

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

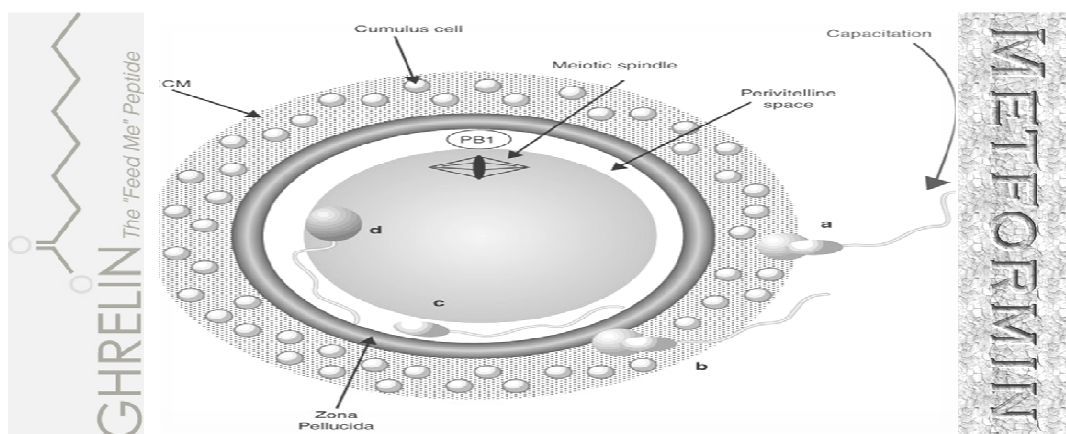
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ  
ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ  
ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ**



ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΝΩΣΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2010

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Μέλη :

ΗΛΙΑΣ ΖΙΝΤΖΑΡΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ M.Sc, Ph.D

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια διεξαγωγής του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στη Βιολογία της Αναπαραγωγής, στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2009-2010. Υπεύθυνος για την επίβλεψη της εργασίας αυτής ήταν ο Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιωάννης Ε. Μεσσήνης.

Φτάνοντας λοιπόν στη συγγραφή της παρούσας εργασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα κάποιους ανθρώπους που μου έδωσαν τη δυνατότητα να την ξεκινήσω και με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Ιωάννη Μεσσήνη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξάγω τη συγκεκριμένη εργασία, καθώς και να γνωρίσω και να ειδικευτώ σε αυτόν τον τόσο ταχέως εξελισσόμενο κλάδο της επιστήμης. Οι πολύτιμες γνώσεις και η βοήθειά του, με έκαναν να καταλάβω την αξία της επιστημονικής συνεργασίας και της ομαδικής δουλειάς καθώς και το ότι, στο χώρο της Ιατρικής και γενικότερα της Επιστήμης, η προσπάθεια, η διαδικασία προς ένα στόχο είναι εξίσου σημαντική με την επίτευξη αυτού του στόχου.

Για την υπομονή τους, την κατανόησή τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στην αναζήτηση και εύρεση πληροφοριών, ευχαριστώ τη Γραμματεία του Προγράμματος, κ. Σοφία Καρυώτου και κ. Γεωργία Κόκκα.

Τέλος, ευχαριστώ πάνω από όλα την οικογένειά μου, για όλα τα εφόδια που μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για τη διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει ώστε να μου δώσουν τη δυνατότητα να ασχοληθώ με κάτι τόσο συναρπαστικό όσο η αναζήτηση της γνώσης.

Θέλω να ελπίζω ότι, μέσα στη συνεχώς μεταβαλλόμενη Ιατρική πραγματικότητα, τα συμπεράσματα αυτής της έρευνας θα βοηθήσουν στη διαφώτιση ενός μικρού τουλάχιστον μέρους της επιστημονικής αλήθειας.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	3
Περιεχόμενα	4

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Μετορμίνη και Γκρελίνη**

1.1 Εισαγωγή	5
1.1.1 Μετορμίνη δομή και λειτουργία	5
1.1.2 Μετορμίνη και αναπαραγωγή	9
1.1.3 Γκρελίνη δομή και λειτουργία	12

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ωρίμανση των ωαρίων**

2.1 In vivo ωρίμανση των ωαρίων	17
2.2 In vitro maturation των ωαρίων (IVM)	25

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Στεροειδογένεση**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:**

4.1 Η μετορμίνη στην ωρίμανση των ωαρίων	30
4.2 Η μετορμίνη στην ωοθηκική στεροειδογένεση	34
4.3.1 Γκρελίνη και αναπαραγωγή	36

4.3.2 Γκρελίνη και ωοθήκες	37
4.3.3 Γκρελίνη και Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών	38
4.3.4 Ανάπτυξη του εμβρύου και εμφύτευση	40
4.4 Η γκρελίνη στην ωρίμανση των ωαρίων	42
4.5 Η γκρελίνη στην ωοθηκική στεροειδογένεση	44
 <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα-Συζήτηση</u></b>	 47
Ερευνητική Πρόταση	51
Περίληψη	53
Abstract	55
 <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	 57

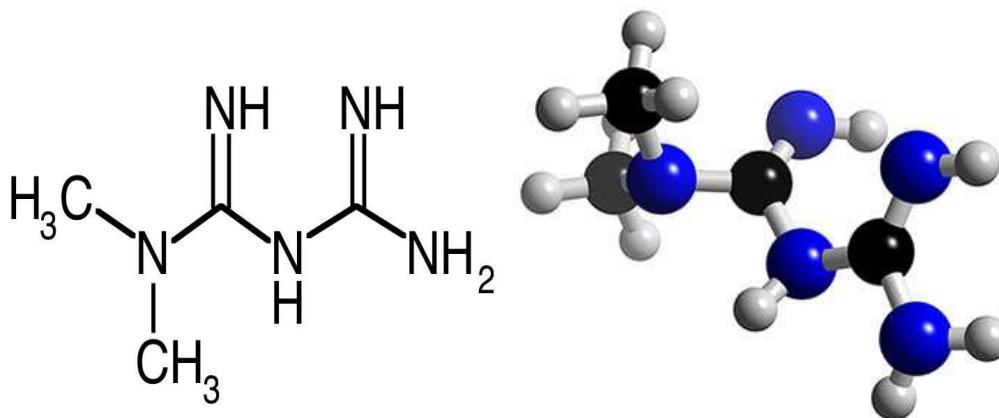
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΚΑΙ ΓΚΡΕΛΙΝΗ

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1.1 ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα διγουανίδια είναι η φαινορμίνη (έχει απαγορευτεί στις περισσότερες χώρες λόγω υψηλού κινδύνου γαλακτικής οξέωσης) και η **μετφορμίνη** (*glucophage*), με κύριο εκπρόσωπο τη δεύτερη. Τα φάρμακα αυτά προϋποθέτουν την παρουσία λειτουργικών β-κυττάρων παγκρέατος για να ασκήσουν τη δράση τους. Η κύρια δράση τους είναι η αναστολή παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ. Επίσης, προωθούν την απώλεια σωματικού βάρους.



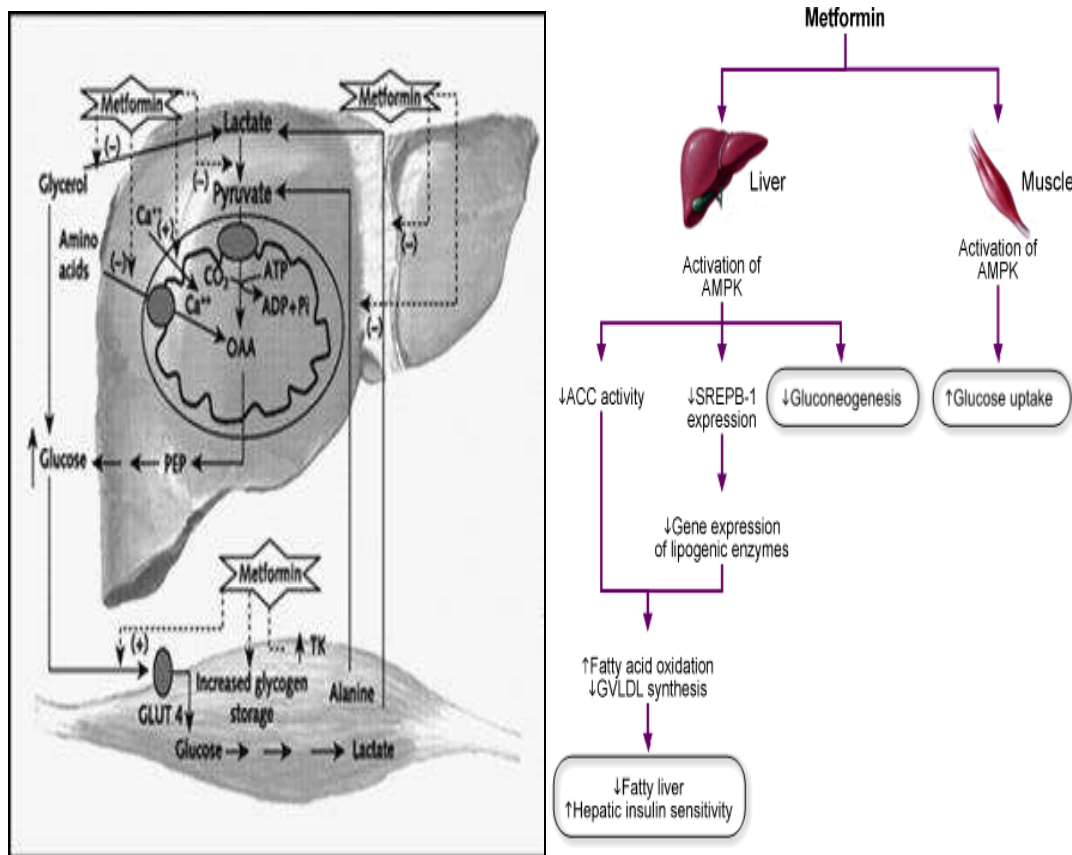
<http://www.3dchem.com/topdrugs.asp>

**Εικόνα 1.1** Δομή μορίου της μετφορμίνης

Η μετφορμίνη είναι μια διγουανίδη (διμεθυλδιγουανίδη) και όπως όλα αυτά τα φάρμακα θεωρείται ευγλυκαιμικός παράγοντας και όχι υπογλυκαιμικός. Συγκεκριμένα, μειώνει τα επίπεδα σακχάρου του αίματος, α) προάγοντας την αναερόβια γλυκόλυση στους περιφερικούς ιστούς (αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς-κυρίως τους μυς και το ήπαρ), β) αναστέλλοντας την ηπατική γλυκονεογένεση (μειώνει το ποσό της γλυκόζης που παράγεται από το ήπαρ), γ) ελαττώνοντας την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης και δ) προάγοντας την δέσμευση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της στους περιφερικούς ιστούς (Bailey & Turner 1996). Τα χαμηλότερα επίπεδα σακχάρου στο αίμα οδηγούν σε μικρότερη ανάγκη για ινσουλίνη. Ο οργανισμός στη συνέχεια παράγει λιγότερη ινσουλίνη, όπου η ελάττωση αυτής οδηγεί σε χαμηλότερη παραγωγή ανδρογόνων.

Ανεξάρτητα από τις δράσεις στη γλυκόζη του αίματος, η μετφορμίνη έχει θετικές επιδράσεις στο λιπιδικό μεταβολισμό. Σε ελεγχόμενες κλινικές μελέτες μεσαίας και μεγάλης χρονικής διάρκειας έχει παρατηρηθεί ότι η μετφορμίνη μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.

Η μετφορμίνη είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος αντιδιαβητικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του μη ινσουλινο-εξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη (ΣΔ τύπου II), καθώς μειώνει τα επίπεδα ινσουλίνης χωρίς να προκαλεί υπογλυκαιμία σε νορμογλυκαιμικά άτομα.



**Εικ.1.2.** Μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης (Kirpichnikov et al, Ann Intern Med 2002)

Ο μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης (Εικ.1.2) έγκειται στη μείωση της ηπατικής γλυκονεογένεσης, στην αύξηση πρόσληψης της γλυκόζης (αύξηση της τυροσινικής κινάσης και των μεταφορέων της γλυκόζης GLUT), στην αύξηση του οξειδωτικού και μη οξειδωτικού μεταβολισμού της γλυκόζης, καθώς και στη μείωση της παραγωγής και οξείδωσης των λιπαρών οξέων και της επακόλουθης ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης (Kirpichnikov et al, Ann Intern Med 2002).

### 1.1.2 ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως η χρήση μετφορμίνης στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών μπορεί να βελτιώσει το ορμονικό και μεταβολικό περιβάλλον, να αποκαταστήσει τον κύκλο τους και να επαναφέρει την ωοθυλακιορρηξία σε πιο τακτική βάση.



Με τον όρο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic ovary syndrome, PCOS) εννοούμε τη συνύπαρξη βιοχημικών και ορμονικών μεταβολών σε συνδυασμό με την ύπαρξη πολυκυστικών ωοθηκών.

Τα αναθεωρημένα απαιτούμενα διαγνωστικά κριτήρια του PCOS (Rotterdam 2003) απαιτούν την ύπαρξη δύο εκ των ακόλουθων:

1. όλιγο- και/ή ανωθυλακιορρηξία
2. Κλινικά (π.χ. δασυτριχισμός και αλωπεκία ανδρικού τύπου, ακμή) και/ή βιοχημικά σημεία υπερανδρογονισμού και αποκλεισμός άλλων αιτιών (π.χ. συγγενής επινεφριδιακή υπερπλασία)
3. Πολυκυστικές ωοθήκες (PCO) υπερηχογραφικά



**Εικ.1.3** Υπερηχογραφική εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών

Για τον ορισμό μιας ωοθήκης ως πολυκυστικής στα πλαίσια του PCOS, απαιτείται η παρουσία 12 ή περισσότερων ωοθυλακίων με διάμετρο 2-9 mm, και/ή αυξημένος όγκος ωοθήκης (>10 ml). Οι διαταραχές που χαρακτηρίζουν το PCOS είναι α) διαταραχές της αναπαραγωγικής λειτουργίας (διαταραχές εμμηνορρυσίας, αυτόματες εκτρώσεις, σακχαρώδης διαβήτης κύησης και υπέρτασική νόσος κύησης) β) σημεία υπερανδρογονισμού και γ) μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία των γυναικών, όπως αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, διαταραχές πηκτικού μηχανισμού, καρδιαγγειακή νόσος, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, υπερπλασία και καρκίνος του ενδομητρίου και τέλος αποφρακτική υπνική άπνοια.

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ως αποτέλεσμα της αντίστασης αυτής είναι η αυξημένη έκκριση ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος και η αντισταθμιστική υπερινσουλιναιμία. Όσο η υπερινσουλιναιμία υπερνικά την IR τα επίπεδα της γλυκόζης παραμένουν φυσιολογικά. Εάν όμως η αντισταθμιστική αυτή έκκριση μειωθεί, προκύπτει σχετική ή απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης, παθολογική ανοχή γλυκόζης (IGT) και ΣΔ τύπου 2. Γυναίκες με PCOS έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο (3-7 φορές) για την ανάπτυξη ΣΔ τύπου 2. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος στις ανωθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS, στις παχύσαρκες και σε αυτές με οικογενειακό ιστορικό ΣΔ τύπου 2.

Μακρόχρονη θεραπεία με μετφορμίνη σε γυναίκες με PCOS, έχει δείξει ότι βοηθά στην ρύθμιση του έμμηνου κύκλου, αυξάνει την ωοθυλακιορρηξία, μειώνει τα επίπεδα των ανδρογόνων στον ορό του αίματος, καθώς και τον κίνδυνο αποβολών σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Έχειδειχθεί ότι η θεραπεία με μετφορμίνη προκαλεί ωοθυλακιορρηξία σε περίπου 45% των γυναικών με PCOS.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (3-βHSD) και κυτόχρωμα P450c17α. Το κυτόχρωμα P450c17α έχει διττή δράση, μετατρέπει την προγεστερόνη σε 17-υδροξυπρογεστερόνη με τη δράση του ενζύμου 17α-υδροξυλάση και στη συνέχεια μετατρέπει τη 17-υδροξυπρογεστερόνη σε ανδροστενδιόνη με τη δράση του ενζύμου 17,20 λυάση. Το κυτόχρωμα P450c17α κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP17.

Έχει βρεθεί ότι το mRNA των γονιδίων CYP17 και CYP11A (ένζυμο διαχωρισμού της πλάγιας αλυσού) βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS, σε σύγκριση με τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών χωρίς το σύνδρομο.

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν ειδικά ένζυμα της στεροειδογένεσης υπερεκφράζονται στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS.

Μολονότι η διαταραχή της στεροειδογένεσης των κυττάρων της έσω θήκης φαίνεται ότι αποτελεί τον κύριο υπεύθυνο για την ενδοωοθηκική υπερανδρογοναιμία στο PCOS, διαταραχές των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας θα μπορούσαν ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο μέσω των εκκρίσεων των κυττάρων αυτών.

Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθυλακίων παράγουν ινχιμίνες, οι οποίες πιστεύεται ότι τροποποιούν άμεσα την ωοθυλακική στεροειδογένεση. Βρέθηκε λοιπόν ότι η ινχιμίνη Α ενισχύει τόσο τη βασική, όσο και την προκαλούμενη από την LH παραγωγή ανδρογόνων σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων της έσω θήκης ωοθυλακίων. Έτσι, οι ινχιμίνες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην περίσσεια ωοθηκικών ανδρογόνων στο PCOS, μέσω παρακρινικής επίδρασης από τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας

## 1.2 ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Η γκρελίνη, ένα πρόσφατα αναγνωρισμένο ακυλιωμένο πεπτίδιο 28 αμινοξέων (Εικ.1.4) είναι μια ορμόνη υπεύθυνη για τη ρύθμιση της όρεξης, η οποία ανακαλύφθηκε το 1999 από τους Kojima et al. Η ουσία αυτή, βρέθηκε στο στομάχι αρουραίου και θεωρήθηκε ως ο ενδογενής διεγέρτης του υποδοχέα έκκρισης της αυξητικής ορμόνης υπότυπου 1a (GHS-R1a).

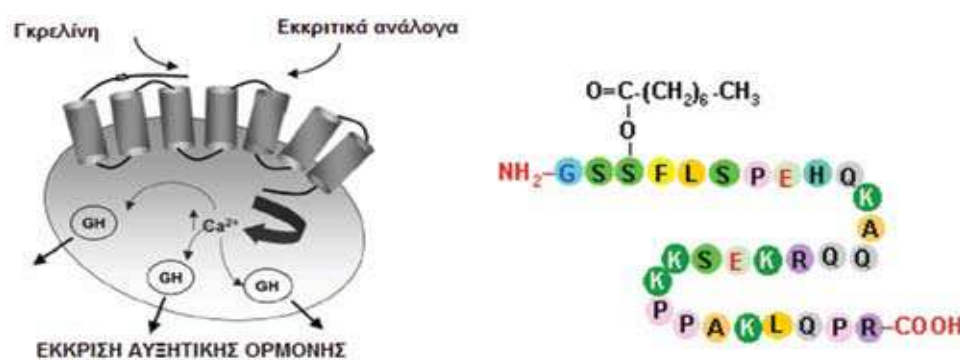
Η γκρελίνη είναι γνωστή για τις υποθαλαμικές της δράσεις στους νευρώνες που εκκρίνουν την ορμόνη έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GHRH) και στους νευρώνες τους σχετιζόμενους με το νευροπεπτίδιο Υ και το agouti-related πεπτίδιο.

Επιπλέον, ενώ η γκρελίνη επηρεάζει διάφορα συστήματα και δρα σε ποικίλα όργανα, πρόσφατα μόνο αναγνωρίστηκε η πολυπλοκότητα των λειτουργιών της στα θηλαστικά και ιδιαίτερα στον άνθρωπο. Η έκκριση της γκρελίνης παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στη διάρκεια της ημέρας, με τις κορυφώσεις να προηγούνται της πρόσληψης τροφής, που σημαίνει ότι η τάση για πρόσληψη τροφής "πυροδοτείται" από την έκκριση γκρελίνης. Η γκρελίνη ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και κατά συνέπεια το σωματικό βάρος, ενώ ο υποδοχέας GHS-R1a, που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, περιλαμβάνοντας και τους υποθαλαμικούς νευρώνες, φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της λήψης τροφής και των επιπέδων της γλυκόζης.

Η αμοιβαία σχέση αλληλεξάρτησης που υπάρχει μεταξύ γκρελίνης και ινσουλίνης φανερώνει ότι η γκρελίνη συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Αποκοπή του μορίου της γκρελίνης με μηχανισμούς μετάλλαξης σε ποντίκια αύξησε την προκαλούμενη από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης και βελτίωσε την ινσουλινική ευαισθησία στους περιφερικούς ιστούς. Επιπλέον, πρόσφατες εργασίες υποδεικνύουν τη συμμετοχή των μηχανισμών δράσης της γκρελίνης στο μεταβολικό σύνδρομο. Τα επίπεδα της κυκλοφορούσας γκρελίνης είναι αντιστρόφως ανάλογα με το δείκτη βάρους σώματος καθώς επίσης αυξάνονται με τη μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων και μειώνονται με την πρόσληψη της τροφής υποδεικνύοντας ότι η έκκριση της γκρελίνης ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από μεταβολικά σήματα.

Η έκκριση της γκρελίνης είναι αυξημένη στην ανορεξία και την καχεξία και μειωμένη στην παχυσαρκία, ενώ επανέρχεται στα φυσιολογικά όρια με την επαναφορά στο ιδεατό βάρος σώματος. Λόγω αυτού, οι αλλαγές της γκρελίνης ως απάντηση στις διακυμάνσεις της θρεπτικής κατάστασης του οργανισμού είναι αντίθετες με αυτές της λεπτίνης και έχει προταθεί ότι αυτές οι δύο ορμόνες δρουν ως σήματα μεταβολικής ισορροπίας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Η μόνη εξαίρεση στην αρνητική συσχέτιση μεταξύ δείκτη βάρους σώματος και έκκρισης γκρελίνης είναι το σύνδρομο Prader-Willi όπου η παχυσαρκία συνδυάζεται με υπερέκκριση γκρελίνης.

Η γκρελίνη επίσης, εκκρίνεται από τον πλακούντα, παράγεται στο νεφρό, στην υπόφυση, στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου και σε άλλους ιστούς. Μετά την παραγωγή της, η γκρελίνη εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία και εμφανίζει σημαντική συγκέντρωση στο πλάσμα.



**Εικόνα 1.4** Η γκρελίνη, εκκριτικά ανάλογα αυξητικής ορμόνης (GHSs) και υποδοχέας GHS-R.

Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η γκρελίνη εκφράζεται και/ή λειτουργεί σε διάφορα επίπεδα του γοναδοτροπικού άξονα, όπως και σε άλλους αναπαραγωγικούς ιστούς. Σύμφωνα λοιπόν με κάποιες μελέτες, η γκρελίνη ενδεχομένως να επιδρά στην αναπαραγωγική λειτουργία των ζώων και των ανθρώπων (Garcia et al., 2007; Tena-Sempere, 2008).

Αρχικά, δεδομένα έδειξαν ότι κεντρική χορήγηση της γκρελίνης καταστέλλει τις ώσεις της LH σε θηλυκούς αρουραίους που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή (Furuta et al, 2001). Επίσης, έχειδειχθεί ότι η γκρελίνη είναι ικανή να εμποδίσει τη έκκριση της LH in vivo σε θηλυκούς αρουραίους στην προεφηβική ηλικία, καθώς και σε άρρενες και θηλυκούς αρουραίους που έχουν αφαιρεθεί οι γονάδες τους, ενώ δεν επηρεάζει καθόλου την έκκριση της FSH (Fernandez-Fernandez et al 2004). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι η γκρελίνη έχει άμεση επίδραση στην υπόφυση.

Όσον αφορά το ρόλο της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροφινών στον άνθρωπο, τα δεδομένα είναι ανεπαρκή και αναφέρονται σε άντρες. Σύμφωνα με την πρώτη δημοσιευμένη μελέτη (Takaya et al., 2000), αυξανόμενες δόσεις γκρελίνης προκαλούσαν αύξηση της GH, αλλά δεν επηρέαζαν τις τιμές της LH σε φυσιολογικούς άντρες. Σε άλλες δυο πιο πρόσφατες μελέτες αναφερόμενες σε άντρες, στη μια η χορήγηση γκρελίνης, προκαλούσε καταστολή των ώσεων της LH (Kluge et al., 2007) ενώ στην άλλη (Lanfranco et al., 2008) ναι μεν είχε ανασταλτική επίδραση στις ώσεις της LH, χωρίς όμως να επηρεάζει την απάντηση της LH στην GnRH. Από σχετικά όμως πρόσφατες μελέτες σε γυναίκες, έγινε γνωστό ότι η χορήγηση γκρελίνης δεν επιδρά στην επαγόμενη από GnRH έκκριση των γοναδοτροφινών FSH και LH, καθώς και στα επίπεδα της E2 και της προγεστερόνης, κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού τους κύκλου (Messini et al 2009).

Επιπρόσθετα, η γκρελίνη εμπλέκεται στον έλεγχο της έκκρισης της προλακτίνης, και οι διεγερτικές της επιδράσεις στα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό έχουν προσδιοριστεί σε ενήλικες ανθρώπους (Arvat et al, 2001). Στα ποντίκια, ωστόσο, έχει πρόσφαταδειχθεί πως η γκρελίνη ελαττώνει την έκκριση της προλακτίνης σε άρρενα και θήλεα σε προεφηβικό στάδιο, δρώντας κυρίως στον υποθάλαμο (Tena-Sempere et al, 2004).

Όσον αφορά το ρόλο της γκρελίνης στην έκκριση της προλακτίνης, από πρόσφατες μελέτες στον άνθρωπο, η χορήγηση της δεν επηρεάζει τις τιμές της προλακτίνης κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου (Messini et al, 2009,2010).

Ποιοι είναι οι λόγοι αυτής της ανακολουθίας μεταξύ των ειδών ανθρώπου και ποντικού, παραμένουν αδιευκρίνιστοι, αλλά μια εκδοχή είναι ότι, οι ανασταλτικές δράσεις της γκρελίνης επάνω στην έκκριση της προλακτίνης περιορίζονται στην περίοδο της (προ)εφηβικής ωρίμανσης, καθώς χρόνια χορήγηση γκρελίνης σε ώριμα ποντίκια επαυξάνει τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό (Pinilla,Tena-Stempere, αδημοσίευτη παρατήρηση).

Η έκφραση της γκρελίνης και του υποδοχέα της έχουν περιγραφεί στο μη φθαρτοποιημένο ενδομήτριο, καθώς η γκρελίνη εμπλέκεται ως παρακρινής/ενδοκρινής ρυθμιστής της φθαρτοποίησης των ανθρώπινων στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου, και πειραματικά στη «συνομιλία» (cross-talk) μεταξύ ενδομητρίου και εμβρύου κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Tanaka et al, 2003).

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της γκρελίνης στο ενδομητρικό υγρό αυξάνονται δραματικά κατά τη διάρκεια της νηστείας στα ποντίκια, ενώ έχει ακόμηδειχθεί πως η γκρελίνη εμποδίζει την εξέλιξη της εμφύτευσης εμβρύων ποντικών in vitro (Kawamura et al, 2003).

Γενικά, είναι ενδιαφέρον να προταθεί πως η γκρελίνη μπορεί να ενεργεί ως σήμα για την ενεργειακή ανεπάρκεια, κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης, δρώντας ως ανασταλτικός παράγοντας στην πρόωρη ανάπτυξη του εμβρύου, προκειμένου να αποφευχθεί η υπέρμετρη κατανάλωση ενέργειας, που συνδέεται με την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία σε καταστάσεις υποσιτισμού (Kawamura et al, 2003).

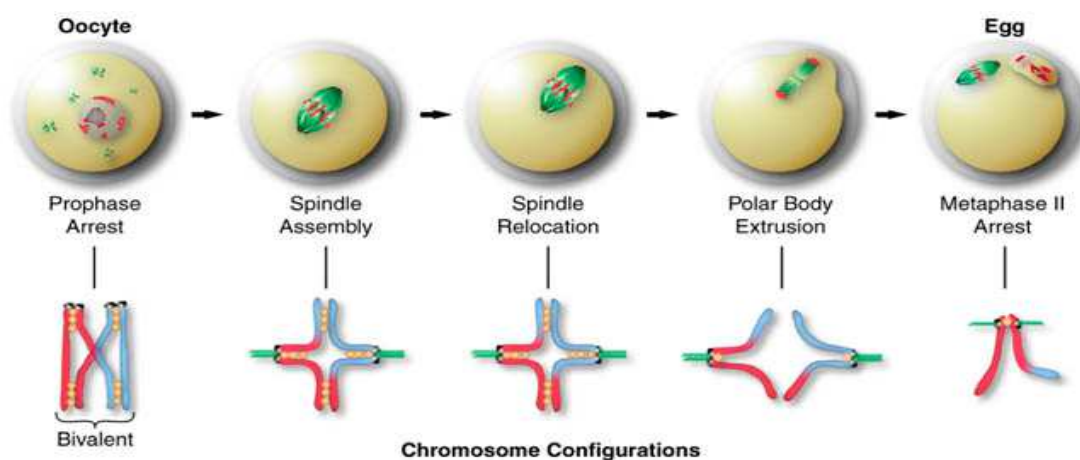
Η γκρελίνη έχει επίσης ανιχνευθεί στον πλακούντα του ανθρώπου και του αρουραίου (Gualillo et al, 2001), καθώς και στην ανθρώπινη εμβρυϊκή κυκλοφορία (Cortelazzi et al, 2003). Ο ρόλος της εμβρυϊκής και πλακουντιακής γκρελίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης κατά την εγκυμοσύνη και στο μεταβολισμό απομένει να διερευνηθεί.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 IN VIVO ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Η ωρίμανση των ωαρίων είναι μια μακρά και σύνθετη διαδικασία, κατά τη διάρκεια της οποίας τα ωάρια περνούν από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV-ωάρια πρόφασης I) στη μετάφαση II (MII). Οι πυρηνικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα οδηγούν στην εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου. Οι γοναδοτροπίνες φαίνεται να παίζουν σημαντικό και αποφασιστικό ρόλο στην ωρίμανση του ωαρίου, δεν είναι όμως ικανές από μόνες τους να αρχίσουν και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης (Halpin et al, 1986; Ataya et al, 1989).

Ορμόνες όπως η GH, ο IGF-1, η PRL και η TSH επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων (Howe E et al, 1978; Liu X et al, 1998; Zhao J et al, 2001; Kiapekou et al, 2005a; Kuzmina et al, 1996), καθώς και τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Yoshimura et al, 1991; Kiapekou et al, 2005).

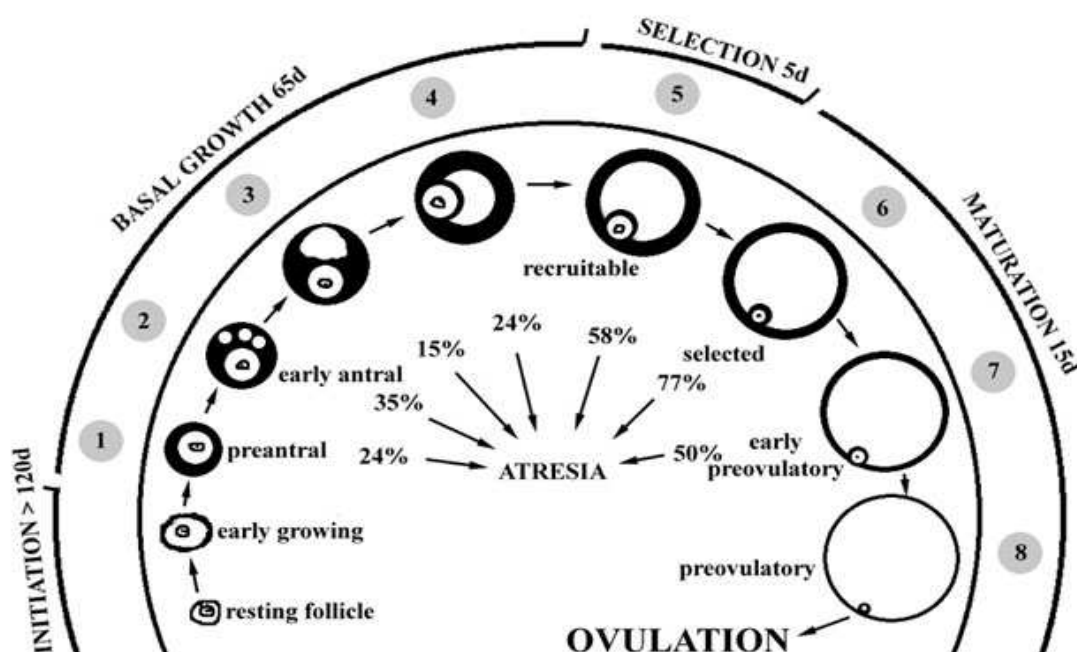


[www2.mrc-lmb.cam.ac.uk](http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk)

**Εικόνα 2.1** Στην πάνω σειρά, φαίνονται τα διαφορετικά στάδια μειωτικής ωρίμανσης και η αντίστοιχη οργάνωση χρωμοσωμάτων (κόκκινο) και μικροσωληνίσκων (πράσινο). Στην κάτω σειρά απεικονίζεται η λεπτομερής διαμόρφωση των τελοκεντρικών χρωμοσωμάτων πατρικής ή μητρικής προέλευσης (μπλε και κόκκινο αντίστοιχα), το σύμπλεγμα της κοχεσίνης (κίτρινες μπάλες), οι κινητοχώροι (μαύροι δίσκοι) και οι μικροσωληνίσκοι (πράσινο). Η ωρίμανση από το ωοκύτταρο στο ζυγωτό διαρκεί 12-14 ώρες.

Στην ωοθήκη βρίσκονται ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή). Η βασική αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης είναι τα αρχέγονα ωοθυλάκια, τα οποία βρίσκονται στον φλοιό της ωοθήκης και εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ωρίμανση.

Περίπου ένα εκατομμύριο αρχέγονα ωοθυλάκια είναι παρόντα στις ανθρώπινες ωοθήκες, κατά τη γέννηση. Αυτά αποτελούνται από ένα ωοκύτταρο, σταματημένο στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και συγκεκριμένα στο στάδιο της δικτυοταινίας, το οποίο περιβάλλεται από μία στιβάδα αποπλατυσμένων κοκκωδών κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα), τα οποία είναι οι πρόδρομες μορφές των κοκκωδών κυττάρων. Σε όλη τη διάρκεια ζωής της γυναίκας με τη μορφή συνεχούς ροής, ομάδες αρχέγονων ωοθυλακίων εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ανάπτυξη, με αποτέλεσμα στην αρχή της εφηβείας να υπάρχουν μόνο 400.000 αρχέγονα ωοθυλάκια και στις δύο ωοθήκες, ενώ τα υπόλοιπα έχουν καταστραφεί με τη διαδικασία της ατρησίας. Από την τεράστια αυτή δεξαμενή ωοθυλακίων, στη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας, 400 περίπου θα φτάσουν έως την ωοθυλακιορρηξία (Εικ.2.2).



**Εικ.2.2** Ωοθυλακιογένεση (Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocr Rev*, 17:121, 1996)



Όταν τα ωοθυλάκια εισέρχονται στη φάση της ωρίμανσης, τα ωοκύτταρα που περιλαμβάνουν μεγαλώνουν σε μέγεθος (στον άνθρωπο η διάμετρός τους αυξάνει από 35  $\mu\text{m}$  σε 120  $\mu\text{m}$ ), ενώ τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν πολλαπλασιάζονται και τα κύτταρα της θήκης διαφοροποιούνται.

Η ωρίμανση των ωαρίων συνοδεύεται από σημαντικό αριθμό σύνθετων κυτταρικών διαδικασιών (Gosden et al, 1995; Moor RM et al, 1998). Αυτές περιλαμβάνουν: πυρηνική και κυτταροπλασματική ανάπτυξη, παραγωγή οργανιδίων, παραγωγή RNA που υποστηρίζει την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση. Η πυρηνική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την απόκτηση της δυνατότητας επανέναρξης της μείωσης από το ωάριο, ενώ η κυτταροπλασματική ωρίμανση σχετίζεται με την ικανότητα του ωαρίου για γονιμοποίηση καθώς και για πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

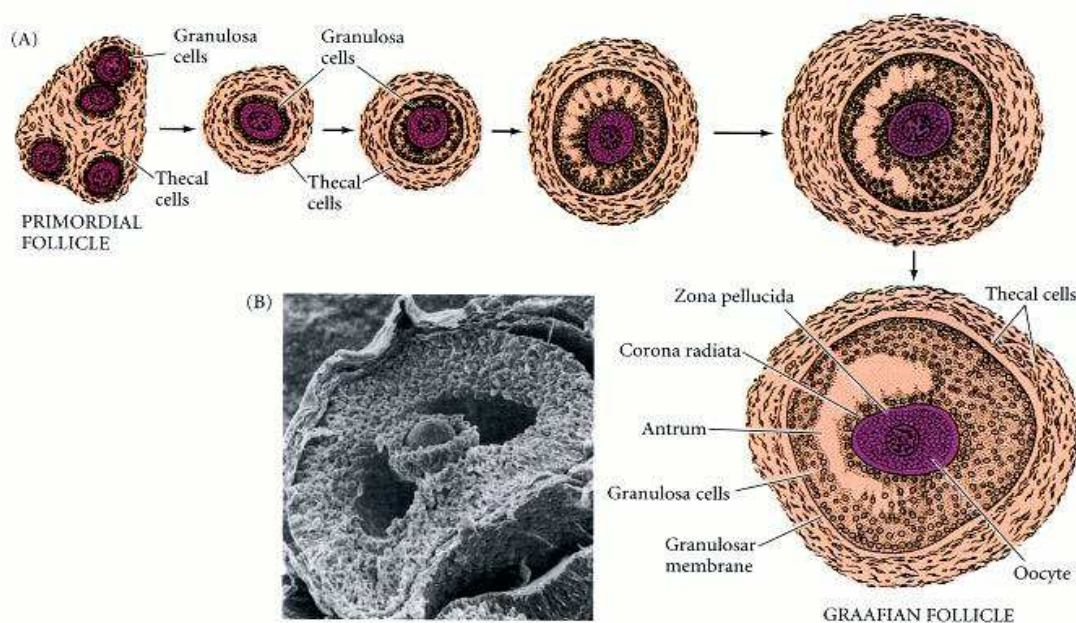
Το αρχέγονο ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα ωοκύτταρο με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, καθώς η μειωτική του διαίρεση έχει ανασταλεί στο στάδιο της πρόφασης. Το ωοκύτταρο αυτό περιβάλλεται από μια σειρά κοκκωδών κυττάρων και μια βασική μεμβράνη που χωρίζει το σύμπλεγμα ωαρίου-κοκκωδών κυττάρων από τον πέριξ ιστό. Όσα από τα αρχέγονα ωοθυλάκια συνεχίσουν να εξελίσσονται, μετατρέπονται αρχικά σε πρωτογενή και αργότερα σε δευτερογενή ωοθυλάκια.

Υπό την επίδραση ενός άγνωστου ακόμη διεγερτικού σήματος, το ωάριο αυξάνει σημαντικά σε μέγεθος και καθίσταται ικανό να συνεχίσει τη μειωτική του διαίρεση. Στο αρχέγονο ωοθυλάκιο, τα κοκκώδη κύτταρα δεν εμφανίζουν δραστηριότητα μέχρις ότου το ωάριο συμπληρώσει την ανάπτυξή του και περιβληθεί από τη διαφανή ζώνη. Τότε, τα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπονται από πλακώδη σε τυπικά κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα.

Το πρωτογενές ωοθυλάκιο, που παριστά εξέλιξη του αρχέγονου ωοθυλακίου, αποτελείται: α) από ένα ωάριο που αναπτύσσεται, β) τη διαφανή ζώνη που περιβάλλει το ωάριο, γ) από μία ή δύο στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων και δ) από τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα κοκκώδη κύτταρα. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο αναπτυσσόμενο εξελίσσεται σε δευτερογενές ωοθυλάκιο.

Στην αρχική του φάση, το δευτερογενές ωοθυλάκιο διαφέρει από το πρωτογενές, διότι περιλαμβάνει δύο υποπληθυσμούς κυττάρων που προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και την εν συνεχεία διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων. Αυτά διακρίνονται σε κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας και σε κύτταρα της έσω και έξω θήκης. Παράλληλα, στα κύτταρα της έσω θήκης που διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά εμφανίζονται υποδοχείς της LH, ενώ στα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας εμφανίζονται υποδοχείς της FSH. Κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης δημιουργούνται μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους σε μία ενιαία κοιλότητα γεμάτη υγρό, η οποία καλείται άντρο.

Μέχρι την εμφάνιση του άντρου, η έναρξη της ωρίμανσης των ωοθυλακίων ελέγχεται και κατευθύνεται από ενδοωθηλικούς παράγοντες και δεν επηρεάζεται από τις γοναδοτροπίνες FSH και LH. Τα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου από το αρχέγονο έως το προωορρηκτικό (γρααφιανό) ωοθυλάκιο απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα (Εικ.2.3).



[ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)

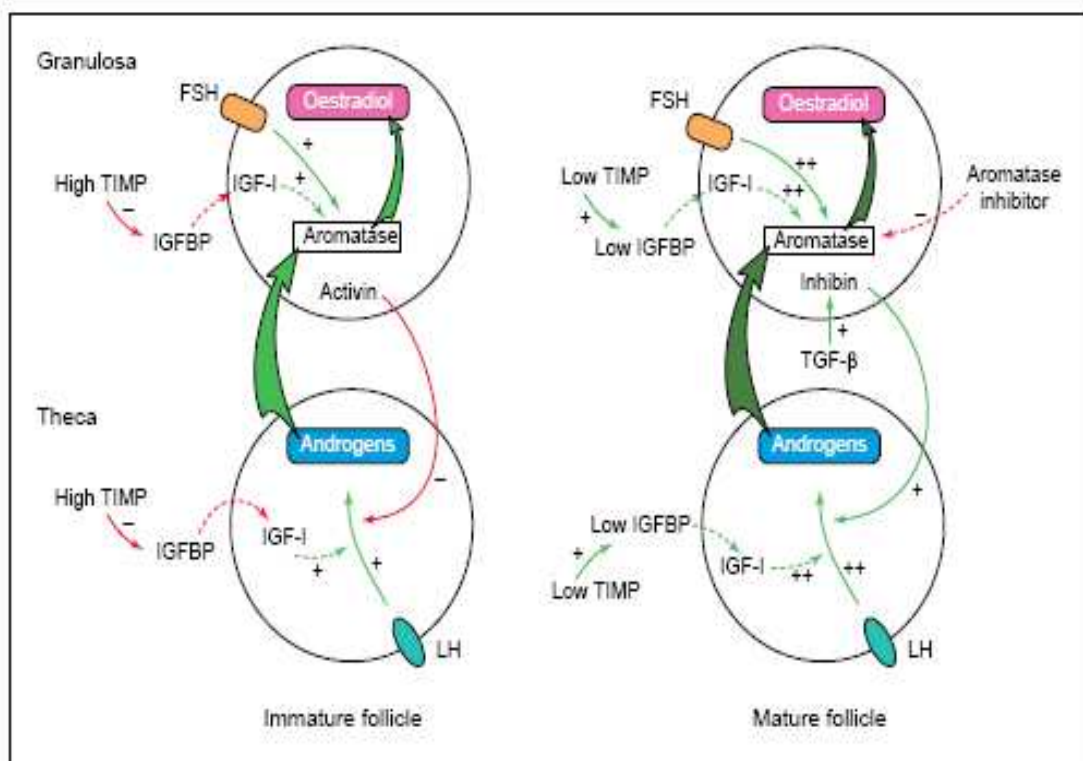
**Εικ.2.3** Στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου από το αρχέγονο έως το προωορρηκτικό (γρααφιανό) ωοθυλάκιο.

Οι φάσεις διακρίνονται ανάλογα με τον αριθμό των κοκκιωδών κυττάρων στο ωοθυλάκιο (Gougeon et al., 1986). Όπως προαναφέρθηκε, τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου είναι ανεξάρτητα από τη δράση των γοναδοτροπινών, μέχρι την εμφάνιση του πρώιμου άντρου του ωοθυλακίου. Το ωοθυλάκιο που διαθέτει άντρο αποτελείται από το ωάριο, τη διαφανή ζώνη του, τα κοκκώδη κύτταρα, το ωοθυλακικό άντρο, τα κύτταρα της θήκης και τη βασική μεμβράνη.

Η LH δρα στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου που βρίσκονται κοντά στη βασική μεμβράνη και προκαλεί στεροειδογένεση προς την κατεύθυνση μόνο των ανδρογόνων. Η FSH δρα στα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία μετατρέπουν τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα λόγω ενεργοποίησης του συστήματος της αρωματοποίησης (παρουσία ενός ενζύμου, της αρωματάσης). Τα κοκκώδη κύτταρα χωρίζονται από τα κύτταρα της θήκης με τη βασική μεμβράνη. Κατά την περίοδο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, υποδοχείς FSH υπάρχουν μόνο στα κοκκώδη κύτταρα ενώ υποδοχείς LH μόνο στα κύτταρα της έσω θήκης. Τα οιστρογόνα (κυρίως η 17-β οιστραδιόλη), ασκώντας τη μιτωτική τους δράση, προκαλούν πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων και αύξηση των υποδοχέων της FSH στην επιφάνειά τους.

Αυτό έχει ως συνέπεια την εντονότερη αρωματοποίηση των παραγομένων από τα κύτταρα της θήκης ανδρογόνων και επομένως την παραγωγή όλο και μεγαλύτερων ποσοτήτων οιστρογόνων, που με τη σειρά τους προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων.

Αυτή η συνεργασία των κυττάρων της θήκης και των κοκκιωδών κυττάρων στην παραγωγή οιστρογόνων είναι γνωστή ως «θεωρία των δύο κυττάρων - δυο γοναδοτροπινών» (Εικ.2.4).



[herkules oulu fi](http://herkules oulu fi)

**Εικ.2.4** «Θεωρία των δύο κυττάρων - δυο γοναδοτροπινών».

Ένα από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια σε κάθε κύκλο ξεχωρίζει, συνεχίζει να αναπτύσσεται και καθίσταται «κυρίαρχο». Από τη στιγμή της δημιουργίας του άντρου, μια ομάδα ωοθυλακίων, που είναι περισσότερο ώριμα από βιοχημικής πλευράς, αποκρίνεται καλύτερα στις γοναδοτροπίνες. Στην αρχή του γεννητικού κύκλου, ίσως και 1-2 ημέρες πριν το τέλος του προηγούμενου, παρατηρείται αύξηση της FSH για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η αύξηση αυτή ονομάζεται «παράθυρο της FSH» και ωθεί μία ομάδα ωοθυλακίων σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης.

Συγκεκριμένα, σε αυτή τη φάση, στις ωοθήκες υπάρχουν αρκετά ωοθυλάκια διαμέτρου 2-5 mm περίπου, τα οποία στρατολογούνται. Η στρατολόγηση των ωοθυλακίων και η επιλογή του «κυρίαρχου» ωοθυλακίου εξαρτώνται αποκλειστικά από την FSH.

Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο όμως, έχοντας περισσότερους υποδοχείς FSH, περισσότερα κοκκιώδη κύτταρα και αυξημένη αιμάτωση, εξελίσσεται έστω και με την υποστήριξη των χαμηλών επιπέδων FSH.

Τα κοκκώδη κύτταρα διογκώνονται και παράγουν αυξημένες ποσότητες 17-β οιστραδιόλης που φθάνει στη μέγιστη συγκέντρωσή της 24-36 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία. Παράλληλα, στο ωάριο, η διεργασία της μειωτικής διαίρεσης φθάνει προς το τέλος της.

Στη φάση αυτή, η FSH σε συνέργεια με τα οιστρογόνα προωθεί τη δημιουργία υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα, ενώ μέχρι τώρα οι υποδοχείς αυτοί υπήρχαν μόνο στα κύτταρα της θήκης.

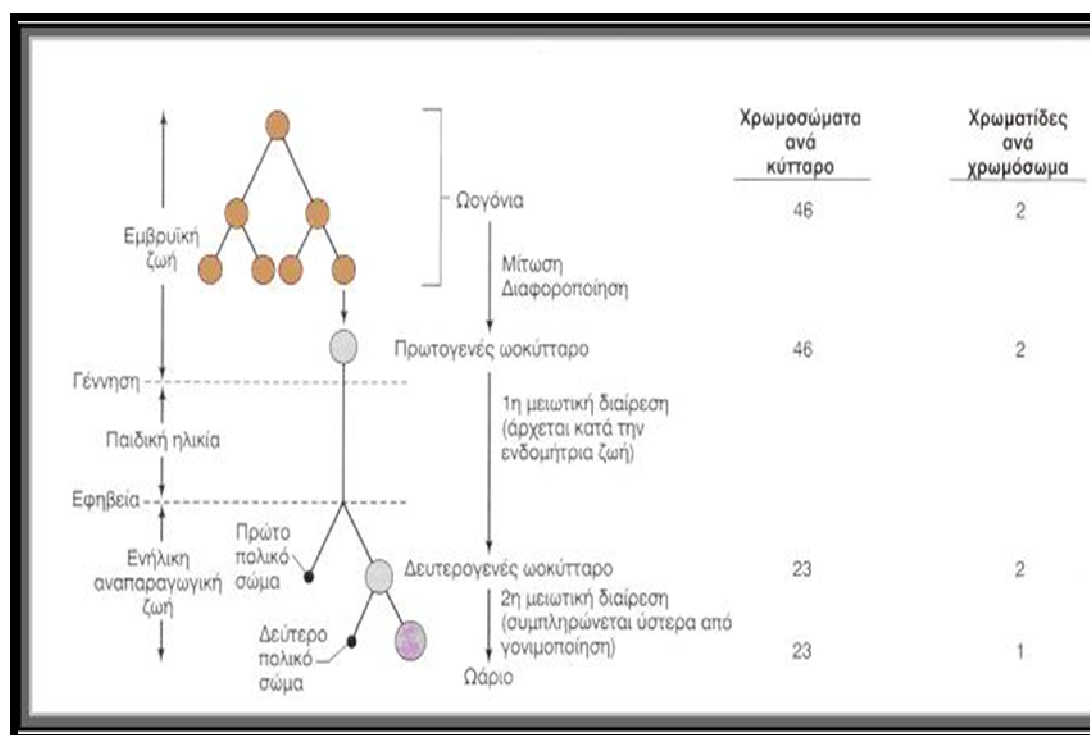
Η διαδικασία της στεροειδογένεσης στο ωοθυλάκιο επηρεάζεται από την παρακρινική και αυτοκρινική δράση διαφόρων τοπικά παραγόμενων ουσιών, όπως είναι η inhibin και η activin, οι παράγοντες IGF και οι δεσμευτικές τους πρωτεΐνες (IGFBPs), τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και άλλες ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, η inhibin ενισχύει τη δράση της LH στα κύτταρα της έσω θήκης και άρα την παραγωγή ανδρογόνων, μια διαδικασία την οποία ανταγωνίζεται η activin, έτσι ώστε η παραγωγή των ανδρογόνων να κυμαίνεται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, ικανά όμως να παράγουν οιστρογόνα στα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας υπό την επίδραση της FSH. Η τελευταία αυτή επίδραση ευνοείται από τη δράση της activin, με αποτέλεσμα την οιστρογονοποίηση του περιβάλλοντος του ωοθυλακίου (Hillier 2001, Mol.Cell. Endocrinol. 179, 39-46).

Οι παράγοντες IGF παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της στεροειδογένεσης. Στα κοκκώδη κύτταρα, η IGFBP-4 δεσμεύει τους παράγοντες αυτούς με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση τους. Υπό την επίδραση της FSH τα κύτταρα αυτά παράγουν μια πρωτεάση (PAPP-A), η οποία διασπά το σύμπλεγμα της δεσμευτικής πρωτεΐνης με τους IGF και απελευθερώνει τους παράγοντες αυτούς, οι οποίοι είναι διαθέσιμοι για δράση.

Υπό την επίδραση όλων αυτών των παραγόντων, τα ωοθυλάκια που συγκεντρώνουν ικανές ποσότητες FSH και ικανό αριθμό υποδοχέων τη ορμόνης αυτής είναι σε θέση να παράγουν αρωματάση, η οποία αρωματοποιεί ανδρογόνα σε οιστρογόνα και έτσι το περιβάλλον του οιστρογονοποιείται.

Στην πρώτη μειωτική διαίρεσή του πριν την ωοθυλακιορρηξία, αντίθετα με το αντίστοιχο στάδιο της σπερματογένεσης, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα. Η συνέχιση της μειωτικής διαίρεσης είναι εμφανής με την εξαφάνιση του βλαστικού κυστιδίου.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατανέμονται στα δύο νέα κύτταρα, τα οποία όμως είναι άνισα σε μέγεθος. Το μεγάλο κύτταρο είναι το δευτερογενές ωοκύτταρο, ή ωάριο, που παραλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός αν γονιμοποιηθεί. Το μικρό κύτταρο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο, περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και τον μισό αριθμό ομολόγων χρωμοσωμάτων. Η ΜΙ ολοκληρώνεται μετά την ήβη, κατά τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου. Όταν το σπερματοζωάριο εισέλθει στο δευτερογενές ωοκύτταρο (ΜΙΙ) διατρυπώντας τη διαφανή ζώνη και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το ωάριο ενεργοποιείται για να σχηματίσει δύο προπυρήνες, αρσενικό και θηλυκό, που στη συνέχεια θα ενωθούν. Η μειωτική διαίρεση συνεχίζεται με την είσοδο του σπερματοζωαρίου και σχηματίζονται δύο νέα κύτταρα. Ένα μεγάλο, το γονιμοποιημένο ωάριο και ένα μικρό, το δεύτερο πολικό σωματίο (Εικ.2.5).



[male-subfertility.tripod.com](http://male-subfertility.tripod.com)

**Εικ.2.5** Το δευτερογενές ωοκύτταρο υπόκειται σε ωοθυλακιωρηξία και δεν συμπληρώνει τη μειωτική διαίρεση εκτός και αν γονιμοποιηθεί από ένα σπερματοζωάριο.

Το ωάριο είναι σταματημένο στο στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (GV στάδιο) μέχρι που μια αύξηση των γοναδοτροπινών, ιδιαίτερα της LH, διεγείρει το ωάριο στο να συνεχίσει την πρώτη μειωτική διαίρεση. Μορφολογικά, η επανέναρξη της μείωσης χαρακτηρίζεται από τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης (GV breakdown).

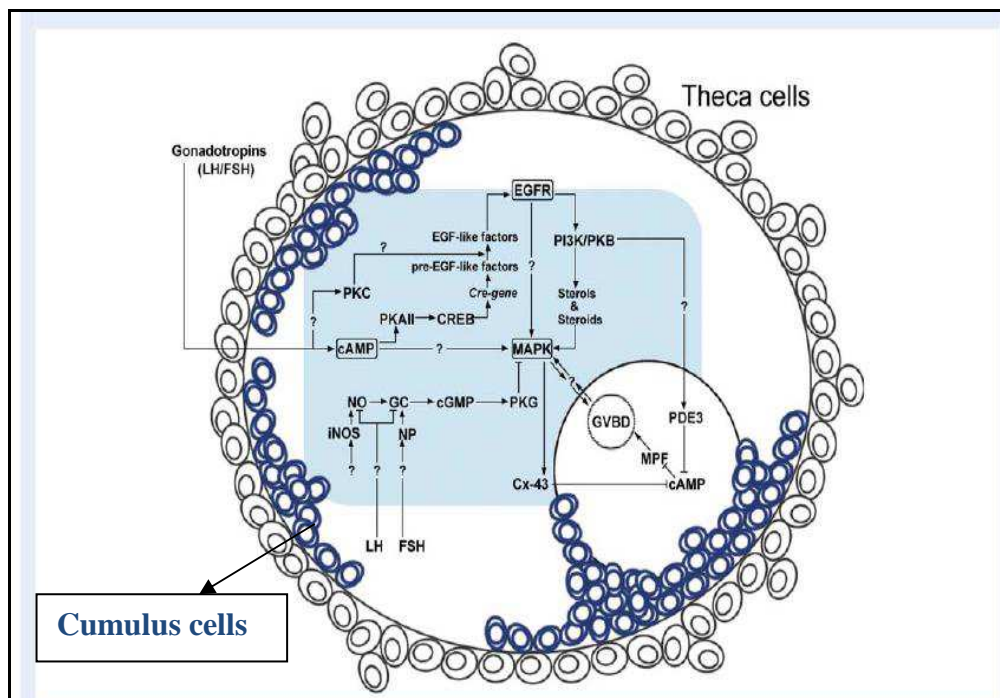
Αν και τα ωάρια είναι ικανά να υποστούν διάλυση της πυρηνικής τους μεμβράνης περίπου με τη συμπλήρωση της ανάπτυξης τους, δεν το κάνουν μέχρι να λάβουν το κατάλληλο ορμονικό ερέθισμα (FSH, LH) (Pincus G and Saunders. Anat Rec 1939). Αυτό σημαίνει ότι παράγοντες μέσα στο ωοθυλάκιο διατηρούν το σταμάτημα της μείωσης στο ωάριο. Η αναστολή της μείωσης πιθανόν επιτυγχάνεται με το πέρασμα ουσιών από τα κοκκώδη κύτταρα στο ωάριο μέσω των χασματοσυνδέσεων.

Κυρίως το cAMP αλλά και άλλες ουσίες όπως cGMP, Mullerian inhibiting substance, β-ενδορφίνη, oocyte maturation inhibitor και άλλες ουσίες έχουν προταθεί σαν υπεύθυνοι για τη διατήρηση της αναστολής της μείωσης (Buccione et al., 1990). Η μειωτική ωρίμανση είναι ζωτικής σημασίας γεγονός στην ωορρηξία, επειδή είναι υποχρεωτική για τη φυσιολογική γονιμοποίηση.

Η επανέναρξη της μειωτικής διαίρεσης από τις γοναδοτροπίνες συμβαίνει μέσω δράσης τους στα σωματικά κύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο παρά με απευθείας δράση στο ίδιο το ωάριο, καθώς τα ωάρια στερούνται υποδοχείς για τις γοναδοτροπίνες (Amsterdam et al., 1975; Dekel et al., 1988) και έτσι δεν αντιδρούν στην FSH και LH (Dekel and Beers, 1978; Eppig, 1982; Downs et al., 1988; Byskov et al., 1997)

Οι γοναδοτροπίνες δρώντας στα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου, προκαλούν μια αύξηση στα επίπεδα του cAMP στα κοκκώδη κύτταρα και μια ελάττωση του cAMP στο ωοκύτταρο, και έτσι ενεργοποιούν την επανέναρξη της μείωσης καθώς και την διόγκωση του ωοφόρου δίσκου (Εικ.2.6)(Downs and Hunzicker-Dunn, 1995, Shimada et al., 2003). Η εκκριτική αιχμή των LH/FSH προκαλεί πτώση του cAMP στο ωάριο, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης μιας φωσφοδιεστεράσης που διασπά το cAMP. Έτσι το ωάριο χάνοντας την ανασταλτική δράση του cAMP επαναρχίζει τη μείωση.





[molehr.oxfordjournals.org](http://molehr.oxfordjournals.org)

**Εικ.2.6** Προτεινόμενο μοντέλο για την επαγόμενη από γοναδοτροφίνες συνέχιση της μειωτικής ωρίμανσης σε προωθυλακιωρηκτικό ωοθυλάκιο θηλαστικών.

Η πρώτη μειωτική διαίρεση προχωρά μέσω της μετάφασης I που εκδηλώνεται με το σχηματισμό του πρώτου πολικού σωματίου, και στη συνέχεια το ωάριο σταματά ξανά στη μετάφαση II μέχρι τη γονιμοποίηση.

Η παλιά αντίληψη ότι το ωάριο των θηλαστικών είχε παθητικό ρόλο στη σχέση του με τα περιβάλλοντα σωματικά κύτταρα δεν ισχύει πλέον.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι το ωάριο είναι βασικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης και της λειτουργίας των σωματικών κυττάρων του ωοθυλακίου και παίζει ένα κεντρικό ρόλο στην ωοθυλακιογένεση

Η αλληλεπίδραση ωαρίου – κυττάρων του ωοφόρου δίσκου εμποδίζει την ωχρινοποίηση των κοκκιωδών κυττάρων με το να προωθεί την ανάπτυξη, με το να ελέγχει τη στεροειδογένεση και τη σύνθεση inhibin και με το να καταστέλλει την έκφραση των υποδοχέων της LH.

Στο ωορηκτικό ωοθυλάκιο, οι αυξητικοί παράγοντες του ωαρίου παίζουν επίσης ένα σημαντικό ρόλο στην διόγκωση του ωοφόρου δίσκου και στη σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας, διευκολύνοντας έτσι την ωορηξία.

Ο GDF-9, ο BMP-15 και ίσως ο BMP-6 είναι οι πιθανοί παράγοντες που εκκρίνονται από το ωάριο και ελέγχουν αυτές τις τόσο σημαντικές ωοθηκικές λειτουργίες.



## 2.2 IN VITRO MATURATION ΩΑΡΙΩΝ (IVM)

Η in vitro ωρίμανση των ωαρίων (in vitro maturation- IVM) είναι η διαδικασία κατά την οποία, ωάρια που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV, ωάρια πρόφασης I) συλλέγονται από ωοθυλάκια με άντρο διαμέτρου 10 mm, καλλιεργούνται, ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση (εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου) και φτάνουν στη μετάφαση II σε 24-48 ώρες. Η in vitro ανάπτυξη των ωοθυλακίων (in vitro follicular growth - IVG) είναι η διαδικασία κατά την οποία αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial) ή ωοθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου (early preantral) καλλιεργούνται με σκοπό την πλήρη ωρίμανσή τους, που καθορίζεται από την εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου (Εικ.2.7).

Δύο τεχνικές ωρίμανσης ωαρίων χρησιμοποιούνται σήμερα. Στην πρώτη, ωάρια που συλλέγονται από ωοθυλάκια διαμέτρου 10 mm, με ή χωρίς προηγηθείσα διέγερση των ωοθηκών, καλλιεργούνται για 24-48 ώρες, ώστε να φτάσουν στη μετάφαση II (Cha et al,1998).

Σημαντικός, όμως, αριθμός ωαρίων φτάνουν στη μετάφαση II, μετά από καλλιέργεια 23-25 ωρών, αφού όλα τα ωάρια που συλλέγονται δεν βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ωρίμανσης. Επομένως, για την αποφυγή παραμονής των ωαρίων αυτών στην μετάφαση II για 20-30 ώρες πριν την γονιμοποίηση και, επειδή τα ωάρια που φτάνουν πρώτα στη μετάφαση II είναι πιο πιθανό να αναπτυχθούν έως το στάδιο της βλαστοκύστης (Barnes et al, 1995), ο χρόνος καλλιέργειας των ωαρίων έχει μειωθεί στις 28-36 (Smith et al, 2000). Ο στόχος της δεύτερης τεχνικής ωρίμανσης, που ακόμη δεν έχει οδηγήσει στην πλήρη ωρίμανση των ωαρίων, είναι η καλλιέργεια in vitro αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων (Hovatta et al, 1997). Οι τεχνικές καλλιέργειας που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα έως τώρα είναι α) η καλλιέργεια τμήματος ωοθηκικού ιστού και β) καλλιέργεια μεμονωμένων ωοθυλακίων.

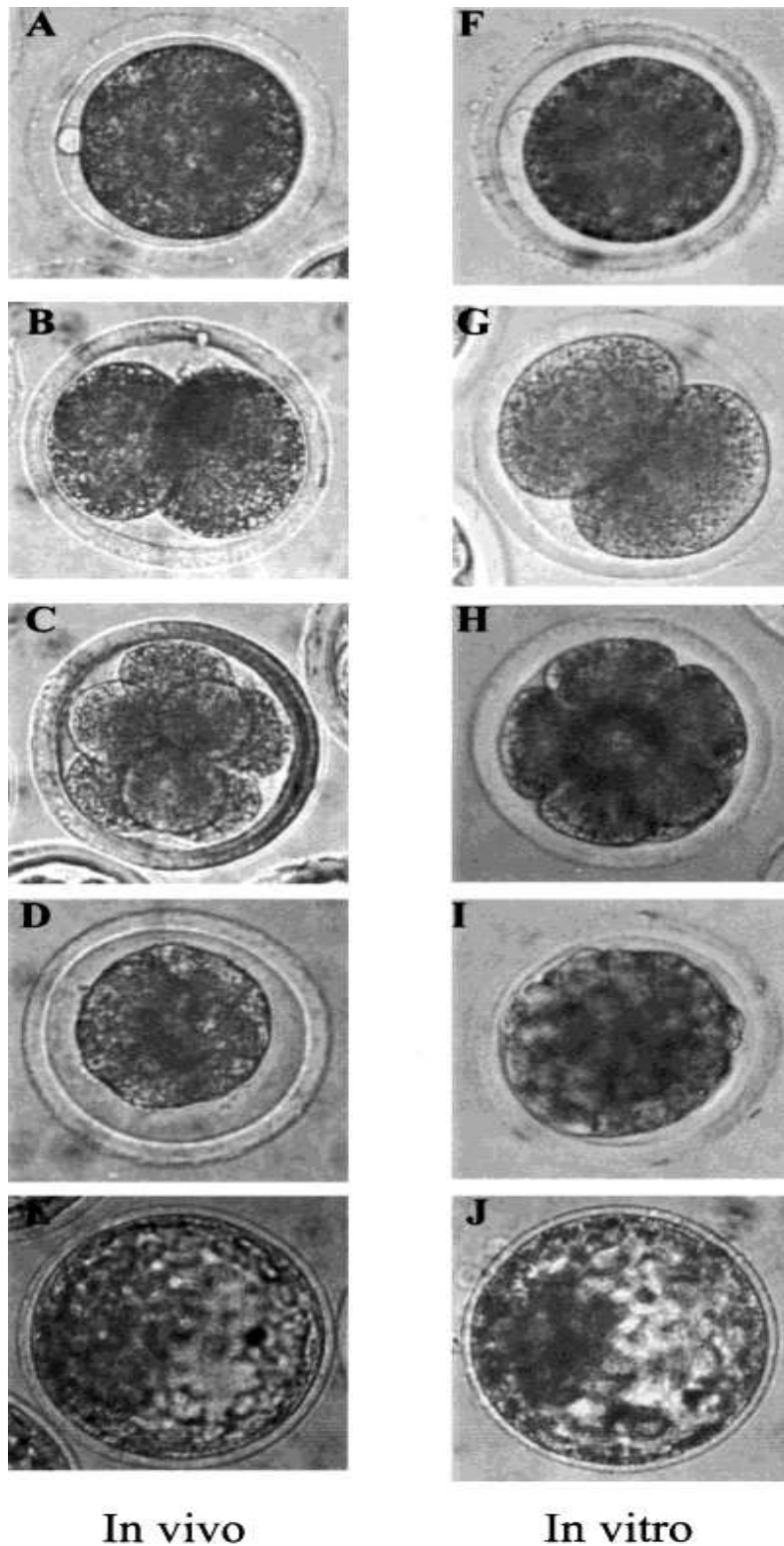
Σε καλλιέργειες ωοθηκικού ιστού, τα αρχέγονα ωοθυλάκια φτάνουν έως το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου (ωοκύτταρο που περιβάλλεται από δύο τουλάχιστον στιβάδες κοκκωδών κυττάρων), ενώ σε καλλιέργειες μεμονωμένων αρχέγονων ωοθυλακίων, τα κύτταρα εκφυλίζονται άμεσα (Hovatta et al, 1997).

Τα δευτερογενή ωοθυλάκια όταν καλλιεργούνται, φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πρώιμο άντρο και μετά εκφυλίζονται, ενώ τα ωοθυλάκια με μικρό άντρο φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πλήρως αναπτυγμένο άντρο σε περιορισμένο όμως αριθμό (Hovatta et al, 1999).

Στο μέλλον, η τεχνική της IVM πιθανώς να αντικαταστήσει την IVF σε επιλεγμένες ασθενείς όπως σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες και σε γυναίκες που υποβάλλονται σε IVF/ICSI λόγω κακής ποιότητας σπέρματος των συντρόφων τους, καθώς και η ανάπτυξη αρχέγονων ωοθυλακίων in vitro (IVG) σε συνδυασμό με in vitro ωρίμανση (IVM) φαίνεται πως θα είναι εφικτή. Πλήρης ανάπτυξη ωοθυλακίων από το στάδιο του αρχέγονου έως και το γραφιανό έχει επιτευχθεί έως τώρα μόνο στον επίμυ (Erpzig & O'Brien, 1996).

Στον άνθρωπο, αντίστοιχα, τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετά από in vitro καλλιέργεια φτάνουν έως το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου και στη συνέχεια εκφυλίζονται (Hovatta et al, 1997).

Η έρευνα συνεχίζεται με στόχο τη βελτίωση των τεχνικών καλλιέργειας ωαρίων, τη βελτίωση των καλλιεργητικών μέσων, και κυρίως των τεχνικών κρυοκατάψυξης ανώριμων ωαρίων αλλά και ολόκληρης της ωοθήκης.



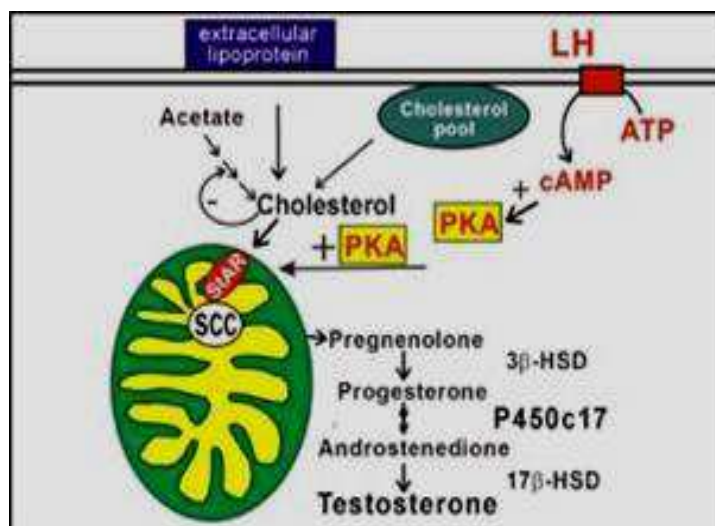
**Εικ. 2.7** Μορφολογία αγελαδινών εμβρύων, παραγόμενα *in vivo* (A-E) και *in vitro* (F-J). Ωριμα ωάρια (A και F), έμβρυο 2- κυττάρων (B και G), 8- κυττάρων (C και H), μορίδιο (D και I) και βλαστοκύστη (E και J). *Molecular reproduction and development* 61:234±248 (2002)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Στεροειδογένεση ονομάζουμε τη δημιουργία στεροειδών ορμονών δηλαδή ανδρογόνων, προγεστερόνης, οιστρογόνων, κορτιζόνης και αλδοστερόνης. Η κύρια πρόδρομη ουσία για τη στεροειδογένεση είναι η χοληστερόλη που προκύπτει μετά τη διαδικασία διαδοχικών βιοχημικών βημάτων από το οξικό οξύ. Οι αδένες στους οποίους επιτελείται η στεροειδογένεση είναι οι ωοθήκες (ωοθυλάκιο, ωχρό σωματίο), οι όρχεις, τα επινεφρίδια και ο πλακούντας. Έτσι, στο ωοθυλάκιο παράγονται κυρίως οιστρογόνα, στο ωχρό σωματίο προγεστερόνη, στους όρχεις ανδρογόνα, στα επινεφρίδια κορτιζόνη και αλδοστερόνη και τέλος στον πλακούντα οιστρογόνα και προγεστερόνη.

Η στεροειδογένεση περιλαμβάνει τις αντιδράσεις παραγωγής του κυριότερου ανδρογόνου, δηλαδή, της τεστοστερόνης. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης είναι η μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια και μάλιστα στην εσωτερική μεμβράνη τους όπου είναι η θέση του πρώτου ενζύμου που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της χοληστερόλης σε τεστοστερόνη. Η μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της υποφυσιακής ορμόνης LH με ειδικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας στα κύτταρα Leydig. Η ορμόνη LH εκκρίνεται από την εμβρυϊκή υπόφυση. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά η ρύθμιση της στεροειδογένεσης γίνεται από την χοριονική γοναδοτροφίνη (hCG) και από τη 13η εβδομάδα από την LH. Στη συνέχεια με την πρόσδεση της ενεργοποιείται η αδεν-κυκλάση που ως απάντηση στο ερέθισμα προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου c-AMP. Στη μεταφορά της χοληστερόλης συμμετέχουν και στοιχεία του κυτταροσκελετού όπως η μεταφορική πρωτεΐνη-2 της στερόλης (*Εικ.3.1*).



[panacea.med.uoa.gr](http://panacea.med.uoa.gr)

**Εικ.3.1** Μεταφορά χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια

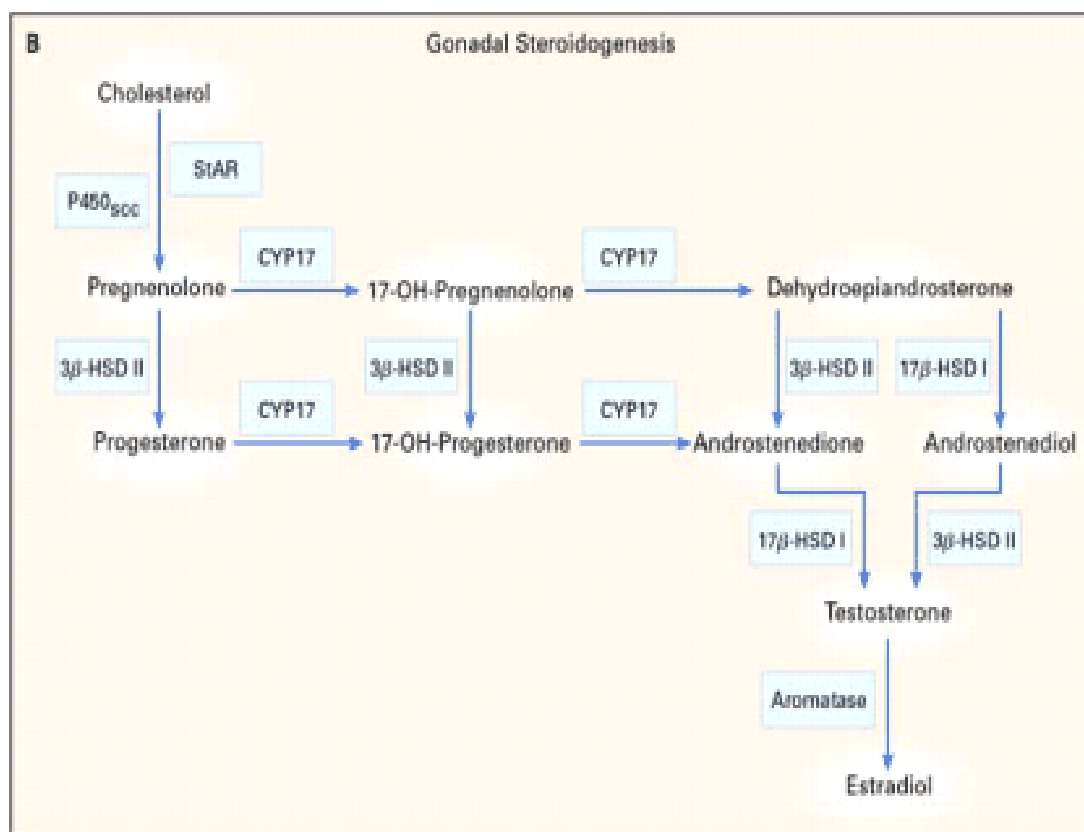
Η πρώτη αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η μετατροπή της c27 χοληστερόλης σε c21 πρεγνενολόνη που καταλύεται από το ένζυμο P450scc. Στη συνέχεια η πρεγνενολόνη μετατρέπεται είτε σε 17ύδροξυ-πρεγνενολόνη με τη βοήθεια του ενζύμου P450c17, είτε σε προγεστερόνη με την δράση του ενζύμου 3βHSD. Έπειτα η 17OH-πρεγνενολόνη σχηματίζει την δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) με τη δράση του ενζύμου P450c17, ενώ η προγεστερόνη δίνει την 17OH-προγεστερόνη που καταλύεται από το ίδιο ένζυμο όπως και η επόμενη αντίδραση που είναι η μετατροπή της 17OH-προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη που είναι πρόδρομος της τεστοστερόνης. Σε ανδροστενδιόνη μπορεί να μετατραπεί απευθείας και η δεϋδροεπιανδροστερόνη με τη βοήθεια του ενζύμου 3βHSD. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη μετατρέπεται σε ανδροστενδιόλη, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο 17βHSD.

Επίσης η ανδροστενδιόνη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη με το ίδιο ένζυμο ενώ και η ανδροστενδιόλη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη με τη δράση του 3βHSD. Τέλος η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε διυδροτεστοστερόνη με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-αναγωγάση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διυδροτεστοστερόνη είναι υπεύθυνη για την αρρενοποίηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων και επομένως έλλειψη της 5α - αναγωγάσης οδηγούν σε ψευδοερμαφροδιτισμό. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στην αρωματοποίηση της ανδροστενδιόνης σε οιστρόνη και της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη, αντιδράσεις που καταλύονται από το ένζυμο P450arom.

Τέλος, μπορεί να επιτευχθεί απευθείας μετατροπή της οιστρονής σε οιστραδιόλη, τη μοναδική αντιστρεπτή αντίδραση, με τη βοήθεια του ενζύμου 17βHSD.

Στην όλη διαδικασία βιοσύνθεσης της τεστοστερόνης λαμβάνουν μέρος τα εξής ένζυμα, P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, P450<sub>arom</sub>, 17βHSD, 3βHSD και 5α-αναγωγή (Εικ.3.2).

Ο καλύτερος δείκτης παραγωγής ανδρογόνων από τις ωοθήκες είναι η τεστοστερόνη, ενώ από τα επινεφρίδια η DHEA-S (θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη). Η DHEA κατά 90% εκκρίνεται από τα επινεφρίδια και μόνο κατά 10% από τις ωοθήκες, ενώ η DHEA-S εκκρίνεται σχεδόν αποκλειστικά (100%) και σε μεγάλες ποσότητες από τα επινεφρίδια.



[panacea.med.uoa.gr](http://panacea.med.uoa.gr)

**Εικ.3.2** Διαδικασία στεροειδογένεσης - παραγωγή οιστρογόνων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 Η ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

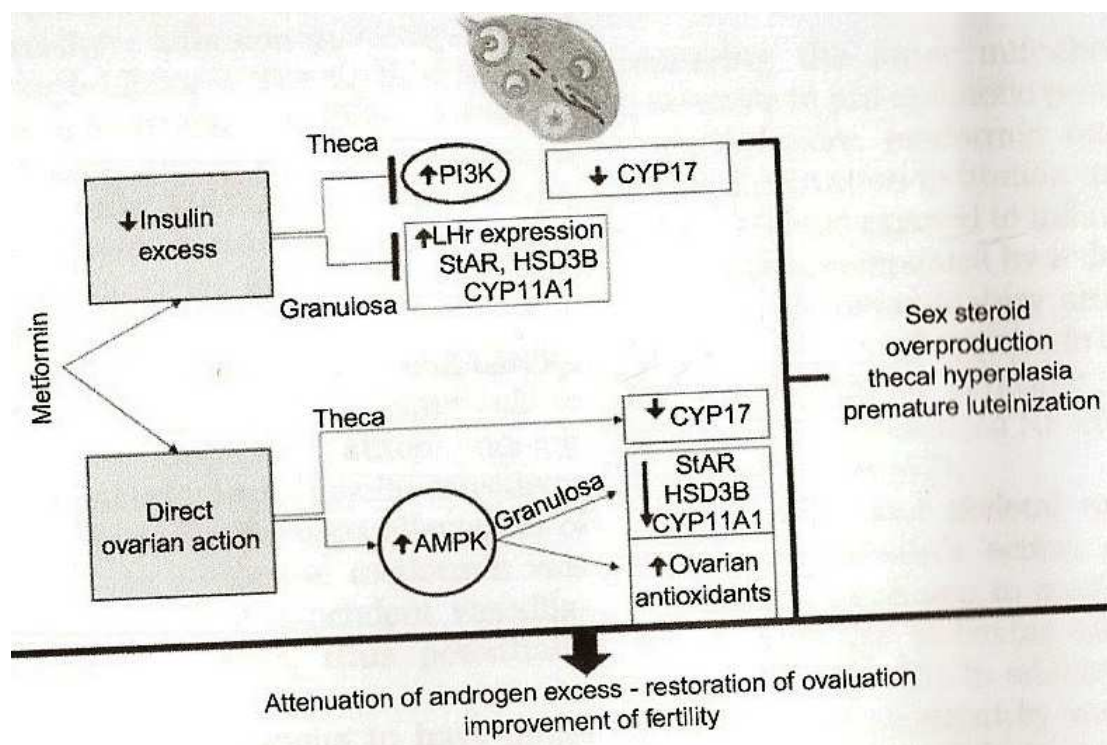
Η δράση της μετφορμίνης στην ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων παραμένει ακόμα και σήμερα υπό διερεύνηση. Τα δεδομένα είναι ανεπαρκή για να σχηματιστεί μια εμπεριστατωμένη άποψη για τη δράση της στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Οι πιο πολλές μελέτες έχουν γίνει σε οικόσιτα ζώα, όπως αγελάδες και χοίρους καθώς και σε ποντίκια.

Η μετφορμίνη φαίνεται να επηρεάζει την ωοθηκική λειτουργία με ένα διπλό τρόπο. Έμμεσα, ελαττώνοντας την επίδραση περίσσειας ινσουλίνης στη στεροειδογένεση και στην ωοθυλακική ωρίμανση αλλά και άμεσα δρώντας πάνω στην ωοθήκη. Τα πιθανά άμεσα αποτελέσματα της μετφορμίνης στην ωοθήκη έχουν ερευνηθεί στους πληθυσμούς των ωοθηκικών κυττάρων.

Όσον αφορά τη δράση της μετφορμίνης στα κύτταρα της θήκης, τα κλινικά στοιχεία δείχνουν ότι η μετφορμίνη αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP17 (17α-υδροξυλάση/c17,20-λυάση) στις γυναίκες με PCOS είτε άμεσα (ινσουλινο-ανεξάρτητη δράση, όπου η μετφορμίνη ήταν σε θέση να καταστείλει την παραγωγή ανδροστενδιόνης) είτε έμμεσα, μέσω μείωσης των επιπέδων ινσουλίνης και της επακόλουθης καταστολής της επαγόμενης από την ινσουλίνη PI3K (φωσφατιδυλοϊνοσιτολική-3-κινάση) δραστηριότητας.

Μειώνοντας τα επίπεδα της ινσουλίνης, η μετφορμίνη αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα της LH, όπως επίσης και τη δραστηριότητα των ενζύμων STAR, 3-βHSD και CYP11A1 (P450<sub>scc</sub>, με δράση 20,22 δεσμολάσης) στα κοκκώδη κύτταρα. Επίσης, η μετφορμίνη επάγοντας την ενεργοποίηση της AMPK (πρωτεϊνικής κινάσης με ενεργοποιημένο AMP), όχι μόνο μειώνει τη δράση των ενζύμων STAR, 3-βHSD και CYP11A1 στα κοκκώδη κύτταρα, αλλά και εντείνει την αντιοξειδωτική άμυνα στον ωοθηκικό ιστό (Kandaraki et al., 2010).

Αυτοί οι μηχανισμοί συνεισφέρουν στην καταστολή της υπερπαραγωγής φυλετικών στεροειδών ορμονών και της πρόωμης ωχρινοποίησης (εξαιτίας της πρόωμης έκφρασης του υποδοχέα LH), που έχουν ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της υπερανδρογοναιμίας και τη βελτίωση της ωοθυλακιορρηξίας (Εικ.4.1).



**Εικ. 4.1** Δράσεις της μετφορμίνης στην ωοθήκη. Μοριακοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί και κλινικά αποτελέσματα (Kandaraki et al. Europ.Society of Endocrinology 2010).

Πολύ χρήσιμες για τη μελέτη της δράσης της μετφορμίνης είναι οι σχετικά πρόσφατες εργασίες που συνδυάζουν το νευροτροφικό παράγοντα BDNF (brain-derived neurotrophic factor) με τη μετφορμίνη και τη συνεργασία τους στην ωρίμανση των ωαρίων αγελάδων και στην αναπτυξιακή ικανότητα των εμβρύων τους. Σε πολλές μελέτες, έχει προταθεί ότι ο BDNF και ο υποδοχέας του, TrkB έχουν διάφορες ωοθηκικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων, της ωοθυλακικής ανάπτυξης, εκκίνηση ανάπτυξης αρχέγονων ωοθυλακίων, στεροειδογένεση, ωρίμανση των ωαρίων και ανάπτυξη των εμβρύων.



Όσον αφορά τη μετορμίνη, εκτός από τη δράση της στην πρόκληση ωοθυλακιωρηξίας στις γυναίκες με PCOS και στη θεραπεία της ινσουλινοαντίστασης στο διαβήτη τύπου 2, έχει συσχετιστεί και με την αύξηση της δραστηριότητας του υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης και την παραγωγή της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης σε ωοκύτταρα *Xenopus* (Stith et al., 1996).

Άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μετορμίνη είναι ικανή να ρυθμίσει την περιεκτικότητα σε ωοθηκική γλουταθειόνη (GSH) (Elia et al., 2006) καθώς και ότι έχει άμεση επίδραση στην ανθρώπινη ωοθηκική στεροειδογένεση (Mansfield et al., 2003). Σχετικά πρόσφατα προτάθηκε ότι η μετορμίνη εντείνει τη δράση της ινσουλίνης στα ωάρια και τα έμβρυα αγελάδων, ενισχύοντας τη δράση του υποδοχέα της ινσουλίνης κινάσης της τυροσίνης (Lee et al., 2005).

Ο BDNF σε συνδυασμό με τη μετορμίνη βρέθηκε ότι αυξάνει σημαντικά το ρυθμό ωρίμανσης των ωαρίων σε MII, καθώς και το ρυθμό ανάπτυξης εμβρύων σταδίου 8-16 κυττάρων συγκρινόμενα με τους μάρτυρες, ενώ η μετορμίνη από μόνη της δε βελτιώνει την ωρίμανση των ωαρίων στις αγελάδες (So Gun Hong et al., 2009).

Σύμφωνα με μια ακόμα μελέτη, η προσθήκη μετορμίνης σε συνδυασμό με ινσουλίνη αυξάνουν σημαντικά το ρυθμό σχηματισμού της βλαστοκύστης καθ'όλη την διάρκεια ωρίμανσης των ωαρίων στους χοίρους, ενώ η προσθήκη μόνο μετορμίνης δεν είχε καμία επίδραση. Επίσης, βρέθηκε ότι η ινσουλίνη σε συνδυασμό με τη μετορμίνη αυξάνουν τη δράση της κινάσης της τυροσίνης, συγκρινόμενες με την προσθήκη μόνο ινσουλίνης (Lee et al., 2005).

Η ενεργοποίηση της 5'AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) εμπλέκεται στη μειωτική ωρίμανση των ωοκυττάρων στις ωοθήκες των ποντικών και των χοίρων. Εντούτοις, τα αποτελέσματά του στο ωοκύτταρο εμφανίζονται να είναι χαρακτηριστικά του είδους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση της AMPK και η φωσφορύλωση των ενεργοποιημένων-μιτωτικά πρωτεϊνικών κινασών (MAPK3/1) κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης (IVM) ωαρίων βοοειδούς και η δράση της μετορμίνης ως ενεργοποιητή της AMPK, στην ωρίμανση ωοκυττάρων με κοκκώδη κύτταρα (cumulus-oocyte complexes COCs), καθώς και απογυμνωμένων ωοκυττάρων βοοειδών (denuded oocytes DOS).

Έτσι, βρέθηκε ότι στα COCs, η μετορμίνη "μπλοκάρει" τη μειωτική ωρίμανση στο GV στάδιο, προάγοντας τη φωσφορυλίωση PRKAA (adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase) και αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των MAPK3/1 στα COCs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης, αλλά όχι στα DOs, που σημαίνει ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για τη δράση της μετορμίνης στην ωρίμανση ωοκυττάρων βοοειδούς (Tosca et al.,2007). Ενώ στα ποντίκια, η ενεργοποίηση της AMPK παρακινεί τη συνέχιση της μειωτικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων, τα οποία διατηρούνταν σε μειωτική στασιμότητα (arrest) από τα cAMP ανάλογα, υποδεικνύοντας ότι αυτή η κινάση έχει ρόλο-κλειδί στην ωρίμανση των ωοκυττάρων (Chen J. et al.,2006; LaRosa C. et al., 2006).

Σε μια μελέτη που έγινε σε ποντίκια, βρέθηκε ότι η υπερανδρογοναιμία προκαλεί οξειδωτικό στρες στον ωοθηκικό ιστό μέσω ενεργοποίησης φωσφορυλίωσης της AMPK. Θεραπεία με δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), βρέθηκε ότι μειώνει τη δράση της καταλάσης (CAT) και της συνθάσης του νιτρικού οξέος (NOS), την περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη (GSH) και την παραγωγή προσταγλανδίνης E (PGE), ενώ αυξάνει την έκφραση της ωοθηκικής πρωτεΐνης iNOS (inducible NOS) και της επαγόμενης κυκλοξυγενάσης (COX2), τα οποία θα μπορούσαν να βλάψουν την ωοθηκική στεροειδογένεση και να αλλάξουν την οξειδωτική κατάσταση των γυναικών με PCOS. Χορήγηση DHEA σε συνδυασμό με μετορμίνη ήταν ικανή για να εμποδίσει την αύξηση ωοθηκικών iNOS (inducible nitric oxide synthase) και την έκφραση COX2 (κυκλοξυγενάσης), αποκαθιστώντας τη φυσιολογική οξειδωτική κατάσταση, επιφέροντας την οξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία στις γυναίκες αυτές (Elia et al.,2006).

Επίσης, από μελέτες σε γυναίκες με PCOS, έγινε γνωστό, ότι η μετορμίνη μειώνει το υψηλό ποσοστό αποβολής. Ο μηχανισμός δράσης της μετορμίνης όμως παραμένει άγνωστος. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή η μετορμίνη ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση της AMPK στο στάδιο της βλαστοκύστης, προκαλώντας τη λήψη γλυκόζης μέσα στο έμβρυο, βελτιώνοντας το σήμα της ινσουλίνης και διασώζοντας τα έμβρυα από απόπτωση εξαιτίας της ινσουλινοαντίστασης (Eng et al.,2007).

Σε πρόσφατη μελέτη (Zhao JZ. et al., 2010), εξετάστηκε η επίδραση των αντισυλληπτικών και της μετφορμίνης σε γυναίκες με PCOS, στην in vitro ωρίμανση των ωοκυττάρων, στην επίτευξη γονιμοποίησης και περαιτέρω διαίρεσης των ωοκυττάρων, στην επίτευξη εγκυμοσύνης, καθώς και στο ποσοστό αποβολής και γέννησης. Έτσι, όσον αφορά την ωρίμανση, τη γονιμοποίηση, τη διαίρεση των ωοκυττάρων και το ποσοστό εγκυμοσύνης, δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική διαφορά μεταξύ των γυναικών στις οποίες χορηγήθηκαν οι παραπάνω ουσίες και σε αυτές που δεν χορηγήθηκαν (control). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό αποβολής (16.13% vs 4.0%), ενώ μεγαλύτερο ποσοστό γέννησης στις γυναίκες αυτές συγκριτικά με την ομάδα control (37.70% vs 30.38%).

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της μετφορμίνης σε γυναίκες με PCOS, oligo-αμηνόρροια και υπογονιμότητα, όπου βρέθηκε ότι η μετφορμίνη βελτιώνει το ποσοστό εγκυμοσύνης και ωορρηξίας. Παρ'όλα αυτά δε βρέθηκε, να βελτιώνει το ποσοστό γέννησης, είτε χορηγούνταν μόνη, είτε σε συνδυασμό με την κλομιφαίνη (Tang T. et al., 2010).

## 4.2 Η ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Η δράση της στην ωοθηκική στεροειδογένεση έχει μελετηθεί κυρίως σε γυναίκες με PCOS. Η αντισταθμιστική υπερινσουλιναμία στις γυναίκες αυτές παρακινεί την παραγωγή ανδρογόνων στην ωοθήκη και είναι επιζήμια στη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων (GCs).

Βρέθηκε ότι η μετφορμίνη έχει άμεση επίδραση στην ανθρώπινη στεροειδογένεση. Συγκεκριμένα, στα **κοκκώδη κύτταρα** αναστέλλει σημαντικά την επαγόμενη από γοναδοτροφίνες (FSH και LH) παραγωγή προγεστερόνης (P) και οιστραδιόλης (E2) (σε ποσοστό 0-30%). Η αναστολή αυτή των P και E2, πιθανώς να παρατηρήθηκε επειδή η P είναι το τελευταίο εκκρινόμενο προϊόν στο μονοπάτι στεροειδογένεσης στα κοκκώδη κύτταρα, στα οποία λείπει το ένζυμο P450c17, καθώς και ανδρογονικό υπόστρωμα για την αρωματάση.

Η αναστολή αυτή της αρωματάσης δείχνει ότι η μετορμίνη δρα σε πολλά σημεία στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η μετορμίνη επιδρά στη λειτουργία του ενζύμου P450c17 (Mansfield et al, 2003). Επίσης, μειώνει την παρακινούμενη από FSH έκφραση των ενζύμων 3β-HSD, STAR, CYP11A1 και της αρωματάσης (CYP19A1), ενώ εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων (Kandaraki et al., 2010).

Στα *κύτταρα θήκης*, η μετορμίνη αναστέλλει την παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενδιόνης) (σε ποσοστό 0-40%), χωρίς να επιδρά στην παραγωγή προγεστερόνης, ενώ, παρουσία ινσουλίνης, η μετορμίνη (ανάλογα με τη δόση) αναστέλλει την παραγωγή ανδροστενδιόνης και αυξάνει την παραγωγή προγεστερόνης (Mansfield et al., 2003).

Επίσης, βρέθηκε ότι αναστέλλεται και η παραγωγή τεστοστερόνης παρουσία μετορμίνης, καθώς και με τη μέθοδο της Western Blotting βρέθηκε ότι η μετορμίνη αναστέλλει την έκφραση των ενζύμων STAR και CYP17, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση των 3βHSD και CYP11A1 κατά τη διάρκεια της στεροειδογένεσης (Attia et al., 2001).

### 4.3.1 ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Αντίθετα με τη λεπτίνη, οι δράσεις της οποίας στο αναπαραγωγικό σύστημα έχουν μελετηθεί διεξοδικά, η γκρελίνη ως νεότερη ουσία έχει μελετηθεί λιγότερο. Οι δράσεις της γκρελίνης περιλαμβάνουν συστηματικές επιδράσεις σε διαφορετικά επίπεδα στο αναπαραγωγικό σύστημα, όπως και άμεσες δράσεις στις γονάδες, όπου τοπικά πιθανώς παράγεται η γκρελίνη (πίνακας 4.1).

Μόριο	Έκφραση	Αναπαραγωγή	Μεταβολισμός και όρεξη
<b>Γκρελίνη</b>	Γκρελίνη ± υποδοχείς γκρελίνης: υποθάλαμος, υπόφυση, ωοθήκη, έμβρυο, ενδομήτριο, πλακούντας, όρχις	Πιθανές δράσεις μέσω υποδοχέων του υποθαλάμου και της υπόφυσης. Παρουσία στην ωοθήκη αρουραίου κατά την παραγωγική φάση του κύκλου και την εγκυμοσύνη. Εμποδίζει την ανάπτυξη του εμβρύου και μειώνει το συνολικό αριθμό κυττάρων της βλαστοκύστης. Εμποδίζει την εμφύτευση, τον πολ/σμο και τη διαφοροποίηση των μη ώριμων κυττάρων Leydig και των σπερματογόνιων κυττάρων	Αυξημένα επίπεδα πριν τη λήψη τροφής, την πείνα και την απώλεια βάρους. Διεγείρει την όρεξη και την πρόσληψη της τροφής. Εμποδίζει την ενεργειακή κατανάλωση και προωθεί την παχυσαρκία. Αυξάνει τη δράση του παρασυμπαθητικού συστήματος. Διεγείρει την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης. Αυξάνει την οξείδωση της γλυκόζης και τη λιπογένεση. Έχει επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

**Πίνακας 4.1.** Κύριες δράσεις της γκρελίνης στο μεταβολισμό και στην αναπαραγωγική διαδικασία.

### 4.3.2 ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΚΑΙ ΩΘΗΚΕΣ

Η σταθερή έκφραση του γονιδίου της γκρελίνης έχει περιγραφεί στην ωθήκη του αρουραίου κατά την διάρκεια του οιστρογονικού κύκλου. Τα επίπεδα του mRNA ποικίλλουν ανάλογα με το στάδιο του κύκλου, με χαμηλότερα επίπεδα στην προοιστρογονική φάση και ύψιστες τιμές στην εκκριτική φάση του κύκλου (Camínos et al, 2003). Καταστέλλοντας την προωθυλακιορρηκτική αιχμή των γοναδοτροπινών και την ωθυλακιορρηξία με ισχυρούς GnRH ανταγωνιστές, διακόπτεται η κυκλική μεταβολή της ωθητικής έκφρασης του mRNA της γκρελίνης. Η έκφραση του mRNA της γκρελίνης ανιχνεύθηκε, επίσης και στην ωθήκη του αρουραίου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Υψηλότερα επίπεδα ανιχνεύθηκαν στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης, συγκρινόμενα με τη χαμηλότερη έκφραση της προς το τέλος της εγκυμοσύνης (Camínos et al, 2003).

Στον άνθρωπο, η ανοσοδραστικότητα της γκρελίνης ανιχνεύεται κυρίως στα κύτταρα του ωχρού σωματίου που παράγουν στεροειδείς ορμόνες του κύκλου, αλλά και σε όλα τα μεταγενέστερα ωχρά σωματίδια που πρόκειται να εκφυλισθούν, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα ανθρώπινα ωθυλάκια σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο (Gaytan et al, 2003).

Σχετικά με το λειτουργικό υποδοχέα της γκρελίνης, η έκφραση της πρωτεΐνης GHSR1a στην ανθρώπινη ωθήκη παρουσίασε ευρύ φάσμα διανομής στον ωθητικό ιστό, με ανιχνεύσιμη έκφραση στα ωκύτταρα, στα σωματικά κύτταρα των ωθυλακίων, όπως επίσης και στα κύτταρα των ωχρών σωματίων. Η ταυτόχρονη έκφραση της γκρελίνης και του υποδοχέα της σε διάφορα ωθητικά διαμερίσματα αποδεικνύει μια πιθανή δράση της τοπικά παραγόμενης γκρελίνης στην αυτο/παρακρινική ρύθμιση της ανθρώπινης ωθητικής λειτουργίας. Επιπλέον, η ευρεία έκφραση της πρωτεΐνης GHSR1a, δείχνει ότι πιθανώς η γκρελίνη λειτουργεί πάνω σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους μέσα στην ωθήκη, όπως έχει δειχθεί και για άλλους παράγοντες με βασικό ρόλο στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, όπως για παράδειγμα η λεπτίνη. (M.L. Barreiro et al., 2004).

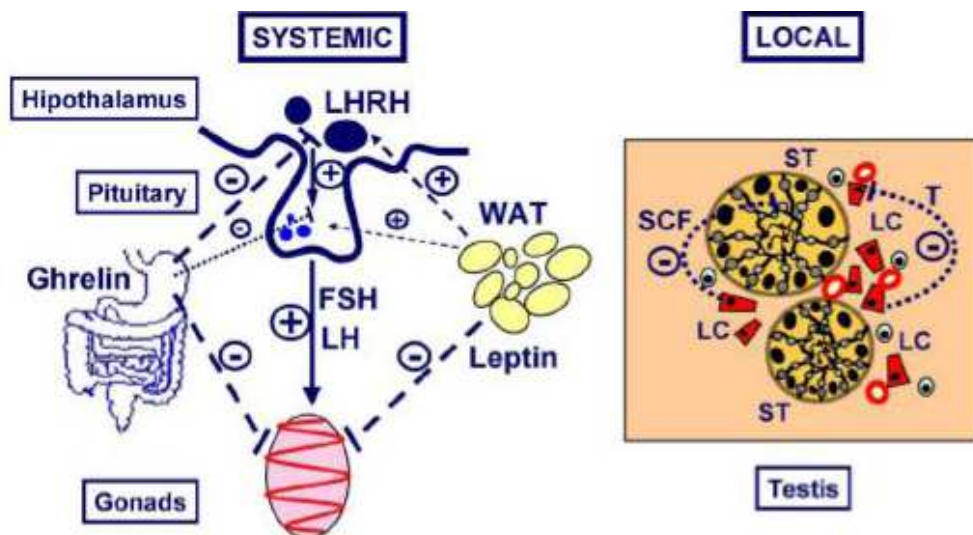
### 4.3.3 ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση της κυκλοφορούσας γρελίνης αναφορικά με τις συγκεντρώσεις της στα ορμονικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά σε γυναίκες με PCOS. Σε μερικές μελέτες, τα επίπεδα της γρελίνης στη νηστεία βρέθηκαν μειωμένα σε γυναίκες με PCOS συγκριτικά με εκείνες που ήταν μάρτυρες (Schofl et al, 2002). Μια αρνητική συσχέτιση ανιχνεύθηκε ανάμεσα στην κυκλοφορούσα γρελίνη και στα επίπεδα των ανδρογόνων στο ανθρώπινο πλάσμα.

Παράλληλα με τη μείωση των κυκλοφορούντων ανδρογόνων υπό θεραπεία με αντιανδρογόνα (φλουταμίδα), τα επίπεδα της γκρελίνης αυξήθηκαν αξιοσημείωτα στην ομάδα της φλουταμίδης, ενώ τα επίπεδα της γκρελίνης παρέμειναν ίδια στην ομάδα που πήρε placebo (Gambineri et al, 2003).

Ωστόσο σε άλλες μελέτες δεν βρέθηκε καμία αλλαγή στα επίπεδα της γκρελίνης σε γυναίκες με ΣΠΩ συγκρινόμενες με εκείνες που ήταν σε ομάδες που το βάρος τους ήταν υπό έλεγχο (Orio et al, 2003, Wasko et al, 2004).

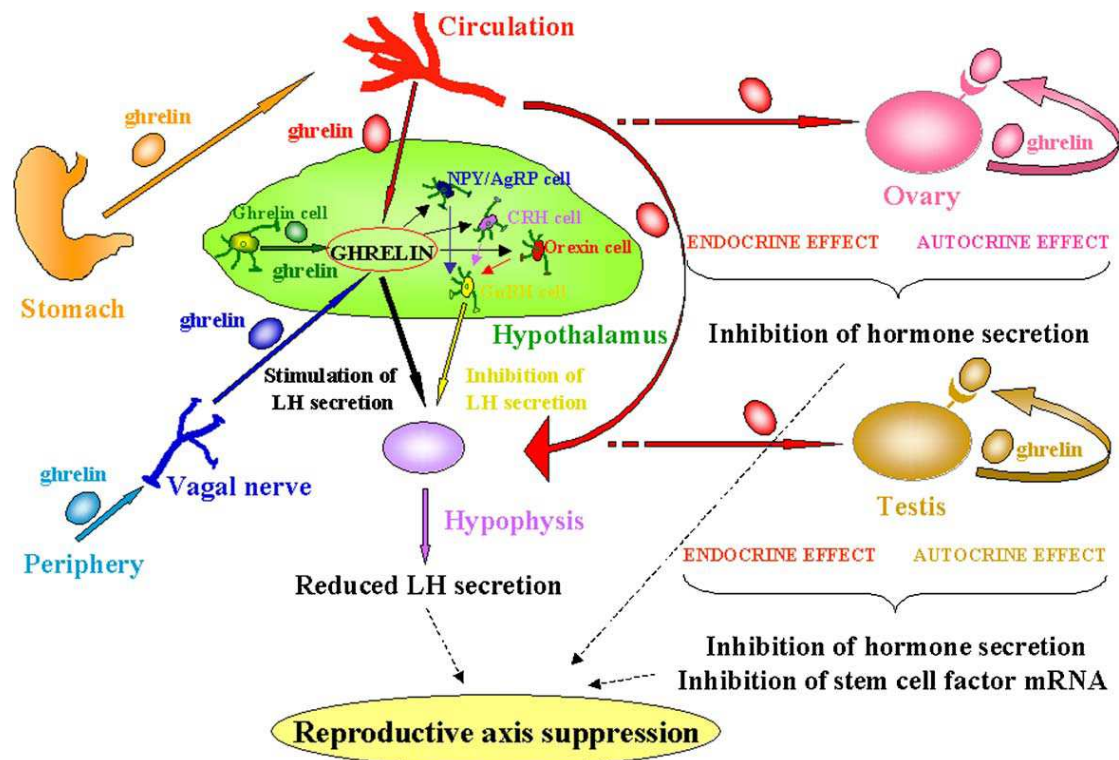
Η γκρελίνη έχει πρόσφατα αναδειχθεί ως ένας πλειοτροπικός νευροενδοκρινικός ρυθμιστής που εμπλέκεται στον έλεγχο ενός ευρέως φάσματος βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης και της ενεργειακής ισορροπίας. Επιπλέον, αυξάνονται οι ενδείξεις ότι η γκρελίνη μπορεί να λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση διαφορετικών παραμέτρων στην αναπαραγωγική λειτουργία.



**Εικόνα 4.2** Οι συστηματικές και τοπικές δράσεις της γκρελίνης στην ωοθήκη και τον όρχι.

Η συστηματικά παραγόμενη από το στόμαχο γκρελίνη (Guallilo et al., 2003), με πιθανές δράσεις σε διαφορετικά επίπεδα στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες, μπορεί να εκτελεί πρόσθετες αυτοκρινείς/παρακρινείς δράσεις στον έλεγχο της λειτουργίας των γονάδων. Συνολικά, έχει προταθεί ότι η γκρελίνη μπορεί να συνεργάζεται με άλλα ρυθμιστικά σήματα, όπως η παραγόμενη από το λιπώδη ιστό ορμόνη λεπτίνη, σε έναν ολοκληρωμένο έλεγχο της ενεργειακής ισορροπίας και της αναπαραγωγής (Εικ.4.3).





**Εικ.4.3** Πηγές γκρελίνης και η δράση της στην αναπαραγωγή. Θεωρώντας ότι ο αναπαραγωγικός άξονας είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενος από την κατάσταση θρέψης, η γκρελίνη δρώντας σε κεντρικό (έκκριση LH) και περιφερικό (γονάδες) επίπεδο, θα μπορούσε να είναι ένας από τους μηχανισμούς που συνδέουν την ενεργειακή κατάσταση του σώματος, με τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση- γονάδες. (Lorenzi et al., Cytokine & Growth Factor Reviews 20 (2009) 137–152)

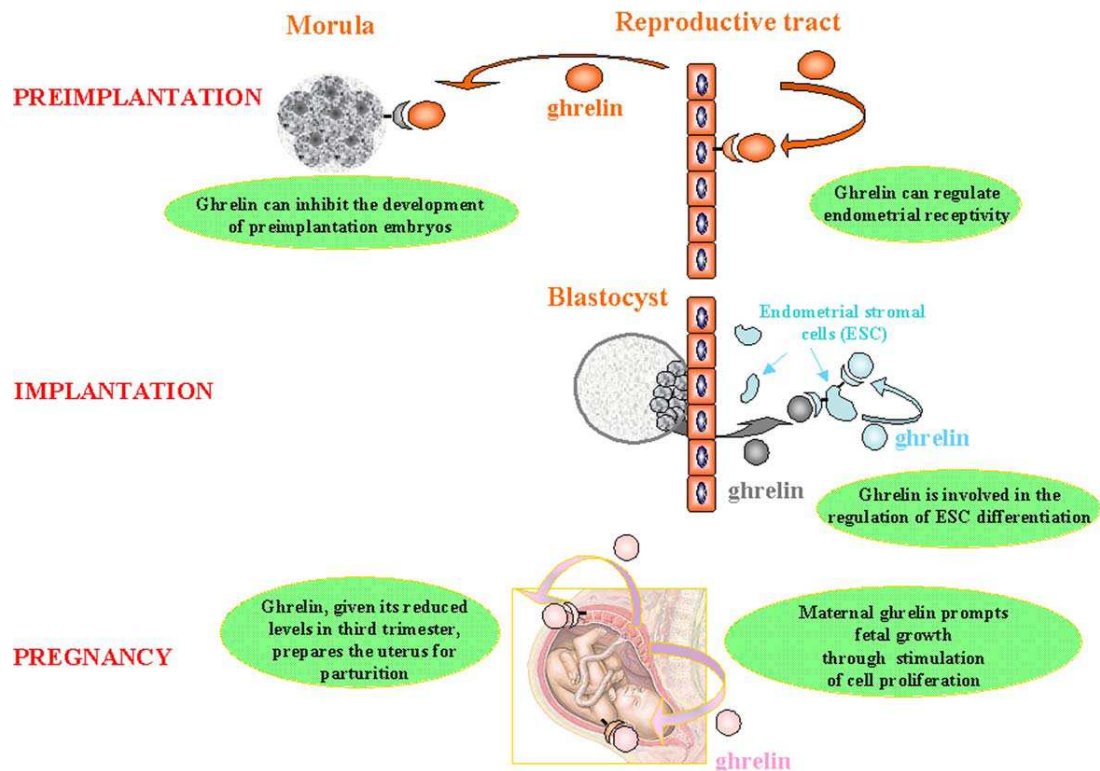
#### 4.3.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ

Πρόσφατα η γκρελίνη και ο υποδοχέας της ανιχνεύθηκαν σε ενδομητρικό ιστό και σε εμφυτευμένα έμβρυα ποντικού (Kawamura et al, 2003), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γκρελίνη μπορεί να ρυθμίσει τις λειτουργίες της εμφύτευσης του εμβρύου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του με αποκρινή-αυτοκρινή δράση. Η γκρελίνη ανιχνεύθηκε στη μήτρα, και το επίπεδο ήταν ιδιαίτερα αυξημένο σε νηστικά ποντίκια, συγκρινόμενα με εκείνα τα ζώα που είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή.

Νηστεία 48 ωρών οδήγησε σε αυξανόμενη έκκριση της γκρελίνης στη μήτρα, όπως παρατηρήθηκε σε δείγματα στο πλάσμα (Kawamura et al, 2003). Η γκρελίνη και το mRNA του GHS-R βρέθηκαν να εκφράζονται στο μορίδιο και τη βλαστοκύστη του ποντικού. Η έκφραση τους στη βλαστοκύστη ανιχνεύθηκε και στα κύτταρα της έσω θήκης και στα τροφοβλαστικά κύτταρα.

Η γκρελίνη, βρέθηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη των εμβρύων από το στάδιο του μοριδίου στο στάδιο της πρώιμης βλαστοκύστης, από το στάδιο της πρώιμης στην εξελισσόμενη βλαστοκύστη και μετέπειτα στην εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη. Συγκεκριμένα, μειώνει το συνολικό αριθμό κυττάρων της βλαστοκύστης, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων και των κυττάρων της εσωτερικής μάζας της βλαστοκύστης. Η δράση αυτή της γκρελίνης αναιρείται από έναν ανταγωνιστή του GHS-R (D-Lys-3 GHRP-6). Η θεραπεία με τον ανταγωνιστή του GHS-R έδειξε μικρή επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου (Kawamura et al, 2003).

Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η γκρελίνη που εκκρίνεται από την αναπαραγωγική οδό, μπορεί να έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των πρώιμων σταδίων του εμβρύου μέσω του GHS-R. Θα μπορούσε να προλεχθεί λοιπόν, πως η γκρελίνη μπορεί να εμποδίσει την εμφύτευση του εμβρύου σε καταστάσεις κακής σιτίσεως, προκειμένου να αποφευχθεί η κατανάλωση υπέρμετρων μεταβολικών απαιτήσεων, που επιβάλλει η εγκυμοσύνη (Εικ.4.4) (Lorenzi et al.,2009).



**Εικ.4.4** Επίδραση της γκρελίνης στην προεμφυτευτική φάση, στην εμφύτευση και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο ρόλος της είναι να βεβαιωθεί η εμφύτευση εμβρύων και η μετέπειτα ανάπτυξή του μόνο σε κατάσταση της θρεπτικής επάρκειας για μια βέλτιστη εμβρυϊκή-μητρική σχέση (Lorenzi et al.,2009).

#### 4.4 Η ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Η πληροφόρηση σχετικά με την επίδραση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ανθρώπινων ωοκυττάρων είναι ανεπαρκής.

Υπάρχουν δυο υπότυποι υποδοχέα της γκρελίνης στην ωοθήκη, ο εντελώς λειτουργικός GHSR-1a και ο βιολογικά ανενεργός GHSR-1b. Η δραστηριότητα του ωοθυλακικού GHSR-1a έχει δείχθει τόσο στα κοκκώδη όσο και στα κύτταρα θήκης ωοθυλακίων με άντρο. Η παρουσία του προσδέτη της γκρελίνης, καθώς και του ενεργού υποδοχέα της γκρελίνης στην ανθρώπινη ωοθήκη, δείχνει το σπουδαίο ρόλο του μορίου αυτού στην ωοθηκική λειτουργία. Έχουν προταθεί δυο μηχανισμοί που εξηγούν πως η γκρελίνη δρα στην έκκριση της οιστραδιόλης, α) η γκρελίνη επηρεάζει άμεσα τη δράση της αρωματάσης και την πρωτεϊνική έκφραση και β) η γκρελίνη παρακινεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον αντιαποπτωτικό μηχανισμό (Rak et al.,2008).

Από μελέτες σε χοίρους, όπου χρησιμοποιήθηκε το ωοθυλακικό τους υγρό (pFF-porcine follicular fluid), έγινε γνωστό ότι η γκρελίνη έχει ανασταλτική δράση στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων και των μικρονηματίων, αναστέλλοντας έτσι, την ωρίμανση των ωοκυττάρων τους (συγκεκριμένα, με την προσθήκη 50-500 ng/ml γκρελίνης, παρατηρήθηκε κατά 30% μειωμένη κατανομή κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων). Επίσης, παρατηρήθηκε και μια μείωση (κατά 40%) στα κυτταροπλασματικά μικρονημάτια μόνο όταν προστέθηκε 500 ng/ml γκρελίνη, ενώ καμία πτώση της πυκνότητας δε σημειώθηκε όταν προστέθηκε 0.5-50 ng/ml γκρελίνη. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε τόσο στα ωοκύτταρα με κοκκώδη κύτταρα, όσο και στα απογυμνωμένα ωοκύτταρα, από το οποίο φαίνεται ότι η γκρελίνη δρα επηρεάζοντας το μονοπάτι σηματοδότησης που συσχετίζεται με την κυτταροσκελετική οργάνωση στα ωοκύτταρα, παρά μέσω των κοκκωδών κυττάρων (Suzuki et al., 2009).

Οι Sirotkin et al. έδειξαν ότι η γκρελίνη παρακινεί την έκφραση του PCNA (δείκτης G-φάσης και S-φάσης του κυτταρικού κύκλου), καθώς και της κυκλίνης B1 (δείκτης G2 φάσης μίτωσης) στα ωοθυλακικά κύτταρα πουλερικών, δείχνοντας ότι η γκρελίνη μπορεί να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ωοθήκης. Επιπλέον, η γκρελίνη ήταν σε θέση να διαμορφώσει την έκφραση διαφόρων αποπτωτικών δεικτών, όπως της πρωτεΐνης bax και της caspase-3 (δείκτες της κυτταροπλασματικής απόπτωσης), της bcl-2 (δεσμευτική πρωτεΐνη για το bax) και της p53 (παράγοντας μεταγραφής που προάγει την πυρηνική απόπτωση και την επιδιόρθωση του πυρηνικού DNA). Επιπλέον, το ποσοστό θρυμματισμού του DNA, όπως υπολογίζεται με τη δοκιμασία TUNEL, άλλαξε με την προσθήκη γκρελίνης. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν τη συμμετοχή της γκρελίνης στον έλεγχο των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών αποπτωτικών γεγονότων στα ωοθηκικά κύτταρα.

## 4.5 Η ΓΚΡΕΛΙΝΗ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

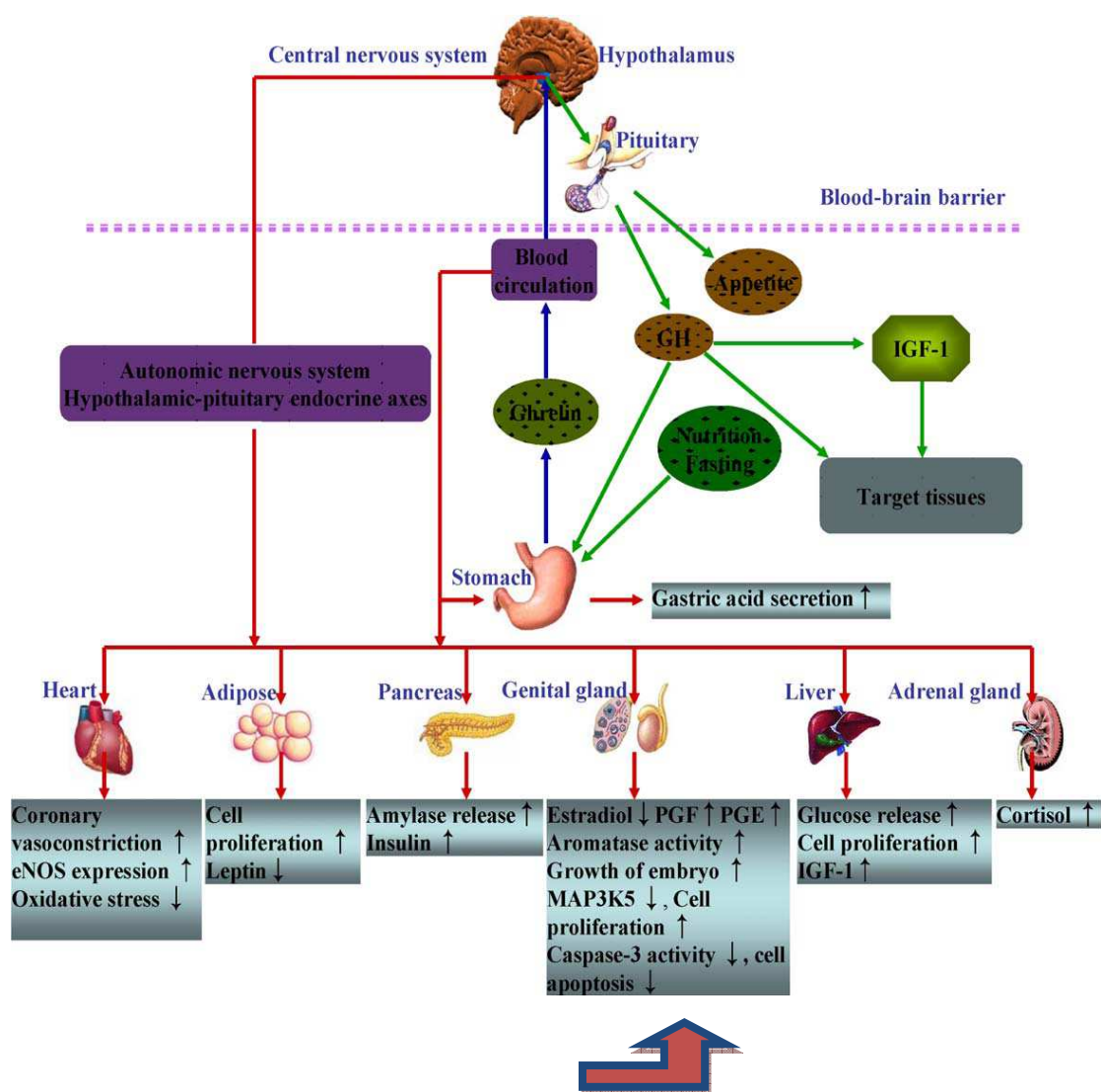
Από μελέτη που έγινε σε χοίρους, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκκριση της οιστραδιόλης (μετά την προσθήκη 250 και 500 pg/ml γκρελίνης), στη δράση της αρωματάσης, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και μείωση της αποπτωτικής διαδικασίας μετά την προσθήκη 250 και 500 pg/ml γκρελίνης στην καλλιέργεια ωοθυλακίων χοίρων. Όπως είναι γνωστό, τα οιστρογόνα βιοσυντίθενται από ανδρογόνα με τη βοήθεια της P450 αρωματάσης. Το ένζυμο αυτό ανιχνεύθηκε στα κοκκώδη κύτταρα ωοθυλακίων με διάμετρο > 6mm, καθώς και στα κύτταρα θήκης των μεγάλων ωοθυλακίων. Ακόμα, η δραστηριότητα της γκρελίνης και του υποδοχέα των οιστρογόνων είναι παρών στα ίδια κύτταρα, δείχνοντας ότι τα οιστρογόνα έχουν άμεση επίδραση στην έκφραση της γκρελίνης. Η διεγερτική δράση της γκρελίνης στην έκκριση της οιστραδιόλης, πιθανώς να οφείλεται στην αντιαποπτωτική της δράση στα ωοθυλάκια (Rak et al., 2008).

Σε αντίθεση με την παραπάνω μελέτη έρχονται τα αποτελέσματα των Sirotkin και Grossmann, όπως και των Dong et al, οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γκρελίνη προκαλεί μείωση της έκκρισης της οιστραδιόλης στα ωοθηκικά κύτταρα πούλερικών και χοίρων αντίστοιχα.

Ακόμη, στους χοίρους βρέθηκε ότι αυξάνει τον ολικό αριθμό κυττάρων των *in vitro* γονιμοποιημένων εμβρύων χοίρων, αλλά μειώνει την ποσοστιαία αναλογία ανάμεσα στα κύτταρα εσωτερικής μάζας και τον ολικό αριθμό κυττάρων. Προκαλεί επίσης, αυξημένη έκκριση προσταγλανδινών F και E (PGF και PGE) στα κοκκώδη κύτταρα χοίρων που καλλιεργούνταν με προσθήκη γκρελίνης, ενώ παράλληλα, αυξάνει τη δράση της αρωματάσης, προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη των εμβρύων και μειώνει τη δράση της κασπάσης-3 και την κυτταρική απόπτωση (Dong et al., 2009) (Εικ.4.5).

Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση στην έκκριση υποθαλαμικής GnRH *in vitro*, καθώς και στη συχνότητα έκκρισης της LH *in vivo*, τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους (Kluge et al., 2007).

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι θηλυκά ποντίκια στα οποία χορηγούνταν γκρελίνη κατά τη διάρκεια της ήβης, εκδήλωναν φυσιολογικό κύκλο οίστρου και ήταν γόνιμα. Ενώ, κάτω από διαφορετικές συνθήκες η γκρελίνη βρέθηκε να αναστέλλει την έκκριση της LH και της GnRH in vivo, ενώ δεν επηρεάζε την έκκριση της FSH (Fernandez-Fernandez R. et al. 2005;2007).



**Εικόνα 4.5** Δράση της γκρελίνης στην ωοθήκη (Dong et al.,2009).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η γκρελίνη ασκεί δράση και στην ανθρώπινη στεροειδογένεση με την πρόσδεσή της στον λειτουργικό της υποδοχέα GHSR-1a. Συγκεκριμένα, ασκεί ανασταλτική δράση στην έκκριση της οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, που συλλέχθηκαν από γυναίκες με υπογονιμότητα εξαιτίας της μη διαβατότητας της μιας ή και των δυο σαλπίγγων. Η μεγαλύτερη μείωση στην E2 (25%) και στην P4 (20%), παρατηρήθηκε μετά από τη χορήγηση  $10^{-7}$  και  $10^{-8}$  mol/l γκρελίνης, αντίστοιχα (Viani et al., 2008).

Τελικά, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση γκρελίνης σε γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, δεν επιδρά στην επαγόμενη από GnRH έκκριση των γοναδοτροφινών FSH και LH, αλλά και ούτε στα επίπεδα της E2, της προγεστερόνης και της προλακτίνης κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Messini et al 2009).

Είναι δύσκολο να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών μεταξύ τους επειδή χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη. Επίσης, οι Viani et al., χρησιμοποίησαν μια στρώση κυττάρων των ανθρώπινων ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, ενώ οι Rak et al., συνκαλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης, δημιουργώντας περισσότερο φυσικές συνθήκες.

Αλλά η πιο σημαντική διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι οι Rak et al χρησιμοποίησαν ωοθυλάκια από προεφηβικούς χοίρους, ενώ οι Viani et al. χρησιμοποίησαν κοκκώδη και κύτταρα θήκης από γυναίκες που έκαναν θεραπεία με γοναδοτροφίνες πριν την ανάκτηση των κυττάρων αυτών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της μετφορμίνης και της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων και την ωοθηκική στεροειδογένεση.

Η **μετφορμίνη** είναι μια διγουανίδη, η οποία μειώνει τα επίπεδα σακχάρου του αίματος. Τα χαμηλότερα επίπεδα σακχάρου στο αίμα οδηγούν σε μικρότερη ανάγκη για ινσουλίνη. Ο οργανισμός στη συνέχεια παράγει λιγότερη ινσουλίνη, όπου η ελάττωση αυτής οδηγεί σε χαμηλότερη παραγωγή ανδρογόνων.

Μακροπρόθεσμη θεραπεία με μετφορμίνη σε γυναίκες με PCOS, έχει δείξει ότι βοηθά στην ρύθμιση του έμμηνου κύκλου, αυξάνει την ωορρηξία, μειώνει τα επίπεδα ανδρογόνων στον ορό του αίματος και μειώνει τον κίνδυνο αποβολών.

Η δράση της μετφορμίνης στην ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων παραμένει ακόμα και σήμερα υπό διερεύνηση. Φαίνεται να επηρεάζει την ωοθηκική λειτουργία με ένα διπλό τρόπο. Έμμεσα, ελαττώνοντας την επίδραση περίσσειας ινσουλίνης στη στεροειδογένεση και στην ωοθυλακική ωρίμανση αλλά και άμεσα δρώντας πάνω στην ωοθήκη. Τα πιθανά άμεσα αποτελέσματα της μετφορμίνης στην ωοθήκη έχουν εξεταστεί στους πληθυσμούς των ωοθηκικών κυττάρων.

Ο μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης όμως παραμένει άγνωστος. Έχει προταθεί ότι δρα ως ενεργοποιητής της AMPK, παρακινώντας τη συνέχιση της μειωτικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων, υποδεικνύοντας ότι αυτή η κίνηση παίζει ρόλο-κλειδί στην ωρίμανση των ωοκυττάρων.



Έτσι, από πειράματα σε βοοειδή, βρέθηκε ότι στα COCs (ωοκύτταρα με κοκκώδη κύτταρα) η μεταφορμίνη "μπλοκάρει" τη μειωτική ωρίμανση στο GV στάδιο, προάγοντας τη φωσφορυλίωση PRKAA (adenosine 5' monophosphate- activated protein kinase) και αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των MAPK3/1 στα COCs κατά τη διάρκεια της in vitro ωρίμανσης, αλλά όχι στα DOs (απογυμνωμένα ωοκύτταρα), που σημαίνει ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για τη δράση της μεταφορμίνης στην ωρίμανση των ωοκυττάρων (Tosca et al., 2007)

Όσον αφορά την επίδραση της μεταφορμίνης στον άνθρωπο, δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική διαφορά στην in vitro ωρίμανση των ωοκυττάρων, στην επίτευξη γονιμοποίησης και περαιτέρω διαίρεσης των ωοκυττάρων, στην επίτευξη εγκυμοσύνης, καθώς και στο ποσοστό αποβολής και γέννησης μεταξύ των γυναικών στις οποίες χορηγήθηκε μεταφορμίνη και σε αυτές που δεν χορηγήθηκε (ομάδα control). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό αποβολής (16.13% vs 4.0%), ενώ μεγαλύτερο ποσοστό γέννησης στις γυναίκες αυτές συγκριτικά με την ομάδα control (37.70% vs 30.38%)(Zhao JZ. et al., 2010).

Η **γκρελίνη**, ένα ακυλιωμένο πεπτίδιο 28 αμινοξέων, είναι μία ορμόνη υπεύθυνη για τη ρύθμιση της όρεξης, η οποία εκκρίνεται κυρίως στο στομάχι. Αυξάνονται συνέχεια όμως οι ενδείξεις ότι η γκρελίνη λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας.

Όσον αφορά την επίδρασή της στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, από μελέτες σε χοίρους, έγινε γνωστό ότι η γκρελίνη έχει ανασταλτική δράση στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων (30% μειωμένη κατανομή κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων) και των μικρονηματίων (κατά 40%), αναστέλλοντας έτσι την ωρίμανση των ωοκυττάρων τους. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε τόσο στα ωοκύτταρα με κοκκώδη κύτταρα, όσο και στα απογυμνωμένα ωοκύτταρα, από το οποίο φαίνεται ότι η γκρελίνη δρα επηρεάζοντας το μονοπάτι σηματοδότησης που συσχετίζεται με την κυτταροσκελετική οργάνωση στα ωοκύτταρα, παρά μέσω των κοκκωδών κυττάρων (Suzuki et al., 2009).

Τέλος, μελετήθηκε η δράση των ορμονών αυτών στην ωοθηκική στεροειδογένεση. Όσον αφορά τη μετορμίνη βρέθηκε ότι έχει άμεση επίδραση στην ανθρώπινη στεροειδογένεση. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα θήκης, τα κλινικά στοιχεία καταδεικνύουν ότι η μετορμίνη αναστέλλει την έκφραση των ενζύμων STAR και CYP17 (Attia et al., 2001), ενώ στα κοκκώδη κύτταρα αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα της LH, όπως επίσης και τη δραστηριότητα των ενζύμων STAR, 3-βHSD και CYP11A1 (Kandaraki et al., 2010).

Αυτοί οι μηχανισμοί συνεισφέρουν στην καταστολή της υπερπαραγωγής φυλετικών στεροειδών ορμονών και της πρόωμης ωχρινοποίησης (εξαιτίας της πρόωμης έκφρασης του υποδοχέα LH), που έχουν ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της υπερανδρογοναιμίας και τη βελτίωση της ωοθυλακιορρηξίας.

Έτσι, στα **κοκκώδη κύτταρα**, η μετορμίνη αναστέλλει σημαντικά την επαγόμενη από γοναδοτροφίνες (FSH και LH) παραγωγή της προγεστερόνης (P) και της οιστραδιόλης (E2), ενώ στα **κύτταρα θήκης** αναστέλλει την παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενδιόνης), χωρίς να επιδρά στην παραγωγή προγεστερόνης (Mansfield et al, 2003).

Όσον αφορά τη γκρελίνη, ασκεί δράση στην ανθρώπινη στεροειδογένεση με την πρόσδεσή της στον λειτουργικό της υποδοχέα GHSR-1a.

Συγκεκριμένα, από μελέτες σε χοίρους και πουλερικά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Σύμφωνα με τους Rak et.al η γκρελίνη προκαλεί σημαντική αύξηση στην έκκριση της οιστραδιόλης στα ωοθηκικά κύτταρα χοίρων, ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Sirotkin και Grossmann, όπως και των Dong et al, η γκρελίνη προκαλεί μείωση της έκκρισης της οιστραδιόλης στα ωοθηκικά κύτταρα πουλερικών και χοίρων αντίστοιχα. Ενώ παράλληλα, αυξάνει τη δράση της αρωματάσης, προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη των εμβρύων και μειώνει τη δράση της κασπάσης-3 και την κυτταρική απόπτωση (Dong et al., 2009)

Επίσης, από πειράματα σε ποντίκια βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση στην έκκριση της υποθαλαμικής GnRH καθώς και στη συχνότητα έκκρισης της LH in vivo, ενώ δεν επηρεάζει την έκκριση της FSH (Fernandez-Fernandez R. et al. 2005;2007; Lafranco et al., 2008). Σε αντίθεση έρχεται η μελέτη των Kluge et al., σύμφωνα με τους οποίους η γκρελίνη καταστέλλει την έκκριση της FSH τόσο στα ποντίκια όσο και στους ανθρώπους (Kluge et al., 2009).

Όσον αφορά τον άνθρωπο, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση γκρελίνης σε γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, δεν έχει επίδραση στην επαγόμενη από GnRH έκκριση των γοναδοτροφινών FSH και LH, αλλά και ούτε στα επίπεδα της E2, της προγεστερόνης και της προλακτίνης κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Messini et al 2009).

Είναι δύσκολο να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών μεταξύ τους επειδή χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη και διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας σε κάθε μία από αυτές.

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι οι δυο αυτές ουσίες δεν είναι πρωταρχικοί παράγοντες ρύθμισης της ανθρώπινης στεροειδογένεσης και ωρίμανσης των ωοκυττάρων, αλλά πιθανόν συμμετέχουν σε αυτήν.

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΤΑΣΗ**

Αν και η διαθεσιμότητα των ανθρώπινων ωαρίων για πειραματικούς σκοπούς είναι μικρή και η συλλογή τους δύσκολη, μια πρόταση διερεύνησης του ρόλου των δυο αυτών ουσιών είναι να συλλέξουμε ωάρια σε GV στάδιο που "περισσεύουν" από γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση και να τα καλλιεργήσουμε στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, στα ωάρια αυτά που συλλέξαμε όπου περιβάλλονται από κοκκώδη (COCs), θα τα καλλιεργήσουμε (in vitro maturation) σε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό και για να βελτιώσουμε τις συνθήκες καλλιέργειας θα προσθέσουμε γκρελίνη, μετορμίνη και αυξητική ορμόνη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0, 0.5, 5, 50 και 500 ng/ml και θα συγκρίνουμε τις επιδράσεις τους στην ωρίμανση των ωοκυττάρων. Αρχικά θα προσθέσουμε μόνο γκρελίνη και στη συνέχεια μόνο μετορμίνη και τέλος σε συνδυασμό.

Τα ίδια ακριβώς θα κάνουμε και αφού "καθαρίσουμε" τα ωοκύτταρα από τα περιβάλλοντα κοκκώδη (denudation), ώστε να διαπιστώσουμε εάν αυτές οι δυο ουσίες δρουν μέσω των κοκκωδών κυττάρων. Τα στάδια της μειωτικής ωρίμανσης θα καθοριστούν με χρώση της χρωματίνης και ανοσοφθορισμό με ειδικά αντισώματα.

Όσον αφορά τη μελέτη της επίδρασης των δυο αυτών ορμονών στην ανθρώπινη στεροειδογένεση, μια ερευνητική πρόταση θα μπορούσε να είναι η απομόνωση ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, από τα αναρροφούμενα ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Μετά την απομόνωση, ακολουθεί καλλιέργεια των κυττάρων αυτών, παρουσία αντιβιοτικών και τεστοστερόνης ως υπόστρωμα της αρωματάσης. Τα κύτταρα θήκης απομονώνονται και αυτά από τα ωοθυλάκια, αφού απομακρυνθούν από τα προσκολλώμενα κοκκώδη και καλλιεργούνται με τον ίδιο τρόπο. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση και των δυο ομάδων κυττάρων παρουσία ή απουσία ποικίλων δόσεων μετοφομίνης, αραιωμένη σε διάλυμα με ή χωρίς FSH ή ινσουλίνη. Την ίδια διαδικασία ακολουθώ και με την προσθήκη γκρελίνης αντίστοιχα. Τέλος, η μέτρηση των στεροειδών ορμονών στο μέσο καλλιέργειας μπορεί να μετρηθεί με τη μέθοδο RIA (ραδιοανοσολογική μέθοδος).

Τελικά, το ουσιώδες ερώτημα εάν αυτές οι δυο ουσίες είναι σημαντικές για την ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων, απαιτεί περισσότερη διερεύνηση. Η επίλυση αυτού του ερωτήματος θα απαιτήσει αναμφισβήτητα πολυάριθμες πειραματικές προσεγγίσεις, οι οποίες μπορεί στο μέλλον, τελικά να οδηγήσουν σε νέες μεθόδους ωρίμανσης των ωαρίων, λιγότερο δαπανηρές, χρονοβόρες και επιβαρυντικές για τη γυναίκα και το κύημα.

## Νώση Ευφροσύνη

### «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ»

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετφορμίνη είναι μια διγουανίδη, η οποία μειώνει τα επίπεδα σακχάρου του αίματος. Θεραπεία με μετφορμίνη σε γυναίκες με PCOS, έχει δείξει ότι βοηθά στην ρύθμιση του έμμηνου κύκλου, αυξάνει την ωοθυλακιορρηξία, μειώνει τα επίπεδα των ανδρογόνων στον ορό του αίματος και τον κίνδυνο αποβολών.

Η γκρελίνη, ένα ακυλιωμένο πεπτίδιο 28 αμινοξέων, είναι μία ορμόνη υπεύθυνη για τη ρύθμιση της όρεξης, η οποία εκκρίνεται κυρίως στο στομάχι. Αυξάνονται συνέχεια όμως οι ενδείξεις ότι η γκρελίνη λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της βιβλιογραφίας σχετικά με την επίδραση των δυο αυτών ουσιών στην ωρίμανση των ωαρίων και την ωοθηκική στεροειδογένεση.

Η δράση της μετφορμίνης στην ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων παραμένει υπό διερεύνηση. Από πειράματα σε βοοειδή, βρέθηκε ότι στα ωοκύτταρα με κοκκώδη κύτταρα, η μετφορμίνη "μπλοκάρει" τη μειωτική ωρίμανση στο GV στάδιο, αλλά όχι στα απογυμνωμένα ωοκύτταρα, που σημαίνει ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για τη δράση της μετφορμίνης. Παρ'όλα αυτά, στον άνθρωπο δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική επίδραση της μετφορμίνης στην *in vitro* ωρίμανση των ωοκυττάρων, στην επίτευξη γονιμοποίησης και περαιτέρω διαίρεσης των ωοκυττάρων, στην επίτευξη εγκυμοσύνης, καθώς και στο ποσοστό αποβολής και γέννησης μεταξύ των γυναικών στις οποίες χορηγήθηκε μετφορμίνη και σε αυτές που δεν χορηγήθηκε (ομάδα control). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό αποβολής και μεγαλύτερο ποσοστό γέννησης νεογνών στις γυναίκες αυτές συγκριτικά με την ομάδα control.

Επίσης, βρέθηκε ότι η μετφορμίνη έχει άμεση επίδραση στην ανθρώπινη στεροειδογένεση.

Συγκεκριμένα, στα κύτταρα της θήκης, τα στοιχεία καταδεικνύουν ότι αναστέλλει την έκφραση του ενζύμου CYP17 και STAR, ενώ στα κοκκώδη κύτταρα αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα της LH όπως επίσης και τη δραστηριότητα των ενζύμων STAR, 3-βHSD και CYP11A1. Επίσης, στα κοκκώδη κύτταρα, η μεταφορμίνη αναστέλλει σημαντικά την επαγόμενη από γοναδοτροφίνες (FSH και LH) παραγωγή της προγεστερόνης (P) και της οιστραδιόλης (E2), ενώ στα κύτταρα της θήκης αναστέλλει την παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενιδιόνης), χωρίς να επιδρά στην παραγωγή προγεστερόνης.

Όσον αφορά στην επίδραση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, από μελέτες σε χοίρους, έγινε γνωστό ότι έχει ανασταλτική δράση, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι των κοκκωδών κυττάρων.

Η γκρελίνη ασκεί δράση στην ανθρώπινη στεροειδογένεση με την πρόσδεσή της στον λειτουργικό της υποδοχέα GHSR-1a. Από μελέτες σε χοίρους και πουλερικά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Σε ορισμένες μελέτες, βρέθηκε ότι η γκρελίνη προκαλεί σημαντική αύξηση στην έκκριση της οιστραδιόλης στα ωοθηκικά κύτταρα, ενώ σε μερικές άλλες μείωση. Επίσης, από πειράματα σε ποντίκια βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση στην έκκριση της υποθαλαμικής GnRH καθώς και στη συχνότητα έκκρισης της LH in vivo, ενώ τα δεδομένα για τη δράση της στην FSH παραμένουν αντιφατικά.

Στον άνθρωπο, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση γκρελίνης σε γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, δεν έχει επίδραση στην επαγόμενη από GnRH έκκριση των γοναδοτροφινών FSH και LH, αλλά ούτε και στα επίπεδα της E2, της προγεστερόνης και της προλακτίνης κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Με βάση τα παραπάνω, είναι κατανοητό ότι οι δυο αυτές ουσίες δεν είναι πρωταρχικοί παράγοντες ρύθμισης της ανθρώπινης στεροειδογένεσης και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, αλλά πιθανόν συμμετέχουν σε αυτήν. Η επίλυση αυτού του ερωτήματος θα απαιτήσει αναμφισβήτητα πολυάριθμες πειραματικές προσεγγίσεις, οι οποίες μπορεί στο μέλλον, τελικά να οδηγήσουν σε νέες μεθόδους ωρίμανσης των ωαρίων, λιγότερο δαπανηρές, χρονοβόρες και επιβαρυντικές για τη γυναίκα και το κύημα.

## «EFFECT OF METFORMIN AND GHRELIN ON OOCYTE MATURATION AND OVARIAN STEROIDOGENESIS»

### ABSTRACT

Metformin is a biguanide antidiabetic medication that lowers the levels of glucose (sugar) in blood. Treatment with metformin in women with PCOS, has shown that it may help improve menstrual regularity, increases ovulation, decreases the level of androgens and the risk of miscarriage.

Ghrelin, an acylated 28-amino-acid peptide, which enhances appetite and increases food intake in humans, is primarily secreted from the stomach. There is also evidence that ghrelin is involved in reproductive function.

The aim of this study is to review the effect of these two substances on the oocyte maturation and ovarian steroidogenesis.

The action of metformin on human oocyte maturation remains under investigation. From experiments in bovine oocytes, it was found that metformin arrested oocytes at the GV stage in cumulus-oocyte complexes but not in denuded bovine oocytes. That means that cumulus cells are essential for the effects of metformin on bovine oocyte maturation. Nevertheless, there was no significant difference between treated women with metformin and healthy controls, in the rates of human oocyte maturation, fertilization, cleavage, and clinical pregnancy ( $p > 0.05$ ). A significantly lower miscarriage rate was obtained in the pretreated group than in the control group. The live birth rate per embryo transfer seemed to be higher in the pretreated group than in the control group, but was not statistically significant.

Also, it has been shown that metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis.

Definitely, in thecal cells metformin may inhibit CYP17 and STAR expression, while in granulosa cells, may inhibit LH receptor expression as well as StAR, HSD3- $\beta$  and CYP11A1 activity.

In granulosa cells, metformin consistently inhibited FSH and LH-stimulated production of progesterone (P) and estradiol (E2), while in thecal cells metformin inhibited androstenedione (A) production, without any effect on progesterone.

As far as concerns the effect of ghrelin on oocyte maturation, studies in pigs have revealed that ghrelin inhibits oocyte maturation, an effect that is independent from the existence of granulosa cells.

Ghrelin acts on human steroidogenesis, binding on its receptor, GHS-R (growth hormone secretagogue receptor). The results from studies in pigs and chicken have been contradictory. In certain studies, it was found that ghrelin could cause a significant increase in estradiol secretion in the oocytes, while in others it caused a reduction. Also, from experiments in mice it was found that ghrelin reduces the secretion of GnRH and LH in vivo, while the data about the action of FSH remain contradictory.

In humans, studies have shown that the stimulating effect of GnRH on LH and FSH secretion was unaffected by ghrelin injection. Neither GnRH nor GnRH plus ghrelin administration had any effect on serum E2, progesterone and prolactin values during the normal menstrual cycle.

In conclusion, the present study demonstrated that these two substances may have some effects on oocyte maturation, but the information is limited.

So, further research on the role of these substances on oocyte maturation is needed in order to gain a better understanding of their role. This could lead to new techniques of oocyte maturation, less expensive, time-consuming and less harmful for women and fetus.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR., *Metformin: an update*, Ann Intern Med., 137(1):25-33, Jul 2 (2002)
2. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*, Nature. 402(6762):656-60, Dec 9 (1999).
3. Nikolopoulos D, Kouraklis G., *The role of ghrelin on glucose homeostasis*, Archives Of Hellenic Medicine, 26(1):42-50, (2009)
4. García MC, López M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C. , *Role of ghrelin in reproduction*, Reproduction,133(3):531-40, Mar (2007)
5. Tena-Sempere M., *Ghrelin as a pleotrophic modulator of gonadal function and reproduction.*, Nat Clin Pract Endocrinol Metab., 4(12):666-74, Dec (2008)
6. Furuta M, Funabashi T, Kimura F., *Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats*, Biochem Biophys Res Commun., 288(4):780-5, Nov 9 (2001)
7. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L., *Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats*, Neurosci Lett. 362(2):103-7, May 20 (2004)
8. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. *Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans*, J Clin Endocrinol Metab., 85(12):4908-11, Dec (2000)
9. Michael Kluge, *Evidence of a suppressive effect of ghrelin on FSH secretion in vivo: Comment on the review article “Ghrelin: A metabolic signal affecting the reproductive system”*, Cytokine & Growth Factor Reviews 20 339–340 (2009)

10. Lanfranco F, Bonelli L, Baldi M, Me E, Broglio F, Ghigo E., *Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis*, J Clin Endocrinol Metab, 93(9):3633-9, Sep (2008)
11. Christina I. Messini, Konstantinos Dafopoulos, Nektarios Chalvatzas, Panagiotis Georgoulis, and Ioannis E. Messinis, *Effect of ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle*, Human Reproduction, Vol.24, No.4 pp. 976–981, (2009)
12. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E., *Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone*, J Clin Endocrinol Metab., 86(3):1169-74, Mar (2001)
13. Tena-Sempere M, Aguilar E, Fernandez-Fernandez R, Pinilla L., *Ghrelin inhibits prolactin secretion in prepubertal rats. Neuroendocrinology.*, 79(3):133-41, Mar (2004)
14. Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulis P, Anifandis G, Messinis IE., *Effect of ghrelin and thyrotropin-releasing hormone on prolactin secretion in normal women.* , Horm Metab Res., 42(3):204-8, Mar (2010)
15. Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulis P, Messinis IE., *Growth hormone and prolactin response to ghrelin during the normal menstrual cycle.* Clin Endocrinol (Oxf)., 71(3):383-7, Sep (2009)
16. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N., *Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells.*, J Clin Endocrinol Metab., 88(5):2335-40. May (2003)
17. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T., *Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro.*, Endocrinology, 144(6):2623-33 Jun (2003)

18. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F., *Ghrelin, a novel placental-derived hormone.*, Endocrinology, 142(2):788-94 Feb (**2001**)
19. Cortelazzi D, Cappiello V, Morpurgo PS, Ronzoni S, Nobile De Santis MS, Cetin I, Beck-Peccoz P, Spada A., *Circulating levels of ghrelin in human fetuses.*, Eur J Endocrinol., 149(2):111-6. Aug (**2003**)
20. Halpin DM, Charlton HM, Faddy MJ., *Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice.*, J Reprod Fertil., 78(1):119-25 Sep (**1986**)
21. Ataya K, Tadros M, Ramahi A., *Gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits physiologic ovarian follicular loss in rats.*, Acta Endocrinol (Copenh)., 121(1):55-60 Jul (**1989**)
22. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis P, Zapanti E, Mastorakos G, Antsaklis A., *Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes.*, Hormones (Athens), 4(3):155-60. Jul-Sep (**2005**)
23. Gougeon A: *Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses*, Endocr Rev, 17:121, (**1996**)
24. Hillier SG., *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development.*, Mol Cell Endocrinol., 179(1-2):39-46, Review. Jun 20 (2001)
25. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ., *Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis*, Biol Reprod. 43(4):543-7 Oct (**1990**)
26. Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR., *Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat.* J Cell Biol. 67(3):894-900 Dec (**1975**)
27. Dekel N, Lewysohn O, Ayalon D, Hazum E. *Receptors for gonadotropin releasing hormone are present in rat oocytes*, Endocrinology. 123(2):1205-7, Aug (**1988**)
28. Andersen CY, Westergaard LG, Byskov AG, Erb K., *Reduced in vitro fertilization of human oocytes correlates with raised circulating FSH levels during ovarian stimulation in normogonadotropic women downregulated with GnRH-analogues.*, J Assist Reprod Genet., 14(10):581-8. Nov (**1997**)

29. Byskov AG, Yding Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. *Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH.*, Mol Reprod Dev.,46(3):296-305 Mar (**1997**)
30. Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T., *Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes.*, Biol Reprod., 68(4):1142-9 Apr (**2003**)
31. Cha KY, Chian RC., *Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use.* Hum Reprod Update., 4(2):103-20. Mar-Apr (**1998**)
32. Smith SD, Mikkelsen A, Lindenberg S., *Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours*, Fertil Steril. 73(3):541-4 Mar (**2000**)
33. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM., *Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture*, Hum Reprod. 12(5):1032-6 May (**1997**)
34. Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RM., *Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation*, Hum Reprod. 14(10):2519-24 Oct (**1999**)
35. Eppig JJ, O'Brien MJ., *Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles*, Biol Reprod. 54(1):197-207 Jan (**1996**)
36. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandarakis E, Economou FN., *Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome*, Eur J Endocrinol. 162(2):193-212 Feb (**2010**)
37. Stith BJ, Goalstone ML, Espinoza R, Mossel C, Roberts D, Wiernsperger N., *The antidiabetic drug metformin elevates receptor tyrosine kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in Xenopus oocytes*, Endocrinology, 137(7):2990-9 Jul (**1996**)
38. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB., *The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice*, Mol Hum Reprod., 12(8):475-81 Aug (**2006**)
39. Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H., *Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis*, Fertil Steril., 79(4):956-62 Apr (**2003**)

40. Lee MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS., *The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos*, Biol Reprod., 73(6):1264-8 Dec (2005)
41. Hong SG, Jang G, Oh HJ, Koo OJ, Park JE, Park HJ, Kang SK, Lee BC., *The effects of brain-derived neurotrophic factor and metformin on in vitro developmental competence of bovine oocytes*, Zygote, 17(3):187-93 Aug (2009)
42. Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J., *Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation*, Biol Reprod., 77(3):452-65 Sep (2007)
43. Chen J, Hudson E, Chi MM, Chang AS, Moley KH, Hardie DG, Downs SM., *AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro*, Dev Biol.;291(2):227-38 Mar 15 (2006)
44. Eng GS, Sheridan RA, Wyman A, Chi MM, Bibee KP, Jungheim ES, Moley KH., *AMP kinase activation increases glucose uptake, decreases apoptosis, and improves pregnancy outcome in embryos exposed to high IGF-I concentrations*, Diabetes, 56(9):2228-34, Sep (2007)
45. Zhao JZ, Lin JJ, Yang HY, Zhang W, Huang XF, Huang YP., *Effects of oral contraceptives and metformin on the outcome of in vitro maturation in infertile women with polycystic ovary syndrome*, J Womens Health (Larchmt), 19(2):261-5. Feb (2010)
46. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH., *Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility*, Cochrane Database Syst Rev. (2010) Jan 20;(1):CD003053.
47. Attia GR, Rainey WE, Carr BR., *Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells*, Fertil Steril.,76(3):517-24 Sep (2001)
48. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C., *Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary*, Endocrinology, 144(4):1594-602 Apr (2003)

49. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M., *Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary*, J Clin Endocrinol Metab. 88(2):879-87 Feb (2003)
50. Barreiro ML, Tena-Sempere M., *Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility*, Mol Cell Endocrinol., 226(1-2):1-9, Oct 29 (2004)
51. Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, Vicennati V, Manicardi E, Carcello A, Cacciari M, De Iasio R, Pasquali R., *Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome*, J Endocrinol Invest., 26(7):629-34 Jul (2003)
52. Schöfl C, Horn R, Schill T, Schlösser HW, Müller MJ, Brabant G., *Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome*, J Clin Endocrinol Metab., 87(10):4607-10. Oct (2002)
53. Orio F Jr, Lucidi P, Palomba S, Tauchmanova L, Cascella T, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi G, De Feo P., *Circulating ghrelin concentrations in the polycystic ovary syndrome*, J Clin Endocrinol Metab. 88(2):942-5. Feb (2003)
54. Waśko R, Komarowska H, Warenik-Szymankiewicz A, Sowiński J., *Elevated ghrelin plasma levels in patients with polycystic ovary syndrome*, Horm Metab Res., 36(3):170-3 Mar (2004)
55. Gualillo O, Lago F, Gómez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C., *Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action*, FEBS Lett. 552(2-3):105-9. Review. Sep 25 (2003)
56. Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, Gualillo O, Muccioli G., *Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system*, Cytokine Growth Factor Rev., 20(2):137-52., Apr (2009)
57. Rak A, Gregoraszczuk EL., *Modulatory effect of ghrelin in prepubertal porcine ovarian follicles*, J Physiol Pharmacol, 59(4):781-93, Dec (2008)
58. Rak A, Szczepankiewicz D, Gregoraszczuk EL., *Expression of ghrelin receptor, GHSR-1a, and its functional role in the porcine ovarian follicles*, Growth Horm IGF Res., 19(1):68-76. Feb (2009)

59. Suzuki H, Sasaki Y, Shimizu M, Matsuzaki M, Hashizume T, Kuwayama H., *Ghrelin and Leptin Did Not Improve Meiotic Maturation of Porcine Oocytes Cultured In Vitro*, Reprod Domest Anim. Mar 28 (2009)
60. Dong XY, Xu J, Tang SQ, Li HY, Jiang QY, Zou XT., *Ghrelin and its biological effects on pigs*, Peptides, 30(6):1203-11. Jun (2009)
61. Kluge M, Schüssler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A., *Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans*, J Clin Endocrinol Metab., 92(8):3202-5, Aug (2007)
62. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L., *Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies*, Neuroendocrinology.82(5-6):245-55 (2005)
63. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Aguilar E, Pinilla L., *Direct stimulatory effect of ghrelin on pituitary release of LH through a nitric oxide-dependent mechanism that is modulated by estrogen*, Reproduction, 133(6):1223-32, Jun (2007)
64. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi S, Ferrari B, Ghizzoni L. *Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells*, J Clin Endocrinol Metab. 93(4):1476-81, Apr (2008)