

Primarna insuficijencija jajnika – genska podloga razvitka bolesti

U općoj populaciji žena fiziološka se menopauza događa oko 50. godine života. Izostanak mjesečnice (amenoreja) tijekom četiri ili više uzastopnih mjeseci uz istovremeni porast vrijednosti FSH-a (hormon koji stimulira folikule) u krvi na vrijednosti koje su karakteristične za fiziološku menopauzu (obično 40 IU L^{-1}) i smanjenje razine estradiola na manje od 50 pg mL^{-1} u žena mlađih od 40 godina je stanje koje se naziva primarna insuficijencija jajnika (engl. *primary ovarian insufficiency*, POI) ili prerano otkazivanje funkcije jajnika (engl. *premature ovarian failure*, POF ili *premature ovarian dysfunction*, POD) ili prerana menopauza. Javlja se u 1-2% žena mlađih od 40 godina i 0,1% žena mlađih od 30 godina. Stanje su prvi opisali Fuller Albright i suradnici 1942. godine. Zbog smanjenja razine estrogena i prestanka ovulacije razvijaju se simptomi jednaki onima u klasičnoj menopauzi – valovi vrućine, noćno znojenje, suhoća rodnice, dispareunija i neplodnost. Ipak, u čak oko 50% oboljelih žena zabilježena je izvjesna, različita, nepredvidljiva preostala aktivnost jajnika, pa ih čak 5-10% može zanijeti.

POI nije samo promijenjeno fizičko stanje organizma. Ono uzrokuje snažne psihosocijalne i probleme vezane uz gubitak fertiliteta. Osim toga oboljele žene sklonije su razvitku osteoporoze i kardiovaskularnih bolesti.

Etiologija POI-a

Čak 76% slučajeva POI-a javlja se nakon normalnog puberteta i uspostave normalnih mjesečnica. Neki od slučajeva POI-a razvijaju se nakon prestanka uzimanja hormonalnih kontraceptiva, a neki se javljaju nakon što se mjesečnice ne uspostave nakon trudnoće. Međutim, patofiziološki razvitak POI-a u većini je slučajeva nepoznat. Tada se govori o idiopatskom POI-u. Mogući uzroci

Primarna insuficijencija jajnika (POI) čest je uzrok steriliteta u žena. Karakteriziraju je: amenoreja, smanjene vrijednosti estradiola i povećane vrijednosti FSH-a prije 40. godine života. Zasad poznati uzroci razvitka POI-a su: aberacije kromosoma, autoimune i metaboličke bolesti, infekcije, jatrogei tretmani, ali i mutacije gena. Abnormalnosti kromosoma X, premutacije gena *FMR1* i mutacije gena *BMP-15* i *GDF-9* su najčešći intrinzički čimbenici nastanka POI-a. Zato se koriste kao dijagnostički biomarkeri bolesti. POI nije samo promijenjeno fizičko stanje organizma. Ono uzrokuje snažne psihosocijalne probleme i probleme vezane uz gubitak fertiliteta. Osim toga, oboljele žene sklonije su razvitku osteoporoze i kardiovaskularnih bolesti. Stoga rana detekcija POI-a, osobito otkrivanje genske podloge razvitka bolesti, osigurava bolje mogućnosti liječenja, i, u budućnosti, razvitak molekularno usmjerenog liječenja.

**Dr. sc. Kornelije Brkić, dr. med.¹,
prof. dr. sc. Jasminka Pavelić²**

¹Poliklinika Medikol, Zagreb

²Laboratorij za molekularnu onkologiju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb

razvitka POI-a su: aberacije kromosoma, autoimune bolesti, metaboličke bolesti, infekcije i jatrogei tretmani (kemoterapija, zračenje) koji mogu uzrokovati disfunkciju i/ili smanjenje broja folikula. Međutim, kao i u mnogih drugih bolesti i razvitak POI-a, odnosno predispozicija razvitku bolesti, može biti posljedica mutacija gena čemu u prilog govori i činjenica da se POI, osim sporadično, javlja učestalošću od 10 do 15% i unutar određenih obitelji. Stoga je razumijevanje genske podloge bolesti važno ne samo za rano dijagnosticiranje POI-a ili otkrivanje predispozicije razvitka bolesti već i za razvitak liječenja kojima bi se potaknuo razvitak folikula.

Folikulogeneza

Ovo je izuzetno organiziran i složen proces postupnog sazrijevanja malih primordijalnih u velike ovulacijske folikule. Ženska se djeca rađaju s velikim brojem primordijalnih folikula, ali ih se samo nekoliko stotina tijekom fertileg života žene razvije u ovulacijske folikule. Folikul se sastoji od oocyte (od koje će nastati

jajna stanica) i potpornih granulosa i teka (theka) stanica koje je okružuju. Ove su stanice izuzetno važne za rast i razvitak folikula. Sintetiziraju i otpuštaju različite hormone i čimbenike rasta, kao što su npr. inhibin, steroidni hormoni, čimbenici rasta i diferencijacije (npr. koštani morfogeni protein 15, BMP 15 i čimbenik diferencijacije 9, GDF9) čija je aktivnost, povratno, regulirana gonadotropnim hormonima, FSH i LH (hormon luteinizacije). Proces sazrijevanja folikula događa se postupno i može trajati i do jedne godine. Završava ovulacijom ili atrezijom (raspadanjem) folikula prije nego što dosegne punu zrelost.

Dijagnostički kriteriji

Ne postoje jasni dijagnostički kriteriji za POI. Diferencijalnom dijagnozom potrebno je isključiti trudnoću i druga stanja koja uzrokuju amenoreju, kao što su policistična bolest ovarija, bolesti hipotalamusa ili nekontrolirani dijabetes mellitus. Također, potrebno je odrediti starost jajnika (povezanog sa starošću žene) što se tradicionalno provodi odre-

divanjem razine hormona u krvi, određivanjem razine anti-Müllerian hormona (AMH) i broja antralnih folikula. Abnormalnosti kromosoma X, premutacije gena *FMR1* i mutacije gena *BMP-15* i *GDF-9* najčešći su intrinzički čimbenici nastanka POI-a. Zato se koriste kao dijagnostički biomarkeri POI-a.

Kromosomske abnormalnosti

Abnormalnosti kromosoma X odgovorne su za oko 5% sporadičnih i obiteljnih oblika POI-a. Uključuju delecije, translokacije, promjene broja kromosoma (monosomija – sindrom Turner, trisomija), mozaicizam te balansirane translokacije između kromosoma X i autosoma. Međutim, za samo je mali broj slučajeva POI-a pokazana povezanost s translokacijom između dva autosoma.

Delecije kromosoma X udružene s amenorejom i otkazivanjem funkcije jajnika zahvaćaju dvije regije: a) Xq21.3 – Xq27 – *premature ovarian failure 1 (POF-1)* regija, i b) Xq13.3 – 21.1 – *premature ovarian failure 2 (POF-2)* regija.

Interesantno je, međutim, da do danas u ovim regijama nije otkriven niti jedan pojedinačni gen uključen u razvitak POI-a. Izgleda, stoga, da strukturna promjena kromosoma mijenja njegovu dinamiku koja potom interferira s normalnim sparivanjem kromosoma tijekom mejoze, što pak dovodi do ubrzanje atrezije folikula.

Geni na kromosomu X

Dugi krak. Na kromosomu X, u regiji Xq27.3, nalazi se gen *FMR1* koji kodira stvaranje proteina FMR-1 važnog za razvoj središnjeg živčanog sustava. Dinamička mutacija ovog gena (produljenje polimorfne regije građene od CGG-tripleta u eksonu 1) uzrokom je nastanka bolesti fragilni-X sindrom čija je glavna osobitost mentalna retardacija. Normalni kromosomi X imaju stabilan broj tripleta CGG-a koji se kreće od 6-45. Produljenje broja tripleta, zbog pogrešaka DNK-polimeraze za vrijeme replikacije, na 50-200 naziva se premutacija. Daljnje povećanje broja tripleta na više od 200 naziva se puna mutacija. Puna mu-

tacija uzrokuje pojačanu metilaciju otoka CpG uzvodno od gena *FMR1*, što dovodi do sprječavanja prepisivanja gena i fenotipskog očitovanja bolesti. Žene s punom mutacijom imaju jednak rizik obolijevanja od POI-a kao i ostatak polucije. Međutim, žene s premutacijom imaju deset puta povećan rizik razvitka POI-a. Premutacija gena *FMR1*, osobito ona s 80-99 CGG-ponavljanja, najčešća je genska promjena u žena s normalnim kariotipom, a koje boluju od POI-a. Nastali POI naziva se fragilni-X vezan POI (FXPOI). Takav premutirani alel nalazi se u 7% sporadičnih slučajeva POI-a i u 21% obiteljnih oblika bolesti. U klinici se danas kao biomarker za dokazivanje POI-a ili otkrivanje žena koje bi mogle razviti POI koristi upravo dokazivanje premutacija gena *FMR1*.

Još su neki geni na dugom kraku kromosoma X vezani uz potencijalni razvitak POI-a: a) *Diaphanous homolog 2 (DIAPH2)*, uključen je u oogenezu; b) *Diachshund homolog 2 (DACH2)*; c) *POF1B* (mapiran distalno od *POF2*) na Xq21; d) *X-inactivation* gen (*XIST*) na Xq13; e) *X-propil aminopeptidaza 2 (XPNP2)* na Xq25; f) *FSH primary response homologue 1 (FSHPRH1)* na Xq22.

Kratki krak. U žena koje boluju od POI-a nađene su i brojne mutacije gena *BMP-15* (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 15*) (Xp11.2) koji kodira istoimeni protein, a koji je, zajedno s proteinom GDF 9, izuzetno važan za većinu stadija folikulogeneze. Mutacije gena *BMP-15* uglavnom rezultiraju ograničenim periodom olakšane ovulacije i fertiliteta u ranijoj fazi reproduktivne dobi (što povećava mogućnost začeća dvojajčanih blizanaca), ali stoga i preranim „iscrpljivanjem“ rezervi folikula u jajnicima i sterilitetom u kasnijoj reproduktivnoj dobi.

Pored toga, još se dva gena na kratkom kraku kromosoma X vezuju uz mogućnost razvitka POI-a i sterilitet: *Ubikvitin-specifična proteaza 9* (eng. *Ubiquitin-Specific Protease 9*, *USP9X*, Xp11) i *Zink Finger X (Zfx)*

Geni na autosomima

Za očekivati je da geni čije bi mutacije mogle biti povezane s razvit-

kom POI-a imaju različite biološke funkcije, kao što su npr. koordinirani razvitak zametnih stanica u primordijalne folikule, regulacija razvitka daljnjih stadija folikula i regulacija oogeneze. U tom je smislu realno za očekivati da bi glavni geni „kandidati“ bili oni čiji su proteinski produkti vezani uz ispravno djelovanje osi hipotalamu-hipofiza-gonade, odnosno atreziju. Međutim, suprotno očekivanju, geni za glavne regulatorne reproduktivne hormone, kao npr. FSH i LH, i njihove receptore nisu dosada dokazani kao uzročnici razvitka POI-a. Mutacije gena za ove proteine i njihove receptore nađene su samo sporadično u žena koje boluju od POI-a. Npr. mutacije gena *FSH-β* (11p13) opisane su u samo dvije žene s primarnom amenorejom. Ili, *missense* mutacija C566T (Ala566Val) gena za receptor za FSH (*FSHR*, 2p21-p16) koja uzrokuje nefunkcionalnost jajnika i amenoreju nađena je u brojnim obiteljima žena s normalnim kariotipom i primarnom i/ili sekundarnom amenorejom u Finskoj, ali ne u drugim dijelovima svijeta. Nadalje, homozigotne mutacije gena *LH-β* i gena *LHR* (receptor za LH, 2p21) nađene su po jednoj ženi koje boluju od POI-a. Za polimorfizme zasada nije pokazano da imaju utjecaj na funkciju jajnika.

Protein GDF-9 (od engl. *Growth Differentiation Factor 9*), kodiran istoimenim genom smještenim na autosomu (5q31.1), nalazi se u folikulima za vrijeme većine faza folikulogeneze. Regulira diferencijaciju oocita, granuloza i teka-stanica. U animalnim je modelima pokazano da gubitak aktivnosti oba alela ovog gena uzrokuje sterilnost ženki zbog smanjenja jajnika i to vjerojatno zbog toga što granuloza stanice izgube svoju mitotičku aktivnost pa je i rast folikula blokiran. U genu je nađeno i nekoliko polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP), od koji su dva, *GDF-9*^{S77F} i *GDF-9*^{S109R}, izravno povezana sa sterilnošću u ovaca. Mutacija *GDF-9*^{P103S} opažena je u žena oboljelih od POI-a, ali i u majki dvojajčanih blizanaca, što upućuje na mogućnost da ova mutacija (kao i mutacije unutar gena *BMF-15*) rezultira ograničenim periodom

olakšane ovulacije i fertilnosti u ranoj fazi reproduktivne dobi, ali stoga i preranim „iscrpljivanjem“ rezervi folikula u jajnicima i sterilitetom u kasnijoj reproduktivnoj dobi.

Inhibin ima dvostruko djelovanje – regulira gametogenezu i sekreciju FSH-a za vrijeme menstrualnog ciklusa. Sinteza inhibina kodirana je genom *INHNA* (inhibin- α -subunit gen) unutar granulosa stanica folikula jajnika. Mutacija gena, G769A, rezultira smanjenom razinom i bioaktivnošću inhibina u serumu što je pak povezano s pojačanim propadanjem folikula i reproduktivnim starenjem. Prevalencija ove mutacije u različitim populacijama iznosi 0-11%. Ipak, ova se mutacija

ne smatra uzročnim čimbenikom POI-a, već čimbenikom koji ukazuje na povećani rizik razvitka bolesti.

Iako su u znanstvenoj literaturi opisane još neke varijante gena na autosomima koje bi se mogle povezati s razvitkom POI-a, ti su nalazi sporadični, često kontradiktorni i ispitani na malom broju oboljelih, pa se generalno, barem zasada, smatra da mutacije gena na autosomima nisu povezane s razvitkom POI-a.

U zaključku, za puno razumijevanje genske osnove razvitka POI-a potrebne su dodatne studije na velikom broju oboljelih. Međutim, kako se, izgleda, radi o heterogenoj, multifaktorijskoj, poligenijskoj bolesti, a traženje mutacija i polimorfizama

koji bi mogli činiti gensku podlogu neke bolesti je mukotrpan posao, očito je da će u tom istraživanju presudnu ulogu imati metode *next-generation* DNK-sekvencioniranja i komparativna genomska hibridizacija, upotreba SNP-čipova kao i *genome-wide* asocijacijske studije.

Za žene je postavljanje dijagnoze POI-a stresan događaj koji se manifestira ljutnjom, depresijom, strahom, jadom, tj. stanjima koja su često podcijenjena. Osobito je to stresno za parove koji još nemaju djece. Stoga bi rano otkrivanje specifičnih genskih defekata moglo pružiti bolje mogućnosti za ranije liječenje i, eventualno, razvitak molekularno ciljanog liječenja.