robinson H.P., Adams A.H., Coutts J.R. (1979) Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135; 122-128.
 38. Han K.O., Moon I.G., Kang Y.S., Chung H.Y., Min H.K. and Han I.K. (1996) Nonassociation of Estrogen Receptor Genotypes with Mineral Density and Estrogen Responsiveness to Hormone Replacement Therapy in Korean Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82(4): 991-995.
 39. Hartshorne G.M., Sargent I.L., Barlow D.H. (1994) Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles in vitro in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Human Reproduction* 9(6); 1003-1012.
 40. Hillier S.G., Miro F. (1993) Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 687: 29-38.
 41. Hisaw F. (1974) Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.* 27: 95-119.
 42. Hodgen D. (1982) The dominant ovarian follicle. *Fert. Steril.* 38: 281-300.
 43. Hoff J., Quigley M.E. and Yen S.S.C. (1983) Hormonal dynamics at midcycle: A reevaluation. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57: 792.
 44. Hughes E.G., Federkow, D.M., Daya, S., Sagle, M., De Koppel, P. & Collins, J. (1992) The routine use of gonadotropin-releasing hormone



- agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Fertility and Sterility*, 58, 888-896.
45. Ignar-Trowbridge M. D., Nelson G. K., Bidwell C. M., Curtis W.S., Washburn F. T., Mac Lachlan A. J. and Korach S. K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4658- 4662.
 46. Ireland J.J., Richards, J.S. (1978) Acute effects of estradiol and follicle-stimulating hormone on specific binding of human [¹²⁵I] -iodo-follicle-stimulating hormone to rat ovarian granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 102, 876-883.
 47. Itch M., Igarashi M., Yamada K., Hasegawa Y., Seki M., Eto Y., Shibai H. (1990) Activin A stimulates meiotic maturation of the rat oocyte in vitro. *Bioch. Bioph. Res. Communications* 166 (3); 1479-1484.
 48. Korach K.S. (1994) Insights from the study of Animals lacking functional Estrogen Receptor. *Science* 266, 1524-1527.
 49. Kuiper-G., Enmark E., Peltto-Huikko M., Nilson S. and Gustaffson J. (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, (5925-5930).
 50. Kumar V., Chambon P. (1988) *Cell* 55, 145-156.
 51. Lehrer S., Sanchez M., Song H.K., Dalton J., Levine E., Savoretti P., Thung N.S. and Schachter B. (1990) Oestrogen receptor B- region polymorphism and spontaneouys abortion in women with breast cancer. *Lancet* 335: 622-624.
 52. Lehrer S.P., Schmutzler, R.K., Rabin, J.M., Schachter, B.S. (1993) An estrogen receptor genetic polymorphism and a history of spontaneous abortions. Correlation in women with estrogen receptor positive breast cancer but not in women with estrogen receptor negative breast cancer or in women without cancer. *Br. Canc. Res. Treat.*, 26, 175-180.
 53. Linkie D.M. (1977) Estrogen receptors in different target tissues: similarities of form—dissimilarities of transformation. *Endocrinology* 101 (6): 1862-1870.
 54. Lintern-Moore S., Moore G. (1978) Transcription of the mouse oocyte genome, *Biol. Reprod.* 20: 773-778.
 55. Louvet J.E., Hartman S.M., Schreiber J.R., Ross G.T. (1975) Evidence for a role of androgens in follicular maturation. *Endocrinology* 97: 366.
 56. Lolis D., Georgiou I., Syrrou M., Zikopoulos K., Konstantelli M. and Messinis I. (1996) Chromomycin A₃-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *International Journal of Andrology* 19:23-27.
 57. Lunenfeld B., Eschkol A., Peters H. (1970) Ovarian development in infant mice. Dependence on gonadotropic hormones. In *Gonadotropins and ovarian development*, edited by Butt W., Crooke A., Dyle M. Livingstone, London, England, pp: 249-258.



58. Λώλης Δ. (1995) Γυναικολογία και Μαιευτική. Τόμος 1^{ος}, κεφ. 28: Στείρωση. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα.
59. Λώλης Δ. (1997) Γυναικολογία και Μαιευτική. Τόμος 2^{ος}, κεφ. 1: Γονιμοποίηση του ωαρίου. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα.
60. Mader S., Kumar V., Vemeuil H., Chambon P. (1989) *Nature* 338, 271-274.
61. Marsh J. (1975) The role of cyclic AMP in gonadal function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 6: 137-199.
62. Mc Ewen, B.S. (1976) Steroid receptors in neuroendocrine tissues. Topography, subcellular distribution and functional implications in subcellular mechanisms. In: Naftolin, F., Ryan, K.J., Davis, I.J. (eds). *Reproductive neuroendocrinology*, Amsterdam, Elsevier, 277-285.
63. Messinis I.E., Templeton A.A. (1987) Relationship between intrafollicular levels of prolactin and sex steroids and in vitro fertilization of human oocytes. *Hum. Reprod.* 2, 607-609.
64. Moghissi K.S., Syner F.N., Evans T.N. (1972) A composite picture of the menstrual cycle. *Am. J. Obst. Gynecol.* 114: 405.
65. Nimrod A., Erickson G.F., Ryan K.J. (1976) A specific FSH receptor in rat granulosa cells. Properties of binding in vitro. *Endocrinology* 98: 56.
66. O' Malley B. (1990) The steroid receptor superfamily: More excitement predicted for the future. *Molecular Endocrinology* 4 (3), 363-369.
67. Osborn C.K., Elledge M.R. and Fuqua A.W. (1996) Estrogen receptors in breast cancer therapy. *Scientific American Science and Medicine* January \ February 32 - 41.
68. Partington M.W., York Moore D., Turner G.M., (1996) Confirmation of Early Menopause in Fragile X Carriers. *Am. J. Med. Gen.* 64: 370-372.
69. Pauestine C.J., Eddy C.A., Croxatto H.D., Hess R., Siler-Khodr T.M., Croxatto H.B. (1978) Temporal relationships of estrogen, progesterone and LH levels to ovulation in women and intrahuman primates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130: 876.
70. Pertschuk L.P., Tobin E.H., Gaetjens E., Carter A.C., Degenshein G.A., Bloom N.D., Brigati D.J. (1980) Histochemical assay of estrogen and progesterone receptors in breast cancer: correlation with biochemical assays and patients' response to endocrine therapies. *Cancer* 46 (12 Suppl): 2896-2901.
71. Peters H., Byskov A., Lintern-Moore S. et al. (1973) The effect of gonadotropin in follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 35: 139-141.
72. Press M.F., Nousek-Goebel N.A., Bur M., Greene G.L. (1986) Estrogen receptor localization in the female genital tract. *Am. J. Pathol.* 123 (2): 280-292.



73. Rabinovici J., Dandekar P., Angle M., Rosenthal S., Martin M. (1990) Insulin - like growth factor I (IGF-I) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles : correlation with serum IGF levels. *Fert. Ster.* 54(3); 428-433.
74. Richards J.S. (1975) Content of nuclear estradiol receptor complex in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology*, 97, 1174-1184.
75. Richards J.S., Ireland, J.J., Rao, M.C., Bernath, G.A., Midgley, A.R. Jr, Reichert, L.E. Jr. (1976) Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology*, 99, 1562-70.
76. Richards J.S. (1979) Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog. Horm. Res.* 35: 343.
77. Richards J.S. (1980) Maturation of ovarian follicles: Action and interaction of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60: 51-89.
78. Robinson G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. (1968) Cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 37; 149-174.
79. Roy S.K. and Greenwald G.S. (1986) Effects of FSH and LH on incorporation of [3H] thymidine into follicular DNA. *J. Reprod. Fert.* 78;201-209.
80. Roy S.K. and Greenwald G.S. (1988) In vitro effects of Follicle - Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Prolactin on Follicular Deoxyribonucleic Acid synthesis in the hamster. *Endocrinology* 122(3); 952-958.
81. Roy S.K. and Greenwald G.S. (1989) Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long - term culture. *J. Reprod. Fert.* 87; 103-114.
82. Roy S.K. and Treacy B.J. (1993) Isolation and long - term culture of human preantral follicles. *Fert. Ster.* 59(4); 783-790.
83. Sano M., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., Emi, M., Shiraki, M., Orimo, H. (1995) Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism in osteoporosis. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 217, 378-383.
84. Schmutzler K. R., Sanchez M., Lehrer S., Chaparro A. C., Philips C., Rabin J. and Schachter B. (1991) Incidence of an estrogen receptor polymorphism in breast cancer patients. *Breast Canc. Res. and Treatment* 19, 111-117.
85. Schreiber J.R., Ross G.T. (1976) Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear trans-location. *Endocrinology* 99: 590.
86. Shoham Z., Schachter M. (1996) Estrogen biosynthesis - regulation, action, remote effects and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertility and Sterility* 65 (4), 687-701.



87. Slemenda C.W., Christian J.C., Williams C.J., Norton J.A. and Johnston C.C. Jr (1991) *J. Bone Miner. Res.* 6: 561-567.
88. Smith E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahishi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S. (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. *NEJM*, 331 (16), 1056-61.
89. Taylor J.A., Li, Y., You, M., Wilcox, A.J., Lin, E. (1992) B region variant of the estrogen receptor gene *N.A.R.*, 20, p. 2895.
90. Testart J., Frydman, R., De Mouzon, J., Lassale, B., Belasscl, J.C. (1983) A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. I. Influence of ovarian stimulation upon the number and condition of oocytes collected. *Biol. Reprod.*, 28 (2), 415-424.
91. Tora L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., Chambon, P. (1989) The cloned human estrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding proteins. *EMBO J.*, 8(7), 1981-6.
92. Tsafiri A., Pomerantz S., Channing C. (1982) Inhibition of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 64: 541-551.
93. Tsafiri A., Vale W., Hsueh J.W. (1989) Effects of Transforming Growth Factors and Inhibin -related proteins on rat preovulatory Graafian Follicles in vitro. *Endocrinology* 125(4); 1857-1862.
94. Turner I.M., Saunders P.T., Shimashki S., Hillier S.G. (1989) Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 125; 2790-2792.
95. Vignon F., Capony F., Chambon M., Freiss G., Garcia M., Rochefort H. (1986) *Endocrinology* 118 (4): 1537-1545.
96. Watson H., Franks S. and Bonney R.C. (1996) Regulation of epidermal growth factor receptor by ovarian steroids in human endometrial cells in culture. *J. of Reproduction and Fertility* 107, 199-205.
97. Welsh T.H., Zhuang, L.Z., Hsueh, A.J. (1983) Estrogen augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone biosynthesis in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 112, 1916-1924.
98. Wolf D.M., Jordan, V.C. (1994) The estrogen receptor from a tamoxifen stimulated MCF-7 tumor variant contains a point mutation in the ligand binding domain. *Breast Canc. Res. Treat.*, 31 (1), 129-38.
99. W.S.O., Robertson D.M., Kretser D.M. (1989) Inhibin as an oocyte inhibitor. *Mol. Cell. Endoc.* 62; 307-311.
100. Yaich L., Dupont, W.D., Cavener, D.R., Parl, F.F. (1992) Analysis of the PvuII restriction fragment length polymorphism and exon structure of the Estrogen Receptor Gene in Breast Cancer and Peripheral Blood. *Cancer Res.*, 52, 77-83.
101. Yamamoto K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.*, 19, 202-252.



102. Young J.R., Jeffe R.B. (1981) Strength duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to GnRH in women:II. Effects of varying concentrations of estradiol. J. Cl. Endocr. Metab. 42: 432.

