



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ-ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

*«Μελέτη του αριθμού των επαναλήψεων CGG του γονιδίου FMR1
σε φυσιολογικές γυναίκες και γυναίκες σε πρωτόκολλο IVF»*

ΕΛΕΝΗ Χ. ΘΕΟΧΑΡΗ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ
Α.Μ.: 20120443

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2017



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική»

Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη του αριθμού των επαναλήψεων CGG του γονιδίου FMR1 σε φυσιολογικές γυναίκες και γυναίκες σε πρωτόκολλο IVF»

Ελένη Χ. Θεοχάρη – Βιολόγος

A.M 20120443

Επιβλέπουσα

- **Μαυρογιάννη Δέσποινα**, Δρ. Μοριακής Βιολογίας – Ε.ΔΙ.Π Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Λουτράδης Δημήτριος**, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Δρακάκης Πέτρος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Α΄ Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Καλλιανίδης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Α΄ Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Αθήνα, Μάρτιος 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ και στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία», στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική», της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θερμά ευχαριστώ στον κ. Δημήτριο Λουτράδη, Καθηγητή Μαιευτικής & Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ για την ευκαιρία της παρακολούθησης του συγκεκριμένου ΠΜΣ , ενός προγράμματος με υψηλότατο ακαδημαϊκό επίπεδο, καταξιωμένους και υψηλότατου επιστημονικού κύρους ομιλητές σχεδιασμένο ώστε να καλύψει άριστα τις γνωσιακές ανάγκες σε έναν τόσο γρήγορα εξελισσόμενο τομέα όπως αυτόν της Αναπαραγωγικής – Αναγεννητικής Ιατρικής. Είναι βέβαιο πως η παρακολούθηση του Προγράμματος συνέβαλε καθοριστικά στην επέκταση του γνωστικού μου αντικειμένου αλλά και στη βελτίωση της άσκησης της επαγγελματικής μου δραστηριότητας.

Η επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Δέσποινα Μαυρογιάννη, Ε.Δι.Π Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Μοριακή Βιολόγο του Τμήματος Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, την οποία θερμά ευχαριστώ για την επιλογή και την ανάθεση ενός τόσο επίκαιρου θέματος, για όλη τη γνώση που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια του πειραματικού και του συγγραφικού μέρους της εργασίας αλλά και για την υπομονή της στη δική μου επιμονή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Π. Δρακάκη και Κ. Καλλιανίδη, της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για όλες τις διορθώσεις και επισημάνσεις προς βελτίωση της παρούσας εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες στους Καθηγητές και Επιβλέποντες για την παρότρυνση και την ευκαιρία που έδωσαν στην παρούσα εργασία να ανακοινωθεί στο 14^ο Ετήσιο Συνέδριο της Μεσογειακής Εταιρείας Αναπαραγωγικής Ιατρικής.

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συνεργασία του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή και τέως Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Καναβάκη Εμμανουήλ καθώς επίσης και την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών Κίτσιου – Τζέλη Σοφία, για την συναίνεση στην πραγματοποίηση του

πειραματικού μέρους της εργασίας στο εν λόγω εργαστήριο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη Δρ. Σοφοκλέους Χρισταλένα, Μοριακή Βιολόγο και εργαστηριακή υπεύθυνη του κέντρου αναφοράς για τον ελληνικό χώρο για τη μελέτη οικογενειών με Σύνδρομο Εύθραυστου Χ η οποία μοιράστηκε μαζί μου την πολυετή εμπειρία και γνώση της στην εργαστηριακή μελέτη του FMR1 γονιδίου. Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Τεχνολόγο Δανιήλ Έφη η οποία εγκάρδια και ακούραστα βοήθησε στην πραγματοποίηση όλων των μετρήσεων.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Έλλη Αναγνώστου για όλα τα στοιχεία των ιατρικών φακέλων των ασθενών που συνέλεξε, ταξινόμησε και μοιράστηκε μαζί μου, για το χρόνο που αφιέρωσε για την επεξήγησή τους καθώς επίσης και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της επί των συμπερασμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ και ιδιαίτερω την κ. Σοφού Αλέκα, την κ. Σούλα Άννα και την κ. Μπάκα Βούλα, για την πάντα ευγενή διάθεση να προσφέρουν τη βοήθειά τους σε κάθε δυσκολία που μπορεί να προέκυπτε αλλά και στη Γραμματέα του ΜΠΣ κ. Μποχρίνη Μυρτιά για την τόσο εγκάρδια και εξυπηρετική υποστήριξη. Θερμές ευχαριστίες επίσης σε όλους τους συμφοιτητές μου για μια τόσο επικοδομητική και άριστη συνεργασία και ιδιαίτερω στην φίλη και υποψήφια διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Κούτση Αθηνά για την ηθική και πρακτική βοήθεια και υποστήριξη.

Ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ στον Δρ. Πάμπανο Ανδρέα, Κυτταρολόγο – Μοριακό Γενετιστή, Επιστημονικά Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Γενετικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, για την ακούραστη και γενναιόδωρη βοήθεια που προσέφερε τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Ευχαριστίες στις συναδέλφους Βιολόγους – Γενετίστριες του Εργαστηρίου Γενετικής του Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ για τις πολύωρες συζητήσεις, για την εμπειρία χρόνων που απλόχερα μοιράζονται αλλά και στο Τεχνολογικό Προσωπικό του Τμήματος.

Κάθε προσπάθεια όμως αποκτά ιδιαίτερο νόημα υπό το πρίσμα της αγάπης και της υποστήριξης των δικών μας ανθρώπων....Θερμές ευχαριστίες στους γονείς μου Χρήστο και Χρυσούλα για το παράδειγμα ζωής, τη δύναμη, την έμπνευση και τα εφόδια. Θερμές ευχαριστίες στην ευρύτερη οικογένεια. Θερμότερες ευχαριστίες στο σύζυγό μου Γιώργο και στο γιο μου Τάσο για όλα όσα μου προσφέρουν καθημερινά...Με προσμονή και ανυπομονησία....

«Ενδέχεται και άλλως έχειν»

Αριστοτέλης, Ηθικά Νικομάχεια

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
Abstract	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	18
2.ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ	21
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ.....	21
2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	25
2.3 ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ	28
3.ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΕΦΕΔΡΕΙΑ	29
3.1 ΔΕΙΚΤΕΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΕΦΕΔΡΕΙΑΣ	31
Α. ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	31
Β.ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	37
4. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FMR1	38
4.1 FMR1 Εκκλητήρας (Promoter).....	40
4.2 Η CGG ΤΡΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	43
Α. ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΩΝ	43
Β. ΑΣΤΑΘΕΙΑ, ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ ΑΠΟ ΓΕΝΙΑ ΣΕ ΓΕΝΙΑ.....	46
Γ.ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ.....	49
Δ. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	50
5. FMRP (Fragile-X Protein)	52
5.1. ΓΕΝΙΚΑ	52
5.2 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ FMRP ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ	53
6. ΑΠΟ ΤΟ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΣΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ.....	57
6.1 ΠΡΟΩΡΗ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΟ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟ Χ(FΧΡΟΙ)	58
6.2 ΧΡΗΣΗ ΖΩΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΟΩΡΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟ Χ.....	62
7.ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ FMR1 ΜΕ ΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΕΦΕΔΡΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ - ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	73
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	73
<i>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	75
4.2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	75
4.2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA (EXTRACTION).....	76

4.2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION- PCR).....	78
Α. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	78
Β. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ PCR	81
Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ CGG ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	83
Δ. ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (Capillary Electrophoresis-CE).....	86
Ε. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ.....	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	92
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	92
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ Ι.....	96
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΙ.....	101
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΙΙ.....	111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	121
ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	121
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	123
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ	128
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ποικιλομορφία των υπογόνιμων ασθενών, αποκλείει τη δυνατότητα ενός ενιαίου τρόπου αντιμετώπισης. Στο μέλλον, η γενετική διάγνωση μπορεί να επιτρέψει την πρόβλεψη της απάντησης στην εξωγενή ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση αλλά και την πρόβλεψη της έκβασης της IVF με βάση το γονότυπο κάθε ασθενούς.

Τα τελευταία 5-10 χρόνια, αρκετή προσοχή έχει δοθεί στο γονίδιο *FMR1* και την εμπλοκή του στην αναπαραγωγική ιατρική. Η παρούσα εργασία μελετά την πιθανή επίδραση του γονιδίου *FMR1* στην έκβαση της IVF. Το γονίδιο *FMR1* βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του X χρωμοσώματος στη θέση Xq27.3. Ο φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος είναι 46,XX άρα κάθε γυναίκα φέρει 2 αλληλόμορφα *FMR1* που αποτελούν το γονότυπό της.

Το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αυτού του γονιδίου βρίσκεται στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο του και είναι μια $(CGG)_n$ αριθμητικά πολυμορφική τρινουκλεοτιδική επανάληψη. Αυτή η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μπορεί να έχει θετική ή αρνητική επίδραση στη μετάφραση ενώ η βέλτιστη μετάφραση συμβαίνει όταν οι επαναλήψεις είναι 30. Ο Fu και συνεργ. το 1991 μελέτησαν το πρότυπο κατανομής των διαφόρων αλληλομόρφων σε φυσιολογικά άτομα και βρήκαν ότι το πιο συχνά εμφανιζόμενο αλληλόμορφο είναι αυτό με τις 29 επαναλήψεις ενώ στο φυσιολογικό ελληνικό πληθυσμό το πιο συχνά εμφανιζόμενο αλληλόμορφο φέρει 28 επαναλήψεις. Σε φυσιολογικά άτομα ο αριθμός των CGG επαναλήψεων κυμαίνεται από 5-45 οδηγώντας σε φυσιολογική μεταγραφή mRNA, μετάφραση και έκφραση. Το αλληλόμορφο προμετάλλαξης (55-200 επαναλήψεις) οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή mRNA αλλά μειωμένη έκφραση *FMRP*. Άρρενες φορείς αλληλομόρφου προμετάλλαξης έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας ενώ θήλεις φορείς έχουν 20% κίνδυνο Πρόωρης Ωοθηκικής Ανεπάρκειας. Το αλληλόμορφο πλήρους μετάλλαξης (>200 επαναλήψεις) οδηγεί στην εμφάνιση Σύνδρομου Έυθραυστου X. Η παρούσα εργασία επικεντρώνει το ενδιαφέρον της στο φυσιολογικό εύρος επαναλήψεων.

Η *FMRP* δρα ως καταστολέας της κυτταρικής μετάφρασης. Ελέγχει το βαθμό μετάφρασης πολλών μεταγράφων (συμπεριλαμβανομένου και του δικού της). Στους ανθρώπους, η *FMRP* εκφράζεται μετά τη γέννηση στη θήλυ γαμετική σειρά, κυρίως στα κοκκώδη κύτταρα ενώ σε πειραματικό μοντέλο επίμου έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση *FMRP* καθώς τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται. Γυναίκες με $(CGG)_n$ εκτός του εύρους που έχει συσχετισθεί με τη φυσιολογική ωοθυλακιογένεση ($26 < n < 34$) αναμένεται

να έχουν χαλαρό μεταγραφικό έλεγχο, τροποποιημένα επίπεδα FMRP τα οποία θα επηρεάσουν την ωοθυλακιογένεση.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, 29-30 CGG επαναλήψεις έχουν προταθεί ως αντιπροσωπευτικές φυσιολογικής ωοθηκικής εφεδρείας ενώ υψηλότερος ή χαμηλότερος αριθμός υποδηλώνει κίνδυνο για Πρόωρη Ωοθηκική Γήρανση. Επιπλέον, προτάθηκαν νέοι γονότυποι, μέσα στο φυσιολογικό εύρος, σε σχέση με την δράση του FMR1 γονιδίου στη φυσιολογία της ωοθήκης: Φυσιολογικός γονότυπος, εάν και τα δύο αλληλομόρφα φέρουν από 26-34 επαναλήψεις CGG, ετερόζυγος γονότυπος αν το ένα αλληλόμορφο φέρει αριθμό επαναλήψεων εκτός 26-34 και ομόζυγος γονότυπος εάν και τα δύο αλληλόμορφα φέρουν αριθμό επαναλήψεων εκτός του παραπάνω εύρους. Οι FMR1 γονοτυποι έχουν συσχετισθεί με την πιθανότητα εγκυμοσύνης: ο ετερόζυγος κυρίως και με μειωμένη πιθανότητα σε σχέση με το φυσιολογικό γονότυπο. Επιπλέον, η παρουσία χαμηλού αλληλομόρφου (<26 CGG), έχει συσχετισθεί με σημαντικά χειρότερη ποιότητα εμβρύων και μικρότερη πιθανότητα εγκυμοσύνης.

Μελετήθηκαν 62 υπογόνιμες γυναίκες σε πρωτόκολλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, 26 από αυτές ήταν πτωχές απαντήτριες (σύμφωνα με τα κριτήρια της Μπολόνια) και 36 καλές απαντήτριες εάν είχαν ≥ 8 ώρια, βασική τιμή $FSH \leq 10$ mIU/mL και μέγιστη τιμή $E2 \geq 1500$ pg/mL. Η αιτία υπογονιμότητας τους ήταν σαλπινγική, ανδρική ή ανεξήγητη. Διαθέσιμα στοιχεία ήταν ηλικία, βάρος, BMI, έτη υπογονιμότητας, προηγούμενοι κύκλοι IVF, ενδοκρινολογικό προφίλ (FSH, LH, PRL, TSH), παράμετροι της διέγερσης/πρόκλησης (ημέρες πρόκλησης, σύνολο χορηγούμενης δόσης FSH, μέγιστη τιμή E2) καθώς επίσης και η έκβαση της IVF (αριθμός ωοθυλακίων, αριθμός ωαρίων, δείκτης ωρίμανσης, δείκτης γονιμοποίησης, ποιότητα εμβρύων, εγκυμοσύνη). Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη συλλογή δειγμάτων και στοιχείων, την απομόνωση DNA, την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας με PCR, την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, την ανάλυση με ειδικό λογισμικό και τέλος τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η καμπύλη κατανομής των συχνοτήτων των FMR1 αλληλομόρφων, με βάση τον αριθμό των CGG επαναλήψεων, για τον μελετηθέντα ελληνικό υπογόνιμο πληθυσμό βρέθηκε σε συμφωνία με την καμπύλη κατανομής του Fu. Δεν βρέθηκε μετατόπιση της καμπύλης κατανομής προς τα δεξιά (μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων), ούτε στο σύνολο του δείγματος ούτε όταν μελετήθηκαν ξεχωριστά οι πτωχές και οι καλές απαντήτριες. Επιπλέον δεν βρέθηκαν ούτε ενδιάμεσα αλληλόμορφα ούτε αλληλόμορφα προμετάλλαξης. Το αλληλόμορφο με 28 επαναλήψεις CGG ήταν το πιο συχνά

εμφανιζόμενο στο σύνολο του μελετηθέντος δείγματος αλλά και στις πτωχές και καλές απαντήσεις ξεχωριστά (43,5%, 42,3%, 44,4% αντίστοιχα) και αυτό δεν ήταν διαφορετικό από το παρατηρούμενο στο γενικό ελληνικό πληθυσμό. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος γονότυπος τόσο στις πτωχές όσο και στις καλές απαντήσεις ήταν ο φυσιολογικός (52,8% , 46,2% αντίστοιχα). Η κατανομή των γονοτύπων μεταξύ πτωχών και καλών απαντητριών δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (p -value 0,256). Με κριτήριο τον *FMR1* γονότυπό τους: οι υπογόνιμες γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο είχαν λιγότερο αριθμό ημερών πρόκλησης, υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης ωαρίων και παρουσίασαν τα καλύτερα ποσοστά εγκυμοσύνης. Οι υπογόνιμες γυναίκες με τον ομόζυγο γονότυπο χρειάστηκαν τις περισσότερες ημέρες πρόκλησης και είχαν το χαμηλότερο βαθμό ωρίμανσης ωαρίων. Τα συγκριτικά ποσοστά εγκυμοσύνης σε αυτή την υποεκπροσωπούμενη ομάδα παραμένουν για μας ασαφή. Οι υπογόνιμες γυναίκες με τον ετερόζυγο γονότυπο παρουσίασαν 83% μικρότερα ποσοστά εγκυμοσύνης σε σχέση με τις φυσιολογικές γυναίκες. Στο σύνολο του μελετηθέντος πληθυσμού, γυναίκες που δεν έφεραν χαμηλό αλληλόμορφο στο γονότυπό τους, είχαν λιγότερο αριθμό ημερών πρόκλησης σε σχέση με αυτές που έφεραν χαμηλό αλληλόμορφο (p -value = 0,033). Στο σύνολο του υπογόνιμου πληθυσμού, η παρουσία χαμηλού αλληλομόρφου ($CGG < 26$) δεν συσχετίστηκε με διαφορές στην πιθανότητα εγκυμοσύνης (p -value=0,198).

Συμπερασματικά, οι γονότυποι του γονιδίου *FMR1* φαίνεται ότι έχουν τόσο ποσοτική (ημέρες πρόκλησης) όσο και ποσοτική (δείκτης ωρίμανσης) επίδραση στην έκβαση της IVF καθώς επίσης και στην πιθανότητα εγκυμοσύνης. Το γονίδιο *FMR1* θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην επιτυχή έκβαση της IVF. Επιπλέον, η δημιουργία ενός πολυγονιδιακού εξατομικευμένου προφίλ, σε συνδυασμό με άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της IVF είναι μία ακόμα επιλογή όπου το *FMR1* γονίδιο θα μπορούσε να αποδειχθεί πληροφοριακό.

Ο συγκριτικά μικρός αριθμός του μελετηθέντος δείγματος επιτρέπει μόνο την εξαγωγή πρώιμων συμπερασμάτων τα οποία χρειάζεται να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων. Η τυχαία απενεργοποίηση του *X* χρωμοσώματος θα μπορούσε να επηρεάζει την επίδραση των γονοτύπων του *FMR1* στην ωοθήκη.

Abstract

Variability in the subfertile patient population excludes the possibility of a single approach to controlled ovarian stimulation (COS) covering all the requirements of a patient. In the future, genetic screening may allow an individual patient's response to COS as well as IVF outcomes to be predicted based on genotype.

In the last 5-10 years a lot of attention has been drawn to the FMR1 gene and its implication in reproductive medicine. Our study focuses on possible effect of FMR1 gene on IVF outcomes. The FMR1 gene is located on the long arm of the X chromosome at position Xq27.3. A normal female karyotype is assigned as 46,XX meaning that every woman carries 2 FMR1 alleles which contribute to her genotype.

The most interesting feature of this gene lies in its 5'end untranslated region and it is a (CGG)_n numerically polymorphic repeat. This (CGG)_n repeat element can exert both positive and negative effect on translation where optimal translation appears near the modal repeat number within the general population. Fu et al. (1991), well characterized the distribution pattern of the different alleles among normal individuals and found that 29 CGG repeats is the most frequent allele while in normal Greek population 28 CGG repeats appear most frequently. In unaffected individuals the CGG ranges between 5-45 leading to normal mRNA transcription, translation and expression. The premutation allele (55-200 repeats) results in elevated mRNA transcription but reduced FMRP expression. Male carriers of a premutation allele have an increased risk of being affected from FXTAS while female carriers may be affected from FXPOI. A full mutation allele (>200 repeats) will lead to FXS. Our study focuses on the normal range.

FMRP is a major cellular translation repressor protein. It controls the level of translation of multiple transcripts (including its own). In humans, FMRP is expressed after birth in female germline predominantly in granulosa cells and in a rat experimental model an increasing FMRP expression has been observed with advancing follicle development. Women with (CGG)_n outside the range associated with normal folliculogenesis (26<n<34) are expected to have relaxed FMR1 transcription control, altered FMRP levels which will affect their folliculogenesis.

In the recent bibliography 29-30 CGG repeats have been proposed to be reflective of normal ovarian reserve while higher and lower counts denote risk for Premature Ovarian Senescence. Additionally, new genotypes, within the typical range, have been proposed for the ovarian function of the FMR1 gene: normal, if (CGG)_n in both alleles are within

26-34, heterozygous if one allele is outside the normal range and homozygous if both alleles are outside the normal range. FMR1 genotypes have been found to be predictive of pregnancy, het-norm/low most significantly and with decreasing chance in comparison to norm genotypes. A low FMR1 allele (CGG<26) has been associated with significant poorer morphologic embryo quality and pregnancy chance.

We have studied 62 infertile women undergoing IVF, 26 poor responders (according to Bologna criteria) and 36 good responders, if having ≥ 8 oocytes, a basal FSH measurement of ≤ 10 mIU/mL and a peak E2 level ≥ 1500 pg/mL. Their infertility reason was tubal, male or unexplained. Available data were age, weight, BMI, years of infertility, previous IVF, their hormonal profile (FSH, LH, PRL, TSH), parameters of ovarian stimulation/induction (days of stimulation, total FSH dose, peak E2) and their IVF outcome (number of follicles, number of oocytes, maturation rate, fertilization rate, embryo quality, pregnancy). Our workflow consisted of sample and data collection, DNA extraction, PCR amplification, capillary electrophoresis, software analysis and statistical analysis.

The distribution curve of FMR1 allele frequencies based on the CGG repeat number of the studied infertile Greek population was found in accordance with Fu's Distribution curve. We found no shift towards higher ends neither in the total sample, nor the good or the poor responders separately. No intermediate or premutation alleles were found. (CGG)₂₈ was the most frequent allele observed in the total sample, good or poor responders (43,5%, 42,3%, 44,4% respectively) and this was no different from Greek general population. The most prevalent genotype in both poor and good responders was norm (52,8% , 46,2% respectively). The distribution of genotypes between good and poor responders did not statistically differ (p -value 0,256). With regards to their FMR1 genetic background: infertile women carrying a norm genotype had less mean days of stimulation, higher mean of oocyte maturation rates and presented the best pregnancy odds. Infertile women carrying a hom genotype needed the most mean days of stimulation and had the lowest mean of oocyte maturation rates. The comparative pregnancy odds in this underrepresented subgroup remains for us inconclusive as a sample effect cannot be ruled out. Infertile women carrying a het genotype had 83% less pregnancy odds compared to those carrying a norm genotype. In the whole study population women not carrying a Low Allele in their Genotype had less mean number of days of stimulation compared to those carrying a Low Allele (p -value = 0,033). In the

whole study population the presence of a low allele (CGG<26) was not associated with differences in pregnancy odds (p-value=0,198).

Conclusively, FMR1 genotypes seem to have both a quantitative (days of stimulation) and a qualitative (maturation rates) effect on IVF outcomes, as well as on pregnancy odds. The FMR1 could be considered as a candidate gene implicated in IVF success. A rationale of building up a multi-genetic, individualized profile with other genes involved in the IVF process is also an option, where FMR1 could prove informative.

The relative small size of the study population allows for only preliminary results, which require confirmation in a larger study population. The random X-inactivation could act as a possible modifier of the impact of FMR1 genotypes in the ovary.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού για επίτευξη εγκυμοσύνης σε διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους (εάν η ηλικία της γυναίκας είναι <35 ετών) ή σε διάστημα 6 μηνών (εάν η ηλικία της γυναίκας είναι >35 ετών) παρά τις επαρκείς, τακτικές (3-4 φορές εβδομαδιαίως) και χωρίς προφύλαξη σεξουαλικές επαφές. Η υπογονιμότητα μπορεί επίσης να οριστεί και ως η αδυναμία να περατωθεί μια εγκυμοσύνη με τη γέννηση ενός ζώντος, υγιούς μωρού. Η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα, σε γυναικείο παράγοντα ή σε συνδυασμό και των δύο ενώ μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Στην πρωτοπαθή υπογονιμότητα το ζευγάρι δεν έχει ποτέ επιτύχει σύλληψη ενώ στη δευτεροπαθή υπάρχει δυσκολία στη σύλληψη ενώ στο παρελθόν έχει προηγηθεί σύλληψη (είτε με ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης είτε με παλινδρόμηση ή αποβολή) (1).

Η υπογονιμότητα είναι μία σύνθετη διαταραχή με σημαντικές ιατρικές, ψυχολογικές και οικονομικές προεκτάσεις. Στοιχεία από πληθυσμιακές μελέτες δείχνουν πως 10-15% των ζευγαριών παγκοσμίως είναι υπογόνιμα (1).

Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας αποτελούν λοίμωξη, τραυματισμός, έκθεση σε τοξίνες, ανατομικές ποικιλομορφίες, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συστηματικά νοσήματα. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου μπορεί να είναι το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η παχυσαρκία και η προχωρημένη ηλικία. Όλα τα παραπάνω σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό οδηγούν σε μειωμένη ποσότητα και/ή κακή ποιότητα σπέρματος.

Η γυναικεία υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε υποκείμενη παθολογία που βλάπτει τους ωαγωγούς, που επηρεάζει την ωοθυλακιορρηξία ή που προκαλεί ορμονική δυσλειτουργία. Αναλυτικότερα οι παράγοντες που ενοχοποιούνται για τη γυναικεία υπογονιμότητα είναι:

1.Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην υπογονιμότητα έχει αποδειχθεί. Τοξικοί παράγοντες όπως κόλλες, πηκτικοί οργανικοί διαλύτες και σιλικόνες, φυσικοί παράγοντες, αντιδραστήρια χημείας σε μορφή σκόνης και φυτοφάρμακα έχουν ενοχοποιηθεί για υπογονιμότητα. Άλλοι πιθανοί επιβλαβείς παράγοντες είναι οι χλώροϋδρογονάνθρακες και οι φθαλικές ενώσεις (1,2).

2.Μεταβολές βάρους: Ωοθηκική δυσλειτουργία μπορεί να εμφανισθεί είτε από υπερβολική αύξηση είτε από υπερβολική ελάττωση βάρους. Επί αυξημένου δείκτη BMI έχει επίσης παρατηρηθεί επίδραση στα αποτελέσματα των θεραπειών υπογονιμότητας και υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η κατάσταση αυξημένου σωματικού λίπους ή

παχυσαρκίας αυξάνει την παραγωγή οιστρογόνων την οποία το σώμα αντιλαμβάνεται ως αντισύλληψη περιορίζοντας τις πιθανότητες εγκυμοσύνης. Επίσης, ελαττωμένο σωματικό λίπος προκαλεί ανεπαρκή παραγωγή οιστρογόνων και άρα ανωμαλίες κύκλου ή/και ανωθυλακιορρηκτικούς κύκλους (1,2).

3.Ηλικία: Η γονιμότητα μειώνεται με την ηλικία. Η μέγιστη γυναικεία γονιμότητα παρατηρείται μεταξύ των ηλικιών 18-24 ενώ αρχίζει να φθίνει μετά την ηλικία των 27 ετών, ελαττώνεται δε, με γρηγορότερο ρυθμό μετά την ηλικία των 35. Με όρους ωοθηκικής εφεδρείας, μία φυσιολογική γυναίκα έχει 12% της ωοθηκικής της εφεδρείας στην ηλικία των 30 και μόνο 3% στην ηλικία των 40. 81% της ποικιλότητας ως προς την ωοθηκική εφεδρεία οφείλεται μόνο στην ηλικία, καθιστώντας την ηλικία το σημαντικότερο παράγοντα γυναικείας υπογονιμότητας (1,2).

4.Τρόπος ζωής: Τόσο το κάπνισμα όσο και η κατανάλωση αλκοόλ συμβάλουν στην υπογονιμότητα. Το κάπνισμα παρεμβαίνει στην ωοθυλακιογένεση (η νικοτίνη και άλλες επιβλαβείς χημικές ενώσεις των τσιγάρων δρουν στη σύνθεση των οιστρογόνων), στην εμβρυομεταφορά, στη δεκτικότητα του ενδομητρίου, στην ενδομήτρια αγγειογένεση, στη ροή αίματος της μήτρας αλλά και στο μυομήτριο. Οι καπνιστές έχουν 60% αυξημένη πιθανότητα να είναι υπογόνιμοι ενώ το κάπνισμα μειώνει της πιθανότητες γέννησης ζώντος υγιούς μωρού μετά από IVF κατά 34%. Η κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων τα οποία ελαττώνουν την έκκριση FSH, παρεμβαίνοντας στην ομαλή ωοθυλακιογένεση (1,2).

5.Ενδοκρινολογικές διαταραχές: Μεταβολές των χημικών σημάτων από τον υποθάλαμο μπορεί να προκαλέσουν διαταραχές στην υπόφυση, τις ωοθήκες, τον θυρεοειδή και τον μαζικό αδένα. Οι ορμονολογικές διαταραχές που μπορεί να επηρεάσουν την ωορρηξία είναι ο υπερθυρεοειδισμός, ο υποθυρεοειδισμός, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και η υπερπρολακτιναιμία. Οι γυναίκες με ενδοκρινολογικές διαταραχές έχουν αυξημένη πιθανότητα να μην παράγουν αρκετά ωοθυλάκια ώστε να εξασφαλιστεί η ανάπτυξη ενός επικρατούντος ωαρίου. Επιπλέον, διαταραχές στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης μπορεί να προκληθούν και από άγχος (1,2).

α) Υπερπρολακτιναιμία: Η υπερπρολακτιναιμία προκαλεί υπογονιμότητα αυξάνοντας την έκκριση ντοπαμίνης από τον υποθάλαμο η οποία αναστέλλει την GnRH και άρα τη στεροειδογένεση στις γονάδες (1,2).

β) Θυρεοειδοπάθεια: Στον υποθυρεοειδισμό, η αυξημένη έκκριση TRH έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των θυρεοτρόφων και λακτοτρόφων κυττάρων και κατά συνέπεια

την αύξηση των επιπέδων τόσο της TSH όσο και της προλακτίνης. Το αποτέλεσμα αυτής της αύξησης είναι διαταραχές ωορρηξίας(1,2).

Ο υπερθυρεοειδισμό από την άλλη μεριά, συσχετίζεται με ακανόνιστους κύκλους και διαταραχές εμμήνου ρύσεως (1,2).

6.Ωοθηκική δυσλειτουργία: Υπογονιμότητα ως αποτέλεσμα ωοθηκικής δυσλειτουργίας μπορεί να οφείλεται στην απουσία ωαρίων ή στην πλήρη έμφραξη των ωοθηκών. Η ωοθηκική δυστροφία (φυσική βλάβη των ωοθηκών ή ωοθήκες με πολλαπλές κύστεις) και το σύνδρομο ωχρινοποιημένων αδιάρρηκτων ωοθυλακίων μπορεί να οδηγήσουν σε ανωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους. Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι συνήθως ένα κληρονομικό πρόβλημα και σε αυτό οφείλεται το 90% των περιπτώσεων ανωοθυλακιορρηξίας. Στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών οι ωοθήκες παράγουν υψηλά ποσά ανδρογόνων, ειδικά τεστοστερόνης κάτι που έχει ως αποτέλεσμα αμηνόρροια ή ολιγομηνόρροια. Τα αυξημένα ποσά ανδρογόνων έχουν ως αποτέλεσμα υψηλά ποσά LH και χαμηλά ποσά FSH άρα τα ωοθυλάκια δεν καταφέρνουν να παράγουν ένα ώριμο ωάριο (1,2).

7.Σάλπιγγικός παράγοντας: Προβλήματα στο περιτόναιο ή στις σάλπιγγες που σχετίζονται με υπογονιμότητα είναι η ενδομητρίωση, οι συμφύσεις, φλεγμονές κυρίως λόγω χλαμυδίων, απόφραξη και δυσλειτουργία (1,2).

8.Προβλήματα στη μήτρα: Ανάμεσα στα προβλήματα της μήτρας είναι το ανώμαλο σχήμα, τα διαφράγματα, οι πολύποδες, το λειομύωμα και το σύνδρομο Asherman. Καλοήθη ινομυώματα μπορεί να προκαλέσουν υπογονιμότητα αλλάζοντας το σχήμα της μήτρας, μπλοκάροντας τις σάλπιγγες ή αλλάζοντας τη θέση του τραχήλου (1,2).

9.Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα: Τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα μπορεί να προκληθούν από ιούς, βακτήρια ή παράσιτα. Πολλές φορές είναι ασυμπτωματικά με αποτέλεσμα να μην προσφέρεται η κατάλληλη θεραπεία εγκαίρως προτού προκληθεί η υπογονιμότητα (1,2).

10.Πυελικές φλεγμονές: Πρόκειται για ποικιλία λοιμώξεων σε πυελικά όργανα που προκαλούνται από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι πυελικές φλεγμονές μπορούν τελικά να καταλήξουν σε συμφύσεις, ουλές, καταστροφή σαλπίγγων, απόφραξη σαλπίγγων, έκτοπη κύηση με συνέπεια την υπογονιμότητα (1,2)

11.Χημειοθεραπεία: Μελέτες έχουν δείξει πως το AFC μειώνεται μετά τον τρίτο κύκλο χημειοθεραπειών, η FSH φτάνει σε εμμηνοπαυσιακά επίπεδα μετά τον τέταρτο κύκλο ενώ και η ινχιμπίνη B αλλά και η AMH μειώνονται. Στα φάρμακα με υψηλή γοναδοτοξικότητα συμπεριλαμβάνεται η προκαρμπαζίνη, κυκλοφωσφαμίδη, ισοσφαμίδη, μπουσουλφάνη,

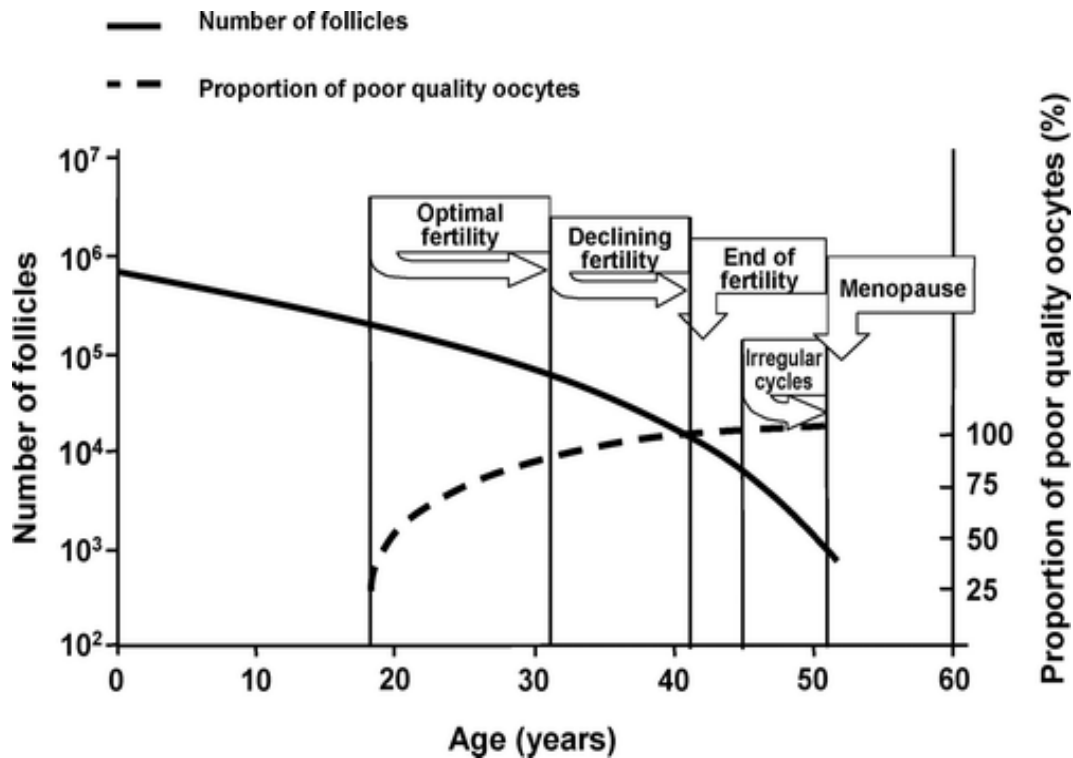
μεφαλάνη, χλωραμβουκίλη και χλωρομεθίνη. Φάρμακα με μέτρια γοναδοτοξικότητα είναι η δοξορουμπικίνη, η σις-πλατίνα και η καρβοπλατίνα ενώ θεραπείες με παράγωγα φυτών όπως η βινκριστίνη και η βινπλαστίνη, αντιβιοτικά και αντιμεταβολίτες (μεθοτρεξάτη, μερκαπτοουρίνη και 5΄φλωρουρακίλη) έχουν χαμηλή γοναδοτοξικότητα (1).

2.ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Το παρών δόγμα στη βιολογία της αναπαραγωγής είναι ότι η δεξαμενή των ωοκυττάρων στις ωοθήκες των θηλυκών θηλαστικών, κατά τη γέννηση, είναι προκαθορισμένη και μη ανανεώσιμη παρόλο που κάποιες νεότερες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο (3). Σύμφωνα με το ισχύων δόγμα, τα ωοκύτταρα αυτά «γερνούν» καθώς οι ίδιες οι γυναίκες γερνούν, με αποτέλεσμα τη σταδιακή ελάττωση της ποιότητας των ωαρίων με την αύξηση της ηλικίας. Η ελαττωμένη ποιότητα των ωαρίων είναι μη αντιστρεπτή ενώ καταλήγει σε αύξηση στη συχνότητα ανευπλοειδίας, χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης, μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης ανά έμβρυο και αύξηση στη συχνότητα των αποβολών. Με λίγα λόγια, η γήρανση των ωαρίων είναι ο βασικός ένοχος για την ωοθηκική γήρανση (4-5).

Κάθε γυναίκα δέχεται έναν αριθμό ωοκυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Τον 4^ο μήνα της εμβρυικής ανάπτυξης οι ωοθήκες περιέχουν 6-7 εκατομμύρια ωάρια τα οποία είναι περιστοιχισμένα από επίπεδα κοκκώδη κύτταρα προκειμένου να σχηματιστεί η δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων. Σε κάθε φάση της βιολογικής ηλικίας η μεγάλη πλειονότητα (>99%) των ωοκυττάρων στην ωοθήκη είναι παρόντα ως μη αναπτυσσόμενα αρχέγονα ωοθυλάκια. Λόγω μιας ταχύτατης απώλειας των περισσότερων αρχέγονων ωοθυλακίων μέσω απόπτωσης κατά το δεύτερο μισό της εμβρυικής ζωής, στη γέννηση παραμένουν μόνο 1-2 εκατομμύρια αρχέγονα ωοθυλάκια. Μετά τη γέννηση, ο υψηλός ρυθμός καταστροφής των ωοθυλακίων πέφτει, έτσι ώστε κατά την εμμηναρχή παραμένουν τουλάχιστον 300.000-400.000 αρχέγονα ωοθυλάκια. Κατά τα αναπαραγωγικά χρόνια, η συνεχιζόμενη και σταδιακά επιταχυνόμενη ελάττωση θα οδηγήσει τα νούμερα να έχουν πέσει σε λιγότερα από 1000 κατά την εμμηνόπαυση (εικόνα 1) (4).

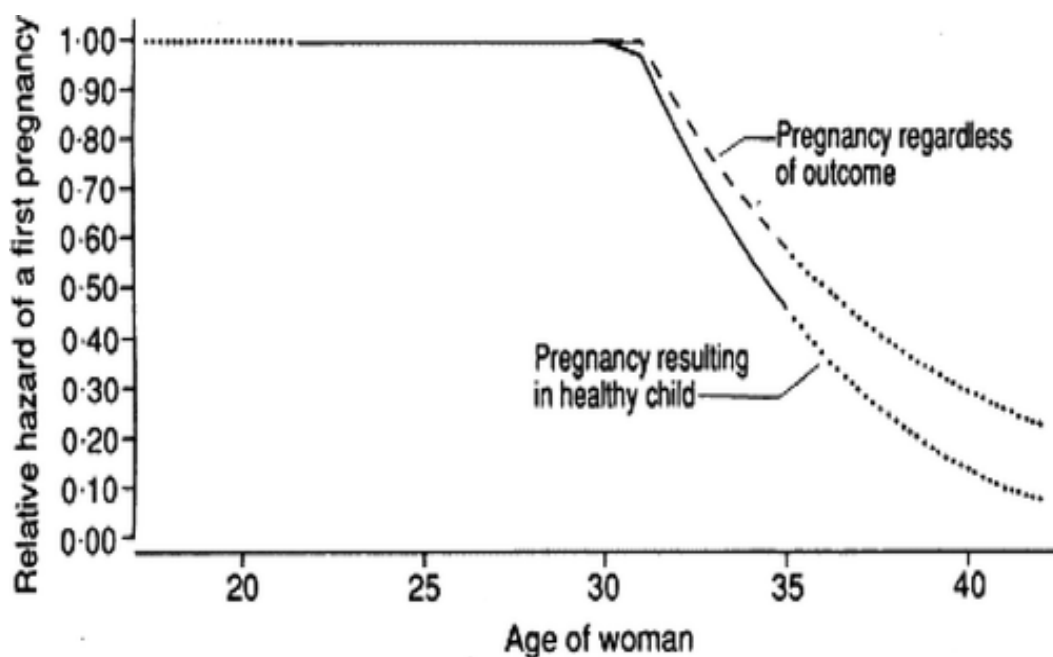


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων που είναι παρόντα στις ωοθήκες και η χρωμοσωμική ποιότητα των ωοκυττάρων σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας και τα σχετιζόμενα αναπαραγωγικά γεγονότα.

Μαζί με τη μείωση στον αριθμό των ωοθυλακίων, μειώνεται επίσης και η ποιότητα των ωαρίων (τουλάχιστον μετά την ηλικία των 31 ετών όπου η γονιμότητα σταδιακά μειώνεται). Η απώλεια της ποιότητας των ωαρίων πιστεύεται πως οφείλεται σε αύξηση στο μειωτικό μη διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων καταλήγοντας σε αύξηση στο βαθμό της ανευπλοειδίας του εμβρύου όταν οι γυναίκες είναι μεγαλύτερης ηλικίας. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί μπορεί να περιλαμβάνουν διαφορές μεταξύ των αρχέγονων κυττάρων, όπως αυτά σχηματίστηκαν κατά την εμβρυική ζωή, συσσωρευμένες βλάβες των ωοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας, ή σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές στην ποιότητα των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο (4-6)..

Παρά τις βαθιές αλλαγές στον αριθμό και τη ποιότητα των ωοθυλακίων κατά τη τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής, η διαδικασία της ωοθηκικής γήρανσης παραμένει σε μεγάλο βαθμό απαρατήρητη. Τα γεγονότα τα οποία μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν είναι οι ακανόνιστοι κύκλοι και η εμμηνόπαυση. Η έναρξη της μειωμένης γονιμότητας και η επακόλουθη απώλεια της φυσικής γονιμότητας δεν μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί σε ατομικό επίπεδο (4-6).

Από αρκετές πηγές έχει φανεί ότι η μηνιαία γονιμότητα σταδιακά ελαττώνεται από τη μέση ηλικία των 30 ετών και μετά (εικόνα 2).



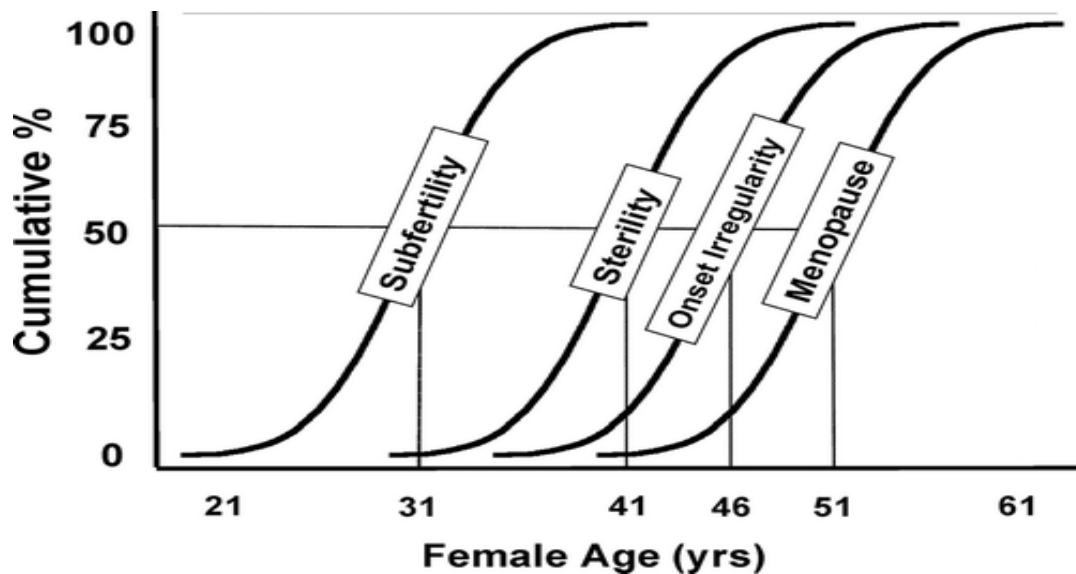
Εικόνα 2: Η γονιμότητα ανά κύκλο σύμφωνα με την ηλικία της γυναίκας. Η μέση πιθανότητα για μια γυναίκα ηλικίας 20-30 ετών είναι 1.00. Για μια γυναίκα ηλικίας 33 ετών, η σχετική πιθανότητα είναι 0,75 και δείχνει πως σε κάθε κύκλο έχει 75% της πιθανότητας που έχει μια γυναίκα ηλικίας 20-30 για να μείνει έγκυος.

Τα πρώτα ήπια κλινικά σημάδια της προαγωγής στη διαδικασία της αναπαραγωγικής γήρανσης είναι μια συντόμευση της διάρκειας του έμμηνου κύκλου κατά 2-3 μέρες. Μόνο όταν οι μηνιαίοι κύκλοι γίνονται ακανόνιστοι τα πρώτα σημάδια της ελάττωσης του αριθμού των ωοθυλακίων γίνονται αντιληπτά. Η ανεπαρκής διαθεσιμότητα των ωοθυλακίων οδηγεί σε μία αυξανόμενη συχνότητα μεγάλων κύκλων ή χαμένων περιόδων ή ακόμα και επιμηκυμένα διαστήματα διακοπής των περιόδων. Αυτό το στάδιο της ωοθηκικής γήρανσης αναφέρεται ως η μετάβαση στην εμμηνόπαυση η οποία εκτείνεται έως τη τελευταία περίοδο και θα πρέπει να διακρίνεται από τη περιεμμηνόπαυση που περιλαμβάνει το χρόνο μετά τη τελευταία έμμηνο ρύση (εικόνα 20). Η έναρξη της περιόδου μετάβασης στην εμμηνόπαυση εμφανίζεται κατά μέσο όρο στην ηλικία των 46 ετών με ένα εύρος από 34-54 έτη (4-6).

Stages:	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2
Terminology:	Reproductive			Menopausal Transition		Postmenopause		
	Early	Peak	Late	Early	Late*	Early*	Late	
Duration of Stage:	variable			variable		a	b	until demise
						1 yr	4 yrs	
Menstrual Cycles:	variable to regular	regular		variable cycle length (>7 days different from normal)	≥2 skipped cycles and an interval of amenorrhea (≥60 days)	Amenorrhea x 12 mos	none	
Endocrine:	normal FSH		↑ FSH	↑ FSH			↑ FSH	

Εικόνα 3: Το σύστημα σταδιοποίησης STRAW, που δείχνει τη σχέση μεταξύ των αλλαγών στην κανονικότητα του κύκλου και τις ενδοκρινολογικές αλλαγές στη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της αναπαραγωγικής γήρανσης.

Μεταξύ των τεσσάρων αναπαραγωγικών σταδίων πιστεύεται πως υπάρχει μια σταθερή χρονική συσχέτιση (εικόνα 4).



Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση των ηλικιακών μεταβολών των διαφόρων σταδίων της γυναικείας αναπαραγωγικής γήρανσης με την παραδοχή της ύπαρξης σταθερών χρονικών διαστημάτων μεταξύ των επάλληλων σταδίων.

2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

α. Ο έμμηνος κύκλος

Το αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών εξαρτάται από επαναλαμβανόμενη κυκλική στρατολόγηση ωοθυλακίων, επιλογή ενός μόνο επικρατούς ωοθυλακίου που ακολουθείται από ωοθυλακιόρρηξη και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Στην περίπτωση που δεν επέλθει γονιμοποίηση και εμφύτευση, το ωχρο σωματίο υποστρέφει με επακόλουθη απόρριψη του ενδομητρίου και εμμηνορροσία (6,7).

Ένα τέτοιο μηνιαίο κυκλικό πρότυπο απαιτεί ενορχηστρωμένη λειτουργία του υποθαλάμου, της υπόφυσης και των ωοθηκών. Η ενδογενής δημιουργία του παλμού της GnRH στον υποθάλαμο εξασφαλίζει την παλμική απελευθέρωση τόσο της LH όσο και της FSH από την υπόφυση. Η μεσοκυκλική αύξηση στη συγκέντρωση της FSH ξεκινά από την ελάττωση στη συγκέντρωση των στεροειδών και της ινχιμπίνης A με την εκφύλιση του ωχρού σωματίου του προηγούμενου κύκλου. Σχετικά υψηλή συγκέντρωση FSH στην ωχρινωοθυλακική μετάβαση θα επιτρέψει κυκλική στρατολόγηση μιας ομάδας ωοθυλακίων με άντρο, ευαίσθητων στην FSH, καθώς επίσης και τη σύνθεση οιστραδιόλης και παραγωγή ινχιμπίνης A και B. Μειούμενα επίπεδα FSH (λόγω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης από την αύξηση της ινχιμπίνης B και της οιστραδιόλης) είναι απαραίτητα για την επικράτηση ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου από όλη την ομάδα. Η παραπάνω διαδικασία αναφέρεται ως θεωρία της οδού/παραθύρου της FSH (6,7).

Η ινχιμπίνη A ακολουθεί το πρότυπο μεταβολής της οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια του κύκλου. Η ινχιμπίνη B εκκρίνεται κυρίως από τα μικρότερα ωοθυλάκια με άντρο και ελαττώνεται καθώς προκύπτει το κυριαρχούν ωοθυλάκιο. Η LH ρυθμίζει τη παραγωγή των ανδρογόνων στα κύτταρα της θήκης των μικρών ωοθυλακίων με άντρο και ως εκ τούτου επιτρέπει τη βιοσύνθεση της οιστραδιόλης μέσω αρωματοποίησης των ανδρογόνων. Η LH είναι επίσης σημαντική για την υποστήριξη του επικρατούς ωοθυλακίου, την ωορρηξία και τον επακόλουθο σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Με τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου τα επίπεδα της FSH αυξάνουν και πάλι στην έναρξη του επόμενου κύκλου (6,7).

β. Αλλαγές στην περιοδικότητα των κύκλων

Οι φυσιολογικοί περιοδικοί μηνιαίοι κύκλοι κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών χρόνων έχουν ως μέση διάρκεια τις 28 μέρες, με μικρή απόκλιση μεταξύ των ατόμων. Ακόμα και πριν χαθεί η περιοδικότητα των κύκλων, στην αρχή της μετάβασης στην

εμμηνόπαυση, μπορεί ήδη να υπάρχουν σημάδια που δείχνουν μειωμένο αριθμό ωοθυλακίων όπως αυξημένη τιμή της FSH κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Κατά την περίοδο μετάβασης στην εμμηνόπαυση (την περίοδο που περιλαμβάνει αρκετά χρόνια πριν την τελευταία έμμηνο ρύση), η μηνιαία περιοδικότητα σταδιακά χάνεται λόγω ανεπαρκούς αριθμού ωοθυλακίων ευαίσθητων στην FSH. Οι κύκλοι γίνονται σταθερά μικρότεροι αρχικά, λόγω προχωρημένης επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου με μικρότερη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης. Αργότερα, οι κύκλοι μπορεί να γίνουν μεγαλύτεροι σε διάρκεια με καθυστερημένη έναρξη της επιλογής του επικρατούς ωοθυλακίου ή ακόμα και ανωοθυλακιόρρηκτοί, με αιμορραγία χωρίς την εμφάνιση ωχρού σωματίου. Μεταγενέστερα, παραλείπονται ολόκληροι κύκλοι και μπορεί να εμφανιστούν περίοδοι αμηνόρροιας, 60 ή και περισσότερων ημερών, λόγω παρατεταμένης απουσίας ωοθυλακίων με άντρο ικανών για στρατολόγηση (6,7).

Η πλήρης απώλεια της ωοθηκικής λειτουργίας ορίζεται ως η τελευταία έμμηνο ρύση που ακολουθείται από 12 μήνες αμηνόρροιας (εμμηνόπαυση) (6,7).

γ. Αλλαγές στην ωοθηκική ανατροφοδότηση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ελάττωση στον αριθμό των ωοθυλακίων στη διάρκεια των χρόνων φαίνεται πως είναι ο κύριος παράγοντας στην ωοθηκική γήρανση. Το μειούμενο μέγεθος της ομάδας των ωοθυλακίων με άντρο είναι η κύρια αιτία για την ελαττωμένη ανατροφοδότηση, με μία μείωση στην ινχιμπίνη Β κατά τα αρχικά στάδια και στην οιστραδιόλη και ινχιμπίνη Α στα μετέπειτα στάδια (6,7).

Από διάφορες μελέτες έχειδειχτεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της FSH και της ινχιμπίνης Β στην πρώιμη ωοθυλακική φάση. Σε γυναίκες που βρίσκονται στη μετάβαση στην εμμηνόπαυση παρατηρείται μια καθαρή μείωση στα επίπεδα της ινχιμπίνης με την επιπλέον αύξηση των επιπέδων της FSH (6,7).

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της ινχιμπίνης Α κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση παραμένουν κυρίως αμετάβλητα σε γυναίκες μέχρι τα μετέπειτα στάδια της μετάβασης στην εμμηνόπαυση. Μόνο όταν οι περίοδοι της εμμηνόπαυσης γίνονται μεγάλες, τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της ινχιμπίνης Α πέφτουν και με τον τρόπο αυτό συνεισφέρουν στην απώλεια της αρνητικής παλίνδρομης ανατροφοδότησης στη μονάδα του υποθαλάμου-υπόφυσης. Συμπερασματικά λοιπόν, τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της ινχιμπίνης Α ελαττώνονται σχετικά μεταγενέστερα στην πορεία της ωοθηκικής γήρανσης (6,7).

Η ενδοκρινολογία της ωχρινικής φάσης δεν φαίνεται να μεταβάλλεται με την αύξηση της ηλικίας. Στην περίπτωση που εξακολουθεί να υπάρχει ωρρηξία σε σταθερή βάση, η παραγωγή οιστραδιόλης, προγεστερόνης και ινχιμπίνης Α από το ωχρο σωματίο φαίνεται αμετάβλητη συγκρίνοντας γυναίκες μικρότερης και μεγαλύτερης ηλικίας. Δυνητικά, αλλαγή στη λειτουργία του ωχρού σωματίου μπορεί να παίξει ρόλο στο μέγεθος της αύξησης της FSH κατά την ωχρινοωοθυλακική μετάβαση ή να επηρεάσει την ποιότητα του εκκριτικού ενδομητρίου λόγω ανεπάρκειας της ωχρινικής φάσης(6,7). Ανακόλουθα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με την έκκριση της ινχιμπίνης Α κατά την ωχρινική φάση. Επιπλέον, αρκετές αναφορές έχουν δείξει σταδιακή πτώση στα επίπεδα των ανδρογόνων ακόμα και από νωρίς στην αναπαραγωγική φάση. Μέχρι τώρα παραμένει ασαφές σε ποιο βαθμό ευθύνονται οι ωθήκες για κάτι τέτοιο. Το γεγονός πως οι αλλαγές στην τεστοστερόνη είναι ανάλογες με αυτές της θειικής δευδροεπιανδροστερόνης μπορεί να καταδεικνύουν τα επινεφρίδια ως την κύρια αιτία αυτών των αλλαγών (6,7).

δ. Αντίκτυπο της αύξησης της FSH

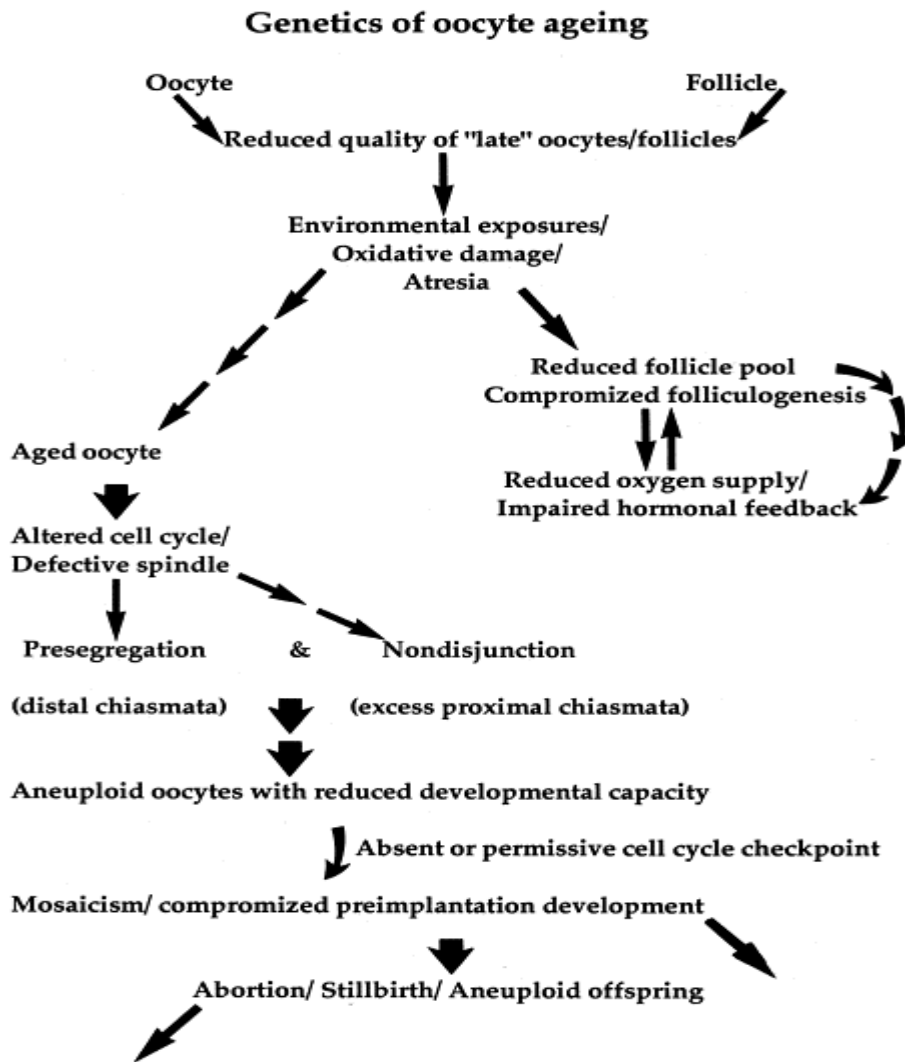
Τα αυξημένα επίπεδα της FSH σε γυναίκες μεγαλύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας, που όμως εξακολουθούν να έχουν τακτικούς έμμηνους κύκλους, έχουν διάφορα αποτελέσματα στην ωοθηκική λειτουργία. Μπορεί να οδηγήσουν σε προαγωγή της κανονικής αύξησης του επικρατούντος ωοθυλακίου. Η αύξηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου και τα πρότυπα της οιστραδιόλης φαίνονται ίδια σε νεαρές γυναίκες με κανονική διάρκεια κύκλου. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει ότι η αύξηση του επικρατούντος ωοθυλακίου ξεκινά νωρίτερα, ακόμα και πριν την έναρξη της εμμηνορυσίας, με υψηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης στην επόμενη όψιμη ωοθυλακική φάση. Εντούτοις η επιταχυνόμενη αύξηση των ωοθυλακίων μπορεί να είναι μια άλλη εξήγηση για τις αλλαγές στη διάρκεια του κύκλου και τα υψηλότερα επίπεδα της οιστραδιόλης στην όψιμη ωοθυλακική φάση (6,7).

Τα υψηλά επίπεδα της FSH νωρίς στην ωοθυλακική φάση θα οδηγήσουν περισσότερα από ένα ωοθυλάκια σε επικράτηση με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα της E2 αλλά και την αυξημένη συχνότητα διζυγωτικών διδύμων. Η ερώτηση που προκύπτει είναι αν αυτή η αύξηση της FSH είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κυκλικότητας και τη γονιμότητα όταν πια τα εφόδια σε ωοθυλάκια είναι οριακά. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ένα επιβλαβές αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων της FSH αυτών καθ'αυτών στην ποιότητα των ωοθυλακίων αλλά και των ωαρίων (6,7).

2.3 ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η γήρανση των ωαρίων δεν φαίνεται να επηρεάζει τη δυνατότητα των ωαρίων να γονιμοποιηθούν αλλά συγκρινόμενα με νεότερες γυναίκες, τα ποσοστά εμφύτευσης είναι χαμηλότερα ενώ τα ποσοστά των αυτόματων αποβολών είναι υψηλότερα σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Η σχετιζόμενη με την ηλικία ελάττωση της γυναικείας γονιμότητας, αποδίδεται στην ποιότητα των ωαρίων. Σε νέες μητέρες το ποσοστό των ανευπλοειδικών ωαρίων ανέρχεται σε 20%, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνει σε 50% ή περισσότερο σε μεγαλύτερες μητέρες. Ένας λόγος είναι ότι το επίπεδο της κοεσίνης, πρωτεΐνης κλειδί για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, πέφτει κάτω από ένα κρίσιμο και αναγκαίο επίπεδο για τη σταθεροποίηση των χιασμάτων αλλά και για τη διατήρηση ενωμένων των κεντρομεριδίων των αδελφών χρωματίδων σε προωθοθλακιορρηκτικά, γηράσκοντα ωάρια. Τα μειωμένα επίπεδα κοεσίνης ενδεχομένως να είναι υπεύθυνα για λάθη στο μειωτικό διαχωρισμό. Επιπλέον, σε προωθοθλακιορρηκτικά, γηράσκοντα ωάρια έχουν παρατηρηθεί δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια αλλά και μικρότερος αριθμός μιτοχονδρίων. Η γονιδιακή έκφραση αλλά και η δομή της χρωματίνης επηρεάζονται επίσης από την ηλικία. Πολλές συζητήσεις επίσης έχουν γίνει σχετικά με το αν οι επιγενετικές τροποποιήσεις επηρεάζονται από την ηλικία καθώς η έκφραση των DNMTs (DNA – μεθυλοτρανσφερασών) αλλά και των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών αλλάζει με την ηλικία. Τέλος υπό μελέτη βρίσκεται πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs και της ποιότητας των ωαρίων ως συνέπεια της αύξησης της μητρικής ηλικίας (108).

Στην ακόλουθη εικόνα συνοψίζονται οι αιτιολογικοί παράγοντες αλλά και οι μηχανισμοί της μητρικής, σχετιζόμενης με την ηλικία, ανευπλοειδίας στα ωάρια των θηλαστικών.



Εικόνα 4: Αιτιολογικοί παράγοντες και μηχανισμοί της μητρικής ανευπλοειδίας της οφειλόμενης στην ηλικία.

3.ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΕΦΕΔΡΕΙΑ

Η ωοθηκική εφεδρεία (*ovarian reserve-OR*) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος όρος, ο οποίος σε μεγάλο βαθμό παραμένει απροσδιόριστος όπως επίσης και καταχρασθής. Αυτό που γενικά αναφέρεται ως ωοθηκική εφεδρεία (*OR*) στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει μόνο μικρά τμήματα της συνολικής ωοθηκικής εφεδρείας (*total ovarian reserve-TOR*). Η αθροιστική υποθετική πιθανότητα για εγκυμοσύνη μιας γυναίκας μαθηματικά αντικατοπτρίζεται από τη συνολική της δεξαμενή ωοθυλακίων, τη συνολική ωοθηκική της εφεδρεία (*TOR*) (8).

Η *TOR* κυρίως αποτελείται από αρχέγονα ωοθυλάκια τα οποία δεν μεγαλώνουν (*Non Growing Follicles-NGFs*) και σε μικρότερο βαθμό από ωοθυλάκια τα οποία μεγαλώνουν και ωριμάζουν (*Growing Follicles-GF*) μετά τη στρατολόγηση. Μόνο τα τελευταία

αντικατοπτρίζουν τη λεγόμενη λειτουργική ωοθηκική εφεδρεία (*Functional Ovarian Reserve - FOR*) που είναι και αυτή η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία σαν *OR*. Κατ' αντιστοιχία όταν χρησιμοποιείται το ακρωνύμιο *DOR* (*Diminished Ovarian Reserve*) υπονοείται η μειωμένη *FOR* (8). Η *DOR* διαγιγνώσκεται με αυξημένα επίπεδα *FSH* (> 10 IU/L τις ημέρες 2-4 ή αποτυχία στη δοκιμασία κλομιφαίνης(βλ. παρακάτω), παρόλο που κάποιοι κλινικοί χρησιμοποιούν την *AMH* και το *AFC* για την εκτίμηση της ωοθηκικής εφεδρείας. Η *DOR* είναι μια φυσιολογική κατάσταση όταν εμφανίζεται στα μέσα ή το τέλος της δεκαετίας των 40 ενώ θεωρείται παθολογική όταν εμφανίζεται νωρίτερα (9).

Με τη πάροδο του χρόνου, η στρατολόγηση των ωοθυλακίων μειώνει την *TOR* ενώ παράλληλα μειώνεται και η *FOR* με τρόπο προβλεπόμενο και μέσα σε όρια ειδικά για την ηλικία. Η φυσιολογική ωοθηκική γήρανση (*Normal Ovarian Aging-NOA*), επομένως, καθορίζεται από χαρακτηριστική της ηλικίας μείωση στην *FOR* μέσα σε αναμενόμενα εύρη (8).

Γύρω στο 2007-2008 εισήχθη ο όρος *Primary Ovarian Insufficiency-POI* (Πρωτογενής Ωοθηκική Ανεπάρκεια) για να περιγράψει μια συνεχιζόμενη δυσλειτουργία που σχετίζεται με την πρόωμη γήρανση των ωοθηκών. Εντούτοις, επικρατεί διχογνωμία σχετικά με τον ακριβή της ορισμό. Κάποιοι σημαντικοί κλινικοί και ερευνητές όρισαν την *POI* με τον ίδιο τρόπο με την *POF-Premature Ovarian Failure* (Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια). Ο όρος *POI* φαίνεται πως αντιπροσωπεύει καλύτερα αυτή την κατάσταση θεωρώντας πως υπάρχει μια εξέλιξη της ωοθηκικής δυσλειτουργίας που προηγείται της Πρόωρης Αμηνόρροιας όπως επίσης και το γεγονός ότι γυναίκες σε αυτή την κατάσταση μερικές φορές έχουν αυτόματη ανάπτυξη ωοθυλακίων και/ή επιστροφή εμμηνορρυσίας και/ή σύλληψη μετά τη διάγνωση (9).

Άλλοι κλινικοί και ερευνητές υποστηρίζουν πως η *POI* αντιπροσωπεύει τη συνέχεια διαφόρων ωοθηκικών σταδίων που περιλαμβάνουν α) μια «σιωπηρή» κατάσταση (μειωμένη γονιμότητα αλλά φυσιολογικές τιμές *FSH*) β) μια «βιοχημική» κατάσταση (μειωμένη γονιμότητα, αυξημένες τιμές *FSH*, κανονικοί κύκλοι) γ) μια «εμφανή» κατάσταση (περίπου αντιστοιχεί στην *POF* αλλά με ακανόνιστους κύκλους) (10).

Περίπου 10% των γυναικών αποκλίνουν από τα ηλικιακά πρότυπα και πριν φθάσουν στην εμμηνόπαυση πάσχουν από Πρόωρη Ωοθηκική Γήρανση (*Premature Ovarian Aging-POA*), επίσης γνωστή και ως Σιωπηρή Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (*Occult Primary Ovarian Insufficiency-OPOI*). Η *NOA* και η *OPOI* έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά αλλά διαφέρουν σε άλλα όπως συνοψίζεται ακολούθως (8):

Χαρακτηριστικά της NOA (Normal Ovarian Aging-Φυσιολογική Ωοθηκική Γήρανση)

1. Ποικίλος αρχικός αριθμός ωαρίων κατά τη γέννηση/ εμμηναρχή
2. Ποικίλος ρυθμός στρατολόγησης ωοθυλακίων μεταξύ ατόμων
3. Μειούμενος ρυθμός στρατολόγησης ωοθυλακίων με την πάροδο της ηλικίας
4. Μειούμενος αριθμός ωοθυλακίων στην ωοθυλακιογένεση με την πάροδο της ηλικίας
5. Αυξανόμενη κακή ποιότητα ωαρίων με την πάροδο της ηλικίας
Λόγω των ανωτέρω...
 - α. Χειρότερη ποιότητα εμβρύων με την πάροδο της ηλικίας
 - β. Μειωμένο ποσοστό αυτόματης σύλληψης με την πάροδο της ηλικίας
 - γ. Μειωμένος αριθμός ωαρίων στην IVF με την πάροδο της ηλικίας
 - δ. Μειωμένος αριθμός εμβρύων με την πάροδο της ηλικίας
 - ε. Μειωμένο ποσοστό επιτυχίας της IVF
- στ. Μειωμένο ποσοστό εγκυμοσύνης με θεραπείες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
- ζ. Αυξημένα ποσοστά ανευπλοειδίας με την αύξηση της ηλικίας

3.1 ΔΕΙΚΤΕΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΕΦΕΔΡΕΙΑΣ

A. ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. FSH

Η βασική FSH (2^η-5^η μέρα του κύκλου) είναι το πιο μελετημένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο ενδοκρινολογικό τεστ προκειμένου να εκτιμηθεί η ωοθηκική εφεδρεία. Ο προσδιορισμός της FSH σε συνδυασμό με την ηλικία είναι καλύτερος δείκτης σε σχέση με την ηλικία μόνη της για την εκτίμηση της έκβασης της IVF. Πολλά κέντρα εξωσωματικής εξακολουθούν να βασίζονται μόνο στις τιμές της FSH παρά τους περιορισμούς όπως η διακύμανσή της στη διάρκεια ενός κύκλου ή και μεταξύ κύκλων αλλά και την παρεμβολή εξωτερικών παραγόντων όπως το κάπνισμα αλλά και τις ανομοιότητες των χρησιμοποιούμενων μεθόδων προσδιορισμού της (8,4,11).

Οι Van der Steeg και συν. μελέτησαν την προγνωστική αξία της FSH σχετικά με την εμφάνιση αυτόματης εγκυμοσύνης σε υπογόνιμες γυναίκες >40 ετών με ωορρηξία και παρατήρησαν μειωμένες πιθανότητες εγκυμοσύνης όταν οι τιμές ήταν πάνω από 8 IU/L, ενώ δεν υπήρχε αντίστοιχη συσχέτιση για χαμηλότερες τιμές FSH. Οι Haadsma και συν.

υπέδειξαν τη βασική FSH και το AFC σαν σημαντικούς δείκτες αυτόματης εγκυμοσύνης (11).

Οι Asrafi και συν. σε μελέτη που συμπεριέλαβε 212 ασθενείς IVF, παρατήρησαν πως γυναίκες με $FSH \geq 15$ IU/L είχαν λιγότερα ωάρια και μεγαλύτερο αριθμό ακυρωθέντων κύκλων σε σχέση με γυναίκες με μικρότερες τιμές, χωρίς σημαντική διαφορά στη χορηγούμενη γοναδοτροπίνη. Οι Creus και συν. επίσης έδειξαν πως η μέση τιμή της FSH ήταν σημαντικά υψηλότερη ανάμεσα σε ασθενείς με ακυρωθέντες κύκλους εξωσωματικής ανεξάρτητα από άλλες μεταβλητές όπως η ηλικία και η ινχιμπίνη-B (11).

Σχετικά με την εμφάνιση εγκυμοσύνης, οι Klinkert και συν. πρότειναν πως ήταν λιγότερο πιθανή σε γυναίκες με $FSH \geq 15$ IU/L σε σχέση με γυναίκες με χαμηλότερες τιμές αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, πρόσφατα φάνηκε πως τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερα σε γυναίκες ηλικίας <35 ετών με αυξημένη βασική FSH παρά σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας αλλά με κανονική τιμή της ορμόνης, θέτοντας την ηλικία ως τον κύριο δείκτη ωοθηκικής εφεδρείας. Σε μια άλλη μελέτη οι Van Montfrans και συν. υποστήριξαν πως ο προσδιορισμός της βασικής FSH δεν θα έπρεπε να είναι αποφασιστικός για το χειρισμό των υπογόνιμων γυναικών με κλινικά φυσιολογικούς κύκλους καθώς υπήρξε εγκυμοσύνη στις μισές γυναίκες με αυξημένα επίπεδα ορμονών (11).

Η FSH εξακολουθεί να είναι ένας ενδιαφέρων δείκτης ωοθηκικής εφεδρείας καθώς είναι εύκολα προσβάσιμος και χαμηλού κόστους. Υψηλά επίπεδα FSH δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για να αποκλείουν γυναίκες από την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή εφόσον βέβαια τυγχάνουν σωστής συμβουλευτικής (8, 11).

2. ΙΝΧΙΜΠΙΝΗ-B

Οι ινχιμπίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες της υπεροικογένειας των παραγόντων TGF- β και εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης. Η ινχιμπίνη-B αναστέλλει την έκκριση της FSH από την υπόφυση αλλά και την παρακρινική δράση της στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, τα οποία έχουν διεγερθεί από την αλληλεπίδραση της FSH με τον IGF-1. Μελέτες σε υπογόνιμες ασθενείς 24-40 ετών έδειξαν σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της βασικής ινχιμπίνης-B και της FSH και σημαντικά θετική συσχέτιση μεταξύ της βασικής ινχιμπίνης-B και του AFC (11).

Σε συμφωνία με αυτό, οι Seifer και συν. έδειξαν πως γυναίκες με φθίνουσα ωοθηκική ανταπόκριση και πτωχά αποτελέσματα σε εξωσωματική γονιμοποίηση παρουσίαζαν χαμηλές συγκεντρώσεις βασικής ινχιμπίνης-B παρά τις μη αυξημένες τιμές της FSH τη

μέρα 3. Επιπλέον, μεγαλύτερη απάντηση σε οιστρογόνα και μεγαλύτερος αριθμός ωοκυττάρων λήφθηκαν μετά από διέγερση γυναικών με τιμές ινχιμπίνης-B ≥ 45 pg/mL ενώ οι ακυρώσεις κύκλων ήταν 3 φορές πιο συχνές μεταξύ αυτών με χαμηλότερες τιμές. Σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ του αριθμού των ωοκυττάρων και των συγκεντρώσεων της ινχιμπίνης-B ενώ όλοι οι ασθενείς με συγκεντρώσεις ινχιμπίνης > 100 pg/mL είχαν περισσότερα από 6 ωάρια. Στη μελέτη των Penarrubia και συν. η ινχιμπίνη-B της 5^{ης} μέρας συσχετίστηκε με ποσοστά υγιών γεννήσεων μετά από IVF με 68,71% ευαισθησία και 88,51% ειδικότητα τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά και ισχυρότερα παρά οποιαδήποτε άλλη μεταβλητή που εξετάστηκε (11).

Άλλες μελέτες εντούτοις δεν πρότεινουν τη χρήση της ινχιμπίνης-B και μόνο σαν βάσιμο δείκτη ωθηκικής εφεδρείας. Οι McIlveen και συν. παρατήρησαν σημαντική διακυκλική διακύμανση στη συγκέντρωση της ινχιμπίνης-B. Η συστηματική ανασκόπηση των Broekmans και συν. ήταν ιδιαίτερα emphaticή ως προς τα υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών τιμών βασικής ινχιμπίνης-B και τον αποκλεισμό ασθενών από προγράμματα IVF με βάση αυτές τις τιμές (11).

3. ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης (E2) μπορούν να παρέχουν επιπλέον χρήσιμη πληροφορία για την εκτίμηση της ωθηκικής εφεδρείας. Η πρώιμη αύξηση των τιμών της E2 εξηγούνται ως συνέπεια της προχωρημένης ωοθυλακικής ανάπτυξης και της πρώιμης επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου που παρατηρείται σε μεγαλύτερες γυναίκες που έχουν κύκλο και που προκαλείται από τα αυξανόμενα επίπεδα της FSH. Υψηλότερες συχνότητες ακυρωθέντων κύκλων έχουν παρατηρηθεί σε επίπεδα $E2 < 20$ pg/mL ή ≥ 80 pg/mL. Η μέτρηση των FSH και E2 μαζί κατά την ημέρα 3 μπορεί να βοηθήσει να μειωθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατά τη μέτρηση μόνο της FSH: όταν και οι δύο δείκτες είναι αυξημένοι η πτωχή απάντηση είναι πολύ πιθανή (11).

Παρόλαυτά άλλες μελέτες υπέρ της χρήσης της E2 ως δείκτης ωθηκικής εφεδρείας δεν κατάφεραν να δείξουν συσχέτιση με την ωοθυλακική ανάπτυξη ή την εμφάνιση εγκυμοσύνης. Οι Ficicicoglu και συν. έδειξαν επίσης παρόμοιες τιμές E2 σε καλές και πτωχές απαντήτριες κατά τη διέγερση με γοναδοτροπίνες σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης (11).

Η E2 μπορεί να είναι χρήσιμη για να καθοδηγήσει την έναρξη της διέγερσης με γοναδοτροπίνες αλλά δεν έχει αξία ως προγνωστικό εργαλείο της IVF. Λαμβανομένου

υπόψιν τη χαμηλή ακρίβεια πρόβλεψης και την έλλειψη επιπέδων cutoff με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία η χρήση της E2 για την ένταξη ζευγαριών σε πρόγραμμα εξωσωματικής θα πρέπει να αποφεύγεται (11).

4. AMH

Η αντιμυλέριος ορμόνη είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη της υπεροικογένειας TGF-β η οποία εκφράζεται από τα κοκκώδη κύτταρα από τη στιγμή που τα αρχέγονα κύτταρα στρατολογούνται, η έκφρασή της δε, διατηρείται μέχρι τα ωθυλάκια να φτάσουν σε διάμετρο τα 6mm, όταν τα προκοιλοτικά/αρχώμενα κοιλοτικά ωθυλάκια επιλέγονται προς επικράτηση ενώ η ωθυλακική ανάπτυξη καθορίζεται από τη δράση της FSH (10,12).

Η δράση της AMH στις γυναίκες δεν είναι πλήρως κατανοητή αλλά στοιχεία των τελευταίων ετών δείχνουν πως μπορεί να δρα ως ρυθμιστής της ωθυλακικής στρατολόγησης και της ωθηκικής στεροειδογένεσης. Η AMH είναι γνωστή για τον ανασταλτικό ρόλο της στη δεξαμενή των αρχέγονων ωθυλακίων δρώντας στα προκοκκώδη κύτταρα με σκοπό να μειώσει τον αριθμό στρατολογούμενων μονάδων και αργότερα ως αποφασιστικός παράγοντας για την εξαρτώμενη από την FSH ανάπτυξη των ωθυλακίων (10,12).

Ο προσδιορισμός της AMH στην κλινική πράξη έχει προταθεί για την εκτίμηση της ωθηκικής εφεδρείας. Η AMH θεωρείται ως δείκτης που μπορεί να εκτιμήσει την ποσότητα και τη δραστηριότητα των ανακτούμενων ωθυλακίων στα πρώιμα στάδια της ωθηκικής απάντησης και του ωθηκικού δυναμικού. Άλλες μελέτες επίσης υποστήριξαν αυτή την υπόθεση λόγω της μειούμενης συγκέντρωσης της κυκλοφορούσας AMH με την αύξηση της ηλικίας (10,12).

Σε σύγκριση με την FSH, την ινχιμπίνη-B και την E2, η AMH έχει το πλεονέκτημα της μη διαφοροποίησης των συγκεντρώσεων της κατά τη διάρκεια του μηνιαίου κύκλου. Έχουν μετρηθεί μέσες τιμές $1,4 \pm 1,1$ ng/mL, $1,43 \pm 1,08$ ng/mL και $1,35 \pm 1,02$ ng/mL στην ωθυλακική, την περιωορρηκτική και μεσοωορρηκτική φάση αντίστοιχα. Οι σταθερές συγκεντρώσεις ορού της AMH έχουν δειχθεί και σε άλλες μελέτες: οι Tsepelidis και συν. μέτρησαν μία μέση τιμή $2,4 \pm 1,1$ ng/mL κατά τη διάρκεια του κύκλου ασθενών με κανονικές ωορρηξίες. Επίσης παρατηρήθηκε επαναληψιμότητα των μετρήσεων της AMH μεταξύ των κύκλων και μικρότερες διαφοροποιήσεις σε συνεχόμενους κύκλους συγκρινομένου με αυτές που έγιναν για την FSH, την ινχιμπίνη-B και την E2 ή το AFC (antral follicle count) σε υπογόνιμες γυναίκες ηλικίας 20-40 ετών (11).

Στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, οι Van Rooij και συν. παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα AMH και AFC στις πτωχές απαντήτριες (γυναίκες με ακυρωθέντες κύκλους ή αυτές από τις οποίες λήφθηκαν λιγότερα από 4 ωάρια) σε σύγκριση με γυναίκες με καλή απάντηση στην εξωγενή διέγερση. Βρέθηκε επίσης σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο δεικτών που ήταν σημαντικοί ως προς την πρόβλεψη της απάντησης. Πρόσφατα δεδομένα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της AMH και του AFC ως προς την πρόβλεψη του αποτελέσματος της IVF υπέδειξαν πως η AMH είναι τουλάχιστον το ίδιο αποτελεσματική με το AFC για την πρόβλεψη της καλής ή της πτωχής ωοθηκικής απόκρισης (11).

Σε μία εκτίμηση προηγούμενων πτωχών απαντητριών (λιγότερα από 4 ωοθυλάκια με διάμετρο >15mm) και ηλικία μεγαλύτερη των 38 ετών με βασική τιμή FSH >10IU/L, η AMH θεωρήθηκε ο καλύτερος μονός δείκτης ωοθηκικής απάντησης στην εξωγενή διέγερση. Στη μελέτη των Ficiocioglu και συν. τα επίπεδα της AMH στον ορό ήταν σημαντικά υψηλότερα σε γυναίκες με επαρκή ωοθηκική απάντηση στην εξωγενή διέγερση ($0,67 \pm 0,41$ pg/mL) σε σύγκριση με τις πτωχές απαντήτριες ($0,15 \pm 0,11$ pg/mL) υποστηρίζοντας αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (11).

Ο Fadini και συν. επιβεβαίωσε τη συγκέντρωση της AMH στον ορό ως ιδιαίτερα αποτελεσματικό δείκτη για την πρόβλεψη του αριθμού των ωαρίων αλλά και την αναγνώριση γυναικών με μειωμένη ωοθηκική λειτουργία και αυτές που είναι κατάλληλες για *in vitro* ωρίμανση ωαρίων (IVM). Στην πράξη, η AMH επέτρεψε στους συγγραφείς να εντοπίσουν κύκλους ικανούς να παράγουν ικανοποιητικό αριθμό ωαρίων και στη συνέχεια να μειώσουν το χρονικό διάστημα μεταξύ IVM και IVF (11).

Η έλλειψη συμφωνίας σε σχέση με ένα cutoff που να συνδυάζει ικανοποιητικά ευαισθησία και ειδικότητα για χρήση σε ρουτίνα παραμένει σημαντικό μειονέκτημα (21,78). Ο Muttukrishna και συν. έδειξαν 87% ευαισθησία και 64% ειδικότητα της AMH στην πρόβλεψη της απάντησης και της ακύρωσης σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όταν χρησιμοποιήθηκε η τιμή 0,2 ng/mL. Ο La Marca και συν. επικύρωσαν τη χρήση της AMH για την πρόβλεψη της πτωχής απάντησης δείχνοντας 80% ευαισθησία και 93% ειδικότητα σε κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όταν χρησιμοποιήθηκε ως cutoff η τιμή 0,75 ng/mL. Μία ενδιαφέρουσα μελέτη ανέφερε την τιμή 1,26 ng/mL με την οποία 88% των πτωχών απαντητριών μπορούν να ανιχνευθούν (<5 ωάρια) σε κύκλους IVF και το ίδιο cutoff χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για την επιλογή της IVM ως θεραπείας (11).

Οι Ivez και συν. πρόσφατα έδειξαν τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βασικής τιμής της FSH ορού με το συνολικό αριθμό ωαρίων αλλά και το AFC, την ινχιμπίνη-B και την FSH, την ποιότητα των ωαρίων και την ανάπτυξη των εμβρύων σε κύκλους ICSI. Οι συγγραφείς παρατήρησαν επίσης ότι το ποσοστό των διαιρέσεων του εμβρύου στα πρώτα στάδια ήταν υψηλότερο σε ασθενείς με συγκέντρωση AMH ανάμεσα σε 1,40 ng/mL και 4,83 ng/mL υποστηρίζοντας μία υποθετική συσχέτιση της AMH με τα ποσοστά εμφύτευσης (11).

Προσπάθειες έχουν γίνει επίσης για συσχέτιση των επιπέδων AMH με την επίτευξη εγκυμοσύνης με μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τιμές μεγαλύτερες των 2,7 ng/mL συσχετίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης (χωρίς όμως να φτάνουν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας). Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να διευκρινίσουν την αξία της AMH ως δείκτη στην απάντηση της διέγερσης δεν κατάφεραν να αποδείξουν τη χρησιμότητά της για την πρόβλεψη επίτευξης εγκυμοσύνης (11).

Βασιζόμενοι στα θετικά αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί αλλά και την αποδεδειγμένη συσχέτιση με σημαντικές παραμέτρους όπως το AFC και την ποσότητα των ώριμων ή ληφθέντων ωαρίων, φαίνεται πως υπάρχει μέλλον για την AMH ως σημαντικό κλινικό δείκτη για την εκτίμηση της γυναικείας υπογονιμότητας. Προς το παρόν η πτωχή απάντηση μπορεί να συσχετισθεί με επίπεδα AMH στον ορό <1 ng/mL, κανονική απάντηση με επίπεδα από 1-4 ng/mL ενώ αυξημένη απάντηση με επίπεδα >4 ng/mL (11).

5. ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

α. Δοκιμασίες κλομφαίνης(CCT)

β. Δοκιμασία διέγερσης με GnRH (GAST)

γ. Δοκιμασία διέγερσης με εξωγενή χορήγηση FSH (EFORT)

Παρόλο που οι ορμονικές δυναμικές δοκιμασίες διεξάγονται με ενιαίο τρόπο, η υψηλή ειδικότητα έναντι της χαμηλής ευαισθησίας και η απουσία ευρέως αποδεκτών μη φυσιολογικών τιμών καθιστά τα συγκεκριμένα τεστ μη προγνωστικά για τον προσδιορισμό της ωοθηκικής εφεδρείας και της λειτουργικής κατάστασης των ωοθηκών (7,11,13).

Β.ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Antral Follicle Count (AFC)

Η υπερηχογραφική μέτρηση των ωοθυλακίων με άντρο πριν τη χρήση μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει αποδεχθεί εξαιρετικός δείκτης της ωοθηκικής εφεδρείας αλλά και της απάντησης σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας, με χαρακτηριστική υπεροχή σε σχέση με άλλους δείκτες. Μελέτες έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του AFC και άλλων τεστ που πραγματοποιούνται στον ορό για την εκτίμηση της ωοθηκικής εφεδρείας αλλά και μεταξύ του AFC και της AMH. Σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση, το AFC μόνο του ήταν τόσο ακριβές όσο διάφοροι συνδυασμοί κλινικών, βιοχημικών και υπερηχογραφικών δεικτών στην πρόβλεψη της απάντησης στην IVF (11).

Σύμφωνα με τον Maseelall και συν., γυναίκες με $AFC \geq 11$ (ωοθυλάκια μεταξύ 2-10 mm και στις δύο ωοθήκες) είναι πιο πιθανό να έχουν γέννηση νεογνού σε σύγκριση με αυτές με λιγότερα ωοθυλάκια με άντρο, οι οποίες θα πρέπει να ενημερώνονται για τις αυξημένες πιθανότητες αποβολής, ακύρωσης κύκλων, υψηλότερων δόσεων γοναδοτροπινών και λιγότερων ωαρίων. Παρά τα αποτελέσματα αυτά, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση υποστήριξε καλά αποτελέσματα για γυναίκες με λιγότερα ωοθυλάκια με άντρο καθώς το 98,7% των γυναικών που έμειναν έγκυες είχαν $AFC \geq 4$ ενώ οι ακυρώσεις κύκλων σε γυναίκες με τουλάχιστον 4 ωοθυλάκια ήταν 2,5% (95%CI, 1,8-3%) (11).

Αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία φαίνεται να συγκλίνουν στην αποδοχή του AFC σαν δείκτη της ωοθηκικής ανταπόκρισης στην εξωγενή διέγερση. Εντούτοις, λόγω της 2,6% ευαισθησίας για την πρόβλεψη μη εμφάνισης εγκυμοσύνης και 66,7% ευαισθησίας για πρόβλεψη της ακύρωσης κύκλων, το AFC δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως κριτήριο για τον αποκλεισμό από μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αλλά ως εργαλείο για την συμβουλευτική σχετικά με τις μικρές πιθανότητες επίτευξης εγκυμοσύνης αλλά και στο να καθοριστεί η εξατομικευμένη παρέμβαση (11).

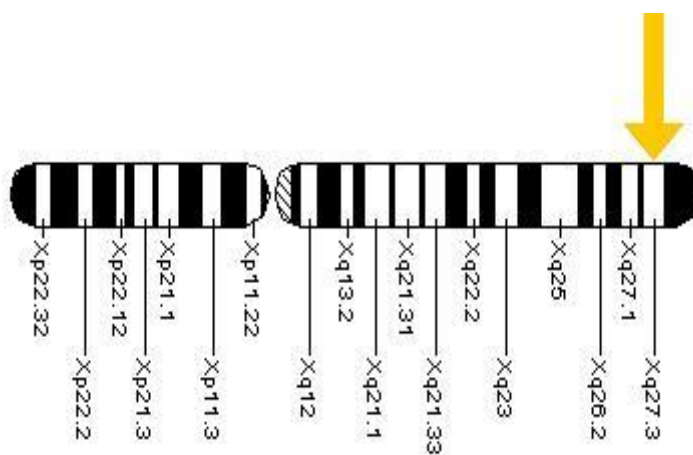
2. Όγκος ωοθήκης (Ovarian volume-OV)

Οι γνώμες δίστανται ως προς το κατά πόσο ο ωθητικός όγκος είναι ένα επαρκές τεστ για την εκτίμηση της ωθητικής εφεδρείας. Οι Syrop και συν. μελέτησαν γυναίκες ηλικίας 23-46 ετών σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συσχετίζοντας μειωμένο αριθμό ωαρίων και ποσοστά εγκυμοσύνης με μειωμένο ωθητικό όγκο. Εντούτοις, οι Elgindy και συν. δεν παρατήρησαν διαφορές στον ωθητικό όγκο μεταξύ νεαρών γυναικών με φυσιολογική και πτωχή απάντηση σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (μέσος όρος $4,1 \pm 0,66$ mL και $3,36 \pm 0,71$ mL αντίστοιχα) και οι McIlven και συν. βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα εκτιμώντας γυναίκες σε υψηλό κίνδυνο για ακύρωση κύκλων. Σε ανασκόπηση, 10 καλά σχεδιασμένων μελετών για τον ωθητικό όγκο, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μέτρηση παρουσιάζει μικρή εφαρμοσιμότητα στην πρόβλεψη της πτωχής απάντησης ή της εγκυμοσύνης (11).

Συμπερασματικά, ο ωθητικός όγκος δεν θα πρέπει να θεωρείται ως δείκτης ωθητικής εφεδρείας αλλά λόγω της ευκολίας της μέτρησής του μπορεί να συμπεριλαμβάνεται στις διαγνωστικές εξετάσεις ρουτίνας προσθέτοντας πληροφορίες στον ιατρικό φάκελο της ασθενούς (11).

4. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FMR1

Το FMR1 είναι ένα γονίδιο μεγέθους 38 kb το οποίο βρίσκεται στην περιοχή Xq27.3 (εικόνα 1).

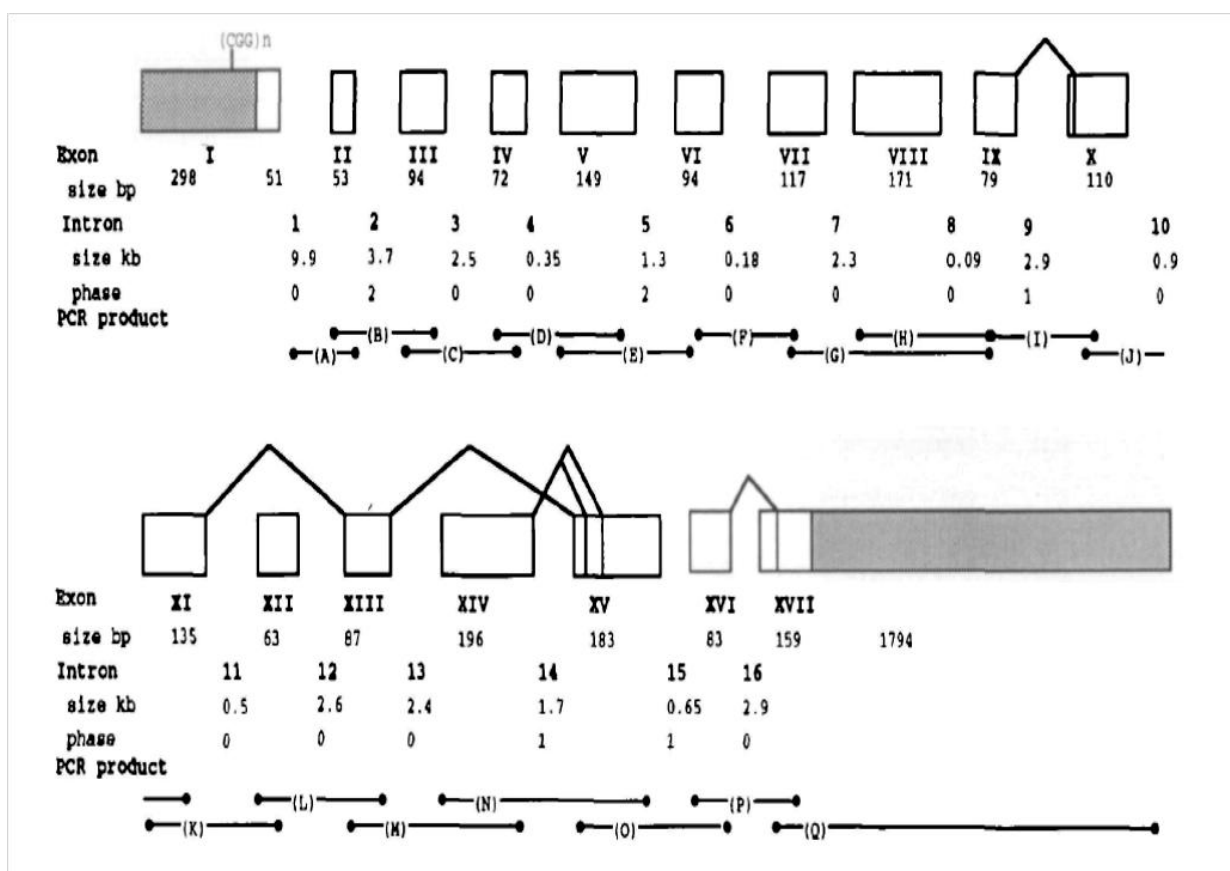


Εικόνα 5: Θέση του γονιδίου FMR1 στο χρωμόσωμα X

Αποτελείται από 17 εξώνια τα οποία είναι όλα μέσου μεγέθους. Τα 16 εσώνια είναι επίσης μέσου μεγέθους με εξαίρεση το πρώτο το οποίο είναι εξαιρετικά μεγάλο, 9.9 kb,

καταλαμβάνοντας περίπου το 1/3 του μήκους του γονιδίου (εικόνα 2). Ένα τόσο μεγάλο εσώνιο θα μπορούσε να είναι σημαντικό σε πιθανές ρυθμίσεις μεταγραφής ή εναλλακτικού ματίσματος (14).

Το γονίδιο *FMR1*, υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα το οποίο επηρεάζει την παρουσία του εξωνίου 12 και 14 και την επιλογή των θέσεων δέκτη στα εξώνια 15 και 17 (εικόνα 2) (1-4). Το εξώνιο 12 απουσιάζει από το 80% των *mRNAs*. Η αφαίρεση του εξωνίου 14 οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης, αλλάζοντας τη C-τελική περιοχή, δημιουργώντας είτε μικρότερο είτε μεγαλύτερο καρβοξυτελικό άκρο, ανάλογα με τη θέση δέκτη που έχει επιλεγεί στο εξώνιο 15 (15-17).



Εικόνα 6: Δομή του γονιδίου *FMR1*

Επιπλέον ασυνήθιστα μεγάλη είναι και η 5'UTR του γονιδίου, με μέγεθος τουλάχιστον 318 bp, με δεδομένο ότι το μέσο μέγεθος των εσωτερικών εσωνίων είναι 112 bp. Με βάση τα παραπάνω το *FMR1* ανήκει σε μια ξεχωριστή κατηγορία γονιδίων που αποτελούν λιγότερο από 8% του συνόλου των γονιδίων των θηλαστικών (14)

Στην 5'UTR του *FMR1* υπάρχει η νησίδα CpG και 250bp δεξιά βρίσκεται μία πολυμορφική, ως προς το μέγεθος, (CGG)*n* τρινουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία μπορεί να κυμανθεί από 6-60 σε φυσιολογικά άτομα και έως εκατοντάδες σε ασθενείς(18). Το

σημείο έναρξης της μετάφρασης με το κωδικόνιο ATG για την πρώτη μεθειονίνη εντοπίζεται 69 βάσεις μετά την αλληλουχία CGG υποδηλώνοντας ότι η αλληλουχία αυτή δεν μεταφράζεται στο πρωτεϊνικό παράγωγο του γονιδίου (16).

4.1 FMR1 Εκκινητής (Promoter)

Ο ελάχιστος, σε μέγεθος εκκινητής του FMR1 γονιδίου, έχει βρεθεί με τη βοήθεια πειραμάτων, πως καταλαμβάνει μία περιοχή περίπου 400bp-200bp προϊούσης της θέσης έναρξης μεταγραφής (19).

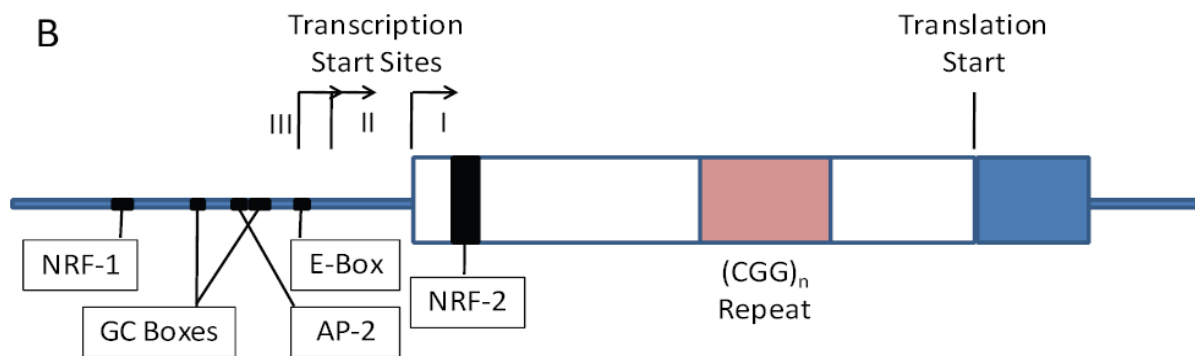
Η μεταγραφή του FMR1 γονιδίου ξεκινά από τρεις διαφορετικές θέσεις έναρξης, -132 έως -128, -166 έως -162 και -181 έως -177 (όπου +1 για τη θέση έναρξης της μεταγραφής με $(CGG)_{16}$). Οι θέσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως I, II, III αντίστοιχα (εικόνα 7). Αναφορικά με τα φυσιολογικά αλληλόμορφα, η θέση I είναι η κύρια θέση έναρξης μεταγραφής σε ποσοστό 67%, ενώ οι άλλες θέσεις II και III χρησιμοποιούνται σε ποσοστό 15% και 18% αντίστοιχα. Αντίθετα, μελέτες που έγιναν σε αλληλόμορφα που φέρουν την προμετάλλαξη $(CGG)_{82}$ και $(CGG)_{160}$, έδειξαν πως η θέση III είναι η κύρια θέση έναρξης μεταγραφής, σε ποσοστό 55% και 58% αντίστοιχα. Σε αλληλόμορφα, τέλος, που φέρουν μεν την προμετάλλαξη αλλά με χαμηλότερο αριθμό επαναλήψεων, $(CGG)_{60}$, χρησιμοποιείται κυρίως η θέση II. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η επιλογή της θέσης έναρξης μεταγραφής υφίσταται σημαντική μετατόπιση ανάντη καθώς ο αριθμός των επαναλήψεων (CGG) αυξάνεται από το φυσιολογικό αριθμό στην προμετάλλαξη (χαμηλή→υψηλή) καθώς επίσης πως το (CGG) στοιχείο φαίνεται να δρα ως κατάντη ενισχυτής για την έναρξη της μεταγραφής από πιο προπορευόμενες θέσεις έναρξης (20).

Το τμήμα (CGG) φαίνεται πως έχει διαφορετική επίδραση στην έκφραση ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων. Για αριθμό επαναλήψεων $n \geq 30$ η έκφραση μειώνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος των επαναλήψεων κάτι που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με μειωμένα επίπεδα της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης FMRP σε αυτό το εύρος των επαναλήψεων παρά την μικρή αύξηση στα επίπεδα του mRNA για μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων. Αντίθετα, για μικρότερο αριθμό επαναλήψεων $0 \leq n \leq 30$ η έκφραση αυξάνει περίπου δύο φορές, με την αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων, χωρίς καμία εμφανή αλλαγή στα επίπεδα του mRNA. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως το τμήμα (CGG) μπορεί να εμφανίσει τόσο θετική ($n < 30$) όσο και αρνητική ($n > 30$) επίδραση στην μετάφραση (21). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η ιδανική

μετάφραση εμφανίζεται κοντά στο μέσο όρο του αριθμού των επαναλήψεων για το γενικό, ανθρώπινο πληθυσμό ($n=29-30$) (21,22).

Στον εκκινητή του *FMR1* γονιδίου δεν παρατηρείται στοιχείο TATA κάτι το οποίο είναι συμβατό με την παρατήρηση των πολλαπλών θέσεων έναρξης μεταγραφής, ενώ παρατηρούνται τρεις *initiator-like* αλληλουχίες (*Inr*) οι οποίες αντιστοιχούν στις τρεις θέσεις έναρξης μεταγραφής I-III. Η πρόσδεση των *Inr*-πρωτεϊνών στα *Inr*-στοιχεία φαίνεται πως διευκολύνει το σχηματισμό του συμπλόκου της RNA pol II, με αλληλεπίδραση με ειδικούς ή γενικούς παράγοντες μεταγραφής. Ιδιαίτερα σημαντικοί στην ενεργοποίηση του *FMR1* γονιδίου φαίνεται να είναι οι παράγοντες *USF1/USF2* και οι *alpha-Pal/Nrf-1*. Οι *USF1/USF2* έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες που προσδέονται σε *Inr*-στοιχεία (20,23).

Στην περιοχή του εκκινητή, υπάρχουν τέσσερις θέσεις πρόσδεσης παραγόντων μεταγραφής (23-26). Οι θέσεις αυτές περιλαμβάνουν μία *a-Pal/ Nrf-1* θέση πρόσδεσης, δύο *GC-boxes* και ένα *E-box*, όπως αυτές εμφανίζονται ξεκινώντας από τις προπορευόμενες αλληλουχίες του γονιδίου (*upstream*) (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Διάγραμμα του εκκινητή και του εξωνίου 1 του *FMR1* γονιδίου. Υπάρχουν τρεις θέσεις έναρξης μεταγραφής (I-III) οι οποίες ταυτίζονται με *Inr*-στοιχεία. Στους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται στον εκκινητή περιλαμβάνονται οι *NRF-1*, *Sp1* (στα *GC-boxes*), *Ap-2*, *CREB* (στο *E-box*) και *NRF-2*. Η μεγάλη 5'UTR του *FMR1* περιλαμβάνει την καλά χαρακτηρισμένη *CGG* τρινουκλεοτιδική αλληλουχία.

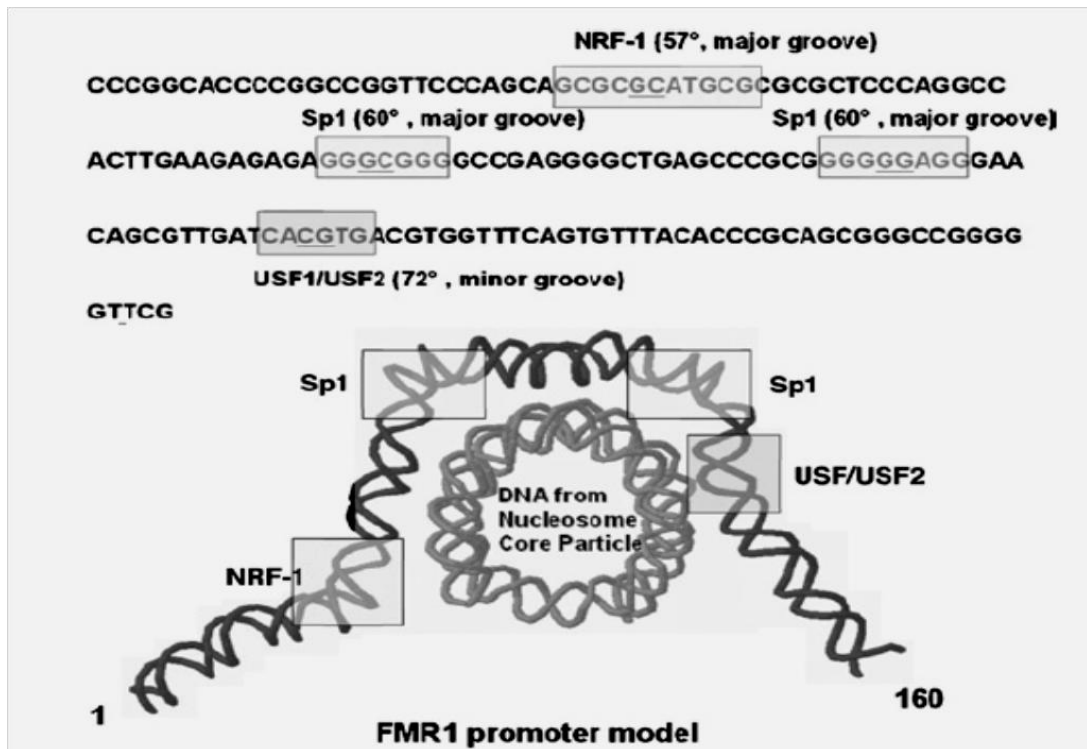
Η πιο προϊούσα από τις επιβεβαιωμένες θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων είναι αυτή στην οποία προσδέεται ο παράγοντας *a-Pal/ NRF-1*. Η θέση αυτή περιλαμβάνει μια παλίνδρομη αλληλουχία πλούσια σε *GC(25)*. Έλλειψη ή μεθυλίωση σε αυτή τη θέση προκαλεί ελαττωμένη μεταγραφή, επιβεβαιώνοντας το σημαντικό του ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση του *FMR1* γονιδίου (23). Οι δύο εσωτερικές θέσεις είναι *GC-boxes* και σε αυτές προσδέονται οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές *Sp1* και *Sp3* (24,27). Στο 3' άκρο του εκκινητή βρίσκεται η θέση *E-box*, στην οποία προσδέεται ο παράγοντας *CREB* ενώ αμφιλεγόμενος είναι ο τρόπος δράσης των παραγόντων *USF1*, *USF2* και *Max*

οι οποίοι επίσης πρόσδεονται στο E-box αλλά φαίνεται πως δρουν ανασταλτικά (25,27-28). Ο παράγοντας NRF-2 επίσης συμμετέχει στην έκφραση του FMR1 γονιδίου (25,28).

Οι NRF-1 και NRF-2 είναι παράγοντες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων του πυρήνα που εμπλέκονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, θέσεις αναγνώρισης αυτών των παραγόντων ανευρίσκονται σε εκκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες προσδέονται στο RNA (25).

Ο Sp1 προσδέεται, και στις δύο θέσεις πρόσδεσης, και προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας έως 100 φορές τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ο Sp1 είναι ο πιο δυνατός από τους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφή του FMR1 γονιδίου και ο πιο ανθεκτικός στη μεθυλίωση του DNA, το γεγονός όμως πως δεν προσδέεται στο fragile X αλληλόμορφο υποδεικνύει πως η πλήρης σιώπηση του γονιδίου απαιτεί επιπρόσθετα γεγονότα.

Η πρόσδεση του NRF-1, ο οποίος προκαλεί μία κάμψη του DNA κατά 57° προς τη μεγάλη αύλακα, σε συνδυασμό με τη δράση των Sp1 και USF1/ USF2 οι οποίοι επίσης προκαλούν κάμψη του DNA δίνουν μια λειτουργική συνοχή στον FMR1 εκκινητή. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως όλες οι πρωτεΐνες που προσδέονται στο E-box κάμπτουν το DNA. Φαίνεται πως ο συνδυασμός των παραπάνω πρωτεϊνών προκαλεί μία κάμψη ικανή να φέρνει κοντά το 5' άκρο του εκκινητή με το 3'. Μία τέτοια αρχιτεκτονική δημιουργεί τη βάση για τη συνάθροιση ικανού αριθμού πρωτεϊνών και διευκολύνει την αλληλεπίδρασή τους (24) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Η αλληλουχία της περιοχής του εκκινήτη που έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μοντέλου φαίνεται στο πάνω μέρος της εικόνας. Οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων φαίνονται μέσα στα κουτιά, με τη γωνία και τη φορά κάμψης που προκαλεί η πρόσδεση του καθένα να αναγράφεται από πάνω. Το κάτω μέρος της εικόνας δείχνει το μοντέλο του εκκινήτη που δημιουργείται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Berkeley Enhanced Rasmol.

Μία ακόμα πιθανή ομάδα ρυθμιστών της έκφρασης του FMR1 είναι αυτή της οικογένειας των AP-2 μεταγραφικών παραγόντων.

Τα χαρακτηριστικά λειτουργικά τμήματα του εκκινήτη είναι συντηρημένα μεταξύ διαφόρων ειδών θηλαστικών (24).

4.2 Η CGG ΤΡΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ

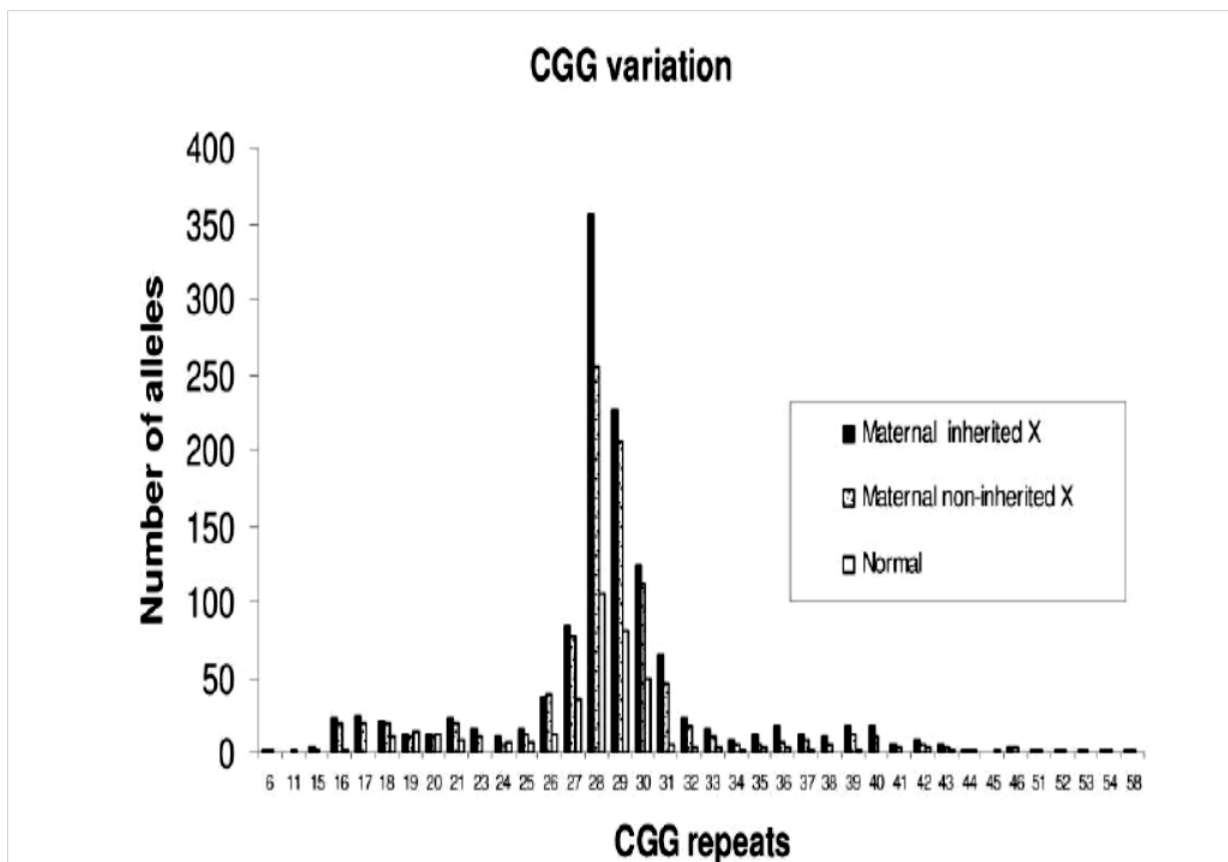
A. ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΩΝ

Ευρισκόμενη στην 5'UTR περιοχή του FMR1 γονιδίου (εικόνα 7), η CGG τρινουκλεοτιδική αλληλουχία αποτελεί μία ασταθή γενωμική περιοχή η οποία είναι επιρρεπής σε μειωτική και μιτωτική γονιδιακή επέκταση ή συστολή.

Με βάση τον αριθμό των CGG επαναλήψεων στο εξώνιο 1 αλλά και τη μεθυλίωση της συγκεκριμένης περιοχής τα FMR1 αλληλόμορφα διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες. Να σημειωθεί πως η ακόλουθη ταξινόμηση έχει γίνει, κυρίως, με βάση την εμπλοκή του γονιδίου κυρίως σε νευρολογικές/ψυχιατρικές διαταραχές οι οποίες είναι γνωστές και καλά μελετημένες από δεκαετίες (29):

1.Φυσιολογικά αλληλόμορφα (5-44 επαναλήψεις)

- Αλληλόμορφα αυτού του μεγέθους δεν εμφανίζουν μειωτική ή μιτωτική αστάθεια και μεταδίδονται από γενιά σε γενιά χωρίς αύξηση ή ελάττωση του αριθμού των επαναλήψεων.
- Μελέτες πληθυσμιακής κατανομής των *FMR1* αλληλομόρφων έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων έχει 29-31 επαναλήψεις (30).
- Αντίστοιχες μελέτες πληθυσμιακής κατανομής στον ελληνικό πληθυσμό έδειξαν ότι το πιο συχνό αλληλόμορφο (ποσοστό 27,9%) φέρει 28 επαναλήψεις CGG (εικόνα 9) (31).



Εικόνα 9: Κατανομή των CGG αλληλομόρφων στον ελληνικό πληθυσμό

- Οι γονότυποι που σχετίζονται με την ωθητική λειτουργία είναι διαφορετικοί από αυτούς που έχουν ιστορικά χαρακτηριστεί για να προσδιορίσουν τη πιθανότητα ενός ατόμου να εμφανίσει νευροψυχιατρικές διαταραχές. Έτσι λοιπόν, σε σχέση με την ωθητική λειτουργία, οι 26-34 CGG επαναλήψεις (διάμεσος 30) αντιπροσωπεύουν το φυσιολογικό, ανεξάρτητα από την εθνικότητα ή τη φυλή (8). Χρησιμοποιώντας αυτή τη κλίμακα, οι γυναίκες μπορούν να διακριθούν σε φυσιολογικές(φύσ), όταν και τα δύο αλληλόμορφα είναι μέσα σε αυτό το εύρος, ετερόζυγες(ετ) όταν το ένα αλληλόμορφο είναι

φυσιολογικό και το άλλο είναι μη φυσιολογικό και ομόζυγες(ομ) όταν και τα δύο αλληλόμορφα είναι μη φυσιολογικά. Οι ετερόζυγες και οι ομόζυγες γυναίκες μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε υπογονότυπους με κριτήριο το αν το μη φυσιολογικό τους αλληλόμορφο είναι πάνω(υψηλό) ή κάτω(χαμηλό) από 26-34 επαναλήψεις (32).

Συνολικά, σε σχέση με την ωοθηκική λειτουργία, διακρίνουμε τους ακόλουθους γονότυπους του FMR1 γονιδίου:

1. Φυσιολογικές
2. α. Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
β. Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
3. α. Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό
β. Ομόζυγες-χαμηλό/υψηλό
γ. Ομόζυγες- υψηλό/υψηλό

Το σκεπτικό, η χρησιμότητα και τα επιμέρους χαρακτηριστικά των γυναικών που φέρουν τους παραπάνω γονότυπους του FMR1 γονιδίου θα αναφερθούν αναλυτικά στη συνέχεια της παρούσας εργασίας.

2. Ενδιάμεσα αλληλόμορφα (ή gray zone ή οριακά) (περίπου 45-54 επαναλήψεις)

- Τα ενδιάμεσα αλληλόμορφα δεν προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις. Παρόλαυτά περίπου το 14% των ενδιάμεσων αλληλομόρφων είναι ασταθή και μπορεί να επεκταθούν σε αλληλόμορφα προμετάλλαξης όταν μεταδοθούν από τη μητέρα. Δεν έχει αναφερθεί η επέκταση σε αλληλόμορφα πλήρους μετάλλαξης σε μία γενιά.

Ο μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων που έχει αναφερθεί σε αυτή την κατηγορία είναι 54 (29).

3. Αλληλόμορφα προμετάλλαξης (περίπου 55-200 επαναλήψεις)

- Αλληλόμορφα αυτού του μεγέθους έχουν αυξημένη πιθανότητα για σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας σχετιζόμενο με το Εύθραυστο Χ και Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (ΠΩΑ). Λόγω της πιθανής αστάθειας αυτού του αριθμού των επαναλήψεων κατά τη

μετάδοση από μητέρα σε παιδί, γυναίκες που φέρουν αλληλόμορφα αυτής της κατηγορίας έχουν κίνδυνο απόκτησης παιδιού με σύνδρομο Εύθραυστου Χ.

- Ο αριθμός των 56 επαναλήψεων είναι ο μικρότερος αριθμός που έχει αναφερθεί πως έχει επεκταθεί σε πλήρη μετάλλαξη σε μία μετάδοση από γενιά σε γενιά (29).

4. Αλληλόμορφα πλήρους μετάλλαξης (>200 επαναλήψεις)

• Από 200 έως εκατοντάδες ή και χιλιάδες επαναλήψεις τα αλληλόμορφα αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση του εκκινητή. Μεθυλίωση της νησίδας CpG έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου FMR1 και ως εκ τούτου τη μη παραγωγή της πρωτεΐνης FMRP. Σχεδόν πάντα παρατηρείται σωματικός μωσαϊκισμός αναφορικά με τον αριθμό των επαναλήψεων σε δείγματα περιφερικού αίματος που έχουν προέλθει από ασθενείς που φέρουν τη πλήρη μετάλλαξη (29).

B. ΑΣΤΑΘΕΙΑ, ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ ΑΠΟ ΓΕΝΙΑ ΣΕ ΓΕΝΙΑ

Οι επεκτεινόμενες επαναλήψεις είναι ασταθείς, μεταβάλλονται σε αριθμό καθώς μεταδίδονται από γονείς σε παιδιά (διαγενεαλογική αστάθεια ή μειωτική αστάθεια) και συχνά εμφανίζουν ποικιλία στον αριθμό στους διάφορους ιστούς του πάσχοντος ατόμου (σωματικός μωσαϊκισμός ή μιτωτική αστάθεια). Η αστάθεια των επαναλήψεων είναι ένα κλινικά σημαντικό φαινόμενο καθώς η αύξηση του αριθμού τους, στην επόμενη γενιά, σχετίζεται με νωρίτερη έναρξη και μεγαλύτερη σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Η τάση του αριθμού των επαναλήψεων να αυξάνονται σε αριθμό καθώς μεταδίδονται από γενιά σε γενιά παρέχει μια μοριακή εξήγηση για την προσδοκία (anticipation) δηλ. την αυξανόμενη σοβαρότητα της ασθένειας σε διαδοχικές πάσχουσες γενεές (33).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο φυσιολογικό πληθυσμό, η CGG τρινουκλεοτιδική αλληλουχία είναι αριθμητικά πολυμορφική αλλά κληρονομείται με ένα σταθερό τρόπο (33).

Η μετάβαση σε αλληλόμορφο πλήρους μετάλλαξης εμφανίζεται διαμέσου ενός αλληλομόρφου προμετάλλαξης το οποίο κληρονομείται ασταθώς και όντας μη

μεθυλιωμένο, άρα δηλαδή χωρίς να εμφανίζει κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο (22,33-36). Ο κίνδυνος επέκτασης μιας προμετάλλαξης σε πλήρη μετάλλαξη στην επόμενη γενιά αυξάνει δραματικά με την αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων από 65 έως 100. Νεώτερες μελέτες αποδίδουν κίνδυνο 3,7% για επαναλήψεις από 55-59, 5,3% για επαναλήψεις από 60-69, 31,1% για επαναλήψεις από 70-79, 57,8% για επαναλήψεις από 80-89, 80,1% για τη κλίμακα 90-99, ποσοστό μεταξύ 94,4% και 100% στη κλίμακα 100-139 και 100% πιθανότητα για αριθμό επαναλήψεων >139 (37). Οι Sherman και συνεργ.(38,39) υποστήριξαν πως ο κίνδυνος για παθολογικό φαινότυπο σε μέλη οικογενειών με Σύνδρομο Εύθραυστου Χ εξαρτάται από τη θέση του ατόμου στο γενεαλογικό δέντρο. Το φαινόμενο γνωστό και ως «Παράδοξο του Sherman» αναφέρεται στην αύξηση του αριθμού και του ποσοστού των ατόμων με διανοητική καθυστέρηση σε διαδοχικές γενιές (33,38,39). Μετάβαση από φυσιολογικό αλληλόμορφο σε αλληλόμορφο προμετάλλαξης δεν έχει παρατηρηθεί. Σπάνια παραδείγματα αστάθειας στην κλίμακα των φυσιολογικών αλληλομόρφων έχουν παρατηρηθεί χωρίς όμως να έχουν επεκταθεί σε αλληλόμορφα πλήρους μετάλλαξης. Φαίνεται λοιπόν πως το μέγεθος του αλληλομόρφου, το οποίο καθορίζεται από τον αριθμό των CGG επαναλήψεων, παίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα ή μη, κατά τη μεταβίβαση από γενιά σε γενιά (33-36,22).

Πολυάριθμοι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση αστάθειας, εκτός του μεγέθους, έχουν ταυτοποιηθεί με κυριότερο αυτών να είναι το φύλο του γονέα που φέρει το αλληλόμορφο, γνωστό και ως «parent of origin effect». Μόνο οι γυναίκες μεταδίδουν το παθολογικό αλληλόμορφο στους απογόνους τους. Άρρενα άτομα μπορούν να φέρουν το αλληλόμορφο προμετάλλαξης («φυσιολογικοί μεταδίδοντες άρρενες» - normal transmitting males - NTMs), εντούτοις δεν μεταδίδουν ποτέ στις κόρες τους αλληλόμορφο με την πλήρη μετάλλαξη, παρόλο που αυτές οι κόρες έχουν κίνδυνο να αποκτήσουν παιδί με Σύνδρομο Έυθραυστου Χ. Κάτι τέτοιο ισχύει ακόμα και στην περίπτωση που το αλληλόμορφο είναι στην κλίμακα των 50-200 επαναλήψεων, μέγεθος που θα οδηγούσε σε επέκταση εάν μεταδιδόταν από το θήλυ γονέα (35,40-41). Ενδιαφέρον εντούτοις παρουσιάζει η μελέτη των Sullivan και συνεργ. οι οποίοι σε ανάλυση 1.482 περιστατικών μεταβίβασης FMR1 αλληλομόρφων, φυσιολογικών και ενδιάμεσων, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι πατρικές μεταβιβάσεις είναι λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις μητρικές. Κάτι τέτοιο έρχεται σε αντίθεση με ότι ισχύει για τα αλληλόμορφα προμετάλλαξης όπου μία αύξηση στον αριθμό των μητρικών επαναλήψεων αυξάνει τη πιθανότητα μεγάλων επεκτάσεων (δηλ. απόγονο με τη πλήρη μετάλλαξη) ενώ οι πατρικές

προμεταλλάξεις ποτέ δεν επεκτείνονται σε πλήρη μετάλλαξη. Επιπλέον με την αύξηση του αριθμού των πατρικών επαναλήψεων αυξάνεται η πιθανότητα γονιδιακής συστολής υποδεικνύοντας διαφορετικούς μεταλλακτικούς μηχανισμούς ή/και διαφορετική διαδικασία φυσικής επιλογής μεταξύ των δύο φύλων (42). Είναι ξεκάθαρο πως άρρενες ασθενείς με σύνδρομο Έυθραυστου Χ που φέρουν την πλήρη μετάλλαξη στα σωματικά τους κύτταρα φέρουν μόνο αλληλόμορφα προμετάλλαξης στο σπέρμα κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από ορχικές βιοψίες όπου στα μεν κύτταρα Sertoli ανευρίσκονται αλληλόμορφα πλήρους μετάλλαξης στα δε σπερματοζωάρια αλληλόμορφα προμετάλλαξης (40-41). Αντίθετα, μελέτες σε ιστούς από θηλυκό έμβρυο 16 εβδομάδων το οποίο έφερε την πλήρη FMR1 μετάλλαξη στο ένα από τα δύο Χ χρωμοσώματα (μετάλλαξη προερχόμενη από μητρικό αλληλόμορφο προμετάλλαξης 70 επαναλήψεων), έδειξαν πως στην ωοθήκη εμφανίζονται αλληλόμορφα πλήρους μετάλλαξης, μεθυλιωμένα και υπομεθυλιωμένα (41).

Ανάμεσα στις CGG τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις εμφανίζονται διασκορπισμένες AGG αλληλουχίες τόσο σε φυσιολογικά αλληλόμορφα όσο και σε αλληλόμορφα ενδιάμεσα ή προμετάλλαξης και συνήθως η θέση τους είναι κάθε 9 ή 10 συνεχείς CGG τριπλέτες $[(CGG)_{8-15}AGG(CGG)_{9-13}AGG(CGG)_x]$. Η παρουσία των AGG τριπλετών έχει φανεί πως αυξάνει τη σταθερότητα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας με το να μειώνει τον αριθμό των συνεχόμενων CGG τριπλετών με παρατηρούμενη αστάθεια να ξεκινά στα αλληλόμορφα στα οποία υπάρχουν περισσότερες από 33 συνεχόμενες CGG επαναλήψεις. Τα αλληλόμορφα προμετάλλαξης συνήθως φέρουν μία ή καμία παρεμβολόμενη AGG αλληλουχία σε αντίθεση με το γενικό πρότυπο των δύο παρεμβολών. Έτσι λοιπόν η απώλεια των AGG (έλλειψη της τριπλέτας ή μετάλλαξη της αδενίνης σε κυτοσίνη $A \rightarrow C$) μπορεί να είναι σύνηθες φαινόμενο στη δημιουργία μιας ασταθούς προμετάλλαξης αλλά μπορεί να είναι απαραίτητο αυτή η απώλεια να συμπέσει με ένα δεύτερο γεγονός, πιθανά μια επέκταση στον αριθμό των επαναλήψεων, προτού ένα αλληλόμορφο μεταπέσει στην κατηγορία της πλήρους μετάλλαξης (43).

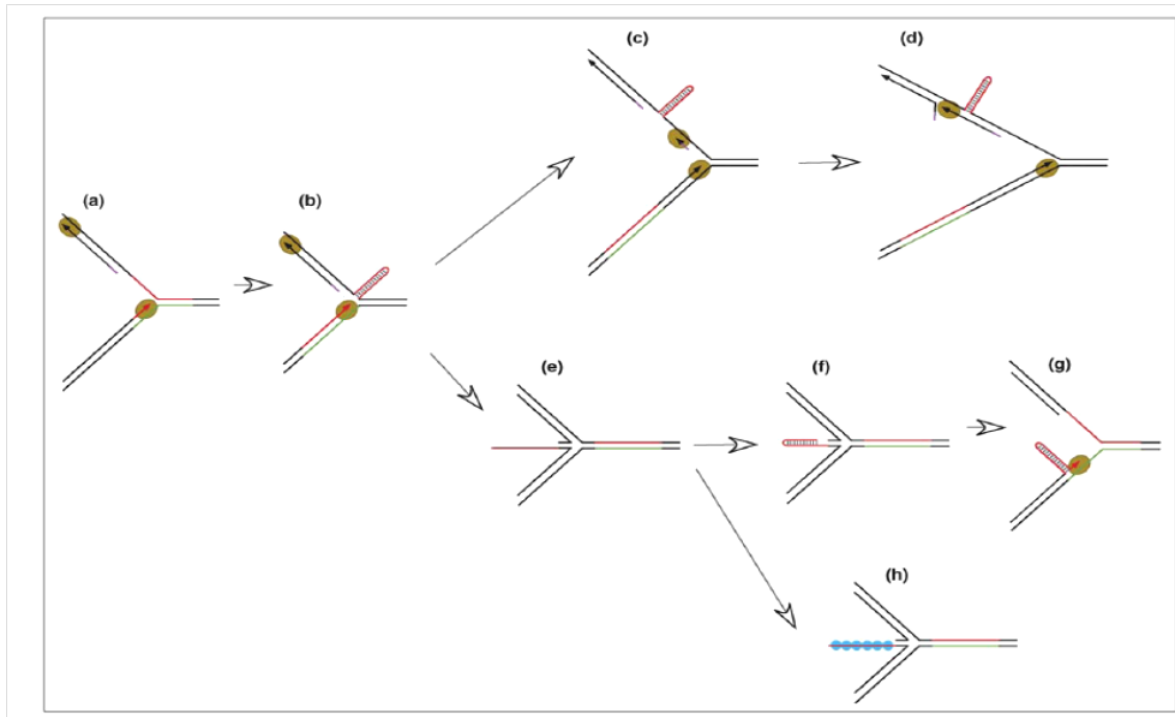
Όπως φαίνεται από το γενικό τύπο παραπάνω, η ποικιλότητα στον αριθμό των CGG επαναλήψεων εμφανίζει πολικότητα προς το 3' άκρο της περιοχής ενώ αντίθετα η θέση των AGG παραμένει αμετάβλητη στις επεκτάσεις.

Παρόλο που ο ακριβής χρόνος της επέκτασης των CGG επαναλήψεων δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, δύο χρονικές περίοδοι έχουν ενοχοποιηθεί κατά τις οποίες η προμετάλλαξη επεκτείνεται σε πλήρη μετάλλαξη: 1) η μείωση κατά τη δημιουργία των ωαρίων στα θήλεα άτομα 2) μετά τη δημιουργία του ζυγωτού κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (44).

Γ.ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ

Η επέκταση των τρινουκλεοτιδικών αλληλουχιών αρχικά ονομάστηκε «δυναμική μετάλλαξη» καθώς η φύση της μετάλλαξης είναι η αλλαγή στον αριθμό των επαναλήψεων και η πιθανότητα μετάλλαξης εξαρτάται από αυτό τον αριθμό (45,46).

Ο πιο πιθανός μηχανισμός επέκτασης θεωρείται το αποτέλεσμα του «γενετικού ολισθήματος» («genetic slippage») μεταξύ των δύο αλυσίδων, στο χρονικό διάστημα του πολλαπλασιασμού του DNA. *In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι κατά την αντιγραφή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών CTG ή CGG (μεγέθους 17-160 τρινουκλεοτιδίων) η DNA πολυμεράση στιγμιαία διακόπτει την αντιγραφή ανά 29-31 τρινουκλεοτίδια μέγεθος που πλησιάζει το οριακό σημείο αστάθειας των 34 επαναλήψεων. Πιθανά αίτια για την παύση της αντιγραφής αποτελούν είτε τα νουκλεοσώματα είτε ειδικά δεσμευόμενες σε τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες πρωτεΐνες ή τέλος δευτεροταγείς δομές που δημιουργούνται λόγω της παρουσίας επεκτεινόμενων αλληλουχιών πλούσιων σε CG. Φυσικό επακόλουθο της διακοπής της αντιγραφής είναι τα πολλαπλά «ολισθήματα» των DNA «θραυσμάτων Okazaki» και η δημιουργία δομών φουρκέτας με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας θυγατρικής αλυσίδας με μεγαλύτερο μέγεθος. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό είναι πιθανό να παρατηρείται πολύ μεγαλύτερη επέκταση εάν η δευτεροταγής δομή που σχηματίζεται είναι πιο σταθερή (όσο μεγαλύτερο το μέγεθος της αλληλουχίας στην οδηγό αλυσίδα τόσο πιο σταθερές οι δευτεροταγείς δομές που δημιουργούνται) (47,48) (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Μοντέλο αστάθειας των επαναλήψεων δημιουργούμενο κατά τη διάρκεια σταματήματος- ξεκινήματος της διχάλας αντιγραφής μέσα στην επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. α) Είσοδος της πολυμεράσης της οδηγού αλυσίδας στην επαναλαμβανόμενη αλληλουχία β) Ο σχηματισμός ασυνήθιστων δομών από τη συνοδό αλυσίδα μήτρα σταματά την πολυμεράση της συνοδού αλυσίδας και τελικά και τη διχάλα αντιγραφής γ) Η συνέχιση της αντιγραφής μετά από υπερπήδηση ενός τμήματος Okazaki δ) Συστολή των επαναλήψεων καθώς η πολυμεράση της συνοδού αλυσίδας υπερπηδά τη δομή της μήτρας της ε) Η αναστροφή της διχάλας αντιγραφής δημιουργεί μία δομή που στο 3' άκρο έχει μία προέκταση-μονόκλωνη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία ς) Αναδίπλωση της προέκτασης σε δομή φουρκέτας γ) Επανάραξη της αντιγραφής στην αντίθετη κατεύθυνση οδηγεί σε επέκταση η) Συγκέντρωση των πρωτεϊνών του ανασυνδυασμού των υπεύθυνων για την ανταλλαγή των αλυσίδων στη προέκταση του 3' άκρου.

Μία αλυσίδα με τάση για σχηματισμό ασυνήθιστων δομών φαίνεται με κόκκινο ενώ η συμπληρωματική του αλυσίδα με πράσινο. Τα κίτρινα οβάλ αντιπροσωπεύουν τη DNA πολυμεράση, οι μωβ γραμμές τους εκκινητές των τμημάτων Okazaki ενώ οι μπλε κύκλοι τις πρωτεΐνες ανασυνδυασμού.

Στην περίπτωση που η δημιουργία δομών φουρκέτας εντοπίζεται στη νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα το αποτέλεσμα είναι η επέκταση της αλληλουχίας CGG ενώ σε περίπτωση σχηματισμού της φουρκέτας στην αλυσίδα μήτρα παρατηρείται μείωση του αριθμού των επαναλήψεων. Πολύ μεγάλες αλληλουχίες CGG ευνοούν το σχηματισμό πολλαπλών δομών φουρκέτας και ως εκ τούτου οδηγούν στην παραγωγή αλυσίδων με πολύ μεγαλύτερη επέκταση στην αλληλουχία CGG (47,48).

Δ. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

Ο όρος επιγενετική αναφέρεται σε αλλαγές των γενετικών χαρακτηριστικών απουσία αλλαγών της αλληλουχίας του DNA. Ένα σημαντικό επιγενετικό φαινόμενο είναι η αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος. Η αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος (X-

chromosome inactivation - XCI) έχει ως αποτέλεσμα ένα από τα δύο X χρωμοσώματα στα σωματικά κύτταρα των θήλεων να αποσιωπείται μεταγραφικά. Η αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος είναι μία τυχαία διαδικασία και κάθε X έχει ίδια πιθανότητα να αδρανοποιηθεί. Φυσιολογικά, η διατήρηση του αδρανούς X χρωμοσώματος σε διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις, μετά τον καθορισμό της απενεργοποίησης θα οδηγήσει σε θήλυ μωσαϊκό για ομάδες κυττάρων με είτε το μητρικό είτε το πατρικό X χρωμόσωμα ενεργό. Η πρωτογενής αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος πραγματοποιείται στο στάδιο της βλαστοκύστης. Μη τυχαία ή στρεβλωμένη απενεργοποίηση εμφανίζεται όταν υπάρχει προτιμητέα αδρανοποίηση του ενός από τα δύο κληρονομούμενα X χρωμοσώματα. Μιλάμε για ήπια και ακραία στρέβλωση (παρέκκλιση) όταν $\geq 75\%$ ή $\geq 90\%$ των κυττάρων αντίστοιχα, έχουν το ίδιο γονεϊκό χρωμόσωμα ενεργό. Ως αποτέλεσμα της φυσικής επιλογής μπορεί να πραγματοποιηθεί δευτερογενής μη-τυχαία αδρανοποίηση. Η ηλικία είναι ένας από τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε δευτερογενή XCI. Η συχνότητα της ακραίας παρέκκλισης ($\geq 90\%$) αυξάνεται από $<3\%$ στα νεογνά, σε $\sim 4\%$ σε γυναίκες ηλικίας 30 ετών ενώ σε γυναίκες ηλικίας 75 ετών το ποσοστό ανέρχεται σε 30%. Η στρέβλωση της XCI λόγω ηλικίας φαίνεται ότι εμφανίζεται λόγω των μικρών εξελικτικών πλεονεκτημάτων του ενός σε σχέση με το άλλο X ή λόγω της εξάντλησης της δεξαμενής των βλαστικών κυττάρων με την πάροδο του χρόνου (49). Μελετώντας κανείς γονίδια που εδράζονται στο X χρωμόσωμα αλλά και τους γονότυπούς τους σκόπιμο είναι να έχει στο μυαλό του τόσο την τυχαία αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος όσο και τις παρεκκλίσεις από αυτή. Πράγματι ανάλυση μεθυλίωσης σε υπογόνιμους ασθενείς στους οποίους είχε ήδη γίνει έλεγχος για FMR1 γονοτύπους έδειξε πως η παρέκκλιση από την τυχαία αδρανοποίηση του X-χρωμοσώματος (50%) ήταν υψηλότερη στην περίπτωση γονοτύπων με το χαμηλό αλληλόμορφο (CGG <26) και χαμηλότερη σε γυναίκες με το φυσιολογικό γονότυπο (26 $<$ CGG <34) (100). Το φαινόμενο αυτό είναι κάτι τελείως διαφορετικό από την περίπτωση ασθενών με το Σύνδρομο Έυθραυστου X, όπου η CGG τριπλέτα εμφανίζεται πάνω από 200 φορές (πλήρης μετάλλαξη), είναι συνήθως υπερμεθυλιωμένη και η μεθυλίωση αυτή εκτείνεται μέχρι τη περιοχή του εκκινήτη που βρίσκεται δίπλα. Σαν αποτέλεσμα, το γονίδιο είναι μεταγραφικά ανενεργό και το προϊόν του, η πρωτεΐνη FMRP, είναι απόν (50).

5. FMRP (Fragile-X Protein)

5.1. ΓΕΝΙΚΑ

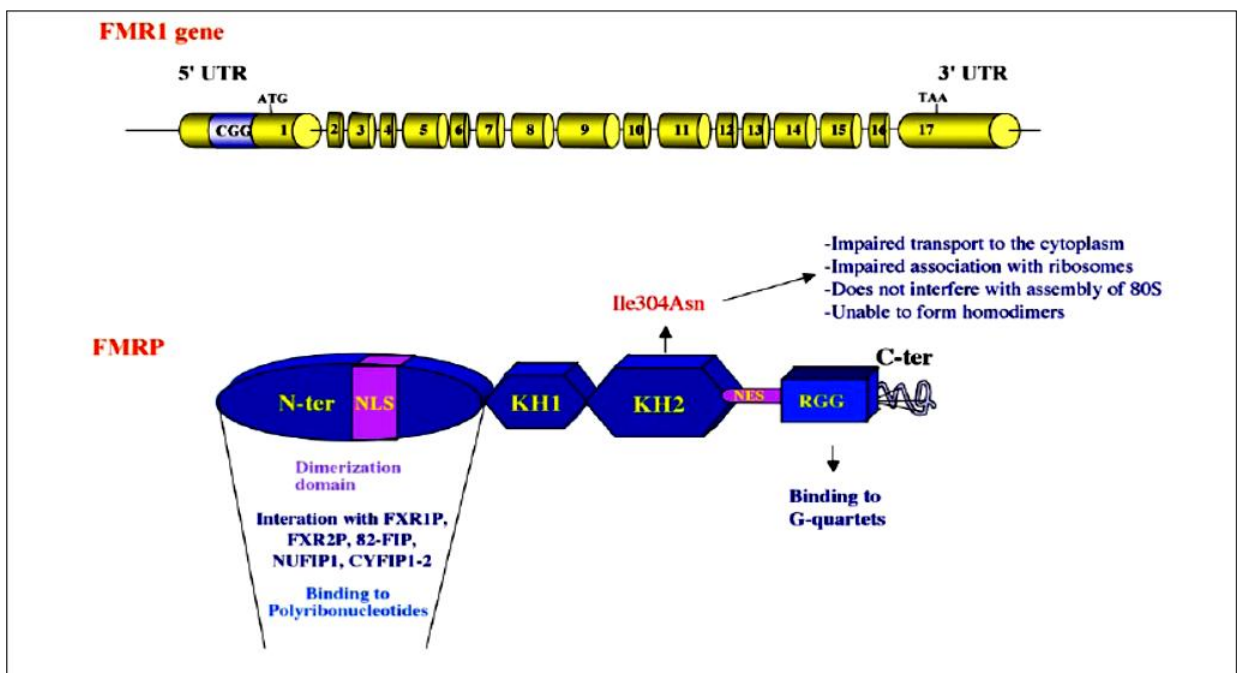
Το προϊόν του *FMR1* γονιδίου είναι η πρωτεΐνη *FMRP*, η οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα σπονδυλωτά και ανήκει σε μια οικογένεια που περιέχει δύο άλλες πρωτεΐνες την *FXR1P* και την *FXR2P*. Μελέτες έδειξαν πως η *FMRP* εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς(ωοθήκη, επιθήλιο του οισοφάγου, θύμος αδένας, οφθαλμός, σπλήνα, μήτρα, θυρεοειδής αδένας, ήπαρ) αλλά κυρίως βρίσκεται στο Κ.Ν.Σ και τους όρχεις. Σε επίπεδο κυτάρου, η *FMRP* είναι κυρίως κυτταροπλασματική αλλά περίπου 5% της συνολικής *FMRP* βρίσκεται στο πυρήνα. Περιέχει τόσο ένα σήμα τοποθέτησης στο πυρήνα (*NLS-Nuclear Localization Signal*) όσο και ένα σήμα εξόδου από το πυρήνα (*NES-Nuclear Export Signal*), επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο στη πρωτεΐνη να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (33,51-53).

Το γεγονός ότι η *FMRP* είναι παρούσα κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένη με *mRNAs* σαν τμήμα μεγάλων ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (*mRNPs*), μαζί με τα πολυριβοσώματα, υποδηλώνει πως η *FMRP* με κάποιο τρόπο εμπλέκεται στο μεταμεταγραφικό έλεγχο της έκφρασης. Έτσι λοιπόν η *FMRP* θα μπορούσε να ελέγχει τη μεταφορά, τον εντοπισμό και/ή τη μετάφραση συγκεκριμένων *mRNAs* στα κύτταρα στα οποία κυρίως εκφράζεται (33,51-53).

Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της *FMRP* αποκάλυψε την παρουσία δύο τύπων μοτίβων πρόσδεσης στο *RNA*, δύο τομείς ομόλογους με ριβονουκλεοπρωτεΐνες *K* (*KH domain*) και συμπλέγματα αργινίνης και γλυκίνης (*RGG boxes*), τα οποία υποδηλώνουν ότι η *FMRP* είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο *RNA* (33,51-53). Η *FMRP* έχει επίσης δειχθεί πως μπορεί να προσδένεται στο ίδιο της το *mRNA* όπως επίσης και στην *antisense* αλληλουχία της. Όλα τα παραπάνω δεδομένα μαζί υποδηλώνουν πως η *FMRP* θα μπορούσε να προσδέσει *RNA* γενικά αλλά και να εμφανίζει κάποια επιλεκτικότητα ως προς το είδος του *RNA* που προσδένει με μεγάλη τάση. Η ειδικότητα της πρόσδεσης πιθανότατα επιτυγχάνεται από το σύνολο των πρώτων ~400 αμινοξέων, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο προσδίδει μια μη ειδική επιφάνεια πρόσδεσης(23,44-46). Η παρατήρηση ότι η *FMRP* συνδέεται με πολυριβοσώματα υποδηλώνει πως η *FMRP* ρυθμίζει τη μετάφραση του *mRNA* και επηρεάζει την αστάθειά του *in vivo* (33).

Όπως προαναφέρθηκε, παρόλο που η *FMRP* κυρίως ανευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, περιέχει τόσο ένα σήμα τοποθέτησης στο πυρήνα (*NLS-Nuclear Localization Signal*) όσο και ένα σήμα εξόδου από το πυρήνα (*NES- Nuclear Export*

Signal). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, έχει προταθεί πως η FMRP παίζει ρόλο στην έξοδο συγκεκριμένων mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η νεοδημιουργούμενη FMRP εισέρχεται στο πυρήνα και εκεί συγκροτείται σε mRNP, αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένα RNA μετάγραφα και άλλες πρωτεΐνες. Τα mRNPs που περιέχουν FMRP και τα RNA στόχοι θα μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα. Εναλλακτικά, ένας πιθανός ρόλος στη ρύθμιση της τοποθέτησης, σταθερότητας και/ή μετάφρασης του mRNA στόχου έχει επίσης υποτεθεί. Η φωσφορυλιωμένη FMRP βρίσκεται κυρίως στο πυρήνα. Η ύπαρξη φωσφορυλιωμένης μορφής υποδηλώνει ρύθμιση μέσω μεταγωγής σήματος (33,51-53).



Εικόνα 11: Δομικά και λειτουργικά τμήματα της FMRP. Η πρωτεΐνη παρουσιάζει τέσσερα τμήματα για RNA πρόσδεση, N-άκρο, KH1, KH2, RGG. Υπάρχουν επίσης σήματα λειτουργικής τοποθέτησης στο πυρήνα και εξόδου απ' αυτόν. Κάθε πρωτεϊνικό τμήμα έχει επίσης δείχθει πως έχει διακριτή λειτουργία όπως αλληλεπίδραση με RNAs και άλλες πρωτεΐνες.

5.2 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ FMRP ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ

Είναι γεγονός, ότι η πλειονότητα των μελετών σχετικά με τη βιολογία της FMRP επικεντρώνονται στο ρόλο της στο νευρικό ιστό, ειδικά λόγω της εμπλοκής της στο Σύνδρομο Εύθραυστου Χ, ένα σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από σοβαρά γνωστικά ελλείματα και ανωμαλίες στη συμπεριφορά. Παρά τη γενικευμένη έκφρασή της καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο ρόλος της FMRP σε μη-νευρικούς ιστούς παραμένει λιγότερο μελετημένος (54).

Η FMRP έχει βρεθεί πως δρα κατά την εμβρυογένεση στη Δροσόφιλα, όπου είναι απαραίτητη στο στάδιο της αυλάκωσης, για τη ρύθμιση των πρώτων γρήγορων πυρηνικών διαιρέσεων αλλά και την οργάνωση της χρωματίνης(54). Παράλληλα, είναι αναγκαία η ύπαρξή της FMRP για το σωστό σχηματισμό των θαλάμων των ωαρίων αλλά και τη διατήρηση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ωογένεσης (54).

Πιο πρόσφατα, δύο ομάδες ανέφεραν πως η Dfcr πρωτεΐνη της Δροσόφιλα (ομόλογη της οικογένειας FMRP και FXR1/2) αλληλεπιδρά απευθείας in vivo με την πρωτεΐνη Argonaute 2 (AGO2), βασικό συστατικό του συμπλέγματος RISC. Η πρωτεΐνη Dicer (μια πρωτεΐνη που μοιάζει με την RNAάση III και είναι υπεύθυνη τόσο για το σχηματισμό των siRNAs όσο και για την ωρίμανση των miRNAs) επίσης ανιχνεύθηκε στο σύμπλοκο (51,55-56). Τα microRNAs, τα ενδογενή siRNAs και τα μοναδικά Piwi RNAs (piRNAs) αποτελούν τη πλειονότητα των μικρών (<30bp) μη κωδικών ρυθμιστικών RNAs στον ωοθηκικό ιστό. Υπάρχει ομοφωνία στη βιβλιογραφία πως τα piRNAs προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα. Τα ενδογενή siRNAs, έχουν απομονωθεί από ωοκύτταρα και σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, αλλά όχι ακόμα σε σωματικά κύτταρα της ωοθήκης. Στη περίπτωση των miRNAs, μελέτες έχουν δείξει πως στα κοκκώδη κύτταρα εκφράζονται πάνω από 212 διαφορετικά miRNAs ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει πως ενώ τα miRNAs είναι παρόντα στο ωοκύτταρο φαίνεται πως έχουν περιορισμένη δραστηριότητα ή σοβαρά κατεσταλμένη ενεργότητα.(57-58). Έτσι με βάση τα παραπάνω ευρήματα, στη Δροσόφιλα, η Dfcr θα μπορούσε να παίζει ρόλο στα μονοπάτια σιώπησης γονιδίων των siRNAs και miRNAs. Τα siRNAs και miRNAs είναι παρόντα σε παρόμοια RNP σύμπλοκα αλλά η λειτουργία τους διαφέρει: ενώ τα siRNAs πυροδοτούν την αποδόμηση των RNA στόχων, τα miRNAs πιστεύεται πως αναστέλλουν τη μετάφραση μετά τη φάση έναρξης (51,55,56).

Σε μια άλλη μελέτη, παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση του *Fmr1*, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA όπως επίσης και στην κυτταρική εντόπιση στα διαφορετικά στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης στην ωοθήκη του επίμου. Με χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών ανιχνεύθηκε έκφραση της FMRP σε όλα τα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένου και των αρχέγονων ωοθυλακίων. Κοκκώδη και κύτταρα θήκης έδειξαν θετική, ως προς FMRP, ανοσοαποτύπωση. Σε ενήλικες επίμους θετική FMRP ανοσοαποτύπωση παρατηρήθηκε επίσης και σε ωχρινικά κύτταρα υποδηλώνοντας ένα πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης στη λειτουργία του ωχρού σωματίου (59).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν την έκφραση τουλάχιστον τεσσάρων ισομορφών της πρωτεΐνης στην ωοθήκη του επίμου σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των

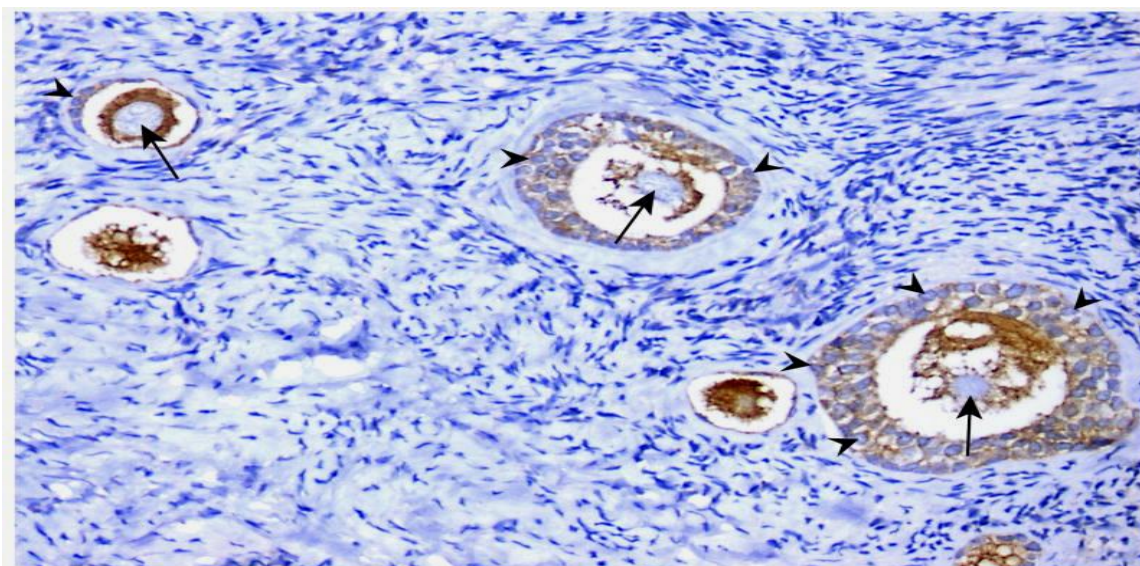
ωοθυλακίων. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση των ισομορφών στην ωοθήκη σε σχέση με τον εγκέφαλο και τους όρχεις θα μπορούσαν να υποδηλώνουν μια διαφορετική λειτουργία για κάποιες από τις ισομορφές στο συγκεκριμένο ιστό. Αξιοσημείωτο είναι πως διαφορετικά επίπεδα όλων των ισομορφών της FMRP ανιχνεύονται με Western Blot κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης· μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε προκοιλοτικά ωοθυλάκια ενώ η έκφραση ήταν πιο αυξημένη στα αρχόμενα κοιλοτικά και στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια ενώ οι διαφορές αυτές ήταν πιο έντονες κατά τη μετάβαση από προκοιλοτικό σε αρχόμενο κοιλοτικό ωοθυλάκιο, στάδιο το οποίο είναι πιο ευαίσθητο σε ατρησία. Έτσι λοιπόν σοβαρές αλλαγές στη πρωτεϊνική μετάφραση μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου για να υπερπηδήσουν την ατρησία και να συνεχίσουν με την ωοθυλακιογένεση. Λαμβανομένου υπ' όψιν πως η FMRP είναι ένας βασικός κυτταρικός καταστολέας της μετάφρασης ο οποίος προσδένεται σε πολλά μετάγραφα ελέγχοντας από εκεί και πέρα τη «μεταγραφική τους μοίρα», μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης κατά το προκοιλοτικό στάδιο θα ευνοούσαν τη μετάφραση των mRNA στόχων ενώ αυξημένες ποσότητες της πρωτεΐνης και άρα αυξημένη καταστολή της μετάφρασης είναι κάτι που θα περίμενε κανείς σε αυξανόμενα σε μέγεθος ωοθυλάκια. Καθώς η FMRP έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρά με το miRNA και τα στοιχεία του miRNA μονοπατιού και λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των γονιδίων στην ωοθήκη και στο γυναικείο γεννητικό σύστημα γενικά, φαίνεται λογικό να αποδώσει κανείς σε αυτή την πρωτεΐνη ένα κρίσιμο ρόλο για την επαρκή λειτουργία της γονάδας. Ελαττώματα στο ρυθμιστικό έλεγχο μπορεί να οδηγήσουν σε ωοθηκική ανεπάρκεια λόγω αποδιοργάνωσης της ωοθυλακιογένεσης, παρεμπόδισης της ωοθυλακιορρηξίας και ανεπάρκεια ωχρού σωματίου μεταξύ άλλων. Επιπλέον, η ανάπτυξη του ωαρίου σε μεγάλο μέρος εξαρτάται από το πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων ξεκινά από το πρωτογενές ωοθυλάκιο και η αύξηση του ωοθυλακίου χαρακτηρίζεται από αυξανόμενα στρώματα κοκκωδών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι εκείνος ο κυτταρικός τύπος ο οποίος υφίσταται τις μεγαλύτερες αλλαγές σε μέγεθος και αριθμό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης θα μπορούσαν να είναι ένα μέτρο της συμβολής της έκφρασης της FMRP σε αυτό το κυτταρικό τύπο στη ρύθμιση της φυσιολογίας της ωοθήκης (59).

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα σε πρωτεϊνικό επίπεδο, προκοιλοτικά και αρχόμενα κοιλοτικά ωάρια παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα μετάγραφων *Fmr1*, ενώ μειωμένη

έκφραση παρατηρήθηκε σε προωθυλακιορρηκτικά ωάρια, υποδηλώνοντας πως η μειωμένη έκφραση του *Fmr1* στην ωοθήκη καθορίζεται σε διαφορετικά και πιθανά ανεξάρτητα επίπεδα. Μία αύξηση είτε στη σταθερότητα του mRNA είτε στο ρυθμό μετάφρασης της πρωτεΐνης στα τελευταία στάδια της ωοθυλακιογένεσης θα μπορούσαν να εξηγούν τις διαφορές στα επίπεδα RNA και πρωτεϊνών (59).

Επιπλέον, σε μελέτη ωαρίων αγελάδας (μόνο-ωοθυλακιορρηκτικό είδος), παρατηρήθηκε έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας *FMRP*, τόσο σε κοκκώδη κύτταρα και ωάρια, όσο και σε πρώιμα έμβρυα. Βρέθηκε ότι η *FMRP* συνεντοπίζεται με μία πρωτεΐνη που σχηματίζει κυστίδια RNA αλλά και με άλλες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής του κυττάρου. Η *FMRP* μόνη της βρέθηκε απαραίτητη για την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη στο στάδιο της βλαστοκύστης ενώ η απουσία των πρωτεϊνών ολόκληρης της οικογένειας *FMRP* κατέληξε σε αναστολή της εμβρυικής ανάπτυξης στο στάδιο του μοριδίου. Αυτός ο αναπτυξιακός «θάνατος» που παρατηρήθηκε μετά την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος κατέδειξε πως η *FMRP* δεν είναι ένας ουσιώδης μεσολαβητής για το μητρικό γονιδίωμα αντίθετα είναι υποδηλωτικός της δράσης της *FMRP* ως μεσολαβητής για την έκφραση του εμβρυικού γονιδιώματος που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό της βλαστοκύστης (116).

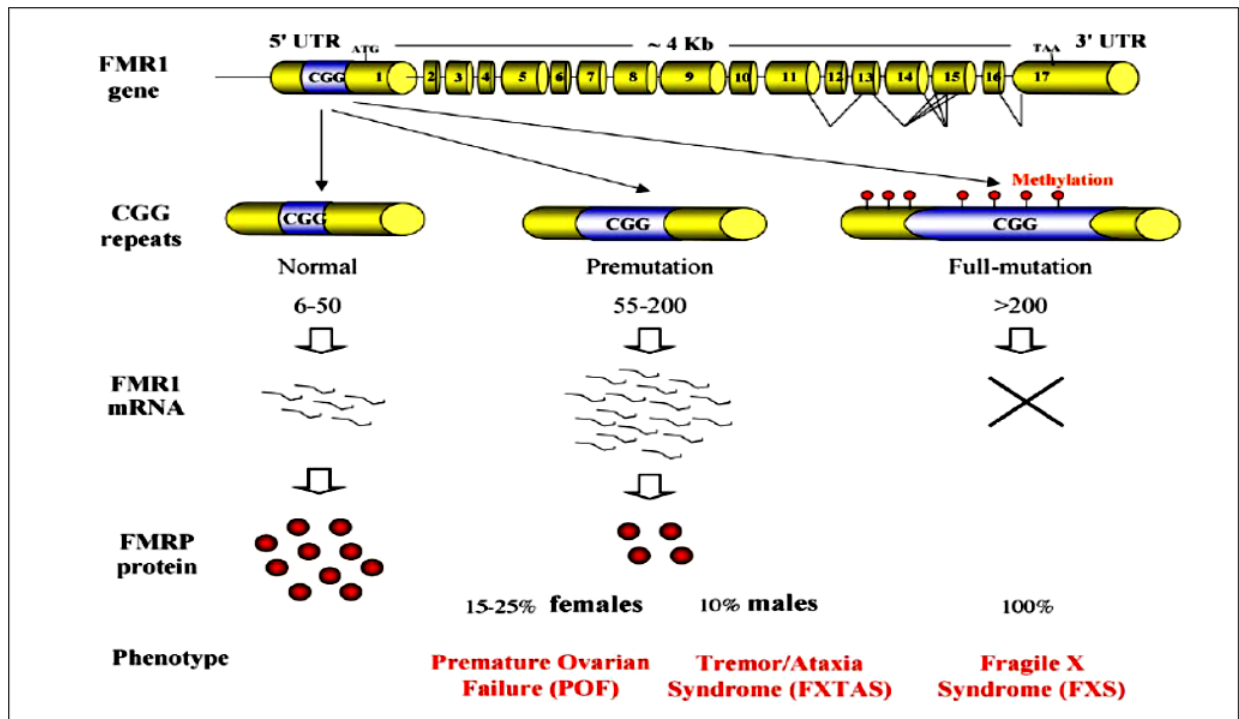
Πριν τη γέννηση, σε ανθρώπινες εμβρυικές ωοθήκες, έκφραση *FMRP* παρατηρήθηκε μόνο σε ωάρια. Εντούτοις παρατηρήθηκε μετατόπιση της κυτταρικής έκφρασης της *FMRP* κυρίως στα κοκκώδη κύτταρα κατά την περαιτέρω ωρίμανση των ανθρώπινων ωοθυλακίων, μετά τη γέννηση (εικόνα 12). Στη συγκεκριμένη μελέτη συμπεραίνεται ότι η ικανοποιητική δράση της *FMRP* στα κοκκώδη κύτταρα εξαρτάται από ένα βέλτιστο επίπεδο μεταγράφων. Όλες οι γυναίκες με αριθμό CGG επαναλήψεων εκτός του φυσιολογικού εύρους ($26 < n < 34$) αναμένεται να παρουσιάζουν έναν πιο χαλαρό μεταγραφικό έλεγχο του *FMR1* γονιδίου (115).



Εικόνα 12: Έκφραση της FMRP στην ανθρώπινη θηλυκή βλαστική σειρά μετά τη γέννηση

6. ΑΠΟ ΤΟ ΓΟΝΟΤΥΠΟ ΣΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ

Όπως έχει προαναφερθεί, το γονίδιο *FMR1* περιλαμβάνει μία CGG επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που είναι παρούσα στην 5'UTR και μπορεί να είναι ασταθής κατά τη μετάδοση στην επόμενη γενιά. Ο αριθμός των επαναλήψεων είναι έως 55 στο φυσιολογικό πληθυσμό. Σε ασθενείς με Σύνδρομο Εύθραυστου Χ, ένα μέγεθος μεγαλύτερο των 200 επαναλήψεων (πλήρης μετάλλαξη), οδηγεί σε μεθυλίωση της περιοχής συμπεριλαμβανομένου και του υποκινητή, κάτι το οποίο οδηγεί σε σιώπηση του γονιδίου *FMR1*. Η απουσία της πρωτεΐνης FMRP είναι η αιτία της πνευματικής καθυστέρησης σε ασθενείς με Σύνδρομο Εύθραυστου Χ. Ως προμετάλλαξη χαρακτηρίζεται αριθμός επαναλήψεων μεταξύ 55-200 επαναλήψεις CGG. Θήλεα άτομα φορείς της προμετάλλαξης έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν πρόωρη ωθητική ανεπάρκεια. Μεγαλύτεροι σε ηλικία φορείς της προμετάλλαξης μπορεί να εμφανίσουν μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που καλείται Σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας σχετιζόμενο με το Εύθραυστο Χ (FXTAS). Παρόλο που ξεκινούν από την ίδια μετάλλαξη, στο ίδιο γονίδιο, διακριτοί μηχανισμοί οδηγούν στο Σύνδρομο Εύθραυστου Χ (απουσία της FMRP), στο Σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας (τοξική λειτουργία του RNA) και Π.Ω.Α (56). Τα παραπάνω συνοψίζονται στην ακόλουθη εικόνα (εικόνα 13).



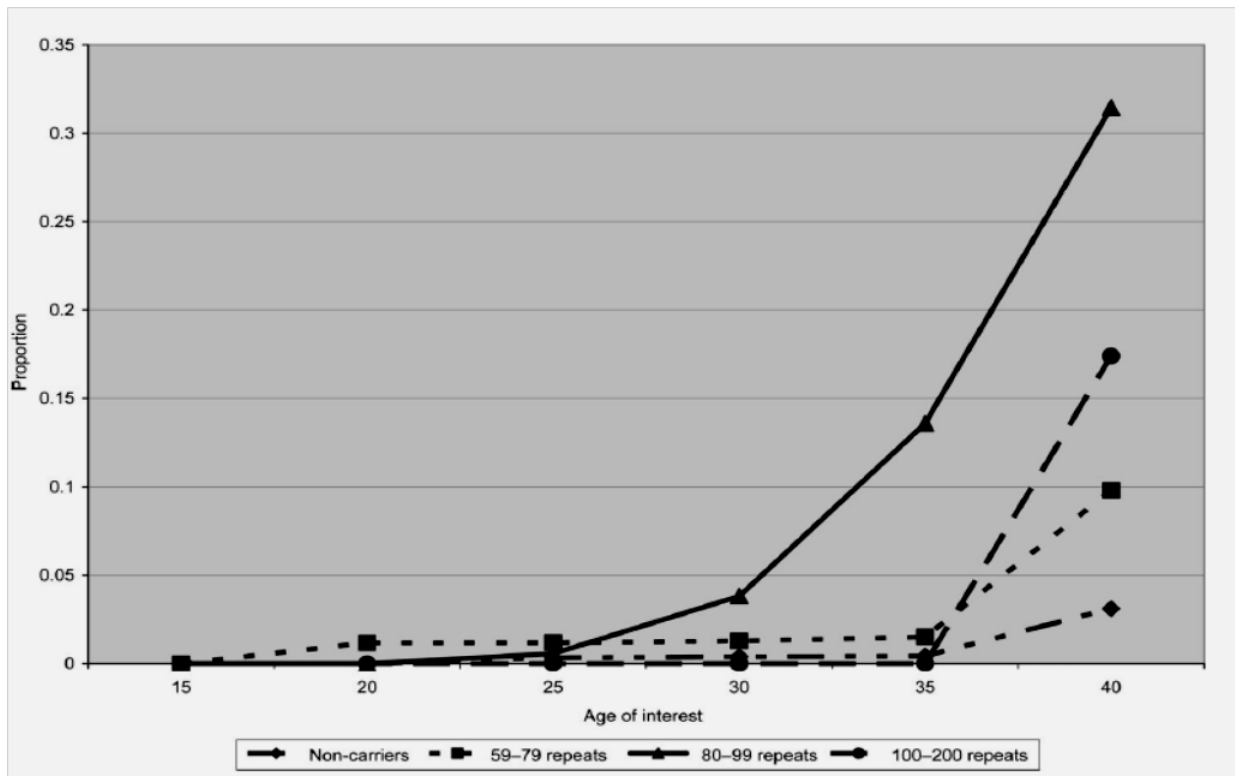
Εικόνα 13: Δομή, αριθμός επαναλήψεων, πρωτεΐνη και φαινότυποι σχετιζόμενοι με το γονίδιο *FMR1*

6.1 ΠΡΩΡΗ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΟ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟ Χ(FXPOI)

Ενώ γυναίκες με τη προμετάλλαξη έχουν χαμηλό ρίσκο να αναπτύξουν Σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας σχετιζόμενο με το Εύθραυστο Χ(FXTAS), η Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (Primary Ovarian Insufficiency-POI) είναι ένα συχνό εύρημα (18,60,61). Ο όρος αυτός προτάθηκε για να αντικατοπτρίσει, εκτός από τη παύση των έμμηνων κύκλων πριν την ηλικία των 40 ετών, και ένα φάσμα ελαττωμένων ωοθηκικών λειτουργιών που εμφανίζονται σε γυναίκες φορείς του *FMR1* αλληλομόρφου με την προμετάλλαξη. Ο πιο εξειδικευμένος όρος, Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια σχετιζόμενη με το Έυθραυστο Χ (Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency-FXPOI), εισήχθη για να περιγράψει κάθε βαθμό Πρόωρης Ωοθηκικής Ανεπάρκειας αποδοτέα στο *FMR1*. Η Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια σχετιζόμενη με το Έυθραυστο Χ επηρεάζει περίπου το 20% των φορέων της προμετάλλαξης, σε διάφορους πληθυσμούς/εθνικότητες, αντιπροσωπεύοντας έναν αυξημένο κίνδυνο κατά 20 φορές σε σχέση με το κίνδυνο εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό που είναι 1% (61-65). Οι υπολογισμένες συχνότητες των φορέων της προμετάλλαξης μεταξύ γυναικών που απευθύνονται σε εξειδικευμένες μονάδες για λόγους υπογονιμότητας, με οικογενή ή σποραδική Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια ήταν: 11,5% με 95% CI: 5,4%-20,8%, για οικογενή δείγματα και 3,2% με 95% CI: 1,4%-6,2%, σε σποραδικά δείγματα,

συγκρινόμενα με ποσοστό ~0,4% για τη συχνότητα αυτών των φορέων στο γενικό πληθυσμό (61). Σε άλλη μελέτη, αντίθετα, αναφέρεται πως η επίπτωση της προμετάλλαξης ήταν 2,0% σε δείγματα πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας, 0,7% σε δείγματα πρόωρης εμμηνόπαυσης και 0,4% σε controls, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως οι προμεταλλάξεις του FMR1 αλληλομόρφου δεν είναι τόσο εμφανείς σε γυναίκες με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, παραμένοντας ωστόσο μία σημαντική αιτία για Π.Ω.Α και πρόωρη εμμηνόπαυση (66).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως από στοιχεία που συλλέχθηκαν από περισσότερες από 500 γυναίκες με μεγάλο εύρος CGG επαναλήψεων (από φυσιολογικό έως και τα υψηλότερα επίπεδα της προμετάλλαξης), φάνηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CGG επαναλήψεων και της εμφάνισης Πρόωρης Ωοθηκικής Ανεπάρκειας σχετιζόμενης με το Έυθραυστο Χ, όχι όμως γραμμική. Για αυτές με <40 επαναλήψεις η επίπτωση της Π.Ω.Α ήταν 0,9%, για αυτές με 41-58 επαναλήψεις αυξήθηκε σε 2,2%, για αυτές με 59-79 επαναλήψεις ήταν 5,9%, για αυτές με 80-99 επαναλήψεις έφτανε σε ποσοστό 18,6% ενώ σε αυτές με >100 επαναλήψεις η επίπτωση έπεφτε σε 12,5%. Επιπλέον, οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν μία συνολική επίδραση του αριθμού των CGG επαναλήψεων στην ηλικία της εμμηνόπαυσης, με φορείς αλληλομόρφων στα χαμηλά όρια να εμφανίζουν εμμηνόπαυση 2,5 χρόνια νωρίτερα σε σχέση με τα controls και φορείς αλληλομόρφων στα υψηλά όρια της προμετάλλαξης να εμφανίζουν εμμηνόπαυση 4 χρόνια νωρίτερα σε σχέση τους φορείς των αλληλομόρφων στα χαμηλά όρια (60). Η μη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CGG επαναλήψεων και της πιθανότητας για εμφάνιση Π.Ω.Α ή/και πρόωρης εμμηνόπαυσης επιβεβαιώθηκε αργότερα και σε άλλη μελέτη, όπου βρέθηκε πως η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων σχετίζεται με αύξηση της πιθανότητας για Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια για αλληλόμορφα προμετάλλαξης έως 80 επαναλήψεις ενώ φορείς αλληλομόρφων με περισσότερες επαναλήψεις έχουν μειωμένο κίνδυνο για Π.Ω.Α και σχεδόν ίδιο με τα φυσιολογικά άτομα (εικόνα 19) (64). Σε άλλη μελέτη, βασισμένη σε στοιχεία που συλλέχθηκαν από 948 γυναίκες βρέθηκε πως η μέση ηλικία εμμηνόπαυσης για φορείς αλληλομόρφων με 59-79 επαναλήψεις και >100 επαναλήψεις ήταν ίδια (48,5 έτη και 47,5 έτη αντίστοιχα) αλλά ήταν ~ 3 έτη νωρίτερη (44,9) σε φορείς των 80-100 επαναλήψεων. Παρόλο που η μεγαλύτερη ελάττωση στην ηλικία έναρξης εμμηνόπαυσης ήταν σε φορείς CGG επαναλήψεων του εύρους 80-100, ήταν γενικότερα χαμηλότερη σε όλο το εύρος της προμετάλλαξης σε σχέση με τα 52,3+0,5 έτη που εμφανίζεται σε φυσιολογικά άτομα (67).

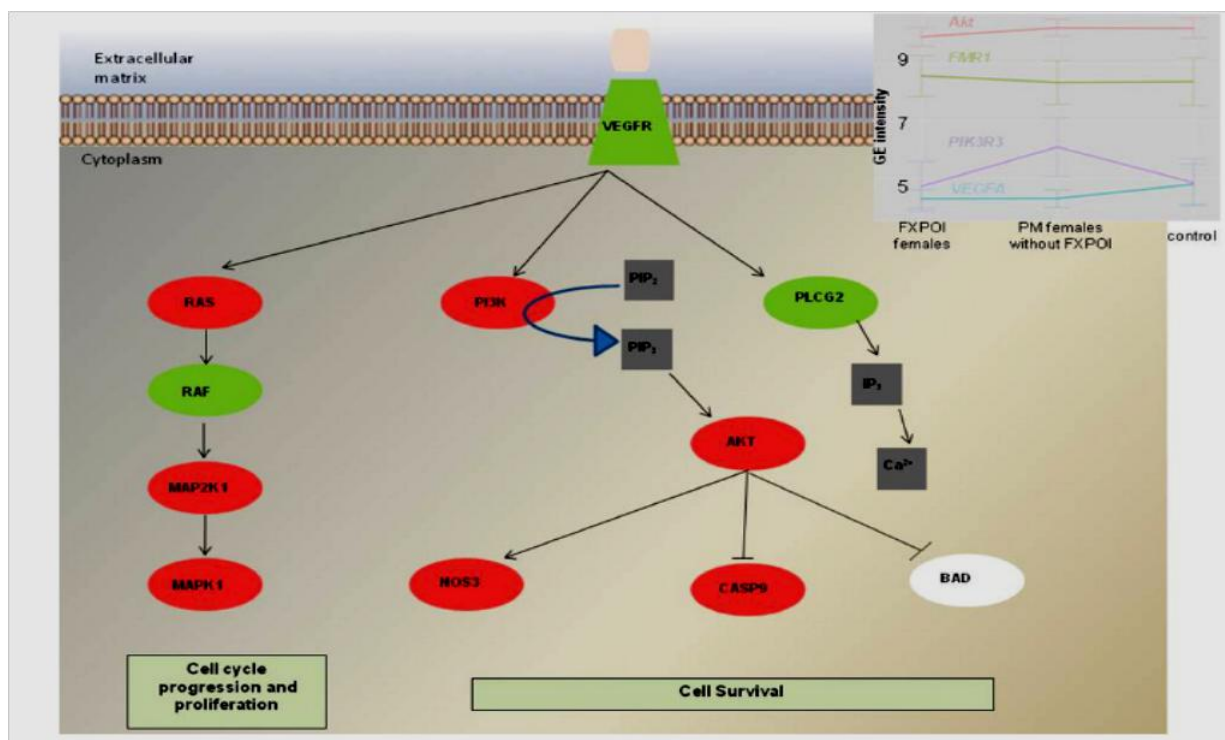


Εικόνα 14: Επίπτωση της εμφάνισης Π.Ω.Α με βάση τον αριθμό των επαναλήψεων σε σχέση με την ηλικία

Τα χαρακτηριστικά που αντικατοπτρίζουν την παθολογία του αναπαραγωγικού συστήματος στις γυναίκες φορείς της προμετάλλαξης εκτείνονται πέρα από την ηλικία έναρξης της εμμηνόπαυσης. Η πιο πρόσφατη και πιο περιεκτική ορμονολογική μελέτη σχετικά με το ενδοκρινολογικό προφίλ γυναικών φορέων της προμετάλλαξης έδειξε πως αυτοί οι φορείς ενώ είχαν κανονικούς κύκλους, εντούτοις είχαν ορμονική δυσλειτουργία. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς μελέτησαν 11 γυναίκες φορείς της προμετάλλαξης με κανονικό κύκλο (ηλικία 23-41 ετών) και φάνηκε ένας σημαντικά μικρότερος κύκλος, αυξημένη FSH σε όλη τη διάρκεια του κύκλου (91% με αύξηση >2SD πάνω από το μέσο όρο), αυξημένη ινχιμπίνη Β στην ωοθυλακική φάση και αυξημένη ινχιμπίνη Α και προγεστερόνη στην ωχρινική φάση σε σύγκριση με τα controls. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ένα μειωμένο αριθμό ωοθυλακίων και δυσλειτουργία των κοκκωδών κυττάρων ή μειωμένο αριθμό κυττάρων στο ωχρό σωματίο σε σχέση με τα control. Επιπλέον, 45% (5 από τις 11) αυτών των φορέων είχαν ιστορικό υπογονιμότητας με κριτήριο τις επαφές χωρίς προφύλαξη αλλά και χωρίς επίτευξη εγκυμοσύνης. Αυτή η μελέτη κατέδειξε υποκλινική ωοθηκική δυσλειτουργία σε γυναίκες φορείς της προμετάλλαξης που δεν είχαν Π.Ω.Α. Η αύξηση της FSH στον ορό σε φορείς της προμετάλλαξης που είχαν ακόμα κύκλους ήταν ένα σταθερό εύρημα και σε άλλες μελέτες και το αποτέλεσμα αυτό εξακολουθούσε να υπάρχει ακόμα και

αν λαμβάναμε υπ' όψιν το κάπνισμα, τη χρήση αντισυλληπτικών, την ηλικία ή άλλους οικογενείς παράγοντες (68). Εντούτοις, ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα FSH εμφανίστηκαν σε γυναίκες 30-39 ετών κάτι το οποίο υποδήλωνε όψιμη έναρξη ωοθηκικής δυσλειτουργίας (63). Χρησιμοποιώντας ως δείκτη ωοθηκικής εφεδρείας την AMH φάνηκε μία σημαντική ελάττωση των επιπέδων της σε όλα τα ηλικιακά γκρουπ μεταξύ 18-50 ετών στους υψηλού ρίσκου (>70 επαναλήψεις) σε σχέση με τους χαμηλού ρίσκου(<70 επαναλήψεις) φορείς της προμετάλλαξης (61). Άλλες παρατηρηθήσες ανωμαλίες ήταν ακανόνιστοι κύκλοι, μικρότεροι κύκλοι, μικρότερη διάρκεια και αραιομηνόρροια στους φορείς της προμετάλλαξης μέσου μήκους καθώς επίσης και αυξημένο ποσοστό δίδυμων κυήσεων (67). Τέλος, ευρύματα σημαντικής μείωσης της οστικής πυκνότητας σε φορείς της προμετάλλαξης σε σχέση με τα φυσιολογικά controls και μία σημαντική αύξηση κατά 11,9% σε εμφάνιση οστεοπόρωσης είναι εξίσου σημαντικά (61).

Σε μελέτη γυναικών με FXPOI, βρέθηκε πως η ελάττωση της γονιμότητας μπορεί να οφείλεται σε μια γενικευμένη απορρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ωαρίων. Πιο συγκεκριμένα, τα μονοπάτια VEGF, μεταβολισμού της φωσφατιδυλινοσιτόλης, του κυτταρικού κύκλου και το μονοπάτι MAPK βρέθηκαν με μειωμένη έκφραση σε γυναίκες με FXPOI. Επιλέον ένας μεγάλος αριθμός από κυτταρικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο βρέθηκαν απορρυθμισμένες σε αυτές τις γυναίκες (εικόνα 15) (117).



Εικόνα 15: VEGF, MAPK, PI3K/AKT κυτταρικά μονοπάτια σε γυναίκες με FXPOI. Με κόκκινο εμφανίζονται τα γονίδια με μειωμένη έκφραση ενώ με πράσινο τα γονίδια με αυξημένη έκφραση.

6.2 ΧΡΗΣΗ ΖΩΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΡΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟ Χ

Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της Π.Ω.Α της σχετιζόμενης με το Έυθραυστο Χ, απαιτεί μια λεπτομερή γνώση της λειτουργίας του *FMR1* mRNA και της *FMRP* στην ωοθήκη. Στους ανθρώπους, δεν είναι διαθέσιμες μη επεμβατικές μέθοδοι έτσι ώστε να μπορούν να εντοπισθούν οι μηχανισμοί της ωοθηκικής δυσλειτουργίας λόγω της προμετάλλαξης και συνεπώς είναι απαραίτητη η δημιουργία ζωικών πειραματικών μοντέλων.

Δημοσιευμένα αποτελέσματα από δύο μοντέλα ποντικών που έφεραν την προμετάλλαξη έδειξαν τη σημασία τους στη μελέτη της αιτιολογίας της Π.Ω.Α της σχετιζόμενης με το Έυθραυστο Χ. Στο μοντέλο «CGG^{nlh}» (KI - Knock In) τα θηλυκά άτομα φέρουν ένα φυσιολογικό *FMR1* αλληλόμορφο ποντικού και ένα δεύτερο το οποίο είναι σχεδόν ίδιο με το ενδογενές αλληλόμορφο του ποντικού με εξαίρεση το μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (περίπου 130 επαναλήψεις). Το μοντέλο «YAC-TG296» φέρει ένα ανθρώπινο αλληλόμορφο προμετάλλαξης με 90 επαναλήψεις (Yeast Artificial Chromosome). Το μοντέλο «CGG^{dut}»(KI – Knock In) δημιουργήθηκε με την αντικατάσταση της ενδογενούς 5'UTR ποντικού με την αντίστοιχη περιοχή από αλληλόμορφο ανθρώπου που φέρει 98 CGG επαναλήψεις (70,71).

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη χρήση πειραματικών μοντέλων σε σχέση με την επίδραση της προμετάλλαξης στην ωοθηκική λειτουργία είναι τα ακόλουθα:

1.Η προμετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του *FMR1*

Αυξημένη έκφραση του *Fmr1* mRNA στην ωοθήκη έχει παρατηρηθεί σε όλα τα πειραματικά μοντέλα ποντικών που φέρουν τη προμετάλλαξη (70,72).

Τα επίπεδα της *FMRP* διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών μοντέλων εξ'αιτίας του τρόπου κατασκευής τους. Δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα της *FMRP* στα νεογνά μοντέλου ποντικού «YAC-TG296» και στα άγρια στελέχη τους όταν μετρήθηκαν στις

6 και 8 εβδομάδες. Στους 1-2 μήνες, τα ποντίκια «CGG^{nlh}» έδειξαν σχετικά μειωμένα επίπεδα FMRP στα κοκκώδη και ωχρινικά κύτταρα. Στο μοντέλο «CGG^{dut}» παρατηρήθηκε μια μείωση της FMRP στους 2 μήνες.

Στους 7 μήνες παρατηρήθηκε μια ανώμαλη κατανομή της FMRP στο μοντέλο «CGG^{nlh}»: Η FMRP εκφραζόταν περισσότερο στο πυρήνα παρά στο κυτταρόπλασμα. Υπήρχαν 8 φορές περισσότερα ωκύτταρα με υψηλότερη έκφραση στο πυρήνα στα ποντίκια φορείς της προμετάλλαξης σε σχέση με τα άγρια στέλεχη (72).

2.Μορφολογία της ωοθήκης ατόμων με τη προμετάλλαξη

Τόσο στο μοντέλο «CGG^{nlh}» όσο και στο μοντέλο «YAC-TG296» τα άτομα είχαν μικρότερες ωοθήκες σε ηλικία 4 μηνών σε σύγκριση με τα άγρια στελέχη. Παρόλ' αυτά στο μοντέλο «CGG^{nlh}» μεταξύ 4-12 μηνών δεν υπήρχε μείωση στο μέγεθος όπως θα αναμενόταν με τη φυσική μείωση στον αριθμό των ωοκυττάρων και των ωχρών σωματίων. Οι ωοθήκες των ποντικών του μοντέλου «CGG^{nlh}» εμφάνισαν επίσης περισσότερες και μεγαλύτερες κύστεις (70-72).

3. Η προμετάλλαξη οδηγεί σε εξάντληση των ωοθυλακίων σε μεταγενέστερα στάδια ωρίμανσης

Παρατηρήσεις τόσο στο μοντέλο «CGG^{nlh}» όσο και στο μοντέλο «YAC-TG296», έδειξαν πως η προμετάλλαξη δεν επηρεάζει τη δημιουργία της δεξαμενής των αρχέγονων ωοθυλακίων. Εντούτοις, ο αριθμός των ωοθυλακίων μεταγενέστερων σταδίων ανάπτυξης αλλά και των ώριμων ωοθυλακίων ήταν μειωμένος σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Επιπλέον σε πειραματόζωα φορείς της προμετάλλαξης παρατηρήθηκε μικρότερος αριθμός ωχρών σωματίων σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Συμπερασματικά, η προμετάλλαξη δεν φαίνεται να παρεμποδίζει κάποιο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και δεν οδηγεί σε αυξημένη στρατολόγηση ωοθυλακίων (70-72).

4.Η προμετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγές στα κοκκώδη κύτταρα

Τα κοκκώδη κύτταρα έχουν κρίσιμο ρόλο στη λειτουργικότητα των ωοθυλακίων. Τα ποντίκια του μοντέλου «CGG^{nlh}» είχαν λιγότερα κοκκώδη κύτταρα στα κοιλοτικά ωοθυλάκια σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Και στα δύο προαναφερθέντα μοντέλα υπήρχαν πολύ περισσότερα κοιλοτικά ωοθυλάκια στα οποία η στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρων

ήταν αποκολλημένη και ο ωοφόρος δίσκος ήταν τμηματικός ή απών. Έτσι η προμετάλλαξη θα μπορούσε να οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση στις ωοθήκες (70-72).

5. Η προμετάλλαξη οδηγεί σε υπογονιμότητα

Διάφορες παράμετροι υπογονιμότητας μελετήθηκαν στο μοντέλο «YAC-TG296». Αυτά τα ποντίκια είχαν αυξημένη συχνότητα στειρότητας ενώ ανάμεσα σε αυτά που ήταν γόνιμα παρατηρήθηκε αύξηση της ηλικίας πρωτοτοκίας ή μικρότερο μέγεθος νεογνών. Στις 9-22 εβδομάδες τα ποντίκια αυτά είχαν υψηλότερη FSH και χαμηλότερη LH σε σύγκριση με τα άγρια στελέχη. Είχαν επίσης υψηλότερα επίπεδα 17β-E2 στις 10-12 εβδομάδες παρόλο που αυτές οι τιμές εξομοιώθηκαν με αυτές των άγριων στελεχών στις 16-22 εβδομάδες (70-72).

6. Η προμετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης

Μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που είναι γνωστό πως εμπλέκονται στην ωοθηκική λειτουργία, σε ωοθήκες ποντικών «YAC-TG296» σε δύο στάδια: την 25η ημέρα ζωής αλλά και σε φάση προ οίστρου (8-14 εβδομάδες). Η έκφραση του υποδοχέα της LH ήταν μειωμένη και στα δύο στάδια. Εντούτοις δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του mRNA, ανάμεσα στα άγρια στελέχη και σε αυτά που έφεραν τη προμετάλλαξη, σε άλλα γονίδια ρυθμιστές της ωοθυλακιογένεσης. Μελετήθηκαν επιπλέον γονίδια σχετικά με την ωορρηξία και βρέθηκε επίσης μειωμένη η έκφρασή τους. Επιπλέον μελετήθηκε το μονοπάτι PI3K-Akt το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων μέσω της δράσης των γοναδοτροπινών, την επέκταση του ωοφόρου δίσκου και την ωρίμανση των ωαρίων. Στις ωοθήκες των ποντικών «YAC-TG296» υπήρχε σημαντική μείωση στα επίπεδα φωσφορυλιωμένου Akt αλλά όχι στο συνολικό Akt. Δεδομένης της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο Akt και στο mTOR μονοπάτι μελετήθηκε και το τελευταίο. Και σε αυτή τη περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση στη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης αλλά όχι στη συνολική mTOR. Συνεπώς το μονοπάτι Akt-mTOR υφίσταται μεταβολές στις ωοθήκες ατόμων με τη προμετάλλαξη (71).

7. Φαινότυπος της ωοθήκης σε μοντέλα με πλήρη έλλειψη του γονιδίου FMR1 (knockout model)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο φαινότυπος της ωοθήκης που παρατηρήθηκε σε ποντίκια με πλήρη έλλειψη του γονιδίου FMR1 (knockout model-KO). Στις 3 εβδομάδες, τα ομόζυγα KO ποντίκια είχαν αυξημένο αριθμό ωοθυλακίων σε σύγκριση με τα άγρια στελέχη. Στις 18

εβδομάδες, το μέγεθος των ωοθηκών στα ΚΟ ποντίκια ήταν μεγαλύτερο ενώ επιπλέον εμφάνισαν κύστεις κατά το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Προϊόντα λύσης κυττάρων από ωοθήκες 9-18 εβδομάδων έδειξαν αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών *Tsc2*, *Sash1* και *mTOR*. Οι συγγραφείς ισχυρίστηκαν πως τα αυξημένα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών, σε απουσία της *FMRP*, μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη ωοθυλακική ανάπτυξη. Συνεπώς, αυτό το ΚΟ μοντέλο μπορεί να προσομοιάσει την ωοθηκική ανεπάρκεια αν και παραμένει ερώτημα κατά πόσο ο μηχανισμός είναι ίδιος με αυτόν της ωοθηκικής ανεπάρκειας της σχετιζόμενης με το Εύθραυστο Χ (73).

Συμπεράσματα από τη χρήση ζωικών μοντέλων: πιθανοί μηχανισμοί Π.Ω.Α σχετιζόμενης με το Έυθραυστο Χ

Όπως αποδεικνύεται, οι γνώσεις μας είναι λίγες σχετικά με τη παθολογία της Π.Ω.Α της σχετιζόμενης με το Έυθραυστο Χ. Μια σειρά παρατηρήσεων υποδηλώνει πως αυτή η παθολογία δεν οφείλεται σε έλλειψη της πρωτεΐνης *FMRP*. Πρώτον, η Π.Ω.Α η σχετιζόμενη με το Έυθραυστο Χ παρατηρείται σε γυναίκες με αριθμό επαναλήψεων που δεν οδηγεί σε απώλεια της *FMRP*, τουλάχιστον στο περιφερικό αίμα. Δεύτερον, οι γυναίκες που φέρουν τη πλήρη μετάλλαξη και άρα έχουν απώλεια της *FMRP* σε τουλάχιστον τα μισά τους κύτταρα, δεν έχουν συμπτώματα Π.Ω.Α (72).

Αναφορικά με το μοριακό μηχανισμό, ενδεχομένως να υπάρχουν παραλληλισμοί με το *FXTAS*. Από μελέτες σε καλλιέργειες ιστών φάνηκε πως η έκφραση του *mRNA* από το αλληλόμορφο με τη προμετάλλαξη, είναι επιβλαβής για μια ποικιλία κυττάρων, άρα είναι λογική η σκέψη πως το *FXTAS* και η *FXPOI* έχουν κοινή παθολογική βάση. Το μοντέλο «*RNA gain of function*» προβλέπει πως η μεγάλη *rCGG* αλληλουχία παραγκωνίζει συγκεκριμένες *CGG* προσδεόμενες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την απώλεια της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται απευθείας στο *CGG-RNA* και των οποίων η αποσιώπηση μπορεί να επηρεάσει τη ζωτικότητα των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των: *hnRNP A2/B1*, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην επεξεργασία του *pre-mRNA*, *Pur a*, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής και στην ανάπτυξη των νευρώνων και το σύμπλεγμα επεξεργασίας του *miRNA*, *DROSHA-DGCR8*. Αυτές οι πρωτεΐνες με τη σειρά τους μπορούν να προσελκύουν άλλες πρωτεΐνες όπως οι *GUGBP1* και την ελικάση *Rm62* (72).

Μετάγραφα από το γονίδιο *FMR1* μπορεί να είναι επιβλαβή και με άλλους τρόπους. Για παράδειγμα, το *rCGG* σχηματίζει σταθερές δευτεροταγείς δομές συμπεριλαμβανομένου και των δομών φουρκέτας οι οποίες είναι υποστρώματα για το ένζυμο *Dicer*. Το *Dicer* είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία μικρών RNAs τα οποία δρουν μέσω του μονοπατιού παρεμβολής του RNA για να μειώσουν τη μετα-μεταφραστική έκφραση γονιδίων που περιέχουν παρόμοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Αναμένεται να αποδειχθεί κατά πόσο τέτοια *rCGGs* θα μπορούσε να είναι τοξικά και με άλλους τρόπους (72).

Διάφορα αντιπληροφοριακά μετάγραφα επίσης παράγονται από το ανθρώπινο *FMR1* γονίδιο και πιθανώς, αυτά συμβάλλουν στην παθολογία της ασθένειας με διάφορους τρόπους. Ενώ μερικά από αυτά τα μετάγραφα είναι χαμηλά σε φυσιολογικά κύτταρα, σε φορείς της προμετάλλαξης κάποια από αυτά τα μετάγραφα εντοπίζονται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του πληροφοριακού μετάγραφου. Μερικά δίκλινα RNA μπορούν να ενεργοποιήσουν ανοσολογική απάντηση στη Δροσόφιλα με τρόπο εξαρτώμενο από το *Dicer*. Τέτοια δίκλινα RNA θα μπορούσαν να προκύψουν από την ένωση του πληροφοριακού και του αντιπληροφοριακού μετάγραφου που θα προκύψουν από το γονίδιο *FMR1*. Τα αντιπληροφοριακά *rCGGs* θα μπορούσαν επίσης να μπλοκάρουν πρωτεΐνες, όπως έχει προταθεί και για τα πληροφοριακά μετάγραφα. Επιπλέον, καθώς η επανάληψη βρίσκεται σε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, θα μπορούσε να παράγει μια πρωτεΐνη πλούσια σε προλίνη η οποία θα συνέβαλε στη παθολογία της ασθένειας (69).

Ένα άλλο πρωτεϊνικό μοντέλο προκύπτει από τη παρατήρηση ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορούν να αυξήσουν τη συχνότητα με την οποία η μετάφραση ξεκινά από διαφορετική της ATG θέση έναρξης της μεταγραφής, μια διαδικασία γνωστή ως μετάφραση RAN (*repeat-associated non-ATG*). Σε ανθρώπους, ποντίκια και μύγες που περιέχουν την ανθρώπινη 5'UTR, υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν πως τέτοιες θέσεις έναρξης μεταγραφής χρησιμοποιούνται για να δημιουργηθούν πρωτεΐνες πλούσιες σε πολυγλυκίνη ή πολυαλανίνη οι οποίες είναι νευροτοξικές (74).

Ενώ τα εγκεφαλικά ενδοκυττάρια έγκλειστα είναι χαρακτηριστικό του *FXTAS*, πολύ λίγα έγκλειστα έχουν βρεθεί στις ωοθήκες ποντικών ή ανθρώπων που φέρουν τη προμετάλλαξη. Τα λίγα έγκλειστα που έχουν βρεθεί στα κύτταρα στρώματος σε φαινομενικά φυσιολογικές ωοθήκες ανθρώπων, μπορεί να υποδηλώνουν μια τοξική δράση που σχετίζεται με την αποδόμηση πρωτεϊνών. Η απουσία τέτοιων εγκλειστων σε ωοθυλάκια μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της γρήγορης καταστροφής τέτοιων ωοθυλακίων, τόσο γρήγορη ώστε να μην προλαβαίνουμε να τις παρατηρήσουμε. Εντούτοις είναι ασαφές κατά

πόσο τέτοια κυτταρικά έγκλειστα είναι προστατευτικά, παθογόνα ή ουδέτερα σε σχέση με την παθολογία της ασθένειας (72).

Τελειώνοντας, φαίνεται πως θα πρέπει να πραγματοποιηθεί περισσότερη έρευνα σε σχέση με την τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση σε μοντέλα προμετάλλαξης. Στοιχεία από το μοντέλο YAC-TG296 έδειξαν μειωμένη έκφραση του φωσφορυλιωμένου Akt και mTOR ενώ αντίστοιχες μετρήσεις από το μοντέλο KO έδειξε αυξημένα επίπεδα mTOR. Η απορρύθμιση του mTOR σε αυτά τα ζώα προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς τόσο η υποέκφραση όσο και η υπερέκφραση του mTOR μπορεί να οδηγήσει σε ωθηκική δυσλειτουργία(4,5,). Έχει φανεί πως η αναστολή του mTOR καταλήγει σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων(75). Υπάρχει η σκέψη πως η μειωμένη φωσφορυλίωση του mTOR, στην Π.Ω.Α τη σχετιζόμενη με το Έυθραυστο Χ, είναι υπεύθυνη για τη μη γραμμική σχέση μεταξύ του αριθμού των CGG επαναλήψεων και του κινδύνου για εμφάνιση Π.Ω.Α. Καθώς ο αριθμός των επαναλήψεων αυξάνεται, τα επίπεδα του FMRP προβλέπεται πως μειώνονται εξαιτίας των δυσκολιών που προκύπτουν με τη μετάφραση των μεγάλων αλληλομόρφων της προμετάλλαξης. Αυτή η μείωση στην FMRP θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του mTOR κάτι που με τη σειρά του θα πυροδοτούσε την απώλεια του mTOR. Εντούτοις, το κατά πόσο η απορρύθμιση του mTOR είναι η βασική αιτία της ωθηκικής δυσλειτουργίας που εμφανίζεται στην FXPOI χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση (72).

7.ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ FMR1 ΜΕ ΤΗΝ ΩΘΗΚΙΚΗ ΕΦΕΔΡΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ - ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο FMR1 έχει συσχετισθεί με διαφοροποιήσεις σχετιζόμενες με την αναπαραγωγή. Πιο αξιοσημείωτη είναι η απόδειξη ότι η προμετάλλαξη συνδέεται με πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια (Π.Ω.Α – P.O.F)

Μετά την επιβεβαίωση της συσχέτισης μεταξύ της προμετάλλαξης του FMR1 γονιδίου και της Π.Ω.Α, μόλις πρόσφατα, εμφανίστηκαν μελέτες αναζητώντας πιθανή συσχέτιση μεταξύ των ωθηκικών ορμονών, της υπογονιμότητας και αυτού του γονιδίου και δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός πως ο όγκος των δημοσιεύσεων σε αυτό το κομμάτι της έρευνας είναι ακόμα πολύ μικρός σε σχέση με το πλήθος των μελετών που αφορούν στην νευροψυχιατρική παθολογία την οφειλόμενη στο FMR1.

Σύμφωνα με τον Gleicher και συν. ένας ακόμα λόγος που οδήγησε στην αναζήτηση της δράσης του φυσιολογικού αλληλόμορφου του FMR1 γονιδίου στην ωθήκη, ήταν αφενός

μεν η επικράτηση των (CGG_{n30-31}) στο γενικό πληθυσμό όπως επίσης και η αναφορά των (CGG_{n30}) ως το μεταβατικό σημείο ανάμεσα σε θετική και αρνητική επίδραση του τμήματος CGG_n στη μετάφραση (76). Οι πρώτες προσπάθειες προς την αναζήτηση της φυσιολογικής δράσης του FMR1 στην ωοθήκη προσανατολίστηκαν στη μελέτη των βασικών ορμονών-δεικτών ωοθηκικής εφεδρείας FSH και AMH (77).

Σε μία μικρή αλλά ιδιαίτερα πληροφοριακή μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες, λήφθηκε καθημερινά δείγμα αίματος για 1 μήνα από 11 γυναίκες, ηλικίας 24-41 ετών, φορείς της προμετάλλαξης, με κανονικό μηνιαίο κύκλο. Η ομάδα ελέγχου ήταν 22 γυναίκες, παρόμοιας ηλικίας χωρίς κανένα οικογενειακό ιστορικό σχετιζόμενο με FXS. Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, οι γυναίκες, φορείς της προμετάλλαξης είχαν αυξημένα επίπεδα τόσο στην ωοθυλακική όσο και στην ωχρινική φάση (78). Άλλες αναφορές με μονήρεις μετρήσεις της FSH επίσης βρίσκουν ότι η παρουσία αλληλομόρφου προμετάλλαξης συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα FSH (79). Αντιθέτως, σε άλλη μελέτη δεν βρέθηκε καμία διαφορά στις τιμές της FSH μεταξύ γυναικών με την πλήρη μετάλλαξη και αυτών με <60 CGG(80). Μία πρόσφατη μελέτη με 372 υπογόνιμες γυναίκες όλων των αιτιολογιών, μεταξύ των οποίων 9 έφεραν ενδιάμεσο αλληλόμορφο και 5 αλληλόμορφο προμετάλλαξης, αναφέρει ότι δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ δεικτών ωοθηκικής εφεδρείας (FSH, AMH και Inhibin B) και του αριθμού των CGG επαναλήψεων (81). Μεταξύ γόνιμων γυναικών στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ενδιάμεσων αλληλομόρφων (34-54 CGG) και των ορμονών FSH/AMH (82).

Επιπρόσθετως, υπάρχουν και κάποιες δημοσιεύσεις που μελετούν πιθανή συσχέτιση των επιπέδων της AMH με τον αριθμό των CGG επαναλήψεων. Η λιγοστή βιβλιογραφία που υπάρχει σχετικά με το θέμα, προσαρμοσμένη ως προς την ηλικία, δεν καταλήγει σε ομοφωνία. Μεταξύ 158 υπογόνιμων γυναικών με κανονικούς έμμηνους κύκλους, ηλικίας <40 ετών και χωρίς να φέρουν την προμετάλλαξη, οι Gleicher και συν. αναφέρουν πως γυναίκες με <35 επαναλήψεις παρουσίασαν υψηλότερες τιμές AMH σε σχέση με γυναίκες με αριθμό επαναλήψεων 35-50 ενώ αριθμός επαναλήψεων μεταξύ 35-50 συσχετίσθηκε αντιστρόφως με την AMH (84). Η ίδια ομάδα σε άλλο άρθρο ανέφερε πως επίπεδα AMH <1,0 ng/mL συσχετίσθηκαν με αριθμό επαναλήψεων > 32 (83). Επιπλέον, η συγκεκριμένη ομάδα μελέτησε 316 υπογόνιμες ασθενείς της κλινικής τους τις οποίες και διαχώρησαν σε 3 ομάδες: ομάδα Α (< 28 επαναλήψεις), ομάδα Β (28-33 επαναλήψεις) και ομάδα Γ (≥34 επαναλήψεις). Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν είναι πως κάθε μείωση κατά 5 επαναλήψεις (αλληλόμορφο 1) στην ομάδα Α αυξάνει την πιθανότητα για μειωμένη ωοθηκική εφεδρεία κατά 40% ενώ κάθε αύξηση κατά 5 επαναλήψεις (αλληλόμορφο 1)

στην ομάδα Γ αυξάνει τον κίνδυνο κατά 50% (95). Σε μία άλλη μελέτη από τις Ηνωμένες Πολιτείες όπου χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα γυναίκες, ηλικίας 31-40 έτη, τόσο από το γενικό πληθυσμό όσο και από γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό FXS, βρέθηκε πως η AMH ήταν χαμηλότερη σε γυναίκες με ≥ 70 επαναλήψεις σε σύγκριση με αυτές που έφεραν < 70 επαναλήψεις. Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ γυναικών ηλικίας > 40 έτη ή ≤ 30 έτη (85). Μία άλλη μελέτη ανέφερε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της AMH και του αριθμού των CGG επαναλήψεων μεταξύ 197 γυναικών υψηλού ρίσκου για ελαττωμένη ωοθηκική λειτουργία και των οποίων ο μέγιστος αριθμός επαναλήψεων ήταν 51 (86). Από την άλλη πλευρά, σε μία μελέτη με 372 υπογόνιμες γυναίκες, όλων των αιτιών, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ AMH και αριθμού CGG επαναλήψεων (81). Μεταξύ 532 υπογόνιμων γυναικών, με ενδιάμεσα αλληλόμορφα που ορίστηκαν ως 35-54 επαναλήψεις, δεν βρέθηκε συσχέτιση με την AMH (82). Σε ένα δείγμα 79 γυναικών με DOR, βρέθηκε πως ένα γραμμικό μοντέλο του $\log(\text{AMH})$, που αντιπροσώπευε μία εκθετική μείωση της AMH με την αυξανόμενη ηλικία, είχε πιο απότομη κλίση σε γυναίκες με ≥ 35 επαναλήψεις σε σχέση με γυναίκες με < 35 επαναλήψεις (87). Σε άλλη μελέτη, μεταξύ 372 υπογόνιμων γυναικών (με ποικίλη αιτιολογία υπογονιμότητας), καμία από τις 3 κατηγορίες CGG επαναλήψεων (προμετάλλαξη, ενδιάμεσα αλληλόμορφα ή υψηλά φυσιολογικά) δεν φάνηκε να επικρατεί, σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες. Επιπλέον, το μέγεθος των CGG επαναλήψεων δεν συσχετίσθηκε με κανέναν από τους δείκτες ωοθηκικής εφεδρείας (99).

Η διαπίστωση των Gleicher και συν. πως η ωοθηκική λειτουργία του FMR1 γονιδίου φαίνεται, φυσιολογικά, να καθορίζεται από ένα εύρος 26-34 επαναλήψεων (μέση τιμή 30) και πως αποκλίσεις και από τις δύο πλευρές αυτού του εύρους αυξάνουν το κίνδυνο για πρόωρη ωοθηκική γήρανση και μειωμένη ωοθηκική εφεδρεία τους οδήγησε σε περαιτέρω μελέτες. Μέχρι τότε όλες οι αναλύσεις στη βιβλιογραφία αναφέρονταν σε ανάλυση ενός αλληλομόρφου, εντούτοις κάθε γυναίκα έχει δύο X χρωμοσώματα και άρα δύο FMR1 αλληλόμορφα. Με βάση τα παραπάνω οι Gleicher και συν. όρισαν τους ακόλουθους γονότυπους για το FMR1: α) φυσιολογικός (normal-norm) εάν και τα δύο αλληλόμορφα είναι μέσα στο φυσιολογικό εύρος (26-34 επαναλήψεις), β) ετερόζυγος (heterozygous-het) εάν το ένα αλληλόμορφο είναι εκτός του φυσιολογικού εύρους και γ) ομόζυγος (homozygous-hom) εάν και τα δύο αλληλόμορφα είναι εκτός του φυσιολογικού εύρους (89-91). Επιπλέον, η παραπάνω ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα πως οι χαμηλές επαναλήψεις (CGG < 26 – low) συσχετίζονται με σημαντικές δράσεις του FMR1 γονιδίου στη γυναικεία αναπαραγωγή. Έτσι προχώρησαν σε παραπέρα διάκριση των γονοτύπων

σε υπογονότυπους των χαμηλών (CGG<26 – low) και υψηλών (CGG>34 – high) αλληλομόρφων (89,90).

Αξιολογώντας νεαρές δότριες ωαρίων και υπογόνιμες γυναίκες διαφόρων ηλικιών, με τη χρήση των γονοτύπων και υπογονοτύπων φάνηκε ακόμα πιο καθαρά η ωοθηκική δράση του FMR1 καθώς διαφορετικός συνδυασμός αλληλομόρφων συσχετίστηκε με διαφορετικό πρότυπο ωοθηκικής γήρανσης. Γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο ακολουθούν ένα φυσιολογικό πρότυπο ωοθηκικής γήρανσης, με βάση τα επίπεδα της AMH. Οι ετερόζυγες που φέρουν χαμηλό αλληλόμορφο, χάνουν τη λειτουργική ωοθηκική τους εφεδρεία (FOR) με επιταχυνόμενο ρυθμό ενώ οι ετερόζυγες που φέρουν υψηλό αλληλόμορφο φαίνεται πως στρατολογούν ωοθυλάκια με χαμηλότερο ρυθμό οπότε σε μεγαλύτερες ηλικίες παρουσιάζουν καλύτερη λειτουργική ωοθηκική εφεδρεία (FOR) (32,89,91). Επειδή οι ομόζυγες γυναίκες είναι πιο σπάνιες, ιδιαίτερα όταν υποδιαίρεθούν σε υπογονότυπους, η επίπτωση αυτών των γονοτύπων δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Πρώιμες παρατηρήσεις δείχνουν πως τα ομόζυγα άτομα παρουσιάζουν επιταχυνόμενη στρατολόγηση εάν και τα δύο αλληλόμορφα είναι είτε χαμηλά είτε υψηλά αλλά οι φορείς του συνδυασμού υψηλό/χαμηλό δεν εμφανίζουν ομοιογενή χαρακτηριστικά προφανώς ανάλογα με το πιο αλληλόμορφο είναι απενεργοποιημένο (84). Με βάση τα παραπάνω προέκυψε το συμπέρασμα πως το FMR1 γονίδιο εμπλέκεται στη στρατολόγηση των ωοθυλακίων αλλά με άγνωστο ακόμα τρόπο (77).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο φυσιολογικός αριθμός επαναλήψεων (CGG_{n26-34}) είναι ο ίδιος σε όλες τις φυλές, εντούτοις η κατανομή των αλληλομόρφων ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών φυλών, με τις γυναίκες Αφρικανικής καταγωγής να φέρουν περισσότερα χαμηλά (low) και λιγότερα υψηλά (high) αλληλόμορφα, ενώ οι γυναίκες Ασιατικής καταγωγής φέρουν περισσότερα υψηλά (high) αλληλόμορφα. Οι Καυκάσιες, με πιο ανομοιόμορφη κατανομή αλληλομόρφων, φαίνεται να βρίσκονται κάπου ανάμεσα στις δύο παραπάνω ομάδες (92,93).

Σύμφωνα με την παραπάνω ομάδα, οι διαφορές στο πρότυπο ωοθηκικής γήρανσης, με βάση τους FMR1 γονοτύπους, είναι ήδη εμφανείς και στις νεαρές δότριες ωαρίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιστοποιηθεί η επιλογή δοτριών (94). Δότριες που φέρουν το χαμηλό (low) FMR1 αλληλόμορφο ήδη από νεαρές ηλικίες αποκλίνουν από δότριες με φυσιολογικά (norm) και υψηλά (high) αλληλόμορφα αναφορικά με τη λειτουργική τους ωοθηκική εφεδρεία όπως αυτή έχει προσδιοριστεί με κριτήριο την AMH (77).

Επιπλέον η παρουσία χαμηλού (low) FMR1 αλληλομόρφου συσχετίσθηκε με σημαντικά χειρότερη ποιότητα εμβρύου και πιθανότητα κύησης. Καθώς η ηλικία των γυναικών αυξάνει, η παρουσία χαμηλού (low) FMR1 αλληλομόρφου επηρεάζει την πιθανότητα εγκυμοσύνης, μετά από IVF, επηρεάζοντας την ποιότητα των ωαρίων/εμβρύων με μηχανισμούς διαφορετικούς από αυτόν της ανευπλοειδίας (90,95).

Προσπαθώντας να κατανοήσουν τους υποκείμενους μηχανισμούς για τις παρατηρούμενες διαφορές ως προς την έκβαση της IVF, με βάση τα FMR1 αλληλόμορφα, προέκυψαν ενδείξεις που υποδηλώνουν πως οι φορείς των χαμηλών (low) αλληλομόρφων μετατρέπουν την δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEAS) σε τεστοστερόνη (T) λιγότερο αποδοτικά (96). Καθώς η χαμηλή λειτουργική ωοθηκική εφεδρεία (LFOR) έχει συσχετισθεί με χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ενώ παράλληλα η αύξηση της τεστοστερόνης μετά από χορήγηση δεϋδροεπιανδροστερόνης είναι υποδηλωτική για επιτυχή έκβαση της IVF, αυτή η παρατήρηση μπορεί εν μέρει να εξηγεί τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας σε φορείς του χαμηλού αλληλομόρφου (97,98).

Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη με μέγεθος δείγματος μεγαλύτερο από 4.600 κύκλους και με ανάλυση ξεχωριστά του χαμηλού και υψηλού αλληλομόρφου αλλά και του συνδυασμού αυτών στους πρόσφατα προταθείς γονότυπους δεν βρέθηκε καμμία κλινική ένδειξη ελέγχου του FMR1 γονιδίου ως προγνωστικό παράγοντα της έκβασης μεθόδων υποβοηθούμενης παραγωγής (111). Σε μια άλλη εξίσου πρόσφατη μελέτη, όπου συμπεριελήφθησαν οι πρώτοι κύκλοι IVF 3006 ασθενών, εξάγεται το συμπέρασμα πως παρά την αυξανόμενη χρησιμοποίησή τους, οι FMR1 CGG επαναλήψεις, στο φυσιολογικό εύρος, δεν αποτελούν προγνωστικούς δείκτες της ωοθηκικής απόκκρισης στην εξωγενή διέγερση με γοναδοτροπίνες (114).

Τελειώνοντας αξίζει να σημειωθεί πως οι αναγνώστες θα πρέπει να παρατηρούν κατά πόσο μία μελέτη υπολογίζει τη συχνότητα του αλληλομόρφου ή τη συχνότητα του φορέα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων αλλά και όταν γίνεται σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών. Επιπλέον, τα ευρήματα κάθε μελέτης πρέπει να ερμηνεύονται υπό το πρίσμα του πληθυσμού από τον οποίο λήφθησαν τα δείγματα, με την έννοια ότι ευρήματα από μελέτες σε οικογένειες με Σύνδρομο Εύθραυστου X μπορεί ή μπορεί να μην εφαρμόζονται σε γυναίκες χωρίς τέτοιο οικογενειακό ιστορικό (75).

Με βάση τα παραπάνω παραμένει ένα σημαντικό ερώτημα κατά πόσο το FMR1 γονίδιο συσχετίζεται με χαμηλή ωοθηκική εφεδρεία και υπογονιμότητα και εάν κάτι τέτοιο ισχύει, ποιος είναι ο αριθμός των επαναλήψεων που ενέχει το μεγαλύτερο ρίσκο. Επιπλέον, ερώτημα εξακολουθεί να παραμένει το κατά πόσο το FMR1 γονίδιο μπορεί να

αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα διαφόρων παραμέτρων έκβασης της IVF. Είναι προφανές πως περισσότερες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση είναι χρήσιμες και απαραίτητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Συνοπτικά, τα στάδια που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό του αριθμού των CGG επαναλήψεων του γονιδίου *FMR1* είναι τα ακόλουθα:

1. Συλλογή δειγμάτων
2. Απομόνωση DNA
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
4. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis-CE)
5. Προσδιορισμός μεγέθους και ανάλυση αποτελεσμάτων
6. Στατιστική ανάλυση

4.2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ένα σύνολο από 62 δείγματα περιφερικού αίματος αναλύθηκαν. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν στο εξωτερικό ιατρείο του τμήματος Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Α΄ Πανεπιστημιακής Κλινικής Γυναικολογίας-Μαιευτικής του Γ.Ν.Α «Έλενα Βενιζέλου-Αλεξάνδρα», από γυναίκες που προσήλθαν λόγω υπογονιμότητας ποικίλης αιτιολογίας (σαλπιγγική, ανδρική, ανεξήγητη). Όλες οι γυναίκες είχαν προηγούμενους αποτυχημένους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, 26 από αυτές είχαν χαρακτηριστεί ως πτωχές απαντήτριες (poor responders) σύμφωνα με τα κριτήρια της Μπολόνια ενώ οι υπόλοιπες 32 ως καλές απαντήτριες (good responders), εάν είχαν ≥ 8 ωάρια, $FSH \leq 10$ mIU/mL και μέγιστο $E2 \geq 1500$ pg/mL. Από τις 26 πτωχές απαντήτριες, οι 12 είχαν ηλικία μικρότερη των 40 ετών και πάνω από δύο προηγούμενους αποτυχημένους κύκλους IVF ενώ οι 14 ήταν άνω των 40 ετών και είχαν τουλάχιστον ένα προηγούμενο αποτυχημένο κύκλο IVF. Ο μέσος όρος ηλικίας των καλών απαντητριών ήταν $31,58 \pm 0,72$ έτη.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε σωληνάρια συλλογής αίματος 4mL με αντιπηκτικό K_3EDTA .

4.2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA (EXTRACTION)

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση του Purelink Genomic DNA Mini Kit της εταιρίας Invitrogen, με τη χρήση στηλών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η απομόνωση DNA με τη χρήση στηλών βασίζεται στην επιλεκτική πρόσδεση του στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης, παρουσία χαστροπικών αλάτων. Τα κύτταρα αρχικά κατεργάζονται με το ένζυμο πρωτεϊνάση K στους 55°C, σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο βοηθά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Όποια εναπομείνουσα ποσότητα RNA, απομακρύνεται με τη χρήση της RNάσης A η οποία προηγείται της πρόσδεση των μορίων στη μεμβράνη σιλικόνης. Το DNA προσδέεται στη μεμβράνη και οι όποιες ανεπιθύμητες ενώσεις απομακρύνονται με διαδοχικές εκπλύσεις με ειδικά διαλύματα. Τελικά, το γενωμικό DNA εκλούεται με ειδικό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων (101).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

A. Λύση των κυττάρων

1. Υδατόλουτρο ή επωαστήρας στους 55°C
2. ≤200μL φρέσκου ή κατεψυγμένου ολικού αίματος σε αποστειρωμένα σωληνάρια erpendorf όγκου 1,5 mL ελεύθερα DNAσών και RNAσών
3. Προσθήκη 20 μL Proteinase K
4. Προσθήκη 20 μL RNase A στο δείγμα, καλή ανάδευση με vortex, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min
5. Προσθήκη 200 μL Genomic Lysis/Binding Buffer, καλή ανάδευση με vortex προς ομογενοποίηση του διαλύματος
6. Επώαση στους 55°C για 10 min για ενίσχυση της πέψης των πρωτεϊνών
7. Προσθήκη 200 μL αιθανόλης 96-100% στο διάλυμα, καλή ανάδευση με vortex προς ομογενοποίηση του διαλύματος

B. Πρόσδεση του DNA (Χρήση Στηλών)

Πριν την έναρξη της διαδικασίας απαραίτητη είναι η προσθήκη αιθανόλης 96-100% στα διαλύματα Genomic Wash Buffer 1 and Genomic Wash Buffer 2 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σήμανση της προσθήκης, καλή ανάδευση, φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Προσθήκη 640 μL από το προϊόν της λύσης (βήματα 1-7) σε μία στήλη
9. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10000 x g, για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου
10. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής το οποίο παρέχεται με το kit.

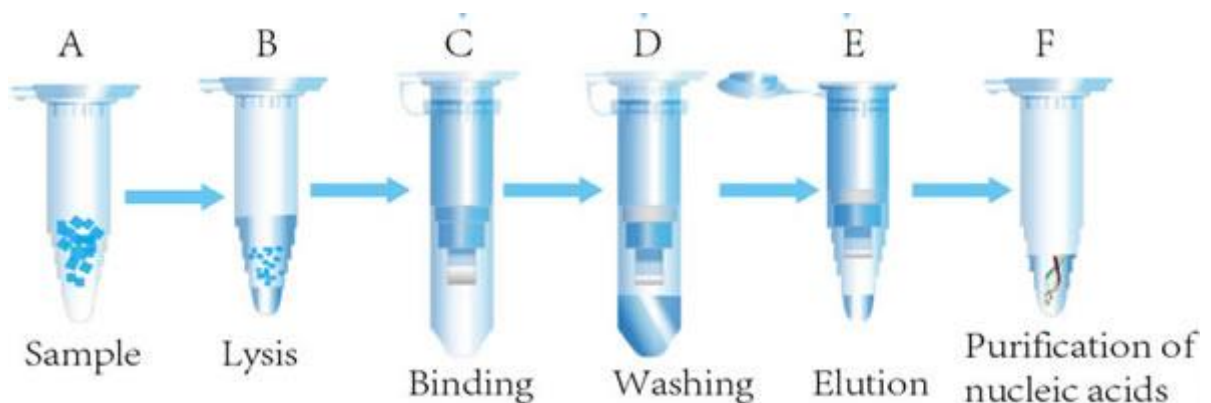
Γ. Έκπλυση του DNA

11. Προσθήκη 500 μL Wash Buffer 1 (στο οποίο έχει προστεθεί αιθανόλη) στη στήλη
12. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10000 x g, για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου
13. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής το οποίο παρέχεται με το kit.
14. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα, για 3 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής

Δ. Έκλυση του DNA

15. Τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf όγκου 1,5 mL
16. Προσθήκη 25–200 μL Genomic Elution Buffer στη στήλη
17. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα, για 1 min. Το σωληνάριο συλλογής περιέχει καθαρό γενωμικό DNA.
18. Προκειμένου να εκπλυθεί μεγαλύτερη ποσότητα DNA επαναλαμβάνεται η διαδικασία έκπλυσης (15-16) σε ένα νέο αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf όγκου 1,5 mL
19. Φυγοκέντρηση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα, για 1,5 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάριο συλλογής περιέχει καθαρό γενωμικό DNA. Απόρριψη της στήλης.
20. Το καθαρό DNA χρησιμοποιείται αμέσως ή φυλάσσεται στους -20°C .

Συνοπτικά, η παραπάνω διαδικασία φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 16: Απομόνωση DNA με στήλες

4.2.3 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION- PCR)

A. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης εκτός από το αρχικό DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, είναι το ένζυμο DNA πολυμεράση, μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων, ένα ζευγάρι εκκινητών που καθορίζουν το μέγεθος των αντιγράφων DNA καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία, που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου (102-104).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Ωστόσο, ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας της συμβατικής τεχνικής PCR (*regular PCR*) περιλαμβάνει:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95⁰ C για ~15min, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.

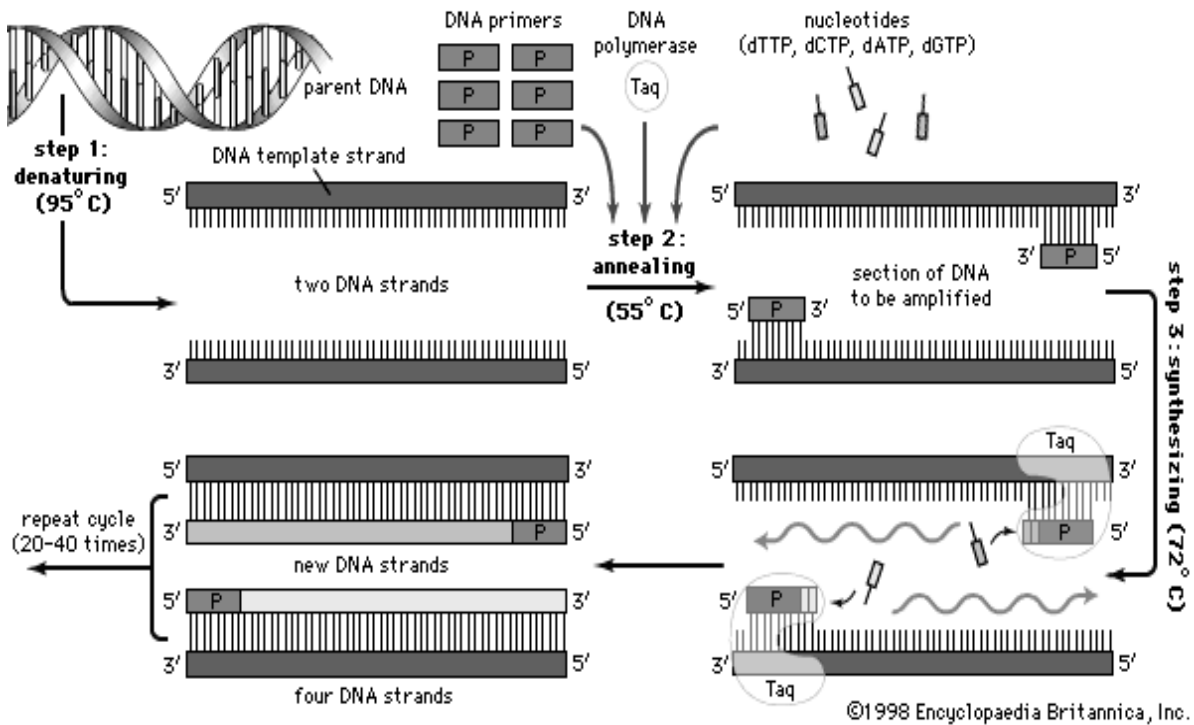
2. Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50 και 71⁰C για 30-60 sec, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία ποικίλλει ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, η οποία για μήκος εκκινητών ~20 βάσεων προσεγγίζεται θεωρητικά από τον τύπο: $Tm=(A+T)*2 + (G+C)*4$ °C.

3. Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72⁰C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου και γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης στο στάδιο αυτό είναι 1-3 min και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε.

4. Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94⁰C για 30 sec, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA, που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Επαναλαμβάνονται 25-40 κύκλοι των σταδίων 2-4. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου ~10 min, ώστε να υπάρχει ο χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.

Συνοπτικά, η παραπάνω διαδικασία φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 17: Στάδια της PCR.

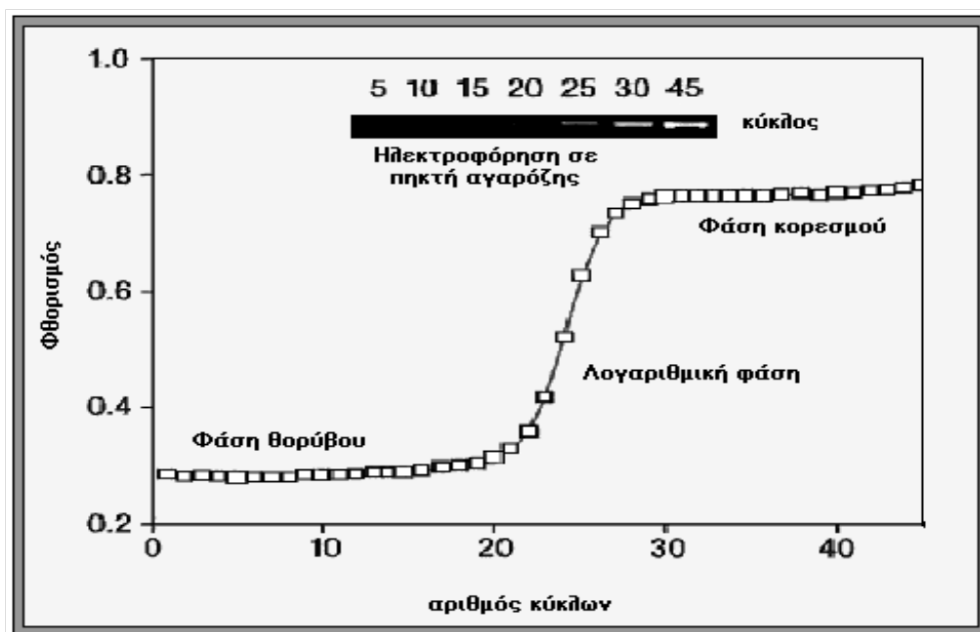
Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου, το παραγόμενο προϊόν έχει ενδιάμεσο μέγεθος, αφού αρχίζει από το σημείο πρόσδεσης του εκκινητή στην αρχική αλυσίδα του DNA και τελειώνει στο σημείο εκείνο που σταματά η δράση της DNA πολυμεράσης. Στο δεύτερο κύκλο έχουμε επίσης προϊόντα ενδιάμεσου μεγέθους, ενώ από τον τρίτο κύκλο εμφανίζονται οι αλυσίδες του DNA που έχουν το επιθυμητό μέγεθος. Από αυτό το σημείο και πέρα η παραγωγή προϊόντων επιθυμητού μεγέθους αυξάνεται εκθετικά, ώστε στο τελικό προϊόν της αντίδρασης ουσιαστικά να ανιχνεύονται μόνο μόρια συγκεκριμένου μεγέθους(102-104).

Η θεωρητική απόδοση της PCR, η οποία καθορίζεται από τον αριθμό των αντιγράφων, μπορεί να εκφραστεί με τον τύπο $(2^{n-2}) * x$, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων ($n > 2$) και x ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα.

Τα παραπάνω όμως προϋποθέτουν απόδοση της PCR 100%, κάτι που δεν παρατηρείται ποτέ εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων:

- 1) Η απόδοση του ενζύμου μειώνεται μετά από 25-30 κύκλους, αφενός εξαιτίας της περίσσειας μορίων DNA προς αντιγραφή και αφετέρου εξαιτίας της θερμικής αποδιάταξης του ενζύμου.
- 2) Με την αύξηση των αντιγράφων παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ αυτών και των εκκινητών στη σύνδεση με τα μόρια του DNA-εκμαγείου.
- 3) Πολλές φορές υπάρχει αδυναμία διαχωρισμού του DNA από άλλα μακρομόρια καθώς και κακή ποιότητα του αρχικού DNA.
- 4) Η αποδιάταξη της διπλής έλικας δεν γίνεται σε όλα τα μόρια

Η ενίσχυση του DNA δεν ακολουθεί καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης εκθετική πορεία. Αρχικά, διακρίνεται μια φάση που δημιουργούνται αντίγραφα του μορίου-εκμαγείου. Στη συνέχεια, ακολουθεί η εκθετική φάση, όπου το DNA αντιγράφεται με εκθετικό ρυθμό. Στο τέλος αυτής της φάσης, δημιουργείται ένα plateau, όπου ο αριθμός των μορίων δεν αυξάνεται σημαντικά.



Εικόνα 18: Φάσεις της PCR

Η απόδοση της αντίδρασης μπορεί να επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από συστατικά που υπάρχουν στο δείγμα από το οποίο προέρχεται το DNA ή από χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια (102-104).

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, που εξαρτώνται από τον πιθανό ιχνηθέτη με τον οποίο είναι σημασμένο το προϊόν της αντίδρασης. Ο πιο κλασσικός τρόπος είναι η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε gel

αγαρόζης, παράλληλα με γνωστή ποσότητα DNA-δείκτη μοριακού βάρους (*M.W DNA marker*), ώστε να μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος των μορίων. Η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει πορτοκαλί χρώμα στα σημεία που υπάρχει DNA, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε έχουμε ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος.

Σε περίπτωση ραδιοσημασμένου προϊόντος, αυτό μπορεί να ανιχνευθεί με αυτοραδιογραφία, είτε του ξηρού πηκτώματος είτε της μεμβράνης στην οποία έχει μεταφερθεί το προϊόν (*Southern blotting*).

Τέλος, για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των προϊόντων PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*HPLC*), καθώς και η τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (*capillary electrophoresis*), με την οποία επιτυγχάνεται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης (102-104).

Β.ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ PCR

1. Δείγμα DNA: Είναι επαρκές λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο ολικού γενωμικού DNA ενώ μπορεί να γίνει ενίσχυση από ένα μόνο μόριο DNA. Τα δείγματα μπορεί να είναι διάφορα βιολογικά υγρά, ιστοί, περιφερικό αίμα, βιοψίες διατηρημένες σε παραφίνη κ.α.

2. Η DNA πολυμεράση: Η πιο γνωστή είναι η *Ampli Taq*, η οποία έχει εκφραστεί στο βακτήριο *E. Coli* και έχει μεγαλύτερη καθαρότητα και επαναληψιμότητα σε σχέση με την *Taq*. Μια άλλη μορφή του ενζύμου είναι το θραύσμα *Stoffel*, το οποίο είναι πιο σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με την *Taq*, λειτουργεί σε μεγαλύτερο εύρος ιόντων μαγνησίων, και δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε εκμαγεία DNA που έχουν υψηλό ποσοστό G-C. Τόσο η *Taq* όσο και η ανασυνδυασμένη μορφή της, αλλά όχι το θραύσμα *Stoffel*, έχουν ενεργότητα εξωνουκλεάσης κατά την κατεύθυνση 5'→3' (επιδιορθωτική). Ωστόσο, σε περίπτωση που πρόκειται να κλωνοποιηθεί το προϊόν της PCR (*cloning*) ή να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική του αλληλουχία (*sequencing*), η επιδιορθωτική δράση του ενζύμου είναι απαραίτητη.

3. Μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPS): Το μείγμα των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να περιέχει ίσες συγκεντρώσεις των *dATP*, *dTTP*, *dCTP*, και *dGTP*. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 20-200 μM .

Χαμηλότερες συγκεντρώσεις (10-100 μM) εξασφαλίζουν μεγαλύτερη αξιοπιστία στο αποτέλεσμα, ενώ πολύ υψηλές (>200 μM) ελαττώνουν την ειδικότητα και την αξιοπιστία της αντίδρασης. Ωστόσο, κάθε φορά η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs καθορίζεται εμπειρικά και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

4. Ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) : Τα ιόντα (Mg^{2+}) προστίθενται στο μίγμα σε μορφή MgCl_2 . Η συγκέντρωσή τους μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0,5-50 mM, με συνηθέστερη 1-1,5 mM. Και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται βελτιστοποίηση της αντίδρασης για να βρεθεί η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου για μια συγκεκριμένη αντίδραση. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ιδανικής οδηγούν σε χαμηλή απόδοση της αντίδρασης ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις διευκολύνουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

5. Ρυθμιστικό διάλυμα : Στο εμπόριο, κάθε ένζυμο συνοδεύεται και με αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα που του εξασφαλίζει βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας. Συνήθως παρασκευάζονται σε συγκέντρωση 10X. Συστατικά που περιέχουν τα περισσότερα ρυθμιστικά είναι:

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 500 mM KCl
- 15 mM MgCl_2 (προαιρετικά)

6. Εκκινητές : Οι εκκινητές πρέπει να έχουν τέλεια συμπληρωματικότητα με τα άκρα του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιασθεί. Το μήκος τους είναι 20-30 bp, παράγοντας που καθορίζει την T_m και κατά συνέπεια τη θερμοκρασία αναδιάταξης. Μικρότεροι εκκινητές ενδέχεται να συνδεθούν με άλλα τμήματα του DNA και να δώσουν μη ειδικά προϊόντα, ενώ μεγαλύτεροι μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης. Το ποσοστό G+C δεν πρέπει να υπερβαίνει το 40-60% των βάσεων του εκκινητή. Οι εκκινητές χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 0,05-0,5 μM , ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις δίνουν μη ειδικά προϊόντα και διμερή των εκκινητών.

Για το σχεδιασμό της PCR απαραίτητο είναι να γνωρίζουμε την T_m του εκκινητή, δηλαδή τη θερμοκρασία κατά την οποία η μετάβαση από το δίκλωνο στο μονόκλωνο μόριο του DNA έχει πραγματοποιηθεί κατά 50%. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ιδανική θερμοκρασία αναδιάταξης είναι $3-5^{\circ} \text{C}$ μικρότερη της T_m .

Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν στο σχεδιασμό των εκκινητών είναι η συμπληρωματικότητα. Επαναλαμβανόμενες δομές με υψηλό ποσοστό G+C μπορούν να οδηγήσουν σε αναδιπλώσεις φουρκέτας (*hairpin loops*). Επίσης το 5' άκρο κάθε εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο ούτε του ίδιου ούτε των άλλων εκκινητών, γιατί αυτό θα οδηγήσει στο σχηματισμό διμερών των εκκινητών (*primer-dimers*). Εξυπακούεται ότι πρέπει να μην έχουν σε υψηλό ποσοστό ομολογία - και κυρίως στο 3' άκρο τους - με περιοχές του γονιδιώματος διαφορετικές από αυτή που θέλουμε να ενισχύσουμε. Στο σχεδιασμό των εκκινητών, σημαντική βοήθεια μπορούν να προσφέρουν προγράμματα H/Y (102-104).

Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ CGG ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής του γονιδίου *FMR1* που περιέχει την αλληλουχία CGG εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ζεύγη εκκινητών τους *f/c* (βασικός έλεγχος) (22). Κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού νουκλεοτιδίων γουανίνης και κυτοσίνης στην περιοχή της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας η αντίδραση απαιτεί υψηλή θερμοκρασία αποδιάταξης και παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, όπως το DMSO. Παράλληλα απαιτείται η παρουσία του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου *dGTP* (7-deaza *dGTP*, SIGMA), για να αποφευχθεί ο κίνδυνος δημιουργίας δευτεροταγών δομών μεταξύ των γουανινών και κυτοσινών της ίδιας αλυσίδας (αγκύλες, *loops*). Η παρουσία του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου *deaza dGTP* στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες δεν επιτρέπει την προσχώρηση του βρωμιούχου αιθιδίου ανάμεσά τους και καθιστά ανεπιτυχή τη μελέτη των προϊόντων μετά από απλή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ως εκ τούτου για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των επαναλήψεων απαιτούνται άλλες μέθοδοι(44).

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το ακόλουθο:

I. Gene specific PCR (βασικός έλεγχος)

PCR Master Mix

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ/ΔΕΙΓΜΑ (μL)
Taq multiplex	5
Buffer Q Solution	1
DMSO	1
DEAZA	0,5
H ₂ O	3
FMR1 F,R FAM-Primers	0,1 / primer
DNA	2

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι (22):

Forward 5'- GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT -3'

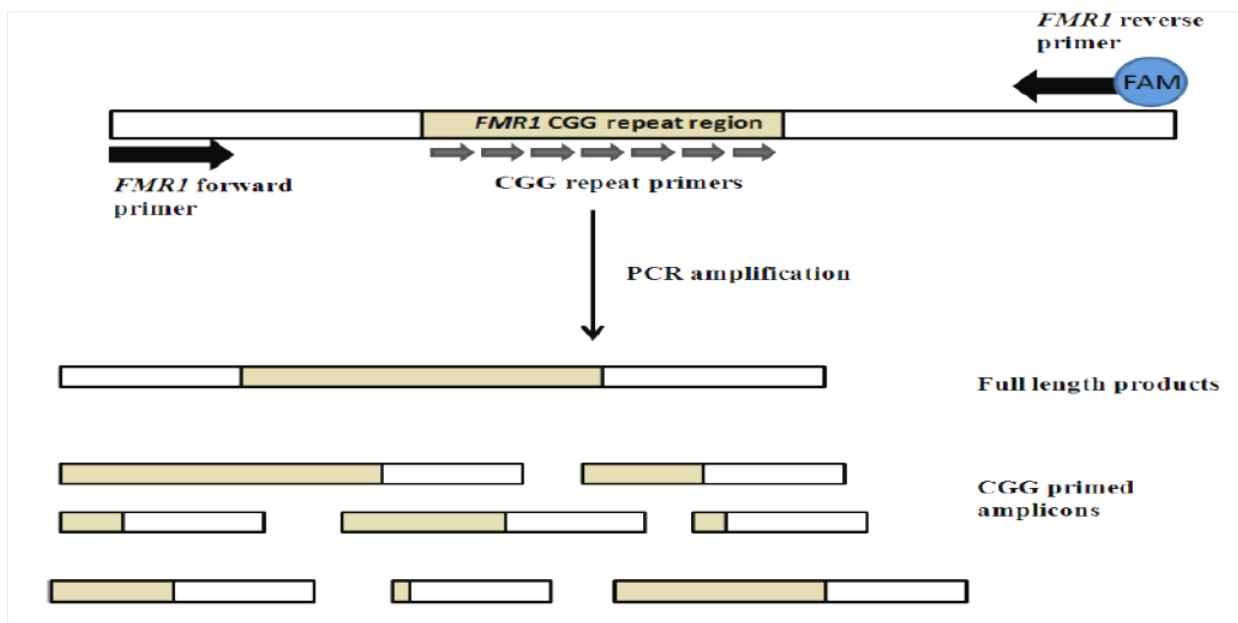
Reverse 5'- AGCCCGCACTTCCACCACCAGCCCCTCCTCCA- 3'

Συνθήκες

ΣΤΑΔΙΟ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ °C	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	
denaturation	95	15 min	1 hold
	98	2 min	
	96	1 min	
annealing	60	2 min	14 κύκλοι
	72	2 min	
	72	2 min	
extension	94	45 sec	20 κύκλοι
	60	1 min	
	72	2 min	
	72	15 min	
	10	for ever	

Η εφαρμογή της PCR στην περίπτωση θήλεων που φέρουν την προμετάλλαξη ή την πλήρη μετάλλαξη μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του προτιμητέου πολλαπλασιασμού του μικρότερου αλληλομόρφου. Τέτοια δείγματα θα εμφανίζουν στο ηλεκτροφόρημα μόνο μία κορυφή ενώ αντίστοιχη θα είναι η εικόνα και στην περίπτωση δειγμάτων που είναι ομόζυγα, φέροντας και στα δύο αλληλόμορφα τον ίδιο αριθμό

επαναλήψεων. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, στα δείγματα που εμφάνισαν μόνο μία κορυφή, εφαρμόστηκε μία δεύτερη PCR. Για αυτόν τον διευρυμένο έλεγχο χρησιμοποιήθηκε το Amplidex™ FMR1 PCR Kit , το οποίο βασίζεται σε μία PCR τριών εκκινήτων (CGG Repeat Primed-RP PCR). Η RP PCR χρησιμοποιεί και έναν τρίτο εκκινήτη ο οποίος είναι συμπληρωματικός στην περιοχή των CGG επαναλήψεων. Αυτή η PCR τριών εκκινήτων καταλήγει σε προϊόν πλήρους μεγέθους ως αποτέλεσμα του συνδυασμού των δύο, ειδικών για το γονίδιο, εκκινήτων ενώ επιπροσθέτως, προκύπτει και μια σειρά αντιγράφων ποικίλων μεγεθών από το συνδυασμό του FAM-reverse εκκινήτη και του CGG εκκινήτη λόγω της τυχαίας πρόσδεσής του στην επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (105),όπως φαίνεται και στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 19: CGG Repeat Primed - RP PCR

Στην περίπτωση αυτή το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το ακόλουθο (105):

II. RP PCR (διευρυμένος έλεγχος)

PCR Master Mix

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ/ΔΕΙΓΜΑ (μL)
CG-Rich Amp Buffer	11,45
FMR1 F,R FAM primers	0,50
FMR1 CGG Primer	0,50
Diluent	0,50
GC-Rich Polymerase Mix	0,05
DNA Sample	2,00
Total Volume per Reaction	15,00

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Forward 5` -TCAGGCGCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCA -3`

Reverse 5` - FAM-AAGCGCCAT TGGA -GCCCCGCACTTCC -3`

CGG primer GCC GCC GCC GCC GCC (συμπληρωματική αλληλουχία της 5x CGG, χωρίς σήμανση με FAM) (Filipovic-Sadic et al. 2010).

Συνθήκες

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ °C	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	
95	15 min	1 hold
97	35 sec	
62	35 sec	10 κύκλοι
68	4 min	
97	35 sec	
62	35 sec	
68	4 min + 20 sec/cycle extension	20 κύκλοι
72	10 min	1 hold
4	For ever	1 hold

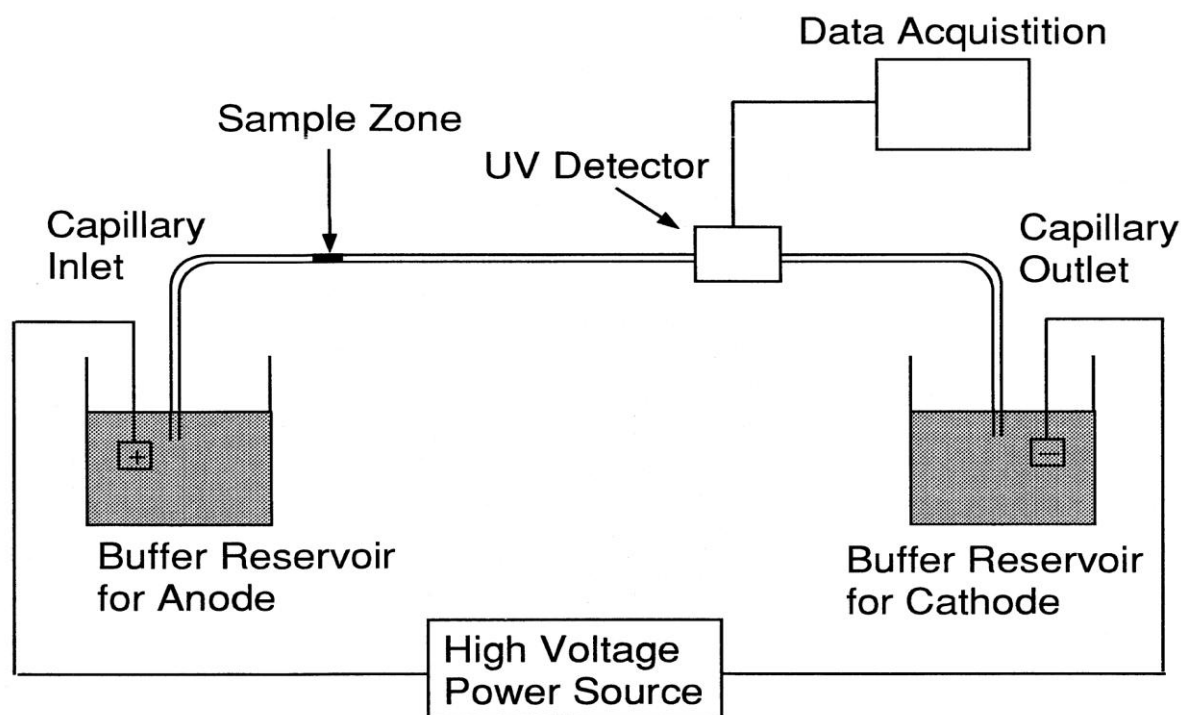
Δ. ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (Capillary Electrophoresis-CE)

Η Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πλέον αυτοματοποιημένη και εξελιγμένη ηλεκτροφορητική τεχνική για διαχωρισμό σακχάρων, πεπτιδίων, φαρμακευτικών ουσιών, ανόργανων ιόντων, πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων. Χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλες δυνατότητες αναλυτικών διαχωρισμών, οι οποίες υπερτερούν ακόμη και έναντι καθιερωμένων χρωματογραφικών μεθόδων, όπως η HPLC. Κύρια πλεονεκτήματα της είναι: α) γρήγοροι, ποσοτικοί και επαναλήψιμοι διαχωρισμοί, β) πολλές δυνατότητες αναλυτικών εφαρμογών και γ) καταλληλότητα για αυτοματοποιημένη χρήση για πολλαπλά δείγματα δ) μεγάλη ευαισθησία ε) απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος στ) κατανάλωση πολύ μικρών ποσοτήτων αντιδραστηρίων .

Η βασική αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η χρησιμοποίηση ενός τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου (fused silica capillary tube) ως μέσο μεταφοράς. Ο σωλήνας έχει συνήθως μήκος μικρότερο των 100 cm και εσωτερική διάμετρο περίπου 50 μm. Ο σωλήνας αυτός μπορεί να είναι κενός ή να περιέχει κατάλληλο ηλεκτροφορητικό υλικό, πχ πολυακρυλαμίδιο. Τα άκρα του τοποθετούνται σε

δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια. Ένα τροφοδοτικό μηχανήμα παρέχει διαφορά δυναμικού στην περιοχή 20.000 - 30.000 Volts για να προκαλέσει μετακίνηση των μορίων. Μετά το διαχωρισμό, ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, τα κλάσματα ανιχνεύονται με οπτικό ανιχνευτή και οι πληροφορίες συλλέγονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή υπό μορφή κορυφών σε ηλεκτροφόρημα (106-107).

Η βασική αρχή λειτουργίας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 20 : Βασική αρχή λειτουργίας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση εκμεταλεύεται τρία φυσικοχημικά φαινόμενα για να επιτύχει τους διαχωρισμούς:

1. Την ηλεκτροφόρηση, διαδικασία κατά την οποία φορτισμένα σωματίδια ή ιόντα κινούνται διαμέσου ενός σταθερού μέσου υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου όπου τα ιόντα κινούνται προς τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια ενώ η ταχύτητα της κίνησης εξαρτάται από την πυκνότητα του φορτίου (106-107).

2. Την ηλεκτροενδόσμωση δηλ. τη σχετική κίνηση ενός υγρού σε μία σταθερή φορτισμένη επιφάνεια υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το μέγεθος και κατεύθυνση της ροής εξαρτάται από το τριχοειδές και το υλικό του. Όλα τα είδη μετακινούνται προς την ίδια κατεύθυνση ανεξαρτήτως φορτίου ενώ υπό κανονικές συνθήκες η κίνηση γίνεται προς την κάθοδο (106-107).

3. Το διαχωρισμό

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία οικογένεια τεχνικών με διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς την εφαρμογή και τη διαχωριστική ικανότητα. Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται τα διάφορα είδη τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης και οι εφαρμογές τους (107):

Use CE Mode...	For Analysis of...
Capillary zone electrophoresis (CZE)	Ions, etc.
Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	Neutral and ionic analytes
Chiral capillary electrophoresis (CCE)	Chiral molecules
Capillary electrochromatography (CEC)	Small molecules
Capillary gel electrophoresis (CGE/SDS-PAGE)	DNA/RNA size/protein MW
Capillary isoelectric focussing (CIEF)	Protein/peptide isoelectric point
Capillary isotachopheresis (CITP)	Ions

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής (Capillary gel electrophoresis-CGE) η οποία χρησιμοποιείται για διαχωρισμό βιομακρομορίων όπως τα ολιγονουκλεοτίδια, το DNA και οι πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με πλήρωση του τριχοειδούς σωλήνα με ηλεκτροφορητικό υλικό, αгарόζη ή πολυακρυλαμίδιο. Τα μεγαλύτερα μόρια επιβραδύνονται σε σύγκριση με τα μικρότερα μόρια, ως συνέπεια του αυξημένου ιξώδους του ηλεκτροφορητικού υλικού, κατά συνέπεια ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό μέγεθος. Έτσι τα μικρότερα τμήματα DNA θα φτάσουν στον ανιχνευτή νωρίτερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα μόρια (105-107).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Capillary electrophoresis with POP-7

Αποδιάταξη, στους 95°C, για 2 min και διατήρηση στους 4 °C μέχρι την έναρξη της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Πολύ συχνά, ιδιαίτερα σε περιοχές πλούσιες σε GC, παρατηρούνται συμπυκνώσεις. Η προσθήκη περίπου 10% φορμαμίδιου ενισχύει την αποδιάταξη και αποτρέπει τις συμπυκνώσεις. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδές 50 cm, εφαρμοζόμενη τάση 2,5 kV για 20 sec και 15 kV για 40 min σε POP-7 πολυμερές τζελ (105-107).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ/ΔΕΙΓΜΑ (μL)
Hi-Di Φορμαμίδιο	9,25
ROX 500 Size Ladder	0,25
PCR product	0,5

Με στόχο την απόκτηση χρήσιμων πληροφοριών από αυτή την τεχνική διαχωρισμού σημαντικό στάδιο είναι η ανίχνευση και η μέτρηση των αναλυόμενων ουσιών. Η ανίχνευση μπορεί να είναι ποιοτική ή/και ποσοτική. Οι περισσότερες ανιχνεύσεις γίνονται στον τριχοειδή σωλήνα (on column detection), πράγμα που σημαίνει πως ένα τμήμα του είναι συνδεδεμένο με τη συσκευή ανίχνευσης και πως το ίδιο το τριχοειδές είναι η μονάδα ανίχνευσης. Στην περίπτωση αυτή η ανίχνευση γίνεται με UV ή φθορισμό. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούν μια εξωτερική πηγή ενέργειας για να διεγείρουν τα μόρια των αναλυόμενων ουσιών σε μία ανώτερη ενεργειακή κατάσταση. Όταν αυτά τα διεγερμένα μόρια επανέλθουν στην αρχική ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπουν ενέργεια χαμηλού μήκους κύματος, το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί και να καταγραφεί ως πέρασμα της αναλυόμενης ουσίας από τον ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές φθορισμού στα συστήματα CE συχνά χρησιμοποιούν λέιζερ ως εξωτερική πηγή διέγερσης (Laser Induced Fluorescence-LIF). Για αναλυόμενα μόρια τα οποία είναι ή μπορούν να μετατραπούν μέσω χημικής αντίδρασης σε φθορίζοντα η ευαισθησία αυτής της ανίχνευσης μπορεί να είναι 10-1000 φορές μεγαλύτερη από την ανίχνευση απορρόφησης. Η ανίχνευση με LIF είναι η μέθοδος εκλογής για την ανάλυση αλληλουχίας του DNA. Με λίγες εξαιρέσεις, η σήμανση των εκκινητών πραγματοποιείται στο 5' άκρο. Για την ανίχνευση δύναται να χρησιμοποιηθεί η φασματομετρία μάζας ή η χημειοφωταύγεια (106-107).

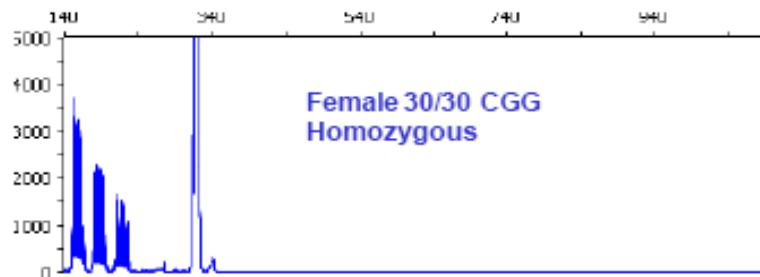
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση με φθορισμό και πιο συγκεκριμένα η LIF στον αναλυτή Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems).

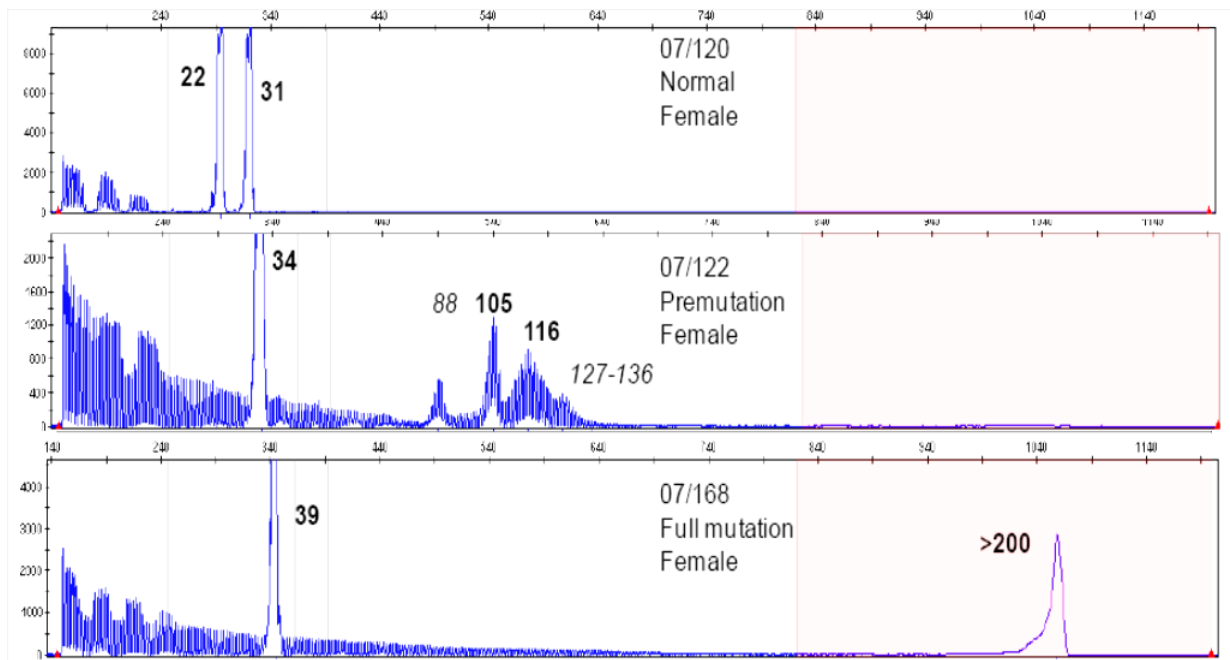
Ε. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

Τα προϊόντα της PCR που ανιχνεύτηκαν με την CE, αναλύθηκαν με το software GeneMarker V 1.95. Το μέγεθος των ειδικών για το γονίδιο προϊόντων υπολογίστηκε με σύγκριση με το standard (ROX 500 Size Ladder) το οποίο εγχύθηκε ταυτόχρονα με τα δείγματα. Ο υπολογισμός του αριθμού των CGG επαναλήψεων γίνεται με τη βοήθεια του τύπου $\#CGG = (Peak\ size - c_0) / m_0$, ενώ ένας αντιπροσωπευτικός πίνακας μετασχηματισμών είναι ο ακόλουθος (105):

Repeat Length	Observed Size
20	291.43bp
29	317.78bp
31	323.65bp
54	391.30bp
119	582.87bp

Παραδείγματα ηλεκτροφορημάτων διαφόρων δειγμάτων έχουν ως εξής:





Εικόνα 20 : Ηλεκτροφορήματα(από πάνω προς τα κάτω) α) Ομόζυγο θήλυ (30/30) β) Φυσιολογικό θήλυ(22/31) γ) Θήλυ με προμετάλλαξη (34/105) γ) Θήλυ με την πλήρη μετάλλαξη(39/ >200)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του αριθμού των CGG επαναλήψεων και για τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου FMR1, καθώς επίσης και ο προσδιοριζόμενος γονότυπος με βάση αυτές τις μετρήσεις παρατίθενται στους ακόλουθους πίνακες:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1- POOR RESPONDERS

ΔΕΙΓΜΑ IVF (A.A)			
a) poor responders <40 years	αριθμός επαναλήψεων CGG(FMR1)		γονότυπος
	allele 1	allele 2	
17	28	40	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
18	28	41	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
30	18	19	Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό
36	18	21	Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό
37	21	27	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
47	28	37	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
48	28	28	φυσιολογικό
71	28	31	φυσιολογικό
85	21	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
104	27	28	φυσιολογικό
102	28	37	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
110	21	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
b)poor responders>40 years			
43	27	28	φυσιολογικό
52	23	41	Ομόζυγες-χαμηλό/υψηλό
56	28	30	φυσιολογικό
80	28	28	φυσιολογικό
101	22	22	Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό
115	22	24	Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό
117	28	28	φυσιολογικό
118	28	28	φυσιολογικό
124	26	30	φυσιολογικό
98	18	32	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
99	28	31	φυσιολογικό
100	28	28	φυσιολογικό
106	28	29	φυσιολογικό
108	17	21	Ομόζυγες –χαμηλό/χαμηλό

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 - GOOD RESPONDERS

ΔΕΙΓΜΑ IVF (A.A)				
good responders<40 years		αριθμός επαναλήψεων CGG(FMR1)		γονότυπος
		allele 1	allele 2	
11		28	28	φυσιολογικό
14		27	28	φυσιολογικό
24		28	30	φυσιολογικό
81		21	39	Ομόζυγες-χαμηλό/υψηλό
83		27	31	φυσιολογικό
82		22	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
34		23	32	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
13		28	30	φυσιολογικό
66		24	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
130		18	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
63		28	29	φυσιολογικό
96		28	29	φυσιολογικό
112		28	28	φυσιολογικό
123a		28	28	φυσιολογικό
126		28	28	φυσιολογικό
128		28	28	φυσιολογικό
6		27	28	φυσιολογικό
10		21	35	Ομόζυγες-χαμηλό/υψηλό
65		19	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
67		28	28	φυσιολογικό
31		22	29	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
72		29	36	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/υψηλό
28				
40		21	30	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
85		21	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
137		27	28	φυσιολογικό
135		27	28	φυσιολογικό
37		21	27	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
162		28	34	φυσιολογικό
149		27	28	φυσιολογικό
167		28	28	φυσιολογικό
152		28	29	φυσιολογικό
153		21	27	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
157		20	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
140		20	43	Ομόζυγες-χαμηλό/υψηλό
70		18	28	Ετερόζυγες-φυσιολογικό/χαμηλό
36		18	21	Ομόζυγες-χαμηλό/χαμηλό

Στη συνέχεια παρατίθεται η στατιστική ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ Ι.

Αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος (*mean*) του αριθμού των επαναλήψεων για το αλληλόμορφο 1 και το αλληλόμορφο 2 και η τυπική απόκλιση (*SD*) για κάθε μία από τις ομάδες : *poor responders(all)*, *good responders*, *poor responders<40*, *poor responders>40*.

Στη συνέχεια, με τη χρησιμοποίηση του *Mann-Whitney U test* έγινε σύγκριση του μέσου αριθμού των CGG επαναλήψεων για το αλληλόμορφο 1 και για το αλληλόμορφο 2 μεταξύ των ομάδων **α)** *poor responders vs good responders* **β)** *poor responders<40 vs poor responders>40* **γ)** *poor responders<40 vs good responders* **δ)** *poor responders>40 vs good responders*. Τα αποτελέσματα των παραπάνω συγκρίσεων φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες:

		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. Deviation</i>	<i>Std. Error Mean</i>	<i>p-value</i>
	<i>poor vs good</i>					
allele 1	<i>poor responders (all)</i>	26	24,81	4,030	,790	,672
	<i>good responders</i>	36	24,58	3,790	,632	
allele 2	<i>poor responders (all)</i>	26	29,42	5,887	1,154	,893
	<i>good responders</i>	36	29,53	3,791	,632	

		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. Deviation</i>	<i>Std. Error Mean</i>	<i>p-value</i>
	<i>poor <40 vs >40</i>					
allele 1	<i>poor responders <40</i>	12	24,50	4,275	1,234	,762
	<i>poor responders >40</i>	14	25,07	3,951	1,056	
allele 2	<i>poor responders <40</i>	12	30,42	7,038	2,032	,772
	<i>poor responders >40</i>	14	28,57	4,799	1,283	

		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. Deviation</i>	<i>Std. Error Mean</i>	<i>p-value</i>
	<i>poor <40 vs good</i>					
allele 1	<i>poor responders <40</i>	12	24,50	4,275	1,234	,921
	<i>good responders</i>	36	24,58	3,790	,632	
allele 2	<i>poor responders <40</i>	12	30,42	7,038	2,032	,920
	<i>good responders<40</i>	36	29,53	3,791	,632	

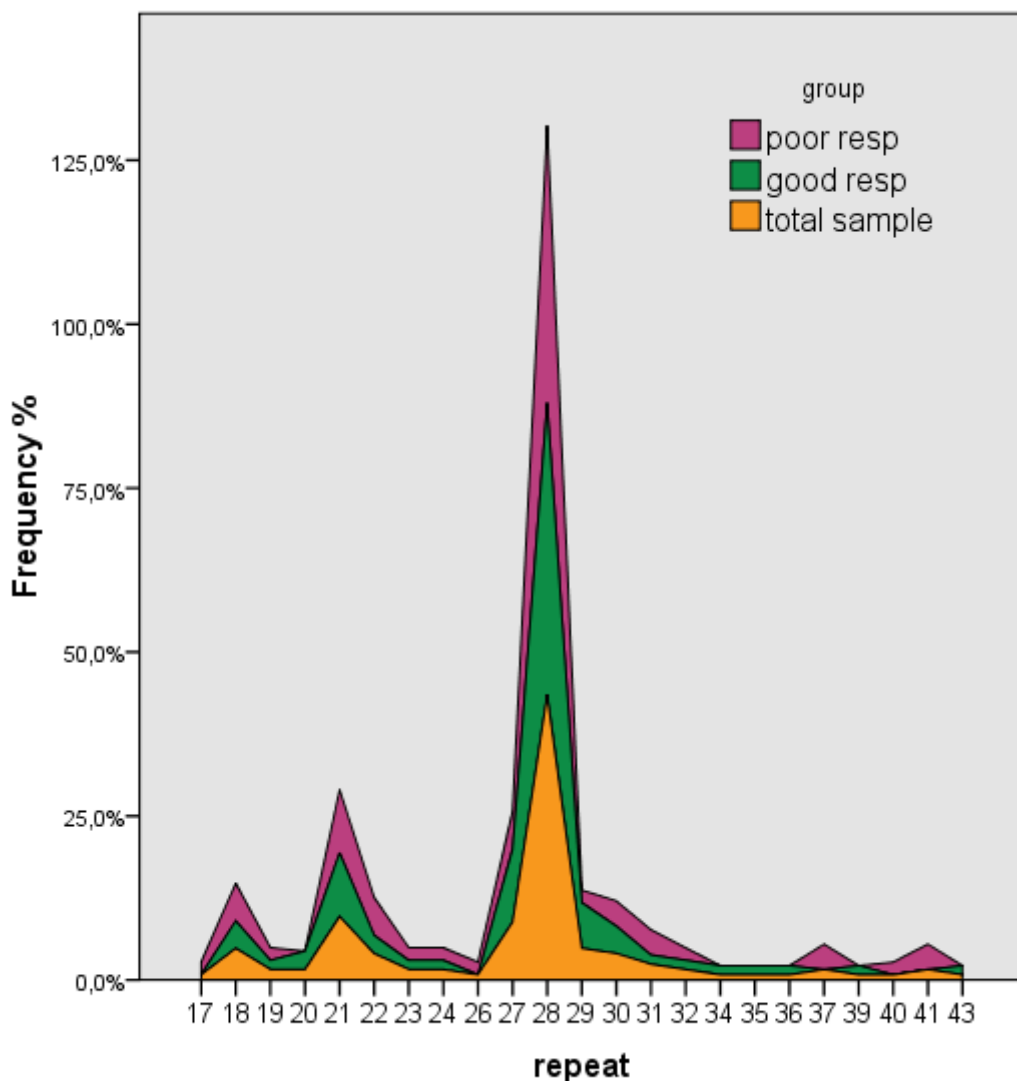
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p-value
allele 1	<i>poor >40 vs good</i>					
	<i>poor responders>40</i>	14	25,07	3,951	1,056	,583
	<i>good responders</i>	36	24,58	3,790	,632	
allele 2	<i>poor responders>40</i>	14	28,57	4,799	1,283	,766
	<i>good responders<40</i>	36	29,53	3,791	,632	

Ο μέσος όρος του αριθμού των επαναλήψεων για το αλληλόμορφο 1 ήταν $24,81 \pm 0,79$ vs $24,58 \pm 0,632$ vs $24,50 \pm 1,234$ vs $25,07 \pm 1,056$ αντίστοιχα, για τις ελεγχόμενες ομάδες *poor responders(all)*, *good responders*, *poor responders<40*, *poor responders>40*.

Ο μέσος όρος του αριθμού των επαναλήψεων για το αλληλόμορφο 2 ήταν $29,42 \pm 1,154$ vs $29,53 \pm 0,632$ vs $30,42 \pm 2,032$ vs $28,57 \pm 1,283$ αντίστοιχα, για τις ελεγχόμενες ομάδες *poor responders(all)*, *good responders*, *poor responders<40*, *poor responders>40*.

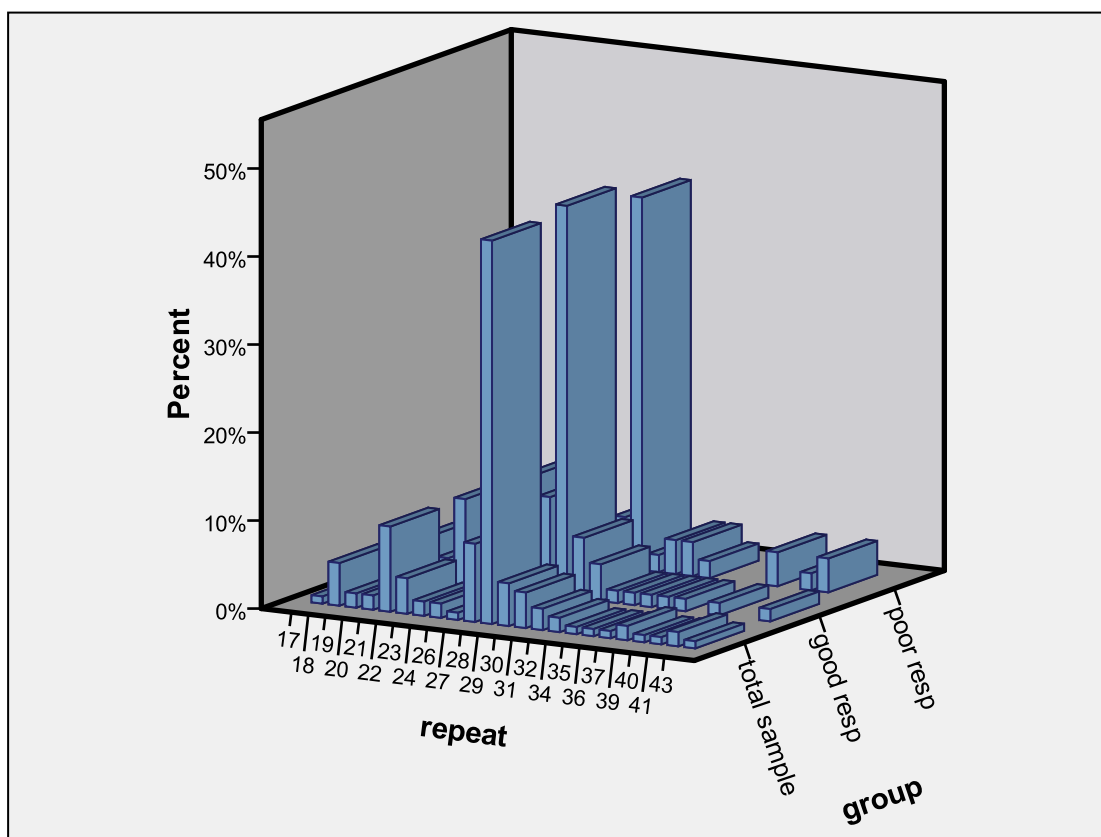
Μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον μέσο όρο του αριθμού των CGG επαναλήψεων ούτε για το αλληλόμορφο 1 ούτε για το αλληλόμορφο 2.

Στη συνέχεια έγινε διάγραμμα κατανομής των συχνοτήτων των αλληλομόρφων α) για τις πτωχές απαντήσεις β) για τις καλές απαντήσεις και γ) για το σύνολο των ασθενών:



	mean \pm SEM	95% CI	MAX REPEATS	PERCENT
poor resp	27,12 \pm 0,76	[25,68 - 28,65]	28	42,3% (22/52)
good resp	27,06 \pm 0,53	[26,00 - 28,12]	28	44,4% (32/72)
total sample	27,08 \pm 0,44	[26,20 - 27,96]	28	43,5 (54/124)

Παρατηρούμε ότι και στις πτωχές απαντήσεις, και στις καλές απαντήσεις αλλά και στο σύνολο των υπογόνιμων γυναικών το πιο συχνά εμφανιζόμενο αλληλόμορφο είναι αυτό των 28 επαναλήψεων (ποσοστό 42,3%, 44,4% και 43,5% αντίστοιχα) κάτι που έρχεται σε συμφωνία με ότι έχει αναφερθεί για τον ελληνικό πληθυσμό (εικόνα 9). Η κατανομή ακολουθεί το πρότυπο κατανομής του Fu et al. (1991) για το φυσιολογικό πληθυσμό και σε αντίθεση με ότι έχει αναφερθεί σε άλλη εργασία (Gleicher et al. 2009) για τον υπογόνιμο πληθυσμό δεν παρατηρείται μετατόπιση της κατανομής προς τα δεξιά, δηλαδή προς μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων.



Με τη χρήση του Fisher's exact test πραγματοποιήθηκε σύγκριση της κατανομής των γονοτύπων μεταξύ των ομάδων good responders και poor responders. Τα αποτελέσματα των ελέγχων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Good respon n(%)	Poor respon n(%)
norm	19 (52,8%)	12 (46,2%)
het	14 (38,9%)	8 (30,8%)
hom	3 (8,3%)	6 (23,1%)
total	36 (100%)	26 (100%)
Fisher's exact test	P-value = 0,298	

Η σύγκριση κατανομής γονοτύπων μεταξύ good responders και poor responders έδειξε ότι και στις δύο ομάδες επικρατής είναι ο φυσιολογικός γονότυπος με ποσοστό 52,8% και 46,2% αντίστοιχα και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι κατανομές των γονοτύπων διαφέρουν (p-value=0,256). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στις καλές όσο και στις πτωχές απαντήτριες ο ομόζυγος γονότυπος εμφανίζεται σε χαμηλό ποσοστό.

B. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια αναζήτησης στατιστικών συσχετίσεων ανάμεσα στον αριθμό των CGG επαναλήψεων και τους γονότυπους με κλινικά, βιοχημικά και εμβρυολογικά στοιχεία όπως αυτά προέκυψαν από τον τηρούμενο για κάθε ασθενή ιατρικό φάκελο στα πλαίσια της γενικής παρακολούθησής του αλλά και της ένταξής του σε πρόγραμμα IVF. Πιο αναλυτικά, τα στοιχεία που καταγράφηκαν και εκτιμήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ηλικία, βάρος, δείκτης μάζας σώματος), διάρκεια υπογονιμότητας και αριθμός προηγούμενων προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης, ορμονολογικό προφίλ (FSH, LH, PRL, TSH), παράμετροι της εξωγενούς διέγερσης (ημέρες πρόκλησης, σύνολο χρησιμοποιούμενης δόσης FSH, μέγιστο E2), έκβαση της IVF (αριθμός ωοθυλακίων, αριθμός ωαρίων, δείκτης ωρίμανσης, δείκτης γονιμοποίησης, ποιότητα εμβρύων, εγκυμοσύνη).

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το *Binary Logistic Model* και το *GLM model*.

Το *Binary Logistic Model* (ή αλλιώς *Logistic Regression*), χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις που η εξαρτημένη μεταβλητή (στην περίπτωση μας "κύηση"), ήταν δίτιμη (ναι/όχι). Εμείς ζητήσαμε να κάνουμε πρόγνωση της πιθανότητας να συμβεί αυτή η μεταβλητή χρησιμοποιώντας ως "predictors" τις μεταβλητές γονότυπος και ηλικία. Δηλ. θέσαμε το ερώτημα: Ποιά είναι η πιθανότητα κύησης όταν έχω το γονότυπο x σε σχέση με το *reference*; ή αλλιώς πόσες φορές πιθανότερο είναι κάποιος με διαφορετικό γονότυπο από το *reference* να επιτύχει κύηση δεδομένης της ηλικίας; Χρησιμοποιήθηκε ο *Norm* ως γονότυπος αναφοράς γιατί α) ο *Norm* είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος γονότυπος και β) το πιο συχνό αλληλόμορφο είναι αυτό με τις 28 επαναλήψεις CGG (άρα *norm*).

Το *GLM model* που είναι η ανάλυση διακύμανσης, δηλαδή συγκρίνει μέσες τιμές, χρησιμοποιήθηκε όταν η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν ποσοτική.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΙ.

I. Αρχικά, έγινε αναζήτηση στατιστικής συσχέτισης μεταξύ των γονοτύπων του συνόλου των υπό μελέτη δειγμάτων υπογονίμων γυναικών (ανεξάρτητα από το αν ήταν καλές ή πτωχές απαντήτριες) με τα παραπάνω αναφερόμενα στοιχεία. Ο παραπάνω έλεγχος έγινε με τη χρήση της *Univariate Analysis Of Variance (GLI - Generalised Linear Model)* και όλα τα στοιχεία ήταν προσαρμοσμένα ως προς την ηλικία (*adjusted for age*).

Τα αποτελέσματα των ελέγχων φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες:

All Patients	vs all data			
		Χρόνια στειρότητας marginal Means		
(sub)Genotype	N		Std. Error	p-value
norm	31	5,973	0,740	
het	22	6,642	0,889	0,713
hom	9	5,357	1,367	
adjusted for age (GLM model)				
		Αριθμός προσπαθειών marginal Means		
(sub)Genotype	N		Std. Error	p-value
norm	31	1,634	0,178	
het	22	2,127	0,214	0,212
hom	9	1,950	0,329	
adjusted for age (GLM model)				
		BMI marginal Means		
(sub)Genotype	N		Std. Error	p-value
norm	31	23,150	0,536	
het	22	23,982	0,644	0,502
hom	9	24,176	0,990	
adjusted for age (GLM model)				
		FSH marginal Means		
(sub)Genotype	N		Std. Error	p-value
norm	31	7,443	0,411	
het	22	6,975	0,494	0,750
hom	9	7,059	0,759	
adjusted for age (GLM model)				
		LH marginal Means		
(sub)Genotype	N		Std. Error	p-value
norm	31	5,947	0,506	
het	22	5,404	0,607	0,549
hom	9	6,610	0,934	
adjusted for age (GLM model)				

(sub)Genotype	N	Ημέρες πρόκλησης marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	9,877	0,278	
het	22	10,943	0,334	0,023
hom	9	11,118	0,514	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Σύνολο μονάδων marginal Means	Std. Error	p-value
norm	30	3033,804	230,222	
het	22	3554,686	271,815	0,295
hom	9	3528,644	418,935	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	5ης μέρας marginal Means	Std. Error	p-value
norm	28	678,822	121,760	
het	22	329,535	139,286	0,156
hom	9	382,579	211,446	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Ε2 Ημ. hCG marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	2426,075	230,792	
het	21	2018,080	283,772	0,151
hom	9	3028,223	426,389	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Αριθμός ωθηλακίων marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	8,704	0,509	
het	22	8,434	0,611	0,888
hom	9	8,958	0,940	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Αριθμός ωαρίων marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	8,144	0,513	
het	22	7,456	0,616	0,688
hom	9	8,056	0,947	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Αριθμός ώριμων ωαρίων marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	5,912	0,439	
het	18	5,685	0,582	0,620
hom	7	4,914	0,923	

(sub)Genotype	N	Maturation Rate marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	0,744	0,028	
het	18	0,796	0,038	0,026
hom	7	0,598	0,060	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Γονιμοπ.Ωάρια marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	5,255	0,352	
het	22	4,521	0,422	0,406
hom	9	5,182	0,649	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Fertilization Rate marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	0,675	0,029	
het	22	0,654	0,035	0,852
hom	9	0,648	0,053	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	Αριθμός μεταφ.εμβρύων marginal Means	Std. Error	p-value
norm	31	2,904	0,153	
het	22	2,907	0,184	0,796
hom	9	3,112	0,283	

adjusted for age (GLM model)

(sub)Genotype	N	πάχος ενδομητρίου marginal Means	Std. Error	p-value
norm	25	10,155	0,391	
het	11	10,141	0,597	0,969
hom	5	9,915	0,889	

adjusted for age (GLM model)

Ενώ με τη χρήση του Μοντέλου Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Model) έγινε αναζήτηση πιθανής στατιστικής συσχέτισης των γονοτύπων του FMR1 γονιδίου με την επίτευξη εγκυμοσύνης, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Binary Logistic Model	B	S.E.	p-value	OR	95,0% C.I. for EXP(B)	
					Lower	Upper
age	-0,081	0,059	0,168	0,922	0,822	1,0347
Geno (het)	-1,774	0,856	0,038	0,170	0,032	0,9081
Geno (hom)	-0,531	0,909	0,559	0,588	0,099	3,4935
Constant	2,067	2,055	0,315	7,900		

Binary Logistic Model

Dependent variable - Pregnancy

Independent variables - Genotype (norm is reference) and Age

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τους παραπάνω ελέγχους είναι τα εξής:

Οι γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο έχουν στατιστικά σημαντικό μικρότερο μέσο αριθμό ημερών πρόκλησης σε σχέση με τις ομόζυγες γυναίκες (p-value=0,023).

Φαίνεται ότι τόσο οι γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο όσο και οι ετερόζυγες έχουν σημαντικά υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης σε σχέση με τις ομόζυγες γυναίκες (p-value=0,026).

Από το μοντέλο παλινδρόμησης προκύπτει πως οι γυναίκες με ετερόζυγο γονότυπο έχουν 83% (1-0,170) μικρότερα odds κύησης σε σχέση με τις γυναίκες που φέρουν το φυσιολογικό γονότυπο με 95% Confidence Interval [32% - 91%] και p-value=0,038.

Αντίθετα οι γυναίκες με ομόζυγο γονότυπο δε φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά odds κύησης σε σχέση με τις γυναίκες με το φυσιολογικό γονότυπο (p-value=0,559).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε καμία άλλη από τις παραπάνω ελεγχόμενες ομάδες.

II. Σε ένα επόμενο στάδιο έγινε αναζήτηση στατιστικής συσχέτισης μεταξύ των γονοτύπων των υπό μελέτη δειγμάτων και των προαναφερθέντων στοιχείων, αλλά για κάθε ομάδα, καλές και πτωχές απαντήτριες, ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκε το *Kruskal Wallis test* (*Non Parametric Analysis Of Variance*). Στη συγκεκριμένη ανάλυση δεν έγινε στάθμιση ως προς την ηλικία λόγω του ότι θεωρήθηκε συμπαγής ομάδα.

Τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες:

A.Good Responders		vs all data				
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	p-value
Ηλικία	norm	19	32,68	5,39	1,24	0,124
	het	14	30,71	2,23	0,60	
	hom	3	28,67	1,15	0,67	
	Total	36	31,58	4,31	0,72	
Χρόνια στειρότητας	norm	19	5,11	2,92	0,67	0,191
	het	14	4,71	2,49	0,67	
	hom	3	2,17	1,26	0,73	
	Total	36	4,71	2,73	0,45	
Αριθμός προσπαθειών	norm	19	1,26	0,56	0,13	0,776
	het	14	1,50	0,85	0,23	
	hom	3	1,33	0,58	0,33	
	Total	36	1,36	0,68	0,11	
BMI	norm	19	23,07	3,10	0,71	0,356
	het	14	24,03	2,24	0,60	
	hom	3	24,51	5,21	3,01	
	Total	36	23,57	2,94	0,49	
FSH	norm	19	6,71	1,73	0,40	0,671
	het	14	6,60	1,32	0,35	
	hom	3	6,10	1,08	0,62	
	Total	36	6,62	1,51	0,25	
LH	norm	19	6,30	3,31	0,76	0,932
	het	14	6,06	3,16	0,85	
	hom	3	5,20	1,93	1,11	
	Total	36	6,12	3,11	0,52	
LH/FSH	norm	19	0,98	0,54	0,12	0,980
	het	14	0,96	0,53	0,14	
	hom	3	0,88	0,38	0,22	
	Total	36	0,96	0,51	0,09	
PRL	norm	17	15,00	5,29	1,28	0,180
	het	14	13,50	8,64	2,31	
	hom	3	11,63	5,92	3,42	

	Total	34	14,08	6,80	1,17	
TSH	norm	12	2,49	1,33	0,38	0,332
	het	5	1,58	0,89	0,40	
	hom	1	2,26			
	Total	18	2,23	1,23	0,29	
Ημέρες πρόκλησης	norm	19	9,63	1,46	0,34	0,091
	het	14	10,64	1,22	0,32	
	hom	3	11,00	2,00	1,15	
	Total	36	10,14	1,48	0,25	
Σύνολο Μονάδων	norm	18	2711	1009	238	0,268
	het	14	3036	1190	318	
	hom	3	4383	2336	1349	
	Total	35	2984	1259	213	
5η μέρα	norm	17	819,94	1074,16	260,52	0,593
	het	14	337,21	295,89	79,08	
	hom	3	290,00	247,44	142,86	
	Total	34	574,41	812,34	139,32	
E2 Ημ. hCG	norm	19	2879	1327	304	0,966
	het	13	2758	1033	287	
	hom	3	3520	2927	1690	
	Total	35	2889	1362	230	
αριθμός ωοθηλακίων	norm	19	10,47	2,87	0,66	0,601
	het	14	10,21	1,63	0,43	
	hom	3	11,67	2,52	1,45	
	Total	36	10,47	2,40	0,40	
αριθμός ωαρίων	norm	19	9,95	2,91	0,67	0,552
	het	14	9,21	1,76	0,47	
	hom	3	10,33	2,08	1,20	
	Total	36	9,69	2,44	0,41	
Ώριμα ωάρια	norm	19	7,37	2,27	0,52	0,983
	het	12	7,25	1,66	0,48	
	hom	3	7,33	2,08	1,20	
	Total	34	7,32	2,00	0,34	
Maturation Rate	norm	19	0,75	0,13	0,03	0,437
	het	12	0,80	0,13	0,04	
	hom	3	0,70	0,07	0,04	
	Total	34	0,76	0,13	0,02	
Γονιμοπ. ωάρια	norm	19	6,42	1,64	0,38	0,177
	het	14	5,29	1,86	0,50	
	hom	3	6,67	1,53	0,88	
	Total	36	6,00	1,77	0,30	
Fertilization Rate	norm	19	0,66	0,11	0,03	0,693
	het	14	0,58	0,17	0,05	
	hom	3	0,64	0,02	0,01	
	Total	36	0,62	0,14	0,02	
αριθμος μεταφ εμβρυων	norm	19	3,11	0,32	0,07	0,417

	het	14	2,93	0,47	0,13	
	hom	3	3,00	0,00	0,00	
	Total	36	3,03	0,38	0,06	
πάχος ενδομητρίου	norm	14	10,29	1,73	0,46	
	het	5	9,60	2,19	0,98	0,565
	hom	1	9,00			
	Total	20	10,05	1,79	0,40	

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων του FMR1 και των παραπάνω στοιχείων για την ομάδα των καλών απαντητριών.

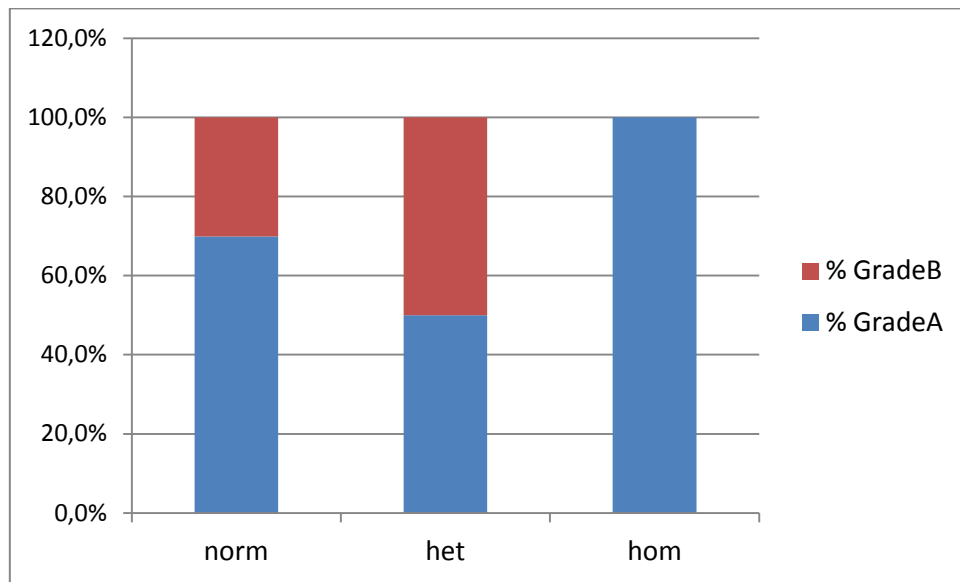
Παράλληλα, για την ίδια ομάδα, με τη χρήση του Fisher's exact test πραγματοποιήθηκε αναζήτηση πιθανής συσχέτισης των γονοτύπων με την επίτευξη εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Genotype		Κύηση		Total
		Όχι	Ναι	
norm	Count	11	8	19
	%	57,9	42,1	100,0
het	Count	12	2	14
	%	85,7	14,3	100,0
hom	Count	1	2	3
	%	33,3	66,7	100,0
Total	Count	24	12	36
	%	66,7	33,3	100,0
Fisher's exact test		p-value = 0,090		

Παρόλο που τα αποτελέσματα δεν έφτασαν στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας του 5%, αξίζει να αναφερθεί ότι στις καλές απαντήτριες έχουμε χαμηλά ποσοστά κύησης, ανεξαρτήτως γονοτύπου, στις ετερόζυγες όμως τα ποσοστά εγκυμοσύνης είναι ακόμα χαμηλότερα (p-value=0,090).

Επιπλέον, με τη χρήση και πάλι του Fisher's exact test πραγματοποιήθηκε αναζήτηση πιθανής συσχέτισης των γονοτύπων με την ποιότητα των εμβρύων που προέκυψαν και τα αποτελέσματα αυτού του ελέγχου ακολουθούν:

	% GradeA	% GradeB	Grade A	Grade B
norm	69,9%	30,1%	72	31
het	50,0%	50,0%	13	13
hom	100,0%	0,0%	7	0



Fisher's exact test $p\text{-value} = 0,021$

Από τα 103 έμβρυα που προήλθαν από γυναίκες με φυσιολογικούς γονότυπους τα 69,9% ήταν Grade A ενώ τα 30,1% Grade B. Στις ετερόζυγες, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 50% και 50% αντίστοιχα ενώ οι ομόζυγες είχαν 100% έμβρυα Grade A. Το καλύτερο grading εμβρύων το είχαν οι ομόζυγες ακολουθούμενο από τις φυσιολογικές ενώ οι ετερόζυγες είχαν το χειρότερο με $p\text{-value}=0,021$. Εντούτοις, λόγω του πολύ μικρού συνολικού αριθμού εμβρύων από γυναίκες που έφεραν τον ομόζυγο γονότυπο θα πρέπει να είναι κανείς ιδιαίτερα προσεκτικός στην ερμηνεία αυτού του αποτελέσματος.

B.Poor Responders**vs all data**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	p-value
Ηλικία	norm	12	39,17	4,34	1,25	0,179
	het	8	35,75	3,96	1,40	
	hom	6	38,67	4,97	2,03	
	Total	26	38,00	4,47	0,88	
Χρόνια στειρότητας	norm	12	8,17	5,83	1,68	0,944
	het	8	8,38	5,73	2,03	
	hom	6	7,50	5,17	2,11	
	Total	26	8,08	5,44	1,07	
Αριθμός προσπαθειών	norm	12	2,33	1,23	0,36	0,148
	het	8	3,00	0,53	0,19	
	hom	6	2,33	0,82	0,33	
	Total	26	2,54	0,99	0,19	
BMI	norm	12	23,28	3,20	0,92	0,670
	het	8	23,88	3,44	1,21	
	hom	6	24,02	1,99	0,81	
	Total	26	23,63	2,95	0,58	
FSH	norm	12	8,79	3,76	1,08	0,475
	het	8	7,25	1,80	0,63	
	hom	6	7,67	1,72	0,70	
	Total	26	8,06	2,86	0,56	
LH	norm	12	5,01	1,54	0,44	0,766
	het	8	4,99	0,89	0,31	
	hom	6	7,07	4,52	1,85	
	Total	26	5,48	2,48	0,49	
LH/FSH	norm	12	0,64	0,24	0,07	0,660
	het	8	0,73	0,24	0,09	
	hom	6	0,92	0,57	0,23	
	Total	26	0,73	0,35	0,07	
PRL	norm	12	11,87	5,89	1,70	0,825
	het	8	12,44	6,14	2,17	
	hom	5	12,46	2,28	1,02	
	Total	25	12,17	5,28	1,06	
TSH	norm	8	1,87	0,73	0,26	0,762
	het	5	1,62	1,33	0,60	
	hom	3	1,90	0,46	0,26	
	Total	16	1,80	0,87	0,22	
Ημέρες πρόκλησης	norm	12	10,25	1,76	0,51	0,279
	het	8	11,50	1,20	0,42	
	hom	6	11,17	2,04	0,83	
	Total	26	10,85	1,71	0,34	
Σύνολο Μονάδων	norm	12	3644	1209	349	0,273
	het	8	4200	1017	360	

	hom	6	3200	1343	548	
	Total	26	3713	1198	235	
5η μέρα	norm	11	534,91	371,32	111,96	
	het	8	194,38	161,10	56,96	0,073
	hom	6	455,17	378,88	154,68	
	Total	25	406,80	343,62	68,72	
E2 Ημ. hCG	norm	12	1508	759	219	
	het	8	1221	480	170	0,063
	hom	6	2647	1321	539	
	Total	26	1682	986	193	
αριθμός ωοθηλακίων	norm	12	5,00	2,41	0,70	
	het	8	7,13	3,04	1,08	0,197
	hom	6	7,00	3,52	1,44	
	Total	26	6,12	2,96	0,58	
αριθμός ωαρίων	norm	12	4,42	2,50	0,72	
	het	8	6,13	3,04	1,08	0,332
	hom	6	6,33	3,14	1,28	
	Total	26	5,38	2,86	0,56	
Όριμα ωάρια	norm	12	3,17	2,17	0,63	
	het	6	3,83	1,72	0,70	0,560
	hom	4	2,50	0,58	0,29	
	Total	22	3,23	1,85	0,39	
Maturation Rate	norm	12	0,74	0,22	0,06	
	het	6	0,78	0,17	0,07	0,099
	hom	4	0,52	0,10	0,05	
	Total	22	0,72	0,21	0,04	
Γονιμοπ. ωάρια	norm	12	3,00	1,60	0,46	
	het	8	4,00	1,51	0,53	0,311
	hom	6	4,17	1,94	0,79	
	Total	26	3,58	1,68	0,33	
Fertilization Rate	norm	12	0,74	0,22	0,06	
	het	8	0,73	0,23	0,08	0,884
	hom	6	0,67	0,12	0,05	
	Total	26	0,72	0,20	0,04	
αριθμος μεταφ εμβρυων	norm	12	2,58	1,38	0,40	
	het	8	2,88	0,64	0,23	0,807
	hom	6	3,17	1,47	0,60	
	Total	26	2,81	1,20	0,24	
πάχος ενδομητρίου	norm	11	10,00	2,00	0,60	
	het	6	10,50	2,51	1,02	0,938
	hom	4	10,25	1,71	0,85	
	Total	21	10,19	2,02	0,44	

Σε καμία από τις παραπάνω ελεγχόμενες κατηγορίες για την ομάδα των poor responders δεν βρέθηκε κάποια σημαντικά στατιστική συσχέτιση στο επίπεδο του 5%.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΙΙ

Σε μία τρίτη, διαφορετική θεώρηση, αναζητήθηκε πιθανή στατιστική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης χαμηλού αλληλομόρφου στο γονότυπο μιας ασθενούς και των υπολοίπων στοιχείων που συνθέτουν το αναπαραγωγικό της προφίλ. Η ανάλυση έγινε τόσο για το σύνολο των υπογόνιμων γυναικών όσο για κάθε ομάδα, πτωχές και καλές απαντήτριες, ξεχωριστά. Για τις στατιστικές αναλύσεις εφαρμόστηκε η *Univariate Analysis Of Variance* (GLI - *Generalised Linear Model*) και όλα τα στοιχεία προσαρμόστηκαν ως προς την ηλικία (*adjusted for age*). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται ακολούθως:

Low allele-All patients		vs all data		
Low allele	N	Χρόνια στειρότητας marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	6,144	0,805	0,970
No	36	6,104	0,683	
adjusted for age (GLM model)				
Low allele	N	Αριθμός προσπαθειών marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	1,962	0,197	0,478
No	36	1,777	0,167	
adjusted for age (GLM model)				
Low allele	N	BMI marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	24,043	0,582	0,318
No	36	23,270	0,493	
adjusted for age (GLM model)				
Low allele	N	FSH marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	6,707	0,438	0,131
No	36	7,592	0,372	
adjusted for age (GLM model)				
Low allele	N	LH marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	5,985	0,552	0,751
No	36	5,753	0,468	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	LH/FSH marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	0,924	0,088	0,390
No	36	0,824	0,074	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	PRL marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	25	13,222	1,279	0,960
No	34	13,308	1,092	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	TSH marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	11	1,583	0,320	0,103
No	23	2,235	0,221	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Ημέρες πρόκλησης marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	10,952	0,309	0,033
No	36	10,063	0,262	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Σύνολο μονάδων marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	3524,119	247,096	0,227
No	35	3124,226	212,645	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	5ης μέρας marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	372,741	126,941	0,179
No	33	606,325	112,350	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	E2 Ημ. hCG marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	25	2588,628	260,658	0,291

No	36	2225,731	216,765	
----	----	----------	---------	--

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Αριθμός ωοθηλακίων marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	8,758	0,551	0,791
No	36	8,564	0,468	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Αριθμός ωαρίων marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	7,811	0,558	0,859
No	36	7,942	0,473	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Αριθμός ώριμων ωαρίων marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	21	5,665	0,534	0,908
No	35	5,744	0,413	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Maturation Rate marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	21	0,736	0,037	0,823
No	35	0,747	0,028	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Γονιμοπ.Ωάρια marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	4,806	0,385	0,549
No	36	5,112	0,327	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Fertilization Rate marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	0,641	0,031	0,332
No	36	0,681	0,026	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	Αριθμός μεταφ.εμβρύων marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	26	3,080	0,164	0,254
No	36	2,831	0,139	

adjusted for age (GLM model)

Low allele	N	πάχος ενδομητρίου marginal Means	Std. Error	p-value
Yes	13	10,164	0,536	0,924
No	28	10,102	0,365	

adjusted for age (GLM model)

Από τις ελεγχόμενες κατηγορίες σημαντικά στατιστική συσχέτιση βρέθηκε στην περίπτωση της διάρκειας πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας καθώς προκύπτει ότι οι ημέρες πρόκλησης είναι λιγότερες σε γυναίκες που δεν φέρουν το χαμηλό αλληλόμορφο (p-value=0,033).

Με τη χρήση του Μοντέλου Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Model) έγινε αναζήτηση πιθανής στατιστικής συσχέτισης ανάμεσα στην εμφάνιση χαμηλού αλληλόμορφου στο γονότυπο και την επίτευξη εγκυμοσύνης, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Binary Logistic Model	B	S.E.	p-value	OR	95,0% C.I. for EXP(B)	
					Lower	Upper
age	-0,067	0,059	0,257	0,935	0,833	1,050
low_allele (Yes)	-0,868	0,674	0,198	0,420	0,112	1,572
Constant	1,357	2,052	0,508	3,885		

Binary Logistic Model

Dependent variable - Pregnancy

Independent variables - Low allele (No is reference) and Age

Η παρουσία του χαμηλού αλληλόμορφου δεν φαίνεται να επιδρά στην πιθανότητα κύησης συγκρινόμενη με την απουσία του (p-value=0,198).

Με τη χρήση του Fisher's exact test πραγματοποιήθηκε σύγκριση της κατανομής του χαμηλού αλληλόμορφου μεταξύ των ομάδων good responders και poor responders. Τα αποτελέσματα των ελέγχων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Low allele	Good respon n(%)	Poor respos n(%)
Yes	16 (61,5%)	20 (55,6%)
No	10 (38,5%)	16 (44,4%)
total	26 (100%)	36 (100%)
Fisher's exact test	P-value = 0,795	

Το χαμηλό αλληλόμορφο εμφανίζεται με υψηλή συχνότητα τόσο στις πτωχές όσο και στις καλές απαντήσεις.

Για τη στατιστική ανάλυση της επίδρασης της παρουσίας του χαμηλού αλληλομόρφου σε καλές και πτωχές απαντήσεις ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U test.

	Low Allele-Good responders		vs all data			
	low allele	N	Mean	SD	Std. Error	p-value
Ηλικία	Ναι	16	30,44	2,25	0,56	0,133
	Όχι	20	32,50	5,31	1,19	
	Total	36	31,58	4,31	0,72	
Χρόνια στειρότητας	Ναι	16	4,22	2,58	0,64	0,461
	Όχι	20	5,10	2,85	0,64	
	Total	36	4,71	2,73	0,45	
Αριθμός προσπαθειών	Ναι	16	1,50	0,82	0,20	0,367
	Όχι	20	1,25	0,55	0,12	
	Total	36	1,36	0,68	0,11	
BMI	Ναι	16	24,19	2,81	0,70	0,143
	Όχι	20	23,06	3,02	0,67	
	Total	36	23,57	2,94	0,49	
FSH	Ναι	16	6,37	1,17	0,29	0,316
	Όχι	20	6,81	1,74	0,39	
	Total	36	6,62	1,51	0,25	
LH	Ναι	16	5,99	3,03	0,76	0,975
	Όχι	20	6,22	3,24	0,72	
	Total	36	6,12	3,11	0,52	
LH/FSH	Ναι	16	0,97	0,50	0,12	0,836
	Όχι	20	0,95	0,53	0,12	
	Total	36	0,96	0,51	0,09	
PRL	Ναι	16	12,95	8,31	2,08	0,038
	Όχι	18	15,09	5,15	1,21	

	Total	34	14,08	6,80	1,17	
TSH	Ναι	6	1,70	0,84	0,34	0,174
	Όχι	12	2,49	1,33	0,38	
	Total	18	2,23	1,23	0,29	
Ημέρες πρόκλησης	Ναι	16	10,75	1,34	0,34	0,026
	Όχι	20	9,65	1,42	0,32	
	Total	36	10,14	1,48	0,25	
Σύνολο Μονάδων	Ναι	16	3334	1479	370	0,208
	Όχι	19	2689	985	226	
	Total	35	2984	1259	213	
5η μέρα	Ναι	16	332	290	73	0,293
	Όχι	18	790	1050	247	
	Total	34	574	812	139	
E2 Ημ. hCG	Ναι	15	2967	1471	380	0,777
	Όχι	20	2830	1310	293	
	Total	35	2889	1362	230	
αριθμός ωοθηλακίων	Ναι	16	10,25	1,61	0,40	0,935
	Όχι	20	10,65	2,91	0,65	
	Total	36	10,47	2,40	0,40	
αριθμός ωαρίων	Ναι	16	9,19	1,60	0,40	0,302
	Όχι	20	10,10	2,92	0,65	
	Total	36	9,69	2,44	0,41	
Ώριμα ωάρια	Ναι	14	7,14	1,66	0,44	0,735
	Όχι	20	7,45	2,24	0,50	
	Total	34	7,32	2,00	0,34	
Maturation Rate	Ναι	14	0,79	0,13	0,03	0,515
	Όχι	20	0,74	0,13	0,03	
	Total	34	0,76	0,13	0,02	
Γονιμοπ. ωάρια	Ναι	16	5,31	1,66	0,42	0,062
	Όχι	20	6,55	1,70	0,38	
	Total	36	6,00	1,77	0,30	
Fertilization Rate	Ναι	16	0,58	0,16	0,04	0,353
	Όχι	20	0,66	0,11	0,03	
	Total	36	0,62	0,14	0,02	
αριθμος μεταφ εμβρυων	Ναι	16	3,00	0,37	0,09	0,691
	Όχι	20	3,05	0,39	0,09	
	Total	36	3,03	0,38	0,06	
πάχος ενδομητρίου	Ναι	6	9,50	1,97	0,81	0,291
	Όχι	14	10,29	1,73	0,46	
	Total	20	10,05	1,79	0,40	

Και στις good responders, οι ημέρες πρόκλησης ήταν λιγότερες σε γυναίκες που δεν έφεραν το χαμηλό αλληλόμορφο (p-value=0,026)

Low Allele-Poor responders	vs all data					
	low allele	N	Mean	SD	Std. Error	p-value
Ηλικία	Ναι	10	37,90	4,86	1,54	0,979
	Όχι	16	38,06	4,37	1,09	
	Total	26	38,00	4,47	0,88	
Χρόνια στειρότητας	Ναι	10	8,40	5,93	1,87	0,916
	Όχι	16	7,88	5,30	1,33	
	Total	26	8,08	5,44	1,07	
Αριθμός προσπαθειών	Ναι	10	2,60	0,84	0,27	0,676
	Όχι	16	2,50	1,10	0,27	
	Total	26	2,54	0,99	0,19	
cBMI	Ναι	10	23,80	2,38	0,75	0,527
	Όχι	16	23,53	3,33	0,83	
	Total	26	23,63	2,95	0,58	
FSH	Ναι	10	7,05	1,60	0,51	0,139
	Όχι	16	8,68	3,32	0,83	
	Total	26	8,06	2,86	0,56	
LH	Ναι	10	6,33	3,53	1,11	0,414
	Όχι	16	4,95	1,41	0,35	
	Total	26	5,48	2,48	0,49	
LH/FSH	Ναι	10	0,90	0,45	0,14	0,097
	Όχι	16	0,62	0,21	0,05	
	Total	26	0,73	0,35	0,07	
PRL	Ναι	9	13,08	3,85	1,28	0,308
	Όχι	16	11,65	5,99	1,50	
	Total	25	12,17	5,28	1,06	
TSH	Ναι	5	1,45	0,71	0,32	0,257
	Όχι	11	1,96	0,92	0,28	
	Total	16	1,80	0,87	0,22	
Ημέρες πρόκλησης	Ναι	10	11,30	1,57	0,50	0,374
	Όχι	16	10,56	1,79	0,45	
	Total	26	10,85	1,71	0,34	
Σύνολο Μονάδων	Ναι	10	3700	1354	428	0,979
	Όχι	16	3720	1136	284	
	Total	26	3713	1198	235	
5η μέρα	Ναι	10	355	336	106	0,506
	Όχι	15	441	356	92	
	Total	25	407	344	69	
Ε2 Ημ. hCG	Ναι	10	2192	1178	373	0,045
	Όχι	16	1364	713	178	
	Total	26	1682	986	193	
αριθμός ωοθυλακίων	Ναι	10	7,30	3,02	0,96	0,079

Oχι	16	5,38	2,75	0,69
Total	26	6,12	2,96	0,58

αριθμός ωαρίων	Ναι	10	6,50	2,76	0,87	0,088
	Όχι	16	4,69	2,77	0,69	
	Total	26	5,38	2,86	0,56	
Ώριμα ωάρια	Ναι	7	3,43	1,51	0,57	0,468
	Όχι	15	3,13	2,03	0,52	
	Total	22	3,23	1,85	0,39	
Maturation Rate	Ναι	7	0,64	0,19	0,07	0,212
	Όχι	15	0,75	0,21	0,05	
	Total	22	0,72	0,21	0,04	
Γονιμοπ. ωάρια	Ναι	10	4,40	1,78	0,56	0,080
	Όχι	16	3,06	1,44	0,36	
	Total	26	3,58	1,68	0,33	
Fertilization Rate	Ναι	10	0,70	0,17	0,05	0,810
	Όχι	16	0,73	0,22	0,06	
	Total	26	0,72	0,20	0,04	
αριθμος μεταφ εμβρυων	Ναι	10	3,20	1,14	0,36	0,241
	Όχι	16	2,56	1,21	0,30	
	Total	26	2,81	1,20	0,24	
πάχος ενδομητρίου	Ναι	7	10,71	2,21	0,84	0,448
	Όχι	14	9,93	1,94	0,52	
	Total	21	10,19	2,02	0,44	

Οι poor responders που έφεραν στο γονότυπό τους το χαμηλό αλληλόμορφο είχαν υψηλότερη τιμή E_2 την ημέρα χορήγησης της hCG (p -value=0,045).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο των γυναικών αλλά και η αυξανόμενη συμμετοχή τους στο εργασιακό δυναμικό είναι δύο σημαντικές παράμετροι στη γυναικεία χειραφέτηση που πραγματοποιείται στις περισσότερες Δυτικές κοινωνίες. Αυτό το διαφορετικό κοινωνικό πρότυπο συνεπάγεται σημαντικές αλλαγές στην αναπαραγωγική συμπεριφορά, όπως συνειδητή επιλογή μη τεκνοποίησης, αναβολή τεκνοποίησης, ελάττωση του αριθμού των τέκνων ανά οικογένεια καθώς και τα επακόλουθα της αυξημένης επίπτωσης διαζυγίων και δεύτερων γάμων (4).

Τόσο η ευρεία χρήση αποτελεσματικής αντισύλληψης όσο και η αυξανόμενη δημοφιλία των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έδωσαν την εντύπωση πως η γυναικεία γονιμότητα μπορεί να διαχειρισθεί ανάλογα με την προσωπική επιθυμία και σε κάθε στάδιο της ζωής. Σχετικά με τη δυνατότητα της προσωρινής «διακοπής» της γονιμότητας η εντύπωση αυτή είναι δικαιολογημένη, ωστόσο σχετικά με την επαναφορά της ευγονίας σε μία βολικότερη περίοδο της ζωής αυτό πολύ συχνά είναι ψευδαίσθηση για την οποία τα ζευγάρια μπορεί να πληρώσουν με το τίμημα της υπογονιμότητας ή ακόμα και της στειρότητας. Όπως εκτενώς αναφέρθηκε, η εξελισσόμενη αναπαραγωγική γήρανση συμβάλλει σημαντικά στην αυξανόμενη επίπτωση της υπογονιμότητας σε συνδυασμό με το γεγονός πως κάποια ζευγάρια φέρουν αυξημένη γενετική προδιάθεση προς αυτή (4).

Η υπογονιμότητα είναι ένα εξαιρετικά συχνό πρόβλημα το οποίο αντιμετωπίζει ένα στα εφτά ζευγάρια και ως αποτέλεσμα, η εξωσωματική γονιμοποίηση έχει γίνει ολοένα και πιο δημοφιλής από το 1978 που πρωτοεφαρμόστηκε. Το 1992, στην Αγγλία, εξωσωματική γονιμοποίηση εφαρμόστηκε σε 14.057 γυναίκες ενώ το 2010 σε 45.264. Καθώς οι γνώσεις της επιστημονικής κοινότητας σε σχέση με την γονιμότητα και την εμβρυολογία αυξάνουν, τα πρωτόκολλα και οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής βελτιώνονται και σαν αποτέλεσμα, ο αριθμός των γεννήσεων από IVF και ICSI έχει αυξηθεί. Το 1991, στην Αγγλία, το ποσοστό γεννήσεων ανά κύκλο IVF ήταν 14,0% ενώ το 2009 έφτασε σε 24,1% (109).

Τα ποσοστά αυτά, αν και βελτιωμένα, παραμένουν χαμηλά. Η εφαρμογή της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης από τη δεκαετία του 1980 επέτρεψε την ωρίμανση περισσότερων του ενός ωαρίων και ως συνέπεια την εμβρυομεταφορά περισσότερων του ενός εμβρύων, βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τα ποσοστά επιτυχίας ανά κύκλο IVF. Σήμερα, η χρήση των γοναδοτροπινών είναι μία τυπική διαδικασία σε γυναίκες που

ακολουθούν πρωτόκολλο εξωσωματικής γονιμοποίησης σε μία προσπάθεια να βελτιωθούν οι πιθανότητες σύλληψης. Το μειονέκτημα της πολλαπλής εμβρυομεταφοράς, ωστόσο, είναι ότι η ασθενής έχει μεγαλύτερη πιθανότητα για πολύδυμη κύηση κάτι το οποίο οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα για μητρική ή εμβρυική νοσηρότητα(109).

Στην παρούσα κλινική πράξη, οι βασικές πηγές πληροφορίας που χρησιμοποιούνται για πρόγνωση και σχεδιασμό θεραπευτικής παρέμβασης είναι δημογραφικά και ανθρωπομετρικά στοιχεία. Σε συνδυασμό με βασικά κλινικά και διατροφικά στοιχεία λειτουργικοί, ορμονολογικοί και γενετικοί βιοδείκτες είναι εργαλεία τα οποία θα μπορούσαν να παρέχουν περισσότερο ακριβείς διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες. Παρά ταύτα, επί του παρόντος δεν υπάρχει επιστημονική συναίνεση στη βιβλιογραφία, σχετικά με το πώς αυτά τα καινούρια εργαλεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να αυξηθούν τα ποσοστά επιτυχίας των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στην παρούσα κλινική πράξη, η επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης γίνεται με βάση τα γενικά χαρακτηριστικά των ασθενών χωρίς να λαμβάνονται υπ'όψιν ιδιαιτερότητες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Οι ποσοτικοί βιοδείκτες χρησιμοποιούνται κυρίως για προγνωστικούς και συμβουλευτικούς λόγους αλλά η δυναμική αυτών των δεικτών για εξατομικευμένη θεραπευτική παρέμβαση συχνά υποεκτιμάται (110).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέγεται η μελέτη του γονιδίου *FMR1* ως πιθανού γενετικού βιοδείκτη.

Η κλασική κατηγοριοποίηση του *FMR1* γονιδίου με βάση τον αριθμό των CGG επαναλήψεων προέκυψε υπό το πρίσμα της μελέτης του Συνδρόμου Εύθραυστου Χ ή τον κίνδυνο επέκτασης, διαμέσου της μητρικής μετάδοσης. Αργότερα έγινε αποδεκτό ότι η προμετάλλαξη ενέχει ρίσκο για Π.Ω.Α και Σύνδρομο Τρόμου/Αταξίας. Μελέτες δεικτών ωοθηκικής λειτουργίας σε πληθυσμούς γυναικών, κυρίως επιλεγμένους με βάση οικογενειακό ιστορικό Συνδρόμου Εύθραυστου Χ, ανέδειξαν συσχέτιση μεταξύ της προμετάλλαξης και της FSH και της AMH. Παρόμοιες μελέτες που εξέτασαν ενδιάμεσα αλληλόμορφα κατέληξαν σε μη ομόφωνα συμπεράσματα· σε κάποιες βρέθηκαν ενδείξεις ωοθηκικής δυσλειτουργίας ενώ σε άλλες καμμία στατιστική συσχέτιση. Στο σύνολο αυτών των εργασιών χρησιμοποιήθηκε η κλασική κατηγοριοποίηση η σχετιζόμενη με το Σύνδρομο Εύθραυστου Χ (110).

Νεότερες και πιο πρόσφατες προσπάθειες κατηγοριοποίησης των CGG επαναλήψεων σε σχέση με την ωοθηκική λειτουργία πρότειναν μία νέα κλίμακα, θεωρώντας τις 26-34 επαναλήψεις ως φυσιολογικές, >34 επαναλήψεις ως υψηλές και <26 ως χαμηλές.

Γυναίκες που φέρουν ένα χαμηλό αλληλόμορφο φάνηκε ότι έχουν μικρότερη πιθανότητα εγκυμοσύνης με IVF, χειρότερη ποιότητα εμβρύων και επιταχυνόμενη ελάττωση της ωοθηκικής εφεδρείας. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών επεκτάθηκαν στην πιθανότητα χρησιμοποίησης του αριθμού των CGG επαναλήψεων για την πρόβλεψη της έκβασης της IVF αλλά και για τον εντοπισμό γυναικών που έχουν αυξημένο κίνδυνο για ελαττωμένη ωοθηκική εφεδρεία. Τα αποτελέσματα αυτά, εντούτοις, προέκυψαν από σχετικά μικρό αριθμό ασθενών και δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλες μελέτες (110).

Η παρούσα διπλωματική εργασία, επιλέγοντας τη μελέτη του FMR1 γονιδίου κινείται σε δύο άξονες: στην αναζήτηση πιθανών διαφορών στον αριθμό των επαναλήψεων CGG ή στους FMR1 γονοτύπους (όπως αυτοί προτάθηκαν από τους Gleicher και συν.) (89,90), μεταξύ γυναικών του γενικού πληθυσμού και υπογόνιμων γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF αλλά και στην αναζήτηση του κατά πόσο ο αριθμός των FMR1 CGG επαναλήψεων ή οι FMR1 γονοτύποι μπορεί να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για την απάντηση στην εξωγενή ωοθηκική διέγερση ή για την έκβαση της IVF.

Από τις στατιστικές αναλύσεις προέκυψε το συμπέρασμα πως τόσο στο σύνολο των υπογόνιμων γυναικών όσο και όταν αυτές αναλύθηκαν ως δύο ξεχωριστές ομάδες, πτωχές και καλές απαντήτριες, το πιο συχνά εμφανιζόμενο αλληλόμορφο ήταν αυτό των 28 επαναλήψεων, αριθμός που συμφωνεί με αυτόν για το γενικό πληθυσμό (31). Συνεπώς είτε σε τυχαία επιλεγμένες γυναίκες είτε σε υπογόνιμες γυναίκες του ελληνικού πληθυσμού, το πιο συχνά εμφανιζόμενο FMR1 αλληλόμορφο είναι αυτό με τις 28 CGG επαναλήψεις. Επιπλέον, η κατανομή του συνόλου των FMR1 αλληλομόρφων βρέθηκε σύμφωνη με το πρότυπο κατανομής του Fu και συν. (22) και σε αντίθεση με ότι έχει αναφερθεί σε άλλη εργασία (83) για τον υπογόνιμο πληθυσμό, δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση της κατανομής προς τα δεξιά δηλαδή προς μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί εντούτοις πως στην προαναφερθείσα εργασία συμπεριελήφθησαν ασθενείς με Πρόωρη Ωοθηκική Γήρανση ή Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια όπως αυτή μετρήθηκε με τη βοήθεια της AMH καθώς επίσης και το ότι βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CGG επαναλήψεων και της AMH. Στην παρούσα εργασία δεν ήταν διαθέσιμες τιμές AMH οπότε τέτοιες συγκρίσεις δεν μπορούν να γίνουν. Σε μία άλλη εργασία, αντίθετα, προκύπτει το συμπέρασμα πως καμμία από τις τρεις κατηγορίες FMR1 αλληλομόρφων (αλληλόμορφα προμετάλλαξης, ενδιάμεσα ή ανώτερα φυσιολογικά αλληλόμορφα) δεν φαίνεται να είναι πιο επικρατή σε υπογόνιμες γυναίκες σε σχέση με γόνιμες γυναίκες του γενικού πληθυσμού ενώ δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανέναν από

τους δείκτες ωοθηκικής εφεδρείας (AMH, FSH, Inhibin B) (81). Στην παρούσα εργασία καμμία ασθενής δεν έφερε ενδιάμεσο αλληλόμορφο ή αλληλόμορφο προμετάλλαξης.

Επιπλέον, η σύγκριση κατανομής των FMR1 γονοτύπων μεταξύ των καλών και πτωχών απαντητριών έδειξε ότι και στις δύο ομάδες επικρατής είναι ο φυσιολογικός γονότυπος ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις πως οι κατανομές των γονοτύπων διαφέρουν. Αξίζει να αναφερθεί ωστόσο ότι και στις δύο κατηγορίες υπογόνιμων ασθενών, οι ομόζυγοι γονότυποι εμφανίζονται με χαμηλό ποσοστό. Δεν υπάρχουν αντίστοιχα στοιχεία κατανομής γονοτύπων από το γενικό γυναικείο ελληνικό πληθυσμό οπότε συγκρίσεις σε αυτό το επίπεδο δεν μπορούν να γίνουν.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια αναζήτησης στατιστικών συσχετίσεων μεταξύ του αριθμού των CGG επαναλήψεων και των FMR1 γονοτύπων, με ανθρωπομετρικά, κλινικά, βιοχημικά και εμβρυολογικά στοιχεία όπως αυτά προέκυψαν από τον τηρούμενο για κάθε ασθενή ιατρικό φάκελο στα πλαίσια της γενικής παρακολούθησής του στο εξωτερικό ιατρείο υπογονιμότητας αλλά και της ένταξής του σε πρόγραμμα IVF. Πιο συγκεκριμένα, τα στοιχεία που εκτιμήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ηλικία, βάρος, δείκτης μάζας σώματος), διάρκεια υπογονιμότητας και αριθμός προηγούμενων προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης, ορμονολογικό προφίλ (FSH, LH, PRL, TSH), παράμετροι της εξωγενούς διέγερσης (ημέρες πρόκλησης, σύνολο χρησιμοποιούμενης δόσης FSH, μέγιστο E2), έκβαση της IVF (αριθμός ωοθυλακίων, αριθμός ωαρίων, δείκτης ωρίμανσης, δείκτης γονιμοποίησης, ποιότητα εμβρύων, εγκυμοσύνη). Η αναζήτηση στατιστικών συσχετίσεων έγινε σε τρία επίπεδα: α) στο σύνολο των υπογόνιμων γυναικών β) σε πτωχές και καλές απαντήτριες ξεχωριστά και γ) στην επίδραση της παρουσίας χαμηλού αλληλομόρφου (<26 CGG) στο σύνολο των υπογόνιμων γυναικών αλλά και στις πτωχές και καλές απαντήτριες ξεχωριστά.

Από τους παραπάνω ελέγχους, στο σύνολο των υπογόνιμων γυναικών, προέκυψε το συμπέρασμα πως οι γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο μέσο αριθμό ημερών πρόκλησης σε σχέση με τις υπογόνιμες γυναίκες. Επιπλέον, φάνηκε πως τόσο οι γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο όσο και οι ετερόζυγες, είχαν σημαντικά υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης ωαρίων σε σχέση με τις ομόζυγες γυναίκες. Με τη χρήση του μοντέλου παλινδρόμησης προέκυψε πως οι υπογόνιμες γυναίκες με ετερόζυγο γονότυπο είχαν 83% (1-0,70) μικρότερα odds κύησης σε σχέση με τις γυναίκες με το φυσιολογικό γονότυπο με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [32%-91%] και $p\text{-value}=0,038$. Οι γυναίκες με ομόζυγο γονότυπο δεν παρουσίασαν στατιστικά

σημαντικά διαφορετικά odds κύησης σε σχέση με τις γυναίκες με φυσιολογικό γονότυπο ($p\text{-value}=0,559$).

Όταν οι παραπάνω έλεγχοι έγιναν ξεχωριστά για την ομάδα των καλών απαντητριών φάνηκε πως από τα 103 έμβρυα που προήλθαν από γυναίκες με φυσιολογικούς γονότυπους τα 69,9% ήταν Grade A ενώ τα 30,1% Grade B. Στις ετερόζυγες γυναίκες τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 50% Grade A και 50% Grade B ενώ οι ομόζυγες είχαν 100% έμβρυα Grade A. Συμπερασματικά, φάνηκε πως το καλύτερο grading εμβρύων το είχαν οι ομόζυγες γυναίκες, ακολουθούμενες από τις φυσιολογικές ενώ οι ετερόζυγες είχαν το χειρότερο.

Κατά τον έλεγχο των πτωχών απαντητριών ξεχωριστά, σε καμμία από τις ελεγχόμενες παραμέτρους δεν βρέθηκε σημαντικά στατιστική συσχέτιση για το επίπεδο του 5%. Φαίνεται πως σε αυτή την ομάδα γυναικών υπάρχουν άλλοι πιο ισχυροί γενετικοί παράγοντες που οδηγούν σε πτωχή απάντηση στην εξωγενή διέγερση οπότε η πιθανή δράση-συνεισφορά του FMR1 γονιδίου, ακόμα και αν υπάρχει δεν μπορεί να αναδειχθεί.

Κατά την αναζήτηση πιθανής στατιστικής συσχέτισης μεταξύ της εμφάνισης χαμηλού αλληλομόρφου στο γονότυπο μιας ασθενούς και των παραμέτρων του αναπαραγωγικού της προφίλ καθώς επίσης και της έκβασης της IVF βρέθηκε πως το χαμηλό αλληλόμορφο απαντάται με υψηλή συχνότητα τόσο στις πτωχές όσο και στις καλές απαντήτριες με ποσοστό 61,5% και 55,6% αντίστοιχα. Στο σύνολο του υπογονίμου πληθυσμού, βρέθηκε πως ο μέσος όρος ημερών πρόκλησης είναι μικρότερος σε γυναίκες που δεν φέρουν το χαμηλό αλληλόμορφο. Επιπλέον, η παρουσία του χαμηλού αλληλομόρφου δεν φαίνεται να επιδρά στην πιθανότητα κύησης συγκρινόμενη με την απουσία του.

Όταν ο έλεγχος έγινε ξεχωριστά για τις καλές απαντήτριες βρέθηκε επίσης πως οι ημέρες πρόκλησης ήταν λιγότερες σε γυναίκες που δεν έφεραν στο γονότυπό τους το χαμηλό αλληλόμορφο ενώ αξίζει να αναφερθεί πως οι πτωχές απαντήτριες που έφεραν το χαμηλό αλληλόμορφο είχαν υψηλότερη τιμή E2 την ημέρα χορήγησης της hCG.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Από την παρούσα μελέτη φαίνεται πως οι γονότυποι του *FMR1* γονιδίου έχουν τόσο ποσοτική (ημέρες πρόκλησης) όσο και ποιοτική (βαθμός ωρίμανσης ωαρίων) επίδραση στα αποτελέσματα της IVF καθώς επίσης και στην πιθανότητα εγκυμοσύνης. Με κριτήριο το *FMR1* γενετικό τους προφίλ, υπογόνιμες γυναίκες με το φυσιολογικό γονότυπο είχαν λιγότερες ημέρες πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας, υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης ωαρίων και εμφάνισαν τα καλύτερα ποσοστά εγκυμοσύνης. Υπογόνιμες γυναίκες με τον ομόζυγο γονότυπο χρειάστηκαν τις περισσότερες μέρες πρόκλησης και παρουσίασαν το χαμηλότερο βαθμό ωρίμανσης ωαρίων. Τα συγκριτικά ποσοστά εγκυμοσύνης αυτής της ομάδας παραμένουν για εμάς χωρίς τελικό συμπέρασμα καθώς το δείγμα ήταν πολύ μικρό. Υπογόνιμες γυναίκες με τον ετερόζυγο γονότυπο παρουσίασαν 83% μικρότερο ποσοστό εγκυμοσύνης σε σχέση με αυτές με το φυσιολογικό γονότυπο. Επιπλέον, καλές απαντήτριες αυτής της κατηγορίας είχαν χαμηλότερο *grading* εμβρύων σε σχέση με γυναίκες που έφεραν τους άλλους γονότυπους.

Συμπερασματικά, θεωρούμε πως το *FMR1* γονίδιο θα μπορούσε να θεωρηθεί ως υποψήφιο γονίδιο του οποίου η δράση συμβάλλει στην επιτυχή έκβαση της IVF. Επιπλέον, η δημιουργία ενός ατομικού, πολυγονιδιακού προφίλ, με άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της IVF (*ESR1,FSHR*), είναι μία άλλη εναλλακτική, όπου πιστεύουμε πως το *FMR1* και οι γονότυποί του θα μπορούσαν να αποδειχθούν πληροφοριακά.

Εντούτοις, το σχετικά μικρό δείγμα που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία επιτρέπει την εξαγωγή μόνο προκαταρκτικών συμπερασμάτων τα οποία θα πρέπει να ελεγχθούν σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων. Παράλληλα, θα πρέπει να αναφερθεί πως η τυχαία αδρανοποίηση του *X* χρωμοσώματος (49) αλλά και οι αποκλίσεις από αυτή καθώς επίσης και η κλωνικότητα των κυττάρων της ωοθήκης (111) θα μπορούσαν να δράσουν ως πιθανοί τροποποιητές της επίδρασης των *FMR1* γονοτύπων στην ωοθήκη, κάτι το οποίο θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής μελέτης.

Στις εώς σήμερα βιβλιογραφικές αναφορές, η ομάδα των *Gleicher* και συνεργατών έχει καταλήξει στο συμπέρασμα πως η ανάλυση του *FMR1* γονιδίου μπορεί να αποβεί χρήσιμη για τον προσδιορισμό της πιθανότητας για Πρόωρη Ωοθηκική Γήρανση σε νεαρές γυναίκες, για την εκτίμηση της παρούσας ωοθηκικής λειτουργίας μιας γυναίκας αλλά και για τον εντοπισμό της αιτίας υπογονιμότητας και αυτό κυρίως λόγω της συσχέτισης που έχει παρατηρηθεί με την AMH. Καθώς τιμές AMH δεν ήταν διαθέσιμες

για τη δική μας ομάδα γυναικών πιστεύουμε ότι μελλοντικά θα είμαστε σε θέση να εξάγουμε και τα δικά μας συμπεράσματα. Επιπλέον η παραπάνω ερευνητική ομάδα πρότεινε τον έλεγχο του *FMR1* ως *screening test* για την επιλογή δοτριών ωαρίων αλλά και την πρόβλεψη της έκβασης της *IVF* μέσω πρόβλεψης της ποιότητας των εμβρύων αλλά και της πιθανότητας για κλινική εγκυμοσύνη (112,113).

Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη με μέγεθος δείγματος μεγαλύτερο από 4.600 κύκλους και με ανάλυση ξεχωριστά του χαμηλού και υψηλού αλληλομόρφου αλλά και του συνδυασμού αυτών στους πρόσφατα προταθείς γονότυπους δεν βρέθηκε καμμία κλινική ένδειξη υπέρ του ελέγχου του *FMR1* γονιδίου ως προγνωστικό παράγοντα της έκβασης μεθόδων υποβοηθούμενης παραγωγής(111). Σε μια άλλη εξίσου πρόσφατη μελέτη, όπου συμπεριελήφθησαν οι πρώτοι κύκλοι *IVF* 3006 ασθενών, εξάγεται το συμπέρασμα πως παρά την αυξανόμενη χρησιμοποίησή τους, οι *FMR1 CGG* επαναλήψεις, στο φυσιολογικό εύρος, δεν αποτελούν προγνωστικούς δείκτες της ωοθηκικής απόκρισης στην εξωγενή διέγερση με γοναδοτροπίνες(114).

Ο βιολογικός ρόλος του *FMR1* γονιδίου και της παραγόμενης *FMRP* πρωτεΐνης στην ωοθηκική φυσιολογία παραμένει αδιευκρίνιστος. Μελέτες στις συστοιχίες γονιδίων των μονοπατιών που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ωαρίων (*VEGF*, *MAPK*, *PI3K/AKT*) καθώς επίσης και μελέτες έκφρασης του *FMR1* στα κοκκώδη κύτταρα θα μπορούσαν να αποβούν πληροφοριακές και χρήσιμες. Εάν και κατά πόσο το *FMR1* θα βρεί τη θέση του ως προγνωστικός δείκτης της έκβασης των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής απομένει να αποδειχθεί στο μέλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Olooto , Wasiu Eniola, Amballi, Adebayo Adetola, Banjo, Taiwo Abayomi (2012). *A review of Female Infertility; important etiological factors and management*, *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2012, 2 (3):379-385.
2. Gianni Forti, and Csilla Krausz (1998). *Evaluation and Treatment of the Infertile Couple. The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism*, 1998, 83, 4177- 4188.
3. Tilly, J. L., Niikura, Y., Rueda, B. R. (2009). *The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism?* *Biol Reprod*, 80, 2-12.
4. Egbert R. te Velde, Peter L. Pearson (2002). *The variability in female reproductive ageing. Human Reproduction Update*, 8, 141-154.
5. Ursula Eichenlaub – Ritter (1998). *Genetics of oocyte ageing. Maturitas*, 30, 143-169.
6. Broekmans, F. J., Soules, M. R., Fauser, B. C. *Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences (2009). Endocrine reviews*, 30, 465-493.
7. David G. Gardner, Dolores Shoback (2007). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 8th edition (international edition)*.
8. Gleicher, N. , Weghofer, A. , Barad, D (2011). *Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. Reprod Biol Endocrinol*, 9, 23.
9. L.M Pastore, J. Johnson (2014). *The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. Front Genet.*, 5, 195.
10. Zec, I., Tislarić-Medenjak D, Megla Z. B., Kucak, I. (2011). *Anti-Mullerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. Biochem Med (Zagreb)*, 21, 219-230.
11. Bruno Ramalho de Carvalho, David Barreira Gomes Sobrihno, Andrea Duarte Damasceno Vieira et al (2012). *Ovarian reserve assessment for infertility investigation. ISRN Obstetrics and Gynecology*.
12. Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S., Themmen, A. P (2006). *Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction*, 131, 1-9.
13. Ευανθία Δ. Διαμάντη - Κανδαράκη (2008). *Εφαρμοσμένη Ενδοκρινολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδη*.
14. Eichler, E. E. Richards, S. Gibbs, R. A. Nelson, D. L. (1993). *Fine structure of the human FMR1 gene . Hum Mol Genet*, 2, 1147-53.

15. Verkerk, A. J. de Graaff, E. De Boule, K Eichler, E. E. Konecki, D. S. Reyniers, E. Manca, A. Poustka, A. Willems, P. J Nelson, D. L (1993) Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet*, 2, 399-404.
16. Ashley, C. T Sutcliffe, J. S Kunst, C. B. Leiner, H. A. Eichler, E. E Nelson, D. L. Warren, S. T. (1993) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*, 4, 244-51.
17. Sittler, A. Devys, D. Weber, C. Mandel, J. L (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet*, 5, 95-102.
18. Saul, R. A. Tarleton, J. C (2012) FMR1-Related Disorders. *Gene Reviews (Internet)* PMID 20301558
19. Hwu, W. L. Lee, Y. M. Lee, S. C. Wang, T. R. (1993) In vitro DNA methylation inhibits FMR-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 324-9.
20. Beilina, A. Tassone, F Schwartz, P. H. Sahota, P. Hagerman, P. J (2004) Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. *Hum Mol Genet*, 13, 543-9.
21. Chen, L. S., Tassone F., Sahota, P., Hagerman, P. J. (2003). The (CGG)*n* repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. *Hum Mol Genet*, 12, 3067-3074.
22. Fu, Y. H. Kuhl, D. P. Pizzuti, A. Pieretti, M. Sutcliffe, J. S Richards, S. Verkerk, A. J. Holden, J. J. Fenwick, R. G., Jr. Warren, S. T. et al., (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67, 1047-58.
23. Kumari, D., Usdin, K (2001) Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha -Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *J Biol Chem*, 276, 4357-64.
24. Kumari, D. Gabrielian, A. Wheeler, D. Usdin, K (2005). The roles of Sp1, Sp3, USF1/USF2 and NRF-1 in the regulation and three-dimensional structure of the Fragile X mental retardation gene promoter. *Biochem J*, 386, 297-303.
25. Garber, K. Smith, K. T. Reines, D. Warren, S. T (2006). Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 270-5.
26. Schwemmler, S. de Graaff, E. Deissler, H. Glaser, D. Wohrle, D. Just, W. Oostra, B. A. Kennerknecht, I Doerfler, W. Vogel, W. Steinbach, P. (1997). Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet*, 60, 1354-62.

27. Smith, K. T. Coffee, B. Reines, D.(2004) Occupancy and synergistic activation of the FMR1 promoter by Nrf-1 and Sp1 in vivo. *Hum Mol Genet*, 13, 1611-21
28. Smith, K. T. Nicholls, R. D. Reines, D.(2006) The gene encoding the fragile X RNA-binding protein is controlled by nuclear respiratory factor 2 and the CREB family of transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 34, 1205-15.
29. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR et al. editors. *GeneReviews (Internet)*.Seattle(WA):University of Washington, Seattle;1993.
30. Peprah, E. (2012). Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Genet*, 76, 178-91.
31. Sofocleous, C. Kitsiou, S,Fryssira, H,Kolialexi, A, Kalaitzidaki, M, Roma, E, Tsangaris, G. T., Chistofidou, C., Metaxotou, C., Kanavakis, E., Mavrou, A(2008). 10 years' experience in fragile X testing among mentally retarded individuals in Greece: a molecular and epidemiological approach. *In Vivo*, 22, 451-5.
32. Gleicher N.,Weghofer A.,Kim A.,Barad, D. H(2012). The impact in older women of ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes on ovarian reserve. *PLoS One*, 7, e33638.
33. Jin, P.,WarrenS. T.(2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, 9, 901-8.
34. Murray, A. Macpherson, J. N. Pound, M. C. Sharrock, A. Youngs, S. A. Dennis, N. R. McKechnie, N. Linehan, P. Morton, N. E. Jacobs, P. A.(1997). The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE
35. Crawford, D. C. Wilson, B. Sherman, S. L.(2000). Factors involved in the initial mutation of the fragile X CGG repeat as determined by sperm small pool PCR. *Hum Mol Genet*,9, 2909-18.
36. Nolin, S. L. Lewis, F. A., 3rd Ye, L. L. Houck, G. E., Jr. Glicksman, A. E. Limprasert, P. Li, S. Y. Zhong, N. Ashley, A. E. Feingold, E. Sherman, Brown, W. T (1996) Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet*, 59, 1252-61.
37. Nolin, S. L.,Brown, W. T.,Glicksman, A.,Houck, G. E., Jr.,Gargano, A. D.,Sullivan, A.,Biancalana, V.,Brondum-Nielsen, K.,Hjalgrim, H.,Holinski-Feder, E.et al.(2003). Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet*,72, 454-64.
38. Sherman, S. L.,Morton, N. E.,Jacobs, P. A.,Turner, G(1984). The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet*, 48, 21-37
39. Sherman, S. L.,Jacobs, P. A.,Morton, N. E,Froster-Iskenius, U,Howard-Peebles, P. N.,Nielsen, K. B.,Partington, M. W.,Sutherland, G. R.,Turner, G.,Watson, M.(1985)

Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. Hum Genet, 69, 289-99.

40. Reyniers E., Vits, L., De Boulle K., Van Roy B., Van Velzen D., de Graaff E., Verkerk A. J., Jorens H. Z., Darby J. K, Oostra, B. et al.(1993). *The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. Nat Genet, 4, 143-6.*

41. Malter, H. E.,Iber, J. C.,Willemsen, R.,de Graaff, E.,Tarleton, J. C.,Leisti, J.,Warren, S. T.,Oostra, B. A.(1997). *Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. Nat Genet, 15, 165-9.*

42. Sullivan A. K.,Crawford D. C.,Scott E. H.,Leslie M. L.,Sherman S. L(2002). *Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. Am J Hum Genet, 70, 1532-44.*

43. Yrigollen, C. M.,Tassone, F.,Durbin-Johnson, B.(2011) *The role of AGG interruptions in the transcription of FMR1 premutation alleles. PLoS One, 6, e21728.*

44. Σοφοκλέους Χρισταλένα (2000). *Μελέτη γονιδίου και πρωτεΐνης Συνδρόμου Εύθραυστου X, Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.*

45. Lenzmeier, B. A.,Freudenreich, C. H.(2003). *Trinucleotide repeat instability: a hairpin curve at the crossroads of replication, recombination, and repair. Cytogenet Genome Res, 100,7-24.*

46. Richards, R. I.(2001). *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. Hum Mol Genet, 10, 2187-94.*

47. Mirkin, S. M(2006). *DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. Curr Opin Struct Biol, 16, 351-8.*

48. S. M. Mirkin(2004). *Molecular models for repeat expansions.Chemtracts-Biochemistry and Molecular Biology, 17,639-662*

49. Elisabeth Xianshi Wu (2010). *X-chromosome Inactivation and FMR1 CGG repeat and AGG Interspersion number in female newborns conceived by Assisted Reproductive Technologies (ARTs). Thesis, Master Of Reproductive and Developmental Sciences, University Of British Columbia, Vancouver.*

50. Oostra, B. A.,Willemsen, R. (2009). *FMR1: a gene with three faces. Biochim Biophys Acta, 1790, 467-77.*

51. Schaeffer, C.,Beaulande, M.,Ehresmann, C.,Ehresmann, B,Moine, H.(2003). *The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. Biol Cell, 95, 221-8.*

52. Adinolfi, S.,Bagni, C.,Musco, G.,Gibson, T.,Mazzarella, L.,Pastore, A(1999). *Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. Rna, 5, 1248-58.*
53. F. Zalfa, C. Bagni (2004). *Molecular Insights into Mental Retardation: Multiple functions for the Fragile X Mental Retardation Protein?.Curr. Issues Mol. Biol. 6: 73-88.*
54. Epstein, A. M.,Bauer, C. R.,Bauer, C. R.,Ho, A.,Bosco, G.,Zarnescu, D. C.(2009) *Drosophila Fragile X protein controls cellular proliferation by regulating cbl levels in the ovary. Dev Biol, 330, 83-92.*
55. Garber, K.,Smith, K. T.,Reines, D.,Warren, S. T.(2006). *Transcription, translation and fragile X syndrome. Curr Opin Genet Dev,16,270-5.*
56. Willemsen, R.,Levenga, J.,Oostra, B. A.(2011). *CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. Clin Genet, 80, 214-25.*
57. Carletti, M. Z.,Christenson, L. K(2009). *MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. J Anim Sci ,87, E29-38*
58. Christenson, L. K.(2010). *MicroRNA control of ovarian function. Anim Reprod,7, 129-133*
59. Ferder, I.,Parborell, F.,Sundblad, V.,Chiauzzi, V.,Chiauzzi, V.,Gomez, K.,Charreau, E. H.,Tesone, M.,Dain, L(2013). *Expression of fragile X mental retardation protein and Fmr1 mRNA during folliculogenesis in the rat. Reproduction,145, 335-43.*
60. Wittenberger, M. D.,Hagerman, R. J.,Sherman, S. L.,McConkie-Rosell, A.,Welt, C. K.,Rebar, R. W.,Corrigan, E. C.,Simpson, J. L.Nelson, L. M.(2007) *The FMR1 premutation and reproduction. Fertil Steril,87,456-65.*
61. Loesch, D.,Hagerman, R. *Unstable mutations in the FMR1 gene and the phenotypes .Adv Exp Med Bio,769,78-114*
62. Murray, A.Ennis, S.MacSwiney, F.Webb, J.Morton, N. E.(2000). *Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions. Eur J Hum Genet,8, 247-52.*
63. Sullivan, A. K.,Marcus, M.,Epstein, M. P.,Allen, E. G.,Anido, A. E.,Paquin, J. J.,Yadav-Shah, M.,Sherman, S. L(2005). *Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. Hum Reprod,20,402-12.*
65. Welt C.K, Smith P.C, Taylor A.E.(2004). *Evidence of early ovarian aging in fragile X permutation carriers. The journal of clinical Endocrinology and metabolism,89, 4569-4574.*
66. Murray, A.,Schoemaker, M. J.,Bennett, C. E.,Ennis, S.,Macpherson, J. N.,Jones, M.,Morris, D. H.,Orr, N.,Ashworth, A.,Jacobs, P. A.,Swerdlow, A. J.(2013) *Population-*

based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet Med*,16,19-24.

67. Allen E, Sullivan A, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein M, Charen K, He W, Taylor K, Sherman S(2007). Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Human reproduction*,22, 2142-2152.

68. Hundscheid R, Braat D, Kiemeneij L, Smits A, Thomas C (2001). Increased serum FSH in female fragile X permutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives. *Human reproduction*, 16, 457-462.

69. Ennis S, Ward D, Murray A (2006). Nonlinear association between CGG number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet*,14,253-255.

70. Hoffman G, Le W, Entezam A, Otsuka N, Tong Z-B, Nelson L, Flaws J, McDonald J, Jafar S, Usdin K (2012). Ovarian abnormalities in a mouse model of Fragile X Primary Ovarian Insufficiency. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60, 439-456.

71. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman S, Gao F, Jin P, Chen D (2012). Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Human Molecular Genetics*, 21, 5039-5047.

72. Sherman S, Curnow E, Easley C, Jin P, Hukema R, Tejada M, Willemsen R, Usdin K.(2014). Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency(FXPOI). *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 6,26

73. Ascano M, Mukherjee N, Bandaru P, Mi J, Nusbaum J, Concoran D, Tusch T (2012). FMR1 targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*, 20, 382-386.

74. Pearson, C. E.(2011). Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet*, 7, e1002018

75. L.M Pastore, J. Johnson (2014).The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Front Genet.*, 5, 195.

76. Chen, L. S., Tassone F., Sahota, P., Hagerman, P. J. (2003). The (CGG)*n* repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. *Hum Mol Genet*, 12, 3067-3074.

77. Gleicher, N., Kushnir V., Weghofer, A., Barad, D (2014). How the FMR1 gene became relevant to female fertility and reproductive medicine. . *Front Genet.*,5, 284.

78. Welt C. K., Smith P. C., Taylor A. E. (2004). Evidence of early ovarian aging in Fragile X Premutation carriers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4569–4574
79. Sullivan A. K., Marcus M., Epstein M. P., Allen E. G., Anido A. E., Paquin J. J., et al. (2005). Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum. Reprod.* 20, 402–412.
80. Murray A., Webb J., MacSwiney F., Shipley E. L., Morton N. E., Conway G. S. (1999). Serum concentrations of follicle stimulating hormone may predict premature ovarian failure in FRAXA premutation women. *Hum. Reprod.* 14, 1217–1218.
81. De Geyter C., M'Rabet N., De Geyter J., Zurcher S., Moffat R., Bosch N., et al. (2013). Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation 1 gene among infertile women and among women with proven fertility: a prospective study. *Genet. Med.*
82. Kline J. K., Kinney A. M., Levin B., Brown S. A., Hadd A. G., Warburton D. (2014). Intermediate CGG repeat length at the FMR1 locus is not associated with hormonal indicators of ovarian age. *Menopause* 21, 740–748.
83. Gleicher N., Weghofer A., Oktay K., Barad D. H. (2009b). Correlation of triple repeats on the FMR1 (fragile X) gene to ovarian reserve: a new infertility test? *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 88, 1024–1030.
84. Gleicher N., Weghofer A., Barad D. H. (2009a). Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullerian hormone. *Fertility and Sterility*, 5, 1700-1706.
85. Rohr J., Allen E. G., Charen K., Giles J., He W., Dominguez C., et al. (2008). Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. *Hum. Reprod.* 23, 1220–1225.
86. Choe S. A., Kim K. C., Lee J. Y., Kim C. H., Hwang D., Jee B. C. (2013). The relationship between the number of CGG repeats and serum level of anti-Mullerian hormone in women without FMR1 premutation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 169, 275–278
87. Pastore L. M., McMurry T. L., Williams C. D., Baker V. B., Young S. L. (2014a). AMH in women with diminished ovarian reserve: potential differences by FMR1 CGG repeat level. *J. Assist. Repro. Genet.*
88. Gleicher, N., Weghofer, A., Oktay, K., and Barad, D. (2009e). Relevance of triple CGG repeats in the FMR1 gene to ovarian reserve. *Reprod. Biomed. Online* 19, 385–390

89. Gleicher, N., Weghofer, A., and Barad, D. H. (2010c). Ovarian reserve determinations suggest new function of FMR1 (fragile X gene) in regulating ovarian ageing. *Reprod. Biomed. Online* 20, 768–77
90. Gleicher, N., Weghofer, A., Lee, I. H., and Barad, D. H. (2010d). FMR1 genotype with autoimmunity-associated polycystic ovary-like phenotype and decreased pregnancy chance. *PLoS ONE*
91. Gleicher, N., and Barad, D. H. (2010). The FMR1 gene as regulator of ovarian recruitment and ovarian reserve *Obstet. Gynecol. Surv.* ,65, 523-530.
92. Gleicher, N., Weghofer, A., and Barad, D. H. (2010b). Effects of race/ethnicity on triple CGG counts in the FMR1 gene in infertile women and egg donors. *Reprod. Biomed. Online* 20, 485–491.
93. Gleicher, N., Kim, A., Weghofer, A., and Barad, D. H. (2012a). Differences in ovarian aging patterns between races are associated with ovarian genotypes and sub-genotypes of the FMR1 gene. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 77.
94. Gleicher, N., Kim, A., Barad, D. H., Shohat-Tal, A., Lazzaroni, E., Michaeli et al. (2013a) FMR1-dependent variability of ovarian aging patterns is already apparent in young oocyte donors. *Reprod. Biol. Endocrinol.*
95. Kushnir, V. A., Yu, Y., Barad, D. H., Weghofer, A., Himaya, E., Lee, H.-J., et al. (2014). Utilizing FMR1 mutations as predictors of treatment success in human in vitro fertilization. *PLoS ONE*
96. Weghofer, A., Kim, A., Barad, D. H., and Gleicher, N. (2012). The impact of androgen metabolism and FMR1 genotypes on pregnancy potential in women with dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation. *Hum. Reprod.* 27, 3287–3293.
97. Weghofer, A., Kim, A., Barad, D. H., and Gleicher, N. (2012). The impact of androgen metabolism and FMR1 genotypes on pregnancy potential in women with dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation. *Hum. Reprod.* 27, 3287–3293.
98. Gleicher, N., Kim, A., Weghofer, A., Shohat-Tal, A., Lazzaroni, E., Lee, H. J., et al. (2013c). Starting and resulting testosterone levels after androgen supplementation determine at all ages in vitro fertilization (IVF) pregnancy rates in women with diminished ovarian reserve (DOR). *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 49–62
99. Christian De Geyter, MD^{1,2}, Nadira M'Rabet, MS¹, Julie De Geyter¹, Stephan Zürcher, MD³, Rebecca Moffat, MD², Nemya Bösch, MS³, Hong Zhang, PhD¹ and Karl Heinemann, MD PhD³ (2013). Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation I gene among infertile women and among women with proven fertility: a prospective study. *Genetics in medicine*, 16, 374-378.

100. D.H. Barad, G.J. Latham, S. Filipovic-Sadic, V.A. Kushnir A., Shohat-Tal, N. Gleicher (2013). Following previously described ovarian phenotypes of the FMR1 gene, methylation fractions were significantly skewed between FMR1 genotypes and sub-genotypes, *Fertility and Sterility*, Volume 100, Issue 3, Supplement, Page S345 (P 681).

101. PureLink® Genomic DNA Kits, Invitrogen, Life Technologies.

102. Σκορίλας Ανδρέας (2006). Στοιχεία Κλινικής και Μοριακής Διαγνωστικής, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής, ΕΚΠΑ.

103. Λιανίδου Εύη, PCR - q PCR, ppt presentation, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.

104. Παπανικολάου Γ., Κατσιλά Θ., Παλαιολόγου Δ., Τζέτη Μ., Τσαρουχά Χ., Δουκίσσας Λ., Κατσαρέλη Ε. 2016. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/647>

105. AmplideX™ PCR Kit, Instructions For Use, Asuragen

106. Harry Whatley (2001), *Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis, Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis., Pathology and Laboratory Medicine*, Springer Science + Business Media LLC.

107. Λιανίδου Εύη, Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές, ppt presentation, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.

108. Zhao-Jia Ge, Heide Schatten, Cui-Lian Zhang, Yuan Sun (2015). Oocyte ageing and epigenetics, *Reproduction*, 149, R103-R114.

109. C. McRae, V. Sharma and J. Fisher (2013). Metabolite Profiling in the Pursuit of Biomarkers for IVF Outcome: The Case for Metabolomics Studies. *International Journal of Reproductive Medicine*, Vol 2013, Article ID 603167, 16 pages.

110. Carlo Alviggi, Peter Humaidan and Diego Ezcurra (2012). Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012, 10:9.

111. Nicole Banks, George Patounakis, Kate Devine, Alan H. DeCherney, Eric Widra, Eric D. Levens, Brian W. Whitcomb, and Micah J. Hill (2016). Is FMR1 CGG repeat length a predictor of in vitro fertilization stimulation response or outcome? *Fertility and Sterility*, 2016, Article in Press.

112. Gleicher et al. (2011). ANALYZING THE FMRI GENE. United States Patent Application Publication. Pub. No.: US 2011/0020795 A1, Pub. Date: Jan. 27, 2011

113. *Gleicher et al. (2014). SCREENING OF OOCYTE DONOR CANDIDATES BASED ON THE FMRI GENE. United States Patent Application Publication, Pub. No.: US 2014/0243585 A1, Pub. Date: Aug. 28, 2014.*

114. *Scott J Morin, Ashley W Tiegs, Jason M Franasiak, Caroline R Juneau, Kathleen H Hong , Marie D Werner, Yiping Zhan, Jessica Landis , Richard T Scott, Jr (2016). FMR1 gene CGG repeat variation within the normal range is not predictive of ovarian response in IVF cycles. Reproductive BioMedicine Online, 2016, Article in Press.*

115. *Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, Vogt PH (2011). Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)_n triplets in exon 1. Hum Reprod., 2011 , 26(5):1241-51.*

116. *Angus Macaulay (2015). Identification of large molecule transfer in cumulus cell - oocyte intercommunication (Thesis).*

117. *Alvarez-Mora MI, Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Garcia-Garcia F, Duran M, Dopazo J, Estivill X, Milà M (2015). Deregulation of key signaling pathways involved in oocyte maturation in FMR1 premutation carriers with Fragile X-associated primary ovarian insufficiency. Gene 571(1):52-7.*