



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**"ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΥΛΛΕΡΙΑΝΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ (ΑΜΗ) ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 15 (BMP-15) ΣΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ ΑΠΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ Smad 5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ"**

υπό

**ΕΡΜΙΟΝΗΣ-ΔΗΜΗΤΡΑΣ ΙΩΑΝ. ΠΡΑΠΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

**Λάρισα, 2016**

© 2016 Ερμιόνη - Δήμητρα Πράπα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα της Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα ( Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Μεσσήνης Ιωάννης**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας-(Επιβλέπων)
2. **Νταφόπουλος Κωνσταντίνος**, Αν. Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Γεωργούλιας Παναγιώτης**, Αν. Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής συμπληρούμενα από τα παρακάτω μέλη ΔΕΠ.

4. **Τσέζου Ασπασία**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. **Δαπόντε Αλέξανδρο**, Αν. Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. **Μεσσήνη Χριστίνα**, Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. **Ανυφαντή Γεώργιο**, Λέκτορα Εμβρυολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή μου κ. Ιωάννη Μεσσήνη, Διευθυντή της Κλινικής κατά την πραγματοποίηση της παρούσης διατριβής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Άννα Βασιλάκη και τη διδακτορική φοιτήτρια Ελένη Κατσιάνη για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γυναικολογίας κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για την ουσιαστική συμβολή του, βοήθεια του και υποστήριξη του σε όλα τα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής. Επιπρόσθετα, ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής κ. Γεωργούλια Παναγιώτη, καθώς και όλη την ομάδα του εργαστηρίου του, για την ευγενική και ποιοτική συνεργασία μας κατά την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη της ομάδας στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και ιδιαίτερα τον Λέκτορα Εμβρυολογίας κ. Γεώργιο Ανυφαντή και τη μαία κ. Αναστασία Τζαβέλλα, για τη βοήθεια που μου παρείχαν στη συλλογή του πειραματικού υλικού.

*Στους αγαπημένους μου γονείς*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1 ΓΕΝΙΚΑ	15
1.1 Μοντέλο δύο κυττάρων δύο γοναδοτροφινών	18
1.2 Βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών $E_2$ και $P_4$	19
1.3 Συμβολή τοπικών παραγόντων στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου	22
1.3.1 Οικογένεια παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης $\beta$	24
1.3.1.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad	28
2 AMH	32
2.1 Δομή της AMH	32
2.2 Τόπος έκφρασης της AMH	32
2.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι της AMH	34
2.4 Δράση της AMH	35
3 BMP-15	37
3.1 Δομή της BMP-15	37
3.2 Τόπος έκφρασης της BMP-15	37
3.3 Δράση της BMP-15	38
4 Αλληλεπίδραση μεταξύ της AMH, της BMP-15 και της FSH στη στεροειδογένεση στην ωοθήκη	41
4.1 Σημασία της ρύθμισης των στεροειδών ορμονών $E_2$ και $P_4$	43
4.2 Δομή και δράση της E	43
4.3 Μηχανισμός δράσης της $E_2$	47
4.4 Δομή και δράση της $P_4$	48
4.5 Μηχανισμός δράσης της $P_4$	49
5 Αναπάντητα Ερωτήματα	50

6	Σκοπός	51
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
7.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
7.1.	Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων	55
7.2.	Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων	56
7.3.	Ανοσοϊστοχημεία	59
7.4.	Μικροσκοπία ανάλυσης εικόνων	60
7.5.	Μέτρηση των στεροειδών ορμονών	60
7.6.	Στατιστική Ανάλυση	61
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
8.1.	Επίδραση της FSH, της AMH και της BMP-15 στη βασική παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα	62
8.1.1.	FSH	62
8.1.2.	AMH	64
8.1.3.	BMP-15	66
8.2.	Επίδραση της AMH και της BMP-15 στην από την FSH-επαγόμενη παραγωγή E <sub>2</sub> και P <sub>4</sub> σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα	69
8.3.	Σηματοδοτικά μονοπάτια στην επίδραση της AMH και της BMP-15 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων	73
9.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
10.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
11.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	86
12.	SUMMARY	88
13.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ-ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	90
14.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ωοθυλάκιο αποτελεί τη λειτουργική μονάδα της ωοθήκης και η ενδοκρινική επικοινωνία αυτού με τις υποθαλαμικές ορμόνες μέσω του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ωοθήκες διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση, ωρίμανση και στεροειδογενετική λειτουργία αυτού. Ωστόσο, τοπικοί αναπτυξιακοί παράγοντες φαίνεται να εμφανίζουν έναν εξίσου σημαντικό και βοηθητικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές. Μεταξύ αυτών, η αντιμυλλέρια ορμόνη (AMH) και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη15 (BMP-15), μέλη και οι δυο της υπερ-οικογένειας των TGF-β παραγόντων, ρυθμίζουν μέσω της αυτοκρινικής/παρακρινικής δράσης τους την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ωρίμανση του ωαρίου.

Βασιζόμενοι στην επιστημονική βιβλιογραφία, είναι ξεκάθαρο ότι τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται πολλές μελέτες στην προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου δράσης των παραγόντων αυτών. Η AMH, μία γλυκοπρωτεΐνη που προέρχεται από τα κοκκώδη κύτταρα των προκοιλιακών και μικρών κοιλιακών ωοθυλακίων, μέσω του υποδοχέα της δρα στα ίδια τα κοκκώδη κύτταρα εξασθενώντας την ευαισθησία αυτών στην ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη FSH, λειτουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση των αποθηκών πρωτογενών ωοθυλακίων στη γυναίκα. Αποτελεί τον καλύτερο δείκτη ωοθηκικής επάρκειας και η δράση της εμπλέκεται επίσης στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Από την άλλη πλευρά, η BMP-15 είναι μια πρωτεΐνη, που προέρχεται αποκλειστικά από το ωάριο και τα υπάρχοντα δεδομένα στην επιστημονική βιβλιογραφία προτείνουν το ρόλο της στη φυσιολογία της

ωοθυλακιογένεσης και στη διατήρηση της γονιμότητας στα θήλα. Μεταλλάξεις του γονιδίου της συνδέονται επίσης με το PCOS και με μειωμένη γονιμότητα.

Ωστόσο, πέρα από τις δράσεις αυτές, το ενδιαφέρον έχει τελευταία στραφεί και στην εμπλοκή της AMH και της BMP-15 σε μία σημαντική λειτουργία της ωοθήκης, τη στεροειδογένεση. Υπάρχουν ορισμέα δεδομένα στην επιστημονική βιβλιογραφία γύρω από το θέμα αυτό, αλλά πολλά αναπάντητα ερωτήματα εξακολουθούν να παραμένουν. Η εργασία αυτή είναι μία προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου δράσης των παραγόντων αυτών στη βασική παραγωγή οιστραδιόλης ( $E_2$ ) και προγεστερόνης ( $P_4$ ) από πρωτογενή ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα καθώς επίσης και στην επαγόμενη από την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) έκκριση των στεροειδών ορμονών. Τα εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια αποτέλεσαν επίσης αντικείμενο μελέτης.





## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

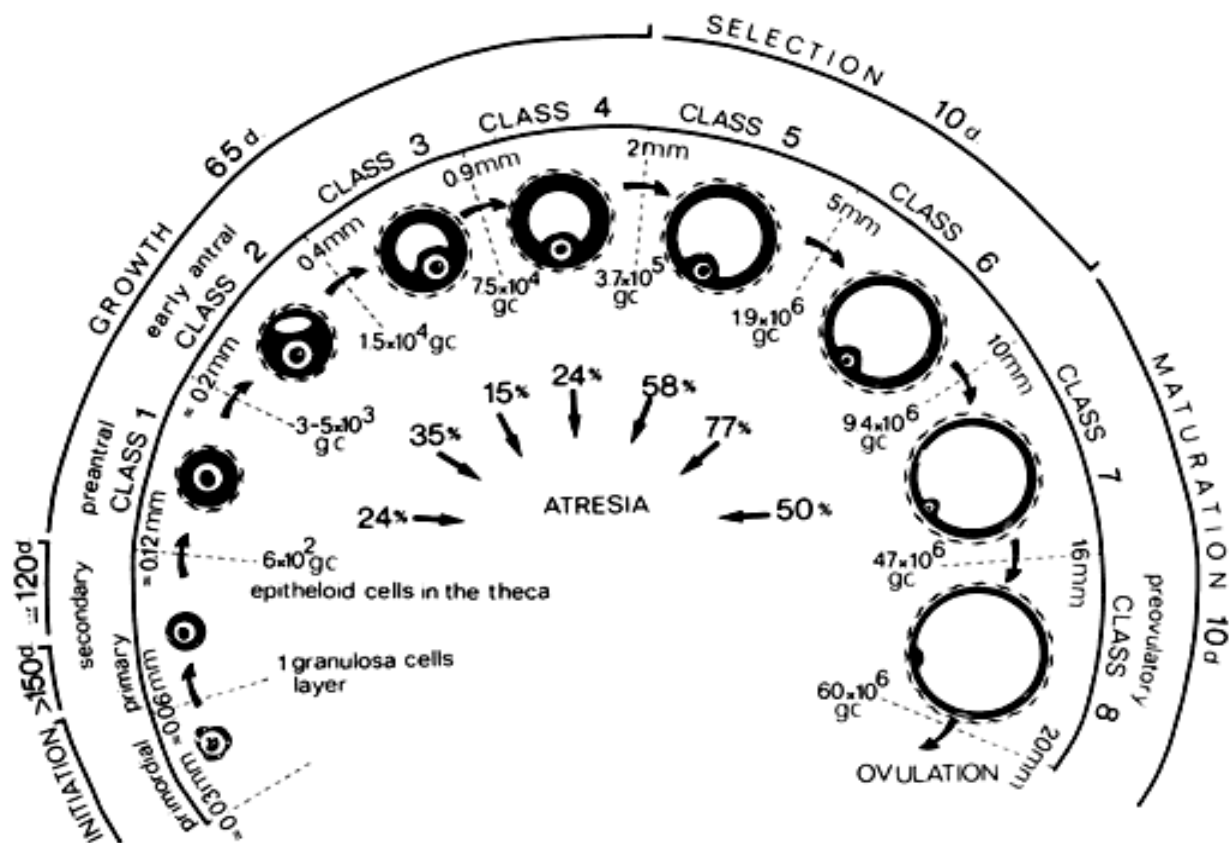


## 1.ΓΕΝΙΚΑ

Το ωοθυλάκιο αποτελεί τη λειτουργική μονάδα της ωοθήκης. Υπάρχουν διάφορες εξελικτικές μορφές ωοθυλακίων αλλά η αρχική μορφή, από την οποία προκύπτουν οι υπόλοιπες, ονομάζεται αρχέγονο. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια αποτελούν τις αρχικές αποθήκες γενετικών κυττάρων στη γυναίκα και σχηματίζονται κατά την εμβρυική ζωή μετά από τη μετανάστευση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων στη γεννητική ταινία, όπου αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας τα ωογόνια, τα οποία με τη σειρά τους αυξάνουν σε μέγεθος, σχηματίζοντας τα αρχέγονα ωοθυλάκια (1).

Τη στιγμή της γέννησης, υπάρχουν στην ωοθήκη πολλά ανώριμα αρχέγονα ωοθυλάκια, καθένα από τα οποία εμπεριέχει ένα ανώριμο ωάριο, το οποίο έχει σταματήσει στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Επόμενο στάδιο είναι το πρωτογενές, το οποίο με τη σειρά του εξελίσσεται σε δευτερογενές. Από αυτήν τη φάση και μετά, τα δευτερογενή ωοθυλάκια ταξινομούνται σε οκτώ κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος τους και την παρουσία ή την απουσία μιας κοιλότητας γεμάτης με υγρό ή διαφορετικά σε προκοιλικά και κοιλικά (Σχήμα 1). Πιο αναλυτικά, ως κατηγορία 1 ορίζουμε το στάδιο όπου το ωοθυλάκιο έχει μέγεθος 0,12 mm απουσία κοιλότητας και ως κατηγορία 8 ορίζουμε το στάδιο όπου το δευτερογενές ωοθυλάκιο έχει πλέον την μορφή ενός ώριμου ωοθυλακίου μεγέθους 17-20 mm (2, 3). Στο στάδιο αυτό, το ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα σωματικών κυττάρων, τα οποία ονομάζονται κύτταρα θήκης, ένα εσωτερικό στρώμα σωματικών κυττάρων που ονομάζονται κοκκώδη κύτταρα και ένα ώριμο ωάριο περιβαλλόμενο από διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία ονομάζονται κύτταρα ωοφόρου δίσκου.

Στο στάδιο αυτό, σχηματίζεται η κοιλότητα, γεμάτη με το λεγόμενο ωθυλακικό υγρό (4).



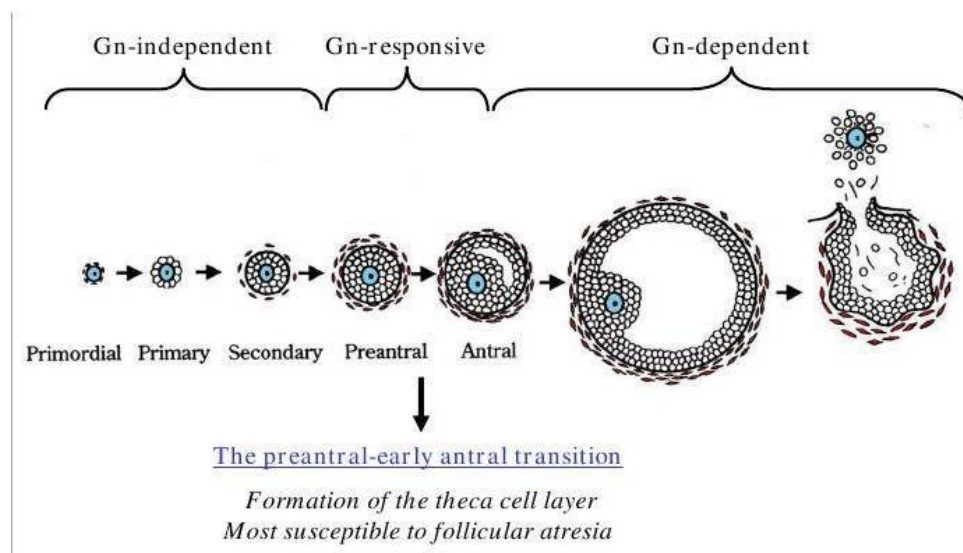
**Σχήμα 1:** Κατηγορίες ωθυλακίων κατά Gougeon (1986).

Τελικό στάδιο στην εξέλιξη του ώριμου δευτερογενούς ωθυλακίου είναι η ωθυλακιόρρηξη. Η διαδικασία όμως της ωθυλακιογένεσης, δηλαδή της ωρίμανσης και ανάπτυξης του ωθυλακίου περνώντας από τα στάδια που προαναφέρθηκαν, είναι



μακρά και απαιτείται σχεδόν ένα έτος για ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο να αναπτυχθεί και να εξελιχθεί μέχρι το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας. Αυτή μπορεί να διαιρεθεί στις τρεις ακόλουθες φάσεις σύμφωνα με το εξελικτικό στάδιο και την εξάρτηση από τις γοναδοτροφίνες (4):

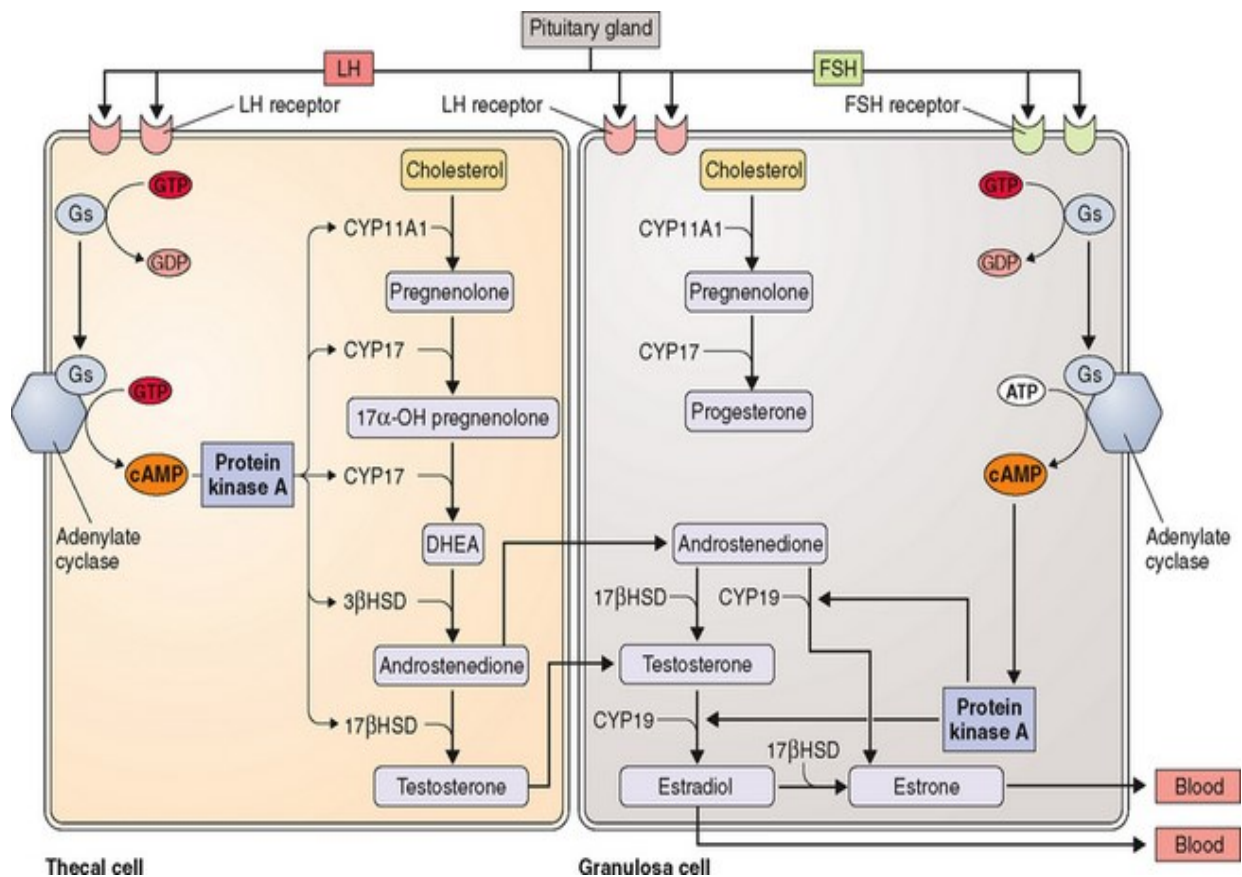
- 1) ανεξάρτητη από γοναδοτροφίνες φάση (εξέλιξη ενός ωοθυλακίου από αρχέγονο σε πρωτογενές και μετά σε δευτερογενές),
- 2) ευαίσθητη στις γοναδοτροφίνες φάση (εξέλιξη από το προκοιλοτικό σε πρώιμο κοιλοτικό στάδιο) και
- 3) εξαρτώμενη από γοναδοτροφίνες φάση (εξέλιξη πέρα από το πρώιμο κοιλοτικό στάδιο, που περιλαμβάνει στρατολόγηση, επιλογή και ωοθυλακιορρηξία) (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Φάσεις της ωοθυλακιογένεσης.

### **1.1 Μοντέλο δράσης δυο κυττάρων-δύο γοναδοτροφινών**

Κατά την τελευταία φάση ωοθυλακικής ωρίμανσης, παρατηρείται σημαντική αύξηση του όγκου του ωοθυλακικού υγρού και του αριθμού των κοκκωδών κυττάρων. Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στο στάδιο αυτό. Μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη, οι γοναδοτροφίνες συντονίζουν την ενδοκρινική, παρακρινική και αυτοκρινική δράση της 17β-οιστραδιόλης ( $E_2$ ) και της προγεστερόνης ( $P_4$ ), οι οποίες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ωρίμανση του ωοθυλακίου καθώς επίσης και στον σχηματισμό και την εκφύλιση του ωχρού σωματίου (5,6). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου και τα κοκκώδη κύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο, ανταποκρίνονται διαφορετικά στην FSH και την LH της υποφύσεως, αναπτύσσοντας ξεχωριστές ενζυμικές δράσεις (7). Οι δύο γοναδοτροφίνες συνεργάζονται στα πλαίσια του μοντέλου των δύο κυττάρων-δύο γοναδοτροφινών, με την LH να δρα στα κύτταρα της θήκης με σκοπό την παραγωγή ανδρογόνων, κυρίως ανδροστενδιόνης ( $A_4$ ), τα οποία διαχέονται προς τα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας, όπου υπό την επίδραση της FSH αρωματοποιούνται σε οιστρογόνα (7) (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3:** Μοντέλο δράσης δύο κυττάρων δύο γοναδοτροφινών. Τα ανδρογόνα παράγονται υπό την επίδραση της LH στα κύτταρα της θήκης και στη συνέχεια μεταφέρονται στα κοκκώδη κύτταρα όπου υπό την δράση της FSH μετατρέπονται σε οιστογόνα.

## 1.2 Βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών $E_2$ και $P_4$ .

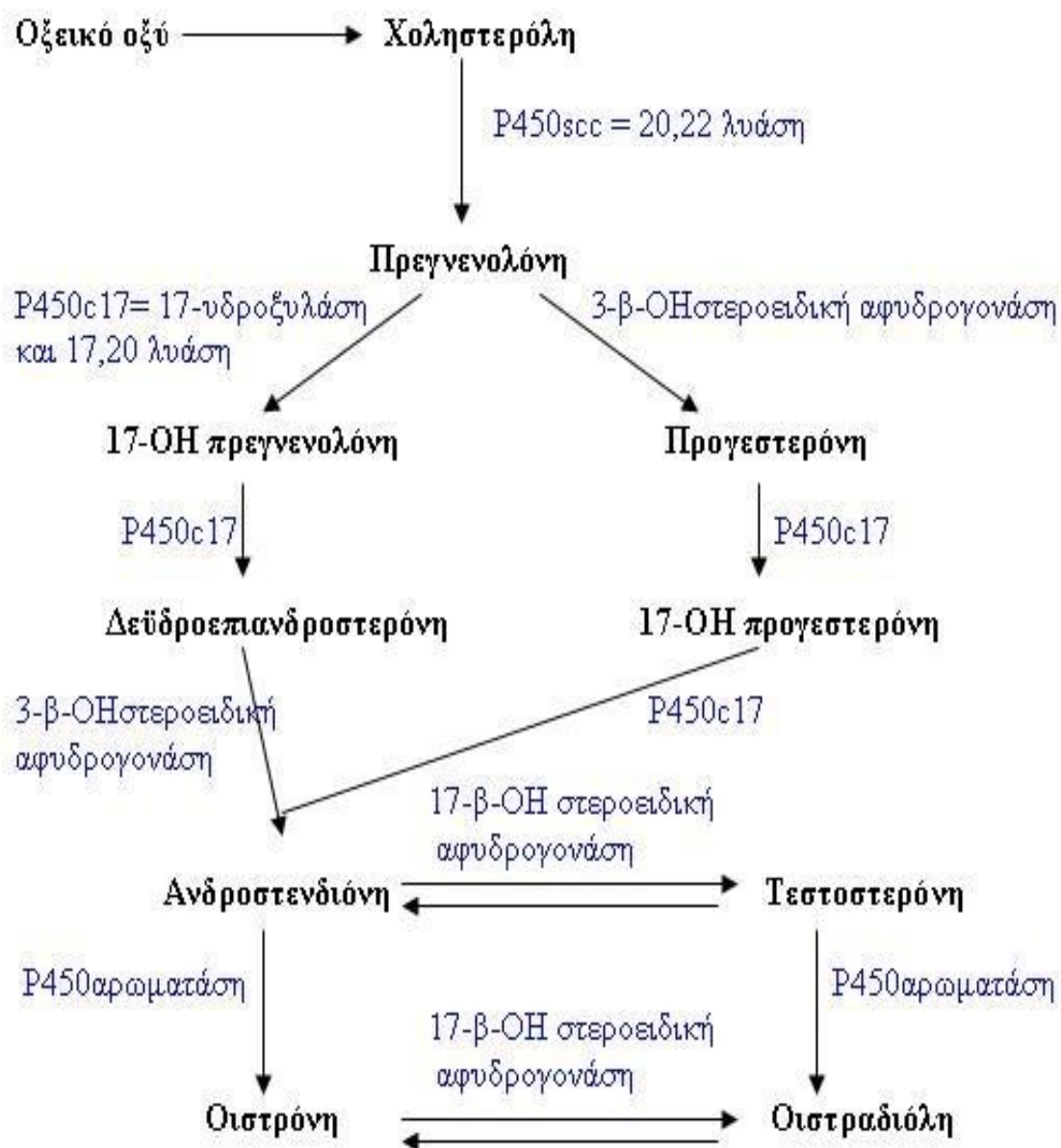
Κυρίαρχο ρόλο στη στεροειδογένεση και συγκεκριμένα στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων διαδραματίζει η χοληστερόλη, την οποία οι ωοθήκες προσλαμβάνουν από τις LDL λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Η είσοδος της χοληστερόλης στην πορεία της στεροειδογένεσης πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια και βασικό κομμάτι της πορείας

αυτής αποτελεί η πρωτεΐνη StAR, μεσολαβώντας στη μεταφορά της χοληστερόλης στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και της μετέπειτα ενζυματικής μετατροπής της πλευρικής αλυσίδας αυτής προς παραγωγή πρόδρομων μορίων της  $E_2$  και της  $P_4$  (8, 9) (Σχήμα 4).

Συγκεκριμένα, το ένζυμο P-450<sub>scc</sub> (δεσμολάση της χοληστερόλης), που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11A, καταλύει τη διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης και σχηματίζεται πρεγνενολόνη. Η τελευταία μετατρέπεται σε προγεστερόνη με τη δράση του ενζύμου 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (3β-HSD). Η πρεγνενολόνη και η προγεστερόνη με το ένζυμο P-450<sub>c17</sub> (17α-υδροξυλάση), που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP17, μετατρέπονται σε 17α-υδροξυλιωμένα παράγωγα και αυτά με το ίδιο ένζυμο, που έχει δραστηριότητα και 17,20-λυάσης, σε δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και Δ<sub>4</sub>-ανδοστενδιόνη αντίστοιχα.

Τόσο η 17α-υδροξυπρεγνενολόνη όσο και η DHEA μπορούν με τη δράση του ενζύμου 3β-HSD να μετατραπούν σε 17α-υδροξυπρογεστερόνη και Δ<sub>4</sub>-ανδοστενδιόνη

αντίστοιχα. Η Δ<sub>4</sub>-ανδοστενδιόνη με τη δράση του ενζύμου 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (17β-HSD) μετατρέπεται σε τεστοστερόνη.



**Σχήμα 4.** Βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών.

Τελικά τα δύο αυτά οιστρογόνα αρωματοποιούνται με τη σειρά τους σε οιστογόνα με την δράση του συμπλέγματος αρωματάση P-450(P450<sub>arom</sub>) (10, 11) (Σχήμα 4).

Η FSH αυξάνει την έκκριση και την ενεργότητα της P450<sub>arom</sub> στα κοκκώδη κύτταρα κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη παραγωγή E<sub>2</sub>. Μετά το κύμα της LH, η ποσότητα του ενζύμου περιορίζεται καθώς τα κοκκώδη κύτταρα ωχρινοποιούνται και αρχίζουν να παράγουν P<sub>4</sub> με τη βοήθεια του ενζύμου P450<sub>scc</sub> (6). Επιπλέον δράσεις της FSH είναι ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων και η επαγωγή του σχηματισμού των υποδοχέων της σε αυτά, ενώ η LH στο στάδιο αυτό, πέρα από την επαγωγή της παραγωγής ενζύμων της στεροειδογένεσης στα κύτταρα της έσω θήκης (17α υδροξυλάσης και 17,20 δεσμολάσης), συμβάλλει και στην ωρίμανση του ωαρίου και την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.

### ***1.3 Συμβολή τοπικών παραγόντων στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου***

Παρά το γεγονός ότι οι γοναδοτροφίνες, αποτελούν τον κύριο παράγοντα που ελέγχει την ωοθυλακιογένεση και την παραγωγή στεροειδών ορμόνων από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, εντούτοις η επίδραση των γοναδοτροφινών καθώς επίσης και η αρχική στρατολόγηση, ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση του ωοθυλακίου, ελέγχεται και από ενδογενείς αυξητικούς παράγοντες της ωοθήκης (2, 10).

Αναλυτικότερα, καθώς το ωοθυλάκιο αναπτύσσεται, τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε δύο ανατομικά και λειτουργικά διαφορετικές υποκατηγορίες : α) τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus granulose cells), τα οποία είναι σε άμεση επαφή με το ωάριο και β) τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα (mural granulosa cells), τα οποία βρίσκονται περιφερειακά του τείχους του ωοθυλακίου σχηματίζοντας ένα

διαστρωματικό επιθήλιο με τη βασική στοιβάδα του ωοθυλακίου. Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ειδικές δομές που διαπερνούν τη διάφανη ζώνη του ωαρίου σχηματίζοντας ένα εξειδικευμένο σύμπλεγμα επικοινωνίας μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων, το αναφερόμενο στη βιβλιογραφία ως cumulus-oocyte complex (COC). Οι διάυλοι (gap junctions) που σχηματίζονται μεταξύ του ωαρίου και των κοκκωδών κυττάρων, συμβάλουν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων αυτών, μέσω της γρήγορης μεταφοράς μορίων μικρού μοριακού βάρους, ενώ μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους μεταφέρονται μέσω ενεργοποίησης ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχέων. Στα μόρια που μπορούν να μεταφερθούν μέσω των διάυλων επικοινωνίας ανήκουν διάφορα ιόντα, αμινοξέα και μεταβολίτες που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωαρίου καθώς επίσης και ρυθμιστικά μόρια υπεύθυνα για τον έλεγχο της διαφοροποίησης του ωαρίου. Αυτό το μοντέλο επικοινωνίας στην ωοθήκη είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τη γονιμότητα, και θεωρείται ότι διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην τοπική μεταφορά ενδοκρινικών σημάτων στο ωάριο μέσω των κοκκωδών κυττάρων (12).

Ένας δεύτερος τρόπος επικοινωνίας μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων είναι μέσω παρακρινικής σηματοδότησης. Ενώ ιστορικά το ωάριο θεωρούταν να εμφανίζει ένα μη ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της ωοθυλακιόγνεσης, αφήνοντας ως βασικούς ρυθμιστές αυτής τις ενδοκρινείς ορμόνες και τους αυξητικούς παράγοντες των σωματικών κυττάρων, τα τελευταία 10-15 χρόνια έχει γίνει σαφές, πως και το ίδιο το ωάριο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ωοθυλακιόγνεσης μέσω αμφίδρομης επικοινωνίας μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων (12).

Το ενδιαφέρον λοιπόν έχει εστιάσει στην ταυτοποίηση της δράσης μορίων που εκκρίνονται από το ωάριο, με την οικογένεια των παραγόντων TGF-β να συγκεντρώνει την πλειοψηφία των μορίων αυτών, όπως είναι ο BMP-15, ο BMP-6 και η ακτιβίνη. Η διευκρίνιση του τρόπου δράσης των μορίων αυτών είναι πολύ σημαντική, όχι μόνο γιατί εμπλέκονται στα διάφορα στάδια της ωοθυλακιογένεσης αλλά και γιατί, όπως φαίνεται από πρώτες μελέτες, ο τρόπος δράσης τους επηρεάζει και άλλες σημαντικές λειτουργίες του ωοθυλακίου και κατ'επέκταση της ωοθήκης, όπως είναι η παραγωγή στεροειδών ορμονών, η ποιότητα παραγωγής και ωρίμανσης των ωαρίων και συνολικά η γονιμότητα των θηλέων ατόμων.

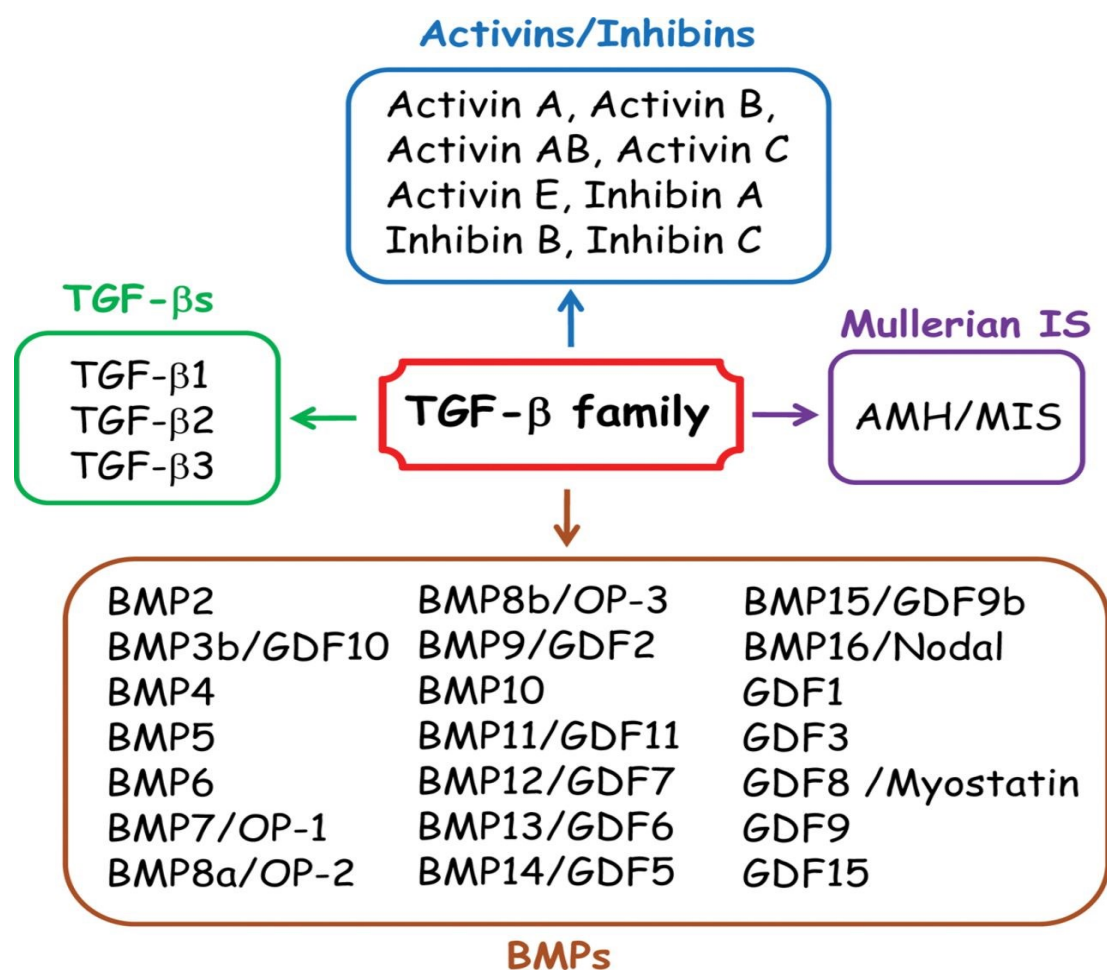
### **1.3.1 Οικογένεια παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης β (TGF-β)**

Στους παραπάνω παράγοντες, εντάσσεται και η υπερ-οικογένεια των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης β (TGF-β), οι οποίοι ασκούν αυτοκρινικές αλλά και παρακρινικές δράσεις μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων της θήκης καθώς επίσης και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωαρίου (13). Πρόκειται για μια πολύ μεγάλη ομάδα παραγόντων, οι περισσότεροι από τους οποίους, εκφράζουν την βιολογική τους δράση σχηματίζοντας ετερομερικά σύμπλοκα με διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι στο σύνολο τους αναφέρονται ως υποδοχείς TGF-β και οι οποίοι εμφανίζουν ενδογενή δραστηριότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης- Ser/Thr (Σχήμα 5).

Πιο αναλυτικά, οι υποδοχείς έχουν μία εξωκυτταρική και μία ενδοκυτταρική περιοχή, υπεύθυνη για την πρόσδεση του μορίου-προσδέτη και τη φωσφορυλίωση του



υποδοχέα αντίστοιχα. Η παρουσία ενός μορίου της υπερ-οικογένειας TGF-β στον εξωκυττάριο χώρο και η επακόλουθη σύνδεση αυτού στον υποδοχέα προκαλεί την δημιουργία ενός ετερο-τετραμερούς συμπλόκου, που αποτελείται από δύο αντίγραφα δύο διαφορετικών υπομονάδων τύπου I και τύπου II. Τόσο η υπομονάδα τύπου I όσο και η υπομονάδα τύπου II εμφανίζουν δράση κινάσης, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από το ATP σε κατάλοιπα Ser/Thr (14).

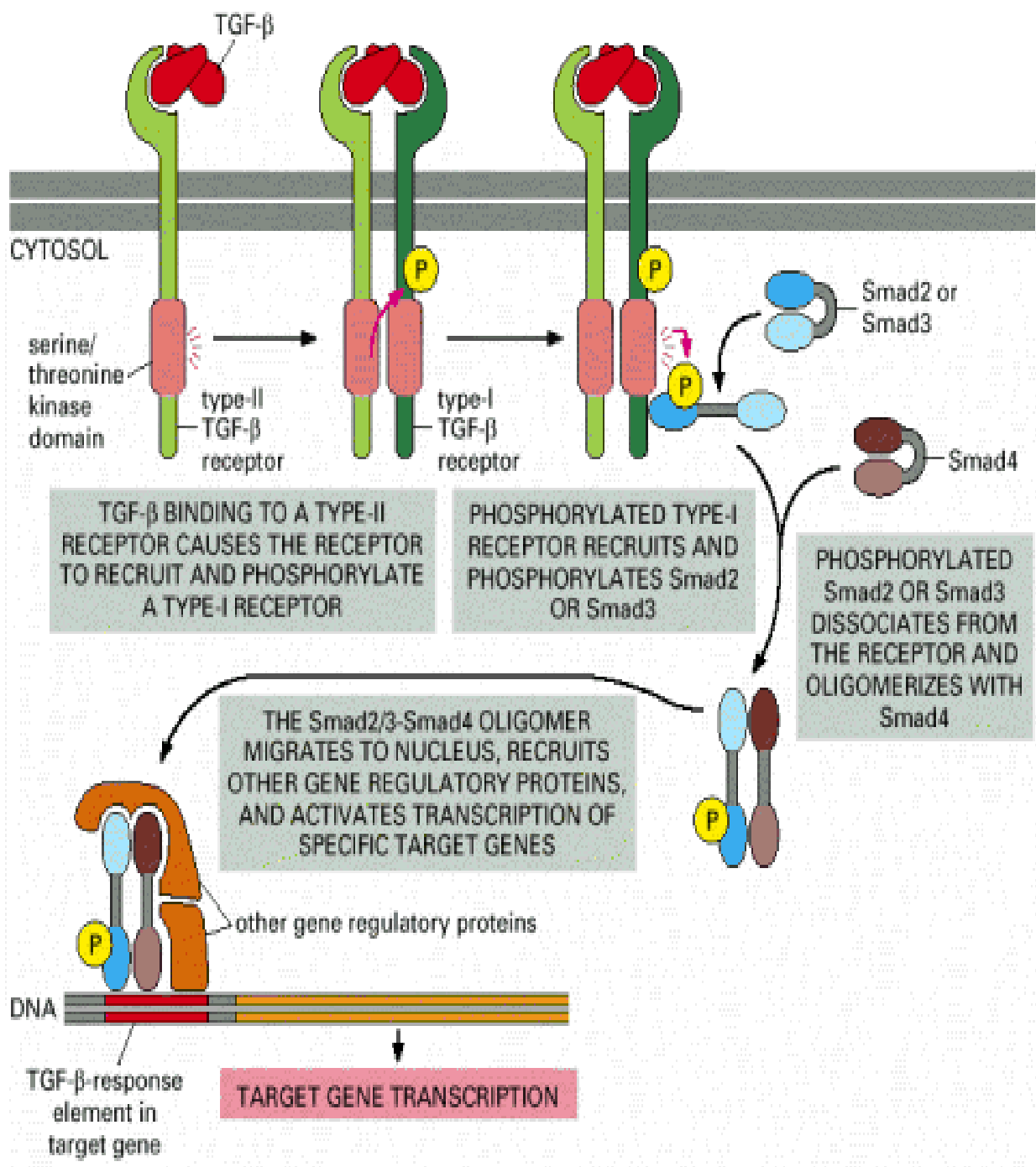


**Σχήμα 5:** Η υπερ-οικογένεια των TGF-β παραγόντων.

Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός ενεργοποίησης είναι ο ακόλουθος:

Το μόριο προσδέτης της οικογένειας TGF- $\beta$  αρχικά προσδένεται στον υποδοχέα τύπου II, και σε αυτή τη μορφή αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα τύπου I. Με τη σειρά του ο υποδοχέας τύπου I συνδέεται στο σύμπλοκο προσδέτης-υποδοχέας τύπου II, δημιουργώντας ένα ετερο- ολιγομερές, όπου ο υποδοχέας τύπου II έχοντας δράση κινάσης Ser/Thr φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I γίνεται σε μία περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (Gly/Ser), γνωστή ως GSbox. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για σηματοδοτικά μόρια τελεστές (15).

Αυτός ο τύπος υποδοχέα επομένως, χρησιμοποιεί δυο υπομονάδες για τη μεταγωγή του σήματος: την υπομονάδα τύπου II, υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέτη, και την υπομονάδα τύπου I, η οποία καθορίζει την εξειδίκευση για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος. Στο κυτταροπλασματικό τμήμα του ενεργοποιημένου πλέον υποδοχέα, λαμβάνουν χώρα πολλαπλές φωσφορυλιώσεις τόσο σε κατάλοιπα Ser/Thr όσο και Tyr, δημιουργώντας θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνών Smad. Τελικός στόχος είναι η μεταφορά του μηνύματος στον πυρήνα και η στοχευόμενη ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων (15) (Σχήμα 6).



**Σχήμα 6.** Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου ενεργοποίησης και δράσης των TGF-β υποδοχέων

### 1.3.1.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad

Οι Smad είναι πρωτεΐνες, που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Φέρουν δηλαδή το χαρακτηριστικό της αλληλεπίδρασης τόσο με το DNA, σε συγκεκριμένες θέσεις, όσο και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό την συντονισμένη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (16).

Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες :

1. **R- Smads** (receptor activated Smad), που ενεργοποιούνται από υποδοχείς των TGF-β παραγόντων. Για τον TGF-β αντιστοιχούν οι Smad2 και Smad3), ενώ για τους παράγοντες BMP και την αντιμύλλερια ορμόνη αντιστοιχούν οι **Smad1, Smad5** και **Smad8**,
2. **Co-Smads** (common mediator Smad) ή κοινός μεσολαβητής. Εδώ ανήκει ο παράγοντας Smad4 και είναι εκείνος που συνοδεύει τους R-Smads στον πυρήνα, και
3. **I-Smads** (inhibitory Smads): είναι οι ανασταλτικοί Smad, σταματούν την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος και είναι οι Smad6 και Smad7.

Αποτελούνται, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, από τρεις διαφορετικές περιοχές:

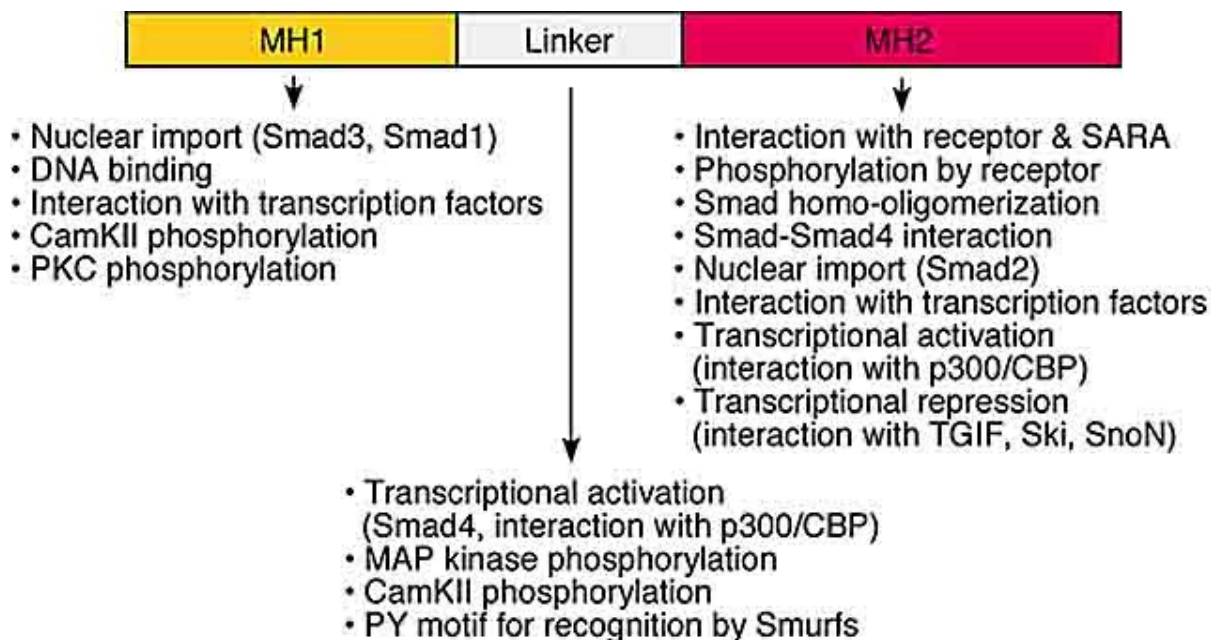
- MH1 N-Mad homology1 [?](#)
- Linker, συνδετική περιοχή [?](#)
- MH2 C-Mad homology2

Κάθε περιοχή εμφανίζει και το δικό της διαφορετικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή MH1 είναι υπεύθυνη για:

1. Αυτοαναστολή των πρωτεϊνών Smad: Απουσία προσδέτη, η περιοχή MH1 αλληλεπιδρά με την περιοχή MH2 αναστέλλοντας τη δράση των Smad.
2. Ικανότητα εισαγωγής στον πυρήνα: Μία ειδική αλληλουχία στην MH1 περιοχή, η οποία ονομάζεται NLS μοτίβο (nuclear localization signal), εξασφαλίζει την ικανότητα εισαγωγής των Smad στον πυρήνα, προκειμένου να προσεγγίσουν το DNA και να λειτουργήσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες.
3. Ικανότητα δέσμευσης με το DNA: Η περιοχή MH1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, προκειμένου να γίνει η έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων στόχων.

Η συνδετική περιοχή (linker), η οποία συνδέει τις περιοχές MH1 και MH2, είναι λιγότερο συντηρημένη, περιέχει σημαντικά ρυθμιστικά μοτίβα πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης και περιλαμβάνει θέσεις φωσφορυλίωσης, ενώ υπάρχει μόνο στις R-Smads. Επιπρόσθετα, ο ρόλος της περιοχής MH2 είναι η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, με υποδοχείς (στην περίπτωση των R-Smads), με άλλους Smads και με μεταγραφικούς παράγοντες (15).

Με την πρόσδεση των R-Smads στον υποδοχέα τύπου I, προκαλείται η φωσφορυλίωσή τους από αυτόν (16). Οι θέσεις φωσφορυλίωσης εδράζουν στην MH2 περιοχή, είναι πλούσιες σε κατάλοιπα σερίνης και πολύ καλά συντηρημένες μέσα στην κατηγορία αυτή. Η πιο γνωστή θέση είναι η Ser 463/465 (15).



**Σχήμα 7:** Δομή των πρωτεϊνών Smad.

Η φωσφορυλίωση των R-Smads προκαλεί με τη σειρά της την απομάκρυνσή τους από τον υποδοχέα και τη δημιουργία συμπλόκου με τον Smad4 (Co-Smad). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο R-Smad - Smad4 εισέρχεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που είναι συνδεδεμένοι με το DNA, και μεταγράφεται το γονίδιο στόχος (17).

Είναι γνωστό ότι αρκετά μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των TGF-β παραγόντων όπως είναι η ακτιβίνη, ο BMP 7, BMP 2 κλπ., έχει το δικό του τύπο διαμεμβρανικού υποδοχέα TGF-β και ενεργοποιεί μια συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών Smad, προκειμένου να μεταφερθεί το μήνυμα στον πυρήνα (17). Κάθε ένα από τα μόρια

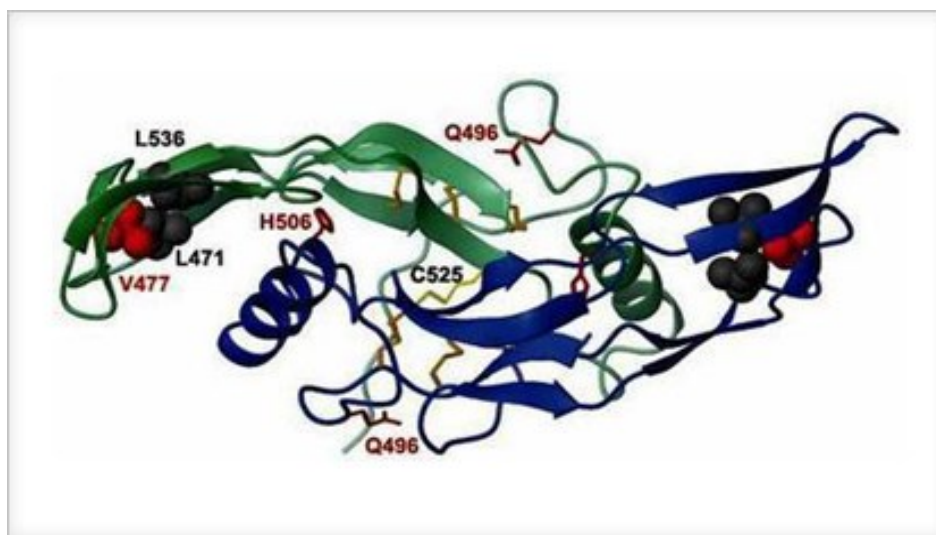
αυτά, εμφανίζουν δράσεις στα κύτταρα του ωοθυλακίου, με αποτέλεσμα, σε γενικές γραμμές, τα πλησιέστερα προς το ώριο κοκκώδη κύτταρα να αποκτούν αυξημένη μιτωτική ικανότητα, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου (18).

Δύο μέλη αυτής της υπερ-οικογένειας παραγόντων, που φαίνεται τα τελευταία χρόνια να βρίσκονται στο προσκήνιο της βιβλιογραφίας, αλλά εντούτοις η δράση τους καθώς επίσης και ο μηχανισμός δράσης τους να μην έχουν πλήρως διευκρινισθεί, είναι η αντυμυλλέρια ορμόνη (AMH) και η μορφογενετική οστική πρωτεΐνη 15 (BMP-15).

## 2 AMH

### 2.1 Δομή της AMH

Η AMH είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 30kD, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *AMH*, το οποίο βρίσκεται στη θέση 13.3 του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος 19 (19) (19 p13.3).



**Σχήμα 8.** Δομή της AMH. Διακρίνεται η πλούσια σε κυστεΐνες λειτουργική περιοχή.

### 2.2 Τόπος έκφρασης της AMH

Είναι ένα ξεχωριστό μέλος της υπερ-οικογένειας των TGF- $\beta$  παραγόντων, καθότι ενώ τα περισσότερα μέλη της υπερ-οικογένειας αυτής εμφανίζουν ποικίλες δράσεις, η δράση



της AMH περιορίζεται αποκλειστικά στα αναπαραγωγικά όργανα. Είναι περισσότερο γνωστή για τη δράση της στο αναπαραγωγικό σύστημα του άρρενος, όπου ως προϊόν των κυττάρων Sertoli του όρχεως είναι υπεύθυνη σε συνεργασία με την τεστοστερόνη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του συστήματος αυτού (19). Πιο συγκεκριμένα, υπό τον έλεγχο του γονιδίου *sry*, το οποίο βρίσκεται στο Υ χρωμόσωμα, οι γονάδες του άρρενος διαφοροποιούνται σε όρχεις. Τα σωματικά κύτταρα του αναπτυσσόμενου όρχεως, δηλαδή τα κύτταρα Leydig και τα κύτταρα Sertoli, παράγουν τρεις ορμόνες που είναι υπεύθυνες για την σωστή ανάπτυξη του άρρενος. Η τεστοστερόνη και ο παράγοντας που προσομοιάζει την ινσουλίνη 3 (INSL3), παράγονται και οι δυο στα κύτταρα Leydig και είναι υπεύθυνες για τη διαμόρφωση των εξωτερικών χαρακτηριστικών του άρρενος καθώς επίσης για τη σωστή κατάβαση του όρχη στο όσχεο αντιστοίχως. Με τη σειρά της η AMH παράγεται, όπως προαναφέρθηκε, από τα κύτταρα Sertoli και στον άρρενα σηματοδοτεί την υποστρόφη των πόρων του Müller, οι οποίοι στα θήλεα διαφοροποιούνται σε σάλπιγγες, μήτρα και στο άνω τμήμα του τραχήλου (20).

Από την άλλη πλευρά όμως είναι πλέον γνωστό ότι η AMH εκφράζεται και στα θήλεα και συγκεκριμένα στην ωοθήκη από τα κοκκώδη κύτταρα των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων, στα οποία τα κοκκώδη κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστική ικανότητα. Πιο αναλυτικά, η AMH εκφράζεται αρχικώς στα πρωτογενή ωοθυλάκια, που εμφανίζονται για πρώτη φορά στο θήλυ έμβρυο στις 36 εβδομάδες της κύησης. Εν συνεχεία, συνεχίζει να εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια στην ωοθήκη μέχρι αυτά να φτάσουν το μέγεθος των 4-6mm και το στάδιο διαφοροποίησης όπου πλέον μπορούν να επιλεγούν για στρατολόγηση και δημιουργία κυρίαρχου ωοθυλακίου υπό την δράση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH). Επιπλέον, η AMH εκφράζεται ακόμη

και στα ωοθυλάκια, τα οποία έχουν επιλεγεί για στρατολόγηση από την αποθήκη πρωτογενών ωοθυλακίων της ωοθήκης και τα οποία όμως δεν προορίζονται προς την πορεία του κυρίαρχου ωοθυλακίου (20). Από εκεί και έπειτα η έκφραση της μειώνεται δραματικά και εξαφανίζεται τελείως στα κύτταρα του ωχρού σωματίου και των άτρητων ωοθυλακίων (21). Το ίδιο το ωάριο συμμετέχει ενεργά σε αυτήν τη ρύθμιση, σύμφωνα με ευρήματα που αποδεικνύουν ότι το ωάριο από το στάδιο του πρώιμου κοιλωτικού, όψιμου κοιλωτικού και προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης του mRNA της AMH στα κοκκώδη κύτταρα (22).

### **2.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι της AMH**

Ως μέλος της υπερ-οικογένειας των αυξητικών παραγόντων TGF- $\beta$  χρησιμοποιεί το ίδιο σηματοδοτικό σύστημα, το οποίο έχει προσδιοριστεί και για άλλους παράγοντες της υπερ-οικογένειας, όπως ο ίδιος ο TGF- $\beta$ , η ακτιβίνη και οι BMPs. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω ενός υποδοχέα τύπου I γνωστός και ως ALKs (activin receptor-like protein kinases) και ενός υποδοχέα τύπου II με δράση κινάση σερίνης-θρεονίνης, οδηγώντας εν συνεχεία στη φωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών Smad (20, 23). Για την AMH, έχει αναγνωριστεί ένας συγκεκριμένου τύπος υποδοχέα τύπου II, ο AMHRII (24) και φαίνεται να είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού της μονοπατιού. (25). Όσον αφορά στον υποδοχέα τύπου I, βρέθηκαν τρεις υποψήφιοι, οι υποδοχείς τύπου I του BMP ALK2, ALK3 και

ALK6. Μετέπειτα έρευνες έδειξαν ότι επικρατέστεροι είναι ο ALK2 και ο ALK3, οι οποίοι εκφράζονται και στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης (26).

#### **2.4 Δράση της AMH**

Η AMH εμφανίζει τις δράσεις της μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού της μονοπατιού. Μελέτες, που έχουν διεξαχθεί σε ποντίκια, έχουν αναγνωρίσει την αναγκαιότητα της ορμόνης αυτής στη διατήρηση των αποθηκών πρωτογενών ωοθυλακίων της ωοθήκης, δρώντας ως αρνητικός παράγοντας στα αρχικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης. Παραγόμενη είτε από πρωτογενή είτε από τα δευτερογενή προκοιλοτικά ωοθυλάκια, αναστέλλει την επίδραση της FSH στην ωρίμανση των ωοθυλακίων ή στην μετατροπή των προκοιλοτικών σε κοιλοτικά καθώς επίσης αναστέλλει την αρχική στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε πρωτογενή (20, 26, 27, 28, 29).

Επιπρόσθετα, δεδομένα που απορρέουν από μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο, αποκαλύπτουν ότι τα επίπεδα της AMH στον ορό της γυναίκας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης ωοθηκικής επάρκειας ωοθυλακίων και ως προγνωστικός δείκτης στην ανταπόκριση της ωοθήκης όσον αφορά στην παραγωγή ωοθυλακίων σε φυσιολογικές γυναίκες, που υποβάλλονται σε ωοθηκική διέγερση στα πλαίσια ενός προγράμματος υποβοηθούμενης γονιμοποίησης (30-33). Η λογική πίσω

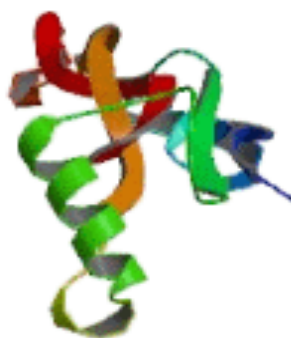
από αυτήν τη χρήση στηρίζεται στο γεγονός, ότι ο αριθμός των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των αποθηκών πρωτογενών ωοθυλακίων της ωοθήκης και ένας δείκτης ο οποίος αντιπροσωπεύει όλα τα ωοθυλάκια τα οποία έχουν κάνει την μετάβαση από το στάδιο των πρωτογενών ωοθυλακίων σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια θα ήταν μία ικανοποιητική ένδειξη της δυναμικής της ωοθήκης σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Δεδομένου ότι η AMH παράγεται σταθερά χωρίς διακυμάνσεις σε όλες τις φάσεις του κύκλου, από τα ωοθυλάκια μέχρι το στάδιο της στρατολόγησης, ικανοποιεί τα κριτήρια και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη ωοθηκικής επάρκειας (26).

Περαιτέρω, η σημασία αυτής της ορμόνης στην ωοθυλακική στρατολόγηση αποδεικνύεται και από μια σειρά μελετών, όπου γίνεται συσχέτιση των επιπέδων της AMH στον ορό και στο ωοθυλακικό υγρό με τον υψηλό αριθμό ωοθυλακίων της τάξης των 2-5mm σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), δίνοντας έτσι στοιχεία στην προσπάθεια διερεύνησης της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου αυτού (34).

### 3. BMP-15

#### 3.1 Δομή της BMP-15

Η BMP-15 ή διαφορετικά παράγοντας GDF-9B είναι μία πρωτεΐνη, που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των BMP παραγόντων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *BMP-15*, το οποίο εδράζει στη θέση 11.2 του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος X. Αποτελείται από 125 αμινοξέα και φέρει 5 πιθανές N-γλυκοζυλιομένες περιοχές σύνδεσης (35) (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Δομή της BMP-15.

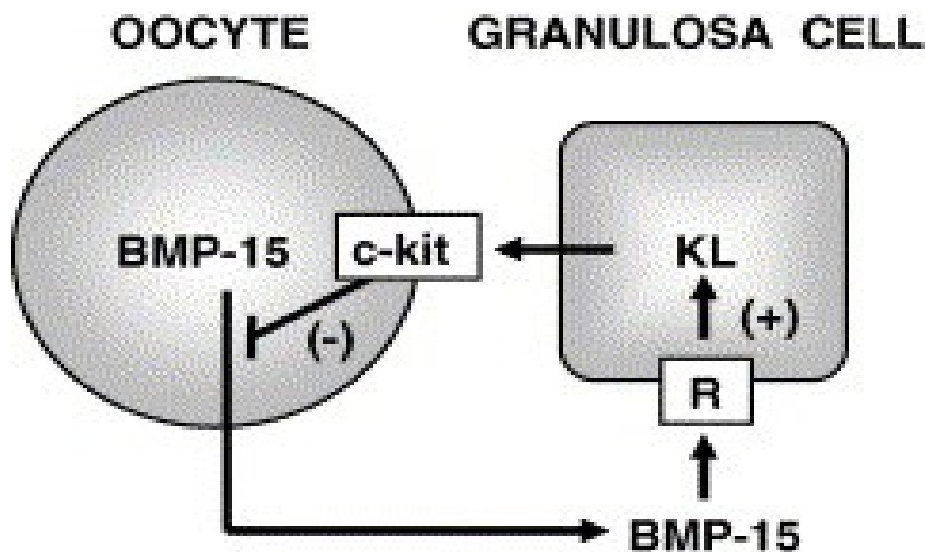
#### 3.2 Τόπος έκφρασης της BMP-15

Εκκρίνεται αποκλειστικά από το ωάριο (36, 37) κα όπως η AMH ανήκει και αυτή στην υπερ-οικογένεια των αυξητικών παραγόντων TGF- $\beta$ , φέροντας στην ενεργή της περιοχή το χαρακτηριστικό μοτίβο κυστεϊνών των TGF- $\beta$  παραγόντων, μια συγκεκριμένη δηλαδή αλληλουχία αμινοξέων κυστεΐνης στη σειρά, με τη διαφορά όμως, ότι η BMP-15 φέρει

μόλις 6 από τα 7 κατάλοιπα κυστεΐνης, που παρατηρούνται στην πλειοψηφία των παραγόντων αυτών (38). Το πιο κοντινό ομόλογο της BMP-15 είναι ο παράγοντας GDF-9 και μαζί με αυτόν εκφράζει τη βιολογική της δράση στον άνθρωπο, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων τύπου I και τύπου II (ALK6/BMPRII) οδηγώντας εν συνεχεία στη φωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών Smad (23, 39).

### **3.3 Δράση της BMP-15**

Η πρωτεΐνη BMP-15 είναι ένας δυνητικός παράγοντας ενεργοποίησης της κυτταρικής μίτωσης και κατά επέκταση του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων (40). Επίσης, μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση του mRNA του προσδέτη των κοκκωδών κυττάρων Kit-Ligand, ενός παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την πρώιμη ωοθυλακική ανάπτυξη (41). Υπό αυτόν τον ρόλο, η BMP-15 δρα ως ένας παράγοντας αρνητικής ρύθμισης μεταξύ του ωαρίου και των σωματικών κοκκωδών κυττάρων, όπου προωθεί την έκφραση του Kit-Ligand από τα κοκκώδη κύτταρα, ο οποίος όμως με τη σειρά του αναστέλλει την έκφραση της BMP-15 από το ωάριο μέσω πρόσδεσης αυτής στον υποδοχέα KIT, που βρίσκεται στην επιφάνεια του ωαρίου (35, 40) (Σχήμα 10).



**Σχήμα 10:** Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης BMP-15 και του Kit ligand.

Η φυσιολογική δράση της BMP-15 στην ωοθήκη είναι βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση της γονιμότητας στα θήλα. Μελέτες σε πρόβατα έχουν αναγνωρίσει μία σειρά από μεταλλάξεις του γονιδίου της BMP-15, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό ωοθυλακιογένεσης στους ετεροζυγότες και υπογονιμότητα στους ομοζυγότες (42-44). Ομοίως στους ανθρώπους, ο σημαντικός ρόλος της BMP-15 στη διατήρηση της γονιμότητας στη γυναίκα, διαφαίνεται από μία σειρά μελετών στις οποίες βρέθηκε ότι υπογόνιμες γυναίκες με σύνδρομο πρώιμης ωοθηκικής ανεπάρκειας και σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών φέρουν επίσης μεταλλάξεις του γονιδίου της BMP-15 (36, 45, 46). Ωστόσο, ευρήματα από μελέτες σε ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο της πρωτεΐνης BMP-15 (gene knock-out mice), υποδεικνύουν ότι η πορεία της ωοθυλακιογένεσης και της ωοθυλακιορηξίας δεν ρυθμίζεται σε όλα τα είδη κατά τον ίδιο τρόπο από της BMP-15. Όντως, ποντίκια στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί και τα

δου αλληλόμορφα του γονιδίου της BMP-15 (homozygous BMP-15-null mice, εμφανίζουν φυσιολογική ωοθυλακική ανάπτυξη με μία μέτριας μορφής υπογονιμότητα, λόγω αμελητέων δυσλειτουργιών κατά την ωοθυλακιορρηξία και την γονιμοποίηση. Ωστόσο, μελέτες *in vitro* σε κοκκώδη κύτταρα ποντικού, παρουσιάζουν ότι η BMP-15 επάγει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και την έκφραση του Kit ligand, ενώ καταστέλλει την έκφραση του υποδοχέα της FSH (45).

Επιπρόσθετα, δεδομένου της σταθερής έκφρασης της BMP-15 από το ωάριο, σε όλες τις φάσεις της ωοθυλακικής ανάπτυξης, ακόμη και μετά την ωοθυλακιορρηξία από το σύμπλεγμα κυττάρων ωοφόρου δίσκου και ωαρίου (cumulus-oocyte complexes), τα επίπεδα της BMP-15 στο ωοθυλακικό υγρό θεωρείται να είναι ένας προγνωστικός δείκτης της ποιότητας των ωαρίων και της μετέπειτα ποιότητας και ανάπτυξης των αντίστοιχων εμβρύων (47). Αναλυτικότερα, μελέτες αποδεικνύουν ότι, υψηλότερα επίπεδα της BMP-15 στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με υψηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης, υψηλότερο ποσοστό πρώιμης αυλάκωσης και καλύτερη ποιότητα εμβρύων με δυνατότητα φυσιολογικής ανάπτυξης (47). Περαιτέρω έρευνες επίσης δείχνουν μια στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της BMP-15 στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με φτωχή απάντηση σε ένα πρόγραμμα ωοθηκικής διέγερσης, όπου υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής οδηγούν σε καλύτερη ανταπόκριση των γυναικών, όσον αφορά τον αριθμό των παραγόμενων ωοθυλακίων, και σε μετέπειτα αυξημένο ποσοστό γονιμοποίησης και κύησης (47).



#### **4. Αλληλεπίδραση μεταξύ της FSH, της AMH και της BMP-15 στην στεροειδογένεση της ωοθήκης**

Μία από τις βασικές λειτουργίες της ωοθήκης, όπως προαναφέρθηκε, είναι η παραγωγή των στεροειδών ορμονών  $E_2$  και της  $P_4$ . Η FSH διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία αυτή και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ωοθυλακιογένεση και τη γονιμότητα της γυναίκας. Πιο συγκεκριμένα, η FSH δρα μέσω του υποδοχέα της στα κοκκώδη κύτταρα προκειμένου να πυροδοτήσει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αυτών, γεγονός που οδηγεί με τη σειρά του την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και τη μετατροπή του σε πρωθυλακιορρηκτικό (48). Οι μηχανισμοί δράσης της FSH περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων στόχων στα κοκκώδη κύτταρα μέσω του σηματοδοτικού καταρράκτη της cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης A. Μερικά από τα γονίδια αυτά είναι η αρωματάση P450 ( $P450_{arom}$ ), η πρωτεΐνη StAR, η ινχιμπίνη και η ακτιβίνη.

Εκτός όμως από τη δράση της FSH στην ρύθμιση της έκκρισης των στεροειδών ορμονών και της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, οι τοπικοί παράγοντες AMH και BMP-15 φαίνεται να εμπλέκονται και αυτοί στη στεροειδογένεση της ωοθήκης. Πρόσφατες μελέτες σε ζώα αλλά και στον άνθρωπο προτείνουν ότι η AMH μειώνει την από την FSH επαγόμενη έκφραση του ενζύμου αρωματάση και κατά επέκταση την παραγωγή της οιστραδιόλης στην ωοθήκη (49-53), ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου της AMH και του υποδοχέα της AMHRII συνδέονται με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου (54).

Όσον αφορά στην BMP-15, δεδομένα μελετών από ζώα μοντέλα και κυτταρικές σειρές ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων προτείνουν ότι η πρωτεΐνη BMP-15 μειώνει τη σύνθεση της προγεστερόνης. Πιο αναλυτικά, μελέτες σε ποντίκια παρουσιάζουν ότι η BMP-15 καταστέλλει την έκφραση του mRNA του υποδοχέα της FSH (FSH-R) και της LH (LH-R) με αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης των γοναδοτροφινών στα κοκκώδη κύτταρα και της παραγωγής της  $P_4$  χωρίς όμως να επιδρούν στην παραγωγή της  $E_2$  (48, 55). Οι ίδιες μελέτες επίσης προτείνουν ότι, η BMP-15 επεμβαίνει στην έκκριση της  $P_4$  και μέσω ενός άλλου μηχανισμού, συγκεκριμένα μέσω μείωσης της έκφρασης του mRNA ενός βασικού ενζύμου της στεροειδογένεσης, το οποίο είναι η πρωτεΐνη P450<sub>scc</sub>, και της πρωτεΐνης StAR.

Σε συμφωνία με τις μελέτες στα ζώα, αποτελέσματα από μία μελέτη σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων κυττάρων (KGN) δείχνουν ότι η BMP-15 αναστέλλει την παραγωγή της  $P_4$  μέσω μείωσης των επιπέδων τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης StAR (39). Επιπρόσθετα, η ίδια μελέτη προτείνει ότι η BMP-15, επιδρά και στα βασικά επίπεδα παραγωγής του mRNA της StAR προκαλώντας μείωση, πράγμα που έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα από κοκκώδη κύτταρα πουλερικών, όπου η BMP-15 μειώνει μόνο την επαγόμενη από την FSH παραγωγή του mRNA της πρωτεΐνης, αφήνοντας ανεπηρέαστα τα βασικά επίπεδα έκφρασης αυτής (39). Δεδομένα όμως για τη δράση της BMP-15 στη ρύθμιση της στεροειδογένεσης σε πρωτογενή ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα δεν υπάρχουν.

#### **4.1 Σημασία της ρύθμισης της έκκρισης των στεροειδών ορμονών $E_2$ και $P_4$**

Από όλα τα παραπάνω λοιπόν, συνεπάγεται ότι το ίδιο το μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου, με τις μη στεροειδείς ορμόνες που παράγονται και εκκρίνονται τόσο από τα κύτταρα του ωοθυλακίου όσο και από το ίδιο το ωάριο, επηρεάζει τη διαδικασία της αναπαραγωγής. Η ελεγχόμενη ρύθμιση της έκκρισης της  $E_2$  και της  $P_4$  είναι ζήτημα ύψιστης σημασίας σε όλα τα στάδια της ζωής της γυναίκας, λόγω των εξειδικευμένων δράσεων που αυτές εμφανίζουν.

#### **4.2 Δομή και δράση της $E_2$**

Η  $E_2$  είναι ένα  $C_{18}$  στεροειδές από το οποίο εκλείπει η προσκολλημένη στη θέση 10 μεθυλική ομάδα. Εκκρίνεται κυρίως από τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων της ωοθήκης, το ωχρό σωματίο και τον πλακούντα. Ένα ποσοστό 2% της ποσότητας της  $E_2$  που βρίσκεται στη κυκλοφορία είναι ελεύθερη, ενώ από την υπόλοιπη ένα ποσοστό 60% είναι δεσμευμένη με αλβουμίνη και ένα ποσοστό 38% είναι δεσμευμένο με την πρωτεΐνη δέσμησης των στεροϊδών ορμονών (gonadal steroid-binding globulin-GBG), η οποία δεσμεύει και τεστοστερόνη (56). Το ήπαρ με τα ειδικά του ένζυμα αποτελεί το κύριο μέρος μεταβολισμού της  $E_2$ . Έτσι η  $E_2$  κατά τη διέλευση της από το ήπαρ με τη βοήθεια της 17β-OH-στεροειδικής δευδρογενάσης μεταβολίζεται σε οιστριόλη και οιστρόνη μέρος των οποίων εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο ηπατικός μεταβολισμός της  $E_2$  ελαττώνει τη βιολογική της ισχύ και αυξάνει τη διαλυτότητά της στη νεφρική απέκκριση και το νερό. Τα μεταβολικά της παράγωγα

αποβάλλονται μέσω της χολής, από όπου επαναρροφώνται στην κυκλοφορία του αίματος. Το μεγαλύτερο μέρος της απορροφάται σε μεγάλο βαθμό στο έντερο και μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτής αποβάλλεται μέσω κοπράνων. Η  $E_2$  συνδέεται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με τη β-σφαιρίνη στο ήπαρ, το οποίο υδρολύει τις γλυκουρονικές ενώσεις της ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση της. Οι φυσιολογικές τιμές της  $E_2$  στην παραγωγική φάση κυμαίνονται μεταξύ 30-150 pg/ml, στη μεσοκυκλική φασή μεταξύ 150-500 pg/ml, στην ωχρινική φάση 80-350 pg/ml ενώ στην εγκυμοσύνη ξεπερνά τα 1000 pg/ml και στην εμμηνόπαυση δεν ξεπερνά τα 15 pg/ml. Τέλος, τα οιστρογόνα αποβάλλονται από τα ούρα με τη μορφή γλυκουρονικών ενώσεων (56).

Η  $E_2$  εμφανίζει ποικίλες δράσεις τόσο στα αναπαραγωγικά όργανα όσο και σε άλλους ιστούς όπως τα αγγεία, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το μαστό, το δέρμα και τα οστά. Είναι πολύ σημαντική για την έκφραση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και την ανάπτυξη του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου, αυξάνοντας την αγγείωση και την αδένωση αυτού. Η παραγόμενη από το ωοθυλάκιο  $E_2$  ασκεί τη μιτωτική της δράση στα κοκκώδη κύτταρα προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης, η FSH σε συνεργασία με την  $E_2$ , επάγει την αύξηση των μεμβρανικών υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα, πράγμα που συνδυασμό με τον επαγόμενο από την  $E_2$  πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων οδηγεί σε μία γενικευμένη αύξηση των υποδοχέων της FSH και σε μία αυξημένη αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Επιπρόσθετα, τα οιστρογόνα σε συνδυασμό με την FSH, επάγουν και την εμφάνιση των υποδοχέων της LH στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, έτσι

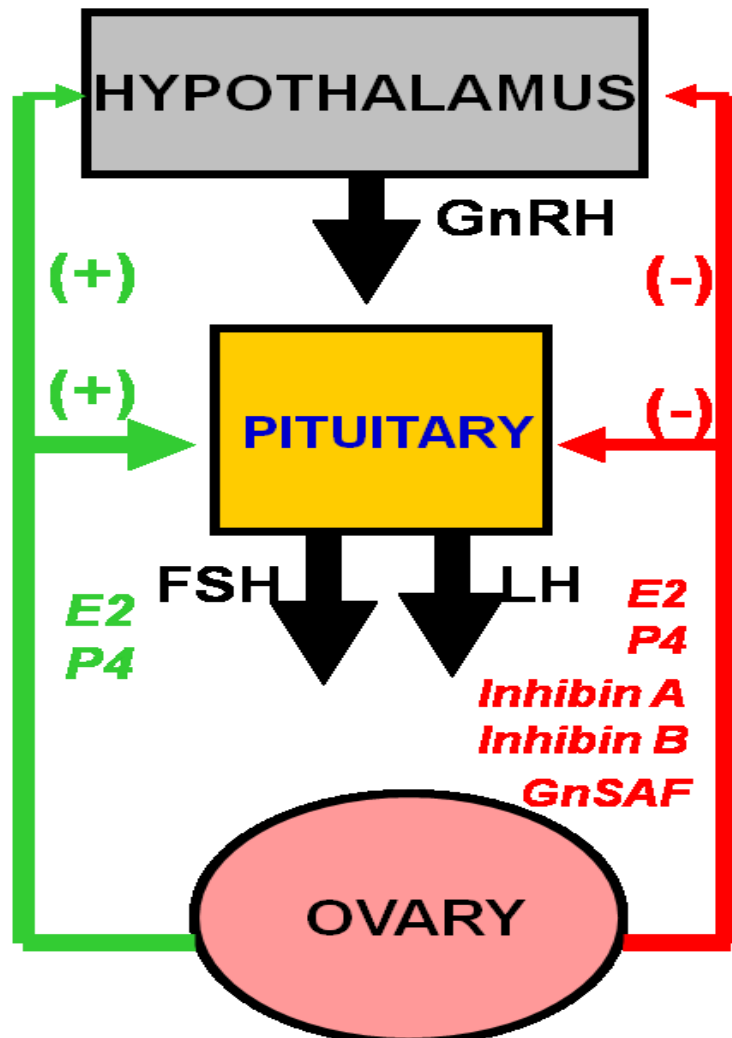
ώστε να γίνει δυνατή η περαιτέρω ανάπτυξη του και ωρίμανση του ωοθυλακίου (56, 57).

Η  $E_2$  όμως, εκτός από την τοπική δράση που εμφανίζει στην ωοθήκη, δρα και στην υπόφυση μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκης. Πιο αναλυτικά, τα αυξανόμενα ποσά  $E_2$ , τα οποία προκύπτουν από την αυξημένη αρωματοποίηση των ανδρογόνων όπως προαναφέρθηκε, σε συνεργασία με την ινχιμπίνη, μία μη στεροειδή ουσία που παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων, προκαλεί ελάττωση της έκκρισης της FSH από την υπόφυση, μέσω μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης δράσης (negative feedback) (57) (Σχήμα 11).

Επομένως, ενώ το ωοθυλάκιο στα αρχικά στάδια του κύκλου, και μάλιστα μέχρι να γίνει το επικρατούν, έχει την δυνατότητα να εκκρίνει μεγάλα ποσά  $E_2$  και να αυξάνει τους υποδοχείς της FSH, ενισχύοντας τη δράση της, εν συνεχεία ο ρόλος αντιστρέφεται, και μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκης, η ίδια η  $E_2$  επάγει μείωση της έκκρισης της FSH (57). Στόχος της ρύθμισης αυτής είναι τα λιγότερα ανεπτυγμένα ωοθυλάκια να οδηγηθούν σε ατρησία και εκφύλιση, εφόσον απουσία υψηλών ποσών FSH η φυσιολογική λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων των μικρότερων ωοθυλακίων αναστέλλεται.

Από τη στιγμή που το επικρατούν ωοθυλάκιο κάνει την εμφάνιση του, τα επίπεδα της  $E_2$  αυξάνουν περαιτέρω μέχρι να φθάσουν στην μέγιστη τιμή τους. Τα σταθερά υψηλά ποσά  $E_2$  για 24 περίπου ώρες, ασκούν στον υποθάλαμο και στην υπόφυση μία θετική πλέον δράση (positive feedback) και όχι αρνητική, όπως προηγουμένως (Σχήμα 11), με

συνέπεια την μαζική έκκριση της LH. Το αποτέλεσμα αυτής είναι η τελική ωρίμανση του ωαρίου και η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας.



**Σχήμα 11:** Μηχανισμός θετικής και αρνητική ρύθμισης της έκκρισης των γοναδοτροφινών από τα ωοθηκικά στεροειδή E<sub>2</sub> και P<sub>4</sub> μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες.

### 4.3 Μηχανισμός δράσης της E<sub>2</sub>

Οι δυο κύριοι τύποι πυρηνικών οιστρογονικών υποδοχέων είναι ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου α (estrogen receptor type α - ER-α) και ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου β (estrogen receptor type β - ER-β), οι οποίοι κωδικοποιούνται από το αντίστοιχο γονίδιο το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 14 (58). Και οι δύο είναι μέλη της υπερ-οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει υποδοχείς για πολλά διαφορετικά στεροειδή. Μετά την πρόσδεση του οιστρογόνου, ο πυρηνικός υποδοχέας διμερίζεται και προσδένεται σε εξειδικευμένες θέσεις πάνω στο DNA, επάγοντας την μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων στόχων. Μερικοί ιστοί διαθέτουν τόσο τον ER-α όσο και τον ER-β ενώ μερικοί μόνο τον έναν από τους 2. Ο ER-α εντοπίζεται κυρίως στη μήτρα, το συκώτι, τα νεφρά και στην καρδιά ενώ ο ER-β εντοπίζεται κυρίως στις ωοθήκες, στον προστάτη, τον πνεύμονα οι επιφύσεις των οστών δεν έκλειναν. Ομοίως, ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον ER-β, ήταν επίσης στείρα και λιποβαρή (57).

Η πλειοψηφία των δράσεων της E<sub>2</sub> είναι σε γονιδιακό επίπεδο και μάλιστα μερικές από αυτές είναι τόσο γρήγορες που δυσκολεύεται κανείς να πιστέψει ότι εξαίρονται μέσω αύξηση του mRNA των γονιδίων στόχων. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι δράσεις αρνητικής ή θετικής ανάδρασης στη ρύθμιση της έκκρισης των υποθαλαμικών ορμονών. Η ύπαρξη τους έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι πέρα από τη γονιδιακή ρύθμιση, η E<sub>2</sub> είναι σε θέση να επάγει και μη γονιδιακές δράσεις, μέσω όχι πυρηνικών αλλά μέσω μεμβρανικών υποδοχέων.

#### 4.4 Δομή και δράση της P<sub>4</sub>

Η P<sub>4</sub> είναι ένα C<sub>21</sub> στεροειδές το οποίο εκκρίνεται κατά κύριο λόγο από το ωχρό σωματίο και τον πλακούντα. Είναι μία απαραίτητη ενδιάμεση ένωση στην πορεία της βιοσύνθεσης των στεροϊδών ορμονών σε όλους τις ιστούς που εκκρίνουν στεροϊδείς ορμόνες. Η συγκέντρωση της P<sub>4</sub> στο πλάσμα των γυναικών κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου είναι περίπου 0,9 ng/ml (3 nmol/L). Κατά την ωχρινική φάση του κύκλου, τα μεγάλα ποσά P<sub>4</sub>, που εκκρίνονται από το ωχρό σωματίο, έχουν ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση αυτής στο πλάσμα να ξεπερνά τα 10 ng/ml (30 nmol/L) (56).

Τα κύρια όργανα στόχοι της P<sub>4</sub> είναι η μήτρα, ο μαστός και ο εγκέφαλος. Πιο αναλυτικά, η P<sub>4</sub> είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές στη δομή του ενδομητρίου. Προκαλεί μια περαιτέρω πάχυνση του επιθηλίου του ενδομητρίου καθιστώντας το υποδεκτικό για την εμφύτευση του εμβρύου. Έχει αντιοιστογόνο δράση στα κύτταρα του ενδομητρίου και μειώνει την ευαισθησία τους στην ωξυτοκίνη. Μειώνει επίσης τον αριθμό των υποδοχέων της E<sub>2</sub> στο ενδομήτριο και αυξάνει τον ρυθμό μετατροπής της E<sub>2</sub> σε λιγότερο ενεργές μορφές. Στο μαστό η P<sub>4</sub> διεγείρει την ανάπτυξη των πόρων και των λοβίων και υποστηρίζει την εκκριτική λειτουργία του μαστού κατά τη διάρκεια του θηλασμού (56).

Η P<sub>4</sub> συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της έκκρισης των υποθαλαμικών ορμονών μέσω μηχανισμού θετικής και αρνητικής ανάδρασης κατά μήκος του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση-ωοθήκες (Σχήμα 11). Συγκεκριμένα, μεγάλη συγκέντρωση της P<sub>4</sub> προκαλεί



αναστολή της έκκρισης της LH από την υπόφυση, δρώντας σε συνεργασία με την  $E_2$  με σκοπό την αποφυγή της ωοθυλακιορηξίας.

#### **4.5 Μηχανισμός δράσης της $P_4$**

Ο μηχανισμός δράσης της  $P_4$  ακολουθεί το μοντέλο των υπόλοιπων στεροειδών ορμονών. Μέσω σύνδεσης στον πυρηνικό υποδοχέα της  $P_4$  και ενεργοποίησης αυτού, το μήνυμα μεταφέρεται στον πυρήνα πυροδοτώντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Δύο ισομορφές του υποδοχέα της  $P_4$  προκύπτουν από διαφορετικό μάτισμα ενός μόνου γονιδίου το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 11. Ο υποδοχέας προγεστερόνης τύπου A ( $PR_A$ ), είναι μια ημιτελής μορφή που όταν ενεργοποιείται είναι σε θέση να αναστέλλει μέρος των δράσεων του πλήρη υποδοχέα τύπου B ( $PR_B$ ). Μία τρίτη ισομορφή του υποδοχέα η  $PR_C$ , έχει επίσης βρεθεί στους ανθρώπους και θεωρείται ότι ρυθμίζει την έκφραση των άλλων δύο ισομορφών (59).

## 5. ΑΝΑΠΑΝΤΗΤΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι το ορμονικό περιβάλλον του ωαρίου παίζει καθοριστικό ρόλο στην ωρίμανση και την εξέλιξη αυτού. Τα δυο κυρίαρχα ωοθηκικά στεροειδή,  $E_2$  και  $P_4$ , σε συνδυασμό με τη δράση των γοναδοτροφινών αλλά και τη δράση τοπικών παραγόντων, ρυθμίζουν την έκκριση των ίδιων τών ορμονών και τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Η ρύθμιση της δράσης αυτής μέσω των γοναδοτροφινών έχει μελετηθεί αρκετά. Ωστόσο, μέχρι σήμερα η πιθανή ρυθμιστική δράση δύο τοπικών αυξητικών παραγόντων, συγκεκριμένα της AMH και της πρωτεΐνης BMP-15 στην ωοθηκική στεροειδογένεση στον άνθρωπο δεν έχει μελετηθεί. Ειδικότερα, δεν έχει διευκρινισθεί η πιθανή δράση των δύο αυτών ουσιών στην παραγωγή της  $E_2$  και της  $P_4$  από πρωτογενή κοκκώδη κύτταρα καθώς και η πιθανή συνεργασία τους με τις γοναδοτροφίνες στη διαδικασία αυτή.

## 6. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της αντιμυλλέριας ορμόνης (AMH) και της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης 15 (BMP-15) στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων υπό την επίδραση των γοναδοτροφινών καθώς επίσης και η διευκρίνιση των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε για πρώτη φορά:

1. η δράση της AMH στη βασική αλλά και την από την FSH επαγόμενη παραγωγή της  $P_4$  σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπου,
2. η δράση της BMP-15 στην παραγωγή της βασικής αλλά και της επαγόμενης από την FSH παραγωγή της  $P_4$ ,
3. οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της AMH και της BMP-15 στη ρύθμιση της παραγωγής  $E_2$  και  $P_4$  παρουσία ή απουσία της FSH και
4. η δράση της FSH στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των TGF- $\beta$  παραγόντων, μέσω ενεργοποίησης για πρώτη φορά σε επίπεδο πρωτεΐνης της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Smad 5.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 7.1 Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων

Ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα απομονώθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό 30 γυναικών, ηλικίας 23-45 ετών, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) με βάση το πρωτόκολλο της πολλαπλής ωοθυλακικής διέγερσης με ανασυνδυασμένη FSH σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστές. Όλες οι γυναίκες συμμετείχαν μετά από γραπτή συναίνεση και το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου. Για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων, χορηγήθηκε ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη (hCG). Έπειτα από 36 ώρες, ακολούθησε η ωοληψία. Η αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού και του ωαρίου πραγματοποιήθηκε διακολπικά με λεπτή βελόνα υπό υπερηχογραφικό έλεγχο.

Μετά την απομάκρυνση του ωαρίου, ακολούθησε η απομόνωση και ο καθαρισμός των κοκκωδών κυττάρων με την μέθοδο της καθίζησης. Η διαδικασία στο σύνολο της πραγματοποιήθηκε σε άσηπτες συνθήκες. Το ωοθυλακικό υγρό, που περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα, διαμοιράστηκε σε σωληνάρια των 15 ml και αραιώθηκε με ισότονο διάλυμα άλατος PBS (Phosphate Buffered Salin) σε αναλογία 3 προς 10, με σκοπό την έκπλυση των κυττάρων. Για την καλύτερη συγκράτηση των κυττάρων στο PBS, προστέθηκε 1mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin). Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και αφέθηκε σε ηρεμία, έως ότου τα κύτταρα καθιζήσουν στον πυθμένα του σωληναρίου, δημιουργώντας ένα ίζημα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο στρώμα, στο οποίο

εγκλωβίζονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οι διάφορες προσμίξεις, αφαιρέθηκε. Η έκπλυση του ιζήματος επαναλαμβάνόταν έως ότου το ίζημα των κυττάρων να είναι μακροσκοπικά καθαρό από ερυθρά αιμοσφαίρια και προσμίξεις. Μετά προστέθηκε στο ίζημα 5ml διαλύματος PBS και ακάλουθησε φυγοκέντρηση 10 λεπτών στις 800 στροφές/λεπτό, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν άλλων προσμίξεων που δεν απομακρύνονται μέσω καθίζησης.

Το ίζημα των κοκκωδών κυττάρων έπειτα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 2ml με καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο 199 Wearle's Salts και Hepes. Ακολούθησε ο έλεγχος της βιωσιμότητας και ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο, προσθέτοντας τη χρωστική trypan blue, η οποία χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα.

## **7.2 Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων**

Για την καλλιέργεια των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο 199 Wearle's Salts και Hepes, στο οποίο είχε προστεθεί 1% αντιβιοτικό (στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη) 0.1% BSA, και 5% L-γλουταμίνη. Η τελική συγκέντρωση των κυττάρων ήταν  $5 \times 10^4$  κύτταρα ανά ml διαλύματος. Έπειτα, το διάλυμα των κοκκωδών κυττάρων διαχωρίστηκε σε καλλιεργητικά τρυβλία 24 θέσεων (συγκέντρωση κυττάρων ανά θέση είναι  $5 \times 10^4$  κύτταρα/ml), τα οποία επώαστηκαν την προηγούμενη ημέρα για 24 ώρες με Donor Calf Serum-DCS, για την ενίσχυση της επικόλλησης και της ανάπτυξης των κυττάρων.



Η επώαση με DCS ακολουθήθηκε από καλή έκπλυση του τρυβλίου με PBS. Μετά την επίστρωση των κυττάρων στα τρυβλία, μία περίοδος προεπώασης 24 ωρών μεσολαβεί προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στο κάτω μέρος του τρυβλίου και να σχηματίσουν μια καλλιέργεια ενός επιπέδου. Εν συνεχεία, το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από serum free καλλιεργητικό υλικό, το οποίο εμπεριείχε  $10^{-6}$  ανδροστενδιόνη ( $A_4$ ) (NIDDK's National Hormone and Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Centre, Los Angeles, CA) ως υπόστρωμα για την αρωματάση σε συνδυασμό με ανασυνδυασμένη hFSH (R&D Systems Inc. Minneapolis, USA) (10 και 100 ng/ml), ανασυνδυασμένο BMP-15 (R&D Systems Inc. Minneapolis, USA) (10 και 100 ng/ml) και AMH (R&D Systems Inc. Minneapolis, USA) (2, 20 και 100 ng/ml) (Πίνακας 1).

Τα τρυβλία επώαστηκαν στη συνέχεια για 72 ώρες και το υπερκείμενο συλλεγόταν κάθε 24 ώρες. Όλα τα υπερκείμενα που συλλέγονταν, αποθηκεύονταν άμεσα στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει ποσοτικοποίηση. Στα πιλοτικά πειράματα για το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου το υπερκείμενο επίσης συλλεγόταν κάθε 24 ώρες. Ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος ότι η μεγαλύτερη παραγωγή στεροειδών ορμονών από τα κοκκώδη κύτταρα

**Πίνακας 1: Πρωτόκολλο χορήγησης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των ορμονών AMH, BMP-15 και FSH και των συνδυασμών τους σε 24, 48 και 72 ώρες καλλιέργειας.**

<b>ΟΡΜΟΝΗ (ΜΕΜΟΝΟΜΕΝΗ- ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΣ)</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΕΛΛΙΩΝ</b>
A <sub>4</sub> + CONTROL	10 <sup>-6</sup> M	6
A <sub>4</sub> + AMH	10 <sup>-6</sup> M + 10 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + AMH	10 <sup>-6</sup> M + 50 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + AMH	10 <sup>-6</sup> M + 100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M+ 10ng/ml	4
A <sub>4</sub> + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M+ 100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + AMH + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M + 2 /20/ 100 ng/ml + 10 /100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + CONTROL	10 <sup>-6</sup> M	6
A <sub>4</sub> + FSH + AMH	10 <sup>-6</sup> M + 10 ng/ml + 2/20/100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH + AMH	10 <sup>-6</sup> M+ 100 ng/ml + 2/ 20/100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M+ 10 ng/ml + / 100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M+ 100 ng/ml + 10 /100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH + AMH + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M + 10 ng/ml + 2/ 20/100 ng/ml + 10/100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH + AMH + BMP-15	10 <sup>-6</sup> M + 100 ng/ml + 2/20 /100 ng/ml + 10/100 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH	10 <sup>-6</sup> M + 10 ng/ml	4
A <sub>4</sub> + FSH	10 <sup>-6</sup> M + 100 ng/ml	4

παρατηρήθηκε στις 48 ώρες καλλιέργειας και η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τις 48 ώρες καλλιέργειας μειωνόταν, το σημείο των 72 ωρών εγκαταλείφτηκε.

### **7.3 Ανοσοϊστοχημεία**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών SMAD και η έκφραση της πρωτεΐνης StAR μελετήθηκαν στα κοκκώδη κύτταρα ανοσοϊστοχημικά, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα, μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, επειδή στις 48 ώρες καλλιέργειας σε σύγκριση με τις 24 ώρες μια επαγόμενη από την FSH αύξηση της παραγωγής της οιστραδιόλης παρατηρήθηκε για πρώτη φορά (Σχήμα 12). Μονοκλωνικό πρώτο Rabbit Anti-SMAD5 1/100 αντίσωμα (phospho S463 + S465 [MMC-1-104-3] - BSA and Azide free ab168252, Abcam Inc.Cambridge, USA) και μονοκλωνικό Mouse Anti-StAR 1/100 αντίσωμα (ab58013, Abcam Inc.Cambridge, USA) χρησιμοποιήθηκαν αρχικά. Τα κύτταρα επικολλήθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm επιστρωμένες με 2% ζελατίνη ακολουθώντας το πρωτόκολλο καλλιέργειας, που προαναφέρθηκε. Μετά από block των κυττάρων με Phosphate Buffered Saline (PB) pH 7.4, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν πάνω στις καλυπτρίδες, χρησιμοποιώντας ice cold 2% παραφορμαλδεύδη (PFA) pH 7.4 για 10 λεπτά. Κάθε μια καλυπτρίδα επώαστηκε εν συνεχεία με το πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε Tris-buffered Saline (TBS), το οποίο εμπεριείχε 0.5% normal donkey serum (NDS) και 0.3% Triton X-100 overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ξέπλυμα των καλυπτρίδων με TBS και επώαση με το δεύτερο φθορίζον αντίσωμα CF™488A labeling highly cross-adsorbed donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Biotium, USA) and CF™594 highly cross-adsorbed donkey anti-mouse

IgG (H+L) (Biotium, USA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικά τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με mounting media και οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για μόνιμη αποθήκευση στους 20° C. Για να αποφευχθεί η μη ειδική σήμανση των αντισωμάτων, αυτόφθορισμός και ψευδώς θετικά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αρνητικού ελέγχου (negative control) με τα πρώτα αντισώματα, σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο.

#### **7.4 Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνων**

Τα κύτταρα εξετάστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο (Axioskop ZEISS) υπό τους φακούς 10/0.25 και 40/0.75 (Oberkochen, Deutschland). Η ανάλυση των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Image J για οπτικά μικροσκόπια (1.47r WR National Institutes of Health USA). Όλες οι εικόνες (RBJ Pictures) αναλύθηκαν ταυτόχρονα και με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Η μέση πυκνότητα σήματος της κάθε καλλιέργειας κατεγράφη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Analyse/Histogram. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές πυκνότητας (0-255, από το ελάχιστο στο μέγιστο της οπτικής πυκνότητας).

#### **7.5 Μέτρηση των στεροειδών ορμονών**

Τα στεροειδή, E<sub>2</sub> και P<sub>4</sub> μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών με ένζυμα διαθέσιμα στο εμπόριο από την εταιρεία Assay Designs (Inc.,Ann Arbor, Mi). Τα

κατώτερα επίπεδα ανίχνευσης της 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης ήταν 37 pmol/L και 0.6 nmol/L αντίστοιχα. Οι διαδραστικές συνιστώσες απόκλισης για E<sub>2</sub> ήταν 6.6% και 6.2% ενώ για την P<sub>4</sub> ήταν 5.4% και 8.3%.

### **7.6 Στατιστική Ανάλυση**

Τα δεδομένα κατανεμήθηκαν σύμφωνα με τη δοκιμασία one sample Kolmogorov-Smirnov. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας two-way Anova για τυχαιοποιημένα δεδομένα, ενώ χρησιμοποιήθηκε one-way Anova μαζί με ανάλυση Bonferroni, με σκοπό να μελετηθεί η σημασία των αλλαγών στην τιμή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης μεταξύ των πειραμάτων. Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism (version 4,00 for Windows, GraphPad Software San Diego, California, USA). Το α-επίπεδο 0.05 θεωρήθηκε ότι έδειχνε στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.05$ ). Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές του  $\pm$ SEM.

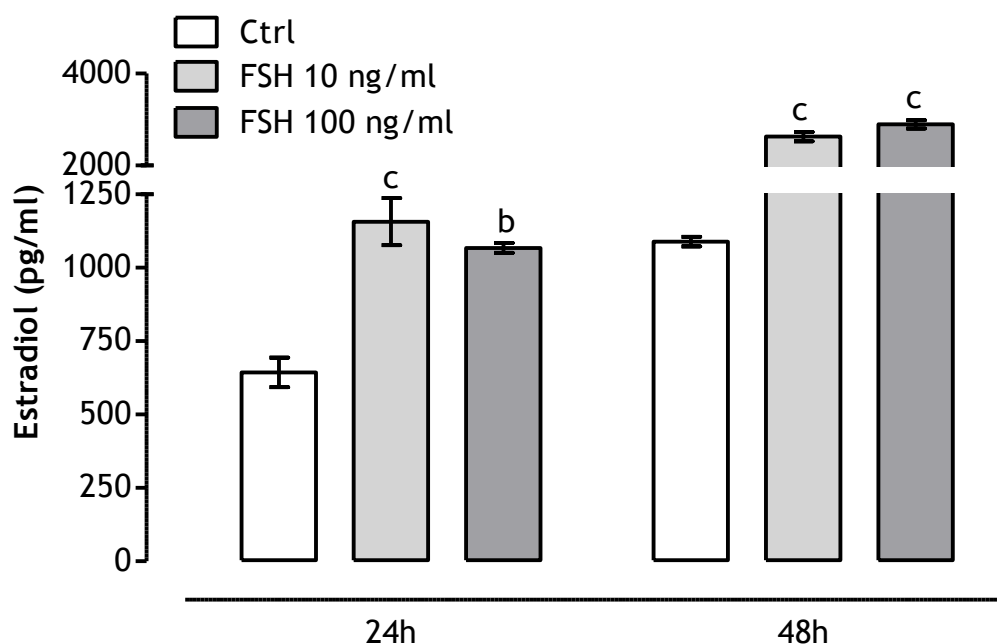
## **8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### ***8.1 Επίδραση της FSH, της AMH και της BMP-15 στη βασική παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα***

Προκειμένου να διερευνηθεί το παραπάνω ερώτημα, χορηγήθηκαν αρχικά μεμονωμένα διαφορετικές και πιθανά δραστικές συγκεντρώσεις των ορμονών FSH, AMH και BMP-15, στα δυο διαφορετικά χρονικά σημεία των 24 και 48 ωρών καλλιέργειας των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων.

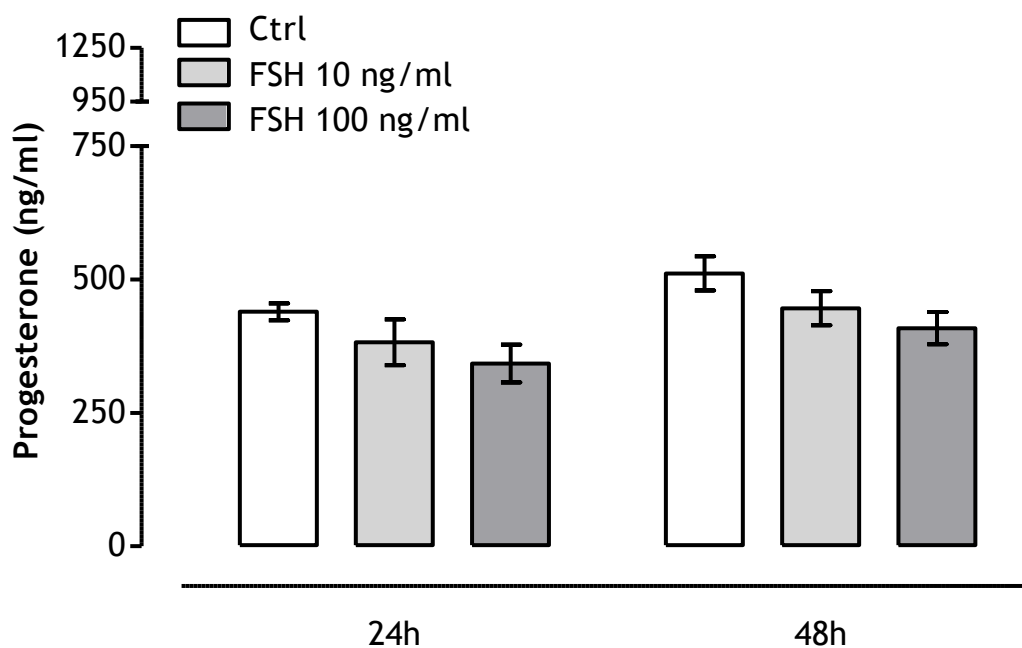
#### ***8.1.1 FSH***

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 12, για την FSH χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, οι οποίες είναι 10 ng/ml και 100 ng/ml. Σε συγκέντρωση 10 ng/ml, η FSH αύξησε την έκκριση της οιστραδιόλης από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, μετά από 48 ώρες καλλιέργειας ( $p < 0.001$  σε σύγκριση με το control), ενώ σε συγκέντρωση 100 ng/ml προκάλεσε μια στατιστικά σημαντική αύξηση ήδη από τις 24 ώρες καλλιέργειας ( $p < 0.01$ ).



**Σχήμα 12:** Δράση της FSH σε συγκέντρωση 10 και 100 ng/ml στην παραγωγή E<sub>2</sub> από ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε (± SEM), n=5 ασθενείς, b: p<0.01; c: p<0.001 στατιστικά σημαντικά από control χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis.

Αντιθέτως, όσον αφορά στην P<sub>4</sub> η, η FSH τόσο σε συγκέντρωση 10 ng/ml όσο και σε 100 ng/ml δεν εμφάνισε καμία δράση. Τα επίπεδα παραγωγής P<sub>4</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, ως απάντηση στη δράση της FSH, παρουσίασαν μια τάση προς μείωση σε σχέση με τη βασική παραγωγή P<sub>4</sub> από αυτά, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Σχήμα 13). Μεγαλύτερη τάση προς μείωση εμφάνισε η συγκέντρωση των 100 ng/ml.



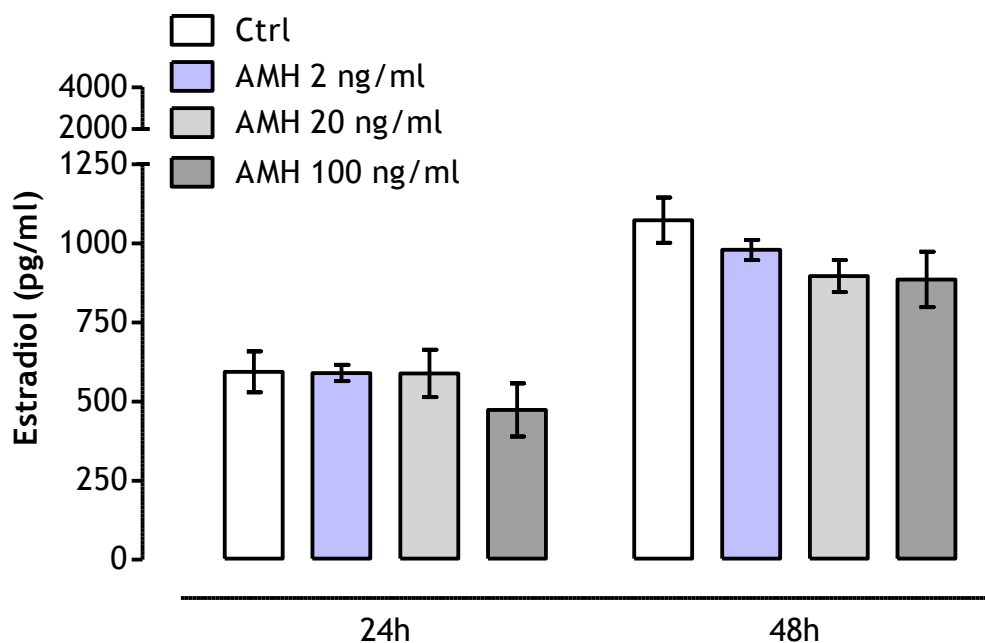
**Σχήμα 13:** Δράση της FSH σε συγκέντρωση 10 και 100 ng/ml στην παραγωγή P<sub>4</sub> από ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε (± SEM), n=5 ασθενείς.

### 8.1.2 AMH

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 14, χορηγήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της AMH, δηλαδή 2, 20 και 100 ng/ml. Καμία από αυτές δεν προκάλεσε μεταβολή της έκκρισης της E<sub>2</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 2 και 20 ng/ml μετά από 24 ώρες καλλιέργειας, δεν υπήρξε καμία μεταβολή, ενώ μετά από 48 ώρες υπήρξε μία τάση προς μείωση, χωρίς όμως να προκληθεί στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε συγκέντρωση 100 ng/ml, η τάση προς μείωση έγινε εμφανής ήδη από τις 24 ώρες καλλιέργειας. Η μείωση συνεχίστηκε και στις 48 ώρες, χωρίς όμως και εδώ να εμφανιστούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, όσον αφορά στην έκκριση E<sub>2</sub> από τα



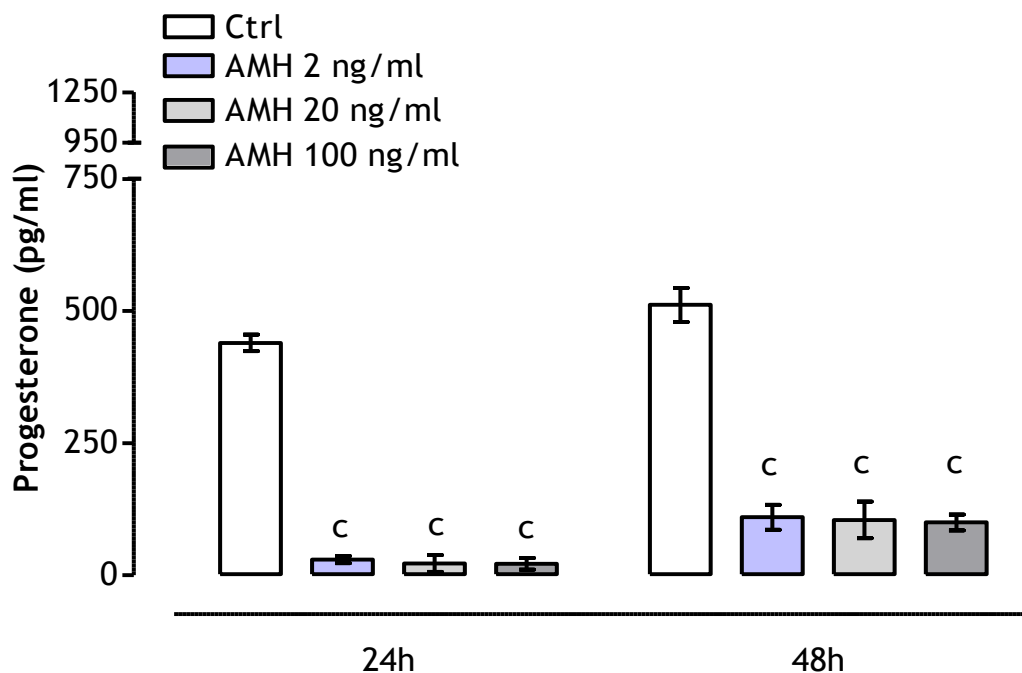
ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες των δύο μικρότερων συγκεντρώσεων.



**Σχήμα 14.** Δράση της AMH στην παραγωγή  $E_2$  από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε συγκέντρωση 2, 20 και 100 ng/ml μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε ( $\pm$  SEM), n=5 ασθενείς.

Αντιθέτως, σχετικά με την  $P_4$ , το σκηνικό διαφοροποιήθηκε με την AMH να προκαλεί μείωση των βασικών επιπέδων έκκρισης της προγεστερόνης από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε όλες τις συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 15. Συγκεκριμένα, τόσο μετά από 24 όσο και μετά από 48 ώρες καλλιέργειας των ανθρώπινων ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, η AMH σε συγκέντρωση 2, 20 και 100 ng/ml προκάλεσε μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης, εμφανίζοντας

στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις περιπτώσεις ( $p < 0.001$ ). Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων της AMH δεν παρατηρήθηκε.

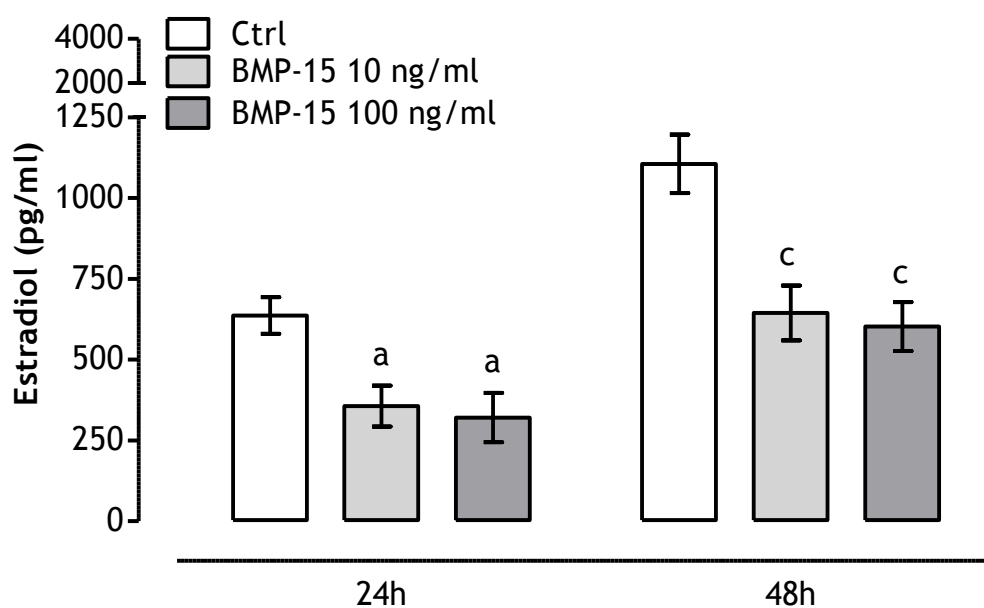


**Σχήμα 15.** Δράση της AMH στην παραγωγή  $P_4$  από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε συγκέντρωση 2, 20 και 100 ng/ml μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε ( $\pm$  SEM),  $n=5$  ασθενείς, c:  $p < 0.001$  στατιστικά σημαντικά από control χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis.

### 8.1.3 BMP-15

Για τη μελέτη της δράσης της BMP-15, χορηγήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 10 και 100 ng/ml. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 16, και οι δύο συγκεντρώσεις προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της έκκρισης της  $E_2$  από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα

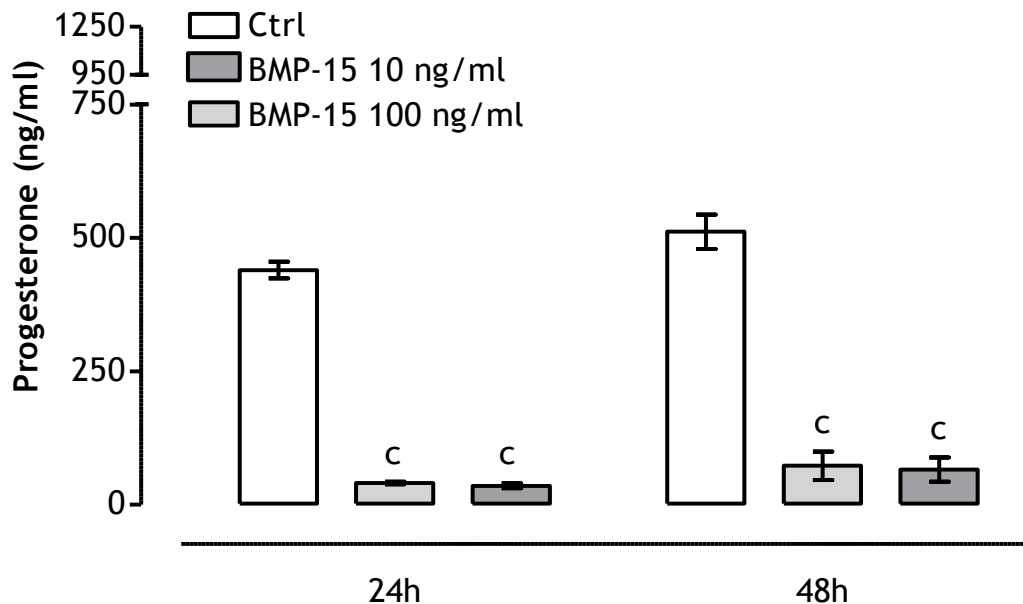
κοκκώδη κύτταρα τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες καλλιέργειας ( $p < 0.05$  και  $p < 0.001$  αντιστοίχως). Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων, που χρησιμοποιήθηκαν, δεν εμφανίστηκε σε κανένα από τα δυο χρονικά σημεία ελέγχου.



**Σχήμα 16.** Δράση της BMP-15 στην παραγωγή  $E_2$  από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε συγκέντρωση 10 και 100 ng/ml μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε ( $\pm$  SEM),  $n=5$  ασθενείς, a:  $p < 0.05$ , c:  $p < 0.001$  στατιστικά σημαντικά από control χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis.

Επιπρόσθετα, όσον αφορά την  $P_4$ , η έκκριση της επηρεάστηκε από την επίδραση της πρωτεΐνης BMP-15 σε όλες τις ώρες καλλιέργειας και σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 17). Συγκεκριμένα, η BMP-15 σε συγκέντρωση 10 και 100 ng/ml, διαφοροποίησε την έκκριση των βασικών επιπέδων προγεστερόνης από τα

κοκκώδη κύτταρα, προκαλώντας μείωση τόσο μετά από 24 όσο και μετά από 48 ώρες καλλιέργειας ( $p < 0.001$ ) (Σχήμα 6).



**Σχήμα 17.** Δράση της BMP-15 στην παραγωγή  $P_4$  από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε συγκέντρωση 10 και 100 ng/ml μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε ( $\pm$  SEM),  $n=5$  ασθενείς, c:  $p < 0.001$  στατιστικά σημαντικά από control χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis).

Επομένως, βασιζόμενοι στα παραπάνω συγκεντρωτικά αποτελέσματα που συνοψίζονται επίσης στον Πίνακα 2, οι συγκεντρώσεις των παραγόντων AMH και BMP-15, που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση αυτών σε συνδυασμό με την παρουσία ή την απουσία της FSH στο μέσο καλλιέργειας, ήταν οι ελάχιστες δυνατές που εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική επίδραση στη παραγωγή των στεροειδών ορμονών, δηλαδή 2 ng/ml για την AMH, 10 ng/ml για τον BMP-15 και 10 ng/ml για την FSH (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Συγκενρωτικά αποτελέσματα της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των ορμονών FSH, AMH και BMP-15 στην παραγωγή E<sub>2</sub> και P<sub>4</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα.

Ορμόνες	Estradiol		Progesterone	
	24h	48h	24h	48h
<b>Control</b>	643.6 ± 49.8	1089.0 ± 16.6	439.6 ± 15.8	511.5 ± 32.0
<b>FSH 10ng/ml</b>	1157.1 ± 156.9 <sup>c</sup>	2627.8 ± 100.3 <sup>c</sup>	382.5 ± 43.1	446.0 ± 32.1
<b>100ng/ml</b>	1067.6 ± 16.9 <sup>b</sup>	2896.4 ± 90.3 <sup>c</sup>	342.6 ± 35.6	408.7 ± 30.1
<b>AMH 2ng/ml</b>	590.0 ± 25.8	978.7 ± 31.4	29.7 ± 6.8 <sup>c</sup>	110.0 ± 23.6 <sup>c</sup>
<b>20ng/ml</b>	588.3 ± 74.5	896.0 ± 50.7	22.5 ± 15.7 <sup>c</sup>	104.7 ± 34.7 <sup>c</sup>
<b>100ng/ml</b>	473.3 ± 84.1	885.4 ± 87.5	21.7 ± 22.9 <sup>c</sup>	100.0 ± 32.6 <sup>c</sup>
<b>BMP-15</b>				
<b>10ng/ml</b>	356.2 ± 63.1 <sup>a</sup>	644.6 ± 84.6 <sup>c</sup>	40.7 ± 2.5 <sup>c</sup>	73.0 ± 26.4 <sup>c</sup>
<b>100ng/ml</b>	320.5 ± 75.9 <sup>a</sup>	602.4 ± 75.3 <sup>c</sup>	35.5 ± 4.3 <sup>c</sup>	65.9 ± 22.4 <sup>c</sup>

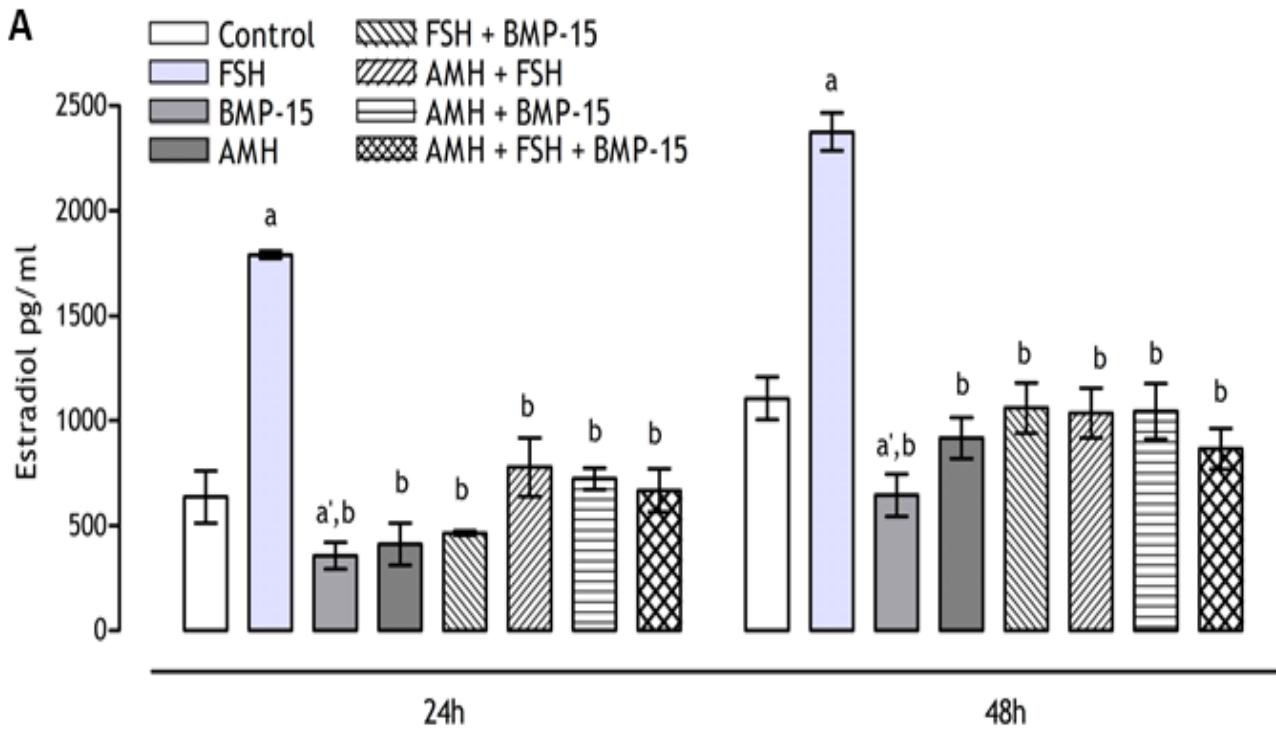
### **8.2 Επίδραση της AMH και της BMP-15 στην από την FSH-επαγόμενη παραγωγή E<sub>2</sub> και P<sub>4</sub> σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα**

Προκειμένου να διερευνηθεί εκτενέστερα η επίδραση των ορμονών AMH και BMP-15 στην παραγωγή E<sub>2</sub> και P<sub>4</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν οι ελάχιστες δυνατές συγκεντρώσεις των

ορμονών, όπως προαναφέρθηκε (Πίνακας 2), τόσο σε μεμονωμένη όσο και σε συνδυασμένη χορήγηση, απουσία η παρουσία του διεγέρτη FSH.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 18Α,Β. Πιο αναλυτικά, σε επίπεδο έκκρισης της  $E_2$ , η AMH δεν εμφάνισε καμία επίδραση στη βασική έκκριση αυτής από τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Αντιθέτως, προκάλεσε μια στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από την FSH παραγωγής  $E_2$ , τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες καλλιέργειας ( $p < 0.001$  και  $p < 0.001$  αντιστοίχως, Σχήμα 18Α).

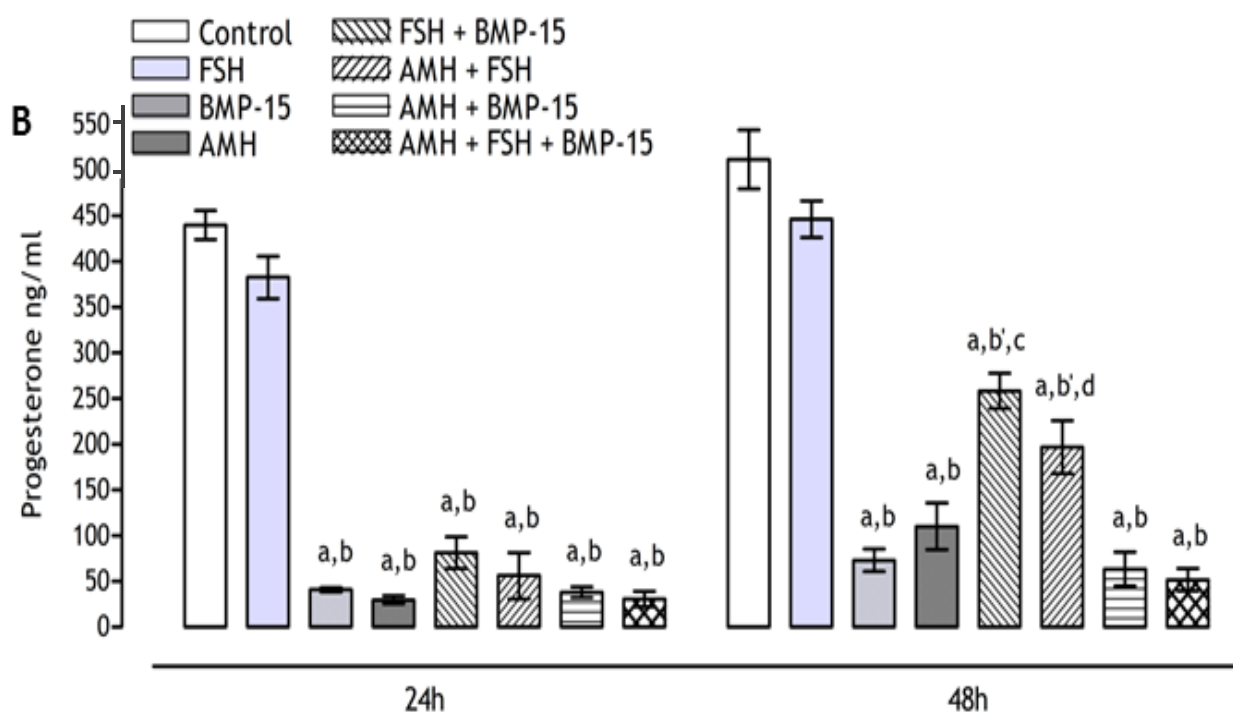
Από την άλλη πλευρά, η BMP-15 προκάλεσε μία στατιστικά σημαντική μείωση των βασικών επιπέδων έκκρισης της  $E_2$  και στα δύο χρονικά σημεία ελέγχου (Σχήμα 18, Πίνακας 2) και ομοίως με την AMH προκάλεσε επίσης μείωση της επαγόμενης από την FSH παραγωγή αυτής (24 ώρες  $p < 0.001$ , 48 ώρες  $p < 0.01$ ). Η συνδυασμένη χορήγηση των δύο παραγόντων εμφάνισε επίσης αρνητική επίδραση στην αύξηση της  $E_2$  ως απόκριση στην FSH (24 ώρες  $p < 0.001$ , 48 ώρες  $p < 0.001$ , Σχήμα 18Α), φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στη βασική έκκριση αυτής (Σχήμα 18Α).



**Σχήμα 18A:** Επίδραση της FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml) και των συνδυασμών τους στην έκκριση της E<sub>2</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κύτταρα μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε (± SEM), n=30 ασθενείς, a: p<0.001 και a': p<0.05 συγκρινόμενο με το control, b: p<0.001 και b': p<0.01 συγκρινόμενο με την FSH, χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis.

Όσον αφορά στην P<sub>4</sub>, η AMH εμφάνισε αρνητική επίδραση στα βασικά επίπεδα παραγωγής P<sub>4</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, πράγμα που μερικώς ανεστράφη με την προσθήκη της FSH μετά το πέρας 48 ωρών καλλιέργειας (p<0.05, Σχήμα 7B). Ομοίως, ενώ η πρωτεΐνη BMP-15 μείωσε τη βασική έκκριση και στα δύο σημεία ελέγχου, η προσθήκη της FSH στο μέσο καλλιέργειας ανέστρεψε αυτήν τη δράση, μειώνοντας στατιστικά σημαντικά τη δράση της BMP-15 (p<0.05, Σχήμα 18B). Αντιθέτως, ενδιαφέρον εμφανίζουν τα αποτελέσματα μετά τη συγχορήγηση της AMH και της BMP-15, όπου εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική καταστολή της βασικής παραγωγής προγεστερόνης, ενώ η προσθήκη της FSH στην καλλιέργεια δεν

διαφοροποίησε το γεγονός αυτό ούτε στις 24 αλλά ούτε και στις 48 ώρες καλλιέργειας (Σχήμα 18B).



**Σχήμα 18B:** Επίδραση της FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml) και των συνδυασμών τους στην έκκριση της P<sub>4</sub> από τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κύτταρα μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας. Δεδομένα εκφρασμένα σε (± SEM), n=30 ασθενείς, a: p<0.001 και a': p<0.05 συγκρινόμενο με το control, b: p<0.001 και b': p<0.01 συγκρινόμενο με την FSH, c: p<0.05 συγκρινόμενο με τον BMP-15, d: p<0.05 συγκρινόμενο με την AMH, χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis.



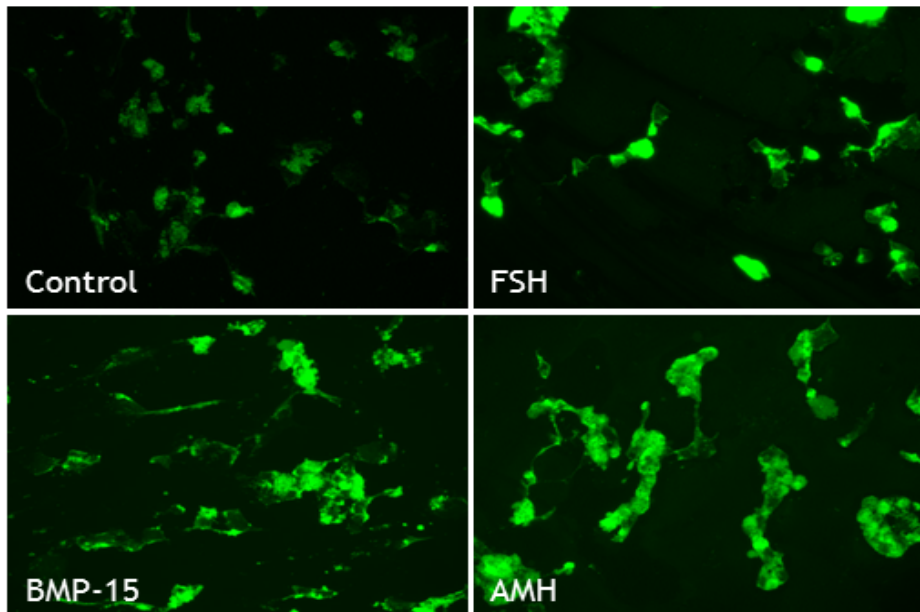
### **8.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην επίδραση της AMH και της BMP-15 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων**

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η δράση της AMH και του BMP-15 στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smad 5 και η έκφραση της πρωτεΐνης StAR. Τα αποτελέσματα δείχνουν, ότι η AMH και η BMP-15 αύξησαν την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Smad 5, Phospho 5 S<sup>463+465</sup>Smad5-immunoreactivity (IR) ( $p < 0.001$ , Σχήμα 19) και η συνδυασμένη χορήγηση των δύο παραγόντων είχε παρόμοια επίσης δράση ( $p < 0.001$ , Σχήμα 19).

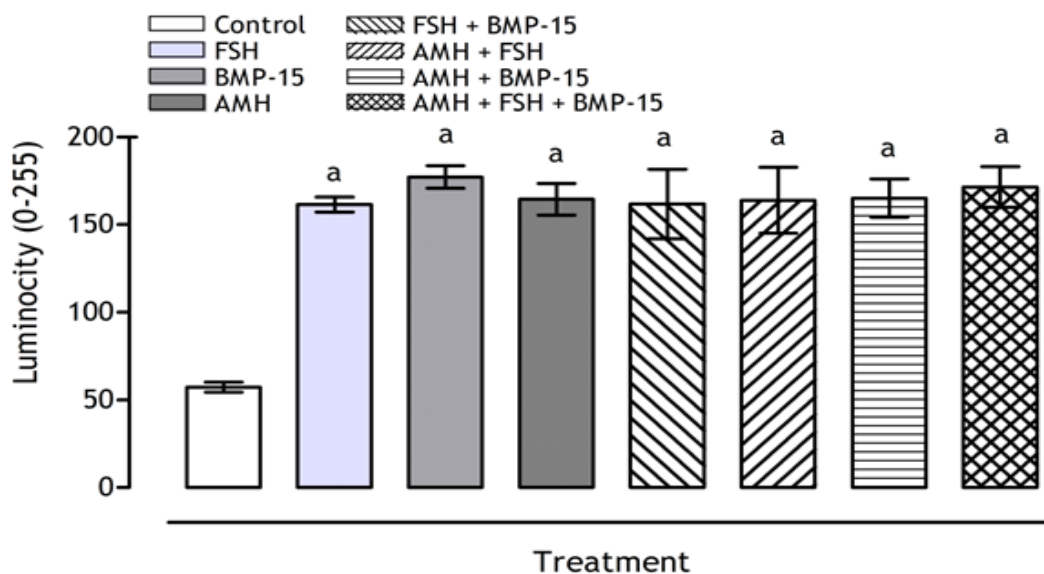
Όσον αφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης StAR, η μεμονωμένη χορήγηση της AMH και του BMP-15 μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από την FSH ανοσοαντίδραση (immunoreactivity –IR) της StAR ( $p < 0.001$ , Σχήμα 20), ενώ ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η ταυτόχρονη χορήγηση των δυο παραγόντων δεν προκάλεσε περαιτέρω μείωση, όπως ήταν αναμενόμενο, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των επιπέδων έκκρισης της προγεστερόνης, όπως προαναφέρθηκε.

A.

Phospho S<sup>463+465</sup>Smad5-IR



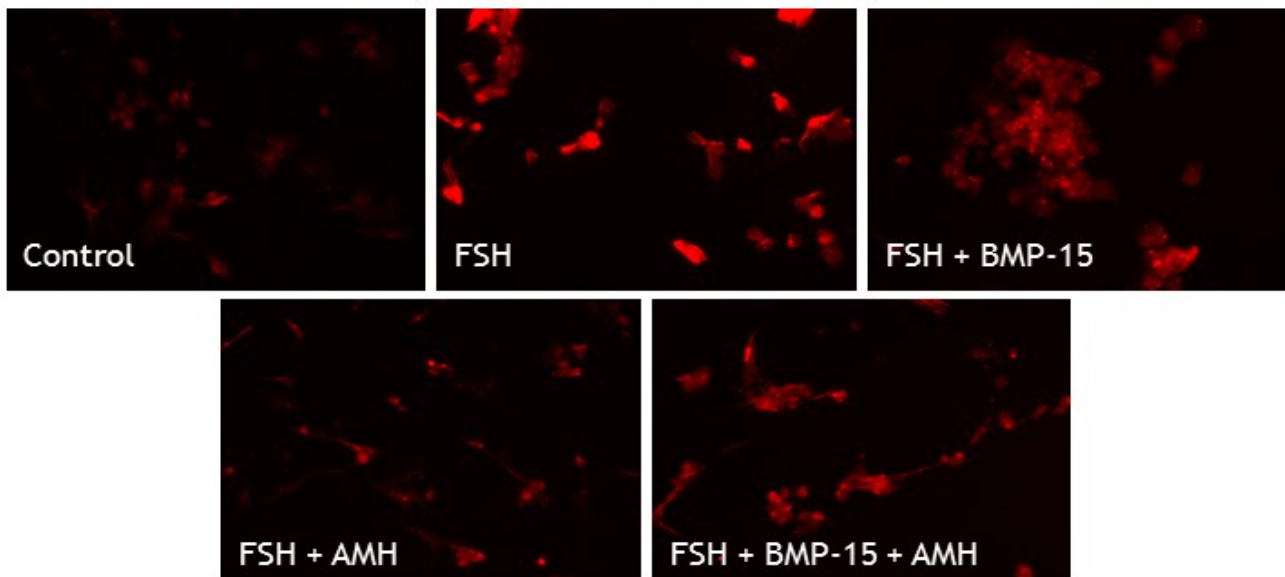
B.



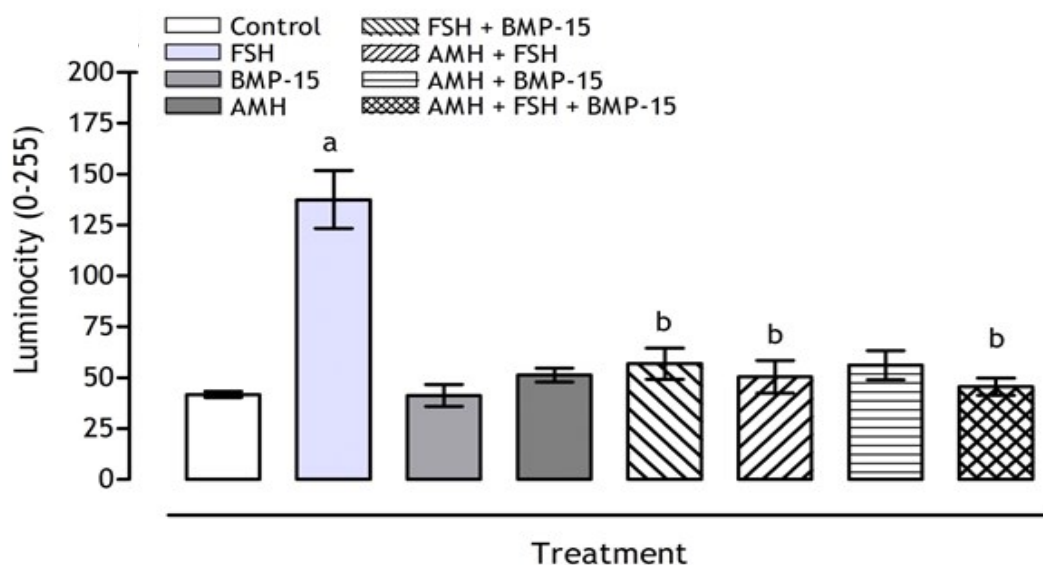
**Σχήμα 19:** **A.** Ειδική ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Phospho S<sup>463+465</sup> Smad5 σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από καλλιέργεια 48 ωρών σε serum free καλλιεργητικό υλικό ή σε υλικό εμπλουτισμένο με FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml). **B.** Επίδραση της FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml) και των συνδυασμών τους στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad5 σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από καλλιέργεια 48 ωρών. Δεδομένα εκφρασμένα σε (± SEM), n=30 ασθενείς, a: p<.001 συγκρινόμενο με το control. Στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis

A.

### StAR-IR



B.



**Σχήμα 20: A.** Ειδική ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης StAR σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από καλλιέργεια 48 ωρών σε υλικό εμπλουτισμένο με FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml). **B.** Επίδραση της FSH (10 ng/ml), AMH (2 ng/ml), BMP-15 (10 ng/ml) και των συνδυασμών τους στα επίπεδα της StAR σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα μετά από καλλιέργεια 48 ωρών. Δεδομένα εκφρασμένα σε ( $\pm$  SEM), n=30 ασθενείς, a:  $p < .0001$  συγκρινόμενο με το control, b:  $p < 0.001$  συγκρινόμενο με την FSH. Στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferroni post-test analysis

## 9.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι πλέον αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι η επικοινωνία μεταξύ του ωαρίου και των σωματικών κυττάρων, που το περιβάλλουν, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διεκπεραίωση μίας σειράς λειτουργιών, που είναι βασικές για την ανάπτυξη και ωρίμανση του ωαρίου (60). Μία από τις λειτουργίες αυτές, η στεροειδογενετική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων, αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης πολλαπλών επιστημονικών ερευνών.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η δράση της ορμόνης AMH, η οποία έχει τόπο προέλευσης τα κοκκώδη κύτταρα, και της πρωτεΐνης BMP-15, η οποία προέρχεται από το ωάριο, καθώς επίσης και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις στη στεροειδογενετική ικανότητα ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων. Εφαρμόστηκε σύστημα πρωτογενούς καλλιέργειας ενός επιπέδου, υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και CO<sub>2</sub>, απουσία ή παρουσία ενός φυσικού διεγέρτη της έκκρισης της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα, της ωοθυλακιοτρόπου δηλαδή ορμόνης FSH.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η BMP-15 φαίνεται να εμφανίζει επίδραση στην έκκριση της E<sub>2</sub> από τα κοκκώδη κύτταρα, καθότι μείωσε στο μισό τη βασική έκκριση της ορμόνης αυτής από αυτά, ενώ αντιθέτως η AMH, δεν παρουσίασε κάποια δράση στα βασικά επίπεδα παραγωγής αυτής.

Από την άλλη πλευρά, τόσο η BMP-15 όσο και η AMH, σε μεμονωμένη ή συνδυασμένη χορήγηση, φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την FSH και να προκαλούν μείωση στην

επαγόμενη από την FSH έκκριση της  $E_2$ . Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι ένα φαινόμενο προσθετικής δράσης, που θα οδηγούσε σε ακόμη μεγαλύτερη αναστολή της έκκρισης της οιστραδιόλης, ως απάντηση στην διεγερτική δράση της FSH, δεν προκύπτει.

Στην προσπάθεια σύγκρισης των αποτελεσμάτων μας με τα υπάρχοντα δεδομένα στην επιστημονική βιβλιογραφία, γύρω από τη δράση των παραγόντων AMH και BMP-15 στη ρύθμιση της παραγωγής  $E_2$  και  $P_4$  από τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, βρίσκουμε την εργασία μας να είναι η πρώτη που αφορά στη δράση της πρωτεΐνης BMP-15 στη βασική και στην επαγόμενη από την FSH παραγωγή της  $E_2$  από πρωτογενή ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια, προτείνοντας για πρώτη φορά ένα σημαντικό ρόλο αυτού του εκκρινόμενου από το ωάριο παράγοντα στη στεροειδογενετική διαδικασία στον άνθρωπο.

Ωστόσο, αναφερόμενοι στην επαγόμενη από την FSH παραγωγή της  $E_2$ , τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με δεδομένα, που προέρχονται από παλαιότερες μελέτες στον ποντικό, οι οποίες δείχνουν ότι η BMP-15 μειώνει την έκκριση της  $E_2$  ως απάντηση στην FSH, ενδεχομένως μέσω μείωσης της διεγερτικής επίδρασης της FSH στη σύνθεση του υποδοχέα της FSH-R (40, 48). Το γεγονός όμως, ότι η BMP-15 μειώνει την παραγωγή της  $E_2$  ακόμη και απουσία της διεγερτικής δράσης της FSH στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, υποδεικνύει έναν διαφορετικό μηχανισμό δράσης, στον οποίο δεν συμπεριλαμβάνεται η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα της FSH, αλλά ενδεχομένως η ρύθμιση της δράσης ή της σύνθεσης ενός διαφορετικού παράγοντα κατά μήκος της στεροειδογενετικής πορείας.

Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα μας σχετικά με την πιθανή αυτοκρινική/παρακρινική δράση της AMH στη βασική αλλά και την επαγόμενη από την FSH παραγωγή της  $E_2$ , είναι σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες, όπου προτείνεται πως η AMH μειώνει την ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων στην FSH μέσω ελαχιστοποίησης της ενεργότητας του ενζύμου αρωματάση P450 (39, 49, 50) και της έκφρασης του mRNA του υποδοχέα της FSH (51).

Επιπρόσθετα, αναφερόμενοι στην  $P_4$ , η βασική έκκριση αυτής μειώνεται τόσο από την AMH όσο και από την BMP-15, ενώ η προσθήκη της FSH στην καλλιέργεια εξασθενεί μερικώς τη δράση αυτή. Με βάση τα όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη για την δράση της AMH στην παραγωγή της  $P_4$  από πρωτογενή ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε περιβάλλον απουσίας ή παρουσίας της FSH. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την σημασία της AMH στη στεροειδογένεση, καθότι δείχνουν την πιθανή επίδραση της απέναντι όχι μόνο στη ρύθμιση της παραγωγής της  $E_2$  αλλά και στη ρύθμιση της έκκρισης της  $P_4$ . Όσον αφορά στον BMP-15, η παρατηρούμενη μείωση της έκκρισης της  $P_4$  από τα πρωτογενή ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα σε απουσία ή παρουσία της διεγερτικής δράσης της FSH είναι σε συμφωνία με υπάρχοντα δεδομένα, που προκύπτουν από κυτταρικές σειρές ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων (tumor-derived human granulosa cell line –KGN) (39) και κοκκώδη κύτταρα ποντικού (40, 48), παρέχοντας ταυτοχρόνως περαιτέρω δεδομένα υπέρ της σημαντικότητας του παράγοντα αυτού στη ρύθμιση της έκκρισης της προγεστερόνης. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που η AMH χορηγείται σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη BMP-15, η FSH αδυνατεί να εμφανίσει κάποια αντισταθμιστική επίδραση στην έκκριση της  $P_4$ , αφήνοντας τα επίπεδα της ιδιαίτερα χαμηλά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μία πιθανή

αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων υπέρ της «εξάλειψης» της διεγερτικής δράσης της FSH στην παραγωγή της προγεστερόνης.

Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα της παρούσης εργασίας δείχνουν μία αλληλεπίδραση μεταξύ της BMP-15 και της AMH με την FSH στη ρύθμιση της έκκρισης της P<sub>4</sub>, μία επαγόμενη από την FSH παραγωγή P<sub>4</sub>, όταν η FSH χορηγείται μεμονωμένα, δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δύο χρονικά σημεία ελέγχου, δηλαδή των 24 και 48 ωρών καλλιέργειας. Στην προσπάθεια να διερευνηθεί περαιτέρω το γεγονός αυτό, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH στη σύνθεση της πρωτεΐνης StAR, μετρώντας την ενεργότητα αυτής σε περιβάλλον παρουσίας ή απουσίας της BMP-15 και/ή της AMH μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της FSH και των δύο άλλων παραγόντων. Παλαιότερες μελέτες στον ποντικό και στον άνθρωπο έχουν δείξει ότι η παραγωγή της P<sub>4</sub>, ως απάντηση στην δράση της FSH, σχετίζεται με μία αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της StAR (61) αλλά και των επιπέδων του τελικού παραγώγου, δηλαδή της ίδιας της πρωτεΐνης StAR (62-66). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η BMP-15 και η AMH δεν έχουν καμία επίδραση στα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης StAR. Η FSH όμως αυξάνει σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής, ενώ η BMP-15 και η AMH, όταν χορηγούνται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, ελαχιστοποιούν έντονα τη διεγερτική επίδραση της FSH στην έκφραση αυτής, το οποίο επιβεβαιώνει και τη μείωση της επαγόμενης από την FSH παραγωγή της προγεστερόνης από τον BMP-15 και την AMH.

Η διαφορά μεταξύ της έκκρισης της  $P_4$  και της έκφρασης της πρωτεΐνης StAR, ως απάντηση στην FSH μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, οφείλεται ενδεχομένως στην προέλευση των κοκκωδών κυττάρων. Πιο αναλυτικά, τα κοκκώδη κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν ωχρινοποιημένα. Προέρχονταν δηλαδή από γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε 36 ώρες πριν την ωοληψία hCG για την τελική ωρίμανση του ωοθυλακίου και του ωαρίου, στα πλαίσια της θεραπείας τους. Όπως είναι καλά γνωστό, η hCG έχει δράση παρόμοια με την LH, τροποποιώντας το μεταβολικό προφίλ των κοκκωδών κυττάρων προς υψηλή παραγωγή  $P_4$ . Ωστόσο, δεδομένα από το εργαστήριο μας δείχνουν ότι, η επιμήκυνση του χρόνου επώασης των κοκκωδών κυττάρων, σύμφωνα με το δικό μας σύστημα καλλιέργειας, οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή τόσο των βασικών επιπέδων  $P_4$  όσο και αυτών, ως απάντηση στη δράση της FSH (47, 54). Επομένως βασιζόμενοι σε αυτήν την παρατήρηση, περιορίσαμε την μελέτη μας στο χρονικό σημείο εξέτασης των 48 ωρών καλλιέργειας, όπου τα κοκκώδη κύτταρα εμφανίζουν καλύτερη βιωσιμότητα και όπου μάλιστα η δράση των παραγόντων AMH και BMP-15 είναι ήδη εμφανής μετά από 24 ώρες καλλιέργειας.

Όπως ήδη σημειώθηκε, τόσο η AMH όσο και η BMP-15 μειώνουν την επαγόμενη από την FSH ανοσοδραστικότητα της πρωτεΐνης StAR (StAR-IR). Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε, αυτήν είναι η πρώτη αναφορά για τη δράση της AMH στα επίπεδα της πρωτεΐνης StAR, ενώ στα πλαίσια της δράσης του BMP-15, προηγούμενες μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα ποντικού και όρνιθας επίσης έδειξαν την ανασταλτική δράση της BMP-15 στην από την FSH επαγόμενη παραγωγή τόσο του mRNA (48, 67) όσο και της πρωτεΐνης της StAR (55, 68).



Βασιζόμενοι στις παραπάνω παρατηρήσεις, η χορήγηση της AMH και της BMP-15 φαίνεται να μεταβάλλουν το στεροειδογενετικό προφίλ των κοκκωδών κυττάρων *in vitro*, εφόσον παρατηρήθηκε μία μείωση στα επίπεδα παραγωγής  $E_2$  και  $P_4$ . Στην προσπάθεια να ενισχύσουμε το εύρημα ότι, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν οφειλόταν αποκλειστικά και μόνο στη δράση της AMH και του BMP-15, μέσω πρόσδεσης αυτών στους κυτταρικούς τους υποδοχείς και με μία μετέπειτα ενεργοποίηση του αντίστοιχου καταρράκτη ενδοκυττάρων μηνυμάτων, μελετήσαμε επίσης τους ενδοκυτταρίους μηχανισμούς ενεργοποίησης του ενδοκυττάρου μονοπατιού.

Όπως αναφέρθηκε, τόσο η AMH όσο και η BMP-15 είναι μέλη της υπερ-οικογένειας των TGF- $\beta$  παραγόντων και ασκούν τις δράσεις τους ενδοκυτταρικά μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Smad (13, 69-71). Η ενεργοποίηση του αντίστοιχου μονοπατιού των TGF- $\beta$  παραγόντων επιβεβαιώθηκε πειραματικά έχοντας ως στόχο την ενεργοποιημένη, δηλαδή την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Smad5, η οποία αποτελεί κοινό σημείο ενεργοποίησης και των δύο προς μελέτη παραγόντων. Πράγματι, η AMH και η BMP-15, παρουσίασαν μία αύξηση και μάλιστα στο τριπλάσιο σε σύγκριση με το control, στα επίπεδα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης Smad5, όπως φάνηκε ανοσοιστοχημικά, επιβεβαιώνοντας την ενεργοποίηση του ενδοκυττάρου μονοπατιού των υποδοχέων σερίνης/θρεονίνης

. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα μελετών, που διεξήχθησαν σε τρωκτικά (rodents) (20, 23, 26, 72-74) και σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων κοκκωδών

κυττάρων(75). Σε αυτά βρέθηκε ότι η AMH επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad5, μέσω σύνδεσης στο σύμπλεγμα των υποδοχέων τύπου I και τύπου II, AMHRII/-ALK2/3/6, της AMH. Επίσης, μελέτες σε κυτταρικές σειρές και συγκεκριμένα στα κύτταρα COV434, έδειξαν ότι ο BMP-15 ασκεί τις δράσεις του προσδένοντας αρχικά στον υποδοχέα του τύπου I και τύπου II, BMPRII/ALK3, και μετέπειτα ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση του συμπλέγματος Smad1/5/8 (76). Το γεγονός ότι η Smad5 είναι κοινός στόχος της AMH και του BMP-15 στο σύστημα μας, μπορεί να εξηγήσει γιατί η συνδυασμένη χορήγηση των παραγόντων δεν οδηγεί σε προσθετική δράση σε επίπεδο παραγωγής των στεροειδών ορμονών.

Τελικά, παρατηρήθηκε ότι η FSH προκαλεί και αυτή αύξηση στα επίπεδα της ενεργοποιημένης μορφής της Smad5, εφόσον παρατηρήθηκε ανοσοιστοχημικά μία αύξηση στην ανοσοαντιδραστικότητα της PhosphoS<sup>463+465</sup>Smad5-IR. Αυτό το εύρημα είναι επίσης σε συμφωνία και προσθέτει ένα επιπλέον στοιχείο σε μία προηγούμενη μελέτη σε κοκκώδη κύτταρα κυτταρικών σειρών -human ovarian granulosa-like tumor cell line KGN (77), όπου βρέθηκε ότι η χορήγηση της FSH αυξάνει το mRNA της Smad5 και όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας οδηγεί και σε αύξηση σε επίπεδο πρωτεΐνης με μία μετέπειτα ενεργοποίηση αυτής. Από αυτά προκύπτει και ένας επιπλέον πιθανός στόχος δράσης της FSH, πέρα από την ενεργοποίηση της cAMP εξαρτώμενης-κινάσης A (78-80) και προστίθεται ένα επιπλέον στοιχείο στο μηχανισμό ρύθμισης της έκκρισης της E<sub>2</sub> και της P<sub>4</sub> στα κοκκώδη ανθρώπινα κύτταρα. Περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για τη διερεύνηση των ενδοκυττάρων μηχανισμών δράσης της, ώστε να διευκρινιστεί πλήρως η σχέση της FSH με το σηματοδοτικό

μονοπάτι των TGF- $\beta$  παραγόντων στο πλαίσιο της στεροειδογένεσης των κοκκωδών κυττάρων στον άνθρωπο.

## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι δύο μέλη της υπερ-οικογένειας των TGF- $\beta$  παραγόντων, συγκεκριμένα η AMH (ένας παράγοντας προερχόμενος από τα κοκκώδη κύτταρα) και η BMP-15 (μία πρωτεΐνη προερχόμενη από το ωάριο), διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της στεροειδογένεσης στα κοκκώδη κύτταρα του ανθρώπου. Και οι δύο αυτές ουσίες φαίνεται να επηρεάζουν τη δράση της FSH, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Smad5, η οποία αποτελεί κοινό σημείο ενεργοποίησης και ρύθμισης του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού των παραγόντων AMH και BMP-15. Επίσης, μέσω της ανασταλτικής τους δράσης στη στεροειδογενετική πρωτεΐνη StAR, η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστή της στεροειδογένεσης στον άνθρωπο και συγκεκριμένα της μετατροπής της χοληστερόλης προς παραγωγή  $E_2$  και  $P_4$ , η AMH και η BMP-15 αντισταθμίζουν τη δράση της FSH στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα.

Επομένως, είναι πιθανόν ότι τόσο η AMH όσο και η BMP-15 λειτουργούν με ένα τρόπο, ώστε να αμβλύνεται η δράση της FSH στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Ενδεχομένως, μια υπερβολική αύξηση των επιπέδων της  $E_2$  και της  $P_4$ , λόγω της μη ελεγχόμενης δράσης της FSH, θα οδηγούσε σε μια μη φυσιολογική πρόωμη ωρίμανση του ωοθυλακίου και γενικά σε μια διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ της ωρίμανσης του επικρατούντος ωοθυλακίου και του αριθμού των ωοθυλακίων, που οδηγούνται σε ατρησία. Η παρουσία μιας συντονισμένης διαδικασίας ωρίμανσης και ατρησίας των

ωοθυλακίων στη γυναίκα είναι μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση των αποθηκών της ωοθήκης σε πρωτογενή ωοθυλάκια και συνεπώς για τη διατήρηση της γονιμότητας.

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης προέρχονται από ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα σε καλλιέργεια. Ως εκ τούτου, τα ευρήματα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή, αφού δεν αντανακλούν υποχρεωτικά τις in vivo διαδικασίες ωοθυλακικής ωρίμανσης. Παρ' όλα αυτά, παρέχουν ενδείξεις για τον πιθανό ρόλο των παραπάνω ουσιών, μια και πειράματα σε κοκκώδη κύτταρα μικρότερων ωοθυλακίων, τα οποία δεν θα έχουν υποστεί ωχρινοποίηση, είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν, λόγω της δυσκολίας εξεύρεσης του κατάλληλου υλικού.

## 11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στην προσπάθεια διερεύνησης των δράσεων της αντιμυλλέριας ορμόνης (AMH) και της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης -15 (BMP-15) στην παραγωγή οιστραδιόλης ( $E_2$ ) και προγεστερόνης ( $P_4$ ) από πρωτογενή ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κύτταρα απουσία ή παρουσία της ορμόνης FSH. Τα εμπλεκόμενα ενδοκυττάρια μονοπάτια και οι μηχανισμοί δράσεις αποτέλεσαν επίσης αντικείμενο μελέτης.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν, κατόπιν γραπτής συναίνεσης, ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό 30 γυναικών, που υποβλήθηκαν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα κοκκώδη κύτταρα, καλλιεργήθηκαν, μετά από μία περίοδο προεπάσης 24 ωρών, σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς ορό παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των ορμονών AMH, BMP-15 και FSH, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Η παραγωγή  $E_2$  και  $P_4$ , καθώς επίσης η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad5 και η έκφραση της πρωτεΐνης StAR, μελετήθηκαν παράλληλα. Οι στεροειδείς ορμόνες μετρήθηκαν ανοσοενζυμικά στο υπερκείμενο των καλλιεργειών, ενώ η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού, στο οποίο εμπλέκεται η πρωτεΐνη Smad5 και η μέτρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης StAR πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικά.

Βρέθηκε ότι η χορήγηση της AMH στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα για 24 και 48 ώρες εξασθένησε την επαγόμενη από την FSH έκκριση της  $E_2$  ( $p < 0.001$ ), ενώ δεν εμφάνισε καμία δράση στη βασική έκκριση αυτής. Επίσης, η AMH μείωσε τη βασική παραγωγή  $P_4$  ( $p < 0.001$ ) και την επαγόμενη από την FSH έκφραση της πρωτεΐνης StAR ( $p < 0.001$ ). Από

την άλλη πλευρά, η BMP-15 προκάλεσε μείωση στη βασική έκκριση της  $E_2$  από τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα και παρόμοια με την AMH εξασθένησε και αυτή την επαγόμενη από την FSH παραγωγή της  $E_2$  ( $p < 0.001$ ). Επιπρόσθετα, η BMP-15 μείωσε την βασική παραγωγή της  $P_4$  ( $p < 0.001$ ), γεγονός που αντιστράφηκε μερικώς με την προσθήκη της FSH στην καλλιέργεια ( $p < 0.01$ ), πιθανότατα λόγω αύξησης των επιπέδων της StAR ( $p < 0.001$ ). Επίσης, η BMP-15 προκάλεσε μείωση των επιπέδων της επαγόμενης από την FSH παραγωγή της StAR ( $p < 0.001$ ). Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των πρωτεϊνών Smad επιβεβαιώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, εφόσον παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της σηματοδοτικής πρωτεΐνης Smad5 ( $p < 0.001$  σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου).

Συμπερασματικά, η AMH και η BMP-15, αλληλεπιδρώντας με την FSH, επηρεάζουν την παραγωγή της  $E_2$  και της  $P_4$  σε πρωτογενή ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κύτταρα, πιθανά μέσω της Smad5 σηματοδότησης. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν ενδείξεις για την πιθανή συμμετοχή των ουσιών αυτών στη διαδικασία στεροειδογένεσης και ωοθυλακικής ωρίμανσης. Περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για τη διερεύνηση του ρόλου των ουσιών αυτών στη φυσιολογία της ωοθήκης.

## 12. SUMMARY

### **Effect of Anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinized granulosa cells through Smad5 signalling.**

**Purpose:** To determine if there is any effect of AMH and BMP-15 on estradiol and progesterone production from primary-cultured human luteinized granulosa cells, to delineate what is the effect of FSH on their actions and which are the possible mechanisms involved.

**Methods:** Luteinized granulosa cells (GCs), obtained from follicular fluid of 30 women undergoing *in vitro* fertilization, were cultured, after a short 24-hour preincubation period, in serum-free medium for 24 or/and 48 hours in the presence/absence of various concentrations of AMH, BMP-15 and FSH alone or in combinations. Estradiol and progesterone production, SMAD5 phosphorylation and StAR expression were studied in parallel. Steroids were measured in culture-supernatant using enzyme-immunoassays, while Smad5-signaling pathway activation and StAR protein expression were assessed immunocytochemically.

**Result(s):** We found that the treatment of AMH in GCs for 24/48 hours attenuated FSH-induced estradiol production ( $p < 0.001$ ), had no effect on basal estradiol levels, decreased basal progesterone production ( $p < 0.001$ ) and FSH-induced StAR expression ( $p < 0.001$ ). On the other hand, BMP-15 decreased basal estradiol levels ( $p < 0.001$ ) and attenuated FSH-induced estradiol production ( $p < 0.001$ ). Furthermore, BMP-15 reduced progesterone basal secretion ( $p < 0.001$ ), an effect that was partially reversed by FSH



( $p < 0.01$ ), probably via increasing StAR expression ( $p < 0.001$ ). FSH-induced StAR expression was also attenuated by BMP-15 ( $p < 0.001$ ). FSH, AMH and BMP-15 activated Smad-signaling pathway, as confirmed by the increase of phospho-Smad5 protein levels ( $p < 0.001$  compared to control).

**Conclusion(s):** AMH and BMP-15 by interacting with FSH affect the production of estradiol and progesterone from cultured luteinized-granulosa cells possibly via Smad5-protein phosphorylation.

### 13. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ – ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Prapa E, Vasilaki A, Dafopoulos K, Katsiani E, Georgoulas P, Messini CI, Anifandis G, Messinis IE. **Effect of Anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinizing granulosa cells through Smad5 signalling.** J Assist Reprod Genet. 2015 Jul;32(7):1079-88.
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Annual Meeting, (29.06 – 02.07. 2014), Poster Presentation of Phd Thesis. Title: **Effect of Anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinizing granulosa cells through Smad5 signalling.**  
Prapa E, Vasilaki A, Dafopoulos K, Katsiani E, Georgoulas P, Messini CI, Anifandis G, Messinis IE



## 14 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? P. Biol Reprod. 2014 Apr 25; 90(4):85 Biol Reprod. 2014 Apr 25; 90(4):85. Review
2. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertil Steril. 2001 Nov;76(5):943-9. Review
3. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev. 2000 Apr;21(2):200-14. Review
4. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod. 1986 Feb;1(2):81-7
5. Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. Fertil Steril. 2008
6. Wood JR, Strauss JF 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. Rev Endocr Metab Disord. 2002 Jan;3(1):33-46. Review
7. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. Mol Cell Endocrinol. 1994 Apr;100(1-2):51-4. Review

8. Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jun 26;1486(1):184-97. Review
9. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol*. 2000 Mar;164(3):247-53. Review
10. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Sep;1205:5-11
11. Whitelaw PF, Smyth CD, Howles CM, Hillier SG. Cell-specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. *J Mol Endocrinol*. 1992 Dec;9(3):309-12
12. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004 Jul;82-83:431-46. Review
13. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006 Aug;132(2):191-206. Review
14. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004 May;29(5):265-73. Review
15. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal*. 2002 Dec;14(12):977-88. Review
16. Kamato D, Burch ML, Piva TJ, Rezaei HB, Rostam MA, Xu S, Zheng W, Little PJ, Osman N. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell Signal*. 2013 Oct;25(10):2017-24. Review

17. Zhang J, Zhang X, Xie F, Zhang Z, van Dam H, Zhang L, Zhou F. The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell*. 2014 Jul;5(7):503-17. doi: 10.1007/s13238-014-0058-8. Epub 2014 Apr 23. Review
18. Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Apr 29;234(1-2):67-73. Review
19. van Houten EL, Themmen AP, Visser JA. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2010 May;71(3):191-7. Review
20. Visser JA. AMH signaling: from receptor to target gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Dec 15;211(1-2):65-73. Review
21. Taieb J, Grynberg M, Pierre A, Arouche N, Massart P, Belville C, Hesters L, Frydman R, Catteau-Jonard S, Fanchin R, Picard JY, Josso N, Rey RA, di Clemente N. FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2011 Apr;25(4):645-55
22. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol*. 2004 Feb 1;266(1):201-8.
23. Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*. 2006 Jul-Aug;12(4):373-83. Epub 2006 Apr 7. Review

24. Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. Mol Cell Endocrinol. 2001 Jun 20;179(1-2):25-32. Review
25. Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. Genes Dev. 1996 Oct 15;10(20):2577-87
26. Visser JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol. 2005 Apr 29;234(1-2):81-6. Review
27. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology. 2001 Nov;142(11):4891-9
28. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology. 2002 Mar;143(3):1076-84
29. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Hum Reprod. 2006 Sep;21(9):2223-7.
30. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction. 2006 Jan;131(1):1-9. Review.

- 31.** Arabzadeh S, Hossein G, Rashidi BH, Hosseini MA, Zeraati H. Comparing serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone as a predictor of in vitro fertilization outcomes in patients with and without polycystic ovary syndrome. Ann Saudi Med. 2010 Nov-Dec;30(6):442-7.
- 32.** Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril. 2009 Jul;92(1):217-21.
- 33.** Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. Hum Reprod. 2006 Jan;21(1):159-63.
- 34.** Romualdi D, Di Florio C, Tagliaferri V, De Cicco S, Gagliano D, Immediata V, Lanzone A, Guido M. The Role of Anti-Müllerian Hormone in the Characterization of the Different Polycystic Ovary Syndrome Phenotypes. Reprod Sci. 2015 Dec 29
- 35.** Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. Hum Reprod Update. 2014 Nov-Dec;20(6):869-83. doi: 10.1093/humupd/dmu036. Epub 2014 Jun 30. Review
- 36.** Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. Am J Hum Genet. 2004 Jul;75(1):106-11.



- 37.** Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):1-5. Review
- 38.** Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. Mol Endocrinol. 1998 Dec;12(12):1809-17
- 39.** Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Leung PC. BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells. Mol Endocrinol. 2013 Dec;27(12):2093-104
- 40.** Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39523-8
- 41.** Otsuka F, Shimasaki S. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. Endocrinology. 2002 Dec;143(12):4938-41
- 42.** Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH. Bmp15 mutations and ovarian function. Mol Cell Endocrinol. 2002 May 31;191(1):15-8. Review.
- 43.** Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries). Biol Reprod. 2004 Apr;70(4):900-9.

44. Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. Mol Reprod Dev. 2011 Jan;78(1):9-21.
45. Liu J, Wang B, Wei Z, Zhou P, Zu Y, Zhou S, Wen Q, Wang J, Cao Y, Ma X. Mutational analysis of human bone morphogenetic protein 15 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. Metabolism. 2011 Nov;60(11):1511-4.
46. Tiotiu D, Alvaro Mercadal B, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, Delbaere A. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. Hum Reprod. 2010 Jun;25(6):1581-7
47. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. Hum Reprod. 2007 Jun;22(6):1526-31.
48. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. J Biol Chem. 2001 Apr 6;276(14):11387-92
49. Li L, Mo YQ, Chen XL, Li Y, Chen YX, Zhong JM, Yang DZ. [Effect of anti-Müllerian hormone on P450 aromatase mRNA expression in cultured human luteinized granulosa cells]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2009 Mar;44(3):191-5.
50. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. Fertil Steril. 2008 May;89(5 Suppl):1364-70.

51. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. Fertil Steril. 2011 Nov;96(5):1246-51.e1.
52. Lyet L, Louis F, Forest MG, Josso N, Behringer RR, Vigier B. Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-müllerian hormone expression in transgenic mice. Biol Reprod. 1995 Feb;52(2):444-54.
53. di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, Vigier B. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. Development. 1992 Mar;114(3):721-7.
54. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Pols HA, Simoni M, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. Hum Reprod. 2007 Jun;22(6):1547-54
55. Elis S, Dupont J, Couty I, Persani L, Govoroun M, Blesbois E, Batellier F, Monget P. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. J Endocrinol. 2007 Sep;194(3):485-97
56. Zielniok K, Gajewska M, Motyl T. Molecular actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone and their relationship with cellular signaling pathways. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2014 Jun 9;68:777-92. Review

57. Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, Micevych P. Hormonal regulation of female reproduction. *Horm Metab Res*. 2012 Jul;44(8):587-91. Review
58. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;29(4):557-68. Review
59. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015 Nov;94 Suppl 161:8-16. doi: 10.1111/aogs.12771. Review
60. Knight PG, Glister C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*. 2003 Oct 15;78(3-4):165-83. Review
61. Minegishi T, Tsuchiya M, Hirakawa T, Abe K, Inoue K, Mizutani T, Miyamoto K. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in rat granulosa cells. *Life Sci*. 2000;67(9):1015-24.
62. Tajima K, Hosokawa K, Yoshida Y, Dantes A, Sasson R, Kotsuji F, Amsterdam A. Establishment of FSH-responsive cell lines by transfection of pre-ovulatory human granulosa cells with mutated p53 (p53val135) and Ha-ras genes. *Mol Hum Reprod*. 2002 Jan;8(1):48-57
63. Anttonen M, Färkkilä A, Tauriala H, Kauppinen M, Maclaughlin DT, Unkila-Kallio L, Bützow R, Heikinheimo M. Anti-Müllerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis. *Lab Invest*. 2011 Nov;91(11):1605-14

64. Pulkki MM, Mottershead DG, Pasternack AH, Muggalla P, Ludlow H, van Dinther M, Myllymaa S, Koli K, ten Dijke P, Laitinen M, Ritvos O. A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 2012 Mar;153(3):1509-18
65. Wachs DS, Coffler MS, Malcom PJ, Chang RJ. Serum anti-mullerian hormone concentrations are not altered by acute administration of follicle stimulating hormone in polycystic ovary syndrome and normal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 May;92(5):1871-4.
66. Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1034-40.
67. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Dec;88(12):5957-62
68. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol*. 2004 Feb 1;266(1):201-8
69. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 2005 Mar-Apr;11(2):143-60. Epub 2005 Feb 10. Review.

70. Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. Anim Reprod Sci. 2004 Jul;82-83:447-60. Review.
71. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Aug;84(8):2744-50.
72. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. Dev Biol. 2004 Feb 1;266(1):201-8
73. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. Endocrinology. 1995 Dec;136(12):5614-22.
74. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. Dev Biol. 2004 Feb 1;266(1):201-8
75. Anttonen M, Färkkilä A, Tauriala H, Kauppinen M, Maclaughlin DT, Unkila-Kallio L, Bützow R, Heikinheimo M. Anti-Müllerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis. Lab Invest. 2011 Nov;91(11):1605-14

- 76.** Pulkki MM, Mottershead DG, Pasternack AH, Muggalla P, Ludlow H, van Dinther M, Myllymaa S, Koli K, ten Dijke P, Laitinen M, Ritvos O. A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 2012 Mar;153(3):1509-18
- 77.** Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod*. 2006 Jun;74(6):1073-82.
- 78.** Nordhoff V, Sonntag B, von Tils D, Götte M, Schüring AN, Gromoll J, Redmann K, Casarini L, Simoni M. Effects of the FSH receptor gene polymorphism p.N680S on cAMP and steroid production in cultured primary human granulosa cells. *Reprod Biomed Online*. 2011 Aug;23(2):196-203.
- 79.** McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):200-14. Review.
- 80.** Földesi I, Breckwoldt M, Neulen J. Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1998 Jun;13(6):1455-60.





