

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής
εμβρύων βοοειδών με τη χρήση γουαϊαζουλενίου και
μελατονίνης**

ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ
Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Καρδίτσα 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής
εμβρύων βοοειδών με τη χρήση γουαϊαζουλενίου και
μελατονίνης**

ΙΩΑΝΝΗΣ Λ. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗΣ
Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων	Γ.Σ. Αμοιρίδης	Επ. Καθηγητής Π.Θ.
Μέλος	Ε. Ρέκκα	Αν. Καθηγήτρια Α.Π.Θ.
Μέλος	Γ. Φθενάκης	Αν. Καθηγητής Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Η. Κραμποβίτης	Καθηγητής Π.Θ.
Η. Κυριαζάκης	Καθηγητής Π.Θ.
Κ. Μπόσκος	Καθηγητής Α.Π.Θ.
Ι. Μενεγάτος	Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.
Ε. Ρέκκα	Αν. Καθηγήτρια Α.Π.Θ.
Γ. Φθενάκης	Αν. Καθηγητής Π.Θ.
Γ.Σ. Αμοιρίδης	Επ. Καθηγητής Π.Θ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την παρασκευή των υποστρώματων που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων (IVP) καταβάλλεται προσπάθεια απομίμησης της σύνθεσης του αντίστοιχου *in vivo* περιβάλλοντος, δηλαδή του υγρού του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου (Υ.Π.Ω.) ή /και του υγρού του αγωγού περί τον οίστρο (Υ.Ω.). Η IVP επηρεάζεται αρνητικά από το οξειδωτικό στρες. Στην εργασία αυτή, αφού προσομοιώθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα (A.I.) του Υ.Π.Ω και του Υ.Ω. στα αντίστοιχα υποστρώματα της IVP με τη χρήση αντιοξειδωτικών, εξετάστηκε η επίδραση της προσομοίωσης αυτής στις αποδόσεις της IVP. Ως αντιοξειδωτικά επιλέχθηκαν το γουαϊαζουλένιο και η μελατονίνη. Το γουαϊαζουλένιο είναι λιπόφιλο προϊόν εκχύλισης ειδών χαμομηλιού, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η μελατονίνη είναι ενδογενής ουσία των οργανισμών, με ορμονική κυρίως δράση, στην οποία πρόσφατα αποδόθηκαν και αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επειδή η μελατονίνη εκκρίνεται *in vivo* με κερκάρδιο ρυθμό, επιχειρήθηκε επιπλέον η προσομοίωση αυτού στις *in vitro* συνθήκες.

Για τους σκοπούς της έρευνας, συλλέχθηκαν δείγματα Υ.Π.Ω. και Υ.Ω. από 10 αγελάδες φυλής Holstein σε οίστρο. Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα από τα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP, δηλαδή της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων (IVM), της *in vitro* γονιμοποίησης (IVF) και της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων (IVC). Προκειμένου να επιλεγθούν τα κατάλληλα τροποποιημένα υποστρώματα που να έχουν A.I. ανάλογη των αντίστοιχών τους βιολογικών υγρών, διαδοχικές αραιώσεις των προαναφερόμενων αντιοξειδωτικών προστέθηκαν στα υποστρώματα της IVP. Η A.I. των δειγμάτων προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά τους να αναστείλουν την προκαλούμενη λιπιδική υπεροξείδωση (Λ.Υ.) σε μικροσωματικές μεμβράνες ήπατος επιμύων. Η Λ.Υ. υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά με τον προσδιορισμό του αντιδρώντος με 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ προϊόντος.

Ακολούθησε η συλλογή συνολικά 18.142 ωαρίων ύστερα από 30.922 αναρροφήσεις ωοθυλακίων διαμέτρου 2-8 mm, που προέρχονταν από 3.478 πτωματικές ωοθήκες αγελάδων. Από τα ωάρια αυτά επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα 8.655 για τους πειραματισμούς αυτής της μελέτης.

Σε ό,τι αφορά στο γουαϊαζουλένιο, πραγματοποιήθηκαν οι εξής πειραματισμοί:

1. IVM για 18 ώρες με προσθήκη γουαϊαζουλενίου. Ακολούθησε μονιμοποίηση και χρώση των ωαρίων με ορκεΐνη 2% και στη συνέχεια μικροσκοπική εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα τους συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα.
2. IVP με ή χωρίς την προσθήκη γουαϊαζουλενίου στα επιμέρους στάδια της σε συνδυασμούς που επιλέχθηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις τα στάδια της IVM και της IVF ήταν 18ωρης διάρκειας. Η εκτίμηση της εκάστοτε επίδρασης στη γονιμοποίηση ή και στην εξέλιξη των παραγόμενων εμβρύων γινόταν συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος της 48ωρης, κάθε φορά, IVC. Επειδή για την υποβοήθηση της διάλυσης του λιπόφιλου γουαϊαζουλενίου στα υδατικά υποστρώματα της IVP γινόταν χρήση DMSO, υπήρχε σε κάθε πειραματισμό και ενδιάμεσος μάρτυρας που περιείχε ισόποση δόση DMSO, απ' όπου προέκυψε, ότι το DMSO δεν παρεμβαίνει στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Σε ό,τι αφορά στη μελατονίνη, πραγματοποιήθηκαν οι εξής πειραματισμοί:

1. IVM για 18 και 24 ώρες με προσθήκη μελατονίνης. Ακολούθησε μονιμοποίηση

και χρώση των ωαρίων με ορκεΐνη 2% και στη συνέχεια μικροσκοπική εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα τους συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα.

2. IVP με προσθήκη μελατονίνης σε ένα, κάθε φορά, επιμέρους στάδιό της. Όπου δεν γινόταν προσθήκη μελατονίνης η επώαση πραγματοποιούνταν στο τυποποιημένο υπόστρωμα του αντίστοιχου σταδίου και για 24 ώρες στην IVM ή IVF. Η εκτίμηση της εκάστοτε επίδρασης στη γονιμοποίηση ή και στην εξέλιξη των παραγόμενων εμβρύων γινόταν συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος της 48ωρης, κάθε φορά, IVC.
3. Επιπλέον, για τη μελέτη της προσομοίωσης του *in vivo* κικκάδιου τρόπου δράσης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων *in vitro* και στην απόδοση της IVP πραγματοποιήθηκαν επώσεις των ωαρίων στο τροποποιημένο υπόστρωμα μετά από προσθήκη μελατονίνης είτε στο πρώτο τρίτο, είτε στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης ή/και της 24ωρης επώασης προκειμένου για την IVM ή την IVF. Η αντίστοιχη επίδραση της μελατονίνης στην IVC μελετήθηκε με παραμονή των εμβρύων σε τροποποιημένο υπόστρωμα είτε μόνο για το πρώτο τρίτο της πρώτης ημέρας, είτε μόνο για το τελευταίο τρίτο της δεύτερης ημέρας, είτε και για τα δύο χρονικά αυτά διαστήματα της 48ωρης καλλιέργειας. Σε κάθε περίπτωση, στο υπόλοιπο χρονικό διάστημα οι επώσεις διενεργούνταν με το τυποποιημένο υπόστρωμα του αντίστοιχου σταδίου.

Η στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδήγησε στις εξής διαπιστώσεις:

- 1) Το υγρό του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου καθώς και το υγρό περιβάλλον στο εσωτερικό του ωαγωγού λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία, στα βοοειδή, έχουν σημαντικά ισχυρότερη A.I. από τα αντίστοιχα κλασικά υποστρώματα της IVP.
- 2) Η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου, σε συγκεντρώσεις που προσομοιώνουν την A.I. των *in vivo* στις αντίστοιχες *in vitro* συνθήκες, στην 18ωρη IVM οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των ωαρίων, στα οποία ολοκληρώθηκε η ωρίμανση του πυρήνα. Επίσης, η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVM μόνο ή σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην 48ωρη IVC βελτίωσε τα ποσοστά γονιμοποίησης και τα ποσοστά ανάπτυξης (με περισσότερα από 4 κύτταρα) των εμβρύων. Η προσθήκη του στη 18ωρη IVF δεν είχε καμία επίδραση στην απόδοση της IVP, ενώ σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην IVM ή και την IVC οδήγησε σε αύξηση μόνο του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της μεμονωμένης προσθήκης του στην IVC.
- 3) Τα ποσοστά γονιμοποίησης ή/και τα ποσοστά ανεπτυγμένων εμβρύων που επιτεύχθηκαν μετά την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVM, μόνο στην IVC, ή και στις δύο, μετά από 18ωρης διάρκειας επώσεις στην IVM και στην IVF, ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του μάρτυρα των 24ωρων επώσεων στην IVM και στην IVF.
- 4) Η προσθήκη μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου της IVP, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις που προσομοιώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των *in vivo* συνθηκών, οδήγησε σε μείωση των αποδόσεων της IVP.
- 5) Η προσθήκη μελατονίνης στις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά με τρόπο που προσομοιάζει στον κικκάδιο ρυθμό έκκρισής της *in vivo*, οδήγησε α) σε σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης και ποσοστά ανεπτυγμένων εμβρύων, όταν προστέθηκε στο τελευταίο τρίτο της 24ωρης IVM και β) μόνο σε

μεγαλύτερο ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων, όταν προστέθηκε στο πρώτο τρίτο της ίδιας επώασης. Το ίδιο παρατηρήθηκε επίσης μετά από προσθήκη μελατονίνης μόνο στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM, καθώς επίσης και μόνο στις τελευταίες 8 ώρες της 48ωρης IVC.

Συμπερασματικά, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών γουαϊαζουλενίου και μελατονίνης σε συγκεκριμένες περιόδους επώασης, στα υποστρώματα της IVP σε συγκεντρώσεις που καθιστούν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ανάλογη με εκείνη των αντίστοιχων *in vivo* συνθηκών, θα μπορούσε να συνεισφέρει στις προσπάθειες βελτιστοποίησης των αποδόσεων της IVP βοοειδών. Οι παραπάνω ουσίες, όταν ασκούν τη δράση τους σε συγκεκριμένα διαστήματα στην IVP, οδηγούν σε αύξηση στα ποσοστά γονιμοποίησης και στα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων. Επιπλέον, στην περίπτωση του γουαϊαζουλενίου μειώνεται και ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη αυτών των ποσοστών. Ωστόσο, προκειμένου τα αντιοξειδωτικά αυτά να καταστούν συστατικά των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVP, απαιτούνται επιπλέον έρευνες σχετικά με την επίδρασή τους στην απόδοση και στη βιωσιμότητα των παραγόμενων βλαστικών κύστεων και κυρίως στο ποσοστό εξέλιξης της εγκυμοσύνης και των γεννήσεων υγιών μόσχων που μπορεί να επιτευχθεί μετά από μεταφορά τους σε ζώα-δέκτες.

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**Modification of the in vitro bovine embryo production
substrates using guaiazulene and melatonin**

IOANNIS L. DIMITRIADIS
DVM

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF
PHILOSOPHY**

Karditsa, Greece 2006

ABSTRACT

Synthesis of the substrates for bovine *in vitro* embryo production (IVP), mimics the *in vivo* composition of fluids where oocytes mature (follicular fluid, FF), are fertilized and early embryonic development occurs (FF and oviductal fluid, OF). Given that oxidative stress adversely affects the IVP outcome, in this study we assessed the antioxidant capacity (AC) of the bovine FF and OF as well as that of the IVP substrates. This was accomplished by assaying the total protection against lipid peroxidation (TPaLP). We adjusted the *in vitro* to the *in vivo* conditions by using certain antioxidants and evaluated the effect of this adjustment on the IVP efficiency. As antioxidants guaiazulene and melatonin were selected. Guaiazulene is a nontoxic component of chamomile-oil, possessing high antioxidant activity. Melatonin is a hormone with antioxidant properties. The circadian manner of the *in vivo* melatonin secretion was taken into consideration for the experimental design.

FF and OF samples were collected from 10 Holstein cows in oestrus. Substrate samples from all the IVP phases, namely *in vitro* oocyte maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* embryo culture (IVC) as well as samples coming from serially diluted samples of the antioxidants in IVP substrates were also used in order to choose the properly modified substrates, that provide (TPaLP) similar to that of their biological reference. We assessed AC according to the sample ability to inhibit rat hepatic microsomal membrane lipid peroxidation (TPaLP). TPaLP was assayed spectrophotometrically, by the determination of the 2-Thiobarbituric acid reactive material.

From 3,478 bovine ovaries, 18,142 oocytes were collected after aspirating 30,922 follicles having diameter between 2 to 8 mm. After quality assessment, 8,655 oocytes were selected and used for our experiments.

Regarding the investigation of guaiazulene effect the following experimental design was used:

1. Microscopical evaluation of nuclear maturation of fixed and stained (2% orcein) oocytes after 18h IVM in the presence of guaiazulene compared with the respective control. Because guaiazulene was dissolved in DMSO, a second control containing the same amount of DMSO was used.
2. Stereomicroscopical evaluation of cleavage and/or early embryo development (>4-cell embryos) after IVP (18h IVM, 18h IVF and 48h IVC) in the presence of guaiazulene during each one of the IVP phases or any possible combination of IVP phases compared with the respective and a second control. Under the above experimental conditions, DMSO did not interfere in the interpretation of our results.

Regarding the investigation of melatonin effect the following experimental design was used:

1. Microscopical evaluation of nuclear maturation of fixed and stained (2% orcein) oocytes after 18h and 24h IVM in the presence of melatonin compared with the respective control.
2. Stereomicroscopical evaluation of cleavage and/or early embryo development

after 48h IVC following the presence of melatonin during each one of the IVP phases (18h either 24h IVM, or 18h IVF, or 48h IVC) compared with the respective control. Whenever melatonin was not present in an IVP phase, a 24h IVM or IVF incubation was carried out in standard substrates.

3. In order to study the effect of a circadian-like addition of melatonin on IVP outcome, a series of experiments were designed. Melatonin-modified substrate was only added in the first or last third of incubation in 18h or 24h IVM and in 18h IVF, or in the first or last 8h of IVC. The remaining time of incubations was carried out in standard IVP substrates.

Our results are summarized as follows:

Bovine FF and OF around oestrus provide significantly higher TPALP than that of their respective IVP substrates.

When the AC of the IVM substrate was adjusted to that of the FF with the addition of guaiazulene, the proportion of oocytes with matured nuclei was increased in comparison with the controls. In addition, guaiazulene improved cleavage and embryo development rates when present during IVM and/or 48h IVC. When present during 18h IVF, guaiazulene exerted no effect. However, when guaiazulene was added in all phases of IVP, embryo development rate was increased in a way similar to that occurred after guaiazulene addition only to the IVC substrate.

Cleavage and embryo development rates in the presence of guaiazulene during IVM and/or IVC, after 18h IVM and IVF, were significantly higher than that of the control group after 24h IVM and IVF.

When melatonin was added into any of all the distinctive IVP phases the IVP efficiency was decreased. Melatonin increased cleavage and embryo development rates, when present only in the last 8h of 24h IVM. Melatonin improved embryo development when added to the IVM substrate only for the first 8 of 24h IVM, or for the last 6h of 18h IVM, or for the last 8h of 48 IVC.

In conclusion, guaiazulene and melatonin supplementation of the IVP substrates, at concentrations simulating AC of their biological reference, may contribute to the optimization of the bovine IVP efficiency. Melatonin should be present only during certain periods of incubations in order to exert beneficial effects on IVP outcome. Guaiazulene could also improve IVP effectiveness by reducing the time required for *in vitro* embryo development.

The possible effects of the antioxidants on blastocyst formation and mainly on the fate of the transferred *in vitro* produced embryos should be the physical continuation of the present research.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT.....	vii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	3
1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου.....	3
1.3. Αερόβιος μεταβολισμός και δραστικές μορφές οξυγόνου.....	4
1.3.1. Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	4
1.3.2. Άλλες φυσιολογικές διεργασίες που συνδέονται με την παραγωγή ROS <i>in vivo</i>	4
1.4. Δραστικές μορφές αζώτου και βιολογικές λειτουργίες	5
1.5. Έλεγχος της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου <i>in vivo</i>	6
1.6. <i>In vivo</i> κυτταρικές βλάβες που αποδίδονται στις ελεύθερες ρίζες	9
1.6.1. Λιπιδική υπεροξειδωση	10
1.6.2. Οξειδωση πρωτεϊνών	11
1.6.3. Οξειδωση των υδατανθράκων	12
1.6.4. Οξειδωση του DNA	12
1.7. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και αναπαραγωγή.....	12
1.7.1. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και σπερματοζώαρια	13
1.7.2. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και ανάπτυξη ωοθυλακίων.....	16
1.7.3. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και ωρίμανση του ωαρίου	17
1.7.4. Ελεύθερες ρίζες και ωοθυλακιορρηξία.....	20
1.7.5. •NO και στεροειδογένεση.....	20
1.7.6. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	21
1.7.7. Άλλες δράσεις του •NO στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού ζώου	23
1.7.8. Παραγωγή εμβρύων <i>in vitro</i> και οξειδωτικό στρες	24
1.8. Σκοπός της διατριβής.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1. Προσομοίωση της Α.Ι.	30
2.1.1. Υλικά.....	30
2.1.2. Συλλογή βιολογικών υγρών	30
2.1.3. Προετοιμασία δειγμάτων των υποστρωμάτων της IVP.....	30
2.1.4. Προετοιμασία ηπατικού μικροσωματικού κλάσματος	30
2.1.5. Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης <i>in vitro</i>	31
2.2. Παραγωγή εμβρύων <i>in vitro</i> (IVP)	31
2.2.1. Συλλογή ωοθηκών –ωαρίων	31
2.2.2. Ωρίμανση ωαρίων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> oocyte maturation, IVM)	32
2.2.3. Εκτίμηση της ωρίμανσης των ωαρίων με βάση την ωρίμανση του πυρήνα τους	33
2.2.4. Προετοιμασία του σπέρματος.....	33
2.2.5. Γονιμοποίηση των ωαρίων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> fertilization, IVF)	35
2.2.6. Εκτίμηση της γονιμοποίησης των ωαρίων και της εξέλιξης των ζυγωτών- εμβρύων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> embryo culture, IVC)	36
2.2.7. Παρασκευή υλικών και υποστρωμάτων	36
2.2.8. Αποστείρωση υλικών και υποστρωμάτων	43
2.3. Σχεδιασμός πειραματισμών	43

2.4. Στατιστική ανάλυση.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1. Αντιοξειδωτική Ικανότητα (A.I.).....	48
3.2. Παραγωγή εμβρύων <i>in vitro</i> (IVP)	50
3.2.1. Γουαϊαζουλένιο	50
3.2.2. Μελατονίνη	61
3.2.3. Επίδραση της διάρκειας επώασης των IVM και IVF στην IVP	76
3.2.4. Σύγκριση της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην IVP με το μάρτυρα επώασης διάρκειας 24 ωρών στην IVM και στην IVF.....	76
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα βιολογικών υγρών και υποστρωμάτων της IVP.....	79
4.2. Παραγωγή εμβρύων <i>in vitro</i> (IVP)	80
4.2.1. Γουαϊαζουλένιο	82
4.2.2. Μελατονίνη	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	124

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι δυνατότητες που παρέχει η *in vitro* παραγωγή εμβρύων στον τομέα της γενετικής βελτίωσης των μηρυκαστικών, και ιδιαίτερα των βοοειδών, σε συνδυασμό με το αναμενόμενο οικονομικό όφελος αποτέλεσαν τους καθοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη της σχετικής μεθοδολογίας με ταχύτερους ρυθμούς σε σύγκριση με άλλα είδη κατοικιδίων θηλαστικών. Ωστόσο, παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί στις εφαρμοζόμενες τεχνικές, η *in vitro* παραγωγή εμβρύων βοοειδών εξακολουθεί να έχει χαμηλά ποσοστά επιτυχίας σε σχέση με την αντίστοιχη της αναπαραγωγική διαδικασία *in vivo*, εξαιτίας αθροιστικών απωλειών στα επιμέρους στάδιά της. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία πιθανή αιτία εμφάνισης των απωλειών αυτών. Στην εργασία αυτή, λοιπόν, αφού επιχειρείται η προσομοίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των *in vivo* στις αντίστοιχες *in vitro* συνθήκες με τη χρήση των αντιοξειδωτικών γουαϊαζουλενίου και μελατονίνης, διερευνάται η επίδραση της προσομοίωσης αυτής στις αποδόσεις της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών.

Η πραγματοποίηση της διατριβής αυτής αποτέλεσε προϊόν συνεργασίας της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης και το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΑΠΘ, στο πλαίσιο του Προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 (Κωδικός έργου 01ΕΔ8.3/1803).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ.Σ. Αμοιρίδη για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής, καθώς και την πρόθυμη και ουσιαστική καθοδήγηση και συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια του εγχειρήματος.

Τον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής, Διευθυντή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής κ. Γ. Φθενάκη ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη και τη συμβολή του στην εκπόνηση της διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ κ. Ε. Ρέκκα, για την πρόθυμη μετάδοση των επιστημονικών γνώσεών της, για τη συμβολή της στην εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών και την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των αντίστοιχων πειραματισμών.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τη Διευθύντρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Σ. Μπελιμπασάκη, που κατέστησε δυνατή την εκπόνηση μεγάλου μέρους της διατριβής στο Ινστιτούτο.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον τακτικό ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Ε. Βαϊνά για την ουσιαστική και πολύπλευρη υποστήριξή του καθώς και τις πολύτιμες υποδείξεις του σε όλες τις φάσεις αυτής της προσπάθειας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον αναπληρωτή ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Κ. Ρέκκα για την καταλυτική συμβολή του στο σχεδιασμό αυτής της μελέτης, την καίρια καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησής της.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά την εντεταλμένη ερευνήτρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Φ. Σαμαρτζή για την ιδιαίτερα σημαντική

συμβολή της στην εκμάθηση εργαστηριακών τεχνικών, καθώς και για την πάντα πρόθυμη και πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε επίπεδο υλοποίησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ το υποψήφιο διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, συνάδελφο και φίλο κ. Θ. Παπανικολάου για την αγαστή συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθειά του ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραματισμών.

Θα ήταν παράλειψή μου εάν δεν ευχαριστούσα ιδιαίτερα την τεχνολόγο ζωικής παραγωγής κ. Α. Κορωνάκη για την επίδειξη εργαστηριακών τεχνικών και την ουσιαστική συμβολή της στην εξοικείωσή μου με τον τρόπο λειτουργίας του εργαστηρίου.

Θεωρώ, ακόμη, υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, καθώς και την εταιρεία ΦΑΓΕ, χωρίς την οικονομική υποστήριξη των οποίων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες αλλά και ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω προς όλους εκείνους, που με στήριξαν τόσο υλικά, όσο, κυρίως ηθικά, όλο το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι σύγχρονες παρεμβάσεις στην αναπαραγωγή των βοοειδών έχουν ως κύριο στόχο την επιτάχυνση του ρυθμού της γενετικής βελτίωσης. Η *post mortem* ή *in vivo* συλλογή ωαρίων από ωοθήκες ζώων, η *in vitro* ωρίμανση, η γονιμοποίησή τους, καθώς και η καλλιέργεια των παραγόμενων εμβρύων μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης αποτελούν βασικά πεδία αυτών των παρεμβάσεων.

Η απόδοση της διαδικασίας της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (*in vitro* embryo production, IVP) παραμένει μέχρι σήμερα αρκετά χαμηλή. Εκτιμάται ότι 15 έως 20% των καλλιεργούμενων ωαρίων ή 25 έως 30% των γονιμοποιημένων ωαρίων εξελίσσονται σε μορίδια ή βλαστικές κύστεις (Hendriksen και συν. 2000, Yuan και συν. 2003, Kniijn και συν. 2003). Τα υπόλοιπα εκφυλίζονται και υφίστανται κυτταρικό θάνατο σε κάποιο στάδιο της IVP (Betteridge 1988, Van Soom και συν. 2002, Merton και συν. 2003).

Σε ολόένα και περισσότερα πειραματικά ευρήματα (Tatemoto και συν. 2000, Kitagawa και συν. 2004) συσχετίζεται ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται κατά την διαδικασία της παραγωγή εμβρύων *in vitro* με εκείνον άλλων κυττάρων του οργανισμού, που προκαλείται από την επίδραση του οξειδωτικού στρες, όπως για παράδειγμα τα ηπατικά (Kyle και συν. 1988), νευρικά (Clapp- Lilly και συν. 2002, Figueroa και συν. 2005) και κύτταρα του νεφρού (Bhat και συν. 1999). Το οξειδωτικό στρες απορρέει από διαταραχές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία των βιολογικών συστημάτων και συνδέεται άρρηκτα με την κατανάλωση οξυγόνου από αυτά.

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ο D. Gilbert πρότεινε ήδη από το 1954 τη θεωρία των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, προκειμένου να ερμηνεύσει την τοξικότητα του οξυγόνου, που παρατηρείται κάτω από ορισμένες συνθήκες (Gilbert 1981). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, ενώ σε ένα κανονικό ομοιοπολικό δεσμό τα δύο ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε ένα μοριακό τροχιακό είναι συζευγμένα και έχουν αντιπαράλληλο σπιν ($\uparrow\downarrow$), στις ελεύθερες ρίζες (που μπορεί να είναι άτομα, μόρια ή ιόντα), ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια με παράλληλο σπιν ($\uparrow\uparrow$) σε ένα ή περισσότερα ατομικά ή μοριακά τροχιακά είναι ασύζευκτο(α). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο προσδίδει συνήθως στις ελεύθερες ρίζες (P^{*}) μεγάλη χημική δραστηριότητα (Korpenol 1994).

Στα βιολογικά συστήματα, η παραγωγή ελευθέρων ριζών γίνεται συνήθως με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, δηλαδή με την προσθήκη ή αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από ένα χημικό είδος, που μπορεί να είναι μόριο, ιόν, ρίζα, άτομο (αναγωγή ή οξείδωση, αντίστοιχα) (Chaudiere 1994).

1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αλλά και γενικότερα οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνει, εκτός από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, και τις ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και τις οργανικές ρίζες και τα υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις που αντέδρασαν με ρίζες οξυγόνου (Halliwell και Gutteridge

1989). Η ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η υδροξυλική ρίζα (HO^{\cdot}) αποτελούν τις σημαντικότερες ROS. Επισημαίνεται ότι στις δραστικές μορφές οξυγόνου δεν περιλαμβάνονται μόνον ελεύθερες ρίζες (π.χ. το H_2O_2).

Ορισμένες ενώσεις του αζώτου, όπως το $^{\cdot}NO$ και το $^{\cdot}NO_2$, είναι ελεύθερες ρίζες. Αυτές και ορισμένα παράγωγά τους, όπως τα νιτρώδη (NO_2^{\cdot}) και τα νιτρικά (NO_3^{\cdot}) ανιόντα, αποτελούν δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Rice-Evans 1994) που ασκούν σημαντική δράση σε αρκετές βιολογικές λειτουργίες.

1.3. Αερόβιος μεταβολισμός και δραστικές μορφές οξυγόνου

Το $O_2^{\cdot-}$ αλλά και άλλες ROS αποτελούν προϊόντα κατάλυσης των οξειδασών. Κύριο γνώρισμα των περισσότερων από 250 γνωστών μέχρι σήμερα οξειδασών είναι το γεγονός ότι περιέχουν ένα ή περισσότερα μεταβατικά μέταλλα (π.χ. $Fe^{++(+)}$) σε μία ή περισσότερες προσθετικές ομάδες (π.χ. αίμη), που τους επιτρέπουν να αποθηκεύουν ηλεκτρόνια και να τα μεταφέρουν στη συνέχεια στο οξυγόνο. Οι οξειδάσες αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο του αερόβιου μεταβολισμού, αφού εμπλέκονται σε πολλές βασικές λειτουργίες, *in vivo* (Chaudiere 1994).

1.3.1. Οξειδωτική φωσφορύλιωση

Εκτιμάται ότι από το συνολικό οξυγόνο που καταναλώνουν τα θηλαστικά, το 85-90% καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια. Από αυτό, περίπου 98% μεταβολίζεται από ένα μόνον ένζυμο, την οξειδάση του κυτοχρώματος, που μεταφέρει τέσσερα ηλεκτρόνια στο O_2 και παράγει δύο μόρια H_2O : $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$

Η οξειδάση του κυτοχρώματος είναι το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, όπου επιτελείται η διεργασία της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά τον καταβολισμό ενεργειακών μορίων (π.χ. υδατανθράκων). Η διεργασία αυτή καταλήγει στην παραπάνω αντίδραση (κυτταρική αναπνοή) και συνδέεται με τη δέσμευση ενέργειας με τη μορφή του ATP. Όταν όλα τα κέντρα του ενζύμου ανάγονται, μεταφέρονται τέσσερα ηλεκτρόνια στο O_2 . Παρόλα αυτά, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, 1-2% του O_2 είναι δυνατό να αναχθεί με ένα ή δύο ηλεκτρόνια, λόγω «διαφυγής» τους κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας και έτσι να σχηματισθεί το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), αντίστοιχα (Korpenol 1994).

1.3.2. Άλλες φυσιολογικές διεργασίες που συνδέονται με την παραγωγή ROS in vivo

Το $O_2^{\cdot-}$ και οι παραγόμενες από αυτό δραστικές μορφές οξυγόνου [H_2O_2 , υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)] χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα για την καταστροφή παθογόνων μικροβίων. Όταν αυτά ενεργοποιηθούν και φαγοκυτταρώσουν ξένα σωματίδια ή βακτηρίδια, τότε καταναλώνουν επιπλέον ποσότητες οξυγόνου («αναπνευστική έκρηξη»), με τη χρήση του οποίου η NADPH οξειδάση, που βρίσκεται κυρίως στα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και στα μακροφάγα κύτταρα, παράγει το $O_2^{\cdot-}$. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τόσο το $O_2^{\cdot-}$ όσο και οι άλλες ROS εκλύονται φυσιολογικά μόνο μέσα στα φαγοσώματα (Kobayashi και συν. 1998).

Οι ROS εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης διαφόρων ενζύμων, όπως για παράδειγμα της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων, που καταλύει την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων σε δεσοξυριβονουκλεοτίδια. Αυτή η αντίδραση της αναγωγής αποτελεί απαραίτητο στάδιο στη σύνθεση του DNA. Ακόμα, οι ROS συνδέονται με τη δράση των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, που επιτελούν αντιδράσεις οξειδωσης με σκοπό το μεταβολισμό είτε ξενοβιοτικών (π.χ. φαρμάκων), είτε ενδογενών ουσιών μετέχοντας έτσι και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες, όπως η ομοιόσταση της βιταμίνης D και η σύνθεση στεροειδών ορμονών (Rice-Evans 1994).

Επίσης, ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία παράγονται ως ενδιάμεσα προϊόντα κατά τη βιοσύνθεση των εικοσανοειδών (θρομβοξανία, προστακυκλίνες, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια) από το αραχιδονικό οξύ. Οι αντιδράσεις βιοσύνθεσης καταλύονται από τις συνθετάσες των προσταγλανδινών ή αλλιώς κυκλοοξυγονάσες 1 και 2 (για τη σύνθεση θρομβοξανίων, προστακυκλινών και προσταγλανδινών) και τις λιποοξυγονάσες (για τη σύνθεση των λευκοτριενίων). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εικοσανοειδή αποτελούν κεφαλαιώδους σημασίας ουσίες, με ευρύτατες φυσιολογικές επιδράσεις στους αερόβιους οργανισμούς. Η δράση τους εκδηλώνεται στο καρδιαγγειακό, αναπαραγωγικό και πεπτικό σύστημα, ενώ συμμετέχουν στη νεφρική λειτουργία, στη θερμορρύθμιση, στη φλεγμονή, στο μηχανισμό πρόκλησης πυρετού κ.α. (Σμοκοβίτης 1993).

Ακόμα, ROS παράγονται στον μεταβολισμό των πουρινών, κατά την αντίδραση μετατροπής της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ, η οποία καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου από αυτή την αντίδραση δεν έχει συσχετιστεί με κάποια φυσιολογική ή παθολογική λειτουργία. Έχει όμως διαπιστωθεί αυξημένη παραγωγή ROS σε ισχαιμικούς ιστούς μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος σε αυτούς (Σμοκοβίτης 1992).

Οι ROS παράγονται από όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων και εμπλέκονται στους μηχανισμούς πολλαπλασιασμού και ανάπτυξής τους. Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω της δυνατότητάς τους να ρυθμίζουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό στα κύτταρα. Οι κατάλληλες οξειδοαναγωγικές συνθήκες ελέγχουν τις ενδοκυτταρικές βιοχημικές διεργασίες αύξησης (Burdon 1994), ευνοώντας τη μετάδοση σημάτων από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο παρόμοιος της ινσουλίνης αυξητικός παράγοντας (Insulin-like Growth Factor, IGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) (Tse και συν. 1991). Σε υψηλότερες, αλλά πάντα ελεγχόμενες από τον οργανισμό συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές, ευνοώντας τη μετάδοση σημάτων από παράγοντες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), ή ενεργοποιώντας πρωτεΐνάσες, όπως οι κασπάσες, να πυροδοτήσουν τις διαδικασίες της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε γηρασμένα, πλεονάζοντα ή με λειτουργικές ανωμαλίες κύτταρα (McConkey και συν. 1989, Jacobson 1996).

1.4. Δραστικές μορφές αζώτου και βιολογικές λειτουργίες

Η σύνθεση του NO στα κύτταρα γίνεται με τη μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη, αντίδραση που καταλύεται από τις συνθετάσες του NO (nitric oxide synthases, NOS). Τρία ισοένζυμα της οικογένειας αυτής έχουν ταυτοποιηθεί. Τα δύο από αυτά, που η βιοσύνθεσή τους είναι συνεχής, χαρακτηρίζονται ως nNOS (neuronal NOS, επειδή εκφράζεται κυρίως στους νευρικούς ιστούς), και eNOS (endothelial NOS, επειδή

εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα). Το τρίτο, που βρίσκεται κυρίως στα μακροφάγα και η βιοσύνθεσή του είναι επαγωγίμη, χαρακτηρίζεται ως iNOS (inducible NOS). Αξίζει να αναφερθεί ότι η δραστηριότητα των δύο πρώτων ισοενζύμων εξαρτάται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}). Αυτό δεν συμβαίνει με το τρίτο ισοένζυμο, του οποίου η δραστηριότητα επάγεται από κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο TNF-α, ως αντίδραση σε κάποιο (κυρίως αντιγονικό) ερέθισμα (Moncada και συν. 1991).

Το $\cdot NO$ εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες ζωτικής σημασίας, όπως η χάλαση των λείων μυικών ινών, η συγκόλληση των αιμοπεταλίων, η νευροδιαβίβαση, η διακυτταρική επικοινωνία και ο κυτταρικός θάνατος από απόπτωση (Lane και συν. 1999). Επίσης, στην αντιμικροβιακή άμυνα του οργανισμού συμμετέχει και το $\cdot NO$ των μακροφάγων που, αντιδρώντας με το $O_2^{\cdot -}$, σχηματίζει το ανιόν του υπεροξυνιτρώδους ($ONOO^-$) (Moncada και συν. 1991).

Ο μηχανισμός δράσης του $\cdot NO$ βασίζεται στην ενεργοποίηση ή στην αδρανοποίηση ενζύμων είτε άμεσα με δέσμευσή του σε αυτά (νιτρωδυλίωση κάποιας –SH ομάδας μιας κυστεΐνης ή του μεταβατικού μετάλλου μιας προσθετικής ομάδας που ενδέχεται να περιέχουν) είτε έμμεσα (νιτρωδυλίωση της γουανυλικής κυκλάσης και μετατροπή της τριφωσφορικής γουανοσίνης (Guanosine Triphosphate, GTP) σε κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cyclic Guanosine Monophosphate, cGMP), το οποίο στη συνέχεια δρα σε ειδικούς στόχους) (Moncada και συν. 1991).

Έτσι για παράδειγμα και σε αντίθεση με ό,τι παρατηρείται στις ROS, η δράση των κασπασών της απόπτωσης, που είναι κυστεΐνοπρωτεϊνάσες αναστέλλεται, με ενδοκυτταρική νιτρωδυλίωση μιας κυστεΐνης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο τους (Sugino και συν. 1996). Ακόμα, το $\cdot NO$ που ελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συνδέεται με το σίδηρο της αίμης της γουανυλικής κυκλάσης, που έτσι ενεργοποιείται και καταλύει τη μετατροπή της GTP σε cGMP. Η cGMP δρώντας σε κατάλληλους υποδοχείς προκαλεί χάλαση των λείων μυικών ινών, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και ελάττωση της πίεσης του αίματος (Σμοκοβίτης 1992).

1.5. Έλεγχος της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου *in vivo*

Οι ελεύθερες ρίζες μετέχουν σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά η δράση τους *in vivo* είναι πάντα ελεγχόμενη, γιατί διαφορετικά μπορεί να δημιουργήσουν συνθήκες ασύμβατες με τη ζωή. Για το λόγο αυτό οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει «μηχανισμούς» ελέγχου της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών, που περιλαμβάνουν διάφορες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί κάθε ουσία, η οποία, όταν βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από μία άλλη ουσία που μπορεί να οξειδωθεί, αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση της τελευταίας (Halliwell και Gutteridge 1989). Καθένα από τα αντιοξειδωτικά μπορεί να δράσει με διάφορους τρόπους κατά την αναστολή μιας αλληλουχίας οξειδωτικών διεργασιών παραγωγής ελευθέρων ριζών. Στα αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται και τα ένζυμα που αποκαθιστούν βλάβες στα μακρομόρια που προκλήθηκαν από την επίδραση ελευθέρων ριζών σε αυτά (Sies 1993, Gutteridge 1995). Στον πίνακα 1 φαίνεται η ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους.

Σύμφωνα με τους Sies (1993) και Diplock (1994) η αντιοξειδωτική προστασία στο σύνολό της περιλαμβάνει τρία επίπεδα άμυνας. Το πρώτο επίπεδο άμυνας αντιπροσωπεύεται από τα προληπτικά αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά αυτά καταστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή εξουδετερώνουν καταλυτικά δραστικές μορφές οξυγόνου. Τα αντιοξειδωτικά στην περίπτωση αυτή είναι κυρίως ένζυμα, όπως οι καταλάσες, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου. Τα παραπάνω αντιοξειδωτικά ένζυμα απομακρύνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου χωρίς να καταναλώνονται στην αντίδραση. Στο ίδιο επίπεδο άμυνας συγκαταλέγονται και ορισμένες πρωτεΐνες (π.χ. τρανσφερρίνη, απτοσφαιρίνες, σερούλοπλασμίνη, αλβουμίνη κ.λπ.), που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με μεταβατικά μέταλλα (π.χ. σιδήρου και χαλκού), παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ελευθέρων ριζών που προάγεται από τα μέταλλα αυτά.

Το δεύτερο επίπεδο άμυνας αντιπροσωπεύεται από αντιοξειδωτικά, που, είτε εξουδετερώνουν τις πρωτογενείς (π.χ. HO^{*}) ελεύθερες ρίζες (free radical scavengers, FRS), που είναι ικανές να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων δημιουργίας δευτερογενών ελευθέρων ριζών (υπεροξειδικές, αλκοξειδικές), είτε σταματούν τη διάδοση των αλυσιδωτών αυτών αντιδράσεων (chain-breaking antioxidants, CBA) αδρανοποιώντας τις δευτερογενείς ελεύθερες ρίζες, είτε έχουν μεικτή δράση. Τα αντιοξειδωτικά αυτά, που έχουν μικρό μοριακό βάρος, καταναλώνονται προοδευτικά και έτσι η αντιοξειδωτική ικανότητά τους εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Από αυτά, άλλα μπορούν να συντεθούν από τους αερόβιους οργανισμούς και έχουν μεικτή δράση (π.χ. ουβικινόλη, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ), ενώ άλλα προσλαμβάνονται με τη διατροφή τους και έχουν τυπική δράση FRS (βιταμίνη C¹), ή CBA (βιταμίνη E). Στο ίδιο επίπεδο άμυνας ανήκει και η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο, που αποτελείται από γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Η δράση της αποδίδεται στην παρουσία της σουλφυδρυλικής ομάδας (-SH) της κυστεΐνης. Βρίσκεται μέσα σε όλα τα ζωικά κύτταρα και αποτελεί μία από τις κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες αυτών. Η GSH όχι μόνο εξουδετερώνει τις ROS, αλλά και συμμετέχει στη δραστηριότητα άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, ή οι γλουταθειονικές-S-τρανσφεράσες. Η σύνθεση της GSH καταλύεται είτε από τη συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης, είτε από τη συνθετάση της γλουταθειόνης.

Το τρίτο επίπεδο άμυνας περιλαμβάνει α) ενζυμικά συστήματα που επισκευάζουν το DNA μετά από προσβολή από ελεύθερες ρίζες, β) ένζυμα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών που υπέστησαν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και γ) ένζυμα [όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η φωσφολιπιδική υδροϋπεροξειδάση της γλουταθειόνης (PH-GPx)] που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων (Halliwell και Gutteridge 1990, Breimer και Samuelsson 1988, Marcillat και συν. 1988).

¹ Στα θηλαστικά, εκτός κυρίως από τα πρωτεύοντα, η βιταμίνη C μπορεί να συντίθεται και στο ήπαρ (Banhegyi και συν. 1997).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους (Gutteridge 1995).

<p>1. Προληπτικά αντιοξειδωτικά: καταστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Με διάσπαση του H_2O_2 ή/και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων ($ROOH$)<ul style="list-style-type: none">-Καταλάση, που διασπά το H_2O_2-Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), που διασπά το H_2O_2 και $ROOH$-Γλουταθειονική S-τρανσφεράση, που διασπά τα $ROOH$▪ Με δέσμευση των μεταβατικών μετάλλων σχηματίζοντας χηλικές ενώσεις<ul style="list-style-type: none">-Τρανσφερρίνη και λακτοφερρίνη, που δεσμεύουν το σίδηρο-Απτοσφαιρίνη, που δεσμεύει την αιμοσφαιρίνη-Αιμοπεξίνη, που δεσμεύει την αίμη-Σερουλοπλασμίνη και αλβουμίνη, που δεσμεύουν το χαλκό▪ Με εξουδετέρωση δραστηκών μορφών οξυγόνου<ul style="list-style-type: none">-Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), που εξουδετερώνει τη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου προς H_2O_2-Καροτινοειδή, που εξουδετερώνουν το οξυγόνο απλής κατάστασης
<p>2. Αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (free radical scavengers) ή/ και σταματούν τη διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων (chain-breaking antioxidants) που οι ρίζες αυτές μπορούν να προκαλέσουν</p> <ul style="list-style-type: none">-Υδροφιλα: βιταμίνη C, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, γλουταθειόνη (GSH), υποταυρίνη, κυστεαμίνη-Λιπόφιλα: βιταμίνη E, ουβικινόλη, καροτινοειδή, φλαβονοειδή
<p>3. Αντιοξειδωτικά επισκευής: Ένζυμα που επισκευάζουν βλάβες που προκλήθηκαν από ρίζες και επαναφέρουν τις μεμβράνες στην αρχική τους κατάσταση</p> <ul style="list-style-type: none">-Λιπάσες, GPx, $PH-GPx$, πρωτεϊνάσες, ένζυμα επισκευής του DNA, τρανσφεράσες

Επίσης, τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την κύρια εντόπισή τους μπορούν να διακριθούν σε ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά ή εκείνα που εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες (πίνακας 2).

Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλά από τα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, κάτω από ορισμένες συνθήκες (περίσσεια συγκέντρωσης ιόντων $Fe^{++(+)}$, έλλειψη βιταμίνης E), μπορούν να δράσουν προ-οξειδωτικά, να ευνοήσουν δηλαδή τις οξειδωτικές διεργασίες (Thomas και συν. 1992). Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία δύο ή περισσότερων αντιοξειδωτικών μπορεί να προσδώσει σε αυτά συνεργική δράση. Έτσι για παράδειγμα, με την παρουσία των βιταμινών C και E εκδηλώνεται συνεργική αντιοξειδωτική δράση, όπου η βιταμίνη C ανάγει τη ρίζα της α-τοκοφερόλης ανακυκλώνοντας τη βιταμίνη E (Packer και συν. 1989).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των κυριότερων αντιοξειδωτικών ανάλογα με την εντόπισή τους στους οργανισμούς (Gutteridge 1995).

Ενδοκυτταρικά	Κυτταρικές μεμβράνες	Εξοκυτταρικά
<i>SOD (δισμουτάση του $O_2^{\bullet-}$)</i> <i>Καταλάση</i> <i>Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης</i> <i>Κυτόχρωμα-αα3</i> <i>Γλουταθειόνη</i>	<i>α-Τοκοφερόλη (Βιτ. E)</i> <i>β-Καροτίνη</i> <i>Ουβικινόλη-10</i>	<i>SOD</i> <i>Τρανσφεράση</i> <i>Λακτοφερίνη</i> <i>Αλβουμίνη</i> <i>Σερουλοπλασμίνη</i> <i>Χολερυθρίνη</i> <i>Ουρικό οξύ</i> <i>Ασκορβικό οξύ (Βιτ. C)</i> <i>Ουβικινόλη ορού</i>

1.6. In vivo κυτταρικές βλάβες που αποδίδονται στις ελεύθερες ρίζες

Ποικίλες διαταραχές της κυτταρικής ομοιόστασης μπορούν να οδηγήσουν στην ενίσχυση της παραγωγής του $O_2^{\bullet-}$ και του H_2O_2 , καθώς και ριζών που σχετίζονται άμεσα με αυτά, όπως της HO^{\bullet} . Το H_2O_2 μετατρέπεται στην HO^{\bullet} παρουσία μεταβατικών μετάλλων και κυρίως του $Fe^{++(+)}$. Η μετατροπή αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton (Wardman και Candeias 1996). Επίσης, η HO^{\bullet} μπορεί να παραχθεί και από την αλληλεπίδραση του H_2O_2 με το $O_2^{\bullet-}$, αντίδραση που καταλύεται από μεταβατικά μέταλλα (αντίδραση Haber-Weiss) (Halliwell και Gutteridge 1989). Όλες αυτές οι (πρωτογενείς) δραστικές μορφές και κυρίως η HO^{\bullet} είναι δυνητικά κυτταροτοξικές. Είναι ικανές, δηλαδή, να αλληλεπιδράσουν με όλα σχεδόν τα μακρομόρια του κυττάρου και να προκαλέσουν σοβαρές και πολλές φορές μη αντιστρεπτές βλάβες σε αυτά (Halliwell 1992). Οι κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες αλλά και από όλες τις άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου που προκύπτουν από αυτές συχνά αναφέρονται με τον όρο οξειδωτικό στρες. Οξειδωτικό στρες είναι η κατάσταση, όπου η οξειδοαναγωγική ισορροπία κλίνει προς τις προ-οξειδωτικές συνθήκες, λόγω υπερπαραγωγής ROS ή/ και εξασθένισης της αντιοξειδωτικής προστασίας (Sies 1985). Σύμφωνα με τη Rice-Evans (1994) το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται τόσο σε εξωγενείς όσο και σε ενδογενείς αιτίες, που συνοπτικά εκτίθενται στον πίνακα 3.

Οι αντιδράσεις της HO^{\bullet} (που είναι και η πιο επιβλαβής από τις πρωτογενείς δραστικές μορφές) με άλλα μόρια μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κύριες κατηγορίες: αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου, προσθήκη ενός ηλεκτρονίου ή αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από οργανικές ενώσεις (Gutteridge 1991). Οι τρεις αυτές αντιδράσεις ακολουθούν τη βασική αρχή της χημείας των ελευθέρων ριζών, σύμφωνα με την οποία η αντίδραση μιας ρίζας με μια ουσία, που δεν είναι ρίζα, οδηγεί στο σχηματισμό μιας νέας ρίζας, η οποία μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο δραστική από τη μητρική της (Korpenol 1994). Τυπικό παράδειγμα αυτών των αντιδράσεων είναι η λιπιδική υπεροξειδωση.

Πίνακας 3. Παράγοντες πρόκλησης οξειδωτικού στρες (Rice-Evans 1994).

Εξωγενείς παράγοντες πρόκλησης οξειδωτικού στρες

1. Έκθεση σε ακτινοβολία (υπεριώδης, υπέρυθρη, ορατού φάσματος)
2. Περίσσεια συγκέντρωσης μεταβατικών μετάλλων
3. Εξωγενώς χορηγούμενες τοξικές ουσίες, όπως φάρμακα με ισχυρές παρενέργειες (π.χ. τετραχλωράνθρακας, αιθανόλη, παρακεταμόλη)
4. Αυξημένη μερική πίεση οξυγόνου στο περιβάλλον
5. Τραυματισμοί, εγκαύματα, ασθένειες.

Ενδογενείς παράγοντες πρόκλησης οξειδωτικού στρες

1. Έντονη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων στο σημείο μιας βλάβης
2. Αυξημένη διαφυγή ηλεκτρονίων προς το μοριακό οξυγόνο κατά την οξειδωτική φωσφορύλιωση λόγω βλάβης στα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων
3. Αποδέσμευση των μεταβατικών μετάλλων από τις ουσίες που τα συγκρατούν
4. Μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικής προστασίας λόγω καταστροφής ή υπερκατανάλωσης των αντιοξειδωτικών.
5. Έντονη ενεργοποίηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος

1.6.1. Λιπιδική υπεροξείδωση

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (poly-unsaturated fatty acids, PUFAs), που εντοπίζονται κυρίως στις λιποπρωτεΐνες και στις μεμβράνες των κυττάρων, είναι ευάλωτα στην επίδραση των ελευθέρων ριζών. Αυτό συμβαίνει, επειδή ανάμεσα σε γειτονικούς διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα (C=C) παρεμβάλλονται απλοί δεσμοί (-CH₂-). Οι διπλοί αυτοί δεσμοί έχουν την τάση να ελαττώνουν την ισχύ του δεσμού άνθρακα-υδρογόνου των αντίστοιχων απλών και να διευκολύνουν έτσι την απομάκρυνση του υδρογόνου. Επομένως, η λιπιδική υπεροξείδωση αρχίζει με την επίδραση κυρίως της HO[•], που έχει την απαιτούμενη δραστηριότητα για την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου, οδηγώντας στο σχηματισμό μίας λιπιδικής ρίζας (R[•]). Στη συνέχεια η λιπιδική ρίζα προσλαμβάνει οξυγόνο και σχηματίζει την υπεροξειδική ρίζα (ROO[•]). Η υπεροξειδική ρίζα, με την απαιτούμενη δραστηριότητα που πλέον διαθέτει για απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου, συνεχίζει την υπεροξείδωση άλλου λιπαρού οξέος σχηματίζοντας νέα υπεροξειδική ρίζα, ενώ η ίδια μετατρέπεται σε ένα οργανικό υδροϋπεροξείδιο. Συνεπώς, η αρχική επίδραση της ελεύθερης ρίζας πυροδοτεί αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν τελικά στο σχηματισμό λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων, τα οποία παρουσία μεταβατικών μετάλλων είναι δυνατό να διασπαστούν και να παραχθούν οι ρίζες RO[•] (αλκοξειδική ρίζα) και ROO[•]. Οι τελευταίες μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από τα PUFAs και να αρχίσουν νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις σταματούν μόνον όταν οι λιπιδικές ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους ή οξειδώσουν μία πρωτεΐνη ή απομακρυνθούν από κάποιο CBA, όπως η βιταμίνη E (Rice-Evans 1994).

Η ολοένα και αυξανόμενη συσσώρευση λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων έχει ως συνέπεια την αλλοίωση της δομής των μεμβρανών (κυτταρικής και των υποκυτταρικών

οργανιδίων). Αυτό σημαίνει ότι αυξάνεται η ρευστότητα και η διαπερατότητα των μεμβρανών σε ουσίες και ιόντα. Επίσης, διαταράσσεται η διαμερισματοποίηση του εσωτερικού του κυττάρου με προσβολή της διάταξης των οργανιδίων του στο χώρο. Οι παραπάνω μεταβολές έχουν ισχυρά βλαπτικές επιπτώσεις στη λειτουργικότητα αλλά και στην ίδια την ακεραιότητα του κυττάρου (Farber 1981).

Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να οφείλεται σε νέκρωση ή σε απόπτωση. Η πρώτη περίπτωση είναι αποτέλεσμα της οξείας επίδρασης κάποιου ισχυρά τοξικού ερεθίσματος στο κύτταρο. Η δεύτερη περίπτωση είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης του ίδιου του κυττάρου, που ενεργοποιεί δικές του πρωτεΐνες (κασπάσες) που το κατακερματίζουν, απέναντι συνήθως σε ένα λιγότερο επιβλαβές ερέθισμα, που δρα μάλλον για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Gjorret και συν. 2003). Η απόπτωση μπορεί να αποτελεί και φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού και μάλιστα με τη βοήθεια των ελευθέρων ριζών, όταν απομακρύνονται γηρασμένα, πλεονάζοντα ή με λειτουργικές ανωμαλίες κύτταρα (Jacobson 1996). Στην περίπτωση όμως του οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται κυρίως διαδικασίες απόπτωσης από τη βλάβη που προκαλούν οι ίδιες οι ελεύθερες ρίζες ή πιο δραστικές μορφές οξυγόνου στα κύτταρα (Yang και συν. 1998, Liu και συν. 1999).

Παρουσία μεταβατικών μετάλλων πραγματοποιείται περαιτέρω διάσπαση των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων προς πλέον σταθερά προϊόντα, όπως αλκάνια, αλκένια, αλδεύδες, διαλδεύδες, κ.ά. Από αυτά τα προϊόντα, ιδιαίτερος κυτταροτοξικός είναι οι διαλδεύδες, με σημαντικότερο εκπρόσωπο την μηλονική διαλδεύδη (MDA), και οι αλδεύδες, με σημαντικότερο εκπρόσωπο την 4-υδροξυ-2-εννεάλη (HNE) (Rice-Evans 1994).

1.6.2. Οξείδωση πρωτεϊνών

Η έκθεση των πρωτεϊνών στη δράση ελευθέρων ριζών προκαλεί αλλαγές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους, ως συνέπεια των μεταβολών στη διάταξη που υφίστανται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες του μορίου τους (Chaudiere 1994). Καθώς όμως οι ελεύθερες ρίζες αλληλεπιδρούν και με το υδρογόνο που συμμετέχει στους δεσμούς μεταξύ πολυπεπτιδίων και είναι υπεύθυνο για τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, προκαλούν επίσης διαταραχές και στη δευτεροταγή τους δομή (Rice-Evans 1994).

Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, οι υπεροξειδικές ρίζες, η μηλονική διαλδεύδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-εννεάλη (HNE), που προέρχονται από τη λιπιδική υπεροξείδωση, είναι οι πλέον δραστικές ουσίες που αντιδρούν με τις σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) των πρωτεϊνών (Chaudiere 1994). Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να αδρανοποιηθούν πολλά ένζυμα, μεταξύ των οποίων και εκείνα του κυτταρικού μεταβολισμού ή της αναπνευστικής αλυσίδας με συνέπεια τη μείωση του κυτταρικού ATP. Επιπλέον, η MDA και η HNE αντιδρούν και με τις αμινοομάδες (-NH₂) και σχηματίζουν πρωτεολιπιδικά πολυμερή, τις βάσεις του Schiff (Trombly και Tappel 1975). Από την αποδόμηση αυτών των πολυμερών στα λυσοσώματα παράγεται η χρωστική λιποφουσκίνη. Είναι γνωστό ότι η τελευταία συσσωρεύεται στα κύτταρα και ιδιαίτερα τα καρδιακά και τα νευρικά με την πάροδο της ηλικίας και έχει συνδεθεί με εκφυλιστικές βλάβες (Keller 2005, Terman και Brunk 2005).

Αντίστοιχα, βλάβη στις πρωτεΐνες μεταφοράς ιόντων της κυτταρικής μεμβράνης, όπως οι Na⁺/K⁺ και Ca⁺ ATPάσες, οι οποίες περιέχουν σουλφυδρυλικές ομάδες στα ενεργά τους κέντρα, μπορεί να επηρεάσει την ομοίωση των ιόντων αυτών (Chaudiere

1994). Η διαταραχή στην ομοιόσταση των ιόντων νατρίου και ασβεστίου θεωρείται μια από τις κύριες και καθοριστικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Έτσι, δυσλειτουργία της αντλίας των Na^+/K^+ οδηγεί σε «κυτταρικό οίδημα» και αλλοίωση των εσωτερικών κυτταρικών δομών. Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση των διαύλων ασβεστίου προκαλεί τη μείωση της αναλογίας εξωκυττάριου προς ενδοκυττάριο ασβέστιο (Burdon 1994). Μία μείωση στην αναλογία αυτή της τάξεως των 1000 έως 10000, που είναι δυνατό να συμβεί σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ενεργοποιεί τις κυτταρικές υδρολάσες. Οι τελευταίες διασπών μεγάλη ποικιλία από δομικά κυτταρικά μακρομόρια, όπως τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών, τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και το DNA (Orrenius 1991), με επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο και την νέκρωση ακόμα και ολόκληρων ιστών (Farber 1981).

1.6.3. Οξείδωση των υδατανθράκων

Έχει αναφερθεί ότι οι μονοσακχαρίτες μπορούν να οξειδωθούν παρουσία ιχθών και μόνο μεταβατικών μετάλλων, σχηματίζοντας δραστικές δικαρβονυλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε απευθείας βλάβη των πρωτεϊνών (Hunt 1990).

1.6.4. Οξείδωση του DNA

Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία μπορούν να προκαλέσουν τη διάσπαση της έλικας του DNA (Inpouye 1984), ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις Cu^{++} (10^{-6} M) και H_2O_2 (10^{-5} M) πυροδοτούν οξειδωτικές διεργασίες στις αλυσίδες του DNA (Sagranti και Kraemer 1989). Επίσης, η 8-υδροξυ-δεσοξυγουανοσίνη (8-OHdG), που σχηματίζεται με την επίδραση της HO^\bullet στο DNA, βρέθηκε να παράγεται με την ταυτόχρονη επίδραση H_2O_2 και υπεριώδους ακτινοβολίας (Floyd και συν. 1988) ή H_2O_2 και αλάτων δισθενούς σιδήρου (Fisher-Nielsen και Poulsen 1992). Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι, το ασκορβικό οξύ παρουσία αλάτων δισθενούς σιδήρου δρα προ-οξειδωτικά ενισχύοντας το σχηματισμό της 8-OHdG (Chaudiere 1994). Η 8-OHdG θεωρείται μεταλλαξιογόνος ουσία, αφού προκαλεί υποκαταστάσεις στις βάσεις του DNA ($\text{G} \rightarrow \text{T}$ και $\text{A} \rightarrow \text{C}$) (Cheng, 1992). Επομένως, η οξειδωτική βλάβη στο DNA αποτελεί πιθανή αιτία καρκινογένεσης (Kuchino και συν. 1987) και πρόκλησης αυτοάνοσων νοσημάτων (Schraufstatter και συν. 1987).

1.7. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και αναπαραγωγή

Η παραγωγή ενέργειας με κατανάλωση οξυγόνου και ο αερόβιος μεταβολισμός των κυττάρων συνδέονται αναπόφευκτα με τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος εκτίθενται με τον ίδιο τρόπο όπως άλλα κύτταρα στις ROS. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της επίδρασης των μεταβολών των οξειδοαναγωγικών συνθηκών στη φυσιολογία τόσο των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων όσο και των εμβρύων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξής τους.

1.7.1. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και σπερματοζωάρια

1.7.1.1. Ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων

Τα σπερματοζωάρια φαίνεται ότι έχουν αναπτυγμένους μηχανισμούς επιπλέον παραγωγής ROS (κυρίως $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2). Για παράδειγμα, τα σπερματοζωάρια του ταύρου παράγουν ROS με οξειδωτική απαμίνωση αμινοξέων (Tosic και Walton 1950), ενώ τα σπερματοζωάρια του ανθρώπου με τη δράση της NADPH οξειδάσης, αντίστοιχα όπως τα μακροφάγα (Aitken και Fisher 1994). Οι ROS ενεργοποιούν την κινάση της τυροσίνης, που επάγει τη φωσφορυλίωσή της. Αντίθετα, οι ROS αναστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης της τυροσίνης, που αποικοδομεί τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη, με οξείδωση της σουλφυδρυλικής ομάδας (-SH) της κυστεΐνης του ενεργού της κέντρου. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται αύξηση στη συγκέντρωση της φωσφορυλιωμένης τυροσίνης, η οποία πυροδοτεί την έναρξη της διαδικασίας ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων (Aitken και συν. 1995, Leclerc και συν. 1997).

Η ενεργοποίηση (capacitation) αποτελεί το σύνολο των μοριακών και βιοχημικών μεταβολών της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, μεταβολές που τα καθιστούν ικανά για τη γονιμοποίηση. Ο έλεγχος της ρύθμισης αυτών των μεταβολών μπορεί να αποδοθεί στις ROS (Aitken και Fisher 1994). Έτσι οι ROS:

- Αυξάνουν τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης που προκαλούν σε αυτή (Aitken και Fisher 1994).
- Απομακρύνουν τις στερόλες (κυρίως τη χοληστερόλη) και τα σύμπλοκά τους, καθώς και τα προϊόντα έκκρισης της επιδιδυμίδας, του σπερματικού πόρου και των επικουρικών αδένων, που βρίσκονται προσροφημένα στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και έχουν ως σκοπό να τη σταθεροποιούν (Langlais και Roberts 1985).
- Διευκολύνουν την υπό έλεγχο εισροή των Ca^{+2} ενεργοποιώντας τους διαύλους των ιόντων αυτών (Sprungin και Breitbart 1996).
- Αυξάνουν τη δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων, όπως της αδενυλικής κυκλάσης, με απευθείας δράση σε αυτή ή έμμεσα με την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των Ca^{+2} (Hyne και Garbers 1979). Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP, το οποίο είναι απαραίτητο για την υποστήριξη της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων (Parrish και First 1993). Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A, που υποστηρίζει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης (Aitken και συν. 1998β).
- Ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A_2 , είτε λόγω της υπεροξειδωσης των λιπιδίων της μεμβράνης (Goldman και συν. 1992), είτε λόγω της αύξησης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{+2} (Bennet και συν. 1987)
- Αδρανοδοποιούν άλλα ένζυμα, όπως τη φωσφοδιεστεράση, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP, και την αντλία Na^+/K^+ (Adeoya-Osiguwa και Fraser 1996). Έτσι, αυξάνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση Na^+ , που οδηγεί σε αυξημένη εκροή H^+ και επακόλουθα σε αύξηση του ενδοκυτταρικού pH (White και συν. 1989, Aitken και συν. 1998β).

Οι παραπάνω μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης στην ουρά, στο μέσο τμήμα, αλλά και στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου έχουν ως αποτέλεσμα:

- την αύξηση της ευλυγισίας του μέσου τμήματος και της ουράς του,
- την παύση της περιστροφής της κεφαλής του.

Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται το πλάτος ταλάντωσης της ουράς και το σπερματοζωάριο κινείται σε τροχιά κυκλική ή ελλειπτική από προωθητική επάνω σε καμπύλη που είχε πριν την ενεργοποίηση (Yanagimachi 1981). Οι μεταβολές αυτές στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εξυπηρετούν:

- τη διευκόλυνση της διόδου τους διαμέσου υλικών με άλλο ιξώδες,
- τη μετακίνησή τους μεταξύ των πτυχών και των κροσσών του βλεννογόνου των ωαγωγών,
- την αποκόλλησή τους από το επιθήλιο του ισθμού των ωαγωγών,
- τη διείσδυσή τους στη διαφανή ζώνη του ωαρίου.

Επιπλέον, η κινητοποίηση των λιπιδίων και η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, που παρατηρείται στην κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου, οδηγεί σε επαναδιάταξη των αναπόσπαστων πρωτεϊνών της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών-υποδοχέων, όπως η γαλακτοσιδική τρανσφεράση (Macek and Shur 1988), που είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση των σπερματοζωαρίων στη διαφανή ζώνη του ωαρίου (Aitken και συν. 1996).

1.7.1.2. Αντίδραση του ακροσώματος

Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων ολοκληρώνεται με την αντίδραση του ακροσώματος. Η προσκόλληση στη διαφανή ζώνη αποτελεί το φυσιολογικό ερέθισμα για την πρόκληση αυτής της αντίδρασης (Ward και Storey 1984). Πιο συγκεκριμένα, όταν η κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου προσκολληθεί στη γλυκοπρωτεΐνη ZP3 της διαφανούς ζώνης, πυροδοτείται, με τη μεσολάβηση των ROS, περαιτέρω εισροή Ca^{+2} και αύξηση του ενδοκυτταρικού pH από την αναστολή της αντλίας Na^+/K^+ . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων του ακροσώματος (π.χ. φωσφολιπάσες, ακροσίνη) (Yanagimachi και συν. 1993) που, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 από τις ROS (Aitken 1994), συντελούν στην έναρξη της αντίδρασης του ακροσώματος. Το φαινόμενο αυτό περιλαμβάνει τη συγχώνευση κατά θέσεις της εξωτερικής ακροσωματικής με την κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου και οδηγεί στην απελευθέρωση των υδρολυτικών ενζύμων του ακροσώματος (π.χ. ακροσίνης, υαλουρονιδάσης, ενεργοποιού του πλασμινογόνου κ.ά.), που είναι απαραίτητα για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη και τη γονιμοποίηση του ωαρίου (Σμοκοβίτης 1993).

Ακόμα, οι ROS μέσω της ελεγχόμενης λιπιδικής υπεροξειδωσής και της ταυτόχρονης ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A_2 είναι υπεύθυνες για την κατάλληλη προετοιμασία της κυτταρικής μεμβράνης της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ύψος του ισημερινού, που θα της επιτρέψει να συγχωνευθεί με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου (Roldan και Harrison 1990, Aitken και Fisher 1994).

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι οι ROS διαδραματίζουν καθοριστικό και ρυθμιστικό ρόλο στην έναρξη, διατήρηση και ολοκλήρωση της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Γενικότερα, το $O_2^{\cdot -}$ είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση, ενώ το H_2O_2 σε χαμηλές (<25μM) συγκεντρώσεις συμμετέχει τόσο στις ενζυμικές διεργασίες όσο και στις μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης που οδηγούν στην αντίδραση του

ακροσώματος των σπερματοζωαρίων του ταύρου (O' Flaherty και συν. 1999). Στα σπερματοζωάρια του ανθρώπου το $O_2^{\cdot -}$ απαιτείται μόνο για την ενεργοποίηση και το H_2O_2 (<12,5μM) μόνο για την αντίδραση του ακροσώματος, φαινόμενα που καταστέλλονται παρουσία SOD (ενεργοποίηση) ή καταλάσης (αντίδραση ακροσώματος) (Aitken και συν. 1995).

Τέλος, έχει βρεθεί ότι το $^{\cdot}NO$ ² σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<0,4 nmol NO_3^- και NO_2^- / 10^6 σπερματοζωάρια) προάγει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Hellstrom και συν. 1994, Rosselli και συν. 1995) και υποστηρίζει την ενεργοποίηση καθώς και την αντίδραση του ακροσώματος (Rodriguez και συν. 2005 α και β). Επίσης, ανιχνεύθηκε η δραστηριότητα των eNOS και nNOS στα σπερματοζωάρια του ανθρώπου και πιστεύεται ότι μέσω της σύνθεσης του $^{\cdot}NO$ αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της κινητικότητας και της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων (Lewis και συν. 1996).

1.7.1.3. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα σπερματοζωάρια

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του Aitken (1998a) στον άνθρωπο, σε ήπιες οξειδωτικές συνθήκες (12,5 μM H_2O_2) ενισχύεται σημαντικά η διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο χωρίς βλάβη στα μακρομόρια των σπερματοζωαρίων. Αντίθετα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (12,5-50 μM) H_2O_2 τα σπερματοζωάρια εκδηλώνουν χαμηλού βαθμού βλάβη στο DNA τους, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η ικανότητά τους για γονιμοποίηση. Τέλος, σε ισχυρότερες οξειδωτικές συνθήκες (200 μM H_2O_2) τα σπερματοζωάρια παρουσιάζουν υψηλού βαθμού τμηματοποίηση στο DNA καθώς και απώλεια της γονιμοποιητικής ικανότητάς τους.

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες³, η αυξημένη συγκέντρωση ROS και ιδιαίτερα του H_2O_2 προκαλεί εκτεταμένη προσβολή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, πυροδοτώντας την έναρξη ανεξέλεγκτων αλυσιδωτών αντιδράσεων δημιουργίας λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων (De Lamirande και Gagnon 1993). Το αποτέλεσμα μίας τόσο μεγάλης έκτασης λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης, η οποία καθίσταται ανίκανη να υποστηρίξει τόσο την ενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου όσο και να υποστεί τις απαραίτητες βιοχημικές μεταβολές για τη συγχώνευσή της με την αντίστοιχη του ωαρίου (De Lamirande και συν. 1998). Ακόμα, παρατηρούνται βλάβες στα αζονοημάτια που, σε συνδυασμό με την ενδοκυτταρική μείωση του ATP, οδηγούν σε δραστική μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (De Lamirande και Gagnon 1992).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η συσσώρευση ROS στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης, διάσπαση του DNA, υποκαταστάσεις των βάσεων του και γενικότερα χρωματοσωμικές ανωμαλίες (Fraser και Lane 1987, Duru και συν. 2000). Μορφολογικά οι ανωμαλίες αυτές υποδηλώνονται με

² Η ημιπερίοδος ζωής του $^{\cdot}NO$ στους ιστούς είναι 3-5 sec (Moncada και συν. 1991). Για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του γίνεται έμμεσα με τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πιο σταθερών μορφών που σχηματίζει, όπως τα νιτρώδη (NO_2^-) και νιτρικά (NO_3^-) ιόντα.

³ Καταστάσεις οξειδωτικού στρες στο σπέρμα παρατηρούνται σε λοιμώξεις του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως η προστατίτιδα, που οδηγούν σε λευκοκυτταροσπερμία (> 10^6 ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα/ml σπέρματος) (Shekarriz και συν. 1995), αλλά και σε ελαττωματική σπερματογένεση που οδηγεί σε κατακράτηση πλεονασματικού κυτταροπλάσματος από τα σπερματοζωάρια, η οποία συσχετίζεται με αυξημένη δράση της NADPH οξειδάσης (Aitken και Fisher 1994).

συρρίκνωση της κεφαλής των σπερματοζωαρίων. Τέλος, οι ROS μπορούν να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες και να επάγουν με αυτό τον τρόπο αποπτωτικές διαδικασίες, προκαλώντας το θάνατο των σπερματοζωαρίων (Agarwal και συν. 2003).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι το *NO σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>1,2 \text{ nmol NO}_3^-$ και $NO_2^-/10^6$ σπερματοζωάρια), που παρατηρούνται *in vivo* σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης ή γενικότερα κάποιας λοίμωξης σε οποιοδήποτε σημείο της γεννητικής οδού του θηλυκού, μπορεί να προκαλέσει θάνατο των σπερματοζωαρίων. Αυτό είναι δυνατό να συμβεί διότι αλληλεπιδρούν με το $O_2^{\cdot-}$ και σχηματίζουν το ισχυρά τοξικό ανιόν του υπεροξυνιτρώδους (Rosselli και συν. 1995).

1.7.1.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα του σπέρματος

Τα σπερματοζωάρια είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε καταστάσεις αυξημένης συγκέντρωσης ROS, διότι η αντιοξειδωτική άμυνά τους είναι εξαιρετικά περιορισμένη καθώς βασίζεται περισσότερο στην προστασία που τους παρέχει το σπερματικό πλάσμα, ή τα υγρά του αναπαραγωγικού συστήματος του θηλυκού (Kovalski και συν. 1992). Στα σπερματοζωάρια των θηλαστικών ανιχνεύεται η γλουταθειόνη (GSH), η φωσφολιπιδική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (PHGPx) (Godeas και συν. 1997), και επιπρόσθετα στα σπερματοζωάρια του ανθρώπου (Alvarez και συν. 1987) και του ταύρου (Bilodeau και συν. 2000) η δισμουτάση του $O_2^{\cdot-}$ (SOD). Στο πλάσμα του σπέρματος του ταύρου ανιχνεύθηκε η παρουσία καταλάσης, GSH και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Bilodeau και συν. 2000), καθώς και ασκορβικό και ουρικό οξύ σε σημαντικές συγκεντρώσεις (Lewis και συν. 1997).

1.7.2 .Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και ανάπτυξη ωοθυλακίων

1.7.2.1. Ο ρόλος του *NO στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Στα κοκκώδη κύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων επιμύων έχει διαπιστωθεί σημαντική δραστηριότητα του επαγωγίμου ισοενζύμου της συνθετάσης του *NO (inducible NOS, iNOS). Πιστεύεται ότι το *NO μπορεί να ασκεί κυτταροστατική δράση μέσω αυτοκρινών ή και παρακρινών μηχανισμών, αναστέλλοντας τη μετάβαση των ωοθυλακίων σε επόμενο στάδιο ανάπτυξης (Matsumi και συν. 2000).

Τα ωοθυλάκια, που κατά την ανάπτυξή τους φυσιολογικά θα οδηγηθούν σε ατρησία, περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις *NO . Η ατρησία έχει συνδεθεί με διεργασίες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) (Tilly 1997). Έχει προταθεί ότι το *NO ρυθμίζει τις διεργασίες αυτές και του αποδίδονται αντιαποπτωτικές ιδιότητες (Sugino και συν. 1996). Μάλιστα, διαπιστώθηκε αντίστροφη σχέση της συγκέντρωσής του με την απόπτωση κοκκωδών κυττάρων επιμύων, *in vitro* (Matsumi και συν. 1998). Από την άλλη πλευρά, υψηλές συγκεντρώσεις *NO με παράλληλα αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ (όπως μπορεί να συμβεί από τις NOS σε συνθήκες έλλειψης αργινίνης ή σε οξειδωτικό στρες) μπορούν να οδηγήσουν σε γενικότερο κυτταρικό θάνατο λόγω του σχηματισμού του τοξικού ανιόντος του υπεροξυνιτρώδους (Rosselli και συν. 1995).

Στα ωοθυλάκια που προορίζονται να ρηχθούν (προωοθυλακιορρηκτικά), παρατηρείται, παράλληλα με την ωρίμανσή τους, σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης *NO στο ωοθυλακικό υγρό (Yamagata και συν. 2002). Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην αυξανόμενη δραστηριότητα του ισοενζύμου eNOS (endothelial NOS) (Jablonka-Shariff και Olson 1998), που εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου, στα

κοκκώδη κύτταρα, στο ωάριο καθώς και στα αγγεία της ωοθήκης, παράλληλα με την αυξανόμενη δραστηριότητα του iNOS των κοκκωδών κυττάρων (Van Voorhis και συν. 1995).

Ο ρυθμιστικός ρόλος του *NO στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων πιστεύεται ότι βασίζεται τόσο στην αντιαποπτωτική δράση του, όσο και στην ικανότητά του να προάγει τη σύνθεση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, όπως ο EGF στα κοκκώδη κύτταρα (Hattori και συν. 1996). Επιπλέον, το *NO συμμετέχει στην υποστήριξη και ρύθμιση του αγγειακού φραγμού μεταξύ αίματος και ωοθυλακίου, πιθανόν μέσω της αγγειοδιασταλτικής ικανότητάς του (Powers και συν. 1995).

1.7.2.2. Επίδραση των ROS στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων απαιτεί την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων προκειμένου να καλυφθούν οι αυξανόμενες ανάγκες τους. Οι ROS που παράγονται σε μικρές ποσότητες από τη NADPH οξειδάση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποιούν αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες (όπως, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και συμβάλλουν έτσι καθοριστικά στην αγγειογένεση και την υποστήριξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Ushio-Fukai και Alexander 2004).

Η παρουσία του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD έχει ανιχνευθεί στα ωοθυλάκια κάθε σταδίου ανάπτυξης (Suzuki και συν. 1999) και ειδικότερα στις μεμβράνες των κοκκωδών κυττάρων (Laloraya και συν. 1989). Η παρουσία του αποσκοπεί πιθανότατα στην αποτροπή της ατρησίας, καθώς η SOD συμμετέχει στην προστασία των κοκκωδών κυττάρων από το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί την ενεργοποίηση της αποπτωτικής ενδονουκλεάσης (McConkey και συν. 1989). Επομένως, η απόπτωση μπορεί να ρυθμίζει τη φυσιολογική και παθολογική απώλεια ωοθυλακίων (Tilly, 1997) και πυροδοτείται από οποιαδήποτε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο περιβάλλον του ωοθυλακίου (Sabatini και συν. 1999).

1.7.3. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και ωρίμανση του ωαρίου

Στα βοοειδή, αλλά και σε άλλα θηλαστικά, το ωάριο, που περικλείεται στο ωοθυλάκιο, βρίσκεται στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσής του. Η ωρίμανσή του γίνεται στο προωθυλακιόρρηκτο ωοθυλάκιο μετά την προωθυλακιόρρηκτη επεισοδιακή έκκριση της LH, διαρκεί 24 ώρες περίπου και συνίσταται σε δύο παράλληλα φαινόμενα:

- την ωρίμανση του πυρήνα, δηλαδή την επανέναρξη της μείωσης μέχρι το στάδιο της μετάφασης της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (μετάφαση II) με την εξώθηση προηγούμενως του πρώτου πολικού σωματίου, και
- την κυτταροπλασματική ωρίμανση, κατά τη διάρκεια της οποίας μεταβολικές και δομικές αλλαγές καθιστούν το ωάριο ικανό τόσο να γονιμοποιηθεί, όσο και να εξελιχθεί σε έμβρυο στα πρώτα στάδιά του (Bevers και συν. 1997).

Σύμφωνα με τους Sirard και συν. (1989), οι οποίοι μελέτησαν τη χρονική διάρκεια των σταδίων της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων βοοειδών, *in vitro*, η επανέναρξη της μείωσης που σηματοδοτείται με λύση της πυρηνικής μεμβράνης παρατηρείται μετά από 6,6 έως 8 ώρες από την αρχή της επώασης, ενώ η συμπύκνωση των χρωματοσωμάτων μετά από 8 έως 10,3 ώρες, παράλληλα με το σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου.

Ακολουθεί η μετάφαση I και η ανάφαση I μετά από 10,3 έως 15,4 και 15,4 έως 16,6 ώρες αντίστοιχα, και στη συνέχεια η τελόφαση I και η μετάφαση II μετά από 16,6 έως 18 και 18 έως 24 ώρες, αντίστοιχα.

Η επανέναρξη της μείωσης αλλά και γενικότερα η διαδικασία της ωρίμανσης ελέγχεται από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, οι οποίες, μέσα από διεργασίες φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης, αντίστοιχα, ρυθμίζουν την εξέλιξη και την αλληλουχία των απαιτούμενων για την ωρίμανση φαινομένων. Δύο από τα σημαντικότερα από τα παραπάνω ένζυμα είναι ο παράγοντας προαγωγής της ωρίμανσης (maturation promoting factor, MPF) και η ενεργοποιημένη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Wehrend και Meinecke 2001). Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούνται λίγο πριν από την επανέναρξη της μείωσης και η δραστηριότητά τους βαίνει συνεχώς αυξανόμενη μέχρι το στάδιο της μετάφασης I, προκειμένου για τον MPF και μέχρι το στάδιο της μετάφασης II, προκειμένου για την MAPK (Fissore και συν. 1996). Στη συνέχεια, η δραστηριότητα του MPF μειώνεται, γεγονός που θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετάβαση από τη μετάφαση I στην ανάφαση I και τη συνέχιση της μείωσης, ενώ αυξάνεται εκ νέου στη μετάφαση II (Viveiros και συν. 2001). Ο ρόλος των ενζύμων αυτών συνδέεται στενά με τη λύση της πυρηνικής μεμβράνης, ώστε να αρχίσει η μείωση, με τη συμπύκνωση των χρωματοσωμάτων και με το σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου, για την πραγματοποίηση της μετάφασης I (Wehrend και Meinecke 2001).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, τα κοκκώδη κύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο (κύτταρα του ωοφόρου δίσκου) συμμετέχουν καθοριστικά στις διεργασίες ωρίμανσής του. Συγκεκριμένα, μέσω των χασματοσυνδέσεων τους (gap-junctions) με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου παρέχουν σε αυτό ουσίες, κυρίως μικρομοριακές, όπως ιόντα, νουκλεοτίδια, αμινοξέα και άλλους μεταβολίτες (Buccione και συν. 1990). Οι χασματοσυνδέσεις αυτές είναι ιδιαίτερα ενεργές τις πρώτες 6 έως 8 ώρες της ωρίμανσης, διάστημα που συμπίπτει με την έντονη μεταγραφή του DNA από το ωάριο και την αυξημένη συγκέντρωση οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό. Οι τελευταίες διεργασίες θεωρούνται απαραίτητες προϋποθέσεις για την κυτταροπλασματική ωρίμανση (Gordon 1994). Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα κοκκώδη κύτταρα υποστηρίζουν τη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH), ενός τριπεπτιδίου με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, από το ωάριο (de Matos και συν. 1997).

1.7.3.1. Ο φυσιολογικός ρόλος του *NO στην ωρίμανση του ωαρίου

Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου πιστεύεται ότι στο στάδιο πριν από την κορύφωση της επεισοδιακής έκκρισης της LH παρέχουν στο ωάριο ουσίες μέσω των χασματοσυνδέσεων, όπως το cAMP (Downs, 1993, Webb και συν. 2002) και οι πουρίνες (π.χ. υποξανθίνη). Αυτές διατηρούν αυξημένα τα επίπεδα του cAMP εντός του ωαρίου (Thibault και συν. 1987, Eppig και συν. 2004), αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την ωρίμανσή του (Eppig και συν. 2004, Mehlmann 2005). Το *NO μπορεί να ρυθμίζει τη δράση του cAMP μέσω του ελέγχου της παραγωγής της cGMP (Hubbard και Terranova 1982). Μετά την κορύφωση της επεισοδιακής έκκρισης της LH, μεταβολές στη συγκέντρωση του *NO που προέρχονται κυρίως από μεταβολές στην παραγωγή του από τα κοκκώδη κύτταρα (κατά τους Jablonka-Shariff και Olson 1997 αύξηση της παραγωγής και κατά τους Nakamura και συν. 2002 μείωση της παραγωγής) οδηγούν σε μεταβολές

στη σχέση cAMP προς cGMP, που σηματοδοτούν την έναρξη της ωρίμανσης του ωαρίου.

Η παρουσία του NO σε συγκεντρώσεις ορισμένου εύρους ($30,69 \pm 5,06 \mu\text{mol NO}_2^-$ και NO_3^-/l) προάγει την ωρίμανση ωαρίων επιμύων *in vitro*, που διατηρούνται σε περιβάλλον τεχνητής αναστολής με υποξανθίνη (Bu και συν. 2003). Αντίθετα, το NO σε πολύ υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις (απουσία υποξανθίνης) είτε αναστέλλει την επανέναρξη της μείωσης (Nakamura και συν. 2002), είτε καταστέλλει το σχηματισμό του πρώτου πολικού σωματίου διακόπτοντας την ωρίμανση πριν την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, είτε τέλος οδηγεί σε αδιευκρίνιστες και εκφυλισμένες μορφές ωαρίων (Jablonka-Shariff και Olson 2000, Bu και συν. 2003).

Οι αδιευκρίνιστες μορφές αποδίδονται σε διαταραχή των απαραίτητων δομικών αλλαγών κατά την αναδιάταξη των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα η κατασκευή της πυρηνικής ατράκτου να μην είναι λειτουργική, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση ανωμαλιών στο διαχωρισμό και τη μορφολογία των χρωματοσωμάτων (Jablonka-Shariff και συν. 1999). Επίσης, οι εκφυλισμένες μορφές έχουν αποδοθεί στην τοξική δράση του υπεροξυνιτρώδους (ONOO^-), που αποτελεί προϊόν της αντίδρασης του NO με το O_2^- (Espey και Lipner 1994).

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι το NO σε συγκεκριμένα επίπεδα είναι απαραίτητο για την ομαλή εξέλιξη της ωρίμανσης του ωαρίου. Τα αποκλίνοντα πολλές φορές ευρήματα μεταξύ των ερευνητών απορρέουν από την έλλειψη μιας αξιόπιστης μεθόδου προσδιορισμού της συγκέντρωσης του NO που απαντάται *in vivo*, καθώς και από τις αποσπασματικές πληροφορίες που μέχρι τώρα υπάρχουν σχετικά με το μηχανισμό της βιολογικής δράσης του (Thaler και Epel 2003).

1.7.3.2. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ωρίμανση του ωαρίου

Σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες έχουν παρατηρηθεί διαταραχές στη σχέση πρωτεϊνικών κινάσων και φωσφατασών κατά την ωρίμανση του ωαρίου. Έχει διαπιστωθεί, ότι οι ROS ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC) (Burdon 1994), η οποία πιθανόν αναστέλλει τη δράση της MAPK (Quan και συν. 2003), που έχει κυρίως την ευθύνη για το σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου (Sun και συν. 2002). Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατό να προκληθούν αλλοιώσεις στην κατασκευή της μειωτικής ατράκτου, που οδηγούν σε αδυναμία αποικοδόμησης του MPF και συνεπώς στη διακοπή της μειωτικής διαίρεσης στο στάδιο της μετάφασης I ή στην καθυστέρηση στην μετάβαση προς την ανάφαση I και κατ' επέκταση στην ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης (Viveiros και συν. 2004).

Κατά την ωρίμανση του ωαρίου μπορούν να προκληθούν επιπρόσθετες αλλοιώσεις σε αυτό λόγω επίδρασης του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η κυτταρική μεμβράνη υφίσταται βλάβες από λιπιδική υπεροξειδωση, ο κυτταροσκελετός αποδιοργανώνεται από οξειδωση των πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων και των μικρονηματίων του (Tarin και συν. 1996), ενώ το DNA διασπάται κατά περιοχές χάνοντας τη συνοχή του. Εκτεταμένες βλάβες στο DNA μπορούν να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο (Jurisicova και συν. 1996, Sabatini, 1999). Τέλος, στο οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται η ανευπλοειδία που παρατηρείται κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων ωαρίων από ηλικιωμένους επίμυες και σχετίζεται με την αγονιμότητα της γήρανσης (Tarin και συν. 1998β).

1.7.3.3. ROS και αντιοξειδωτική προστασία κατά την ωρίμανση του ωαρίου

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ο αερόβιος μεταβολισμός του ωαρίου είναι ιδιαίτερα αυξημένος (Rieger και Loskutoff 1994). Η υπερπαραγωγή ROS από την αυξημένη αυτή μεταβολική δραστηριότητα αντισταθμίζεται από την έντονη παρουσία αντιοξειδωτικών ενζύμων και ουσιών, που εντοπίζονται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στο ωοθυλακικό υγρό. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται η αναγκαία για την ωρίμανση του ωαρίου ισορροπία στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ωοθυλακίου. Έτσι, εντός του ωαρίου έχει ανιχνευθεί η συνθετάση της γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), η GPx, η SOD, η GSH (El. Mouatassim και συν. 1999). Στο ωοθυλακικό υγρό αντίστοιχα έχει εντοπιστεί σημαντική παρουσία των οιστρογόνων, στα οποία αποδίδεται εκτός των άλλων και αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση (Yagi 1997). Επίσης, έχουν ανιχνευθεί τα εξής αντιοξειδωτικά ένζυμα και ουσίες: GSH (Gardiner και συν. 1998), καταλάση, γλουταθειονική S-τρανσφεράση, GPx και αναγωγή της γλουταθειόνης (GRd) (Carbone και συν. 2003), SOD (Sabatini και συν. 1999), ταυρίνη και υποταυρίνη (Guerin και Menezo 1995), κυστεαμίνη (Guyader-Joly και συν. 1998), ασκορβικό οξύ (Paszkowski και Clarke 1999), α-τοκοφερόλη και καροτινοειδή (Schweigert & Zucker 1988), ουρικό οξύ (Cassano και συν. 1999), μελατονίνη (Brzezinski και συν. 1987).

1.7.4. Ελεύθερες ρίζες και ωοθυλακιόρρηξία

Η αυξημένη δραστηριότητα της eNOS των κυττάρων της θήκης, που παρατηρείται κατά το τέλος της διαδικασίας της ωρίμανσης του ωοθυλακίου, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την αγγειοδιαστολή και την επακόλουθη αυξημένη αιματική κυκλοφορία προς αυτό (Rosselli και συν. 1998). Με τον τρόπο αυτό είναι πιθανόν ότι αυξάνεται η διήθηση του τοιχώματος του ωοθυλακίου από λευκοκύτταρα, τα οποία, παράγοντας κυτοκίνες και κυρίως την ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ενισχύουν τη δραστηριότητα της iNOS των κοκκωδών κυττάρων και των μακροφάγων (Bonello και συν. 1996). Συνεπώς, η προκαλούμενη αύξηση του *NO εκτιμάται ότι προάγει την ωοθυλακιόρρηξία (Rosselli και συν. 1998), πιθανόν μέσω ενεργοποίησης των κυκλοοξυγονασών 1 και 2 και οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση προσταγλανδινών PGE₂ και PGF_{2α} από την ωοθήκη (Faletti και συν. 1999).

Οι προσταγλανδίνες επιτείνουν την προσέλκυση και διήθηση λευκοκυττάρων και δημιουργούν συνήθως διαδικασίες ανάλογες με εκείνες της φλεγμονής, οδηγώντας έτσι στην υπερπαραγωγή ROS (Loukides και συν. 1990, Brannstrom και Norman 1993). Στη συνέχεια, οι ROS προκαλούν αποδιοργάνωση των κυττάρων του τοιχώματος του ωοθυλακίου και ιδιαίτερα ρήξη των λυσοσωματίων τους με απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεΐνάσες κ.ά.), συντελώντας στην ωοθυλακιόρρηξία (Brannstrom και συν. 1994).

1.7.5. *NO και στεροειδογένεση

Σύμφωνα με τις *in vitro* έρευνες των Rettori και συν. (1994), το *NO φαίνεται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της εκλυτικής ορμόνης της LH (GnRH) από τον υποθάλαμο και στην αιφνίδια έξαρση της προωοθυλακιόρρηκτικής έκκρισης της LH. Είναι γνωστό ότι η GnRH, προκαλώντας την έκκριση των γοναδοτροπινών (κυρίως της LH) από την υπόφυση, ρυθμίζει τόσο την λειτουργία των θηλυκών και αρσενικών

γονάδων (ωοθυλακιορρηξία, σπερματογένεση) όσο και τη σύνθεση και έκκριση στεροειδών ορμονών (οιστρογόνα-προγεστερόνη, τεστοστερόνη) από αυτές.

Επίσης, βρέθηκε ότι το NO ασκεί απευθείας δράση στο μηχανισμό σύνθεσης των στεροειδών ορμονών. Έτσι, σε καλλιέργειες κοκκωδών ή/ και ωχρινικών κυττάρων αναστέλλει τη σύνθεση τόσο των οιστρογόνων όσο και της προγεστερόνης, δράση που αποδίδεται κυρίως στην αδρανοποίηση της αρωματάσης, ενός από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, που είναι υπεύθυνα για τη στεροειδογένεση (Van Voorhis και συν. 1994). Μάλιστα, η έντονη δραστηριότητα των NOS που παρατηρήθηκε στο ωχρό σωματίο του επίμουσ συνδέθηκε με τη φυσιολογική παλινδρόμησή του (Olson και συν. 1996). Αντίστοιχη δράση εντοπίστηκε στα κύτταρα του Sertoli και του Leydig των όρχεων, στα οποία αναστέλλει τη σύνθεση της τεστοστερόνης από αυτά (Adams και συν. 1992).

1.7.6. Οξειδοαναγωγικές συνθήκες και πρόμη εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η ικανότητα των ωαρίων να υποστηρίζουν τις διαδικασίες σχηματισμού του ζυγωτού εξαρτάται από το στάδιο προόδου της κυτταροπλασματικής ωρίμανσής τους, η οποία συνδέεται άμεσα με τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), που συντίθεται από αυτά (Perreault και συν. 1988, Abeydeera και συν. 1998). Η GSH είναι η κυριότερη ενδογενής μη ενζυμικής φύσης αντιοξειδωτική ουσία μέσα στα κύτταρα των θηλαστικών (Meister 1983). Κατά τη διάρκεια της *in vivo* ωρίμανσης των ωαρίων η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της GSH αυξάνεται συνεχώς μέχρι τη στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας (Perreault και συν. 1988).

Μετά τη διείσδυση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, η GSH φαίνεται ότι έχει καθοριστική συμμετοχή στην αποσυμπύκνωση του πυρήνα του σπερματοζωαρίου και στο μετασχηματισμό του στον αρσενικό προπυρήνα (Perreault και συν. 1984). Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται παράλληλα με την ενεργοποίηση του ωαρίου, η οποία πυροδοτείται από την αυξημένη εισροή Ca^{+2} , κατόπιν ενεργοποίησης των διαύλων Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης του, πιθανώς από την επίδραση των ROS που παράγονται από το σπερματοζωάριο (Aitken και Fisher 1994, Runft και συν. 2002). Η αυξημένη εισροή Ca^{+2} ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη, η οποία αυξάνει τη δραστηριότητα ενζύμων, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης II της καλμοδουλίνης (calmodulin-dependent protein kinase II, CamKII) (Benitez-King και συν. 1996, Markoulaki και συν. 2004). Η CamKII ενεργοποιεί με τη σειρά της άλλους παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν στην ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης του ωαρίου με τη μετάβαση από τη μετάφαση II στην τελόφαση II και στην εξώθηση του δεύτερου πολικού σωματίου, ενώ ακολουθεί ο σχηματισμός του θηλυκού προπυρήνα (Jones 2005). Στη συνέχεια, τα χρωματοσώματα των δύο προπυρήνων μεταναστεύουν στο κέντρο του ωαρίου με τη βοήθεια του συστήματος μικροσωληνίσκων (άτρακτος), ενώ ταυτόχρονα γίνεται ο διπλασιασμός των χρωματίδων τους. Ακολούθως, τα χρωματοσώματα ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό της ατράκτου προκειμένου να διεξαχθεί η πρώτη μιτωτική διαίρεση. Έχει καταδειχθεί ότι η GSH μπορεί να προφυλάξει το σύστημα των μικροσωληνίσκων και μικρονηματίων από οξειδωτικές βλάβες και συνεπώς μπορεί να διασφαλίσει τη μετακίνηση των χρωματοσωμάτων των δύο προπυρήνων και τη μετάβαση του εμβρύου στο στάδιο των 2 κυττάρων (Zuelke και συν. 1997).

Κατά την πρόοδο της πρόμης εμβρυϊκής ανάπτυξης τα επίπεδα ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της GSH μειώνονται σημαντικά. Στον ποντικό, παρατηρήθηκε ότι η

συγκέντρωσή της GSH μειώνεται κατά 90% από το ώριμο ωάριο μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης. Ενδεχομένως, αυτό συμβαίνει, διότι το έμβρυο μέχρι το στάδιο αυτό στερείται της ικανότητας σύνθεσης της GSH εκ νέου, όπως και της πρόσληψης εξωκυτταρικής GSH από το υγρό του ωαγωγού (Gardiner και συν. 1998), ενώ ο μεταβολισμός των κυττάρων του είναι ιδιαίτερα αυξημένος⁴. Έτσι, η παρουσία της GSH εξωκυτταρικά είναι ικανή να προστατεύσει μόνο τις πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης από οξειδωτικές βλάβες. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να διατηρηθεί η λειτουργικότητα της αντλίας Na^+/K^+ , που συμβάλλει στο σχηματισμό της βλαστικής κοιλότητας (Thomas και Dagher 1994).

Η μείωση της συγκέντρωσης της GSH ενδοκυτταρικά αποτελεί φυσιολογικό φαινόμενο της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η μείωση αυτή, σε συνδυασμό με την επίδραση του NO που παράγεται από το έμβρυο (Nishikimi και συν. 2001), σχετίζεται με τη ρύθμιση αποπτωτικών διεργασιών σε πλεονάζοντα και περιττά κύτταρα του εμβρύου (Parchment 1993). Φαίνεται, επίσης, ότι έχει ρόλο στην προαγωγή της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης (Jacobson 1997). Επιπλέον, πιστεύεται ότι η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της GSH σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη αυξημένη παραγωγή $\text{O}_2^{\cdot-}$ από τις έντονες μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων του εμβρύου συντελούν στην εκκόλαψη της βλαστικής κύστης (Thomas και συν. 1997).

Το έμβρυο, μετά την κάθοδό του από τον ωαγωγό, και προκειμένου να εγκατασταθεί στη μήτρα, παράγει αυξημένες ποσότητες NO . Με τον τρόπο αυτό προκαλείται διαστολή των τριχοειδών αγγείων και αυξημένη αιματική ροή τοπικά, που αποτελούν βασική προϋπόθεση για την εγκατάσταση και την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου (Gouge και συν. 1998).

1.7.6.1. Αντιοξειδωτική άμυνα του πρώιμου εμβρύου και του περιβάλλοντός του

Στα έμβρυα των θηλαστικών ανιχνεύονται τα αντιοξειδωτικά ένζυμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) και της καταλάσης, καθώς και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η GSH. Η συγκέντρωσή τους ποικίλλει κατά είδος αλλά και ανά στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Guerin και συν. 2001).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος στο χοίρο, στην αίγα και στον ποντικό πραγματοποιείται στο στάδιο των 2 έως 4 κυττάρων, ενώ στο πρόβατο και στην αγελάδα στο στάδιο των 8 έως 16 κυττάρων (Parrish και First 1993, de Sousa και συν. 1998). Μέχρι το στάδιο αυτό, τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής προστασίας διατηρεί το mRNA, που κωδικοποιεί πληροφορίες για τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα και ουσίες που είναι αποθηκευμένα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου και προέρχονται από μεταγραφή ή σύνθεση κατά την περίοδο της ωρίμανσής του (Howlett και Bolton 1985).

Γενικά, θεωρείται ότι η αντιοξειδωτική άμυνα του εμβρύου μέχρι το στάδιο των 8 έως 16 κυττάρων είναι ελλιπής, αφού κάμπτεται ακόμα και σε περιπτώσεις ήπιων διαταραχών της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Gardiner και συν. 1998). Το έλλειμμα αυτό καλύπτεται εξωκυτταρικά από το υγρό του ωοθυλακίου, από το οποίο απελευθερώθηκε το ωάριο που γονιμοποιήθηκε, και από το υγρό του ωαγωγού. Συνολικά η εξωκυτταρική αντιοξειδωτική προστασία που παρέχεται στο έμβρυο κατά την

⁴ Κυρίως από την έντονη οξειδωτική φωσφορυλίωση και από την αυξημένη δραστηριότητα των οξειδασών NADPH και ξανθίνης (Nasr-Esfahani και συν. 1991, Guerin και συν. 2001).

ανάπτυξή του στον ωαγωγό αποδίδεται στην παρουσία των GSH, GPx, SOD, καταλάσης, τρανσφερρίνης, αλβουμίνης, ταυρίνης και υποταυρίνης, κυστεαμίνης, ασκορβικού, α-τοκοφερόλης, καροτινοειδών, οιστρογόνων, ουρικού οξέος, μελατονίνης (Brzezinski και συν. 1987, Guerin και συν. 2001).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών στα υγρά τόσο του ωοθυλακίου όσο και του ωαγωγού στα διάφορα είδη των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Όλα τα γνωστά αντιοξειδωτικά και ενδεχομένως άλλα, τα οποία δεν έχουν ακόμα απομονωθεί, προσδίδουν στα βιολογικά υγρά την ιδιότητα μιας δεξαμενής αντιοξειδωτικών, από όπου αντλείται προστασία με ρυθμό τέτοιο που να εξασφαλίζει την εκάστοτε απαιτούμενη οξειδοαναγωγική ισορροπία τόσο για την επιβίωση των γαμετών και τη γονιμοποίηση όσο και για την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη (Smith και συν. 1996).

Το έμβρυο στο στάδιο της βλαστικής κύστης, και ιδιαίτερα μετά από την εγκατάστασή του στη μήτρα, είναι λιγότερο ευάλωτο στην παρουσία των ROS, κυρίως διότι μπορεί πλέον, να συνθέτει αντιοξειδωτικά ένζυμα και GSH σε επαρκή για την άμυνά του επίπεδα (Gardiner και συν. 1998).

1.7.6.2. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στο έμβρυο

Η αυξημένη συσσώρευση ROS στο περιβάλλον του εμβρύου έχει αναφερθεί ότι προκαλεί βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες (Halliwell και Chirico 1993), κατακερματισμό του DNA των κυττάρων του (Halliwell και Aruoma 1991), ανώμαλες κυτταρικές διαιρέσεις (Goyanes και συν. 1990) και καθυστέρηση στην εμβρυική ανάπτυξη (Pabon και συν. 1989). Τέλος, επάγει αποπτωτικές διεργασίες που έχουν ως συνέπεια τον πρόιμο εμβρυικό θάνατο (Jurisicova και συν. 1996, Feugang και συν. 2003).

1.7.7. Άλλες δράσεις του *NO στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού ζώου

Η παρουσία του *NO έχει ανιχνευθεί στα επιθηλιακά κύτταρα και στο μυικό χιτώνα του ωαγωγού. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η απελευθέρωσή του κατά τόπους και σε μικρές ποσότητες συμβάλλει στην προαγωγή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Με δεδομένη την ικανότητά του να προκαλεί χάλαση των λείων μυικών ινών, μπορεί να του αποδοθεί ρόλος στον έλεγχο της συσπαστικότητας του ωαγωγού καθώς και στην κίνηση των κροσσών του επιθηλίου του. Με αυτά τα δεδομένα, το *NO θεωρείται ότι έχει σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση, την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη αλλά και στην προώθηση του εμβρύου προς τη μήτρα (Rosselli και συν. 1998).

Ακόμα, το *NO εντοπίστηκε στο ενδομήτριο και στο μυομήτριο. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα, το *NO μετέχει στη ρύθμιση της εκκριτικής δραστηριότητας του αδενικού επιθηλίου ασκώντας κυρίως έλεγχο στην αιματική ροή προς αυτό αλλά και στη συσπαστικότητα της μήτρας. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί αύξηση των συγκεντρώσεών του στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και μείωση στα τελευταία στάδιά της. Με βάση αυτά τα δεδομένα, το *NO φαίνεται ότι υποστηρίζει την κυοφορία και εμπλέκεται στον έλεγχο του τοκετού (Dixit και Parvizi 2001).

1.7.8. Παραγωγή εμβρύων *in vitro* και οξειδωτικό στρες

Η παραγωγή εμβρύων βοοειδών *in vitro* (IVP) περιλαμβάνει τρεις βασικές φάσεις: την ωρίμανση των ωαρίων *in vitro* (*in vitro* oocyte maturation, IVM), που αποσκοπεί στην ωρίμανση τόσο του πυρήνα όσο και του κυτταροπλάσματός τους, την γονιμοποίησή τους *in vitro* (*in vitro* fertilization, IVF) και την καλλιέργεια των γονιμοποιημένων ωαρίων *in vitro* (*in vitro* embryo culture, IVC) συνήθως μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης, ώστε να ακολουθήσει η μεταφορά τους σε ζώα δέκτες. Η IVP διενεργείται κάτω από ειδικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, με τη χρήση ειδικών τυποποιημένων υποστρωμάτων, σε επώασεις μέσα σε κλιβάνους με συγκεκριμένη θερμοκρασία 38,5 έως 39 °C και ειδική ατμόσφαιρα, όπως 5% CO₂ σε αέρα (συνήθως για την IVM) και 5% CO₂, 5 έως 10% O₂ και 90 έως 85% N₂ (συνήθως για IVF και IVC), υγρασία >95%. Η διάρκεια κάθε φάσης είναι: από 18 μέχρι 24 ώρες προκειμένου για την IVM και την IVF (Wang και συν. 1992, De Azambuja και συν. 1993, Gordon 1994) και από 24 ώρες μέχρι 7 έως 8 ημέρες προκειμένου για την IVC (Gradl 1988). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τεχνικές που βρίσκουν εφαρμογή στην IVP ποικίλλουν ανά εργαστήριο, ενώ δοκιμάζεται συνεχώς η αποτελεσματικότητα τροποποιήσεων τόσο στη σύνθεση των υποστρωμάτων, όσο και στις συνθήκες επώασης.

Κατά τη διενέργεια των IVM, IVF και IVC υπάρχουν μερικώς, απώλειες σε ωάρια και σε πρώιμα έμβρυα λόγω κυτταρικού θανάτου που μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην επίδραση του οξειδωτικού στρες (Yang και συν. 1998, Tatamoto και συν. 2000). Έχει διαπιστωθεί ότι η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών σε κάποιο από τα στάδια της IVP, όπως για παράδειγμα της βιταμίνης C, στα υποστρώματα της IVM (Tatamoto και συν. 2001), ή της GSH, στα υποστρώματα της IVF (Boquest και συν. 1999), ή της ταυρίνης (Li και συν. 1993), υποταυρίνης (Fujitani και συν. 1997) ή βιταμίνης E (Olson και Seidel 2000), στα υποστρώματα της IVC, συμβάλλει στη βελτίωση των ποσοστών γονιμοποίησης ή και πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της IVP αποτελεί τη συνισταμένη κυρίως δύο επιμέρους παραμέτρων:

- i) Η παραγωγή ROS. Λόγω έκθεσης των γαμετών και των εμβρύων σε συνθήκες με υψηλή μερική συγκέντρωση οξυγόνου (Kitagawa και συν. 2004) και παρουσία φωτός (Nakayama και συν. 1994) παρατηρείται υπερβολική παραγωγή ROS. *In vivo*, τόσο οι γαμέτες όσο και τα έμβρυα βρίσκονται σε περιβάλλον με συγκέντρωση οξυγόνου που αποτελεί το ένα τρίτο αυτής που επικρατεί κατά τους χειρισμούς *in vitro* στο εργαστήριο ή εντός των κλιβάνων επώασης. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με λιγότερους δυνατούς χειρισμούς, με επικάλυψη των υποστρωμάτων της IVP με παραφινέλαιο (Gordon 1994) και με μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στους κλιβάνους, ιδιαίτερα στα στάδια της IVF και της IVC, σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα που παρατηρούνται *in vivo* (5 έως 10%) (Fisher και Bavister 1993).
- ii) Τα επίπεδα αντιοξειδωτικής προστασίας που παρέχουν τα υποστρώματα της IVP. Κατά τη διάρκειά της, τόσο οι γαμέτες, όσο και τα έμβρυα προστατεύονται από τις οξειδώσεις με ενδοκυτταρικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Επίσης, προστατεύονται από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που προστίθενται τα υποστρώματα, όπως είναι οι εξής: το ερυθρό της φαινόλης, HEPES, η γλυκόζη, η αλβουμίνη (Alvarez και Storey, 1983, Ermilov και συν. 1999), το πυροσταφυλικό οξύ σε συνδυασμό ή όχι με γαλακτικό οξύ (de Lamirande και Gagnon 1992)

κ.λπ.. Δεν είναι ακόμα γνωστό όμως, εάν η συνολική ικανότητα των τυποποιημένων υποστρωμάτων να παρέχουν αποτελεσματική αντιοξειδωτική προστασία στους γαμέτες και τα έμβρυα είναι επαρκής.

1.8. Σκοπός της διατριβής

Με βάση τα ευρήματα που παρατέθηκαν, γίνεται αντιληπτό ότι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στα βιολογικά συστήματα διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινομένου της ζώης. Αναφορικά με την αναπαραγωγή, συνάγεται ότι οι εκάστοτε οξειδοαναγωγικές συνθήκες που επικρατούν φυσιολογικά υποστηρίζουν τις λειτουργίες που σχετίζονται με την ωρίμανση του ωαρίου, τη γονιμοποίησή του από ενεργοποιημένο σπερματοζώαριο και την ανάπτυξη του εμβρύου που προκύπτει.

Ακόμα, αναφέρθηκε ότι η χαμηλή απόδοση της IVP μπορεί να οφείλεται στο οξειδωτικό στρες που είναι δυνατό να υποστούν τόσο οι γαμέτες όσο και τα έμβρυα κυρίως στα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους. Το γεγονός ότι η επιπλέον προσθήκη αντιοξειδωτικών σε κάποιο από τα υποστρώματα της IVP, έστω και αν οι συγκεντρώσεις τους επιλέγονται αυθαίρετα, εμπειρικά ή ενδεικτικά (Li και συν. 1993, de Matos και συν. 1996, Boquest και συν. 1999, Ali και συν. 2003), βελτιώνει την απόδοσή της, υποδηλώνει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα (A.I.) των υποστρωμάτων υπολείπεται εκείνης των αντίστοιχων βιολογικών υγρών (υγρό του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, υγρό του ωαγωγού περί τον οίστρο) (Guerin και συν. 2001).

Παρόλο που υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη δραστηριότητα ποικίλων αντιοξειδωτικών ενζύμων ή τη συγκέντρωση πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών στα παραπάνω βιολογικά υγρά, ωστόσο λείπουν πληροφορίες αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα (A.I.) των υγρών αυτών. Εξαίρεση αποτελούν μόνον οι μελέτες της A.I. του ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υπόκεινται σε εξωσωματική γονιμοποίηση λόγω διαφόρων προβλημάτων γονιμότητας σε σχέση με την *in vitro* γονιμοποίηση του ωαρίου και τη βιωσιμότητα του παραγόμενου εμβρύου (Attaran και συν. 2000, Oyawoye και συν. 2003, Pasqualotto και συν. 2004). Ακόμα, αναφέρεται η μελέτη της A.I. του υγρού των ωοθυλακίων βουβάλων σε σχέση με τη διάμετρο των ωοθυλακίων και τη μορφολογία των ωαρίων (Cassano και συν. 1999). Τέλος, υπάρχει ένδεια δεδομένων που να αφορούν στην A.I. των υποστρωμάτων της IVP, εκτός από την παρατηρούμενη μείωση της A.I. του υποστρώματος όταν καλλιεργούνται χαμηλής βιωσιμότητας έμβρυα σε αυτό (Paszkowski και Clarke 1996).

Συνεπώς, κρίθηκε σκόπιμο:

1. να προσδιοριστεί η A.I. των υγρών του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου και του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο καθώς και των υποστρωμάτων της IVM, της IVF και της IVC,
2. να προσομοιωθεί η A.I. των *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες με την προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών
3. να μελετηθεί η επίδραση της προσομοίωσης αυτής στην απόδοση της IVP σε όλα τα στάδιά της.

Επιπλέον, και με δεδομένο ότι η χρήση της IVP σε παραγωγική βάση απαιτεί μέγιστη αποτελεσματικότητα και χρήση της ελάχιστης διάρκειας επώασης των IVM και IVF, μελετήθηκε η προσομοίωση αυτή σε επώασεις 18ωρης διάρκειας στην IVM και στην IVF.

Έτσι, επιχειρήθηκε μια συνεισφορά στις προσπάθειες τυποποίησης των υποστρωμάτων στο βαθμό που να προσεγγίζουν τις αντίστοιχες συνθήκες *in vivo* και ειδικότερα τις απαιτήσεις σε αντιοξειδωτική προστασία. Η προσέγγιση των συνθηκών *in vivo* φαίνεται ότι αποτελεί την ικανή και αναγκαία συνθήκη για την επίτευξη των βέλτιστων αποδόσεων της IVP (Kruip και συν. 2000).

Τα αντιοξειδωτικά που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό είναι το γουαϊαζουλένιο (guaiiazulene) και η μελατονίνη. Το γουαϊαζουλένιο (1,4-διμεθυλ-7-ισοπροπυλαζουλένιο) αποτελεί συστατικό του εκχυλίσματος των ειδών χαμομηλιού *Guajacum officinale* (Zygophyllaceae) και *Marticaria chamomilla* (Asteraceae), είναι μη τοξικό προϊόν, ευρέως διαδεδομένο στη φύση. Επιπλέον, είναι λιπόφιλη ουσία, εύκολα διαθέσιμη, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, στην οποία αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό οι αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές και αντιελκωτικές ιδιότητές της, που παρουσιάζει στον άνθρωπο (Yanasigawa και συν. 1990). Έτσι, καταδείχθηκε τόσο ότι εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και κυρίως τη HO[•], που θεωρείται και η πιο κυτταροτοξική, όσο και ότι αδρανοποιεί τις υπεροξειδικές και αλκοξειδικές ρίζες αναστέλλοντας έτσι τη λιπιδική υπεροξείδωση των μεμβρανών. Μάλιστα, σε καταστάσεις πρόκλησης οξειδωτικού στρες σε ήπαρ επίμυων, εξουδετερώνει τους προ-οξειδωτικούς παράγοντες και διατηρεί τα επίπεδα GSH σε φυσιολογικές τιμές, εύρημα που έμμεσα υποδηλώνει την αποτελεσματική αντιοξειδωτική προστασία που παρέχει στα ηπατοκύτταρα (Kourounakis και συν. 1997).

Η μελατονίνη (N-ακετυλο-5-μεθοξυ-τροπταμίνη) είναι μία ορμόνη που παράγεται κυρίως στα κύτταρα της επίφυσης αλλά και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στον εντερικό σωλήνα, στην ωοθήκη. Αποτελεί παράγωγο του αμινοξέος τροπτοφάνη, με ενδιάμεσο προϊόν τη σεροτονίνη. Η μελατονίνη στερείται τοξικότητας, ακόμα και όταν χορηγείται σε φαρμακολογικές δόσεις, σε αντιδιαστολή με πολλά εξωγενή αντιοξειδωτικά, που πάνω από έναν συγκεκριμένο ουδό γίνονται τοξικά (Reiter και συν. 1994).

Η μελατονίνη έχει πολλαπλές αντιοξειδωτικές δράσεις, πολλές από τις οποίες μόνον πρόσφατα άρχισαν να γίνονται αντιληπτές. Έτσι:

- Έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει όλο σχεδόν το φάσμα των ROS [O₂^{•-} (Zhang και συν. 1998), H₂O₂ (Burkhardt και συν. 2001), HOCl (Dellegar και συν. 1999), ROO[•] (Pieri και συν. 1994), καθώς και τα ιδιαίτερος τοξικά ONOO⁻ (Zhang και συν. 1998), HO[•] (Tan και συν. 1993)] αλλά και το [•]NO (Mahal και συν. 1999).
- Ενισχύει τη δραστηριότητα των περισσότερων και σημαντικότερων από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η SOD, η καταλάση, η υπεροξειδάση (GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRd). Μάλιστα, επειδή τα δύο τελευταία ένζυμα συμμετέχουν στην ανακύκλωση της GSH, η μελατονίνη επιτυγχάνει την ομοιόστασή της, ενώ παράλληλα προάγει τη σύνθεσή της αφού ενεργοποιεί το υπεύθυνο για το σκοπό αυτό ένζυμο, δηλαδή τη συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης (Reiter και συν. 2000, Mayo και συν. 2002, Rondriguez και συν. 2004).
- Μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα των NOS (Pozo και συν. 1997 και Crespo και συν. 1999), μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή [•]NO.
- Αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και προάγει την απόδοση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Με αυτό τον τρόπο:

- i) αυξάνεται η σύνθεση του ATP, που είναι απαραίτητο για όλες σχεδόν τις κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αφορούν στην αποκατάσταση βλαβών που υπέστησαν τα μακρομόρια σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες (Martin και συν. 2001),
- ii) περιορίζεται η δυνατότητα διαφυγής ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα, γεγονός που σημαίνει ότι δυνητικά μειώνεται η παραγωγή ROS (Reiter και συν. 2000).
- Εκδηλώνει συνεργική δράση με την ταυτόχρονη παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών, όπως της βιταμίνης C, της βιταμίνης E και της GSH (Gitto και συν. 2001). Επιπλέον, σε συγκριτικές δοκιμές με αυτά, η μελατονίνη έχει αποδεδειγμένα αποτελεσματικότερη αντιοξειδωτική δράση (Tan και συν. 2002).
- Ενώ τα περισσότερα αντιοξειδωτικά κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι δυνατό να εκδηλώσουν προ-οξειδωτική δράση, αυτό δεν έχει διαπιστωθεί στην περίπτωση της μελατονίνης (Tan και συν. 2000).

Στην αποτελεσματική δράση της ως αντιοξειδωτικό συνηγορούν και το μικρό μοριακό βάρος της καθώς και ότι είναι αμφιδιαλυτή ουσία, δηλαδή υδατοδιαλυτή και λιποδιαλυτή (Shida και συν. 1994). Οι ιδιότητες αυτές της επιτρέπουν να διέρχεται απρόσκοπτα τις κυτταρικές μεμβράνες και να έχει άμεση πρόσβαση σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα ή κυτταρικό οργανίδιο καθώς και στον πυρήνα των κυττάρων (Menendez-Pelaez και Reiter 1993).

Αξιοσημείωτη είναι και η ορμονική δράση της, όπως και ο αντίκτυπός της στις διεργασίες της αναπαραγωγής. Πιο συγκεκριμένα, ο κερκάδιος ρυθμός έκκρισής της (μόνο τη νυχτερινή περίοδο του 24ώρου) αντικατοπτρίζει τις μεταβολές του φωτοπεριοδισμού (σχέση φωτός-σκότους κατά τη διάρκεια του 24ώρου), όπως αυτές «ανιχνεύονται» από τον αμφιβληστροειδή χιτώνα των οργανισμών και μεταφέρονται στην επίφυση. Στη συνέχεια, η μελατονίνη αναλαμβάνει το ρόλο της προσαρμογής των διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών των οργανισμών βάσει αυτών των μεταβολών (βιορυθμός). Έτσι, ρυθμίζει σε σημαντικό βαθμό τις ημερήσιες και κατ' επέκταση τις εποχικές επιδράσεις στην αναπαραγωγική λειτουργία (ιδιαίτερα εμφανείς στο πρόβατο και στον ίππο), στο μεταβολισμό και στο σωματικό βάρος. Επιπλέον, η μελατονίνη επηρεάζει την έκκριση των ορμονών του θυρεοειδούς, το ανοσολογικό σύστημα, τους μηχανισμούς θερμορρύθμισης και τον ύπνο, ενώ η σταδιακή μείωση της δραστηριότητάς της σχετίζεται με τη γήρανση του οργανισμού (Σμοκοβίτης 1993).

Επιπρόσθετα, η μελατονίνη επιδρά στη λειτουργία των ωοθηκών έμμεσα και έμμεσα. Στην πρώτη περίπτωση αυτό επιτυγχάνεται με την εμπλοκή της στη ρύθμιση της απελευθέρωσης της GnRH από τον υποθάλαμο (Martin και Sattler 1982), αλλά και στους μηχανισμούς λειτουργίας της υπόφυσης για παραγωγή και έκκριση της LH, οι οποίοι βασίζονται στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP και των Ca^{+2} (Vanecsek 1995).

Σε ό,τι αφορά στην απευθείας δράσης της στις ωοθήκες, εντοπίστηκε 3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση μελατονίνης στο υγρό του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου συγκριτικά με τον ορό του αίματος σε γυναίκες (Brzezinski και συν. 1987), που μάλιστα παρουσίαζε κερκάδια και εποχική διακύμανση (Ronnberg και συν. 1990, Yie και συν. 1995). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι το ωοθυλάκιο αποτελεί εστία εκλεκτικής συγκέντρωσης της μελατονίνης. Ακόμα, μέσω υποδοχέων της στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών-ωχρινικών κυττάρων (Niles και συν. 1999, Woo και συν. 2001) ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων για τους υποδοχείς της LH και GnRH. Επιπλέον ενισχύει την

παραγωγή προγεστερόνης είτε άμεσα (Webley και Luck 1986, Baratta και Tamanini 1992), είτε με τη συνεργική δράση της hCG (Brzezinski, 1991, Baratta και Tamanini 1992). Δε διαπιστώθηκε η επίδρασή της στην παραγωγή οιστραδιόλης (Webley, 1986, Baratta, 1992) σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων ανθρώπου (Brzezinski, 1991, Webley και Luck 1986), αγελάδας (Webley και Luck 1986) και προβάτου (Baratta και Tamanini 1992). Αντίθετα, σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επιμύων ενισχύει επιπλέον και την παραγωγή οιστρογόνων (Fiske και συν. 1984).

Επίσης, η μελατονίνη ανταγωνίζεται την καλμοδουλίνη, μία πρωτεΐνη που βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα (Turjanski και συν. 2004). Στην ενεργοποίησή της βασίζεται η δραστηριότητα πολλών ενζύμων, μεταξύ των οποίων οι φωσφοδιεστεράσες που αποικοδομούν το cAMP (Benitez-King και συν. 1991), η πρωτεϊνική κινάση της καλμοδουλίνης II (calmodulin-dependent protein kinase II, CamKII) (Benitez-King και συν. 1996, Markoulaki και συν. 2004) και η PKC (Luria και συν. 2000), τα οποία ασκούν ποικίλες δράσεις στα κύτταρα. Η αναστολή της δραστηριότητας των eNOS και nNOS που προκαλεί η μελατονίνη υποστηρίζεται ότι επιτυγχάνεται μέσω του ανταγωνισμού της με την καλμοδουλίνη (Reiter και συν. 2000).

Έχουν αποδοθεί στη μελατονίνη και κυτταροστατικές ιδιότητες (Tamarkin και συν. 1981). Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις (0,2 έως 0,4 nM) η μελατονίνη υποστηρίζει και ενισχύει τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασματοσυνδέσεων σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων μυών (Blackman και συν. 2001). Οι χασματοσυνδέσεις μεταξύ των κυττάρων θεωρούνται απαραίτητες για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Loewenstein 1979).

Η μελατονίνη σε φαρμακολογικά (10^{-9} M, Kanishi και συν. 2000) ή και σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα (10^{-2} M, Kojima και συν. 1997) παρουσιάζει ισχυρή κυτταροστατική δράση που μπορεί να αποδοθεί σε απευθείας επίδραση της μελατονίνης σε κυτταρικούς υποδοχείς, που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη (Dubocovich και συν. 1999) ή στον πυρήνα (Acuna-Castroviejo και συν. 1994, Rato και συν. 1999).

Σχετικά πρόσφατα εντοπίστηκαν υποδοχείς της μελατονίνης στον πυρήνα (Wiesenberg και συν. 1995). Επειδή αυτοί οι υποδοχείς ουσιαστικά αποτελούν τους παράγοντες που προάγουν τη μεταγραφή για ορισμένα γονίδια του γενετικού υλικού, θεωρείται ότι η μελατονίνη συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασής τους. Έτσι, επηρεάζει διάφορες λειτουργίες, μερικές μόνο από τις οποίες έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα, όπως η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, η διαφοροποίηση των νευρώνων και των μυικών κυττάρων, αλλά και γενικότερα η κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός καθώς και ο έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης (Smirnov 2001). Η τελευταία λειτουργία έχει μελετηθεί περισσότερο, αφού η μελατονίνη μέσω της επίδρασής της στους πυρηνικούς της υποδοχείς αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου και κατ' επέκταση τη δραστηριότητα της λιποοξυγονάσης, που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των λευκοτριενίων, στα Β λεμφοκύτταρα (Wiesenberg και συν. 1998). Στα Τ λεμφοκύτταρα μειώνει την παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), ενώ αντίθετα στα μακροφάγα επάγει τη σύνθεση IL-2 και IL-6. Οι δράσεις αυτές αποκαλύπτουν τη σπουδαιότητα της μελατονίνης και των χημικών αναλόγων της ως πιθανά θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων, ενώ παράλληλα διανοίγονται ευοίωνες προοπτικές για τη χρήση τους ως ασφαλή και αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα (Missbach και συν. 1996).

Στην παρούσα μελέτη, η μελατονίνη επιλέχθηκε με κριτήριο την αντιοξειδωτική της ιδιότητα και με βάση αυτή διερευνήθηκε η επίδρασή της στα επιμέρους στάδια της IVP. Για την πληρέστερη εκτίμηση αυτής της επίδρασης επιχειρήθηκε η προσομοίωση του κερκάρδιου τρόπου δράσης της *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Προσομοίωση της Α.Ι.

2.1.1. Υλικά

Το γουαϊαζουλένιο (1,4-διμεθυλ-7-ισοπροπυλαζουλένιο) και το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) προέρχονταν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Chemical (Γερμανία), ενώ η μελατονίνη, το ασκορβικό οξύ και ο δισθενής θειικός σίδηρος από την εταιρεία Merck (Γερμανία).

2.1.2. Συλλογή βιολογικών υγρών

Για τον προσδιορισμό της Α.Ι. των βιολογικών υγρών (των προωθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων και των ωαγωγών) χρησιμοποιήθηκαν 10 αγελάδες φυλής Holstein, ηλικίας 4 έως 5 ετών. Όλα τα ζώα ήταν υγιή και δεν παρουσίαζαν κάποιο πρόβλημα στο γεννητικό τους σύστημα. Ο οίστρος προκλήθηκε με την τοποθέτηση ενδοκολπικών σπειραμάτων απελευθέρωσης προγεστερόνης (PRID) (Ceva, Γαλλία), από τα οποία αφαιρέθηκε η κάψουλα των οιστρογόνων. Τα σπειράματα παρέμειναν *in situ* για 11 ημέρες και τη δεύτερη ημέρα μετά την αφαίρεσή τους τα ζώα οδηγήθηκαν στο βιομηχανικό σφαγείο της Χαλάστρας του Νομού Θεσσαλονίκης.

Οι ωοθήκες και οι ωαγωγοί, που συλλέχθηκαν από τα ζώα αυτά, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 20 έως 30', συντηρούμενα σε θερμοκρασία 15 °C. Ακολούθησε η αναρρόφηση του κυρίαρχου (προωθυλακιορρηκτικού) ωοθυλακίου (διαμέτρου >1,5 cm) από κάθε αγελάδα με σύριγγα μιας χρήσης στην οποία είχε προσαρμοστεί βελόνα 21 G. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν οι ομόπλευροι με τα κυρίαρχα ωοθυλάκια ωαγωγοί από κάθε ζώο και εκπλύθηκαν εσωτερικά με 1 ml PBS (κεφάλαιο 2.2.7.3.).

Κάθε δείγμα διηθήθηκε μέσω ηθμού μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0,22 μm (Millipore). Τέλος, όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

2.1.3. Προετοιμασία δειγμάτων των υποστρωμάτων της IVP

Η παρασκευή τόσο των τυποποιημένων όσο και των τροποποιημένων υποστρωμάτων με την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου ή της μελατονίνης γινόταν την ημέρα της ανάλυσής τους και όπως περιγράφεται στην ενότητα των πειραματισμών της IVP. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών, που να εξασφαλίζουν Α.Ι. στα υποστρώματα ανάλογη εκείνης των αντίστοιχων με αυτά βιολογικών υγρών, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις τους στα υποστρώματα.

2.1.4. Προετοιμασία ηπατικού μικροσωματικού κλάσματος

Για την παρασκευή των ηπατικού μικροσωματικού κλάσματος με τη μέθοδο που περιγράφουν οι Chrysselis και συν. (2000) χρησιμοποιήθηκαν υγιείς αρσενικοί επίμυες φυλής Fischer-344, βάρους 220 έως 280 g. Συγκεκριμένα, το ήπαρ από τους επίμυες αφαιρέθηκε χειρουργικά και ομογενοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα 1,15% KCl, ώστε να αντιστοιχούν 250 mg ήπατος ανά ml, και φυγοκεντρήθηκε (9000 g, 4 °C, 20') για να

απαλλαγεί από υπολείμματα κυτταρικών μεμβρανών, πυρήνες, μιτοχόνδρια και λυσοσωμάτια. Το υπερκείμενο διάλυμα (μεταμιτοχονδριακό κλάσμα) φυγοκεντρήθηκε (110.000 g, 4 °C, 60') για να ληφθεί μικροσωματικό κλάσμα (ίζημα), ενώ ακολούθησε έκπλυσή του με αραιώση, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), που περιείχε 150 mM KCl, και φυγοκέντρωση (110.000 g, 4 °C, 60'). Στο μικροσωματικό κλάσμα προστέθηκε αντίστοιχος με τον αρχικό όγκος ρυθμιστικού διαλύματος Tris (pH 7,4), ομογενοποιήθηκε και συντηρήθηκε στους -80 °C.

2.1.5. Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης *in vitro*

Η Α.Ι. κάθε δείγματος βιολογικών υγρών και τυποποιημένων ή τροποποιημένων υποστρωμάτων της IVP υπολογίστηκε με βάση την ικανότητά του να αναστέλλει την προκαλούμενη λιπιδική υπεροξειδωση των ηπατικών μικροσωματικών μεμβρανών, όπως περιγράφεται από τους Kourounakis και συν. (1999). Σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl/KCl (50 mM/150 mM, pH 7,4) γινόταν προσθήκη μικροσωματικού εναιωρήματος, ενζυμικά αδρανοποιημένου (90 °C για 90'), ώστε να αντιστοιχούν 2,5 mg μικροσωματικής πρωτεΐνης ανά ml (ή 4 mM λιπαρών οξέων) τελικού μείγματος επώασης, ασκορβικού οξέος (0,2 mM), που προηγουμένως είχε εξουδετερωθεί με διάλυμα KOH, και ακολούθως του δείγματος σε συγκέντρωση 6,7% v/v στο τελικό μείγμα επώασης. Η αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης άρχιζε με την προσθήκη FeSO₄ (10 μM). Το μείγμα επωαζόταν στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση και απρόσκοπτη κυκλοφορία του αέρα σε αυτό, επί 45'. Σε τακτικά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη ποσότητας (0,3 ml) από το κάθε μείγμα επώασης και μεταφερόταν σε 2 ml ψυχρού διαλύματος 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος (3 mM), που περιείχε τριχλωροξικό οξύ (1,03 M), υδροχλωρικό οξύ (130 mM) και βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT, 0,68 mM). Η λιπιδική υπεροξειδωση υπολογιζόταν φασματοφωτομετρικά (535nm-600nm) με τον προσδιορισμό του αντιδρώντος με 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ προϊόντος. Από τη σύγκριση της πορείας της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τον αντίστοιχο πάντα μάρτυρα (H₂O στη θέση του δείγματος) της μεθόδου εξαγόταν η Α.Ι. κάθε δείγματος. Κάτω από τις προαναφερόμενες συνθήκες πειραματισμών το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO), που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για το γουαϊάζουλένιο, εξετάστηκε και χωριστά μέσα σε κάθε υπόστρωμα και δεν παρενέβη στην ακολουθούμενη μέθοδο ή στα αποτελέσματα αυτής.

2.2. Παραγωγή εμβρύων *in vitro* (IVP)

2.2.1. Συλλογή ωοθηκών –ωαρίων

Για τις ανάγκες των πειραματισμών αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες μοσχίδων και αγελάδων φυλής Holstein μετά από σφαγή τους στα βιομηχανικά σφαγεία Χαλκηδόνας και Χαλάστρας του Νομού Θεσσαλονίκης. Οι ωοθήκες συλλέγονταν ανεξάρτητα από το στάδιο του οιστρικού κύκλου, την ηλικία και την αιτία σφαγής των ζώων. Δεν χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες ζώων προσβεβλημένων από φυματίωση ή βρουκέλλωση.

Η συλλογή των ωοθηκών γινόταν με λήψη όλων των μέτρων ασηψίας αμέσως μετά την ανάρτηση των σφαγίων και τη διάνοιξη της κοιλιακής τους κοιλότητας. Το

χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε από τη σφαγή (αφαίμαξη) του ζώου μέχρι και τη συλλογή των ωθηκών του κυμαινόταν μεταξύ 40' έως 50'.

Οι ωθήκες τοποθετούνταν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε υπόστρωμα έκπλυσης (κεφάλαιο 2.2.7.3.), σε θερμοκρασία 25 έως 30 °C. Το pH του διαλύματος ήταν 7,2 και η ωσμωτική πίεσή του κυμαινόταν μεταξύ 285 και 295 mOsm. Μετά το τέλος της συλλογής οι ωθήκες μεταφέρονταν στο εργαστήριο σε χρόνο που κυμαινόταν μεταξύ 20' και 30'.

Οι χειρισμοί που ακολουθούσαν έγιναν σύμφωνα με όσα περιγράφουν οι Lutterbach και συν. (1987), Βαϊνάς και συν. (1994) και Lonergan και συν. (1999). Αρχικά επιδιωκόταν μείωση του εξωτερικού μικροβιακού φορτίου των ωθηκών. Για το σκοπό αυτό, οι ωθήκες υποβάλλονταν σε τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με υπόστρωμα έκπλυσης. Ακολουθούσε η συλλογή των συμπλεγμάτων ωαρίου-ωοφόρου δίσκου (cumulus-oocyte complexes, COCs), από μη ατρητικά ωοθυλάκια διαμέτρου από 2 έως 8 mm με αναρρόφηση του περιεχομένου τους. Η επιλογή των μη ατρητικών ωοθυλακίων στηριζόταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως, η καλή ανάπτυξη αγγείωσης του τοιχώματός τους και η διαύγειά τους (Hendriksen και συν. 2000).

Οι αναρροφήσεις γίνονταν με συσκευή αναρρόφησης που δημιουργούσε υποπίεση (100 mm Hg), στην οποία προσαρμοζόταν σωλήνας αναρρόφησης που στη μία άκρη είχε βελόνη 18 G, ενώ το περιεχόμενο κατέληγε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν 1 ml υποστρώματος έκπλυσης και διατηρούνταν σε υδατόλουτρο (37 °C). Το περιεχόμενο από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφερόταν σε τρυβλίο Petri ιστοκαλλιέργειας διαμέτρου 10 cm. Ακολουθούσε, υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (×75) και σε στείρο περιβάλλον θαλάμου οριζόντιας νηματικής ροής, αρχικά η εντόπιση και στη συνέχεια η εκτίμηση της ποιότητας των συλλεχθέντων COCs.

Η εκτίμηση της ποιότητας του κάθε COC γινόταν με βάση τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Για τους πειραματισμούς αυτής της μελέτης επιλέγονταν μόνο τα ωάρια με λεπτόκοκκο και ομοιογενές κυτταρόπλασμα που περιβαλλόταν από ισχυρά προσκολλημένο ακέραιο και συμπαγή ωοφόρο δίσκο (κατηγορία A κατά Leibfried και First 1979).

Ακολουθούσε η διαδοχική δίοδος των ωαρίων, που επιλέγονταν ως κατάλληλα για ωρίμανση *in vitro*, από 2 τρυβλία διαμέτρου 3 cm, που περιείχαν 3 ml υποστρώματος ωρίμανσης (κεφάλαιο 2.2.2.).

Η συνολική διάρκεια των χειρισμών αυτών κυμαινόταν από 60' έως 90'.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3.478 ωθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν 30.922 αναρροφήσεις ωοθυλακίων (8,9 αναρροφήσεις ανά ωθήκη) και συλλέχθηκαν 18.142 (ποσοστό συλλογής 58,7%) COCs, από τα οποία 8.655 (2,49 κατάλληλα ωάρια ανά ωθήκη) επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στους πειραματισμούς αυτής της μελέτης.

2.2.2. Ωρίμανση ωαρίων *in vitro* (*in vitro* oocyte maturation, IVM)

Τα COCs που επιλέγονταν ως κατάλληλα για ωρίμανση *in vitro* χωρίζονταν τυχαία σε ομάδες των 15 έως 20 και τοποθετούνταν σε χωριστά βοηθία των ειδικών τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας (τεσσάρων βοηθίων χωρητικότητας 1 ml ανά βοηθίο, Nunclon, Nunc, Δανία), που περιείχαν είτε το τυποποιημένο (μάρτυρας), είτε το τροποποιημένο με προσθήκη αντιοξειδωτικού υπόστρωμα ωρίμανσης.

Η ωρίμανση των ωαρίων γινόταν σε κλίβανο δύο αερίων. Τα COCs επωάζονταν για 18 ή 24 ώρες σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν. 1994, Lonergan και συν.1999).

2.2.3. Εκτίμηση της ωρίμανσης των ωαρίων με βάση την ωρίμανση του πυρήνα τους

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της προσομοίωσης της Α.Ι. των *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (Gradl 1988, Κίνης και συν. 1989, Βαϊνάς και συν. 1994):

- Τα ωάρια, μετά το τέλος της IVM, απογυμνώνονταν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που τα περιέβαλαν με μεταφορά τους σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 2,96 % (w/v) και ανακίνησης για 4' περίπου.
- Αμέσως μετά, τα απογυμνωμένα ωάρια μεταφέρονταν σε τρυβλίο που περιείχε 3 ml υπότονου διαλύματος KCl (0,075 M), στο οποίο και παρέμεναν για 7' σε θερμοκρασία 37 °C, προκειμένου να διευρυνθεί η απόσταση μεταξύ των χρωματοσωμάτων τους.
- Στη συνέχεια, τα ωάρια μεταφέρονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία γινόταν προσθήκη, στάγδην και υπό στερεοσκοπική παρατήρηση, μονιμοποιητικού διαλύματος (οξικό οξύ/ μεθανόλη 1:3, v/v), μέχρι να επιτευχθεί η διάλυση της διαφανούς ζώνης και η σταθεροποίησή τους στην αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου και αφήνονταν για μονιμοποίηση.
- Περίπου 24 ώρες αργότερα γινόταν χρώση των παρασκευασμάτων με διάλυμα ορκεΐνης 2% (κεφάλαιο 2.2.7.5.).

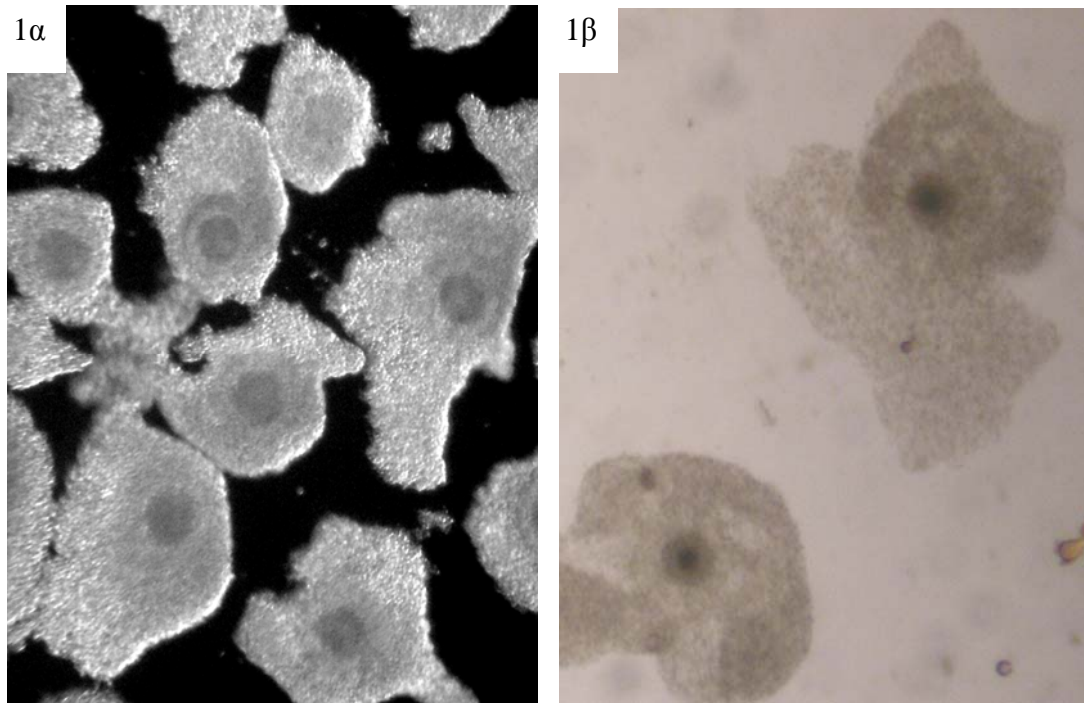
Η εκτίμηση της εξέλιξης της ωρίμανσης του πυρήνα γινόταν σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού. Κατά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων (μεγέθυνση ×1000) ο πυρήνας των ωαρίων αναμενόταν να βρίσκεται σε ένα από τα παρακάτω στάδια:

- Πρόφαση I (PI)
- Μετάφαση I (MI)
- Ανάφαση I (AI)
- Τελόφαση I (TI)
- Μετάφαση II (MII).

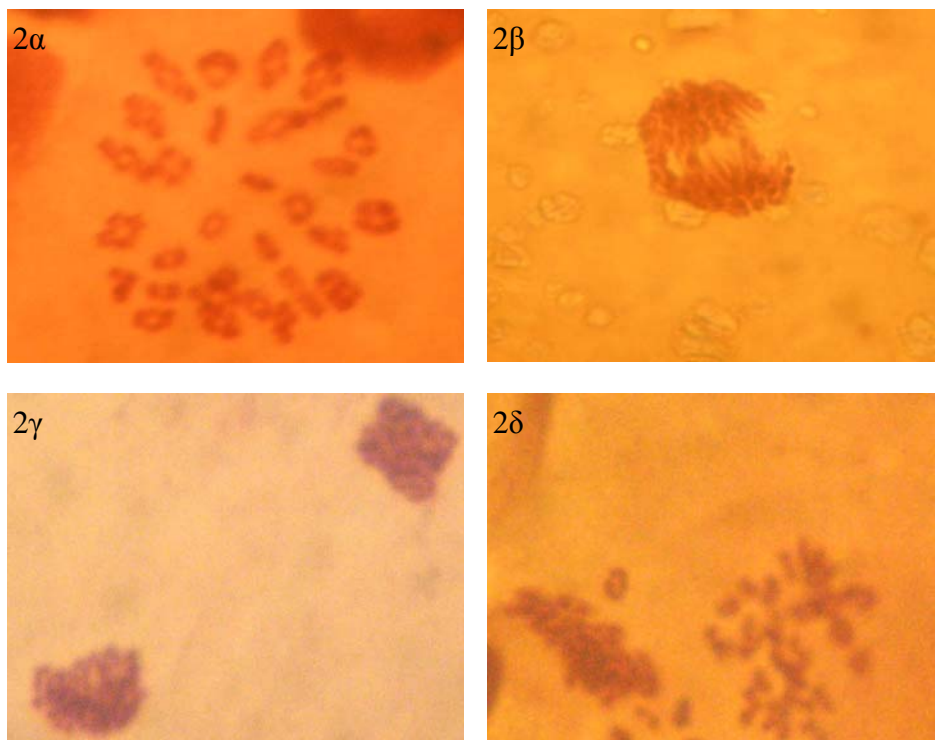
Ως ώριμα θεωρούνταν τα ωάρια που βρίσκονταν στο στάδιο είτε στο στάδιο της μετάφασης II, είτε της τελόφασης I (Leibfried-Rutledge και συν. 1986, Chian και συν. 1992, Dominko και First 1997). Τα ωάρια, στα οποία δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί το στάδιο εξέλιξης του πυρήνα τους, χαρακτηρίζονταν ως αδιευκρίνιστα. Στις φωτογραφίες 1 και 2 απεικονίζονται τα βασικά στάδια της IVM, όπως αυτά παρατηρήθηκαν κατά τους πειραματισμούς αυτής της εργασίας και χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της IVM.

2.2.4. Προετοιμασία του σπέρματος

Σε όλους τους πειραματισμούς που αφορούσαν στη γονιμοποίηση *in vitro* χρησιμοποιήθηκε κατεψυγμένο σπέρμα μιας σπερματοληψίας ενός ταύρου φυλής Holstein («Ηγεμών») του Ινστιτούτου Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης Θεσσαλονίκης, αποδεδειγμένης *in vivo* γονιμοποιητικής ικανότητας (Το ποσοστό μη επιστροφών σε οίστρο των αγελάδων, 60 ημέρες μετά από τη σπερματέγχυση με σπέρμα της συγκεκριμένης παρτίδας ήταν κατά μέσο όρο 72,4%). Η ζωτικότητα και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων του πριν από την κατάψυξη ήταν 75% και 4,



Φωτογραφία 1. Ωάρια πριν από την έναρξη της IVM (1α), και μετά από την IVM (1β), όπου διακρίνεται η επέκταση του ωοφόρου δίσκου (μεγέθυνση $\times 100$).



Φωτογραφία 2. Ωάρια μετά από 18ωρη ή 24ωρη IVM, μονιμοποίηση και χρώση με ορκεΐνη 2%. Διακρίνονται τα χρωματοσώματα στο στάδιο της μετάφασης I (2α), της ανάφασης I (2β), της τελόφασης I (2γ) και της μετάφασης II (2δ) (μεγέθυνση $\times 1000$). Τα ωάρια στα δύο τελευταία στάδια θεωρούνταν ώριμα.

αντίστοιχα. Μετά την αναβίωση, γινόταν μικροσκοπική εκτίμηση της ζωτικότητας και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων που ήταν κατά μέσο όρο 60% και 3,5 αντίστοιχα.

Ο απαιτούμενος αριθμός σπερματοζωαρίων για την κάλυψη των αναγκών κάθε επιμέρους πειραματισμού εξασφαλιζόταν με τη χρησιμοποίηση του περιεχομένου πλαστικών σωληναρίων (paillette) χωρητικότητας 0,5 ml, που περιείχαν 60×10^6 σπερματοζωάρια ανά ml.

Η αναβίωση του σπέρματος γινόταν με εμβάπτιση των πλαστικών σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 38 έως 39 °C για 25'. Στη συνέχεια γινόταν εμπλουτισμός σε σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση, που επιτυγχανόταν με την εφαρμογή της τεχνικής του εμπλουτισμού μετά από την επώαση του σπέρματος σε υπόστρωμα ενεργοποίησης. Πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η εξής τεχνική (Parrish και συν. 1986, Gordon 1994):

- Σπέρμα όγκου 210 μl τοποθετούνταν στον πυθμένα 4 έως 8 κωνικών σωλήνων (ανάλογα με τον αριθμό των βοθρίων του εκάστοτε πειραματισμού που υποβάλλονταν σε IVF, αντιστοιχούσε περίπου ένας κωνικός σωλήνας ανά βοθρίο). Καθένας από τους κωνικούς σωλήνες περιείχε 1 ml υποστρώματος ενεργοποίησης, και επώάζονταν για 1h σε κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95%.
- Από κάθε κωνικό σωλήνα, συλλέγονταν περίπου 900 μl του υπερκείμενου υποστρώματος, τα οποία περιείχαν σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση σε υψηλό ποσοστό (>90%), τοποθετούνταν σε άλλο κωνικό σωλήνα και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στα 200 g για 10'.
- Στη συνέχεια, απομακρυνόταν το υπερκείμενο υπόστρωμα και τελικά στον πυθμένα κάθε σωλήνα απέμεναν 0,1 έως 0,2 ml εναιωρήματος εμπλουτισμένου σε ζωντανά σπερματοζωάρια.
- Ακολουθούσε η συγκέντρωση του υλικού σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και ο προσδιορισμός της πυκνότητας των σπερματοζωαρίων με τη βοήθεια αιμοκυτόμετρου Neubauer.

Στον τελικό όγκο του εναιωρήματος η πυκνότητα των σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση κυμαινόταν από 25 έως 35 $\times 10^6$ σπερματοζωάρια ανά ml.

2.2.5. Γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro* (*in vitro* fertilization, IVF)

Τα ωάρια, μετά την ωρίμανσή τους *in vitro*, μεταφέρονταν (ως COCs), σε ομάδες των 15 έως 20, σε βοθρία τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας που περιείχαν είτε το τυποποιημένο (μάρτυρας), είτε το τροποποιημένο υπόστρωμα γονιμοποίησης. Ακολουθούσε η προσθήκη διαλύματος ηπαρίνης (κεφάλαιο 2.2.7.2.). Κατόπιν, γινόταν η προσθήκη ανάλογης ποσότητας από το τελικό εναιώρημα σπερματοζωαρίων που να εξασφαλίζει την αναλογία 18.000 σπερματοζωάρια ανά ωάριο. Η συνεπώαση των γαμετών διαρκούσε 18 ή 24 ώρες και γινόταν σε κλίβανο τριών αερίων (Narco 7100) με ατμόσφαιρα 10% O₂, 5% CO₂ και 85% N₂, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν.1994, Lonergan και συν. 1999).

2.2.6. Εκτίμηση της γονιμοποίησης των ωαρίων και της εξέλιξης των ζυγωτών-εμβρύων *in vitro* (*in vitro* embryo culture, IVC)

Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της εκάστοτε αγωγής είτε στη γονιμοποίηση των ωαρίων, είτε στην εξέλιξη των εμβρύων στα πρώτα στάδιά της, βασιζόταν κυρίως στην παρουσία των κυτταρικών διαιρέσεων (ποσοστό αυλάκωσης) και στον αριθμό καθώς και στην ποιότητα των βλαστομεριδίων (Gradl 1988, Gordon 1994).

Για το σκοπό αυτό, μετά το τέλος της συνεπάωσης των γαμετών, τα ωάρια-ζυγωτά, μεταφέρονταν στις ίδιες πάντα ομάδες των 15 έως 20 σε βοθρία τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας, που περιείχαν το τυποποιημένο ή το τροποποιημένο υπόστρωμα καλλιέργειας. Πριν από τη μεταφορά τους μεσολαβούσαν 3 διαδοχικές δίοδοι διαμέσου πιπέτας (διαμέτρου 120 μm), ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα σπερματοζωάρια. Το περιεχόμενο κάθε βοθρίου καλυπτόταν με παραφινέλαιο (κεφάλαιο 2.2.7.9.). Κατόπιν γινόταν καλλιέργεια των ωαρίων-ζυγωτών σε κλίβανο τριών αερίων (Narco 7100) με ατμόσφαιρα 10% O₂, 5% CO₂ και 85% N₂, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν. 1994, Lonergan και συν. 1999).

Μετά το τέλος της 48ωρης *in vitro* καλλιέργειας τα έμβρυα και τα αγονιμοποίητα ωάρια απογυμνώνονταν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανακίνηση παρουσία διαλύματος κιτρικού νατρίου 2,96% (Κίνης, 1989). Η εκτίμηση της προόδου των κυτταρικών διαιρέσεων στα έμβρυα γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (μεγέθυνση ×200 και ×400 σε ανάστροφο στερεομικροσκόπιο). Τα έμβρυα που θεωρούνται ικανά για περαιτέρω ανάπτυξη είναι εκείνα με περισσότερα από 4 κύτταρα τη δεδομένη χρονική στιγμή (Gradl, 1988, Van Soom και συν. 1992 και 1997, Βαϊνάς και συν. 1994).

Προκειμένου να διαχωριστούν τα αγονιμοποίητα από τα γονιμοποιημένα ωάρια, όπου δεν παρατηρούνταν αυλάκωση, γινόταν μονιμοποίηση και χρώση τους, με την ίδια τεχνική που προαναφέρθηκε για την εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων (κεφάλαιο 2.2.3). Ο διαχωρισμός τους γινόταν με κριτήριο την παρατήρηση είτε των προπυρήνων, είτε των πολικών σωματίων, είτε κάποιου σταδίου της μείωσης των ωαρίων σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού (×1000).

Στη φωτογραφία 3 φαίνονται τα βασικά στάδια της IVC, όπως παρατηρήθηκαν κατά τους πειραματισμούς αυτής της εργασίας και χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της IVC.

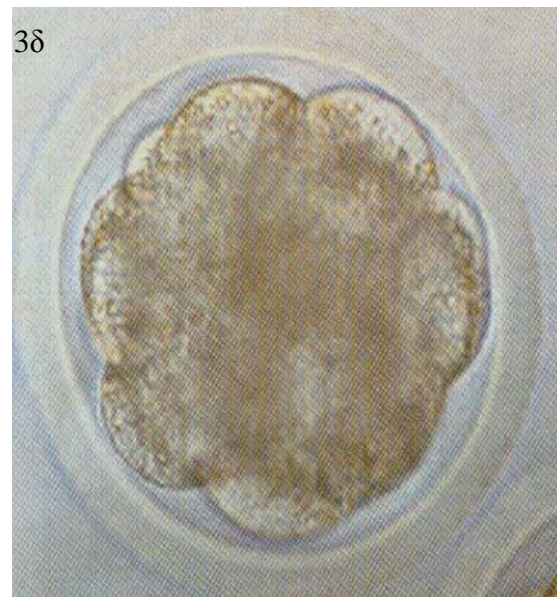
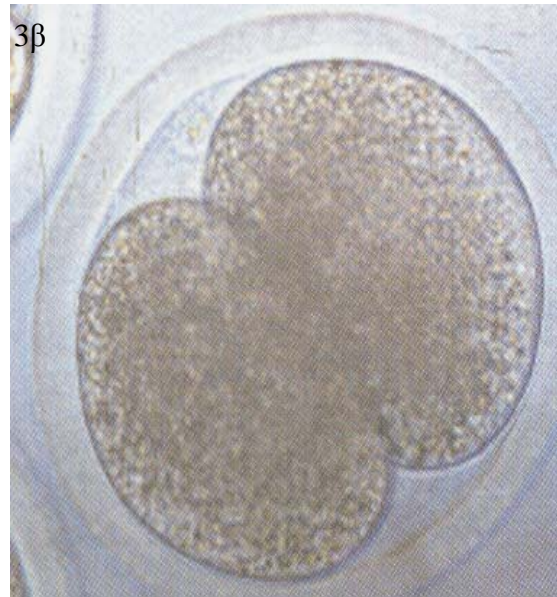
2.2.7. Παρασκευή υλικών και υποστρωμάτων

2.2.7.1. Νερό

Για την παρασκευή όλων των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε υψηλής καθαρότητας νερό. Αυτό επιτυγχανόταν κατόπιν επεξεργασίας με το σύστημα αντίστροφης όσμωσης και Milli-Q της εταιρείας Millipore.

2.2.7.2. Υλικά

Η προμήθεια όλων των χημικών αντιδραστηρίων έγινε από την εταιρεία Sigma Chemical (Γερμανία), εκτός αν επισημαίνεται διαφορετικά, και ήταν ελεγμένα για την απουσία τοξικότητας στα έμβρυα (embryo tested).



Φωτογραφία 3. Ωάριο που δεν παρουσίασε αυλάκωση (3α). Έμβρυο στο στάδιο των δύο (3β), των 8 (3γ) και των 16 (3δ) κυττάρων. Έμβρυα των δύο τελευταίων σταδίων μετά από 48ωρη IVC θεωρούνταν ανεπτυγμένα (μεγέθυνση $\times 400$).

2.2.7.3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων κατά Dulbecco (PBS) και υπόστρωμα έκπλυσης

Αρχικά παρασκευάζονταν δύο χωριστά διαλύματα που είχαν την ακόλουθη σύνθεση:

Διάλυμα Ι		
Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
NaCl	8,0 g	S 5886
KCl	0,2 g	P 5405
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	M 2393
CaCl ₂	0,1 g	C 2661
H ₂ O	qs 500 ml	

Διάλυμα ΙΙ		
Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
Na ₂ HPO ₄	1,00 g	S 5136
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,15 g	S 9638
KH ₂ PO ₄	0,20 g	Merck 7566
H ₂ O	qs 500 ml	

Στη συνέχεια τα διαλύματα αυτά αναμιγνύονταν και το τελικό διάλυμα (1000 ml) αποτελούσε το PBS. Το υπόστρωμα έκπλυσης παρασκευαζόταν ως εξής:

Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
Πυροσταφυλικό νάτριο	36 mg	P 3662
Άλας πενικιλίνης με κάλιο	20 mg	P 7794
Θευική στρεπτομυκίνη	40 mg	S 9137
Γλυκόζη	1000 mg	G 6152
PBS	qs 1000 ml	

Η αποστείρωση γινόταν με διήθηση διαμέσου ηθμού μιας χρήσης (Millipore) με πόρους διαμέτρου 0,22 μm με τη χρησιμοποίηση ειδικής συσκευής στην οποία η εφαρμογή της απαραίτητης υποπίεσης επιτυγχανόταν με αντλία κενού. Το pH του τελικού διαλύματος ήταν 7,2 και η οσμωτική του πίεση 285 έως 295 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν στους 4 °C και διαρκούσε έως 30 ημέρες.

2.2.7.4. Υπόστρωμα ωρίμανσης των ωαρίων (IVM)

Το υπόστρωμα ωρίμανσης παρασκευαζόταν την ημέρα της χρήσης του και αποτελούνταν από (Lutterbach και συν. 1987, Vergos 1990, Βαϊνάς και συν. 1994):

- Τροποποιημένο κατά Parker υπόστρωμα (Modified Parker's Medium, MPM) (2.2.7.4.1.)
- Ορό αγελάδας σε οίστρο (OCS) (2.2.7.4.2.) 10% κατ' όγκο (v/v)
- Ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) (2.2.7.4.3.) σε συγκέντρωση 21 μg/ml υποστρώματος

Η οσμωτική πίεση ήταν 280 έως 300 mOsm. Αρχικά γινόταν η προσθήκη 400μl υποστρώματος σε κάθε βιοθρίο χωρίς FSH (360 μl MPM+ 40 μl OCS). Το pH (7,4)

ρυθμιζόταν, πριν από την έναρξη της ωρίμανσης με την παραμονή του υποστρώματος στον επωαστικό κλίβανο με 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον.

2.2.7.4.1. Τροποποιημένο υπόστρωμα κατά Parker

Το υπόστρωμα αυτό παρασκευαζόταν την ημέρα της χρήσης του και είχε την ακόλουθη σύνθεση:

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>	<u>Κωδικός Εταιρείας</u>
Γαλακτικό ασβέστιο	60 mg	Merck 2103
H ₂ O	qs 10 ml	
L-γλουταμίνη	10 mg	G 8540
NaHCO ₃	80 mg	S 5761
Hepes	140 mg	H 6147
Πυροσταφυλικό νάτριο	25 mg	P 3662
Θευκή στρεπτομυκίνη	4 mg	S 9137
Άλας πενικιλίνης με κάλιο	2 mg	P 7794
TC Medium 199	qs 110 ml	ICN 1220254

2.2.7.4.2. Ορός αγελάδας σε οίστρο (OCS)

Για τη συλλογή του ορού χρησιμοποιήθηκε αίμα αγελάδων που βρίσκονταν σε οίστρο. Η επιβεβαίωση του οίστρου στηριζόταν στην εμφάνιση των κλινικών του εκδηλώσεων και στα ευρήματα της ψηλάφησης του γεννητικού συστήματος διαμέσου του απευθυσμένου. Μετά τη φυγοκέντρηση του αίματος (1200g για 15΄) γινόταν εργαστηριακός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και των οιστρογόνων στον ορό με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA). Ο ορός θεωρούνταν κατάλληλος και χρησιμοποιούνταν μόνον όταν οι τιμές της προγεστερόνης κυμαίνονταν μεταξύ 0,0 και 0,2 ng/ml (Βαϊνάς και συν. 1994).

Ο ορός μοιραζόταν σε ποσότητες του 1ml και η συντήρησή του γινόταν στους -20 °C για 2 έως 3 μήνες. Πριν από τη χρησιμοποίησή του αδρανοποιούνταν στους 56 °C για 30΄ (Lu και Gordon 1987, Gordon 1994).

2.2.7.4.3. Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH)

Χρησιμοποιήθηκε FSH πρόβειας προέλευσης (ICP, Ολλανδία). Αρχικά διαλυόταν σε φυσιολογικό ορό σε συγκέντρωση 0,88 mg/ml και μοιραζόταν σε ποσότητες των 0,25 ml. Ακολουθούσε η συντήρησή της στους -20 °C έως 3 μήνες.

Λίγο πριν τη μεταφορά των ωαρίων στα τρυβλία καλλιέργειας γινόταν η προσθήκη 10 μl του διαλύματος ανά βοθρίο.

2.2.7.5. Χρώση παρασκευασμάτων ωαρίων για την εκτίμηση του βαθμού ωρίμανσης του πυρήνα τους.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, 24 ώρες μετά από τη μονιμοποίηση των ωαρίων, τοποθετούνταν σε διάλυμα ορκεΐνης 2% (w/v) για 45΄. Στη συνέχεια, γινόταν έκπλυση των παρασκευασμάτων με διαδοχική εμβάπτισή τους στο καθένα από τα παρακάτω διαλύματα:

- Οξικό οξύ 45%
- Αιθυλική αλκοόλη 70%
- Αιθυλική αλκοόλη 96%
- Αιθυλική αλκοόλη 100%
- Αιθυλική αλκοόλη 100%
- Ξυλόλη 100%
- Ξυλόλη 100%.

2.2.7.5.1. Ορκεΐνη

Το διάλυμα ορκεΐνης παρασκευαζόταν στο εργαστήριο και είχε την ακόλουθη σύνθεση:

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>	<u>Κωδικός Εταιρείας</u>
Ορκεΐνη	5 g	MERCK 7100
CH ₃ COOH	150 ml	MERCK 2511
H ₂ O	100 ml	

Για την παρασκευή του διαλύματος, 150 ml οξικού οξέος θερμαίνονταν μέχρι την εμφάνιση των πρώτων φυσαλίδων βρασμού και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε φιάλη που περιείχε 5 g ορκεΐνης. Ακολουθούσε ανάδευση και προσθήκη 100 ml νερού σε αντίστοιχη θερμοκρασία. Η συντήρηση του διαλύματος γινόταν σε γυάλινη φιάλη ερμητικά κλειστή και σε θερμοκρασία δωματίου, έως 2 μήνες.

2.2.7.6. Υπόστρωμα ενεργοποίησης σπερματοζωαρίων

Το υπόστρωμα ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων παρασκευαζόταν την ημέρα γονιμοποίησης των ωαρίων και αποτελούνταν από (Gradl 1988, Parrish και συν. 1988, Βαϊνάς και συν. 1994):

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>	<u>Κωδικός Εταιρείας</u>
Βόεια αλβουμίνη ορού	600 mg	A 7906
Γενταμυκίνη	5 mg	G3632
Πυροσταφυλικό νάτριο	11 mg	P 3662
Sperm TL- Stock	qs 100 ml	επόμενο πίνακα

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35 έως 7,4 και η ωσμωτική του πίεση ήταν 290 έως 300 mOsm.

2.2.7.6.1. Υπόστρωμα Sperm TL-Stock

Το υπόστρωμα Sperm TL-Stock παρασκευαζόταν στο εργαστήριο και είχε την ακόλουθη σύνθεση (Critse και συν. 1984, Parrish και συν. 1988):

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>	<u>Κωδικός Εταιρείας</u>
NaCl	580,0 mg	S 5886
KCl	23,0 mg	P 5405
NaHCO ₃	209,0 mg	S 5761
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,0 mg	S 9638

Hepes	238,0 mg	H 6147
Ερυθρό της φαινόλης	1,0 mg	P 2167
Σιρόπι γαλακτικού νατρίου (60% w/w)	365 µl	L 7900
MgCl ₂ .6H ₂ O	31,0 mg	M 2393
CaCl ₂ .2H ₂ O	38,4 mg	C 7902
H ₂ O	qs 100 ml	

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35 έως 7,4 και η ωσμωτική του πίεση ήταν 290 έως 300 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν σε θερμοκρασία 4°C και διαρκούσε έως 1 μήνα.

2.2.7.7. Υπόστρωμα γονιμοποίησης (IVF)

Το υπόστρωμα γονιμοποίησης παρασκευαζόταν την ημέρα γονιμοποίησης των ωαρίων *in vitro* και αποτελούνταν από (Lutterbach και συν. 1987, Lonergan και συν. 1999):

Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
Βόεια αλβουμίνη ορού	600 mg	A 7906
Πυροσταφυλικό νάτριο	22 mg	P 3662
TL- Stock	qs 100 ml	επόμενο πίνακα

Ακολουθούσε η διανομή 400µl από το παραπάνω υπόστρωμα ανά βοθρίο και το pH (7,35 έως 7,4) ρυθμιζόταν, πριν από την έναρξη της επώασης, με την παραμονή του υποστρώματος στον κλίβανο με 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον. Η ωσμωτική πίεση ήταν 295 έως 300 mOsm. Τέλος, το υπόστρωμα γονιμοποίησης ήταν έτοιμο κατόπιν προσθήκης 20µl διαλύματος ηπαρίνης (2.2.7.7.2.).

2.2.7.7.1. Υπόστρωμα TL-Stock

Το υπόστρωμα TL-Stock παρασκευαζόταν στο εργαστήριο και είχε την ακόλουθη σύνθεση (Bavister και Yanagimachi, 1977, Parrish και συν. 1988):

Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
NaCl	666,0 mg	S 5886
KCl	23,5 mg	P 5405
NaHCO ₃	210,3 mg	S 5761
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,7 mg	S 9638
Ερυθρό της φαινόλης	1,0 mg	P 2167
Σιρόπι γαλακτικού νατρίου (60% w/w)	186 µl	L 7900
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,0 mg	M 2393
CaCl ₂ .2H ₂ O	39,7 mg	C 7902
Θευική στρεπτομυκίνη	4,0 mg	S 9137
Άλας πενικιλλίνης με κάλιο	6,5 mg	P 7794
H ₂ O	qs 100 ml	

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35 έως 7,4 και η ωσμωτική του πίεση ήταν 290 έως 300 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν σε θερμοκρασία 4 °C έως 15 μέρες.

2.2.7.7.2. Ηπαρίνη

Την ημέρα της γονιμοποίησης *in vitro* παρασκευαζόταν το διάλυμα της ηπαρίνης ως ακολούθως:

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>	<u>Κωδικός Εταιρείας</u>
Ηπαρίνη	1 mg	H 3149
TL-Stock	qs 5 ml	

Λίγο πριν την έναρξη της συνεπάωσης των γαμετών, γινόταν η προσθήκη 20 μl από το διάλυμα σε κάθε βοθρίο, ώστε η τελική συγκέντρωση της ηπαρίνης στο υπόστρωμα γονιμοποίησης να είναι 9,5 μg/ml (Parrish και συν. 1986, Lonergan και συν. 1999).

2.2.7.8. Υπόστρωμα καλλιέργειας ζυγωτών-εμβρύων (IVC)

Το υπόστρωμα αυτό αποτελούνταν από MPM, όπως αυτό περιγράφεται για την παρασκευή του υποστρώματος ωρίμανσης των ωαρίων, εμπλουτισμένο με ορό αγελάδας σε οίστρο (OCS) σε αναλογία 10% (v/v). Το pH (7,4) ρυθμιζόταν πριν από την έναρξη της καλλιέργειας με την παραμονή του υποστρώματος στον επωαστικό κλίβανο με 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον (Lutterbach και συν. 1987, Vergos, 1990, Βαϊνάς και συν. 1994). Η ωσμωτική πίεση ήταν 290 έως 300 mOsm.

2.2.7.9. Παραφινέλαιο

Το παραφινέλαιο (M 8410) χρησιμοποιούνταν για την επικάλυψη των υποστρωμάτων επώασης σε ποσότητα 300 μl ανά βοθρίο. Η προσθήκη του γινόταν μετά την κατανομή των εκάστοτε υποστρωμάτων στα βοθρία. Τουλάχιστον 4 ώρες πριν την επικάλυψη γινόταν έκπλυση της ποσότητας του παραφινέλαιου που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί (2-3 ml) με ίσο όγκο αντίστοιχου υποστρώματος της εκάστοτε επώασης και τοποθέτησή του στον κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα (Lu και Gordon 1987). Η χρήση του παραφινέλαιου αποσκοπούσε στην αποφυγή της εξάτμισης των υποστρωμάτων και της μόλυνσης καθώς και τον περιορισμό των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας, του pH και της περιεκτικότητας σε αέρια των υποστρωμάτων μεταξύ των χειρισμών εκτός κλιβάνου και της επώασης μέσα στον κλίβανο (Gordon 1994).

2.2.7.10. Γουαϊαζουλένιο

Το γουαϊαζουλένιο είναι λιπόφιλη ένωση και γι' αυτό έγινε υποβοήθηση της διάλυσής του στα υδατικά υποστρώματα με τη χρήση ενδιάμεσου διαλύτη, του DMSO. Το διάλυμα με γουαϊαζουλένιο παρασκευαζόταν ως εξής: αρχικά, 40 mg διαλύονταν σε 10 ml DMSO, ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις σε DMSO, ώστε να ληφθεί τελική συγκέντρωση 0,08 mg/ml. Η συντήρησή του τελικού διαλύματος γινόταν στους 4 °C και διαρκούσε έως 2 μήνες. Λίγο πριν την έναρξη των επώασεων στην IVM, IVF ή στην IVC προσθέτονταν 10 μl από το τελικό διάλυμα στο αντίστοιχο υπόστρωμα. Η τελική συγκέντρωση του γουαϊαζουλενίου σε κάθε τροποποιημένο υπόστρωμα ήταν 0,1 mM. Αυτή ήταν η συγκέντρωση που βρέθηκε από τους πειραματισμούς της λιπιδικής υπεροξειδωσής που προηγήθηκαν να προσδίδει στα υποστρώματα A.I. ανάλογη εκείνης των αντίστοιχων με αυτά βιολογικών υγρών. Η ωσμωτική πίεση του εκάστοτε τροποποιημένου υποστρώματος ήταν 295 έως 300 mOsm.

2.2.7.11. Μελατονίνη

Η παρασκευή του τροποποιημένου υποστρώματος με μελατονίνη γινόταν τουλάχιστον 1 ώρα προτού να χρησιμοποιηθεί ως ακολούθως: αρχικά λαμβάνονταν 2 ml του εκάστοτε υποστρώματος (είτε της IVM, είτε της IVF, είτε της IVC) και σε αυτά γινόταν προσθήκη 0,23 mg μελατονίνης, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο εκάστοτε τροποποιημένο υπόστρωμα να είναι 5×10^{-4} M. Αυτή ήταν η συγκέντρωση που βρέθηκε από τους πειραματισμούς της λιπιδικής υπεροξειδωσής που προηγήθηκαν να προσδίδει στα υποστρώματα A.I. ανάλογη εκείνης των αντίστοιχων με αυτά βιολογικών υγρών. Ακολουθούσε ανάδευση για 15' τουλάχιστον. Σε όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας και της χρήσης δινόταν προσοχή ώστε να μην εκτεθεί το διάλυμα στο φως, αφού η μελατονίνη είναι φωτοευαίσθητη. Οι υπόλοιπες διαδικασίες που ακολουθούνταν για την προετοιμασία του ήταν ίδιες με εκείνες που προαναφέρθηκαν για το αντίστοιχο, κάθε φορά, τυποποιημένο υπόστρωμα (μάρτυρας). Η ωσμωτική πίεση του εκάστοτε τροποποιημένου υποστρώματος ήταν 295 έως 300 mOsm.

2.2.8. Αποστείρωση υλικών και υποστρωμάτων

Η αποστείρωση των γυάλινων σκευών γινόταν σε ξηρό κλίβανο, σε θερμοκρασία 240 °C για 4 ώρες. Η αποστείρωση όλων των υποστρωμάτων, τελικών διαλυμάτων και του OCS γινόταν με διήθηση διαμέσου ηθμών μιας χρήσης (Millipore) με πόρους διαμέτρου 0,22 μm σε στείρο περιβάλλον (θάλαμος οριζόντιας νηματικής ροής). Τα ρύγγη των πιπετών καθώς και ο σωλήνας αναρρόφησης αποστειρώνονταν σε υγρό κλίβανο, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1 bar για 45'. Όλα τα τρυβλία ήταν μιας χρήσης, αποστειρωμένα και ελεγμένα από τον κατασκευαστή για απουσία κυτταροτοξικότητας (tissue culture tested ή embryo tested).

2.3. Σχεδιασμός πειραματισμών

Διακρίνονται δύο ενότητες πειραματισμών:

A. Στην πρώτη ενότητα ανήκουν οι πειραματισμοί προσδιορισμού της A.I. των υποστρωμάτων της IVP και των αντίστοιχων με αυτά βιολογικών υγρών. Επιπλέον, στην ίδια κατηγορία εντάσσονται και οι πειραματισμοί για την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων γουαϊαζουλενίου και μελατονίνης στα υποστρώματα της IVP που να επιτυγχάνουν προσομοίωση της A.I. των *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες. Αυτό πραγματοποιήθηκε κατόπιν δοκιμής διαδοχικών αραιώσεων γουαϊαζουλενίου (1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 και 0,01 mM) και μελατονίνης (5×10^{-4} , $2,5 \times 10^{-4}$, 1×10^{-4} και 5×10^{-5} M) στα υποστρώματα αυτά .

B. Στη δεύτερη ενότητα περιλαμβάνονται οι πειραματισμοί όπου ελέγχθηκε η επίδραση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων γουαϊαζουλενίου και μελατονίνης στην απόδοση της IVM ή της IVP. Πιο συγκεκριμένα, διενεργήθηκε η IVM συνολικά 8.655 ωαρίων, από τα οποία στα 2.245 εκτιμήθηκε μικροσκοπικά η εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα τους μετά το τέλος της IVM, ενώ στα υπόλοιπα 6.410 ακολούθησε IVF και IVC.

B.1. Για τους πειραματισμούς με γουαϊαζουλένιο καλλιεργήθηκαν συνολικά 3.525 ωάρια. Προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν επιπλοκές από τη χρησιμοποίηση του DMSO, κάθε φορά που εξεταζόταν η επίδραση του γουαϊαζουλενίου στα επιμέρους στάδια της IVP υπήρχε επιπλέον βοθρίο που περιείχε ισόποση δόση διαλύτη (ενδιάμεσος μάρτυρας) στο εκάστοτε υπόστρωμα. Οι πειραματισμοί κατανέμονται ως εξής:

B.1.1. IVM διάρκειας 18 ωρών, με προσθήκη γουαϊαζουλενίου, που ακολουθήθηκε από μονιμοποίηση και χρώση των ωαρίων και μικροσκοπική εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Κατανομή των ωαρίων που καλλιεργήθηκαν *in vitro* επί 18 ώρες (IVM) για την εκτίμηση της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην ωρίμανση του πυρήνα τους.

	ΓΟΥΑΪΑΖΟΥΛΕΝΙΟ	DMSO	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΣΥΝΟΛΟ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΑΡΙΩΝ	208	192	187	587

B.1.2. IVP με προσθήκη γουαϊαζουλενίου στα επιμέρους στάδια της σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Όπου δεν γινόταν προσθήκη γουαϊαζουλενίου, η επώαση πραγματοποιούνταν στο τυποποιημένο υπόστρωμα του αντίστοιχου σταδίου. Η εκτίμηση της εκάστοτε επίδρασης στη γονιμοποίηση των ωαρίων ή και στην εξέλιξη των παραγόμενων εμβρύων γινόταν συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος 48ωρης, κάθε φορά, IVC. Χρησιμοποιήθηκαν 2.938 ωάρια συνολικά για τις ακόλουθες ομάδες πειραματισμών (πίνακας 5):

Πίνακας 5. Κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην IVP ανά στάδιο ή συνδυασμούς σταδίων όπου έγινε προσθήκη του γουαϊαζουλενίου.

ΓΟΥΑΪΑΖΟΥΛΕΝΙΟ				DMSO	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ
IVM*	IVF*	IVC**	ΩΑΡΙΑ	ΩΑΡΙΑ	ΩΑΡΙΑ	
+	-	-	170	143	138	451
-	+	-	196	137	107	440
-	-	+	194	144	114	452
+	+	-	116	109	102	327
+	-	+	173	129	128	430
-	+	+	224	127	104	455
+	+	+	164	108	111	383
ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ			1237	897	804	2938

*18ωρης διάρκειας επώαση, ** 48ωρης διάρκειας επώαση.

α. Προσθήκη γουαϊαζουλενίου μόνο σε ένα στάδιο της IVP:

- i) Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVM.
- ii) Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVF.
- iii) Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVC

β. Προσθήκη γουαϊαζουλενίου σε δύο στάδια της IVP :

- i) Γουαϊαζουλένιο στην IVM και IVF.
- ii) Γουαϊαζουλένιο στην IVM και IVC.

iii) Γουαϊαζουλένιο στην IVF και IVC.

γ. Προσθήκη γουαϊαζουλενίου σε όλα τα στάδια της IVP:

i) Γουαϊαζουλένιο στην IVM, IVF και IVC.

B.2. Σε ό,τι αφορά στον έλεγχο της επίδρασης της εξεταζόμενης συγκέντρωσης της μελατονίνης στην IVM ή στην IVP χρησιμοποιήθηκαν 5.130 ώαρια συνολικά. Από αυτά στα 1.658 εκτιμήθηκε μικροσκοπικά η εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα τους μετά το τέλος της IVM ενώ στα υπόλοιπα 3.472 ακολούθησε IVF και IVC. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται οι εξής πειραματισμοί:

B.2.1. IVM με προσθήκη μελατονίνης σε 18ωρη και 24ωρη διάρκεια επώασης και μετά το πέρας αυτής μονιμοποίηση και χρώση των ωαρίων. Ακολουθούσε μικροσκοπική εκτίμηση της επίδρασης της στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα (πίνακας 6).

B.2.2. IVP με προσθήκη μελατονίνης στα επιμέρους στάδιά της. Όπου δεν γινόταν προσθήκη μελατονίνης η επώαση πραγματοποιούνταν στο τυποποιημένο υπόστρωμα του αντίστοιχου σταδίου και για 24 ώρες στην IVM ή IVF. Η εκτίμηση της εκάστοτε επίδρασης γινόταν συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος της 48ωρης, κάθε φορά, IVC. Οι ομάδες πειραματισμών που πραγματοποιήθηκαν ανά περίπτωση έχουν ως εξής:

α. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της 18ωρης IVM.

β. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της 24ωρης IVM.

γ. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της 18ωρης IVF.

δ. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της 48ωρης IVC.

Στον πίνακα 7 παρουσιάζεται η αντίστοιχη κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

B.2.3. Επιπλέον, επιχειρήθηκε και εκτιμήθηκε η προσομοίωση του κικκάδιου τρόπου δράσης της μελατονίνης *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες. Αυτό επιδιώχθηκε με την παραμονή των ωαρίων σε τροποποιημένο υπόστρωμα, είτε μόνο για το πρώτο, είτε μόνο για το τελευταίο 1/3 18ωρης ή/και 24ωρης διάρκειας επώασεων και αφορούσε είτε στην IVM, είτε στην IVF. Η αντίστοιχη επίδραση της μελατονίνης στην IVC μελετήθηκε με παραμονή των εμβρύων σε τροποποιημένο υπόστρωμα είτε μόνο για το πρώτο 1/3 της πρώτης ημέρας (πρώτο 1/6 του συνολικού χρόνου της καλλιέργειας), είτε μόνο για το τελευταίο 1/3 της δεύτερης ημέρας (τελευταίο 1/6 του συνολικού χρόνου της καλλιέργειας) είτε και για τα δύο χρονικά αυτά διαστήματα της 48ωρης καλλιέργειας. Στα υπόλοιπα διαστήματα οι επώσεις διενεργούνταν με το τυποποιημένο υπόστρωμα του αντίστοιχου σταδίου. Ανάλογοι χειρισμοί πραγματοποιούνταν και στο μάρτυρα με ανανέωση του τυποποιημένου υποστρώματος στα αντίστοιχα διαστήματα. Επομένως, οι ομάδες πειραματισμών που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της συγκεκριμένης επίδρασης της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων ή και στην απόδοση της IVP ανά περίπτωση έχουν ως εξής:

α. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο 18ωρης IVM.

β. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο 24ωρης IVM.

γ. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο 18ωρης IVM.

δ. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο 24ωρης IVM.

ε. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο 18ωρης IVF.

στ. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο 18ωρης IVF.

ζ. Μελατονίνη στο πρώτο 1/6 της 48ωρης IVC.

η. Μελατονίνη στο τελευταίο 1/6 της 48ωρης IVC.

θ. Μελατονίνη και στο πρώτο και στο τελευταίο 1/6 της 48ωρης IVC.

Στους πίνακες 6 και 7 παρουσιάζεται η αντίστοιχη κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 6. Κατανομή των ωαρίων που καλλιεργήθηκαν στην IVM για την εκτίμηση της επίδρασης της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα τους ανά διάρκεια και στάδιο προσθήκης της.

ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ				ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ	IVM		ΩΑΡΙΑ	ΩΑΡΙΑ	
	18ωρη	24ωρη			
Σε όλη τη διάρκεια	+		168	107	275
		+	171	112	283
Στο πρώτο τρίτο	+		150	132	282
		+	132	99	231
Στο τελικό τρίτο	+		184	138	322
		+	160	105	265
ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ			965	693	1658

Πίνακας 7. Κατανομή ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην IVP με προσθήκη μελατονίνης ανά διάρκεια και στάδιο προσθήκης της.

ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ						ΜΑΡΤΥΡΑΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ	IVM		IVF		IVC	ΩΑΡΙΑ		ΩΑΡΙΑ
	18ωρη	24ωρη	18ωρη	24ωρη	48ωρη			
Σε όλη τη διάρκεια	+			-	-	136	142	278
		+		-	-	117	120	237
		-	+		-	107	104	211
		-		-	+	151	104	255
Στο πρώτο τρίτο	+			-	-	160	148	308
		+		-	-	156	140	296
		-	+		-	126	99	225
Στο τελικό τρίτο	+			-	-	166	126	292
		+		-	-	162	117	279
		-	+		-	100	104	204
Στο πρώτο έκτο		-		-	+	166	122	288
Στο τελικό έκτο		-		-	+	213	116	329
Πρώτο & τελικό έκτο		-		-	+	143	127	270
ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ						1903	1569	3472

2.4. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

1. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τον έλεγχο διαφορών και τη σύγκριση των μέσων τιμών των Α.Ι. μεταξύ των βιολογικών υγρών και των υποστρωμάτων. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν με το τεστ του Duncan F-range.
2. Η ανάλυση των συχνοτήτων (χ^2 test) για τη διαπίστωση των διαφορών στα συστήματα καλλιέργειας με τροποποιημένα και τυποποιημένα υποστρώματα και έχουν ως κριτήριο:
 - Το βαθμό εξέλιξης της ωρίμανσης του πυρήνα ωαρίων που ωρίμασαν *in vitro*
 - Το ποσοστό των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν *in vitro*
 - Το ποσοστό των εμβρύων που αναπτύχθηκαν *in vitro*

Ο εκάστοτε πειραματισμός πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Σε κάθε περίπτωση, το P θεωρήθηκε σημαντικό εφόσον ήταν μικρότερο του 0,05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

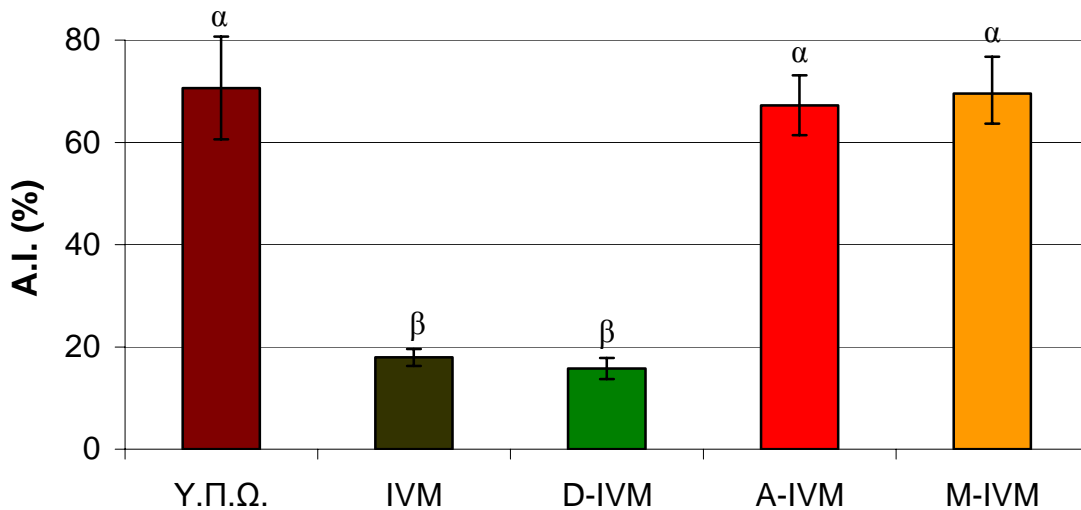
3.1. Αντιοξειδωτική Ικανότητα (A.I.)

Η A.I. (μέση τιμή % \pm SD), 2,5 λεπτά μετά από την έναρξη της προκαλούμενης λιπιδικής υπεροξειδωσης *in vitro*, του υγρού των προωοθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων (Υ.Π.Ω.) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη εκείνης του υγρού των ωαγωγών (Υ.Ω.). Η A.I. των υποστρωμάτων της IVM, IVF και IVC ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη του Υ.Π.Ω. Σε καμία περίπτωση δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του DMSO στην A.I. των υποστρωμάτων. Η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στα υποστρώματα σε συγκέντρωση 0,1 mM διαμόρφωσε την A.I. αυτών στα επίπεδα των αντίστοιχων με αυτά βιολογικών υγρών. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε κατόπιν προσθήκης μελατονίνης στα υποστρώματα σε συγκέντρωση 0,5 mM (πίνακας 8, εικόνες 1, 2 και παράρτημα).

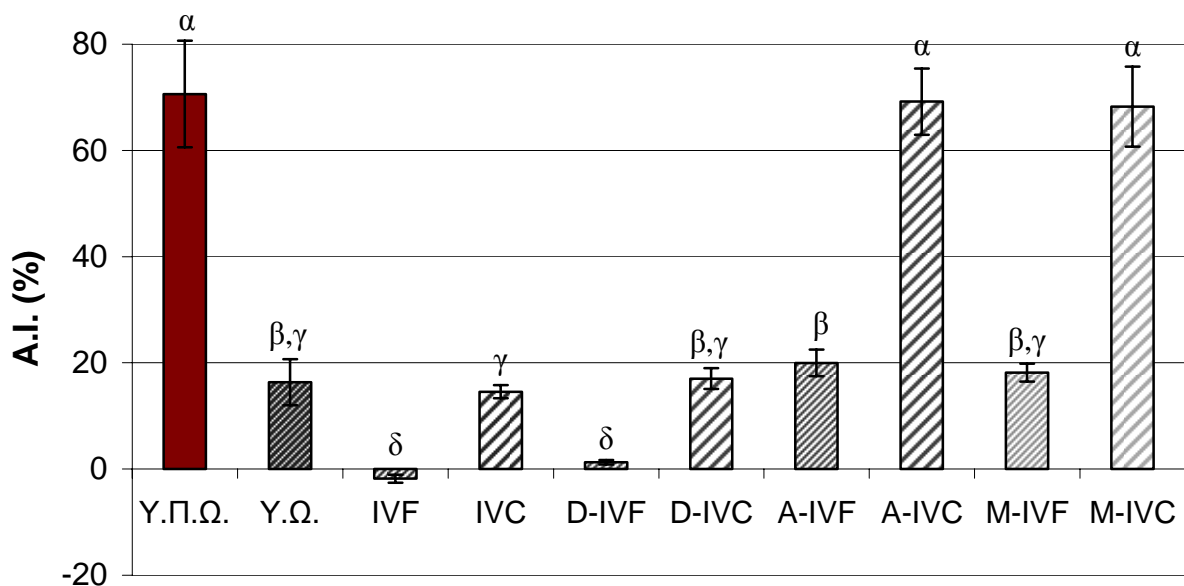
Πίνακας 8 Τιμές A.I. (μέση τιμή %) και τυπική απόκλιση (SD), 2,5' μετά από την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης, των υγρών του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου και του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο, των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVF και IVC και των τροποποιημένων αντίστοιχων υποστρωμάτων κατόπιν προσθήκης, είτε DMSO, είτε γουαϊαζουλενίου σε DMSO, είτε μελατονίνης.

Υγρό	A.I.(%) \pm SD
Υ.Π.Ω.	70,63 \pm 10,03 ^α
Υ.Ω.	16,33 \pm 4,33 ^{β,γ}
IVM	17,94 \pm 1,66 ^{β,γ}
IVF	-1,82 \pm 0,78 ^δ
IVC	14,57 \pm 1,26 ^γ
D-IVM	15,79 \pm 2,08 ^{β,γ}
D-IVF	1,29 \pm 0,41 ^δ
D-IVC	17,04 \pm 1,98 ^{β,γ}
A-IVM	67,24 \pm 5,85 ^α
A-IVF	19,98 \pm 2,49 ^β
A-IVC	69,19 \pm 6,22 ^α
M-IVM	69,52 \pm 7,20 ^α
M-IVF	18,15 \pm 1,68 ^{β,γ}
M-IVC	68,30 \pm 7,51 ^α

Υ.Π.Ω.: υγρό του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου. Υ.Ω.: υγρό του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο. IVM, IVF και IVC: τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. D-IVM, D-IVF, D-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης DMSO υποστρώματα της IVP. A-IVM, A-IVF, A-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης γουαϊαζουλενίου σε DMSO στα υποστρώματα της IVP. M-IVM, M-IVF, M-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης μελατονίνης στα υποστρώματα της IVP. Οι τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).



Εικόνα 1. Μέσες τιμές A.I. (%) 2,5' μετά από την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης: του υγρού του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου (Y.Π.Ω.) αγελάδων, του τυποποιημένου υποστρώματος της IVM και των τροποποιημένων αντίστοιχων υποστρωμάτων κατόπιν προσθήκης, είτε DMSO (D-IVM), είτε γουαϊαζουλενίου σε DMSO (A-IVM), είτε τέλος, μελατονίνης (M-IVM). Οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).



Εικόνα 2. Μέσες τιμές A.I. (%) 2,5' μετά από την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης: των υγρών του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου (Y.Π.Ω.) και του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο (Y.Ω.), των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVF και IVC και των τροποποιημένων αντίστοιχων υποστρωμάτων κατόπιν προσθήκης, είτε DMSO (D-IVF, D-IVC), είτε γουαϊαζουλενίου σε DMSO (A-IVF, A-IVC), είτε τέλος, μελατονίνης (M-IVF, M-IVC). Οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

3.2. Παραγωγή εμβρύων *in vitro* (IVP)

Συνολικά διενεργήθηκε η IVM 8.625 ωαρίων, από τα οποία σε 2.245 εκτιμήθηκε μικροσκοπικά η εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα τους μετά το τέλος της IVM, ενώ στα υπόλοιπα 5.380 ακολούθησε IVF και IVC.

3.2.1. Γουαϊαζουλένιο

Για τους πειραματισμούς με το γουαϊαζουλένιο χρησιμοποιήθηκαν 3.525 ώρια συνολικά. Από αυτά εκτιμήθηκαν μικροσκοπικά τα 587 μετά το τέλος της 18ωρης IVM ενώ στα υπόλοιπα 2.938 πραγματοποιήθηκε 18ωρη IVF και 48ωρη IVC. Σε κάθε περίπτωση η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου γινόταν σε συγκεντρώσεις που εξασφαλίζουν αντιοξειδωτική προστασία ανάλογη αυτής του Υ.Π.Ω. ή και του υγρού του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο. Τέλος, σε καμία περίπτωση δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του DMSO στα αποτελέσματα του εκάστοτε πειραματισμού, όταν συγκρίνονταν με εκείνα του αντίστοιχου μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων και στην απόδοση της IVP φαίνονται συνοπτικά στους πίνακες 9 και 10 αντίστοιχα.

3.2.1.1. Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVM

Διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των ώριμων ωαρίων (αυτών που ο πυρήνας τους μετά το τέλος της επώασης ήταν είτε στο στάδιο της μετάφασης II, είτε στο στάδιο της τελόφασης I), τα οποία επώαστηκαν στο τροποποιημένο υπόστρωμα του γουαϊαζουλενίου (55,3%) ήταν σημαντικά μεγαλύτερο συγκριτικά με εκείνο του DMSO (36,5%, $P < 0,001$) και του μάρτυρα (39,0%, $P = 0,0012$), (εικόνα 3).

Επίσης, η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στην IVM είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης (79,4%) αλλά και των ανεπτυγμένων (με περισσότερα από 4 κύτταρα) εμβρύων μετά από 48ωρη IVC (57,8%) έναντι εκείνων του DMSO (64,3%, $P = 0,003$ και 37,0%, $P = 0,002$, αντίστοιχα) και του μάρτυρα (64,5%, $P = 0,0035$ και 38,2%, $P = 0,004$, αντίστοιχα), (εικόνα 4).

3.2.1.2. Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVF

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά του τροποποιημένου υποστρώματος ως προς την επίδρασή του στη γονιμοποίηση και στο ρυθμό της εξέλιξης των εμβρύων συγκριτικά με το DMSO και το μάρτυρα (εικόνα 5).

3.2.1.3. Γουαϊαζουλένιο μόνο στην IVC

Το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (62,5%) στο τροποποιημένο υπόστρωμα γουαϊαζουλενίου έναντι εκείνου του DMSO (40,7%, $P = 0,0014$) και του μάρτυρα (39,7%, $P = 0,0018$), (εικόνα 6).

3.2.1.4. Γουαϊαζουλένιο στην IVM και στην IVF

Παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης, το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (56,4%), όταν γινόταν χρήση του τροποποιημένου υποστρώματος γουαϊαζουλενίου στην

Πίνακας 9. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων *in vitro*.

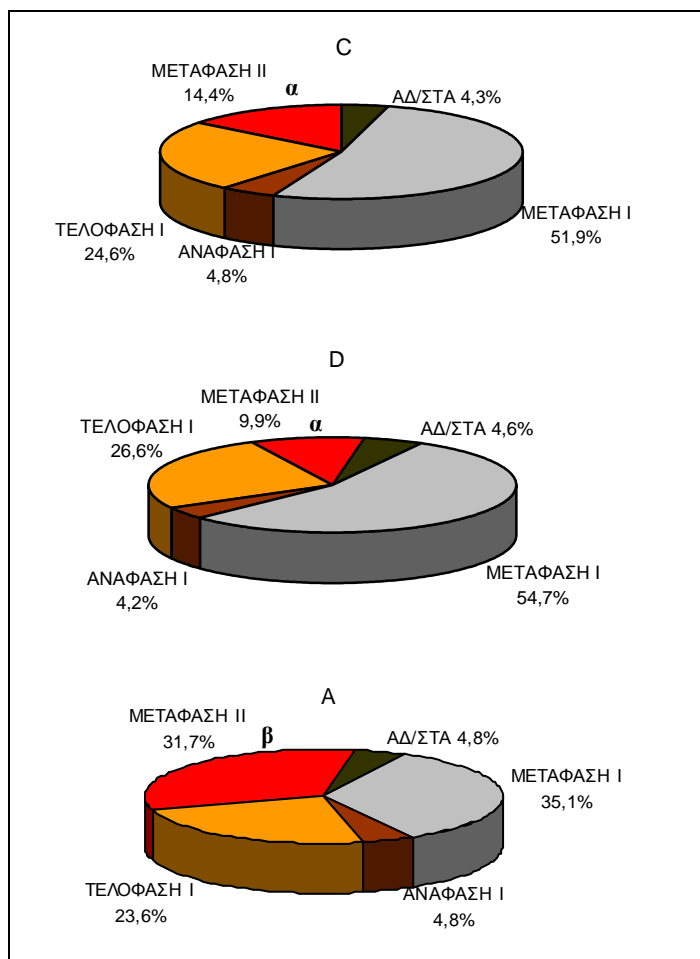
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΑ		ΜΕΤΑΦΑΣΗ I		ΑΝΑΦΑΣΗ I		ΤΕΛΟΦΑΣΗ I		ΜΕΤΑΦΑΣΗ II		ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
C	187	8	4,3	97	51,9 ^α	9	4,8	46	24,6	27	14,4	73	39,0 ^α
D	192	9	4,6	105	54,7 ^α	8	4,2	51	26,6	19	9,9	70	36,5 ^α
A	208	10	4,8	73	35,1 ^β	10	4,8	49	23,6	66	31,7	115	55,3 ^β

C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. N: αριθμός ωαρίων, ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ: το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση I και τη μετάφαση II. %: ποσοστό επί του συνόλου των καλλιεργούμενων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

IVM και στην IVF συγκριτικά με εκείνο του DMSO (30,0%, $P=0,002$) και του μάρτυρα (29,6%, $P=0,0024$), (εικόνα 7).

3.2.1.5. Γουαϊαζουλένιο στην IVM και στην IVC

Το ποσοστό γονιμοποίησης (78,0%), αλλά και ανεπτυγμένων εμβρύων (60,7%) ήταν σημαντικά μεγαλύτερο όταν τα ωάρια και τα έμβρυα επώάζονταν σε τροποποιημένο υπόστρωμα γουαϊαζουλενίου από το αντίστοιχο του DMSO (57,4%, $P<0,001$ και 39,2%, $P=0,003$ αντίστοιχα) και του μάρτυρα (57,8%, $P<0,001$ και 36,5%, $P<0,001$, αντίστοιχα), (εικόνα 8).



Εικόνα 3. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων *in vitro*.

C: τυποποιημένο υπόστρωμα,

D: υπόστρωμα με DMSO και

A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο.

ΑΔ/ΣΤΑ: αδιευκρίνιστα ωάρια.

Το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση I και τη μετάφαση II αποτελεί το σύνολο των ώριμων ωαρίων. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0,05$).

3.2.1.6. Γουαϊαζουλένιο στην IVF και στην IVC

Παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης, το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (55,3%) όταν γινόταν χρήση του τροποποιημένου υποστρώματος γουαϊαζουλενίου στην IVF και στην IVC συγκριτικά με εκείνο του DMSO (31,4%, $P=0,0016$) και του μάρτυρα (35,5%, $P=0,012$), (εικόνα 9).

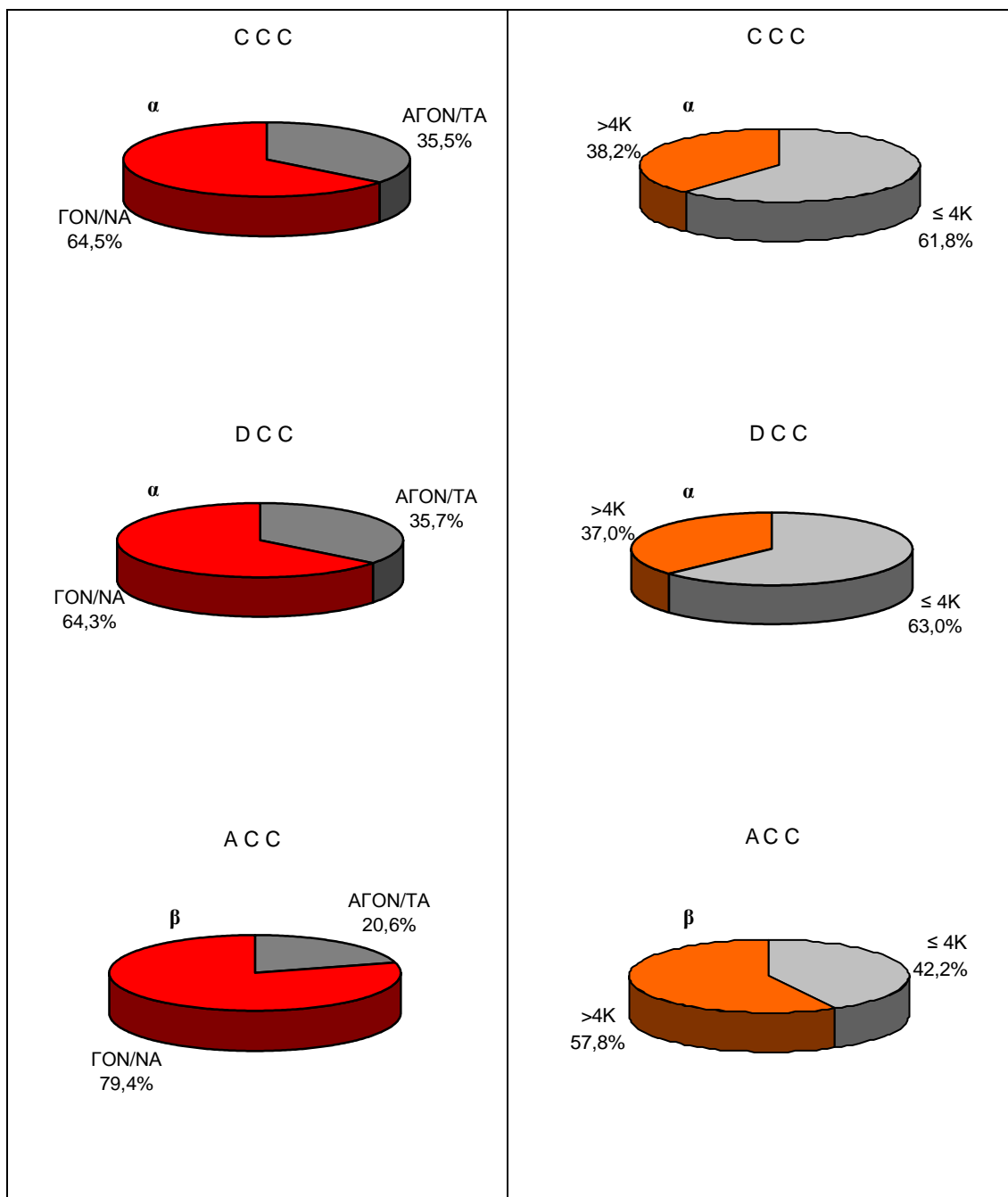
Πίνακας 10. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου ανά στάδιο προσθήκης στην IVP.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
C	C	C	138	89	64,5 ^a	34	38,2 ^a
D	C	C	143	92	64,3 ^a	34	37,0 ^a
A	C	C	170	135	79,4 ^b	78	57,8 ^b
C	C	C	107	66	61,7 ^a	23	34,8 ^a
C	D	C	137	80	58,4 ^a	23	28,8 ^a
C	A	C	194	105	54,1 ^a	32	30,5 ^a
C	C	C	114	73	64,0 ^a	29	39,7 ^a
C	C	D	144	91	63,2 ^a	37	40,7 ^a
C	C	A	205	128	62,4 ^a	80	62,5 ^b
C	C	C	102	54	52,9 ^a	16	29,6 ^a
D	D	C	109	60	55,0 ^a	18	30,0 ^a
A	A	C	123	78	63,4 ^a	44	56,4 ^b
C	C	C	128	74	57,8 ^a	27	36,5 ^a
D	C	D	130	74	57,4 ^a	29	39,2 ^a
A	C	A	173	135	78,0 ^b	82	60,7 ^b
C	C	C	104	62	59,6 ^a	22	35,5 ^a
C	D	D	127	70	55,1 ^a	22	31,4 ^a
C	A	A	206	114	55,3 ^a	63	55,3 ^b
C	C	C	111	63	56,8 ^a	22	34,9 ^a
D	D	D	107	58	54,2 ^a	19	32,8 ^a
A	A	A	166	106	63,9 ^a	60	56,6 ^b

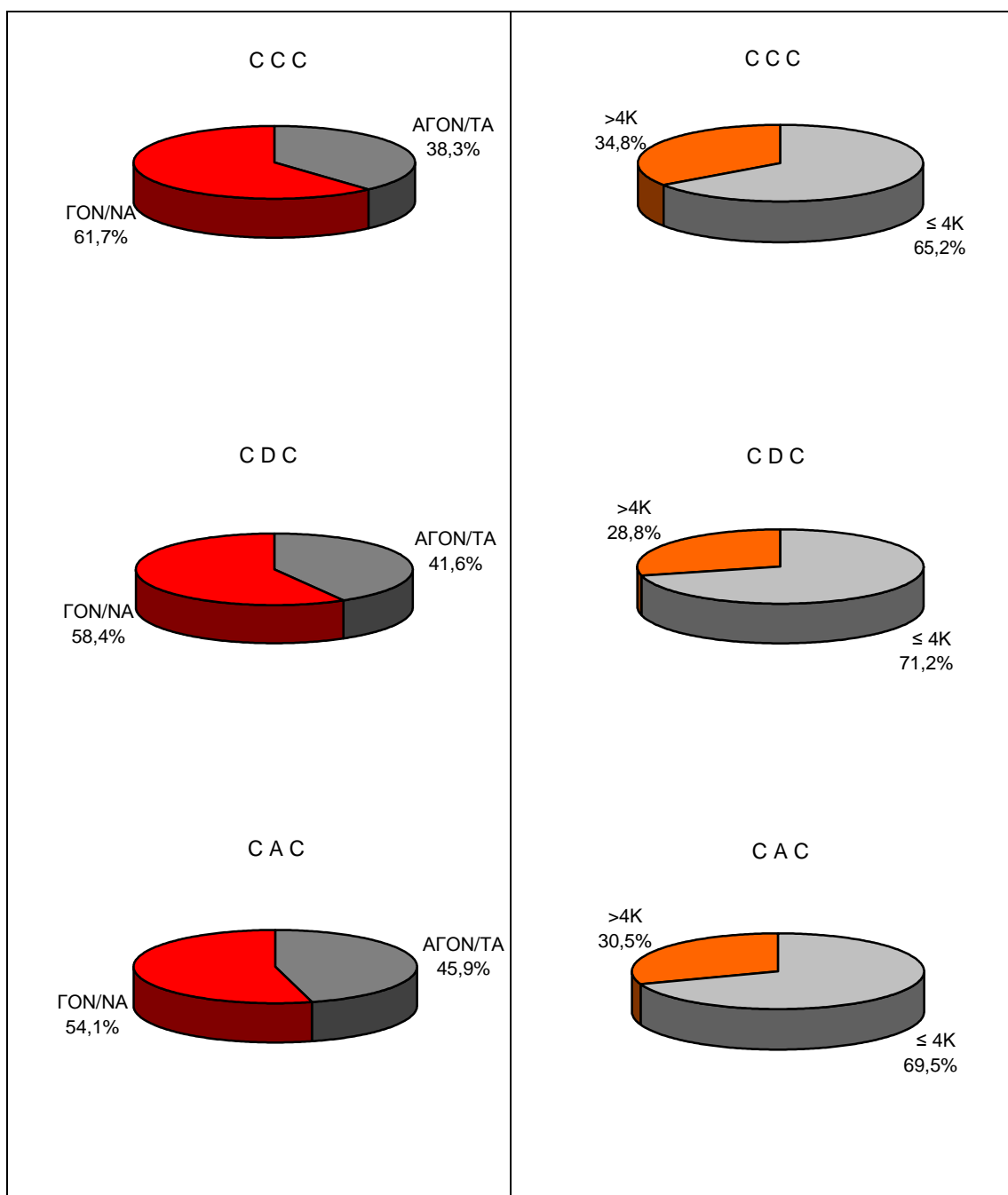
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

3.2.1.7. Γουαϊαζουλένιο στην IVM, IVF και IVC

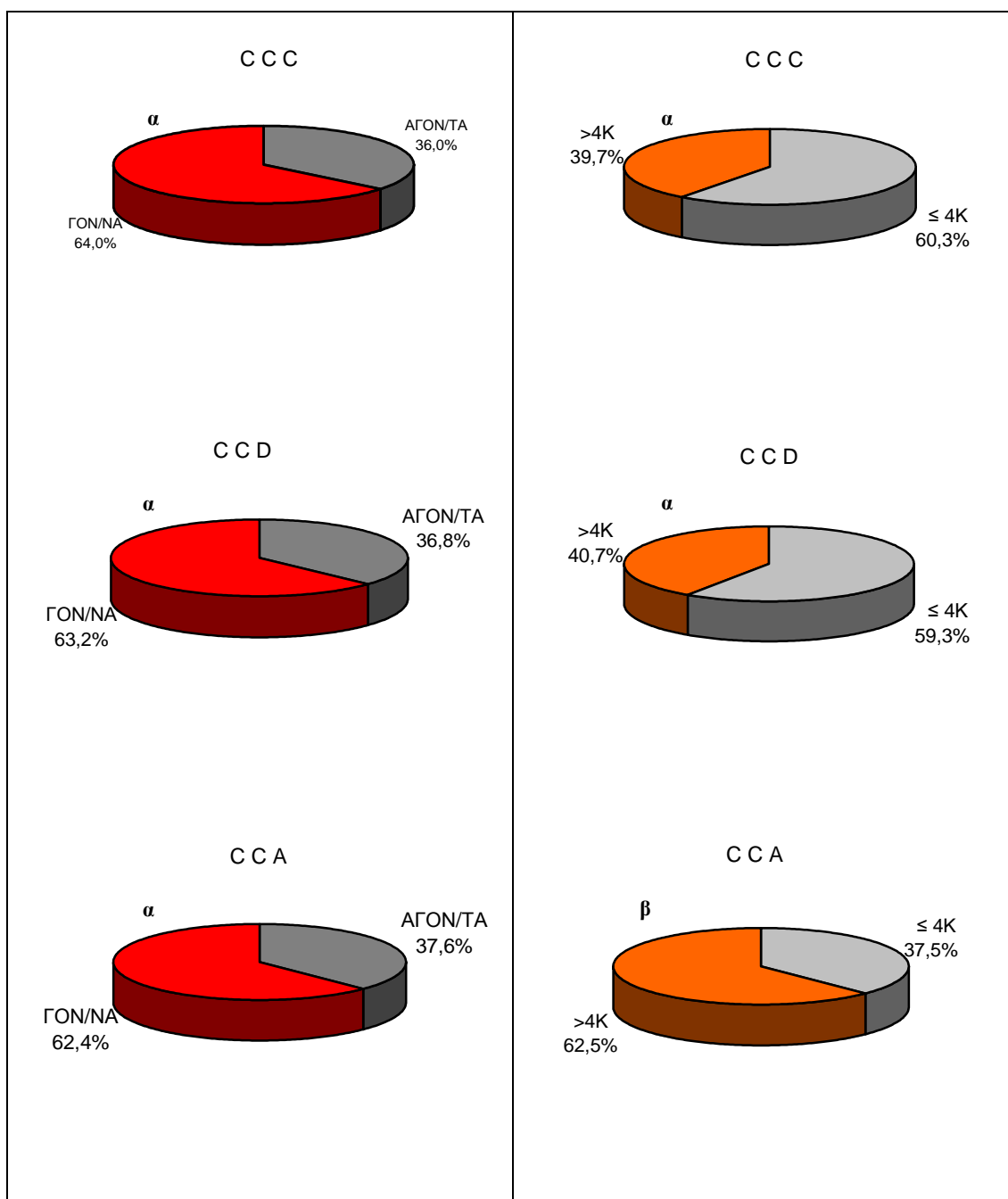
Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης, ωστόσο το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (56,6%) όταν γινόταν χρήση του τροποποιημένου υποστρώματος γουαϊαζουλενίου και σε όλες τις επώσεις συγκριτικά με εκείνο του DMSO (32,8%, P=0,0035) και του μάρτυρα (34,9%, P=0,0064), (εικόνα 10).



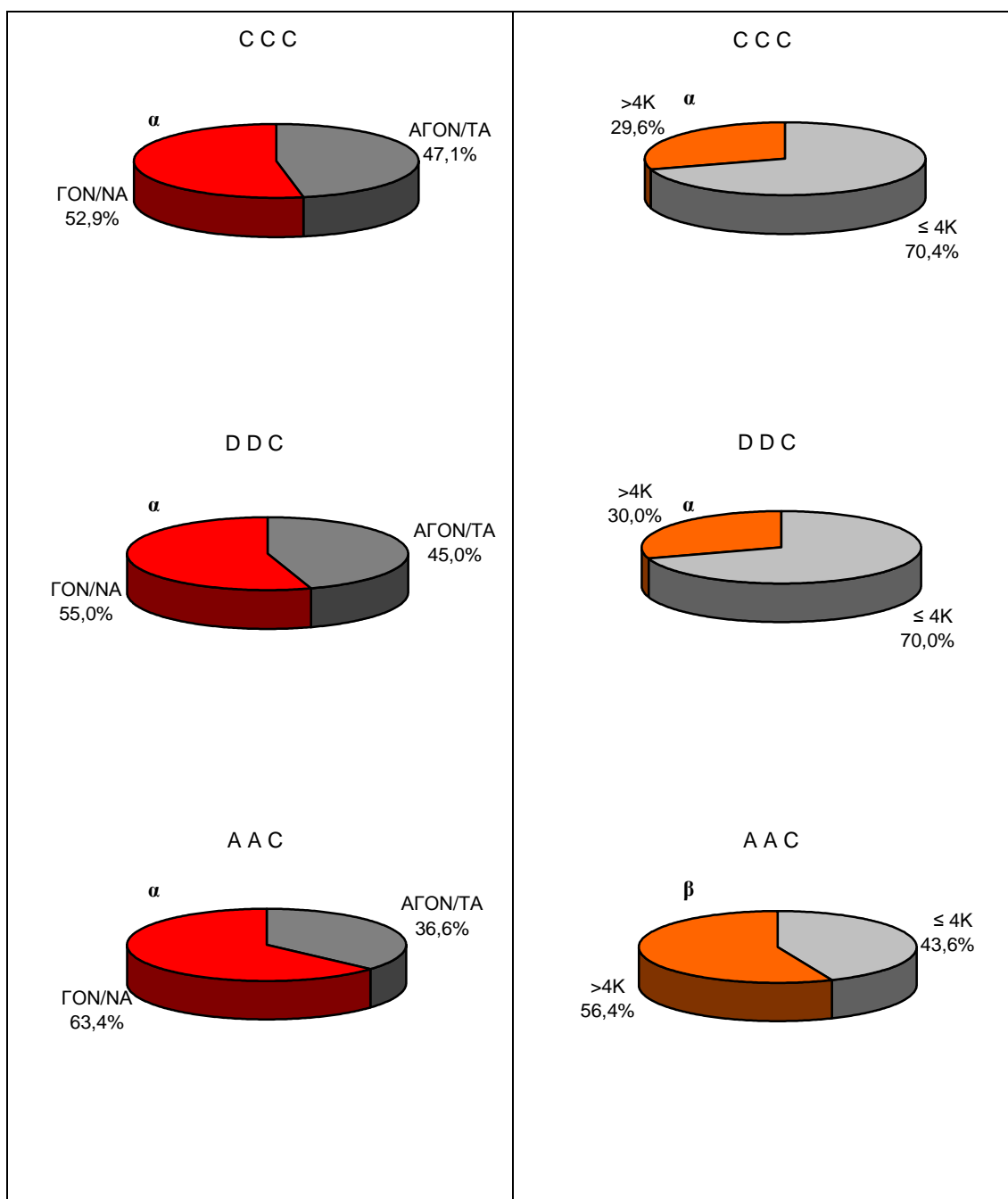
Εικόνα 4. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVM. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης (P<0,05).



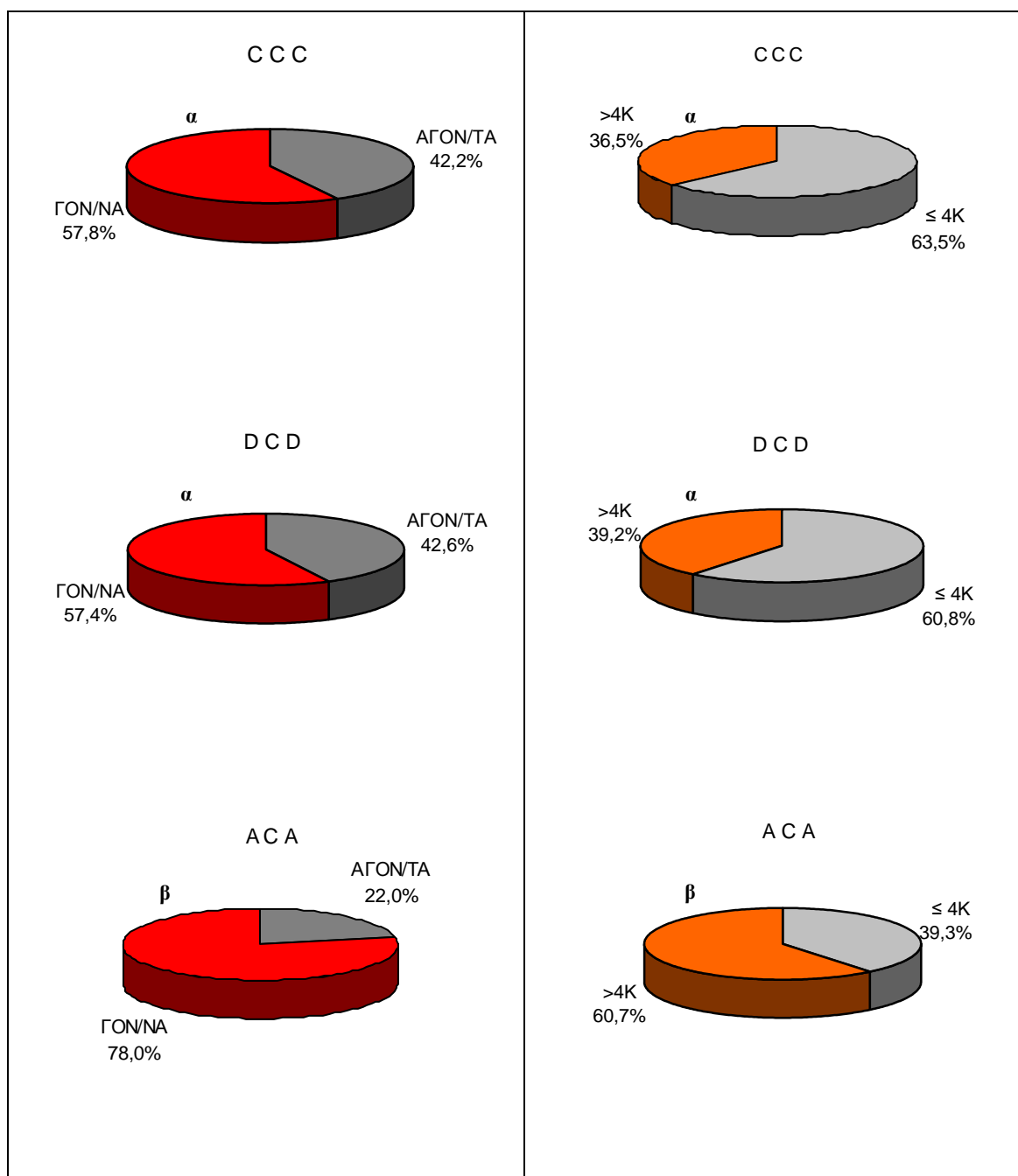
Εικόνα 5. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVF. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια, ≤4Κ: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4Κ: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της κάθε στήλης ($P < 0,05$).



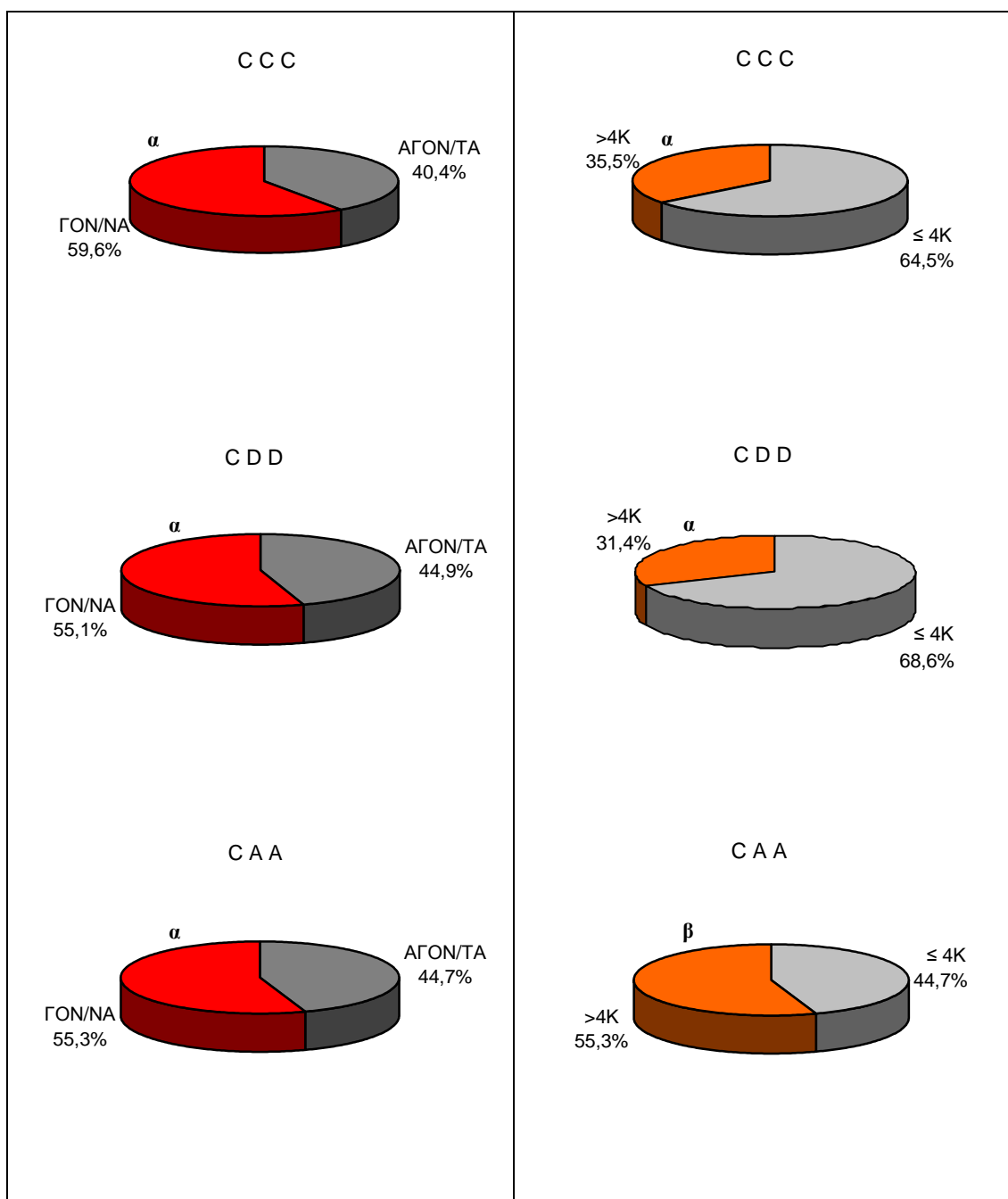
Εικόνα 6. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVC. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιοποιητά ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιοποιημένα ωάρια, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης ($P < 0,05$).



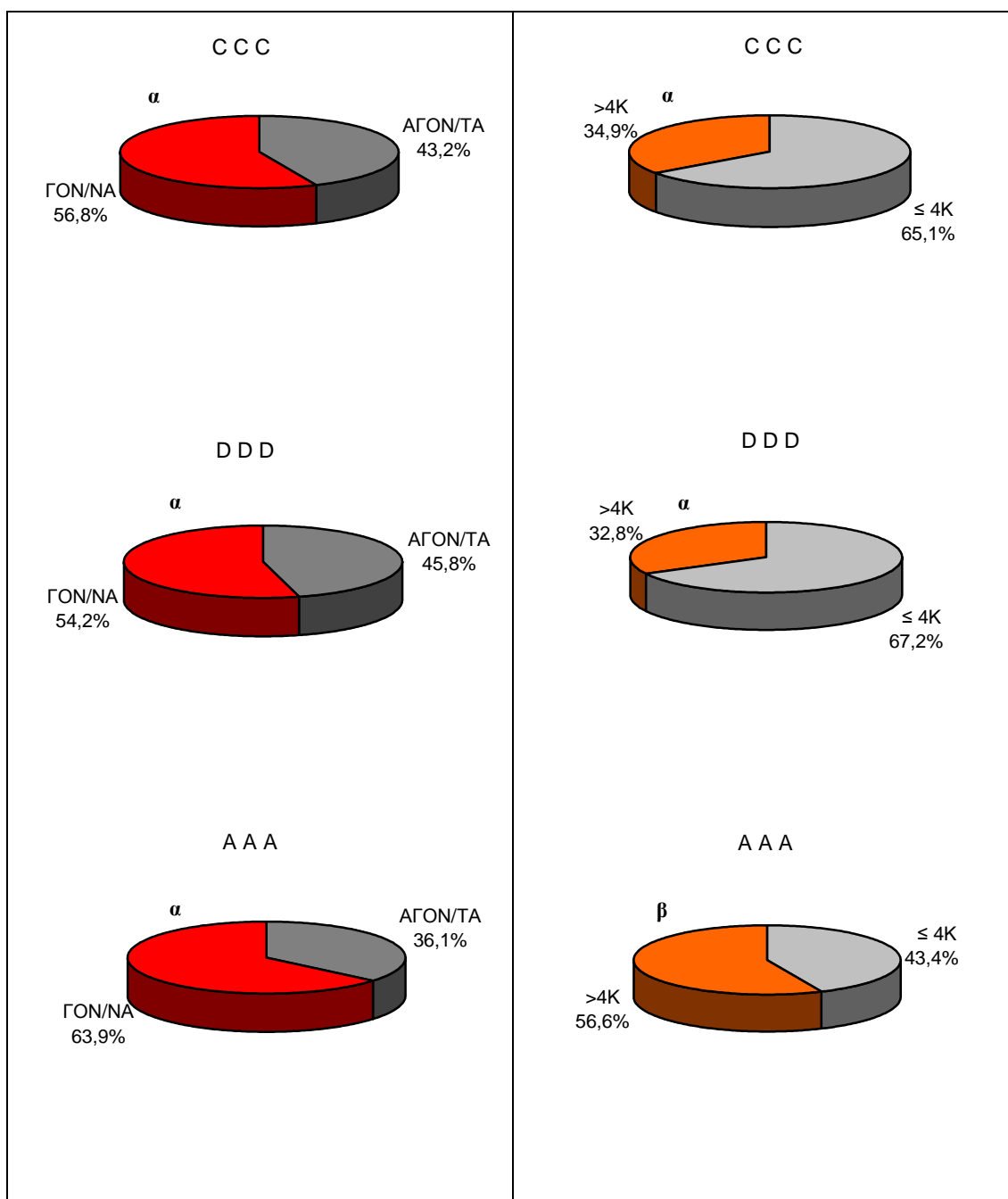
Εικόνα 7. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVM και IVF. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιοποιήτα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιοποιημένα ωάρια, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης (P<0,05).



Εικόνα 8. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVM και IVC. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης (P<0,05).



Εικόνα 9. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του στην IVF και IVC. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιοποιητά ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιοποιημένα ωάρια, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης (P<0,05).



Εικόνα 10. Επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην IVP μετά από προσθήκη του σε όλα τα στάδια της. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια, ≤4Κ: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4Κ: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά εντός της ίδιας στήλης (P<0,05).

3.2.2. Μελατονίνη

Για τους πειραματισμούς με τη μελατονίνη χρησιμοποιήθηκαν 5.130 ώρια συνολικά. Από αυτά, στα 1.658 εκτιμήθηκε μικροσκοπικά η εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα τους μετά το τέλος της IVM ενώ στα υπόλοιπα 3.472 πραγματοποιήθηκε IVF και IVC. Σε κάθε περίπτωση η προσθήκη της μελατονίνης γινόταν σε συγκεντρώσεις που εξασφάλιζαν αντιοξειδωτική προστασία ανάλογη αυτής του Υ.Π.Ω. ή και του υγρού του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο.

3.2.2.1 Μελατονίνη στην IVM

3.2.2.1.1. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της IVM

Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια της 18ωρης IVM προκάλεσε σημαντική μείωση:

- i) στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων (3,6%) έναντι του μάρτυρα (38,4%, $P < 0,001$), ενώ αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι αυξήθηκε σημαντικά τόσο το ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων όσο και εκείνων που παρέμειναν στο στάδιο της πρόφασης I, (πίνακας 11 και εικόνα 11),
- ii) στο ποσοστό γονιμοποίησης (20,6%) έναντι του μάρτυρα (62,7%, $P < 0,001$), (πίνακας 13 και εικόνα 13),
- iii) στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (0%) έναντι του μάρτυρα (30,3%, $P = 0,0016$), (πίνακας 13 και εικόνα 14).

Σημαντική ήταν επίσης η μείωση που προέκυψε από την αντίστοιχη 24ωρη IVM:

- i) στο ποσοστό ώριμων ωαρίων (10,5%) έναντι του μάρτυρα (77,7%, $P < 0,001$). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα ποσοστά τόσο των αδιευκρίνιστων ωαρίων, όσο και εκείνων που παρέμειναν στο στάδιο της πρόφασης I καθώς και εκείνων, στα οποία διεκόπη η εξέλιξη της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης στο στάδιο της μετάφασης I ήταν σημαντικά υψηλά, (πίνακας 12 και εικόνα 12),
- ii) στο ποσοστό γονιμοποίησης (10,3%) έναντι του μάρτυρα (68,3%, $P < 0,001$), (πίνακας 14 και εικόνα 15),
- iii) στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (8,3%) έναντι του μάρτυρα (47,6%, $P = 0,0115$), (πίνακας 14 και εικόνα 16).

3.2.2.1.2. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο της IVM

Η προσθήκη μελατονίνης μόνο στο πρώτο τρίτο της 18ωρης IVM προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (9,3%) έναντι του μάρτυρα (39,4%, $P < 0,001$) (πίνακας 11 και εικόνα 11). Η αντίστοιχη αγωγή στο πρώτο τρίτο της 24ωρης IVM δεν επηρέασε το ποσοστό αυτό (72,7% έναντι του μάρτυρα (70,7%), (πίνακας 12 και εικόνα 12).

Επίσης, η προσθήκη μελατονίνης στο πρώτο τρίτο της 18ωρης IVM είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης (28,8%) έναντι του μάρτυρα (66,9%, $P < 0,001$) (πίνακας 13 και εικόνα 13). Η αντίστοιχη αγωγή στο πρώτο τρίτο 24ωρης IVM δεν επηρέασε το ποσοστό αυτό (67,9%) έναντι του μάρτυρα (68,6%), (πίνακας 14 και εικόνα 15).

Τέλος, η προσθήκη μελατονίνης στο πρώτο τρίτο της 18ωρης IVM προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων (13%) έναντι του μάρτυρα

(31,3%, $P=0,0237$), (πίνακας 13 και εικόνα 14). Αντίθετα, σε 24ωρη IVM αυξήθηκε το αντίστοιχο ποσοστό (62,3%) έναντι του μάρτυρα (44,8%, $P=0,013$), (πίνακας 14 και εικόνα 16).

3.2.2.1.3. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο της IVM

Η προσθήκη μελατονίνης μόνο στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (22,8%) έναντι του μάρτυρα (37,7%, $P=0,0037$) (πίνακας 11 και εικόνα 11), ενώ η αντίστοιχη αγωγή στο τελευταίο τρίτο της 24ωρης IVM δεν επηρέασε το ποσοστό αυτό (67,5%) έναντι του μάρτυρα (71,4%), (πίνακας 12 και εικόνα 12).

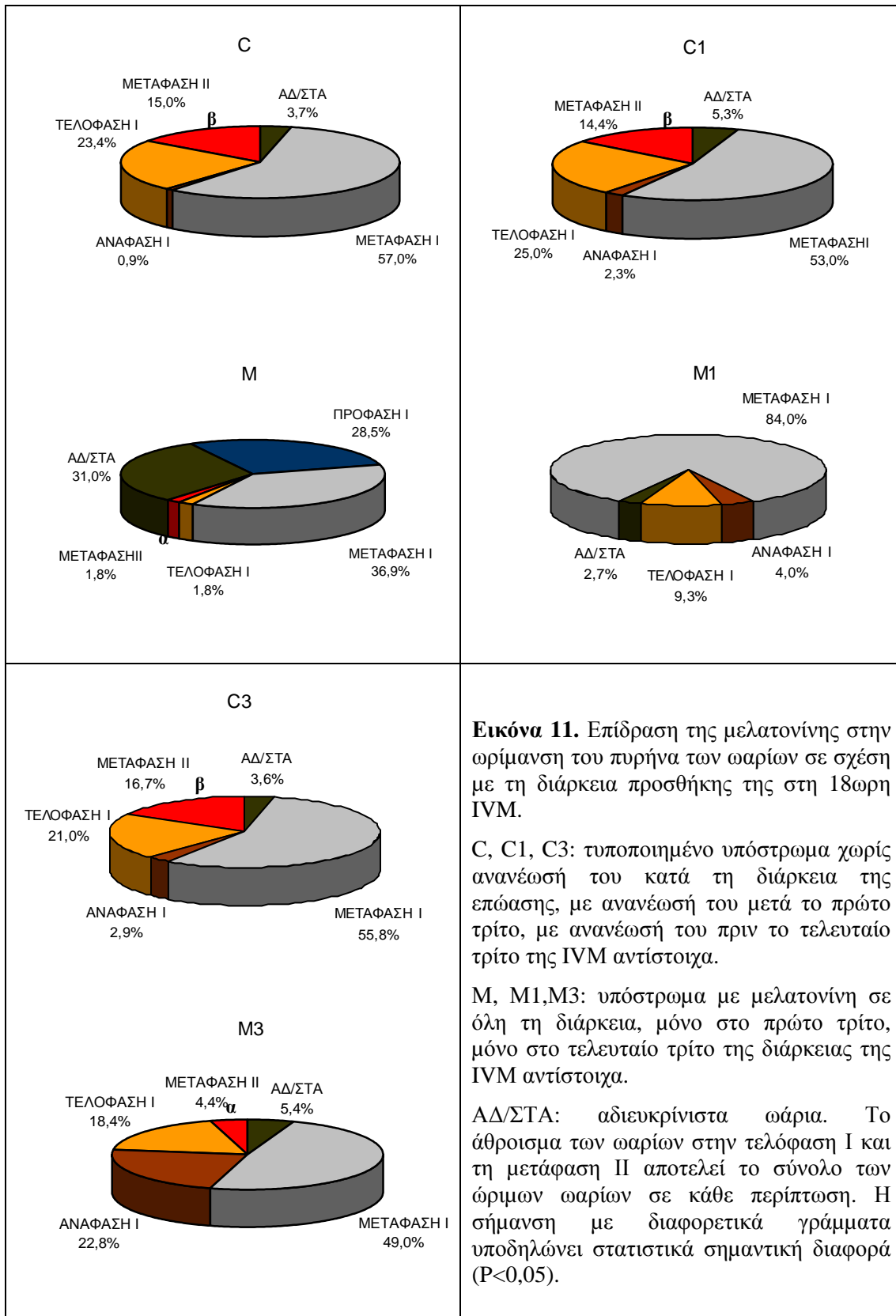
Επίσης, η προσθήκη μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM δεν επηρέασε το ποσοστό γονιμοποίησης (60,2%) έναντι του μάρτυρα (57,9%), (πίνακας 13 και εικόνα 13), ενώ η αντίστοιχη αγωγή στο τελευταίο τρίτο 24ωρης IVM προκάλεσε σημαντική αύξηση του ποσοστού αυτού (79,6%) έναντι του μάρτυρα (67,5%, $P=0,015$), (πίνακας 14 και εικόνα 15).

Τέλος, η προσθήκη μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων (51% έναντι 34,3% του μάρτυρα, $P=0,022$), (πίνακας 13 και εικόνα 14). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την αντίστοιχη αγωγή στο τελευταίο τρίτο της 24ωρης IVM (62,8%) έναντι του μάρτυρα (45,6%, $P=0,015$), (πίνακας 14 και εικόνα 16).

Πίνακας 11. Επίδραση της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVM.

ΥΠΟ ΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΑ		ΠΡΟΦΑΣΗ I		ΜΕΤΑΦΑΣΗ I		ΑΝΑΦΑΣΗ I		ΤΕΛΟΦΑΣΗ I		ΜΕΤΑΦΑΣΗ II		ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
C	107	4	3,7 ^α	0	0,0 ^α	61	57,0 ^β	1	0,9 ^α	25	23,4	16	15,0	41	38,4 ^γ
M	168	52	31,0 ^β	48	28,5 ^β	62	36,9 ^α	0	0,0 ^α	3	1,8	3	1,8	6	3,6 ^α
C ₁	132	7	5,3 ^α	0	0,0 ^α	70	53,0 ^β	3	2,3 ^α	33	25,0	19	14,4	52	39,4 ^γ
M ₁	150	4	2,7 ^α	0	0,0 ^α	126	84,0 ^γ	6	4,0 ^α	14	9,3	0	0,0	14	9,3 ^α
C ₃	138	5	3,6 ^α	0	0,0 ^α	77	55,8 ^β	4	2,9 ^α	29	21,0	23	16,7	52	37,7 ^γ
M ₃	184	10	5,4 ^α	0	0,0 ^α	90	49,0 ^β	42	22,8 ^β	34	18,4	8	4,4	42	22,8 ^β

C, C₁, C₃: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα. M, M₁, M₃: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα. N: αριθμός ωαρίων, ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ: το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση I και τη μετάφαση II. %: ποσοστό επί του συνόλου των καλλιεργούμενων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).



Εικόνα 11. Επίδραση της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVM.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM αντίστοιχα.

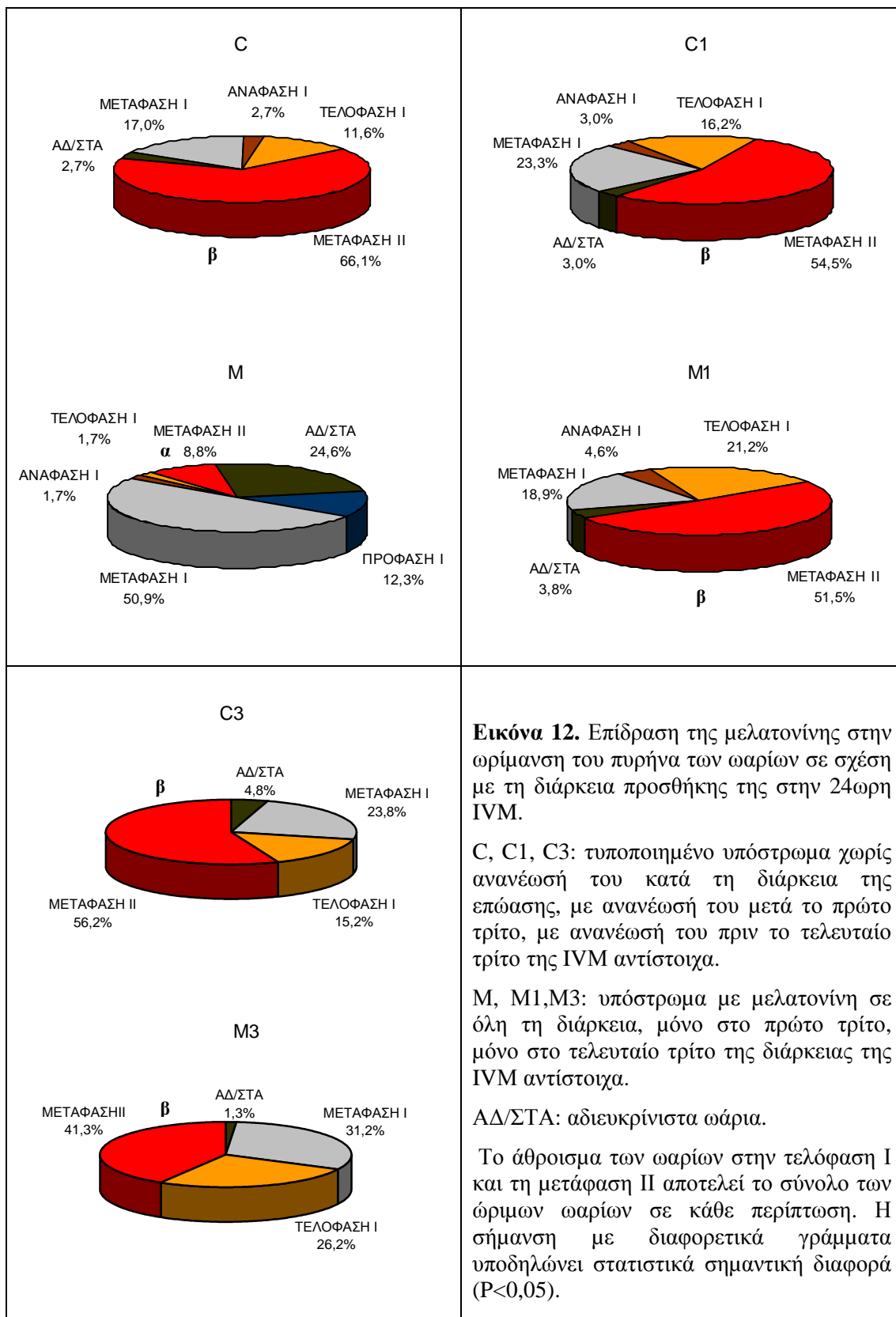
M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM αντίστοιχα.

ΑΔ/ΣΤΑ: αδιευκρίνιστα ωάρια. Το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση Ι και τη μετάφαση Ι αποτελεί το σύνολο των ώριμων ωαρίων σε κάθε περίπτωση. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

Πίνακας 12. Επίδραση της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 24ωρη IVM

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΑ		ΠΡΟΦΑΣΗ I		ΜΕΤΑΦΑΣΗ I		ΑΝΑΦΑΣΗ I		ΤΕΛΟΦΑΣΗ I		ΜΕΤΑΦΑΣΗ II		ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
C	112	3	2,7 ^α	0	0,0 ^α	19	17,0 ^α	3	2,7	13	11,6	74	66,1	87	77,7 ^β
M	171	42	24,6 ^β	21	12,3 ^β	87	50,9 ^γ	3	1,7	3	1,7	15	8,8	18	10,5 ^α
C ₁	99	3	3,0 ^α	0	0,0 ^α	23	23,3 ^{α,β}	3	3,0	16	16,2	54	54,5	70	70,7 ^β
M ₁	132	5	3,8 ^α	0	0,0 ^α	25	18,9 ^α	6	4,6	28	21,2	68	51,5	96	72,7 ^β
C ₃	105	5	4,8 ^α	0	0,0 ^α	25	23,8 ^{α,β}	0	0,0	16	15,2	59	56,2	75	71,4 ^β
M ₃	160	2	1,3 ^α	0	0,0 ^α	50	31,2 ^β	0	0,0	42	26,2	66	41,3	108	67,5 ^β

C, C₁, C₃: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα. M, M₁, M₃: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα. N: αριθμός ωαρίων, ΣΥΝΟΛΟ ΩΡΙΜΩΝ: το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση I και τη μετάφαση II. %: ποσοστό επί του συνόλου των καλλιεργούμενων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).



Εικόνα 12. Επίδραση της μελατονίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 24ωρη IVM.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM αντίστοιχα.

M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM αντίστοιχα.

ΑΔ/ΣΤΑ: αδιευκρίνιστα ωάρια.

Το άθροισμα των ωαρίων στην τελόφαση Ι και τη μετάφαση ΙΙ αποτελεί το σύνολο των ώριμων ωαρίων σε κάθε περίπτωση. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

Πίνακας 13. Επίδραση της μελατονίνης στην IVP σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVM.

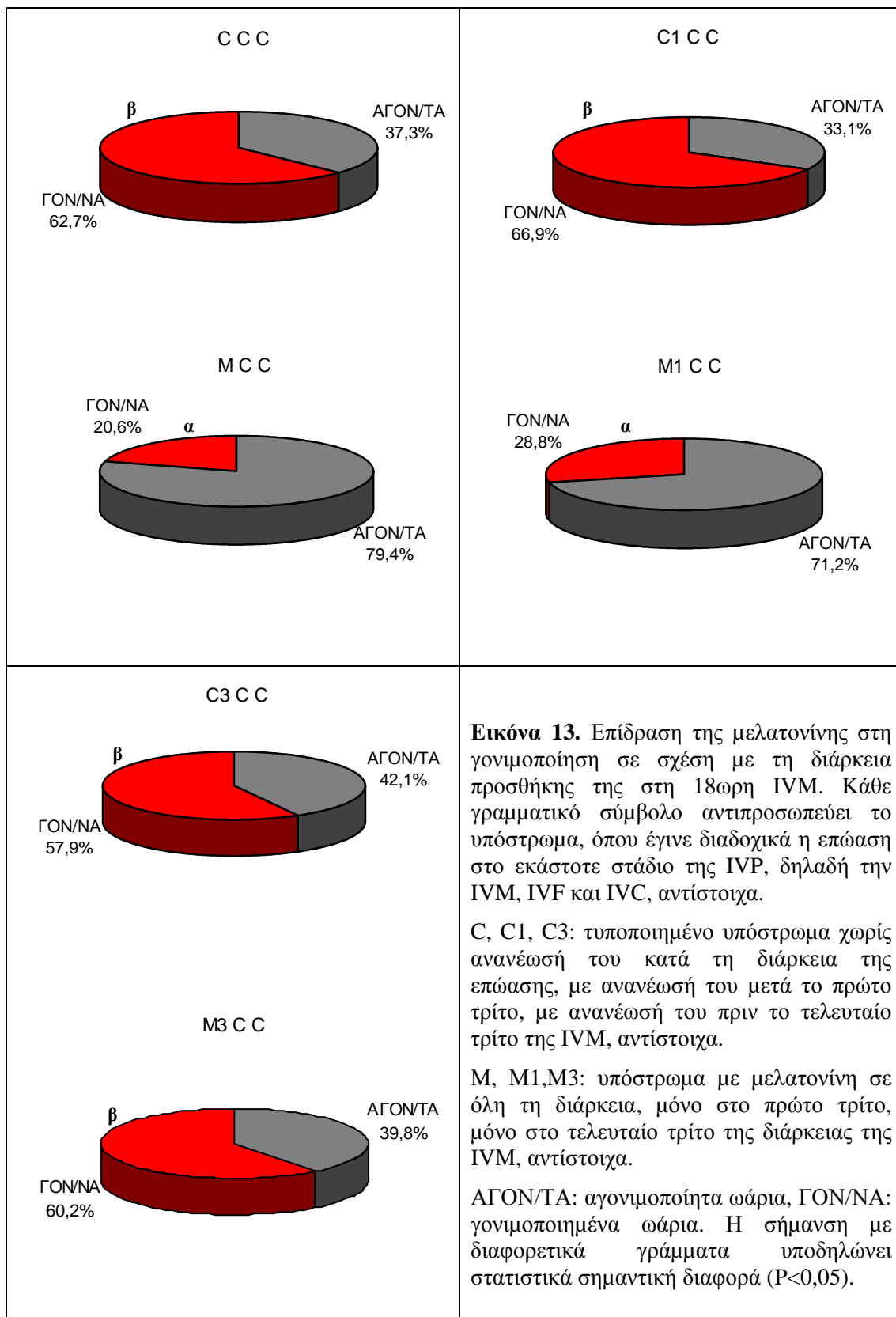
ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
18ωρη	24ωρη	48ωρη					
C	C	C	142	89	62,7 ^β	27	30,3 ^γ
M	C	C	136	28	20,6 ^α	0	0,0 ^α
C ₁	C	C	148	99	66,9 ^β	31	31,3 ^γ
M ₁	C	C	160	46	28,8 ^α	6	13,0 ^β
C ₃	C	C	126	73	57,9 ^β	25	34,3 ^γ
M ₃	C	C	166	100	60,2 ^β	51	51,0 ^δ

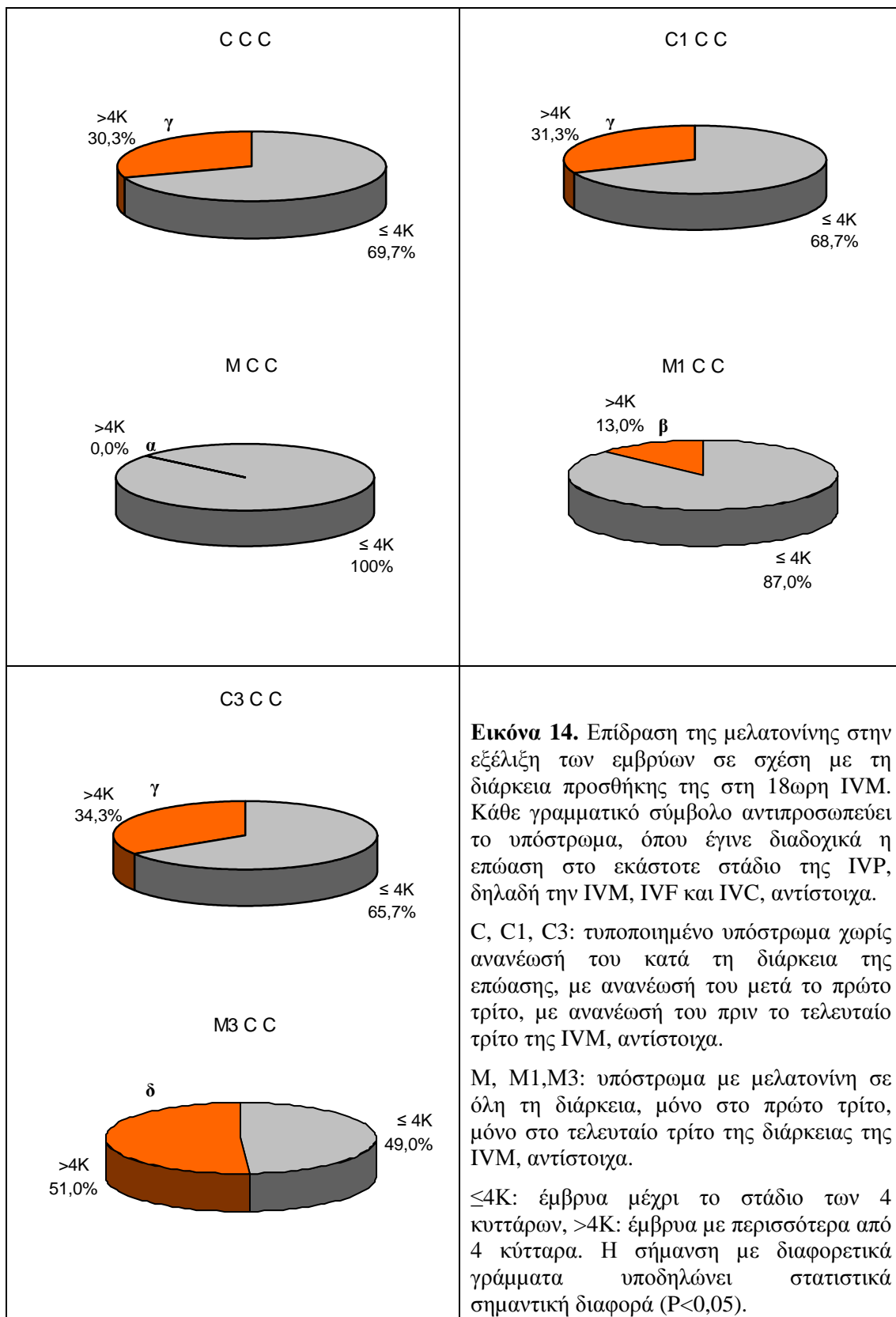
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C₁, C₃: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα. M, M₁, M₃: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Πίνακας 14. Επίδραση της μελατονίνης στην IVP σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 24ωρη IVM.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
24ωρη	24ωρη	48ωρη					
C	C	C	120	82	68,3 ^β	39	47,6 ^β
M	C	C	117	12	10,3 ^α	1	8,3 ^α
C ₁	C	C	140	96	68,6 ^β	43	44,8 ^β
M ₁	C	C	156	106	67,9 ^β	66	62,3 ^γ
C ₃	C	C	117	79	67,5 ^β	36	45,6 ^β
M ₃	C	C	162	129	79,6 ^γ	81	62,8 ^γ

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C₁, C₃: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα. M, M₁, M₃: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).



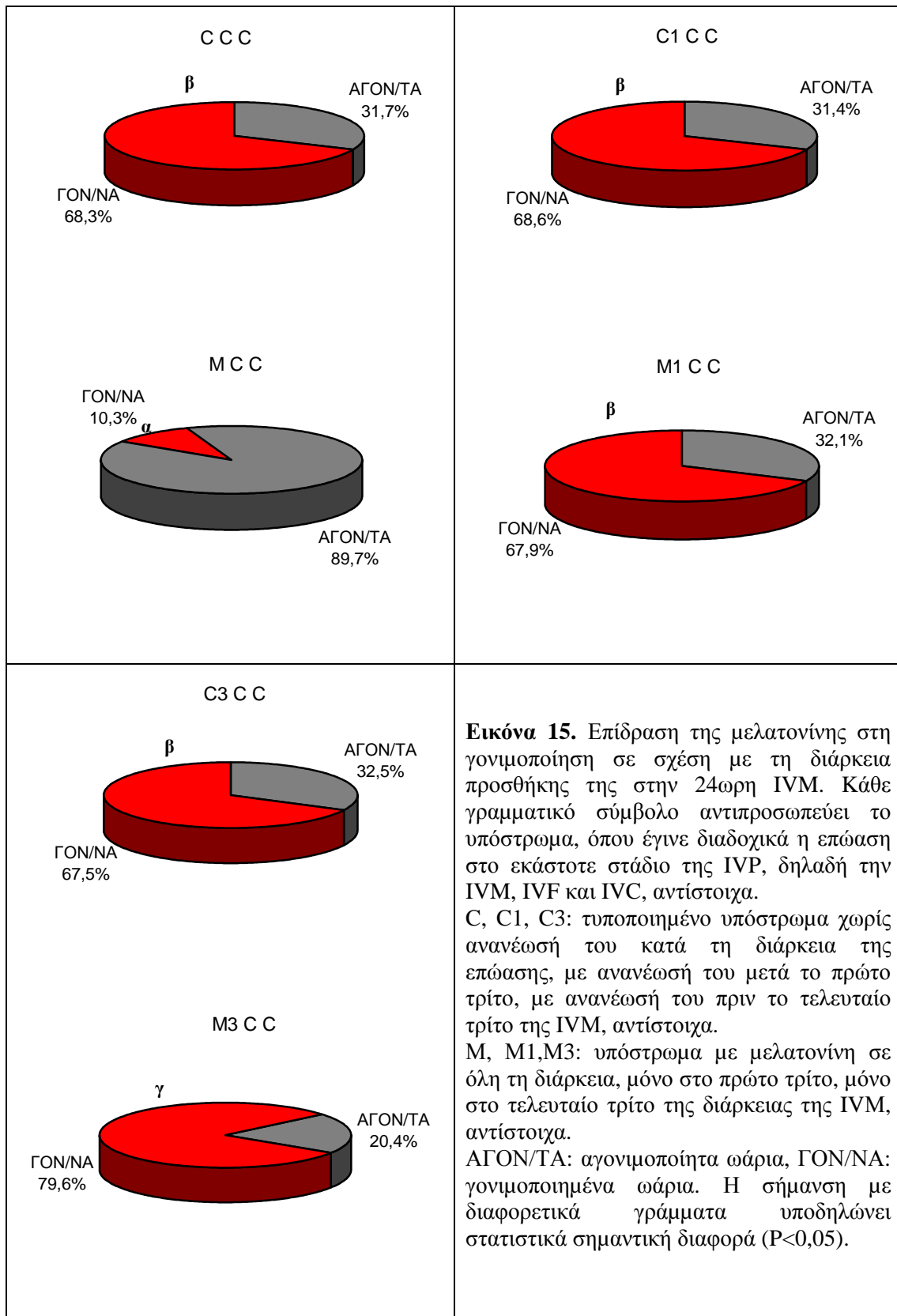


Εικόνα 14. Επίδραση της μελατονίνης στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVM. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα.

M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα.

$\le 4K$: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, $>4K$: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

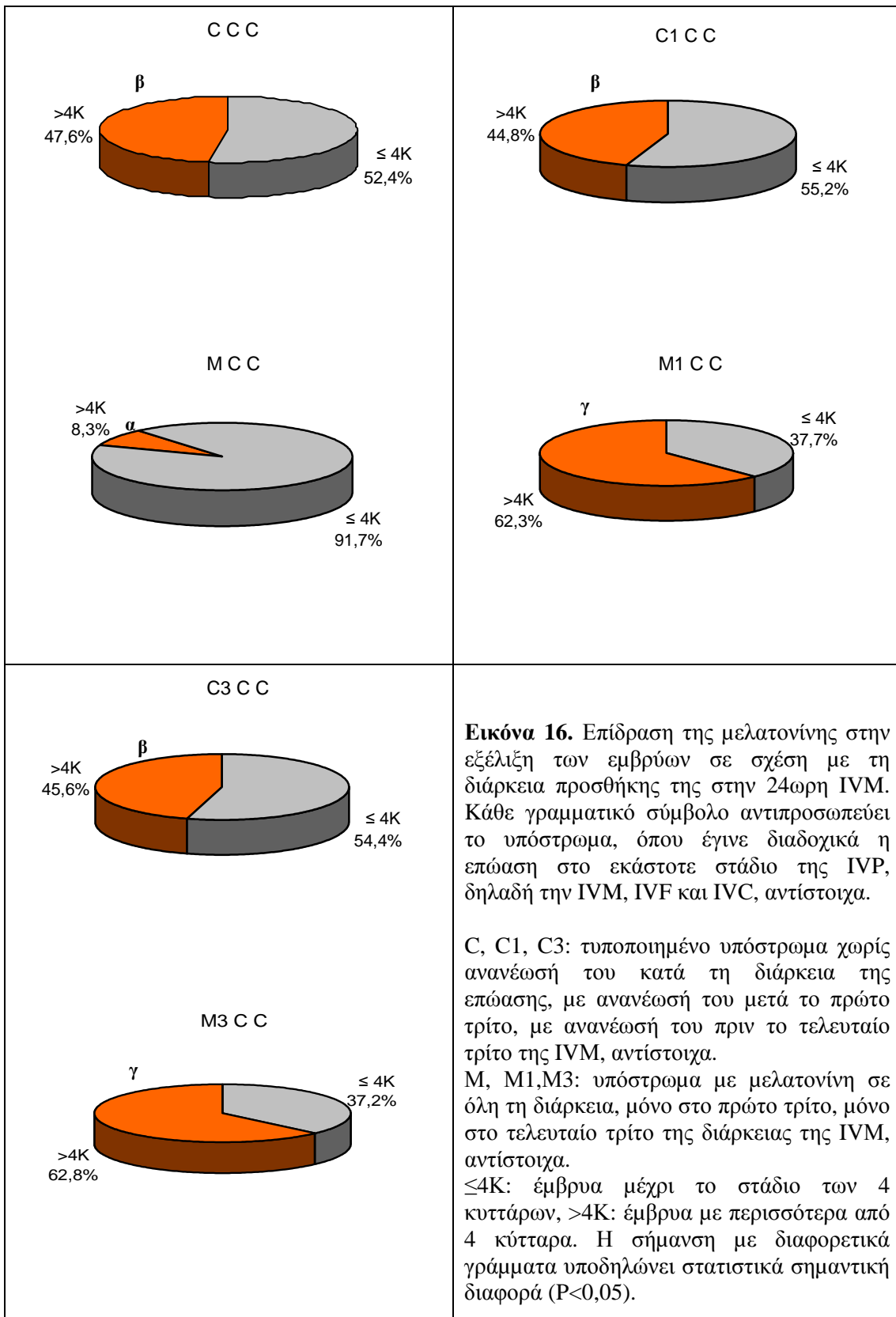


Εικόνα 15. Επίδραση της μελατονίνης στη γονιμοποίηση σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 24ωρη IVM. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα.

M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα.

ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).



Εικόνα 16. Επίδραση της μελατονίνης στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 24ωρη IVM. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVM, αντίστοιχα.

M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVM, αντίστοιχα.

≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05).

3.2.2.2. Μελατονίνη στη 18ωρη IVF

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της μελατονίνης στην IVP κατόπιν προσθήκης της στην IVF φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 15 και τις εικόνες 17 και 18.

3.2.2.2.1. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της IVF

Η προσθήκη μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια της IVF προκάλεσε σημαντική μείωση:

- i) στο ποσοστό γονιμοποίησης (13,1%) έναντι του μάρτυρα (66,3%, $P<0,001$),
- ii) στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (7,1%) έναντι του μάρτυρα (42,0%, $P=0,013$).

3.2.2.2.2. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο της IVF

Η προσθήκη μελατονίνης μόνο στο πρώτο τρίτο της 18ωρης IVF προκάλεσε σημαντική μείωση:

- i) στο ποσοστό γονιμοποίησης (40,5%) έναντι του μάρτυρα (67,7%, $P<0,001$),
- ii) στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (9,8%) έναντι του μάρτυρα (41,8%, $P<0,001$).

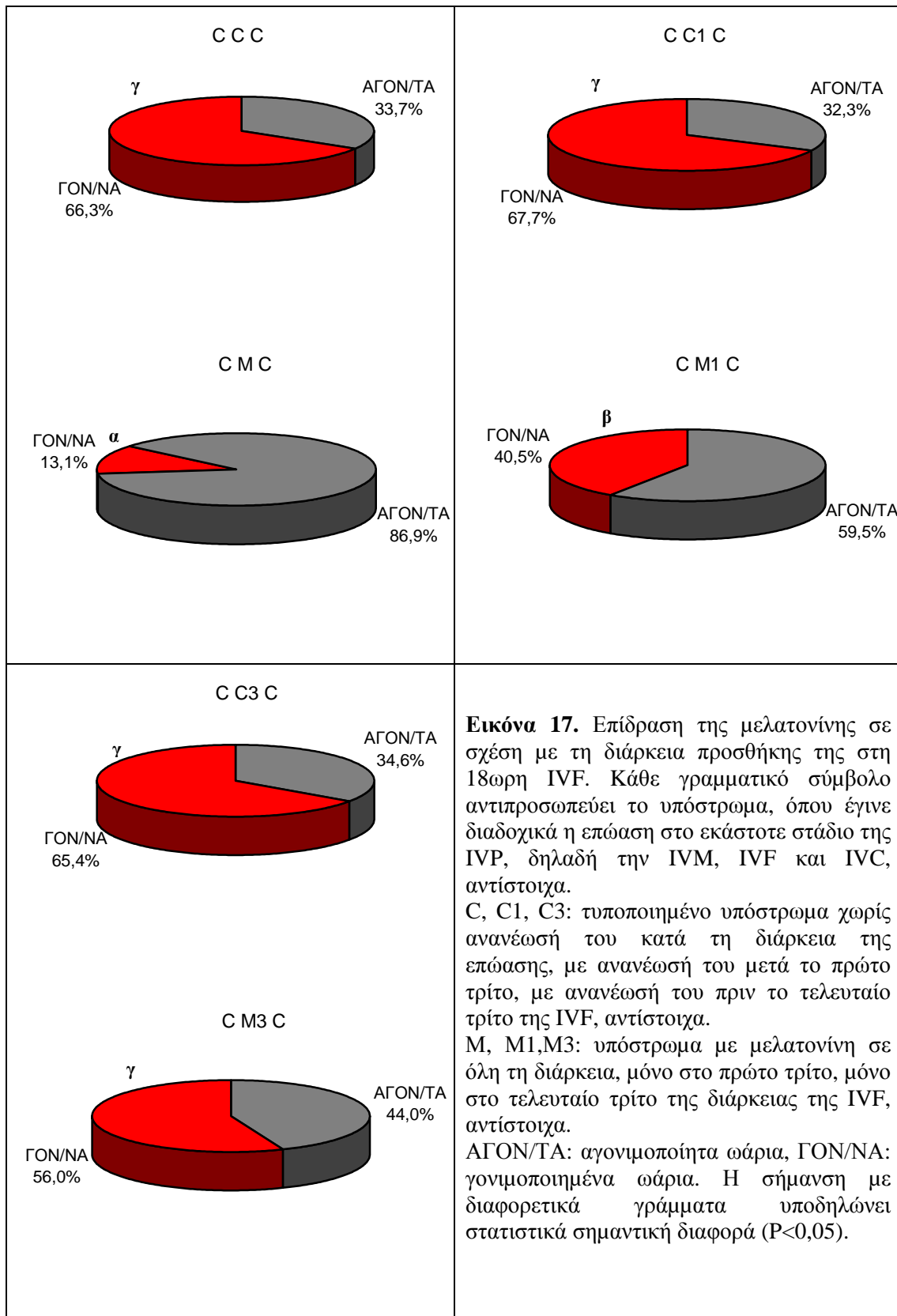
3.2.2.2.3. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο της IVF

Η προσθήκη μελατονίνης μόνο στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVF δεν επηρέασε ούτε το ποσοστό γονιμοποίησης (56,0%) έναντι του μάρτυρα (65,4%) ούτε το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (32,1%) έναντι του μάρτυρα (41,2%).

Πίνακας 15. Επίδραση της μελατονίνης στην IVP σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVF.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
24ωρη	18ωρη	48ωρη					
C	C	C	104	69	66,3 ^γ	29	42,0 ^β
C	M	C	107	14	13,1 ^α	1	7,1 ^α
C	C ₁	C	99	67	67,7 ^γ	28	41,8 ^β
C	M ₁	C	126	51	40,5 ^β	5	9,8 ^α
C	C ₃	C	104	68	65,4 ^γ	28	41,2 ^β
C	M ₃	C	100	56	56,0 ^γ	18	32,1 ^β

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C₁, C₃: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVF, αντίστοιχα. M, M₁, M₃: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVF, αντίστοιχα. ΑΓΟΝ/ΓΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).

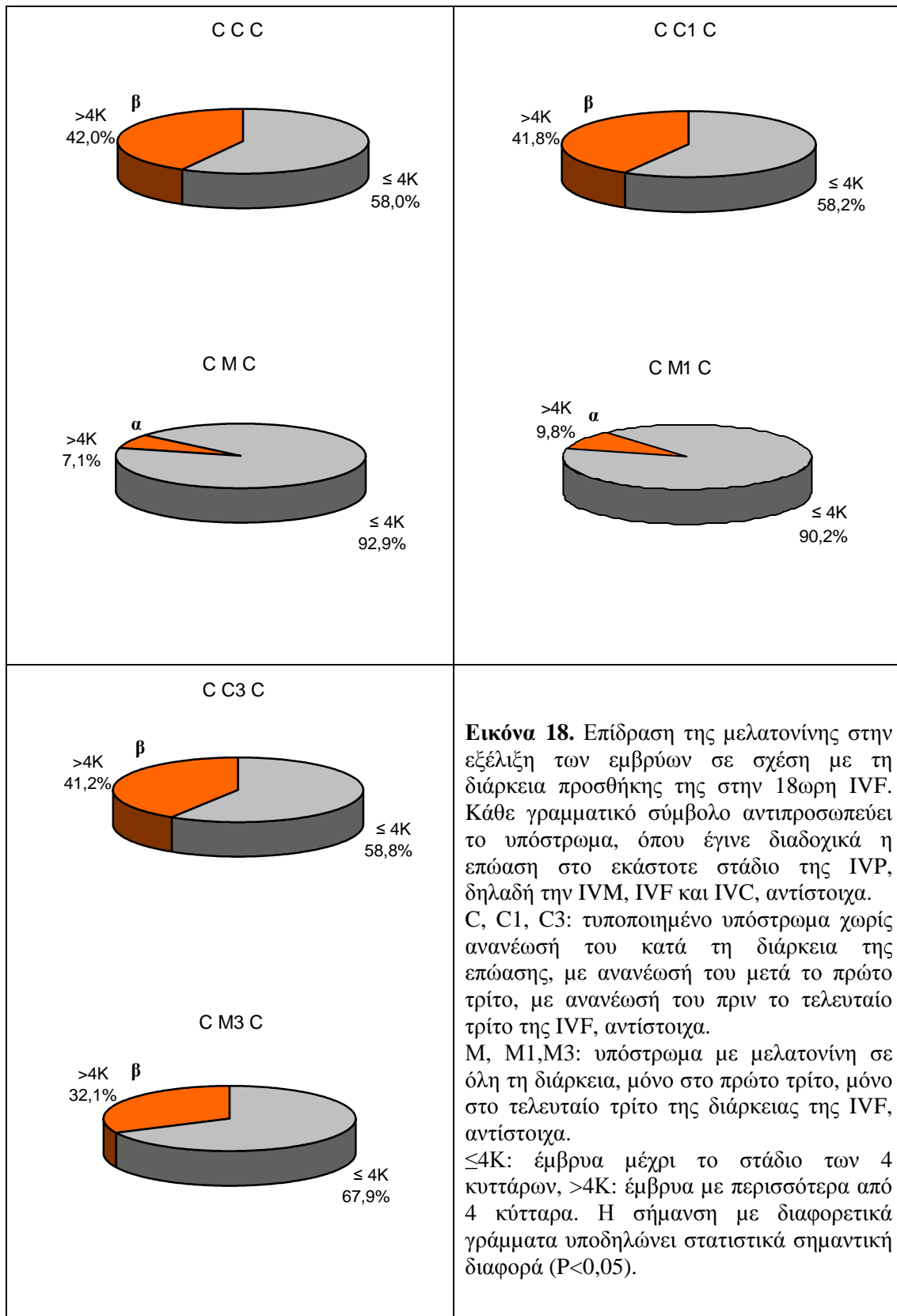


Εικόνα 17. Επίδραση της μελατονίνης σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 18ωρη IVF. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα.

C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVF, αντίστοιχα.

M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVF, αντίστοιχα.

ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΓΟΝ/ΝΑ: γονιμοποιημένα ωάρια. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).



Εικόνα 18. Επίδραση της μελατονίνης στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στην 18ωρη IVF. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C1, C3: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μετά το πρώτο τρίτο, με ανανέωσή του πριν το τελευταίο τρίτο της IVF, αντίστοιχα. M, M1, M3: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο τρίτο, μόνο στο τελευταίο τρίτο της διάρκειας της IVF, αντίστοιχα. ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05).

3.2.2.3. Μελατονίνη στην IVC

Η προσθήκη μελατονίνης στην IVC γινόταν κατόπιν 24ωρων επώσεων στα τυποποιημένα υποστρώματα των IVM και IVF. Τα αποτελέσματα της επίδρασης της μελατονίνης στην IVP κατόπιν προσθήκης της στην IVC φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 16 και την εικόνα 19.

3.2.2.3.1 Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της IVC

Η προσθήκη μελατονίνης, σε όλη τη διάρκεια της 48ωρης IVC προκάλεσε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (5,6%) έναντι του μάρτυρα (47,2 %, $P<0,001$).

3.2.2.3.2. Μελατονίνη στο πρώτο έκτο της IVC

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την προθήκη της μελατονίνης μόνο στο πρώτο τρίτο της πρώτης ημέρας της 48ωρης IVC (34,2 %) έναντι του μάρτυρα (48,8%, $P=0,035$).

Πίνακας 16. Επίδραση της μελατονίνης στην IVP σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 48ωρη IVC.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
24ωρη	24ωρη	48ωρη					
C	C	C	104	72	69,2	34	47,2 ^{β,γ}
C	C	M	151	108	71,5	6	5,6 ^α
C	C	C _{α6}	122	86	70,5	42	48,8 ^γ
C	C	M _{α6}	166	117	70,5	40	34,2 ^β
C	C	C _{β6}	116	81	69,8	39	48,1 ^γ
C	C	M _{β6}	213	147	69,0	92	62,6 ^δ
C	C	C _{αβ6}	127	89	70,1	40	44,9 ^{β,γ}
C	C	M _{αβ6}	143	100	69,9	35	35,0 ^{β,γ}

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C_{α6}, C_{β6}, C_{αβ6} : τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώσης, με ανανέωσή του μόνο μετά το πρώτο έκτο, με ανανέωσή του μόνο πριν το τελευταίο έκτο, με ανανέωσή του και μετά το πρώτο και πριν το τελευταίο έκτο της IVC, αντίστοιχα. M, M_{α6}, M_{β6}, M_{αβ6}: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο έκτο, μόνο στο τελευταίο έκτο, στο πρώτο και στο τελευταίο έκτο της IVC, αντίστοιχα. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγωνισμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($P<0,05$).

3.2.2.3.3. Μελατονίνη στο τελευταίο έκτο της IVC

Η προσθήκη της μελατονίνης μόνο στο τελευταίο τρίτο της δεύτερης ημέρας της 48ωρης IVC προκάλεσε, αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων (62,6 %) έναντι του μάρτυρα (48,1 %, $P=0,035$).

3.2.2.3.4. Μελατονίνη στο πρώτο και τελευταίο έκτο της IVC

Τέλος, η προσθήκη της μελατονίνης, τόσο στο πρώτο τρίτο της πρώτης, όσο και στο τελευταίο τρίτο της δεύτερης ημέρας της IVC δεν επηρέασε το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων (35%) έναντι του μάρτυρα (44,9%).

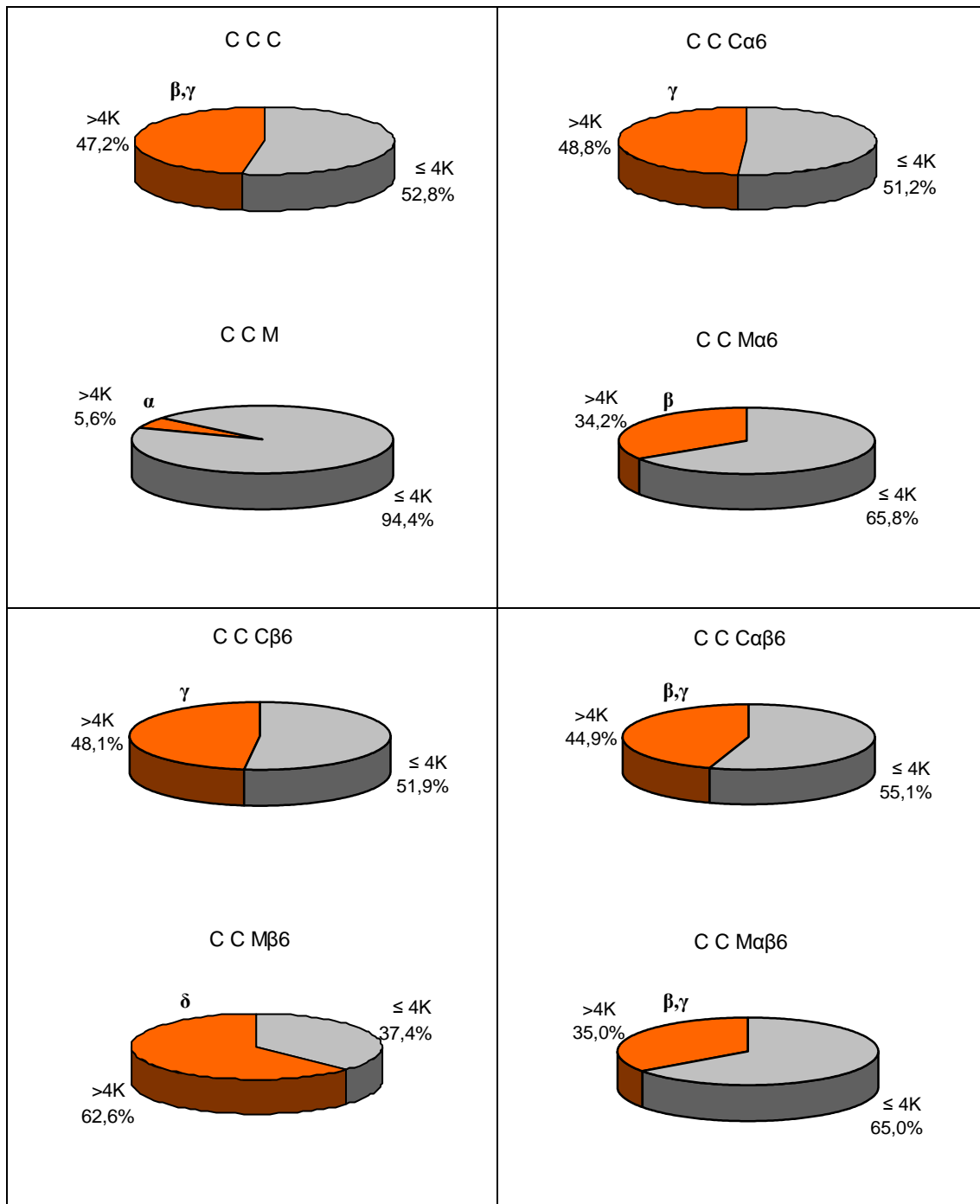
3.2.3. Επίδραση της διάρκειας επώασης των IVM και IVF στην IVP

Από το άθροισμα των επιμέρους αποτελεσμάτων που αφορούν στους μάρτυρες, προέκυψε ότι το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερα, όταν η διάρκεια επώασης στην IVM και στην IVF ήταν 24 ώρες (69,1% και 46,7%, αντίστοιχα), σε σύγκριση με την επώαση διάρκειας 18 ωρών στην IVM και στην IVF (59,8% και 35,8%, αντίστοιχα, $P<0,001$), (πίνακας 17).

3.2.4. Σύγκριση της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην IVP με το μάρτυρα επώασης διάρκειας 24 ωρών στην IVM και στην IVF

Οι πειραματισμοί που αφορούσαν στη μελέτη της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην IVP πραγματοποιήθηκαν σε επώσεις 18ωρης διάρκειας στις IVM και IVF. Ωστόσο, τα ποσοστά γονιμοποίησης και ανεπτυγμένων εμβρύων των πειραματισμών αυτών, όταν συγκρίθηκαν με εκείνα του μάρτυρα των αντίστοιχων επώασεων 24ωρης διάρκειας (69,1% και 46,7%, αντίστοιχα), προέκυψε ότι (πίνακας 18) :

- i) ήταν σημαντικά μεγαλύτερα, όπου γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVM μόνο (79,4%, $P=0,007$, και 57,8%, $P=0,02$, αντίστοιχα) ή σε συνδυασμό με προσθήκη του στην IVC (78%, $P=0,019$, και 60,7%, $P=0,003$ αντίστοιχα)
- ii) ήταν σημαντικά μικρότερα, όπου γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVF (54,1%, $P<0,001$ και 30,5%, $P=0,002$, αντίστοιχα)
- iii) δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά, όπου γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVF σε συνδυασμό πάντα με ταυτόχρονη προσθήκη του είτε μόνο στην IVM (63,4% και 56,4%, αντίστοιχα), είτε στις IVM και IVC (63,9% και 56,6%, αντίστοιχα)
- iv) μόνο το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν σημαντικά μικρότερο, ενώ το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων δεν παρουσίαζε διαφορά, όταν γινόταν διαδοχικά η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στις IVF και IVC (55,3%, $P<0,001$, και 55,3%, αντίστοιχα)
- v) το ποσοστό γονιμοποίησης δεν παρουσίαζε διαφορά, αλλά το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερο, όταν γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVC (62,4% και 62,5%, $P=0,003$, αντίστοιχα).



Εικόνα 19. Επίδραση της μελατονίνης στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με τη διάρκεια προσθήκης της στη 48ωρη IVC. Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. C, C α6, C β6, Caβ6: τυποποιημένο υπόστρωμα χωρίς ανανέωσή του κατά τη διάρκεια της επώασης, με ανανέωσή του μόνο μετά το πρώτο έκτο, με ανανέωσή του μόνο πριν το τελευταίο έκτο, με ανανέωσή του και μετά το πρώτο και πριν το τελευταίο έκτο της IVC, αντίστοιχα. M, Ma6, Mβ6, Maβ6: υπόστρωμα με μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια, μόνο στο πρώτο έκτο, μόνο στο τελευταίο έκτο, στο πρώτο και στο τελευταίο έκτο της IVC, αντίστοιχα. ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα. Η σήμανση με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05).

Πίνακας 17. Επίδραση της διάρκειας επώασης των IVM και IVF στην IVP.

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ (h)			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
18	18	48	804	481	59,8 ^a	172	35,8 ^a
24	24	48	846	585	69,1 ^β	273	46,7 ^β

ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, % ΓΟΝ: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Πίνακας 18. Σύγκριση της επίδρασης του γουαϊαζουλενίου στην IVP με το μάρτυρα 24ωρων επώσεων στις IVM και IVF.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ			ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ	ΓΟΝ/ΣΗ %	>4K	
IVM	IVF	IVC				N	ΓΟΝ %
24c	24c	C	846	585	69,1 ^β	273	46,7 ^β
A	C	C	170	135	79,4 ^γ	78	57,8 ^γ
C	A	C	194	105	54,1 ^a	32	30,5 ^a
C	C	A	205	128	62,4 ^{a,β}	80	62,5 ^γ
A	A	C	123	78	63,4 ^{a,β}	44	56,4 ^{β,γ}
A	C	A	173	135	78,0 ^γ	82	60,7 ^γ
C	A	A	206	114	55,3 ^a	63	55,3 ^{β,γ}
A	A	A	166	106	63,9 ^{a,β}	60	56,6 ^{β,γ}

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC, αντίστοιχα. 24c: τυποποιημένο υπόστρωμα σε 24ωρη επώαση, C: τυποποιημένο υπόστρωμα. D: υπόστρωμα με DMSO και A: υπόστρωμα με DMSO και γουαϊαζουλένιο. ΑΓΟΝ/ΤΑ: αγονιμοποίητα ωάρια, ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΝ: σύνολο γονιμοποιημένων ωαρίων, ΓΟΝ/ΣΗ %: ποσοστό γονιμοποίησης, ≤4K: έμβρυα μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων, >4K: έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα, N: αριθμός εμβρύων, ΓΟΝ %: ποσοστό επί των γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής συνοψίζονται ως εξής:

Το υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου καθώς και το υγρό περιβάλλον στο εσωτερικό του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο έχουν σημαντικά μεγαλύτερη Α.Ι. από τα αντίστοιχα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου, σε συγκεντρώσεις που προσομοιώνουν την Α.Ι. των *in vivo* στις αντίστοιχες *in vitro* συνθήκες, στην 18ωρη IVM, οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των ώριμων ως προς τον πυρήνα ωαρίων. Επίσης, η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVM μόνο ή σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην 48ωρη IVC βελτίωσε τα ποσοστά γονιμοποίησης και τα ποσοστά ανάπτυξης (με περισσότερα από 4 κύτταρα) των εμβρύων. Η προσθήκη του στη 18ωρη IVF δεν είχε καμία επίδραση στην απόδοση της IVP, ενώ σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην IVM ή και την IVC οδήγησε σε αύξηση μόνο του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων. Το ίδιο παρατηρήθηκε επίσης και στην περίπτωση της προσθήκης του μόνο στην IVC. Επιπλέον, τα ποσοστά γονιμοποίησης ή και τα ποσοστά ανεπτυγμένων εμβρύων που επιτεύχθηκαν μετά την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVM, μόνο στην IVC, ή και στις δύο, μετά από 18ωρης διάρκειας επώσεις στην IVM και στην IVF, ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του μάρτυρα των 24ωρων επώσεων στην IVM και στην IVF. Σε ό,τι αφορά στη χρήση μελατονίνης, η προσθήκη της σε όλη τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου της IVP, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις που προσομοιώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των *in vivo* συνθηκών, οδήγησε σε γενικά σε μείωση των αποδόσεων της IVP. Αντίθετα, η προσθήκη της στις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά με τρόπο που προσομοιάζει στον κερκάρδιο ρυθμό έκκρισής της *in vivo*, οδήγησε α) σε σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης και ποσοστά ανεπτυγμένων εμβρύων, όταν προστέθηκε στο τελευταίο τρίτο της 24ωρης IVM και β) μόνο σε μεγαλύτερο ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων, όταν προστέθηκε στο πρώτο τρίτο της ίδιας επώσης. Το ίδιο παρατηρήθηκε επίσης μετά από προσθήκη μελατονίνης μόνο στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM, καθώς επίσης και μόνο στις τελευταίες 8 ώρες της 48ωρης IVC.

4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα βιολογικών υγρών και υποστρωμάτων της IVP

Στη μελέτη αυτή, το υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου είχε ισχυρή Α.Ι. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και άλλοι ερευνητές, οι οποίοι μελέτησαν την Α.Ι. από Υ.Π.Ω. βουβάλων (Cassano και συν. 1999) και ανθρώπου (Attaran και συν. 2000, Oyawoye και συν. 2003, Pasqualotto και συν. 2004). Οι διαφορετικές μέθοδοι καθώς και ο διαφορετικός τρόπος προσδιορισμού της Α.Ι. που χρησιμοποιήθηκαν διεθνώς δεν επιτρέπουν την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων. Οι Pasqualotto και συν. (2004) διαπίστωσαν ότι η Α.Ι. του ωοθυλακικού υγρού είναι σημαντικά υψηλότερη από τον ορό του αίματος των γυναικών, και ότι οι γυναίκες που κυοφόρησαν μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση είχαν υψηλότερη Α.Ι. στο υγρό του ωοθυλακίου που αναρροφήθηκε σε σχέση με εκείνες τις γυναίκες που δεν κυοφόρησαν. Οι Oyawoye και συν. (2003) παρατήρησαν ότι αυξημένες τιμές της Α.Ι.

στο υγρό του ωοθυλακίου που αναρροφήθηκε ευνοούν την *in vitro* γονιμοποίηση των αντίστοιχων ωαρίων. Από την άλλη πλευρά, οι Attaran και συν. (2000) δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση της τιμής της A.I. με την έκβαση της IVF ή την εγκυμοσύνη γυναικών, αλλά υποστηρίζουν, όπως και οι Pasqualotto και συν. (2004), ότι η παρουσία των ROS σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο ωοθυλακικό υγρό ευνοεί την εγκυμοσύνη.

Στην παρούσα εργασία η A.I. του υγρού του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο ήταν σημαντικά μικρότερη εκείνης του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου. Όμως, συνολικά, η αντιοξειδωτική προστασία που παρέχει το περιβάλλον του ωαγωγού στους γαμέτες και το πρώιμο έμβρυο ενδέχεται να είναι πολύ μεγαλύτερη, αφού σε αυτή θα πρέπει να συμπεριληφθεί και η αντιοξειδωτική προστασία που προσφέρει το υγρό του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου, το οποίο συνοδεύει το ωάριο μετά την ωοθυλακιόρρηξία κατά την κάθοδό του στον ωαγωγό (Guerin και συν. 2001). Αντίστοιχες μελέτες προσδιορισμού της A.I. του υγρού του ωαγωγού λείπουν από τη διεθνή βιβλιογραφία Έχει μόνον ανιχνευθεί η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx, SOD και καταλάσης (Lapointe και Bilodeau 2003), όπως και των αντιοξειδωτικών ουσιών GSH (Lapointe και Bilodeau 2003), υποταυρίνης και ταυρίνης (Guerin και Menezo 1995) καθώς και αλβουμίνης (Ehrenwald και συν. 1990) στο υγρό του ωαγωγού αγελάδων σε οίστρο.

Επίσης, από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας προέκυψε ότι η A.I. των υποστρωμάτων της IVP ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη που έχουν τα αντίστοιχα με αυτά βιολογικά υγρά. Επιπλέον, η A.I. του τυποποιημένου υποστρώματος της IVF παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζει μια ελαφρά προ-οξειδωτική συμπεριφορά. Σύμφωνα με τους Gomez και Aitken (1996), αντίστοιχη αλλά πολύ ισχυρότερη προ-οξειδωτική δράση ασκεί το υπόστρωμα Ham's F-10, που χρησιμοποιείται συνήθως στην IVF του ανθρώπου, αφού διαπιστώθηκε ότι επιτείνει βλάβες από προκαλούμενη λιπιδική υπεροξείδωση στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Αντίθετα, δεν φαίνεται το ίδιο υπόστρωμα να επιτείνει οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Ermilov και συν. 1999). Σε αντιδιαστολή με το υπόστρωμα Ham's F-10, το συνθετικό υπόστρωμα υγρού ωαγωγών ανθρώπου ασκεί μερικώς ανασταλτική δράση σε βλάβες του DNA λόγω προκαλούμενου οξειδωτικού στρες (Ermilov και συν. 1999). Επίσης, έχει διαπιστωθεί η αντιοξειδωτική δράση αρκετών από τις ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συστατικά των υποστρωμάτων της IVP: ερυθρό της φαινόλης, HEPES, γλυκόζη, αλβουμίνη (Alvarez και Storey 1983, Ermilov και συν. 1999), πυροσταφυλικό οξύ σε συνδυασμό ή όχι με γαλακτικό οξύ (de Lamirande και Gagnon 1992). Ωστόσο, δεν παρέχονται από τη διεθνή βιβλιογραφία πληροφορίες, που να συγκρίνουν την A.I. των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVP με εκείνη των αντίστοιχών τους βιολογικών υγρών.

4.2. Παραγωγή εμβρύων *in vitro* (IVP)

Τα ποσοστά των ώριμων ωαρίων μετά από IVM διάρκειας τόσο 18 όσο και 24 ωρών στο τυποποιημένο υπόστρωμα των μαρτύρων κυμάνθηκαν, στους πειραματισμούς της εργασίας αυτής, από 37,7 έως 39,4% και από 73,8 έως 77,7% αντίστοιχα και κρίνονται ικανοποιητικά, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα διεθνώς αποδεκτά (Wehrend και Meinecke, 2001, Dalvit και συν. 2005, Li και συν. 2005). Ως

ώριμα χαρακτηρίστηκαν τα ωάρια εκείνα, που μετά το τέλος της IVM βρίσκονταν είτε στο στάδιο της τελόφασης I, είτε στο στάδιο της μετάφασης II. Η καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, που παρατηρήθηκε στα ωάρια της τελόφασης I θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός, ότι στους πειραματισμούς αυτής της μελέτης επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μόνο ωάρια που έφεραν συμπαγή και ακέραιο ωοφόρο δίσκο. Στα ωάρια αυτά, όπως υποστηρίζουν οι Spiropoulos και Long (1989), είναι δυνατό να παρατηρηθεί καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, η οποία όμως ολοκληρώνεται κατά την έναρξη της IVF, χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητα γονιμοποίησής τους. Για το λόγο αυτό προσμετρώνται στα ώριμα ωάρια (Chian και συν. 1992, Dominko και First 1997).

Τα ποσοστά γονιμοποίησης και τα ποσοστά ανεπτυγμένων εμβρύων που προέκυψαν μετά από IVP στα τυποποιημένα υποστρώματα, κυμάνθηκαν, στους πειραματισμούς μας, ανάλογα και με τη διάρκεια των επώασεων στις IVM και IVF, από 52,9% έως 70,5% και από 29,6% έως 48,8% αντίστοιχα και κρίνονται επίσης ικανοποιητικά, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα διεθνώς αποδεκτά (de Matos και Furnus 2000, Ali και συν. 2003, Dalvit και συν. 2005). Ως ανεπτυγμένα χαρακτηρίστηκαν τα έμβρυα εκείνα, που τη δεδομένη χρονική στιγμή της παρατήρησής τους, δηλαδή μετά το τέλος της 48ωρης διάρκειας της IVC, είχαν περισσότερα από 4 κύτταρα. Σύμφωνα με τους Van Soom και συν. (1992 και 1997) αλλά και τους Grisart και συν. (1994) τα έμβρυα αυτά έχουν σημαντικές πιθανότητες για περαιτέρω εξέλιξη.

Θα πρέπει να τονιστεί, ότι η παρουσία του DMSO (2,5% v/v) δεν επηρέασε τα αποτελέσματα των πειραματισμών αυτής της έρευνας. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και από τους Avery και Greve (2000), εκτός από την περίπτωση της σημαντικής μείωσης των ποσοστών γονιμοποίησης και ανεπτυγμένων εμβρύων μετά από την προσθήκη 2% v/v DMSO στην 24ωρη IVM, στα βοοειδή. Η διαφορά στην παρατήρηση αυτή πιθανόν να οφείλεται τόσο στη διαφορετική διάρκεια επώασης (18ωρης διάρκειας IVM στους πειραματισμούς αυτής της μελέτης), όσο και στη διαφορετική σύνθεση του αντίστοιχου υποστρώματος.

Από τη σύγκριση των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν σε επώσεις 18ωρης διάρκειας με εκείνους των επώασεων 24ωρης διάρκειας στις IVM και IVF προέκυψε ότι το ποσοστό γονιμοποίησης καθώς και το ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων που επιτεύχθηκαν μετά από επώσεις διάρκειας 18 ωρών ήταν σημαντικά χαμηλότερα. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων στην πρώτη περίπτωση ενδεχομένως υπολείπεται εκείνης που επιτυγχάνεται με την 24ωρη IVM, και αποκαθίσταται τις πρώτες ώρες της IVF σε βάρος της απαιτούμενης διάρκειας για την πραγματοποίηση της γονιμοποίησής τους σε μία επώαση της IVF, επίσης μειωμένης διάρκειας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με εκείνα των Dominko και First (1997) και των Laurincik και συν. (1998).

4.2.1. Γουαϊαζουλένιο

A. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια 18ωρης IVM βελτίωσε σημαντικά την ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στο υπόστρωμα της 18ωρης IVM προκάλεσε σημαντική αύξηση του ποσοστού των ώριμων ως προς τον πυρήνα των ωαρίων. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευτούν με βάση το γεγονός ότι τα ωάρια υφίστανται την επίδραση οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια της επώασης, που είναι δυνατό να καθυστερήσει ή να αναστείλει την επανέναρξη της μείωσης ή τη μετάβαση από το στάδιο της μετάφασης I στο στάδιο της ανάφασης I. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες στην μειωτική άτρακτο. Αυτό μπορεί να συμβεί άμεσα, με οξείδωση των πρωτεΐνης σωληνίνης των μικροσωληνίσκων, όπως διαπιστώθηκε με επίδραση του H_2O_2 στη μειωτική άτρακτο κατά την IVM ωαρίων ποντικού (Tarin και συν. 1996). Επίσης, μπορεί να συμβεί έμμεσα, με αδρανοποίηση της MAPK. Η αναστολή της δράσης της MAPK εξαιτίας της επίδρασης οξειδωτικού στρες μπορεί να οφείλεται είτε α) στην ενεργοποίηση της PKC (Quan και συν. 2003), όπως διαπιστώθηκε, όταν το H_2O_2 ή και το $O_2^{\cdot-}$ επέδρασαν σε κυτταροκαλλιέργειες ινοβλαστών ανθρώπου και ποντικού (Burdon 1994), είτε β) στην υπερφωσφορυλίωση της MAPK, η οποία καθίσταται πάλι ανενεργή (Frank και συν. 2000, Sun και συν. 2002). Σ' όλες τις περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι η αδυναμία αποικοδόμησης του MPF και η καθυστέρηση ή διακοπή της μείωσης στη μετάφαση I (Viveiros και συν. 2004). Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι, γενικά, η εμφάνιση οξειδωτικού στρες κατόπιν επίδρασης του H_2O_2 οφείλεται πρωταρχικά στην παραγωγή από αυτό της πλέον κυτταροτοξικής HO^{\cdot} , στην οποία καταλήγει το H_2O_2 με την επίδραση μεταβατικών μετάλλων (αντίδραση Fenton), ή κατόπιν αλληλεπίδρασής του με το $O_2^{\cdot-}$ (αντίδραση Haber-Weiss), αντίδραση που καταλύεται από μεταβατικά μέταλλα (Guerin και συν. 2001, Reiter και συν. 2003). Το γουαϊαζουλένιο, με δεδομένη την ικανότητά του να εξουδετερώνει την HO^{\cdot} (Kourounakis και συν. 1997), ενδεχομένως αποτρέπει τις διαταραχές αυτές επιτυγχάνοντας την ομαλή διεξαγωγή της μείωσης.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της ενεργοποιημένης-φωσφορυλιωμένης MAPK, που προκαλείται με προσθήκη ουσιών όπως το οκαδαϊκό οξύ, οδηγεί στην επιτάχυνση της επανέναρξης και της ολοκλήρωσης της διαδικασίας της μείωσης (Fissore και συν. 1996, Sun και συν. 2002). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί, ότι η αναστολή της δράσης της PKC και η προστασία της μειωτικής ατράκτου από βλάβες προάγουν την είσοδο στην ανάφαση I (Viveiros και συν. 2004). Είναι πιθανόν, η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου να διατηρεί σε αυξημένα επίπεδα την ενεργοποιημένη MAPK, αφού μπορεί, εξουδετερώνοντας τις ROS σε μεγάλο βαθμό, να αναστείλει τη δράση της PKC. Επίσης, το γουαϊαζουλένιο θα μπορούσε να προστατεύει τους μικροσωληνίσκους από οξειδωτικές βλάβες. Έτσι διασφαλίζει ενδεχομένως την ακεραιότητα της μειωτικής ατράκτου, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την γρήγορη αποικοδόμηση του MPF στο τέλος της μετάφασης I και την περαιτέρω συνέχιση της μείωσης. Με τον τρόπο αυτό πιθανόν, το γουαϊαζουλένιο συμβάλλει στη μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων.

Το εύρημα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με εκείνα άλλων ερευνητών, οι οποίοι παρατήρησαν ότι σε πειραματική πρόκληση οξειδωτικού στρες κατά την καλλιέργεια ωαρίων ποντικού προκλήθηκε διακοπή της μείωσης στο στάδιο της μετάφασης I ή επιβράδυνση στην ολοκλήρωσή της, ενώ η προσθήκη αντιοξειδωτικών όπως η διθειοθρεϊτόλη, αποκατέστησε την ομαλή διεξαγωγή της ωρίμανσης του πυρήνα (Tarin και συν. 1998a). Επίσης, η προσθήκη L-ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης απογυμνωμένων από κοκκώδη κύτταρα ωαρίων χοίρου οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό ώριμων ωαρίων (Tao και συν. 2004). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στο χοίρο βελτίωση στο ποσοστό ώριμων ωαρίων που καλλιεργήθηκαν ως COCs, πιθανώς γιατί αυτά είναι περισσότερο ανθεκτικά στην επίδραση του οξειδωτικού στρες (Tatemoto και συν. 2000), καθώς έχει καταδειχθεί, ότι τα κοκκώδη κύτταρα υποστηρίζουν τη σύνθεση της GSH από το ωάριο (de Matos και συν.1997). Για τη συγκεκριμένη διάρκεια επώασης που επιλέχθηκε από τους Tao και συν. (2004) (48ωρη), η ενδεχόμενη επιτάχυνση στην ολοκλήρωση της μείωσης από την προσθήκη αντιοξειδωτικών δεν ήταν δυνατό να διαπιστωθεί, αφού το μεγαλύτερο ποσοστό των ωαρίων του χοίρου (περίπου 80%) βρίσκεται στη μετάφαση II στο τέλος μιας τέτοιας επώασης (Wehrend και Meinecke 2001).

Ακόμα, έχει διαπιστωθεί (Dalvit και συν. 2005), ότι η προσθήκη βιταμίνης E ή/ και C στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης COCs βοοειδών για 22 ώρες δεν βελτιώνει το ποσοστό των ώριμων ωαρίων. Το εύρημα αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι μετά από διάρκειας τουλάχιστον 20 ωρών καλλιέργεια τα ωάρια βρίσκονται στη μετάφαση II ήδη σε μεγάλο ποσοστό (>70%), χωρίς να μπορεί να αναδειχθεί άμεσα η ανάγκη χρήσης αντιοξειδωτικών για περαιτέρω βελτίωση της ωρίμανσης του πυρήνα τους (Li και συν. 2005). Επιπλέον, ενδέχεται η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήθηκαν από τους Dalvit και συν (2005) να μην καθιστούν την Α.Ι. του υποστρώματος ανάλογη εκείνης του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου, με αποτέλεσμα, είτε την ανεπαρκή αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, είτε τη δημιουργία ισχυρά αντιοξειδωτικού περιβάλλοντος. Στην τελευταία αυτή περίπτωση, όπου η Α.Ι., η οποία επιτεύχθηκε από την προσθήκη των αντιοξειδωτικών αποβαίνει ενδεχομένως ισχυρότερη, οι ROS εξουδετερώνονται σε μεγαλύτερο από τον απαιτούμενο βαθμό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει επίσης σε διαταραχή της ισορροπίας στη δραστηριότητα των πρωτεϊνικών κινασών και των φωσφατασών, που ρυθμίζουν τη διαδικασία της ωρίμανσης (Sun και συν. 2000 και 2002). Πράγματι, έχει διαπιστωθεί ότι οι ROS, όταν βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα, διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, κυρίως μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των υπεύθυνων γονιδίων, γνωστών και ως πρωτοογκογονιδίων (Burdon 1995) αλλά και της πιθανής εμπλοκής τους στη φωσφορύλιωση της MAPK (Frank και συν. 2000). Για το λόγο αυτό μπορεί να προκληθεί και η παρατηρούμενη αντιστρεπτή αναστολή της επανέναρξης της μείωσης μετά από προσθήκη συνθετικών αντιοξειδωτικών ή αναστολέων της λιποοξυγονάσης στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων επιμύων (Takami και συν.1999 και 2000). Επομένως, κατά τη επιλογή της συγκέντρωσης του εκάστοτε αντιοξειδωτικού, που προστίθεται στα υποστρώματα της IVM, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ικανότητά του να καθιστά την Α.Ι. των υποστρωμάτων ανάλογη εκείνης του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου.

B. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια 18ωρης IVM βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα των ωαρίων για γονιμοποίηση και υποστήριξη της ανάπτυξης των εμβρύων που αποδίδουν.

Η σημαντική αύξηση του ποσοστού τόσο της γονιμοποίησης, όσο και του ποσοστού ανεπτυγμένων εμβρύων μετά από την προσθήκη γουαϊαζουλενίου στο υπόστρωμα της IVM, που διαπιστώθηκε στην εργασία αυτή, μπορεί να αποδοθεί στη διατήρηση αυξημένης συγκέντρωσης της GSH στα ώριμα ωάρια. Η GSH αποτελεί την κυριότερη μη ενζυμικής φύσης ενδογενή αντιοξειδωτική ουσία (Meister 1983) που, κατά τη διάρκεια της IVM, τα επίπεδά της αυξάνονται συνεχώς μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης του ωαρίου (Perreault και συν. 1988). Υποστηρίζεται, ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της GSH στο τέλος της IVM αντανακλά το βαθμό κυτταροπλασματικής ωρίμανσης του ωαρίου (de Matos και συν. 1997, de Matos και Furnus 2000). Όμως, η μείωση της διάρκειας επώασης της IVM από τις 24 στις 18 ώρες δεν παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής αυξημένης ποσότητας GSH από τα ωάρια (Perreault και συν. 1984), που, κάτω από την επίδραση του οξειδωτικού στρες, μειώνεται περισσότερο (Zuelke και συν. 1997). Πράγματι, τα *in vivo* ώριμα ωάρια περιέχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα GSH σε σχέση με εκείνα που ωριμάζουν *in vitro*, γεγονός που αποδίδεται στην κινητοποίηση από τα ωάρια της GSH, προκειμένου να προστατευθούν από την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες κατά την επώαση (Brad και συν. 2003). Όμως, το γουαϊαζουλένιο έχει την ικανότητα να αναστείλει την κατανάλωση και να διατηρήσει έτσι αυξημένα τα επίπεδα της GSH για τη συγκεκριμένη διάρκεια επώασης, αφού μπορεί να παρέχει αποτελεσματική αντιοξειδωτική προστασία στα κύτταρα, όπως διαπιστώθηκε για τα ηπατοκύτταρα επιμύων μετά από πειραματική πρόκληση οξειδωτικού στρες (Kourounakis και συν. 1997).

Μετά από τη διείδυση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, η GSH συμμετέχει καθοριστικά στο σχηματισμό του αρσενικού προπυρήνα (Perreault και συν. 1984) και στην παράλληλη ολοκλήρωση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης του ωαρίου (Zuelke και συν. 1997). Επίσης, προστατεύει τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου από οξειδωτικές βλάβες, υποστηρίζοντας τη διάταξη των χρωματοσωμάτων των δύο προπυρήνων στον ισημερινό και την πραγματοποίηση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης (Zuelke και συν. 1997). Επομένως, η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVM, διατηρώντας αυξημένα τα επίπεδα της GSH, ενδεχομένως προάγει τη γονιμοποίηση των ωαρίων και παρέχει επαρκή αντιοξειδωτική προστασία στα ζυγωτά.

Έχει παρατηρηθεί, ότι τα έμβρυα είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες μέχρι το στάδιο των 8 έως 16 κυττάρων (Van Langendonck και συν. 1998). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι νωρίτερα τα έμβρυα δεν έχουν αναπτύξει την ικανότητα για τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων, εκτός από περιορισμένες ποσότητες αυτών μέσω της μετάφρασης του εναπομείναντος μητρικού (στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου) mRNA (Gordon 1994, Harvey και συν. 1995). Αδυναμία παρατηρείται επίσης και για σύνθεση GSH εκ νέου μέχρι το στάδιο αυτό (Lim και συν. 1996). Έτσι, το έμβρυο προστατεύεται μόνο από τα αντιοξειδωτικά του περιβάλλοντός του και του ωαρίου, από το οποίο προήλθε (Guerin και συν. 2001). Για το λόγο αυτό πιθανόν παρατηρήθηκε, ότι η συγκέντρωση της GSH μειώνεται περίπου κατά 90% από το ώριμο ωάριο μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης στο

ποντικό (Gardiner και συν. 1998). Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της GSH, και ενδεχομένως, και άλλων αντιοξειδωτικών κατά το τέλος της ωρίμανσης του ωαρίου, τόσο πιο αποτελεσματική θα είναι η αντιοξειδωτική προστασία που θα παρέχει στο πρώιμο έμβρυο που θα προκύψει (de Matos και συν. 1996 και 2002). Με αυτό τον τρόπο το γουαϊαζουλένιο, όταν προστέθηκε στην IVM κατά την παρούσα μελέτη, προστατεύοντας τα COCs από το οξειδωτικό στρες, ενδεχομένως οδήγησε στην ανάπτυξη αυξημένης συγκέντρωσης της GSH ή και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στο ώριμο ωάριο, που κάλυψαν σε σημαντικό βαθμό τις απαιτήσεις των εμβρύων σε αντιοξειδωτική προστασία και βελτίωσαν την εξέλιξή τους τουλάχιστον μέχρι στο στάδιο των 8 κυττάρων.

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο κατά την IVP είναι η αναγωγή της κυστίνης του υποστρώματος της IVM σε κυστεΐνη, δομική ουσία της GSH, διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψή της και ενισχύοντας τη σύνθεση της GSH από το ωάριο (de Matos και συν. 1997). Το οξειδωτικό στρες όμως κατά την IVM μπορεί να προάγει αποπτωτικές διεργασίες και να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο στα κοκκώδη κύτταρα (Tatemoto και συν. 2000, Yuan και συν. 2005). Όμως, το γουαϊαζουλένιο θα μπορούσε να αναστείλει αυτές τις αποπτωτικές διεργασίες, κατά τρόπο ανάλογο με εκείνον που διαπιστώθηκε ότι υποστηρίζει τη βιωσιμότητα και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητα των ηπατοκυττάρων επιμύων μετά από πειραματική πρόκληση οξειδωτικού στρες (Kourounakis και συν. 1997). Αυτό σημαίνει ότι είναι δυνατό να προστατεύσει τα κοκκώδη κύτταρα από τη βλαπτική επίδραση του οξειδωτικού στρες, συμβάλλοντας έμμεσα στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της GSH στο ωάριο. Ενδέχεται επίσης, το γουαϊαζουλένιο, μειώνοντας τα επίπεδα των ROS να αναστέλλει την αυτοοξειδωση της κυστεΐνης του υποστρώματος σε κυστίνη και με αυτό τον τρόπο να αυξάνει επίσης τα επίπεδα της GSH από το ωάριο.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνάδουν με εκείνα άλλων ερευνητών, οι οποίοι μελέτησαν τα αποτελέσματα της προσθήκης διαφόρων αντιοξειδωτικών, όπως κυστεαμίνη (de Matos και συν. 1995), β-μερκαπτοαιθανόλη, κυστεΐνη ή κυστίνη (de Matos & Furnus, 2000, Ali και συν. 2003) και ρετινόλη (Livingston και συν. 2004) στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών. Από την άλλη πλευρά, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη βιταμίνης E ή/ και C στο υπόστρωμα της IVM ωαρίων βοοειδών για 22 ώρες δεν βελτιώνει το ποσοστό γονιμοποίησης καθώς και αυτό των ανεπτυγμένων εμβρύων (Dalvit και συν. 2005). Ενδέχεται στην τελευταία περίπτωση, η παρατήρηση αυτή των ερευνητών να οφείλεται στην επιλεγείσα συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήθηκαν, η οποία πιθανόν δεν κατέστησε την Α.Ι. του υποστρώματος ανάλογη εκείνης του προωθοθλακιορρηκτικού ωοθυλακίου.

Γ. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια IVF δεν επέδρασε στη γονιμοποίηση και στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στο υπόστρωμα της IVF, το οποίο εξουδετερώνει τις ROS και ιδιαίτερα την HO^{*} (Kourounakis και συν. 1997), που θεωρείται και η πιο δραστική (Rice-Evans 1994), ενδεχομένως επιβραδύνει την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της γονιμοποίησης των ωαρίων. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό της γονιμοποίησης. Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με εκείνα άλλων ερευνητών,

που μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης βιταμίνης E (Dalvit και συν. 1998), GSH (Kim και συν. 1999) στην IVF ωαρίων βοοειδών ή της GSH (Boquest και συν. 1999) στην IVF ωαρίων χοίρου.

Το γουαϊαζουλένιο ενδέχεται να προστατεύει τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια, που είναι και περισσότερο ευάλωτα (Kovalski και συν. 1992), από την επίδραση ενός ισχυρότερου από το απαιτούμενο οξειδωτικού στρες, το οποίο πιθανώς αναπτύσσεται κατά την IVF. Επιπλέον το γουαϊαζουλένιο, ως λιπόφιλη και μικρού μοριακού βάρους ουσία, είναι ικανό να διέλθει τις κυτταρικές μεμβράνες (Yanasigawa και συν. 1990) και να αποτρέψει βλάβες στο DNA των σπερματοζωαρίων, που θα μπορούσαν να επιφέρουν χρωματοσωμικές ανωμαλίες στο ζυγωτό και να αναστείλουν την επακόλουθη εμβρυική ανάπτυξη (Zuelke και συν. 1997).

Επίσης, μετά τη διείσδυση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, το οξειδωτικό στρες είναι δυνατό να αναστείλει τόσο το σχηματισμό του αρσενικού προπυρήνα, όσο και την παράλληλη ολοκλήρωση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης του ωαρίου, αφού μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της GSH (Zuelke και συν. 1997) ή/και άλλων αντιοξειδωτικών (Tatemoto και συν. 2001). Η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στο υπόστρωμα της IVF θα μπορούσε να αναχαιτίσει το οξειδωτικό στρες και να διατηρήσει τα επίπεδα της GSH ή/και άλλων αντιοξειδωτικών του ώριμου ωαρίου υψηλά. Με τον τρόπο αυτό ενδεχομένως υποστηρίζει την ολοκλήρωση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης και την ικανότητα του πρώιμου εμβρύου για περαιτέρω ανάπτυξη.

Στην παρούσα μελέτη, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων συγκριτικά με το μάρτυρα θα μπορούσε να αποδοθεί στα ήδη μειωμένα επίπεδα της GSH ή/και άλλων αντιοξειδωτικών από την προηγούμενη επίδραση του οξειδωτικού στρες κατά την ωρίμανση των ωαρίων. Ενδεχομένως όμως να οφείλεται και στη μειωμένη συνολικά διάρκεια των IVF (18ωρη) και IVC (48 ώρες). Αυτό σημαίνει, ότι, για τη συγκεκριμένη διάρκεια επώασης, η ενδεχόμενη βελτίωση στην πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη δεν ήταν ικανή να αντισταθμίσει την επιβράδυνση στην ενεργοποίηση και διείσδυση των σπερματοζωαρίων στα ωάρια, ούτε να αποκαλύψει οποιαδήποτε ανωμαλία και πιθανή καθυστέρηση στην ανάπτυξη των εμβρύων του μάρτυρα. Κατά ανάλογο τρόπο δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στο ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων μετά από προσθήκη βιταμίνης E (Dalvit και συν. 1998). Αντίθετα, η προσθήκη της GSH στην 24ωρη IVF ωαρίων βοοειδών οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικών κύστεων έναντι του μάρτυρα (Van Soom και συν. 2002), ενώ σύμφωνα με τους Luvoni και συν. (1996) η προσθήκη της GSH δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή.

Σύμφωνα με τους Kim και συν. (1999), η προσθήκη GSH στο στάδιο της IVF επιδρά στο ποσοστό ανεπτυγμένων εμβρύων ανάλογα με τη δόση, αλλά εξαρτάται επιπλέον και από την ποιότητα σπέρματος του ταύρου που χρησιμοποιείται στην IVF. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη GSH (1 mM) αποδεικνύεται ωφέλιμη για την εξέλιξη των εμβρύων, μόνον όταν χρησιμοποιείται σπέρμα ταύρου μειωμένης *in vitro* γονιμοποιητικής ικανότητας, λόγω αυξημένης παραγωγής ROS ή και της εξαιρετικά μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας των σπερματοζωαρίων του. Αντίθετα, η προσθήκη GSH σε δεκαπλάσια συγκέντρωση ανέστειλε τόσο τη γονιμοποίηση, όσο και την εξέλιξη των εμβρύων, εξαιτίας της εξουδετέρωσης των ROS σε βαθμό

μεγαλύτερο από τον απαιτούμενο για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Kim και συν. 1999). Με τον τρόπο αυτό, θα μπορούσαν να ερμηνευτούν όχι μόνο τα αντιφατικά ευρήματα μεταξύ των ερευνητών σχετικά με την επίδραση της προσθήκης της GSH, αλλά και γενικότερα τα αποτελέσματα μετά από την προσθήκη αντιοξειδωτικών στην IVF.

Για τους πειραματισμούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε σπέρμα ταύρου υψηλής γονιμοποιητικής ικανότητας (ζωτικότητα 75% και κινητικότητα 4). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ελεγχόμενη παραγωγή ROS από τα σπερματοζωάρια, και για το λόγο αυτό δεν προέκυψε αύξηση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων μετά την προσθήκη γουαϊαζουλενίου στην IVF. Τέλος, φαίνεται ότι η συγκέντρωση του γουαϊαζουλενίου, που επιλέχθηκε κατόπιν προσομοίωσης των αντίστοιχων *in vivo* συνθηκών της Α.Ι. στο υπόστρωμα της IVF, ενδεχομένως δεν εγκαθιστά απλά ένα ισχυρά αντιοξειδωτικό περιβάλλον, αλλά παρέχει αντιοξειδωτική προστασία στους γαμέτες σε βαθμό που δεν διαταράσσει σημαντικά την απαιτούμενη οξειδοαναγωγική ισορροπία για τη γονιμοποίηση και εξέλιξη των εμβρύων.

Δ. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια 48ωρης IVC βελτίωσε σημαντικά την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη.

Η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στο υπόστρωμα της IVC για 48 ώρες σε ατμόσφαιρα με σύνθεση αερίων 5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂ βελτίωσε σημαντικά το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων. Αυτό εκτιμάται ότι συνέβη γιατί, αφενός μεν ενισχύθηκε η ικανότητα του υποστρώματος να μειώνει τα επιβλαβή επίπεδα των εξωκυτταρικών ROS, αφετέρου δε ισχυροποιήθηκε η αντιοξειδωτική άμυνα των εμβρύων με την ενδεχόμενη δίοδο του γουαϊαζουλενίου από τις κυτταρικές μεμβράνες. Ο έντονος μεταβολικός ρυθμός των εμβρυικών κυττάρων (Thompson 2000), σε συνδυασμό με την περιορισμένη ικανότητά τους να συνθέσουν ενδογενή αντιοξειδωτικά μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων (Gordon 1994, Harvey και συν. 1995), καθιστά τα έμβρυα αυτά ιδιαίτερα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες (Van Langendonck και συν. 1998). Έτσι, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, μπορούν να παρατηρηθούν βλάβες από λιπιδική υπεροξείδωση στις κυτταρικές μεμβράνες (Halliwell και Chirico 1993), κατακερματισμό του DNA (Halliwell και Auroma 1991), ανώμαλες κυτταρικές διαιρέσεις (Goyanes και συν. 1990), καθυστέρηση στην εμβρυική ανάπτυξη (Pabon και συν. 1989) και τέλος κυτταρικός θάνατος (Jurisicova και συν. 1996). Επομένως, το γουαϊαζουλένιο, αποτρέποντας τις βλάβες αυτές συμβάλλει ενδεχομένως στην πρόοδο της πρόιμης εμβρυικής ανάπτυξης.

Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από τα ευρήματα άλλων ερευνητών. Η προσθήκη, σε διάφορα σχήματα, 100 μM βιταμίνης E (Olson και Seidel 2000) ή 50 μM κυστεαμίνης (de Matos και συν. 2000) ή 0,6 mM κυστεΐνης (Ali και συν. 2003) στο υπόστρωμα της IVC εμβρύων βοοειδών οδήγησε σε βελτίωση της εμβρυικής ανάπτυξης όταν η επώαση γινόταν σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂. Αντίθετα, η αντίστοιχη προσθήκη 0,1 έως 10 mM υποταυρίνης (Fujitani και συν. 1996), ή κυστίνης, ή 5 μM ρετινόλης (Livingston και συν. 2004) οδήγησε σε βελτίωση της εμβρυικής ανάπτυξης μόνο όταν η επώαση γινόταν σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, ενώ η προσθήκη 10 mM ταυρίνης (Loneragan και συν. 1999) δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη των εμβρύων σε οποιαδήποτε επώαση. Στις προαναφερθείσες εργασίες, δεν εντοπίστηκε κάποια αναφορά σχετική με τον

προσδιορισμό της A.I. των τροποποιημένων υποστρωμάτων ή σύγκριση αυτής της A.I. με τις αντίστοιχες *in vivo* συνθήκες. Έτσι, πιστεύεται ότι οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές επιλέχθηκαν μετά από δοκιμές διαδοχικών αραιώσεων τους στα υποστρώματα της IVP.

E. Η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια της IVM και της IVF δεν βελτίωσε το ποσοστό γονιμοποίησης, προήγαγε όμως την ανάπτυξη των εμβρύων.

Διαπιστώθηκε, ότι η χρήση του γουαϊαζουλενίου μόνο στο στάδιο της IVM, βελτίωσε τη γονιμοποίηση και την εμβρυική ανάπτυξη, ενώ η παρουσία του μόνο στο στάδιο της IVF δεν επέδρασε στην απόδοση της IVP. Στην περίπτωση της συνδυασμένης προσθήκης του και στα δύο αυτά στάδια το αποτέλεσμα ήταν ενδιάμεσο αυτών των σταδίων. Εκτιμάται ότι η παρουσία του γουαϊαζουλενίου στην IVM δεν ήταν ικανή να αντισταθμίσει την πιθανή επιβράδυνση στην ενεργοποίηση και διεύθυνση των σπερματοζωαρίων στα ωάρια, που προκλήθηκε μετά από την προσθήκη του στην IVF. Ο βαθμός της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης των ωαρίων, που καλλιεργήθηκαν με την παρουσία του γουαϊαζουλενίου, ενδέχεται να τα κατέστησε ικανά για υποστήριξη της ολοκλήρωσης της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης και της περαιτέρω εμβρυικής ανάπτυξης μετά τη γονιμοποίηση. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία υψηλών επιπέδων GSH ή/και άλλων αντιοξειδωτικών, που διατηρήθηκαν στα ώριμα ωάρια, κατ' ανάλογο τρόπο που διαπιστώθηκε στα ηπατοκύτταρα επιμύων κατόπιν πειραματικής πρόκλησης οξειδωτικού στρες (Kourounakis και συν. 1997).

ΣΤ. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια της IVM και της IVC βελτίωσε σημαντικά τόσο τη γονιμοποίηση, όσο και την εμβρυική ανάπτυξη.

Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου μόνο στο στάδιο της IVM ή της IVC βελτίωσε τη γονιμοποίηση των ωαρίων ή και την ανάπτυξη των εμβρύων. Στην περίπτωση της ταυτόχρονης προσθήκης και στα δύο αυτά στάδια το αποτέλεσμα εξακολούθησε να παραμένει το ίδιο, χωρίς περαιτέρω σημαντική βελτίωση στην εμβρυική εξέλιξη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα GSH αλλά ενδεχομένως και άλλων αντιοξειδωτικών, που πιθανώς προάγονται από το γουαϊαζουλένιο στα ώριμα ωάρια, επαρκούν για την ανάπτυξη των εμβρύων τουλάχιστον μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων, ώστε η επιπλέον προσθήκη του στο στάδιο της IVC μέχρι τη δεδομένη χρονική στιγμή ανάπτυξης να μην παρουσιάζει κάποιο επιπρόσθετο πλεονέκτημα. Αντίθετα, οι de Matos και συν. (2002), όταν πρόσθεσαν κυστεαμίνη τόσο στην IVM (100 μM) όσο και από τη δεύτερη μέχρι την τρίτη ημέρα της IVC (50 μM), παρατήρησαν ότι αναπτύχθηκαν περισσότερες βλαστικές κύστες την 6^η ημέρα της IVC συγκριτικά με το μάρτυρα αλλά και με την περίπτωση προσθήκης κυστεαμίνης μόνο στην IVM. Επομένως, η συνδυασμένη προσθήκη του γουαϊαζουλενίου τόσο στην IVM όσο και στην IVC, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για πιθανό όφελος της παρουσίας του κατά την μετέπειτα εμβρυική εξέλιξη και μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης.

Z. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια της IVF και της IVC βελτίωσε σημαντικά την εμβρυική ανάπτυξη.

Μετά από την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVF και στην IVC δεν παρατηρήθηκε καμία επίδρασή του στη γονιμοποίηση (όπως συνέβη στην περίπτωση της παρουσίας του μόνο στην IVF), αλλά το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων αυξήθηκε στην IVC (όπως συνέβη στην περίπτωση της παρουσίας του μόνο στην IVC, χωρίς να προκύπτει σημαντική διαφορά από τη μεταξύ τους σύγκριση). Αυτό σημαίνει, ότι ακόμα και εάν το γουαϊαζουλένιο επιβράδυνε συνολικά τη γονιμοποίηση, φαίνεται ότι υποστήριξε την εξέλιξη των εμβρύων, αφού πιθανώς παρείχε επαρκή προστασία απέναντι στο οξειδωτικό στρες κατά την IVC. Δεν εντοπίστηκαν ανάλογα βιβλιογραφικά δεδομένα.

H. Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της IVP βελτίωσε σημαντικά μόνον την εμβρυική ανάπτυξη.

Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη γουαϊαζουλενίου σε όλα τα στάδια της IVP οδήγησε σε σημαντική αύξηση μόνον του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων. Τα υψηλά επίπεδα GSH ή/και άλλων αντιοξειδωτικών, που ενδεχομένως διατηρήθηκαν στα ώριμα ωάρια από την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVM, φαίνεται ότι υποστήριξαν την εμβρυική ανάπτυξη. Το ποσοστό γονιμοποίησης, αντίθετα, δεν μεταβλήθηκε, όπως επίσης διαπιστώθηκε σε κάθε πειραματισμό, όπου γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVF μόνο ή σε συνδυασμό με την προσθήκη του σε άλλα στάδια, ενδεχομένως εξαιτίας της επιβράδυνσης που επέφερε στην ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και στη διείσδυσή τους στα ωάρια. Στη βελτίωση της εμβρυικής ανάπτυξης συνέβαλε και η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου στην IVC, χωρίς να μπορεί να αναδειχθεί κάποιο επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα, πιθανώς λόγω της μειωμένης διάρκειας επώασης της IVC στους πειραματισμούς αυτής της μελέτης. Τέλος, το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων δεν διέφερε σημαντικά από κάθε άλλο πειραματισμό, όπου γινόταν προσθήκη του γουαϊαζουλενίου, είτε στην IVM, είτε στην IVC, είτε και στις δύο. Δεν εντοπίστηκαν άλλες εργασίες με σχετικές πληροφορίες.

Θ. Η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στην IVM ή/και στην IVC βελτίωσε σημαντικά την πρόωμη εμβρυική ανάπτυξη συγκριτικά και με το μάρτυρα, στον οποίο διενεργούνταν 24ωρης διάρκειας επώσεις στην IVM και IVF.

Η διαπίστωση ότι τα ποσοστά γονιμοποίησης των ωαρίων ή και ανεπτυγμένων εμβρύων που επιτεύχθηκαν μετά την προσθήκη του γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVM, μόνο στην IVC, ή και στις δύο, κατόπιν 18ωρων επώασεων στην IVM και στην IVF, είναι σημαντικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του μάρτυρα των 24ωρων επώασεων στην IVM και IVF, θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι το γουαϊαζουλένιο, όχι μόνο βελτιώνει την απόδοση της IVP, αλλά ενδεχομένως και την αποτελεσματικότητά της, αφού σε μικρότερο συνολικά χρονικό διάστημα (κατά 12 ώρες) επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόδοση σε έμβρυα.

4.2.2. Μελατονίνη

A. Μελατονίνη σε όλη τη διάρκεια της IVM

- Η προσθήκη μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια τόσο της 18ωρης, όσο και της 24ωρης IVM προκάλεσε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων, των γονιμοποιημένων ωαρίων καθώς και του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων.

Σε αντίθεση με το γουαϊαζουλένιο, που είναι μία εξωγενής ουσία, της οποίας η δράση μπορεί να ερμηνευτεί στα πλαίσια της σαφούς αντιοξειδωτικής της ιδιότητας, η μελατονίνη αποτελεί μία ενδογενή ουσία των οργανισμών, που ασκεί πολλαπλές δράσεις, κυρίως ορμονικού χαρακτήρα, ενώ πρόσφατα ανακαλύφθηκε η αντιοξειδωτική της ικανότητα. Βέβαια, η επιλογή της συγκέντρωσης της μελατονίνης στα υποστρώματα της IVP έγινε με γνώμονα την προσομοίωση της A.I. των *in vivo* σε εκείνη των αντίστοιχων *in vitro* περικυτταρικών υγρών. Είναι όμως πιθανό η συνολική αντιοξειδωτική προστασία που παρέχει η μελατονίνη στα κύτταρα να είναι αρκετά ισχυρότερη της A.I. που προσομοιώθηκε, λόγω της εμπλοκής της μελατονίνης στο μηχανισμό πολλών ενζυμικών συστημάτων των κυττάρων. Αυτό σημαίνει, ότι η A.I. των τροποποιημένων, κατόπιν προσθήκης της μελατονίνης, υποστρωμάτων της IVP μαζί με τα καλλιεργούμενα σε αυτά κύτταρα ενδέχεται να είναι υψηλότερη από την A.I. των ίδιων υποστρωμάτων σε απουσία κυττάρων. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ικανότητα της μελατονίνης να επάγει τη δραστηριότητα των περισσότερων και σημαντικότερων από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η SOD, η καταλάση, η υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης, ενώ παράλληλα προάγει τη σύνθεση της GSH (Reiter και συν. 2003). Όμως, η αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών αυτών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των ROS σε βαθμό μεγαλύτερο από τον ωφέλιμο (Burdon 1995). Αυτό πιθανόν σημαίνει την αναστολή της φωσφορυλίωσης της MAPK (Frank και συν. 2000), που συμμετέχει καθοριστικά στη διεξαγωγή της μείωσης από τα ωάρια (Fissore και συν. 1996), και κατά συνέπεια την καθυστέρηση ή τη διακοπή της ωρίμανσης του πυρήνα τους (Viveiros και συν. 2004). Για το λόγο αυτό, ενδεχομένως παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό ωαρίων, που καλλιεργήθηκαν παρουσία μελατονίνης, να βρίσκονται στην πρόφαση I.

Επιπλέον, η μελατονίνη είναι δυνατό να δεσμεύσει το $\cdot\text{NO}$ (Mahal και συν. 1999) και να αναστείλει τη δραστηριότητα των NOS, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή $\cdot\text{NO}$ (Crespo και συν. 1999). Η μείωση όμως της συγκέντρωσης του $\cdot\text{NO}$ προκαλεί διαταραχές στη δομή της μειωτικής ατράκτου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανωμαλιών στο διαχωρισμό και τη μορφολογία των χρωματοσωμάτων, δημιουργώντας αδιευκρίνιστες μορφές ωαρίων (Jablonka-Shariff και συν. 1999), και την καταστολή του σχηματισμού του πρώτου πολικού σωματίου διακόπτοντας την ωρίμανση πριν την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (Bu και συν. 2003). Δεν αποκλείεται επίσης η μελατονίνη να δεσμεύεται απευθείας από την πρωτεΐνη σωληνίνη των μικροσωληνίσκων, αναστέλλοντας έτσι τον πολυμερισμό και την αναδιάταξή τους (Huerto-Delgadillo και συν. 1994), που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου προς το τέλος της πρόφασης I (Lu και συν. 2002). Με τους τρόπους αυτούς, ενδεχομένως, μπορούν να ερμηνευθούν τα μεγάλα ποσοστά αδιευκρίνιστων ωαρίων αλλά και

ωαρίων που βρίσκονται στη μετάφαση I μετά από επίδραση της μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια, είτε της 18ωρης, είτε της 24ωρης IVM.

Η αναστολή της μειωτικής διαίρεσης θα μπορούσε να αποδοθεί και στις κυτταροστατικές ιδιότητες της μελατονίνης. Υποστηρίζοντας και ενισχύοντας τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασματοσυνδέσεων σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων μυών, καταδείχθηκε ότι η μελατονίνη ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Blackman και συν. 2001). Ανάλογη δράση είναι πιθανό να ασκεί και στις χασματοσυνδέσεις μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και ωαρίου. Έτσι, πιθανώς αναστέλλει τη λύση των χασματοσυνδέσεων αυτών, που θεωρείται από ορισμένους ερευνητές απαραίτητη προϋπόθεση για την επανέναρξη και ολοκλήρωση της μείωσης (Allworth και Albertini 1993). Μάλιστα, έχει καταδειχθεί ότι μία μείωση των αρχικών χασματοσυνδέσεων στο 40% περίπου σχετίζεται με την επανέναρξη της ωρίμανσης του πυρήνα του ωαρίου (Thomas και συν. 2004), ενδεχομένως γιατί μειώνονται τα ανασταλτικά για την ωρίμανση επίπεδα του cAMP εντός του ωαρίου, που τα κοκκώδη κύτταρα διοχετεύουν (Webb και συν. 2002) ή διατηρούν αυξημένα με τη διοχέτευση ανασταλτικών της ωρίμανσης ουσιών (Thibault και συν. 1987) μέσω των χασματοσυνδέσεων στο ωάριο.

Επίσης, η μελατονίνη ανταγωνίζεται την καλμοδουλίνη (Turjanski και συν. 2004), μία πρωτεΐνη που βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και στα ωάρια (Markoulaki και συν. 2004). Στην ενεργοποίησή της βασίζεται η δραστηριότητα πολλών ενζύμων, μεταξύ των οποίων και οι φωσφοδιεστεράσες που αποικοδομούν το cAMP (Benitez-King και συν. 1991). Είναι πιθανόν η μελατονίνη και με τον τρόπο αυτό να αναστείλει την επανέναρξη της μείωσης, αφού διατηρεί αυξημένα τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του cAMP στα ωάρια. Μάλιστα, επειδή σύμφωνα με τους Luciano και συν. (1999 και 2004), η αύξηση του cAMP εντός των COCs συνδέεται με την υποστήριξη της επικοινωνίας μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και ωαρίων μέσω χασματοσυνδέσεων, ενδέχεται η μελατονίνη να διατηρεί τις χασματοσυνδέσεις αυτές μέσω της αύξησης των επιπέδων του cAMP στα COCs.

Ακόμη, η μελατονίνη μπορεί να ασκεί ανασταλτική δράση στην ωρίμανση του πυρήνα και μέσω υποδοχέων της, είτε στην κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου, είτε στον πυρήνα του, αντίστοιχα, όπως έχει ανακαλυφθεί για τα ηπατοκύτταρα επιμύων (Acuna-Castroviejo και συν. 1994, Dubocovich και συν. 1999). Η δράση της αυτή αποδίδεται, είτε στην ισχυρή της αντιοξειδωτική ιδιότητα (Sainz και συν. 2003), είτε στην εμπλοκή της κατά τη μεταγραφή γονιδίων (Guerrero και συν. 2000), πιθανώς και πρωτοογκογονιδίων, που ελέγχουν τη διεξαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης (Burdon 1995, Smirnov 2001), χωρίς όμως να υπάρχουν μέχρι τώρα διαθέσιμες περισσότερες πληροφορίες σχετικές με αυτή. Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται, ότι η ενίσχυση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων που προκαλεί η μελατονίνη, πραγματοποιείται μέσω ενός σύνθετου μηχανισμού, που πυροδοτείται από τη δέσμευση της μελατονίνης στους υποδοχείς της, που βρίσκονται είτε στον πυρήνα, είτε στην κυτταρική μεμβράνη, και οδηγεί στη μεταγραφή των αντίστοιχων για τα ένζυμα αυτά γονιδίων (Tomas-Zapico και Coto-Montes, 2005).

Τέλος, μέσω των υποδοχέων της στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων (Niles και συν. 1999), η μελατονίνη μπορεί να υποστηρίξει τη σύνθεση προγεστερόνης από αυτά (Barrata και συν. 1992), γεγονός που είναι δυνατό να επηρεάσει τη σχέση οιστρογόνων-προγεστερόνης, με ανασταλτικές πιθανόν

συνέπειες για την ωρίμανση των ωαρίων κυρίως στα πρώτα της στάδια (Gordon 1994).

Από τη στιγμή που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή, ότι η μελατονίνη αναστέλλει πρωταρχικά την ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων, η επακόλουθη διαπίστωση, ότι αυτά δεν ήταν ικανά να γονιμοποιηθούν ή να αποδώσουν φυσιολογικά ανεπτυγμένα έμβρυα σε περίπτωση που γονιμοποιηθούν, ήταν αναμενόμενη.

B. Μελατονίνη στο πρώτο τρίτο της IVM

- Στη 18ωρη IVM: Προκλήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων, της γονιμοποίησης καθώς και του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων
- Στην 24ωρη IVM: Δεν επηρεάστηκε το ποσοστό των ώριμων ωαρίων, ούτε και αυτό της γονιμοποίησης, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων.

Διαπιστώθηκε, ότι η διάρκεια επώασης (18 ή 24 ώρες) σε συνδυασμό με τη διάρκεια επίδρασης (6 ή 8 ώρες) της μελατονίνης στο πρώτο τρίτο της IVM διαφοροποίησε τα αποτελέσματά μας. Η προσθήκη της μελατονίνης για το πρώτο τρίτο της διάρκειας της IVM (18ωρη ή 24ωρη) είναι δυνατό να προάγει τη δραστηριότητα όλων σχεδόν των αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς και τη σύνθεση της GSH. Αυτό σημαίνει, ότι θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση, σε μεγαλύτερα από τα ωφέλιμα για την ενεργοποίηση της MAPK, των επιπέδων των ROS, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της επανέναρξης της μείωσης ακόμα και μετά την απομάκρυνση της μελατονίνης από το υπόστρωμα. Είναι πιθανό, τα ωάρια που καλλιεργήθηκαν παρουσία μελατονίνης στο πρώτο τρίτο της 24ωρης IVM να ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους με μεγαλύτερα επίπεδα ενδοκυτταρικής GSH αλλά και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ενδεχομένως, με αυτό τον τρόπο να μπορεί να ερμηνευτεί και το σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων που παρατηρείται μετά από τη συγκεκριμένη επώαση, αφού πιθανώς παρέχεται σε αυτά μεγαλύτερη ενδογενής αντιοξειδωτική προστασία τόσο κατά την IVF όσο και κατά την IVC.

Κατά την IVF και την IVC, τα αντιοξειδωτικά και ιδιαίτερα η GSH υποστηρίζουν τις μιτωτικές διαιρέσεις, αφού είναι ικανά να αναχαιτίζουν την επίδραση του οξειδωτικού στρες στο DNA και τη μιτωτική άτρακτο, έτσι ώστε να αποφεύγονται σε μεγάλο βαθμό χρωματοσωμικές ανωμαλίες στο ζυγωτό ή το έμβρυο και αναστολή στην επακόλουθη εμβρυική ανάπτυξη (Richter και συν. 1985, Zuelke και συν. 1997). Επιπλέον, προστατεύουν την κυτταρική μεμβράνη, αλλά και τις μεμβράνες των υποκυτταρικών οργανιδίων από λιπιδική υπεροξείδωση, καθώς επίσης και το μιτοχονδριακό DNA (Guerin και συν. 2001), που φέρει κωδικοποιημένα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορύλιωση (Taanman 1999). Αντίθετα, τα ζυγωτά ή τα έμβρυα του μάρτυρα πιθανώς διέθεταν ανεπαρκή αντιοξειδωτική άμυνα, με αποτέλεσμα να υφίστανται πιο εκτεταμένες βλάβες στο γενετικό υλικό τους, στο μιτοχονδριακό DNA ή και τις κυτταρικές μεμβράνες, που μπορεί να οδήγησαν σε καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης ή ακόμα και κυτταρικό θάνατο (Guerin και συν. 2001). Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε

ενδεχομένως να ερμηνευθεί, γιατί ενώ τα ποσοστά γονιμοποίησης των ωαρίων που καλλιεργήθηκαν με προσθήκη μελατονίνης στο πρώτο τρίτο της 24ωρης IVM και του αντίστοιχου μάρτυρα ήταν παρόμοια, ωστόσο τα αντίστοιχα ποσοστά των ανεπτυγμένων εμβρύων διέφεραν μεταξύ τους.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη μελατονίνης στο διάστημα αυτό πιθανόν διατηρεί τις χασματοσυνδέσεις μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων ενεργές ακόμα και μετά την απομάκρυνσή της, αφού πιστεύεται ότι επιδρά στο μηχανισμό σύνθεσης των συνδεκτινών, που είναι δομικές πρωτεΐνες των χασματοσυνδέσεων (Blackman και συν. 2001). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να επιβραδύνεται η μείωση (Thomas και συν. 2004), φαινόμενο που αν συμβαίνει, είναι εφικτό να αποκατασταθεί στην 24ωρη IVM, αντίθετα με ό,τι παρατηρείται στην 18ωρη IVM. Αυτό μπορεί να συμβεί, γιατί στην 24ωρη επώαση το διάστημα που υπολείπεται για την ολοκλήρωση της IVM είναι μεγαλύτερο (16 ώρες) σε αντίθεση με αυτό της 18ωρης επώασης (12 ώρες). Πιθανόν για το λόγο αυτό δεν παρατηρείται επίδραση της μελατονίνης στο ποσοστό ώριμων ωαρίων στην 24ωρη IVM, όπως αντίθετα συνέβη στην 18ωρη IVM.

Επιπλέον, η διατήρηση κάποιου ποσοστού των χασματοσυνδέσεων για μεγαλύτερο διάστημα, ενώ μπορεί να καθυστερεί την ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων, ωστόσο όμως ωφελεί περισσότερο την κυτταροπλασματική τους ωρίμανση (Luciano και συν. 2004, Thomas και συν. 2004). Για το λόγο αυτό ενδεχομένως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων με την προσθήκη μελατονίνης στο πρώτο τρίτο μόνο της 24ωρης IVM, αντίστοιχα όπως παρατηρήθηκε για ουσίες που υποστηρίζουν τη διατήρηση των χασματοσυνδέσεων, όπως το cAMP σε ορισμένες συγκεντρώσεις, (Luciano και συν. 2004) και για 28ωρη IVM (Thomas και συν. 2004). Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στο ποσοστό της γονιμοποίησης, εύρημα που συμφωνεί με τα αντίστοιχα των προαναφερθέντων ερευνητών.

Γ. Μελατονίνη στο τελευταίο τρίτο της IVM

- *Στη 18ωρη IVM: Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων, ενώ δεν επηρέασε το ποσοστό της γονιμοποίησης, παρόλο που αυξήθηκε το ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων*
- *Στην 24ωρη IVM: Δεν επηρεάστηκε το ποσοστό των ώριμων ωαρίων, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των ποσοστών της γονιμοποίησης και των ανεπτυγμένων εμβρύων.*

Διαπιστώθηκε, ότι η διάρκεια επώασης (18 ή 24 ώρες) σε συνδυασμό με τη διάρκεια επίδρασης (6 ή 8 ώρες) της μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της IVM διαφοροποίησε τα αποτελέσματά μας. Ο τρόπος δράσης της μελατονίνης φαίνεται ότι σχετίζεται όμως περισσότερο με τη χρονική στιγμή που επιδρά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωαρίων *in vitro*. Στην περίπτωση της 18ωρης IVM, η μελατονίνη επιδρά μετά από 12 ώρες, που σημαίνει ότι ο μεγαλύτερος πληθυσμός των ωαρίων βρίσκεται στην αρχή ή στη μέση της μετάφασης I (Wehrend και Meinecke 2001, Li και συν. 2005), ενώ στην περίπτωση της 24ωρης IVM, η μελατονίνη επιδρά μετά από 16 ώρες, που σημαίνει ότι ο μεγαλύτερος πληθυσμός των ωαρίων βρίσκεται προς το τέλος της μετάφασης I ή την αρχή της ανάφασης I (Wehrend και Meinecke 2001, Li και συν. 2005).

Από τη στιγμή της προσθήκης της, η μελατονίνη πιθανώς εξουδετερώνει το μεγαλύτερο μέρος των ROS, που είχαν ήδη παραχθεί κατά την ωρίμανση. Η ενδεχόμενη δραστική μείωση των επιπέδων των ROS μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ή και αναστολή της δραστηριότητας της MAPK (Frank και συν. 2000). Κατά τη διάρκεια της IVM έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα της MAPK είναι σημαντικά αυξημένη στο πρώτο μισό της μετάφασης I (Wehrend και Meinecke 2001). Αυτό σημαίνει, ότι τα ωάρια που βρίσκονται στο στάδιο αυτό ή προγενέστερο ενδέχεται να υποστούν και τη σημαντικότερη ανασταλτική επίδραση της μελατονίνης. Πιθανόν για το λόγο αυτό, παρατηρείται και η σημαντική μείωση στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων μετά από επίδραση της μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης και όχι της 24ωρης IVM.

Τα ωάρια που καθυστέρησαν να ωριμάσουν κατά τη διάρκεια της 18ωρης IVM είναι δυνατό να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της IVF. Πρόκειται όμως κυρίως για τα ωάρια εκείνα που βρίσκονταν τουλάχιστον στην ανάφαση I και τα οποία έχουν λίγες πιθανότητες να γονιμοποιηθούν (Domino και First 1997). Τα ωάρια που βρίσκονταν στη μετάφαση I έχουν ακόμα λιγότερες πιθανότητες να ωριμάσουν και βέβαια ελάχιστες να γονιμοποιηθούν. Όμως, στην περίπτωση της προσθήκης μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM, αρκετά από αυτά τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν, πιθανώς γιατί η αναστολή της ωρίμανσης του πυρήνα τους από την επίδραση της μελατονίνης ήταν αντιστρεπτή σε μεγάλο βαθμό, ενώ η μελατονίνη ενδεχομένως υποστήριξε την κυτταροπλασματική τους ωρίμανση. Έτσι, το ποσοστό της γονιμοποίησης δε διαφοροποιήθηκε.

Η παρατήρηση ότι η μελατονίνη πιθανόν υποστηρίζει την κυτταροπλασματική ωρίμανση προκύπτει από το αποτέλεσμα της αντίστοιχης προσθήκης της στην 24ωρη IVM, όπου σημειώθηκε αύξηση στο ποσοστό της γονιμοποίησης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην ενίσχυση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας των ωαρίων. Ο έντονος μεταβολικός ρυθμός των ωαρίων κατά τη διάρκεια της επώασης (Downs και συν. 2002) οδηγεί πιθανώς στην κατανάλωση μεγάλου μέρους των αντιοξειδωτικών ουσιών και κυρίως της GSH των ωαρίων (Brad και συν. 2003) ή ενδεχομένως και στη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων ROS προς το τέλος της επώασης. Επιπλέον, η έκθεση των ωαρίων κατά την IVM σε ένα προ-οξειδωτικό περιβάλλον, όπως αυτό του κλιβάνου επώασης με ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, που σημαίνει ότι η μερική πίεση οξυγόνου στο περιβάλλον είναι τριπλάσια (περίπου 20%) εκείνης που απαντάται *in vivo*, πιθανώς προκαλεί την αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση ROS προς το τέλος της επώασης (Hashimoto και συν. 2000). Η μελατονίνη, εκτός του γεγονότος ότι μπορεί να προστατεύσει τα ωάρια άμεσα από το οξειδωτικό στρες, επάγει και τη δραστηριότητα από ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών τους ενζύμων καθώς και προάγει τη σύνθεση της GSH.

Για τον ίδιο λόγο, ενδεχομένως, διαπιστώθηκε σε αυτή τη μελέτη αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων από την προσθήκη της μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο τόσο της 18ωρης, όσο και της 24ωρης IVM. Τα υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στα ώριμα ωάρια είναι δυνατό να προστατεύσουν τα παραγόμενα από αυτά έμβρυα τουλάχιστον μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων, όπου το έμβρυο μπορεί πλέον να συνθέσει τα δικά του αντιοξειδωτικά ένζυμα και τη GSH (De Sousa

και συν. 1998), από την ανασταλτική για την εμβρυική ανάπτυξη επίδραση του οξειδωτικού στρες (Van Langendonck και συν. 1998).

Τέλος, επειδή οι χασματοσυνδέσεις μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και ωαρίου παραμένουν ενεργές κυρίως τις πρώτες 6 έως 8 ώρες της IVM, ενώ μετά λύνονται προοδευτικά (Gordon 1994, Luciano και συν. 2004) δεν αναμενόταν κάποια επίδραση σε αυτές από την προσθήκη της μελατονίνης στο τελευταίο τρίτο της IVM.

Δ. Μελατονίνη στην IVF

- Σε όλη τη διάρκεια της 18ωρης IVF ή μόνο στο πρώτο τρίτο της 18ωρης IVF: Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό της γονιμοποίησης καθώς και στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων
- Μόνο στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVF: Δεν επηρεάστηκε κανένα από τα δύο ποσοστά.

Όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και ακολούθως η γονιμοποίηση των ωαρίων, είναι απαραίτητη η παρουσία των ROS σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα της IVF. Αν όμως ληφθεί υπόψη η αντίστοιχη επίδραση της προσθήκης του γουαϊαζουλενίου στην IVF, τότε η σημαντική μείωση του ποσοστού της γονιμοποίησης δε θα μπορούσε να ερμηνευτεί μόνο στη βάση της άμεσης αντιοξειδωτικής ιδιότητας της μελατονίνης, τουλάχιστον όχι για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε, οι οποίες προσομοιώνουν την A.I. των *in vivo* στις αντίστοιχες *in vitro* συνθήκες.

Η μελατονίνη, είτε άμεσα με την προσκόλλησή της στη σωληνίνη των μικροσωληνίσκων (Hereto-Deltaville και συν. 1994), είτε έμμεσα με τη δέσμευση του *NO αλλά και την αδρανοποίηση των NOS του ωαρίου (Jablonka-Shariff και συν. 1999), ενδεχομένως προκαλεί αλλοιώσεις στη μειωτική άτρακτο και καθυστέρηση στην εξώθηση του δεύτερου πολικού σωματίου από το ωάριο. Με τον ίδιο τρόπο θα μπορούσε να αναστείλει τη μετανάστευση των δύο προπυρήνων στο κέντρο του ωαρίου, που πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικροσωληνίσκων, καθώς και να προσβάλει την κατασκευή της μιτωτικής ατράκτου. Αυτό σημαίνει, ότι είναι δυνατόν επιπλέον να προκαλέσει ανωμαλίες κατά τη διάταξη των χρωματοσωμάτων στον ισημερινό, ίσως και κατά τον αποχωρισμό τους και πιθανόν έτσι να ερμηνεύεται η αναστολή της ολοκλήρωσης της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης.

Με δεδομένο ότι το *NO προάγει την κινητικότητα και την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Rosselli και συν. 1995, Rodriguez και συν. 2005a), η μελατονίνη πιθανώς ασκεί ανασταλτική δράση στην εκδήλωση των φαινομένων αυτών, μέσω δέσμευσης του *NO και αδρανοποίησης των NOS των σπερματοζωαρίων (Lewis και συν. 1996).

Η μελατονίνη αναστέλλει την ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης των Ca^{+2} στα κύτταρα της υπόφυσης επιμύων, πιθανώς επειδή καταστέλλει τη δραστηριότητα των διαύλων των Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω υπερπόλωσής της (Vanecsek και Klein 1993). Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να ανασταλεί και η εισροή των Ca^{+2} , που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση τόσο των σπερματοζωαρίων (Yanagimachi 1993), όσο και του ωαρίου (Runft και συν. 2002).

Έχει υποστηριχθεί, ότι κατά τη συγχώνευση των κυτταρικών μεμβρανών σπερματοζωαρίου-ωαρίου, κάτω από την επίδραση των ROS και με διαδικασίες

πρόκλησης λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενεργοποιούνται οι διάλυτοι ιόντων Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου με επακόλουθη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των Ca^{+2} (Aitken και Fisher 1994). Η αύξηση αυτή ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη και πολλά ένζυμα που εξαρτώνται από αυτή, όπως η πρωτεϊνική κινάση της καλμοδουλίνης II (calmodulin-dependent protein kinase II, CamKII) (Benitez-King και συν. 1996, Markoulaki και συν. 2004) και η PKC (Luria και συν. 2000). Η CamKII πιστεύεται ότι υποστηρίζει τη δραστηριότητα παραγόντων που ενεργοποιούν το ωάριο, ώστε να ολοκληρώσει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, ενώ η PKC φαίνεται να διατηρεί ανοιχτούς τους διαύλους Ca^{+2} (Jones 2005).

Από την άλλη πλευρά, η μελατονίνη ενισχύει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενώ ανταγωνίζεται την καλμοδουλίνη (Turjanski και συν. 2004), με αποτέλεσμα να αναστέλλει τόσο την προκαλούμενη λιπιδική υπεροξειδωση της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου, όσο και την ενεργοποίηση της CamKII (Benitez-King και συν. 1996), που απαιτούνται για την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Συνεπώς με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε η μελατονίνη επίσης να εμποδίσει τη διεξαγωγή της γονιμοποίησης.

Επιπρόσθετα, η μελατονίνη, ως αμφιδιαλυτή ουσία, μπορεί να διέρχεται όλες τις μεμβράνες του κυττάρου και να εντοπίζεται σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα ακόμα και στον πυρήνα. Μάλιστα, πιστεύεται από ορισμένους ερευνητές, ότι ο πυρήνας αποτελεί εστία εκλεκτικής εντόπισης της μελατονίνης, αφού μετά από εξωγενή χορήγησή της σε τρωκτικά, αυξήθηκε η συγκέντρωσή της στον πυρήνα κυττάρων διαφόρων ιστών, ενώ στο κυτταρόπλασμα τους παρέμεινε σταθερή (Menendez-Pelaez και Reiter 1993). Η εντόπισή της στον πυρήνα και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη υποδοχέων που τη δεσμεύουν και ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την κυτταροστατική της δράση (Smirnov 2001). Η δράση αυτή σχετίζεται τόσο με την εμπλοκή της μελατονίνης, μέσω των υποδοχέων της στον πυρήνα, στην έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όσο και με την εντοπισμένη ισχυρή λόγω υψηλής συγκέντρωσής της στον πυρήνα αντιοξειδωτική της ικανότητα (Sainz και συν. 2003), η οποία πιθανώς είναι κατά πολύ ισχυρότερη της παρατηρούμενης από το γουαϊαζουλένιο. Στην τελευταία περίπτωση, πιθανόν αναστέλλεται η δραστηριότητα της MAPK (Sainz και συν. 2003) ή και η εξαρτώμενη από την παρουσία χαμηλών επιπέδων ROS δραστηριότητα της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων, η οποία είναι επιφορτισμένη με την αντιγραφή του DNA (Rice-Evans 1994). Με τον τρόπο αυτό, παρεμποδίζεται ενδεχομένως ο διπλασιασμός και η συμπύκνωση των χρωματίδων από τα χρωματοσώματα των δύο προπυρήνων, που θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει σε αναστολή της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης.

Έχει αναφερθεί, ότι η διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο κατά την IVF πραγματοποιείται συνήθως 4 έως 8 ώρες μετά την έναρξη της συνεπάωσης των γαμετών (Hyttel και συν. 1988, Laurincik και συν. 1998). Το γεγονός όμως ότι η προσθήκη της μελατονίνης μόνο για τις πρώτες 6 ώρες της IVF οδήγησε, μεν σε σημαντική, αλλά όχι τόσο δραματική μείωση στο ποσοστό της γονιμοποίησης συγκριτικά με την περίπτωση της προσθήκης της για όλη τη διάρκεια της IVF, ενδεχομένως μαρτυρά, ότι αναστολή της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων και της γονιμοποίησης είναι ως ένα βαθμό αντιστρεπτή μετά την απομάκρυνση της μελατονίνης από το υπόστρωμα. Παρ' όλα αυτά, η καθυστέρηση στην ολοκλήρωση

της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης και στην επακόλουθη εμβρυική ανάπτυξη είναι δεδομένη.

Έχει διαπιστωθεί, ότι η αντιγραφή του DNA των δύο προπυρήνων αρχίζει 14 έως 15 ώρες μετά την έναρξη της συνεπώσεως των γαμετών και διαρκεί για 8 έως 10 ώρες (Laurincik και συν. 1998). Αυτό σημαίνει, ενδεχομένως ότι, όταν η μελατονίνη προστίθεται για τις τελευταίες 6 ώρες τις IVF, αναστέλλει ακριβώς τη διαδικασία αυτή, η οποία είναι προφανώς αντιστρεπτή και αποκαθίσταται κατά τη διάρκεια της επακόλουθης IVC.

E. Μελατονίνη στην IVC

- Σε όλη τη διάρκεια ή μόνο στις πρώτες 8 ώρες της 48ωρης IVC: Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων
- Μόνο στις τελευταίες 8 ώρες: Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του προηγούμενου ποσοστού
- Και στις πρώτες και στις τελευταίες 8 ώρες της 48ωρης IVC: Δεν επηρεάστηκε το ποσοστό αυτό.

Με δεδομένη την ικανότητα να προσκολλάται στη σωληνίνη των μικροσωληνίσκων (Huerto-Delgadillo και συν. 1994), αλλά και να δεσμεύει το NO καθώς και να αδρανοποιεί τις NOS του κυτταροπλάσματος των βλαστομεριδίων (Jablonka-Shariff και Olson 2000), η μελατονίνη ενδεχομένως προκαλεί αλλοιώσεις στη μιτωτική άτρακτο. Αυτό σημαίνει, ότι είναι δυνατό να προκαλέσει ανωμαλίες κατά τη διάταξη των χρωματοσωμάτων στον ισημερινό, ίσως και κατά τον αποχωρισμό τους, και πιθανόν έτσι να ερμηνεύεται η αναστολή της ολοκλήρωσης των μιτωτικών διαιρέσεων και η παρατηρούμενη καθυστέρηση στην εμβρυική ανάπτυξη (Jablonka-Shariff και συν. 1999).

Η εκλεκτική εντόπισή της στον πυρήνα των κυττάρων και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993) καθιστά πιθανώς τη μελατονίνη ικανή να εμπλέκεται τόσο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Smirnov 2001), όσο και στην αναστολή της δραστηριότητας της MAPK (Sainz και συν. 2003) καθώς και της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων (Rice-Evans 1994). Με τον τρόπο αυτό, παρεμποδίζεται ενδεχομένως ο διπλασιασμός και η συμπύκνωση των χρωματίδων από τα χρωματοσώματα του πυρήνα, που θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει σε αναστολή των μιτωτικών διαιρέσεων.

Το γεγονός όμως ότι η προσθήκη της μελατονίνης μόνο για τις πρώτες 8 ώρες της IVC οδήγησε σε σημαντική αλλά όχι τόσο δραματική μείωση στο ποσοστό των ανεπτυγμένων εμβρύων συγκριτικά με την περίπτωση της προσθήκης της για όλη τη διάρκεια της IVC, ενδέχεται να μαρτυρά ότι αναστολή μιτωτικών διαιρέσεων είναι σε κάποιο βαθμό αντιστρεπτή μετά την απομάκρυνση της μελατονίνης από το υπόστρωμα, αλλά η καθυστέρηση στην εμβρυική ανάπτυξη είναι, τουλάχιστον μέχρι το στάδιο που μελετήσαμε, αναπόφευκτη. Σύμφωνα με τους Menendez-Pelaez και συν.(1993), οι οποίοι χορήγησαν εξωγενώς μελατονίνη σε τρωκτικά και πρωτεύοντα, η μελατονίνη είναι δυνατό να συγκεντρωθεί ενδοκυτταρικά σε επίπεδα μέχρι 1000 φορές σχεδόν μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα εξωκυτταρικά στους διάφορους ιστούς. Είναι πιθανόν λοιπόν το εσωτερικό των βλαστομεριδίων να εξακολουθεί να είναι κορεσμένο σε μελατονίνη για αρκετό διάστημα ακόμα και μετά την απομάκρυνσή της

από το υπόστρωμα και με αυτό τον τρόπο ενδεχομένως να παρατείνεται αντίστοιχα και η κυτταροστατική της δράση.

Η παρατηρούμενη αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων μετά από προσθήκη, των ίδιων πάντα συγκεντρώσεων μελατονίνης, στις τελευταίες 8 ώρες όμως της IVC, θα μπορούσε να αποδοθεί κυρίως στην αντιοξειδωτική της δράση. Είναι γεγονός, ότι μετά από παρέλευση 40 ωρών καλλιέργειας και έντονου κυτταρικού μεταβολισμού έχουν συσσωρευτεί μεγάλες ποσότητες ROS τόσο στο υπόστρωμα, όσο και στο εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίες έχουν ανατρέψει την οξειδοαναγωγική ισορροπία και απειλούν την περαιτέρω εξέλιξη και τη βιωσιμότητα του εμβρύου (Thompson 2000). Η μελατονίνη στη φάση αυτή πιθανόν καταναλώνεται κυρίως για να εξουδετερώσει το πλεόνασμα των ενδοκυτταρικών ROS και να αποκαταστήσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία, προωθώντας με αυτό τον τρόπο την εμβρυική εξέλιξη.

Τέλος, στην περίπτωση της προσθήκης της μελατονίνης στις πρώτες και στις τελευταίες 8 ώρες της IVC το παρατηρούμενο αποτέλεσμα προκύπτει από το συνδυασμό των δύο επιμέρους δράσεων. Δηλαδή, η ανασταλτική επίδραση της κυτταροστατικής δράσης των πρώτων 8 ωρών φαίνεται να αντισταθμίζεται από την κυρίως αντιοξειδωτική δράση των τελευταίων 8 ωρών της επώασης και στο βαθμό που προωθεί την εμβρυική εξέλιξη.

Συμπερασματικά, από τη μελέτη αυτή διαπιστώνεται ότι:

- 1) στα βοοειδή, το υγρό του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου καθώς και το υγρό περιβάλλον στο εσωτερικό του ωαγωγού λίγο πριν την ωοθυλακιόρρηξία έχουν σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα κλασικά υποστρώματα της IVP.
- 2) Η προσομοίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των *in vivo* στις *in vitro* συνθήκες με τη χρήση του αντιοξειδωτικού γουαϊαζουλενίου οδηγεί γενικά σε αύξηση των αποδόσεων της IVP. Το γεγονός αυτό παρέχει μία ισχυρή ένδειξη ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία πιθανή αιτία για τη χαμηλή απόδοση της IVP.
- 3) Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου κατά τη διάρκεια της IVM για 18 ώρες βελτιώνει σημαντικά την ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων.
- 4) Η προσθήκη γουαϊαζουλενίου στην IVM μόνο ή σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην IVC για 48 ώρες βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα των ωαρίων για γονιμοποίηση και την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη.
- 5) Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου μόνο κατά τη διάρκεια της IVF για 18 ώρες δεν έχει καμία επίδραση στις απόδοσης της IVP, ενώ σε συνδυασμό με την προσθήκη του στην IVM, στην IVC ή και στις δύο βελτιώνει σημαντικά την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη.
- 6) Η παρουσία του γουαϊαζουλενίου μόνο κατά τη διάρκεια της IVC βελτιώνει επίσης σημαντικά την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη.
- 7) Η προσθήκη γουαϊαζουλενίου μόνο στην IVM, μόνο στην IVC, ή και στις δύο, κατόπιν 18ωρων επώασεων στην IVM και στην IVF, επειδή προάγει σημαντικά την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη συγκριτικά με το μάρτυρα των 24ωρων επώασεων στην IVM και IVF, βελτιώνει εκτός από την απόδοση και

την αποτελεσματικότητα της IVP, αφού συμβάλλει στη μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την παραγωγή εμβρύων *in vitro*.

- 8) Η προσθήκη μελατονίνης σε όλη τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου της IVP, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις που προσομοιώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των *in vivo* συνθηκών, οδηγεί γενικά σε σημαντική μείωση της απόδοσης της IVP.
- 9) Η μελατονίνη στις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά με τρόπο που προσομοιάζει στον κερκάρδιο ρυθμό έκκρισής της *in vivo*, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση α) της ικανότητας των ωαρίων για γονιμοποίηση και υποστήριξη της ανάπτυξης των εμβρύων που αποδίδουν, όταν προστίθεται στο τελευταίο τρίτο της 24ωρης IVM και β) μόνο της εμβρυικής ανάπτυξης, όταν προστίθεται στο πρώτο τρίτο της 24ωρης IVM, στο τελευταίο τρίτο της 18ωρης IVM ή στις τελευταίες 8 ώρες της 48ωρης IVC.

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί την τελευταία δεκαετία τόσο στις τεχνικές όσο και στα μέσα που χρησιμοποιούνται από τα διάφορα εργαστήρια, η IVP εμβρύων βοοειδών παρουσιάζει ακόμα σχετικά χαμηλές αποδόσεις. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών, όπως του γουαϊαζουλενίου αλλά και της μελατονίνης σε συγκεκριμένες περιόδους επώασης, στα υποστρώματα της IVP σε συγκεντρώσεις που καθιστούν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ανάλογη εκείνης των αντίστοιχων *in vivo* συνθηκών, αποτελεί πολύτιμο εφόδιο στις προσπάθειες επίτευξης υψηλότερων αποδόσεων της IVP. Προκειμένου όμως τα αντιοξειδωτικά αυτά να καταστούν συστατικά των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVP, θα πρέπει να διεξαχθούν επιπλέον έρευνες σχετικά με την επίδρασή τους στην απόδοση και τη βιωσιμότητα των παραγόμενων βλαστικών κύστεων και, μετά τη διατραχηλική μεταφορά τους σε ζώα-δέκτες, στο ποσοστό υγιών μοσχαριών που θα γεννηθούν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 1998; 50(5):747-56.
- Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16(2):100-12.
- Adams ML, Nock B, Truong R, Cicero TJ. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of NG-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sci* 1992; 50(6):PL35-40.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. Evidence for Ca(2+)-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 1996; 44(1):111-20.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79(4):829-43.
- Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994; 16(4):259-67.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Irvine DS. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa: evidence for a ubiquitous response that is rapidly down-regulated. *Endocrinology* 1996; 137(9):3999-4009.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998 α ; 59(5):1037-46.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 1998 β ; 111:645-56.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 5):2017-25.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59(3-4):939-49.
- Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 1993; 158(1):101-12.

- Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 1983; 29(3):548-55.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8(5):338-48.
- Aten RF, Duarte KM, Behrman HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod* 1992; 46(3):401-7.
- Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45(5):314-20.
- Avery B, Greve T. Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(4):438-45.
- Βαϊνάς Ε, Βαφειάδης Δ, Μπόσκος Κ, Τσακάλωφ Π. *In vitro* ωρίμανση και γονιμοποίηση ωαρίων αγελάδας και καλλιέργεια ζυγωτού. Δελτίον Ελλ. Κτην. Εταιρείας 1994, 45(1):31-36.
- Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(5):793-803.
- Baratta M, Tamanini C. Effect of melatonin on the *in vitro* secretion of progesterone and estradiol 17 beta by ovine granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992; 127(4):366-70.
- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1977; 16(2):228-37.
- Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity *in vitro*. *Brain Res* 1991; 557(1-2):289-92.
- Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. *In vitro* inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290(2):191-6.
- Bennet PJ, Moatti JP, Mansat A, Ribbes H, Cayrac JC, Pontonnier F, Chap H, Douste-Blazy L. Evidence for the activation of phospholipases during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta* 1987; 919(3):255-65.
- Berg U, Brem G. Developmental rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. *Theriogenology* 1990; 33:195.

- Betteridge KJ. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 1988; 29:155-187.
- Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997; 47:13-22.
- Bhat PV, Samaha H. Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem Pharmacol* 1999; 57(2):195-7.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(3):282-8.
- Blackman CF, Andrews PW, Ubeda A, Wang X, House DE, Trillo MA, Pimentel ME. Physiological levels of melatonin enhance gap junction communication in primary cultures of mouse hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17(1):1-9.
- Bonello N, McKie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brannstrom M, Norman RJ. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996; 54(2):436-45.
- Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH, Day BN. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 1999; 51(7):1311-9.
- Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL. Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003;64:492-498.
- Brannstrom M, Norman RJ. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 1993; 8(10):1762-75.
- Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 1994; 61(3):488-95.
- Breimer M, Samuelsson BE. [Glycosphingolipids--membrane structures of biomedical interest]. *Lakartidningen* 1988; 85(32-33):2538-42.
- Brzezinski A. Melatonin in health and disease. *Fertil Steril* 1991; 55(5):1025.
- Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(4):865-7.
- Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 207(1-2):21-30.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990; 43(4):543-7.

- Burdon RH. Free radicals and cell proliferation. In: Rice-Evans CA. and Burdon RH. (Eds), Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier, 1994:155-185.
- Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(4):775-94.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(8):775-83.
- Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S *et al.* Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(11):639-43.
- Cassano E, Tosto L, Balestrieri M, Zicarelli L, Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol Biochem* 1999; 9(2):106-16.
- Chaudiere J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: Rice-Evans CA. and Burdon RH. (Eds), Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier, 1994:25-66.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267(1):166-72.
- Chian RC, Niwa K, Nakahara H. Effect of sperm penetration *in vitro* on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* 1992;96:73-78.
- Chrysselis MC, Rekkas EA, Kourounakis PN. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of some novel morpholine derivatives with antioxidant activity. *J Med Chem* 2000; 43(4):609-12.
- Clapp-Lilly KL, Smith MA, Perry G, Harris PL, Zhu X, Drew KL, Duffy LK. Melatonin exhibits antioxidant properties in a mouse brain slice model of excitotoxicity. *Int J Circumpolar Health* 2002; 61(1):32-40.
- Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-Castroviejo D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; 13(12):1537-46.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, First NL. The effect of semen extension, cAMP and caffeine on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1984;21:625-631.

- Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. *Reprod Domest Anim* 2005; 40(2):93-7.
- Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 1998; 49(3):619-27.
- De Azambuja RM, Moreno JF, Kraemer D, Westhusin M. Effect of gas atmosphere on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993;39:184.
- de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59(6):1291-5.
- de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; 13(5):379-86.
- de Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcsome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 1998; 19(5):585-94.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(4):451-7.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 1997; 57(6):1420-5.
- de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53(3):761-71.
- de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57(5):1443-51.
- de Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R *et al.* Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol Reprod Dev* 2002; 62(2):203-9.
- de Matos DG, Herrera C, Nogueira D, Donaldson M, Pasqualini RS. Stimulation of glutathione synthesis during *in vitro* maturation and *in vitro* culture of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 2000; 25:75. [Abstract].
- De Sousa PA, Watson AJ, Schultz RM. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol Reprod* 1998; 59(4):969-77.

- Dellegar SM, Murphy SA, Bourne AE, DiCesare JC, Purser GH. Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(2):431-9.
- Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA. and Burdon RH. (Eds), *Free radical damage and its control*. Amsterdam: Elsevier, 1994:113-130.
- Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; 65(1-2):1-16.
- Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997; 47(4):456-67.
- Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev* 2002; 62(1):113-23.
- Downs SM. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes, *Theriogenology*, 1993;39:65-79.
- Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol* 1999; 460:181-90.
- Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil Steril* 2000; 74(4):715-20.
- Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 2001; 276(11):7957-62.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990; 25(2):195-204.
- El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 89(1):1-6.
- Eppig JJ, Vivieros MM, Marin-Bivens C, De La Fuente R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In : PCK Leung & EY Adashi (Eds), *The Ovary*. Amsterdam :Elsevier, 2004:113-129.
- Ermilov A, Diamond MP, Sacco AG, Dozortsev DD. Culture media and their components differ in their ability to scavenge reactive oxygen species in the plasmid relaxation assay. *Fertil Steril* 1999; 72(1):154-7.

- Espey, L.L., Lipner, H. Ovulation. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven press, New York, 1994.pp 725–780.
- Faletti A, Martinez SP, Perotti C, deGimero AF. Activity of ovarian nitric oxide synthase during ovulatory process in the rat: relationship with the prostaglandin production. *Nitric Oxide* 1999;3:340-347.
- Farber JL. The role of calcium in cell death. *Life Sci* 1981; 29(13):1289-95.
- Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* 1894; 65:899-909.
- Feugang JM, Van Langendonck A, Sayoud H, Rees JF, Pampfer S, Moens A, Dessy F, Donnay I. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote* 2003; 11(2):107-18.
- Figuroa S, Canadas S, Arce C, Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP. SNAP, a NO donor, induces cortical neuron death by a mechanism in which the caspase pathway is implicated. *Brain Res* 2005; 1047(2):168-76.
- Fisher B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993;99:933-942.
- Fisher-Nielsen A, Poulsen H. 8 Hydroxydeoxyguanosine *in vitro*: effects of glutathione, ascorbate and 5-aminosalicylic acid. *Free Radical Biol Med* 1992; 13:121-126.
- Fiske VM, Parker KL, Ulmer RA, Ow CH, Aziz N. Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the *in vitro* secretion of estrogens or progesterone by granulosa cells of rats. *Endocrinology* 1984;114:407-410.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55(6):1261-70.
- Floyd RA, West MS, Eneff KL, Hogsett WE, Tingey DT. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 1988; 262(1):266-72.
- Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology* 2000; 141(9):3120-6.
- Fraser LR, Lane MR. Capacitation- and fertilization-related alterations in mouse sperm oxygen consumption. *J Reprod Fertil* 1987; 81(2):385-93.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.

- Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. *J Anim Sci* 1997; 75(2):483-9.
- Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ, Stover SK. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod* 1998; 59(2):431-6.
- Gilbert DL (Ed). *Oxygen and Living Processes: An inter-disciplinary Approach*. Springer, New York, 1981.
- Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(10):1393-401.
- Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 2003; 69(4):1193-200.
- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili E. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 57(6):1502-8.
- Goldman R, Ferber E, Zort U. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. *FEBS Lett* 1992; 309(2):190-2.
- Gomez E, Aitken J. Impact of *in vitro* fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1996; 65(4):880-2.
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. In: *Biotechnology in agriculture*. Wallingford: CAB International, 1994.
- Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998; 58(4):875-9.
- Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod* 1990; 5(5):613-8.
- Gradl E. *In vitro* Produktion von Rinderembryonen. Munchen, Diss Med Vet, 1988.
- Grisart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1994; 101(2):257-64.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7(2):175-89.
- Guerin P, Menezo Y. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments:

- de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 1995; 3(4):333-43.
- Guerrero JM, Pozo D, Garcia-Maurino S, Carrillo A, Osuna C, Molinero P, Calvo JR. Nuclear receptors are involved in the enhanced IL-6 production by melatonin in U937 cells. *Biol Signals Recept* 2000; 9(3-4):197-202.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2(2):195-256.
- Gutteridge JM. Hydroxyl radical formation from the auto-reduction of a ferric citrate complex. *Free Radic Biol Med* 1991; 11(4):401-6.
- Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41/12:819-28.
- Guyader-Joly C, Guerin P, Renard JP, Guillaud J, Ponchon S, Menezo Y. Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced *in vitro*. *Amino Acids* 1998; 15(1-2):27-42.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31(4):261-72.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59(5):1609-23.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281(1-2):9-19.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl):715S-24S; discussion 724S-725S.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280(1):1-8.
- Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schultz GA, Watson AJ. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod* 1995; 53(3):532-40.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *Mol Reprod Dev* 2000;57:353-360.
- Hattori M, Sakamoto K, Fujihara N, Kojima I. Nitric oxide: a modulator for the epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. *Am J Physiol* 1996; 270(3 Pt 1):C812-8.

- Hellstrom WJ, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 1994; 61(6):1117-22.
- Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 2000; 53(1):11-20.
- Howlett SK, Bolton VN. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87:175-206.
- Hubbard CJ, Terranova PF. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact cumulus. *Biol Reprod* 1982; 26(4):628-32.
- Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17(2):55-62.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycolysation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39:1420-1424.
- Hyne RV, Garbers DL. Calcium-dependent increase in adenosine 3',5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(11):5699-703.
- Hyttel p, Callesen H, Greve T. Fertilization *in vivo* versus *in vitro* of bovine oocytes matured *in vivo*: an ultrastructural study. *J Reprod Fertil* 1988; Abstract Series No1, Abs. 17.
- Inouye S. Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Lett*, 1984;172:231-234.
- Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 1997; 47(2):175-80.
- Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6(2):95-101.
- Jablonka-Shariff A, Olson LM. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138(1):460-8.
- Jablonka-Shariff A, Olson LM. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(4):412-21.
- Jablonka-Shariff A, Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139(6):2944-54.

- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88(3):347-54.
- Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(3):83-6.
- Jones KT. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 2005; 130(6):813-23.
- Juriscova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(2):93-8.
- Kanishi Y, Kobayashi Y, Noda S, Ishizuka B, Saito K. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. *J Pineal Res* 2000; 28(4):227-33.
- Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod* 1981; 25(4):785-91.
- Keller JN. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2006; 5(1):1-13.
- Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi AL, Hendriksen PJ, Bevers MM. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999; 52(3):537-47.
- Kinis A, Vergos V, Gallagher M, Gordon AC. Use of sodium citrate in the denudation of bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization. *Proceedings of the Fifth International Conference of the European Embryo Transfer Association (Lyon), 1989*;162.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004; 62(7):1186-97.
- Knijn HM, Gjorret JO, Vos PL, Hendriksen PJ, van der Weijden BC, Maddox-Hyttel P, Dieleman SJ. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol Reprod* 2003; 69(4):1371-8.
- Kobayashi T, Robinson JM, Seguchi H. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 1):81-91.
- Kojima T, Mochizuki C, Mitaka T, Mochizuki Y. Effects of melatonin on proliferation, oxidative stress and Cx32 gap junction protein expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Struct Funct* 1997; 22(3):347-56.

- Koppenol WH. Chemistry of iron and copper in radical reactions. In: Rice-Evans CA. and Burdon RH. (Eds), Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier, 1994: 3-24.
- Kourounakis AP, Galanakis D, Tsiakitzis K, Rekka EA, Kourounakis PN. Synthesis and pharmacological evaluation of novel derivatives of anti-inflammatory drugs with increased antioxidant and anti-inflammatory activities. *Drug Dev Res* 1999;47:9-16.
- Kourounakis AP, Rekka EA, Kourounakis PN. Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49(9):938-42.
- Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril* 1992; 58(4):809-16.
- Kruip TA, Bevers MM, Kemp B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 2000; 53(2):611-8.
- Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura, K, Ohtsuka, E, Nishimura, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327(6117):77-9.
- Kyle ME, Nakae D, Serroni A, Farber JL. 1,3-(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea potentiates the toxicity of acetaminophen both in the phenobarbital-induced rat and in hepatocytes cultured from such animals. *Mol Pharmacol* 1988; 34(4):584-9.
- Laloraya M, Kumar GP, Laloraya MM. Histochemical study of superoxide dismutase in the ovary of the rat during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1989; 86(2):583-7.
- Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 1999; 19(3):215-29.
- Langlais RD, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985;12:183-224.
- Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003; 68(4):1157-64.
- Lapointe S, Sullivan R, Sirard MA. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 58(3):747-53.
- Laurincik J, Hyttel P, Baran V, Eckert J, Lucas-Hahn A, Pivko J, Niemann H, Brem G, Schellander K. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes *in vitro*: cell-cycle chronology and ultrastructure. *Mol Reprod Dev* 1998; 50(2):192-9.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine

- phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(4):643-56.
- Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 1979; 48:76-86.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish LL, First NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1986;35:850-857.
- Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(11):873-8.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67(1):142-7.
- Li GP, Liu Y, Bunch TD, White KL, Aston KI. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol Reprod Dev* 2005; 71(2):220-6.
- Li J, Foote RH, Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol Reprod* 1993; 49(1):33-7.
- Lim JM, Liou SS, Hansel W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:429-439.
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biol Reprod* 1999; 61(4):1162-9.
- Livingston T, Eberhardt D, Edwards JL, Godkin J. Retinol improves bovine embryonic development *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2(1):83.
- Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 1979; 560(1):1-65.
- Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 1999; 51(8):1565-76.
- Loukides JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML. Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(5):1363-7.

- Lu KH, Gordon I. Effect of serum, hormones and cumulus cells on *in vitro* maturation of bovine oocytes. Proceedings of the Society for the study of Fertility 1987;81.
- Lu Q, Dunn RL, Angeles R, Smith GD. Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2A during mouse oocyte meiosis. Biol Reprod 2002; 66(1):29-37.
- Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. Biol Reprod 2004; 70(2):465-72.
- Luciano AM, Pocar P, Milanesi E, Modina S, Rieger D, Lauria, A, Gandolfi F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. Mol Reprod Dev 1999; 54(1):86-91.
- Luria A, Tennenbaum T, Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H. Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development. Biol Reprod 2000; 62(6):1564-70.
- Lutterbach A, Koll RA, Brem G. *In vitro* maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. Zuchthyg 1987; 22:145-150.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. Mol Reprod Dev 1996; 43(4):437-43.
- Macek MB, Shur BD. Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. Gamete Res 1988; 20(1):93-109.
- Mahal HS, Sharma HS, Mukherjee T. Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. Free Radic Biol Med 1999; 26(5-6):557-65.
- Marcillat O, Zhang Y, Lin SW, Davies KJ. Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. Biochem J 1988; 254(3):677-83.
- Markoulaki S, Matson S, Ducibella T. Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. Dev Biol 2004; 272(1):15-25.
- Martin JE, Sattler C. Selectivity of melatonin pituitary inhibition for luteinizing hormone-releasing hormone. Neuroendocrinology 1982; 34(2):112-6.
- Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khadly H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. Int J Biochem Cell Biol 2001;1212:1-10.

- Matsumi H, Koji T, Yano T, Yano N, Tsutsumi O, Momoeda M, Osuga Y, Taketani Y. Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr J* 1998; 45(6):745-51.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Yano N, Tsutsumi O, Momoeda M, Osuga Y, Taketani, Y. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol Reprod* 2000; 63(1):141-6.
- Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(10):1706-13.
- McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Wyllie AH, Orrenius S. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol Lett* 1988; 42(2):123-30.
- Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130(6):791-9.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220(4596):472-7.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; 53(4):373-82.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; 15(2):59-69.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59(2):651-74.
- Missbach M, Jagher B, Sigg I, Nayeri S, Carlberg C, Wiesenberg I. Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid X receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem* 1996; 271(23):13515-22.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
- Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol Reprod* 2002; 67(5):1588-92.
- Nakayama DK, Geller DA, Di Silvio M, Bloomgarden G, Davies P, Pitt BR, Hatakeyama K, Kagamiyama H, Simmons RL, Billiar TR. Tetrahydrobiopterin synthesis and inducible nitric oxide production in

- pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 1994; 266(4 Pt 1):L455-60.
- Nasr-Esfahani MM, Johnson MH. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. *Development* 1991; 113(2):551-60.
- Niles LP, Wang J, Shen L, Lobb DK, Younglai EV. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 156(1-2):107-10.
- Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, Ikeda S, Kira Y, Sato EF, Inoue M, Yamada M. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction* 2001; 122(6):957-63.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999; 52(2):289-301.
- Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996; 137(8):3531-9.
- Olson SE, Seidel GE Jr. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 2000; 62(2):248-52.
- Orrenius S, McConkey DJ, Nicotera P. Role of calcium in toxic and programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 1991; 283:419-25.
- Orrenius S. Mechanisms of oxidative cell damage. In: Poli G, Albano E, Dianzani U, eds. *Free Radicals, From Basic Science to Medicine*. Berlin: Birkhauser Verlag, 1993:47-64.
- Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003; 18(11):2270-4.
- Pabon JE Jr, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989; 51(5):896-900.
- Packer L, Maguire JJ, Mehlhorn RJ, Serbinova E, Kagan VE. Mitochondria and microsomal membranes have a free radical reductase activity that prevents chromanoxyl radical accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(1):229-35.
- Parchment RE. The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int J Dev Biol* 1993; 37(1):75-83.
- Parrish JJ, First NL. Fertilization. In: King GJ (Ed), *Reproduction in Domesticated animals*, Elsevier Science Publishers BV, 1993:195-227.

- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986; 25(4):591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38(5):1171-80.
- Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 2004; 81(4):973-6.
- Paszkowski T, Clarke RN. Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum Reprod* 1996; 11(11):2493-5.
- Paszkowski T, Clarke RN. The Graafian follicle is a site of L-ascorbate accumulation. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16(1):41-5.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125(1):181-6.
- Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Dev Biol* 1984; 101(1):160-7.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55(15):PL271-6.
- Powers RW, Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Gonadotropin-stimulated regulation of blood-follicle barrier is mediated by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt 1):E290-8.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; 65(3):430-42.
- Quan HM, Fan HY, Meng XQ, Huo LJ, Chen DY, Schatten H, Yang PM, Sun QY. Effects of PKC activation on the meiotic maturation, fertilization and early embryonic development of mouse oocytes. *Zygote* 2003; 11(4):329-37.
- Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 1999; 13(8):857-68.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnecki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4):1129-46.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7(6):444-58.

- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719:1-12.
- Rettori V, Kamat A, McCann SM. Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid *in vitro*. *Brain Res Bull* 1994; 33(5):501-3.
- Rice-Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA. and Burdon RH. (Eds), *Free radical damage and its control*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 131-153.
- Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1994; 100(1):257-62.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM *et al*. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36(1):1-9.
- Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 2005a; 85(3-4):231-42.
- Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* 2005b; 37(5):166-72.
- Roldan ER, Harrison RA. Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(1):8-15.
- Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(2):492-6.
- Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* 1995; 10(7):1786-90.
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998; 4(1):3-24.
- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol* 2002; 245(2):237-54.
- Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72(6):1027-34.
- Sagripanti JL, Kraemer KH. Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1989; 264(3):1729-

- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Lopez-Burillo S, Natarajan M, Reiter RJ. Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302(3):625-34.
- Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53(7):576-82.
- Schraufstatter IU, Hyslop PA, Jackson J, Cochrane CC. Oxidant injury of cells. *Int J Tissue React* 1987; 9(4):317-24.
- Schweigert FJ, Zucker H. Concentrations of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J Reprod Fertil* 1988; 82(2):575-9.
- Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12(2):70-4.
- Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994; 16(4):198-201.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (Eds) *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985:1-8.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215(2):213-9.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1989; 40(6):1257-63.
- Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66(1):19-26.
- Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 140(1):1-12.
- Σμοκοβίτης Α. Θέματα Φυσιοπαθολογίας. Θεσσαλονίκη, 1992.
- Σμοκοβίτης Α. Φυσιολογία. Θεσσαλονίκη, 1993.
- Spiropoulos J, Long SE. Female meiosis in dairy cattle. *J Reprod Fertil*, 1989; 3:48 abstr.
- Spungin B, Breitbart H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 7):1947-55.
- Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H, Shimamura K, Nakamura Y, Tsuruta R, Sadamitsu D, Ueda T, Maekawa T, Kato H. Nitric oxide concentrations in the

- follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod* 1996; 11(11):2484-7.
- Sun QY, Lai L, Prather RS, Schatten H. Antioxidants stimulate meiosis resumption, but inhibit mitogen-activated protein kinase phosphorylation and further cell cycle progression in porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12(7-8):383-9.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Bonk A, Cabot R, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 2002; 66(3):580-8.
- Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999; 72(4):720-6.
- Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410:103-123.
- Takami M, Preston SL, Behrman HR. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(4):C646-50.
- Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1):E684-8.
- Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res* 1981; 41(11 Pt 1):4432-6.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Sainz RM, Reiter RJ. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003;34:249-259.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000; 9(3-4):137-59.
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden L. R.. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Lett* 1993; 70(1-2):65-71.
- Tan DX, Reiter Rj, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002;2:181-198.
- Tao Y, Zhou B, Xia G, Wang F, Wu Z, Fu M. Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from

- metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reprod Domest Anim* 2004; 39(1):52-7.
- Tarin JJ, Ten J, Vendrell FJ, Cano A. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod* 1998 α ; 13(2):381-6.
- Tarin JJ, Vendrell FJ, Ten J, Blanes R, van Blerkom J, Cano A. The oxidizing agent tertiary butyl hydroperoxide induces disturbances in spindle organization, c-meiosis, and aneuploidy in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(12):895-901.
- Tarin JJ, Vendrell FJ, Ten J, Cano A. Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on meiotic division and chromosomal segregation in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998 β ; 4(3):281-8.
- Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N. Enhancement of developmental competence after *in vitro* fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* 2001; 65(6):1800-6.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *In vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 2000; 63(3):805-10.
- Terman A, Brunk UT. The aging myocardium: roles of mitochondrial damage and lysosomal degradation. *Heart Lung Circ* 2005; 14(2):107-14.
- Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des* 2003; 9(5):399-409.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 1987; 27(5):865-96.
- Thomas CE, McLean LR, Parker RA, Ohlweiler DF. Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* 1992; 27(7):543-50.
- Thomas M, Jain S, Kumar GP, Laloraya M. A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 14):1597-602.
- Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 2004; 70(3):548-56.
- Thomas SR, Dagher G. A kinetic model of rat proximal tubule transport--load-dependent bicarbonate reabsorption along the tubule. *Bull Math Biol* 1994; 56(3):431-58.
- Thompson JG. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:263-75.

- Tilly JL. Apoptosis and the ovary: a fashionable trend or food for thought? *Fertil Steril* 1997; 67(2):226-8.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; 39(2):99-104.
- Tomek W, Melo Sterza FA, Kubelka M *et al.* Regulation of translation during *in vitro* maturation of bovine oocytes: the role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1. *Biol Reprod* 2002; 66(5):1274-82.
- Tornell J, Billig H, Hillensjo T. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiol Scand* 1990; 139(3):511-7.
- Tosic J, Walton A. Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochem J* 1950; 47(2):199-212.
- Trombly R, Tappel A. Fractionation and analysis of fluorescent products of lipid peroxidation. *Lipids* 1975; 10(8):441-7.
- Tse CA, Scott GK. Growth-related proteinase activity in a recently-established human tumour cell culture. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(3):285S.
- Turjanski AG, Estrin DA, Rosenstein RE *et al.* NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. *Protein Sci* 2004; 13(11):2925-38.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004; 264(1-2):85-97.
- Van Langendonck X, Morales H, Massip A, Dessy F. Effect of hydrogen peroxide on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 1998;49:221.
- Van Soom A, Van Vlaenderen V, Mahmoudzudeh AR, Deluyker H, De Kruif A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 1992;38:905-919.
- Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; 47(1):47-56.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A.. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 2002; 57(5):1453-65.
- Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135(5):1799-806.

- Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation *in vivo*. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2719-26.
- Vanecek J. Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107(2):149-53.
- Vergos E. *In vitro* fertilization and embryo culture in cattle. Phd Thesis, National University of Ireland, Dublin, 1990.
- Viveiros MM, Hirao Y, Eppig JJ. Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes. *Dev Biol* 2001; 235(2):330-42.
- Viveiros MM, O'Brien M, Eppig JJ. Protein kinase C activity regulates the onset of anaphase I in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2004; 71(5):1525-32.
- Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I, Polge C. The effect of gas phase on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology* 1992;37:320.
- Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984; 104(2):287-96.
- Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 1996; 145(5):523-31.
- Webb RJ, Bains H, Cruttwell C, Carroll J. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 2002;123:41-52.
- Webley GE, Luck MR. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1986; 78(2):711-7.
- Wehrend A, Meinecke B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci* 2001; 66(3-4):175-84.
- White G, Lovinger DM, Weight FF. Transient low-threshold Ca²⁺ current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(17):6802-6.
- Wiesenberg I, Missbach M, Carlberg C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 12(2-3):143-50.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. Transcriptional

- activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(3):327-33.
- Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10):4789-97.
- Yagi K. Female hormones act as natural antioxidants--a survey of our research. *Acta Biochim Pol* 1997; 44(4):701-9.
- Yamagata Y, Nakamura Y, Sugino N, Harada A, Takayama H, Kashida S, Kato H. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. *Endocr J* 2002; 49(2):219-26.
- Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni L and Biggers JD eds, *Fertilization and Embryonic Development in vitro*. New York: Plenum Press, 1981:81-182.
- Yanagimachi R, Katayose H, Killian G, Lee CN, Carrell DT, Huang TT. Moderate heat treatment increases the penetrability of zona pellucida of salt-stored mammalian oocytes by spermatozoa. *Zygote* 1993; 1(4):345-51.
- Yanasigawa T, Kosakai K, Tomiyama T, Yasunami M, Takase K. Studies on anti ulcer agents. II. Synthesis and anti-ulcer activities of 6-isopropylazulene-I-sodium sulphate derivatives. *Chem Pharm Bull* 1990; 38:335-3358.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13(4):998-1002.
- Yie SM, Brown GM, Liu GY, Collins JA, Daya S, Hughes EG, Foster WG, Younglai EV. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Hum Reprod* 1995; 10(1):50-5.
- Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FO, Minitiens K, Boerjan ML, Van Zeveren, de Kruif A, Peelman LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2003; 59(7):1585-96.
- Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 2005; 63(8):2147-63.
- Zhang H, Squadrito GL, Pryor WA. The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(1):83-7.
- Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol Reprod* 1997; 57(6):1413-9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας. Μέσες τιμές A.I. (%) και τυπική απόκλιση (SD), 2,5' μετά από την έναρξη της προκαλούμενης λιπιδικής υπεροξειδωσης *in vitro*, των υγρών του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου και του αγωγού αγελάδων σε οίστρο, των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVF και IVC και των τροποποιημένων αντίστοιχων υποστρωμάτων κατόπιν προσθήκης, είτε DMSO, είτε γουαϊαζουλενίου σε DMSO σε συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,05 mM, είτε μελατονίνης σε συγκεντρώσεις 5×10^{-4} και $2,5 \times 10^{-4}$ M .

Υγρό	A,I,(%) \pm SD
Υ.Π.Ω.	70,63 \pm 10,03 ^δ
Υ.Ω.	16,33 \pm 4,33 ^{ζ,η}
IVM	17,94 \pm 1,66 ^{ζ,η}
IVF	-1,82 \pm 0,78 ^ι
IVC	14,57 \pm 1,26 ^η
D-IVM	15,79 \pm 2,08 ^η
D-IVF	1,29 \pm 0,41 ^ι
D-IVC	17,04 \pm 1,98 ^{ζ,η}
0,5 A-IVM	95,15 \pm 2,82 ^α
0,5 A-IVF	92,55 \pm 3,49 ^{α,β}
0,5 A-IVC	94,4 \pm 3,10 ^α
0,2 A-IVM	88,17 \pm 4,1 ^γ
0,2 A-IVF	46,60 \pm 2,20 ^ε
0,2 A-IVC	89,61 \pm 3,25 ^{β,γ}
0,1 A-IVM	67,24 \pm 5,85 ^δ
0,1 A-IVF	19,98 \pm 2,49 ^ζ
0,1 A-IVC	69,19 \pm 6,22 ^δ
0,05 A-IVM	37,88 \pm 2,95 ^{στ}
0,05 A-IVF	9,79 \pm 0,89 ^θ
0,05 A-IVC	34,59 \pm 3,22 ^{στ}
5×10^{-4} M-IVM	69,52 \pm 7,20 ^δ
5×10^{-4} M-IVF	18,15 \pm 1,68 ^{ζ,η}
5×10^{-4} M-IVC	68,30 \pm 7,51 ^δ
$2,5 \times 10^{-4}$ M-IVM	34,86 \pm 3,37 ^{στ}
$2,5 \times 10^{-4}$ M-IVF	8,58 \pm 0,92 ^θ
$2,5 \times 10^{-4}$ M-IVC	38,07 \pm 3,86 ^{στ}

Υ.Π.Ω.: υγρό του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου. Υ.Ω.: υγρό του αγωγού αγελάδων σε οίστρο. IVM, IVF και IVC: τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. D-IVM, D-IVF, D-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης DMSO στα υποστρώματα της IVP. A-IVM, A-IVF, A-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης γουαϊαζουλενίου σε DMSO στα υποστρώματα της IVP σε συγκεντρώσεις 0,5, 0,2 και 0,05 mM. M-IVM, M-IVF, M-IVC: τροποποιημένα κατόπιν προσθήκης μελατονίνης υποστρώματα της IVP σε συγκεντρώσεις 5×10^{-4} και $2,5 \times 10^{-4}$ M. Οι τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

