

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



**«Μελέτη της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης στην εξωσωματική παραγωγή
εμβρύων και στο περιβάλλον του ωαγωγού των αγελάδων»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΣΤΑΜΠΕΡΝΑ
Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Καρδίτσα 2022

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
VETERINARY FACULTY
DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND REPRODUCTION



«Study on the effects of heat stress on *in vitro* embryo production and the oviductal environment in cattle»

Konstantina Stamperna
DVM

Karditsa 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης, Επιβλέπων

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Ζήσης Μαμούρης, Μέλος

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αν. Καθηγήτρια Ειρήνη Βαλάση, Μέλος

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα
Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΠΘ

Αν. Καθηγήτρια Ειρήνη Βαλάση

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, ΠΘ

**Επ. Καθηγητής Θεμιστοκλής
Γιαννούλης**

Εργαστήριο Βιολογίας, Γενετικής και
Βιοπληροφορικής, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής
Παραγωγής, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, ΠΘ

Καθηγητής Ζήσης Μαμούρης

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και
Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΠΘ

**Αν. Καθηγήτρια Βασιλική
Μαυρογιάννη**

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα
Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΠΘ

**Καθηγητής Κωνσταντίνος
Νταφόπουλος**

Κλινική Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΠΘ

Αν. Καθηγήτρια Ελένη Ντόβολου

Εργαστήριο Αναπαραγωγής των ζώων, Τμήμα
Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Σχολή
Γεωπονικών Επιστημών, ΠΘ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2018-2022 στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ, στα πλαίσια του έργου «Βελτίωση της γονιμότητας των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής μέσω εντοπισμού και αξιοποίησης ατόμων με γενετικά καθοριζόμενη θερμοαντοχή-The summer cow» που χρηματοδοτήθηκε από τη δράση ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ. Με την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτήν την προσπάθεια και με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Καθηγητή κ. Γεώργιο Σ. Αμοιρίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προσφέροντας μου τη δυνατότητα να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα και για την παραχώρηση του Εργαστηρίου για την πραγματοποίηση των πειραμάτων την εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανεξάντλητη υπομονή και κατανόηση του, τη συνεχή παρακολούθηση και καθοδήγηση του, την παροχή κάθε δυνατής βοήθειας, συμβάλλοντας καθοριστικά στην εκπόνηση της παρούσας Διατριβής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής, και Διευθυντή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής κ. Γεώργιο Χ. Φθενάκη που ενέκρινε τη διεξαγωγή των πειραματισμών της Διατριβής στην Κλινική του.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα ακόμα να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής κ. Ειρήνη Βαλάση, για τη διαρκή και ουσιαστική καθοδήγηση τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας Διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω:

Στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ελένη Ντόβολου για την πρόθυμη και ουσιαστική καθοδήγηση της, την ενθάρρυνση και την υποστήριξη -συναισθηματική και επιστημονική- κατά τη διεξαγωγή των απαιτητικών πειραματισμών της εξωσωματικής.

Στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη που αποτέλεσε σημαντικό συνεργάτη στη διενέργεια των γονιδιακών μελετών.

Στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Ρίζο και την ερευνητική του ομάδα του Ινστιτούτου INIA στη Μαδρίτη για τη συνεργασία και την πραγματοποίηση μέρους των πειραματισμών που αφορούσαν τη μελέτη του περιβάλλοντος του ωαγωγού.

Στη διδάκτορα και φίλη Κατερίνα Δαδούλη για την πολύτιμη βοήθεια της στην πραγματοποίηση των στατιστικών αναλύσεων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Στους διδάκτορες και φίλους, Ιωάννη Νανά και Θωμά Χουζούρη, για την ουσιαστική βοήθεια καθώς και για την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών.

Στην Μαρία Καλεμεκρίδου, για την πραγματοποίηση των μοριακών τεχνικών που απαιτούνταν στη Διατριβή και την εκπαίδευση μου στον τομέα αυτό.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, Στέφανο και Ευθυμία, για την αγάπη, την κατανόηση και την αμέριστη υποστήριξη τους στην προσπάθεια μου αυτή. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, που στάθηκαν στο πλευρό μου, στηρίζοντας την προσπάθεια μου.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT.....	15
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι.....	22
Εισαγωγή.....	22
Επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας στην ωοθήκη	24
Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο ωάριο	25
Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο έμβρυο	27
Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στον ωαγωγό	27
Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, Hsps).....	29
Hsp70	30
Σκοπός της διατριβής	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ.....	33
Επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής ωρίμανσης, στην παραγωγή και στην ποιότητα εμβρύων βοοειδών.....	33
Εισαγωγή.....	33
Υλικά και Μέθοδοι	35
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	35
Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	37
Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης	37
Στατιστική ανάλυση.....	40
Αποτελέσματα.....	40
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	40
Εκφράσεις γονιδίων	41
Ανάλυση συσχέτισης.....	46
Συζήτηση.....	46
Κεφάλαιο ΙΙΙ.....	52
Η επίδραση της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 70 (heat shock protein 70 – Hsp70) σε ωάρια βοοειδών μετά από έκθεση τους σε θερμική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ωρίμανσης	52
Εισαγωγή.....	52
Υλικά και Μέθοδοι	53
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	53
Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	53
Ανάλυση έκφρασης γονιδίων	54
Στατιστική ανάλυση	56
Αποτελέσματα.....	56

<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	56
Εκφράσεις γονιδίων	57
Συζήτηση.....	62
Κεφάλαιο IV	67
Συγκριτική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης/εξέλιξης ωαρίων αγελάδων των φυλών Holstein και Limousine, μετά από έκθεση σε θερμική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ωρίμανσης.....	67
Εισαγωγή.....	67
Υλικά και Μέθοδοι	69
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	69
Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	70
Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.....	70
Στατιστική ανάλυση	70
Αποτελέσματα.....	71
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	71
Εκφράσεις γονιδίων	72
Ανάλυση συσχέτισης.....	76
Συζήτηση.....	78
Κεφάλαιο V.....	83
Η επίδραση της προσθήκης της Hsp70 στο υπόστρωμα της <i>in vitro</i> καλλιέργειας, στην ανάπτυξη και την ποιότητα εμβρύων βοοειδών που εκτέθηκαν σε θερμική καταπόνηση.....	83
Εισαγωγή.....	83
Υλικά και Μέθοδοι	84
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	84
Εκφράσεις γονιδίων	85
Στατιστική ανάλυση	87
Αποτελέσματα.....	88
<i>In vitro</i> παραγωγή εμβρύων	88
Εκφράσεις γονιδίων	89
Συζήτηση.....	91
Κεφάλαιο VI.....	97
Μελέτη του μεταγραφώματος των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και των εξωκυτταρικών κυστιδίων σε θερμοουδέτερες συνθήκες και σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.....	97
Εισαγωγή.....	97
Υλικά και Μέθοδοι	100
Ανάλυση προγεστερόνης	101
Απομόνωση RNA και αλληλούχηση μεταγραφώματος.....	101

Ανάλυση δεδομένων.....	102
Απομόνωση και χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs).....	104
Απομόνωση των EVs του ωαγωγού με Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους.....	105
Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός των EVs του υγρού του ωαγωγού	105
Στατιστική ανάλυση	107
Αποτελέσματα.....	107
Προγεστερόνη.....	107
Χαρακτηρισμός του γονιδιώματος των ομόπλευρων και των ετερόπλευρων τμημάτων του ωαγωγού	107
Έλεγχος της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης.....	111
Κατανομή μεγέθους και συγκέντρωση των EVs στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων τμημάτων του ωαγωγού την άνοιξη και το καλοκαίρι.....	113
Συζήτηση.....	115
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	122
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	123
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	129

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής διενεργήθηκαν πέντε διακριτοί πειραματισμοί που είχαν ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης (ΘΚ) στο περιβάλλον του ωοθυλακίου και στον ωαγωγό των αγελάδων. Ειδικότερα, σε *in vitro* συνθήκες, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της ΘΚ στην ωρίμανση του συμπλέγματος ωαρίου – κυττάρων ωοφόρου δίσκου, στη γονιμοποιητική ικανότητα του ωαρίου, στην ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων, ενώ σε *in vivo* συνθήκες μελετήθηκαν οι επαγόμενες από τη ΘΚ αλλαγές στο περιβάλλον του ωαγωγού. Οι πειραματισμοί εστίασαν: α) στην επίδραση της ΘΚ κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών στα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων και στην ποιότητα τους, β) στη διερεύνηση της επίδρασης της εξωγενούς προσθήκης heat shock protein 70 (Hsp70) στο υπόστρωμα ωρίμανσης ωαρίων που εκτέθηκαν σε ΘΚ, γ) στη συγκριτική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης ωαρίων αγελάδων των φυλών Holstein και Limousine, μετά από έκθεση σε ΘΚ κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης, δ) στη μελέτη της επίδρασης της προσθήκης Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας στην ανάπτυξη και την ποιότητα εμβρύων βοοειδών που εκτέθηκαν σε ΘΚ, ε) στη συγκριτική μελέτη του μεταγραφώματος των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και των εξωκυτταρικών κυστιδίων σε θερμοουδέτερες συνθήκες και σε συνθήκες ΘΚ σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

Η Διατριβή χωρίζεται σε έξι κεφάλαια.

Το Κεφάλαιο I αποτελεί ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας των επιστημονικών πεδίων στα οποία εκτείνονται οι πειραματισμοί της Διατριβής.

Στο Κεφάλαιο II, αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις της μικρής διάρκειας, ήπιας αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της IVM, στην παραγωγή εμβρύων και στην έκφραση διαφόρων γονιδίων. Σε 8 επαναλήψεις, τα συμπλέγματα ωαρίων-κυττάρων ωοφόρου δίσκου (COCs) ωρίμασαν για 24 ώρες στους 39°C (μάρτυρες, C, n=520) ή στους 41°C από την ώρα 2 έως την ώρα 8 της IVM (ομάδα έκθεσης σε αυξημένη θερμοκρασία, T, n=802), γονιμοποιήθηκαν, και τα πιθανά ζυγωτά καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες στους 39°C. Η εκτίμηση του ποσοστού αυλάκωσης στα πρώιμα έμβρυα και του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων πραγματοποιούνταν 48 ώρες και 7, 8, και 9 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (post insemination, pi), αντίστοιχα. Κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, απογυμνωμένα ωάρια και βλαστοκύστες από 5 επαναλήψεις καταψύχθηκαν για την ανάλυση της σχετικής έκφρασης γονιδίων, που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την απόκριση στο θερμικό και οξειδωτικό στρες, την απόπτωση και τη δυνατότητα ανάπτυξης πλακούντα. Στην ομάδα T, τα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων ήταν σημαντικά ($p<0.05$) χαμηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα C (αυλάκωση 86.7% έναντι 74.2%, βλαστοκύστες: ημέρα 7, 29.9% έναντι 19.7%, ημέρα 8, 34.2% έναντι 22.9% και ημέρα 9, 35.9% έναντι 24.5%). Η έκφραση τριών γονιδίων στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (HSP90AA1, CPT1B, G6PD) και τριών γονιδίων στις βλαστοκύστες (DNMT3A, PLAC8, GPX1) εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p<0.05$). Η έκφραση των G6PD, SOD2, GXP1 στα ωάρια και του PTGS2 στις βλαστοκύστες έτεινε να διαφέρει μεταξύ των ομάδων ($0.05< p<0.08$). Η ΘΚ μετέβαλε ($p<0.05$) τη συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ των HSPs και άλλων γονιδίων στα ωάρια (G6PD, GPX1, CCNB1), στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (LDH, CCNB1) και στις βλαστοκύστες (AKR1B1, PLAC8).

Στο Κεφάλαιο III, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών που εκτέθηκαν σε συνθήκες ΘΚ και αξιολογήθηκε η ικανότητα της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, καθώς και η ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων, με βάση την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Ωάρια βοοειδών ωρίμασαν για 24 ώρες στους 39°C χωρίς (ομάδα C39, n=471) ή με Hsp70 (ομάδα H39, n=353) και στους 41°C για τις πρώτες 6 ώρες, και στη συνέχεια για 16 ώρες στους 39°C με (ομάδα H41, n=704) ή χωρίς Hsp70 (ομάδα C41, n=405). Μετά τη γονιμοποίηση, τα ζυγωτά καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες στους 39°C. Τα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής εμβρύων εκτιμήθηκαν 48 ώρες *pi* και τις ημέρες 7, 8, 9, αντίστοιχα. Η γονιδιακή έκφραση εκτιμήθηκε με RT-PCR σε ωάρια, κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και βλαστοκύστες. Στην ομάδα C41, ο ρυθμός σχηματισμού βλαστοκύστεων ήταν χαμηλότερος σε σχέση με την C39 και την ημέρα 9 ήταν χαμηλότερος από την H41. Στα ωάρια, η Hsp70 ενίσχυσε την έκφραση τριών γονιδίων *HSP* ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία ωρίμανσης. Η Hsp70 στους 39°C οδήγησε σε ισχυρό συντονισμό της γονιδιακής έκφρασης στα ωάρια και στις βλαστοκύστες, αλλά όχι στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Στο Κεφάλαιο IV, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της ΘΚ κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης στην ικανότητα ανάπτυξης ωαρίων που προήλθαν από αγελάδες Limousine και Holstein και η επίδραση στη διαφορική γονιδιακή έκφραση σημαντικών γονιδίων σε ωάρια, κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και βλαστοκύστες, μεταξύ των φυλών. Σε επτά επαναλήψεις, COCs από αγελάδες Holstein (H) και Limousine (L) ωρίμασαν για 24 ώρες στους 39°C (μάρτυρες C, HC, n= 405, LC, n=370) ή στους 41°C από την ώρα 2 έως την ώρα 8 της IVM (ομάδες που υποβλήθηκαν σε αύξηση της θερμοκρασίας T, HT, n=652, LT, n=488), γονιμοποιήθηκαν και τα πιθανά ζυγωτά καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες στους 39°C. Οι ρυθμοί αυλάκωσης και σχηματισμού εμβρύων αξιολογήθηκαν 48h *pi* και τις ημέρες 7, 8 και 9, αντίστοιχα. Σε υποομάδες κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, ωαρίων και βλαστοκύστεων από όλες τις ομάδες αναλύθηκε η σχετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, το στρες, την απόπτωση και την ικανότητα ανάπτυξης πλακούντα. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές στο ρυθμό αυλάκωσης ή στο ρυθμό σχηματισμού βλαστοκύστεων μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων. Και στις δύο φυλές, η ΘΚ μείωσε την παραγωγή βλαστοκύστεων, αλλά όλες τις ημέρες η καταστολή ήταν μεγαλύτερη στα Limousine. Στα Holstein, μεταβλήθηκε η γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (*G6PD*, *GLUT1*) και στις βλαστοκύστες (*PLAC8*), ενώ στα Limousine, διαφορές εντοπίστηκαν στα ωάρια (*G6PD*, *HSP90AA1*), στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (*CPT1B*, *HSP90AA1*, *SOD2*) και στις βλαστοκύστες (*DNMT*, *HSP90AA1*, *SOD2*).

Ο σκοπός του Κεφαλαίου V ήταν να εξεταστεί η επίδραση της προσθήκης Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας στην ικανότητα ανάπτυξης και την ποιότητα εμβρύων ημέρας 3. Ωάρια βοοειδών (n=1442) ωρίμασαν *in vitro*, γονιμοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν για τις δύο πρώτες ημέρες σύμφωνα με τις καθιερωμένες μεθόδους. Τα πιθανά ζυγωτά κατανεμήθηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες: μάρτυρες, C (έμβρυα που καλλιεργήθηκαν στους 39°C καθ' όλη την περίοδο καλλιέργειας, n=396), ομάδα C41 (η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 41°C από την 48^η έως την 72^η ώρα *pi* και στη συνέχεια επανήλθε στους 39°C για την υπόλοιπη περίοδο καλλιέργειας, n=514) και την ομάδα H41 (η τροποποίηση της θερμοκρασίας ήταν η

ίδια όπως στην C41 και κατά τη διάρκεια της έκθεσης στη ΘΚ, προστέθηκε Hsp70 στο υπόστρωμα καλλιέργειας, $n=532$). Η αυλάκωση και η παραγωγή εμβρύων αξιολογήθηκαν 48 ώρες *pi* και τις ημέρες 7, 8, 9, αντίστοιχα. Η γονιδιακή έκφραση στις βλαστοκύστες ημέρας 7 αξιολογήθηκε με RT-PCR. Η απόδοση σε βλαστοκύστες ήταν υψηλότερη στην ομάδα C39 και υψηλότερη στην ομάδα H41 σε σύγκριση με την ομάδα C41. Από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, εντοπίστηκε τροποποίηση της έκφρασης 11 γονιδίων μεταξύ των ομάδων. Η ανάλυση των ενορχηστρωμένων προτύπων γονιδιακής έκφρασης διέφερε μεταξύ των ομάδων. Στο Κεφάλαιο VI, περιγράφονται το μεταγράφομα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των εξωκυτταρικών κυστιδίων (Extracellular Vesicles, EVs) γαλακτοπαραγωγών αγελάδων σε θερμοουδέτερη περίοδο και περίοδο ΘΚ. Ωαγωγοί από είκοσι αγελάδες συγκρίθηκαν την άνοιξη με $THI=65,6\pm0,90$ και το καλοκαίρι με $THI=78,36\pm2,73$. Κατά τη διάρκεια κάθε εποχής, οι οιστρικοί κύκλοι των αγελάδων συγχρονίστηκαν και την 3^η ημέρα του επακόλουθου κύκλου, συλλέχθηκε ένα δείγμα αίματος για προσδιορισμό της προγεστερόνης, ενώ οι ωαγωγοί τους συλλέχθηκαν μετά τη σφαγή. Τα επιθηλιακά κύτταρα και το υγρό του ωαγωγού συλλέχθηκαν από τους ομόπλευρους και ετερόπλευρους ως προς το ωχρό, ωαγωγούς, αντίστοιχα. Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική προσέγγιση του μεταγραφώματος, χρησιμοποιώντας RNA Sequencing (RNASeq), σε κύτταρα που συλλέχθηκαν από τους ομόπλευρους και τους ετερόπλευρους ωαγωγούς. Το μέγεθος και η συγκέντρωση των EVs και στις δύο εποχές μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας Ηλεκτρονική Μικροσκόπηση Μετάδοσης και Ανάλυση Εντοπισμού Νανοσωματιδίων και η ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με Western blotting. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν υψηλότερη κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου. Μεταξύ των εποχών, διαπιστώθηκε αποκλίνουσα έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, τη συσπαστικότητα, την προστασία των γαμετών και τα μακρά μη κωδικοποιημένα RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs). Το μέγεθος και η συγκέντρωση των EVs δεν διέφεραν μεταξύ των εποχών, ωστόσο, η συγκέντρωση στον ομόπλευρο ωαγωγό έτεινε να είναι χαμηλότερη ($p=0.09$) από τον ετερόπλευρο το καλοκαίρι, αλλά όχι την άνοιξη.

Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας Διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

1. Η αυξημένη θερμοκρασία κατά την ωρίμανση των ωαρίων διαταράσσει την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων, καταστέλλει την παραγωγή βλαστοκύστεων και μεταβάλλει σημαντικά το συντονισμένο μοτίβο των γονιδιακών εκφράσεων.
2. Η προσθήκη της Hsp70 προστατεύει τα υπό ωρίμανση ωάρια σε συνθήκες ΘΚ και διατηρεί την ικανότητα ανάπτυξης τους, αποτρέποντας την απόπτωση, ενισχύοντας την ανταλλαγή σημάτων και αυξάνοντας την αντιοξειδωτική προστασία των εμβρύων.
3. Τα COCs των Holstein είναι πιο ανθεκτικά από τα COCs των Limousine, πιθανώς λόγω της υποχρεωτικής επιλογής που έχουν υποστεί, με γνώμονα την παραγωγή.
4. Η αύξηση της θερμοκρασίας είναι επιβλαβής για την ικανότητα ανάπτυξης των πρώιμων εμβρύων και η Hsp70 μπορεί εν μέρει, μόνο, να μετριάσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ, βελτιώνοντας την παραγωγή εμβρύων και μειώνοντας τις αρνητικές επιπτώσεις της ΘΚ σε ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των εμβρύων.

5. Η τροποποίηση του περιβάλλοντος του ωαγωγού κατά τη διάρκεια της ΘΚ θα μπορούσε να σχετίζεται με την παρατηρούμενη υπογονιμότητα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

ABSTRACT

The accomplishment of this PhD thesis required the conduction of five distinct experiments. The aim of these experiments was to study the effects of heat stress (HS) on the reproduction of cows. Particularly, the effects of HS on oocytes and early embryos, as well as on the oviduct environment, were studied. The experiments focused on studying: a) the effect of HS during the *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes on blastocyst production rates and their quality, b) the effect of exogenous addition of heat shock protein 70 (Hsp70) in the maturation medium of oocytes exposed to HS, c) the differences in the developmental competence of Holstein and Limousine cows' oocytes, after exposure to HS during the *in vitro* maturation, d) the effect of the addition of Hsp70 in the *in vitro* culture medium on the developmental competence and quality of bovine embryos which were exposed to HS, e) the oviductal epithelial cells transcriptome and extracellular vesicles characterization during thermoneutral and heat stress conditions in dairy cows.

This PhD thesis is separated in six chapters.

Chapter I includes the review of the international published literature for the scientific fields of the experiments.

In Chapter II, the effects of short, moderate temperature elevation during IVM, on embryo yield, and on the expression of various genes were evaluated. In 8 replicates, cumulus oocyte complexes (COCs) were matured for 24 hours at 39°C (controls n=520) or at 41°C from hour 2 to hour 8 of IVM (treated, n =802), fertilized, and presumptive zygotes were cultured for 9 days at 39°C. Cleavage and embryo formation rates were evaluated 48 hours post insemination (pi) and on days 7, 8, 9 respectively. Cumulus cells, oocytes and blastocysts from 5 replicates were snap frozen for the relative expression analysis of genes related to metabolism, thermal and oxidative stress response, apoptosis, and placentation. In treated group, cleavage and embryo formation rates were statistically significantly lower compared with the control (cleavage 86.7% vs 74.2%; blastocysts: day 7, 29.9% vs 19.7%, day 8, 34.2% vs 22.9% and day 9 35.9% vs 24.5%). Relative mRNA abundance of three genes in cumulus cells (*HSP90AA1*, *CPT1B*, *G6PD*) and three genes in blastocysts (*DNMT3A*, *PLAC8*, *GPX1*) indicated significantly different expression between groups ($p<0.05$). The expression of *G6PD*, *SOD2*, *GXP1* in oocytes and *PTGS2* in blastocysts tended to differ among groups ($0.05<p<0.08$). Heat stress altered ($p<0.05$) the correlation of expression between *HSPs* and other genes in oocytes (*G6PD*, *GPX1*, *CCNB1*), cumulus cells (*LDH*, *CCNB1*) and blastocysts (*AKR1B1*, *PLAC8*).

In Chapter III, the effects of supplementing Hsp70 in *in vitro* matured bovine oocytes under thermoneutral or heat stress conditions were examined, and its efficacy on *in vitro* embryo yield and quality was assessed; the latter was determined on the basis of the expression of various genes related to important cellular functions. Bovine oocytes were matured for 24h at 39°C without (group C39, n=471) or with Hsp70 (group H39, n=353) and at 41°C for the first 6h, followed by 16h at 39°C with (group H41, n=704) or without Hsp70 (group C41, n=405). After insemination, zygotes were cultured for 9 days at 39°C. Cleavage and embryo yield were assessed 48h pi and on days 7, 8, 9, respectively. Gene expression was assessed by RT-PCR in oocytes, cumulus cells and blastocysts. In C41, blastocysts formation rate was lower than in C39 and on day 9 it was

lower than in H41. In oocytes, Hsp70 enhanced the expression of three *HSP* genes regardless of incubation temperature. Hsp70 at 39°C led to tight coordination of gene expression in oocytes and blastocysts, but not in cumulus cells.

In Chapter IV, the effects of HS during *in vitro* maturation on the developmental potential of oocytes derived from Limousine and Holstein cows were investigated and the effect on the differential gene expression of important genes in oocytes, cumulus cells and blastocysts in the growth competence between the breeds was estimated. In seven replicates, COCs from Holstein and Limousine cows were matured for 24h at 39°C (controls C; HC, n=405, LC, n=370) or at 41°C from hour 2 to hour 8 of IVM (treated T; HT, n=652, LT, n=488), fertilized, and presumptive zygotes were cultured for 9 days at 39°C. Cleavage and embryo formation rates were evaluated 48h pi and on days 7, 8 and 9, respectively. From all groups, subsets of cumulus cells, oocytes and blastocysts were analyzed for the relative expression of genes related to metabolism, stress, apoptosis and placentation. No difference was detected in cleavage rate or in blastocyst formation rate among the control groups. In both breeds, HS reduced blastocyst yield, but at all days the suppression was higher in Limousines. In Holsteins, altered gene expression was detected in cumulus cells (*G6PD*, *GLUT1*) and blastocysts (*PLAC8*), while in Limousines, differences were found in oocytes (*G6PD*, *HSP90AA1*), in cumulus cells (*CPT1B*, *HSP90AA1*, *SOD2*) and blastocysts (*DNMT*, *HSP90AA1*, *SOD2*).

The aims of Chapter V were to examine the effects of Hsp70 addition in the *in vitro* culture medium of day 3 embryos on their developmental competence and quality. Bovine oocytes (n=1442) were *in vitro* matured, inseminated and cultured for the first two days according to standardized methods. The presumptive zygotes were randomly allocated in three experimental groups: Control, C (embryos cultured at 39°C throughout the culture period=396), group C41 (temperature was raised to 41°C from the 48th to 72nd h pi and then it returned at 39°C for the remaining culture period, n=514), and group H41 (the temperature modification was the same as in C41 and during heat exposure, Hsp70 was added in the culture medium, n=532). Cleavage and embryo yield were assessed 48h pi and on days 7, 8, 9, respectively and gene expression in day 7 blastocysts was assessed by RT-PCR. Blastocyst yield was the highest in group C39 and higher in group H41 compared to group C41. From the gene expression analyses, altered expression of 11 genes was detected among groups. The analysis of the orchestrated patterns of gene expression differed between groups.

In Chapter VI, the transcriptome of oviductal epithelial cells and certain characteristics of their extracellular vesicles (EVs) of dairy cows were described under thermoneutral and heat stress conditions. Twenty cows were compared in springtime at THI=65.6±0.90 and in summertime at THI=78.36±2.73. During each season, the estrous cycles of the cows were synchronized, and on day 3 of the ensuing cycle, a blood sample was collected for progesterone determination, while their oviducts were collected after slaughter. Epithelial cells and oviductal fluid were collected from the oviduct ipsilateral and contralateral to the corpus, respectively. For the gene expression study, a comparative transcriptomic approach, using RNA Sequencing (RNASeq), was performed on cells collected from the ipsilateral and the contralateral oviducts. The size and the concentration of EVs at both seasons were analyzed using Transmission Electron Microscopy and Nanoparticle tracking

analysis and specific proteins were detected by Western blotting. Progesterone concentration was higher during the thermoneutral period. Between seasons, divergent expression of genes related to immune system, contractility, gamete protection and long non-coding RNAs (lncRNAs) was found. The size and the concentration of the EVs did not differ between seasons, however, the concentration in the ipsilateral oviduct tended to be lower ($p=0.09$) from the contralateral one in the summer, but not in the spring.

The main findings of the present PhD thesis are summarized as following:

1. The elevated temperature during oocyte maturation disrupts the developmental competence of the oocytes, suppresses blastocyst yield and significantly alters the coordinated pattern of gene expressions.
2. The external supplementation of Hsp70 protects heat stressed maturing bovine oocyte and restores its developmental competence, by preventing apoptosis, supporting signal transduction, and increasing antioxidant protection of the embryo.
3. The Holstein COCs are more tolerant than Limousine COCs, possibly due to compulsory, production driven selection.
4. The temperature rise is detrimental for the developmental potential of the early embryos. The Hsp70 can partly mitigate the harmful effects of HS, by improving the embryo yield and by reducing the adverse effects of HS on some embryo quality characteristics.
5. The altered oviductal environment during HS could be related with the suppressed summer fertility in dairy cows.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πλήρη άρθρα σε Διεθνή Περιοδικά

1. Stamperna K, Giannoulis T, Nanas I, Kalemkeridou M, Dadouli K, Moutou K, Amiridis GS, Dovolou E. (2020): Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, cumulus cells and blastocysts in cattle. *Theriogenology*, **156**:36-45.
2. Stamperna K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. (2021): Heat Shock Protein 70 Improves *In Vitro* Embryo Yield and Quality from Heat Stressed Bovine Oocytes. *Animals*, **11**:1794.
3. Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. (2021): Developmental competence of heat stressed oocytes from Holstein and Limousine cows matured in vitro. *Reproduction of Domestic Animals*, **56**:1302-1314.
4. Stamperna K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. (2021): The Effects of Heat Shock Protein 70 Addition in the Culture Medium on the Development and Quality of *In Vitro* Produced Heat Shocked Bovine Embryos. *Animals*, **11**:3347.
5. Stamperna K, Giannoulis T, Cañon-Beltrán K, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Rizos D, Moutou KA, Mamuris Z, Amiridis GS. (2022): Oviductal epithelial cells transcriptome and extracellular vesicles characterization during thermoneutral and heat stress conditions in dairy cows. *Theriogenology*, **187**:152-163.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή και Εθνικά Συνέδρια

1. Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Mamuris Z, Dadouli K, Amiridis GS. (2019): Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, cumulus cells and blastocysts in cattle. *35th Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE)*, Murcia, Spain.(poster)
2. Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Kalemkeridou M, Moutou K, Amiridis GS. (2021): Effects of HSP70 addition in the IVM medium of heat stressed oocytes. *1st European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR-ECAR) Online Conference*.(oral presentation)
3. Stamperna K, Giannoulis T, Nanas I, Chouzouris T-M, Dadouli K, Amiridis GS, Dovolou E. (2022): Effects of temperature rise during *in vitro* maturation on embryo production in dairy and beef cattle. *19th International congress on animal reproduction (ICAR)*, Bologna, Italy.(oral presentation)
4. Stamperna K, Giannoulis T, Canon-Beltran K, Kalemkeridou M, Nanas I, Rizos D, Mamuris Z, Amiridis GS. (2022): Multilevel Effects of Summer heat stress on oviductal characteristics in dairy cows. *19th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, Bologna, Italy.(poster)
5. Σταμπέρνα Κ, Νανάς Ι, Γιαννούλης Θ, Καλεμκερίδου Μ, Αμοιρίδης ΓΣ, Ντόβολου Ε. (2022): Επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας και της παρουσίας HSP70 στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων βοοειδών. *15^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο*, Αθήνα, Ελλάδα.(poster)

6. Σταμπέρνα Κ, Γιαννούλης Θ, Cañon-Beltrán Κ, Ντόβολου Ε, Καλεμκερίδου Μ, Νανάς Ι, Ρίζος Δ, Μούτου Κ, Μαμούρης Ζ, Αμοιρίδης ΓΣ. (2022): Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στον ωαγωγό των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. *15^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο*, Αθήνα, Ελλάδα.(poster)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί έναν από τους βασικότερους κινδύνους, με τους οποίους βρίσκεται αντιμέτωπη η ανθρωπότητα, τις τελευταίες δεκαετίες. Η συνεχής αύξηση της μέσης θερμοκρασίας, επιδρά σοβαρά τόσο στην ευζωία, όσο και στην παραγωγικότητα των παραγωγικών ζώων, προκαλώντας σοβαρότατες κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις. Σύμφωνα με τα στοιχεία της διακυβερνητικής επιτροπής για την κλιματική αλλαγή, η θερμοκρασία της Γης αυξάνεται κατά 0,2°C ανά δεκαετία, ενώ προβλέπεται να αυξηθεί κατά 1,4-4,8°C μέχρι το 2100 (Pachauri & Reisinger 2007). Η μείωση της παραγωγικότητας των ζώων, εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, είναι το αποτέλεσμα των μεταβολών που προκαλεί η αύξηση της θερμοκρασίας, τόσο στη διαθεσιμότητα και την ποιότητα των ζωοτροφών και νερού, όσο και στις αλλαγές της φυσιολογίας και του επιπέδου ευζωίας των ζώων. Η συνεχής αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τις απαιτήσεις σε νερό τόσο για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα ζώα όσο και αυτές για την άρδευση των καλλιεργειών, με αποτέλεσμα την εξάντληση των υδάτινων πόρων (Thornton *et al.* 2009). Παράλληλα, ευνοείται η επιβίωση και η διάδοση παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και παρασίτων, οδηγώντας σε αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα των ζώων (Harvell *et al.* 2002). Ο ρυθμός εμφάνισης της κλιματικής αλλαγής στη Μεσόγειο είναι πολύ πιο έντονος συγκριτικά με άλλες περιοχές παγκοσμίως. Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια, οι περίοδοι καύσωνα γίνονται ολοένα εντονότεροι και συχνότεροι, ενώ έχουν ενταθεί οι περίοδοι ξηρασίας (Cramer *et al.* 2018). Επομένως, κρίνεται αναγκαία η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών επίδρασης της κλιματικής αλλαγής στο περιβάλλον και στα ίδια τα ζώα, καθώς και η ανεύρεση μεθόδων προσαρμογής στις νέες συνθήκες.

Σε όλα τα ζωικά είδη, ως θερμική καταπόνηση (ΘΚ) ορίζεται το σύνολο των περιβαλλοντικών δυνάμεων που δρουν σε έναν ομοιόθερμο οργανισμό, ώστε να μεταβληθεί η φυσιολογική θερμοκρασία σώματος του (Yousef 1984). Πέραν της αύξησης της εσωτερικής θερμοκρασίας, στα παραγωγικά ζώα η ΘΚ προκαλεί, ταχύπνοια, εφίδρωση, μείωση της κατανάλωσης τροφής, με τελική κατάληξη τη μείωση της παραγωγής και της γονιμότητας τους (Nardone *et al.* 2010, Lacetera *et al.* 2003, St-Pierre *et al.* 2003). Η ένταση της ΘΚ εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και από την υγρασία, την ηλιακή ακτινοβολία και την ταχύτητα του αέρα.

Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, ως θερμοουδέτερη ζώνη ορίζεται το διάστημα 0.5-20°C. Για την εκτίμηση του βαθμού ΘΚ των ζώων, εκτός από τη θερμοκρασία αξιολογείται και η συμβολή της υγρασίας. Έτσι, έχει επικρατήσει η χρήση ενός ενιαίου δείκτη θερμοκρασίας-υγρασίας (THI-Temperature Humidity Index), ο οποίος υπολογίζεται από τον κάτωθι μαθηματικό τύπο, $(0.8 \times T) + ((\%H/100) \times (T - 14.4)) + 46.4$, όπου T=Θερμοκρασία περιβάλλοντος, H=σχετική υγρασία (Davis *et al.* 2003). Παλαιότερα, ως ανώτερο όριο θερμοουδέτερης ζώνης για τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής θεωρούταν το THI=72· νεότερα δεδομένα όμως

αποδεικνύουν ότι οι πρώτες εκδηλώσεις ΘΚ, ειδικά σε ζώα υψηλών αποδόσεων, εμφανίζονται σε τιμές $THI > 68$ (Zimbelman *et al.* 2009).

Η έκθεση των αγελάδων σε συνθήκες ΘΚ μεταβάλλει σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, καθώς και τη συμπεριφορά τους. Η αύξηση της θερμοκρασίας σώματος προκαλεί αύξηση του ρυθμού αναπνοής – ταχύπνοια- (Berman *et al.* 1985), του καρδιακού ρυθμού και της εφίδρωσης (Ganaie *et al.* 2013), ενώ παράλληλα αυξάνεται η κοπιώδης αναπνοή και το λαχάνιασμα. Η πρόσληψη ξηράς ουσίας και ο μηρυκασμός μειώνονται (Collier *et al.* 1982), ενώ αυξάνονται σημαντικά οι απαιτήσεις σε ενέργεια και η πρόσληψη νερού (Silanikove 1992), οδηγώντας τα ζώα σε μια συνεχή αναζήτηση σκιάς και νερού. Η παραγωγή γάλακτος μειώνεται, ενώ παράλληλα, μεταβάλλεται και η ποιότητα του γάλακτος, με κυριότερο χαρακτηριστικό τη μείωση της περιεκτικότητας λίπους και πρωτεϊνών (Bouraoui *et al.* 2002, Kadzere *et al.* 2002).

Η μειωμένη γονιμότητα αποτελεί ίσως τη σοβαρότερη επίπτωση της ΘΚ στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (De Rensis & Scaramuzzi 2003, Al Katanani *et al.* 1999, Thompson *et al.* 1996, Ingraham *et al.* 1974). Σε συνθήκες ΘΚ, τόσο τα ποσοστά συλλήψεων, όσο και ο ρυθμός εγκυμοσύνης (pregnancy rate) μειώνονται σημαντικά (Nabenishi *et al.* 2011, Amundson *et al.* 2006). Αναλόγως της έντασης και της διάρκειας της ΘΚ, τα ποσοστά συλλήψεων μπορεί να μειωθούν έως και 50% (Cavestany *et al.* 1985), ενώ ο ρυθμός εγκυμοσύνης έως και 60% (Amundson *et al.* 2006). Το πρόβλημα της μειωμένης γονιμότητας εντείνεται περαιτέρω από τη μειωμένη ανίχνευση οίστρου κατά τους θερινούς μήνες (Rutledge 2001). Συνεπώς, ο συνολικός αριθμός σπερματεγχύσεων μειώνεται εξαιτίας της ανεπιτυχούς ανίχνευσης οίστρου, ενώ αυξάνεται ο αριθμός των σπερματεγχύσεων/εγκυμοσύνη, οδηγώντας σε αυξημένα μεσοδιαστήματα τοκετών, αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης ζώων εξαιτίας μειωμένης παραγωγής και αύξηση του ρυθμού αντικατάστασης (Menta *et al.* 2022, De Rensis & Scaramuzzi 2003).

Η έκθεση των ζώων σε υψηλές θερμοκρασίες διαταράσσει το ενδοκρινολογικό σύστημα, επιδρώντας, κατά κύριο λόγο, στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες (YYΩ). Ειδικότερα, η βασική συγκέντρωση της LH μειώνεται, προκαλώντας μείωση στη σύνθεση των οιστρογόνων από τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων, με συνέπεια την απουσία ή την εμφάνιση σιωπηλών οίστρων. Η διαδικασία ανάπτυξης/ωρίμανσης των ωοθυλακίων διαταράσσεται, οδηγώντας, κατά συνέπεια, στη δημιουργία ανεπαρκών ωχρών σωματίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από περιορισμένη εκκριτική ικανότητα προγεστερόνης, γεγονός που καθιστά προβληματική την ανάπτυξη των εμβρύων ή την εξέλιξη της εγκυμοσύνης στα πρώιμα στάδια (De Rensis & Scaramuzzi 2003, Nanas *et al.* 2021a). Σημαντικές μεταβολές συμβαίνουν και στο ενδομήτριο, με κύρια χαρακτηριστικά την αυξημένη θερμοκρασία και τις αυξημένες συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Loven 1988), που συνιστούν δυσμενές περιβάλλον για την εγκατάσταση του κήματος στη μήτρα. Σε αγελάδες που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, παρατηρείται μείωση των επιπέδων της γκρελίνης (Nanas *et al.* 2021b), ενώ η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξάνεται (Hall *et al.* 2018), γεγονός που συνδέεται με μειωμένη κατανάλωση τροφής και αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο, που, όπως είναι γνωστό, τελικώς επιδρούν δυσμενώς, μέσω διαφόρων μηχανισμών, στη γονιμότητα (Wathes *et al.* 2007).

Ιδιαίτερης σημασίας, είναι το γεγονός ότι οι αρνητικές επιπτώσεις της ΘΚ στη γονιμότητα, κυρίως εξαιτίας διαταραχών στο ωοθυλακικό περιβάλλον, επεκτείνονται μέχρι και για 40 έως 50 ημέρες μετά την έκθεση των ζώων στις υψηλές θερμοκρασίες, εξηγώντας τη μειωμένη γονιμότητα στους πρώτους φθινοπωρινούς μήνες, κατά τους οποίους η ΘΚ είναι ελάχιστη ή δεν υφίσταται (Roth *et al.* 2001a&b).

Επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας στην ωοθήκη

Ο οιστρικός κύκλος των αγελάδων διαιρείται σε 2 φάσεις: την ωχρινική και την ωοθυλακική. Κατά τη διάρκεια του, αναπτύσσονται, κατά κανόνα, δύο ή τρία κύματα ωοθυλακίων, εκ των οποίων θα προκύψει στο τέλος του οιστρικού κύκλου ένα κυρίαρχο -προωοθυλακιορρηκτικό- ωοθυλάκιο, ενώ τα υπόλοιπα θα οδηγηθούν σε ατρησία (Wolfenson *et al.* 2004, Savio *et al.* 1988 Sirois & Fortune 1988). Η ωοθυλακιορρηξία λαμβάνει χώρα στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης και πριν την έναρξη της ωχρινικής και ακολουθείται από το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Οι ωοθήκες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή στεροειδών ορμονών (οιστρογόνα, προγεστερόνη), προσταγλανδινών, πεπτιδίων και γλυκοπρωτεϊνών, που συμμετέχουν τόσο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωοθυλακιορρηξία, όσο και στην προετοιμασία της μήτρας για τη μετέπειτα υποδοχή των νεαρών εμβρύων. Η εύρυθμη λειτουργία των ωοθηκών στα βοοειδή διασφαλίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων των τοπικών αυτών παραγόντων με ορμόνες, κυρίως, της υπόφυσης και του υποθαλάμου (Webb *et al.* 1992).

Σε συνθήκες ΘΚ, διαταράσσεται η έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της FSH και τη μείωση της συγκέντρωσης της LH (Wolfenson *et al.* 1995, Wise *et al.* 1988), ενώ παράλληλα μειώνεται και η ανταπόκριση των κυττάρων των ωοθυλακίων στην δράση της LH (Kanai *et al.* 1995). Επιπλέον, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της ανασταλτίνης στο πλάσμα του αίματος (Roth *et al.* 2000), με συνέπεια την εμφάνιση πολλών, μεσαίου μεγέθους ωοθυλακίων, την αύξηση των ποσοστών διπλών ωοθυλακιορρηξιών, γεγονός που ερμηνεύει τα αυξημένα ποσοστά δίδυμων κυοφοριών που προκύπτουν από γονιμοποίηση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Ryan & Boland 1991). Σε συνθήκες ΘΚ, μειώνεται η δραστηριότητα της αρωματάσης στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων, και κατ' επέκταση η σύνθεση της οιστραδιόλης (Badinga *et al.* 1993). Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό παραμένει σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και μετά την αποκατάσταση της θερμοκρασίας στη θερμοουδέτερη ζώνη, δηλαδή στις αρχές του φθινοπώρου και αποκαθίσταται σταδιακά επανερχόμενη σε φυσιολογικά επίπεδα στις αρχές του χειμώνα (Roth *et al.* 2004, 2001a). Τα αποτελέσματα της μειωμένης συγκέντρωσης οιστρογόνων ενοχοποιούνται για την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης σιωπηλών οίστρων ή/και ανοίστρων (Wolfenson *et al.* 1988, Gwazdauskas *et al.* 1981), την παρεμπόδιση της ωοθυλακιορρηξίας ή/και της φυσιολογικής ωρίμανσης των ωαρίων, την αυξημένη εμφάνιση κύστεων ωοθυλακίων, καθώς και τη μείωση της παραγωγής και έκκρισης προγεστερόνης από τα ωχρά σωματίδια (Wolfenson *et al.* 2000). Επιπλέον, σε συνθήκες ΘΚ, παρατείνεται η διάρκεια κυριαρχίας του κυρίαρχου ωοθυλακίου, επιδρώντας δυσμενώς στην ικανότητα

σύλληψης (Wolfenson *et al.* 1995, Mihm *et al.* 1994). Όσον αφορά τη συγκέντρωση της προγεστερόνης στο περιφερικό αίμα, οι απόψεις δίστανται. Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η συγκέντρωσή της παραμένει αμετάβλητη (Guzeloglu *et al.* 2001, Roth *et al.* 2000), ενώ σε άλλες μελέτες αναφέρεται είτε αύξηση (Trout *et al.* 1998, Vaught *et al.* 1977, Abilay *et al.* 1975) είτε μείωση της συγκέντρωσης της (Ronchi *et al.* 2001, Jonsson *et al.* 1997, Howell *et al.* 1994, Younas *et al.* 1993, Rosenberg *et al.* 1977). Η διάσταση των απόψεων πρωτίστως θα πρέπει να αναζητηθεί στα πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μελέτη (πχ οξύ και αιφνίδιο πειραματικό στρες, ένταση και διάρκεια της καταπόνησης, κλπ). Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας, έδειξαν ότι σε συνθήκες εκτροφής, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης είναι μειωμένες το καλοκαίρι σε σχέση με αυτές του χειμώνα (Nanas *et al.* 2021a). Η χαμηλή συγκέντρωση προγεστερόνης κατά τη διάρκεια τη ωχρινικής φάσης έχει αρνητικό αντίκτυπο στη γονιμότητα, παρεμποδίζοντας τόσο τη φυσιολογική ωρίμανση των ωοθυλακίων/ωαρίων πριν την ωοθυλακιορρηξία και συνδέεται με πρώιμους εμβρυικούς θανάτους (Ahmad *et al.* 1995), ενώ η μειωμένη εκκριτική ικανότητα του ωχρού σωματίου συνδέεται με ατελή ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου, το οποίο τελικά, έχει μειωμένες πιθανότητες εγκατάστασης (Lamming & Royal 2001, Mann *et al.* 1999).

Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο ωάριο

Η έκθεση του ωαρίου σε υψηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζει διαδικασίες απαραίτητες για την επιτυχή ολοκλήρωση της ωρίμανσης του ωαρίου, τη γονιμοποίηση του και την ανάπτυξη του εμβρύου πριν την εγκατάσταση. Σύμφωνα με τους Al Katanani *et al.* (2002), τα ωάρια που συλλέχθηκαν από αγελάδες που είχαν εκτεθεί σε ΘΚ εμφάνισαν μειωμένη πιθανότητα να εξελιχθούν σε βλαστοκύστες. Μεταβολές, που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, διαταράσσουν τη φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Roth *et al.* 2000), τη στεροειδογένεση (Ozawa *et al.* 2005, Roth *et al.* 2001a, Wolfenson *et al.* 1997), καθώς και την έκφραση σημαντικών γονιδίων (Argov *et al.* 2005), επιδρώντας δυσμενώς στη μετέπειτα ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η ΘΚ στο ωάριο δεν είναι πλήρως γνωστός, είναι απολύτως τεκμηριωμένο ότι οι διαταραχές αφορούν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Οι βλάβες που προκαλούνται στις διάφορες δομές και οργανίδια του ωαρίου μπορεί να είναι αναστρέψιμες ή μη, και εξαρτώνται από τη διάρκεια και την ένταση με την οποία επιδρά η αυξημένη θερμοκρασία πάνω σε αυτό (Ju *et al.* 2005, Roth & Hansen 2005).

Οι μεταβολές, που προκαλούνται στον κυτταροσκελετό, σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση της μειωτικής διαίρεσης, και κατ' επέκταση της ωρίμανσης του πυρήνα, είναι μία από τις κύριες επιπτώσεις της ΘΚ στο ωάριο. Αυτό υποδεικνύεται από το γεγονός ότι μετά από έκθεση ανώριμων ωαρίων (GV-στάδιο) σε υψηλές θερμοκρασίες, μειώνεται δραματικά το ποσοστό αυτών που καταφέρνουν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης και να φτάσουν στο στάδιο της μετάφασης II (MII), ενώ παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των ωαρίων που βρίσκονται στο στάδιο της μετάφασης I (MI) (Lima 2012, Paula-Lopes *et al.* 2008, Roth &

Hansen 2005, Payton *et al.* 2004, Roth & Hansen 2004). Σύμφωνα με τους Gendelman & Roth (2012a), οι επιπτώσεις της ΘΚ στο ανώριμο ωάριο, γίνονται εμφανείς σε μετέπειτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, λόγω των μεταβολών που υφίσταται το μητρικό γονιδίωμα στο στάδιο αυτό και οι οποίες, στη συνέχεια, συντελούν στη μειωμένη ικανότητα μεταγραφής. Οι Roth & Hansen (2004) παρατήρησαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τις πρώτες 12-14 ώρες της *in vitro* ωρίμανσης (*in vitro* maturation, IVM) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των ωαρίων που ήταν θετικά στη δοκιμή TUNNEL, που υποδηλώνει κατακερματισμό του DNA, χαρακτηριστικό της απόπτωσης.

Σε σύγκριση με τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα είναι περισσότερο ευαίσθητο στις δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ (Shen *et al.* 2010). Η έκθεση του ωαρίου σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί αποδιοργάνωση της μειωτικής ατράκτου, μέσω μεταβολών στη δομή των μικροσωληνίσκων, παρεμποδίζοντας τη μεταφορά των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, καθώς και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη γονιμοποίηση (Edwards *et al.* 2005). Η δραστηριότητα των μιτοχονδρίων μειώνεται σε συνθήκες ΘΚ, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία της απόπτωσης (Lima 2012, Ispada *et al.* 2011). Συμπληρωματικά, οι Gendelman & Roth (2012b) παρατήρησαν διαφορετική εντόπιση των μιτοχονδρίων μεταξύ ωαρίων το καλοκαίρι και το χειμώνα, γεγονός που συνδέεται με μειωμένη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και μειωμένη κυτταροπλασματική ωρίμανση. Η έκφραση γονιδίων, όπως των *MnSOD* και *CPT1B*, που συνδέονται με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, και κυρίως αυτών που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, επηρεάζεται από τις υψηλές θερμοκρασίες. Παράλληλα, μειώνεται η συνολική πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ αυξάνεται η δράση των κασπασών 2, 3, και 7, γεγονός που υποδεικνύει κατακερματισμό του πυρήνα (Edwards & Hansen 1996, 1997, Curci *et al.* 1987).

Φυσιολογικά, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου προμηθεύουν το ωάριο με γλυκόζη και διάφορα άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως διάφορα λιπαρά οξέα, αμινοξέα και υδατάνθρακες (Auclair *et al.* 2013), τα οποία είναι σημαντικά για την εξέλιξη του, ενώ παράλληλα το προστατεύουν από τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) και συμμετέχουν στην ανταλλαγή χημικών σημάτων, μέσω του δικτύου των χασματοσυνδέσμων (gap junctions) (Kidder & Vanderhyden 2010, Cetica *et al.* 2001). Δεδομένης της σημασίας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου για τη φυσιολογική ωρίμανση του ωαρίου, η μείωση της ενδοκυττάριας επικοινωνίας μέσω των χασματοσυνδέσμων και η ταυτόχρονη αύξηση της συμπύκνωσης της χρωματίνης στον πυρήνα του ωοκυττάρου, που προκαλούνται από την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών, επηρεάζουν δυσμενώς την εξέλιξη του ωαρίου (Campen *et al.* 2018, Rispoli *et al.* 2013). Η μείωση της συνεκτικότητας και της διαπερατότητας των χασματοσυνδέσμων, που φυσιολογικά συμβαίνουν μετά το τέλος της μειωτικής διαίρεσης, υπό συνθήκες ΘΚ προκαλούνται εξαιτίας της μειωμένης παραγωγής υαλουρονικού οξέος από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (Lenz *et al.* 1983). Η έκθεση των συμπλεγμάτων ωαρίων-κυττάρων ωοφόρου δίσκου (COCs) σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί αύξηση της παραγωγής ROS στο ωάριο και μείωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης, γεγονός που επάγει το μηχανισμό της απόπτωσης, με αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των ωαρίων που φτάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης (Nabenishi *et al.* 2012a, Circu & Aw 2010). Τέλος, η ΘΚ προκαλεί μεταβολές στην έκκριση της μεταλλοπεπτιδάσης 9

(MMP9) και της προγεστερόνης, επιδρώντας στην πρωτεϊνοσύνθεση και παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική ωρίμανση και ανάπτυξη του ωαρίου. Η μεταλλοπεπτιδάση αποτελεί προγνωστικό δείκτη της καλής ανάπτυξης του ωαρίου, καθώς επίσης είναι απαραίτητη για τη γονιμοποίηση και τη μετέπειτα εγκατάσταση του εμβρύου στη μήτρα, με αποτέλεσμα η μείωση της συγκέντρωσης της σε συνθήκες ΘΚ να οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα ωρίμανσης και γονιμοποίησης του ωαρίου. Παράλληλα, η αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ομαλή εξέλιξη της μειωτικής διαίρεσης και κατ' επέκταση της φυσιολογικής ωρίμανσης του ωαρίου (Rispoli *et al.* 2013).

Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο έμβρυο

Η ευαισθησία των εμβρύων στην επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκονται. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος συμβαίνει στο στάδιο των 8-16 κυττάρων (Sirard 2012, Telford *et al.* 1990), η ικανότητα ανάπτυξης και η θερμοαντοχή του πρώιμου εμβρύου εξαρτώνται αρχικά από την ποιότητα του ωαρίου από το οποίο προέρχεται, ενώ στη συνέχεια η θερμοαντοχή αυξάνεται προοδευτικά από το στάδιο του μοριδίου έως αυτό της βλαστοκύστης (Sakatani *et al.* 2012, Edwards & Hansen 1997). Οι Gendelman *et al.* (2010) αναφέρουν ότι έμβρυα, που προέρχονται από ωάρια που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, παρουσιάζουν καθυστέρηση της αυλάκωσης και των δύο πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων, με αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των εμβρύων που είναι ικανά να εξελιχθούν σε βλαστοκύστες, γεγονός που είναι ενδεικτικό της ποιότητάς τους. Η έκθεση πρώιμων εμβρύων 8-κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί, στη συνέχεια, μείωση του συνολικού αριθμού κυττάρων στις βλαστοκύστες, και ιδιαίτερα αυτών της τροφοβλάστης (Sakatani *et al.* 2008, 2012). Παράλληλα, στα έμβρυα 2-κυττάρων παρατηρείται διάσπαση των μικροϊνιδίων και των μικροσωληνίσκων, βλάβες στα μιτοχόνδρια, και κατ' επέκταση καταστροφή των οργανιδίων, μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης και αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων σε έμβρυα 8-κυττάρων (Sakatani *et al.* 2012, Rivera *et al.* 2003, 2004, Paula-Lopes & Hansen 2002). Σε συνθήκες ΘΚ, η οξειδωτική ισορροπία στα εμβρυϊκά κύτταρα διαταράσσεται, εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής ROS (Ozawa *et al.* 2002), και της παράλληλης μειωμένης μεταγραφικής ικανότητας του πρώιμου εμβρύου, με αποτέλεσμα να υποεκφράζονται αντιοξειδωτικά γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν τη γλουταθειόνη και την Hsp70 (Edwards *et al.* 2001, Hansen 1999).

Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στον ωαγωγό

Ο ωαγωγός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των γαμετών, τη γονιμοποίηση καθώς και κατά την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Besenfelder *et al.* 2012, Holt & Fazeli 2010, Kölle *et al.* 2009). Ο κάθε ωαγωγός διαιρείται σε τρία τμήματα: τον κώδωνα, τη λήκυθο και τον ισθμό, στο καθένα από αυτά λαμβάνουν

χώρα διαφορετικές διαδικασίες απαραίτητες για τη γονιμοποίηση. Συγκεκριμένα, στη λήκυθο πραγματοποιείται η γονιμοποίηση, ενώ στον ισθμό αποθηκεύεται το σπέρμα πριν την ωοθυλακιορρηξία. Το επιθήλιο του βλεννογόνου του ωαγωγού αποτελείται τόσο από κροσσωτά, όσο και από εκκριτικά κύτταρα, των οποίων η λειτουργία και η μορφολογία μεταβάλλονται ανάλογα με το στάδιο του οιστρικού κύκλου (Rottmayer *et al.* 2006, Yániz *et al.* 2000). Το υγρό του ωαγωγού περιέχει θρεπτικά συστατικά και αντιοξειδωτικές ουσίες απαραίτητες για την επιβίωση των γαμετών (Avilés *et al.* 2010, Leese *et al.* 2008). Στο υγρό του ωαγωγού περιέχονται μεταβολικά στοιχεία, όπως το πυροσταφυλικό, το γαλακτικό, η γλυκόζη, και διάφορα αμινοξέα, που προέρχονται τόσο από το επιθήλιο του ωαγωγού όσο και από το πλάσμα του αίματος. Η σύνθεση του, όμως, διαφέρει από αυτή του υγρού της μήτρας και του πλάσματος (Hugentobler *et al.* 2008, Leese *et al.* 2008, Harris *et al.* 2005, Stanke *et al.* 1974). Τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού εκκρίνουν θρεπτικές ουσίες (αμινοξέα, πυροσταφυλικό), αυξητικούς παράγοντες (IGF-α, FGF, VEGF), αντιοξειδωτικές ουσίες (ταυρίνη, υποταυρίνη), καθώς και εμβρυοτροφικές ουσίες (OVGP1) (Kölle *et al.* 2009, Wijayagunawardane *et al.* 2005, Wolf *et al.* 2003, Makarevich & Markkula 2002, Guerin *et al.* 2001). Ο Rapała και οι συνεργάτες του (2018) αναφέρουν ότι σε συνθήκες ΘΚ, παρότι δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού, μεταβάλλεται η έκκριση του εμβρυοτροφικού παράγοντα OVGP1, που συμμετέχει στη σύνδεση ωαρίου-σπερματοζωαρίου μεταβάλλοντας τη λειτουργία της διαφανούς ζώνης και αποτρέποντας την εμφάνιση πολυσπερμίας (Coy *et al.* 2008).

Σημαντικό συστατικό του υγρού του ωαγωγού αποτελούν, επίσης, τα εξωσώματα, τα οποία είναι εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) διαμέτρου 30-100nm. Παρόλο που η αναγνώριση των εξωκυτταρικών κυστιδίων έχει συμβεί εδώ και 50 χρόνια, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο βιολογικός τους ρόλος. Η διάκριση των εξωσωμάτων από τους άλλους 2 τύπους εξωκυτταρικών κυστιδίων, τα μικροκυστίδια και τα αποπτωτικά κυστίδια, αφορά το μέγεθος, τη σύσταση, την κυτταρική προέλευση και τη λειτουργία (Zaborowski *et al.* 2015, Borges *et al.* 2013). Τα εξωκυτταρικά κυστίδια, καθώς και, τα εξωσώματα παράγονται από τους περισσότερους τύπους κυττάρων, καθώς και από τα κύτταρα του ωαγωγού, και ανευρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά, όπως το σάλιο, το βρογχικό έκπλυμα, το γάλα, τα ούρα, το πλάσμα του αίματος, το αμνιακό υγρό και το υγρό του ωαγωγού (Veziroglu & Mias 2020, Doyle & Wang 2019). Τα εξωσώματα, όπως και οι άλλες 2 κατηγορίες εξωκυτταρικών κυστιδίων, περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA, mRNAs, miRNAs και άλλα μεταβολικά στοιχεία περικλειόμενα από λιποπρωτεϊνική μεμβράνη (Maas *et al.* 2017, Raposo & Stoorvogel 2013), αλλά διαφέρουν ως προς τον τρόπο σχηματισμού τους (Van Niel *et al.* 2018). Δεδομένης της ικανότητας τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, συμμετέχουν στην επικοινωνία των κυττάρων του ωαγωγού με τους γαμέτες και το πρώιμο έμβρυο (Al-Dossary & Martin-Deleon 2016, Burns *et al.* 2016). Πολυάριθμες μελέτες καταδεικνύουν τη θετική επίδραση των εξωσωμάτων τόσο στην ωρίμανση του ωαρίου όσο και στη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Harris *et al.* 2020, Lopera-Vásquez *et al.* 2016, 2017, Almiñana *et al.* 2017).

Ο ωαγωγός συμμετέχει στη μεταφορά τόσο των γαμετών όσο και των πρώιμων εμβρύων μέσω των συσπάσεων του μυϊκού του χιτώνα και των εκκρίσεων των επιθηλιακών του κυττάρων. Η διαδικασία αυτή

βρίσκεται υπό τον έλεγχο των προσταγλανδινών PGE₂ και PGF_{2a}, οι οποίες ρυθμίζουν την κινητικότητα των λείων μυϊκών ινών του ωαγωγού (Wijayagunawardane *et al.* 2001). Η σύνθεση και η έκκριση των προσταγλανδινών διαταράσσονται σε συνθήκες ΘΚ, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητα του ωαγωγού, η οποία μπορεί να αποτελέσει έναν επιπρόσθετο παράγοντα που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της γονιμότητας (Kobayashi *et al.* 2013).

Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, Hsps)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps) είναι οικογένεια πρωτεϊνών που εκφράζονται στην πλειονότητα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων (Lindquist 1992). Οι Hsps ανακαλύφθηκαν, για πρώτη φορά, σε κύτταρα του σιελογόνου αδένου της *Drosophila melanogaster*, τα οποία είχαν εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες (Tissières *et al.* 1974, Ritossa 1962). Μολονότι η αρχική τους ονοματοδοσία είχε προκύψει από την πρώτη αποκρυπτογράφηση του λειτουργικού τους ρόλου -την απόκριση των κυττάρων στο θερμικό σοκ- μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν τη συμμετοχή τους σε πολλές σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε περιπτώσεις άλλων δυσμενών συνθηκών για τα κύτταρα (ακτινοβολία, κρύο, νεοπλάσματα, τραυματισμοί, διάφορα φάρμακα, χαμηλό pH) (Morimoto *et al.* 1992, Ananthan *et al.* 1986). Η οικογένεια των Hsps διαιρείται σε υποομάδες, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Έχει αποδειχθεί ότι Hsps με διαφορετικό μοριακό βάρος μπορεί να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες ή να ενεργοποιούνται από διαφορετικά ερεθίσματα (Jee 2016). Οι Hsps κατανέμονται σε ποικίλα κυτταρικά διαμερίσματα και εμπλέκονται σε σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι η αναδίπλωση και μεταφορά των πρωτεϊνών, η αναδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων, η ρύθμιση και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η σταθερότητα του κυτταροσκελετού, η ανοσοαπόκριση και η θερμοαντοχή σε συνθήκες ΘΚ, τόσο στα κύτταρα, όσο και στα πρώιμα έμβρυα (Kregel 2002, Welch 1992). Τα κυριότερα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Hsps, το μέγεθος τους, η εντόπιση τους στο κύτταρο καθώς και οι κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Οι κυριότερες πρωτεΐνες Hsps με το αντίστοιχο μέγεθος, την εντόπιση και τη λειτουργία τους.

Όνομα	Μέγεθος (kDa)	Εντόπιση	Λειτουργία
Hsp100	100-110 kDa	Κυτταρόπλασμα	Αναδίπλωση πρωτεϊνών
Hsp90	83-90 kDa	Κυτταρόπλασμα, ενδοπλασματικό δίκτυο, πυρήνας	Ρύθμιση των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, ρύθμιση δυναμικών κυτταροσκελετού, μεταφορά

πρωτεϊνών			
Hsp70	66-78 kDa	Κυτταρόπλασμα, ενδοπλασματικό δίκτυο, πυρήνας, μιτοχόνδρια	Αναδίπλωση και μεταφορά πρωτεϊνών, θερμοαντοχή, κυτταροπροστασία
Hsp60	60 kDa	Μιτοχόνδρια	Αναδίπλωση και μεταφορά πρωτεϊνών, ρύθμιση της απόπτωσης
sHsps	10-28 kDa	Κυτταρόπλασμα, πυρήνας, μιτοχόνδρια	Σταθεροποίηση κυτταροσκελετού, θερμοαντοχή
Ubiquitin	8 kDa	Κυτταρόπλασμα, πυρήνας	Αποδόμηση πρωτεϊνών

Hsp70

Η οικογένεια των Hsp70 εμφανίζεται σε 2 μορφές στα κύτταρα των θηλαστικών: την Hsc70 (73-kDa), που εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα και την Hsp70 (72-kDa), που παράγεται κάτω από συνθήκες stress. Οι δύο αυτές μορφές, είναι δομικά και λειτουργικά ομόλογες, αν και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, και αναφέρονται ως Hsp70 (Kregel 2002). Αν και οι Hsps έχουν συσχετιστεί, γενικά, με την ανταπόκριση του κυττάρου στη ΘΚ, υπάρχει μια πληθώρα άλλων στρεσογόνων παραγόντων που επάγουν την έκφραση τους (Ashburner 1970). Φυσιολογικά, κατανέμονται σε όλα τα τμήματα των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς και των ωαρίων, όπως το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τον πυρήνα, και το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ υπό συνθήκες ΘΚ γίνεται εντονότερη η εντόπιση τους στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (Edwards *et al.* 1997, Hahn & Li 1990). Έχει αποδειχθεί η παρουσία τους και στον εξωκυττάριο χώρο, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή τους στην κυτταρική ανοσοαπόκριση και την απόπτωση (Milani *et al.* 2002, Multhoff 2002). Οι Hsp70 συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι η αναδίπλωση και η μεταφορά των πρωτεϊνών μετά τη μεταγραφή διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Ju 2005, Wegele *et al.* 2004), η αποδιάταξη κυστιδίων που είναι καλυμμένα από κλαθρίνη (clathrin-coated vesicles) (Schmid *et al.* 1985, Schmid & Rothman 1985), η ρύθμιση της απόκρισης στη ΘΚ (Archana *et al.* 2017), καθώς και η αλληλεπίδραση με υποδοχείς στεροειδών (Pratt & Welsh 1994). Η Hsp70 είναι μια μοριακή συνοδός πρωτεΐνη (molecular chaperon), που προστατεύει το ωάριο έναντι των δυσμενών επιπτώσεων της ΘΚ. Ως συνοδός πρωτεΐνη, συνδέεται σε πρόδρομες διαμορφώσεις πρωτεϊνών, με τρόπο που εμποδίζει τη συσσωμάτωσή τους και επιτρέποντας τη σωστή αναδίπλωση τους και τη συγκρότηση ολιγομερών τους στο κυτταρόπλασμα, ή τη μεταφορά τους στον πυρήνα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια και στα λυσοσώματα προκειμένου

να αποδομηθούν (Beckmann *et al.* 1992, Kang *et al.* 1990, Kozutsumi *et al.* 1988). Συνδέεται σε μικρά υδρόφοβα τμήματα πολυπεπτιδίων, ανεξαρτήτως δευτεροταγούς και τεταρτοταγούς δομής, εξαρτώμενη από το ATP (Pelham 1986). Ασκήι δράση ATPάσης, αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, φέροντας στο ένα άκρο μια αμινοομάδα που συνδέεται με ATP και στο άλλο μία καρβοξυομάδα, η οποία συνδέεται με πεπτίδια (Ju 2005, Wegele *et al.* 2004). Υπό συνθήκες ΘΚ, η Hsp70 εμποδίζει την κυτταρική απόπτωση μέσω της αναστολής των CED-3 κασπασών (Mosser *et al.* 1997) και αναστέλλει τη μεταγραφή μέσω της φωσφορυλίωσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 2α, γεγονός που είναι σημαντικό για τη μείωση της πρωτεϊνσύνθεσης καθώς η πιθανότητα λανθασμένης αναδίπλωσης είναι μεγάλη (Wallace *et al.* 2015).

Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της Hsp70 από τη ΘΚ περιλαμβάνει τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα σε ένα στοιχείο θερμικού σοκ (HSE) στο 5'πλευρικό άκρο (Santoro *et al.* 1998). Υπάρχουν 2 μεταγραφικοί παράγοντες για τον HSE, οι HSF1 και HSF2· ο HSF1 που ενεργοποιείται υπό συνθήκες στρες, και ο HSF2 που είναι υπεύθυνος για τη γονιδιακή έκφραση υπό φυσιολογικές συνθήκες (Wu *et al.* 1994). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο HSF1 βρίσκεται σε μορφή μονομερούς στο κυτταρόπλασμα (Wang *et al.* 2013). Η μετουσίωση των πρωτεϊνών, που προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα, οδηγεί στην ενεργοποίηση και τη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα, όπου υπόκειται σε πολυμερισμό και μετατρέπεται στην ενεργή του μορφή. Η ενεργή μορφή συνδέεται, στη συνέχεια, στον εκκινητή, με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής και της μετάφρασης (Kim *et al.* 1995, Sorger 1991). Αντιθέτως, ο HSF2, υπό συνθήκες στρες, παραμένει στην ανενεργή μορφή του (Morimoto *et al.* 1994).

Μολονότι, το ωάριο κατά την ωρίμανση συνθέτει φυσιολογικά Hsp70, δεν είναι ικανό να μεταβάλει τη σύνθεση της υπό συνθήκες ΘΚ (Edwards & Hansen 1996, 1997). Μελέτες έχουν αποδείξει το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη διατήρηση της σταθερότητας της μειωτικής ατράκτου σε συνθήκες ΘΚ, καθώς η κατανομή της Hsp70 στο ωόπλασμα των ωαρίων παρέμεινε σταθερή (Kawarsky & King 2001). Ωστόσο, η σύνθεση της Hsp70 αυξάνεται κατά το στάδιο των 2-κυττάρων υπό την επίδραση της ΘΚ, ακόμα και παρουσία κυκλοεξιμίδης, που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την μεταγραφή της Hsp70 (Manejwala *et al.* 1991).

Σκοπός της διατριβής

Η ΘΚ αποτελεί, ίσως, τη σημαντικότερη περιβαλλοντική απειλή για τη γονιμότητα των αγελάδων, με κύριες εκδηλώσεις την αδυναμία γονιμοποίησης, την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης πρώιμων εμβρυικών θανάτων και αποβολών. Η έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία επιδρά αρνητικά τόσο στο ενδοκρινολογικό σύστημα, και ιδιαίτερα στον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-ωοθήκες, όσο και απευθείας στα ωάρια και τα αναπτυσσόμενα έμβρυα. Μεταβάλλει, επίσης, το περιβάλλον ωαγωγών/μήτρας, καθιστώντας το λιγότερο φιλόξενο για την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση της τεχνολογίας της εξωσωματικής (*in vitro*) παραγωγής εμβρύων (IVP) αυξάνεται συνεχώς, με κύριο στόχο, την επιτάχυνση της γενετικής βελτίωσης των πληθυσμών μέσω της

ταχείας παραγωγής μεγάλου αριθμού απογόνων από ζώα υψηλής γενετικής αξίας. Παρόλα αυτά, η *in vitro* παραγωγή εμβρύων θα μπορούσε να συμβάλλει στην αντιμετώπιση της ΘΚ και των δυσμενών επιπτώσεων της στη γονιμότητα. Με τη μέθοδο αυτή, είναι δυνατή η παραγωγή εμβρύων κατά τους χειμερινούς μήνες, κατά τη διάρκεια των οποίων η ποιότητα των ωαρίων είναι καλύτερη αυτής των θερινών μηνών, διασφαλίζοντας, κατά συνέπεια, την παραγωγή και τη διαθεσιμότητα προς μεταφορά, βλαστοκύστεων ανώτερης ποιότητας. Με δεδομένη την θερμοαντοχή των βλαστοκύστεων σε σχέση με τα πρώιμα έμβρυα, τα κατεψυγμένα έμβρυα μπορούν να μεταφερθούν στις αγελάδες δέκτριες το καλοκαίρι, αυξάνοντας -θεωρητικά- τις πιθανότητες εγκατάστασης και εξέλιξης τους. Επιπλέον, η εφαρμογή της *in vitro* παραγωγής συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης της ΘΚ στα υπό ωρίμανση ωάρια και στα πρώιμα έμβρυα. Δεδομένου ότι, η ωρίμανση και η γονιμοποίηση του ωαρίου καθώς και η ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου *in vitro* αποτελούν διαδικασίες που πραγματοποιούνται σε μη προσπελάσιμο τμήμα του γεννητικού συστήματος της αγελάδας, η μελέτη των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα σε συνθήκες ΘΚ, διευκολύνεται με τη διενέργεια *in vitro* τεχνικών σε συνθήκες προσομοίωσης του γεννητικού σωλήνα του θηλυκού.

Κατά συνέπεια, οι κύριοι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν:

1. να διερευνηθεί η επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών, στα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων καθώς και στην ποιότητα τους με βάση τη συγκριτική μελέτη έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.
2. να διερευνηθεί ο ρόλος της Hsp70 στην *in vitro* ωρίμανση ωαρίων βοοειδών, και να αξιολογηθεί η δράση της ως προς την ποσοτική απόδοση σε έμβρυα και την ποιότητα τους, όπως αυτή εκτιμάται με βάση το πρότυπο έκφρασης μιας σειράς σημαντικών γονιδίων.
3. να συγκριθεί ο βαθμός επίδρασης της αυξημένης θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών, στα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων καθώς και στην ποιότητα τους μεταξύ δύο βασικών ευρωπαϊκών φυλών, των Holstein και των Limousine.
4. να διερευνηθεί ο ρόλος της Hsp70 κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των εμβρύων, με κριτήριο τα ποσοστά εξέλιξης των εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης και στην ποιότητα αυτών.
5. να μελετηθούν οι πιθανές επιπτώσεις της θερινής ΘΚ στο περιβάλλον του ωαγωγού, με αξιολόγηση της μεταγραφικής ικανότητας των κυττάρων του επιθηλίου του ωαγωγού και των ποσοτικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των εξωκυτταρικών κυστιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής ωρίμανσης, στην παραγωγή και στην ποιότητα εμβρύων βοοειδών

Εισαγωγή

Όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1, η ΘΚ αποτελεί τη σημαντικότερη περιβαλλοντική απειλή για την παγκόσμια βιομηχανία παραγωγής γάλακτος. Εξαιτίας της υπερθέρμανσης του πλανήτη, οι επιπτώσεις της ΘΚ που παραδοσιακά εντοπίζονταν σε τροπικές, υποτροπικές και περιοχές της Μεσογείου, έχουν επεκταθεί πλέον σε πιο βόρεια ή νότια, ανάλογα με το ημισφαίριο, γεωγραφικά πλάτη. Οι δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής εκδηλώνονται με αύξηση της εσωτερικής θερμοκρασίας, ταχύπνοια, αυξημένη νοσηρότητα ή/και θνησιμότητα (Lacetera 2019), μείωση της πρόσληψης ξηράς ουσίας, και κατά συνέπεια της γαλακτοπαραγωγής, περιορισμό της ημερήσιας πρόσκτησης βάρους και μειωμένη γονιμότητα (Liu *et al.* 2019, De Rensis & Scaramuzzi 2003, Ealy *et al.* 1993). το τελευταίο να αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη αρνητική επίπτωση της ΘΚ στις αγελάδες, διότι συντελεί στη διεύρυνση του μεσοδιαστήματος τοκετών, καθιστώντας επισφαλή την παραμονή των αγελάδων στην αγέλη.

Κατά τους θερινούς μήνες, τα ποσοστά σύλληψης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής μειώνονται δραματικά σε σύγκριση με εκείνα της χειμερινής περιόδου του έτους (De Rensis *et al.* 2002, Badinga *et al.* 1985). Πληθώρα ερευνητικών αποτελεσμάτων αποδεικνύουν ότι η μειωμένη γονιμότητα το καλοκαίρι αποτελεί την τελική έκβαση ενός συνδυασμού μεταβολών στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, στο περιβάλλον ωαγωγού/μήτρας και στην ανάπτυξη του εμβρύου πριν την εγκατάσταση (De Rensis & Scaramuzzi 2003, Wolfenson *et al.* 2000). Ιδιαίτερης σημασίας για την αδιάλειπτη λειτουργία των εκτροφών αποτελεί το γεγονός ότι η έκθεση των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη ΘΚ το καλοκαίρι, συνήθως ακολουθείται από μειωμένη γονιμότητα, η οποία παραμένει και κατά τους φθινοπωρινούς μήνες ακόμα και όταν η έκθεση σε ΘΚ έχει υποχωρήσει (Roth *et al.* 2001a,b, Badinga *et al.* 1985). Δεδομένου ότι απαιτούνται 40-50 ημέρες ώστε ένα τριτογενές ωοθυλάκιο να φτάσει στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (Lussier *et al.* 1987), είναι προφανές ότι το ωοθυλάκιο και το περικλειόμενο ωάριο αποτελούν τα πιο ευάλωτα τμήματα στον καταστρεπτικό κύκλο της θερινής υπογονιμότητας. *In vivo* μελέτες έχουν αποδείξει ότι, κατά τις περιόδους ΘΚ, η διάρκεια της κυριαρχίας του ωοθυλακίου είναι σημαντικά μεγαλύτερη, αλλά ο βαθμός κυριαρχίας μειώνεται (Badinga *et al.* 1993), οδηγώντας σε μειωμένη γονιμότητα του περικλειόμενου ωαρίου (Mihm *et al.* 1994). Η άμεση επίδραση της ΘΚ στο ανώριμο ωάριο έχει μελετηθεί εκτενώς σε *in vitro* μοντέλα και έχει αναφερθεί σε πληθώρα

ερευνητικών εργασιών (Wang *et al.* 2009, Paula-Lopes *et al.* 2008, Roth & Hansen 2004, Edwards & Hansen 1996). Από τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών αναδεικνύεται ότι η έκθεση των ανώριμων ωαρίων σε υψηλές θερμοκρασίες (40°C-41.5°C) επάγει μεταβολές στην ωρίμανση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα. Η *in vitro* ωρίμανση υπό συνθήκες ΘΚ έδειξε ότι σημαντικός αριθμός ωαρίων δεν ωριμάζουν φυσιολογικά, είτε διότι αποτυγχάνουν να εξελιχθούν στο στάδιο της μετάφασης II (MII) (Roth & Hansen 2005, Payton *et al.* 2004) ή βρίσκονται στο στάδιο της MII στις 16-18 ώρες της *in vitro* ωρίμανσης (IVM), γεγονός που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επιταχυσμένη ωρίμανση (Edwards *et al.* 2005). Η διατάραξη της ωρίμανσης των ωαρίων που έχουν εκτεθεί σε ΘΚ αποδίδεται σε σειρά παραγόντων, όπως των έντονων αποπτωτικών διεργασιών που επάγονται από την αυξημένη κατάρτιση του DNA στον πυρήνα (Ju *et al.* 2005, Roth & Hansen 2004) ή λόγω των διαταραχών που προκαλούνται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Soto & Smith 2009). Η κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων είναι μία σταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει την αναδιοργάνωση των φλοιικών κοκκίων, των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου, προκειμένου να υποστηριχθεί ο σχηματισμός του προπυρήνα, η γονιμοποίηση και η ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Erpigg *et al.* 1996). Σε αυτές τις μεταβολές του ωοπλάσματος, τα μικροϊνίδια και οι μικροσωληνίσκοι κατέχουν κυρίαρχο ρόλο (Sun & Schatten 2006). Παρεμπόδιση της αναδιοργάνωσης του κυτταροπλάσματος, περιλαμβανομένης της ατελούς μετανάστευσης των φλοιικών κοκκίων και της παρεμπόδισης της κατανομής των μιτοχονδρίων και της λειτουργίας τους, αναφέρονται συχνά σε ωάρια που έχουν εκτεθεί σε ΘΚ (Roth & Hansen 2005, Payton *et al.* 2004). Η ποιότητα των ωαρίων που έχουν υποβληθεί σε ΘΚ μειώνεται περαιτέρω λόγω του οξειδωτικού stress. Η αύξηση των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο ωάριο συμβάλλει στην καταστροφή του DNA, επάγει αποπτωτικά φαινόμενα και συμβάλλει στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (Nabenishi *et al.* 2012b, Ozawa *et al.* 2002).

Η ολοκλήρωση της ωρίμανσης, η ικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου καθώς και η ικανότητα ανάπτυξης του πρώιμου εμβρύου εξαρτώνται άμεσα από τη λειτουργική ακεραιότητα των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, που το περιβάλλουν (Geshi *et al.* 2000). Οι χασματοσυνδέσεις μεταξύ του ωαρίου και των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, επιτρέπουν την ανταλλαγή μεταβολικών υποστρωμάτων και δευτερογενών αγγειοφόρων ουσιών (Kidder & Vanderhyden 2010). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, οι χασματοσυνδέσεις καταστρέφονται, ωστόσο τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, που συνεχίζουν να περιβάλλουν το ωάριο, δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που συμμετέχει ενεργά τόσο στην ωοθυλακιορρηξία, όσο και στη διαδικασία της γονιμοποίησης (Russell & Robker 2007, Hyttel *et al.* 1986). Όταν τα COCs εκτεθούν στους 41°C για 12 ώρες, παρατηρείται σειρά μεταβολών στα επίπεδα μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την εξωκυττάρια περιοχή στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, γεγονός που ενδεχομένως οδηγεί σε παρεμπόδιση της ωρίμανσης του ωαρίου (Rispoli *et al.* 2013). Ο σημαντικός ρόλος των παραγόντων που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου στη διαδικασία της ωρίμανσης του ωαρίου καταδεικνύεται περαιτέρω από την παρατήρηση ότι τα απογυμνωμένα ωάρια αποκτούν την ικανότητα να εξελιχθούν σε βλαστοκύστες όταν ωριμάζουν *in vitro* παρουσία άθικτων συμπλεγμάτων κυττάρων ωοφόρου δίσκου-ωαρίων (Luciano *et al.* 2005).

Η πλειονότητα των εργασιών που μελετούν την επίδραση της ΘΚ στο υπό ωρίμανση ωάριο, στηρίζονται σε πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν την έκθεση των COCs σε αυξημένη θερμοκρασία για 12 έως 24 ώρες. Η απομάκρυνση του ωαρίου από το ωοθυλακικό περιβάλλον επιφέρει επανέναρξη της μείωσης, με παράλληλη αποδιάταξη του βλαστικού κυστιδίου (πυρήνα), που συνοδεύεται με εξαφάνιση της πυρηνικής μεμβράνης (GVBD στάδιο) (Pincus & Enzmann 1935). Η διαδικασία της ωρίμανσης περιλαμβάνει δομικές και χημικές αλλαγές στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Οι μεταβολές αυτές απαιτούν *de novo* πρωτεϊνσύνθεση, φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και σύνθεση RNA στο ωάριο και στα περιβάλλοντα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (Motlík & Kubelka 1990). Αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών ή RNA κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων ωρών της IVM μειώνει σημαντικά το ποσοστό των ωαρίων που φτάνουν στο στάδιο GVBD (Tatemoto & Terada 1995, Kastrop *et al.* 1991). Συνεπώς, θεωρείται ότι, η τροποποίηση της θερμοκρασίας μετά τη 2^η ώρα της *in vitro* ωρίμανσης, δεν θα αποκλείσει τα COCs, ειδικά εκείνα που προέρχονται από μικρά ωοθυλάκια, να αποκτήσουν μια αρχική ικανότητα ωρίμανσης. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας κατά το κρίσιμο 6ωρο διάστημα της ωρίμανσης (2^η έως 8^η ώρα της IVM) στο ποσοστό απόδοσης σε βλαστοκύστες και στις μοριακές αλλαγές στα ωάρια, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και στα νεαρά έμβρυα. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης μιας σειράς γονιδίων, που σχετίζονται με το μεταβολισμό, το οξειδωτικό και θερμικό stress, την απόπτωση σε ωάρια, κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και βλαστοκύστες, και τη δυνατότητα ανάπτυξης λειτουργικού πλακούντα στις βλαστοκύστες. Επιπλέον, διερευνήθηκε η συσχέτιση των προτύπων έκφρασης ομάδων γονιδίων σε σχέση με τη μεταβολή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro παραγωγή εμβρύων

Εκτός των περιπτώσεων που αναφέρονται διαφορετικά, όλα τα χημικά προμηθεύτηκαν από τη Sigma Chemical Company (Poole, UK). Η *in vitro* παραγωγή εμβρύων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το από δεκαετίας υφιστάμενο και καθιερωμένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου μας (Dovolou *et al.* 2011, 2014). Η παρασκευή των υποστρωμάτων παρατίθεται στο Παράρτημα της παρούσας διατριβής.

- Συλλογή Ωαρίων

Για τη συλλογή των COCs χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες αγελάδων φυλών Holstein, Limousine ή/και μιγάδων, που συλλέγονταν από σφαγεία και μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός 2 ωρών από τη σφαγή, σε ισοθερμικό δοχείο σε θερμοκρασία 37°C. Το υπόστρωμα μεταφοράς περιείχε φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%, ΒΙΟΣΕΡ, Τρίκαλα, Ελλάδα) και 0,1% v/v γενταμυκίνη (Gentamycin sulphate 5% injection, BREMER PHARMA GMBH, Germany). Αμέσως μετά την άφιξη στο εργαστήριο οι ωοθήκες πλένονταν 3 φορές με θερμό φυσιολογικό ορό και διατηρούνταν στους 37°C. Η συλλογή των COCs γινόταν από ωοθυλάκια διαμέτρου

3mm έως 8mm, με αναρρόφηση του περιεχομένου τους, μέσω υποδερμικής βελόνας 22g συνδεδεμένης σε

σύριγγα 10ml. Το περιεχόμενο των ωοθυλακίων τοποθετούταν σε κωνικό φιαλίδιο των 50ml, και παρέμενε ακίνητο για 10-15 λεπτά μέχρι την ολοκλήρωση της καθίζησης των COCs. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρούνταν, και το ίζημα εξεταζόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση για τη συλλογή των COCs. Τα μορφολογικά κριτήρια με βάση τα οποία επιλέγονταν τα ωάρια ήταν αυτά της 1^{ης} και 2^{ης} κατηγορίας, σύμφωνα με τα κριτήρια των de Loos *et al.* (1989) και Younis *et al.* (1989). Στην 1^η κατηγορία κατατάσσονταν τα ωάρια με ομοιογενές και διάφανο ωόπλασμα, των οποίων ο ωοφόρος δίσκος απαρτιζόταν από πολλές συμπαγείς στιβάδες κυττάρων, ενώ στη 2^η κατηγορία ανήκαν εκείνα τα οποία είχαν λιγότερο διαυγές ωόπλασμα και περιβάλλονταν από τουλάχιστον 3 συμπαγείς στιβάδες κυττάρων. Συνολικά, συλλέχθηκαν 1517 COCs, 1322 εκ των οποίων πληρούσαν τα απαραίτητα μορφολογικά κριτήρια και κατανεμήθηκαν σε δυο ομάδες (μάρτυρες C, n= 520, και ομάδα έκθεσης σε αυξημένη θερμοκρασία T, n=802).

- Εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων

Η ωρίμανση πραγματοποιούταν σε υπόστρωμα ωρίμανσης TCM199 εμπλουτισμένο με 10 ng/ml Επιδερμικό Αυξητικό Παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και 10% Ορό Εμβρύου Μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS) σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, με μέγιστη υγρασία. Η θερμοκρασία ωρίμανσης ήταν για την ομάδα C 39°C καθ' όλη τη διάρκεια της IVM, ενώ στην ομάδα T η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 41°C από τη 2^η έως την 8^η ώρα της IVM.

- Εξωσωματική γονιμοποίηση

Τα ώριμα COCs γονιμοποιήθηκαν με καταψυγμένο/αποψυγμένο σπέρμα τάυρου. Σε όλα τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε σπέρμα του ίδιου τάυρου φυλής Holstein, γνωστής *in vivo* και *in vitro* γονιμότητας, από το ίδιο εκσπερμάτισμα, σε τελική συγκέντρωση των 1x10⁶ σπερματοζωάρια/ml. Για την ενεργοποίηση του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος swim-up. Το υπόστρωμα ενεργοποίησης αποτελούταν από Tyrode's medium, που περιείχε NaHCO₃, γαλακτικό, πυρουβικό, γενταμικίνη, 6mg/ml αλβουμίνη ορού μόσχου (BSA) και 2.4mg/ml HEPES. Το υπόστρωμα Tyrode's χρησιμοποιούταν ως τυποποιημένο υπόστρωμα της IVF, και περιείχε NaHCO₃, γαλακτικό, πυρουβικό, γενταμικίνη, 1xBME απαραίτητα αμινοξέα, 1xMEM μη-απαραίτητα αμινοξέα, 10μg/ml ηπαρίνη, 1mg/ml υποταυρίνη και 6mg/ml BSA. Οι γαμέτες συν-επώαζονταν για 20 ώρες στους 39°C, με 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία.

-Εξωσωματική καλλιέργεια εμβρύων

Κατά προσέγγιση 20 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (pi), τα πιθανά ζυγωτά κάθε ομάδας απογυμνώθηκαν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου μέσω διαδοχικών διαβάσεων δια μέσου λεπτής γυάλινης πιπέτας, έγινε έκπλυση τους σε PBS και διαχωρίστηκαν σε ομάδες των 25, σε μικροσταγόνες των 25μl που καλύφθηκαν με παραφινέλαιο. Τα πιθανά ζυγωτά καλλιεργήθηκαν *in vitro*, στους 39°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 5% O₂ και 90% N₂, με μέγιστη υγρασία. Το υπόστρωμα καλλιέργειας και για τις δυο ομάδες ήταν συνθετικό υγρό ωαγωγού (Synthetic Oviductal Fluid, SOF), του οποίου η χημική σύνθεση και η διαδικασία παραγωγής αναλύονται στο Παράρτημα.

Η εκτίμηση του ποσοστού αυλάκωσης (cleavage rate) στα πρώιμα έμβρυα και του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων πραγματοποιούνταν 48 ώρες και 7, 8, και 9 ημέρες *pi*, αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκαν 8 πειραματικές επαναλήψεις *in vitro* παραγωγής εμβρύων

Επιπλέον σε 5 από τις ως άνω 8 επαναλήψεις, ώριμα ωάρια, που περιβάλλονταν από αναπτυγμένη στιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, απογυμνώθηκαν μηχανικά με επανειλημμένες διόδους των COCs διαμέσου λεπτής πιπέτας. Τα ωάρια (ομάδες των 10), τα κύτταρα των ωοφόρων δίσκων, και βλαστοκύστες ημέρας 7 (ομάδες των 10) συλλέχθηκαν χωριστά, καταψύχθηκαν με εμβάπτιση του περιέκτη σε υγρό άζωτο και συντηρήθηκαν έως τη διενέργεια των αναλύσεων για την έκφραση διαφόρων γονιδίων.

Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του PicoPure RNA Isolation Kit (Thermofisher Scientific), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για τη μετέπειτα κατεργασία με DNάση, χρησιμοποιήθηκε το DNA-free DNA Removal Kit (Thermofisher Scientific). Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Themofischer Scientific) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 15ng ολικού DNA και συνδυασμό ολιγονουκλεοτιδίων-T και τυχαίων εκκινητών. Τα δείγματα του cDNA αραιώθηκαν περαιτέρω (1:2 για τα ωάρια, 1:5 για τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τις βλαστοκύστες) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

Ο κύριος σκοπός ήταν να εντοπιστεί η διαφορική γονιδιακή έκφραση (Differential Gene Expression, DGE) και ρύθμιση μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων (39°C vs 41°C), αξιολογώντας τη σχετική έκφραση γονιδίων, που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως την ανταπόκριση στο οξειδωτικό και θερμικό stress, τον κυτταρικό κύκλο, τις μεταβολικές διεργασίες, καθώς και την ανάπτυξη του εμβρύου. Στα ωάρια, αναλύθηκε η έκφραση των *HSPB11*, *HSP90AA1*, *HSPA1A* (heat-shock πρωτεΐνες), *MnSOD*, *GPX1* (αντιοξειδωτική δραστηριότητα), *G6PD* (μεταβολισμός) και *CCNB1* (κυτταρικός κύκλος). Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου μελετήθηκε η έκφραση των *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSPB11*, *MnSOD*, *GPX1* (αντιοξειδωτική δραστηριότητα), *GLUT1*, *PTGS2*, *CPT1B*, *G6PD*, *LDHA* (μεταβολισμός), *GREM1* (κυτταρικός δείκτης ποιότητας), *CCNB1* (κυτταρικός κύκλος). Τέλος, στις βλαστοκύστες ελέγχθηκε η έκφραση των *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *GPX1*, *MnSOD* (αντιοξειδωτική δραστηριότητα), *AKR1B1*, *GLUT1*, *PTGS2* (μεταβολισμός), *IGF2R* (κυτταρικός δείκτης ποιότητας), *DNMT3A* (ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης), *BAX* (απόπτωση) και *PLAC8* (δυνατότητα ανάπτυξης πλακούντα / εμβρυϊκή ανάπτυξη).

Η εφαρμογή της Real time PCR (qPCR) έγινε με τη χρήση του SYBR Green Technology with an AB Step One Plus Mastercycler (Applied Biosystems). Η ανάλυση qPCR πραγματοποιήθηκε σε όγκο αντίδρασης 20 μl με προσθήκη 1.5 μl cDNA στο PCR mix που περιείχε ειδικούς γονιδιακούς εκκινητές (τελική συγκέντρωση 300 nM) και 1x KAPA SYBR FAST qPCR Master mix (Sigma-Aldrich). Οι συνθήκες για την qPCR ήταν 5 λεπτά

στους 95°C και 40 κύκλοι των 20 δευτερολέπτων στους 95°C και των 20 δευτερολέπτων στους 60°C για τον υβριδισμό (annealing) και την επιμήκυνση (extension). Στο τέλος κάθε αντίδρασης, γινόταν ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve analysis), ώστε να διασφαλιστεί η ειδικότητα των προϊόντων. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν, και εφαρμόστηκε μια μέγιστη διαφορά της τάξης του ± 0.2 στις τιμές Cq ως κατώφλι στις διπλές μετρήσεις. Τα ζεύγη των εκκινητών για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν με τη χρήση των Primer-BLAST και Primer3 (Untergasser *et al.* 2007). Προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα που θα μπορούσαν να παρέμβουν στην αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων, τα διμερή των εκκινητών, ο σχηματισμός «φουρκέτας» κλπ., τα ζεύγη των εκκινητών αξιολογήθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>). Η πλήρης λίστα των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Η σχετική έκφραση όλων των γονιδίων εξομαλύνθηκε με τη χρήση τριών γονιδίων αναφοράς: *YWHAZ*, *UBA52* και *EEF1A1*. Η καταλληλότητα των γονιδίων αναφοράς αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το GeNorm, και η τιμή M ως ένδειξη της σταθερότητας της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων.

Για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε η συνδυαστική προσέγγιση LinReg – Quantification Cycle (Cq): οι τιμές Cq ανακτήθηκαν για κάθε αντίδραση θέτοντας ένα σταθερό κατώφλι και οι μέσες τιμές για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού LinReg, όπως αυτό έχει προταθεί από τους Ramakers *et al.* (2003). Η σχετική έκφραση των γονιδίων εξομαλύνθηκε χρησιμοποιώντας το γεωμετρικό μέσο όρο των τριών γονιδίων αναφοράς.

Πίνακας 2: Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για τη real time PCR και μέγεθος προϊόντος.

Gene name	Gene description	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size (bp)
HSP90A1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	CTGGAAGGAGACGACGACAC	ACACACTGGAGGGAATGGAG	103
PLAC8	placenta-specific 8	GTTTCACAGCCAGGTTACAGC	AGAGCCCCACAGAGACAGAT	104
GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist	TTCTACATCCCCAGGCACAT	CAGGACAGTTGAGAGTGACCA	105
AKR1B1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	GAAAGTGGTGAAGCGTGAGG	TAGAGGTCCAGGTAGTCCAGC	129
SLC2A1	solute carrier family 2 member 1	AGCGTCATCTTCATCCCA GC	GGTTCTCCTCGTTGCGGT TA	97
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70)	GGACCTGCTGTTGCTGG	TTCGTGGGGATGGTGGAG	103

	member 1A	AC	TT	
GPX1	glutathione peroxidase 1	GAAAAGTGCGAGGTGAA TGG	GAGAGCAGTGGCGTCGTC	93
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	TTTGCTTCAGGGTTTCAT CC	CGCTTCAGACACTCGCTC AG	120
LDHA	lactate dehydrogenase A	GCTCGCTTCCGTTATCTC AT	TCCACTCCATACAGGCAC AC	108
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ACCAACCGCCTCTTCTAC CT	ACGGCTTCTCCACGATGA T	118
UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	CCGCAAGAAGAAGTGTG GC	GCAAAGGAGAAGCAGGT GGA	84
SOD2	superoxide dismutase 2	GCAGCAAGTAAACCGTC AGC	ACACTACAACAGAGCAG CGT	108
IGF2R	insulin like growth factor 2 receptor	GGACTACAGGCATCAGG ACG	AACACGAAGGGGAACAC ACA	105
YWHAZ	tyrosine 3- monooxygenase/trypto phan 5- monooxygenase activation protein zeta	CTGTAAGTGAAGCAAGGA GC	CCAAGATGACCTACGGGC	95
HSPB11	heat shock protein family B (small) member 11	AGAGGAGGCGGAGGACG G	GGTGATAGGGCACGAAG CAA	117
CCNB1	cyclin B1	ATACTCCCTCTCCAAGCC CC	ATCCGCTCCGTCTTCTGC	122
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	CCCCAGGACACAGAGAC TTC	ATTCACCAACACCAGCAG CA	93
PTGS2	prostaglandin- endoperoxide synthase 2	AGTCTTTGGTCTGGTGCC TG	AACAAGTGTCTATCGCCC C	117
CPT1B	carnitine palmitoyltransferase 1B	TCTCCAGCAAGTTCTCCA GC	ATCTCTCCAGCCCTTAGC CA	126
DNMT3A	DNA methyltransferase 3	GAAGGAGCATTTGGGAA CAG	GTTATTGCGTGAGCCTGG AT	117

	alpha			
--	-------	--	--	--

Στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των ποσοστών αυλάκωσης και της παραγωγής βλαστοκύστεων μεταξύ των πειραματικών ομάδων χρησιμοποιήθηκε το two-tailed student's t-test.

Η στατιστική ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του R και πιο συγκεκριμένα:

- Το στατιστικό στοιχείο δοκιμής Welch μεταξύ του μάρτυρα και της ομάδας που υποβλήθηκε σε αγωγή υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση t-test για κάθε γονίδιο.
- Οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για κάθε ζεύγος γονιδίων σε κάθε ομάδα χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση cor, καθώς η συσχετισμένη γονιδιακή έκφραση μπορεί να είναι ενδεικτική για έναν παρόμοιο μηχανισμό ρύθμισης που διέπει την έκφραση του γονιδίου. Ωστόσο, αυτά τα γονίδια μπορεί να μην έχουν την ίδια τάση υπό όλες τις πειραματικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό, οι συντελεστές υπολογίστηκαν μετά από υποομαδοποίηση των δειγμάτων στις ομάδες των μαρτύρων και αυτών που υποβλήθηκαν στην αγωγή.
- Εφαρμόστηκε το χ^2 test στη συνάρτηση *cortest.mat* function στα ζεύγη συσχέτισης (control vs treated) για να ελεγχθεί η ισότητα μεταξύ τους (π.χ. για να ελεγχθεί εάν οι συντελεστές συσχέτισης διαφέρουν στατιστικά μεταξύ των δύο συνθηκών).
- Η μη εποπτευόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση *hclust* και οι αντίστοιχες αποστάσεις για κάθε ομάδα δειγμάτων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους συντελεστές συσχέτισης (Απόσταση = $1 - \text{Συντελεστής συσχέτισης}^2$). Η ανάλυση των ομάδων είχε ως αποτέλεσμα τη γραφική αναπαράσταση συσχετισμένων γονιδιακών ομάδων με χρήση του *plot*. Οι μη εποπτευόμενες τεχνικές ομαδοποίησης προτιμώνται από τις εποπτευόμενες τεχνικές ομαδοποίησης, καθώς ο αριθμός των ομάδων είναι άγνωστος, εκ των προτέρων, για κάθε σύνολο δειγμάτων.

Αποτελέσματα

In vitro παραγωγή εμβρύων

Κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής ωρίμανσης των ωαρίων, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 2°C για έξι συνολικά ώρες, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) του ποσοστού αυλάκωσης στην ομάδα T σε σύγκριση με την ομάδα C. Στη συνέχεια στην ομάδα T, ο ρυθμός παραγωγής βλαστοκύστεων, σε όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, ήταν σημαντικά μικρότερος ($p < 0.001$) από τον αντίστοιχο της ομάδας C. Τα αναλυτικά αποτελέσματα, που αφορούν συνολικά στα ποσοστά εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων σε 2 ομάδες COCs που ωρίμασαν στους 39°C (ομάδα C) ή στους 41°C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).

Ομάδα	COCs	Βλαστοκύστες			
		αυλάκωση (%)	ημέρα 7 (%)	ημέρα 8 (%)	ημέρα 9 (%)
Control (C)	520	429 (81.8±9.5)*	147 (28.3±7.7)**	175 (33.7±6.7)**	185 (35.6±5.9)**
Treated (T)	802	587 (73.2±8.1)	134 (16.7±6.1)	148 (18.5±7.3)	157 (19.6±7.8)

Τα αποτελέσματα αφορούν σε 8 επαναλήψεις, και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα. Τα αποτελέσματα που είναι επισημασμένα με αστερίσκο διαφέρουν σημαντικά (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

Εκφράσεις γονιδίων

-Ωάρια

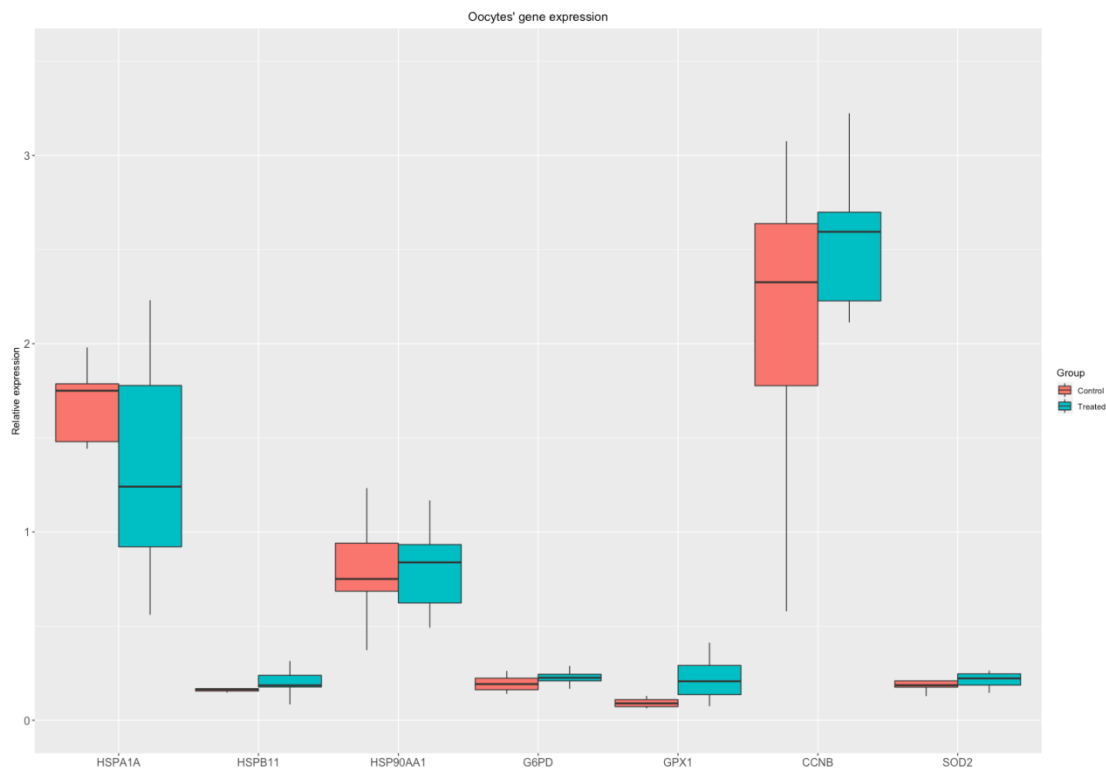
Τα τρία γονίδια αναφοράς παρουσίασαν σταθερή έκφραση στους 3 τύπους κυττάρων, με τιμές M κάτω του ορίου του 0.15 (πχ 0.027, 0.030 και 0.027 για τα *UBA52*, *EEF1A1* και *YWHAZ* αντίστοιχα στα ωάρια με CV≈10%). Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των ωαρίων, των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και των βλαστοκύστεων. Η έκφραση του *CCNB1* ήταν 5 φορές υψηλότερη στα ωάρια σε σύγκριση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Επίσης, όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν Hsps παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση στα ωάρια. Ειδικότερα, η έκφραση του *HSPA1A* ήταν 7 φορές και 2.4 φορές μεγαλύτερη στα ωάρια σε σύγκριση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τις βλαστοκύστες, αντίστοιχα; η έκφραση του *HSP90AA1* ήταν 4.5 φορές υψηλότερη στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου σε σχέση με τις βλαστοκύστες; και αυτή του *HSPB11* ήταν 5 φορές υψηλότερη στα ωάρια σε σχέση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Αντιθέτως, τα ωάρια παρουσίασαν τη χαμηλότερη συνολικά, έκφραση του *GPX1*. Τέλος, η έκφραση του *PTGS2* στις βλαστοκύστες ήταν 2.5 φορές μεγαλύτερη από αυτή των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Γραφήματα 3 και 5).

Στο γράφημα 1 φαίνεται ότι δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των δύο ομάδων στα ωάρια. Ωστόσο, η έκφραση των *GPX1*, *MnSOD* και *G6PD* έδειξε ισχυρή τάση να διαφέρει μεταξύ των ωαρίων των ομάδων C και T ($0.05 < p < 0.07$).

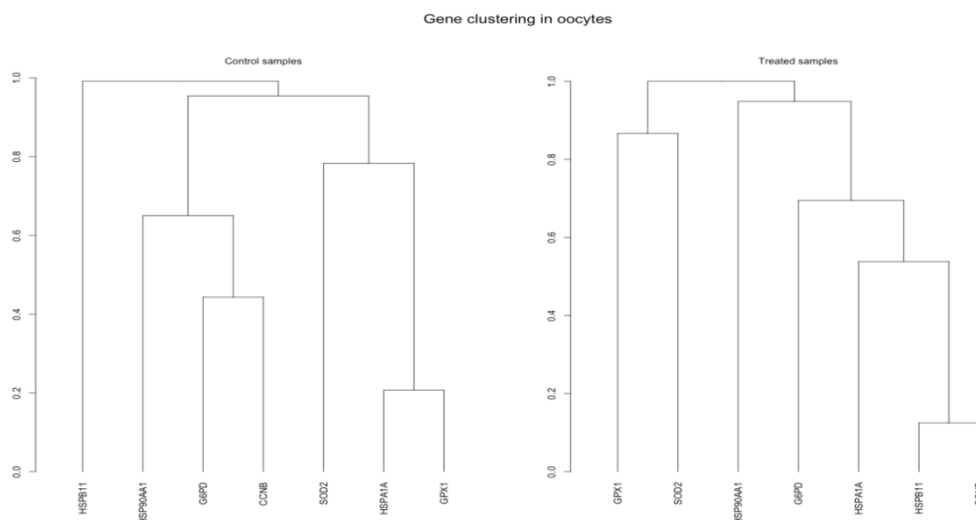
Η ιεραρχική συσχέτιση των γονιδίων αποκάλυψε σταθερή συσχέτιση μεταξύ των *MnSOD* και *GPX1* τόσο στην ομάδα C όσο και στην ομάδα T, υποδεικνύοντας συντονισμένη ρύθμιση των δύο γονιδίων, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Επίσης, η έκθεση των ωαρίων σε αυξημένη θερμοκρασία οδήγησε σε στενή συσχέτιση

των *HSPA1A*, *HSPB11* και *CCNB1*, υπογραμμίζοντας τη συνήθη ανταπόκριση στην αυξημένη θερμοκρασία από τα βασικά στοιχεία του κυτταρικού κύκλου και της θερμοανθεκτικότητας (Γράφημα 2).

Γράφημα 1: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 7 γονιδίων σε ωάρια που ωρίμασαν στους 39°C (ομάδα C) ή στους 41°C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



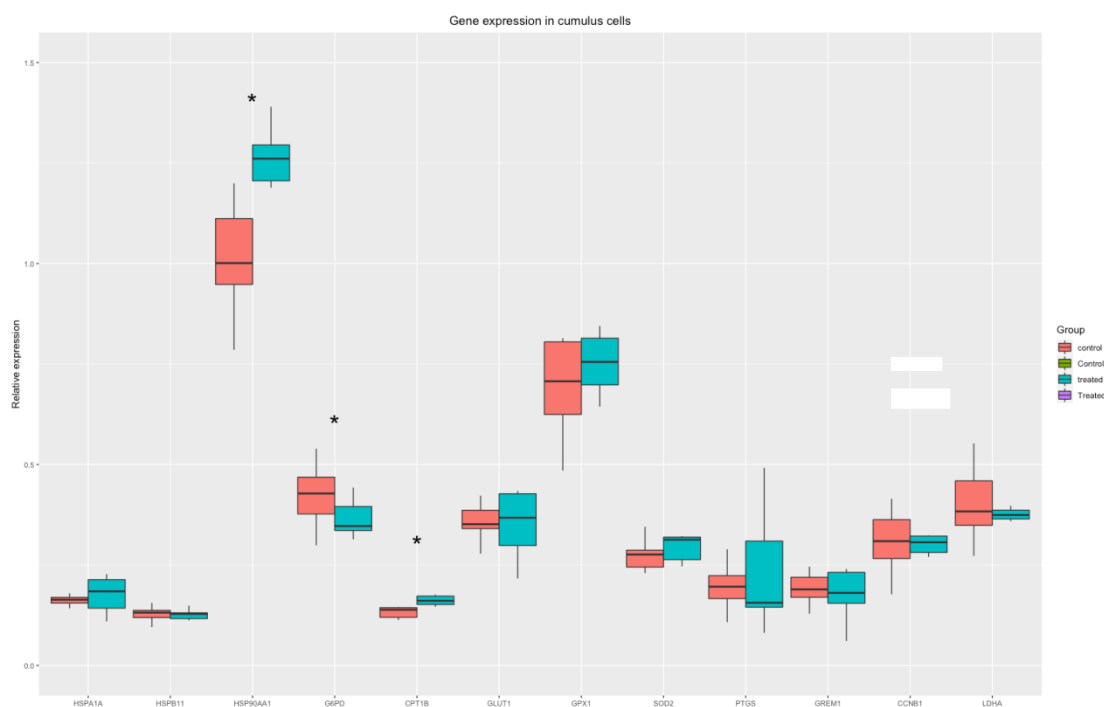
Γράφημα 2: Ιεραρχική συσχέτιση των γονιδίων σε ωάρια που ωρίμασαν στους 39°C (ομάδα C) ή στους 41°C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



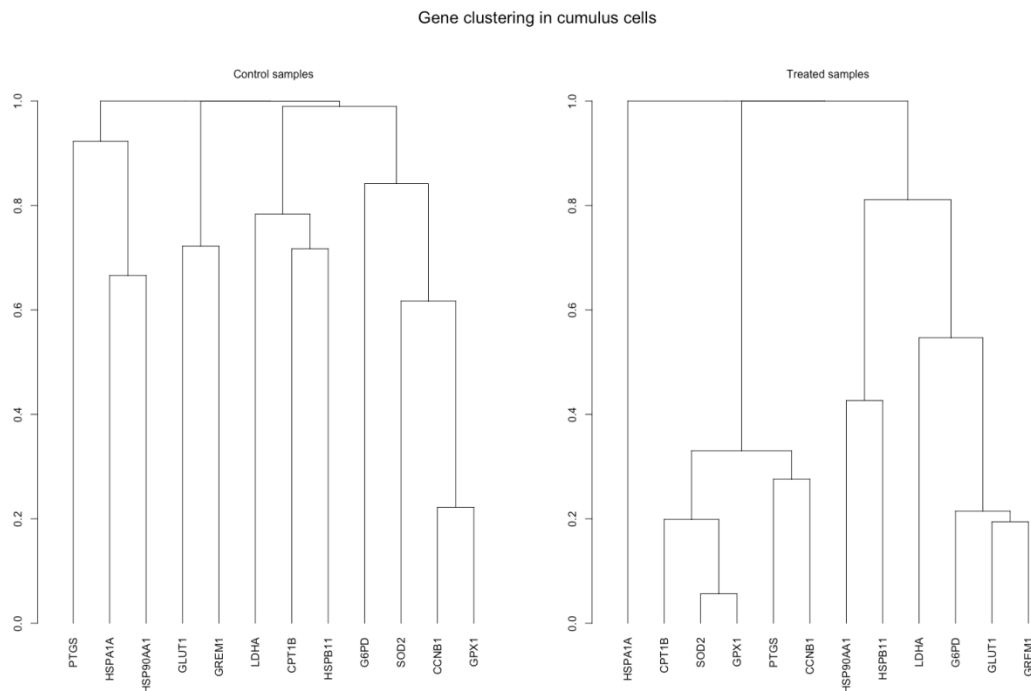
-Κύτταρα Ωοφόρου Δίσκου

Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου ανταποκρίθηκαν στη ΘΚ με σημαντική αύξηση της έκφρασης των *HSP90AA1*, *G6PD* και *CPT1B*. Τα *MnSOD* και *GPX1* ήταν και εδώ στενά συνδεδεμένα και στις δύο ομάδες κυττάρων (Γράφημα 3). Τα *GREM1* και *GLUT1* εμφάνισαν επίσης σταθερή συσχέτιση ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία ωρίμανσης. Η συσχέτιση των *HSP* γονιδίων διαφοροποιήθηκε ανάλογα με τη θερμοκρασία ωρίμανσης; το *HSP90AA1* ομαδοποιήθηκε με το *HSPB11* στην ομάδα T ενώ στην ομάδα των μαρτύρων με το *HSPA1A*. Επιπλέον, η αυξημένη θερμοκρασία οδήγησε σε συντονισμένη ανταπόκριση τριών γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης (*LDHA*, *G6PD* και *SLC2A1*), που στην ομάδα T, ομαδοποιήθηκαν με το *GREM1* (Γράφημα 4).

Γράφημα 3: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 12 γονιδίων σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που καλλιεργήθηκαν στους 39°C (ομάδα C) ή στους 41°C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



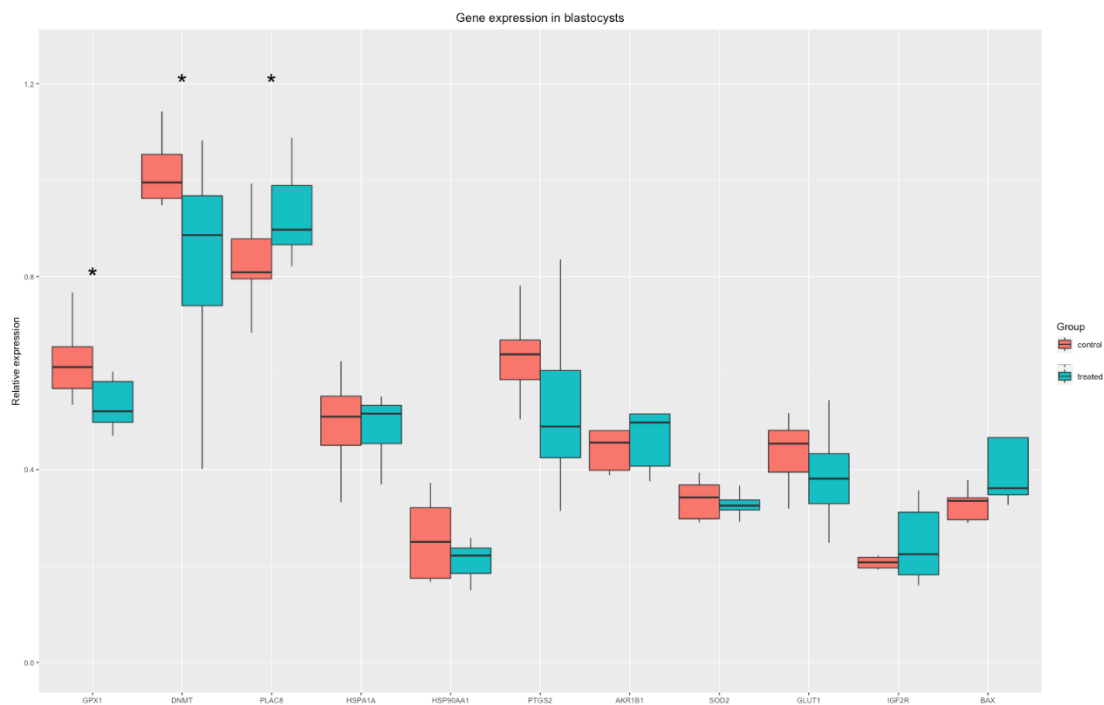
Γράφημα 4: Ιεραρχική συσχέτιση των γονιδίων σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που ωρίμασαν στους 39⁰C (ομάδα C) ή στους 41⁰C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



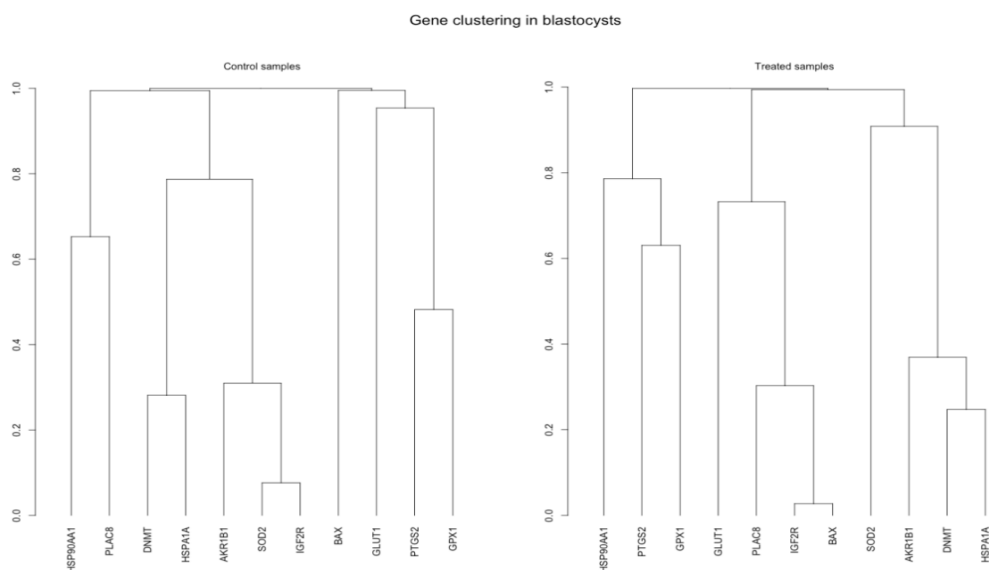
-Βλαστοκύστες

Τα επίπεδα έκφρασης των *GPX1*, *DNMT3A* και *PLAC8* διέφεραν σημαντικά μεταξύ των βλαστοκύστεων των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, στις βλαστοκύστες της ομάδας T η έκφραση των *GPX1*, *DNMT3A* μειώθηκε, ενώ αυτή του *PLAC8* ήταν σημαντικά αυξημένη. Επίσης, η έκφραση του *PTGS2* έτεινε ($0.05 < p < 0.08$) να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων (Γράφημα 5). Η ιεραρχική συσχέτιση των γονιδίων στις βλαστοκύστες, αποκάλυψε δύο σταθερές συσχετίσεις: το *GPX1* ομαδοποιήθηκε εξίσου και στις δύο ομάδες με το *PTGS2*, ενώ το *DNMT3A* ομαδοποιήθηκε με το *HSPA1A* υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση και η επιδιόρθωση του DNA πιθανόν να υπόκεινται σε κοινούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Στην ομάδα T, το *GPX1* και το *PTGS2* ομαδοποιήθηκαν με το *HSP90AA1* (Γράφημα 6).

Γράφημα 5: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 11 γονιδίων σε βλαστοκύστες ημέρας 7 που προέκυψαν από ωάρια που ωρίμασαν στους 39⁰C (ομάδα C) ή στους 41⁰C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



Γράφημα 6: Ιεραρχική συσχέτιση των γονιδίων σε βλαστοκύστες ημέρας 7 που προέκυψαν από ωάρια που ωρίμασαν στους 39⁰C (ομάδα C) ή στους 41⁰C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδα T).



Ανάλυση συσχέτισης

Στα ωάρια, τα επίπεδα έκφρασης των *HSPA1A* και *HSP90AA1* συσχετίστηκαν σημαντικά ($R=0.575$) μετά την έκθεση στη ΘΚ, ενώ αντίστοιχη συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Αντιθέτως, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου τα επίπεδα των *HSPA1A* και *HSP90AA1* ήταν σημαντικά αρνητικά συσχετιζόμενα ($R=-0.578$) στην ομάδα των μαρτύρων, με την έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες να προκαλεί εξασθένηση της συσχέτισης αυτής. Τα ωάρια και τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παρουσίασαν αντίστροφα πρότυπα έκφρασης στα *MnSOD* και *GPX1*. Η έκφραση του *MnSOD* ήταν υψηλότερη στα ωάρια σε σχέση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, ενώ η έκφραση του *GPX1* ήταν διπλάσια στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου σε σύγκριση με αυτή των ωαρίων. Επιπλέον, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου της ομάδας των μαρτύρων εντοπίστηκε μία ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ των *MnSOD* και *GPX1* ($R=0.517$), η οποία ενισχύθηκε επιπλέον από την έκθεση στη ΘΚ ($R=0.946$). Τα δύο γονίδια φαίνεται να αποτελούν τμήματα του ίδιου δικτύου και κατέχουν κεντρικό ρόλο στη συντονισμένη απόκριση στη ΘΚ, καθώς το *MnSOD* στην ομάδα T ήταν στενά συνδεδεμένο με όλα τα γονίδια ($0.509 < R < 0.946$).

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, για μόλις 6 ώρες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωαρίων, διαταράσσει τη φυσιολογική διαδικασία της ωρίμανσης. Η παρατήρηση αυτή πρωτίστως αναδεικνύεται από τα μειωμένα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων, και επιβεβαιώνεται από τις σημαντικές μεταβολές στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων στα ωάρια, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και στις βλαστοκύστες, καθώς και στο πρότυπο συσχέτισης των εκφράσεων τους. Συνεπώς, συνάγεται ότι η αυξημένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωαρίων έχει σημαντική επίπτωση τόσο στην παραγωγή εμβρύων όσο και στην ποιότητα τους. Τα αποτελέσματά δείχνουν ότι οι επιπτώσεις μιας σχετικά σύντομης και ήπιας ΘΚ των ωαρίων, παραμένουν και μεταβιβάζονται στα έμβρυα τουλάχιστον για επτά ημέρες μετά το τέλος της έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η άνοδος της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της IVM επιδεινώνει εξίσου την ικανότητα των ωαρίων να γονιμοποιηθούν και να φτάσουν στο στάδιο των 2-κυττάρων, όσο και να εξελιχθούν στη συνέχεια σε βλαστοκύστες. Στα βοοειδή, η διαδικασία των πρώτων 3-4 διαιρέσεων του ζυγωτού ελέγχεται από το μητρικό γονιδίωμα, και στη συνέχεια από το εμβρυϊκό γονιδίωμα, το οποίο συνήθως ενεργοποιείται στο στάδιο των 8-16 κυττάρων (Brevini-Gandolfi *et al.* 2000). Τα χαμηλά ποσοστά βλαστοκύστεων υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ωαρίου, ακόμα και για μικρό χρονικό διάστημα, έχει σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου μετά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος.

Η έκθεση των ωαρίων σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης έχει καταστροφικές επιπτώσεις στη μετέπειτα ικανότητα γονιμοποίησης και εξέλιξης σε βλαστοκύστες (Silva *et al.* 2013, Hansen 2007, Jordan 2003). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι πρώτες 12 ώρες της *in vitro* ωρίμανσης είναι η πιο κρίσιμη

περίοδος για τη διατήρηση της ικανότητας ανάπτυξης των ωαρίων (Sirard *et al.* 1989). Κατά τις πρώτες 12 ώρες της ωρίμανσης το ωάριο περνάει από τη φάση επαγωγής (GV, 0-6h; GVBD, 6-8h), στη φάση σύνθεσης (8-24h). Στο αργά αναπτυσσόμενο ωάριο, το στάδιο GVBD απαιτεί *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι, τροποποίηση του υποστρώματος ωρίμανσης με προσθήκη εξωγενών αναστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά τη διάρκεια των 6 πρώτων ωρών της IVM, αναστέλλει την ωρίμανση των ωαρίων (Loneragan *et al.* 1998). Όμως, τα ωάρια που προέρχονται από μεγάλα ωοθυλάκια, φτάνουν νωρίτερα στο στάδιο GVBD σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από μικρά ωοθυλάκια, πιθανόν λόγω μεγαλύτερης συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα, τροποποιήσεις μετά τη μεταγραφή, όπως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, που δρουν στην πυρηνική μεμβράνη, η πυκνωση της χρωματίνης, η αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, συμβαίνουν μέσω της ενεργοποίησης της ενεργοποιημένης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) και των κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα (Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2, ERK1/2), υπό τον έλεγχο του παράγοντα προαγωγής της μίτωσης (M-Phase Promoting Factor, MPF) (Salhab *et al.* 2013, Vigneron *et al.* 2004).

Η συμβολή των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου στην ολοκλήρωση της ωρίμανσης του ωαρίου είναι καθοριστικής σημασίας. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου πραγματοποιείται αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση και έντονος οξειδωτικός μεταβολισμός, που οδηγούν σε μεταφορά ενέργειας και διάφορων μοριακών ενώσεων προς το ωάριο (Brevini-Gandolfi & Gandolfi 2001), που τελικώς συνεισφέρουν στην αύξηση της σύνθεσης του RNA από το ωάριο. Όλες αυτές οι κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες, που οδηγούν στην ωρίμανση του ωαρίου, φαίνεται ότι είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητες σε εξωτερικά ερεθίσματα. Έτσι, η ΘΚ των ωαρίων για μόλις 3 ώρες, μεταξύ της 18^{ης} και 21^{ης} ώρας της ωρίμανσης, επάγει σοβαρές διαταραχές στην κυτταροπλασματική ωρίμανση παρόμοιες με αυτές που σχετίζονται με τη γήρανση του ωαρίου (Andreu-Vasquez *et al.* 2010), οι οποίες, μπορούν μόνο μερικώς να προληφθούν ή να αναστραφούν με την προσθήκη αντιοξειδωτικών στο υπόστρωμα ωρίμανσης (Maya-Soriano *et al.* 2013a).

Στη μελέτη μας, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά αυλάκωσης στην ομάδα T σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων. Από άλλες ερευνητικές εργασίες φαίνεται ότι η ικανότητα γονιμοποίησης και το ποσοστό αυλάκωσης ωαρίων, που εκτίθενται για 6 ή 12 ώρες σε αυξημένες θερμοκρασίες, δεν επηρεάζεται, αλλά μειώνεται σημαντικά το ποσοστό εξέλιξης τους στο στάδιο της βλαστοκύστης (Payton *et al.* 2018, Edwards *et al.* 2005). Οι ίδιες μελέτες δείχνουν ότι η ΘΚ προκαλεί μεταβολές στην αρχιτεκτονική δομή του ωαρίου, που το κάνουν να μοιάζει γηρασμένο. Σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα, άλλοι ερευνητές αναφέρουν σημαντική μείωση του ποσοστού αυλάκωσης μετά από 12 ώρες έκθεσης σε ΘΚ, που ακολουθείται από σημαντική μείωση στην παραγωγή βλαστοκύστεων (Gendelman & Roth 2012c, Roth & Hansen 2005). Τα μειωμένα ποσοστά αυλάκωσης μπορούν να αποδοθούν στην ατελή ωρίμανση των ωαρίων ή/και στην διαταραγμένη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και του ωαρίου. Οι πιο σημαντικές μεταβολές στη δομή του ωαρίου λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της ωρίμανσης, ως εκ τούτου, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι, παρά το γεγονός ότι τα ωάρια συνέχισαν την ωρίμανση σε θερμικά

ουδέτερη θερμοκρασία για 16 ώρες, η προηγηθείσα αύξηση της θερμοκρασίας μεταξύ 2^{ης} και 8^{ης} ώρας της IVM ήταν ικανή να επάγει σοβαρές και μη αναστρέψιμες βλάβες σε αυτά.

Κατά κανόνα, τα ωάρια παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση των *HSPs* σε σύγκριση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τις βλαστοκύστες, ανεξάρτητα από το αν εκτέθηκαν σε ΘΚ. Ειδικότερα, υψηλότερη έκφραση ανιχνεύθηκε στο γονίδιο *HSPA1A*, που κωδικοποιεί την HSP72, μια μοριακή συνοδό πρωτεΐνη, που εμπλέκεται έντονα στην επιδιόρθωση του DNA μέσω των μηχανισμών εκτομής βάσεων (base excision), εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleotide excision), και επιδιόρθωσης των αταίριαστων ζευγών βάσεων (mismatch repair) (Sottile & Nadin 2018), καθώς και στην αναστολή της απόπτωσης (Gupta *et al.* 2010). Ο ρόλος, αυτός, των *HSPA1A*/Hsp72 αποκτά ιδιαίτερη σημασία για το υπό ωρίμανση ωάριο, που διατηρεί 7 φορές μεγαλύτερη έκφραση, σε σύγκριση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Υπερέκφραση στο ωάριο ανιχνεύθηκε και στο γονίδιο *HSP90AA1*, που κωδικοποιεί μία σημαντική κυτταροπλασματική μοριακή συνοδό πρωτεΐνη με κρυοπροστατευτικό ρόλο, η οποία διασφαλίζει τη σωστή αναδίπλωση και σταθερότητα πρωτεϊνών στόχων, καθώς και τη σταθεροποίηση των μεμβρανών, μέσω της αλληλεπίδρασης με τις διπλοστιβάδες των φωσφολιπιδίων (Liu *et al.* 2019). Σύμφωνα με τον Sakatani και τους συνεργάτες του (2013), η έκφραση τόσο του *HSP90AA1* όσο και του *HSPA1A* αυξάνεται σε έμβρυα βοοειδών μετά από 2, 4, και 8 ώρες ΘΚ, ενώ το *HSPB11* που κωδικοποιεί μια μικρή heat shock πρωτεΐνη, είναι το μοναδικό γονίδιο το οποίο υπερεκφράζεται μετά από 8 ώρες ΘΚ. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η ΘΚ είχε αντίστοιχη δράση μόνο στην έκφραση του *HSP90AA1*, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Πιο συγκεκριμένα, η ανταπόκριση στη ΘΚ αποκάλυψε διαφορετικά πρότυπα ρύθμισης της έκφρασης των *HSPs* εντός των COCs. Η έλλειψη μιας ομοιόμορφης απόκρισης των *HSPs* εντός των COCs υποδεικνύει ότι η ρύθμιση τους είναι πιθανώς στενά συνυφασμένη με την κυτταρική διαφοροποίηση.

Η ΘΚ επάγει μεταβολές στην οξειδωτική ισορροπία στο ωάριο και στα περιβάλλοντα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (Sakatani 2017, Rispoli *et al.* 2013), που εκδηλώνονται με αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ROS αναμένεται να διαταράξουν την οξειδωτική ισορροπία και τη φυσιολογική λειτουργία των κυτταρικών οργανιδίων με διαφορετικό τρόπο, δεδομένου ότι τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα χαρακτηρίζονται από διαφορετικές συγκεντρώσεις ROS (Sies & Jones 2020). Έχει αποδειχθεί ότι ωρίμανση για 6 ώρες στους 41°C προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των ROS στα μιτοχόνδρια, χωρίς να επηρεάζει τη συγκέντρωσή τους στο κυτταρόπλασμα, ενώ μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο ωάριο, η οποία δρα προστατευτικά (Nabenishi *et al.* 2012a, Brevini-Gandolfi & Gandolfi 2001). Στην ομάδα T των ωαρίων της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε μία ισχυρή τάση ($0.05 < P < 0.07$) για υπερέκφραση τριών αντιοξειδωτικών γονιδίων (*GPX1*, *MnSOD*, *G6PD*). Τα γονίδια *GPX1*, *MnSOD* και *G6PD* είναι σημαντικά συστατικά του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του κυττάρου (Molavian *et al.* 2015, Lonergan *et al.* 2003, Weisiger & Fridovich 1973), ενώ παράλληλα η δράση του *G6PD* σχετίζεται θετικά με την ικανότητα ανάπτυξης του ωαρίου (Koester *et al.* 2011, Alm *et al.* 2005, Ferrandi *et al.* 2002). Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του *G6PD* στα ωάρια της ομάδας T, η οποία συσχετίστηκε σημαντικά με αυτή του *HSPB11* ($R=0.787$), γεγονός που θα

μπορούσε να ερμηνευτεί ως μέρος ενός προστατευτικού μηχανισμού ενάντια στους οξειδωτικούς παράγοντες. Δεδομένης της ισχυρής και σταθερά θετικής συσχέτισης της έκφρασης του *G6PD* με αυτή του *CCNB1* (group-C, $R=0.567$; group-T, $R=0.682$), ο προστατευτικός αυτός μηχανισμός πιθανόν να έχει στόχο την ακεραιότητα του κυτταρικού κύκλου. Προς αυτή την κατεύθυνση κινείται και η ισχυρή συσχέτιση του *HSPB11* με το *CCNB1* ($R=0.939$) στην ομάδα T των ωαρίων.

Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου ανταποκρίθηκαν στη ΘΚ αυξάνοντας την έκφραση του *G6PD*, χωρίς, όμως, σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης των *GPX1* και *MnSOD*. Κατά τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παρουσιάζουν φυσιολογικά υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, η οποία εξασθενεί προς το τέλος της IVM (Cetica *et al.* 2001). Τα κύτταρα αυτά παρέχουν πυροσταφυλλικό ή/και γαλακτικό, τα οποία χρησιμοποιούνται από τα ωάρια χάρη στη δράση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι η δραστηριότητα των *SOD*, *GPX* και *CAT* είναι σημαντικά χαμηλότερη σε απογυμνωμένα ωάρια, σε σύγκριση με αυτά που περιβάλλονται από πολλαπλές στιβάδες κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Tatemoto *et al.* 2000, Cetica *et al.* 1999). Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα ευρήματα, σε συνδυασμό με τα δικά μας αποτελέσματα, υποθέτουμε ότι η οξείδωση που επάγεται από τη ΘΚ ξεκινάει σύντομα μετά από την έκθεση των COCs σε υψηλή θερμοκρασία· στη συνέχεια, τα ωάρια αποκτούν αντιοξειδωτική προστασία, με την υποστήριξη των CCs, η οποία διαρκεί μέχρι το τέλος της IVM, ή μέχρι τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου απωλέσουν την ικανότητα παροχής αντιοξειδωτικής δράσης.

Η επίπτωση της ΘΚ στην έκφραση των *G6PD* και *CPT1B* μπορεί να εντοπιστεί ακόμα και στο τέλος της IVM. Εκτός από την προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες, το *G6PD* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου συμμετέχει στο μεταβολισμό και στην παραγωγή ενέργειας, παρέχοντας στο υπό ωρίμανση ωάριο ενεργειακές ουσίες, όπως πυροσταφυλλικό και γαλακτικό (Sutton-McDowall *et al.* 2010, Steeves & Gardner 1999). Για το υπό ωρίμανση ωάριο, τα λιπαρά οξέα θεωρούνται ως μία συμπληρωματική πηγή ενέργειας, που είναι πιο πλούσια ενεργειακά σε σχέση με τη γλυκόζη (Prates *et al.* 2014). Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (FAO) οδηγεί στην παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια, και η παλμιτυλοτρανσφεράση-1B της καρνιτίνης (*CPT1B*) είναι το βασικό ένζυμο ελέγχου της β-οξείδωσης. Η *CPT1B* είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των λιπαρών οξέων ακετυλο-CoAs μακριάς αλύσου από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και τη μετέπειτα β-οξείδωση (Bonnefont *et al.* 2004). Έχει αποδειχτεί ότι η *in vitro* ωρίμανση ωαρίων βοοειδών επηρεάζεται σημαντικά από τη σύνθεση λιπαρών οξέων, τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και τη λιπολυτική δραστηριότητα στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία επηρεάζουν την πρόοδο της μειωτικής διαίρεσης και την ικανότητα ανάπτυξης του ωαρίου (Sanchez-Lazo *et al.* 2014). Κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης των COCs, η έκφραση του *CPT1B* αυξάνεται κατά 6.6 φορές στην 6^η ώρα, επιστρέφει στα επίπεδα πριν την ωρίμανση στις 18 ώρες και παραμένει αμετάβλητη μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης (Bonnefont *et al.* 2004). Εξ όσων είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται, για πρώτη φορά, ότι η ΘΚ επιταχύνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, καθώς η έκφραση του *CPT1B* βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα T των CCs σε σύγκριση με αυτή των μαρτύρων, ενώ αντιθέτως, μειώθηκε ο μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω της αρνητικής ρύθμισης του *G6PD*. Η ισχυρά θετική συσχέτιση της έκφρασης του μεταφορέα της

γλυκόζης *GLUT1* με το *CPT1B* και το *G6PD* στην ομάδα T των CCs υποθέτουμε ότι υποδηλώνει μία συντονισμένη προσαρμογή του μεταβολισμού στη ΘΚ, με σκοπό τη διασφάλιση του εφοδιασμού του ωαρίου με την απαιτούμενη ενέργεια. Συνδυάζοντας τα ανωτέρω, θα μπορούσε να προταθεί ότι τα προϊόντα της β-οξειδωσης στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου προορίζονται για να καλύψουν αντισταθμιστικά τις ενεργειακές ελλείψεις του ωαρίου, οι οποίες δημιουργούνται λόγω του μειωμένου μεταβολισμού της γλυκόζης στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Στις βλαστοκύστες της ομάδας T, η έκφραση των *HSPs* δεν επηρεάστηκε, ενώ ανιχνεύθηκε υποέκφραση των *GPX1* και *DNMT3A* και υπερέκφραση του *PLAC8*. Οι βλαστοκύστες της ομάδας T φαίνεται να έχουν ασθενέστερη αντιοξειδωτική προστασία σε σύγκριση με τους μάρτυρες, καθώς η έκφραση του *GPX1* ήταν σημαντικά μειωμένη, και η έκφραση του *MnSOD* δεν μεταβλήθηκε ως απόκριση στο HS. Ομοίως, στην ομάδα T των βλαστοκύστεων, η έκφραση του *AKR1B1*, που προστατεύει έναντι των τοξικών αλδεϋδων (Singh *et al.* 2015) που προέρχονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων, παρέμεινε αμετάβλητη. Παράλληλα, η έκφραση του *BAX*, που κωδικοποιεί έναν ενεργοποιό της απόπτωσης (Huppertz *et al.* 1999, Kidd 1998), ήταν αυξημένη. Τέλος, η έκφραση του *PTGS2* έτεινε να είναι μικρότερη στα έμβρυα της ομάδας T σε σχέση με τους μάρτυρες. Το γονίδιο *DNMT3A* κωδικοποιεί την *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράση, που ελέγχει μερικώς την εμφάνιση επιγενετικών φαινομένων (Okano *et al.* 1999), και κατά συνέπεια, η μειωμένη δραστηριότητα υποδηλώνει μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης. Έχει αποδειχθεί ότι η μειωμένη έκφραση του *DNMT3A* συνδέεται με αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Sagirkaya *et al.* 2006). Σε έμβρυα που προέκυψαν από παρθενογένεση, οι Gomez *et al.* (2009) συσχέτισαν τη χαμηλή έκφραση του *DNMT3A* με υψηλότερα ποσοστά βλαστοκύστεων σε σχέση με *in vitro* παραγόμενα έμβρυα. Αντιθέτως, η υπερέκφραση του *DNMT3A* σε βλαστοκύστες, που προήλθαν από ωάρια που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με αυξημένη συγκέντρωση μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFA), το οποίο δεν αποτελεί ιδανικό περιβάλλον ωρίμανσης, υποδεικνύει χαμηλής ποιότητας βλαστοκύστες (Van Hoeck *et al.* 2011).

Τέλος, στις βλαστοκύστες της ομάδας T καταγράφηκε αυξημένη έκφραση του *PLAC8*. Το *PLAC8* συμμετέχει στη ρύθμιση της ανάπτυξης του πλακούντα και στις αλληλεπιδράσεις μητέρας-εμβρύου. Σε μελέτη που διενεργήθηκε κατόπιν βιοψίας εμβρύων που επρόκειτο να μεταφερθούν σε δέκτριες, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι υψηλότερη στα έμβρυα που εγκαθίστανται και εξελίσσεται η εγκυμοσύνη μέχρι τέλους, σε σχέση με αυτή όσων οδηγούνται σε πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο ή αποβολή (Ghanem *et al.* 2011). Έτσι, το πρότυπο έκφρασης των *DNMT3A* και *PLAC8* της παρούσας μελέτης δείχνει ότι τα ωάρια που επιβίωσαν του θερμικού σοκ, μπορούν να εξελιχθούν σε υγιή έμβρυα, με αυξημένες πιθανότητες εγκατάστασης/εξέλιξης. Στην πραγματικότητα, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού τα ποσοστά εγκυμοσύνης μειώνονται στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, αλλά ποτέ δεν μηδενίζονται. Πιο συγκεκριμένα, όσα ωάρια ανθίσταται στις δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τους, είναι ικανά να γονιμοποιηθούν και να εξελιχθούν σε φυσιολογικά ή ακόμα και σε υψηλής ποιότητας έμβρυα.

Συμπερασματικά, τα ωάρια, κατά τη διάρκεια των 6 πρώτων ωρών της ωρίμανσης, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ευαισθησία στο θερμικό σοκ, η οποία εκδηλώνεται με μειωμένα ποσοστά αυλάκωσης και

μειωμένη παραγωγή εμβρύων. Σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παρότι επηρεάζονται σοβαρά από τη ΘΚ, φαίνεται να δρουν αντισταθμιστικά για την αναπλήρωση του ενεργειακού ελλείμματος των ωαρίων. Τέλος, μολονότι η παραγωγή βλαστοκύστεων μειώνεται δραματικά εξαιτίας της έκθεσης των ωαρίων σε ΘΚ, κάποιοι δείκτες ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων βελτιώνονται σημαντικά, υποδεικνύοντας τη δυνατότητά τους να αναπτύξουν λειτουργικό πλακούντα ικανό να υποστηρίξει την εξέλιξη του κυήματος.

Το κεφάλαιο αυτό έχει δημοσιευθεί αυτούσιο στο Theriogenology 2020, 156, 36-45.

Κεφάλαιο ΙΙΙ

Η επίδραση της πρωτεΐνης θερμικής καταπόνησης 70 (heat shock protein 70 – Hsp70) σε ωάρια βοοειδών μετά από έκθεση τους σε θερμική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της *in* *vitro* ωρίμανσης

Εισαγωγή

Σε συνέχεια των αποτελεσμάτων του προηγούμενου κεφαλαίου, η υπόθεση εργασίας της παρούσας μελέτης ήταν ότι όταν το ωάριο εκτίθεται σε αυξημένες θερμοκρασίες, αδυνατεί να ανταποκριθεί έγκαιρα με την παραγωγή ενδογενών προστατευτικών παραγόντων, ή ότι η παραγωγή ενδογενών προστατευτικών παραγόντων έπεται των συνεπειών της δράσης του βλαπτικού παράγοντα. Επομένως, ελέγχθηκε αν η προσθήκη Hsp70, ενός κυτταρικού προστατευτικού παράγοντα κατά την έναρξη της ΘΚ, μπορεί να αποτρέψει ή να αμβλύνει τις αρνητικές συνέπειες του θερμικού στρες.

Η Hsp70 είναι μια μοριακή συνοδός πρωτεΐνη, που προστατεύει το ωάριο από τις δυσμενείς επιπτώσεις του stress. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η οικογένεια των Hsp70 εμφανίζεται σε 2 μορφές: την Hsc70, που εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα και την Hsp70, που παράγεται κάτω από συνθήκες stress. Οι Hsps, είχαν συσχετιστεί αρχικά με την ανταπόκριση στη ΘΚ. Ωστόσο, είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι σειρά παραγόντων καταπόνησης επάγει την έκφραση τους, και επομένως χαρακτηρίζονται πλέον ως πρωτεΐνες «κυτταρικού stress» (Ashburner 1970). Όπως έχει αναφερθεί διεξοδικά στη γενική εισαγωγή της παρούσας διατριβής, υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι Hsps ανιχνεύονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, ενώ σε περιόδους ΘΚ, η δράση τους εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα (Edwards *et al.* 1997). Σε επίπεδο αναπτυξιακής εμβρυολογίας, έχει αποδειχθεί ότι η Hsp70 ρυθμίζει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του κυτταροσκελετού στα ωάρια, και μειώνει τις αποπτωτικές διεργασίες (Hansen 1999, Ju 2005, Velazquez *et al.* 2010), ενώ η αναστολή της δράσης της με ειδικά αντισώματα, καταστέλλει την εξελικτική ικανότητα των εμβρύων (Al-Katanani & Hansen 2002, Neuer *et al.* 1998).

Σε συνθήκες καταπόνησης, οι δράσεις των Hsps δεν περιορίζονται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, αλλά επεκτείνονται και στον εξωκυττάριο χώρο (Mambula *et al.* 2007), όπου ρυθμίζουν λειτουργίες όπως η φλεγμονή και η οξεία ανοσοαπόκριση (Srivastava 2002, Asea *et al.* 2000). Η έκκριση των Hsps στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να διευκολύνεται μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκονται τα λυσοσώματα (Andrei *et al.* 1999), μέσω σωματιδίων που περιβάλλονται από μεμβράνη (Calderwood *et al.* 2016) ή μέσω

παθητικής μεταφοράς από νεκρωτικά κύτταρα, ύστερα από καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών τους

(Mambula *et al.* 2007). Οι συμμετοχή των Hsps που συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις εξεργασίες θεωρείται ότι ρυθμίζεται ή διευκολύνεται από τους Toll-Like υποδοχείς (TLRs) και ειδικότερα τους TLR2 και TLR4 (Jayaprakash *et al.* 2015, Spiering *et al.* 2012, Borges *et al.* 2012, Asea *et al.* 2000).

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αποδείξαμε ότι η έκθεση των COCs για 6 ώρες στους 41°C κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της *in vitro* ωρίμανσης, μειώνει την παραγωγή εμβρύων και αποδιοργανώνει την έκφραση πολλών γονιδίων στα ωάρια, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και στις βλαστοκύστες. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί για πρώτη φορά εάν η προσθήκη Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης, μπορεί να αποτρέψει τις δυσμενείς επιπτώσεις της αύξησης της θερμοκρασίας στο ωάριο, στα ποσοστά παραγωγής εμβρύων και να διερευνηθούν πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την ποιότητα τους.

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro παραγωγή εμβρύων

Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν σε όλα τα στάδια (ωρίμανση, γονιμοποίηση, καλλιέργεια) της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων, όπως επίσης και οι μέθοδοι εκτίμησης απόδοσης της τεχνικής, ήταν ακριβώς οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στα αντίστοιχα εδάφια του προηγούμενου κεφαλαίου. Οι αγελάδες, από τις οποίες συλλέχθηκαν τα COCs ανήκαν στις φυλές Holstein, Limousine και σε μιγάδες γαλακτοπαραγωγικής ή κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης.

Χρησιμοποιήθηκαν 1933 COCs κατανεμημένα σε 4 ομάδες αναλόγως της τροποποίησης της θερμοκρασίας ή / και της συμμετοχής ή όχι Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης:

- Ομάδα C39 (n=471), πρόκειται για την ομάδα μαρτύρων, στην οποία η ωρίμανση διενεργήθηκε στους 39°C σε μη τροποποιημένο υπόστρωμα.
- Ομάδα H39 (n=353), στην οποία το υπόστρωμα τροποποιήθηκε με προσθήκη Hsp70 σε αυτό και η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή στους 39°C.
- Ομάδα C41 (n=405), στην οποία χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο υπόστρωμα, και η ωρίμανση πραγματοποιήθηκε στους 41°C από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM, και στη συνέχεια στους 39°C.
- Ομάδα H41 (n=704), στην οποία τροποποιήθηκαν τόσο το υπόστρωμα με προσθήκη Hsp70, όσο και η θερμοκρασία, όπως στην ομάδα C41.

Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για τη μετέπειτα κατεργασία με

DNάση, χρησιμοποιήθηκε το DNA-free DNA Removal Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 15ng ολικού DNA και ένα συνδυασμό ολιγονουκλεοτιδίων-T και τυχαίων εκκινητών. Τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν περαιτέρω (1:2 για τα ωάρια, 1:5 για τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τις βλαστοκύστες) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ανάλυση έκφρασης γονιδίων

Στα ωάρια, αναλύθηκε η έκφραση των γονιδίων *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSPB11* (heat shock πρωτεΐνες), *SOD2*, *GPX1* (αντιοξειδωτικά), *G6PD* (μεταβολισμός), *BCL2* (κυτταρικός κύκλος) και *TLR2* (φλεγμονή). Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου ελέγχθηκε η έκφραση των *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *BCL2* (κυτταρικός κύκλος), *CPT1B*, *G6PD* (μεταβολισμός), *IGF1* (κυτταρική σηματοδότηση), *GSTP1* (αντιοξειδωτικό) και *ATP1A1* (ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης). Τέλος, στις βλαστοκύστες μελετήθηκε η έκφραση των *HSP90AA1*, *HSPA1A*, *HSF1* (ρύθμιση της έκφρασης των HSPs), *GPX1*, *GSTP1*, *PLAC8A* (εγκατάσταση εμβρύου), *TLR2*, *ATP1A1*, *BAX*, *BCL2*, *DNMT3A* (ρύθμιση επιγενετικών φαινομένων), *AKR1B1* (μεταβολισμός) και *IGF1* (σηματοδότηση). Τα περισσότερα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη για τις αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης ήταν αυτά που σχεδιάστηκαν για την προηγούμενη μελέτη, και προστέθηκαν νέα ζεύγη που σχεδιάστηκαν ειδικώς για αυτή τη μελέτη και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Ο σχεδιασμός των εκκινητών, οι συνθήκες της Real time PCR (qPCR), η εξομάλυνση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων, όπως και η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων έγιναν με τις ίδιες μεθόδους που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 4: Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για τη real time PCR και μέγεθος προϊόντος.

Gene Name	Gene Description	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size (bp)
<i>TLR2</i>	Toll like receptor 2	GCTGCCATTCTGATTCTGCT	GCCACTCCAGGTAGGTCTTG	103
<i>BCL2</i>	BCL2 apoptosis regulator	CCCTGTTTGATTTCTCCTGGC	CTGTGGGCTTCACTTATGGC	107
<i>HSF1</i>	Heat shock transcription factor 1	ATGAAGCACGAGAACGAGGC	GCACCAGCGAGATGAGGAACT	112
<i>ATP1A1</i>	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	CGCCAGGGTTTATCCAGTT	AGGGGAAGCCAGTTTTTGT	80
<i>IGF1</i>	Insulin like growth factor 1	TCACATCCTCCTCGCATCTCTT	AGCATCCACCAACTCAGCC	107
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	CGCTTCAGACACTCGCTCAG	120

Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικές αναλύσεις της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (IVP) και της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του R. Στην IVP, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα. Οι μεταβλητές ακολουθούν κανονική κατανομή, κάτι που διαπιστώθηκε μέσα από το τεστ Shapiro-Wilks. Η ομοιογένεια μεταξύ των διακυμάνσεων δεν παραβιάστηκε σε καμία από τις παρακάτω συγκρίσεις, γεγονός που διαπιστώθηκε μέσω του Levene's Test ($p > 0.05$). Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Two-way ANOVA για να διαπιστωθεί η συμβολή της θερμοκρασίας ή της Hsp70 στις διαφορές, και τα δεδομένα χωρίστηκαν σε 4 στρώματα για να εντοπιστεί η πραγματική σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Ο στόχος της διαστρωμάτωσης ήταν να οριστεί η ενδεχόμενη επίδραση της τροποποίησης και να δημιουργηθούν ομάδες, στις οποίες η επίδραση της τροποποίησης να μην ποικίλλει. Μετά από αυτό, πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητο Student's t-test για να προσδιοριστούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων, που εφαρμόστηκε αγωγή με μεταβολή της θερμοκρασίας και προσθήκη Hsp70, σε όλες τις φάσεις. Η σημαντικότητα αξιολογήθηκε στην τιμή $p < 0.05$.

Η στατιστική ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

- i. Εφαρμόστηκε η δοκιμή Two-way ANOVA στις τέσσερις ομάδες ώστε να εντοπιστεί η πιθανή επίδραση των δύο παραγόντων (θερμοκρασία, προσθήκη Hsp) μαζί με την αλληλεπίδραση τους στη διαφορική γονιδιακή έκφραση. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ των ομάδων (C39, H39, C41, H41). Επικεντρωθήκαμε στις διαφορές μεταξύ των ομάδων H και C, καθώς το μεγαλύτερο ερώτημα ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση της προσθήκης Hsp στο υπόστρωμα.
- ii. Οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για κάθε ζεύγος γονιδίων σε δύο ομάδες (δείγματα με προσθήκη και χωρίς προσθήκη Hsp) χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση `corr`, καθώς η συσχετισμένη γονιδιακή έκφραση μπορεί να είναι ενδεικτική για έναν παρόμοιο μηχανισμό ρύθμισης που διέπει την έκφραση του γονιδίου. Οι συντελεστές απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας τη λειτουργία `corrplot`, όπου οι θετικοί συσχετισμοί εμφανίζονται με μπλε και οι αρνητικοί συσχετισμοί με κόκκινο χρώμα. Η ένταση του χρώματος και το μέγεθος του κύκλου είναι ανάλογα των συντελεστών συσχέτισης.

Αποτελέσματα

In vitro παραγωγή εμβρύων

Το ποσοστό αυλάκωσης στην ομάδα C39 ήταν σημαντικά υψηλότερο ($p < 0.01$) σε σύγκριση με τις ομάδες C41 και H41 και έτεινε να είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με αυτό της ομάδας H39 ($p = 0.068$). Δεν εντοπίστηκαν άλλες διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων τις ημέρες 7, 8, και 9 στην ομάδα C41 ήταν σημαντικά χαμηλότερα ($p<0.03$) σε σχέση με της ομάδας C39, και την ημέρα 7, έτεινε ($p=0.06$) να είναι χαμηλότερο σε σχέση με αυτό της ομάδας H39. Παρόμοια, την ημέρα 9, το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων στην ομάδα C41 ήταν σημαντικά χαμηλότερο ($p=0.03$) σε σχέση με της ομάδας H39. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές στην παραγωγή εμβρύων μεταξύ των ομάδων C39 και H41. Τα αποτελέσματα των συνολικών ποσοστών εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων σε 4 ομάδες COCs που ωρίμασαν στους 39°C με προσθήκη Hsp70 (ομάδα H39) ή χωρίς (ομάδα C39) και στους 41°C με προσθήκη Hsp70 (ομάδα H41) και χωρίς (ομάδα C41) για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM. Τα αποτελέσματα αφορούν σε 10 επαναλήψεις και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπικό σφάλμα. Τα αποτελέσματα που είναι επισημασμένα με διαφορετικά γράμματα στον εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($p<0.05$).

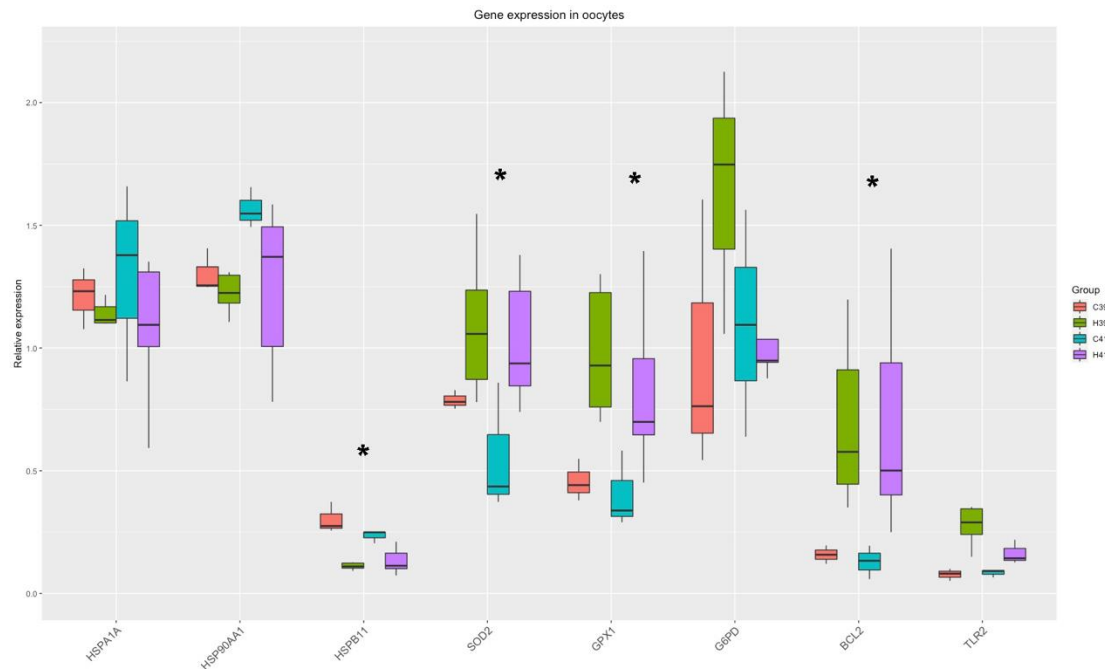
Βλαστοκύστες					
Ομάδα	COCs	αυλάκωση (%)	ημέρα 7 (%)	ημέρα 8 (%)	ημέρα 9 (%)
C39	519	438 ^a (84.4±4.5)	154 ^a (29.7±6.6)	172 ^a (33.1±6.0)	179 ^a (34.5±7.6)
H39	353	286 ^{a,b} (81.0±7.5)	94 ^{ab} (26.6±4.4)	111 ^{ab} (31.4±6.0)	122 ^{ab} (34.5±6.5)
C41	508	401 ^{b,c} (78.8±6.8)	102 ^b (20.1±3.7)	123 ^b (24.2±7.9)	129 ^c (25.5±9.0)
H41	704	551 ^{b,c} (78.2±7.4)	186 ^{ab} (26.4±10.4)	226 ^{ab} (32.1±11.2)	235 ^{abc} (33.4±11.4)

Εκφράσεις γονιδίων

-Ωάρια

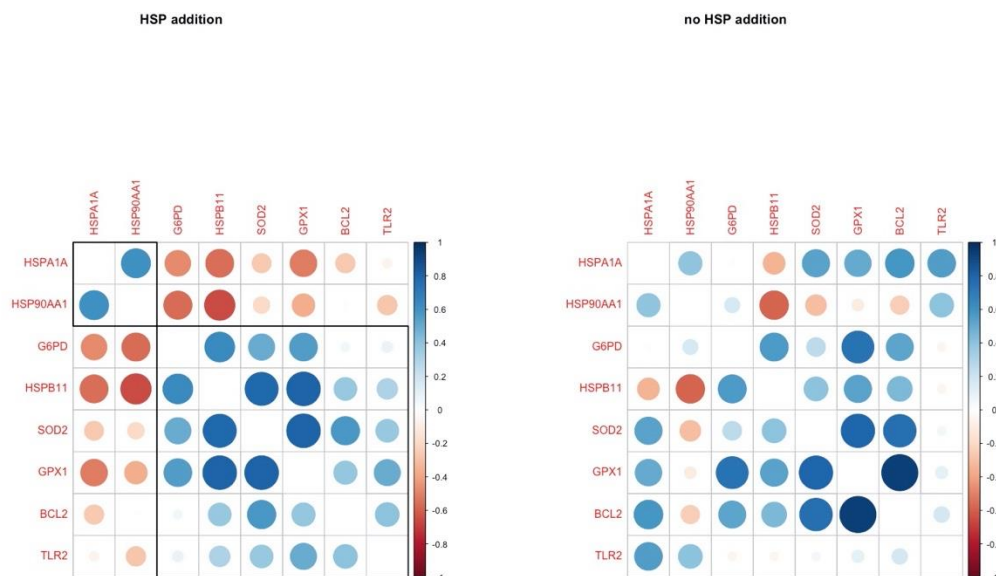
Η ανάλυση Two-Way ANOVA έδειξε ότι στα οχτώ γονίδια που μετρήθηκαν, η έκφραση τεσσάρων (*HSPB11*, *BCL2*, *GPX1*, *SOD2*) μεταβλήθηκε σημαντικά από την παρουσία της Hsp70 στο υπόστρωμα, και υπήρξε μία ισχυρή τάση διαφοροποιημένης έκφρασης του *G6PD* (p -value=0.07). Η σχετική έκφραση των γονιδίων παρουσιάζεται στο Γράφημα 7.

Γράφημα 7: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 8 γονιδίων σε ωάρια που ωρίμασαν *in vitro* στους 39°C χωρίς προσθήκη Hsp (C39), και με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H39) και στους 41°C χωρίς (C41) ή με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H41) από τη 2^η έως την 8^η ώρα της IVM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων επισημαίνονται με αστερίσκο.



Η ανάλυση συσχέτισης αποκάλυψε τρία γονίδια με ισχυρή θετική συσχέτιση (*HSPB11*, *SOD2*, *GPX1*) στην ομάδα με την προσθήκη Hsp, και τα γονίδια αυτά συσχετίστηκαν αρνητικά με δύο γονίδια *HSP* (*HSP90AA1*, *HSPA1A*). Στις ομάδες όπου δεν υπήρχε παρουσία Hsp, δεν ανιχνεύθηκαν ανάλογες συσχετίσεις. Το γονίδιο *HSP90AA1* συσχετίστηκε αρνητικά με το *HSPB11*, ενώ η έκφραση του *BCL2* συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του *GPX1* (Γράφημα 8).

Γράφημα 8: Συντελεστές συσχέτισης κατά ζεύγη των υπό μελέτη γονιδίων στα ωάρια των ομάδων H και C, αντίστοιχα.

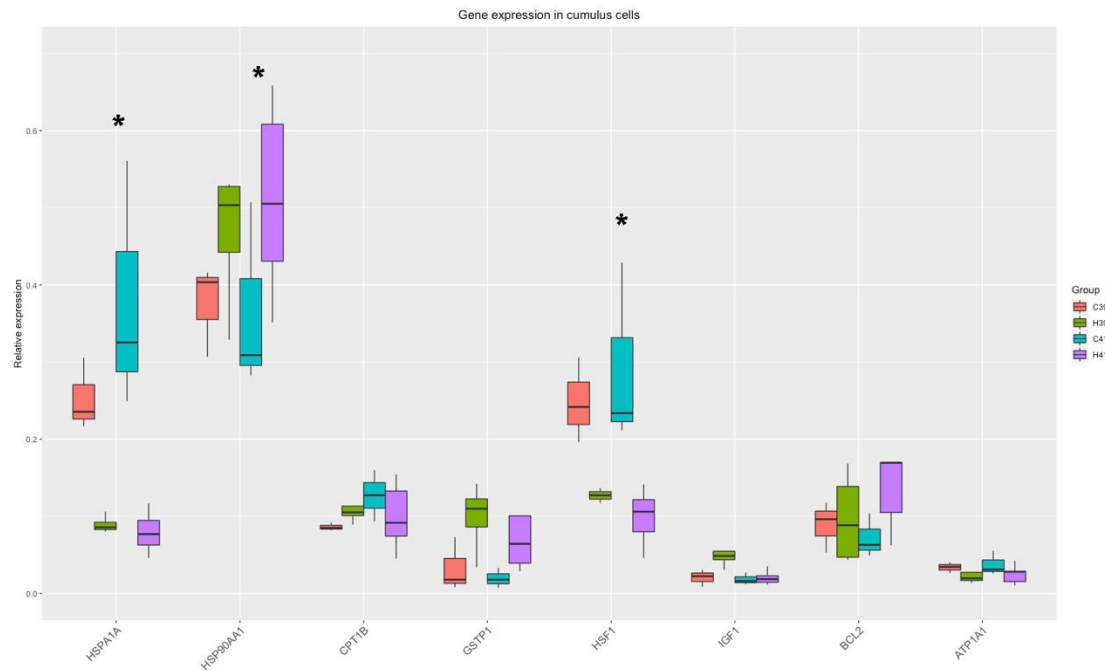


-Κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

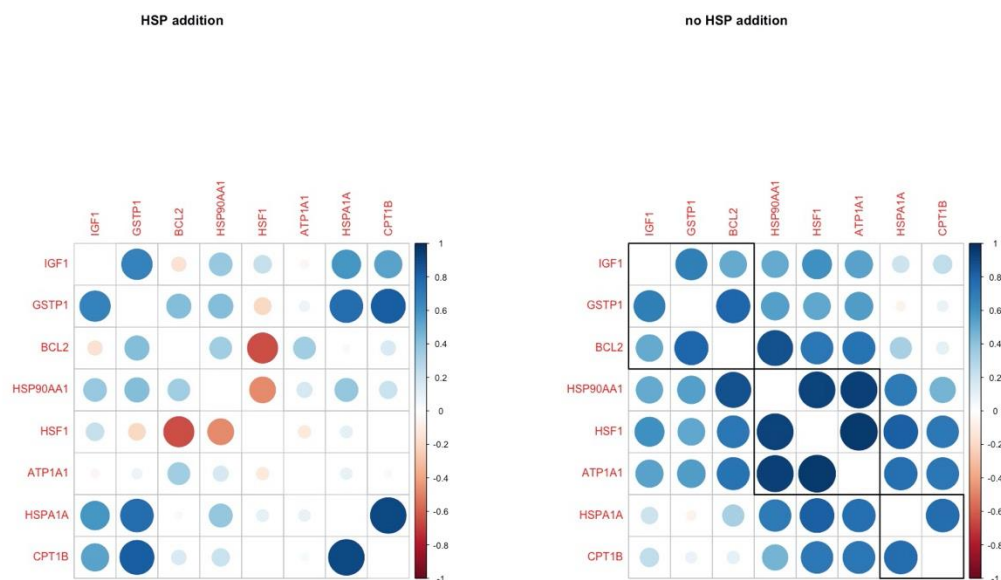
Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, η ανάλυση Two-Way ANOVA έδειξε ότι, στα οχτώ γονίδια που μετρήθηκαν, η έκφραση τριών (*HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSF1*) μεταβλήθηκε σημαντικά από την παρουσία της Hsp70 στο υπόστρωμα και υπήρξε μια ισχυρή τάση διαφοροποιημένης έκφρασης του *GSTP1* (p-value=0.06) (Γράφημα 9).

Η ανάλυση συσχέτισης αποκάλυψε τέσσερα γονίδια με ισχυρά θετική συσχέτιση ($r > 0.5$, *IGF1*, *GSTP1*, *HSPA1A*, *CPT1B*) στην ομάδα που προστέθηκε Hsp, ενώ το γονίδιο *HSF1* συσχετίστηκε αρνητικά με το *BCL2*. Στην ομάδα χωρίς την προσθήκη Hsp, τα γονίδια *HSP90AA1*, *HFS1*, *ATP1A1* έδειξαν ισχυρή θετική συσχέτιση, ενώ οι συσχετίσεις αυτές απουσίαζαν στην ομάδα που προστέθηκε Hsp70 (Γράφημα 10).

Γράφημα 9: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 8 γονιδίων σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που ωρίμασαν *in vitro* στους 39°C χωρίς προσθήκη Hsp (C39), και με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H39) και στους 41°C χωρίς (C41) ή με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H41) από τη 2^η έως την 8^η ώρα της IVM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων επισημαίνονται με αστερίσκο.



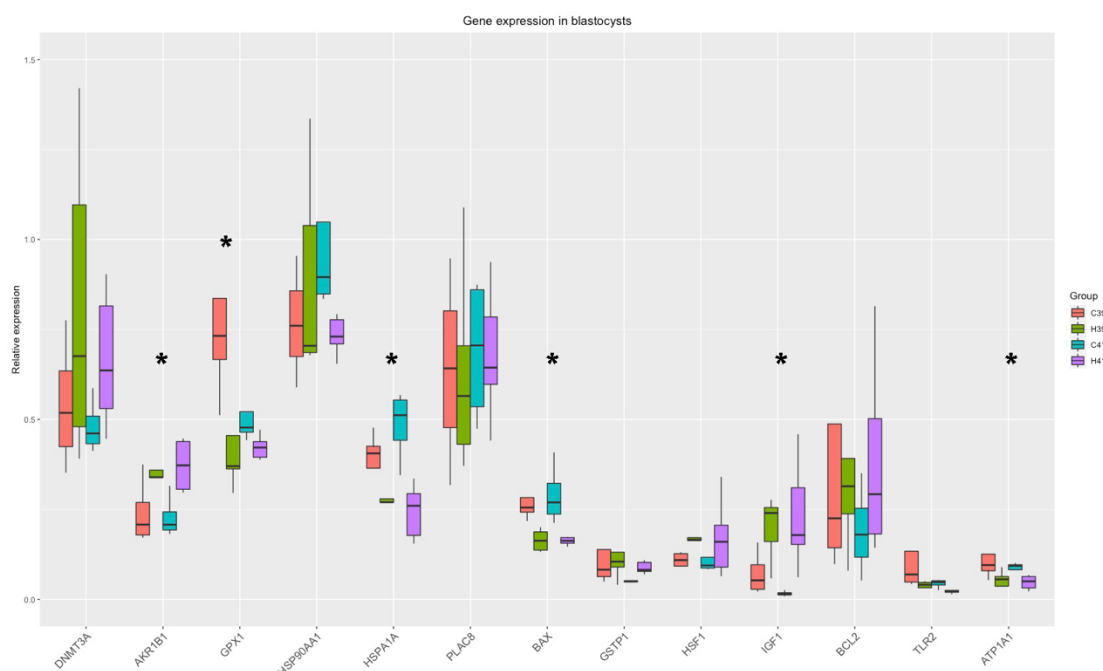
Γράφημα 10: Συντελεστές συσχέτισης κατά ζεύγη των υπό μελέτη γονιδίων στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των ομάδων H και C, αντίστοιχα.



-Βλαστοκύστες

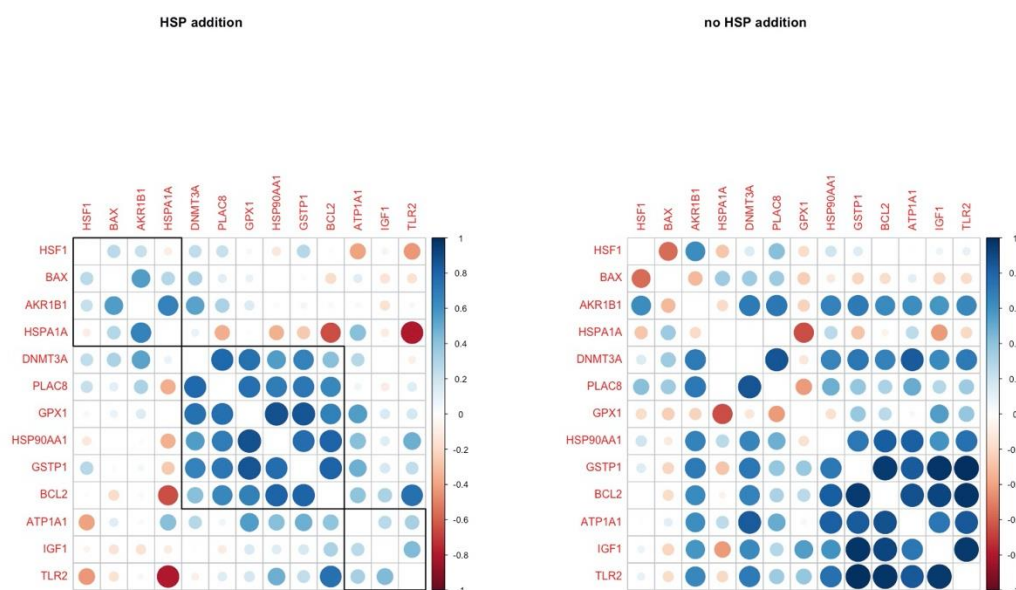
Η προσθήκη Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης προκάλεσε διαφοροποιημένη έκφραση 5 γονιδίων (*AKR1B1*, *GPX1*, *HSPA1A*, *IGF1*, *BAX*, *ATP1A1*) στις βλαστοκύστες καθώς επίσης, ανιχνεύθηκε ισχυρή τάση για το γονίδιο *GSTP1* (Γράφημα 11).

Γράφημα 11: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 13 γονιδίων σε βλαστοκύστες που προήλθαν από ωάρια που ωρίμασαν *in vitro* στους 39°C χωρίς προσθήκη Hsp (C39), ή με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H39) και στους 41°C χωρίς (C41) ή με προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης (H41) από τη 2^η έως την 8^η ώρα της IVM. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων επισημαίνονται με αστερίσκο.



Η προσθήκη Hsp στο υπόστρωμα ωρίμανσης ωαρίων οδήγησε σε θετική συσχέτιση στην έκφραση 6 γονιδίων (*DNMT3A*, *PLAC8*, *GPX1*, *HSP90AA1*, *GSTP1*, *BCL2*) στις βλαστοκύστες, ενώ οι περισσότερες από αυτές τις συσχετίσεις απουσίαζαν από την άλλη ομάδα. Εντοπίστηκε επίσης, μία άλλη ομάδα γονιδίων, απαρτιζόμενη από τα *HSP90AA1*, *GSTP1*, *BCL2*, *ATP1A1*, *IGF1*, *TLR2*, στην οποία η έκφραση συσχετίστηκε ισχυρά στην ομάδα χωρίς Hsp. Η έκφραση των γονιδίων *HSP90AA1* και *GSTP1* έδειξε σταθερά θετική συσχέτιση και στις δύο ομάδες (Γράφημα 12).

Γράφημα 12: Συντελεστές συσχέτισης κατά ζεύγη των υπό μελέτη γονιδίων στις βλαστοκύστες των ομάδων H και C, αντίστοιχα.



Συζήτηση

Η μελέτη αυτή αποδεικνύει, για πρώτη φορά, ότι η παρουσία εξωγενούς Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης μπορεί να αμβλύνει τις δυσμενείς επιπτώσεις της αύξησης της θερμοκρασίας στην παραγωγή βλαστοκύστεων και να διατηρήσει την ποιότητα των ωαρίων και των εμβρύων, μεταβάλλοντας το πρότυπο έκφρασης μιας σειράς σημαντικών γονιδίων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι, σε αντίθεση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, το ωάριο ανταποκρίνεται περισσότερο στην προσθήκη της Hsp70, και ότι η αντισταθμιστική δράση της Hsp70 έναντι της επιβλαβούς αύξησης της θερμοκρασίας, παραμένει μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης.

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού επιβεβαιώνουν τα ευρήματα του προηγούμενου πειραματισμού, ότι δηλαδή, η μικρής διάρκειας έκθεση των υπό ωρίμανση ωαρίων στη ΘΚ προκαλεί σημαντική μείωση στο ποσοστό αυλάκωσης. Η προσθήκη της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης δεν μπόρεσε να εξαλείψει την επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στο ποσοστό αυλάκωσης. Η υπόθεση ότι η προσθήκη της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης θα βελτιώσει το ποσοστό αυλάκωσης, δεν επιβεβαιώθηκε. Αντιθέτως, η προσθήκη της Hsp70 χωρίς παράλληλη αύξηση της θερμοκρασίας (H39) προκάλεσε μία μικρή μείωση ($p=0.068$) του ποσοστού αυλάκωσης,

σε σύγκριση με την ομάδα C39. Μία σειρά στοιχείων αποδεικνύουν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, ακόμα και για μικρό χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια της IVM, επιφέρει μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης και μειωμένο ποσοστό παραγωγής εμβρύων (Silva *et al.* 2013, Hansen 2007, Jordan 2003). Η Hsp70 δρώντας στους μικροσωληνίσκους, συμβάλλει στην σταθεροποίηση της μειωτικής ατράκτου στο ωάριο. Ενώ οι περισσότερες Hsps συντίθενται φυσιολογικά, η Hsp70 συντίθεται, κυρίως, υπό συνθήκες stress (Edwards *et al.* 1997). Είναι κατά συνέπεια, εύλογο να υποτεθεί ότι, η παρουσία της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης, λειτούργησε ως ένα ερέθισμα δυνητικού κινδύνου για το ωάριο ή/και για τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, πυροδοτώντας αμυντικούς μηχανισμούς, που τελικά μείωσαν μερικώς το ποσοστό αυλάκωσης.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της IVM, μείωσε σημαντικά το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων στην ομάδα C41. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν σύμφωνο με τα προηγούμενα ευρήματά μας και με σειρά δημοσιευμένων εργασιών (Maya-Soriano *et al.* 2013b, Gendelman & Roth 2012c, Edwards *et al.* 2005), ενώ, οι υποκείμενοι μηχανισμοί έχουν συζητηθεί εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο. Παρά τις συνθήκες ΘΚ στα ωάρια, η απόδοση σε βλαστοκύστες αποκαταστάθηκε παρουσία της Hsp70, και δεν διέφερε σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή από εκείνη της ομάδας C39. Το εύρημα αυτό είναι λογικό να αποδοθεί στον προστατευτικό ρόλο που άσκησε η Hsp70 στα COCs. Γενικά, η παρουσία της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης τροποποίησε την έκφραση των HSP γονιδίων (*HSP90AA1*, *HSPB11*) στα ωάρια, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Όπως έχει προαναφερθεί, το γονίδιο *HSP90AA1* κωδικοποιεί μία μοριακή συνοδό πρωτεΐνη, που συμμετέχει στην ορθή αναδίπλωση, μεταφορά και σταθεροποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων με τη δράση μιας ATPάσης, υπό τη ρύθμιση συν-συνοδών πρωτεϊνών (Brandvold & Morimoto 2015). Το γονίδιο *HSP90AA1* συμμετέχει, επίσης, σε πολλές άλλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η μεταγραφή, η ρύθμιση των κινασών και η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Assidi *et al.* 2008). Η Hsp72, που κωδικοποιείται από το *HSPA1A*, επίσης, αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο με διάφορους τρόπους (Gupta *et al.* 2010). Από την άλλη μεριά, το γονίδιο *HSPB11*, που κωδικοποιεί μια μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ, δρα ως μοριακή συνοδός πρωτεΐνη, που αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης (Bellyei *et al.* 2006). Θεωρείται ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο η Hsp90 έχει κυρίαρχο ρόλο, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (Turi *et al.* 2015). Στο προηγούμενο κεφάλαιο αποδείξαμε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 39°C στους 41°C για έξι ώρες προκαλεί αύξηση της έκφρασης του *HSPB11* στα ωάρια που εκτίθενται στη ΘΚ, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στην έκφραση των *HSPA1A* και *HSP90AA1*. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μία άλλη μελέτη, στην οποία το *HSPB11* ήταν το μοναδικό μεταξύ 16 HSP γονιδίων που μελετήθηκαν, που μεταβλήθηκε σημαντικά σε έμβρυα βοοειδών μετά από έκθεση

σε ΘΚ (Sakatani *et al.* 2013). Συνάγεται επομένως ότι, μόνη η προσθήκη Hsp70 υποκινεί μία ισχυρότερη ανταπόκριση στα ωάρια, που υποστηρίζεται περαιτέρω από την αυξημένη έκφραση του SOD2 (αντιοξειδωτικό) και του GPX1 (αντιοξειδωτικό). Το γονίδιο SOD2 αποτελεί τμήμα της οικογένειας της υπεροξειδικής δισμουτάσης, που καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου, που παράγονται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, σε υπεροξείδια του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (Fukai & Ushio-Fukai 2011). Το γονίδιο GPX1 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, που ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης, μέλη της οποίας μετατρέπουν τα υπεροξείδια του υδρογόνου μέσω οξείδωσης της γλουταθειόνης, σε νερό (Lubos *et al.* 2011). Η έκφραση του GPX1 αυξήθηκε τόσο στα ωάρια όσο και στις βλαστοκύστες παρουσία της Hsp70 στους 39°C (H39), σε σύγκριση με τα ωάρια και τις βλαστοκύστες που ωρίμασαν στους 39°C (C39), υποδεικνύοντας ότι η Hsp70 είναι ανώτερη ιεραρχικά στην αλληλουχία απόκρισης στη ΘΚ, σε σύγκριση με τον προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην αύξηση της θερμοκρασίας, που επάγεται από το οξειδωτικό stress. Η προσθήκη της Hsp70 οδήγησε επίσης σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του BCL2 ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Το γονίδιο BCL2 δρα ως προστατευτικό μόριο κατά τη διάρκεια της ΘΚ μέσω του αντι-αποπτωτικού του ρόλου και η υπερέκφραση του έχει διαπιστωθεί σε μελέτες που έγιναν σε αγελάδες σε ΘΚ (Somai *et al.* 2015, Cory 1995, Pernice *et al.* 2011, Yadav *et al.* 2013). Το γονίδιο BCL2 κωδικοποιεί μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, που λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού θανάτου, μέσω της αναστολής της δράσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Η έκφραση του έχει συσχετιστεί με υψηλής ποιότητας έμβρυα (Filali *et al.* 2009, Gomez *et al.* 2009).

Επιπλέον, η προσθήκη της Hsp70 οδήγησε σε στενή συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων G6PD, HSPB11, SOD2 and GPX1. Είναι εμφανές ότι η Hsp70 συνδέεται στενά με τη ρύθμιση του μηχανισμού έναντι του οξειδωτικού stress μέσω της HSPB11, και εντάσσει τα τρία αντιοξειδωτικά γονίδια (G6PD, SOD2, GPX1) στον ίδιο μηχανισμό ρύθμισης.

Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, η προσθήκη της Hsp70 οδήγησε σε τροποποίηση της έκφρασης τριών γονιδίων, και συγκεκριμένα των HSPA1A, HSP90AA1 και HSF1. Οι παράγοντες heat shock (HSFs), που κωδικοποιούνται από το γονίδιο HSF1, είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή της σύνθεσης των Hsps υπό συνθήκες stress (Ju 2005). Σε συνθήκες ΘΚ, οι HSFs ενεργοποιούνται, εισέρχονται στον πυρήνα και συνδέονται στους παράγοντες θερμικού σοκ (HSEs). Η αντίδραση αυτή οδηγεί σε μεταγραφή των HSPs (Morimoto 1998). Η εξωγενής χορήγηση Hsp70 φαίνεται ότι οδηγεί το κύτταρο σε μία αντανakλαστική ανάγκη για τροποποίηση της παραγωγής των Hsps. Το γονίδιο HSPA1A ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Hsp70, οπότε υποθέτουμε, ότι υπάρχει μία αρνητική ανάδραση στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών εξαιτίας της εξωγενούς προσθήκης Hsp70 στο

υπόστρωμα, ενώ το *HSP90AA1* είναι μέλος της οικογένειας Hsp90, και, όπως επισημάνθηκε ανωτέρω, υπερεκφραζόμενο, άσκησε τον κυτταροπροστατευτικό του ρόλο.

Τα συντονισμένα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου είναι ενδεικτικά των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα σε κάθε ομάδα. Συγκρίνοντας τα συντονισμένα πρότυπα μεταξύ των ομάδων, αποκαλύφθηκε ότι η έκφραση του *IGF1*, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, είναι στενά συνδεδεμένη με την έκφραση των *CPT1B* και *GSTP1*, παρουσία της Hsp70. Το γονίδιο *CPT1B* κωδικοποιεί την παλμιτυλοτρανσφεράση-1B της καρνιτίνης, ένα σημαντικό ένζυμο για την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, απαραίτητο για την εξέλιξη της μειωτικής διαίρεσης και την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων (Dunning *et al.* 2010). Η στενή συσχέτιση του με το *IGF1* δείχνει ότι ενδέχεται να εμπίπτει στο φάσμα της ρύθμισης των μηχανισμών ανάπτυξης του *IGF1*. Αξιοσημείωτο είναι, ότι η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GSTP1*), σημαντικό ένζυμο της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στα κύτταρα, είναι τόσο στενά συνδεδεμένη με γονίδια που σχετίζονται με την παροχή ενέργειας και την ανάπτυξη. Αν και είναι γνωστό ότι το γονίδιο *GSTP1* παρουσιάζει αντι-αποπτωτική δραστηριότητα μέσω διαφόρων μονοπατιών (Tsuchida & Yamada 2014), μέχρι στιγμής η λειτουργία του δεν έχει συνδεθεί με μηχανισμούς ανάπτυξης. Επιπλέον, τα γονίδια *HSF1* και *BCL2* εμφανίζουν μία ισχυρά αρνητική συσχέτιση, καθώς το *HSF1* υπερεκφράσθηκε εξαιτίας της προσθήκης της Hsp70, ενώ το *BCL2* υπερεκφράσθηκε (αν και όχι σημαντικά) ειδικά στην ομάδα H41 όπως αυτό αντικατοπτρίζεται στις συγκρίσεις κατά ζεύγη, ασκώντας σύμφωνα με τις ιδιότητες που περιγράφονται παραπάνω, αντι-αποπτωτική δράση.

Η προσθήκη της Hsp70 τροποποίησε την έκφραση των γονιδίων *AKR1B1*, *IGF1*, *GPX1*, *HSPA1A*, *BAX* και *ATP1A1* (Γράφημα 11) στις βλαστοκύστες, ενώ η έκφραση του *GSTP1* παρουσίασε επίσης σημαντικές διαφορές στις ομάδες H και C. Η έκφραση του *AKR1B1*, που προστατεύει έναντι των τοξικών αλδεϋδων που προέρχονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Singh *et al.* 2015), παρουσία της Hsp70 υπερεκφράσθηκε, υποδεικνύοντας τη προστατευτική δράση της Hsp70. Επιπλέον, δεδομένου ότι το γονίδιο *IGF1* είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των μηχανισμών ανάπτυξης (Qu *et al.* 2016), η υπερέκφρασή του μπορεί να ερμηνεύσει εν μέρει τη δυναμική ανάπτυξης των βλαστοκύστεων. Από την άλλη πλευρά, η έκφρασή του γονιδίου *BAX*, που κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή της απόπτωσης (Huppertz *et al.* 1999, Kidd 1998), υποεκφράσθηκε στις ομάδες H, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από την απόπτωση. Η έκφραση του *HSPA1A* ήταν σταθερά μειωμένη στις ομάδες H όλων των τύπων κυττάρων (ωάρια, κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, βλαστοκύστες), για την οποία έχει ήδη προταθεί ανωτέρω μια πιθανή εξήγηση.

Στην ομάδα όπου έγινε προσθήκη της Hsp70, τα γονίδια *BCL2* και *GPX1* ομαδοποιήθηκαν με τα γονίδια *GSTP1*, *DNMT3A*, *HSP90AA1* και *PLAC8A*. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την ποιότητα και την ικανότητα επιβίωσης των βλαστοκύστεων (το *BCL2* είναι αντι-αποπτωτικό, τα *GPX1* και

GSTP1 είναι αντιοξειδωτικά, το *PLAC8A* είναι υπεύθυνο για τη φυσιολογική εγκατάσταση του εμβρύου και το *DNMT3A* είναι υπεύθυνο για τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό του εμβρύου μετά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος) και η συντονισμένη έκφραση τους μπορεί να υποστηρίξει συντονισμένα την επιβίωση των βλαστοκύστεων παρουσία αντιφλεγμονωδών σημάτων (εξωκυττάρια Hsp70). Αυτή η ομαδοποίηση δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα των μαρτύρων, όπου η έκφραση των *BCL2* και *GSTP1* συσχετίστηκε ισχυρά με τα *ATP1A1*, *IGF1*, και *TLR2*. Αυτά τα γονίδια συμμετέχουν στην ανταπόκριση στο stress (αυξημένη θερμοκρασία και αντιφλεγμονώδη σήματα), και λειτουργούν ως ρυθμιστές της απόπτωσης και της ανάπτυξης (Liu *et al.* 2010, Block *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2005, Eicher *et al.* 2004). Η εμφανής συμβολή της Hsp70 στην αύξηση της παραγωγής εμβρύων στην ομάδα H41, μπορεί να αποδοθεί στην ενίσχυση όλων των προαναφερθέντων προστατευτικών μηχανισμών οι οποίοι επέτρεψαν τη γονιμοποίηση και την εξέλιξη ωαρίων τα οποία δεν διέθεταν κάποιο είδος εγγενούς θερμοαντοχής στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Συνοψίζοντας, αποδεικνύεται ότι η εξωγενής προσθήκη της Hsp70 μπορεί να αντισταθμίσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ στην παραγωγή εμβρύων. Στη μελέτη αυτή, η παρουσία της Hsp70 ενήργησε προστατευτικά για τα ωάρια, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τις βλαστοκύστες, παρεμποδίζοντας την απόπτωση, ενισχύοντας την ανταλλαγή σημάτων και αυξάνοντας την αντιοξειδωτική προστασία του εμβρύου.

Το κεφάλαιο αυτό έχει εξ ολοκλήρου δημοσιευθεί στο περιοδικό *Animals* 2021, 11, 1794.

Κεφάλαιο IV

Συγκριτική μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης/εξέλιξης ωαρίων αγελάδων των φυλών Holstein και Limousine, μετά από έκθεση σε θερμική καταπόνηση κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης

Εισαγωγή

Όπως έχει αναλυθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, η ΘΚ των αγελάδων αποτελεί ισχυρή τροχοπέδη για την εκδήλωση του γενετικού τους δυναμικού, και ανασταλτικό παράγοντα γονιμότητας. Οι ευρωπαϊκές φυλές βοοειδών χαρακτηρίζονται από μειωμένη θερμορυθμιστική ικανότητα, γεγονός που τις κάνει ευάλωτες στην έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Nardone *et al.* 2010). Κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες, οι αγελάδες καταπονούνται και αυτό εκδηλώνεται με έντονη αύξηση των συγκεντρώσεων κορτιζόλης και της Hsp70 (Nanas *et al.* 2021a), μικρότερη κατανάλωση τροφής, και σοβαρή μείωση της γαλακτοπαραγωγής (Liu *et al.* 2019, De Rensis & Scaramuzzi 2003, Ealy *et al.* 1993). Επιπλέον, στις περιόδους ΘΚ, η νοσηρότητα αυξάνεται και η ευζωία των ζώων υποβαθμίζεται σημαντικά (Lacetera 2019). Η έκθεση εγκύων αγελάδων σε ΘΚ έχει σοβαρότατες επιπτώσεις στο κυοφορούμενο έμβρυο επηρεάζοντας τα μελλοντικά του χαρακτηριστικά. Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι οι απόγονοι 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς αγελάδων που εκτέθηκαν σε ΘΚ κατά τα τελευταία στάδια της κυοφορίας, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα γαλακτοπαραγωγής καθώς και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης σε σύγκριση με τους απογόνους αγελάδων που δεν εκτέθηκαν σε αυξημένες θερμοκρασίες (Laporta *et al.* 2020). Με σκοπό την άμβλυνση των αρνητικών επιπτώσεων της ΘΚ, οι σύγχρονες εκμεταλλεύσεις διαθέτουν πλέον εξελιγμένα συστήματα ψύξης, που τροποποιούν το μικροκλίμα των εγκαταστάσεων βελτιώνοντας τις συνθήκες διαβίωσης των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Κάτω από τις τεχνητά τροποποιημένες συνθήκες, υποστηρίζεται η διατήρηση της ικανότητας πρόσληψης ξηράς ουσίας και συντηρείται η γαλακτοπαραγωγή (Turner *et al.* 1992). Μολονότι η τεχνητή ψύξη αποκαθιστά την παραγωγή κατά το θέρος σε συγκρίσιμα επίπεδα με το χειμώνα, η γονιμότητα τους θερινούς μήνες παραμένει σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και για τις αγελάδες που ψύχονται εντατικά (Flamenbaum & Galon 2010).

Μέσω της διαχρονικής εξέλιξης, διάφορες φυλές βοοειδών έχουν προσαρμοστεί επαρκώς και παραμένουν γόνιμες κάτω από αυξημένες θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Gantner *et al.* 2017, Hernández-Cerón *et al.* 2004). Ειδικότερα, φυλές *Bos taurus*, όπως η Senepol και η Romosinuano, και όλες οι φυλές *Bos indicus* έχουν αξιοσημείωτη γενετική θερμοαντοχή, η οποία είναι το αποτέλεσμα της ικανότητας τους να ρυθμίζουν αποτελεσματικά τη θερμοκρασία σώματος (Gaughan *et al.* 1999, Hammond *et al.* 1996). Επιπρόσθετα, τα έμβρυα των θερμοάντοχων φυλών είναι περισσότερο ανθεκτικά στη ΘΚ από τα έμβρυα ευρωπαϊκών φυλών, πιθανότατα εξαιτίας της έμμεσης επιλογής γονιδίων, που ελέγχουν την ανθεκτικότητα στις αυξημένες θερμοκρασίες σε μοριακό επίπεδο (Paula-Lopes *et al.* 2003).

Παρόλο που η διακύμανση στη γονιμότητα σε συνθήκες ΘΚ στις αγελάδες Holstein έχει μελετηθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία, οι πληροφορίες για τις κρεοπαραγωγικές φυλές είναι ιδιαιτέρως περιορισμένες. Αυτό πιθανώς οφείλεται στα διαφορετικά συστήματα εκτροφής των βοοειδών των δύο παραγωγικών κατευθύνσεων. Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, κατά κύριο λόγο αυτών της φυλής Holstein, η οποία παγκοσμίως αποτελεί την κυρίαρχη φυλή γαλακτοπαραγωγής, επικρατεί το εντατικό σύστημα εκτροφής, για τη βιωσιμότητα του οποίου απαιτείται υψηλή γονιμότητα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Σύμφωνα με τα επικρατούντα πρότυπα της Δυτικής Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, οι αγελάδες Holstein εκτρέφονται, κατά κανόνα, σε κλειστές εκτροφές, ενώ οι περισσότερες κρεοπαραγωγές φυλές εκτρέφονται σε συστήματα χαμηλών εισροών, αξιοποιώντας για μεγάλα χρονικά διαστήματα, που παραλλάσσουν αναλόγως των κλιματικών συνθηκών, φυσικούς βοσκοτόπους. Στην πλειονότητα των ελληνικών εκτροφών κρεοπαραγωγών βοοειδών, οι αγελάδες σταβλίζονται μόνο για λίγους μήνες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Νοέμβριος με Μάρτιο) και μετακινούνται σε ορεινούς κυρίως βοσκοτόπους στις αρχές της άνοιξης, όπου μένουν μέχρι αργά το φθινόπωρο. Κατά συνέπεια, εξαιτίας των χαμηλότερων θερμοκρασιών που επικρατούν στα μεγαλύτερα υψόμετρα, της έλλειψης συνωστισμού, της ύπαρξης φυσικής σκιάς και ανέμου, η επίδραση της ΘΚ στις αγελάδες κρεοπαραγωγής φαίνεται ότι είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στην οποία εκτίθενται οι εντατικώς εκτρεφόμενες αγελάδες της φυλής Holstein. Ωστόσο, εξ όσων μπορούμε να γνωρίζουμε, πληροφορίες σχετικά με την συγκριτική θερμοανθεκτικότητα των κρεοπαραγωγικών και γαλακτοπαραγωγικών φυλών δεν υπάρχουν, και κατά συνέπεια είναι άγνωστο εάν η ενδεχόμενη διαφορά θα μπορούσε να αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες.

Στα προηγούμενα κεφάλαια μελετήθηκε η επίδραση της ΘΚ στα ωάρια που υποβάλλονται σε εξωσωματική ωρίμανση και γονιμοποίηση. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από καθαρόαιμες αγελάδες διαφόρων φυλών, όπως επίσης και από μιγάδες, γεγονός που καθιστούσε αδύνατη τη μελέτη της συνεισφοράς των γενετικών χαρακτηριστικών στο βαθμό θερμοαντοχής κάθε φυλής. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση πιθανής διαφοροποίησης στην

ανθεκτικότητα στη ΘΚ των ωαρίων που προέρχονται από καθαρόαιμα άτομα δυο κοινών ευρωπαϊκών φυλών βοοειδών, Holstein και Limousine, και η επίδραση της ΘΚ στη δυνατότητα γονιμοποίησης των ωαρίων, στην εξέλιξη και στην ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων.

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro παραγωγή εμβρύων

Για να αποφευχθεί κάθε δυνατή επίδραση του θερμικού στρες στην ποιότητα των ωαρίων, τα πειράματα της IVP διεξήχθησαν σε θερμοουδέτερη περίοδο του χρόνου (Ιανουάριος με Μάρτιο 2019).

Τα ωάρια των αγελάδων Limousine προέρχονταν από ζώα 3 εκτροφών της Θεσσαλίας, στις οποίες εκτρέφονται καθαρόαιμα άτομα της φυλής, και η αναπαραγωγή γίνεται με πιστοποιημένους ταύρους Limousine, που εισάγονται από τη Γαλλία.

Τα ωάρια των αγελάδων φυλής Holstein, προέρχονταν από αγελάδες εκτροφών της κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας, στις οποίες εφαρμόζεται κατ' αποκλειστικότητα η τεχνητή σπερματέγχυση. Για τη συλλογή των ωοθηκών, επιλέχθηκαν μόνο ζώα που διέθεταν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καθαρόαιμων ατόμων της φυλής.

Η παρούσα ερευνητική φάση ολοκληρώθηκε σε 7 επαναλήψεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 1915 COCs. Τα COCs που συλλέχθηκαν κατανεμήθηκαν αναλόγως της φυλής σε ομάδες μαρτύρων (Holstein, HC, n=405 και Limousine, LC, n=370) και σε δύο ομάδες στις οποίες τα COCs εκτέθηκαν σε αυξημένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής ωρίμανσης (HT, n=652 και LT, n=488).

Τα πρωτόκολλα συλλογής ωαρίων, εξωσωματικής ωρίμανσης, γονιμοποίησης και ανάπτυξης των εμβρύων ήταν πανομοιότυπα με αυτά που περιγράφονται λεπτομερώς στα αντίστοιχα εδάφια των προηγούμενων δυο κεφαλαίων.

Η θερμοκρασία ωρίμανσης των COCs των ομάδων HT και LT διατηρήθηκε στους 39°C για τις πρώτες 2 ώρες, στη συνέχεια αυξήθηκε στους 41°C για τις επόμενες 6 ώρες, και επανήλθε στους 39°C μέχρι το πέρας της IVM.

Από πέντε επαναλήψεις, ομάδες ώριμων ωαρίων (n=10), κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, που συλλεχθήκαν μετά από την απογύμνωση των παραπάνω ώριμων ωαρίων, και βλαστοκύστεων ημέρας 7 (ομάδες των 10) καταψύχθηκαν σε PBS σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C, έως την ανάλυση των γονιδιακών εκφράσεων.

Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο, αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού RNA, κατεργασία με DNάση και σύνθεση cDNA και τα αραιωμένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

Και στα τρία υπό μελέτη υλικά (ωάρια, κύτταρα ωοφόρου δίσκου και βλαστοκύστες) από κάθε ομάδα ελέγχθηκε η έκφραση των ίδιων γονιδίων που εξετάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στα ωάρια, εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων σχετικών με (α) την ΘΚ (*HSPB11*, *HSP90AA1*, *HSPA1A*), (β) την οξειδωση (*SOD2*, *GPX1*), (γ) το μεταβολισμό (*G6PD*) και (δ) τον κυτταρικό κύκλο (*CCNB1*). Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, μελετήθηκε η έκφραση των *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSPB11* (ΘΚ), *SOD2*, *GPX1* (αντιοξειδωτική δραστηριότητα), *GLUT1*, *PTGS2*, *CPT1B*, *G6PD*, *LDHA* (μεταβολισμός), *GREM1* (κυτταρική σηματοδότηση), και τέλος στις βλαστοκύστες η έκφραση των *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *GPX1*, *SOD2* (αντιοξειδωτική δραστηριότητα), *AKR1B1*, *GLUT1*, *PTGS2* (μεταβολισμός), *IGF2R* (κυτταρική σηματοδότηση), *DNMT3A* (ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης), *BAX* (απόπτωση) και *PLAC8* (εμβρυική ανάπτυξη). Χρησιμοποιήθηκαν τρία γονίδια αναφοράς (HKGs), το *YWHAZ*, το *UBA52* και το *EEFA1* για την εξομάλυνση της σχετικής έκφρασης όλων των γονιδίων. Η καταλληλότητα των γονιδίων αναφοράς αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το GeNorm (Vandesompele *et al.* 2002), και την τιμή M ως ένδειξη της σταθερότητας της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων.

Η εφαρμογή της Real time PCR (qPCR) έγινε με τη χρήση του SYBR Green Technology with an AB Step One Plus Mastercycler εις διπλούν για κάθε δείγμα. Οι λεπτομέρειες για τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη για τις αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης σχεδιάστηκαν στην προηγούμενη μελέτη και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε η συνδυαστική προσέγγιση LinReg–Quantification Cycle (Cq): οι τιμές Cq ανακτήθηκαν για κάθε αντίδραση θέτοντας ένα σταθερό κατώφλι και οι μέσες τιμές για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού LinReg, όπως αυτό έχει προταθεί από τους Ramakers *et al.* (2003). Η σχετική έκφραση των γονιδίων εξομαλύνθηκε χρησιμοποιώντας το γεωμετρικό μέσο όρο των τριών γονιδίων αναφοράς.

Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των ποσοστών αυλάκωσης και του σχηματισμού εμβρύων μεταξύ των πειραματικών ομάδων για κάθε φυλή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανεξάρτητων δειγμάτων t-test. Τα δεδομένα

ελέγχθηκαν για απόκλιση από την κανονική κατανομή χρησιμοποιώντας το Shapiro-Wilk normality test και για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε το Levene's test. Για όλες τις αναλύσεις, τέθηκε ένα ποσοστό σημαντικότητας 5%. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με SPSS version 25.0.

Η στατιστική ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του R και πιο συγκεκριμένα:

1. Το Welch t test χρησιμοποιήθηκε μεταξύ των μαρτύρων και των ομάδων που υποβλήθηκαν σε αγωγή σε κάθε φυλή (LC vs, LT, HC vs, HT) για τον εντοπισμό των γονιδίων με σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ των διαφόρων συνθηκών.
2. Οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για κάθε ζεύγος γονιδίων σε κάθε ομάδα χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση *rcorr*, καθώς η γονιδιακή έκφραση συσχέτισης μπορεί να είναι ενδεικτική για έναν παρόμοιο μηχανισμό ρύθμισης που διέπει την έκφραση του γονιδίου. Οι συντελεστές συσχέτισης σχεδιάστηκαν με τη χρήση της συνάρτησης *corrplot*, όπου οι θετικές συσχετίσεις απεικονίζονται με μπλε χρώμα και οι αρνητικές με κόκκινο. Η ένταση του χρώματος και το μέγεθος των κύκλων μεταβάλλονται ανάλογα με τους συντελεστές συσχέτισης. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους του δείγματος (3 επαναλήψεις σε κάθε ομάδα), υπολογίστηκαν οι συνολικοί συντελεστές συσχέτισης ανά φυλή (Holstein vs Limousine), για να αποφευχθούν ενδεχόμενες ψευδείς συσχετίσεις εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού παρατηρήσεων. Καθώς διερευνήθηκαν οι ισχυρά σημαντικές συσχετίσεις ($r > 0.7$), δείγμα μεγέθους 6 θεωρήθηκε επαρκές (Bujang & Baharum 2016).

Αποτελέσματα

In vitro παραγωγή εμβρύων

Η αύξηση της θερμοκρασίας για 6 ώρες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, και στις δύο φυλές, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση τόσο του ποσοστού αυλάκωσης ($p=0.02$) όσο και του ποσοστού δημιουργίας βλαστοκύστεων ($p=0.03$) στις ομάδες HT και LT συγκριτικά με τις ομάδες HC και LC. Στα Limousine, το ποσοστό αυλάκωσης διέφερε ($p=0.04$) μεταξύ των ομάδων LC και LT, και την ημέρα 7, το ποσοστό δημιουργίας βλαστοκύστεων ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα LC σε σύγκριση με αυτό της LT ($p=0.0002$). Παρομοίως, τις ημέρες 8 και 9 ο ρυθμός σχηματισμού βλαστοκύστεων στις ομάδες T και των δυο φυλών ήταν σημαντικά μειωμένος (Holstein $p=0.02$ και $p=0.02$, και

Limousine $p=0.005$ και $p=0.02$ τις ημέρες 8 και 9, αντίστοιχα). Λεπτομερής περιγραφή των αποτελεσμάτων παραγωγής εμβρύων δίνεται στον Πίνακα 6.

Δεν ανιχνεύθηκε σημαντική διαφορά ($p>0.1$) στο ποσοστό αυλάκωσης και στο ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων μεταξύ των μαρτύρων των δυο φυλών. Στις ομάδες T, παρόλο που δεν ανιχνεύθηκε διαφορά στο ποσοστό αυλάκωσης ($p=0.17$), στα ωάρια φυλής Holstein, η παραγωγή εμβρύων ήταν σταθερά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτά της φυλής Limousine ($p=0.002$, 0.02 και 0.03, για τις ημέρες 7,8,9 αντίστοιχα; Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων σε 2 ομάδες COCs αγελάδων φυλών Holstein και Limousine, που ωρίμασαν στους 39°C (ομάδες HC και LC) ή στους 41°C για 6 ώρες από την 2^η έως την 8^η ώρα της IVM (ομάδες HT και LT). Τα αποτελέσματα αφορούν σε 7 επαναλήψεις και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα. Τα αποτελέσματα που είναι επισημασμένα με αστερίσκο διαφέρουν σημαντικά μέσα στην ίδια φυλή, ενώ τα αποτελέσματα που είναι επισημασμένα με διαφορετικό εκθετικό γράμμα παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των 2 φυλών τη δεδομένη χρονική στιγμή.

Ομάδα	ζυγωτά	Αυλάκωση (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 7 (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 8 (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 9 (%)
Holstein μάρτυρες (HC)	360	306 (85.0 $\pm$ 7.6)*	109 (30.3 $\pm$ 8.6)*	128 (35.6 $\pm$ 7.5)*	133 (36.9 $\pm$ 6.4)*
Holstein με θέρμανση (HT)	599	459 (76.6 $\pm$ 7.0)	129 (21.5 $\pm$ 5.2) ^a	148 (24.7 $\pm$ 8.2) ^a	158 (26.4 $\pm$ 9.3) ^a
Limousine μάρτυρες (LC)	333	274 (82.3 $\pm$ 9.8)*	86 (25.8 $\pm$ 4.9)*	101 (30.3 $\pm$ 8.9)*	107 (32.1 $\pm$ 12.3)*
Limousine με θέρμανση (LT)	443	311 (70.2 $\pm$ 6.9)	63 (14.2 $\pm$ 3.2) ^b	73 (16.5 $\pm$ 3.9) ^b	77 (17.4 $\pm$ 5.0) ^b

Εκφράσεις γονιδίων

Φυλή Limousine

-Ωάρια

Στα ωάρια που υποβλήθηκαν σε ΘΚ, παρατηρήθηκε σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου *HSP90AA1* ($p=0.05$) και ανάλογη τάση ($p=0.08$) του γονιδίου *G6PD* ($p=0.08$, Γράφημα 13).

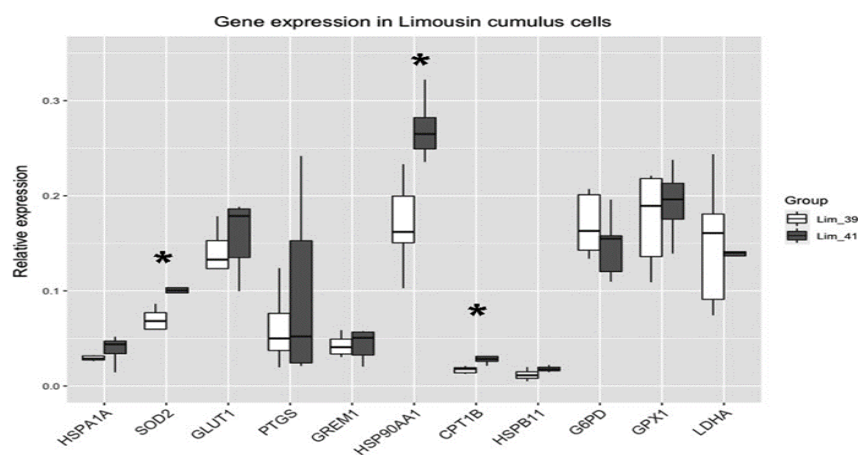
Γράφημα 13: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε ωάρια Limousine. Τα ωάρια ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2^η-8^η ώρα της IVM, Lim41).



-Κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, που υποβλήθηκαν σε ΘΚ, ανιχνεύθηκε υπερέκφραση, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, των γονιδίων *HSP90AA1*, *SOD2* και *CPT1B* ($p=0.002$, 0.045 και 0.026 , αντίστοιχα), και ισχυρή ανάλογη τάση για το *HSPB11* ($p=0.08$, Γράφημα 14).

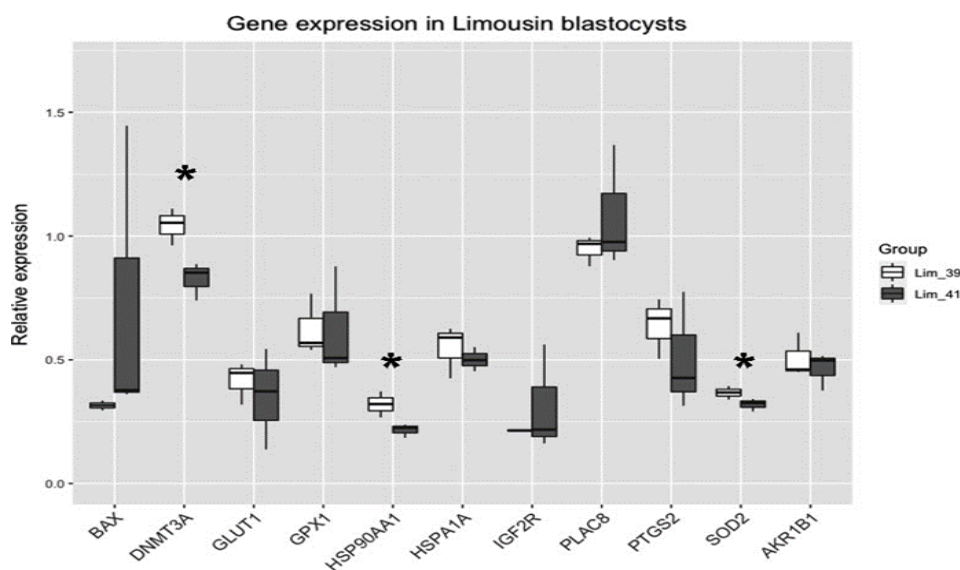
Γράφημα 14: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που προέρχονται από COCs Limousine αγελάδων. Τα κύτταρα ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2^η-8^η ώρα της IVM, Lim41).



-Βλαστοκύστες

Σε αντίθεση με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, στις βλαστοκύστες υπερέκφραση εντοπίστηκε στη ομάδα των μαρτύρων και αφορούσε τα γονίδια *DNMT1* ($p=0.012$), *HSP90AA1* ($p=0.027$) και *SOD2* ($p=0.046$, Γράφημα 15).

Γράφημα 15: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε βλαστοκύστες ημέρας 7 που προέρχονται από αγελάδες Limousine. Τα έμβρυα προέκυψαν από ωάρια που ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2η-8η ώρα της IVM, Lim41).

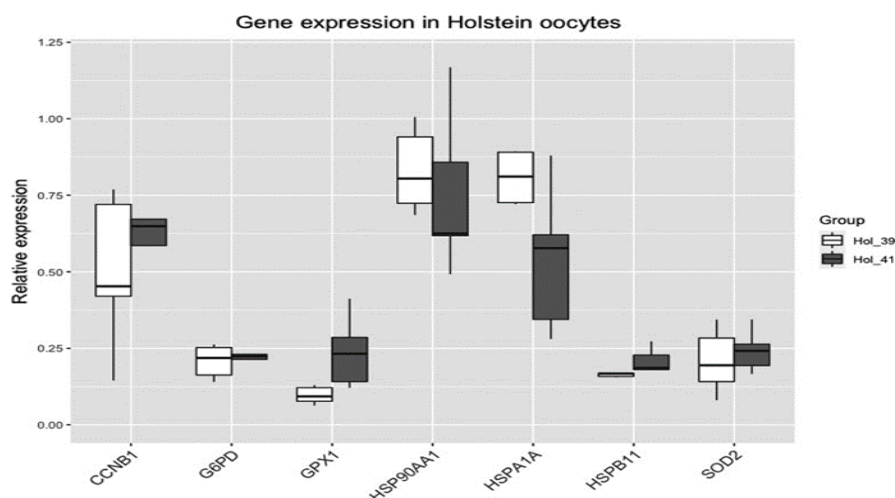


Φυλή Holstein

-Ωάρια

Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των μαρτύρων και των ωαρίων που υποβλήθηκαν σε ΘΚ (Γράφημα 16).

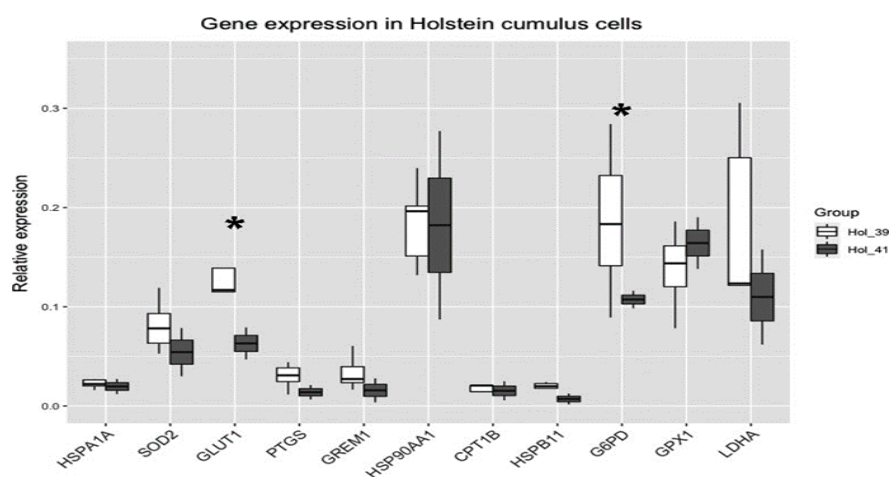
Γράφημα 16: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε ωάρια Holstein. Τα ωάρια ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2^η-8^η ώρα της IVM, Lim41).



-Κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Δύο γονίδια εντοπίστηκαν με σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, το *G6PD* και *GLUT1*, τα οποία παρουσίασαν υπερέκφραση στην ομάδα των μαρτύρων ($p=0.039$ και $p=0.03$, αντίστοιχα, Γράφημα 17).

Γράφημα 17: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που προέρχονται από COCs Holstein αγελάδων. Τα κύτταρα ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2^η-8^η ώρα της IVM, Lim41).



-Βλαστοκύστες

Στις βλαστοκύστες, το γονίδιο *PLAC8* παρουσίασε υπερέκφραση ($p=0.013$) στην ομάδα HT σε σχέση με τους μάρτυρες (HC) (Γράφημα 18).

Γράφημα 18: Σχετική γονιδιακή έκφραση σε βλαστοκύστες ημέρας 7 που προέρχονται από αγελάδες Holstein. Τα έμβρυα προέκυψαν από ωάρια που ωρίμασαν είτε για 24 ώρες στους 39°C (Lim39) ή στους 41°C για 6 ώρες (2η-8η ώρα της IVF, Lim41).

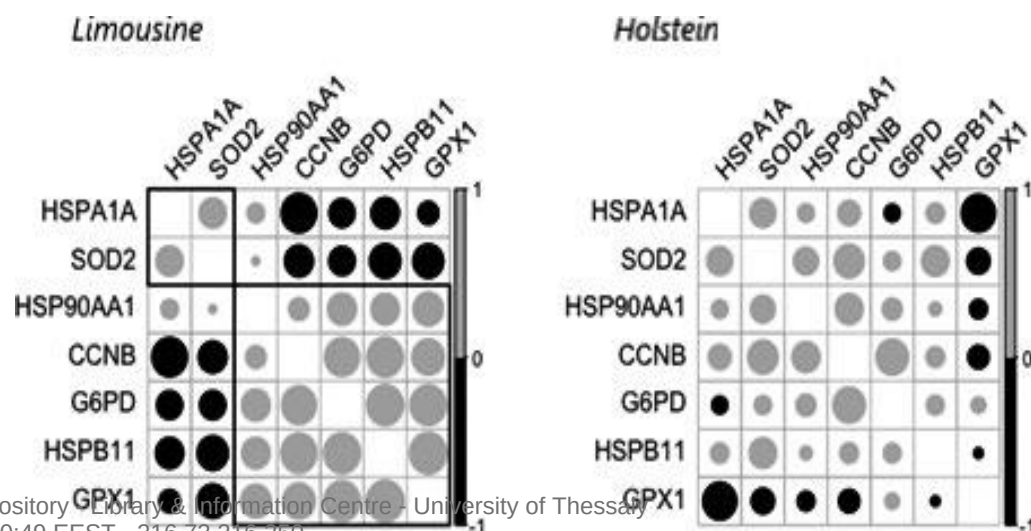


Ανάλυση συσχέτισης

-Ωάρια

Στα ωάρια των αγελάδων της φυλής Holstein υπήρξε ένα ασθενές δίκτυο συσχέτισης στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων, στο οποίο το *GPX1* εμφάνιζε μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση με το *HSPA1A* ($r=-0.8$), ενώ το *CCNB1* έδειξε ισχυρή θετική συσχέτιση με το *G6PD* ($r=0.7$). Αντιθέτως, στα ωάρια αγελάδων φυλής Limousine, υπήρξε ισχυρή σύνδεση στην έκφραση των γονιδίων όπως φαίνεται στο Γράφημα 19: τα γονίδια *CCNB1*, *HSPB11*, *G6PD* και *GPX1* συσχετίστηκαν ισχυρά ($|r|>0.7$).

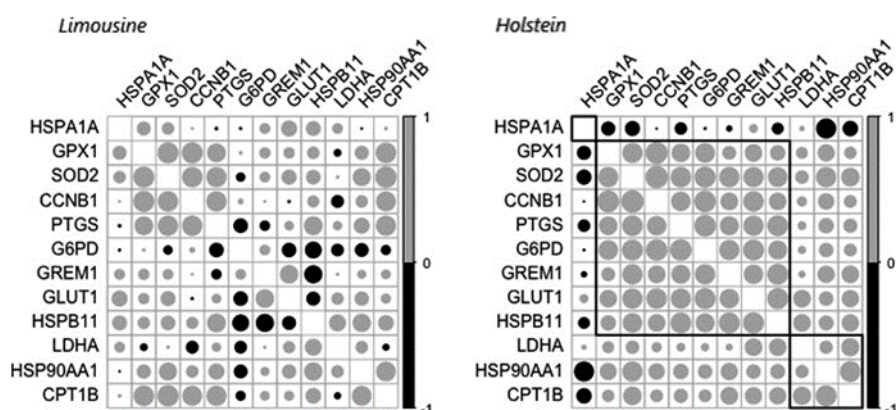
Γράφημα 19: Ανάλυση συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης σε ωάρια Limousine (αριστερά) και Holstein (δεξιά). Το γκρι χρώμα υποδεικνύει θετική συσχέτιση, ενώ το μαύρο υποδεικνύει αρνητική συσχέτιση. Το μέγεθος των κύκλων υποδεικνύει το βαθμό της συσχέτισης.



-Κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου το δίκτυο συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης άλλαξε δραματικά σε σύγκριση με των ωαρίων: 7 γονίδια (*GPX1*, *SOD2*, *PTGS2*, *G6PD*, *GREM1*, *GLUT1*, *HSPB11*) εμφάνισαν ένα συντονισμένο πρότυπο έκφρασης στη φυλή Holstein με ισχυρούς συντελεστές συσχέτισης ($r > 0.65$). Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου της φυλής Limousine, μόνο 3 από τα προαναφερθέντα γονίδια συσχετίστηκαν ισχυρά θετικά (*GPX1*, *SOD2*, *PTGS2*, $r > 0.5$), επιπλέον στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου της ίδιας φυλής, το *CPT1B* συσχετίστηκε ισχυρά με γονίδια που αφορούν την ανταπόκριση στο stress (*GPX1*, *SOD2*, *HSPA1A*, *HSP90AA1*, $r > 0.65$), ενώ στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου φυλής Holstein το *CPT1B* συσχετίστηκε μόνο με το *HSP90AA1*. Τέλος, υπήρξε μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των *HSP90AA1* και *HSPA1A* στην ομάδα των Holstein ($r = -0.85$), ενώ απουσίαζε στα Limousine (Γράφημα 20).

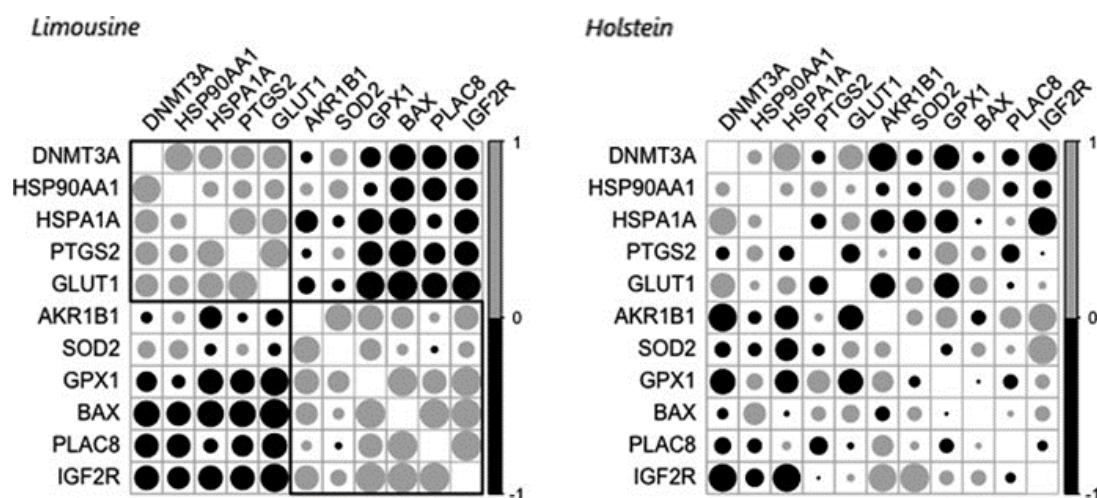
Γράφημα 20: Ανάλυση συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου Limousine (αριστερά) και Holstein (δεξιά). Το γκρι χρώμα υποδεικνύει θετική συσχέτιση, ενώ το μαύρο υποδεικνύει αρνητική συσχέτιση. Το μέγεθος των κύκλων υποδεικνύει το βαθμό της συσχέτισης.



-Βλαστοκύστες

Στις βλαστοκύστες υπήρχαν δυο δίκτυα προτύπων στη συσχέτιση έκφρασης μεταξύ των γονιδίων στη φυλή Limousine: το ένα αφορούσε γονίδια με ισχυρή θετική συσχέτιση (*GPX1*, *BAX*, *PLAC8* και *IGF2R*), ενώ το άλλο κυρίως ισχυρά αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της προαναφερθείσας ομάδας και μιας ομάδας πέντε γονιδίων (*DNMT1*, *HSP90AA1*, *HSPA1A*, *PTGS2*, *GLUT1*). Αυτές οι δυο ισχυρά συσχετιζόμενες ομάδες απουσίαζαν στη φυλή Holstein, με κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις συγκεκριμένων ζευγών γονιδίων: τα *SOD2*, *IGF2R* και *AKR1B1* παρουσίασαν ισχυρή θετική συσχέτιση ($r > 0.65$), ενώ μαζί με το *GPX1* εμφάνισαν ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τα *GLUT1*, *DNMT1* και *HSPA1A* (Γράφημα 21).

Γράφημα 21: Ανάλυση συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης σε βλαστοκύστες ημέρας 7 Limousine (αριστερά) και Holstein (δεξιά). Το γκρι χρώμα υποδεικνύει θετική συσχέτιση, ενώ το μαύρο υποδεικνύει αρνητική συσχέτιση. Το μέγεθος των κύκλων υποδεικνύει το βαθμό της συσχέτισης.



Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απέδειξαν, για πρώτη φορά, ότι τα ωάρια αγελάδων φυλής Holstein είναι περισσότερο ανθεκτικά στη ΘΚ από αυτά των αγελάδων φυλής Limousine. Αυτό πρωτίστως αποτυπώνεται στα υψηλότερα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων, μετά την έκθεση των ωαρίων σε θερμικό στρες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους. Παρόλο που η διαπίστωση αυτή αναφέρεται σε μια μόνο παράμετρο γονιμότητας, φαίνεται να είναι αντίθετη με την πεποίθηση ότι τα βοοειδή κρεοπαραγωγών φυλών είναι, γενικώς, περισσότερο ανθεκτικά στο θερμικό στρες από τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής. Στην πραγματικότητα, σύμφωνα με τους Canali *et al.* (2001), η θερμοουδέτερη ζώνη για τα κρεοπαραγωγά βοοειδή έχει ανώτερο όριο τους 30°C με σχετική υγρασία 80% (THI=83). Σε αντίθεση, όταν τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής εκτίθενται σε τέτοιες συνθήκες περιβάλλοντος υφίστανται ισχυρή καταπόνηση (Morton *et al.* 2007, Bouraoui *et al.* 2002). Οι δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ που έχουν διαπιστωθεί στις αναπαραγωγικές αποδόσεις των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής, στην πρόσληψη ξηράς ουσίας και γενικά στους δείκτες ευζωίας, εκδηλώνονται επίσης και στα βοοειδή κρεοπαραγωγής, αλλά σε πιο ήπιο βαθμό. Αυτό πιθανόν αποδίδεται στο μικρότερο μεταβολικό θερμικό φορτίο των φυλών κρεοπαραγωγής, σε συνδυασμό με τα παραδοσιακά χαμηλής εισροής, εκτατικά συστήματα εκτροφής, τα οποία είναι παρόμοια παγκοσμίως (Summer *et al.* 2019, Nguyen *et al.* 2010, St-Pierre *et al.* 2003). Παρόλα αυτά, όταν αγελάδες φυλής Friesian υποβάλλονται σε ελεγχόμενο θερμικό στρες, παρουσιάζουν μεγαλύτερη

αύξηση στο ρυθμό αναπνοής και στη θερμοκρασία σώματος, από τις αγελάδες φυλής Limousine όταν αυτές εκτίθενται σε παρόμοιες συνθήκες, αλλά η πρόσληψη ξηράς ουσίας και οι συγκεντρώσεις τριωδοθυρονίνης δεν επηρεάζονται, σε αντίθεση με τις αγελάδες της φυλής Limousine (Pereira *et al.* 2008).

Στη δική μας μελέτη, τα ποσοστά αυλάκωσης επηρεάστηκαν με παρόμοιο τρόπο και στις δυο φυλές, αποδεικνύοντας για ακόμα μια φορά ότι τα ωάρια και/ή τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη ΘΚ, ακόμα και όταν αυτή διαρκεί για σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της προηγούμενης μελέτης, που αφορούσε ομάδες ωαρίων διαφόρων φυλών (Holstein, Limousine και μιγάδων), τα οποία ωρίμασαν *in vitro* κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Τα αποτελέσματα, είναι επίσης σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές άλλων ερευνητών, στις οποίες παρουσιάζονται μειωμένα ποσοστά αυλάκωσης μετά από αύξηση της θερμοκρασίας για 6 ή 12 ώρες (Gendelman & Roth 2012c, Roth & Hansen 2005). Αντιθέτως, σε άλλες μελέτες, κάτω από παρόμοιες συνθήκες ωρίμανσης, παρόλο που αναφέρεται σημαντική μεταβολή στην ακεραιότητα της δομής των ωαρίων, δεν αναφέρονται διαφορές στο ποσοστό αυλάκωσης (Payton *et al.* 2018, Edwards *et al.* 2005). Σε κάθε περίπτωση, τα ωάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη ΘΚ: τριώρη έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία είναι αρκετή για να προκαλέσει κυτταροπλασματική αποδιοργάνωση παρόμοια με αυτή των γηρασμένων ωαρίων, η οποία αποδίδεται σε έντονο οξειδωτικό στρες (Maya-Soriano *et al.* 2013b, Andreu-Vazquez *et al.* 2010).

Ένα σημαντικό εύρημα, που αφορούσε τα ωάρια των αγελάδων Limousine, ήταν ότι παρουσίασαν ισχυρότερη ανταπόκριση στην αυξημένη θερμοκρασία σε σχέση με αυτά της φυλής Holstein. Η ευαισθησία αυτή εκδηλώθηκε με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση ενός *HSP* γονιδίου και με το πρότυπο συσχέτισης της έκφρασης αρκετών γονιδίων, που σχετίζονται με την ανταπόκριση σε εξωγενή παράγοντα στρες. Πιο συγκεκριμένα, στις αγελάδες φυλής Limousine, η έκφραση του γονιδίου *HSP90AA1* υπερεκφράστηκε στα ωάρια που είχαν υποστεί ΘΚ. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια *Hsp90* πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της θερμοαντοχής (Kumar *et al.* 2018). Το γονίδιο *HSP90AA1* παρουσιάζει αντι-αποπτωτικό ρόλο στα θηλαστικά (Garrido *et al.* 2001). Η ρύθμιση της έκφρασης, υπολογισμένη με συντελεστές συσχέτισης, ανέδειξε σημαντικές μεταβολές ανάμεσα στις δύο φυλές. Τα ωάρια των αγελάδων φυλής Limousine, σε αντίθεση με αυτά των Holstein, έδειξαν ισχυρά συσχετισμένη έκφραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών γονιδίων (*G6PD*, *GPX1*), ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ (*HSPB11*) και του *CCNB1*, το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, η ίδια ανταπόκριση στη γονιδιακή έκφραση παρατηρήθηκε και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των Limousine, αν και υπήρχε μια απόκλιση στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται μαζί (Γράφημα 14). Η έκφραση ενός

αντιοξειδωτικού γονιδίου (*SOD2*) ενισχύθηκε, μαζί με αυτή του *HSP90AA1* και ενός γονιδίου που σχετίζεται με το μεταβολισμό (*CPT1B*). Το γονίδιο *SOD2* είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των υποπροϊόντων υπεροξειδωσής κατά τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορύλωση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο, προστατεύοντας το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες (Fukai & Ushio-Fukai 2011). Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *CPT1B* συμμετέχει σε μια μιτοχονδριακή διαδικασία, τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων (Bonnetfont *et al.* 2004). Η ρύθμιση της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων, και η διαχείριση των επιβλαβών υποπροϊόντων της, είναι σημαντικές για το κύτταρο, ειδικά σε περίπτωση ΘΚ (Payton *et al.* 2018). Ωστόσο, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των Limousine φαίνεται να έχουν χάσει την ισχυρή συσχέτιση μιας ομάδας γονιδίων σε σύγκριση με αυτά των Holstein (*GREM1*, *GLUT1*, *HSPB11*, *GPX1*, *SOD2*, *PTGS2* και *G6PD*). Κάποια από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την απόκριση του κυττάρου στο στρες (*HSP11*, *SOD2*, *GPX1*, *PTGS2* και *G6PD*). Η ενεργοποίηση των προστατευτικών μηχανισμών ενάντια στην απειλή της ΘΚ είναι μια διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, καθώς η δράση των Hsp πρωτεϊνών εξαρτάται από το ATP (Richter *et al.* 2010). Επιπλέον, το επαγόμενο οξειδωτικό στρες προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή των μιτοχονδρίων (Slimen *et al.* 2014) με περαιτέρω εξάντληση των πηγών ενέργειας, μειώνοντας την διαθεσιμότητα του ATP. Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι η έντονη απόκριση των ωαρίων και των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου στο στρες, δεν διασφαλίζει απαραίτητως τη βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά μπορεί να έχει και αντίθετα αποτελέσματα. Θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί ότι η διαταραχή του προτύπου συσχέτισης αυτών των γονιδίων, είχε δυσμενείς επιπτώσεις στη βιωσιμότητα του κυττάρου, η οποία εκδηλώθηκε με τη σημαντικά μειωμένη παραγωγή εμβρύων σε αυτήν τη φυλή. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την υποέκφραση των *HSP90AA1* και *SOD2* στις βλαστοκύστες των Limousine. Ως εκ τούτου, η έλλειψη ενέργειας θα μπορούσε να θεωρηθεί ως πρωταρχική αιτία για την αδυναμία των πρώιμων βλαστοκύστεων να διατηρήσουν ενεργούς τους προστατευτικούς μηχανισμούς, μολονότι τα υπεύθυνα γονίδια είχαν παρουσιάσει υπερέκφραση στα ωάρια και/ή στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Παρόλο που η μείωση του ποσοστού αυλάκωσης μεταξύ των δυο φυλών ήταν παρόμοια, το πρότυπο των γονιδιακών εκφράσεων διέφερε σημαντικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τα Limousine, κανένα από τα *HSPs* γονίδια δεν εκφράστηκε διαφορετικά στα ωάρια ή τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των Holstein. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι σε αυτήν τη φυλή, η αύξηση της θερμοκρασίας που επιλέχθηκε δεν ήταν αρκετά υψηλή ώστε να πυροδοτήσει την αντίστοιχη κυτταρική απόκριση.

Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού παρά τη γενική μείωση των ποσοστών σύλληψης και την αυξημένη συχνότητα πρώιμων εμβρυικών θανάτων, ένα μικρό ποσοστό αγελάδων παραμένει

αξιοσημείωτα γόνιμο κατά την πρώτη τεχνητή σπερματέγχυση (Nanas *et al.* 2020). Εξετάζοντας διαφορές σε χαρακτηριστικά πρώιμης εγκυμοσύνης κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του χειμώνα, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των γλυκοπρωτεϊνών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (PAGs) είναι υψηλότερες το καλοκαίρι από αυτές του χειμώνα (Nanas *et al.* 2021a). Είναι γνωστό ότι οι PAGs συντίθενται στον πλακούντα (Pohler *et al.* 2015, Beckers *et al.* 1998), κατ'έκταση φαίνεται ότι όσα έμβρυα επιβιώνουν κατά τη διάρκεια των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών του καλοκαιριού, σχηματίζουν έναν πολύ πιο λειτουργικό πλακούντα. Το γονίδιο *PLAC8* σχετίζεται με την ανάπτυξη του πλακούντα και την εγκατάσταση του πρώιμου εμβρύου (El-Sayed *et al.* 2006), ως εκ τούτου η παρατηρούμενη υπερέκφρασή του μόνο στις βλαστοκύστες των Holstein που εκτέθηκαν στη ΘΚ, αποτελεί μια εύλογη ερμηνεία των προηγούμενων ευρημάτων ότι μόνο τα έμβρυα με καλά αναπτυγμένο πλακούντα μπορούν να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες του καλοκαιριού. Δεδομένης της κατάστασης αυτής, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στις αγελάδες Limousine η πιθανότητα διατήρησης της εγκυμοσύνης κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μειώνεται συγκριτικά με τις αγελάδες Holstein. Τα τελευταία 30 χρόνια, η αναπαραγωγική ικανότητα και η συνολική γονιμότητα βρίσκονται υπο συνεχή έλεγχο και αυστηρή αξιολόγηση στις περισσότερες εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Η διατήρηση της υψηλής γονιμότητας των αγελάδων είναι υψίστης σημασίας, γιατί η παράταση των «ανοικτών ημερών» οδηγεί σε μειωμένη ετήσια παραγωγή γάλακτος και αυξημένα ποσοστά απομάκρυνσης ή αντικατάστασης (Auldist *et al.* 2007, Rajala-Schultz & Gronn 1999). Για το λόγο αυτό, πολλές αγελάδες απομακρύνονται εάν αποτύχουν να συλλάβουν μέχρι τις 220 ημέρες γαλακτοπαραγωγής (DIM), αν και έχει προταθεί ότι η προσπάθεια γονιμοποίησης μιας μέσης αγελάδας μέχρι περίπου τις 260 DIM δεν προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες (Esslemont *et al.* 2001). Εξαιτίας αυτής της αυστηρής επιλογής όσον αφορά τη γονιμότητα, οι αγελάδες που γεννούν νωρίς την άνοιξη έως το καλοκαίρι, έχουν αυξημένες πιθανότητες να απομακρυνθούν εξαιτίας της αποτυχίας έγκαιρης σύλληψης. Σε βάθος χρόνου, η στρατηγική απομακρύνσεων με βάση την αναπαραγωγική απόδοση, οδηγεί, στις εκτροφές αγελάδων Holstein, σε μία ακούσια επιλογή με γνώμονα τη θερμοαντοχή, κάτι, το οποίο δεν ισχύει για τις αγελάδες Limousine, καθώς τα συστήματα εκτροφής δεν είναι εντατικά και η καθημερινή παραγωγή δεν υφίσταται.

Τέλος, το *DNMT3A* σε βλαστοκύστες που προήλθαν από θερμικά καταπονημένα COCs αγελάδων Limousine, αλλά όχι Holstein, υποεκφράστηκε. Το γονίδιο *DNMT3A* εμπλέκεται σε επιγενετικά φαινόμενα, καθώς κωδικοποιεί τη *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράση, που ελέγχει μερικώς τη δραστηριότητα της μεθυλίωσης. Η μειωμένη έκφραση του *DNMT3A* συνδέεται με αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Sagirkaya *et al.* 2006). Προς υποστήριξη αυτού, η έκφραση του *DNMT3A* είναι αυξημένη σε βλαστοκύστες που προκύπτουν από ωάρια που

ωριμάζουν *in vitro* σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα -ένα δυσμενές περιβάλλον για τα υπο ωρίμανση ωάρια- υποδεικνύοντας το σχηματισμό καλής ποιότητας βλαστοκύστεων (Van Hoeck *et al.* 2011).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η μικρής διάρκειας έκθεση των υπό ωρίμανση ωαρίων και των δύο φυλών σε αυξημένη θερμοκρασία έχει δυσμενή επίδραση στην ικανότητα ανάπτυξης τους, και υποδηλώνουν ότι (α) τα ωάρια των αγελάδων Limousine είναι πιο ευάλωτα στη ΘΚ από αυτά των Holstein, (β) η αυξημένη θερμοευαισθησία των Limousine αποδίδεται στην εξάντληση της ενέργειας στα ωάρια και /ή στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και (γ) στις αγελάδες φυλής Holstein οι βλαστοκύστες, που προέρχονται από ωάρια που εκτέθηκαν σε συνθήκες ΘΚ, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να σχηματίσουν έναν καλά λειτουργικό πλακούντα.

Το κεφάλαιο αυτό δημοσιεύθηκε αυτούσιο στο περιοδικό *Reproduction of Domestic Animals* 2021, 56, 1302-1314.

Κεφάλαιο V

Η επίδραση της προσθήκης της Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας, στην ανάπτυξη και την ποιότητα εμβρύων βοοειδών που εκτέθηκαν σε θερμική καταπόνηση

Εισαγωγή

Όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα των κεφαλαίων 2,3 και 4 και από πληθώρα μελετών, που μνημονεύονται στα προηγούμενα κεφάλαια, η δυσμενής επίπτωση της ΘΚ στα υπό ωρίμανση ωάρια είναι αδιαμφισβήτητη. Τα πρώιμα έμβρυα παρουσιάζουν μια διφασική ανοχή στη ΘΚ. Τα νεαρά έμβρυα είναι εξαιρετικά ευάλωτα στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους- μέχρι το στάδιο των 8-κυττάρων ενώ, σε μεταγενέστερα στάδια καθίστανται περισσότερο ανθεκτικά. Αυτό έχει αποδειχτεί σε πολλά είδη ζώων, όπως στα βοοειδή (Ealy & Hansen 1994, Ealy *et al.* 1993), στα πρόβατα (Dutt 1963), στα κουνέλια (Alliston *et al.* 1965) και στους χοίρους (Omtvedt *et al.* 1971), όμως, οι υποκείμενοι μηχανισμοί, που επάγουν την εμφάνιση της θερμοαντοχής, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Η έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες εμβρύων βοοειδών που καλλιεργήθηκαν *in vitro*, όταν αρχικώς βρίσκονταν στο στάδιο του ζυγωτού, των 2-, των 4-, των 8-κυττάρων και του μοριδίου, οδήγησε σε μείωση της παραγωγής βλαστοκύστεων, που ήταν ανάλογη του σταδίου ανάπτυξης, όντας μεγαλύτερη στα ζυγωτά ή στα έμβρυα 2-κυττάρων, ενδιάμεση στα έμβρυα 4- με 8-κυττάρων και επηρέασε ελάχιστα αυτή των μοριδίων (Ortega *et al.* 2016, Sakatani *et al.* 2012, Eberhardt *et al.* 2009, Edwards & Hansen 1997). Χρονικά η απόκτηση της θερμοαντοχής συμπίπτει με την 4^η κυτταρική διαίρεση, δηλαδή με το στάδιο των 8-16 κυττάρων, το οποίο συμπίπτει με την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος (Memili & First 2000, De Sousa *et al.* 1998). Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από αυξημένη δραστηριότητα μεταγραφής (Pavlok *et al.* 1993), μεταβολές στην πρωτεϊνοσύνθεση (Frei *et al.* 1989) και οργάνωση της λειτουργίας του πυρήνα (Laurincik *et al.* 2000). Θεωρείται ότι μετά την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος, οι περισσότερες μεταβολές που συμβαίνουν στην κυτταρική λειτουργία και καθιστούν το έμβρυο ανθεκτικό στη θερμική απειλή, αφορούν την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για τη

σύνθεση πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Lerock 2005). Ένας δεύτερος, εξίσου σημαντικός αμυντικός μηχανισμός του εμβρύου ενάντια στη ΘΚ, είναι η αντιοξειδωτική προστασία, η οποία στο πρώιμο έμβρυο ενεργοποιείται, επίσης, ενδογενώς μετά το στάδιο των 8-κυττάρων (Sakatani *et al.* 2013).

Σε προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκαν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η Hsp70 δρα προστατευτικά σχεδόν σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών έναντι πολλών ειδών στρες. Έχει ήδη αναφερθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες η Hsp70 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ κατά τη διάρκεια και μετά τη ΘΚ ανιχνεύεται κυρίως στον πυρήνα συμμετέχοντας στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στη μεταφορά τους διαμέσου των μεμβρανών, αλλά και στη “μετανάστευση” στο μεσοκυττάριο χώρο (Edwards *et al.* 1997, Ju *et al.* 2005, Wegele *et al.* 2004, Mambulla *et al.* 2007, Calderwood *et al.* 2016).

Στο κεφάλαιο 3, δείξαμε ότι η μείωση του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων που επάγεται από τη ΘΚ, όπως και η υποβάθμιση της ποιότητάς τους, μπορεί μερικώς να αναστραφεί μετά από προσθήκη Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης. Ο πρωταρχικός σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να εξετασθεί εάν η προσθήκη της Hsp70 στο υπόστρωμα καλλιέργειας θα μπορούσε να μετριάσει τις αρνητικές επιπτώσεις της έκθεσης πρώιμων εμβρύων βοοειδών σε αυξημένη θερμοκρασία (41°C) για 24 ώρες.

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro παραγωγή εμβρύων

Όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (IVP) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα του εργαστηρίου, όπως έχουν περιγραφεί στα προηγούμενα κεφάλαια. Τα COCs που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό, προέρχονταν από ωοθήκες αγελάδων φυλής Holstein, που συλλέχθηκαν αμέσως μετά από τη σφαγή των ζώων.

Ο πειραματισμός ολοκληρώθηκε μετά από 7 επαναλήψεις και χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 1442 COCs. Η *in vitro* ωρίμανση και γονιμοποίηση πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες – τις τυποποιημένες συνθήκες του εργαστηρίου που περιγράφονται στα προηγούμενα κεφάλαια, ενώ η *in vitro* καλλιέργεια έλαβε χώρα σε τροποποιημένες συνθήκες θερμοκρασίας και σύνθεσης υποστρώματος καλλιέργειας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Είκοσι ώρες μετά τη γονιμοποίηση (pi), και την απογύμνωση των πιθανών ζυγωτών, τα έμβρυα κάθε επανάληψης κατανεμήθηκαν τυχαία σε μία από τις τρεις παρακάτω πειραματικές ομάδες: μάρτυρες,

C (n=396), C41 (n=514), και H41 (n=532). Τα ζυγωτά καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες σε συνθετικό υγρό ωαγωγού (SOF) εμπλουτισμένο με 5% FCS σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, και μέγιστη υγρασία. Τα ζυγωτά της ομάδας των μαρτύρων (ομάδα C) επώασθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας σε τυποποιημένο υπόστρωμα καλλιέργειας (IVC) στους 39°C. Στις ομάδες C41 και H41 τα ζυγωτά επώαστηκαν για το πρώτο εικοσιτετράωρο της καλλιέργειας στους 39°C, έπειτα η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 41°C από την 25^η μέχρι την 48^η ώρα της καλλιέργειας (72^η ώρα pi) και στη συνέχεια στους 39°C για το υπόλοιπο της *in vitro* καλλιέργειας. Τα έμβρυα της ομάδας C41 καλλιεργήθηκαν σε τυποποιημένο υπόστρωμα IVC, ενώ τα έμβρυα της ομάδας H41, και μόνο για την περίοδο που επώαστηκαν στους 41°C, καλλιεργήθηκαν σε τροποποιημένο υπόστρωμα. Η τροποποίηση αυτή αφορούσε την προσθήκη Hsp70 σε συγκέντρωση 5ng/ml. Η επιλογή της συγκεκριμένης δόσης στηρίχθηκε στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Hsp70 στο περιφερικό αίμα αγελάδων φυλής Holstein μετά από έκθεση σε ΘΚ (Nanas *et al.* 2020). Για να εφαρμόζονται όμοιοι χειρισμοί σε όλες τις ομάδες, ταυτόχρονα με την αντικατάσταση του υποστρώματος στην ομάδα H41, τα υποστρώματα των υπολοίπων ομάδων ανανεώνονταν με νέο υπόστρωμα ίδιας σύνθεσης.

Η καταγραφή των ποσοστών αυλάκωσης και σχηματισμού βλαστοκύστεων πραγματοποιήθηκε υπό στερεοσκοπική παρατήρηση στις 48h pi και στις ημέρες 7, 8, και 9 pi, αντίστοιχα. Βλαστοκύστες ημέρας 7 σε ομάδες των 8, από 5 επαναλήψεις, καταψύχθηκαν σε PBS και αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο στους -80°C έως την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.

Εκφράσεις γονιδίων

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του PicoPureTM RNA Isolation Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το DNAfreeTM DNA Removal Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA. Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA εκτιμήθηκαν με τη χρήση του QubitTM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) RNA BR Assay Kit. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 15ng ολικού RNA και ένα συνδυασμό ολιγονουκλεοτιδίων-T και τυχαίων εκκινητών. Τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν περαιτέρω (1:5) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση του RNA και την αντίστροφη μεταγραφή, ήταν αυτές που περιγράφονται λεπτομερώς στα προηγούμενα κεφάλαια.

Για την εκτίμηση της επίδρασης της προσθήκης Hsp στο υπόστρωμα καλλιέργειας επιλέχθηκε μία ομάδα γονιδίων, η έκφραση των οποίων υπολογίστηκε με Real time PCR (qPCR) χρησιμοποιώντας τα ίδια υλικά και μεθόδους που περιγράφονται προηγουμένως. Η γονιδιακή έκφραση των *HSF1*, *HSP90AA1*, *HSPA1A* (απόκριση στη ΘΚ), *GSTP1*, *GPX1* (αντιοξειδωτικά), *PLAC8A* (εγκατάσταση εμβρύου), *DNMT3A* (ρύθμιση επιγενετικών φαινομένων), *ATPA1A* (ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης), *IGF1*, *PTGS2* (κυτταρική σηματοδότηση), *TLR2*, *TLR4*, *TNFA* (ανοσία), *AKR1B1* (μεταβολισμός), *BCL2* και *BAX1* (απόπτωση) αναλύθηκε.

Τα ζεύγη των εκκινητών για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν με τη χρήση των Primer-BLAST και Primer3 και εκτιμήθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>), για την καταλληλότητα τους (διμερή των εκκινητών, σχηματισμοί φουρκέτας, κλπ) και το UCSC In-Silico PCR tool για την αξιολόγηση της ειδικότητας, χρησιμοποιώντας το πιο πρόσφατο γονιδίωμα των ειδών (ARS-UCD1.2 in <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Η πλήρης λίστα των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για τη real time PCR και μέγεθος προϊόντος.

Gene name	Gene description	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size (bp)
HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	CTGGAAGGAGACGACGACAC	ACACACTGGAGGGAATGGAG	103
PLAC8	placenta-specific 8	GTTTCACAGCCAGGTTACAGC	AGAGCCCCACAGAGACAGAT	104
TLR2	Toll like receptor 2	GCTGCCATTCTGATTCTGCT	GCCACTCCAGGTAGGTCTTG	103
AKR1B1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	GAAAGTGGTGAAGCGTGAGG	TAGAGGTCCAGGTAGTCCAGC	129
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha1	CGCCAGGGTTTATCCAGTT	AGGGGAAGCCAGTTTTTTGTT	80
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	GGACCTGCTGTTGCTGGAC	TTCGTGGGGATGGTGGAGTT	103
GPX1	glutathione peroxidase 1	GAAAAGTGCGAGGTGAATGG	GAGAGCAGTGGCGTCGTC	93
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	CGCTTCAGACACTCGCTCAG	120
BCL2	BCL2 apoptosis regulator	CCCTGTTTGATTCTCCTGGC	CTGTGGGCTTCACTTATGGC	107
IGF1	Insulin like growth factor 1	TCACATCCTCCTCGCATCTCTT	AGCATCCACCAACTCAGCC	107
UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	CCGCAAGAAGAAGTGTGGC	GCAAAGGAGAAGCAGGTGGA	84
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	TGGAAGGAGGAGGTGGTGAC	CAGGTGACGCAGGATGGTATTG	211
HSF1	Heat shock transcription factor 1	ATGAAGCACGAGAACGAGGC	GCACCAGCGAGATGAGGAAC	112
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	CTGTAAGTGAAGCAAGGAGC	CCAAGATGACCTACGGGC	95
TLR4	Toll like receptor 4	AGGTAGCCCAGACAGCATTT	GAGCGAGTGGAGTGGTTCA	110

EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	CCCCAGGACACAGAGACTTC	ATTCACCAACACCAGCAGCA	93
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	AGTCTTTGGTCTGGTGCCTG	AACAACCTGCTCATCGCCCC	117
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha	GAAGGAGCATTTGGGAACAG	GTTATTGCGTGAGCCTGGAT	117

Η σχετική έκφραση όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν, εξομαλύνθηκε σύμφωνα με τα ίδια γονίδια αναφοράς (*YWHAZ*, *UBA52* και *EEF1A1*), η καταλληλότητα των οποίων αξιολογήθηκε όπως στις προηγούμενες μελέτες.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση για την *in vitro* παραγωγή εμβρύων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του IBM SPSS Statistics 25.0 for Windows. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα. Η κανονικότητα των δεδομένων ελέγχθηκε με το Shapiro-Wilks test. Η ομοιογένεια μεταξύ των διακυμάνσεων αξιολογήθηκε με τη χρήση του Levene's test of homogeneity of variance. Τα ποσοστά αυλάκωσης εκτιμήθηκαν μεταξύ των ομάδων με one-way ANOVA. Η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και της προσθήκης Hsp70 στην παραγωγή εμβρύων μεταξύ των ομάδων. Η ανάπτυξη εμβρύων μεταξύ των ομάδων C και C41 καθώς και μεταξύ των C41 και H41 εξετάστηκε με το Student's t-test. Η σημαντικότητα ορίστηκε στο $p \leq 0.05$.

Η στατιστική ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του R ως ακολούθως: Για να εντοπιστεί η πιθανή επίδραση της προσθήκης Hsp στη γονιδιακή έκφραση (function `kruskal.test`), εφαρμόστηκε το Kruskal-Wallis test ανάμεσα στις τρεις ομάδες, θέτοντας ως κατώφλι σημαντικότητας το $p \leq 0.05$.

Για την ανίχνευση διαφορών κατά ζεύγη ανάμεσα στα ζεύγη των ομάδων (C39 vs. C41, C39 vs. H41, C41 vs. H41), εφαρμόστηκε το Dunn test ως ad-hoc test, θέτοντας ως κατώφλι σημαντικότητας το $p \leq 0.05$.

Οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν για κάθε ζεύγος γονιδίων σε δύο ομάδες (δείγματα με προσθήκη και χωρίς προσθήκη Hsp), χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση `rcorr`, καθώς η συσχετισμένη γονιδιακή έκφραση μπορεί να είναι ενδεικτική για έναν παρόμοιο μηχανισμό ρύθμισης που διέπει την έκφραση των γονιδίων. Οι συντελεστές απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας τη λειτουργία `corrplot`, μαζί με τις αντίστοιχες p-τιμές.

Αποτελέσματα

In vitro παραγωγή εμβρύων

Η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης αποκάλυψε ότι και οι δυο μεταβλητές, δηλαδή η θερμοκρασία και η προσθήκη Hsp70, προέβλεψαν τα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων στις ημέρες 7 και 9 [ημέρα 7 $F(2,18)=85.273$, $p<0.001$, $R^2=0.905$; ημέρα 9 $F(2,18)=43.082$, $p<0.001$, $R^2=0.827$]. Και οι δύο μεταβλητές συνέβαλαν σημαντικά στην πρόβλεψη ($p<0.05$). Την ημέρα 8, όσον αφορά τη θερμοκρασία, τα ποσοστά ανάπτυξης εμβρύων προβλέφθηκαν ($p<0.05$) από τη θερμοκρασία αλλά όχι από την προσθήκη Hsp70 ($F(2,18)=40.814$, $p<0.001$, $R^2=0.819$), Πίνακας 8.

Πίνακας 8: Ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης (Εξαρτημένη μεταβλητή: ρυθμοί ανάπτυξης εμβρύου τις ημέρες 7, 8, 9, αντίστοιχα και ανεξάρτητες μεταβλητές: θερμοκρασία και Hsp70).

Στάδιο ανάπτυξης εμβρύων	Παράγοντας	B- συντελεστής με	
		διάστημα	p
		εμπιστοσύνης (CI)	
		95%	
βλαστοκύστες ημέρα7	θερμοκρασία	-9.1 (-10.7, -7.6)	<0.001
	Hsp70	3.9 (0.8, 6.9)	0.017
βλαστοκύστες ημέρα 8	θερμοκρασία	−10.0 (−12.5,−7.5)	<0.001
	Hsp70	4.1 (−0.8, 9.0)	0.096
βλαστοκύστες ημέρα 9	θερμοκρασία	-9.9 (-12.2, -7.5)	<0.001
	Hsp70	4.8 (0.2, 9.5)	0.043

Όπως ήταν αναμενόμενο, η ανάλυση one-way ANOVA δεν έδειξε διαφορά στα ποσοστά αυλάκωσης μεταξύ των ομάδων ($p=0.289$). Στην ομάδα C39, τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων στις ημέρες 7, 8, και 9 ήταν σταθερά υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά των άλλων ομάδων, ($p<0.0001$). Στην ομάδα H41 τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά της ομάδας C41 τις ημέρες 7 και 9 ($p<0.02$ και $p<0.03$, αντίστοιχα) ενώ

ανιχνεύθηκε ισχυρή τάση την ημέρα 8 ($p=0.064$). Λεπτομέρειες για τα ποσοστά παραγωγής εμβρύων δίνονται στον Πίνακα 9.

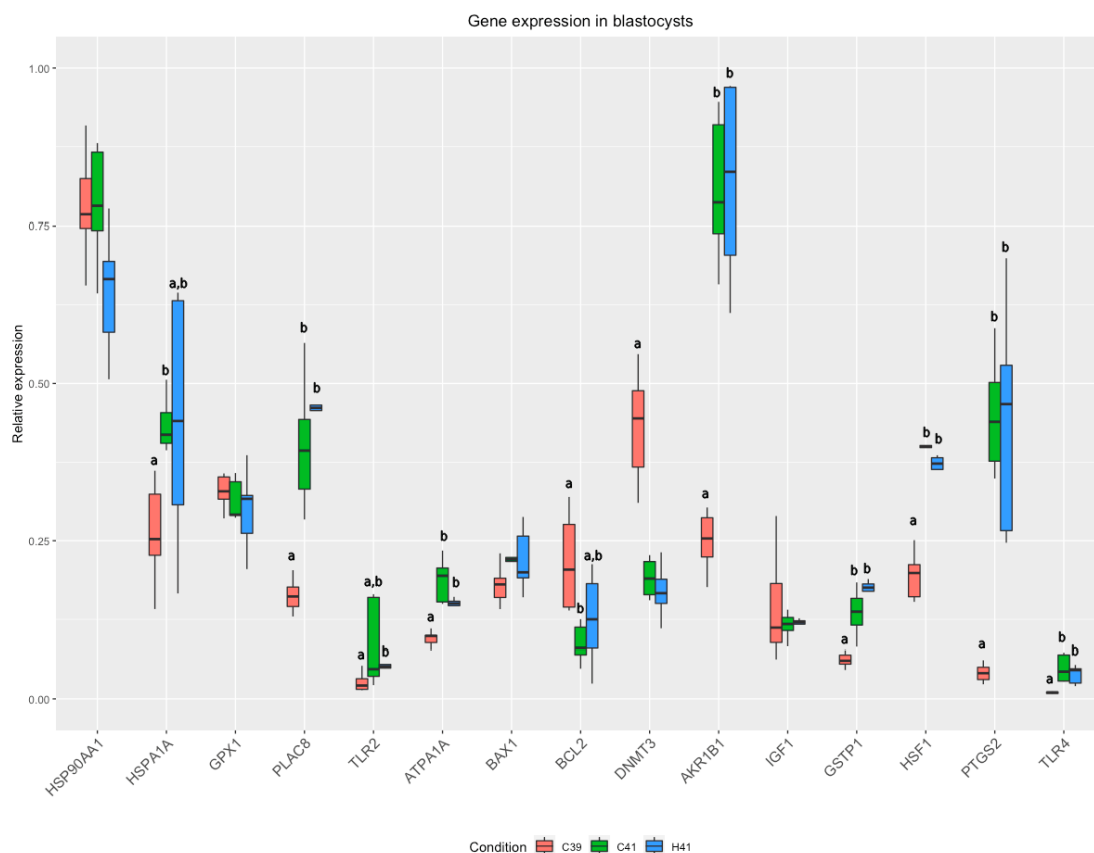
Πίνακας 9: Ποσοστά παραγωγής στις ομάδες μαρτύρων (ομάδα C), μετά από έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία για 24 ώρες (C41) και μετά από έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία με την προσθήκη Hsp70 στο υπόστρωμα IVC (ομάδα H41). Μέσα στις σειρές, οι τιμές που επισημαίνονται με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά.

Ομάδα	αριθμός ζυγωτών	αυλάκωση (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 7 (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 8 (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 9 (%)
C	396	327 (82.6 ± 2.3)	108 (27.3 ± 2.1) ^a	137 (34.6 ± 5.4) ^a	146 (36.9 ± 5.1) ^a
H41	532	427 (80.2 ± 2.1)	68 (12.8 ± 2.0) ^b	96 (18.0 ± 3.2) ^b	114 (21.4 ± 3.5) ^b
C41	514	411 (80.3 ± 3.5)	47 (8.9 ± 3.8) ^c	70 (13.6 ± 4.3) ^b	82 (15.9 ± 3.6) ^c

Εκφράσεις γονιδίων

Η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές στην έκφραση 11 γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των *HSPA1A*, *PLAC8*, *TLR2*, *ATPA1A*, *BCL2*, *DNMT3*, *AKR1B1*, *GSTP1*, *HSF1*, *PTGS2*, και *TLR4*. Οι σημαντικές διαφορές κατά ζεύγη εμφανίζονται στο Γράφημα 22. Καθώς το ενδιαφέρον μας αφορούσε κυρίως την πιθανή επίδραση της προσθήκης Hsp70 σε συνθήκες ΘΚ, εστίασαμε στις διαφορές ανάμεσα στις ομάδες C41 και H41. Δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ωστόσο βρέθηκε ισχυρή τάση ($p=0.07$) για διαφορετική έκφραση 3 γονιδίων στις ομάδες C41 και H41 (*HSF1*, *HSP90AA1* και *ATP1A1*), καθώς επίσης τάση διαφοράς στην έκφραση του *TLR2* ($p=0.10$) (Γράφημα 22).

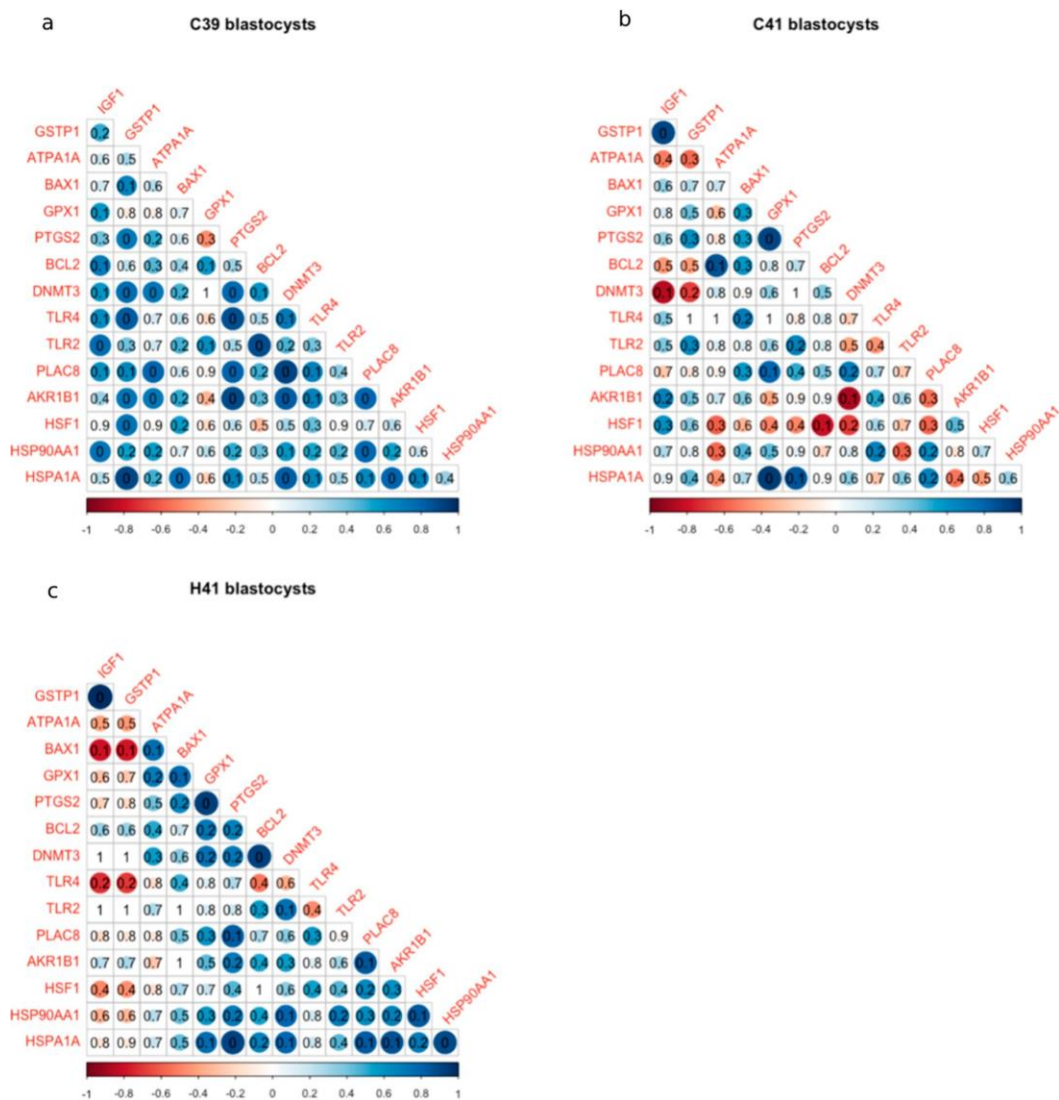
Γράφημα 22: Θηκόγραμμα της κανονικοποιημένης έκφρασης 15 γονιδίων σε βλαστοκύστες που καλλιιεργήθηκαν *in vitro* στους 39°C (C39) ή στους 41°C για 24 ώρες χωρίς (C41) ή με προσθήκη Hsp70 (H41) στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Μεταξύ των τριάδων, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα (σύμφωνα με το Kruskal-Wallis test και το ad-hoc Dunn test).



Σε σύγκριση με την ομάδα C41, οι ομάδες C39 και H41 παρουσίασαν, γενικά, υψηλότερες συσχετίσεις γονιδιακών εκφράσεων. Στην ομάδα C39, δυο ομάδες γονιδίων παρουσίασαν ισχυρά θετικές συσχετίσεις: η πρώτη περιελάμβανε τα *IGF1*, *HSP90AA1*, *BCL2*, *TLR2* και η δεύτερη τα *ATP1A1*, *DNMT3*, *PLAC8*, *PTGS2*, *AKR1B1*, *TLR4*, *GSTP1* και *HSPA1A*.

Η προσθήκη Hsp70 οδήγησε σε υψηλές συσχετίσεις ($r > 0.5$) στην έκφραση 6 γονιδίων (*ATP1A1*, *BAX1*, *GPX1*, *PTGS2*, *BCL2* και *DNMT3*) και μεταξύ των *PLAC8*, *AKR1B1*, *HSP90AA1*, *HSF1*, *HSPA1A*. Τέλος, τα γονίδια *TLR4* και *BAX1* συσχετίστηκαν αρνητικά με τα *IGF1* και *GSTP1*. Στην ομάδα C41, εντοπίστηκαν σποραδικές συσχετίσεις (θετικές ή αρνητικές): το *PTGS2* συσχετίστηκε θετικά με το *GPX1* και το *HSPA1A*, ενώ το *DNMT3* συσχετίστηκε αρνητικά με τα *HSF1*, *AKR1B1*, *IGF1*, *GSTP1* και *ATP1A1* (Γράφημα 23).

Γράφημα 23: Συντελεστές συσχέτισης κατά ζεύγη γονιδίων στις υπό μελέτη ομάδες: βλαστοκύστες που καλλιεργήθηκαν *in vitro* στους 39°C (C39, a) ή στους 41°C για 24 ώρες χωρίς (C41, b) ή με προσθήκη Hsp70 (H41, c) στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Οι θετικές συσχετίσεις εμφανίζονται με μπλε και οι αρνητικές με κόκκινο χρώμα. Η ένταση του χρώματος και το μέγεθος του κύκλου είναι ανάλογα με τους συντελεστές συσχέτισης. Η τιμή *p* κάθε συσχέτισης παρουσιάζεται σε κάθε κύκλο.



Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή, τα έμβρυα που εκτέθηκαν σε αυξημένη θερμοκρασία (41°C) από την 48^η έως την 72^η ώρα της καλλιέργειας, παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Το εύρημα αυτό συνάδει με πληθώρα προηγούμενων αναφορών, που

καταδεικνύουν τις καταστρεπτικές επιπτώσεις της ΘΚ στην ικανότητα ανάπτυξης των πρώιμων εμβρύων βοοειδών (Silva *et al.* 2013, Hansen 2007, Rivera *et al.* 2003, Ealy *et al.* 1995). Η θερμοαντοχή στο αναπτυσσόμενο έμβρυο φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος (στάδιο 8-κυττάρων) (Eyestone & First 1986), ενώ τα προηγούμενα στάδια παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στις αυξημένες θερμοκρασίες (Hansen 2007, Krininger *et al.* 2002, Edwards & Hansen 1997). Στο κεφάλαιο 3 της παρούσας Διατριβής αποδείχθηκε ότι η προσθήκη Hsp70 στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης, προστατεύει σημαντικά τα ωάρια που εκτίθενται σε συνθήκες τεχνητής ΘΚ, και ότι η επίδραση αυτή παραμένει μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Ομοίως, στην παρούσα μελέτη, ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 επιβεβαιώθηκε στα πολύ πρώιμα εμβρυικά στάδια, καθώς η ομάδα που εκτέθηκε σε ΘΚ και στην οποία έγινε προσθήκη της Hsp70 παρουσίασε σημαντικά αυξημένη παραγωγή βλαστοκύστεων σε σχέση με τα έμβρυα που εκτέθηκαν σε ΘΚ χωρίς προσθήκη Hsp70. Μολαταύτα, και στις δύο ομάδες, τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων υπολείπονταν σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (ομάδα C39). Αν και αρχικά είχε θεωρηθεί ότι τα έμβρυα βοοειδών που βρίσκονται στο στάδιο των 2-κυττάρων είναι ευαίσθητα στη ΘΚ εξαιτίας της έλλειψης ή της μειωμένης μεταγραφικής δραστηριότητας, που αποτελεί προϋπόθεση για την προσαρμογή στις περιβαλλοντικές προκλήσεις (Barnes & First 1991), σύντομα αποδείχθηκε ότι τα έμβρυα αυτά είναι ικανά να ανταποκριθούν στη ΘΚ, συνθέτοντας Hsps (Edwards & Hansen 1996). Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη, οι Lelièvre *et al.* (2017) έδειξαν ότι η μεταγραφική απόκριση σε σοβαρού ή μετρίου βαθμού ΘΚ εμφανίζεται μόνο μετά από την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος.

Στη μελέτη μας, η μείωση στα ποσοστά ανάπτυξης βλαστοκύστεων που προκλήθηκε από την έκθεση στους 41°C για 24 ώρες ήταν πιο έντονη στην ομάδα όπου απουσίαζε η Hsp70 από το υπόστρωμα καλλιέργειας. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η Hsp70 παίζει σημαντικό ρόλο στην γονιμοποίηση και στην ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Zhang *et al.* 2011). Πρώιμα έμβρυα ποντικών ή βοοειδών που καλλιεργήθηκαν *in vitro* παρουσία αντισωμάτων για την Hsp70 εμφανίζουν μειωμένα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων και εκκόλαψης (Al-Katanani & Hansen 2002, Neuer *et al.* 1998). Η Hsp70 διατηρεί τη σταθερότητα του κυτταροσκελετού, ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και την ανοσολογική απόκριση, αποτρέπει την κυτταρική απόπτωση και συμβάλλει στη θερμοαντοχή των κυττάρων (Ju 2005, Hansen 1999). Η Hsp70 παρεμποδίζει την απόπτωση, μέσω της διακοπής του μηχανισμού της ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (Velazquez *et al.* 2010), καθώς επίσης και μέσω της αρνητικής ρύθμισης της πρωτεϊνσύνθεσης (Hansen 1999).

Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη για την εκτίμηση, σε μοριακό επίπεδο, της επίδρασης της προσθήκης Hsp70 στο υπόστρωμα της IVC, στην έκφραση σειράς γονιδίων στις βλαστοκύστες. Η αύξηση της θερμοκρασίας (με ή χωρίς την προσθήκη της Hsp70) οδηγεί σε

σημαντικές τροποποιήσεις στη σχετική έκφραση των γονιδίων, καθώς και σε μεταβολές στα πρότυπα συσχέτισης των γονιδιακών εκφράσεων. Τα έντεκα γονίδια που παρουσίασαν διαφορική έκφραση μεταξύ των ομάδων, συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την απόκριση στο stress. Το γονίδιο *HSPA1A* κωδικοποιεί μια Hsp70 πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί ως μοριακή συνοδός, συμμετέχοντας στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, και η έκφραση του αυξήθηκε στα έμβρυα βοοειδών που εκτέθηκαν στη ΘΚ μετά την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος (Lelièvre *et al.* 2017). Η έκφραση των *HSP* γονιδίων βρίσκεται γενικά υπό τη ρύθμιση των παραγόντων ΘΚ, που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *HSF1*, το οποίο ενορχηστρώνει τη σειρά των αντιδράσεων σε συνθήκες διαφόρων μορφών stress (θερμικό stress, οξειδωτικό στρες, κλπ) (Barna *et al.* 2018). Η ενεργοποίηση της απόκρισης θερμικού σοκ (Heat Shock Response, HSR) και της απόκρισης που αφορά στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR), είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, κυρίως μέσω της αναδίπλωσης ή της αποδόμησης των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο, ο ρόλος του *HSF1* ως παράγοντα μεταγραφής δεν περιορίζεται μόνο στα *HSP* γονίδια, καθώς έχει βρεθεί ότι, σε συνθήκες ΘΚ, συμμετέχει στην υπερέκφραση του *PTGS2* στα μονοκύτταρα του αίματος του ανθρώπου (Rossi *et al.* 2012).

Τα αυξημένα επίπεδα προσταγλανδινών έχουν συσχετιστεί με αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη εμβρύων βοοειδών που παρήχθησαν είτε *in vitro* είτε *in vivo* (Scenna *et al.* 2004), και επιπλέον, αυξημένες συγκεντρώσεις προσταγλανδινών – ειδικά της F2α- μπορεί να προκαλέσουν πρόωρη ωχρινόλυση, με επακόλουθη αποβολή του εμβρύου (Malayer *et al.* 1990, Putney *et al.* 1988). Η έκφραση του *DNMT3* ήταν σημαντικά μειωμένη στις ομάδες των θερμικώς καταπονημένων εμβρύων. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια DNA μεθυλοτρανσφεράση και έχει αποδειχτεί ότι η μειωμένη έκφρασή του σχετίζεται με αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Gómez *et al.* 2009, Sagirkaya *et al.* 2006). Επιπλέον, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του *PLAC8* στις ομάδες C41 και H41. Το γονίδιο *PLAC8* ρυθμίζει την ανάπτυξη του πλακούντα και χρησιμοποιείται ως δείκτης της ποιότητας των εμβρύων, καθώς η αυξημένη έκφραση του έχει συνδεθεί με δυνατότητα φυσιολογικής εξέλιξης και ολοκλήρωσης της εγκυμοσύνης (Ghanem *et al.* 2011). Οι σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των *PLAC8* και *DNMT3* σε συνθήκες ΘΚ, που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη, συμφωνούν απολύτως με τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων, και επιβεβαιώνουν ότι λίγα μόνο έμβρυα είναι ικανά να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες stress κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους *in vitro*. πιθανολογούμε ότι πρόκειται για έμβρυα που διαθέτουν ανθεκτικό γονότυπο όσον αφορά τη θερμοαντοχή.

Τα γονίδια *TLR2* και *TLR4* κωδικοποιούν τους υποδοχείς Toll-like (TLRs), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση των παθογόνων και την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης (O'Neill 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι η ΘΚ ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία εμπλέκονται οι TLRs (Zhou *et al.* 2005, Eicher *et al.* 2004), και η υπερέκφραση που εντοπίστηκε στη μελέτη μας συνάδει με τα ευρήματα της μελέτης των Srikanth *et al.* (2017), στην οποία αποδεικνύεται η υπερέκφραση των *TLR2* και *TLR4* σε μόσχους φυλής Holstein υπο συνθήκες ΘΚ. Η αυξημένη έκφραση των TLRs φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη έκφραση των Hsp70s (το γονίδιο *HSPA1A* ανήκει σε αυτήν την οικογένεια), η οποία συνδέεται στους *TLR2* και *TLR4*, έχοντας ανοσορυθμιστική δράση. Ωστόσο, η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης, βρέθηκε ασθενώς θετική στις ομάδες C41 και H41.

Το γονίδιο *ATP1A1* κωδικοποιεί μια από τις τέσσερις υπομονάδες της Na⁺/K⁺ ATPάσης, η οποία εμπλέκεται στην ανταλλαγή ιόντων μέσω της μεμβράνης, συμβάλλοντας στη διατήρηση κατάλληλης ηλεκτροχημικής ισορροπίας (Das *et al.* 2015). Η λειτουργία αυτή είναι εξαρτώμενη από τη διαθέσιμη ενέργεια διότι απαιτεί περίπου το 20-30% του ολικού ATP στα κύτταρα των θηλαστικών σε κατάσταση ηρεμίας (Xu 2005). Επομένως, οι μεταβολές στην έκφραση της Na⁺/K⁺ ATPάσης είναι υπεύθυνες για τις μεταβολές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της ΘΚ και διευκολύνουν τη διαμεσολαβούμενη από τις Hsps απόκριση στη ΘΚ μέσω της ρύθμισης της ισορροπίας του ATP. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του *ATP1A1* μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ΘΚ σε αρκετές φυλές βοοειδών. Κατά τη διάρκεια της ΘΚ, η έκφραση του *AKR1B1*, το οποίο προστατεύει έναντι των τοξικών αλδεϋδων, που προέρχονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων, ήταν αυξημένη, μαζί με την αύξηση της Hsp70, υποδεικνύοντας την προστατευτική επίδραση της Hsp70 (εξωγενούς και ενδογενούς). Αυτό το εύρημα συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας, καθόσον η προσθήκη της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης προκάλεσε υπερέκφραση του *AKR1B1* στις βλαστοκύστες, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική προστασία των εμβρύων.

Το γονίδιο *GSTP1* κωδικοποιεί την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης Pi, που συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των κυττάρων. Το οξειδωτικό στρες τείνει να αυξάνεται σε συνθήκες ΘΚ, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, επιδρώντας αρνητικά στη φυσιολογία και το μεταβολισμό του σώματος (Sakatani 2017, Rispoli *et al.* 2013). Θεωρείται ότι η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου, ενεργοποιώντας αντι-αποπτωτικούς μηχανισμούς (Pallepati & Averill-Bates 2010).

Εστιάζοντας στη διαφορική έκφραση γονιδίων μεταξύ των ομάδων που εκτέθηκαν στη ΘΚ, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της προσθήκης της Hsp70, παρατηρήσαμε διαφορές στην έκφραση τριών γονιδίων (*HSF1*, *HSP90AA1* και *ATP1A1*), που παρουσίασαν ισχυρή τάση υποέκφρασης στην ομάδα H41. Ο ρόλος των *HSF1* και *ATP1A1* συζητήθηκε διεξοδικά σε προηγούμενες ενότητες της συζήτησης. Το γονίδιο *HSP90AA1* ανήκει στην οικογένεια των Hsp90 και κωδικοποιεί μια μοριακή συνοδό πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση των λανθασμένα διπλωμένων

πρωτεϊνών, μέσω της δράσης μιας ATPάσης (Brandvold & Morimoto 2015). Ωστόσο, η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται επίσης και σε άλλες λειτουργίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η μεταγραφή, η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Liu *et al.* 2021, Zuehlke *et al.* 2015), λειτουργίες που απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας για να μετριαστούν οι αρνητικές επιπτώσεις της ΘΚ σε κυτταρικό επίπεδο.

Τα αποτελέσματα μας παρέχουν ικανή τεκμηρίωση για να υποστηριχθεί ότι η προσθήκη εξωγενώς Hsp70 στην καλλιέργεια, έδρασε προστατευτικά σε πολλαπλά επίπεδα για τα αναπτυσσόμενα έμβρυα: αφενός η αφομοίωση ή η απορρόφηση των Hsps από τα πρώιμα έμβρυα παρείχε «έτοιμα για χρήση» υλικά για τα κύτταρα με σκοπό να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, και αφετέρου απάλλαξαν τα έμβρυα από την ανάγκη για έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (όπως αυτά των HSFs, Hsps, κα) και την ενεργοποίηση διαδικασιών που απαιτούν ενέργεια, όπως των UPR και HSR, με τελικό αποτέλεσμα την άμβλυνση των αρνητικών επιπτώσεων της ΘΚ. Συνάγουμε λοιπόν, ότι τα έμβρυα δεν εξαντλούνται ενεργειακά και μπορούν να καταναείμουν την περίσσεια ενέργειας σε άλλες διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση και η ενεργοποίηση του γονιδιώματος, που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους.

Συγκρίνοντας τα ενορχηστρωμένα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης το κυριότερο εύρημα μας ήταν η παρεμπόδιση της συντονισμένης γονιδιακής έκφρασης στην ομάδα C41. Από την άλλη πλευρά, η ομάδα C39 έδειξε μια ισχυρή ρύθμιση στην έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την ικανότητα ανάπτυξης και την ποιότητα των εμβρύων, καθώς επίσης και στη ρύθμιση των προστατευτικών μηχανισμών. Τα γονίδια *GSTP1*, *BAX1*, *PTGS2*, *DNMT3*, *TLR4*, *PLAC8*, *AKR1B1*, *HSF1* και *HSPA1A* παρουσίασαν ισχυρά θετικές συσχετίσεις κατά ζεύγη, γεγονός που είναι ενδεικτικό ενός συντονισμένου προτύπου έκφρασης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτός ο συντονισμός φαίνεται να είναι απαραίτητος για να υποστηρίξει τη σωστή ανάπτυξη και ποιότητα των εμβρύων. Τα γονίδια *GSTP1*, *HSF1*, *HSPA1A* και *BAX1* συμμετέχουν σε μηχανισμούς άμυνας έναντι στρεσογόνων παραγόντων (οξειδωτικό και θερμικό στρες) για να προστατεύσουν τα κύτταρα από την απόπτωση (Gupta *et al.* 2010, Ju 2005, Huppertz *et al.* 1999, Kidd 1998). Το γονίδιο *HSF1* φαίνεται να είναι ο σύνδεσμος μεταξύ των κοινών ρυθμίσεων αυτών των διαδικασιών (Barna *et al.* 2018). Ωστόσο, σε συνθήκες ΘΚ (ομάδα C41), η στενή συσχέτιση στην έκφραση αυτών των γονιδίων φαίνεται να μην υπάρχει, με αποτέλεσμα, τα ισχυρά πρότυπα συσχέτισης να είναι σπάνια. Το γονίδιο *HSPA1A* συσχετίστηκε ισχυρά με τα *GPX1* και *PTGS2*, γεγονός που, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αντικατοπτρίζει τη στενή ρύθμιση των Hsp70 με τα αντιοξειδωτικά γονίδια και την παραγωγή προσταγλανδινών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η προσθήκη εξωγενούς Hsp70 επανέφερε τη συντονισμένη έκφραση των περισσότερων γονιδίων, αν και τα καινούργια γονιδιακά ζεύγη περιελάμβαναν διαφορετικούς συνδυασμούς γονιδίων σε σχέση με αυτά της ομάδας C39. Τα

γονίδια *HSF1*, *HSP90AA1* και *HSPA1A* συσχετίστηκαν θετικά με τα *AKR1B1* και *PLAC8*, γεγονός που συνδέει τους προστατευτικούς μηχανισμούς με την ικανότητα ανάπτυξης του εμβρύου. Αφετέρου, τα γονίδια *DNMT3*, *BCL2*, *PTGS2*, *GPX1*, *BAX1* και *ATP1A1* συσχετίστηκαν ισχυρά. Τα γονίδια *GPX1*, *BCL2*, και *BAX1* είναι ρυθμιστές της απόπτωσης (Huppertz *et al.* 1999, Kidd 1998), ενώ, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η έκφραση των *ATP1A1* και *PTGS2* επηρεάζεται συνήθως από τη ΘΚ.

Συνοψίζοντας, αποδείχτηκε ότι η εξωγενής προσθήκη της Hsp70 μπορεί μερικώς να αντισταθμίσει τις επιβλαβείς επιπτώσεις της ΘΚ στην εξέλιξη και την ανάπτυξη των πρώιμων εμβρύων έως το στάδιο της βλαστοκύστης. Θεωρούμε ότι η θετική δράση της Hsp70 οφειλόταν συνδυαστικά στην αυξημένη παροχή απαραίτητων πρωτεϊνών για την απόκριση στο θερμικό stress, και την αύξηση στη διαθεσιμότητα ενέργειας, η οποία είναι απαραίτητη για την επακόλουθη και αδιατάρακτη ανάπτυξη των εμβρύων.

Το κεφάλαιο αυτό δημοσιεύθηκε αυτούσιο στο περιοδικό *Animals* 2021, 11, 3347.

Κεφάλαιο VI

Μελέτη του μεταγραφώματος των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και των εξωκυτταρικών κυστιδίων σε θερμοουδέτερες συνθήκες και σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής

Εισαγωγή

Οι δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού στην παραγωγή και τη γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής έχουν μελετηθεί εκτενώς (Liu *et al.* 2019, Nardone *et al.* 2010, De Rensis & Scaramuzzi 2003, Ealy *et al.* 1993). Η αιτιολογία του ‘συνδρόμου’ της θερινής υπογονιμότητας των αγελάδων αποδίδεται α) σε ενδοκρινικές διαταραχές που προκαλούνται από τη ΘΚ και αφορούν στη διαταραχή της έκκρισης των γοναδοτροπινών, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης (De Rensis & Scaramuzzi 2003) β) στις βλαπτικές επιπτώσεις της ΘΚ στο ωοθυλακικό περιβάλλον, οι οποίες αφορούν πρωτίστως τα ωάρια και τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (Edwards & Hansen 1996,1997, Rispoli *et al.* 2013 Campen *et al.* 2018), γ) στην ευαισθησία των πρώιμων εμβρύων στη ΘΚ (Ealy & Hansen 1994, Ealy *et al.* 1993). Από την άλλη μεριά, σειρά ερευνητικών αποτελεσμάτων αποδεικνύει ότι μετά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος, το έμβρυο ανακτά μία βαθμιαία αυξανόμενη θερμοαντοχή, με τις βλαστοκύστες (πέραν της ημέρας 8) να είναι σημαντικά πιο ανθεκτικές στο HS σε σύγκριση με τα πρώιμα έμβρυα ή τα ωάρια (Ortega *et al.* 2016, Sakatani *et al.* 2012, Eberhardt *et al.* 2009, Edwards & Hansen 1997). Λαμβάνοντας υπόψη αυτήν τη διαφοροποίηση, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η δυνατότητα επιβίωσης του εμβρύου κάτω από δυσμενείς συνθήκες δεν αποδίδεται μόνο σε γενετικούς παράγοντες, αλλά και ότι, πιθανές διαταραχές στο μικροπεριβάλλον του ωαγωγού, μέσα στο οποίο αναπτύσσεται το πρώιμο έμβρυο, καθορίζουν τη δυνατότητα επιβίωσης του.

Σε όλα τα θηλαστικά, ο κάθε ωαγωγός αποτελεί μία σωληνοειδή δομή, που συνδέει τη σύστοιχη ωοθήκη με τη μήτρα και έχει καταλυτικό ρόλο στη μεταφορά των γαμετών, τη γονιμοποίηση και τη μεταφορά του πρώιμου εμβρύου στον αυλό της μήτρας. Ανατομικά, ο ωαγωγός διαιρείται σε πέντε διακριτές περιοχές, τον κώδωνα, τη λήκυθο, τη σύνδεση της λήκυθου με τον ισθμό, τον ισθμό, και τη σύνδεση του ωαγωγού με τη μήτρα, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία διαφορετικών

τύπων επιθηλιακών κυττάρων, όπως κροσσωτών, μη κροσσωτών και εκκριτικών κυττάρων (Maillo *et al.* 2016). Το περιβάλλον του ωαγωγού, το οποίο αποτελείται κυρίως από το υγρό του ωαγωγού, είναι ένα δυναμικό περιβάλλον, το οποίο υφίσταται σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση του, οι οποίες επάγονται κυρίως από τις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των στεροειδών ορμονών κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου (Smits *et al.* 2017, Lamy *et al.* 2016, 2018). Απλοί και σύνθετοι υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα, μικρού μοριακού βάρους μεταβολίτες, λιπίδια και εξωκυτταρικά κυστίδια είναι τα κύρια συστατικά του υγρού του ωαγωγού (Leese 1988). Αν και ο ωαγωγός είναι ένα μικρό όργανο, χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες τοπογραφικές λειτουργικές ρυθμίσεις, που επηρεάζονται από το στάδιο του οιστρικού κύκλου και από την παρουσία ή την απουσία γαμετών ή εμβρύων, γεγονός που επιτρέπει την αδιατάρακτη επικοινωνία μεταξύ του ωαγωγού και του εμβρύου (Pérez-Cerezales *et al.* 2018). Κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, πολλά γονίδια εκφράζονται διαφορετικά στα κύτταρα της ληκύθου ή του ισθμού, εκ των οποίων κάποια εκφράζονται αποκλειστικά σε μία τοπογραφική περιοχή, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με τη διαφορετική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο υγρό του ωαγωγού κατά την ωοθυλακική και την ωχρινική φάση (Cerny *et al.* 2015, Maillo *et al.* 2015, Seytanoglu *et al.* 2008). Με τη χρήση ενός *in vitro* μοντέλου, οι Hamdi *et al.* (2019) συμπέραναν ότι το μεταγράφομα των κυττάρων του ωαγωγού επηρεάζεται από την παρουσία των πρώιμων εμβρύων (έμβρυα 2- ή 8-κυττάρων), αλλά η απόκριση των κυττάρων στα έμβρυα ρυθμίζεται από το στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου. Επιπλέον, παρουσία εμβρύου, η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος στα κύτταρα του ωαγωγού μειώνεται, επιτρέποντας την επιβίωση του εμβρύου (Hamdi *et al.* 2019, Smits *et al.* 2016). Από την άλλη μεριά, τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού διεγείρουν την παραγωγή ιντερφερόνης-Τ από τα έμβρυα, η οποία ακολούθως προάγει την αντιφλεγμονώδη απόκριση στον ωαγωγό (Talukder *et al.* 2018). Έχει βρεθεί ότι η ΘΚ στα βοοειδή διαταράσσει σοβαρά την ισορροπία της έκκρισης προσταγλανδινών (PGE₂ και PGF_{2α}) στον ωαγωγό, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τη μεταφορά των γαμετών και των εμβρύων εξαιτίας της μειωμένης μυϊκής κινητικότητας (Kobayashi *et al.* 2013). Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την έκκριση της PGE₂ και την έκφραση του *HSP90AA1* στη λήκυθο, αλλά όχι στον ισθμό, ενώ η έκκριση της PGF_{2α} δεν επηρεάζεται σε καμία τοπογραφική περιοχή (Kobayashi *et al.* 2013). Επομένως, οι μεταβολές στο περιβάλλον του ωαγωγού, που οφείλονται στη ΘΚ, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του εμβρύου, και να συμβάλλουν σημαντικά στην υπογονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων επιτυγχάνεται με άμεση επαφή μέσω μορίων σηματοδότησης της μεμβράνης και με παρακρινή σηματοδότηση δια μέσω ορμονών, χημειοκινών και κυτοκινών. Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1) της παρούσας διατριβής, η αρχική αντίληψη ότι τα

εξωσωματικά κυστίδια (EVs) είναι απλώς μεταφορείς κυτταρικών αποβλήτων έχει αναθεωρηθεί, και πλέον έχει αναγνωρισθεί ο ρόλος των EVs ως σημαντικοί διαμεσολαβητές στη διακυτταρική επικοινωνία (Almiñana *et al.* 2018, Al-Dossary *et al.* 2013, Février & Raposo 2004). Ο γενικός όρος EV έχει υιοθετηθεί για το χαρακτηρισμό όλων των κυστιδίων νανομεγέθους, περιλαμβάνοντας τα αποπτωτικά σωμάτια, τα μικροκυστίδια και τα εξωσώματα (Théry *et al.* 2018). Τα EVs είναι νανοσωματίδια, που περιβάλλονται από λιποπρωτεϊνική μεμβράνη και βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο, και περιέχουν πρωτεΐνες λιπίδια, mRNAs και miRNAs (Raposo & Stoorvogel 2013, Silveira *et al.* 2012, Simons & Raposo 2009). Τα EVs απελευθερώνονται από τους περισσότερους τύπους κυττάρων και έχουν απομονωθεί σε ποικίλα βιολογικά υγρά όπως το αίμα, τα ούρα, το σάλιο, το βρογχικό έκπλυμα, το γάλα (Yáñez-Mó *et al.* 2015, Simpson *et al.* 2008), το ωοθυλακικό υγρό (Silveira *et al.* 2012), το υγρό του ωαγωγού (Hamdi *et al.* 2021, Almiñana *et al.* 2018), το σπερματικό πλάσμα (Piehl *et al.* 2013) και το περιβάλλον της μήτρας (Hamdi *et al.* 2021, Ng *et al.* 2013). Θεωρώντας τα EVs ως ένα σημαντικό ρυθμιστή στην αλληλεπίδραση μητέρας-γαμέτη/εμβρύου, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονη ερευνητική δραστηριότητα στην κατεύθυνση της αποκωδικοποίησης του ρόλου των EVs του ωαγωγού στη γονιμοποίηση και στην απρόσκοπτη ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου. Έχει αποδειχθεί ότι τα EVs του ωαγωγού προσλαμβάνονται από το πρώιμο έμβρυο και βρίσκονται στον κυτταροπλασματικό χώρο περίξ του πυρήνα. Ως εκ τούτου, είναι ικανά να μεταναστεύουν διαμέσου της ακέραιης διαφανούς ζώνης από το υγρό του ωαγωγού μέσα στο έμβρυο (Almiñana *et al.* 2017). Σήμερα, υπάρχει πληθώρα στοιχείων που αποδεικνύουν τη θετική επίδραση των EVs στην ωρίμανση των ωαρίων και την ανάπτυξη των πρώιμων εμβρύων (Morales Dalanezi *et al.* 2019, Almiñana *et al.* 2018, Lopera-Vásquez *et al.* 2016).

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Gatien *et al.* (2019) μελέτησαν το μεταβολικό περιεχόμενο των EVs του ωαγωγού σε διαφορετικά στάδια του οιστρικού κύκλου σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Παρατήρησαν ιδιαίτερη αύξηση σημαντικών μεταβολικών στοιχείων (1-φωσφορική γλυκόζη και μαλτόζη) κατά το τέλος της ωχρινικής φάσης, που σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα προγεστερόνης, ενώ κατά τη διάρκεια της περι-ωοθυλακιορρηκτικής περιόδου η συγκέντρωση της μεθειονίνης ήταν αυξημένη, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην αντιοξειδωτική ισορροπία και/ή στον επιγενετικό προγραμματισμό του πρώιμου εμβρύου.

Το περιβάλλον του ωαγωγού είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη γονιμοποίηση, το γενετικό, επιγενετικό αναπρογραμματισμό και την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Pérez-Cerezales *et al.* 2018), αν και το μικροπεριβάλλον αυτό είναι τοπογραφικά σημαντικά εξειδικευμένο και υπόκειται σε δυναμικές μεταβολές σύμφωνα με την ορμονική κατάσταση, την παρουσία εμβρύων και εξωτερικούς παράγοντες. Καθώς η ΘΚ είναι επιβλαβής για την ανάπτυξη των εμβρύων, ο σκοπός

αυτής της μελέτης ήταν να εξετασθεί εάν οι υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού θα μπορούσαν να επάγουν μεταβολές στη μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού και στα χαρακτηριστικά των EVs, που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως επιπρόσθετοι καθοριστικοί παράγοντες για τη θερινή υπογονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.

Υλικά και Μέθοδοι

Το πείραμα διεξήχθη κατά τη διάρκεια μιας θερμοουδέτερης (Απρίλιος και Μάιος 2020) και μιας περιόδου ΘΚ (Αύγουστος 2020). Ο δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας (THI) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $THI = [(0.8T + RH)/100] \times T - 14.4 + 46.4$, όπου T=θερμοκρασία και RH=σχετική υγρασία (McDowell *et al.* 1979). Κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου και της περιόδου ΘΚ ο μέσος THI ήταν 65.6 ± 0.90 και 78.36 ± 2.73 , αντίστοιχα. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν είκοσι υγιείς ενήλικες, μη έγκυες αγελάδες φυλής Holstein (5 έως 7 ετών), οι οποίες είχε προαποφασισθεί να απομακρυνθούν από την εκτροφή αποκλειστικώς εξαιτίας της χαμηλότερης από την αναμενόμενη παραγωγής τους. Σε κάθε εποχή, χρησιμοποιήθηκαν δέκα ζώα, τα οποία χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (τρία, τρία και τέσσερα ζώα, αντίστοιχα). Οι οιστρικοί κύκλοι των αγελάδων συγχρονίστηκαν με τη χρήση ενδοκολπικής συσκευής που απελευθερώνει προγεστερόνη (1.55gr progesterone, PRID Delta, Ceva, France) που παρέμεινε *in situ* για 8 μέρες. Μια ημέρα (24 ώρες) πριν την αφαίρεση του PRID, προκλήθηκε ωχρινόλυση με χορήγηση προσταγλανδίνης PGF2α (500 mcg cloprostenol, Estrumate, MSD, Germany). Η ανίχνευση του οίστρου (ημέρα 0) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας ηλεκτρονικής συσκευής παρακολούθησης δραστηριότητας (SCR, Israel) και επιβεβαιώθηκε με οπτική παρατήρηση. Την ημέρα 3, ένα δείγμα αίματος συλλέχθηκε από την κοκκυγική φλέβα, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης, και τα ζώα θανατώθηκαν, σε σφαγείο της περιοχής. Αμέσως μετά τον εκσπλαχνισμό, οι ωαγωγοί και η αντίστοιχη ωοθήκη αφαιρέθηκαν, τοποθετήθηκαν σε θρυμματισμένο πάγο, και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 90 με 120 λεπτών από τη σφαγή.

Το υγρό του ωαγωγού και τα επιθηλιακά κύτταρα συλλέχθηκαν, όπως περιγράφεται παρακάτω, για την απομόνωση των EVs και για ανάλυση του γονιδιώματος, αντίστοιχα. Σε κάθε επανάληψη τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν χωριστά για τους ομόπλευρους και τους ετερόπλευρους, ως προς το ωχρό, ωαγωγούς. Έτσι, από κάθε ομάδα των 3 ή 4 ζώων προέκυψαν δυο δείγματα για κάθε εξέταση.

Ανάλυση προγεστερόνης

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης μετρήθηκε εις διπλούν με τη χρήση εμπορικού kit ανοσο-ενζυμικής δοκιμής-ELISA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (DRG, Germany EIA1561). Το εύρος ανίχνευσης ήταν 0.08 ng/ml έως 50.0ng/ml και οι συντελεστές διακύμανσης της εντός και μεταξύ των δοκιμών ήταν 6.8% και 5.6%, αντίστοιχα. Η απορρόφηση (οπτική πυκνότητα) διαβάστηκε στα 450nm, με τη χρήση φωτόμετρου ELISA (MRC, Scientific Instruments, Israel).

Απομόνωση RNA και αλληλούχηση μεταγραφώματος

Όπως αναφέρεται ανωτέρω, κάθε εποχή, χρησιμοποιήθηκαν έξι ομαδοποιημένα δείγματα (τρία από τους ομόπλευρους και τρία από τους ετερόπλευρους ωαγωγούς). Η συλλογή των επιθηλιακών κυττάρων γινόταν μετά από την έκπλυση του αυλού του οργάνου για την απομόνωση των EVs (βλέπε κατωτέρω).

Για τη συλλογή των επιθηλιακών κυττάρων, ο ωαγωγός συμπίεστηκε απαλά από τον κώδωνα μέχρι το μητριάιο άκρο χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα, που εκλύθηκαν, συλλέχθηκαν σε σωλήνα που περιείχε 5ml θερμό ρυθμιστικό υπόστρωμα Hepes 199 και 0.4g/L BSA (Sigma 9647). Μετά από σύντομη ανάδευση, ο σωλήνας παρέμεινε για 5 λεπτά στους 37°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε φορά το υπερκείμενο υγρό αφαιρούταν και αναπληρωνόταν με νέο υπόστρωμα. Το τελικό εναιώρημα κυττάρων μεταφέρθηκε σε eppendorf και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο μέχρι την ανάλυση.

Το σύνολο των επιθηλιακών κυττάρων απομονώθηκε από 50μl του αραιωμένου δείγματος με τη χρήση του E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega BIOTEK), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, ενώ, ένα επιπλέον βήμα επεξεργασίας με DNAση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Ambion DNase I (Invitrogen), ώστε να διασφαλιστεί η απουσία υπολειμμάτων γονιδιωματικού υλικού στα δείγματα. Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA εκτιμήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και ποσοτικοποίηση με Qubit, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το Qubit RNA BR Assay Kit. Επίσης, η αναλογία 260/280 χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί περαιτέρω η ποιότητα του δείγματος. Τα τρία δείγματα για κάθε εποχή αναμείχθηκαν ισομοριακά σε τελική ποσότητα 1.8μg (45ng/μl) και στάλθηκαν στο Novogene για προετοιμασία βιβλιοθηκών cDNA και paired-end αλληλούχηση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της Illumina.

Ανάλυση δεδομένων

Ένα ζεύγος fastq αρχείων λήφθηκε για κάθε δείγμα (R1 και R2 για τα ζεύγη ανάγνωσης, αντίστοιχα) και η ανάλυση βιοπληροφορικής εκτελέστηκε ως ακολούθως:

- Το Fastq εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της ποιότητας των αλληλουχιών.
- Το trimmomatic χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση αναγνώσεων με επιμολύνσεις από τον προσαρμογέα, αναγνώσεων με υψηλό ποσοστό αβέβαιων νουκλεοτιδίων και αναγνώσεων με χαμηλή ποιότητα ($Q < 30$) (Bolger *et al.* 2014).
- Οι φιλτραρισμένες αλληλουχίες χαρτογραφήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς *Bos taurus* (http://ftp.ensembl.org/pub/release104/fasta/bos_taurus/cdna/Bos_taurus.ARSUCD1.2.cdna.all.fa.gz) με χρήση του Salmon (Patro *et al.* 2017). Το αποτέλεσμα ήταν η ποσοτικοποίηση των αναγνώσεων ανά μετάγραφο (συνολικός αριθμός αλληλουχιών) μαζί με τις κανονικοποιημένες εκτιμήσεις (με χρήση του Transcripts Per Kilobase Million, TPM), ανά αντίγραφο.
- Οι εκτιμήσεις του επιπέδου μεταγραφής ανά μετάγραφο μετατράπηκαν σε επίπεδα έκφρασης ανά γονίδιο χρησιμοποιώντας τη λειτουργία tximport στο περιβάλλον R, ώστε να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης για κάθε γονίδιο στις επόμενες αναλύσεις (Soneson *et al.* 2015).
- Τα κορυφαία 1000 γονίδια σε κάθε περίπτωση (ταξινομήθηκαν με φθίνοντα τρόπο με χρήση του TPMs) αναλύθηκαν με το Reactome (Jassal *et al.* 2020, Fabregat *et al.* 2017) για τον εντοπισμό και την απεικόνιση των ενισχυμένων μονοπατιών σε συγκεκριμένα τμήματα του ωαγωγού.
- Για τον εντοπισμό της διαφορικής έκφρασης ανάμεσα στο καλοκαίρι και την άνοιξη στο ομόπλευρο και στο ετερόπλευρο τμήμα του ωαγωγού, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί αλγόριθμοι: *edgeR's exact test* (McCarthy *et al.* 2012, Robinson *et al.* 2010) και *NOISeq* (Tarazona *et al.* 2012, 2015), οι οποίοι είναι διαθέσιμοι μέσω του πακέτου Bioconductor στο R. Και οι δύο αλγόριθμοι χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των συγγραφέων: για το *edgeR*, $|\log FC| > 2$ και Benjamini Hochberg προσαρμοσμένες τιμές $p < 0.05$ χρησιμοποιήθηκαν ως κατώφλι για τη διαφορική έκφραση ενώ για το *NOISeq*, δημιουργήθηκαν πέντε προσομοιώσεις με το 20% των αναγνώσεων (όπως προτείνεται από τους συγγραφείς), και το επίπεδο της διαφορικής έκφρασης ορίστηκε σε επίπεδο πιθανότητας 95%. Θεωρήθηκαν ως γονίδια με διαφορική έκφραση αυτά που υποδείχθηκαν και από τις δύο προσεγγίσεις. Τα σχετικά Volcano plots κατασκευάστηκαν με τη χρήση της λειτουργίας *ggplot* στο περιβάλλον R.

- Ένα υποσύνολο γονιδίων με διαφορετική έκφραση επιλέχθηκαν για να επικυρωθούν μέσω της Real Time PCR. Τα ζεύγη των εκκινητών για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν με τη χρήση των PrimerBLAST και Primer3 (Untergasser *et al.* 2007). Για την αποφυγή φαινομένων που θα μπορούσαν να παρέμβουν στην αποδοτικότητα των αντιδράσεων, όπως διμερή των εκκινητών, σχηματισμός φουρκέτας, κλπ, οι εκκινητές αξιολογήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση του Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>). Η πλήρης λίστα των εκκινητών φαίνεται στον Πίνακα 10. Η εφαρμογή της Real time PCR (qPCR) έγινε με τη χρήση του SYBR Green Technology with an AB Step One Plus Mastercycler (Applied Biosystems). Η ανάλυση qPCR πραγματοποιήθηκε σε όγκο αντίδρασης 20μl με προσθήκη 1.5μl cDNA στο PCR mix που περιείχε ειδικούς γονιδιακούς εκκινητές (τελική συγκέντρωση 300nM) και 1x KAPA SYBR FAST qPCR Master mix (Sigma-Aldrich). Οι συνθήκες για την qPCR ήταν 5 λεπτά στους 95°C και 40 κύκλοι των 20 δευτερολέπτων στους 95°C και των 20 δευτερολέπτων στους 60°C για τον υβριδισμό (annealing) και την επιμήκυνση (extension). Στο τέλος κάθε αντίδρασης, πραγματοποιούνταν ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve analysis), ώστε να διασφαλιστεί η ειδικότητα των προϊόντων. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν, και εφαρμόστηκε μια μέγιστη διαφορά της τάξης του ± 0.2 στις τιμές Cq ως κατώφλι στις διπλές μετρήσεις. Η σχετική έκφραση όλων των γονιδίων εξομαλύνθηκε με τη χρήση τριών γονιδίων αναφοράς: *YWHAZ*, *UBA52* και *EEF1A1*. Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε η συνδυαστική προσέγγιση LinReg–Quantification Cycle (Cq): οι τιμές Cq ανακτήθηκαν για κάθε αντίδραση θέτοντας ένα σταθερό κατώφλι και οι μέσες τιμές για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού LinReg, όπως αυτό έχει προταθεί από τους Ramakers *et al.* (2003). Η σχετική έκφραση των γονιδίων κανονικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το γεωμετρικό μέσο όρο των τριών γονιδίων αναφοράς. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για κάθε τμήμα του ωαγωγού παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για υπολογισμό της διαφορικής τους έκφρασης μέσω της real time PCR.

Gene Name	Oviductal part	Forward Primer	Reverse Primer
ENSBTAG000000544 04	Contralateral	CGGTCATCGTCATCCTCATC	CTCTCCTCATCCTCCGACTG
ENSBTAG000000477 00	Contralateral/ Ipsilateral	AAAAATGCCTGACCCTTGC	CCCTTTCCTTCACACAGAG
ENSBTAG000000500 62	Contralateral/ Ipsilateral	TCAGGAGGGGTTTTGTGC	GACCGAGGGTGGGGACTT
ENSBTAG000000143 29	Contralateral	CCCAAAGGAGGGTATTCAGG	AGGCAAGAGCGTGAGGACTA
ENSBTAG000000218 42	Contralateral	GTGATTTCGACTGGCTGTT	CTGGTTGTGACGAGTGTAGCA
ENSBTAG000000063 54	Contralateral	ACGACAAGGAAGACGACACC	CCATACTCAGCCACAGCACA
ENSBTAG000000084 41	Ipsilateral	GCCACTCTCCAACATCTCTG	GCTGGGTGACTTTCTCGTAGG
ENSBTAG000000034 08	Ipsilateral	TCGTGTGCTTGGTGAATGAT	TCTTGCTGTCTGGTCTGTG
ENSBTAG000000005 07	Ipsilateral	AAGAGGTTGAGGTGGGAGTG	GGGCAGGAAGAGAGCAAGTA
ENSBTAG000000471 21	Ipsilateral	CCGTGGTGTCTGATTGGAG	CCCCTGTGCTGGTCATTTAT

Απομόνωση και χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs)

Στο εργαστήριο, απομακρύνθηκαν όλοι οι περιβάλλοντες ιστοί από τους ωαγωγούς, σφραγίστηκε το μητριαίο άκρο και πραγματοποιήθηκε έκπλυση του ωαγωγού με 500 μl υγρού έκπλυσης με τη χρήση λεπτού πλαστικού καθετήρα, που εισήχθη μέσω του κώδωνα. Το συλλεχθέν υγρό του ωαγωγού φυγοκεντρήθηκε, αρχικά, στα 12.000xg για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν πιθανά κυτταρικά συγκρίματα. Το υπερκείμενο υγρό υπερφυγοκεντρήθηκε στα 100.000xg για 90 λεπτά, με σκοπό την

καθίζηση των EVs που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με τους Cañón-Beltrán *et al.* (2021), με μικρές τροποποιήσεις.

Απομόνωση των EVs του ωαγωγού με Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

Οι μελέτες που περιγράφονται κατωτέρω διενεργήθηκαν στο εργαστήριο αναπτυξιακής εμβρυολογίας του ινστιτούτου INIA της Μαδρίτης.

Η απομόνωση των EVs του υγρού του ωαγωγού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Size Exclusion Chromatography (SEC) PURE-EV® (HansaBioMed Life Sciences), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος θεωρείται πολύ αποτελεσματική για το διαχωρισμό των EVs από τις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες και δεν επηρεάζει το πραγματικό μέγεθος και τη λειτουργικότητα των κυστιδίων (Monguió-Tortajada *et al.* 2019). Εν συντομία, μετά την απόρριψη του ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχονταν στη στήλη SEC, έγινε έκπλυση της στήλης με 30ml PBS, στη συνέχεια, το κάθε δείγμα (≈ 2 ml) τοποθετήθηκε στην κορυφή της στήλης SEC, και η αποφυγή στεγνώματος της στήλης διασφαλίστηκε με την επιστρώματωση 11 ml PBS. Η συλλογή των EVs έγινε στα δεύτερα 2ml μετά την απόρριψη των πρώτων 3ml. Στη συνέχεια, τα 2ml, που περιείχαν τα EVs, υπερφυγοκεντρήθηκαν για 1 ώρα στους 4°C, στα 100.000xg, ώστε να καθιζάνουν τα EVs. Χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος Beckman Coulter Optima-L-90K με περιστρεφόμενο ρότορα “SW41 Ti” και σωληνίσκους πολυπροπυλενίου με λεπτό τοίχωμα Beckman coulter (Κωδ.: 331372). Το ληφθέν pellet των EVs εναιωρήθηκε σε 100μl κρύου PBS. 10μl του pellet χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των EVs με ανάλυση εντοπισμού νανοσωματιδίων (NTA) και ηλεκτρονική μικροσκόπηση μετάδοσης (TEM) και το υπόλοιπο για ανάλυση Western blot.

Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός των EVs του υγρού του ωαγωγού

-Ηλεκτρονική μικροσκόπηση μετάδοσης (TEM)

Πέντε μl του εναιωρήματος των EVs κάθε δείγματος που λήφθηκαν κατά το προηγούμενο στάδιο διαλύθηκαν (1:10) σε PBS για την εκτέλεση της αρνητικής χρώσης των EVs. Ένα πλέγμα ιονισμένου άνθρακα και επικαλυμμένο με χαλκό κολλίδιο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου επέπλευσε με αραιωμένη σταγόνα δείγματος, εκπλύθηκε, χρωματίστηκε με 2% οξικό ουρανύλιο και παρατηρήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης JEM-1010 (JEOL, Tokyo, Japan).

-Ανάλυση εντοπισμού νανοσωματιδίων (NTA)

Παρομοίως, 5μl του pellet κάθε δείγματος που συλλέχθηκαν για χαρακτηρισμό των EVs αραιώθηκαν, επίσης, σε αναλογία 1:20 σε PBS και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της συγκέντρωσης των EVs με NTA on Nanosight LM10 equipment (Malvern, Inc.), με χρήση του λογισμικού NTA 3.1. Τρία βίντεο των 60 δευτερολέπτων καταγράφηκαν για κάθε

δείγμα με επίπεδο κάμερας 13, και θερμοκρασία 22°C. Για τις ρυθμίσεις της ανάλυσης, το όριο ανίχνευσης τέθηκε στο επίπεδο 2 με 3. Η ανάλυση NTA πραγματοποιήθηκε σε 6 επαναλήψεις του υγρού του ωαγωγού για κάθε εποχή.

-Western blotting

Χρησιμοποιήθηκαν ομάδες 3 δειγμάτων (3x90μl που αντιστοιχούν στην έκπλυση 10 ωαγωγών από τα ομόπλευρα και ετερόπλευρα τμήματα των ωαγωγών αγγείων την άνοιξη και το καλοκαίρι), ώστε να έχουμε επαρκή ποσότητα πρωτεϊνικών βιοδεικτών των EVs για να είναι ανιχνεύσιμη με τη Western blot. Οι πρωτεΐνες των εξωκυτταρικών κυστιδίων λύθηκαν με 1xRIPA buffer (Cell Signaling Technology, 9806S), εμπλουτισμένο 1x αναστολέα πρωτεάσης, φωσφατάσης Cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα των EVs προσδιορίστηκε με τη χρήση του Bicinchoninic acid assay (BCA) (Micro BCA Protein Assay Kit; 23325). Συνολικά 35 μg πρωτεΐνης ανά δείγμα, αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης Laemmli, και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε μία πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE βαθμίδας 4–12%. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (GE Healthcare Life Sciences Whatman™). Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και αποκλείστηκαν με PBS που περιείχε Tween 20 (0.1% (w/v)) (PBS-T) και εμπλουτίστηκε με ορό βόειας αλβουμίνης (BSA) (3% w/v) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα διαλυμένα σε PBS-T που περιείχε BSA (5% w/v) όλη τη νύχτα στους 4°C και ήπια ανάδευση. Τρία πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες των EVs: αντιτετρασπανίνη πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας CD63 (anti-CD63 pAb, AA 120-175 antibodies-online GmbH, Aachen, Germany), αντι-heat shock πρωτεΐνη 70 (anti-Hsp70 mAb, C92F3A-5 Enzo Life Sciences, NY, USA), αντι-ALIX πρωτεΐνη (anti-ALIX mAb, sc-53540, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Ως αρνητικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε το αντι-Calnexin (sc-23954, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), για την υπόδειξη απουσίας κυτταρικής επιμόλυνσης στα δείγματα των EVs. Μετά την επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα, οι μεμβράνες εκπλύθηκαν με PBS-T και επώαστηκαν για 2 ώρες υπό ανάδευση με δευτερογενή αντισώματα. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση χρένου: συζευγμένο με υπεροξειδάση AffiniPure anti-goat IgG (H₂L) (JAC705035003, Jackson Immuno Research Lab., Inc., West Grove, PA, USA) ή horse anti-mouse IgG-HRP (sc7076, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States). Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν εκ νέου τρεις φορές σε PBS-T για 5 λεπτά και επώαστηκαν για ένα λεπτό σε υπόστρωμα Immobilon Forte Western HRP (#WBLUF0100, Millipore, Burlington, MA) και revealed by chemiluminescence με Image Quant LAS500 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences, USA, 29005063). Οι ακόλουθοι ιστοί ποντικών: νεφρός, πάγκρεας, πνεύμονες και

ουρητήρες χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα ως μάρτυρες για τις πρωτεΐνες CD63, Hsp70, ALIX και CANX, όπου εκφράζονται σε υψηλό βαθμό.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SigmaStat software package (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα (SEM). Οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση του Student's t-test.

Αποτελέσματα

Προγεστερόνη

Στα 10 δείγματα κάθε περιόδου, η μέση συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν 2.54 ± 0.43 ng/ml κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου και 2.14 ± 0.39 ng/ml κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ($p=0.04$).

Χαρακτηρισμός του γονιδιώματος των ομόπλευρων και των ετερόπλευρων τμημάτων του ωαγωγού

Ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που εκφράζονταν ήταν παρόμοιος μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του ωαγωγού και μεταξύ των δύο εποχών (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Συνολικός αριθμός των γονιδίων που εκφράστηκαν ανά συνθήκη (TPM>0).

Ωαγωγός	Εποχή	Καλοκαίρι	Άνοιξη
	Ετερόπλευρος	17933	17972
	Ομόπλευρος	17813	17997

Τα κύρια εμπλουτισμένα μονοπάτια των γονιδίων, που εκφράζονταν περισσότερο ήταν κοινά μεταξύ των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών, όπως επίσης και μεταξύ των δύο εποχών. Τα εμπλουτισμένα μονοπάτια, που εντοπίστηκαν, συμμετέχουν στο μεταβολισμό του RNA και στη ρύθμιση της μετάφρασης των πρωτεϊνών, στη βιογένεση και λειτουργία των μιτοχονδρίων και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των εποχών αποκάλυψε 17 γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην άνοιξη και το καλοκαίρι στον ετερόπλευρο ωαγωγό (6 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 11 υποεκφράστηκαν στα δείγματα της άνοιξης, Γράφημα 24) και 16 γονίδια με σημαντικές διαφορές στον ομόπλευρο (9 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 7 υποεκφράστηκαν στα δείγματα της άνοιξης, Γράφημα 25). Τα γονίδια, οι αντίστοιχες log fold μεταβολές (logFC) και οι σχετικές p-τιμές παρουσιάζονται στους Πίνακες 12 και 13 για τους ετερόπλευρους και τους ομόπλευρους ωαγωγούς, αντίστοιχα.

Πίνακας 12: Γονίδια με σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ καλοκαιριού και άνοιξης στον ετερόπλευρο ωαγωγό. Το logFC αντιστοιχεί στη logfold μεταβολή των κανονικοποιημένων τιμών TPM και οι αντίστοιχες p τιμές προέκυψαν από το edgeR.

Gene ID	logFC	p-value	Gene Description
ENSBTAG00000051167	7.66	2.27E-07	Miscellaneous RNA
ENSBTAG00000050869	7.40	2.48E-06	Transcription elongation factor A like 8
ENSBTAG00000045102	6.31	2.42E-03	Small Cajal bodyspecific RNA 12
ENSBTAG00000028419	6.26	4.64E-03	U1 spliceosomal RNA
ENSBTAG00000042414	6.15	4.64E-03	Small nucleolar RNA SNORA23
ENSBTAG00000050062	4.46	1.10E-12	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
ENSBTAG00000049523	3.73	2.46E-02	Long noncoding RNA
ENSBTAG00000052477	2.92	1.39E-19	Noncoding RNA RMST10
ENSBTAG00000047700	2.83	1.49E-03	IgM precursor

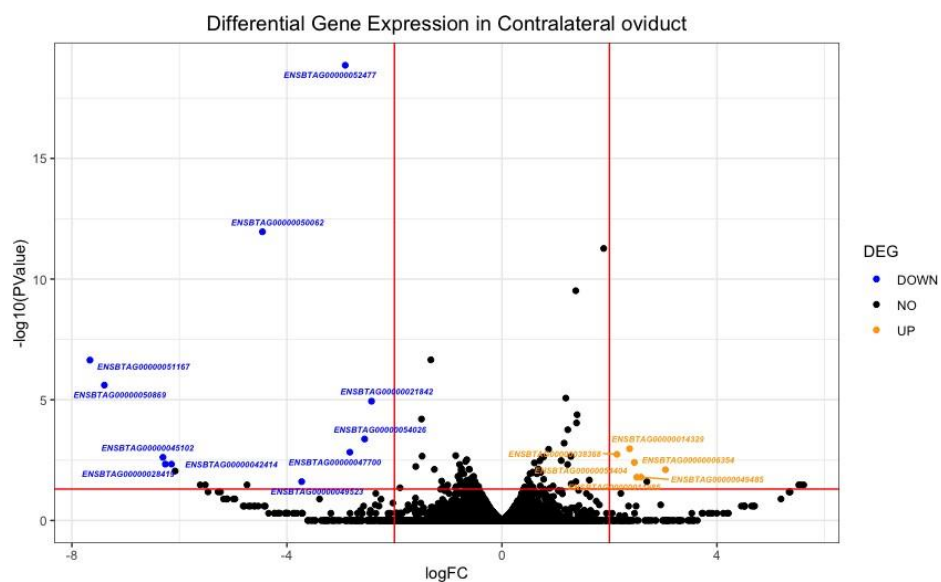
ENSBTAG00000054026	2.55	4.22E-04	Noncoding RNA RMST6
ENSBTAG00000021842	2.43	1.15E-05	Fc fragment of IgG receptor IIb
ENSBTAG00000038368	2.14	1.82E-03	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
ENSBTAG00000014329	2.38	1.07E-03	Antileukoproteinase
ENSBTAG00000054404	2.46	3.94E-03	Stannin
ENSBTAG00000011985	2.51	1.61E-02	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 2
ENSBTAG00000049485	2.59	1.61E-02	Long noncoding RNA
ENSBTAG00000006354	3.04	7.88E-03	Haptoglobin

Πίνακας 13: Γονίδια με σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ καλοκαιριού και άνοιξης στον ομόπλευρο ωαγωγό. Το logFC αντιστοιχεί στη logfold μεταβολή των κανονικοποιημένων τιμών TPM και οι αντίστοιχες p τιμές προέκυψαν από το edgeR.

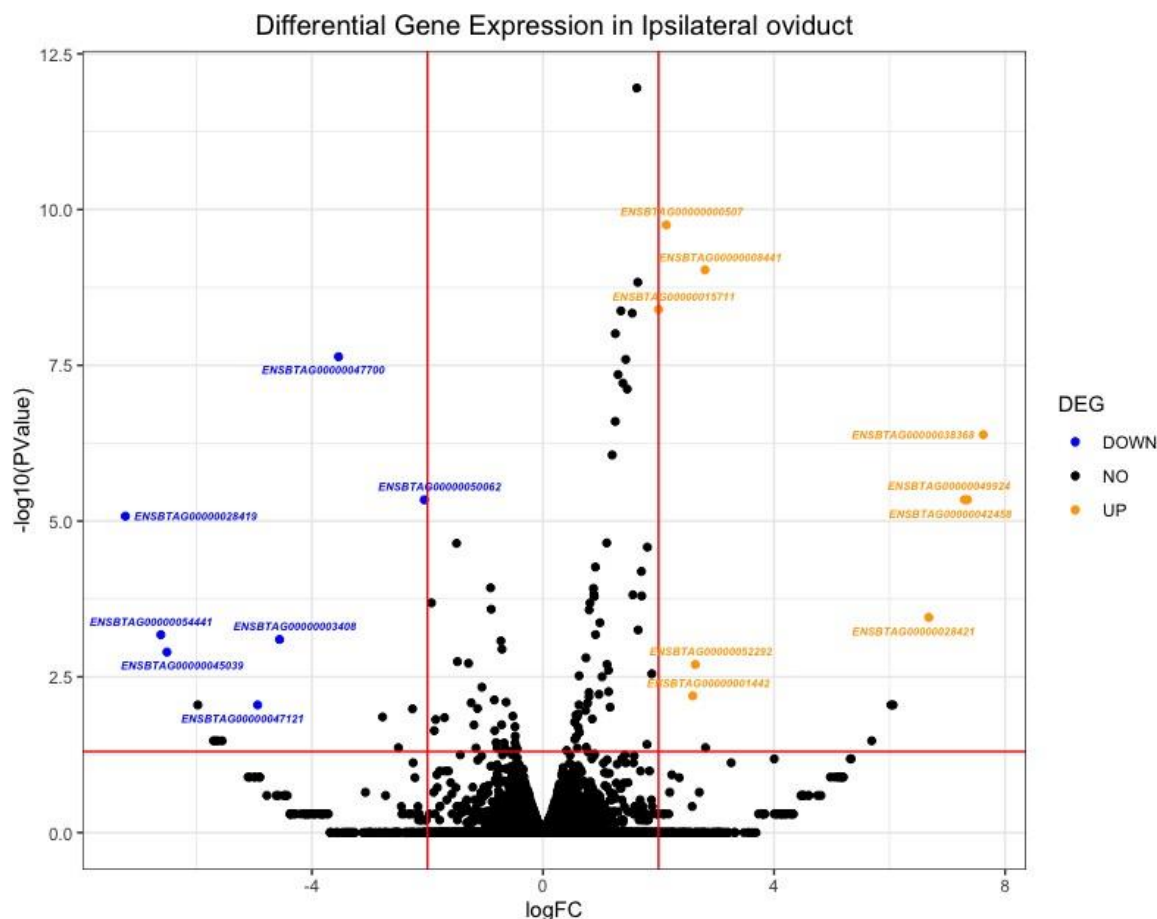
Gene ID	logF C	p-value	Gene Description
ENSBTAG00000000507	2.14	1.76E-10	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1
ENSBTAG00000001442	2.59	6.39E-03	Solute carrier family 15 member 2like
ENSBTAG000000003408	4.56	7.95E-04	Ig kappa chain
ENSBTAG000000008441	2.81	9.33E-10	Suppressor of cytokine signaling 3
ENSBTAG000000015711	2.00	4.01E-09	BTG antiproliferation factor 2
ENSBTAG000000028419	7.23	8.35E-06	U1 spliceosomal RNA

ENSBTAG000000284 21	6.68	3.52E-04	U1 spliceosomal RNA
ENSBTAG000000383 68	7.62	4.11E-07	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
ENSBTAG000000424 58	7.35	4.54E-06	RNase MRP
ENSBTAG000000450 39	6.51	1.27E-03	Noncoding RNA SCARNA 17
ENSBTAG000000471 21	4.94	8.94E-03	Immunoglobulin lambda1 light chain- like
ENSBTAG000000477 00	3.54	2.30E-08	IgM precursor
ENSBTAG000000499 24	7.30	4.54E-06	Noncoding RNA uc 338
ENSBTAG000000500 62	2.06	4.56E-06	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
ENSBTAG000000522 92	2.64	2.01E-03	U2 spliceosomal RNA
ENSBTAG000000544 41	6.62	6.67E-04	Long myosin light chain kinase

Γράφημα 24: Διαφορική γονιδιακή έκφραση μεταξύ καλοκαιριού και άνοιξης στον ετερόπλευρο ωαγωγό. Τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν την άνοιξη εμφανίζονται με πορτοκαλί χρώμα, αυτά που υποεκφράστηκαν με μπλε χρώμα, ενώ, τα γονίδια που δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές εμφανίζονται με μαύρο χρώμα.



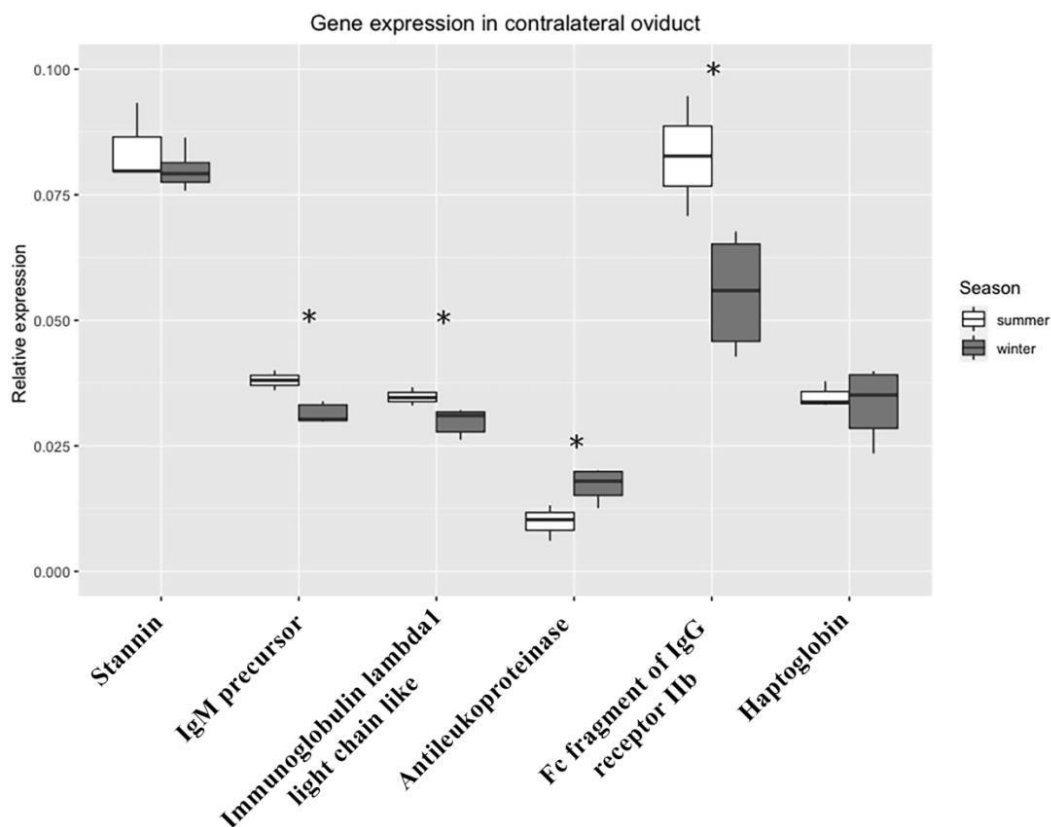
Γράφημα 25: Διαφορική γονιδιακή έκφραση μεταξύ καλοκαιριού και άνοιξης στον ομόπλευρο ωαγωγό. Τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν την άνοιξη εμφανίζονται με πορτοκαλί χρώμα, αυτά που υποεκφράστηκαν με μπλε χρώμα, ενώ, τα γονίδια που δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές εμφανίζονται με μαύρο χρώμα.



Έλεγχος της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης

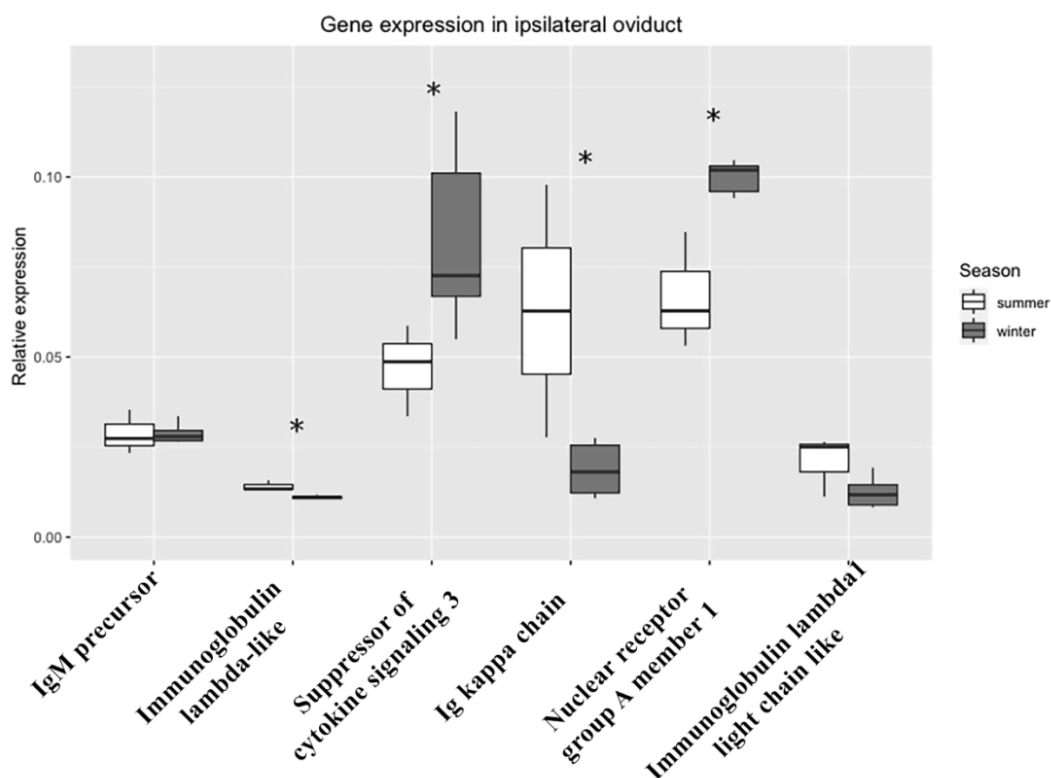
Στις περισσότερες περιπτώσεις, η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε τα αναμενόμενα αποτελέσματα στην έκφραση των γονιδίων που επιλέχθηκαν. Στον ετερόπλευρο ωαγωγό, 4 από τα 6 γονίδια ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης με την αλληλούχηση RNA (τα IgM precursor, Immunoglobulin lambda light chain like, Fc Fragment of IgG receptor IIb υπερεκφράστηκαν στα δείγματα του καλοκαιριού και η αντιλευκοπρωτεΐνωση υπερεκφράστηκε στα δείγματα της άνοιξης), ενώ τα άλλα δυο γονίδια δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους (Γράφημα 26).

Γράφημα 26: Γονιδιακή έκφραση στον ετερόπλευρο ωαγωγό. Οι σημαντικές μεταβολές μεταξύ των εποχών επισημαίνονται με αστερίσκο (*) ($p\text{-value} < 0.05$).



Στον ομόπλευρο ωαγωγό, 4 από τα 6 γονίδια ακολούθησαν τα ίδια πρότυπα έκφρασης με την αλληλούχηση RNA (τα Immunoglobulin lambda-like, Ig kappa chain υπερεκφράστηκαν στα δείγματα του καλοκαιριού και τα Suppressor of cytokine signalling 3, Nuclear receptor group A member 1 υπερεκφράστηκαν στα δείγματα της άνοιξης), ενώ το Immunoglobulin lambda light chain like έδειξε ισχυρή τάση για υπερέκφραση στα δείγματα του καλοκαιριού. Από την άλλη μεριά η έκφραση του IgM precursor δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των εποχών (Γράφημα 27).

Γράφημα 27: Γονιδιακή έκφραση στον ομόπλευρο ωαγωγό. Οι σημαντικές μεταβολές μεταξύ των εποχών επισημαίνονται με αστερίσκο (*) (p-value<0.05).



Κατανομή μεγέθους και συγκέντρωση των EVs στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων τμημάτων του ωαγωγού την άνοιξη και το καλοκαίρι

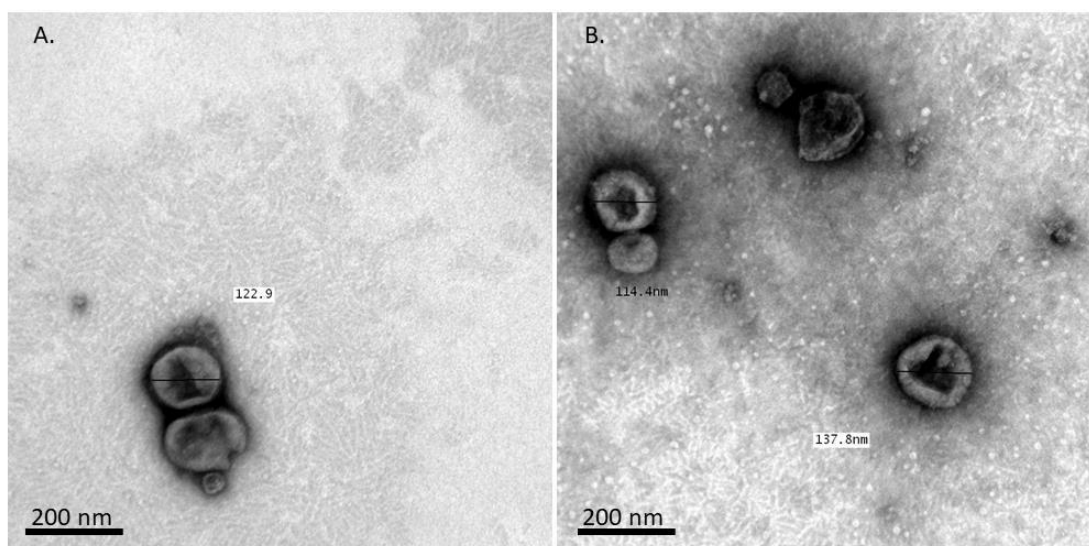
Ο βιοφυσικός και ο μοριακός χαρακτηρισμός των EVs στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των TEM, NTA και τη western blot analysis. Οι παρατηρήσεις από την TEM επιβεβαίωσαν την παρουσία των EVs στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια και των δυο εποχών (άνοιξη και καλοκαίρι) (Γράφημα 28). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της NTA επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις με την TEM στις επαναλήψεις που αναλύθηκαν στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών, υποδεικνύοντας ένα πληθυσμό EVs μέσου μεγέθους που κυμαίνεται από 160.9 ± 2.4 έως 190.2 ± 15.4 nm (Πίνακας 14).

Η NTA ανάλυση αποκάλυψε ότι η συγκέντρωση των σωματιδίων στον ομόπλευρο και ετερόπλευρο ωαγωγό δεν διέφερε κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου και έτεινε να διαφέρει (p=0.09)

κατά τη διάρκεια της περιόδου ΘΚ (4.29×10^{10} EVs/mL έναντι 12.90×10^{10} EVs/mL, αντίστοιχα), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 14).

Η ανάλυση Western blot επιβεβαίωσε την έκφραση μερικών από τους κλασσικούς εξωσωμικούς δείκτες (Théry *et al.* 2018, Almiñana *et al.* 2017, Lopera-Vásquez *et al.* 2016, 2017) στα EVs στο υγρό του ομόπλευρου και ετερόπλευρου ωαγωγού από τις δύο εποχές: CD63, HSP70, και ALIX πρωτεΐνες, ενώ ήταν αρνητικοί για το CANX, το οποίο συνήθως απουσιάζει ή υποεκφράζεται στα EVs/εξωσώματα (Lötvall *et al.* 2014) (Γράφημα 29).

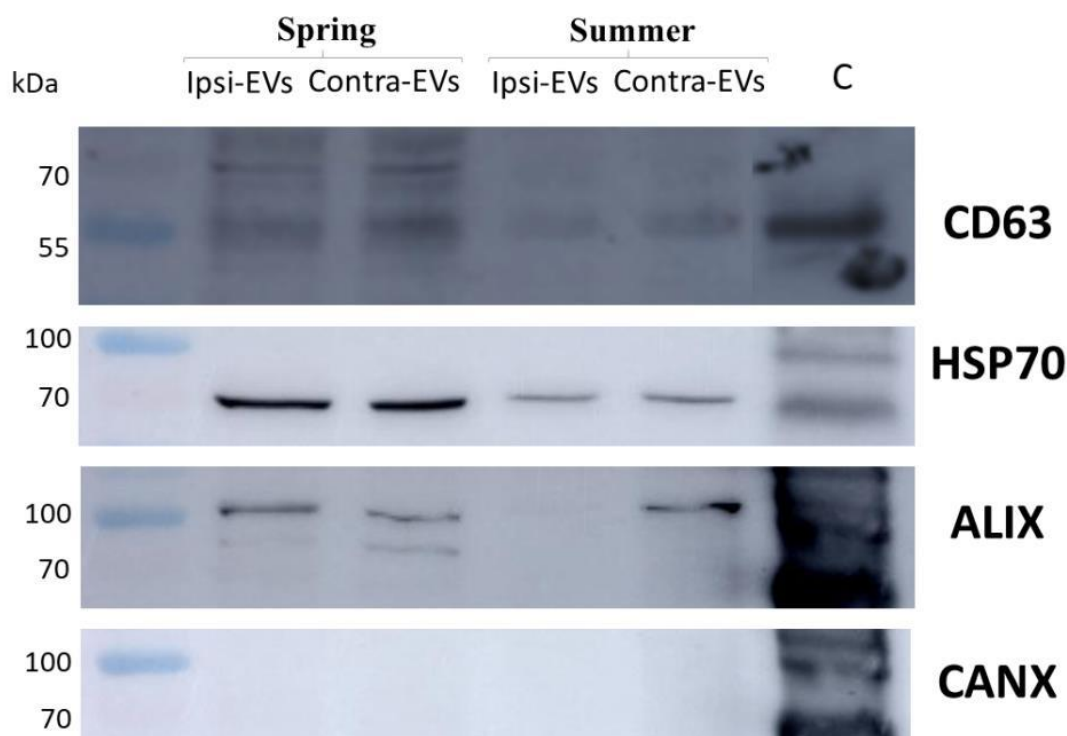
Γράφημα 28: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των EVs στο υγρό του ομόπλευρου (A) και του ετερόπλευρου (B) ωαγωγού με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης (TEM).



Πίνακας 14: Συγκέντρωση σωματιδίων (σωματίδια/ml), μέσο μέγεθος (nm), και λειτουργικό μέγεθος (nm) προσδιορισμένα με NTA στο ομαδοποιημένο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών, την άνοιξη και το καλοκαίρι.

Περίοδος συλλογής		Σωματίδια/ml × $10^{10} \pm \text{SEM}$	Μέσο μέγεθος	Λειτουργικό μέγεθος
			nm ± SEM	nm ± SEM
Άνοιξη	Ομόπλευρος	8.92 ± 6.5	227.2 ± 13.9	190.2 ± 15.4
	Ετερόπλευρος	8.72 ± 2.2	207.6 ± 15.7	160.9 ± 2.4
Καλοκαίρι	Ομόπλευρος	4.29 ± 4.0	229.7 ± 10.6	179.1 ± 22.5
	Ετερόπλευρος	12.90 ± 3.2	212.6 ± 5.4	160.9 ± 9.1

Γράφημα 29: Χαρακτηρισμός πρωτεϊνικών δεικτών των εξωσωμάτων στο υγρό των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών βοοειδών την άνοιξη και το καλοκαίρι, με τη μέθοδο Western blot. Αναγνωρίστηκαν 3 δείκτες EVs: CD63, HSP70 και ALIX, που υπερεκφράστηκαν. Επιπλέον, επαληθεύτηκε η παρουσία του CANX, μία πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, που λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας για την παρουσία κυτταρικής επιμόλυνσης.



Συζήτηση

Σε αυτήν τη μελέτη περιγράφονται, για πρώτη φορά, οι μεταβολές που προκαλεί η ΘΚ στο πρότυπο της έκφρασης γονιδίων και στον πληθυσμό των EVs στον ωαγωγό αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.

Οι επιπτώσεις της ΘΚ στην αναπαραγωγή των βοοειδών έχουν μελετηθεί εκτενώς σε πολλαπλά επίπεδα, από την κλασσική ενδοκρινολογία, την ωρίμανση των ωαρίων, το σχηματισμό εμβρύου και την κύηση (Nanas *et al.* 2021a, Stamperna *et al.* 2020, 2021, Roth 2017, De Rensis & Scaramuzzi 2003, Al-Katanani *et al.* 2002, Hansen *et al.* 2001). Οι μελέτες αυτές ανέδειξαν συγκεκριμένα γονίδια και μονοπάτια που εμπλέκονται στη μειωμένη γονιμότητα κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες, που περιλαμβάνουν την οξειδωτική βλάβη (Wang *et al.* 2019, Alemu *et al.* 2018), μη φυσιολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Payton *et al.* 2018, Paula-Lopes *et al.* 2012), διαταραχή των λειτουργιών του μεταβολισμού και του ανοσοποιητικού συστήματος (Bagath *et al.* 2019, Belhadj Slimen *et al.* 2016). Ωστόσο, μετά από εξονυχιστικό έλεγχο της παγκόσμιας βιβλιογραφίας,

διαπιστώθηκε ότι οι επιπτώσεις της θερινής ΘΚ στο περιβάλλον του ωαγωγού, δεν έχουν μελετηθεί έως τώρα. Οι Rapala *et al.* (2018) μελέτησαν *in vitro*, την επίδραση της ΘΚ στα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού βοοειδών (BOECs), που εκτέθηκαν σε αυξημένη θερμοκρασία και εντόπισαν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των *HSP70* και *OVGP1*, ενώ τα ποσοστά επιβίωσης τους δεν επηρεάστηκαν.

Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που χρησιμοποιεί μια προσέγγιση προσδιορισμού της αλληλουχίας του RNA για την εκτίμηση της μεταγραφικής κατάστασης των ομόπλευρων και ετερόπλευρων ωαγωγών και για τον εντοπισμό γονιδίων με σημαντικές μεταβολές στην έκφραση τους υπό συνθήκες ΘΚ. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του RNA είναι η μέθοδος επιλογής για την δημιουργία μεταγραφικού προφίλ, αφού επιτρέπει τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης, και διαθέτει υψηλή ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα (Marioni *et al.* 2008, Nagalakshmi *et al.* 2008).

Η μελέτη μας αποκάλυψε τα κύρια λειτουργικά μονοπάτια που διέπουν τη δραστηριότητα των δυο ωαγωγών (ομόπλευρου και ετερόπλευρου) και διαπιστώθηκε ότι τα πιο αντιπροσωπευτικά μονοπάτια διατηρήθηκαν και στις δυο εποχές και ήταν ισχυρά συνδεδεμένα με τον προστατευτικό ρόλο του ωαγωγού για το έμβρυο. Ειδικότερα, ο μεταβολισμός του RNA και η μετάφραση των πρωτεϊνών είναι διαδικασίες υπεύθυνες για την εκκριτική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων, που είναι υπεύθυνα να παρέχουν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο RNAs και πρωτεΐνες, πιθανότατα μέσω των EVs που εκκρίνουν (Almiñana *et al.* 2018), ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του μέχρι την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος.

Σε κάθε τύπο κυττάρων, ο υψηλός μεταβολικός ρυθμός υποστηρίζεται από την αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και τις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας, όπως είναι ο κύκλος του Krebs, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η επακόλουθη παραγωγή ATP από την συνθάση F0F1 ATP. Επιπλέον, η διατήρηση ενός πλήρως λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος έχει μεγάλη σημασία για το περιβάλλον του ωαγωγού (Marey *et al.* 2016, Maillou *et al.* 2015), καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν να αντιμετωπίσουν διπλή πρόκληση κατά τη γονιμοποίηση: την επιτυχή απόκριση στη μικροχλωρίδα που μεταφέρεται κατά τη διαδικασία της γονιμοποίησης και την επίδειξη ανοχής στο αλλογενές σπέρμα και στο ημι-αλλογενές έμβρυο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεταβολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, όπως των *IL10* και *TGFB1* (μόρια καθοδηγούμενα από τα Th2, με αντιφλεγμονώδη δράση) και των *TNFa* και *IL10* (μόρια τύπου Th1, προφλεγμονώδη), τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Marey *et al.* 2016, Yousef *et al.* 2016).

Η ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης αποκάλυψε ένα μικρό αριθμό γονιδίων με στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ των εποχών, γεγονός που μπορεί να

αποδοθεί σε δύο παράγοντες, που δεν αποκλείει ο ένας τον άλλο: τα αυστηρά στατιστικά κριτήρια που εφαρμόστηκαν στην ανάλυση εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων και η υψηλή διατήρηση των λειτουργιών των δυο ωαγωγών, ανεξάρτητα από την εποχή. Δυστυχώς, η έλλειψη σχετικών μελετών, που χρησιμοποιούν τις ίδιες προσεγγίσεις, περιορίζει την ικανότητα να ελέγξουμε την υπόθεση μας. Ωστόσο, το αποτέλεσμα της επικύρωσης των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού της αλληλούχησης του RNA είναι ενδεικτικό της καταλληλότητας των διαδικασιών που ακολουθούνται στην ανάλυση της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης.

Τα γονίδια, που παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση τους στους ετερόπλευρους και στους ομόπλευρους ωαγωγούς, φαίνεται να συμμετέχουν στις ίδιες λειτουργίες, καθώς τα περισσότερα από αυτά κωδικοποιούν γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και τα μη κωδικοποιημένα RNAs (κυρίως μακρά μη κωδικοποιημένα RNAs, lncRNAs). Τα lncRNAs δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά κατέχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής, την επιγενετική τροποποίηση και μέσω άλλων μηχανισμών (Yoon *et al.* 2013). Οι Ni *et al.* (2020) ταυτοποίησαν lncRNAs με διαφορική έκφραση σε συνθήκες ΘΚ στον υποθάλαμο, την υπόφυση και το μαστικό αδένιο σπύων. Επιπλέον, τα lncRNAs έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικά συστατικά της απόκρισης των θηλαστικών στη ΘΚ (Place & Noonan 2014) και 174 lncRNAs που υπερεκφράστηκαν ή υποεκφράστηκαν στο μαστικό αδένιο αγελάδων γαλακτοπαραγωγής υπό συνθήκες ΘΚ, υποστηρίζουν τη συμμετοχή τους στην απόκριση στη ΘΚ (Li *et al.* 2020). Ωστόσο, παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση στην αλληλουχία, και η κατηγοριοποίηση τους και η πρόβλεψη της λειτουργίας τους αποτελούν μάλλον πρόκληση (Alexandre *et al.* 2020), καθώς στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής δεν υπάρχουν διαθέσιμοι αλγόριθμοι για πρόβλεψη λειτουργίας και μπορούν να δρουν με *cis* και/ή *trans* τρόπο. Εξάλλου, η έκφραση των lncRNA έχει συσχετισθεί με τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης στα MAC-T κύτταρα και την ακόλουθη ανάπτυξη μαστίτιδας στα βοοειδή (Wang *et al.* 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεκριμένα γονίδια, που κωδικοποιούν lncRNAs, βρέθηκε να εκφράζονται διαφορετικά τόσο στους ομόπλευρους, όσο και στους ετερόπλευρους ωαγωγούς (βλέπε Πίνακες 13 και 14). Η μελέτη αυτών των γονιδίων και η αποκρυπτογράφηση του λειτουργικού τους ρόλου και της συμμετοχής τους στην απόκριση στη ΘΚ μπορούν να αποτελέσουν την αφετηρία για τη μελέτη των μηχανισμών των lncRNAs στη ΘΚ.

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης βρέθηκε χαμηλότερη κατά τους θερινούς μήνες του έτους σε σύγκριση με αυτή των θερμοουδέτερων περιόδων. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενα ευρήματα της ομάδας μας (Nanas *et al.* 2021a) και είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Wolfenson *et al.* 2002, Howell *et al.* 1994, Younas *et al.* 1993). Οι σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της ΘΚ και της θερμοουδέτερης περιόδου

ενδέχεται, εν μέρει, να ευθύνονται για τη διαφορική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα. Η προγεστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη με καθοριστικό ρόλο στην εγκατάσταση και διατήρηση της εγκυμοσύνης, που επιδεικνύει ανοσοτροποποιητική δράση σε αρκετά σπονδυλωτά (Graham *et al.* 2011). Η υπερ-ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε συνθήκες ΘΚ ενδέχεται να έχει επιβλαβή επίδραση στη γονιμότητα των αγελάδων. Σε κυτταρικό επίπεδο, τόσο το αναπαραγωγικό όσο και το ανοσοποιητικό σύστημα απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας, και η αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο συστημάτων είναι καλά τεκμηριωμένη (Rauw 2012, Zuk & Stoehr 2002), καθώς τα θρεπτικά στοιχεία και οι πηγές ενέργειας ανακατανέμονται από τις αναπαραγωγικές λειτουργίες προς τις ανοσολογικές λειτουργίες και αντίστροφα (Spurlock 1997). Επιπλέον, ο σωστός συντονισμός της ανοσολογικής απόκρισης στον ωαγωγό, όπου πραγματοποιούνται η γονιμοποίηση και η ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου, είναι σημαντικός και οδηγείται προς την Th2 απόκριση και ανοσοκαταστολή, συμβάλλοντας στην ανοχή προς το έμβρυο (Yousef *et al.* 2016, Kowsar *et al.* 2013, Blois *et al.* 2007). Η παρουσία του εμβρύου στα βοοειδή έχει αποδειχθεί ότι επάγει την παραγωγή ιντερφερόνης-T, η οποία εκτός από παράγοντας μητρικής αναγνώρισης της εγκυμοσύνης, δρα ως σημαντικό αντιφλεγμονώδες μόριο (Talukder *et al.* 2018). Σύμφωνα με τους Elenkov *et al.* (2000), η ΘΚ επηρεάζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταβάλλοντας την αναλογία Th1:Th2, επιδρώντας στην ανοσολογική ομοιοστάση. Μεταξύ των άλλων γονιδίων που παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές, εστίασαμε σε τρία ειδικά γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του αναπαραγωγικού και ανοσοποιητικού συστήματος: την απτοσφαιρίνη, η οποία υπερεκφράστηκε στον ομόπλευρο ωαγωγό κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου, την κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης και την αντιλευκοπρωτεΐνωση, οι οποίες υπερεκφράζονται στον ετερόπλευρο ωαγωγό κατά τη διάρκεια της ΘΚ.

Η απτοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη οξειάς φάσης, που αρχικά θεωρήθηκε ότι συμμετείχε μόνο στη φλεγμονώδη απόκριση, ωστόσο πλέον έχει αναγνωριστεί ο ρυθμιστικός της ρόλος στην αναπαραγωγική λειτουργία, ρυθμίζοντας την αλληλεπίδραση των γαμετών και την ανάπτυξη του εμβρύου (Lavery *et al.* 2004, Olson *et al.* 1997, Friedrichs *et al.* 1995). Τα επίπεδα της απτοσφαιρίνης στη μήτρα αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στους ανθρώπους (Berkova *et al.* 2001) και κατά την προεμφυτευτική περίοδο στα κουνέλια (Hoffman *et al.* 1996). Επιπλέον, η προσθήκη απτοσφαιρίνης στο υπόστρωμα γονιμοποίησης και καλλιέργειας αυξάνει σημαντικά, σχεδόν διπλασιάζει, τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων κατά την *in vitro* παραγωγή εμβρύων στους χοίρους (García-Vázquez *et al.* 2021). Επομένως, η παρατηρούμενη υπερέκφραση της απτοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου ενδέχεται να ενίσχυσε την επιτυχία της αναπαραγωγικής διαδικασίας στις αγελάδες, υποστηρίζοντας την

ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου και λειτουργώντας ως ένας δυνητικός ανοσοκαταστολέας, μέσω της αρνητικής ρύθμισης στην ανοσολογική απόκριση κατά του σπέρματος και του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Gloria-Bottini *et al.* 2009).

Το γονίδιο της κινάσης ελαφράς αλύσου της μυοσίνης κωδικοποιεί ένα ένζυμο εξαρτώμενο από το ασβέστιο/καλμοδουλίνη. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει τις ρυθμιστικές ελαφρές αλύσους της μυοσίνης ώστε να διευκολύνει την αλληλεπίδραση της μυοσίνης με τα νημάτια ακτίνης για την παραγωγή συσταλτικής δραστηριότητας. Η υπερέκφραση της κινάσης ενδέχεται να σχετίζεται με εξασθενημένα κύματα συστολής και χαλάρωσης του ωαγωγού κατά τη διάρκεια της ΘΚ, μέσω της ανισορροπίας στην παραγωγή των προσταγλανδινών (Kobayashi *et al.* 2013).

Τέλος, η αντιλευκοπρωτεϊνία είναι αναστολέας των πρωτεασών σερίνης, προστατεύοντας τα επιθηλιακά κύτταρα από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (δεδομένα από RefSeq). Έχει διαπιστωθεί ότι η αντιλευκοπρωτεϊνία ενδέχεται να συμμετέχει στην αναστολή των προφλεγμονωδών κυτοκινών μέσω της E2, αναστέλλοντας την έκφραση του NF-Kb (Fahey *et al.* 2008). Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι έχει διαπιστωθεί η έκφραση της στον ωαγωγό του ανθρώπου, συμμετέχοντας στην αλληλεπίδραση σπέρματος-ωαρίου, και προστατεύοντας την αντίδραση του ακροσώματος από την ανασταλτική δράση της ελαστάσης (Ota *et al.* 2002). Επομένως, η υπερέκφραση της κατά τη διάρκεια της θερμοουδέτερης περιόδου θα μπορούσε να σχετίζεται με αυξημένη αναπαραγωγική απόδοση και γονιμότητα στις αγελάδες.

Η συγκέντρωση των EVs ήταν παρόμοια με αυτή που αναφέρεται σε μελέτες που έχουν δημοσιευτεί προηγουμένως (Almiñana *et al.* 2018), ενώ το μέσο μέγεθος και στις δυο εποχές επιβεβαιώνει ότι οι αναγνωρισμένες δομές ανήκαν στην κατηγορία των EVs (Almiñana *et al.* 2017).

Διαπιστώθηκε μία αξιοσημείωτη ομοιομορφία στη συγκέντρωση των EVs στους ομόπλευρους και στους ετερόπλευρους ωαγωγούς κατά τη θερμοουδέτερη περίοδο. Ωστόσο, η συγκέντρωση τους στον ομόπλευρο ωαγωγό μειώθηκε κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Παρόλο που η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.09$), κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, η μέση συγκέντρωση των EVs στον ομόπλευρο ωαγωγό ήταν τρεις φορές μικρότερη σε σύγκριση με τον ετερόπλευρο και δυο φορές μικρότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές κατά τη θερμοουδέτερη περίοδο. Υποθέτουμε ότι εξαιτίας της μεθόδου δειγματοληψίας (ομαδοποιημένα δείγματα) και του μικρού αριθμού παρατηρήσεων που προέκυψαν, δεν κατέστη εφικτή η εντόπιση στατιστικά σημαντικών διαφορών στη μέση συγκέντρωση των EVs.

Τα EVs συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωρίμανση των ωαρίων *in vivo*, επιδρώντας στην αφθονία μεταγραφής στα ωάρια και στα κοκκώδη κύτταρα (Morales Dalanezi *et al.* 2019), ενώ EVs που συλλέχθηκαν *in vivo* βελτίωσαν τα ποσοστά και την ποιότητα των *in vitro* παραγόμενων βλαστοκύστεων (Almiñana *et al.* 2017, Lopera-Vásquez *et al.* 2017, Da Silveira *et al.*

2017). Με τη χρήση *in vitro* μοντέλου, οι Lopera-Vásquez *et al.* (2016, 2017), συν-καλλιέργησαν ζυγώτες με EVs που προέρχονταν από τον κώδωνα ή τον ισθμό και εξέτασαν τα ποσοστά παραγωγής, την ποιότητα και την κρυοαντοχή των βλαστοκύστεων ημέρας 7. Αναφέρουν ότι η παρουσία των EVs δεν επηρεάζει τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων, αλλά η ποιότητα τους, όπως αυτή εκφράζεται από την αφθονία μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τους διαύλους κυκλοφορίας νερού, τον μεταβολισμό και τα επιγενετικά φαινόμενα, καθώς και την κρυοαντοχή τους, βελτιώθηκε σημαντικά, ιδιαίτερα όταν τα EVs προέρχονταν από τον ισθμό. Επιπλέον, η ίδια ομάδα απέδειξε ότι νωπά ή καταψυγμένα EVs από επιθηλιακά κύτταρα ωαγωγού αγελάδων αποτελούν υπόστρωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην *in vitro* καλλιέργεια εμβρύων, οδηγώντας σε υψηλής ποιότητας βλαστοκύστες (Lopera-Vásquez *et al.* 2016). Ομοίως, η προσθήκη καταψυγμένων EVs στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας εμβρύων αύξησε τον αριθμό των κυττάρων των εμβρύων και βελτίωσε την κρυοαντοχή των βλαστοκύστεων (Almiñana *et al.* 2017). Μία πρόσφατη μελέτη, όπου EVs από τον ωαγωγό και το υγρό της μήτρας από το ίδιο ζώο χαρακτηρίστηκαν ταυτόχρονα και το περιεχόμενο τους σε miRNAs αναλύθηκε κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, έδειξε ότι τα φορτία miRNA των EVs, τόσο του ωαγωγού όσο και της μήτρας, μεταβάλλονται εμφανώς, σε συνάρτηση με το στάδιο του οιστρικού κύκλου (Hamdi *et al.* 2021). Επιπλέον, τα miRNAs, που βρέθηκαν να εκφράζονται διαφορετικά, στα EVs του υγρού του ωαγωγού (8 miRNAs) στο στάδιο 4 (προωοθυλακιωρρηκτική περίοδος) σε σύγκριση με των άλλων σταδίων (αρχή, μέση και τέλος της ωχρινικής φάσης), θα μπορούσαν να συσχετισθούν με υψηλότερου βαθμού μεταγραφική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, γεγονός που συνάδει με την προετοιμασία του ωαγωγού για να δεχτεί τους γαμέτες και το πρώιμο έμβρυο (Hamdi *et al.* 2021).

Η συγκέντρωση των EVs του ωαγωγού αυξάνεται βαθμιαία από 5×10^8 σωματίδια/ml περίπου τις ημέρες 1 έως 4, σε 1.5×10^9 σωματίδια/ml τις ημέρες 11 έως 17 του οιστρικού κύκλου στις αγελάδες (Almiñana *et al.* 2018), υποδηλώνοντας ότι η αύξηση αυτή συμβαίνει πιθανόν με τη διαμεσολάβηση της προγεστερόνης. Ομοίως, στα πρόβατα η συγκέντρωση των EVs της μήτρας αυξάνεται κατά 6 φορές από την ημέρα 10 (1.22×10^{10}) έως την ημέρα 14 (7.65×10^{10}) του οιστρικού κύκλου. Στην ίδια μελέτη, χρησιμοποιώντας ωθηκεκτομημένες προβατίνες, οι συγκεντρώσεις των EVs στον αυλό της μήτρας ήταν 2.5 φορές υψηλότερες στα ζώα που χορηγήθηκε μόνο προγεστερόνη σε σύγκριση με εκείνα στα οποία χορηγήθηκε προγεστερόνη μαζί με έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα της προγεστερόνης (RU 486) (Burns *et al.* 2018). Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα, συμπεραίνουμε ότι η χαμηλή συγκέντρωση προγεστερόνης κατά τους θερμούς μήνες του έτους, συνδέεται με τη μειωμένη παραγωγή EVs από τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού. Η μειωμένη συγκέντρωση των EVs κατά τους θερμούς μήνες, στον ομόπλευρο ωαγωγό, ενδέχεται να είναι ένας επιπρόσθετος σημαντικός

παράγοντας για την επιβίωση και την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου, καθώς το πρώιμο έμβρυο χάνει μέρος των εμβρυοτροφικών παραγόντων του φορτίου των EVs κατά το κρίσιμο στάδιο που το έμβρυο διέρχεται διαμέσου του ωαγωγού. Ωστόσο, είναι δύσκολο να ερμηνευθεί γιατί η συγκέντρωση των EVs στον ετερόπλευρο ωαγωγό δεν επηρεάζεται.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που περιγράφει την επίδραση της ΘΚ στο περιβάλλον του ωαγωγού. Στο μέλλον, πληρέστερες μελέτες που θα εστιάσουν στις πιθανές αποκλίσεις του περιεχόμενου των EVs κατά τη διάρκεια της ΘΚ πιθανόν να συμβάλλουν στην αποκωδικοποίηση του ρόλου τους, όσον αφορά την αλληλεπίδραση εμβρύου/μητέρας υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το κεφάλαιο αυτό έχει δημοσιευθεί αυτούσιο στο περιοδικό *Theriogenology*, 187, 152-163-2022.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από τους πειραματισμούς της παρούσας Διατριβής συνοψίζονται παρακάτω:

1. Τα ωάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην επίδραση της ΘΚ κατά τα πρώτα στάδια της *in vitro* ωρίμανσης, γεγονός που εκδηλώνεται στη συνέχεια με μειωμένα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων. Σε συνθήκες ΘΚ, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου δρουν υποστηρικτικά, καλύπτοντας τις ενεργειακές ελλείψεις των ωαρίων. Μολονότι, μειώνεται σημαντικά η παραγωγή βλαστοκύστεων σε συνθήκες ΘΚ, διαπιστώθηκε ότι βελτιώνονται κάποιοι γονιδιακοί δείκτες ποιότητας, υποδεικνύοντας ότι τα έμβρυα αυτά είναι ικανά να αναπτύξουν λειτουργικό πλακούντα, ικανό να υποστηρίξει την κύηση.
2. Η ενσωμάτωση της Hsp70 στο υπόστρωμα ωρίμανσης μπορεί να αμβλύνει τις δυσμενείς επιπτώσεις στην παραγωγή εμβρύων. Η παρουσία της Hsp70 βελτίωσε την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων, των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και των βλαστοκύστεων, παρεμποδίζοντας την απόπτωση, υποστηρίζοντας την ανταλλαγή σημάτων και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική προστασία των εμβρύων.
3. Τα ωάρια αγελάδων φυλής Holstein είναι περισσότερο ανθεκτικά στη ΘΚ σε σύγκριση με τα ωάρια αγελάδων φυλής Limousine και οι αντίστοιχες βλαστοκύστες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν λειτουργικό πλακούντα. Η αυξημένη ευαισθησία των ωαρίων και των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου των Limousine μπορεί να αποδοθεί στην εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων.
4. Η παρουσία Hsp70 στο υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί μόνο μερικώς να αντισταθμίσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της ΘΚ στην ανάπτυξη και εξέλιξη των πρώιμων εμβρύων. Η θετική επίδραση της Hsp70 αποδίδεται, κυρίως, στην αυξημένη παροχή πρωτεϊνών και ενέργειας στα πρώιμα έμβρυα.
5. Η ΘΚ κατά το θέρους μεταβάλλει τόσο τον πληθυσμό των EVs στους ωαγωγούς, όσο και το κλασικό πρότυπο έκφρασης γονιδίων από τα κύτταρα του επιθηλίου των ωαγωγών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή Υποστρωμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Σε όλα τα στάδια της IVP, το PBS χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση ωαρίων, ζυγωτών και εμβρύων.

Η παρασκευή 500ml διαλύματος γινόταν ως εξής:

Διάλυμα 1	
Υλικά	g/500ml
NaCl	4.000
KCl	0.100
KH ₂ PO ₄	0.100
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0.715

Τα συστατικά διαλύονται σε 250 ml H₂O

Διάλυμα 2	
Υλικά	g/500ml
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.070
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.100

Τα συστατικά διαλύονται σε 50 ml H₂O

Στη συνέχεια, ακολουθούσε ανάμειξη των βασικών διαλυμάτων 1 και 2 και προσθήκη των παρακάτω υλικών:

Διάλυμα 1+2	
Υλικά	g/500ml
D- glucose	0.500
Pyruvate	0.018
Gentamycin	2.5 ml

Στο νέο διάλυμα που προέκυπτε πραγματοποιούνταν ανάμιξη όλων των χημικών και προσθήκη H₂O μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Ακολουθούσε έλεγχος της οσμωτικής πίεσης (280mOsm) και γινόταν προσθήκη 0.25gr βόειας αλβουμίνης (BSA, A9647). και ελεγχόταν το pH του διαλύματος (7.2-7.4). Το διάλυμα αποστειρωνόταν μηχανικά, μέσω διέλευσής του από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm, και μπορούσε να συντηρηθεί στους 4°C για 1 μήνα.

Υπόστρωμα Tyrode's (TALP)

Το υπόστρωμα Tyrode's αποτελεί το βασικό μέσο διάλυσης των αντιδραστηρίων, που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των υποστρωμάτων επεξεργασίας του σπέρματος.

Tyrode's medium σε όγκο 250 ml

Διάλυμα 1 σε 150 ml H ₂ O	
Υλικά	g/250ml
NaCl	1.666
KCl	0.060
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0.010
Διάλυμα 2 σε 100 ml H ₂ O	
Υλικά	g/250ml
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.075
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.025

Μετά από καλή ανάμειξη των βασικών διαλυμάτων 1 και 2, γινόταν. προσθήκη 0.0025 gr ερυθρού της φαινόλης (χρωστική ένδειξης pH). Ακολουθούσε έλεγχος της οσμωτικής πίεσης στα 230 mOsm, και το διάλυμα συντηρείτο στους 4°C για έως 1 μήνα.

Υπόστρωμα ενεργοποίησης σπερματοζωαρίων (Sp-TALP ή Swim up medium) και υπόστρωμα γονιμοποίησης (Fert-TALP or IVF medium)

Αρχικά, ετοιμαζόταν ένα κοινό διάλυμα και για τα δύο υποστρώματα, χρησιμοποιώντας 20 ml Tyrode's medium, ως βασικό διάλυμα, για την προετοιμασία των διαλυμάτων Sp-TALP και Fert-TALP.

Κοινό διάλυμα για Sp-TALP και Fert-TALP	
Υλικά	Ποσότητα
NaHCO ₃	0,043 g
Πυροσταφυλικό νάτριο	0.0022 g
DL- γαλακτικό νάτριο	61,3 μl
Γενταμυκίνη	100 μl

Στη συνέχεια, το παραπάνω διάλυμα χωριζόταν σε δύο αποστειρωμένα δοχεία (10 ml το καθένα), για την παρασκευή των τελικών υποστρωμάτων Sp-TALP και Fert-TALP:

Swim up medium (10ml)		IVF medium (10ml)	
Υλικά	Ποσότητα	Υλικά	Ποσότητα
BSA (A 7030)	0,060 g	BSA (A 7030)	0,060 g
Hepes	0.024 g	Μη απαραίτητα αμινοξέα –MEMaa (100x)*	100 μl
		Απαραίτητα αμινοξέα- BMEaa (50x)*	200 μl
		Ηπαρίνη (2 mg/ml)	50 μl
		Υποταυρίνη (100 mg/ml)	100 μl

Τα διαλύματα αποστειρώνονταν μηχανικά, μέσω διέλευσής τους από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm και μπορούσαν να διατηρηθούν στους 4°C έως και 2 εβδομάδες. Μία μέρα πριν την *in vitro* γονιμοποίηση τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο CO₂ ώστε να εξισορροπηθεί το pH και διατηρηθεί η θερμοκρασία τους στους 39°C.

Συνθετικό υγρό ωαγωγού (Synthetic oviductal fluid, SOF)

Για την προετοιμασία του SOF ήταν απαραίτητη η προηγούμενη παρασκευή τεσσάρων βασικών διαλυμάτων:

Διάλυμα Α (όγκος σε 49.7 ml H ₂ O)	
Υλικά	Ποσότητα
NaCl	3.145 gr
KCl	0.267 gr
KH ₂ PO ₄	0.081gr
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.091gr
DL- γαλακτικό νάτριο	0.3 ml

Διάλυμα Β (όγκος σε 50 ml H ₂ O)	
Υλικά	Ποσότητα
NaHCO ₃	1.05gr
Ερυθρό της φαινόλης	0.005gr

Διάλυμα Γ (όγκος σε 10 ml H ₂ O)	
Υλικά	Ποσότητα
Πυροσταφυλικό νάτριο	0.080gr

Διάλυμα Δ (όγκος σε 50 ml H ₂ O)	
Υλικά	Ποσότητα
CaCl ₂ *2H ₂ O	1.310gr

Όλα τα βασικά διαλύματα αποστειρώνονταν μηχανικά, μέσω διέλευσής τους από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm, και η συντήρησή τους γινόταν στους 4°C έως και 1 μήνα (διαλύματα Α, Β, και Δ), ενώ το διάλυμα Γ συντηρείτο μόνο για 1 εβδομάδα.

SOF κατά Holm <i>et al.</i> (1999)		για τελικό όγκο 100 ml
Υλικά	Ποσότητες	
H ₂ O	78 ml	
Κιτρικό νάτριο	0.010 gr	
Μυο-ινοσιτόλη	0.050 gr	
Διάλυμα Α	10 ml	
Διάλυμα Γ	1 ml	
Διάλυμα Δ	1 ml	
BME	3 ml	
MEM	1 ml	
L-γλουταμίνη	100 μl	
Γενταμικίνη	500 μl	
Διάλυμα Β	10 ml	

Μετά από έλεγχο της ωσμωτικής πίεσης (270-280mOsm) και προσθήκη 0.3gr βόειας αλβουμίνης (BSA, A9647), το διάλυμα αποστειρωνόταν μηχανικά, μέσω διέλευσής του από ηθμό διαμέτρου 0.22μm και μπορούσε να συντηρηθεί στους 4°C έως και 2 εβδομάδες. Η ενσωμάτωση του ορού εμβρύου μόσχου (FCS) στο υπόστρωμα της IVC πραγματοποιούνταν πριν τη χρησιμοποίησή του, σε αναλογία 5%. Στη συνέχεια το υπόστρωμα καλλιέργειας τοποθετούταν στον κλίβανο CO₂ για την εξισορρόπηση του pH και τη διατήρηση της θερμοκρασίας του στους 39°C.

Αδρανοποίηση ορού εμβρύου μόσχου (FCS)

Η διαδικασία αδρανοποίησης του FCS περιλάμβανε τη σταδιακή και ήπια απόψυξη του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες ή σε 2-6°C για 24 ώρες και στη συνέχεια θέρμανση του στους 56°C για 30 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό απενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν λύση των κυττάρων, των αναστολέων της κυτταρικής ανάπτυξης και των μυκοπλασμάτων, που ενδεχομένως εμπεριέχονται στον ορό. Μετά την απενεργοποίησή του ο ορός κατανεμήθηκε σε φιαλίδια τύπου erpendorf όγκου 1ml που συντηρήθηκαν στους -20°C. Σημειώνεται ότι σε όλες τις φάσεις όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε FCS της ίδιας προέλευσης, ώστε να διασφαλιστεί η ομοιομορφία τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abilay TA, Johnson HD, Madam LM. (1975): Influence of environmental heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine oestrus cycle. *Journal of Dairy Science*, **58**:1836–1840.
2. Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. (1995): Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*, **52**:1129–1135.
3. Al-Dossary AA, Strehler EE, Martin-DeLeon PA. (2013): Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One*, **8**:e80181.
4. Al-Dossary AA, Martin-DeLeon PA. (2016): Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Frontiers in Bioscience*, **21**:1278–1285.
5. Alemu TW, Pandey HO, Salilew Wondim D, Gebremedhn S, Neuhof C, Tholen E, Holker M, Schellander K, Tesfaye D. (2018): Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. *Theriogenology*, **110**:130–141.
6. Alexandre A, Reverter A, Berezin RB, Porto-Neto LR, Ribeiro G, Santana MHA, Ferraz JBS, Fukumasu H. (2020): Exploring the Regulatory Potential of Long Non-Coding RNA in Feed Efficiency of Indicine Cattle. *Genes*, **11**:997.
7. Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. (1999): Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science*, **82**:2611–2616.
8. Al-Katanani YM, Hansen PJ. (2002): Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, **62**:174–180.
9. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. (2002): Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, **85**:390–396.
10. Alliston CW, Howarth B, Ulberg LC. (1965): Embryonic mortality following culture in vitro of one- and two-cell rabbit eggs at elevated temperatures. *Reproduction*, **9**:337–341.
11. Alm H, Torner H, Loehrke B, Viergutza T, Ghoneim IM, Kanitz W. (2005): Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, **63**:2194–2205.

12. Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Alcântara-Neto AS, Labas V, Reynaud K, Galio L, Uzbekov R, Garanina AS, Druart X, Mermillod P. (2017): Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct–embryo cross-talk. *Reproduction*, **154**:153–168.
13. Almiñana C, Tsikis G, Labas V, Uzbekov R, da Silveira JC, Bauersachs S, Mermillod P. (2018): Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics*, **19**:622.
14. Amundson JL, Mader TL, Rasby RJ, Hu QS. (2006): Environmental effects on pregnancy rate in beef cattle. *Journal of Animal Science*, **84**:3415-3420.
15. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. (1986): Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, **232**:522-524.
16. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. (1999): The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, **10**:1463–1475.
17. Andreu-Vasquez C, Lopez-Gatius F, Garcia Ispuerto I, Hunter RHF. (2010): Does the heat stress provoke the loss of continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation. *Zygote*, **18**:293-299.
18. Archana PR, Aleena J, Pragna P, Vidya MK, Niyas APA, Bagath M, Krishnan G, Manimaran A, Beena V, Kurien EK, Sejian V, Bhatta R. (2017): Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, **5**:00127.
19. Argov N, Moallem U, Sklan D. (2005): Summer heat stress alters the mRNA expression of selective-uptake and endocytotic receptors in bovine ovarian cells. *Theriogenology*, **64**:1475–1489.
20. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones E, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. (2000): Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine*, **6**:435–442.
21. Ashburner M. (1970): Patterns of Puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma*, **31**:356–376.
22. Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. (2008): Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of Reproduction*, **79**:209–222.
23. Auclair S, Uzbekov R, Elis S, Sanchez L, Kireev I, Lardic L, Dalbies-Tran R, Uzbekova S. (2013): Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **304**:599–613.

24. Auldist MJ, O'Brien G, Cole D, Macmillan KL, Grainger C. (2007): Effects of varying lactation length on milk production capacity of cows in pasture-based dairying systems. *Journal of Dairy Science*, **90**:3234–3241.
25. Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. (2010): Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction*, **16**:896-906.
26. Badinga L, Collier RJ, Thatcher WW, Wilcox CJ. (1985): Effect of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, **68**:78–85.
27. Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D. (1993): Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, **39**:797–810.
28. Bagath M, Krishnan G, Devaraj C, Rashamol VP, Pragna P, Lees AM, Sejian V. (2019): The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: a review. *Research in Veterinary Science*, **126**:94–102.
29. Barna J, Csermely P, Vellai T. (2018): Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75**:2897–2916.
30. Barnes FL, First NL. (1991): Embryonic Transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **29**:117–123.
31. Beckers JF, Zarrouk A, Batalha ES, Garbayo JM, Mester L, Szenci O. (1998): Endocrinology of pregnancy: Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropins and pregnancy-associated glycoproteins: review. *Acta Veterinaria Hungarica*, **46**:175–189.
32. Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ. (1992): Examining the Function and Regulation of hsp 70 in Cells Subjected to Metabolic Stress. *The Journal of Cell Biology*, **117**:1137-1150.
33. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Abdrabba M. (2016): Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **100**:401-412.
34. Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, Pozsgai E, Gomori E, Melegh B, Janaky T, Bogнар Z, Hocsak E, Sumegi B *et al.* (2006): Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via HSP90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. *Apoptosis*, **12**:97–112.
35. Berkova N, Lemay A, Dresser DW, Fontaine JY, Kerizit J, Goupil S. (2001): Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. *Molecular Human Reproduction*, **7**:747-754.

36. Berman A, Folman YM, Kaim M, Mamen Z, Herz D, Wolfenson A, Graber Y. (1985): Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a tropical climate. *Journal of Dairy Science*, **68**:488–495.
37. Besenfelder U, Havlicek V, Brem G. (2012): Role of the Oviduct in Early Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*, **47**:156–163.
38. Block J, Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann D, Hansen PJ. (2008): Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **75**:895–903.
39. Blois S, Ilarregui J, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. (2007): A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nature Medicine*, **13**:1450–1457.
40. Bolger MA, Lohse M, Usadel B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**:2114–2120.
41. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. (2004): Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, **25**:495-520.
42. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. (2012): The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology*, **3**:95.
43. Borges F, Reis L, Schor N. (2013): Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **46**:824–830.
44. Bouraoui R, Lahmar M, Majdoub A, Djemali M, Belyea R. (2002): The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research*, **51**:479–491.
45. Brandvold KR, Morimoto RI. (2015): The chemical biology of molecular chaperones - Implications for modulation of proteostasis. *Journal of Molecular Biology*, **427**:2931–2947.
46. Brevini-Gandolfi TAL, Favetta LA, Lonergan P, Gandolfi F. (2000): The mechanism regulating maternal mRNA stability and translation is affected in bovine embryos with low developmental competence. *Theriogenology*, **53**:268.
47. Brevini-Gandolfi TAL, Gandolfi F. (2001): The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, **55**:1255–1276.
48. Bujang MA, Baharum N. (2016): Sample size guideline for correlation analysis. *World Journal of Social Science Research*, **3**:37.

49. Burns GW, Brooks KE, Spencer TE. (2016): Extracellular vesicles originate from the conceptus and uterus during early pregnancy in sheep. *Biology of Reproduction*, **94**:56.
50. Burns GW, Brooks KE, O'Neil EV, Hagen DE, Behura SK, Spencer TE. (2018): Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biology of Reproduction*, **98**:612–622.
51. Calderwood SK, Gong J, Murshid A. (2016): Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Frontiers in Immunology*, **7**:159.
52. Campen KA, Abbott CR, Rispoli LA, Payton RR, Saxton AM, Edwards JL. (2018): Heat stress impairs gap junction communication and cumulus function of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, **64**:385-392.
53. Canali E, Fallon R, Le Neindre P, Lidfors L, Manteca X, Sundrum A. (2001): The welfare of cattle kept for beef production. *European Commission, Health and Consumer Protection, Directorate C-Scientific Health Opinions, Unit C2-Management of scientific committees*.
54. Cañón-Beltrán K, Hamdi M, Mazzarella R, Cajas YN, Leal CLV, Gutiérrez-Adán A, González EM, da Silveira JC, Rizos D. (2021): Isolation, Characterization, and MicroRNA Analysis of Extracellular Vesicles from Bovine Oviduct and Uterine Fluids. *Methods in Molecular Biology*, **2273**:219-238.
55. Cavestany D, El-Whishy AB, Foot RH. (1985): Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, **68**:1471–1478.
56. Cerny KL, Garrett E, Walton A, Anderson LH, Bridges PJ. (2015): A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **13**:84.
57. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. (1999): Effects of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocyte and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. *Theriogenology*, **51**:541-550.
58. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. (2001): Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte in Vitro Maturation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **51**:57–64.
59. Circu ML, Aw TY. (2010): Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, **48**:749–762.
60. Collier RJ, Beede DK, Thatcher WW, Israel LA, Wilcox CJ. (1982): Influences of Environment and Its Modification on Dairy Animal Health and Production. *Journal of Dairy Science*, **65**:2213–2227.
61. Cory S. (1995): Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annual Review of Immunology*, **13**:513–543.

62. Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, Matás C, Avilés M. (2008): Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**:15809–15814.
63. Cramer W, Guiot J, Fader M, Garrabou J, Gattuso JP, Iglesias A, Lange MA, Lionello P, Llasat MC, Paz S, Peñuelas J, Snoussi M, Toreti A, Tsimplis MN, Xoplaki E. (2018): Climate change and interconnected risks to sustainable development in the Mediterranean. *Nature Climate Change*, **8**:972-980.
64. Curci A, Bevilacqua A, Mangia F. (1987): Lack of heat shock response in preovulatory mouse oocytes. *Developmental Biology*, **123**:154-160.
65. Das R, Gupta I, Verma A, Singh A, Chaudhari M, Sailo L, Upadhyay R, Goswami J. (2015): Genetic polymorphisms in ATP1A1 gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. *Indian Journal of Dairy Science*, **68**:50–54.
66. Da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. (2012): Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, **86**:71.
67. Da Silveira JC, Andrade GM, Del Collado M, Sampaio RV, Sangalli JR, Silva LA, Pinaffi FVL, Jardim IB, Cesar MC, Nogueira MFG, Cesar ASM, Coutinho LL, Pereira RW, Perecin F, Meirelles FV. (2017): Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS One*, **12**:e0179451.
68. Davis MS, Mader TL, Holt SM, Parkhurst AM. (2003): Strategies to reduce feedlot cattle heat stress: Effects on tympanic temperature. *Journal of Animal Science*, **81**:649–661.
69. De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip TA. (1989): Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, **24**: 197-204.
70. De Rensis F, Marconi P, Capelli T, Gatti F, Facciolongo F, Franzini S, Scaramuzzi RJ. (2002): Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrous synchronization and fixed time A.I. after the induction of an LH surge with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG). *Theriogenology*, **58**:1675–1687.
71. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. (2003): Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology*, **60**:1139–1151.
72. De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ. (1998): Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*, **49**:115–128.

73. Dovolou E, Clemente M, Amiridis GS, Messinis IE, Kallitsaris A, Gutierrez-Adan A, Rizos D. (2011): Effects of guaiazulene on in vitro bovine embryo production and on mRNA transcripts related to embryo quality. *Reproduction of Domestic Animals*, **46**:862-869.
74. Dovolou E, Periqueta E, Messinis IE, Tsiligianni Th, Dafopoulos K, Gutierrez- Adan A, Amiridis GS. (2014): Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*, **81**:565-571.
75. Doyle LM, Wang MZ. (2019): Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, **8**:727.
76. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. (2010): Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biology of Reproduction*, **83**:909–918.
77. Dutt RH. (1963): Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *Journal of Animal Science*, **22**:713–719.
78. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. (1993): Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, **76**:2899–2905.
79. Ealy AD, Hansen PJ. (1994): Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *Journal of Cellular Physiology*, **160**:463–468.
80. Ealy AD, Howell JL, Monterroso VH, Aréchiga CF, Hansen PJ. (1995): Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *Journal of Animal Science*, **73**:1401–1407.
81. Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CRL, Trinca LA, Barros CM. (2009): Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal Reproduction Science*, **114**:54–61.
82. Edwards JL, Hansen PJ. (1996): Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of Reproduction*, **55**:340–346.
83. Edwards JL, Hansen PJ. (1997): Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, **46**:138–145.
84. Edwards JL, Ealy AD, Monterroso VH, Hansen PJ. (1997): Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **48**:25–33.

85. Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD. (2001): Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, **55**:209-223.
86. Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR. (2005): Exposure to physiologically relevant temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. *Journal of Dairy Science*, **88**:4326-4333.
87. Eicher SD, McMunn KA, Hammon HM, Donkin SS. (2004): Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **98**:115–125.
88. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. (2000): Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **917**:94–105.
89. El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. (2006): Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics*, **28**:84–96.
90. Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. (1996): Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **44**:260-277.
91. Esslemont RJ, Kossaibati MA, Allcock J. (2001): Economics of fertility in dairy cows. *BSAP Occasional Publication*, **26**:19–29.
92. Eyestone WH, First NL. (1986): A Study of the 8 to 16 Cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, **25**:152.
93. Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, Forner O, Marin-Garcia P, Arnau V, D'Eustachio P, Stein L, Hermjakob, H. (2017): Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics*, **18**:142.
94. Fahey JV, Wright JA, Shen L, Smith JM, Ghosh M, Rossoll RM, Wira CR. (2008): Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunology*, **1**:317–325.
95. Ferrandi B, Cremonesi G, Consiglio AL, Luciano AM, Gandolfi F, Modina S, Carnevali A, Porcelli F. (2002): Microdensitometric assay of enzymatic activities in parthenogenetically activated and in vitro fertilized bovine oocytes. *Acta Histochemica*, **104**:193–198.
96. Février B, Raposo G. (2004): Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**:415–421.

97. Filali M, Frydman N, Belot MP, Hesters L, Gaudin F, Tachdjian G, Emilie D, Frydman R, Machelon V. (2009): Oocyte in-vitro maturation: BCL2 mRNA content in cumulus cells reflects oocyte competency. *Reproductive Biomedicine Online*, **19**:4309.
98. Flamenbaum I, Galon N. (2010): Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *Journal of Reproduction and Development*, **56**:1–6.
99. Frei RE, Schultz GA, Church RB. (1989): Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, **86**:637–641.
100. Friedrichs WE, Navarajo-Ashbaugh AL, Bowman BH, Yang F. (1995): Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **209**:250-256.
101. Fukai T, Ushio-Fukai M. (2011): Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**:1583–1606.
102. Ganaie AH, Shanker G, Bumla NA, Ghasura RS, Mir NA. (2013): Biochemical and physiological changes during thermal stress in bovines. *Journal of Veterinary and Science Technology*, **4**:126.
103. Gantner V, Bobic T, Gantner R, Gregic M, Kuterovac K, Novakovic J, Potocnik K. (2017): Differences in response to heat stress due to production level and breed of dairy cows. *International Journal of Biometeorology*, **61**:1675–1685.
104. García-Vázquez FA, Moros-Nicolás C, López-Úbeda R, Rodríguez-Tobón E, Guillén-Martínez A, Ross JW, Luongo C, Matás C, Hernández-Caravaca I, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. (2021): Evidence of haptoglobin in the porcine female genital tract during oestrous cycle and its effect on in vitro embryo production. *Scientific Reports*, **11**:12041.
105. Garrido C, Gurbuxani, S, Ravagnan L, Kroemer G. (2001): Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **286**: 433–442.
106. Gatien J, Mermillod P, Tsikis G, Bernardi O, Janati Idrissi S, Uzbekov R, Le Bourhis D, Salvetti P, Almiñana C, Saint-Dizier M. (2019): Metabolomic profile of oviductal extracellular vesicles across the estrous cycle in cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**:6339.
107. Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Josey MJ, Rowan KJ. (1999): Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. *Journal of Animal Science*, **77**:2398–2405.
108. Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. (2010): Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, **140**:73–82.

109. Gendelman M, Roth Z. (2012a): Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biology of Reproduction*, **86**:1–9.
110. Gendelman M, Roth Z. (2012b): Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biology of Reproduction*, **87**:1–12.
111. Gendelman M, Roth Z. (2012c): In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science*, **134**:125-34.
112. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. (2000): Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of Reproduction*, **63**:1730–1734.
113. Ghanem N, Salilew Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M. (2011): Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction*, **142**:551-64.
114. Gloria-Bottini F, Magrini A, Amante A, Nicotra M, Bottini E. (2009): Haptoglobin phenotype and reproductive success in repeated spontaneous abortion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **144**:153-156.
115. Gomez E, Caamano JN, Bermejo-Alvarez P, Diez C, Munoz M, Martin D, Carrocera S, Gutierrez-Adan A. (2009): Gene Expression in Early Expanded Parthenogenetic and In Vitro Fertilized Bovine Blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*, **55**:607–614.
116. Graham SP, Earley RL, Guyer C, Mendonça MT. (2011): Innate immune performance and steroid hormone profiles of pregnant versus nonpregnant cottonmouth snakes (*Agkistrodon piscivorus*). *General and Comparative Endocrinology*, **174**:348–353.
117. Guerin PE, Mouatassim S, Menezo Y. (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, **7**:175–189.
118. Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A. (2010): HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biology*, **8**:e1000410.
119. Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ, Thatcher WW. (2001): Long term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Animal Reproduction Science*, **66**:15–34.

120. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Kiddy CA, Paape MJ, Wilcox CZ. (1981): Hormonal patterns during heat stress following PGF2 α -tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, **16**:271–285.
121. Hahn GM, Li GC. (1990): Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgeopoulos C (editors). *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, NY:79-100.
122. Hall LW, Villar F, Chapman JD, McLean DJ, Long NM, Xiao Y, Collier JL, Collier RJ. (2018): An evaluation of an immunomodulatory feed ingredient in heat-stressed lactating Holstein cows: Effects on hormonal, physiological, and production responses. *Journal of Dairy Science*, **101**:7095–7105.
123. Hamdi M, Sánchez Calabuig MJ, Rodríguez-Alonso B, Bagés-Arnal S, Roussi K, Sturmey RGS, Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D. (2019): Gene expression and metabolic response of bovine oviduct epithelial cells to the early embryo. *Reproduction*, **158**:85-94.
124. Hamdi M, Cañon-Beltrán K, Mazzarella R, Cajas YN, Leal CLV, Gutierrez-Adan A, González EM, Da Silveira JC, Rizos D. (2021): Characterization and profiling analysis of bovine oviduct and uterine extracellular vesicles and their miRNA cargo through the estrous cycle. *FASEB Journal*, **35**:e22000.
125. Hammond AC, Olson TA, Chase CC, Bowers EJ, Randel RD, Murphy CN, Vogt DW, Tewolde A. (1996): Heat tolerance in two tropically adapted Bos taurus breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. *Journal of Animal Science*, **74**:295– 303.
126. Hansen PJ. (1999): Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. *Annual Review Biomedical Science*, **1**:5-29.
127. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger 3'd CE, Chase CCJr. (2001): Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, **55**:91-103.
128. Hansen J. (2007): To be or not to be—Determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, **68**:40-48.
129. Harris S, Gopichandran N, Picton H, Leese H, Orsi N. (2005): Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*, **64**:992–1006.
130. Harris EA, Stephens KK, Winuthayanon W. (2020): Extracellular Vesicles and the Oviduct Function. *International journal of molecular sciences*, **21**:8280.

131. Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD. (2002): Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, **296**:2158–2162.
132. Hernández-Cerón J, Chase CC, Hansen PJ. (2004): Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds*. *Journal of Dairy Science*, **87**:53– 58.
133. Hoffman LH, Winfrey VP, Blaeuer GL, Olson GE. (1996): A Haptoglobin-Like Glycoprotein is produced by Implantation-Stage Rabbit Endometrium. *Biology of Reproduction*, **55**:176–184.
134. Holt WV, Fazeli A. (2010): The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Molecular Reproduction and Development*, **77**:934–943.
135. Howell JL, Fuquay JW, Smith AE. (1994): Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *Journal of Dairy Science*, **77**:735–739.
136. Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, Morris DG. (2008): Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development*, **75**:496–503.
137. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. (1999): The apoptosis cascade -- morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, **200**:1–18.
138. Hyttel P, Callesen H, Greve T. (1986): Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **76**:645–656.
139. Ingraham RH, Gillette DD, Wagner WD. (1974): Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in a subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, **57**:476-481.
140. Ispada J, Lima RS, Risolia PHB, Assumpcao MEOA, Visintin JA, Paula-Lopes FF. (2011): Insulin like growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. *Reproduction, Fertility and Development*, **24**:209.
141. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J, Gillespie M, Haw R, Loney F, May B, Milacic M, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Weiser J, Guanming Wu, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. (2020): The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, **48**:498–503.
142. Jayaprakash P, Dong H, Zou M, Bhatia A, O'Brien K, Chen M, Woodley DT, Li W. (2015): Hsp90alpha and Hsp90beta together operate a hypoxia and nutrient paucity stress-response mechanism during wound healing. *Journal of Cell Science*, **128**:1475–1480.
143. Jee H. (2016): Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *Journal of exercise rehabilitation*, **12**:255–259.

144. Jonsson NN, McGowan MR, McGuigan K, Davison TM, Hussain AM, Kafi M, Matschoss A. (1997): Relationship among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment. *Animal Reproduction Science*, **47**:315–326.
145. Jordan ER. (2003): Effects of Heat Stress on Reproduction. *Journal of Dairy Science*, **86**:104-114.
146. Ju JC, Parks JE, Yang X. (1999): Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, **53**:336–340.
147. Ju JC. (2005): Cellular responses of oocyte and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Animal Reproduction Science*, **2**:79–90.
148. Ju J, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. (2005): Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration in bovine oocytes. *Theriogenology*, **64**:1677-1689.
149. Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. (2002): Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livestock Production Science*, **77**:59–91.
150. Kanai Y, Yagyu N Shimizu T. (1995): Hypogonadism in heat stressed goats: poor responsiveness of the ovary to the pulsatile LH stimulation induced by hourly injections of a small dose of GnRH. *Journal of Reproduction and Development*, **41**: 133–139.
151. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N. (1990): Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**:137–143.
152. Kastrop PMM, Hulshof SCJ, Bevers MM, Destree OHJ, Kruip ThAM. (1991): The effects of α -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **28**:249–254.
153. Kawarsky SJ, King WA. (2001): Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, **9**:39–50.
154. Kidd VJ. (1998): PROTEOLYTIC ACTIVITIES THAT MEDIATE APOPTOSIS. *Annual Review of Physiology*, **60**:533–573.
155. Kidder GM, Vanderhyden BC. (2010): Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **88**:399–413.
156. Kim D, Ouyang H, Li GC. (1995): Heat shock protein hsp70 accelerates the recovery of heat-shocked mammalian cells through its modulation of heat shock transcription factor HSF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:2126–2130.

157. Kobayashi Y, Wakamiya K, Kohka M, Yamamoto Y, Okuda K. (2013): Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. *Reproduction*, **146**:103-110.
158. Koester M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Montag M, Rings F, Schimming T, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. (2011): Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction*, **141**:779–787.
159. Kölle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. (2009): Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biology of Reproduction*, **81**:267–274.
160. Kowsar R, Hambruch N, Liu J, Shimizu T, Pfarrer C, Miyamoto A. (2013): Regulation of innate immune function in bovine oviduct epithelial cells in culture: the homeostatic role of epithelial cells in balancing TH1/TH2 response. *Journal of Reproduction and Development*, **59**:470–478.
161. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. (1988): The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, **332**:462–464.
162. Kregel KC. (2002): Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, **92**:2177–2186.
163. Krininger CE, Stephens SH, Hansen PJ. (2002): Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **63**:335–340.
164. Kumar D, Yadav B, Choudhury S, Kumari P, Madan AK, Singh SP, Rout PK, Ramchandran N, Yadav S. (2018): Evaluation of adaptability to different seasons in goat breeds of semi-arid region in India through differential expression pattern of heat shock protein genes. *Biological Rhythm Research*, **49**:466–478.
165. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. (2003): Physiological and productive consequences of heat stress: The case of dairy ruminants. *Proceedings of the Symposium on Interaction between Climate and Animal Production: EAAP Technical Series*, **7**:45–60.
166. Lacetera N. (2019): Impact of climate change on animal health and welfare. *Animal Frontiers*, **9**:26–31.
167. Lamming GE, Royal MD. (2001): Ovarian hormone patterns and subfertility in dairy cows. In: Diskin MG, editor. Fertility in the high-producing dairy cow, vol. 26. *BSAS Endinburgh: Occasional Publication*, **26**:105–118.
168. Lamy J, Liere P, Pianos A, Aprahamian F, Mermillod P, Saint-Dizier M. (2016): Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*, **86**:1409–1420.

169. Lamy J, Gatien J, Dubuisson F, Nadal-Desbarats L, Salvetti P, Mermillod P, Saint-Dizier M. (2018): Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reproduction, Fertility and Development*, **30**:1021–1028.
170. Laporta J, Ferreira FC, Ouellet V, Dado-Senn B, Almeida AK, De Vries A, Dahl GE. (2020): Late-gestation heat stress impairs daughter and granddaughter lifetime performance. *Journal of Dairy Science*, **103**:7555–7568.
171. Laurincik J, Thomsen PD, Hay-Schmidt A, Avery B, Greve T, Ochs RL, Hyttel P. (2000): Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biology of Reproduction*, **62**:1024–1032.
172. Lavery K, Gabler C, Day J, Killian G. (2004): Expression of haptoglobin mRNA in the liver and oviduct during the oestrous cycle of cows (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science*, **84**:13-26.
173. Leese HJ. (1988): The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, **82**:843–856.
174. Leese H, Hugentobler S, Gray S, Morris D, Sturmey R, Whitear S, Sreenan J. (2008): Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility and Development*, **20**:1–8.
175. Lelièvre JM, Peynot N, Ruffini S, Laffont L, Le Bourhis D, Girard PM, Duranthon V. (2017): Regulation of heat-inducible HSPA1A gene expression during maternal-to-embryo transition and in response to heat in in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **29**:1868–1881.
176. Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. (1983): In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biology of Reproduction*, **29**:173–179.
177. Lepock JR. (2005): How do cells respond to their thermal environment? *International Journal of Hyperthermia*, **21**:681–687.
178. Li Q, Qiao J, Zhang Z, Shang X, Chu Z, Fu Y, Chu M. (2020): Identification and analysis of differentially expressed long non-coding RNAs of Chinese Holstein cattle responses to heat stress. *Animal Biotechnology*, **31**:9-16.
179. Lima RS. (2012): O papel do fator de crescimento semelhante à insulina-I sobre os efeitos deletérios do choque térmico em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa [in Portuguese]. Botucatu, Brazil: UNESP. Thesis.
180. Lindquist S. (1992): Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Current Opinion in Genetics and Development*, **2**:748–755.

181. Liu YX, Zhou X, Li DQ, Cui QW Wang GL. (2010): Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research*, **9**:891-896.
182. Liu J, Li L, Chen X, Lu Y and Dong Wang D. (2019): Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **32**:1332–1339.
183. Liu H, Lu Z, Shi X, Liu L, Zhang P, Golemis EA, Tu Z. (2021): HSP90 inhibition downregulates DNA replication and repair genes via E2F1 repression. *Journal of Biological Chemistry*, **297**:100996.
184. Lonergan P, Fair T, Khatir H, Cesaroni G, Mermillod P. (1998): Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, **50**:417–431.
185. Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, De la Fuente J, Boland MP. (2003): Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, **69**:1424–1431.
186. Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, Maillo V, Beltrán-Breña P, Calle A, Redruello A, López-Martín S, Gutierrez-Adán A, Yáñez-Mó M, Ramirez MÁ, Rizos D. (2016): Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One*, **11**:e0148083.
187. Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Maillo V, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, Ramírez MÁ, Yáñez-Mó M, Rizos D. (2017): Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction*, **153**:461-470.
188. Lötvall J Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. (2014): Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, **3**:26913.
189. Loven DP. (1988): A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and the induction of thermotolerance. *Medical Hypotheses*, **26**: 39–50.
190. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. (2011): Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signaling*, **15**:1957–1997.

191. Luciano AM, Lode V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. (2005): Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 30,50 -monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, **71**:389–397.
192. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. (1987): Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, **81**:301-307.
193. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. (2017): Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, **27**:172–188.
194. Maillo V, Gaora PÓ, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, Spencer TE, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. (2015): Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street? *Biology of Reproduction*, **92**:144.
195. Maillo V, Sanchez-Calabuig MJ, Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. (2016): Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. *Reproduction*, **152**:127–141.
196. Makarevich AV, Markkula M. (2002): Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of Reproduction*, **66**:386–392.
197. Malayer JR, Hansen PJ, Gross TS, Thatcher WW. (1990): Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology*, **34**:219–230.
198. Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK. (2007): Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods*, **43**:168–175.
199. Manejwala FM, Logan CY, Schultz RM. (1991): Regulation of hsp70 mRNA levels during oocyte maturation and zygotic gene activation in the mouse. *Developmental Biology*, **144**:301–308.
200. Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. (1999): The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, **54**:317–328.
201. Marey MA, Yousef MS, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Pfarrer C, Miyamoto A. (2016): Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance? *Domestic Animal Endocrinology*, **56**:204-211.
202. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. (2008): RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, **18**:1509-1517.

203. Maya-Soriano MJ, Taberner E, Lopez-Bejar M. (2013a): Retinol improves in vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. *Zygote*, **21**:377-384.
204. Maya-Soriano MJ, López-Gatius F, Andreu-Vázquez C, López-Béjar M. (2013b): Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology*, **79**:299–305.
205. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. (2012): Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research*, **40**:4288–4297.
206. McDowell RE, Hooven NW, Camoens JK. (1979): Effect of climate on performance of Holsteins in first lactation. *Journal of Dairy Science*, **68**:2418-2435.
207. Menta PR, Machado VS, Pineiro JM, Thatcher WW, Santos JEP, Vieira-Neto A. (2022): Heat stress during the transition period is associated with impaired production, reproduction and survival in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **105**:4474-4489
208. Memili E, First NL. (2000): Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, **8**:87–96.
209. Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. (1994): Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, **102**:123–130.
210. Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. (2002): Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *International Journal of Hyperthermia*, **18**:563–575.
211. Molavian H, Tonekaboni AM, Kohandel M, Sivaloganathan S. (2015): The synergistic coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H₂O₂. *Scientific Reports*, **5**:13620.
212. Monguió-Tortajada M, Morón-Font M, Gámez-Valero A, Carreras-Planella L, Borràs FE, Franquesa M. (2019): Extracellular-Vesicle Isolation from Different Biological Fluids by Size-Exclusion Chromatography. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, **49**:82.
213. Morales Dalanezi F, Mogollon Garcia HD, de Andrade Ferrazza R, Fagali Franchi F, Kubo Fontes P, de Souza Castilho AC, Gouveia Nogueira MF, Dos Santos Schmidt EM, Sartori R, Pinheiro Ferreira JC. (2019): Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. *Animal Reproduction Science*, **205**:94-104.
214. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. (1992): Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *Journal of Biological Chemistry*, **267**:21987-21990.

215. Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE. (1994): Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (editors). *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY:417–455.
216. Morimoto RI. (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, **12**:3788–3796.
217. Morton JM, Tranter WP, Mayer DG, Jonsson NN. (2007): Effects of environmental heat on conception rates in lactating dairy cows: Critical periods of exposure. *Journal of Dairy Science*, **90**:2271–2278.
218. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. (1997): Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **17**:5317 – 5327.
219. Motlík J, Kubelka M. (1990): Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **27**:366–375.
220. Multhoff G. (2002): Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *International Journal of Hyperthermia*, **18**:576–585.
221. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. (2011): Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *Journal of Reproduction and Development*, **57**:450–456.
222. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. (2012): The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, **20**:249–259.
223. Nabenishi H, Tagagi S, Katama H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. (2012): The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Molecular Reproduction and Development*, **79**:31–40.
224. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. (2008): The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, **320**:1344–1349.
225. Nanas I, Chouzouris T, Dadouli K, Dovolou E, Stamperna K, Barbagianni M, Valasi I, Tsiaras A, Amiridis, GS. (2020): A study on stress response and fertility parameters in phenotypically thermotolerant and thermosensitive dairy cows during summer heat stress. *Reproduction of Domestic Animals*, **55**:1774–1783.

226. Nanas I, Chouzouris TM, Dovolou E, Dadouli K, Stamperna K, Kateri I, Barbagianni M, Amiridis, GS. (2021a): Early embryo losses, progesterone and pregnancy associated glycoproteins levels during summer heat stress in dairy cows. *Journal of Thermal Biology*, **98**:102951.
227. Nanas I, Dovolou E, Psimadas D, Dadouli K, Chouzouris TM, Satra M, Georgoulis P, Amiridis GS. (2021b): Age, gestational and heat stress effects on ghrelin secretion in dairy cattle. *Theriogenology*, **176**:82-93.
228. Nardone A, Ronchi B, Lacetera N, Ranieri MS, Bernabucci U. (2010): Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*, **130**:57–69.
229. Neuer A, Mele C, Liu HC, Rosenwaks Z, Witkin SS. (1998): Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Human Reproduction*, **13**:987–990.
230. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Fortere A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. (2013): Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo–endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE*, **8**:e58502.
231. Nguyen TLT, Hermansen JE, Mogensen L. (2010): Environmental consequences of different beef production systems in the EU. *Journal of Cleaner Production*, **18**:756–766.
232. Ni Y, Wu F, Chen Q, Cai J, Hu J, Shen J, Zhang J. (2020): Long noncoding RNA and mRNA profiling of hypothalamic-pituitary-mammary gland axis in lactating sows under heat stress. *Genomics*, **112**:3668–3676.
233. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. (1999): DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, **99**:247–257.
234. Olson GE, Winfrey VP, Matrisian PE, Melner MH, Hoffman LH. (1997): Specific expression of haptoglobin mRNA in implantation-stage rabbit uterine epithelium. *Journal of Endocrinology*, **152**:69–80.
235. Omtvedt IT, Nelson RE, Edwards RL, Stephens DF, Turman EJ. (1971): Influence of heat stress during early, mid and late pregnancy of gilts. *Journal of Animal Science*, **32**:312–317.
236. O'Neill LA. (2006): How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*, **18**:3-9.
237. Ortega MS, Rocha-Frigoni NAS, Mingoti GZ, Roth Z, Hansen PJ. (2016): Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L. *Journal of Dairy Science*, **99**:9152–9164.
238. Ota Y, Shimoya K, Zhang Q, Moriyama A, Chin R, Tenma K, Kimura T, Koyama M, Azuma C, Murata Y. (2002): The expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the fallopian

tube: SLPI protects the acrosome reaction of sperm from inhibitory effects of elastase. *Human Reproduction*, **17**:2517-2522.

239. Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. (2002): Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction*, **124**:683-689.
240. Ozawa M, Tabayashi D, Latief TA, Shimizu T, Oshima I, Kanai Y. (2005): Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, **129**:621-630.
241. Pachauri RK, Reisinger A. (2007): Climate Change 2007: Synthesis Report. *Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK*.
242. Pallepati P, Averill-Bates DA. (2010): Mild thermotolerance induced at 40°C increases anti-oxidants and protect HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: role of p53. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **495**:97-111.
243. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. (2017): Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, **14**:417-419.
244. Paula-Lopes FF, Hansen PJ. (2002): Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*, **66**:1169-1177.
245. Paula-Lopes FF, Chase CC, Al-Katanani YM, Krininger CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. (2003): Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: Differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, **125**:285-294.
246. Paula-Lopes FF, Milazzotto M, Assumpcao MEOA, Visintin JA. (2008): Heat shock-induced damage in bovine oocytes. *Reproduction Fertility and Development*, **43**:208.
247. Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpcao MEOA, Visintin JA. (2012): Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction*, **9**:395-403.
248. Pavlok A, Kopečný V, Lucas-Hahn A, Niemann H. (1993): Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, **35**:233-243.
249. Payton RR, Romar R, Co, P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL. (2004): Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biology of Reproduction*, **71**:1303-812.

250. Payton RR, Rispoli LA, Nagle KG, Gondro C, Saxton AM, Voy BH, Edwards JL. (2018): Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *Journal of Reproduction and Development*, **64**:243-251.
251. Pelham HRB. (1986): Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, **46**:959–961.
252. Pereira AMF, Baccari F, Titto EAL, Almeida JAA. (2008): Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *International Journal of Biometeorology*, **52**:199–208.
253. Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Acuña OS, Avilés M, Coy P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A. (2018): The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biology of Reproduction*, **98**:262-276.
254. Pernice M, Dunn SR, Miard T, Dufour S, Dove S, Hoegh-Guldberg O. (2011): Regulation of apoptotic mediators reveals dynamic responses to thermal stress in the reef building coral *Acropora Millepora*. *PLoS ONE*, **6**:e16095.
255. Piehl LL, Fischman ML, Hellman U, Cisale H, Miranda PV. (2013): Boar seminal plasma exosomes: Effect on sperm function and protein identification by sequencing. *Theriogenology*, **79**:1071–1082.
256. Pincus G, Enzmann EV. (1935): THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO: I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. *The Journal of Experimental Medicine*, **62**:665-75.
257. Place RF, Noonan EJ. (2014): Non-coding RNAs turn up the heat: An emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, **19**:159–172.
258. Pohler KG, Green JA, Geary TW, Peres RFG, Pereira MHC, Vasconcelos JLM, Smith MF. (2015): Predicting embryo presence and viability. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, **216**:253–270.
259. Prates EG, Nunes JT, Pereira RM. (2014): A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators of Inflammation*, **2014**:692067.
260. Pratt WB, Welsh MJ. (1994): Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Seminars in Cell Biology*, **5**:83–93.
261. Putney DJ, Malayer JR, Gross TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M. (1988): Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biology of Reproduction*, **39**:717–728.

262. Qu P, Li Y, Deng T, Jia D, Qing S, Su J, Zhang Y, Wang Y. (2016): Effects of Insulin-like Growth Factor-1 on Development of Somatic Cell Cloned Bovine Embryos. *Cellular Reprogramming*, **18**:162-170.
263. Rajala- Schultz PJ, Gröhn YT. (1999): Culling of dairy cows. Part III. Effects of diseases, pregnancy status and milk yield on culling in Finnish Ayrshire cows. *Preventive Veterinary Medicine*, **41**:295–309.
264. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM. (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, **339**:62–66.
265. Rapała Ł, Starzyński RR, Trzeciak PZ, Dąbrowski S, Gajewska M, Jurka P, Smolarczyk R, Duszewska AM. (2018): Influence of elevated temperature on bovine oviduct epithelial cells (BOECs). *PLoS One*, **13**:e0198843.
266. Raposo G, Stoorvogel W. (2013): Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, **200**:373–383.
267. Rauw WM. (2012): Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics*, **3**:267.
268. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. (2010): The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, **40**:253–266.
269. Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN, Edwards JL. (2013): Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction*, **146**:193–207.
270. Ritossa F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, **18**:571–573.
271. Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. (2003): Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biology of Reproduction*, **69**:2068–2077.
272. Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. (2004): Reorganization of microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryos. *Biology of Reproduction*, **70**:1852–1862.
273. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. (2010): edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**:139–140.
274. Ronchi B, Stradaoli G, Verini Supplizi A, Bernabuci U, Lacetera N, Accorsi PA, Nardone A, Seren E. (2001): Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17beta, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livestock Production Science*, **68**:231–241.

275. Rosenberg M, Herz Z, Davidson M, Folman J. (1977): Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conceptions in primiparous and multiparous dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, **51**:363–367.
276. Rossi A, Coccia M, Trotta E, Angelini M, Santoro MG. (2012): Regulation of cyclooxygenase-2 expression by heat: A novel aspect of heat shock factor 1 function in human cells. *PLoS ONE*, **7**:e31304.
277. Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. (2000): Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, **120**:83–90.
278. Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D. (2001a): Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, **121**:745–751.
279. Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. (2001b): Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, **122**:737–744.
280. Roth Z, Bor A, Braw-Tal R, Wolfenson D. (2004): Carry-over effect of summer thermal stress on characteristics of the preovulatory follicle of lactating cows. *Journal of Thermal Biology*, **29**:681–685.
281. Roth Z, Hansen PJ. (2004): Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, **71**:1898–1906.
282. Roth Z, Hansen PJ. (2005): Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, **129**:235–44.
283. Roth Z. (2017): Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annual Review of Animal Biosciences*, **5**:151–170.
284. Rottmayer R, Ulbrich SE, Kölle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer H, Wolf E, Hiendleder S. (2006): A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo–maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, **132**:637–648.
285. Russell DL, Robker RL. (2007): Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, **13**:289–312.

286. Rutledge JJ. (2001): Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, **55**:105–111.
287. Ryan DP, Boland MP. (1991): Frequency of twin births among Holstein-Friesian cows in a warm dry climate. *Theriogenology*, **36**:1–10.
288. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. (2006): Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, **131**:895–904.
289. Sakatani M, Yamanaka K, Kobayashi S, Takahashi M. (2008): Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, **54**:496–501.
290. Sakatani M, Alvarez NV, Takahashi M, Hansen PJ. (2012): Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *Journal of Dairy Science*, **95**:3080–3091.
291. Sakatani M, Bonilla L, Dobbs KB, Block J, Ozawa M, Shanker S, Yao JQ, Hansen PJ. (2013): Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: Relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **11**:3.
292. Sakatani M. (2017): Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction Development*, **63**:347–352.
293. Salhab M, Dhome-Pollet S, Auclair S, Guyader-Joly C, Brisard D, Dalbies-Tran R, Dupont J, Ponsart C, Mermillod P, Uzbekova S. (2013): In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development*, **80**:166–182.
294. Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. (2014): Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Molecular Endocrinology*, **28**:1502–1521.
295. Santoro N, Johansson N, Thiele, DJ. (1998): Heat Shock Element Architecture Is an Important Determinant in the Temperature and Transactivation Domain Requirements for Heat Shock Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology*, **18**:6340–6352.
296. Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. (1988): Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Reproduction*, **83**:663–671.
297. Scenna FN, Edwards JL, Rohrbach NR, Hockett ME, Saxton AM, Schrick FN. (2004): Detrimental effects of prostaglandin F_{2α} on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, **73**:215–226.

298. Schmid SL, Braell WA, Rothman JE. (1985): ATP catalyzes the sequestration of clathrin during enzymatic uncoating. *Journal of Biological Chemistry*, **260**:10057–10062.
299. Schmid SL, Rothman JE. (1985): Two classes of binding sites for uncoating protein in clathrin triskelions. *Journal of Biological Chemistry*, **260**:10050–10056.
300. Seytanoglu A, Georgiou AS, Sostaric E, Watson PF, Holt WV, Fazeli A. (2008): Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *Journal of Proteome Research*, **7**:2825–2833.
301. Shen PC, Lee JW, Cheng WTK, Su HY, Lee SN, Liu BT, Wang CH, Chen LR, Ju JC. (2010): Differential thermal sensitivity between the recipient ooplasm and the donor nucleus in Holstein and Taiwan native yellow cattle. *Theriogenology*, **74**:1587- 1595.
302. Sies H, Jones DP. (2020): Reactive oxygen species as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **21**:363-383.
303. Silanikove N. (1992): Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Livestock Production Science*, **30**:175–194.
304. Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, Eduardo HP, Loureiro B, Barros CM. (2013): Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, **79**:351-357.
305. Simons M, Raposo G. (2009): Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, **21**:575-581.
306. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. (2008): Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, **8**:4083–4099.
307. Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. (2015): Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-Biological Interactions*, **234**:261–273.
308. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, and First NL. (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, **40**:1257-1263.
309. Sirard MA. (2012): Factors Affecting Oocyte and Embryo Transcriptomes. *Reproduction in Domestic Animals*, **47**:148–155.
310. Sirois J, Fortune JE. (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, **39**:308-317.
311. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. (2014): Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia*, **30**:513–523.

312. Smits K, De Coninck DI, Van Nieuwerburgh F, Govaere J, Van Poucke M, Peelman L, Deforce D, Van Soom A. (2016): The equine embryo influences immune related gene expression in the oviduct. *Biology of Reproduction*, **94**:36.
313. Smits K, Nelis H, Van Steendam K, Govaere J, Roels K, Ververs C, Leemans B, Wydooghe E, Deforce D, Van Soom A. (2017): Proteome of equine oviducal fluid: effects of ovulation and pregnancy. *Reproduction Fertility and Development*, **29**:1085.
314. Somal A, Aggarwal A, Upadhyay RC. (2015): Effect of thermal stress on expression profile of apoptosis related genes in peripheral blood mononuclear cells of transition Sahiwal cow. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **16**:137–143.
315. Soneson C, Love MI, Robinson MD. (2015): Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, **4**:1521.
316. Sorger PK. (1991): Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, **65**:363–366.
317. Soto P, Smith LC. (2009): BH4 peptide derived from BclxL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **76**:637-646.
318. Sottile ML, Nadin SB. (2018): Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress Chaperones*, **23**:303-315.
319. Spiering R, van der Zee R, Wagenaar J, van Eden W, Broere F. (2012): Mycobacterial and mouse Hsp70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells. *Cell Stress Chaperones*, **18**:439–446.
320. Spurlock ME. (1997): Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *Journal of Animal Science*, **75**:1773-1783.
321. Srikanth K, Kwon A, Lee E, Chung H. (2017): Characterization of genes and pathways that respond to heat stress in Holstein calves through transcriptome analysis. *Cell Stress and Chaperones*, **22**:29–42.
322. Srivastava P. (2002): Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, **2**:185–194.
323. Stamperna K, Giannoulis T, Nanas I, Kalemkeridou M, Dadouli K, Moutou K, Amiridis GS, Dovolou E. (2020): Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, cumulus cells and blastocysts in cattle. *Theriogenology*, **156**:36-45.
324. Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. (2021): Developmental competence of heat stressed oocytes from Holstein and Limousine cows matured in vitro. *Reproduction of Domestic Animals*, **00**:1-13.

325. Stanke D, Sikes J, DeYoung D, Tumbleson M. (1974): Proteins and amino acids in bovine oviductal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, **38**:493–496.
326. Steeves TE, Gardner DK. (1999): Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development*, **54**:92–101.
327. St-Pierre N, Cobanov B, Schnitkey G. (2003): Economic losses from heat stress by US Livestock Industries. *Journal of Dairy Science*, **86**:52–77.
328. Summer A, Lora I, Formaggioni P, Gottardo F. (2019): Impact of heat stress on milk and meat production. *Animal Frontiers*, **9**:39–46.
329. Sun QY, Schatten H. (2006): Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, **131**:193–205.
330. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. (2010): The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, **139**:685–695.
331. Talukder AK, Rashid MB, Yousef MS, Kusama K, Shimizu T, Shimada M, Suarez SS, Imakawa K, Miyamoto A. (2018): Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Scientific Reports*, **8**:7850.
332. Tarazona S, García F, Ferrer A, Dopazo J, Conesa A. (2012): NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBNet.journal*, **17**:18-19.
333. Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Di Pietro A, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. (2015): Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Research*, **43**:140.
334. Tatemoto H, Terada T. (1995): Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, **43**:1107-1113.
335. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. (2000): Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, **63**:805-810.
336. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. (1990): Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, **26**:90–100.
337. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, *et al.* (2018): Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, **7**:1535750.

338. Thompson JA, Magee DD, Tomaszewski MA, Wilks DL, Fourdraine RH. (1996): Management of summer infertility in Texas Holstein dairy cattle. *Theriogenology*, **46**:547-558.
339. Thornton PK, Van de Steeg J, Notenbaert A, Herrero M. (2009): The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. *Agricultural Systems*, **101**:113–127.
340. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. (1974): Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, **84**:389–398.
341. Trout JP, McDowell LR, Hansen PJ. (1998): Characteristics of the oestrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to stress. *Journal of Dairy Science*, **81**:1244–1250.
342. Tsuchida S, Yamada T. (2014): Glutathione Transferases. *Reference Module in Biomedical Science*.
343. Turi Z, Hocsak E, Racz B, Szabo A, Balogh A, Sumegi B, Gallyas FJ. (2015): Role of mitochondrial network stabilisation by a human small heat shock protein in tumour malignancy. *Journal of Cancer*, **6**:470–476.
344. Turner LW, Chastain JP, Hernken RW, Gates RS, Crist WL. (1992): Reducing heat stress in dairy cows through sprinkler and fan cooling. *Applied Engineering in Agriculture*, **8**:251–256.
345. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts P, Leunissen JAM. (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, **35**:71–74.
346. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**:RESEARCH0034.
347. Van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, Bols PEJ, Leroy JLMR. (2011): Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS One*, **6**:e23183.
348. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. (2018): Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **19**:213–228.
349. Vaught LW, Monty DW, Foote WC. (1977): Effect of summer heat stress on serum LH and progesterone values in Holstein-Frisian cows in Arizona. *American Journal of Veterinary Research*, **38**:1027–1032.
350. Velazquez MM, Alfaro NS, Dupuy CRF, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. (2010): Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science*, **118**:201–209.

351. Veziroglu EM, Mias GI. (2020): Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Frontiers in Genetics*, **11**.
352. Vigneron C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Prigent C, Mermillod P. (2004): Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, **69**:466-474.
353. Wallace EWJ, Kear-Scott JL, Pilipenko EV, Schwartz MH, Laskowski PR, Rojek AE, Katanski CD, Riback JA, Dion MF, Franks AM, Airoidi EM, Pan T, Budnik BA, Drummond DA. (2015): Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress. *Cell*, **162**:1286–1298.
354. Wang JZ, Sui HS, Miao DQ, Liu N, Zhou P, Ge L, Tan JH. (2009): Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, **137**:181-189.
355. Wang HY, Fu JCM, Lee YC, Lu PJ. (2013): Hyperthermia Stress Activates Heat Shock Protein Expression via Propyl Isomerase 1 Regulation with Heat Shock Factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, **33**:4889–4899.
356. Wang Y, Yang C, Elsheikh NAH, Li C, Yang F, Wang G, Li L. (2019): HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging (Albany NY)*, **11**:5535-5547.
357. Wang X, Wang H, Zhang R, Li D, Gao MQ. (2020): LRRC75A antisense lncRNA1 knockout attenuates inflammatory responses of bovine mammary epithelial cells. *International Journal of Biological Sciences*, **16**:251–263.
358. Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. (2007): Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, **68**:232–241.
359. Webb R, Gong JG, Law AS, Rusbridge SM. (1992): Control of ovarian function in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, **45**:141-156.
360. Wegele H, Müller L, Buchner J. (2004): Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **151**:1–44.
361. Weisiger RA, Fridovich I. (1973): Superoxide dismutase. Organelle specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **248**:3582–3592.
362. Welch WJ. (1992): Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, **72**:1063–1081.
363. Wijayagunawardane M, Miyamoto A, Taquahashi Y, Gabler C, Acosta T, Nishimura M, Killian G, Sato K. (2001): In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct:

- stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *Journal of Endocrinology*, **168**:117–130.
364. Wijayagunawardane MP, Kodithuwakku SP, Yamamoto D, Miyamoto A. (2005): Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: a possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. *Molecular Reproduction and Development*, **72**:511– 520.
 365. Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F. (1988): Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *Journal of Dairy Science*, **71**:2480–2485.
 366. Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S, Kölle S, Prelle K, Reichenbach HD, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F. (2003): Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction of Domestic Animals*, **38**:276–289.
 367. Wolfenson D, Flamenbaum I, Berman A. (1988): Hyperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **71**:3497–3504.
 368. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A. (1995): Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, **52**:1106–1113.
 369. Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. (1997): Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction Science*, **47**:9-19.
 370. Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. (2000): Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, **60–61**:535–547.
 371. Wolfenson D, Sonogo H, Bloch A, Shaham-Albalancy A, Kaim M, Folman Y, Meidan R. (2002): Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, **22**:81–90.
 372. Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. (2004): Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, **62**:1042–1055.
 373. Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroun RI. (1994): Structure and regulation of heat shock transcription factor. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (editors). *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY:395–416.
 374. Xu K.Y. (2005): Activation of (Na⁺/K⁺)-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**:1669–1677.

375. Yadav A, Singh KP, Singh MK, Saini N, Palta P, Manik RS, Singla SK, Upadhyay RC, Chauhan MS. (2013): Effect of physiologically relevant heat shock on development, apoptosis and expression of some genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced in vitro. *Reproduction of Domestic Animals*, **48**:858–865.
376. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J et al. (2015): Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, **4**:27066.
377. Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins K. (2000): Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, **260**:268–278.
378. Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. (2013): Posttranscriptional Gene Regulation by Long Noncoding RNA. *Journal of Molecular Biology*, **425**:3723-3730.
379. Younas M, Fuquay JW, Smith AE, Moore AB. (1993): Estrus and endocrine responses of lactating Holsteins to forced ventilation during summer. *Journal of Dairy Science*, **76**:430–434.
380. Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. (1989): Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, **23**:189-201.
381. Yousef MK. (1984): Stress physiology: definition and terminology. In: Yousef MK (Ed.) *Stress Physiology in Livestock*. Boca Raton, FL: CRC Press.
382. Yousef MS, Marey MA, Hambruch N, Hayakawa H, Shimizu T, Hussien HA, Abdel-Razek AK, Pfarrer C, Miyamoto A. (2016): Sperm Binding to Oviduct Epithelial Cells Enhances TGFβ1 and IL10 Expressions in Epithelial Cells as Well as Neutrophils In Vitro: Prostaglandin E2 As a Main Regulator of Anti-Inflammatory Response in the Bovine Oviduct. *PLoS One*, **11**:e0162309.
383. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CPK. (2015): Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, **65**:783–797.
384. Zhang B, Peñagaricano F, Driver A, Chen H, Khatib H. (2011): Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *Journal of Dairy Science*, **94**:4174–4182.
385. Zhou J, An H, Xu H, Liu S, Cao X. (2005): Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology*, **114**:522–530.
386. Zimbelman RB, Rhoads RP, Rhoads ML, Duff GC, Baumgard LH, and Collier RJ. (2009): A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. *IEICE Technical Report ASN Ambient Intelligence & Sensor Networks*, **113**:113-126.
387. Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, Prince T. (2015): Regulation and function of the

human HSP90AA1 gene. *Gene*, **570**:8–16.

388. Zuk M, Stoehr AM. (2002): Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, **160**:9-22.