



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BMP-2»

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Ιωάννης Ε. Μεσσήνης – Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Ασπασία Τσέζου – Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής – Κλινικός Εμβρυολόγος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΩΘΗΚΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ- ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	4
ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΣΤΙΣ ΩΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	5
<i>TGF-β παράγοντες</i> ,	7
ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ	8
<i>BMPs</i>	13
<i>Δράση της BMP-2 - έρευνες σε διάφορα αναπτυξιακά μοντέλα</i>	16
ΣΚΟΠΟΣ	21
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	22
ΥΛΙΚΑ	22
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
<i>Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων</i>	22
<i>Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων</i>	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
<i>Παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες καλλιέργειας</i>	27
<i>Παραγωγή προγεστερόνης στις 48 ώρες καλλιέργειας</i>	29
<i>Παραγωγή προγεστερόνης στις 72 ώρες καλλιέργειας</i>	30
<i>Παραγωγή οιστραδιόλης στις 24 ώρες καλλιέργειας</i>	32
<i>Παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες καλλιέργειας</i>	33
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
ABSTRACT	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται πολλές έρευνες γύρω από την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και των παραγόντων που λαμβάνουν χώρα σ' αυτήν. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ελέγχεται από τη δράση των γοναδοτροπινών, καθώς και από ωοθηκικούς, παρακρινικούς και αυτοκρινικούς παράγοντες.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα, απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες BMP (Bone Morphogenetic Proteins), που είναι μέλη της οικογένειας των TGF- β (Transforming growth factor β) παραγόντων και δρουν αυτοκρινικά και παρακρινικά, καταλαμβάνουν σημαντική θέση στην γονιμοποιητική ικανότητα των θηλαστικών. Οι BMPs έχουν ρόλο κλειδί στην γυναικεία υπογονιμότητα, ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως την στεροειδογένεση και την μίτωση στα κοκκώδη κύτταρα (Shimasaki et al., 2003; Shimasaki et al., 2004).

Στην μελέτη αυτή εστιάσαμε στην επίδραση της πρωτεΐνης BMP-2 στην στεροειδογένεση, σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που συμμετείχαν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να ελέγξουμε την επίδραση της ορμόνης και σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Παλαιότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα, έχουν δείξει την επίδραση της BMP-2 στην στεροειδογένεση, και πιο συγκεκριμένα στην παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Η δράση της BMP-2 στην στεροειδογένεση συσχετίζεται με τη φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων και συνεπώς και με τη γονιμότητα της γυναίκας.

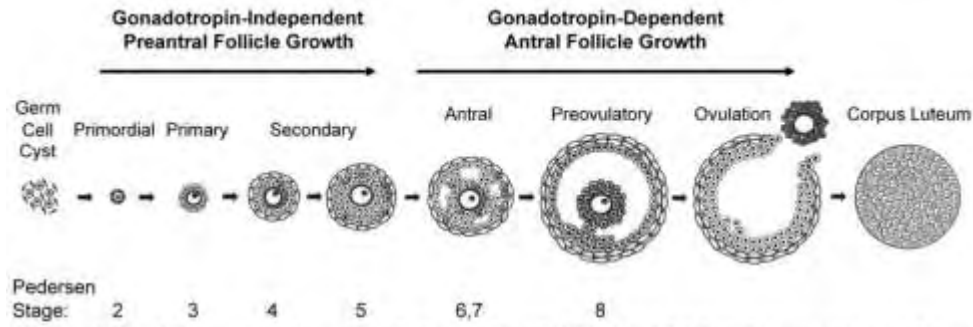
Τα πειράματα περιελάμβαναν τεχνικές καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων με προσθήκη ορμονών-διεγερτών (FSH, BMP-2, Ανδροστενδιόνη) με απώτερο σκοπό την επαγωγή της στεροειδογένεσης. Τα επίπεδα έκκρισης της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της Elisa. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πρόγραμμα one-way ANOVA. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η ορμόνη BMP-2 (100ng/ml), δρώντας μόνη της ή σε συνεργασία με την FSH (10ng/ml) επάγει την παραγωγή της οιστραδιόλης ενώ αντίθετα αναστέλει την παραγωγή της προγεστερόνης.

Εισαγωγή

Η ωοθήκη των θηλαστικών αποτελεί ένα ιδιαίτερα δυναμικό όργανο στο οποίο ένας μεγάλος αριθμός ωοθυλακίων εξαλείφεται κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας. Οι ωοθήκες έχουν δύο βασικές λειτουργίες, την παραγωγή του ωαρίου και την έκκριση των ορμονών. Το ωάριο στο στάδιο ανάπτυξης του ωοθυλακίου υφίσταται μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές. Το μέγεθος του αυξάνει από 20 μm στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου σε 80 μm στο στάδιο του δευτερογενούς. Επιπλέον το ίδιο το ωοκύτταρο με την έκκριση διαφόρων πρωτεϊνικών ουσιών, και διαφόρων αυξητικών παραγόντων, όπως TGF- β 2, FGF-8, GDF-9 κ.λ.π, είναι σε θέση να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων (Trombly et al., 2009). Έρευνες των τελευταίων δεκαετιών, διευκρίνησαν τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και της ατρησίας, στις ωοθήκες των θηλαστικών. Οι λειτουργίες αυτές ρυθμίζονται εκτός από τις γοναδοτροπίνες, από τα ωοθηκικά στεροειδή και κάποιους αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες (Matsuda et al., 2012).

Ωοθηκική λειτουργία- σχηματισμός κοκκωδών κυττάρων

Η λειτουργία των ωοθηκών στη γυναίκα αρχίζει με την ήβη και τελειώνει με την εμμηνόπαυση. Η περίοδος της ωοθηκικής λειτουργίας μεταξύ της ήβης και της εμμηνόπαυσης ονομάζεται αναπαραγωγική, ενώ πριν την ήβη προηβική. Η ωρίμανση των ωοθυλακίων περιλαμβάνει δύο κύριες φάσεις. Τη στρατολόγηση και την επιλογή. Η στρατολόγηση διακρίνεται στην αρχική, η οποία συμβαίνει στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου και στην κυκλική, η οποία γίνεται στο στάδιο της κατηγορίας 5 (Εικόνα 1) και συγκεκριμένα στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης. Το αρχέγονο ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται από το ωοκύτταρο και περιβάλλεται από ένα στοίχο επίπεδων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν την αρχική μορφή των κοκκωδών κυττάρων και σχηματίζονται πριν ή αμέσως μετά τη γέννηση (Edson et al., 2009).



Εικόνα 1. Ταξινόμηση ωοθυλακίων στα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια. (Τροποποιημένη από Edson et al., 2009).

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε πρωτογενές και χαρακτηρίζεται από το ότι τα κοκκώδη κύτταρα από επίπεδα γίνονται κυβοειδή. Το πρωτογενές μετατρέπεται σε δευτερογενές με πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων σε πολυάριθμους στοίχους και με την ανάπτυξη της διαφανούς ζώνης μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων. Η στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρων ονομάζεται κοκκώδης στοιβάδα και γύρω από αυτή σχηματίζεται μία δεύτερη στοιβάδα κυττάρων, την λεγόμενη έσω θήκη (Εικόνα 1). Τα κύτταρα της θήκης αρχίζουν να εμφανίζονται και να σχηματίζουν τη στοιβάδα τους γύρω από τα κοκκώδη μετά τον σχηματισμό του δευτερογενούς ωοθυλακίου (Hirshfield AN., 1991). Στο στάδιο αυτό αρχίζει και ο σχηματισμός του άντρου και το ωοθυλάκιο ονομάζεται αρχόμενο κοιλοτικό. Η κοιλότητα έχει αναπτυχθεί σημαντικά στο ώριμο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο, και τα κύτταρα που περιβάλλουν το ωοκύτταρο σχηματίζουν τον ακτινωτό στέφανο σε μία περιοχή της κοκκώδους στοιβάδας, η οποία ονομάζεται ωοφόρος λόφος. Το προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο θα υποστεί την ρήξη, έτσι ώστε να απελευθερώσει το ωοκύτταρο και να μετατραπεί στη συνέχεια σε ωχρό σωματίο (Edson et al., 2009).

Ορμόνες που δρουν στις ωοθήκες και επηρεάζουν τη γονιμότητα

Η αναπαραγωγική ηλικία στη γυναίκα εξαρτάται από τη σωστή λειτουργία του άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-ωοθήκης. Ο υποθάλαμος εκκρίνει την ορμόνη GnRH, η οποία επιδρά στην υπόφυση και προκαλεί την έκκριση των δύο γοναδοτροφινών, FSH και LH. Οι FSH και LH επιδρούν στις ωοθήκες και προκαλούν την έκκριση ωοθηκικών ορμονών, οι οποίες με τη σειρά τους ασκούν αρνητικές και θετικές επιδράσεις στον υποθάλαμο και

την υπόφυση. Σε πολλά οικόσιτα ζώα η ανάπτυξη του ωοθυλακίου που δεν έχει σχηματίσει ακόμα άντρο, δεν απαιτεί τη δράση των υποφυσιακών γοναδοτροπινών (Εικόνα 1), αντίθετα, από τις γοναδοτροπίνες εξαρτάται η ανάπτυξη του ωοθυλακίου που ήδη έχει σχηματίσει άντρο (Edson et al., 2009; Webb et al., 2007).

Έχει καθιερωθεί ότι η FSH αποτελεί την κυρίαρχη ορμόνη που ελέγχει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, στα περισσότερα αναπτυξιακά στάδια των ωοθυλακίων. Υποδοχείς της FSH εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα προ-κοιλοτικών ωοθυλακίων (Roy et al., 1987). Όσον αφορά όμως στο χρονικό διάστημα που το ωοθυλάκιο είναι προκοιλοτικό, έχει βρεθεί ότι η FSH δεν συμμετέχει στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, στον άνθρωπο. Μία λογική εξήγηση είναι ότι τα πρωτογενή ωοθυλάκια εντοπίζονται σε περιοχή της ωοθήκης που απουσιάζουν αγγεία, με αποτέλεσμα να δρουν σ' αυτά τοπικοί παράγοντες. (Van Wezel and Rodgers, 1996). Παρ' όλα αυτά δεν είναι ακόμα σαφές εάν η ορμόνη FSH παίζει ρόλο στον μηχανισμό της αρχικής στρατολόγησης. Σε πειραματόζωα, έχει διαπιστωθεί ότι η FSH παρουσία κυκλικού GMP καταστέλλει τη απόπτωση και διεγείρει *in vitro*, την αύξηση των προκοιλοτικών ωοθυλακίων (McGee et al., 1997). Τα ωοθυλάκια που συγκεντρώνουν ικανές ποσότητες FSH και ικανό αριθμό υποδοχέων της ορμόνης αυτής, είναι σε θέση να παράγουν αρωματάση. Το ένζυμο αυτό, αρωματοποιεί ανδρογόνα σε οιστρογόνα και έτσι το περιβάλλον οιστρογονοποιείται και το ωοθυλάκιο επιζεί.

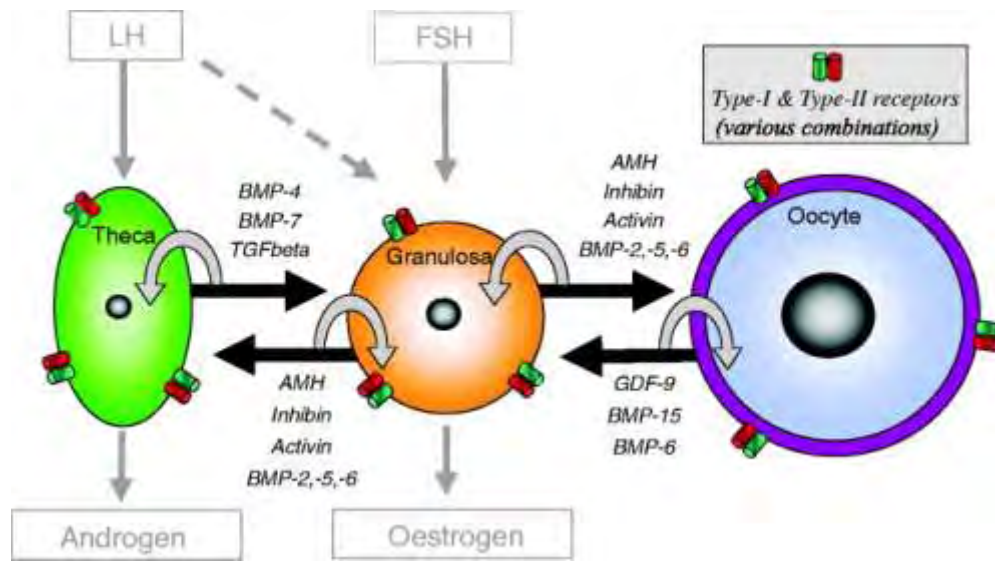
Εκτός όμως από την FSH υπάρχουν και άλλοι παράγοντες με αντι- αποπτωτική δράση που προάγουν την επιβίωση του ωοθυλακίου. Τέτοια δράση έχουν η LH, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες καθώς και η προγεστερόνη, δρώντας με διαφορετικούς μηχανισμούς (Rolaki et al., 2005).

Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν και το ωοκύτταρο φαίνεται ότι συμμετέχει στην ωοθυλακική ωρίμανση μέσω της παραγωγής διαφόρων ουσιών. Διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν ειδικές πρωτεΐνες και αναπτυξιακούς παράγοντες εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα μικρών ωοθυλακίων. Τα κοκκώδη κύτταρα μέσω αυτών των παραγόντων έχουν την δυνατότητα να συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες, που λαμβάνουν χώρα στα ωοθυλάκια, ελέγχοντας την πορεία που θα ακολουθήσει το

ωοθυλάκιο (ατρησία/ωρίμανση), συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στην αναπαραγωγική ικανότητα της γυναίκας. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι επιδερμικοί αυξητικοί παράγοντες (EGF), οι μεταμορφωτικοί αναπτυξιακοί παράγοντες (TGF- α , TGF- β) και ο ινσουλινο εξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας (IGF-1), ο οποίος παίζει ρόλο στην αρχική ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων (May et al., 1990; Adashi E.Y., 1988; Knight and Glister, 2006).

TGF- β παράγοντες.

Παράγοντες που ανήκουν στην ομάδα των TGF- β εκκρίνονται είτε από τα κοκκώδη κύτταρα (AMH, inhibin, activin, BMP-2, BMP-5, BMP-6), είτε από τα κύτταρα της θήκης (BMP-4, BMP-7, TGF- β), είτε από το ωοκύτταρο (GDF-9, BMP-15, BMP-6). Οι παράγοντες αυτοί ασκούν αυτοκρινικές και παρακρινικές δράσεις μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης, καθώς και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου (Εικόνα 2) (Knight and Glister, 2006). Οι παράγοντες αυτοί είναι σημαντικοί, καθώς σε περίπτωση μεταλλαγών τους παρατηρείται υπογονιμότητα και ωοθηκική δυσγενεσία στις γυναίκες (Knight and Glister, 2006; Di Pasquale et al., 2004). Τα κοκκώδη κύτταρα, που περιβάλλουν το ωοκύτταρο, υπό την επίδραση τέτοιων μορφογενετικών παραγόντων, διαφοροποιούνται λειτουργικά, έτσι ώστε τα ευρισκόμενα πλησιέστερα προς το ωοκύτταρο να παρουσιάζουν αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, ενώ τα πλέον απομακρυσμένα να δείχνουν κυρίως στεροειδογενετική δραστηριότητα.



Εικόνα 2. Παρακρινική και αυτοκρινική σηματοδότηση των TGF-β παραγόντων μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων, των κυττάρων της θήκης και του ωαρίου (Knight and Glister, 2006).

Στεροειδογένεση

Η στεροειδογένεση αποτελεί σημαντική διαδικασία για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Η στεροειδογένεση στο ωοθυλάκιο γίνεται βάση της θεωρίας των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροφινών. Έχει καθιερωθεί ότι τα κύτταρα της θήκης παράγουν ανδρογόνα, ενώ τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν οιστρογόνα μόνο παρουσία ανδρογόνων (Hillier S.G, 2004). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η LH επιδρά στα κύτταρα της θήκης μέσω ειδικών υποδοχέων και διεγείρει την παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενδιόνης και τεστοστερόνης) (Erickson et al., 1985). Τα τελευταία μεταφέρονται στα κοκκώδη κύτταρα και υπό την επίδραση της αρωματάσης, αρωματοποιούνται σε οιστρογόνα (οιστρόνη και οιστραδιόλη αντίστοιχα) (McNatty et al., 1979). Η παραγωγή της αρωματάσης, γίνεται υπό την επίδραση της FSH (Whitelaw et al., 1992), η οποία δρα στα κοκκώδη κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων (Roy et al., 1987). Την ίδια στιγμή η FSH επάγει την έκφραση του υποδοχέα της στα κοκκώδη κύτταρα (Dorrington and Armstrong, 1979). Μόνο στα κυρίαρχα ωοθυλάκια υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της αρωματάσης, η οποία παράγει αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία) (McNatty et al., 1979). Εάν δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της FSH και σχηματισμός της αρωματάσης, τα ανδρογόνα μετατρέπονται σε 5α-αναχθέντα ανδρογόνα μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάση, το οποίο αναστέλλει την παραγωγή της

αρωματάσης. Τα ωοθυλάκια αυτά διασώζονται για περαιτέρω ανάπτυξη ενώ τα ωοθυλάκια που δε συγκεντρώνουν ικανά επίπεδα FSH, λόγω επικράτησης της 5α-αναγωγάσης, έχουν περιβάλλον ανδρογονικό και μετατρέπονται σε άτρητα. Επομένως η παραγωγή των οιστρογόνων και άρα η οιστρογονοποίηση του ωοθυλακίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Αντίθετα η ατρησία αποτελεί μία αποπτωτική διαδικασία, η οποία συμβαίνει σε όλα τα στάδια της ωοθυλακικής ωρίμανσης και έχει αποδειχθεί ότι τα ανδρογόνα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, την αυξάνουν, ενώ τα οιστρογόνα την ελαττώνουν (Billig and Futura, 1993). Παρ' όλα αυτά, ενώ τα στεροειδή είναι σημαντικά για την ωοθυλακική ανάπτυξη στα ζώα, η σημαντικότητά τους στη γυναίκα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Findlay et al., 2000).

Οι στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης έχουν ως βασικό μόριο τον πυρήνα του κυκλοπεντανοφενανθρενίου, ο οποίος αποτελείται από τρεις εξαμελείς δακτυλίους και έναν πενταμελή δακτύλιο. Ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακος, από τον πυρήνα αυτό προκύπτουν διαφορετικές μητρικές ουσίες, που έχουν σημασία για την παραγωγή των αντίστοιχων στεροειδών, όπως οι πρεγνάνες με 21 άτομα άνθρακος από τις οποίες προέρχεται η προγεστερόνη, οι ανδροστάνες από τις οποίες προέρχονται τα ανδρογόνα και οι οιστράνες από τις οποίες προέρχονται τα οιστρογόνα. Η κύρια πρόδρομη ουσία κατά τη στεροειδογένεση είναι η χοληστερόλη. Ειδικότερα η LDL χοληστερόλη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ειδικών θυλάκων και συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτα, όπου υπό την επίδραση μιας λιπάσης απελευθερώνεται ελεύθερη χοληστερόλη για περαιτέρω μεταβολισμό σε στεροειδείς ουσίες. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει η πρωτεΐνη StAR η οποία είναι σημαντική για την στεροειδογένεση, αφού φαίνεται ότι συμβάλλει στην μεταφορά της χοληστερόλης από την έξω στην έσω επιφάνεια των μιτοχονδρίων (Hiroi et al., 2004). Η στεροειδογένεση στην ωοθήκη περιλαμβάνει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη υπό την επίδραση του ενζύμου P450sc. Από την πρεγνενολόνη σχηματίζονται μέσω δύο διαφορετικών οδών τα ανδρογόνα και συγκεκριμένα η ανδροστενδιόνη. Η τελευταία μετατρέπεται κατά ένα μέρος σε τεστοστερόνη και κατά ένα μέρος αρωματοποιείται σε οιστραδιόλη (Εικόνα 3). Τα κύρια οιστρογόνα της ωοθήκης είναι η οιστραδιόλη και η οιστρόνη. Ένα τρίτο οιστρογόνο, η

οιστριόλη, αποτελεί μεταβολικό προϊόν των δύο άλλων ενώ παράγεται αυτούσιο μόνο κατά τη διάρκεια της κύησης από την εμβρυοπλάκουντιακή μονάδα.



Εικόνα 3. Οδός στεροειδογένεσης

Οιστρογόνα

Ο ρόλος των οιστρογόνων στην ωρίμανση του ωοθυλακίου είναι πιο ξεκάθαρος. Τα οιστρογόνα δρουν στους διάφορους ιστούς μέσω ειδικών υποδοχέων. Διευκολύνουν τις δράσεις της FSH και συνεπώς την ωοθυλακική ωρίμανση (Laven and Fauser, 2006).

Οιστραδιόλη

Η οιστραδιόλη αποτελεί το κατ' εξοχήν ισχυρό οιστρογόνο, το οποίο δρα ενδοκυτταρίως, ενώ η μετατροπή της σε οιστρώνη και η σύνδεση της με την ειδική δεσμευτική της πρωτεΐνη (SHBG) μειώνει την οιστρογονική της δράση.

Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων της οιστραδιόλης, οι υποδοχείς α και β (Pelletier and El-Alfy, 2000; Scobie et al., 2002). Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων και η σύνδεση της ουσίας με τον υποδοχέα οδηγεί σε μεταβολή του σχήματος και διμερισμό της. Ο υποδοχέας τύπου β φαίνεται να παίζει σημαντικότερο ρόλο στις ωοθήκες σε σχέση με τον υποδοχέα τύπου α. Επιπλέον, σε πειραματόζωα που έχει κατασταλεί η έκφραση του β υποδοχέα, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός ατρητικών ωοθυλακίων και μειωμένη παραγωγή οιστραδιόλης, που ακολουθείται από μειωμένα επίπεδα ωορρηξίας (Emmen et al., 2005).

Η οιστραδιόλη δρα συνεργιστικά με την FSH, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, αυξάνοντας τους υποδοχείς της FSH αλλά και την παραγωγή αρωματάσης, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ατρησία (Wang and Greenwald, 1993, Fauser and Van Heusden, 1997). Επίσης, σε πειραματόζωα, τα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια είναι ικανά να αρωματοποιούν ανδρογόνα σε οιστρογόνα απουσία των οιστρογονικών υποδοχέων τύπου β. Παρ' όλα αυτά τα χαμηλά επίπεδα της FSH δεν είναι αρκετά για να επάγουν την έκφραση των LH υποδοχέων, με συνέπεια να οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα ωοθυλακιορρηξίας (Course et al., 2005).

Έρευνες που έγιναν σε γυναίκες όμως, έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τα πειραματόζωα. Σε γυναίκες με έλλειψη των ενζύμων 17α- υδροξυλάση/17,20- λυάση, χορηγήθηκε εξωγενώς FSH μετά από απευαισθητοποίηση της υπόφυσης και παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων (Rabinovici et al., 1989). Επίσης γυναίκες με έλλειψη αρωματάσης, ανέπτυξαν κύστες ωοθυλακίων με υψηλά επίπεδα FSH και χαμηλά επίπεδα οιστραδιόλης (Mullis et al., 1997). Ομοίως, γυναίκες με υπογοναδικό υπογοναδοτροφισμό, όταν τους χορηγήθηκε FSH απουσία LH, ανέπτυξαν ποικίλα προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια παρ' όλα τα χαμηλά επίπεδα οιστραδιόλης (Schoot et al., 1992).

Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα ωοθυλάκια μπορούν να ωριμάσουν από το στάδιο του κοιλοτικού στο προωθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο υπό την επίδραση της FSH και απουσία υψηλών συγκεντρώσεων οιστραδιόλης, αποδεικνύοντας ότι το οιστρογόνο αυτό δεν απαιτείται για την ωοθυλακική ανάπτυξη στις γυναίκες. Παρ' όλα αυτά απαιτείται διευκρίνιση κατά πόσο η αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων σε ένα μοτίβο ίδιο με αυτό των φυσιολογικών γυναικών (Messinis et al., 2010).

Προγεστερόνη

Η προγεστερόνη είναι ένα ωοθηκικό στεροειδές, το οποίο παράγεται από το ωχρό σωμάτιο. Η διαδικασία παραγωγής της ονομάζεται ωχρινοποίηση. Κατά την ωχρινοποίηση τα κοκκώδη κύτταρα υφίστανται την τελική τους διαφοροποίηση, παύουν να διαιρούνται και εκφράζουν ένζυμα ωχρινικής φάσης. Το ωχρό σωμάτιο σχηματίζεται

από τη μετατροπή των κυττάρων της θήκης σε μικρά ωχρινικά κύτταρα και των κοκκωδών κυττάρων σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα. Και τα δύο αυτά είδη κυττάρων παράγουν προγεστερόνη, η οποία όμως παράγεται κατά κύριο λόγο από τα μεγάλα ωχρινικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται υπό την επίδραση της LH. Εκτός όμως από την προγεστερόνη το ωχρό σωματίο παράγει και οιστρογόνα με τη συνεργασία των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροφινών. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η έκφραση του ενζύμου P450c17, μετατρέπει την προγεστερόνη σε ανδρογόνα στα κύτταρα της θήκης και αντίστοιχα το ένζυμο P250 αρωματάση στα κοκκώδη κύτταρα, σε κυρίαρχα ωοθυλάκια (Smyth et al., 1993; Hillier et al., 1994).

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης είναι πολύ χαμηλές. Παλιότερα θεωρούσαν ότι η κύρια πηγή της προγεστερόνης είναι ο αδένας των επινεφριδίων, αλλά κλινικά στοιχεία απέδειξαν ότι προγεστερόνη παράγεται και στις ωοθήκες (Judd et al., 1992; Alexandris et al., 1997). Παρ' όλο που το στεροειδές αυτό μπορεί να έχει ενδοκρινικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης (Daforoulos et al., 2004), ο ρόλος του στην επιλογή του ωοθυλακίου είναι λιγότερο πιθανός όταν οι υποδοχείς της προγεστερόνης δεν είναι παρόντες στα κοκκώδη κύτταρα μέχρι την αρχή του κύματος της αιχμής της LH (Hild-Petito et al., 1988; Iwai et al., 1990).

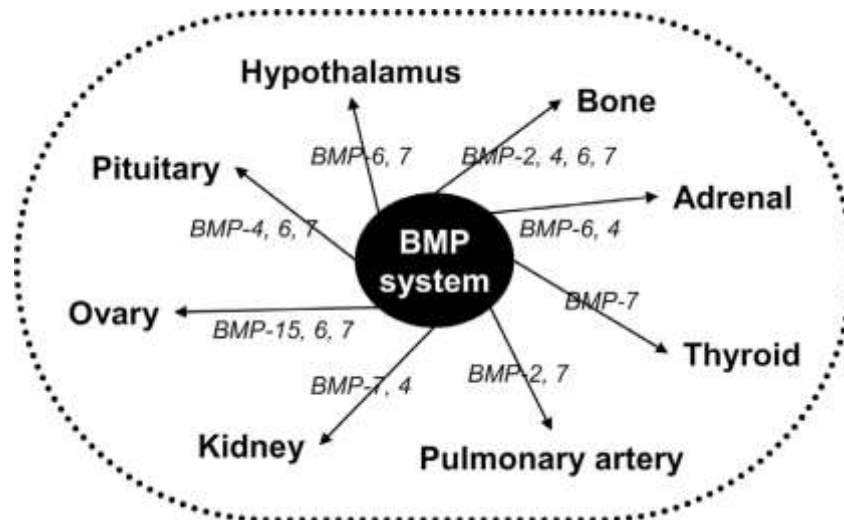
Όπως ήδη αναφέρθηκε, στον άνθρωπο η διαδικασία της αρχικής στρατολόγησης δεν επηρεάζεται από τις γοναδοτροφίνες. Περισσότερο φαίνεται να παίζουν ρόλο ουσίες τοπικά παραγόμενες στην ωοθήκη, που ασκούν αυτοκρινικές και παρακρινικές δράσεις. Η διαδικασία της στεροειδογένεσης ελέγχεται από παρακρινικούς και αυτοκρινικούς παράγοντες, που παράγονται τοπικά από τα ωοθυλάκια. Η δράση αυτή άλλοτε διεγερτική και άλλοτε κατασταλτική στοχεύει, σε συνεργασία με τις γοναδοτροπίνες, στην παραγωγή της ωρίμανσης των ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου (αύξηση του μεγέθους, ορμονοσύνθεση). Τέτοιοι παράγοντες είναι το σύστημα inhibin/activin, το σύστημα των αυξητικών παραγόντων IGFs (IGF-1, IGF-2), οι δεσμευτικές τους πρωτεΐνες IGFBPs, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα (Hillier, 2001), καθώς και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας TGF- α και TGF- β που θα αναλύσουμε παρακάτω.

BMPs

Οι πρωτεΐνες BMPs (bone morphogenetic proteins) κατατάσσονται δομικά στην υπεροικογένεια των μεταμορφωτικών αυξητικών παραγόντων TGF- β . Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί παραπάνω από 30 μέλη της υπεροικογένειας αυτής σε διάφορα είδη (Griffith et al., 1996; Kawabata and Miyazono, 2000). Οι BMPs αρχικά εντοπίστηκαν στον οστικό ιστό. Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στον σχηματισμό οστού και χόνδρου και μπορούν να επάγουν τον σχηματισμό τους σε έκτοπες σκελετικές θέσεις, *in vivo* (Wozney et al., 1988). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν πολλαπλές βιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και τη μορφογένεση.

Επίσης, οι BMPs παρουσιάζουν κυτταρική εξειδίκευση σε διάφορους ενδοκρινείς ιστούς. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αποτελούν ρυθμιστές ποικίλων ιστών και κυττάρων. Εκτός από τα οστά, στοιχεία δείχνουν ότι η έκφραση των BMP γονιδίων είναι υψηλή στο ήπαρ, στο λεπτό έντερο και στην καρδιά, ρυθμίζοντας την κυτταρική ομοίωση με αυτοκρινικούς και παρακρινικούς μηχανισμούς. Πρόσφατα έχουν αναγνωρισθεί και άλλες δράσεις τους και πιο συγκεκριμένα σε ενδοκρινείς ιστούς όπως η ωθήκη, ο θυροειδής αδένας, η υπόφυση και ο υποθάλαμος (Εικόνα 4). Έρευνες αναφέρουν την σημαντική δράση των BMPs στις ωθήκες και συγκεκριμένα την συμμετοχή τους στην ωοθυλακιογένεση (Shimasaki et al., 1999; Shimasaki et al., 2004).

Το σύστημα των BMPs και πιο συγκεκριμένα το σύστημα από συνδέτες, υποδοχείς και δεσμευτικές πρωτεΐνες έχει κρίσιμο ρόλο στις θεμελιώδεις ενδοκρινείς λειτουργίες (Lyons et al., 1990). Η λανθασμένη λειτουργία του BMP συστήματος στους διάφορους ιστούς μπορεί να προκαλέσει ποικίλες ενδοκρινείς διαταραχές (Otsuka, 2010).

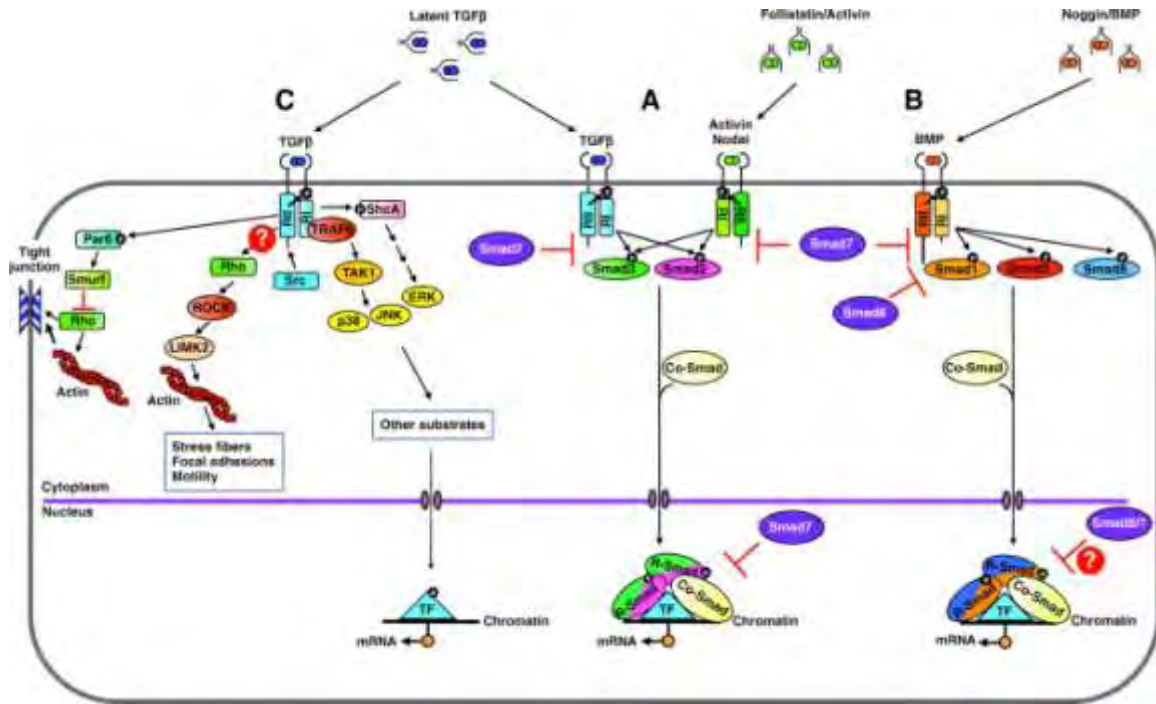


Εικόνα 4. Ιστοειδική δραστηριότητα των BMPs (Otsuka, 2010)

Μοριακά χαρακτηριστικά και σηματοδότηση του συστήματος BMP

Οι συνδέτες της υπερικογένειας των TGF- β αρχικά συντίθενται ως μεγάλα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες διμερίζονται και διασπώνται από πρωτεολυτικά ένζυμα σε ώριμες διμερείς πρωτεΐνες. Οι BMPs ξεχωρίζουν από τις άλλες πρωτεΐνες της υπερικογένειας έχοντας επτά αντί για εννέα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, στην ώριμη περιοχή. Έξι από τις επτά κυστεΐνες της ώριμης πρωτεΐνης συνδέονται με την υπομονάδα σχηματίζοντας μία ισχυρά συνδεδεμένη δομή. Η εναπομείνασα έβδομη πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τον διμερισμό της πρωτεΐνης μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Έχουν περιγραφεί στα θηλαστικά επτά υποδοχείς τύπου I (ALK-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7) και πέντε τύπου II (ActRII, ActRIIB, AMHR-II, BMPRII και T β RII) των TGF- β παραγόντων. Και οι δύο τύποι υποδοχέων έχουν την ίδια δομή και κατέχουν περιοχές κίνησης σερίνης/θρεονίνης στην εδοκυτταρική τους δομή. Οι διμερείς πρωτεΐνες TGF- β συνδέονται σε ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο των υποδοχέων τύπου I και τύπου II. Οι BMPs έχουν μεγάλη συγγένεια και με τους δύο τύπους υποδοχέων (Liu et al., 1995).

Μετά τη σύνδεση των BMPs με τον υποδοχέα τους, οι φωσφορυλιωμένοι υποδοχείς ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδοτικών μορίων Smads. Συνοπτικά η δράση των BMPs και γενικότερα των TGF- β ακολουθείται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Εικόνα 5).

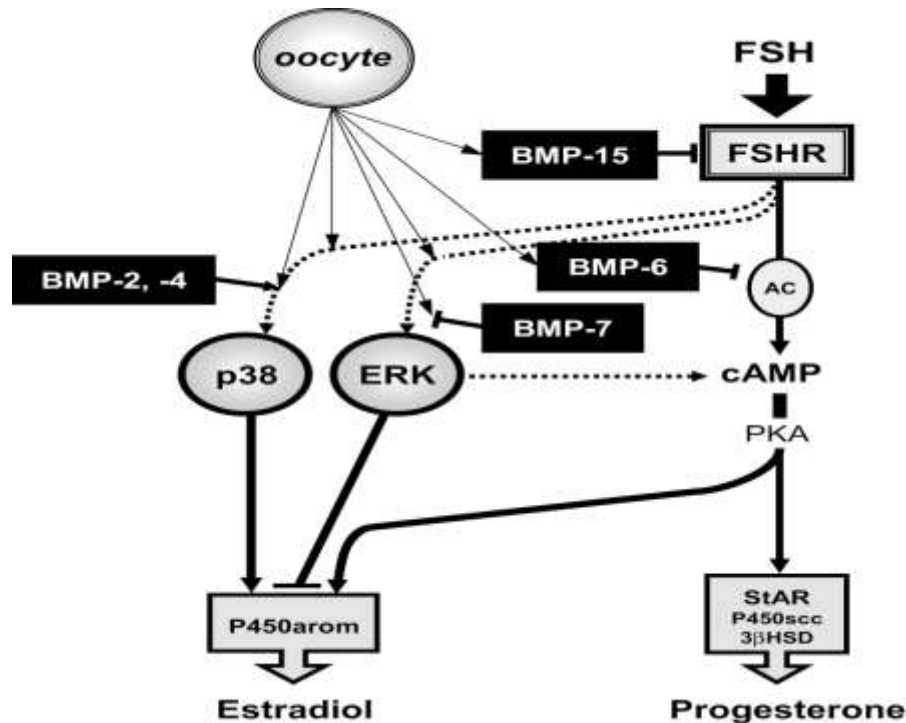


Εικόνα 5. TGF-β και BMP σηματοδότηση (Moustakas and Heldin, 2009)

Ο ρόλος των ωθητικών BMPs και των υποδοχέων τους στην αναπαραγωγική λειτουργία

Η έκφραση της BMP-2,-3,-3b,-4,-6,-7,-15, του GDF-9, και ο υποδοχέας τύπου IA του BMP (BMPRIA/ALK-3), IB(BMPRI/ALK-6) και τύπου II (BMPRII) εντοπίστηκαν στην ωθήκη διάφορων θηλαστικών (Erickson and Shimasaki, 2003). Τα διάφορα μόρια BMPs εκφράζονται ειδικά σε κύτταρα των ωθηκών και υποβάλλονται σε δυναμικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωθυλακίων και της ωχρινικής μορφογένεσης (Shimasaki et al., 2004). Είναι συνεπώς πιθανόν οι διαδικασίες της ωθυλακιογένεσης (στρατολόγηση, επιλογή και ατρησία), της ωορρηξίας καθώς και της ωχρινοποίησης και ωχρινόλυσης να συνοδεύονται από δραματικές χωρικές και χρονικές μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων BMPs. Πειράματα έχουν δείξει ότι οι BMP-2, -4, -6 and -7 δραστηριοποιούνται κάθε μια ξεχωριστά, σε ενέργειες όπως, τη στεροειδογένεση και την μίτωση των κοκκωδών κυττάρων στην ωθήκη. Πιο συγκεκριμένα, η BMP-2 και η BMP-4 ενισχύουν την επαγόμενη από την FSH φωσφορυλίωση της p38-MAPK κινάσης οδηγώντας σε αύξηση της επαγόμενης από την FSH, οιστραδιόλης (Inagaki et al., 2009). Συμπερασματικά, οι BMP-2,-4,-6,-7 ρυθμίζουν

με διαφορετικό τρόπο την επαγόμενη από την FSH στεροειδογένεση στα κοκκώδη κύτταρα. (Εικόνα 6)



Εικόνα 6. Επίδραση των BMP-2, -4, -6, -7 στην στεροειδογένεση (Otsuka, 2010).

Κάθε μόριο BMP παρουσιάζει διαφορετική χωροχρονική έκφραση και επίδραση στην ωοθήκη. Για παράδειγμα, η BMP-7 και η BMP-6 εκφράζονται στα κύτταρα της θήκης και στα κοκκώδη κύτταρα αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στην ανθρώπινη ωοθήκη, και οι δύο BMPs αυξάνουν την έκφραση του υποδοχέα της FSH και μειώνουν τον υποδοχέα της LH, στα κοκκώδη κύτταρα (Shi et al., 2010; Shi et al., 2009). Αντίστοιχα οι BMP-15 και GDF-9, εκφράζονται στα ωοκύτταρα και η μετάλλαξη των γονιδίων τους οδηγεί σε παύση της ωοθυλακιογένεσης στον άνθρωπο (Laissue et al., 2006).

Δράση της BMP-2 - έρευνες σε διάφορα αναπτυξιακά μοντέλα

BMP-2 – επίδραση στην παραγωγή οιστραδιόλης

Πληθώρα στοιχείων δείχνει ότι οι κυτοκίνες BMP, μέλη της υπερικογένειας των TGF-β, παίζουν σημαντικό ρόλο στην γονιμότητα των θηλυκών θηλαστικών (Shimasaki et al., 2004; Knight and Glister, 2006).

Έρευνες έχουν δείξει ότι μαζί οι πρωτεΐνες BMP-2 και η BMP-6 εμποδίζουν την στεροειδογένεση σε κύτταρα θήκης των χοίρων, ενώ η BMP-6 προκαλεί μόνη της τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της θήκης. Παρ' όλα αυτά και οι δύο πρωτεΐνες μειώνουν την απελευθέρωση του cAMP από τα κύτταρα της θήκης των χοίρων, δείχνοντας ότι οι BMPs επηρεάζουν την στεροειδογένεση, τουλάχιστον στο επίπεδο παραγωγής cAMP. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής της ανδροστενδιόνης και της προγεστερόνης όταν χορηγήθηκαν οι παράγοντες BMPs σε καλλιέργειες κυττάρων θήκης και κοκκωδών μαζί. Μεμονωμένα η BMP-2 προκάλεσε μείωση της παραγωγής της οιστραδιόλης, ενώ η BMP-6 τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της θήκης (Brankin et al., 2005). Ίδιες παρατηρήσεις υπήρξαν και στα κοκκώδη κύτταρα αγελάδας (Glister et al., 2004) και χοίρου (Brankin et al., 2005) στα οποία οι BMPs προκάλεσαν τη μειωμένη σύνθεση προγεστερόνης.

Υποδοχείς της BMP-2 στην ωοθήκη του προβάτου είναι οι BMPR2,1A,1B. Σε έρευνα που έχει γίνει παρατηρήθηκε η επίδραση της BMP-2 στην επαγόμενη από την FSH, διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων του προβάτου, μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων της BMP-2 (Liu et al., 1995).

Υποδοχείς της BMP-2 εντοπίστηκαν στα κοκκώδη κύτταρα πρωτογενών έως και προωορρηκτικών ωοθυλακίων στα πρόβατα (Souza et al., 2002). Οι υποδοχείς αυτοί παρατηρήθηκαν επίσης σε κοιλοτικά ωοθυλάκια, σε κύτταρα θήκης, αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κοκκώδη κύτταρα. Επίσης σε μεγάλη συγκέντρωση εντοπίστηκαν στο επιφανειακό επιθήλιο της ωοθήκης, στο ωχρό σωματίο εκτός από το στρώμα της ωοθήκης. Αυτό σημαίνει ότι και η BMP-2 δρα στα αντίστοιχα σημεία. Η ίδια κατανομή των υποδοχέων παρατηρείται και στις ωοθήκες των αρουραίων (Shimasaki et al., 1999).

Η έρευνα αυτή απέδειξε ότι η BMP-2 δεν ασκούσε καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Ενώ η παραγωγή της οιστραδιόλης στην καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων αυξανόταν όσο περνούσε η ώρα και όσο τα κύτταρα διαφοροποιούνταν *in vitro*. Η προσθήκη της BMP-2 σε μεγαλύτερη δόση ενίσχυε την παραγωγή της οιστραδιόλης. Αυτή η αύξηση ήταν εμφανής από τη δεύτερη, κιάλας, ημέρα της καλλιέργειας. Τα κοκκώδη κύτταρα αύξησαν την παραγωγή της

οιστραδιόλης και της inhibinA κατά την περίοδο που καλλιεργούνταν. Η BMP-2 από την μεριά της ενίσχυσε την διαφοροποίηση των ανώριμων κοκκωδών κυττάρων *in vitro*. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης τις δράσεις των BMP υποδοχέων στην παρακρινική ρύθμιση της ωοθήκης στο πρόβατο (Souza et al., 2002).

Όσον αφορά όμως στα ποντίκια, η έλλειψη του υποδοχέα BMPR1B, προκάλεσε την ελαττωμένη παραγωγή της οιστραδιόλης, και την στειρότητα στα ποντίκια (Yi et al., 2001).

BMP-2 – επίδραση στην παραγωγή προγεστερόνης

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην όρνιθα, έδειξαν ότι σε αδιαφοροποίητα κοκκώδη κύτταρα, η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη BMP-2 επάγει την φωσφορυλίωση των SMAD1/5/8 και μπλοκάρει τους μεταμορφωτικούς αυξητικούς παράγοντες β (TGF-β) και την επαγόμενη από την FSH έκφραση του υποδοχέα της και παραγωγή της προγεστερόνης. Συγκεντρωτικά, στοιχεία δείχνουν ότι πριν την επιλογή του ωοθυλακίου, το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMP2 συμβάλλει στη διατήρηση των κοκκωδών κυττάρων με έναν διαφορετικό τρόπο. Η BMP2 στην όρνιθα, δρα σαν αυτοκρινικός ή παρακρινικός παράγοντας της ωοθήκης (Woods & Johnson, 2005).

Μέλη των παραγόντων TGFβ και της Activin A , μόνη της ή σε συνδυασμό με την FSH, προάγουν την έκφραση της FSH και την αρχική από την FSH επαγόμενη παραγωγή της προγεστερόνης, σε αδιαφοροποίητα κοκκώδη κύτταρα από δευτερογενή ωοθυλάκια. Η προγεστερόνη παράγεται από τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, υποστηρίζοντας την έναρξη και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης, μέσω της ωχρινοποίησης. Οποιαδήποτε διατάραξη αυτών των γεγονότων , όπως η πρόωρη και αποτυχημένη ωχρινοποίηση μπορεί να βλάψει την αναπαραγωγή σε πειραματόζωα (McMNatty et al., 2006).

Εξίσου η BMP-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ωοθήκη. Στα ποντίκια, η BMP-2 εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα και η έκφραση της μειώνεται μετά την ωοθυλακιορρηξία (Shimasaki et al., 2004). Η BMP-2 καταστέλει την παραγωγή της προγεστερόνης στα κοκκώδη κύτταρα των προβάτων (Juengel et al 2006) και των αρουραίων (Inagaki et al, 2009) και στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα καρκινικής σειράς

KGN (Miyoshi et al., 2006). Βασιζόμενοι σ' αυτά τα δεδομένα, υποθέτουμε ότι η BMP-2 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ωχρινοποίησης.

BMP-2 έρευνα σε ανθρώπινη ωοθήκη.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ωοθυλάκια ανθρώπινης ωοθήκης, διαπιστώθηκε ότι η BMP-2 εκφράζεται αποκλειστικά σε κοιλοτικά ωοθυλάκια. Ενώ η συγκέντρωση της σε κοκκώδη κύτταρα ωχρού σωματίου ήταν εξαιρετικά χαμηλή. Αποδείχθηκε ότι χορηγώντας hCG (human chorionic gonadotropin), καταστέλλεται η έκφραση της BMP-2 και επάγεται η έκφραση του παράγοντα BAMBI (activin membrane-bound inhibitor), ο οποίος ανταγωνίζεται τον υποδοχέα της BMP-2 (τύπου I) για την πρόσδεση της, μειώνοντας έτσι τη δράση της. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση της BMP-2 μπορεί να εξασθενεί στα κοκκώδη κύτταρα σε απάντηση του κύματος LH in vivo, το οποίο επαληθεύει και τη μειωμένη συγκέντρωση της στα ωχρά σωματίδια (Shi et al., 2011).

Διαπιστώθηκε ότι η BMP-2 παρουσιάζει ποικίλη δράση στα ωοθυλάκια. Βρέθηκε ότι σε κοκκώδη κύτταρα αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων μειώνει την έκφραση της StAR πρωτεΐνης και κατά συνέπεια και την παραγωγή προγεστερόνης. Παρόμοια δράση ασκεί και στον υποδοχέα της LH, καταστέλλοντας την έκφραση του και συνεπώς και την παραγωγή της προγεστερόνης. Αντίθετα όσον αφορά την οιστραδιόλη, η BMP-2 επάγει την παραγωγή της, ενισχύοντας την παραγωγή της αρωματάσης και του υποδοχέα της FSH (Shi et al., 2011).

Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η BMP-2 συμβάλλει στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Αντίθετα η μειωμένη συγκέντρωση της στο ωχρό σωματίο υποδεικνύει την ελάχιστη συμβολή της ορμόνης στην ωχρινοποίηση ή εναλλακτικά η απουσία της στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα θα μπορούσε να προφυλάσσει το ωοθυλάκιο από πρόωρη ωχρινοποίηση. Η ρύθμιση της BMP-2 στα κοκκώδη κύτταρα μοιάζει να παίζει ρόλο στη φυσιολογική μετάβαση της απ' το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο στο ωχρό σωματίο. Συγκεντρωτικά η BMP-2 μπορεί να ελέγξει την στεροειδογένεση στα κοκκώδη κύτταρα μέσω ενεργοποίησης τοπικών ενζύμων όπως συμβαίνει και στα ενδοκρινικά συστήματα. Τέλος μπορεί να θεωρηθεί ότι η δυσλειτουργία των BMPs εμποδίζει την

ωχρινοποίηση και μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή ωοθυλακική ανάπτυξη και υπογονιμότητα (Shi et al., 2011).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της ορμόνης BMP-2 στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που υπόκεινται σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της ορμόνης στην στεροειδογένεση και συγκεκριμένα στην παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης.

Πειραματική Διαδικασία

Συνοπτικά στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κοκκώδη κύτταρα 26 γυναικών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Συλλέχθηκε ωοθυλακικό υγρό κατά την ωοληψία, από το οποίο απομονώθηκαν ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Στη συνέχεια ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων αυτών και προσθήκη των ορμονών Ανδροστενδιόνης, FSH και BMP-2 σε συνδυασμούς που φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 2 έως Πίνακας 5). Τέλος ακολούθησε ποσοτική ανάλυση της παραγωγής της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, με τη μέθοδο ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSpecific Assay) και ερμηνεία των αποτελεσμάτων με την πολυπαραγοντική δοκιμασία one-way ANOVA.

Υλικά

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια όπως παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη πειραματική διαδικασία.

Εμπορική ονομασία	Εταιρεία
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma-Aldrich
199 Wearle's salts με Hepes	Sigma-Aldrich
FSH (10ng/ml)	Sigma-Aldrich
BMP-2 (100ng/ml)	Sigma-Aldrich
Ανδροστενδιόνη ($10^{-6}M$)	Sigma-Aldrich

Μέθοδοι

Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων

Λαμβάνονται ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα από γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), με βάση το πρωτόκολλο της πολλαπλής ωοθυλακικής διέγερσης με ανασυνδυασμένη FSH σε συνδυασμό με αγωνιστές GnRH. Για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγείται hCG. Έπειτα από 36 ώρες ακολουθεί ωοληψία. Η αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού και του ωαρίου πραγματοποιείται διακολλικά υπό υπερηχογραφικό έλεγχο.

Μετά την απομάκρυνση του ωαρίου ακολουθεί η απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων με την μέθοδο της καθίζησης. Η διαδικασία στο σύνολο της πραγματοποιείται σε άσηπτες συνθήκες.

Το ωοθυλακικό υγρό, που περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα, διαμοιράζεται σε σωληνάκια των 15ml και αραιώνεται με ισότονο διάλυμα άλατος PBS (Phosphate Buffered Salin) σε αναλογία 3 προς 10 με σκοπό την έκπλυση των κυττάρων. Για την καλύτερη συγκράτηση των κυττάρων στο PBS προστίθεται 1mg/ml FBS (Fetal Bovine Serum).

Το μείγμα αναδεύεται καλά και αφήνεται σε ηρεμία έως ότου τα κύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου δημιουργώντας ίζημα. Το υπερκείμενο στο οποίο εγκλωβίζονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και διάφορες προσμίξεις, αφαιρείται. Η έκπλυση του ιζήματος επαναλαμβάνεται έως ότου το ίζημα των κυττάρων είναι μακροσκοπικά καθαρό από ερυθρά αιμοσφαίρια και προσμίξεις.

Προστίθεται στο ίζημα διάλυμα PBS έως ότου το διάλυμα φθάσει στα 11 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση 10 λεπτών στις 800 στροφές/λεπτό, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν άλλων προσμίξεων που δεν απομακρύνθηκαν με τις πλύσεις.

Το ίζημα των κοκκωδών κυττάρων έπειτα αραιώνεται σε τελικό όγκο 1ml με καλλιεργητικό μέσο 199 Wearle's Salts με HEPES (Sigma - Aldrich). Σε αυτό προστέθηκαν 1% αντιβιοτικό (στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη) και 5% Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma - Aldrich). Η προσθήκη του FBS βοηθά στην επικόλληση των κυττάρων στην πλάκα καλλιέργειας.

Ακολουθεί υπολογισμός των ζωντανών κυττάρων σε πλάκα Newbauer. Από το διάλυμα των κοκκωδών κυττάρων με το καλλιεργητικό μέσο, λαμβάνονται 20μl και αναδεύονται με 20μl χρωστικής trypan blue. Στην πλάκα τοποθετούνται 20μl από το τελικό διάλυμα και καταμετρούνται στα 4 χαρακτηριστικά τετράγωνα της πλάκας Newbauer τα ζωντανά κύτταρα.

Ακολουθούν οι υπολογισμοί :

Μέσος όρος ζωντανών κυττάρων = $(A+B+\Gamma+\Delta)/4$, όπου A, B, Γ, Δ ο αριθμός των κυττάρων που καταμετρήθηκαν στα τέσσερα τετράγωνα.

Αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος ζωντανών κυττάρων X συνολικό των κυττάρων στο σωλήνα (1ml) X Αραίωση (=2) X 10^4

Βιωσιμότητα κυττάρων (%) = Μέσος όρος ζώντων κυττάρων / συνολικό αριθμό κυττάρων X 100

Σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας καλλιέργειας (24 οπών) επιθυμούμε να έχουμε συγκέντρωση κυττάρων ίση με 50000 κύτταρα/οπή.

Η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων πρέπει να λαμβάνει χώρα σε σύντομο χρονικό διάστημα, γιατί οι εκτενείς διακυμάνσεις στο pH μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για το λόγο αυτό στο καλλιεργητικό υλικό εμπεριέχεται ένας δείκτης pH (Phenol Red).

Κάτω από το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης παρατηρούμε τα κοκκώδη κύτταρα ως πιο φωτεινά και μεγαλύτερα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα κοκκώδη κύτταρα έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα και να προσκολλώνται στον πυθμένα του τρυβλίου.

Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιείται κλίβανος σε θερμοκρασία 37°C , ενώ το μείγμα αερίων στον περιβάλλοντα χώρο είναι 95% O_2 και 5% CO_2 .

Τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο (τα κοκκώδη είναι προσκολλημένα στην πλάκα) και ελέγχεται η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και τυχόν επιμόλυνση.

Ακολουθεί η προσθήκη ορμονών μαζί με καλλιεργητικό μέσο 199 Wearle's Salts με HEPES (Sigma - Aldrich), χωρίς την προσθήκη ορού FBS (Sigma - Aldrich), αυτή τη φορά. Οι καλλιέργειες διαρκούν για 24, 48 και 72 ώρες. Οι συνδυασμοί των ορμονών-

διεγερτών και των χρονικών ορίων καλλιέργειας στα δείγματα απεικονίζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2. Δείγματα Control: Τρία δείγματα για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας 24, 48 και 72 ωρών. Στα δείγματα προστέθηκε καλλιεργητικό μέσο και το υπόστρωμα αρωματοποίησης, η Ανδροστενδιόνη ($10^{-6}M$) . Το καλλιεργητικό μέσο δεν περιελάμβανε ορό.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ CONTROL			
24 ώρες καλλιέργειας	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)
48 ώρες καλλιέργειας	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)
72 ώρες καλλιέργειας	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)	Ανδροστενδιόνη (A4) 0,1 μl/ml ($10^{-6}M$)

Πίνακας 3. Δείγματα με προσθήκη ορμόνης FSH (10ng/ml): Τρία δείγματα για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας 24, 48 και 72 ωρών. Στα δείγματα προστέθηκε καλλιεργητικό μέσο, Ανδροστενδιόνη ($10^{-6}M$) και η ορμόνη FSH (10ng/ml).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ FSH			
24 ώρες καλλιέργειας	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)
48 ώρες καλλιέργειας	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)
72 ώρες καλλιέργειας	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)	A4 ($10^{-6}M$) + FSH (10ng/ml)

Πίνακας 4. Δείγματα με προσθήκη ορμόνης BMP-2 (100ng/ml): Τρία δείγματα για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας 24, 48 και 72 ωρών. Στα δείγματα προστέθηκε καλλιεργητικό μέσο, Ανδροστενδιόνη (10^{-6} M) και η ορμόνη BMP-2 (100ng/ml).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ BMP-2			
24 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)
48 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)
72 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)

Πίνακας 5. Δείγματα με προσθήκη ορμόνης BMP-2 (100ng/ml) και FSH (10ng/ml): Τρία δείγματα για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας 24, 48 και 72 ωρών. Στα δείγματα προστέθηκε καλλιεργητικό μέσο, Ανδροστενδιόνη (10^{-6} M), η ορμόνη BMP-2 (100ng/ml) και η FSH (10ng/ml).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ BMP-2 + FSH			
24 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)
	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)
48 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)
	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)
72 ώρες	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)	A4 (10^{-6} M)
καλλιέργειας	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)	+ BMP-2 (100ng/ml)
	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)	+ FSH (10ng/ml)

Σε όλες τις καλλιέργειες προστέθηκε Ανδροστενδιόνη (A_4) (Sigma - Aldrich) ως υπόστρωμα αρωματοποίησης.

Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -80°C .

Τέλος ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της στεροειδογένεσης, 17β -οιστραδιόλης και προγεστερόνης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSpecific Assay) και ερμηνεία των αποτελεσμάτων με την πολυπαραγοντική δοκιμασία one-way ANOVA.

Αποτελέσματα

Μετά την ποσοτική μέτρηση της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης με ELISA, ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την πολυπαραγοντική δοκιμασία one-way ANOVA. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έχει ως στόχο να κατανοήσουμε την επίδραση της BMP-2 στη στεροειδογένεση, σε σύγκριση με τα δείγματα Control και σε αλληλεπίδραση με την FSH στις διάφορες ώρες καλλιέργειας.

Πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις και μετα-αναλύσεις κατά Bonferroni ώστε να εξεταστούν οι μεταβολές στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων, όσον αφορά στην έκκριση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, συγκρίνοντας όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ορμονών-διεγερτών. Όσον αφορά τις μετρήσεις της προγεστερόνης, η στατιστική ανάλυση έγινε για την καλλιέργεια των 24, 48 και 72 ωρών και εξετάστηκε η διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ορμονών-διεγερτών (FSH (10 ng/ml), BMP-2 (100 ng/ml), BMP-2 (100 ng/ml) + FSH (10 ng/ml)) και του Control δείγματος. Αντίστοιχα για την οιστραδιόλη, η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε την ίδια διαδικασία με εξαίρεση ότι η μελέτη πραγματοποιήθηκε μόνο για τις καλλιέργειες των 24 και 48 ωρών. Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων για την καλλιέργεια των 72 ωρών δεν συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα μας, εξαιτίας της ύπαρξης ακραίων τιμών της οιστραδιόλης που απορρίφθηκαν εξ αρχής.

Παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 413.53 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 50.40 ng/ml, η μέγιστη τιμή 1265 ng/ml και η τυπική απόκλιση των τιμών 412.2 ng/ml.

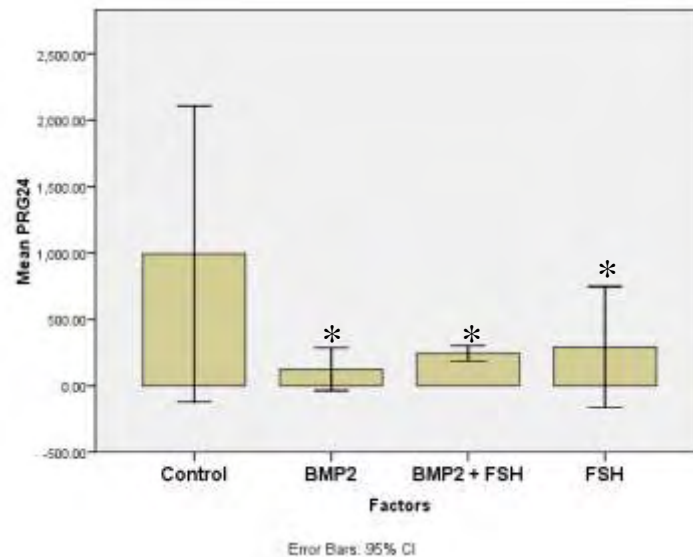
Με την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν η επίδραση της BMP-2 και των άλλων συνδυασμών-ορμονών σε σύγκριση με το Control στις 24 ώρες καλλιέργειας και η έκκριση της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα. (Πίνακας 6)

Πίνακας 6. Πολλαπλή σύγκριση της έκκρισης της προγεστερόνης μεταξύ των δειγμάτων: Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml) σε καλλιέργεια (24 ωρών) κοκκωδών κυττάρων.

PRG24
Bonferroni

(I) Factors	(J) Factors	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	868.20000 [*]	200.07127	.015
	BMP2 + FSH	748.86667 [*]	200.07127	.034
	FSH	702.13333 [*]	200.07127	.048
BMP2	Control	-868.20000	200.07127	.015
	BMP2 + FSH	-119.33333	200.07127	1.000
	FSH	-166.06667	200.07127	1.000
BMP2 + FSH	Control	-748.86667	200.07127	.034
	BMP2	119.33333	200.07127	1.000
	FSH	-46.73333	200.07127	1.000
FSH	Control	-702.13333	200.07127	.048
	BMP2	166.06667	200.07127	1.000
	BMP2 + FSH	46.73333	200.07127	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Εικόνα 7. Διακύμανση της έκκρισης της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια 24 ωρών ύστερα από την προσθήκη ορμονών-διεγερτών (Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)).

Από τις παραπάνω αναλύσεις παρατηρείται μείωση στην έκκριση της προγεστερόνης μετά τη προσθήκη της ορμόνης BMP-2 (100 ng/ml), της FSH (10 ng/ml) και του

συνδυασμού τους, εμφανίζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά με το Control δείγμα για $P < 0,05$. (Εικόνα 7)

Παραγωγή προγεστερόνης στις 48 ώρες καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 321.3 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 147.2 ng/ml, η μέγιστη τιμή ήταν 619 ng/ml και η τυπική απόκλιση των τιμών 175.78 ng/ml.

Με την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν η επίδραση της BMP-2 και των άλλων συνδυασμών-ορμονών σε σύγκριση με το Control στις 48 ώρες καλλιέργειας και η έκκριση της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα. (Πίνακας 7)

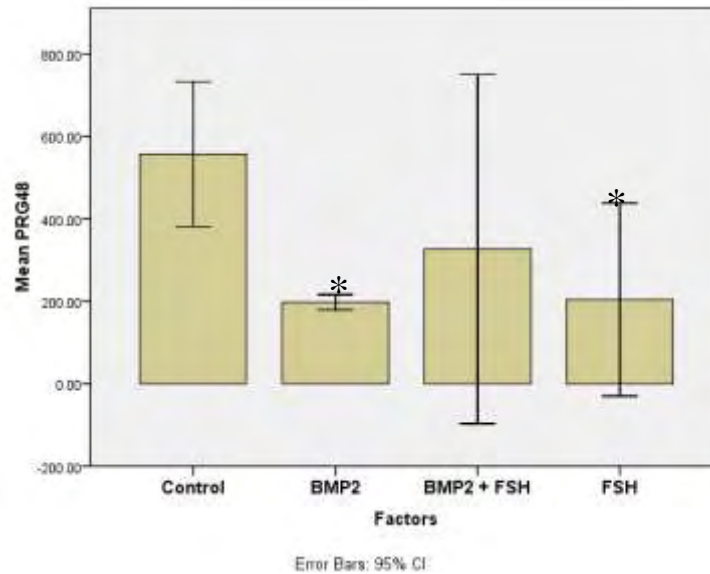
Πίνακας 7. Πολλαπλή σύγκριση της έκκρισης της προγεστερόνης μεταξύ των δειγμάτων: Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml) σε καλλιέργεια (48 ωρών) κοκκωδών κυττάρων.

PRG48

Bonferroni

(I) Factors	(J) Factors	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	359.33333 [*]	84.64143	.017
	BMP2 + FSH	230.40000	84.64143	.157
	FSH	353.06667 [*]	84.64143	.019
BMP2	Control	-359.33333	84.64143	.017
	BMP2 + FSH	-128.93333	84.64143	.997
	FSH	-6.26667	84.64143	1.000
BMP2 + FSH	Control	-230.40000	84.64143	.157
	BMP2	128.93333	84.64143	.997
	FSH	122.66667	84.64143	1.000
FSH	Control	-353.06667 [*]	84.64143	.019
	BMP2	6.26667	84.64143	1.000
	BMP2 + FSH	-122.66667	84.64143	1.000

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Εικόνα 8. Διακύμανση της έκκρισης της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια 48 ωρών ύστερα από την προσθήκη ορμονών-διεγερτών (Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)).

Από τις παραπάνω αναλύσεις παρατηρείται μείωση στην έκκριση της προγεστερόνης μετά τη προσθήκη της ορμόνης BMP-2 (100 ng/ml) και της FSH (10 ng/ml) εμφανίζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά με το Control δείγμα για $P < 0,05$. Ενώ η μείωση της έκκρισης της προγεστερόνης που παρατηρείται μετά την προσθήκη και του συνδυασμού BMP-2 (100 ng/ml) + FSH (10 ng/ml), δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με το Control δείγμα.

Παραγωγή προγεστερόνης στις 72 ώρες καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 316.8 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 109.8 ng/ml, η μέγιστη τιμή ήταν 1216 ng/ml και η τυπική απόκλιση των τιμών 307.6 ng/ml.

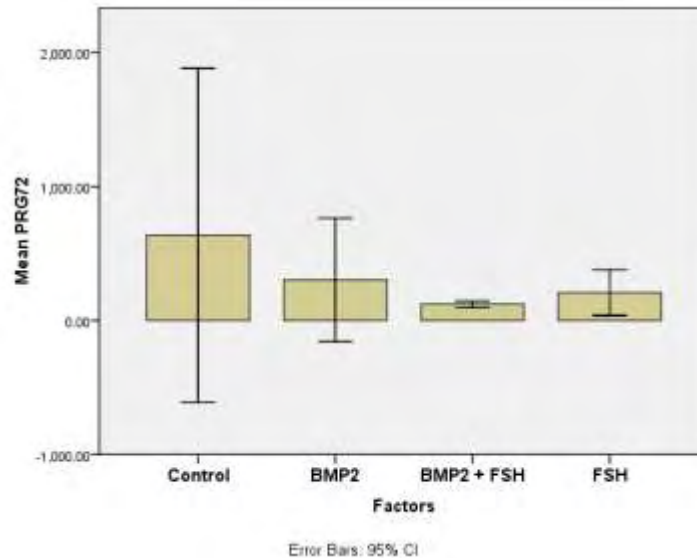
Με την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν η επίδραση της BMP-2 και των άλλων συνδυασμών-ορμονών σε σύγκριση με το Control στις 72 ώρες καλλιέργειας και η έκκριση της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα. (Πίνακας 8)

Πίνακας 8. Πολλαπλή σύγκριση της έκκρισης της προγεστερόνης μεταξύ των δειγμάτων: Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml) σε καλλιέργεια (72 ωρών) κοκκωδών κυττάρων.

PRG72

Bonferroni

(I) Factors	(J) Factors	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	334.46667	220.04246	1.000
	BMP2 + FSH	516.46667	220.04246	.281
	FSH	430.06667	220.04246	.518
BMP2	Control	-334.46667	220.04246	1.000
	BMP2 + FSH	182.00000	220.04246	1.000
	FSH	95.60000	220.04246	1.000
BMP2 + FSH	Control	-516.46667	220.04246	.281
	BMP2	-182.00000	220.04246	1.000
	FSH	-86.40000	220.04246	1.000
FSH	Control	-430.06667	220.04246	.518
	BMP2	-95.60000	220.04246	1.000
	BMP2 + FSH	86.40000	220.04246	1.000



Εικόνα 9. Διακύμανση της έκκρισης της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια 72 ωρών ύστερα από την προσθήκη ορμονών-διεγερτών (Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)).

Από τις παραπάνω αναλύσεις παρατηρείται μείωση στην έκκριση της προγεστερόνης μετά τη προσθήκη της ορμόνης BMP-2 (100 ng/ml), της FSH (10 ng/ml) και του

συνδυασμού τους, χωρίς να εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. (Εικόνα 9)

Παραγωγή οιστραδιόλης στις 24 ώρες καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 507.9 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 171.8 pg/ml, η μέγιστη τιμή ήταν 986 pg/ml και η τυπική απόκλιση των τιμών 214.6 pg/ml.

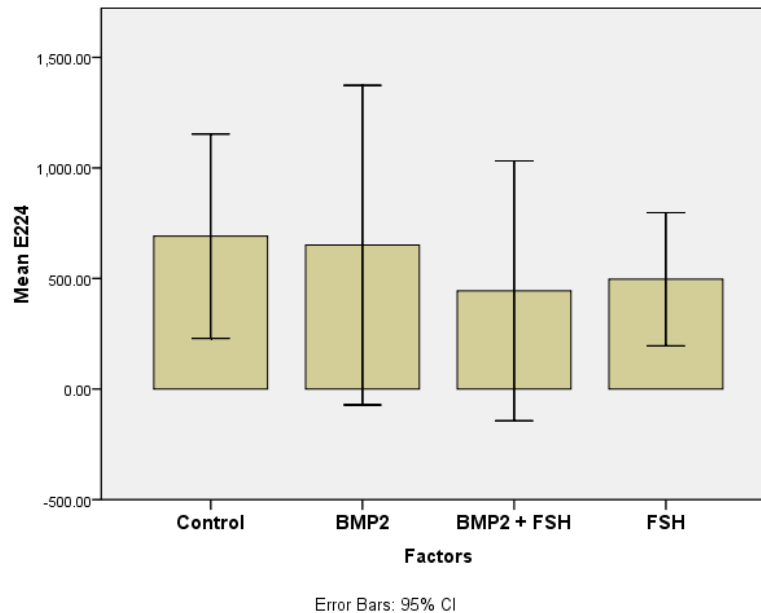
Με την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν η επίδραση της BMP-2 και των άλλων συνδυασμών-ορμονών σε σύγκριση με το Control, στις 24 ώρες καλλιέργειας και στην έκκριση της οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα. (Πίνακας 9)

Πίνακας 9. Πολλαπλή σύγκριση της έκκρισης της οιστραδιόλης μεταξύ των δειγμάτων: Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml) σε καλλιέργεια (24 ωρών) κοκκωδών κυττάρων.

E224

Bonferroni

(I) Factors	(J) Factors	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	40.43333	177.86148	1.000
	BMP2 + FSH	247.06667	177.86148	1.000
	FSH	194.60000	177.86148	1.000
BMP2	Control	-40.43333	177.86148	1.000
	BMP2 + FSH	206.63333	177.86148	1.000
	FSH	154.16667	177.86148	1.000
BMP2 + FSH	Control	-247.06667	177.86148	1.000
	BMP2	-206.63333	177.86148	1.000
	FSH	-52.46667	177.86148	1.000
FSH	Control	-194.60000	177.86148	1.000
	BMP2	-154.16667	177.86148	1.000
	BMP2 + FSH	52.46667	177.86148	1.000



Εικόνα 10. Διακύμανση της έκκρισης της οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια 24 ωρών ύστερα από την προσθήκη ορμονών-διεγερτών (Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)).

Από τις παραπάνω αναλύσεις παρατηρείται μία μικρή μείωση στην έκκριση της οιστραδιόλης μετά τη προσθήκη της ορμόνης BMP-2 (100 ng/ml), της FSH (10 ng/ml) και του συνδυασμού τους, χωρίς να εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων και του Control. (Εικόνα 10)

Παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 3673.2 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 1124 pg/ml, η μέγιστη τιμή ήταν 9206 pg/ml και η τυπική απόκλιση των τιμών 3055.7 pg/ml.

Με την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν η επίδραση της BMP-2 και των άλλων συνδυασμών-ορμονών σε σύγκριση με το Control, στις 48 ώρες καλλιέργειας και στην έκκριση της οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα. (Πίνακας 10)

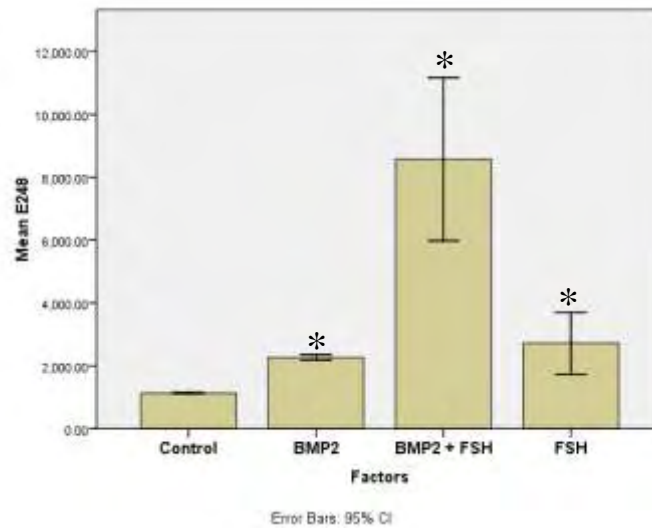
Πίνακας 10. Πολλαπλή σύγκριση της έκκρισης της οιστραδιόλης μεταξύ των δειγμάτων: Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml) σε καλλιέργεια (48 ωρών) κοκκωδών κυττάρων.

E248

Bonferroni

(I) Factors	(J) Factors	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	-1133.66667	456.13896	.227
	BMP2 + FSH	-7446.33333	456.13896	.000
	FSH	-1588.73333	456.13896	.050
BMP2	Control	1133.66667	456.13896	.227
	BMP2 + FSH	-6312.66667	456.13896	.000
	FSH	-455.06667	456.13896	1.000
BMP2 + FSH	Control	7446.33333	456.13896	.000
	BMP2	6312.66667	456.13896	.000
	FSH	5857.60000	456.13896	.000
FSH	Control	1588.73333	456.13896	.050
	BMP2	455.06667	456.13896	1.000
	BMP2 + FSH	-5857.60000	456.13896	.000

The mean difference is significant at the 0.05 level



Εικόνα 11. Διακύμανση της έκκρισης της οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια 48 ωρών ύστερα από την προσθήκη ορμονών-διεγερτών (Control (Ανδροστενδιόνη 10-6M), BMP-2 (100ng/ml) και BMP-2 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)).

Από τις παραπάνω αναλύσεις παρατηρείται αύξηση στην έκκριση της οιστραδιόλης μετά τη προσθήκη της ορμόνης BMP-2 (100 ng/ml), της FSH (10 ng/ml) και του συνδυασμού

τους. Σημαντική αύξηση σε σχέση με το Control δείγμα παρατηρείται μετά την προσθήκη του συνδυασμού BMP-2 (100 ng/ml) + FSH (10 ng/ml) εμφανίζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$). Μικρότερη αύξηση της οιστραδιόλης παρατηρείται και μετά την προσθήκη της FSH (10 ng/ml), αλλά με στατιστικά σημαντική διαφορά με το Control δείγμα ($P < 0,05$). Στατιστικά σημαντική διαφορά φαίνεται όμως και μεταξύ των ομάδων BMP-2 με BMP-2 + FSH, προκαλώντας μεγαλύτερη έκκριση της οιστραδιόλης στην καλλιέργεια η προσθήκη της BMP-2 (100 ng/ml) μαζί με την FSH (10 ng/ml). (Εικόνα 11)

Τέλος πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με την ανάλυση Bonferroni για την παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης αντίστοιχα, συμπεριλαμβάνοντας τα δείγματα απ' όλες τις καλλιέργειες. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) παρατηρήθηκε στην παραγωγή της οιστραδιόλης στις καλλιέργειες των 24 και 48 ωρών και μεταξύ των δειγμάτων BMP-2 (24 ώρες) με την BMP-2 (48 ώρες), της FSH (24 ώρες) με την FSH (48 ώρες) και των BMP-2 + FSH (24 ώρες) με τις BMP-2 + FSH (48 ώρες). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών της οιστραδιόλης στην καλλιέργεια των 48 ωρών σε σύγκριση με την καλλιέργεια των 24 ωρών.

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία είδαμε την επίδραση της BMP-2 στη στεροειδογένεση και συγκεκριμένα στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλης και προγεστερόνης, σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων έδειξε την ανασταλτική δράση της BMP-2 (μόνη της ή σε συνδυασμό με την FSH(10 ng/ml) στην έκκριση της προγεστερόνης, προκαλώντας μείωση της παραγωγής της. Αντίστοιχα η αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης, έδειξε ότι η επίδραση της BMP-2 (100 ng/ml) και της FSH(10 ng/ml) ήταν συνεργιστική, καθώς η προσθήκη και των δύο ορμονών στην καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων προκάλεσε την αυξημένη παραγωγή της.

Προηγούμενες μελέτες σε πειράματόζωα έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η BMP-2 έχει βρεθεί ότι μειώνει την παραγωγή της προγεστερόνης σε πειράματα που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα προβάτων (Juengel et al., 2006), ποντικών (Inagaki et al., 2009) όπως και στην καρκινική σειρά κοκκωδών κυττάρων KNG (Miyoshi et al., 2006). Βασιζόμενοι σ' αυτά τα στοιχεία μπορούμε να υποθέσουμε ότι η BMP-2 μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της ωχρινοποίησης. Παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα έδειξε ότι η BMP-2 είναι ικανή να μειώσει την παραγωγή της προγεστερόνης, αναστέλλοντας την έκφραση της StAR πρωτεΐνης καθώς και των υποδοχέων της LH (Shi et al., 2011). Συνακολούθως, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της προγεστερόνης μετά την προσθήκη και των δύο ορμονών FSH (10 ng/ml) και της BMP-2 (100 ng/ml). Παρόμοια επίδραση υπήρξε και σε μελέτη που έγινε σε κοκκώδη κύτταρα όρνιθας, όπου η δράση της BMP-2 ανέστειλε την επαγόμενη από την FSH παραγωγή της προγεστερόνης (Haugen and Johnson, 2010). Όλα τα παραπάνω στοιχεία συγκλίνουν στο γεγονός ότι η BMP-2 ορμόνη, μόνη της ή και σε συνεργασία με την FSH, ίσως παίζει αρνητικό ρόλο στην ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων.

Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει και για την παραγωγή της οιστραδιόλης. Η προσθήκη της BMP-2 σε κοκκώδη κύτταρα προβάτων αύξησε τα επίπεδα της οιστραδιόλης, με έναν χρονικό και δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Souza et al., 2002).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της οιστραδιόλης όταν προστέθηκε στην καλλιέργεια BMP-2 (100 ng/ml) μαζί με FSH (10 ng/ml). Η δράση της κάθε μίας ορμόνης ξεχωριστά στη στεροειδογένεση έχει διερευνηθεί τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα σε ποντίκια η FSH επιδρά θετικά στην παραγωγή της οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα (Shimasaki et al., 1999). Αντίστοιχα και η BMP-2 ασκεί θετική δράση στην παραγωγή της οιστραδιόλης τόσο στο πρόβατο (Souza et al., 2002), όσο και στον άνθρωπο (Shi et al., 2011). Συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια η μελέτη της Shi έδειξε ότι η BMP-2 ενισχύει την παραγωγή της οιστραδιόλης επάγοντας την έκφραση της αρωματάσης και των υποδοχέων της FSH.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι ο η ορμόνη BMP-2 πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ωχρινοποίηση τους συμμετέχοντας ενεργά στη στεροειδογένεση και συγκεκριμένα στην παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Η συσχέτιση της BMP-2 με την ωοθυλακική ανάπτυξη στη γυναίκα, θα εξηγήσει πιθανόν και έναν ακόμα άγνωστο παράγοντα υπογονιμότητας και ωοθηκικής δυσγενεσίας.

Επιπροσθέτως η συνεργασία των BMP-2 και FSH στην παραγωγή της οιστραδιόλης πρέπει να συνεκτιμηθεί και να ανοίξει δρόμο για επιπλέον έρευνα και εφαρμογή αυτής της γνώσης στην πράξη.

Τέλος καθίσταται σαφές ότι θα πρέπει να ακολουθήσουν περαιτέρω έρευνες σε ωοθυλάκια γυναικών για να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της BMP-2 στην στεροειδογένεση και στην αναπαραγωγή. Ίσως θα πρέπει να πραγματοποιηθεί έρευνα με περισσότερα δείγματα και εξέταση και άλλων παραγόντων όπως η ηλικία, η αιτία υπογονιμότητας καθώς και η αλληλεπίδραση παραγόντων με την BMP-2 όπως η ωχρινοτρόπος ορμόνη LH, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG, η αυξητική ορμόνη κ.α.

Abstract

Follicular growth is regulated by gonadotropins, as well as by follicular, paracrine and autocrine factors. Studies in animal models, showed that BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) may act as such factors. Those proteins, play key roles in fertility in mammals, by regulating processes such as steroidogenesis and mitosis in granulosa cells. In this study, we examined the impact of BMP-2 in steroidogenesis, in luteinized granulosa cells from women participating *in vitro* fertilization treatment. The aim of this study was to address the effect of this factor in human granulosa cells, as previous studies have examined this effect in animal models. Experimental procedures include culture of human granulosa cells, in the presence or absence of FSH, BMP-2 and Androstenedione. Levels of estradiol and progesterone, 24, 48 and 72 hours after treatment, were measured using ELISA method. Measured levels of those hormones, in the corresponding time points, tested for statistical significance using one-way ANOVA analysis. Statistical analysis showed that BMP-2 (100 ng/ml), either alone or with FSH (10 ng/ml) induce the production of estradiol, in human granulosa cells, whereas decrease the production of progesterone. It's concluded that BMPs may play significant role in normal follicular growth, in humans, by acting on the steroidogenesis process in luteinized granulosa cells.

Βιβλιογραφία

- Adashi E.Y. (1998) The Igf family and folliculogenesis. *J. Reprod. Immuno.* 39, 13-19.
- Alexandris E., Millingos S., Kollios G., Seferiadis K., Lolis D. and Messinis I.E (1997) Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. *Clin. Endocrinol (Oxf)* 47, 721-6.
- Billig H., Futura I. and Hsueh A.J (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-12.
- Brankin V., Quinn R.L, Webb R., Hunter M.G. (2005) BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co- cultured with granulosa cells. *Domest Anim. Endocrinol.* 29:(593–604).
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. (2005) Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim. Endocrinol.* 28:367–79.
- Course J.F., Yates M.M., Deroo B.J. and Korach K.S (2005) Estrogen receptor- beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* 146, 3247-62.
- Dafopoulos K.G., Kotsovassilis C.P., Millingos S.D., Kallitsaris A.T., Georgadakis G.S., Sotiros P.G. and Messinis I.E. (2004) Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen – treated post- menopausal women: evidence that gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum. Reprod.* 19, 1985-92.
- Di Pasquale E., Beck- Peccoz P. and Persani L. (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 106-11.
- Dorrington J.H and Armstrong D.T.(1979) Effects of FSH on gonadal functions. *Recent. Prog. Horm. Res.* 35, 301-42.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM.(2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* . 30, 624-712.

Emmen J.M., Course J.F., Elmore S.A., Yates M.M., Kissling G.E. and Korach K.S. (2005) In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) (alpha) and ER (beta) null mice indicate a role for ER (beta) in follicular maturation. *Endocrinology* 146, 2817-26.

Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A. and Hofeditz C.(1985) The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6, 371-99.

Erickson GF, Shimasaki S (2003) The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1:9.

Fauser B.C. and Van Heusden A.M (1997) Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* 18, 71-106.

Findlay J.K., Drummond A.E., Britt K.L., Dyson M., Wreford N.G., Robertson D.M., Groome N.P., Jones M.E., and Simpson E.R. (2000) The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 81-7.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. (2004) Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127:239–54.

Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD (1996) Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:878-883.

Haugen MJ, Johnson AL.(2010) Bone Morphogenetic Protein 2 inhibits FSH responsiveness in hen Granulosa cells. *Reprod.* 140(4):551-8.

Hild-Petito S., Stouffer R.L., and Brenner R.M. (1988) Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 123, 2896-905.

Hillier S.G. (2001) Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179, 39-46.

Hillier S.G. (1994) Current of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 9, 188-91.

Hillier S.G., Whitelaw P.F. and Smyth C.D. (1994) Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two- gonadotrophin” model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 51-4.

Hiroi H, Christenson LK, Strauss JF (2004) Regulation of transcription of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modification. *Mol Cell Endocrinol* 215:119-126.

Hirshfield AN. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124, 43-101.

Inagaki K, Otsuka F, Miyoshi T, Yamashita M, Takahashi M, Goto J, Suzuki J, Makino H (2009) p38- Mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte cocultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4. *Endocrinology* 150:1921-1930.

Iwai T., Nanbu Y., Iwai M., Taii S., Fujii S. and Mori T. (1990) Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchows Arch A. Pathol. Anat. Histopathol.* 417, 369-75.

Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA: (2006) Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 154:739-744.

Judd S., Terry A., Petrucco M. and White G. (1992) The source of pulsatile secretion of progesterone during the human follicular phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 299-305.

Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty KP (2006) The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6, and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction* 131:501-513.

Kawabata M, Miyazono K (2000) Bone morphogenetic proteins. In: Canalis E ed. *Skeletal Growth Factors*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 269-290.

Knight PG, Glister C. (2006) TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132:191-206.

Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux n, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Laven J.S., Fauser B.C. (2006) What role of estrogens in ovarian stimulation. *Maturitas* 20;54(4):356-62.

Liu F., Ventura F., Doody J., Massague J.(1995) Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell. Biol.* 15:3479-3486.

Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL (1990) Organogenesis patterns suggest a role for bone morphogenetic protein- 2A (BMP-2A). *Development* 109:833-844.

Matsuda F., Inoue N., Nanabe N. and Ohkura S. (2012) Follicular growth and atresia in mammalian ovaries : regulation by survival and death of granulosa cells. *J. Reprod. Dev.* 58(1): 44-50.

May J.V., Frost J.P and Bridge A.J., (1990) Regulation of granulosa cell proliferation: facilitative roles of platelet- derived growth factors and low density lipoprotein. *Endocrinology* 126, 2896-905.

McGee E, Spears N, Minami S, Hsu S.Y., Chun S.Y., Billig H. and Hsueh A.J. (1997) Preantral ovarian follicles in serum- free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'- monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle- stimulating hormone. *Endocrinology*, 138, 2417-24.

McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondth R. and Ryan K.J (1979) Metabolism of androstendione by human ovarian tissues in vitro with particular reference to reductase and aromatase activity. *Steroids* 34, 429-43.

McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondth R. and Ryan K.J (1979) The production of progesterone , androgens, and estrogens by granulosa cells, theca tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 687-99.

McMNatty KP, Henderson KM (2006) Gonadotrophins, fecundity genes and ovarian follicular function. *J Steroid Biochem* 1987; 27: 365-373.

Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. (2010) The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1205:5-11.

Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, kano Y, Otani H, MIMUra Y, Ogura T, Makino H. (2006) Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod*;74:1073-1082.

Moustakas A. and Heldin C.H. (2009) The regulation of TGFβ signal transduction. *Development* 136, 3699-3714.

Mullis P.E., Yoshimura N., Kuhlmann B., Lippuner K., Jaeger P. and Harada H. (1997) Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the 450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J. Clin. Endocrinol. metab.* 82, 1739-45.

Otsuka F. (2010) Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr. J.* 57,(1):3-14.

Pangas SA, Li X, Robertson E.J, Matzuk MM. (2006) Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 Knockout mice. *Mol Endocrinol* 20: 1406-1422.

Pelletier and El- Alfy M. (2000) Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4835-40.

Rabinovici J., Blankstein J., Goldman B., Rudak E., Dor Y., Pariente C., Geier A., Lunenfeld B. and Mashiach S.(1989) In vitro fertilization and primary embryonic cleavage are possible in 17 alpha- hydroxylase deficiency despite extremely low intrafollicular 17 beta-estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 693-7.

Rolaki A., Drakakis P., Millingos S., Loutradis D. and Makrigiannakis A. (2005) Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod. Biomed. Online* 11, 93-103.

Roy S.K., Wang S.C. and Greenwald G.S.(1987) Radioreceptor and autoradiographic analysis of FSH, hCG and prolactin binding sites in primary to antral hamster follicles during the periovulatory period. *J. Reprod. Fertil.* 79,307-13.

Scobie G.A., Macpherson S., Millar M.R., Groome N.P., Romana P.G. and Saunders P.T.(2002) Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids* 67, 985-92.

Schoot D.C., Coelingh Bennink H.J., Mannaerts B.M., Lamberts S.W., Bouchard P. and Fauser B.C.(1992) Human recombinant follicle- stimulating hormone induces growth of preovulatory follicles without concomitant increase in androgen and estrogen biosynthesis in a woman with isolated gonadotrophin deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1471-3.

Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. (2009) Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 92:1794-1798.

Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y. (2010) Bone morphogenetic protein 7(BMP-7) increases the expression of follicle –stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. *Fertil Steril* 93:1273-1279.

Shi J., Yoshino O., Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Nose E., Nishii O., Yano T., Taketani Y. (2011) Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and STAR in Human Granulosa Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 65, 421-427.

Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ and Erickson GF (1999) A functional bone morphogenetic protein system in the ovary *Proceedings National Academy of Sciences USA* 96 7282–728.

Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F (2003) The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod. Suppl.* 61:323-337.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF, (2004) The role of bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25:72-101.

Smyth C.D., Miro F., Whitelaw P.F., Howles C.M. and Hillier S.G. (1993) Ovarian thecal/ interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle- stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology.* 133, 1532-8.

Souza, C. J. H., Campbell B. K., McNeilly A. S and Baird D. T. (2002) Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry, *Reproduction* 123, 363–369.

Trombly D.J., Woodruff T.K., Mayo K.E. (2009) Roles of transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis *Semin. Reprod. Med.* 27(1):14-23.

Van Wezel and Rodgers R.J (1996) Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol. Reprod.* 55, 1003-11.

Wang X.N and Greenwald G.S. (1993) Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J. Reprod. Fertil.* 99,403-13.

Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. (2007) Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 68, S22-S29.

Whitelaw P.F., Smyth C.D., Howles C.M. and Hillier S.G (1992) Cell –specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 9, 309-12.

Woods DC & Johnson AL 2005 Regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA in hen granulosa cells relative to follicle selection. *Biology of Reproduction* 72 643–650. (doi:10.1095/biolreprod. 104.033902)

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988), Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.

Yi SE, LaPolta PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK and Lyons KM (2001) The type I BMP receptor *Bmpr1B* is essential for female reproductive function *Proceedings National Academy of Sciences USA* 98 7994–7999.