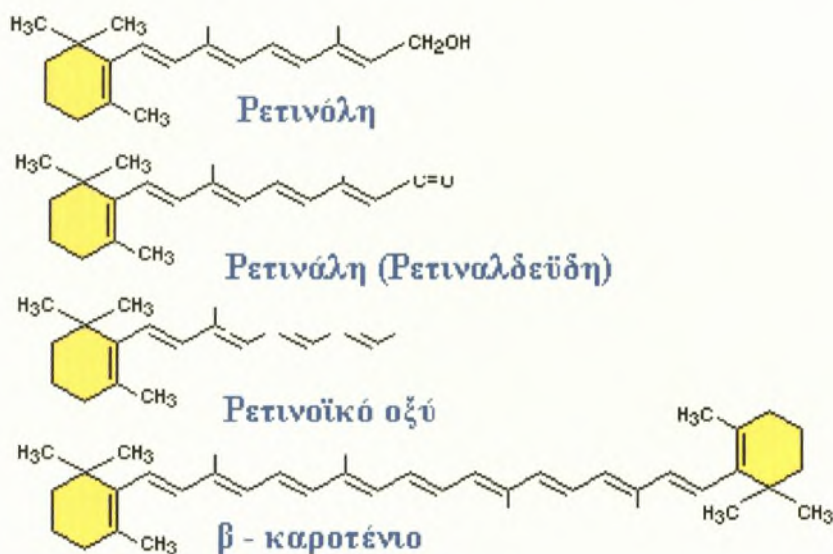


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**Τα επίπεδα της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος στο ωοθυλακικό υγρό**

**ΚΟΤΣΟΓΙΑΝΝΗ ΜΗΔΕΙΑ**

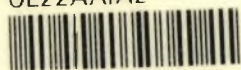
**Λάρισα 2005**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4656/1  
Ημερ. Εισ.: 14-10-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΚΟΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087877

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική εργασία μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε ένα πείραμα στο οποίο είχα προσωπική συμβολή και αποκόμισα εμπειρία που μελλοντικά θα μου φανεί χρήσιμη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Ανάργυρο Μουλά για την επιστημονική καθοδήγηση και για το ενδιαφέρον θέμα με το οποίο είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα που παραχωρήθηκαν από τη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Η κλινική μελέτη διεξήχθη στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Οι βιοχημικοί προσδιορισμοί έγιναν στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Λάρισας (υπεύθυνος καθηγητής κ. Ανάργυρος Μουλάς, Αναπληρωτής καθηγητής του Τ.Ζ.Π. του Τ.Ε.Ι. Λάρισας).

Το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τ.Ζ.Π. του Τ.Ε.Ι. Λάρισας διαθέτει όλη την απαραίτητη υποδομή για τους προσδιορισμούς των ρετινοειδών. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο και έχει εφαρμοστεί και σε άλλες κλινικές μελέτες.

Η λήψη των δειγμάτων των ωοθυλακικών υγρών των αγελάδων έγινε στην Κτηνιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (υπεύθυνος κ. Γεώργιος Αμοιρίδης, Επίκουρος καθηγητής Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

Επιπλέον δείγματα ωοθυλακικών υγρών παρελήφθησαν από τα σφαγεία της Λάρισας στην περιοχή της Γυρτώνης, καθώς και από το σφαγείο του Τυρνάβου.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής είναι : **ο κ. Ανάργυρος Μουλάς** Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Λάρισας, **ο κ. Δημήτριος Κομμιώτης** Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας και **ο κ. Δημήτριος Κουρέτας** Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας.

# Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Σελίδες

**ΙΣΤΟΡΙΚΑ - ΧΗΜΕΙΑ – ΠΗΓΕΣ - ΕΛΛΕΙΨΗ  
ΥΠΕΡΒΟΛΙΚΗ ΛΗΨΗ..... 1-3**

## **ΟΙ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ**

- RBP (retinol-binding protein) – Η δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης.
- CRBP I (retinol binding protein type I)  
Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης τύπου I.
- CRBP II (cellular retinol binding protein type II)  
Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης τύπου II.  
CRABP (cellular retinoic acid-binding protein)  
Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη του ρετινοϊκού οξέος..... 3-5

**ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ  
ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ ..... 5-7**

**ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α,  
ΗΠΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ  
ΤΩΝ ΧΥΛΟΜΙΚΡΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ  
ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α ΣΤΟ ΗΠΑΡ ..... 7-11**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ..... 11-12**

**ΕΚΚΡΙΣΗ..... 12**

**ΑΝΑΤΟΜΙΑ..... 13**

## **ΩΟΘΗΚΕΣ**

- Κατασκευή της ωοθήκης.
- Διάπλαση των ωοθηκών (γοναδικό – gonadal – φύλο).
- Ωογένεση
- Γνωρίσματα των ωοθυλακίων.
- Ωοθυλάκια- ωοθυλακικό υγρό.
- Χημική σύσταση του ωοθυλακικού υγρού.
- Ωχρό σωματίο..... 13-18

## **ΤΟ ΟΡΜΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΑ**

- Οι λειτουργίες των ορμονών της ωοθήκης –  
Η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη.
- Η χημεία των γεννητικών ορμονών στη γυναίκα.
- Σύνθεση των οιστρογόνων και προγεστινών.
- Η ρύθμιση του μηνιαίου κύκλου στη γυναίκα –  
Η συνέργεια μεταξύ των ορμονών της ωοθήκης  
και του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.
- Ο ρόλος των ωοθηκικών ορμονών.
- Γεννητικός κύκλος.
- Εξήγηση των ορμονικών μεταβολών.
- Η ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη και η επίδρασή της  
στη διατήρηση του ωχρού σωματίου και την αποτροπή της  
εμμηνορρυσίας.
- Η λειτουργία της ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης..... 18-26

**ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ..... 26-27**

**ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ..... 28-33**

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ..... 34**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 35-42**

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... 43-50**

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 51-55**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... 56**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ..... 57-59**

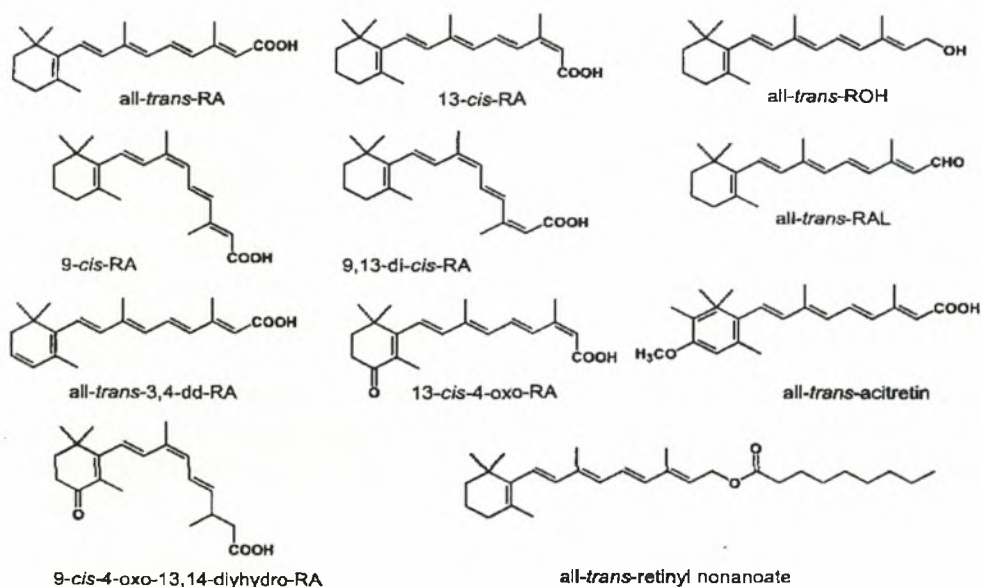
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 60-61**

## ΙΣΤΟΡΙΚΑ

Το 1909, ο Strepp παρατήρησε πως ο κρόκος του αυγού περιέχει ένα λιποδιαλυτό συστατικό απαραίτητο για τη ζωή. Το 1919, ο McCollum ονόμασε το συστατικό του κρόκου, καθώς και το συστατικό των ζωικών λιπών και του ιχθυελαίου, λιποδιαλύτη Α, ενώ το 1920 μετονομάστηκε σε βιταμίνη Α από τον Drummond. Η αλκοολική δομή της βιταμίνης προτάθηκε από τον Karrer et al. στην Ελβετία το 1931 και η σύνθεσή της πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Hoffman-La Roche το 1947. Το β-καροτένιο, η μορφή της βιταμίνης Α στα φυτά, είχε απομονωθεί εκατό χρόνια νωρίτερα και ο Steenbock το 1919 έδειξε πως διαθέτει ενεργότητα βιταμίνης Α. Στα μέσα της δεκαετίας του '30, ο Wald πρότεινε το ρόλο της βιταμίνης Α στην όραση.<sup>(3)</sup>

## ΧΗΜΕΙΑ

Ο όρος βιταμίνη Α αναφέρεται σε μια ομάδα λιποδιαλυτών συστατικών, γνωστά και ως “ρετινοειδή”. Γενικά, η δομή τους αποτελείται από ένα β-ιονικό δακτύλιο, μια συζευγμένη ισοπρενοειδή αλυσίδα και μια πολική τελική ομάδα. Η *all-trans* ρετινόλη και τα εστερικά παράγωγα του λιπαρού οξέος αναφέρονται ως προσχηματισμένη βιταμίνη Α σε αντιδιαστολή με τον όρο πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α που αντιστοιχεί στα β-καροτένια.<sup>(2)</sup>



Εικόνα 1. Η χημική δομή των σημαντικότερων ρετινοειδών.<sup>(5)</sup>

## ΠΗΓΕΣ

Η πλουσιότερη πηγή βιταμίνης Α είναι τα ιχθυέλαια. Ανάμεσα στις τροφές ζωικής παραγωγής με υψηλά επίπεδα βιταμίνης συγκαταλέγονται το λίπος του γάλακτος (300-1000 IU), ο κρόκος του αυγού, το συκώτι (11655 IU), μα μόνο στις περιπτώσεις που τα ζώα από τα οποία προέρχονται σιτίζονται με δίαιτα που περιείχε επαρκή ποσότητα βιταμίνης Α.<sup>(2, 11)</sup>



Συμπληρωματική πηγή βιταμίνης Α αποτελεί και η βιομηχανική, χημική σύνθεσή της, που αναπτύχθηκε το 1949. Από τότε η συνθετική μορφή της βιταμίνης είναι η κύρια μέθοδος για εμπλουτισμό της διαίτας των οικόσιτων ζώων, καθώς και των ανθρώπων. <sup>(11)</sup>

Λαχανικά με κίτρινη, πορτοκαλί και πράσινη χρωστική περιέχουν εξίσου υψηλές ποσότητες β-καροτένιου (πρόδρομου μορίου της βιταμίνης Α) και κυρίως οι κολοκύθες και τα καρότα (11000 και 7500 IU αντίστοιχα).

Η ενεργότητα της βιταμίνης Α εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες - international units (IU). Μία μονάδα IU ορίζεται ως η βιολογική ενεργότητα 0,300μg ρετινόλης ή 0,550μg εστέρα παλμιτιμού οξέος βιταμίνης Α. Μία μονάδα IU προβιταμίνης Α αντιστοιχεί στην ενεργότητα 0,6 μg β-καροτένιου, δηλαδή του στοιχείου αναφοράς. Η βιταμίνη Α ενδέχεται να εκφράζεται σε ισοδύναμο ρετινόλης (RE) αντί των IU. Εξ ορισμού, ένα ισοδύναμο ρετινυλικού εστέρα (RE) ισούται με 1μg ρετινόλης, 6μg β-καροτένιου ή 12μg άλλων καροτενοειδών προδρόμων της βιταμίνης Α.

## ΕΛΛΕΙΨΗ

Ζώα που έχουν υποβληθεί σε πειράματα ανεπαρκή σε βιταμίνη Α, εμφανίζουν σημαντική μείωση της όρεξης τους και έτσι ελαττώνεται ή αποτυχαίνει τελείως η αύξηση τους. Η απώλεια της όρεξης αποδίδεται στην απώλεια ή τη μείωση της αίσθησης της γεύσης λόγω κερατινοποίησης και αποξήρανσης, των γευστικών καλύκων.

Έλλειψη της κατά την παιδική ηλικία πιθανόν να προκαλέσει ανεπαρκή αύξηση των οστών, με συνακόλουθα προβλήματα στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού καθώς και τραυματισμούς του νευρικού συστήματος, που εκδηλώνονται με παραλύσεις ή άλλα νευρολογικά συμπτώματα.

Ακόμη παρατηρείται πρόκληση ημεραλωπίας, κερατινοποίηση των επιπεφυκότων (ξηροφθαλμία) και εξελκώσεις του κερατοειδούς (κερατομαλακία). Το δέρμα γίνεται πιο σκληρό εξ αιτίας της υπερκερατώσεως. Στα πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί ότι αναπτύσσονται εύκολα λοιμώξεις του αναπνευστικού, πιθανώς εξ αιτίας μεταβολών του βρογχικού επιθηλίου. Παρόμοια συσχέτιση δεν έχει αποδειχθεί για τον άνθρωπο.

Η έλλειψη σε βιταμίνη Α είναι ένας βασικός παράγοντας για τον σχηματισμό νεφρολιθιάσεων στα πειραματόζωα και στον άνθρωπο. Έχει αποδειχθεί ότι η ανεπάρκεια σε βιταμίνη Α οδηγεί σε μεταπλασία (δηλαδή μία προκαρκινική κατάσταση). <sup>(6, 32)</sup>

## ΥΠΕΡΒΟΛΙΚΗ ΛΗΨΗ

Μία μόνο δόση των 300.000 ως 1.000.000 I.U. Είναι δυνατόν να προκαλέσει άμεση τοξική απάντηση με τα ακόλουθα συμπτώματα : κεφαλαλγία (από αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης), κατακράτηση νερού (οίδημα οπτικής θηλής), ανορεξία, ναυτία που μπορεί να καταλήξει σε εμετούς, καθώς και απόπτωση βλεννογόνων, προβληματική όραση νευρική.

Αλλά συμπτώματα της οξείας δηλητηρίασης με βιταμίνη Α είναι : φλεγμονή στα ούλα, απώλεια του τριχώματος του κεφαλιού, ξηρότητα και απολέπιση του δέρματος με έντονο κνησμό, αίσθηση υπερκόπωσης, υπνηλία και απώλεια της ικανότητας προσανατολισμού. Μπορεί επίσης να παρατηρηθούν τριχοειδικές και εσωτερικές αιμορραγίες και ρινορραγίες (αιμορραγίες στη μύτη). Με εργαστηριακές εξετάσεις διαπιστώνεται αύξηση της βιταμίνης Α, των ενζύμων αλκαλική

φοσφατάση και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση και του ασβεστίου στο αίμα. Αλλά και η καθημερινή πρόσληψη 25.000 - 100.000 I.U. βιταμίνης A για μήνες μπορεί να προκαλέσει χρόνια τοξική επίδραση.

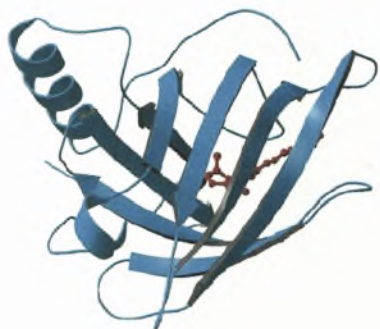
Η πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων βιταμίνης A προκαλεί ηπατομεγαλία, απώπωση των τριχών και περιοριστική πάχυνση των μακρών οστών. Ακόμη προκαλούν αύξηση της κρανιοεγκεφαλικής πίεσης με ναυτία, κεφαλαλγία, λήθαργο κ.α. Η υπερβιταμίνωση με βιταμίνη A είναι μια επικίνδυνη κατάσταση.

Η υπερβολική ποσότητα καροτίνης συχνά θεωρείται υπεύθυνη για κάποιον βαθμό κίτρινης απόχρωσης του δέρματος, η οποία εξαφανίζεται όταν η πρόσληψη μειώνεται. <sup>(6)</sup>

## ΟΙ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ

### RBP (retinol-binding protein) – Η δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης

Η RBP απομονώθηκε για πρώτη φορά από το ανθρώπινο πλάσμα το 1968. Αποτελείται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα περίπου 21kd. Στο πλάσμα, η RBP ενώνεται μη ομοιοπολικά με την προαλβουμίνη, που ονομάζεται και τρανσθυρετίνη (TTR).



Εικόνα 2.

Η 3γής δομή του συμπλόκου *holo*-RBP. Η δεσμευμένη ρετινόλη έχει κόκκινο χρώμα. <sup>(18)</sup>

Στο πλάσμα η τριτοταγής δομή της RBP παρουσιάζει διαμόρφωση β-βαρελιού, με οκτώ αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και μια α-έλικα, όπου ενσωματώνεται ένα μόριο ρετινόλης. Η ρετινόλη δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης με την υδροξυλική ομάδα της να προσανατολίζεται προς την πρωτεΐνη, ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα της κατευθύνεται στο εσωτερικό της διαμόρφωσης του β-βαρελιού. Ο ενδογενής προσδέτης είναι κυρίως η

*all-trans* ρετινόλη και σε μικρότερο βαθμό τα *cis* ισομερή της ρετινόλης και του ρετινοϊκού οξέος. Το cDNA της RBP του ανθρώπου έχει μέγεθος 600bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 199 αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένου ενός πεπτιδίου 16

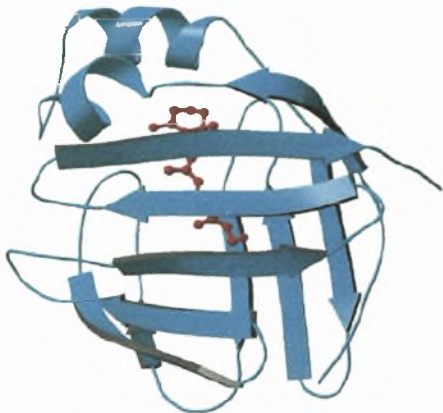
αμινοξέων. Το γονίδιο της RBP, αποτελείται από γενωμικό DNA 10kd και περιέχει έξι εξόνια και πέντε ιντρόνια. Κάθε εξόνιο κωδικοποιεί για μία δομική μονάδα της πρωτεΐνης.

Η TTR είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες 127 αμινοξέων η καθεμιά. Τα μονομερή διευθετούνται σε δύο β-πτυχωτά φύλλα με τετραπλή περιέλιξη. Δύο μονομερή σχηματίζουν ένα σταθερό διμερές, ενώ δύο διμερή σχηματίζουν ένα τετραμερές. Το τετραμερές της TTR διαθέτει μια περιοχή με διάμετρο 10 Å, η οποία περιέχει δύο θέσεις δέσμωσης για τη θυροξίνη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το ρετινοϊκό οξύ και άλλα μόρια όπως τα στεροειδή ή η πενικιλίνη, δεσμεύονται στην περιοχή της TTR με ευκολία. <sup>(4,18)</sup>



## ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ

### CRBP I (retinol binding protein type I) – Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης τύπου I



Εικόνα 3.

Η 3γής δομή της πρωτεΐνης CRBP I. Η δεσμευμένη ρετινόλη απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. <sup>(18)</sup>

Η CRBP I προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1973 και είναι μέλος μιας οικογένειας τουλάχιστον 11 πρωτεϊνών με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 14-15kd. Στην οικογένεια αυτή συμπεριλαμβάνονται τρεις ακόμη δεσμευτικές πρωτεΐνες των ρετινοειδών : η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης τύπου II (CRBP II) και δύο μορφές της κυτταρικής δεσμευτικής πρωτεΐνης του ρετινοϊκού οξέος (CRABP-I και CRABP II). Επιπλέον η οικογένεια περιλαμβάνει δύο μορφές δεσμευτικών πρωτεϊνών των λιπαρών οξέων. Καθεμιά από τις πρωτεΐνες της οικογένειας είναι το μοναδικό προϊόν ενός γονιδίου και έχει διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς.

Το βασικό μοτίβο διαμόρφωσης αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών έχει δομή φουρκέτας και αποτελείται από δύο ορθογώνιες περιοχές αντιπαράλληλων β-αλυσίδων, ενώ το μόριο του προσδέτη περικλείεται στο εσωτερικό της διαμόρφωσης. Ο κύριος ενδογενής προσδέτης για τη CRBP είναι η *all trans* ρετινόλη, η οποία σε αντίθεση με τη ρετινόλη που δεσμεύεται στην RBP, έχει την υδροξυλική ομάδα της τοποθετημένη στο εσωτερικό του σημείου πρόσδεσης, έτσι ώστε η ρετινόλη να είναι απομονωμένη στον πυρήνα. Η δομή των γονιδίων όλων των πρωτεϊνών της οικογένειας έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται από τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια.

Η CRBP είναι παρούσα σε διάφορους ιστούς, με υψηλότερο ποσοστό έκφρασης το ήπαρ, τους νεφρούς και την επιδιδυμίδα. Στο ήπαρ ενήλικων ποντικών η CRBP εκφράζεται τόσο στα παρεγχυματικά, όσο και στα αστεροειδή κύτταρα. Δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αν η έκφραση της CRBP ρυθμίζεται από τα ρετινοειδή. Όμως, παρατηρείται μικρή μείωση στη συγκέντρωση της CRBP στο ήπαρ ποντικών με ανεπάρκεια βιταμίνης A. Παρ' όλα αυτά, αύξηση των επιπέδων της ρετινόλης ή του ρετινοϊκού οξέος στην τροφή, δεν προκαλούν περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα CRBP. <sup>(1, 4, 18)</sup>

### CRBP II (cellular retinol binding protein type I) – Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης τύπου II

Η CRBP II απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1984. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε αφθονία στο λεπτό έντερο νεαρών και ενήλικων ποντικών, καθώς και στον άνθρωπο. Παρ' όλο που η CRBP I και η CRBP II έχουν παρόμοιο μέγεθος (134 αμινοξέα), είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων και η μεταξύ τους αμινοξική ομοιότητα είναι μόλις 56%. Η CRBP II δεσμεύει διάφορα μόρια με κύριο προσδέτη την *all trans* ρετινόλη. Η κρυσταλλική δομή της CRBP II δείχνει ότι η ρετινόλη περικλείεται στο εσωτερικό της διαμόρφωσης, όπως και στη CRBP I.

Η CRBP II δεσμεύει ακόμη *all-trans* ρετινάλη και *13-cis*-ρετινόλη, όχι όμως ρετινοϊκό οξύ ή ρετινυλικούς εστέρες. Η CRBP II εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κύτταρα της λάχνης του λεπτού εντέρου. Το γονίδιο για τη CRBP II αποτελείται από τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια και στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3. (1,4,18)

### **CRABP (cellular retinoic acid-binding protein) – Η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη του ρετινοϊκού οξέος**

Η CRABP απομονώθηκε για πρώτη φορά από το κυτταρόπλασμα εμβρύου κοτόπουλου. Μια δεύτερη πρωτεΐνη που ορίστηκε ως CRABP II απομονώθηκε από ποντίκια. Ο ενδογενής προσδέτης για την CRABP I είναι το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ. In vitro η CRABP έχει την ίδια συγγένεια πρόσδεσης για το *all-trans* και το 3,4-διδεϋδρορετινοϊκό οξύ, μα προσδένεται με μικρότερη συγγένεια στο *13-cis*-ρετινοϊκό οξύ, τη ρετινόλη, τη ρετινάλη και τους εστέρες του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος.

Οι πρωτεΐνες CRABPs έχουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς από τις CRBPs. Στα περισσότερα όργανα του ενήλικου ποντικού, όπως στους νεφρούς, το ήπαρ και το λεπτό έντερο, τα επίπεδα της CRABP είναι μειωμένα, ενώ στα μάτια και στα αναπαραγωγικά όργανα των νεογέννητων ποντικών, η συγκέντρωση της CRABP ισούται με αυτή της CRBP. Τα επίπεδα της βιταμίνης A έχουν μικρή επίδραση στην έκφραση της CRABP. Η CRABP II εκφράζεται σε πολυάριθμους ιστούς κατά την εμβρυογένεση, μα στα ενήλικα άτομα περιορίζεται στην επιδερμίδα.

Συμπληρωματικές μορφές κυτταρικών δεσμευτικών πρωτεϊνών των ρετινοειδών εντοπίζονται σε εξειδικευμένους αναπαραγωγικούς ιστούς. Σ' αυτές τις μορφές συμπεριλαμβάνονται δύο μεγαλύτερες πρωτεΐνες, η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινάλης CRALBP (cellular retinal-binding protein) και η ενδιάμεση δεσμευτική πρωτεΐνη των ρετινοειδών IRBP (interstitial retinoid-binding protein). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στη μεταφορά των ρετινοειδών εντός και ανάμεσα από τα κύτταρα των οπτικών ιστών. (1,4)

### **ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ**

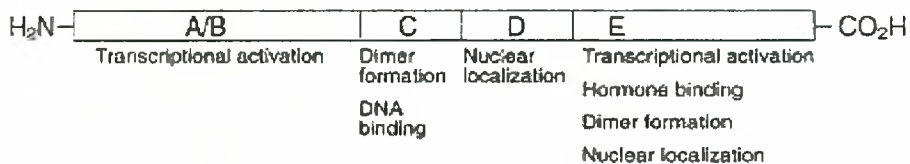
Ο πυρήνας των κυττάρων περιέχει έναν υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RAR), ο οποίος παρουσιάζει ισχυρή ομολογία με την οικογένεια των υποδοχέων της βιταμίνης D, καθώς και των στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών. Ο υποδοχέας RAR ενεργοποιείται μετά από πρόσδεση του ρετινοϊκού οξέος και κατόπιν προσδένεται σε συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες (τα ρυθμιστικά στοιχεία του ρετινοϊκού οξέος RAREs, retinoid acid response elements) στην περιοχή του προαγωγέα των γονιδίων στόχων. (1,4)

Η οικογένεια των RAR υποδοχέων περιλαμβάνει τους RAR-α, RAR-β και RAR-γ υποδοχείς. Επιπλέον έγινε η ταυτοποίηση των RXR υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης για το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ, μα συμβάλλουν στη ρύθμιση σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τους RAR υποδοχείς. Το *9-cis*-ρετινοϊκό οξύ αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή των RXRs. Εκτός από τους RARs, οι RXRs σχηματίζουν ετεροδιμερή και με άλλα μέλη της υπεροικογένειας των υποδοχέων όπως τους υποδοχείς της βιταμίνης D και της θυρεοειδούς ορμόνης. Συνεπώς οι RXRs συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. (4,9,33)

Οι RARs μοιράζονται τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά με άλλους υποδοχείς της υπερικογένειας των υποδοχέων. Διαθέτουν μια θέση πρόσδεσης για το DNA, το δάκτυλο ψευδαργύρου, μια περιοχή αρκετά συντηρημένη, καθώς και μια θέση πρόσδεσης του ligand, η οποία παρουσιάζει μικρότερη ομολογία μεταξύ των RAR-α, -β και -γ. Οι RXRs πρωτεΐνες έχουν παρόμοια οργάνωση με τις RARs και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους. Πάραυτα, η ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας με τις RARs είναι χαμηλή, κυρίως στην περιοχή δέσμευσης του ligand. Οι RARs έχουν μεγαλύτερη ομολογία με τους υποδοχείς των θυρεοειδών ορμονών από ό,τι οι RXRs. <sup>(9,33)</sup>

Τα ρυθμιστικά στοιχεία του ρετινοϊκού οξέος RARE ή RXRE εντοπίστηκαν στην περιοχή του προαγωγέα σε μεγάλο αριθμό γονιδίων. Τα RAREs αποτελούνται από επαναλήψεις συναινετικών αλληλουχιών AGGTCA, AGTTCA διευθετημένες σε παλινδρομική ακολουθία ή σε άμεσες επαναλήψεις και απομακρυσμένες μεταξύ τους από ένα αριθμό νουκλεοτιδίων. <sup>(9)</sup>

Πειράματα που διεξήχθησαν σε ιστούς φυσιολογικών ποντικών, απέδειξαν ότι οι RAR-α υποδοχείς εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς και κυρίως στον εντερικό σωλήνα. Το ήπαρ εκφράζει κυρίως τους RAR-α, η έκφραση των RAR-β αντιστοιχεί στο μισό των RAR-α, ενώ οι RAR-γ είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμοι. Οι RAR-γ υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στα αναπαραγωγικά όργανα και στους επιδερμικούς ιστούς. Περαιτέρω μελέτες όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων των RAR και RXR υποδοχέων, θα συμβάλλουν σημαντικά στην κατανόηση του διαμεσολαβούμενου από τα ρετινοειδή ελέγχου της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης.



**Εικόνα 4. Οι λειτουργικές περιοχές των υποδοχέων των ρετινοειδών <sup>(9)</sup> :**

**A/B:** Αμινοτελική περιοχή, στην οποία αποδίδεται η μεταγραφική δράση που εξαρτάται από την πρόσδεση του ligand.

**C:** Περιλαμβάνει τη DBD (DNA-binding domain) περιοχή πρόσδεσης συγκεκριμένων DNA αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στις αλληλουχίες του προαγωγέα των γονιδίων στόχων.

**D:** Η περιοχή αυτή είναι ο συνδετικός παράγοντας ανάμεσα στην DBD και LBD (ligand-binding domain) περιοχή, που επιτρέπει την αλλαγή διαμόρφωσης της DBD και της LDL περιοχής.

**E:** Το καρβοξυτελικό άκρο είναι μια διατηρημένη περιοχή που περιέχει τη θέση πρόσδεσης του προσδέτη LBD. Επιπλέον η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα, καθώς και για το διμερισμό των υποδοχέων. <sup>(21)</sup>

Απουσία του ligand, οι ρετινοϊκοί υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα. Τα ετεροδιμερή RAR/RXR δεσμεύονται σε συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες ή στα στοιχεία RAREs μέσω της DBD περιοχής τους. Τα περισσότερα γονίδια-στόχοι είναι σιωπηλά γονίδια των οποίων η χρωματίνη είναι ισχυρά πακεταρισμένη, εμποδίζοντας την έναρξη της μεταγραφής. Έτσι, τα RAREs των προαγωγέων των γονιδίων συνδέονται με πρωτεΐνες-συγκатаστολείς, που εμποδίζουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων. Για την ενεργοποίηση, λοιπόν, της μεταγραφής, οι ρετινοϊκοί υποδοχείς ανταγωνίζονται τις χρωματινικές περιοχές. Η



σύνδεση του προσδέτη επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση των υποδοχέων, με αποτέλεσμα την αποσύνδεση των συγκαταστολέων και τη συσσώρευση ενεργοποιητών. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν στην αποδιάταξη της χρωματίνης και τέλος στην εναπόθεση του μεταγραφικού μηχανισμού στην περιοχή του προαγωγέα. Οι συνεργοποιητές τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης μέσω της δράσης τους ως ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης (HAT: histone acetyltransferase), ακετυλιώνοντας το N-αμινοτελικό άκρο των ιστονών, αποδυναμώνοντας την αλληλεπίδραση του N-τελικού άκρου και πυρηνικού DNA. Άλλοι συνεργοποιητές δρουν ως μεθυλοτρανσφεράσες της ιστόνης (HMT: histone methyltransferase), μεθυλιώνοντας τα κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης, τροποποιώντας με τη σειρά τους την αλληλεπίδραση DNA-ιστονών. Ακόμη στην αποδιάταξη συμβάλλουν τροποποιητές τη χρωματίνης εξαρτώμενοι από το ATP, οι οποίοι χρησιμοποιώντας την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, εκτοπίζουν τα νουκλεοσώματα από την περιοχή του προαγωγέα, διευκολύνοντας έτσι την πρόσδεση σ' αυτόν του μεταγραφικού μηχανισμού. <sup>(18, 21)</sup>

Η μεταγραφική δραστηριότητα των ρετινοϊκών υποδοχέων ρυθμίζεται από ένα πρωτεολυτικό σύστημα εξαρτώμενο από την ουβικιτίνη. Ο κύριος ρόλος του συστήματος αυτού είναι η αποικοδόμηση των μεταγραφικών ενεργοποιητών. Αρχικά ουβικιτιώνεται η ομάδα της λυσίνης του RAR υποδοχέα και στη συνέχεια ακολουθεί υδρόλυση από πρωτεολυτικά ένζυμα. Έχει προταθεί ότι αυτή η δράση αποτελεί ένα μηχανισμό ρύθμισης της διάρκειας της μεταγραφής που διαμεσολαβείται από ρετινοϊκούς υποδοχείς. <sup>(21)</sup>

Οι RAR και RXR υποδοχείς φωσφορυλιώνονται στο N-τελικό άκρο της A/B περιοχής, η οποία παρουσιάζει δράση κινάσης εξαρτώμενης από την κυκλίνη. Αυτή η φωσφορυλίωση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αντίδραση των ρετινοϊκών υποδοχέων. Σε περίπτωση που δε λάβει χώρα η φωσφορυλίωση, η μεταγραφική δραστηριότητα είναι μειωμένη. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση διευκολύνει τη στρατολόγηση των παραγόντων του μεταγραφικού μηχανισμού πιθανόν μέσω της αποσύνδεσης του RAR υποδοχέα από τους μεταγραφικούς αναστολείς. <sup>(21)</sup>

## **ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α, ΗΠΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΩΝ ΧΥΛΟΜΙΚΡΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α ΣΤΟ ΗΠΑΡ**

Τα καροτένια των φρούτων και των λαχανικών, καθώς και οι ρετινυλικοί εστέρες ζωικής προέλευσης (κυρίως από το ήπαρ), χρησιμεύουν ως διαιτητικά πρόδρομα μόρια της ρετινόλης. <sup>(9)</sup>

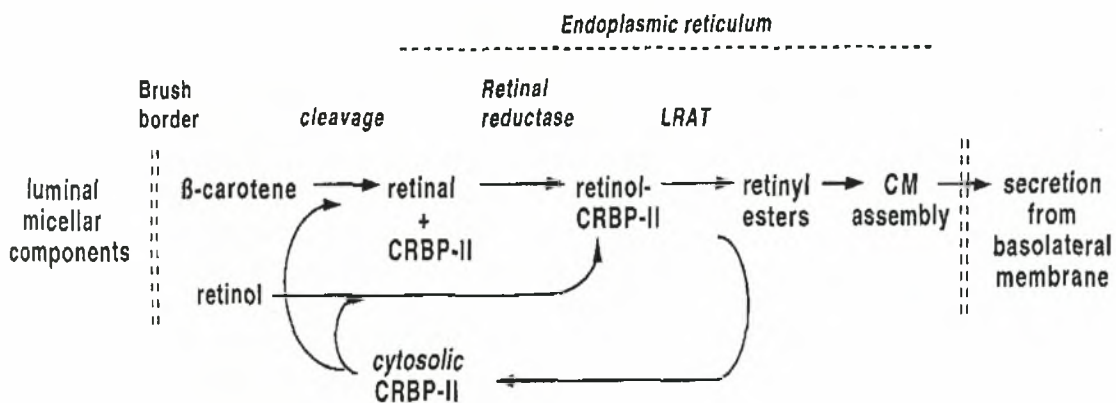
Τα β-καροτένια, τα α-καροτένια και η β-κρυπτοξανθίνη είναι αδιάλυτα σε υδατικά περιβάλλοντα, γι' αυτό πριν την απορρόφησή από τον εντερικό βλεννογόνο, προηγείται η γαλακτοματοποίησή τους με χολικά άλατα και λιπαρά οξέα στον εντερικό αυλό. Στη συνέχεια, ακολουθεί διάσπαση του μορίου τους για παραγωγή ρετινόλης. <sup>(4)</sup>

Η μετατροπή των β-καροτένιων σε βιταμίνη Α λαμβάνει χώρα κυρίως στον εντερικό βλεννογόνο και περιλαμβάνει τη διάσπαση των καροτένιων για την παραγωγή ρετινόλης. Τα καροτένια που συμμετέχουν στη διαδικασία μετατροπής πρέπει να διαθέτουν ένα β-ιονικό δακτύλιο που δεν έχει υποκατασταθεί. Στο μονοπάτι της μετατροπής του β-καροτένιου σε βιταμίνη Α εμπλέκονται δύο ένζυμα. Το ένζυμο καροτένιο-15,15'-διοξυγονάση (carotene-15-15'-dioxygenase) καταλύει τη διάσπαση του β-καροτένιου μεταξύ του 15 και 15'ατόμου άνθρακα, ώστε να

παραχθούν δύο μόρια ρετινάλης. Αν η διάσπαση γίνει τυχαία σε κάποιον άλλο δεσμό, τότε παράγονται ρετινοϊκό οξύ και ρετινάλη, καθώς και αρκετά ενδιάμεσα καροτένιων. (8,9)

Ένα μικρό ποσοστό της ρετινάλης οξειδώνεται σε ρετινοϊκό οξύ και συνδέεται με αλβουμίνη πριν τη μεταφορά του στη γενική κυκλοφορία. Το μεγαλύτερο τμήμα της παραγόμενης ρετινάλης ανάγεται σε ρετινόλη από το ένζυμο ρεδουκτάση της ρετινάλης. Το ένζυμο αυτό για να καταλύσει την αντίδραση απαιτεί την παρουσία της κυτταρικής δεσμευτικής πρωτεΐνης της ρετινόλης CRBP II (cellular retinol-binding protein). Η CRBP II κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη μεταφορά της ρετινάλης και της ρετινόλης διαμέσου του εντερικού βλεννογόνου. (4)

Μέσα στην εντερική κοιλότητα η ρετινόλη επανεστεροποιείται σε λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας (όπως παλμιτικούς εστέρες, στεατικό οξύ, ελαϊκό οξύ και λινολαϊκό οξύ). Τη διαδικασία καταλύει η ακυλοτρανσφεράση της ρετινάλης (λεκιθίνη) LRAT (lecithin: retinal acylotransferase). Οι νεοσυντιθέμενοι ρετινυλικοί εστέρες πακετάρονται στα χυλομικρά και εκκρίνονται στη λέμφο, από όπου περνούν στη γενική κυκλοφορία. Η LRAT για την αντίδραση της εστεροποίησης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το σύμπλοκο ρετινόλης - CRBP II. Μεταφέρει sn-1 λιπαρό οξύ από τη λεκιθίνη στη ρετινόλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή ρετινυλικού εστέρα και την απελευθέρωση της CRBP II πρωτεΐνης. Οι παραγόμενοι ρετινυλικοί εστέρες μαζί με τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια, τους εστέρες της χοληστερόλης και άλλα διαιτητικά λιπίδια, συνδέονται με την απολιποπρωτεΐνη Β (apoB) και ενσωματώνονται στα χυλομικρά για να ακολουθήσει η έκκρισή τους στο λεμφικό σύστημα. (4)



**Εικόνα 5. Ο εντερικός μεταβολισμός της βιταμίνης Α (1)**

Τα διατροφικά ρετινοειδή έχουν είτε τη μορφή προσχηματισμένων μορίων βιταμίνης Α (ρετινόλη, ρετινυλικοί εστέρες), είτε τη μορφή καροτένιων, πρόδρομων μορίων της βιταμίνης (β-καροτένιο, α-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη). Τα μόρια της προσχηματισμένης βιταμίνης εισέρχονται στον εντερικό βλεννογόνο και πακετάρονται απευθείας στα σχηματιζόμενα χυλομικρά, ενώ τα καροτένια διασπώνται από το ένζυμο καροτένιο-15,15'-διοξυγονάση για την παραγωγή δύο μορίων ρετινάλης. Κατόπιν η ρετινάλη μετατρέπεται ενζυματικά σε ρετινόλη μέσω της δράσης της εντερικής ρεδουκτάσης της ρετινάλης. Οι διατροφικοί ρετινυλικοί εστέρες δεν μπορούν να διαπεράσουν το φραγμό των ψυκτροειδών παρυφών και γι' αυτό πρώτα υδρολύονται σε ρετινόλη είτε μέσω της παγκρεατικής υδρολάσης των ρετινυλικών εστέρων, είτε μέσω υδρολάσης των ρετινυλικών εστέρων της ψυκτροειδούς παρυφής. Η ρετινόλη διέρχεται γρήγορα μέσα από την ψυκτροειδή παρυφή και δεσμεύεται με την εντερική δεσμευτική πρωτεΐνη CRBP II. Στη συνέχεια, η δεσμευμένη ρετινόλη εστεροποιείται προς το σχηματισμό ρετινυλικών εστέρων, μια διαδικασία που καταλύεται από τη

λεκιθίνη: ακυλοτρανσφεράση της ρετινόλης LRAT. Αυτοί οι ρετινυλικοί εστέρες μαζί με άλλα διατροφικά λιπίδια ενσωματώνονται στα χυλομικρά με ένα άγνωστο μηχανισμό και κατόπιν εισέρχονται στη γενική κυκλοφορία. Οι περισσότεροι από τους ρετινυλικούς εστέρες των χυλομικρών προσλαμβάνονται από το ήπαρ, με ένα μικρό ποσοστό απορροφάται από περιφερικούς ιστούς. <sup>(36)</sup>

Στη γενική κυκλοφορία ακολουθεί αλληλεπίδραση των χυλομικρών με τη λιποπρωτεϊνική λιπάση LPL (lipoprotein lipase) που εντοπίζεται στο ενδοθήλιο των αγγείων. Η LPL υδρολύει τα τριγλυκερίδια, με αποτέλεσμα την παραγωγή λιπαρών οξέων και μικρότερων λιποπρωτεϊνικών μορίων που καλούνται υπολείμματα των χυλομικρών. Τα λιπαρά οξέα προσλαμβάνονται από εξωηπατικούς ιστούς (μυϊκός, λιπώδης ιστός) για την παραγωγή ενέργειας, ενώ τα υπολείμματα των χυλομικρών συνδέονται με την απολιποπρωτεΐνη E (apoB) για την περαιτέρω πρόσληψή τους από τα ηπατοκύτταρα.

Τα κύτταρα του ήπατος διαθέτουν πολυάριθμους υποδοχείς που αναγνωρίζουν λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την apoB. Στους υποδοχείς αυτούς συγκαταλέγονται ο LDL υποδοχέας (LDL receptor-LDL-R) και LRP υποδοχέας (LDL receptor related protein-LRP). Στα ηπατοκύτταρα επιτελείται η υδρόλυση των ρετινυλικών εστέρων των υπολειμμάτων των χυλομικρών με τη δράση του ενζύμου υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων REH (retinyl ester hydrolase). Σε αντίθεση με το ένζυμο του εντέρου, αυτή η υδρολάση δεν απαιτεί την παρουσία χολικών αλάτων για την ενεργοποίησή της. Το προϊόν της υδρόλυσης είναι η ρετινόλη, η οποία προσδέεται στην πρωτεΐνη CRBP I. Η ρετινόλη εκκρίνεται από το ήπαρ με τη βοήθεια της RBP (retinol-binding protein), κυκλοφορεί στους περιφερικούς ιστούς ως σύμπλοκο holo-RBP και συνδέεται με την τρανσθυρετίνη TTR (holo-RBP-TTR) σε αναλογία 1:1 <sup>(9)</sup>. Το σύμπλοκο holo-RBP-TTR μεταφέρεται στους ιστούς στόχους, όπου και προσδέεται σε κυτταρικούς υποδοχείς, οπότε η ρετινόλη μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα του ιστού στόχου. <sup>(8)</sup> Εναλλακτικά, η ρετινόλη μπορεί να κατευθυνθεί στα αστεροειδή κύτταρα για να αποθηκευτεί με τη μορφή ρετινυλικών εστέρων. <sup>(1)</sup>

Το σύμπλοκο RBP-ρετινόλης μεταφέρεται στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της ρετινόλης επανεστεροποιείται, με την ταυτόχρονη απόθεση των ρετινυλικών εστέρων στα κυτταροπλασματικά λιπιδικά σταγονίδια. <sup>(9)</sup> Περίπου το 99% των ρετινοειδών που εντοπίζονται στα αστεροειδή κύτταρα, βρίσκονται με τη μορφή ρετινυλικών εστέρων ενσωματωμένων σε λιπιδικά σταγονίδια. Η λιπιδική σύνθεση των σταγονιδίων συνίσταται σε 42% ρετινυλικούς εστέρες, 28% τριγλυκερίδια, 13% χοληστερόλη και 4% φωσφολιπίδια. Το ποσοστό των ρετινυλικών εστέρων (42%) διαιρείται σε 70% παλμιτικούς εστέρες, 15% ρετινυλικούς εστέρες, 15% στεατικούς εστέρες, 8% ελαιικούς εστέρες, 4% λινελαϊκούς ρετινυλικούς εστέρες και από άλλους ρετινυλικούς εστέρες μακριάς αλυσίδας. <sup>(4)</sup>

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα προσλαμβάνουν τη ρετινόλη που βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος δεν είναι πλήρως κατανοητός. Σχεδόν όλη η ποσότητα της ρετινόλης στη γενική κυκλοφορία είναι προσδεδεμένη στο σύμπλοκο holo-RBP-TTR. Ενδεχομένως να υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων ειδικοί υποδοχείς για την πρωτεΐνη RBP, οι οποίοι ελέγχουν την ποσότητα της ρετινόλης που εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Προς το παρόν είναι γνωστός μόνο ένας υποδοχέας της RBP, ο p63 και εντοπίζεται στο επιθήλιο του αμφιβληστροειδή χιτώνα. <sup>(3)</sup>

Σύμφωνα με μια άλλη άποψη, η ρετινόλη αποδεσμεύεται ταχύτατα από το σύμπλοκο RBP-TTR, έτσι ώστε η ύπαρξη ενός RBP υποδοχέα να μην αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την πρόσληψη της ρετινόλης από το κύτταρο. Οι υποστηρικτές αυτής της άποψης προτείνουν ένα μηχανισμό πρόσληψης, ο οποίος



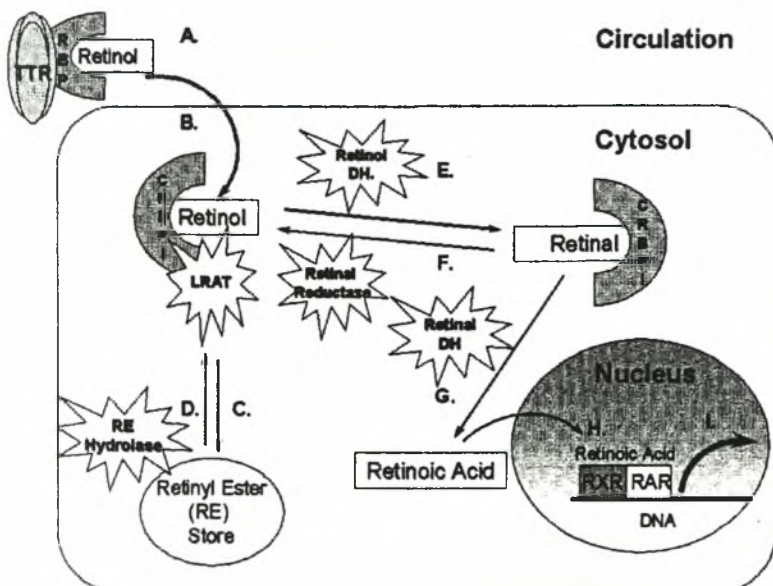
ρυθμίζεται από την ενδοκυτταρική πρωτεΐνη CRBP I. Ο μεταβολισμός ή η εστεροποίηση της ρετινόλης ή η σύνθεση CRBP I, επάγει τη διάχυση της ρετινόλης στο εσωτερικό των κυττάρων. Η ρετινόλη δεσμεύεται 3 με 5 φορές ταχύτερα στη CRBP I από ό,τι στην RBP. Η συγκέντρωση της RBP στο πλάσμα και της CRBP I στο κυτταρόπλασμα του ήπατος είναι ίδια (2-5μmol/L). Επιπλέον, η CRBP I μπορεί να δεσμεύσει όλη την ποσότητα της μη εστεροποιημένης ρετινόλης του κυτταροπλάσματος, η οποία μέσω διάχυσης εισέρχεται στα κύτταρα-στόχους. <sup>(1)</sup>

Σημαντικό ρόλο στην κατάλυση της οξείδωσης της ρετινόλης σε ρετινάλη, καθώς και για το σχηματισμό του ρετινοϊκού οξέος κατέχουν τα μέλη δύο ενζυμικών οικογενειών. Η πρώτη οικογένεια αποτελείται από το ένζυμο δεϋδρογονάση/ρεδουκτάση (SDR : short-chain dehydrogenase/reductase) και η δεύτερη οικογένεια αποτελείται από το ένζυμο αλκοολική δεϋδρογενάση (ADH : medium-chain alcoholdehydrogenase).

- Η οικογένεια SDR. Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 26 και 34kD και συνήθως βρίσκονται προσδεσμένοι σε περιοχές των κυτταρικών μεμβρανών. Οι SDRs καταλύουν κυρίως την οξείδωση της *all-trans*- ρετινόλης, καθώς και της *9/13-cis*-ρετινόλης. Μία ή περισσότερες SDRs εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς, όπως στο ήπαρ, στην επιδερμίδα, στα μάτια, στους όρχεις, στους νεφρούς και στους πνεύμονες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα ρετινοειδή ή/και έχουν αυξημένες απαιτήσεις για ρετινοϊκό οξύ.

Μερικές από τις SDRs χρησιμοποιούν τη ρετινόλη που είναι δεσμευμένη στην πρωτεΐνη CRBP I ως υπόστρωμα για το σχηματισμό ρετινοϊκού οξέος και απαιτούν NADP<sup>+</sup> για την δράση τους

- Η οικογένεια ADH. Η οξείδωση της ρετινόλης καταλύεται από πολυάριθμα μέλη της οικογένειας ADH. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες 40kD που αποτελούν τις αλκοολικές δεϋδρογονάσες. Διακρίνονται τρεις ισότυποι η ADH1, η ADH3 και η ADH4. Καθένας από αυτούς τους ισότυπους χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για το σχηματισμό ρετινάλης ελεύθερη ρετινόλη, αλλά όχι ρετινόλη δεσμευμένη στην CRBP I και απαιτούν NAD<sup>+</sup> για τη δράση τους. Επιπλέον, οι διάφοροι ισότυποι εκφράζονται σε εμβρυονικούς ιστούς που συνθέτουν και έχουν ανάγκη μεγάλες ποσότητες ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, έμμεσα τα μέλη της ADH οικογένειας συμμετέχουν στη σύνθεση ρετινοϊκού οξέος. <sup>(36)</sup>



Εικόνα 6.

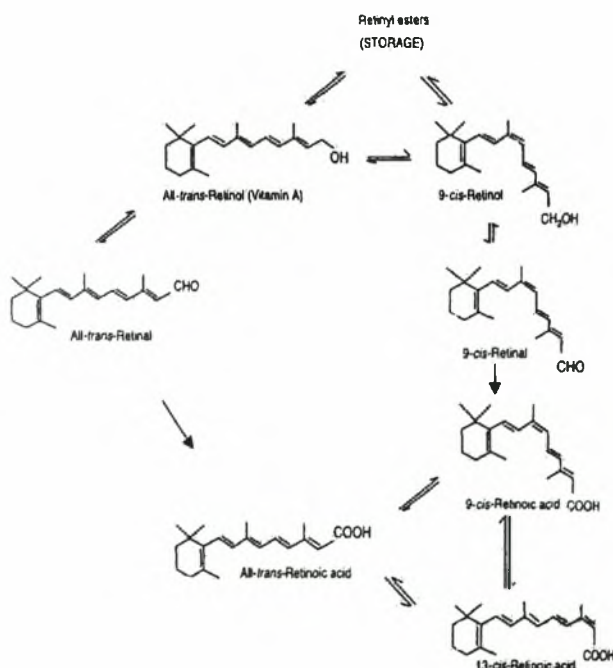
Η κυτταρική πρόσληψη και μεταφορά των ρετινοειδών. <sup>(36)</sup>

(A) Η ρετινόλη στο ήπαρ προσδέεται στην πρωτεΐνη RBP και αμέσως μετά την έκκρισή της στη γενική κυκλοφορία σχηματίζει σύμπλοκο με την τρανσθυρετίνη TTR (ρετινόλη- RBP-TTR). (B) Στη συνέχεια

η ρετινόλη εισέρχεται στα κύτταρα όπου και δεσμεύεται από τα μέλη της οικογένειας των κυτταρικών πρωτεϊνών που δεσμεύουν ρετινόλη. Η CRBP I εντοπίζεται στους περισσότερους ιστούς, ενώ οι άλλες τρεις CRBPs εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς. (C) Μετά τη πρόσληψη της ρετινόλης, μπορούν να ακολουθηθούν δύο διαδικασίες: 1) η ρετινόλη εστεροποιείται από τη λεκιθίνη LRAT και αποθηκεύεται με τη μορφή ρετινυλικών εστέρων (RE) στα λιπιδικά σταγονίδια που βρίσκονται στα κύτταρα. (D) Σε περίπτωση που τα κύτταρα χρειάζονται ρετινόλη μια υδρολάση των ρετινυλικών εστέρων, απελευθερώνει τη ρετινόλη από τους αποθηκευτικούς χώρους. 2) (E) Εναλλακτικά, η ρετινόλη υδρολύεται από μια από τις πολυάριθμες δεϋδρογονάσες της ρετινόλης (Retinol DH) και οξειδώνεται σε ρετινάλη. (F) Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή και η ρετινάλη μπορεί να μετατραπεί ξανά σε ρετινόλη μέσω της κυτταρικής ρεδοκτάσης της ρετινάλης. (G) Μετά το σχηματισμό της η ρετινάλη μπορεί να μετατραπεί μη αναστρέψιμα σε ρετινοϊκό οξύ από τη δεϋδρογονάση της ρετινάλης (Retinal DH). (H) Με τη σειρά του το ρετινοϊκό οξύ εισέρχεται στον πυρήνα, δεσμεύει και ενεργοποιεί έναν από τους πυρηνικούς υποδοχείς των ρετινοειδών, (H) ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων-στόχων.

## ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Αρχικά η *all-trans* ρετινόλη οξειδώνεται σε ρετινάλη μέσω της δράσης της δεϋδρογονάσης της ρετινόλης (ADHs) και των ενζύμων της οικογένειας των αλκοολικών δεϋδρογονασών μικρής αλυσίδας (SCAD). Οι ADHs αναλαμβάνουν την οξείδωση της αδέσμευτης ρετινόλης, ενώ οι SCAD καταλύουν την οξείδωση της ρετινόλης που σχηματίζει σύμπλοκο με τη CRBP I. Η ρετινάλη που παράγεται οξειδώνεται με τη σειρά της σε *all-trans* ρετινοϊκό οξύ. Η αντίδραση καταλύεται από τις αλδεϋδικές δεϋδρογονάσες του κυτταροπλάσματος. Η δράση αυτών των ενζύμων εξαρτάται από το  $NAD^+$  και εμπλέκονται στη μετατροπή της *all-trans* και *9-cis* ρετινάλης στα αντίστοιχα ρετινοϊκά οξέα. Στη συνέχεια το *all-trans* και *9-cis* ρετινοϊκό οξύ συνδέονται στους RAR υποδοχείς ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε περισσότερο πολικά μόρια όπως το 4-υδροξυ-RA, το 18-υδροξυ-RA, το 4-οξο-RA, το 5,6-εποξυ-RA. Στο μεταβολισμό του atRA συμμετέχουν ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (για το σχηματισμό των 4-OH-RA, το 18-OH-RA, το 4-οξο-RA) και Cyp26B1. Αυτοί οι μεταβολίτες ανιχνεύονται στους αναπαραγωγικούς ιστούς των θηλυκών ατόμων. (1, 14)



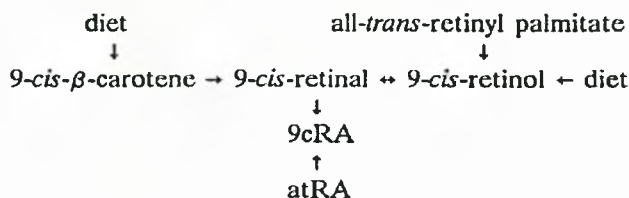
Εικόνα 7.

Το μεταβολικό μονοπάτι για τη σύνθεση του *all-trans*, *13-cis*, και *9-cis* ρετινοϊκού οξέος από την *all-trans* ρετινόλη. (4)

## ΠΙΘΑΝΕΣ ΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 9cRA

Το 9cRA πιθανότατα προέρχεται από την ενζυματική ισομερείωση του atRA. Τα προσχηματισμένα μόρια των 9-*cis*-ρετινοειδών αποτελούν και

αυτά υποστρώματα για τη βιοσύνθεση του 9cRA. Η 9-*cis*-ρετινόλη και το 9-*cis*-β-καροτένιο προσλαμβάνονται με τη διατροφή και μετά την αποθήκευσή τους στους ιστούς μετατρέπονται σε 9-*cis*-ρετινόλη. Το κυτταρόπλασμα διαθέτει δραστηριότητα δεϋδρογονάσης της 9-*cis*-ρετινόλης και μετατρέπει την *all-trans*- και την 9-*cis*-ρετινάλη στα αντίστοιχα ρετινοϊκά οξέα τους, όμως δεν επιδρά στη 13-*cis*-ρετινάλη. Ομοίως, οι RARs και οι E-RARB δεσμεύουν atRA και 9cRA με παρόμοια συγγένεια, μα δε συμβαίνει το ίδιο και με το 13cRA. Μια λειτουργία της δεϋδρογονάσης της 9-*cis*-ρετινάλης θα μπορούσε να είναι η μετατροπή της 9-*cis*-ρετινάλης, που παράγεται από τη διατροφική 9-*cis*-ρετινόλη και το διατροφικό 9-*cis*-β-καροτένιο, σε 9cRA. Με μια διαδικασία παράγεται 9-*cis*-ρετινόλη από τους *all-trans*-ρετινυλικούς εστέρες με τρόπο ανάλογο μ' αυτόν που μετατρέπει τους *all-trans*-ρετινυλικούς εστέρες σε 11-*cis*-ρετινόλη.



**Εικόνα 8.** Πιθανό μονοπάτι σύνθεσης του 9cRA <sup>(9)</sup>

*In vivo* το 9cRA υποβάλλεται σε ταχεία, μα αντιστρεπτή μετατροπή σε 9,13cRA, το οποίο έχει μικρότερη συγγένεια για τους RXR υποδοχείς από το 9cRA. Αυτός ίσως να είναι ένας μηχανισμός κάθαρσης του 9cRA, ώστε να διοχετευτεί στην κυκλοφορία μια λιγότερο τοξική μορφή του 9cRA για περαιτέρω χρήση. Η εκτεταμένη μετατροπή του 9cRA σε 9,13cRA *in vivo*, καθιστά δύσκολη την ποσοτικοποίηση του 9cRA με HPLC ανάλυση.<sup>(9)</sup>

## ΕΚΚΡΙΣΗ

Τα παράγωγα της βιταμίνης Α με άθικτη την καρβοξυλική αλυσίδα εκκρίνονται στα κόπρανα, ενώ τα προϊόντα της όξινης αλυσίδας εκκρίνονται στα ούρα. Στην κατάσταση δυναμικής ισορροπίας, το ποσοστό των μεταβολιτών που εκκρίνεται στα ούρα ισούται με αυτό που εκκρίνεται στα κόπρανα.

Μερικά από τα παράγωγα της βιταμίνης (κυρίως το ρετινοϊκό οξύ και κάποιο μέρος της ρετινόλης) επανεκκρίνονται στον εντερικό σωλήνα μέσω της χολής. Τα συστατικά της βιταμίνης Α που απαντώνται στη χολή είναι τα γλυκουρονίδια. Ένα σεβαστό ποσό των γλυκουρονιδίων επαναρροφάται δημιουργώντας μια εντεροηπατική κυκλοφορία των παραγώγων της βιταμίνης Α, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της βιταμίνης. Διάφορες μελέτες σχετικά με την κινητική της βιταμίνης αποδεικνύουν ότι τα μόρια της ρετινόλης διέρχονται πολλές φορές μεταξύ του εντέρου και των εξωηπατικών ιστών πριν την αποικοδόμησή τους.<sup>(11)</sup>



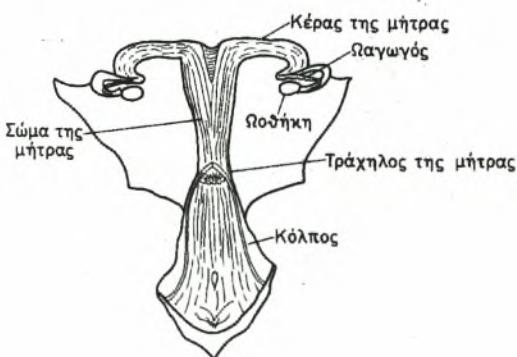
## ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει τις δύο ωοθήκες και την αντίστοιχη αναπαραγωγική οδό, δηλαδή τους δύο ωαγωγούς, τη μήτρα και τον κόλπο. Οι δομές αυτές ονομάζονται επίσης έσω γεννητικά όργανα θήλεος (**Εικόνα 9**). Οι θήλεις, σε αντίθεση με τους άρρενες, έχουν εντελώς ξεχωριστό το ουροποιητικό από το αναπαραγωγικό σύστημα.

Οι ωοθήκες είναι αμυγδαλοειδή όργανα στην άνω πυελική κοιλότητα καθένα από τα οποία κείται σε καθεμιά πλευρά της μήτρας. Το πέρας των ωαγωγών, οι οποίοι είναι επίσης γνωστοί ως σάλπιγγες ή φαλλοπιανοί πόροι, δεν εφάπτεται ακριβώς επάνω στις ωοθήκες, αλλά πλησιάζει αυτές ανοίγοντας το σχήμα τους εντός της κοιλιακής χώρας ως μια χοάνη, τον επονομαζόμενο κώδωνα, ο οποίος καταλήγει σε επιμήκεις μικροσκοπικές τριχοειδείς προεκβολές επικαλυμμένες από επιθήλιο (κροσσοί). Το άλλο πέρας των ωοθηκών εφάπτεται στη μήτρα και αδειάζει απευθείας



**Εικόνα 9.** Το αναπαραγωγικό σύστημα του θήλεος.<sup>(30)</sup>



**Εικόνα 10.** Απεικόνιση των γεννητικών οργάνων του προβάτου.<sup>(31)</sup>

στην κοιλότητά της. Η μήτρα είναι ένα κοιλώδες, μυϊκό όργανο με παχύ τοίχωμα το οποίο κείται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του ορθού εντέρου. Είναι η πηγή της αιμορραγίας κατά την εμμηνορρυσία και φιλοξενεί το έμβρυο κατά την εγκυμοσύνη. Το χαμηλότερο μέρος της μήτρας ονομάζεται τράχηλος. Ένα μικρό άνοιγμα ενώνει τον τράχηλο με τον κόλπο, ο οποίος είναι ένας πόρος που ξεκινάει από τη μήτρα και καταλήγει στο εξωτερικό περιβάλλον.<sup>(30)</sup>

## ΩΟΘΗΚΕΣ

Είναι δύο και βρίσκονται αριστερά και δεξιά της μήτρας μέσα στον ωοθηκικό βόθρο. Έχουν μέγεθος, στην ώριμη γυναίκα, αποπλατυσμένου αμυγδάλου. Το μήκος τους φτάνει τα 3-4 εκ. και το πάχος τους 1-3 μεταβαλλόμενο ανάλογα και με τη φάση του κύκλου της γυναίκας. Οι ωοθήκες είναι οι γεννητικοί αδένες της γυναίκας. Η θέση της ωοθήκης μεταβάλλεται κατά την κύηση ακολουθώντας τις μεταβολές της θέσης της μήτρας.<sup>(23)</sup>

## ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ

Η ωοθήκη αποτελείται από την έσω μυελώδη στιβάδα και την έξω φλοιώδη. Η τελευταία είναι η πιο σημαντική, διότι σ' αυτή βρίσκεται ο αδενικός ιστός και τα ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια εξέλιξης. Η φλοιώδης στιβάδα καλύπτεται εξωτερικά από μονόστιβο κυβοειδές βλαστικό επιθήλιο. Εσωτερικά ο συνδετικός ιστός και οι ελαστικές ίνες που έχουν στροβιλοειδή διάταξη, σχηματίζουν το ονομαζόμενο στρώμα της ωοθήκης. Ο συνδετικός ιστός, με άφθονο θεμέλιο ουσία, που παρεμβάλλεται μεταξύ βλαστικού επιθηλίου και στρώματος της ωοθήκης ονομάζεται ινώδης χιτώνας. η μυελώδης στιβάδα της ωοθήκης αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, ελαστικές λείες μυϊκές ίνες, μεγάλα αγγειακά και νευρικά στελέχη, καθώς και άφθονο λεμφικό δίκτυο. <sup>(23)</sup>

## ΔΙΑΠΛΑΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ (γοναδικό – gonadal – φύλο)

Η ωοθηκική διάπλαση είναι διαφορετική στις διάφορες χρονικές περιόδους της εμβρυϊκής και της μετεμβρυϊκής ζωής.

Οι γονάδες (ωοθήκες ή όρχεις) πρωτοεμφανίζονται στα δύο φύλα την 5<sup>η</sup> – 6<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής και μόνο προς το τέλος της 7<sup>ης</sup> εβδομάδας αρχίζει να αναγνωρίζεται όρχις στα αρρένα. Ακολούθως, αρχέγονοι γεννητικοί πόροι εξελίσσονται και διαμορφώνονται σε άρρενος ή θήλεος τύπου, αντίστοιχα με τη φύση των γεννητικών αδένων. <sup>(47)</sup>

## ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Κατά τη γέννηση, οι ωοθήκες ενός θήλεος περιέχουν περίπου 2 έως 4 εκατομμύρια ωάρια, χωρίς να προστίθενται καινούρια ωάρια στο υπόλοιπο της ζωής του. Έτσι, σε εντυπωσιακή αντίθεση με το άλλο φύλο, το νεογεννηθέν θήλυ φέρει έναν καθορισμένο αριθμό γαμετικών κυττάρων, ο οποίος ποτέ δε θα αλλάξει. Μόνο μερικά από αυτά, περίπου 400, προορίζονται για ωορρηξία. Όλα τα άλλα εκφυλίζονται σε κάποιο σημείο της ανάπτυξής τους και έτσι λίγα ή κανένα, παραμένουν στη θέση τους όταν η γυναίκα φτάσει περίπου στην ηλικία των 50 ετών.

Κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης στη μήτρα, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, ονομάζονται ωογόνια κατά αναλογία των σπερματοζωαρίων στους αρρένες, υπόκεινται σε πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις. Τρεις μήνες μετά ύστερα από την εμβρυονική σύλληψη, τα ωογόνια παύουν να διαιρούνται και από αυτό το σημείο και έπειτα δεν αναπαράγονται πια γαμετικά κύτταρα. Ωστόσο, στο έμβρυο, όλα τα ωογόνια αναπτύσσονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα, τα οποία ακολούθως υπόκεινται στην πρώτη μειωτική διαίρεση αντιγράφοντας το DNA τους. η διαίρεση αυτή όμως δεν ολοκληρώνεται εντός του εμβρύου. Συνεπώς, όλα τα ωάρια κατά τη στιγμή της γέννησης είναι πρωτογενή ωοκύτταρα περιέχοντα 46 χρωμοσώματα, καθένα από τα οποία φέρουν δύο αδελφές χρωματίδες. Σε αυτή την περίπτωση λέγεται ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε μειωτική παύση.

Η ανενεργός αυτή κατάσταση συνεχίζεται μέχρι την εφηβεία, όπου παρατηρείται έναρξη και ανανέωση δραστηριότητας στις ωοθήκες. Πράγματι, μόνο εκείνα τα πρωτογενή ωοκύτταρα τα οποία προορίζονται για ωορρηξία θα ολοκληρώσουν την προσπάθεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, η οποία επιτελείται μόλις προτού την ωορρηξία. Καθένα κύτταρο λαμβάνει 23 χρωμοσώματα, με 2

χρωματίδες το καθένα. Κατά αυτή τη διαίρεση, πάντως, ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, το δευτερογενές ωκύτταρο, διατηρεί στην κυριολεξία ολόκληρο το κυτταρόπλασμα. Το άλλο, ονομαζόμενο πρώτο πολικό σώμα, είναι πολύ μικρό και μη λειτουργικό. Έτσι, το πρωτογενές ωκύτταρο, το οποίο είναι ήδη τόσο μεγάλο όσο το ωάριο, θα μεταβιβάσει στο δευτερογενές ωκύτταρο τα μισά από τα χρωμοσώματά του, αλλά σχεδόν ολόκληρο το διατροφικά πλούσιο κυτταρόπλασμά του.

Η δεύτερη μειωτική διαίρεση επέρχεται στη μήτρα ύστερα από την ωορρηξία, αλλά μόνο εάν το ωκύτταρο γονιμοποιηθεί, εάν δηλαδή ένα σπέρμα έχει εισδύσει στο εσωτερικό του. Ως αποτέλεσμα αυτής της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, καθένα θυγατρικό κύτταρο λαμβάνει 23 χρωμοσώματα με μια χρωματίδη έκαστο. Για μια ακόμη φορά, ένα θυγατρικό κύτταρο, τώρα ονομαζόμενο ωάριο, κατακρατά σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα, ενώ το άλλο, ονομαζόμενο δεύτερο πολικό σώμα είναι πολύ μικρό και μη λειτουργικό. Το τελικό αποτέλεσμα της ωογένεσης είναι ότι καθένα πρωτογενές ωκύτταρο μπορεί να παράγει μόνο ένα ωάριο. Αντίθετα, κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο παράγει τέσσερα βιώσιμα σπερματοζώαρια.

Αφού το τελικό στάδιο της γαμετογένεσης, δηλαδή ο σχηματισμός ωαρίου, επιτελείται μόνο ύστερα από γονιμοποίηση και η γονιμοποίηση συμβαίνει έξω από την ωοθήκη (στους ωαγωγούς), οι ίδιες οι ωοθήκες, μιλώντας τεχνικά, δεν παράγουν πλήρως ώριμους γαμέτες, τα ωάρια, αλλά μόνο δευτερογενή ωκύτταρα.

## ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο είναι ο μοναδικός τύπος ωοθυλακίου που απαντάται στην εμβρυϊκή και την εν γένει προηβική ζωή. Αποτελείται από μία στιβάδα αποπλατυσμένων, ενδοθηλιόμορφων επιθηλιακών κυττάρων. Το επιθηλιακό τοίχωμα των ωοθυλακίων προέρχεται από το βλαστικό καλυπτικό επιθήλιο της ωοθήκης, περιβάλλει το αρχέγονο ωάριο και καλείται κοκκιώδης στιβάδα, ιδίως για τα πιο ώριμα ωοθυλάκια.

Μετέπειτα τα αρχέγονα ωάρια διατηρούνται μέχρι την εμμηνόπαυση διαρκώς ελαττούμενα μέχρι να εξαφανισθούν πλήρως. Ένας αριθμός από αυτά, σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο, εισέρχονται στην οδό της περαιτέρω ωρίμανσης και προκύπτουν κατά σειρά (όλα έχουν στην περιφέρειά τους διάφανη ζώνη) :

**Τα πρωτογενή (primary) ωοθυλάκια.** Είναι μεγαλύτερα από τα αρχέγονα, έχουν μωινόςτιβο κυβοκυλινδρικό ή πολύστιβο κοκκιώδες επιθήλιο (μέχρι 4 στιβάδες). Κοκκιώδης στιβάδα δύναται να προκύψει και χωρίς προσδιορισμένη ορμονική επίδραση.

**Τα δευτερογενή ωοθυλάκια.** Είναι ακόμη πιο μεγάλα, έχουν ακόμη πιο μεγάλο πολύστιβο κοκκιώδες επιθήλιο, το οποίο τελικά παρουσιάζει κεντρική σύντηξη και σχηματισμό της κοιλότητας (άντρου) του ωοθυλακίου, το οποίο πληρούται από ορώδες υγρό, περιλαμβάνεται σε προβολή “εξέδρα” του κοκκιώδους επιθηλίου προς το άντρο και αποκαλείται ωοφόρος δίσκος. Παράλληλα, το προς τα έξω του ωοθυλακίου συνδετικό υπόστρωμα διαμορφώνει ίδια στιβάδα που καλείται θήκη.

**Το τριτογενές ή γραφιανό (Γκραφιανό) ωοθυλάκιο.** Είναι το μεγαλύτερο, κυρίως το πιο ώριμο από τα ωοθυλάκια, κείται περιφερικότερα στην ωοθήκη, φιλοξενεί το ωριμότερο (και χρωμοσωμακά) ωάριο και τείνει προς ρήξη (ωοθυλακιωρρηξία).

Τελικά ρήγνυται και απελευθερώνει το προς γονιμοποίηση ωάριο. Η θήκη του ωοθυλακίου διακρίνεται σε έσω και έξω. Η τελευταία είναι κυτταροβριθής, πιο



ορμονοεξαρτώμενη και ορμονοπαραγωγός. Το απόλυτο ώριμο τριτογενές ωάριο του ανθρώπου είναι κυρίως μέγιστο των κυττάρων του σώματος, μόλις ορατό με γυμνό οφθαλμό και διαμέτρου 0,1 – 0,3 του χιλ. (100 – 300μm). Το μέγεθος του ωαρίου οφείλεται και στη σχετικά άφθονη λέκιθο που περιέχει. Σε σχέση προς τα σωματικά κύτταρα περιέχει πράγματι άφθονη λέκιθο, σε σχέση όμως προς τα ωάρια των ζώων, το ανθρώπινο ωάριο χαρακτηρίζεται ως ολιγολεκιθικό και πρακτικά αλεκιθικό. Γενικά, το ωάριο εμφανίζει ευμεγέθη ελαφροχρωματικό πυρήνα με ένα ή περισσότερα πυρήνια, δίκτυο Golgi, μιτοχόνδρια, κεντροσωμάτιο ως και κοκκία γλυκογόνου και λεκιθικού λίπους. Έξω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη και έξω από αυτή διακρίνεται ο ακτινωτός στέφανος, ο οποίος προέρχεται από τα κοκκιώδη επιθήλια του ωοφόρου δίσκου, μετά τη ρήξη του τριτογενούς ωοθυλακίου. Η διαφανής ζώνη αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες και συντίθεται από τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας και από το ωάριο. Το τελευταίο συνδέεται με τα κοκκιώδη κύτταρα με αποφυάδες, που φέρονται δια της διαφανούς ζώνης. Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας φέρονται σαν κύτταρα – θεραπεινίδες (nurse cells) και αναβιβάζονται σε 600 σε κάθε τριτογενές ωάριο.

Μετά την ωοθυλακιορρηξία του τριτογενούς ωοθυλακίου τούτο μεταβάλλεται σε **ωχρό σωμάτιο** και επί γόνιμου κύκλου υπερτρέφεται και μεταβάλλεται σε **ωχρό σωμάτιο εγκυμοσύνης**. Σε επόμενες φάσεις και τα δύο τείνουν να μεταβληθούν σε ουλώδες λευκό σωμάτιο.

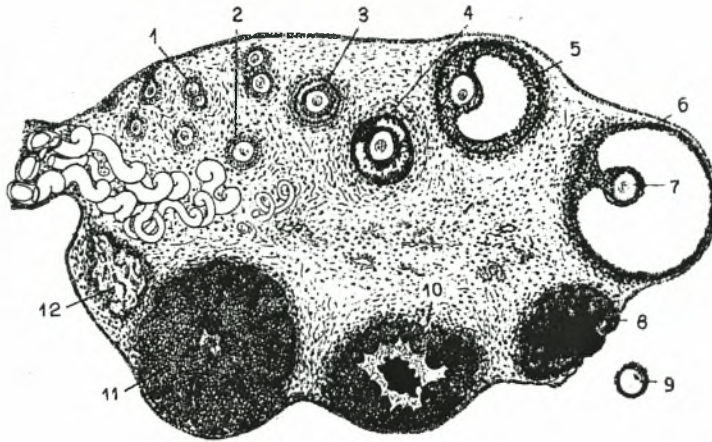
Τα μετά ήβη εκφυλιζόμενα ωοθυλάκια προσδιορίζονται συνοπτικά ως άτρητα ή άρρηκτα – κυστικά ενίοτε – ωοθυλάκια. <sup>(23)</sup>

## ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ- ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Στα κατοικίδια ζώα οι ωοθήκες παρουσιάζουν δύο διακριτές ζώνες (ουσίες): τη φλοιώδη και τη μυελώδη.

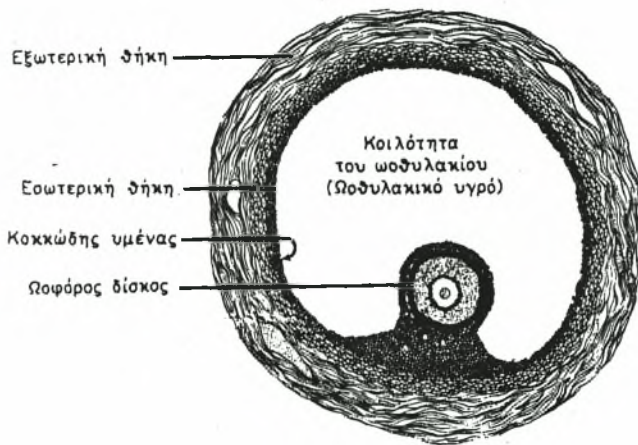
Τα ωοκύτταρα ( γεννητικά κύτταρα) αναπτύσσονται από τα κύτταρα της φλοιώδους ζώνης. Κάθε ωοκύτταρο 1<sup>ης</sup> τάξης περιβάλλεται από μία απλή στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. αυτό το σύνολο αποτελεί το αρχέγονο ωοθυλάκιο. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια βρίσκονται στην περιφέρεια της φλοιώδους ζώνης των ωοθηκών. Κατά τη γέννηση οι ωοθήκες περιέχουν μεγάλο αριθμό αρχέγονων ωοθυλακίων. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του ζώου μόνο ένας πολύ περιορισμένος αριθμός από τα αρχέγονα αυτά ωοθυλάκια θα αναπτυχθεί και θα ωριμάσει. Τα περισσότερα αρχέγονα ωοθυλάκια υποπλάσσονται (ατρησία των ωοθυλακίων). Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εξελίσσονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια, πολλά από τα οποία μπορούν να εξελιχθούν περαιτέρω σε δευτερογενή ωοθυλάκια και τελικά (ένας περιορισμένος αριθμός από αυτά) σε ώριμα ωοθυλάκια. Τα άλλα υποπλάσσονται.

Το ώριμο ωοθυλάκιο αποτελείται, από τα έξω προς τα μέσα, από τη θήκη (την εξωτερική θήκη και την εσωτερική θήκη), τον κοκκώδη υμένα και την κοιλότητα των ωοθυλακίων, η οποία περιέχει υγρό (υγρό του ωοθυλακίου, ωοθυλακικό υγρό). Ο κοκκώδης υμένας παρουσιάζει ένα έπαρμα, που προέχει στην κοιλότητα του ωοθυλακίου. Το έπαρμα αυτό ονομάζεται ωοφόρος δίσκος και περιέχει το ωάριο. <sup>(31)</sup>



**Εικόνα 11.**

Αναπαράσταση των σταδίων εξέλιξης από τα αρχέγονα στα ώριμα ωοθυλάκια, την ωοθυλακιορρηξία και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. 1. αρχέγονα ωοθυλάκια, 2. πρωτογενές ωοθυλάκιο, 3. δευτερογενές ωοθυλάκιο, 4. αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, 5. ωοθυλάκιο λίγο πριν την ωρίμανσή του, 6. ώριμο ωοθυλάκιο, 7. ωοφόρος δίσκος με το περιεχόμενο ωοκύτταρο, 8. ωοθυλάκιο μετά τη ρήξη του (γεμάτο από πήγματα αίματος), 9. ωοκύτταρο μετά την ελευθέρωσή του, 10. ωχρό σωματίο (στην αρχική του φάση), 11. ωχρό σωματίο πλήρως αναπτυγμένο, 12. λευκό σωματίο. <sup>(31)</sup>



**Εικόνα 12.**

Απεικόνιση ενός ώριμου ωοθυλακίου. <sup>(31)</sup>

## ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ

Κατ' αρχήν, το μέγεθος του ώριμου ωοθυλακίου (του Graaf) είναι γενετικά προκαθορισμένο και έχει φυσιολογική σημασία, γιατί ο όγκος της κοιλότητας του ωοθυλακίου επηρεάζει τη συγκέντρωση ορμονών και άλλων βιολογικά δραστικών ουσιών που περιέχονται στο ωοθυλακικό υγρό.

Γενικά, το ωοθυλακικό υγρό περιέχει ουσίες που προέρχονται από το πλάσμα του αίματος ή παράγονται και μεταβολίζονται στο ωοθυλάκιο. Μεταξύ αίματος-ωοθυλακίου υπάρχει ένας "φραγμός", που δεν είναι όμως σημαντικά περιοριστικός, όπως άλλωστε ισχύει και για όλους τους άλλους "φραγμούς" που λειτουργούν στον

οργανισμό. Η σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού μεταβάλλεται με την ανάπτυξη του ωοθυλακίου ή και πριν από την ωοθυλακιορρηξία.

Στο ωοθυλακικό υγρό περιέχονται οι περισσότερες τουλάχιστο πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος, σε βαθμό όμως που ποικίλλει στα διάφορα είδη ζώων και στον άνθρωπο. Σε ποικίλες, επίσης, συγκεντρώσεις, που εξαρτώνται από το είδος του ζώου, απαντούν στο ωοθυλακικό υγρό διάφοροι ηλεκτρολύτες ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ). Επιπλέον, στο ωοθυλακικό υγρό έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεγάλου αριθμού διαφόρων ενζύμων: ενδοπεπτιδάση, αμινοπεπτιδάση, διπεπτιδάση, όξινη φωσφατάση, αλκαλική φωσφατάση, πυροφωσφατάση, θρομβοπλασμίνη, καλλικρεΐνη, υαλουρονιδάση, κολλαγενάση, ενεργοποιός του πλασμινογόνου, πλασμίνη κ.ά. Επίσης, στο ωοθυλακικό υγρό απαντούν και διάφορες ορμόνες : FSH, LH, προλακτίνη, κορτιζόλη, οιστρογόνα, προγεστερόνη, τεστοστερόνη και ανδροστενεδιόνη, ανασταλτίνη, κατεχολαμίνες κ.ά. Τέλος, μπορεί να απαντούν και ουσίες που ρυπαίνουν το περιβάλλον, όπως είναι διάφορα εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, κ.ά.<sup>(31)</sup>

## ΩΧΡΟ ΣΩΜΑΤΙΟ

Από τη ρήξη του ωοθυλακίου (ωοθυλακιορρηξία) προκαλείται μια μικρή αιμορραγία (τοπικός σχηματισμός πήγματος αίματος). Τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα και της εσωτερικής θήκης πολλαπλασιάζονται και δημιουργείται, τελικά, ένας σχηματισμός, που ονομάζεται ωχρό σωματίο (corpus luteum). Το ωχρό σωματίο διαθέτει ένα πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων. Τα κύτταρα του ωχρού σωματίου παράγουν μια ορμόνη, που ονομάζεται προγεστερόνη. Ο σχηματισμός του ωχρού σωματίου και η παραγωγή της προγεστερόνης βρίσκονται υπό την επίδραση, κυρίως της LH. Εκτός από την προγεστερόνη, στο ωχρό σωματίο παράγονται και οιστρογόνα, καθώς και οι ορμόνες ρελαξίνη και ωκυτοκίνη.

Αν το ωάριο, μετά την ωοθυλακιορρηξία, γονιμοποιηθεί και επακολουθήσει κυοφορία, το ωχρό σωματίο διατηρείται στα περισσότερα είδη των ζώων μέχρι το τέλος, σχεδόν, της κυοφορίας, οπότε εκφυλίζεται (ωχρό σωματίο κυοφορίας). Αν το ωάριο δε γονιμοποιηθεί, το ωχρό σωματίο υποπλάσσεται, εκφυλίζεται (περιοδικό ωχρό σωματίο). Γενικά, μετά την εκφύλιση του ωχρού σωματίου σχηματίζεται επουλωτικός (συνδετικός) ιστός, το λευκό σωματίο και αυτό βαθμιαία σχεδόν εξαφανίζεται.<sup>(31)</sup>

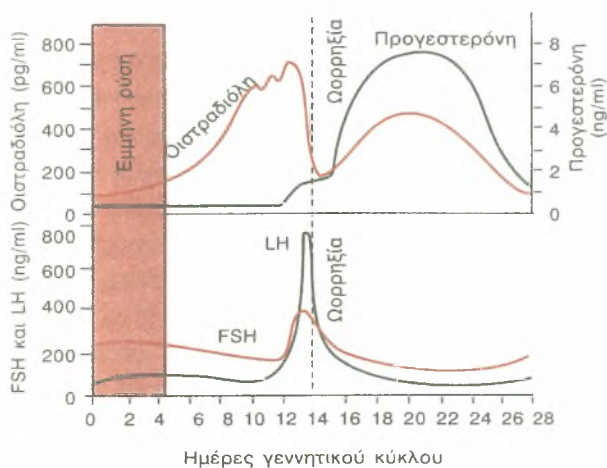
## ΤΟ ΟΡΜΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΑ

Το ορμονικό σύστημα στη γυναίκα αποτελείται από τρεις ιεραρχίες διαφορετικών ορμονών:

- Μια υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη, η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης (GnRH), η οποία ονομάζεται και εκκριτική ορμόνη για την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LHRH).
- Δύο ορμόνες του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH), που εκκρίνονται, και οι δύο, σε απάντηση προς την εκκριτική ορμόνη του υποθαλάμου.

- Οι ορμόνες της ωοθήκης, δηλαδή τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, οι οποίες εκκρίνονται από τις ωοθήκες σε απάντηση προς τις δύο ορμόνες του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.

Οι διάφορες αυτές ορμόνες δεν εκκρίνονται σε σταθερά ποσά κατά ολόκληρο το μηνιαίο γεννητικό κύκλο της γυναίκας, αλλά με δραστικά διάφορο ρυθμό κατά τα διάφορα τμήματα του μηνιαίου κύκλου. Στην **εικόνα 13** απεικονίζονται οι μεταβολές της συγκέντρωσης στο πλάσμα των γοναδοτροπινών του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης FSH και LH, καθώς και των ορμονών της ωοθήκης, οιστραδιόλης (οιστρογόνο) και προγεστερόνης.



**Εικόνα 13.**

Οι κατά προσέγγιση συγκεντρώσεις στο πλάσμα των γοναδοτροπινών και ωοθηκικών ορμονών κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου στη γυναίκα. <sup>(24)</sup>

Η GnRH από τον υποθάλαμο αυξάνεται και ελαττώνεται πολύ λιγότερο από τον εμμηνορυσιακό κύκλο και πιθανώς ελαφρά μόνο. Εκκρίνεται κατά βραχείες ώσεις ανά 1 ως 3 ώρες, όπως αυτό συμβαίνει και στον άνδρα κατά τη διάρκεια ενός μηνιαίου γεννητικού κύκλου. <sup>(24)</sup>

## ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ – Η ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ

Από τις ωοθήκες εκκρίνονται δύο είδη γεννητικών ορμονών, τα οιστρογόνα και οι προγεστίνες. Το σημαντικότερο οιστρογόνο είναι η οιστραδιόλη και η σημαντικότερη προγεστίνη η προγεστερόνη. Τα οιστρογόνα κυρίως προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση ειδικών κυττάρων του σώματος και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των περισσότερων από τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου στη γυναίκα. Εξάλλου, οι προγεστίνες αφορούν σχεδόν αποκλειστικά την τελική προετοιμασία της μήτρας για την κύηση και των μαστών για τη γαλουχία. <sup>(24)</sup>

## Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΑ

**Τα οιστρογόνα:** Στη φυσιολογική μη έγκυο γυναίκα, τα οιστρογόνα εκκρίνονται σε μεγάλα ποσά μόνο από τις ωοθήκες, αν και πολύ μικρά ποσά εκκρίνονται και από το φλοιό των επινεφριδίων. Κατά την εγκυμοσύνη, πολύ μεγάλα ποσά εκκρίνονται επίσης από τον πλακούντα.

Τρία είναι μόνο τα οιστρογόνα που βρίσκονται σε σημαντική ποσότητα στο πλάσμα του αίματος στη γυναίκα: η β-οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη. Το



κυριότερο οιστρογόνο που εκκρίνεται από τις ωοθήκες είναι η β-οιστραδιόλη. Επίσης εκκρίνονται μικρά ποσά οιστρώνης, το μεγαλύτερο όμως μέρος αυτής της ορμόνης σχηματίζεται σε περιφερικούς ιστούς από ανδρογόνα που εκκρίνονται από το φλοιό των επινεφριδίων, καθώς και από τα κύτταρα θήκης των ωοθηκών. Η οιστριόλη είναι ένα πολύ ασθενές προϊόν οξειδωσης του οιστρογόνου, που προέρχεται τόσο από την οιστραδιόλη, όσο και από την οιστρόνη, η δε σχετική μετατροπή επιτελείται κυρίως στο ήπαρ.

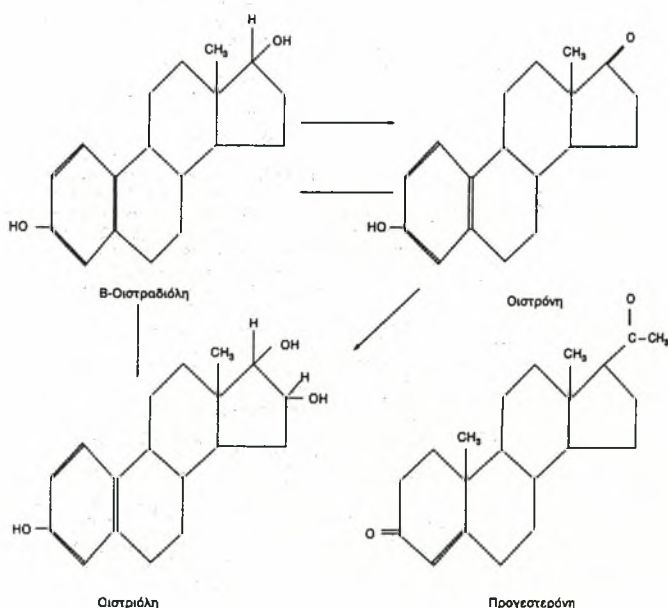
Η οιστρογονική δυναμικότητα της β-οιστραδιόλης είναι 12 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της οιστρώνης, και 80 φορές εκείνης της οιστριόλης. Από τα δεδομένα αυτά είναι προφανές ότι η ολική οιστρογονική επίδραση της β-οιστραδιόλης είναι συνήθως πολλαπλάσια εκείνης των άλλων δύο οιστρογόνων μαζί. Γι' αυτό το λόγο, η β-οιστραδιόλη θεωρείται ότι αποτελεί το μείζον οιστρογόνο, παρά το γεγονός ότι η οιστρογονική δραστηριότητα της οιστρώνης δεν μπορεί να θεωρείται αμελητέα.

**Οι προγεστίνες:** Η σημαντικότερη από τις προγεστίνες είναι η προγεστερόνη. Εντούτοις, μικρά ποσά από μια άλλη προγεστίνη, την 17-α-υδροξυπρογεστερόνη, εκκρίνονται παράλληλα με την προγεστερόνη, και έχει ουσιαστικά την ίδια επίδραση. Όμως για πρακτικούς σκοπούς, συνηθίζεται να θεωρείται η προγεστερόνη σαν η μοναδική σημαντική προγεστίνη.

Στη φυσιολογική μη έγκυο γυναίκα, η προγεστερόνη εκκρίνεται σε σημαντικά ποσά μόνο κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του ωοθηκικού κύκλου, όταν αυτή εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο. Ελάχιστα μόνο ποσά προγεστερόνης βρίσκονται στο πλάσμα κατά το πρώτο μισό του ωοθηκικού κύκλου, που εκκρίνονται κατά ίσα περίπου ποσά από τις ωοθήκες και το φλοιό των επινεφριδίων. Μολαταύτα, πολύ μεγάλα ποσά προγεστερόνης εκκρίνονται και από τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, και ιδιαίτερα μετά τον τέταρτο μήνα της κύησης. <sup>(24)</sup>

## ΣΥΝΘΕΣΗ, ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΗΞΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΓΕΣΤΙΝΩΝ

Από τους χημικούς τύπους των οιστρογόνων και προγεστινών της εικόνας 14 προκύπτει ότι όλες αυτές οι ουσίες είναι στεροειδή.



Εικόνα 14.

Οι χημικοί τύποι των κυριότερων γεννητικών ορμονών του θήλεος. <sup>(24)</sup>

Συντίθενται στις ωοθήκες κυρίως από χοληστερόλη που παραλαμβάνεται από το από το αίμα, αλλά και σε μικρότερο βαθμό και από ακέτυλο συνένζυμο A, πολλαπλά μόρια του οποίου είναι δυνατό να συνδέονται για να σχηματίζουν τον κατάλληλο δακτύλιο των στεροειδών.

Κατά τη σύνθεση, η προγεστερόνη και η ανδρική γεννητική ορμόνη τεστοστερόνη συντίθενται πρώτες. Στη συνέχεια, κατά την ωοθυλακική φάση του ωοθηκικού κύκλου, πριν αυτές οι ορμόνες εγκαταλείψουν τις ωοθήκες, όλη σχεδόν η τεστοστερόνη και μεγάλο μέρος από την προγεστερόνη μετατρέπονται σε οιστρογόνα από τα κοκκιώδη κύτταρα. Κατά την ωχρινική φάση του κύκλου, παράγεται πολύ περισσότερη προγεστερόνη από όση μπορεί να μετατρέπεται, και ακριβώς σ' αυτό οφείλεται η μεγάλη έκκριση της προγεστερόνης που παρατηρείται σ' αυτή τη φάση. Αλλά ακόμα και έτσι, το ποσό της τεστοστερόνης που αποδίδεται προς το αίμα στη γυναίκα από τις ωοθήκες είναι μόνο το 1/15 του ποσού αυτής της ορμόνης που εκκρίνεται προς το αίμα από τους όρχεις στον άνδρα.

Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη μεταφέρονται στο αίμα συνδεδεμένες κυρίως με λευκωματίνες του πλάσματος, καθώς και με ειδικές σφαιρίνες για τη δέσμευση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Εντούτοις, η σύνδεση αυτών των ορμονών με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι χαλαρή και γι' αυτό αποδίδονται εύκολα προς τους ιστούς, σε 30 λεπτά περίπου.

Στο ήπαρ τα οιστρογόνα υφίστανται σύζευξη για να σχηματίσουν γλυκουρονίδια και θεικές ενώσεις, και στη συνέχεια, το 1/5 περίπου από αυτές τις ενώσεις απεκκρίνονται με τη χολή, τα δε υπόλοιπα αποβάλλονται με τα ούρα. Επίσης, το ήπαρ μετατρέπει τα δραστικά οιστρογόνα οιστραδιόλη και οιστρόνη προς το σχεδόν αδρανές οιστρογόνο οιστριόλη. Κατά συνέπεια, σε περιπτώσεις ελαττωμένης ηπατικής λειτουργίας, η δραστηριότητα των οιστρογόνων στο σώμα αυξάνεται και σε μερικές περιπτώσεις προκαλείται υπεροιστρινισμός.

Σε λίγα λεπτά μετά την έκκριση, ολόκληρο σχεδόν το ποσό της προγεστερόνης διασπάται σε άλλα στεροειδή, τα οποία δεν εμφανίζουν δραστηριότητα προγεστερόνης. Και σ' αυτή την περίπτωση, όπως και για τα οιστρογόνα, το ήπαρ έχει ιδιαίτερη σημασία για τη μεταβολική αυτή διάσπαση.

Το κύριο προϊόν διάσπασης της προγεστερόνης είναι η πρεγνανεδιόλη. Ποσοστό 10% περίπου από την αρχική προγεστερόνη απεκκρίνεται με αυτή τη μορφή με τα ούρα. Γι' αυτό το λόγο, ο ρυθμός έκκρισης προγεστερόνης στο σώμα μπορεί να υπολογίζεται από το ρυθμό της αποβολής της πρεγνανεδιόλης με τα ούρα.<sup>(24)</sup>

## **Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΗΝΙΑΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΑ – Η ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΛΟΒΟΥ ΤΗΣ ΥΠΟΦΥΣΗΣ**

Ο υποθάλαμος εκκρίνει GnRH. Αυτή προκαλεί την έκκριση από την υπόφυση LH και FSH. Η έκκριση των περισσότερων ορμονών του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, ρυθμίζεται από εκλυτικές ορμόνες που εκκρίνονται από τον υποθάλαμο και στη συνέχεια μεταφέρονται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης με το πυλαίο σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης. Στην περίπτωση των γοναδοτροπινών, σημασία έχει μια τουλάχιστο εκλυτική ορμόνη, η ορμόνη για την έκκριση των γοναδοτροπινών GnRH. Η ορμόνη αυτή έχει ληφθεί σε καθαρή μορφή, είναι δεκαπεπτίδιο και έχει τον ακόλουθο χημικό τύπο : Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>



Έχει αποδειχθεί ότι η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο δεν είναι συνεχής, αλλά σφυγμική, κατά ώσεις, η καθεμιά από τις οποίες διαρκεί λίγα μόνο λεπτά και επαναλαμβάνονται κάθε 1 ως 3 ώρες.

Η κατά ώσεις έκκριση της GnRH συνεπάγεται και την κατά ώσεις έκκριση της LH. Σε μικρή έκταση, η έκκριση της FSH υφίσταται αυξομειώσεις εξαιτίας της σφυγμικής έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο, παρατηρείται όμως μια περισσότερο σημαντική μακροχρόνια επίδραση στην έκκριση της FSH, η οποία επιμένει για πολλές ώρες μάλλον παρά να μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό από τη μια σφυγμική έκκριση στην επόμενη.

Η νευρική δραστηριότητα με την οποία προκαλείται η σφυγμική έκκριση της GnRH παρατηρείται κατά κύριο λόγο στο μεσοβασικό τμήμα του υποθαλάμου και κυρίως στους τοξοειδείς πυρήνες της περιοχής αυτής. <sup>(24)</sup>

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι από τις ωοθηκικές εκκρινόμενες στεροειδείς ορμόνες, οιστρογόνα και προγεστερόνη επηρεάζουν την έκκριση της LHRH (εκλυτική ορμόνη της LH) με αρνητική ή θετική επίδραση στον υποθάλαμο (feedback ή μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης).

**Αρνητική επίδραση των οιστρογόνων:** Αύξηση των οιστρογόνων στο αίμα από ενδογενή παραγωγή ή εξωγενή χορήγηση ελαττώνει την έκκριση της LHRH και των υποφυσιακών γοναδοτροφινών. Μετά από ωοθηκεκτομία η επίδραση αυτή καταργείται και τότε παρατηρείται σημαντική αύξηση των γοναδοτροφινών στο αίμα.

**Αρνητική επίδραση προγεστερόνης:** Χορήγηση προγεστερόνης σε γυναίκες ελαττώνει την έκκριση των γοναδοτροφινών. Η αρνητική επίδραση της προγεστερόνης και της έκκρισης της LHRH πραγματοποιείται μόνο με ταυτόχρονη χορήγηση οιστρογόνων. Έτσι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η χορήγηση προγεστερόνης δεν ελαττώνει τις αυξημένες στο αίμα γοναδοτροφίνες.

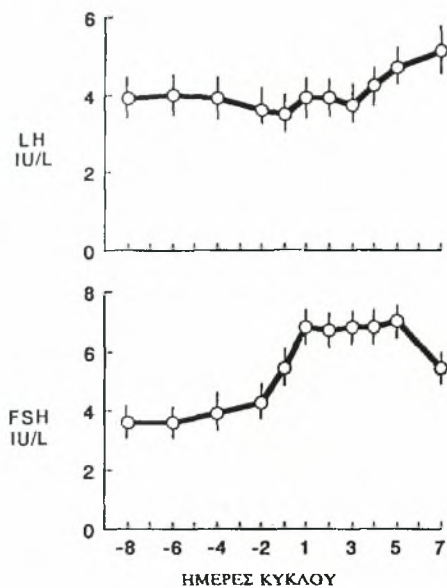
**Θετική επίδραση οιστρογόνων:** Χορήγηση οιστρογόνων σε γυναίκες σε δόσεις κατάλληλες να διατηρήσουν υψηλή στάθμη οιστρογόνων στο αίμα για τουλάχιστον 24-36 ώρες, συνοδεύεται από εκκριτική αιχμή της LH και λιγότερο της FSH. Η δράση αυτή πραγματοποιείται επειδή αυξάνεται η έκκριση της LHRH στον υποθάλαμο και ευαισθητοποιείται η υπόφυση στη LHRH.

**Θετική επίδραση προγεστερόνης:** Παρόμοια αύξηση των γοναδοτροφινών μετά από χορήγηση της προγεστερόνης παρατηρείται μόνο εφόσον έχει προηγηθεί ικανοποιητική δράση οιστρογόνων.

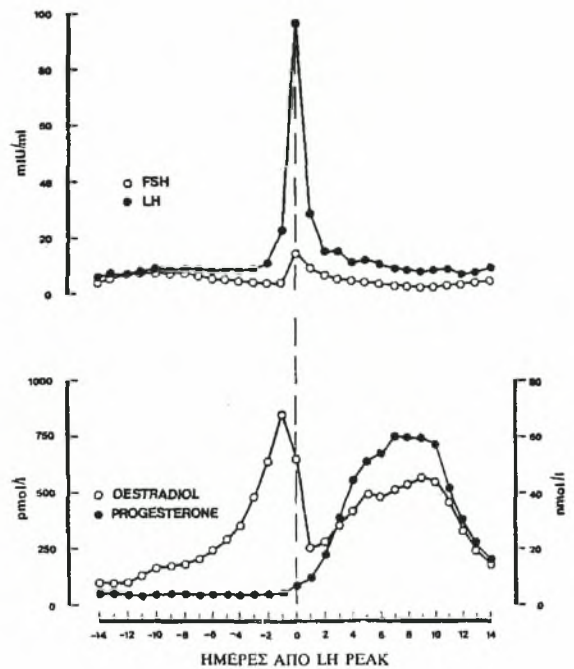
Εκτός από τα στεροειδή, οι ωοθήκες παράγουν και μη στεροειδείς ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες τουλάχιστον κάτω από πειραματικές συνθήκες επηρεάζουν την έκκριση των γοναδοτροφινών με αρνητική ή θετική επίδραση. Τέτοιες ουσίες είναι η ανασταλτίνη (inhibin), οι ακτιβίνες (activins), και η φολιστατίνη (folistatin), οι οποίες απομονώθηκαν πρόσφατα, καθώς και μια ακόμα ουσία που ονομάζεται gonadotropin surge attenuating factor (GnSAF). Η ανασταλτίνη και η φολιστατίνη ελαττώνουν εκλεκτικά τη βασική έκκριση της FSH, ενώ οι ακτιβίνες εμφανίζουν αντίθετη δράση, δηλ. διεγείρουν τη βασική έκκριση της FSH. Οι παραπάνω ουσίες ασκούν και παρακρινή δράση μέσα στις ωοθήκες και έτσι επηρεάζουν την ωρίμανση του ωοθυλακίου και την παραγωγή των στεροειδών ορμονών. Ο GnSAF δεν έχει ακόμη απομονωθεί και έχει σαν κύρια δράση τη ρύθμιση του εύρους της μεσοκύκλιας εκκριτικής αιχμής των γοναδοτροφινών με αρνητική επίδραση. <sup>(24)</sup>

## ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Χαρακτηρίζεται από κυκλικές μεταβολές στην έκκριση των γοναδοτροφινών και των ωθηκικών στεροειδών που οδηγούν στην περιοδική εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως. Η διάρκειά του είναι κατά μέσον όρο 28 ημέρες (23-35). Διαιρείται σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση πραγματοποιείται ωρίμανση του ωοθυλακίου (ωοθυλακική φάση), το οποίο ρήγνυται περί το μέσον του κύκλου (ωοθυλακιόρρηξια). Από το σημείο αυτό αρχίζει η δεύτερη φάση του κύκλου με τη μετατροπή του ραγέντος ωοθυλακίου σε ωχρό σωματίο ( ωχρινική φάση).



Εικόνα 15. (αριστερά)  
Διακυκλική αύξηση των τιμών της FSH και LH σε φυσιολογικές γυναίκες. (23)



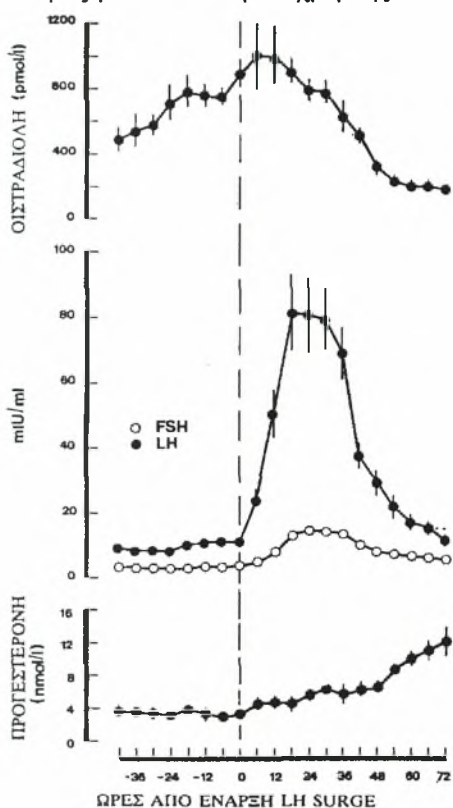
Εικόνα 16. (δεξιά)  
Διακυμάνσεις των τιμών FSH, LH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης στο αίμα γυναικών στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. (23)

Αν και οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τη εξέλιξη του αρχέγονου ωοθυλακίου σε πρωτογενές είναι άγνωστοι, τα τελικά στάδια εξέλιξης και ωρίμανσης του ωοθυλακίου εξαρτώνται από την επίδραση της FSH. (Εικόνες 15,16). Μικρή αλλά σημαντική αύξηση της FSH στο αίμα αρχίζει 2-3 μέρες προ της αναμενόμενης εμμήνου ρύσεως και συνεχίζεται τις πρώτες 5-6 ημέρες της πρώτης φάσης του επόμενου κύκλου (διακυκλική αύξηση). Με την έναρξη της εμμήνου ρύσεως, την αύξηση της FSH ακολουθεί μικρή αλλά σταθερή αύξηση της οιστραδιόλης στο αίμα. Η FSH στη συνέχεια μειώνεται και διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της πρώτης φάσης του κύκλου. Η διακυκλική αύξηση της FSH είναι υπεύθυνη για την επιλογή ενός μόνο ωοθυλακίου στο γεννητικό κύκλο, το οποίο θα επικρατήσει των άλλων και θα εξελιχθεί σε προωρρηκτικό.

Παρά τη χαμηλή στάθμη της FSH στο αίμα η έκκριση της οιστραδιόλης από το ωριμάζον ωοθυλάκιο συνεχίζεται, ώστε η στάθμη της στο αίμα να αυξάνει αρχικά βραδέως και στη συνέχεια γρηγορότερα φθάνοντας σε αιχμή (peak) δύο ημέρες περίπου πριν την ωοθυλακιόρρηξια. Η στάθμη της οιστραδιόλης ελαττώνεται στη συνέχεια απότομα. Η LH εμφανίζει μικρότερη αύξηση της FSH στο αίμα τις πρώτες

ημέρες του κύκλου και διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης.

Στο μέσον του κύκλου παρατηρείται το κύμα της LH ή εκκριτική αιχμή (LH surge), το οποίο θα προκαλέσει την ωχρινοποίηση και τη ρήξη του προωρρηκτικού ωοθυλακίου. Η διάρκεια της αιχμής αυτής είναι περίπου 48 ώρες και εμφανίζει αρχή, ανιόν σκέλος, κορυφή, κατιόν σκέλος και τέλος. Η αρχή της εμφανίζεται κατά λίγες ώρες μετά από την αιχμή της οιστραδιόλης (**Εικόνα 17**).



Η κορυφή του κύματος της LH εμφανίζεται συνήθως μία ημέρα μετά την αιχμή των οιστρογόνων. Σύγχρονη αλλά μικρότερου μεγέθους αιχμή με εκείνη της LH εμφανίζει και η FSH. Η ωοθυλακιόρρηξη λαμβάνει χώρα 36-48 ώρες μετά την έναρξη της εκκριτικής αιχμής των γοναδοτροφινών. Η έναρξη του κύματος των γοναδοτροφινών προκαλεί ωχρινοποίηση του ωοθυλακίου με αποτέλεσμα την παραγωγή προγεστερόνης και την προοδευτική αύξηση της στάθμης της στο αίμα πριν ακόμη να γίνει η ωοθυλακιορρηξία. Η στάθμη της προγεστερόνης συνεχίζει να αυξάνεται προοδευτικά στη διάρκεια της ωχρινικής φάσης φθάνοντας τη μέγιστη τιμή επτά περίπου ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία.

Η οιστραδιόλη της οποίας η στάθμη κατά την ωοθυλακιορρηξία βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, αυξάνει εκ νέου στη δεύτερη φάση του κύκλου παράλληλα με την προγεστερόνη, φθάνοντας επίσης σε νέα εκκριτική αιχμή επτά περίπου ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. Η δεύτερη αιχμή της οιστραδιόλης είναι μικρότερη εκείνης της πρώτης

**Εικόνα 17.**

Χαρακτηριστικά του μεσοκύκλιου τμήματος των LH και FSH (LH surge) σε σχέση με τις μεταβολές των τιμών της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο αίμα. <sup>(23)</sup>

φάσης του κύκλου. Στη συνέχεια η στάθμη της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης ελαττώνεται προοδευτικά στο αίμα μέχρι την εμφάνιση της εμμηνου ρύσεως, οπότε βρίσκεται στο κατώτερο σημείο της. Και οι δύο γοναδοτροφίνες μετά τη μεσοκύκλια εκκριτική αιχμή τους παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη δεύτερη φάση του κύκλου μέχρι τη νέα διακυκλική αύξηση της στάθμης της FSH. <sup>(23)</sup>

## ΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ

Ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν ότι η πτώση της στάθμης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στο αίμα κατά το τέλος της δεύτερης φάσης του κύκλου θεωρείται υπεύθυνη για τη διακυκλική αύξηση της FSH (άρση του αρνητικού feedback μηχανισμού). Η μείωση της FSH μετά το πρώτο ήμισυ της πρώτης φάσης του κύκλου αποδίδεται στην αρνητική επίδραση που ασκούν τα αυξανόμενα οιστρογόνα. Η συνεχής όμως περαιτέρω αύξηση της στάθμης της οιστραδιόλης, παρά τη μείωση της FSH, οφείλεται στην προκαλούμενη από τα οιστρογόνα αύξηση της ευαισθησίας του



ωοθυλακίου στην FSH και αυτή αύξηση των υποδοχέων της στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας και στην παρακρινή επίδραση ενδοωθηκικών παραγόντων. Έτσι τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν συνεχώς οιστρογόνα. Η παρατηρούμενη εκκριτική αιχμή των γοναδοτροφινών λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία οφείλεται στην προηγηθείσα αύξηση (αιχμή) των οιστρογόνων και είναι το αποτέλεσμα θετικής παλίνδρομης ρύθμισης.

Η εξήγηση του φαινομένου της θετικής παλίνδρομης ρύθμισης γίνεται με τη συνεργό δράση της LHRH και των οιστρογόνων. Έτσι, ενώ μικρά ποσά οιστρογόνων δρουν ανασταλτικά, η προοδευτική αύξηση της στάθμης τους, όπως στο δεύτερο ήμισυ της πρώτης φάσης του κύκλου, αυξάνει τις αποθήκες της υπόφυσης στις γοναδοτροφίνες και την ευαισθησία των γοναδοτρόπων κυττάρων στη LHRH. Τα παραπάνω οδηγούν σε μεγάλη έκκριση των γοναδοτροφινών. Η μικρή αύξηση της στάθμης της προγεστερόνης στο αίμα λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία πιθανολογείται ότι ενισχύει την προαναφερθείσα θετική δράση των οιστρογόνων (θετική επίδραση της προγεστερόνης). Εκτός από την αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη LHRH υπάρχουν ενδείξεις και για πραγματική αύξηση της έκκρισης της LHRH από τον υποθάλαμο στο μέσο του κύκλου. Η μετά τη μεσοκύκλια αιχμή, ελάττωση και διατήρηση των γοναδοτροφινών σε χαμηλά επίπεδα, κατά τη δεύτερη φάση του κύκλου, αποδίδεται στην αύξηση της στάθμης της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. <sup>(23)</sup>

## **Η ΑΝΘΡΩΠΕΙΑ ΧΟΡΙΟΝΙΚΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΗ (HCG) ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΩΧΡΟΥ ΣΩΜΑΤΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΣ**

Η έμμηνη ρύση φυσιολογικά εμφανίζεται 14 περίπου μέρες μετά την ωορρηξία, κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του ενδομητρίου της μήτρας αποπίπτει από το τοίχωμα και αποβάλλεται προς τα έξω. Εάν αυτό συμβεί μετά την εμφύτευση του ωαρίου, η κύηση τερματίζεται. Εντούτοις, αυτό αποτρέπεται, με την έκκριση της ανθρώπεια χοριονικής γοναδοτροπίνης, με τον ακόλουθο τρόπο.

Παράλληλα με την ανάπτυξη των κυττάρων της τροφοβλάστης από το γονιμοποιημένο ωάριο, η ορμόνη ανθρώπεια χοριονική γοναδοτροπίνη εκκρίνεται από τα συγκυτιακά κύτταρα της τροφοβλάστης, προς τα υγρά του σώματος της μητέρας. Η έκκριση αυτής της ορμόνης μπορεί να μετρηθεί στο αίμα 8 έως 9 μέρες μετά την ωορρηξία, νωρίς μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Στη συνέχεια, ο ρυθμός της έκκρισής της αυξάνεται ταχέως, για να φτάσει σε ένα μέγιστο 10 έως 12 εβδομάδες περίπου μετά την ωορρηξία και περιορίζεται σε πολύ χαμηλότερη τιμή από τη 16<sup>η</sup> ως την 20<sup>η</sup> εβδομάδα μετά την ωορρηξία. Η έκκριση αυτή συνεχίζεται σ' αυτό το επίπεδο για την υπόλοιπη διάρκεια της κύησης.

Η ανθρώπεια χοριονική γοναδοτροπίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος περίπου 39.000 και εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τη μοριακή δομή και λειτουργία της ωχρινοτρόπου ορμόνης, που εκκρίνεται από την υπόφυση. Η σημαντικότερη λειτουργία της συνίσταται στο γεγονός ότι εμποδίζει τη φυσιολογική υποστροφή του ωχρού σωματίου κατά το τέλος του μηνιαίου γεννητικού κύκλου στη γυναίκα. Εξάλλου, προκαλεί την έκκριση από το ωχρό σωματίο, σε ακόμα μεγαλύτερα ποσά των ορμονών του, δηλαδή προγεστερόνης και οιστρογόνων, για τους επόμενους λίγους μήνες. Οι γεννητικές αυτές ορμόνες εμποδίζουν την εμφάνιση έμμηνης ρύσης και προκαλούν τη συνέχιση της αύξησης του ενδομητρίου και την αποθήκευση μέσα σ' αυτό μεγάλου ποσού θρεπτικών ουσιών μάλλον παρά την αποβολή τους με την έμμηνη

ρύση. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα κύτταρα του φθαρού, που αναπτύσσονται στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου της γυναίκας μετατρέπονται σε πραγματικά, πολύ διογκωμένα και θρεπτικά φθαρογενή κύτταρα, νωρίς μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης.

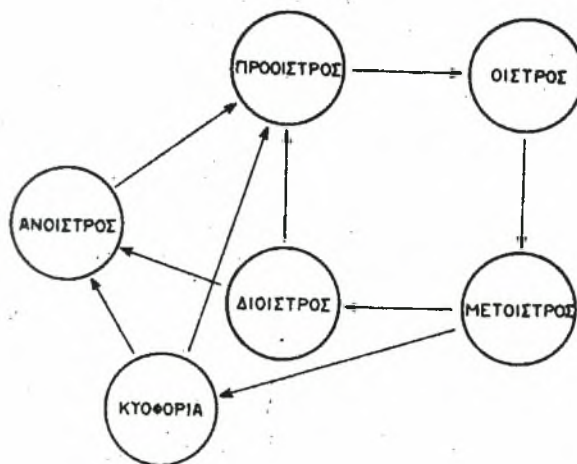
Υπό την επίδραση της ανθράπειας χοριονικής γοναδοτροπίνης, το ωχρό σωματίο αυξάνεται στο διπλάσιο περίπου από το αρχικό του μέγεθος σε ένα περίπου μήνα από την έναρξη της κύησης, και με την εξακολούθηση της έκκρισης οιστρογόνων και προγεστερόνης διατηρεί τη φθαροειδή φύση του ενδομητρίου της μήτρας, που είναι απαραίτητη για την αρχική ανάπτυξη του εμβρύου. Εάν το ωχρό σωματίο αφαιρεθεί πριν από την 7<sup>η</sup> περίπου εβδομάδα της κύησης, προκαλείται σχεδόν πάντοτε αυτόματη έκτρωση, σε μερικές περιπτώσεις ακόμη και ως τη 12<sup>η</sup> εβδομάδα. Μετά από αυτό το χρόνο, ο ίδιος ο πλακούντας εκκρίνει ικανά ποσά προγεστερόνης και οιστρογόνων για τη διατήρηση της κύησης για το υπόλοιπο της διάρκειάς της. Το ωχρό σωματίο υφίσταται βραδεία υποστροφή μετά τη 13<sup>η</sup> ως τη 17<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης.<sup>(22)</sup>

## ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Τα ενήλικα θηλυκά ζώα παρουσιάζουν οίστρο σε τακτά χρονικά διαστήματα, που εξαρτώνται από το είδος του ζώου. Το σύνολο των φυσιολογικών μεταβολών, που σε μια διαδοχική σειρά συμβαίνουν σε κάθε ένα από τα διαστήματα αυτά, είναι ο ωοθηκικός κύκλος (ovarian cycle) ή ο οιστρικός κύκλος (estrous cycle).

Ο ωοθηκικός κύκλος ελέγχεται από τον υποθάλαμο (απελευθερωτική ορμόνη των γοναδοτρόπων ορμονών), τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (γοναδοτρόπες ορμόνες), την ωοθήκη (ωοθηκικές ορμόνες), αλλά και από τη μήτρα (παραγωγή της PGF<sub>2a</sub>). Στην ωοθήκη ο αριθμός των υποδοχέων στις γοναδοτρόπες ορμόνες ποικίλλει σημαντικά στα διάφορα στάδια του ωοθηκικού κύκλου.

Σε κάθε ωοθηκικό κύκλο, που διαφέρει στα διάφορα είδη ζώων, διακρίνουμε τα εξής στάδια:



Εικόνα 18. (31)

Ο ωοθηκικός κύκλος στα κατοικίδια ζώα και οι περίοδοι του ανοίστρου και της κυφορίας.

### Πρόοιστρος (proestrus):

Υποπλάσσει το ωχρό σωματίο και μειώνεται συγκέντρωση της προγεστερόνης στο αίμα. Η FSH, κυρίως, και η LH (συνεργικά) διεγείρουν την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων. Η αυξανόμενη συγκέντρωση των

οιστρογόνων στο αίμα οδηγεί στο στάδιο του οίστρου.

Οίστρος (estrus): Είναι το στάδιο του οργασμού που προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση οιστρογόνων στο αίμα. Κατά το στάδιο αυτό προκαλείται η ωοθυλακιόρρηξια στα περισσότερα είδη των ζώων. Η ωοθυλακιόρρηξια οφείλεται στην επίδραση, κυρίως της LH και συνεργικά της FSH. Στο τέλος του σταδίου αυτού

η συγκέντρωση των οιστρογόνων και της LH στο αίμα μειώνεται. Αρχίζει η ανάπτυξη του ωχρού σωματίου.

Μέτοιστρος (metestrus): Αναπτύσσεται το ωχρό σωματίο και αρχίζει η παραγωγή της προγεστερόνης, που μειώνει την έκκριση FSH και, κατά συνέπεια, την ανάπτυξη νέων ωοθυλακίων.

Δίοιστρος (diestrus): Το ωχρό σωματίο βρίσκεται σε πλήρη ανάπτυξη και κυριαρχεί η επίδραση της προγεστερόνης στο γεννητικό σωλήνα. Στο τέλος του σταδίου αυτού αρχίζει η υποπλασία του ωχρού σωματίου, η παραγωγή προγεστερόνης μειώνεται, η έκκριση της FSH αυξάνεται και ετοιμάζεται η έναρξη ενός νέου ωοθυλακικού κύκλου.

Οι φάσεις αυτές του ωοθηκικού κύκλου συνοδεύονται και από μεταβολές (βιοχημικές, ιστολογικές) στο γεννητικό σωλήνα, που οφείλονται στην επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης.

Τα πρόβατα είναι πολυοιστρικά ζώα, αλλά η γεννητική τους δραστηριότητα είναι εποχική (εποχικά πολυοιστρικά ζώα), σε συνθήκες όμως εντατικής εκτροφής, η εποχικότητα μειώνεται ή και αυξάνεται. Η διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου είναι 16-17 ημέρες. Ο οίστρος διαρκεί 24-36 ώρες. Η ωοθυλακιόρρηξια συμβαίνει προς το τέλος του οίστρου.

Σε ζώα με εποχική εκδήλωση ωοθηκικών κύκλων η περίοδος κατά την οποία οι κύκλοι αναστέλλονται ονομάζεται *άνοιστρος (anestrus)*.<sup>(31)</sup>



## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

- **Βιταμίνη Α και γονιμοποίηση :**

Η βιταμίνη Α διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αναπαραγωγή της γυναίκας και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα πολλών ερευνών υποστηρίζουν ότι ο κύριος μεταβολίτης της βιταμίνης Α που εμπλέκεται στις παραπάνω διαδικασίες είναι το *all-trans* (atRA) ρετινοϊκό οξύ. Οι ερευνητές κατέληξαν σ' αυτό το συμπέρασμα μετά τη διαπίστωση ότι τα περισσότερα προβλήματα που προέκυπταν από την έλλειψη της βιταμίνης Α αναιρούνται μετά τη χορήγηση *all-trans* ρετινοϊκού οξέος.

Ο κύριος στόχος του μέλλοντος είναι η διαλεύκανση των μονοπατιών που εξαρτώνται από το atRA, τα οποία διαταράσσονται σε περιπτώσεις έλλειψης της βιταμίνης, προκαλώντας στα ζώα φαινοτύπους VAD (vitamin A deficient).

Η σοβαρότητα της έλλειψης της βιταμίνης καθορίζει την επίτευξη της αναπαραγωγής. Όταν η έλλειψη της βιταμίνης προϋπάρχει του ζευγαρώματος των ζώων, τα κερατινοποιημένα κύτταρα είναι παρόντα στον κόλπο και δεν επιτυγχάνεται η εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Μια μικρή σχετικά έλλειψη βιταμίνης Α επιτρέπει μεν τη γονιμοποίηση και την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, μα αυτή ακολουθείται από θάνατο του εμβρύου σε μεταγενέστερο χρόνο. Όταν η έλλειψη της βιταμίνης Α έχει ως αποτέλεσμα την κερατινοποίηση του επιθηλίου του κόλπου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τότε η εγκυμοσύνη τερματίζεται. Αν όμως η κερατινοποίηση των κυττάρων δεν εμφανιστεί μέχρι το μέσο της εγκυμοσύνης, η κύηση δεν τερματίζεται, μα παρατείνεται ως την 23<sup>η</sup> ημέρα, οπότε και διαπιστώνεται ο θάνατος του εμβρύου. Τα παραπάνω αποτελέσματα που προέκυψαν από διάφορες μελέτες αποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει ο βαθμός της έλλειψης της βιταμίνης κατά τη γονιμοποίηση.

Τα ρετινοειδή είναι παρόντα στον αναπαραγωγικό αγωγό του θήλεος και στα θηλυκά ποντίκια η παραγωγή atRA από τη μήτρα και τις ωοθήκες ελέγχεται ορμονικά. mRNAs που κωδικοποιούν ένα πλήθος ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή της ρετιναλδεΐδης από τη ρετινόλη εντοπίζονται τόσο στις ωοθήκες (ADH 1,3 και 4), όσο και στη μήτρα (ADH 1 και 3). Τα δύο ένζυμα RALDH1 και RALDH2, τα οποία καταλύουν την οξείδωση της ρετιναλδεΐδης σε atRA, εκφράζονται στη μήτρα και τις ωοθήκες. Η παρουσία αυτών των ενζύμων στις ωοθήκες εξηγεί γιατί σε περιπτώσεις έλλειψης της βιταμίνης Α τα ωάρια στους ωαγωγούς αποσυντίθενται. Στη μήτρα το mRNA αυτών των ενζύμων εντοπίζεται στο αδενικό επιθήλιο και στα στρωματικά κύτταρα, ενώ η έκφρασή τους ελέγχεται ορμονικά.

Το ρετινοϊκό οξύ δρα μέσω της πρόσδεσής του στους πυρηνικούς υποδοχείς που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Η *all-trans* και η *9-cis* μορφή του ρετινοϊκού οξέος προσδένεται στην οικογένεια των RAR υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος. Παρ' όλα αυτά in vivo έχει αποδειχθεί πως μόνο το atRA ρετινοϊκό οξύ είναι ικανό να ενεργοποιήσει αυτή τη λειτουργία, ενώ η ύπαρξη του *9-cis* αμφισβητείται. Υπάρχουν τρεις υπότυποι των RAR υποδοχέων (α, β και γ). Οι RAR σχηματίζουν ετεροδιμερή με μια δεύτερη πυρηνική πρωτεΐνη, τον X υποδοχέα των ρετινοειδών (RXR) και το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες (στοιχεία RARE) στην περιοχή του προαγωγέα των γονιδίων στόχων. Η σύνδεση του προσδέτη με τον RAR υποδοχέα είναι απαραίτητη για την

ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων, ενώ η σημασία της πρόσδεσης στον RXR υποδοχέα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Είναι γνωστές δύο ισομορφές των κυτταροπλασματικών δεσμευτικών πρωτεϊνών των ρετινοϊκών οξέων (CRABP I και CRABP II). Στη δράση τους συμπεριλαμβάνεται η προστασία του atRA από την οξειδωση, τη διαλυτοποίηση του προσδέτη, τη ρύθμιση του μεταβολισμού του atRA, καθώς και τον έλεγχο της πρόσβασης του atRA σε κυτταρικά διαμερίσματα όπως ο πυρήνας. Παρ' όλα αυτά η δράση αυτών των δύο πρωτεϊνών δεν είναι ουσιώδης για τη συμβολή της βιταμίνης A στην αναπαραγωγή. <sup>(14)</sup>

Τα πιο άφθονα ρετινοειδή που ανιχνεύονται στον ορό είναι το *all-trans*, *4-oxo* και *13-cis* ρετινοϊκό οξύ. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα ρετινοειδή εμπλέκονται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη πιθανότατα περιλαμβάνει τους πυρηνικούς υποδοχείς των ρετινοειδών, οι οποίοι δεσμεύουν το *all-trans* και *9-cis* ρετινοϊκό οξύ ή και τα δύο οξέα. Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί ή καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων που ανταποκρίνονται στο ρετινοϊκό οξύ. Η υπερβολική λήψη, καθώς και η έλλειψη της βιταμίνης A οδηγούν σε ανωμαλίες του εμβρύου. Υπερβολική λήψη βιταμίνης A ενδεχομένως να εμπλέκεται στα μονοπάτια σηματοδότησης μέσω των ρετινοειδών και πιθανότατα οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των υποδοχέων τους. Αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν ότι το *13-cis* ρετινοϊκό οξύ εμπλέκεται στην τερατογένεση, μάλλον μέσω της ισομερείωσής του σε *all-trans* ρετινοϊκό οξύ. Υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την ευαισθησία των διάφορων ειδών στην τερατογένεση, που μάλλον οφείλονται σε διαφορές στα μονοπάτια της αποτοξίνωσης και στη μεταφορά των ρετινοειδών μέσω του πλακούντα. Σε είδη με μειωμένη ευαισθησία όπως τα ποντίκια, η μεταφορά του *13-cis* ρετινοϊκού οξέος είναι χαμηλή, ενώ σε ευαίσθητα είδη όπως οι πίθηκοι υψηλή. Στοιχεία σχετικά με τους ανθρώπους δεν υπάρχουν.

- **Ρετινοϊκό οξύ (RA) και εγκυμοσύνη:**

Αναλύσεις που έγιναν σε έγκυες γυναίκες τριών μηνών, καθώς και σε επίτοκες γυναίκες, έδειξαν πως οι δύο αυτές ομάδες γυναικών παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα ρετινόλης από την ομάδα των μη εγκύων γυναικών. Η ρετινόλη στον ορό των εγκύων και των επίτοκων ήταν χαμηλότερη από αυτή των μη εγκύων. Αυτή η μείωση μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στην ομοιόσταση της ρετινόλης στον ορό ή στην αύξηση στο ρυθμό οξειδωσης της ρετινόλης προς atRA κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Το atRA είναι το μόνο ρετινοειδές που φαίνεται να αυξάνει στον 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> μήνα της εγκυμοσύνης, αγγίζοντας ένα ποσοστό που διατηρεί τους υπόλοιπους μήνες της εγκυμοσύνης. Μια πιθανή ερμηνεία γι' αυτήν την εκλεκτική αύξηση του atRA μπορεί να αποτελεί η προσπάθεια του οργανισμού να ανταποκριθεί στις συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες του εμβρύου για αυτό το βιολογικό συστατικό, με αποτέλεσμα την αύξηση της βαθμίδωσης του atRA κατά μήκος του πλακουντιακού φραγμού.

Τα ρετινοειδή εκδηλώνουν σε όλα σχεδόν τα είδη τερατογόνο δράση σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό. Πιθανότατα η δράση αυτή να προκαλείται από το atRA, αν και το ίδιο αποτέλεσμα επιφέρουν και οι μεταβολίτες 13cRA και 4-oxo ρετινοϊκό οξύ. Ο ακριβής ρόλος των διάφορων ισομερών είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, γιατί το atRA ισομερειώνεται σε 13cRA και η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή. <sup>(14,26)</sup>

- **β-καροτένιο και παραγωγή προγεστερόνης:**

Έχουν διεξαχθεί έρευνες για τυχόν συσχέτιση μεταξύ του βάρους και της διαμέτρου του ωχρού σωματίου, του ωοθυλακίου, των επιπέδων της προγεστερόνης, του β-καροτένιου και της βιταμίνης Α στα αναπαραγωγικά όργανα βοοειδών.

Τα επίπεδα της βιταμίνης Α στο πλάσμα, στο ωχρό σωματίο και στο ωοθυλακικό υγρό δε συσχετίζονται μεταξύ τους. Η υψηλότερη συγκέντρωση βιταμίνης Α παρατηρήθηκε κατά το στάδιο του πρόοιστρου και του οίστρου, περιόδους στις οποίες είναι αυξημένη η ωοθηκική δραστηριότητα.

Αντίθετα η συγκέντρωση του β-καροτένιου στο πλάσμα, στο ωχρό σωματίο και στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίζονται άμεσα μεταξύ τους. Τα υψηλότερα επίπεδα β-καροτένιου στο πλάσμα, στο ωχρό σωματίο και στο ωοθυλακικό υγρό, ανιχνεύτηκαν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όταν η ωχρινοποιητική φάση είναι μέγιστη, ενώ τα επίπεδα του β-καροτένιου στο ωχρό σωματίο σχετίζονται άμεσα με το βάρος και τη διάμετρο του ωχρού σωματίου. Υπάρχει αναλογία ανάμεσα στα επίπεδα της προγεστερόνης του πλάσματος και του βάρους και της διαμέτρου του ωχρού σωματίου, μα η συσχέτιση αυτή δεν ισχύει για τη διάμετρο του ωοθυλακίου. Εκτός αυτού, τα επίπεδα του β-καροτένιου στο πλάσμα, στο ωοθυλακικό υγρό και στο ωχρό σωματίο συσχετίζονται με τα επίπεδα της προγεστερόνης στο πλάσμα. Η συγκεκριμένη έρευνα αποκάλυψε πως η συγκέντρωση του β-καροτένιου του πλάσματος, του ωοθυλακικού υγρού και του ωχρού σωματίου στα βοοειδή, εξαρτώνται από το στάδιο του οιστρικού κύκλου ή την εγκυμοσύνη και σχετίζονται με την ωχρινοποιητική φάση χωρίς να επηρεάζονται από τα επίπεδα της βιταμίνης Α.

Το ωχρό σωματίο είναι ένας ιστός σύνθεσης των στεροειδών και είναι πλούσιος σε β-καροτένιο. Στα βοοειδή τα επίπεδα του β-καροτένιου αυξάνονται από την 6<sup>η</sup> έως τη 16<sup>η</sup> ημέρα του οιστρικού κύκλου και στη συνέχεια μειώνονται κατά την υποστροφή του ωχρού σωματίου.

Εξαιτίας του αιματικού φραγμού, μέσα στο ωοθυλακικό υγρό μπορούν να μεταφερθούν μόνο ουσίες με μοριακό βάρος  $\leq 850.000$ , συνεπώς στο ωοθυλακικό υγρό ανιχνεύεται μόνο το β-καροτένιο που είναι συνδεδεμένο με λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας. Γι' αυτό το λόγο η συγκέντρωση του β-καροτένιου στο ωοθυλακικό υγρό είναι χαμηλότερη από αυτή του πλάσματος και του ωχρού σωματίου. Επιπλέον, έχει καταγραφεί πως οι υψηλότερες ενδοθυλακικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης Α εντοπίζονται σε ωοθυλάκια που δεν έχουν υποστεί ατρησία. Έτσι η ατρητική ή μη κατάσταση των ωοθυλακίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη λειτουργία του ωοθυλακίου στα βοοειδή. <sup>(13)</sup>

- **Βιταμίνη Α και ωρίμανση των ωοθυλακίων:**

Η βιταμίνη Α επάγει την ωρίμανση των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων, όταν η χορήγησή της συμβαίνει κατά το τελικό στάδιο ωρίμανσής τους σε βοοειδή που σιτίζονται με δίαιτα υψηλής ενέργειας.

Λαγοί των οποίων τα επίπεδα της βιταμίνης Α στο αίμα ήταν υψηλά, παρήγαγαν περισσότερα ωοκύτταρα κατά την ωορρηξία από τους λαγούς των οποίων ο ορός περιείχε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης. Οι συγκεντρώσεις της ρετινόλης ήταν υψηλότερες στα υγιή ωοθυλάκια βοοειδών από ό,τι σ' αυτά που είχαν υποστεί ατρησία.

Στα βοοειδή τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εκδηλώνονταν πιο γρήγορα μετά τη χορήγηση της βιταμίνης Α. Πιο συγκεκριμένα η χορήγηση της βιταμίνης κατά τη 16<sup>η</sup> ημέρα του οιστρικού κύκλου, επιφέρει αύξηση του μεγέθους των ωοθυλακίων και της συγκέντρωσης της ρετινόλης στο ωοθυλακικό υγρό. Τα ωοθυλάκια των ζώων που προσέλαβαν βιταμίνη Α παρουσίαζαν χαμηλότερη αναλογία οιστραδιόλης:προγεστερόνης, κάτι που υποδηλώνει πως βρίσκονταν σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η βιταμίνη επάγει την αύξηση του μεγέθους των ωοθυλακίων σε νωρίτερα αναπτυξιακά στάδια από ό,τι συμβαίνει κανονικά και συνεπώς κατά την περίοδο της ωορρηξίας τα ωοθυλάκια είναι περισσότερο ώριμα.

Η χορήγηση της βιταμίνης Α ενδέχεται να μεταβάλλει το πρότυπο της παραγωγής των ορμονών μέσα στο ωοθυλάκιο και να διεγείρει μια επανάληψη της μείωσης, έτσι ώστε περισσότερα ωοκύτταρα να προσεγγίσουν ένα πιο προηγμένο μειωτικό στάδιο κατά το χρονικό διάστημα της ωορρηξίας. <sup>(20)</sup>

- **Ρετινοϊκό οξύ (RA) και έλεγχος της μείωσης:**

Έχει εξεταστεί η επίδραση των ρετινοειδών κατά την περίοδο της εισόδου των γαμετών θηλυκών ατόμων στη μειωτική πρόφαση και η περαιτέρω ανάπτυξή τους. Ο σκοπός της έρευνας ήταν να αποδείξει ότι το RA επισπεύδει τη διαδικασία της μειωτικής πρόφασης στις ωοθήκες εμβρύων ποντικών.

Η πρώτη επίδραση του RA ήταν η ταχύτερη είσοδος στη μείωση, αφού την 9<sup>η</sup> ημέρα έκαναν την εμφάνισή τους τα κύτταρα της ζυγοταινίας. Κανονικά αυτό το στάδιο απουσιάζει από τις ωοθήκες που αναπτύσσονται κανονικά. Αυτό υποδηλώνει την εμπλοκή σήματος από τον RARα που με τη σειρά του οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ένας RARα αγωνιστής προάγει τη μείωση.

Μια δεύτερη δράση του RA είναι η καθυστέρηση της μετάπτωσης από το στάδιο της ζυγοταινίας σ' αυτό της παχυταινίας. Τα κύτταρα του σταδίου της ζυγοταινίας έχουν πιο συμπαγή πυρήνα, συνεπώς ενδέχεται το RA να ενισχύει τη συμπύκνωση του πυρήνα. <sup>(27)</sup>

- **Ρετινοϊκό οξύ (RA) και ωοτοκία:**

Έχει μελετηθεί η επίδραση του RA στην ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων και στην παραγωγή αυγών στα ορτύκια (*Coturnix coturnix japonica*). Οι ωοθήκες και οι ωαγωγοί της ομάδας που προσλάμβανε RA αναπτύσσονταν πιο γρήγορα από αυτές της ομάδας που προσλάμβανε βιταμίνη Α. Επιπλέον, τα ορτύκια που τους είχε χορηγηθεί RA γεννούσαν νωρίτερα από τα πουλιά που προσλάμβαναν βιταμίνη Α. Άρα το ρετινοϊκό οξύ επιταχύνει την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος στα θηλυκά ορτύκια, κάτι που συμβαίνει και με την ωρίμανση των όρχεων στα αρσενικά ορτύκια. Το RA φαίνεται να επισπεύδει τη σεξουαλική ωρίμανση των θηλυκών και αρσενικών ορτυκιών.

Στην ηλικία των 5 εβδομάδων το μέσο σωματικό βάρος των πουλιών που προσλάμβαναν RA ξεπερνούσε αυτό της ομάδας που προσλάμβαναν βιταμίνη Α, κάτι που υποδηλώνει πως η ταχεία ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων συνοδεύεται από αύξηση του σωματικού βάρους. Η έναρξη της παραγωγής των αυγών από κοτόπουλα και ορτύκια, συμπίπτει με τη σεξουαλική ωριμότητα και εξαρτάται από βιολογικούς παράγοντες, όπως το σωματικό βάρος και η ηλικία. Συνεπώς, η αύξηση του σωματικού βάρους στα ορτύκια που τους χορηγήθηκε RA μπορεί να είναι η



πρωταρχική αιτία για την πρόωρη έναρξη της παραγωγής αυγών, καθώς επίσης να αποτελεί την αιτία της σεξουαλικής ωριμότητας.

Η έλλειψη της βιταμίνης A καθυστερεί την έναρξη την ωοτοκίας στα κοτόπουλα και τα ορτύκια. Τα ορτύκια που τους χορηγούνταν βιταμίνη A άρχισαν να παράγουν αυγά νωρίτερα από τα ορτύκια που προσλάμβαναν δίαιτες με RA. Η ανικανότητα των αυγών της ομάδας του RA να εκκολαφθούν, προκλήθηκε από τον εμβρυϊκό θάνατο κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Η ερμηνεία αυτού του φαινομένου αποδίδεται στο ότι όταν το RA χορηγείται ως η μόνη πηγή βιταμίνης A στο ενήλικο ορτύκι, δε μεταφέρεται στο αυγό. Συνεπώς ο εμβρυϊκός θάνατος τόσο νωρίς απορρέει από την έλλειψη βιταμίνης A στα έμβρυα. <sup>(10)</sup>

Σε μια άλλη έρευνα ωοκύτταρα βοοειδών επώαστηκαν *in vitro* με 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ ( $5\text{nmol l}^{-1}$ ), ώστε να διαπιστωθεί αν μια τέτοια προσθήκη θα είχε επιπτώσεις την ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Έτσι μετά από *in vitro* γονιμοποίηση και καλλιέργεια σε απλό μέσο, παρατηρήθηκε αύξηση στην ανάπτυξη των βλαστοκύστεων με την επώαση με 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ.

Ακόμη, σε πειράματα που διεξήχθησαν σε κουνέλια, η αύξηση στη συγκέντρωση της βιταμίνης A στο πλάσμα, οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή ωαρίων. Η αύξηση στην παραγωγή της *all-trans* ρετινόλης είναι ένδειξη υγείας στα ωοθυλάκια προβάτων, σε αντίθεση με τα ωοθυλάκια που έχουν υποστεί ατρησία. Η χορήγηση στις αγελάδες *all-trans* ρετινόλης αύξησε την ανάπτυξη, καθώς και την ποιότητα των βλαστοκύστεων. Οι επιδράσεις της *all-trans* ρετινόλης ρυθμίζονται από την πρόσδεσή της στη δεσμευτική πρωτεΐνη της ρετινόλης (RBP). Η RBP ανιχνεύεται στα ωοκύτταρα των βοοειδών, ενώ η κυτταρική δεσμευτική πρωτεΐνη CRBP εντοπίζεται στα ωοκύτταρα ποντικών κοντά στα κοκκιώδη κύτταρα. Στο κύτταρο, η *all-trans* ρετινόλη μεταβολίζεται σε ρετινοϊκό οξύ, το οποίο με τη σειρά του προσδέεται στη CRBP. Η *all-trans* ρετινόλη συσσωρεύεται στο κύτταρο με τη μορφή των πιο σταθερών ρετινυλικών εστέρων του παλμιτικού. Το παλμιτικό οξύ είναι το πιο άφθονο λιπαρό οξύ στα ωοκύτταρα των βοοειδών, των χοίρων και των προβάτων. Αυτό ίσως αποτελεί ένδειξη ότι τα ενδογενή ρετινοειδή επιδρούν στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων.

Λίγα είναι γνωστά για το ποια κύτταρα παράγουν ρετινοϊκό οξύ και κάτω από ποιες συνθήκες. Τα κοκκιώδη κύτταρα των ποντικών συνθέτουν ρετινοϊκό οξύ από την *all-trans* ρετινόλη και η παρουσία των RARs υποδηλώνει πως τα κύτταρα αυτά αποτελούν στόχους για το ρετινοϊκό οξύ στα ποντίκια και στον άνθρωπο. Τα ρετινοϊειδή δρουν τροποποιώντας τη μεταγραφική δραστηριότητα στο εσωτερικό των ωοκυττάρων, ασκώντας τη δράση τους απευθείας στο ωοκύτταρο ή στα παρακείμενα κοκκιώδη κύτταρα ή και στα δύο. Ως αποτέλεσμα, η IVM (*in vitro* maturation) και η μετέπειτα ανάπτυξη επηρεάζεται από τα ρετινοειδή. <sup>(12)</sup>

- **Ρετινοειδή και στερεοειδογένεση:**

Σε μια άλλη πειραματική μελέτη έγινε η ανίχνευση των πρωτεϊνών RBP και CRBP στις ωοθήκες βοοειδών. Οι ανοσοκυτταρολογικές αναλύσεις εντοπίζουν την RBP στα κοκκιώδη κύτταρα και στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου. Η θέση εντοπισμού της πρωτεΐνης είναι πιο έντονη στα μεγάλα, υγιή ωοθυλάκια. Η CRBP εντοπίζεται με τη σειρά της στα κοκκιώδη κύτταρα του ωοθυλακίου. Στο ωχρό σωματίο είναι παρούσες και οι δύο πρωτεΐνες στα μεγάλο μεγέθους ωχρινοποιητικά κύτταρα, μα μόνο η RBP ανιχνεύεται σε μικρού μεγέθους ωχρινοποιητικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα Northern blot ανάλυσης αποδεικνύουν πως τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου εκφράζουν mRNA των πρωτεϊνών RBP

και CRBP. Τα επίπεδα της ρετινόλης, της RBP, της οιστραδιόλης-17β και της προγεστερόνης είναι υψηλότερα στα ωοθυλάκια με μεγάλη διάμετρο (8-14mm). Η CRBP πιστεύεται πως συμμετέχει στην αποθήκευση της ρετινόλης, μέσω της παρουσίας της ρετινόλης στη λεκιθίνη, δηλ. την ακυλοτρανσφεράση της ρετινόλης, για τη μετατροπή της σε ρετινυλικούς εστέρες. Ποντίκια τα οποία παρουσιάζουν έλλειψη CRBPI διαθέτουν μειωμένα επίπεδα ρετινυλικών εστέρων στις αποθήκες του ήπατος, ενώ η αναπαραγωγική ικανότητα συνεχίζεται κανονικά όταν στα ποντίκια χορηγείται δίαιτα εμπλουτισμένη με βιταμίνη Α. Οι RBP και CRBP πρωτεΐνες ενδεχομένως κατευθύνουν το μεταβολισμό της ρετινόλης και τη μεταφορά της μέσα στην ωοθήκη. Στα ωοθυλάκια με αυξημένο μέγεθος, τα μειωμένα επίπεδα CRBP και η αύξηση της RBP αντανακλούν τα μειωμένα επίπεδα της αποθηκευμένης ρετινόλης στα κοκκιώδη κύτταρα και την αύξηση της μεταφοράς μέσα στο ωοθυλακικό υγρό.

Στους αρουραίους, η έλλειψη βιταμίνης Α οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή στεροειδών ορμονών από την ωοθήκη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τελικά σε θάνατο του εμβρύου. Επίσης ενδέχεται να οδηγήσει σε μικρό μέγεθος της ωοθήκης, καθώς και σε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας.

Τα αποτελέσματα ερευνών δείχνουν πως τα ρετινοειδή επηρεάζουν τη στεροειδογένεση μέσα στην ωοθήκη. Η προγεστερόνη του ορού και της ωοθήκης, μειώνεται σε περίπτωση έλλειψης της βιταμίνης Α. In vitro, τα ρετινοειδή αυξάνουν την παραγωγή της προγεστερόνης και επάγουν την παραγωγή των στεροειδών σε απάντηση στην παραγωγή γοναδοτροπινών από τα κοκκιώδη κύτταρα ποντικών. Ο εντοπισμός της RBP και της CRBP στα κοκκιώδη κύτταρα, στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου και στα κύτταρα του ωχρού σωματίου, πιθανόν να υποδηλώνουν πως η συσσώρευση και ο μεταβολισμός της ρετινόλης ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό μέσα στην ωοθήκη. <sup>(25)</sup>

Η παρουσία των RARs στα κύτταρα της ωοθήκης, καθώς και στα κοκκιώδη, βλαστικά, επιθηλιακά και ορισμένα ωχρινικά κύτταρα, υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά ίσως αποτελούν στόχους του RA. Ζώα τα οποία στερούνται ρετινόλης, διαθέτουν σε χαμηλότερα επίπεδα τα απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση της προγεστερόνης, κάτι που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα προγεστερόνης. In vitro, η ρετινόλη και το RA επάγουν την παραγωγή της προγεστερόνης στα ωχρινοτρόπα κοκκιώδη κύτταρα. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως ένας τρόπος με τον οποίο το RA ρυθμίζει την αναπαραγωγική οδό των θηλυκών ατόμων, είναι ο έλεγχος της σύνθεσης των στεροειδών μέσα στην ωοθήκη. <sup>(15)</sup>

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η βιταμίνη Α ή αλλιώς ρετινόλη, είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τα ζώα και τον άνθρωπο αφού ο ρόλος της εμπλέκεται σε ένα πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών, όπως είναι η όραση, η αναπαραγωγή, η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, καθώς και η ανοσολογική ρύθμιση.

Σκοπός της πειραματικής μελέτης είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των επιπέδων της ρετινόλης, του 13-*cis*-, του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος και του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος σε δείγματα ωοθυλακικών υγρών γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, καθώς και σε δείγματα ωοθυλακικών υγρών αγελάδων. Έγινε λήψη δειγμάτων αίματος σε προκαθορισμένες φάσεις της διαδικασίας εξωσωματικής γονιμοποίησης και διερευνήθηκαν οι διακυμάνσεις των παραπάνω παραμέτρων. Τα δείγματα των αγελάδων, αντιστοιχούν στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης των ωοθυλακίων κατά τον οιστρικό κύκλο.

Για την εξέταση της επίδρασης της βιταμίνης Α στα ωοθυλακικά υγρά με χρήση του συστήματος υψηλής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC), αξιολογήθηκε η εφαρμογή μιας μεθόδου που αρχικά είχε αναπτυχθεί για πλάσμα αίματος στο εργαστήριο βιοχημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Λάρισας και η οποία έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες.

Το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ είναι ο κύριος μεταβολίτης της βιταμίνης Α που εμπλέκεται στη διαδικασία της αναπαραγωγής. Ασκεί τη δράση του μέσω της πρόσδεσής του σε ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα την επαγωγή ή την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της λειτουργίας δεν έχει αποσαφηνιστεί.<sup>(14)</sup>

Οι συγκεντρώσεις των ρετινοειδών και της RBP στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό δεν είναι γνωστές. Σε μια και μοναδική μελέτη έχει μετρηθεί η συγκέντρωση της ρετινόλης σε γυναίκες, αλλά δεν έχουν μετρηθεί άλλα ρετινοειδή ή RBP.<sup>(34)</sup> Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα ρετινοειδή παίζουν ρόλο στη στεροειδογένεση<sup>(13,15,25)</sup>, την ωρίμανση του ωαρίου<sup>(20)</sup> και την αρχική ανάπτυξη του εμβρύου.<sup>(10,12,14)</sup>

Η εργασία βρίσκεται σε εξέλιξη. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αναμένεται να διευρύνουν τις γνώσεις μας για το ρόλο της βιταμίνης Α στη διαδικασία ωρίμανσης του ωαρίου και στην αρχική φάση της αναπαραγωγής.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Έγινε χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), αποτελούμενο από αντλία G1314A, απαερωτή G1322A και σύστημα έκχυσης Rheodyne Model 7725 που διαθέτει βρόγχο 100μl με υποδιαιρέσεις για την έγχυση των βιολογικών δειγμάτων και UV ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος G1314A. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε στήλη χρωματογραφίας Hypesil Betabasic C18 (Pore Size 150A, Part Size 5nm, Lot No P1L11, Serial No 0320816H, Part No 255-715) με διαστάσεις 250mm x 4,6mm. Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε UV ανιχνευτής HP 1100 με ανίχνευση στα 350 nm.

Το όλο σύστημα παρέμεινε συνδεδεμένο με H/Y που διέθετε λογισμικό Chemstation Agilent Technologies, Palo Alto, CA εκτυπωτή Hewlett Packard Deskjet 610C, για τη γραπτή παραλαβή των αποτελεσμάτων που ανακτήθηκαν από τη χρωματογραφική ανάλυση.

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος (SU 11 RH, Firlabo, Meyzieu, France) με δυνατότητα φυγοκέντρωσης στις 3000-4000 στροφές/λεπτό. Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων και για τις διάφορες πλύσεις στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υπερκάθαρου νερού PL512202, USF ELGA, Purelab Plus UV (18,2 mΩ).

### ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ: ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (High Performance Liquid Chromatography)

Η High Performance Liquid Chromatography (HPLC) είναι μια αναλυτική τεχνική για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό οργανικών και μη οργανικών διαλυμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων ουσιών ποικίλης προελεύσεως. Χρησιμοποιείται σε διαχωρισμούς και ανάλυση μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλής πολυκότητας, πολυμερών και ιονικών ενώσεων. Η HPLC αποτελεί σήμερα την τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης, αφού σε τέτοιες αναλύσεις τα δείγματα είναι κυρίως μίγματα.. Εκεί όμως που αξιοποιείται η ισχύς της τεχνικής είναι η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνήθως πριν από της εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο προηγείται εκχύλιση. Στην υγρή χρωματογραφία η υγρή φάση διαπερνά τους πόρους μιας σταθερής μη κινητής φάσης και εκλύει τη διαλυμένη ουσία σε έναν ανιχνευτή.

- Η μη κινητή φάση έχει τη μορφή κυλινδρικού σωλήνα που αποτελείται από σωματίδια μικρής διαμέτρου (5-10 mm) Συνήθως ο κυλινδρικός σωλήνας κατασκευάζεται από άκαμπτο υλικό (ανοξείδωτο ατσάλι ή πλαστικό) και έχει μήκος 5-30 cm, ενώ η εσωτερική του διάμετρος κυμαίνεται μεταξύ 1-9 mm. Τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσεως στην HPLC αποτελούν υλικά πλήρωσης (μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου-silica gel) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις. Η υγρή στατική



φάση συνδέεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια της πηκτής διοξειδίου του πυριτίου.

- Μια αντλία υψηλής πίεσης είναι απαραίτητη για τη διέλευση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης με ροή 0,1-2 ml/min στην είσοδο της στήλης απαιτείται υψηλή πίεση για να υπερνικηθεί η αντίσταση που δημιουργείται κατά τη μεταφορά της κινητής φάσης στη στήλη. Επειδή η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση με αποτέλεσμα τη βαθμιαία καταστροφή της, συνήθως παρεμβάλλεται μια μικρή στήλη πριν από την κύρια στήλη, πληρωμένη με το ίδιο υλικό (προστήλη). Έτσι η κινητή φάση φτάνει στην κύρια στήλη κορεσμένη από την υγρή στατική φάση. Η προστήλη επίσης προστατεύει την κύρια στήλη από ακαθαρσίες που προσροφούνται μη αντιστρεπτά.
- Το δείγμα τοποθετείται στην κινητή φάση μέσω ενός συστήματος έγχυσης, το οποίο μπορεί να είναι αυτόματο ή χειροκίνητο και τοποθετείται πριν από τη στήλη. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος είναι συνήθως μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης, με βρόχο δείγματος. Αποτελείται από ένα ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, ο ένας από τους οποίους οδηγεί στη στήλη. Στη θέση “φορτώσεως” η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη, ενώ με τη βοήθεια της σύριγγας πληρώνεται ο βρόχος δείγματος με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος. Με το σύστημα αυτό δείγματα όγκου ολίγων μL εισάγονται με ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
- Ο ανιχνευτής στην HPLC είναι κρίσιμο στοιχείο του συστήματος, γιατί κάνει ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση. Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV) περιέχει κύτταρο χαμηλής έντασης μέσα από το οποίο διέρχεται η κινητή φάση, μεταφέροντας τα συστατικά του δείγματος. Είναι ουσιαστικά ένα φασματοφωτόμετρο στο τέλος της στήλης του χρωματογράφου. Η ευαισθησία του εξαρτάται από τη μοριακή απορροφητικότητα των διαφόρων συστατικών. Συνήθως ο ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 0,01μg/ml. Είναι διάφορος στις μεταβολές της θερμοκρασίας και αποκρίνεται σε ένα μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων. Με τον ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος μπορεί να παρθεί το φάσμα απορροφήσεως κάθε διαχωριζόμενου συστατικού.<sup>(35)</sup>

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για την αποφυγή της ισομερείωσης και της αποικοδόμησης των συστατικών των βιολογικών δειγμάτων, οι πειραματικές διαδικασίες, η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων και η χρωματογραφική ανάλυση, διεξήχθησαν σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, αποκλείοντας τη διέλευση του φυσικού φωτισμού, ώστε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης η βιταμίνη Α και οι μεταβολίτες της να μην έρθουν σε επαφή με αυτό.

## ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Τα κλινικά δείγματα των γυναικών λήφθηκαν από τη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωλήνες συλλογής ορού (Wasserman), φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να αναλυθούν. Η συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με προφύλαξη από το φως με κάλυψη των σωλήνων με αλουμινόχαρτο και τοποθέτησή τους σε σκοτεινό μέρος. Το δείγμα ωοθυλακικού υγρού που θα εξεταστεί, παραλήφθηκε κατά τη διαδικασία της ωοληψίας. Μόλις περατώθηκε η διαδικασία της ωοληψίας και αφού έγινε η περισυλλογή του ωαρίου από κάθε ωοθυλάκιο, το ωοθυλακικό υγρό, προφυλαγμένο από το φως, φυγοκεντρήθηκε, τοποθετήθηκε σε ειδικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκε μέχρι να αναλυθεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη ενημερώθηκαν σχετικά με ειδικό έντυπο και προφορικές εξηγήσεις και έδωσαν τη συναίνεσή τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Επιπλέον, έγινε λαπαροσκοπικά λήψη δειγμάτων ωοθυλακικών υγρών από αγελάδες στην Κτηνιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μετά τη συλλογή τα δείγματα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

Από τα σφαγεία της Γυρτώνης στην πόλη της Λάρισας και από τα σφαγεία της περιοχής του Τυρνάβου, παρελήφθησαν από κτηνιάτρους οι ωοθήκες προβάτων και αγελάδων που προορίζονταν για σφαγή. Προηγουμένως τα ζώα είχαν υποβληθεί στον απαραίτητο υγειονομικό έλεγχο, ώστε να είναι κατάλληλα για κατανάλωση. Τα ζώα βρίσκονταν σε διαφορετικό στάδιο του κύκλου τους. Κατόπιν, στο βιοχημικό εργαστήριο του Τ.Ε.Ι. Λάρισας, με ιατρικές σύριγγες, απομακρύνθηκε το ωοθυλακικό υγρό από τις ωοθήκες και τοποθετήθηκε σε εργαστηριακά μπουκαλάκια τα οποία αμέσως φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 4000 στροφές. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο των βιολογικών δειγμάτων και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η μεταφορά των ωοθηκών από τα σφαγεία στο εργαστήριο έγινε μέσα σε κλειστό δοχείο για την αποφυγή της έκθεσης των δειγμάτων στο φως, ενώ κατά την παραλαβή του υγρού από τις ωοθήκες είχαν αποκλειστεί οι πηγές φωτός. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

## ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ

Μετά τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων ακολούθησε η παραγωγή των πρότυπων καμπυλών για να καταστεί δυνατή η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

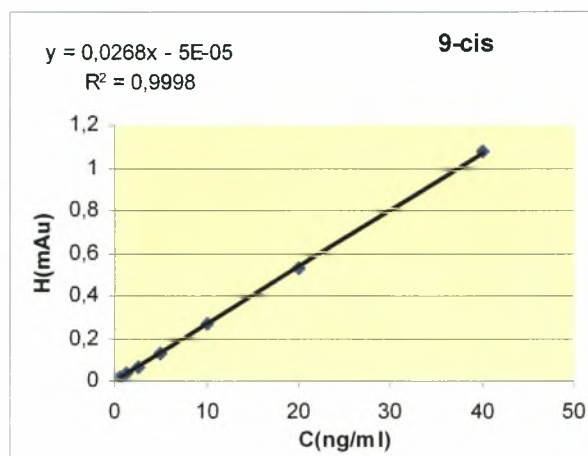
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων για καθένα από τα ρετινοειδή (παράρτημα 2).

Για την παρασκευή των πρότυπων καμπυλών χρειάστηκε η παρασκευή 10 διαλυμάτων (standards) διαφορετικής συγκέντρωσης. Ακολούθησε η δημιουργία standard 1(ST1) (παράρτημα 3) και σειριακή αραιώση του ST1 με διαλύτη 9 φορές. Οι συγκεντρώσεις (ng/ml) του Spike και των standards παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

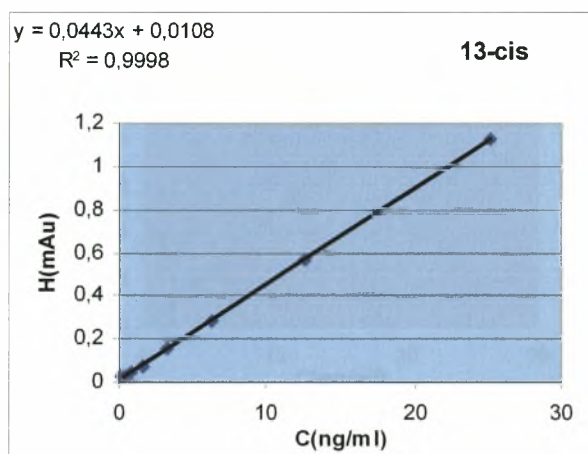
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ SPIKE	C <sub>SPIKE</sub> (ng/ml)	C <sub>ST1</sub> (ng/ml)	C <sub>ST2</sub> (ng/ml)	C <sub>ST3</sub> (ng/ml)	C <sub>ST4</sub> (ng/ml)	C <sub>ST5</sub> (ng/ml)	C <sub>ST6</sub> (ng/ml)	C <sub>ST7</sub> (ng/ml)	C <sub>ST8</sub> (ng/ml)	C <sub>ST9</sub> (ng/ml)	C <sub>ST10</sub> (ng/ml)
ROL	31800	15900	7950	3975	1987.5	993.75	497	248.4	124.2	62.1	31.05
ALL-TRANS	402	25.1	12.55	6.28	3.14	1.57	0.78	0.39	0.196	0.098	0.049
13-CIS	55.2	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078
9-CIS	80	40.2	20.1	10.05	5.025	2.5125	1.25	0.628	0.314	0.157	0.078
RAL	80.4	23	11.5	5.75	2.88	1.44	0.72	0.36	0.18	0.089	0.045

Κάθε μείγμα αναλύθηκε τέσσερις φορές με τη μέθοδο διαχωρισμού. Από τις τιμές του ύψους των κορυφών κατασκευάσαμε τις παρακάτω πρότυπες καμπύλες:

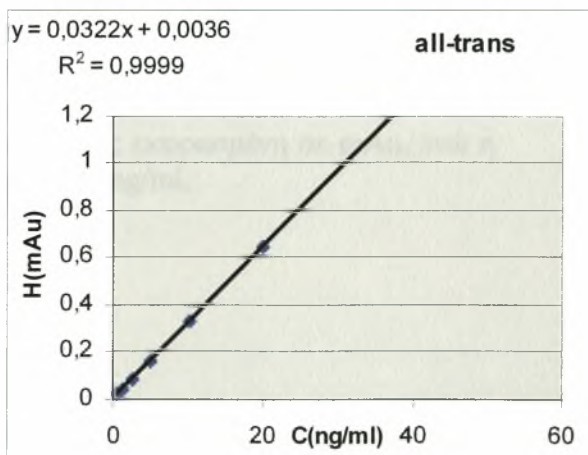
C	H
<b>9-cis Ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)</b>	<b>Ύψος (mAu)</b>
0,625	0,019
1,25	0,04
2,5	0,067
5	0,1275
10	0,2675
20	0,53
40	1,075



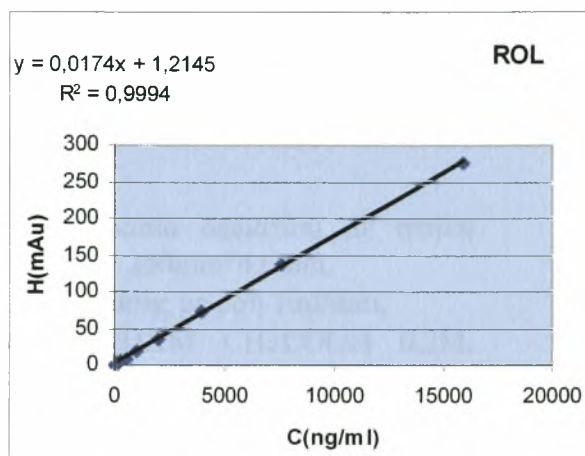
C	H
<b>13-cis Ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)</b>	<b>Ύψος (mAu)</b>
0,196	0,024
0,39	0,029
0,78	0,043
1,57	0,076
3,14	0,16
6,28	0,28
12,55	0,565
25,1	1,125



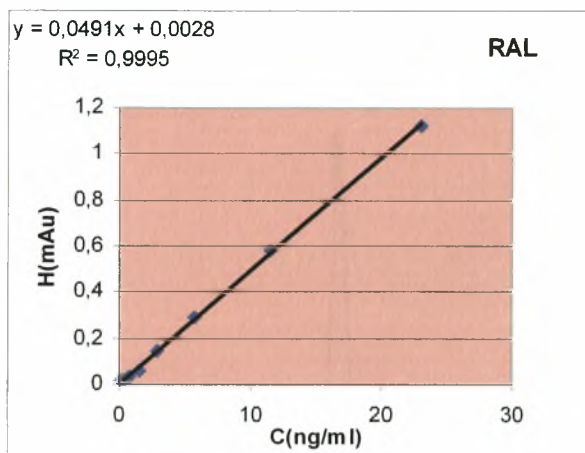
C	H
<b>All-trans Ρετινοϊκό οξύ (ng/ml)</b>	<b>Ύψος (mAu)</b>
0,628	0,028
1,25	0,046
2,5125	0,082
5,025	0,16
10,05	0,33
20,1	0,65
40,2	1,3



C	H
Ρετινόλη (ng/ml)	Ύψος (mAu)
31,05	0,64
62,1	1,3
124,2	2,475
248,4	4,8
496,87	9,35
993,75	18,5
1987,5	35,875
3975	72,3
7650	138,85
15900	274,525
31800	426,6



C	H
Ρετινόλη(ng/ml)	Ύψος (mAu)
0,18	0,0135
0,36	0,02
0,72	0,035
1,44	0,058
2,88	0,1475
5,75	0,295
11,5	0,58
23	1,125



Η ανάλυση κάθε δείγματος έγινε τέσσερις φορές. Οι τιμές του ύψους που παρουσιάζονται αποτελούν το μέσο όρο των τιμών, που προέκυπταν μετά τη διπλή ανάλυση του κάθε δείγματος. Για το σχεδιασμό των πρότυπων καμπυλών του ύψους των κορυφών σε σχέση με τη συγκέντρωση, έγινε χρήση της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων. Οι κλίσεις των καμπυλών που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των προς ανάλυση ουσιών.

Η τιμή του y αντιστοιχεί στην κορυφή του ύψους εκφρασμένη σε mAu, ενώ η τιμή του x αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκφρασμένη σε ng/ml.

## ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

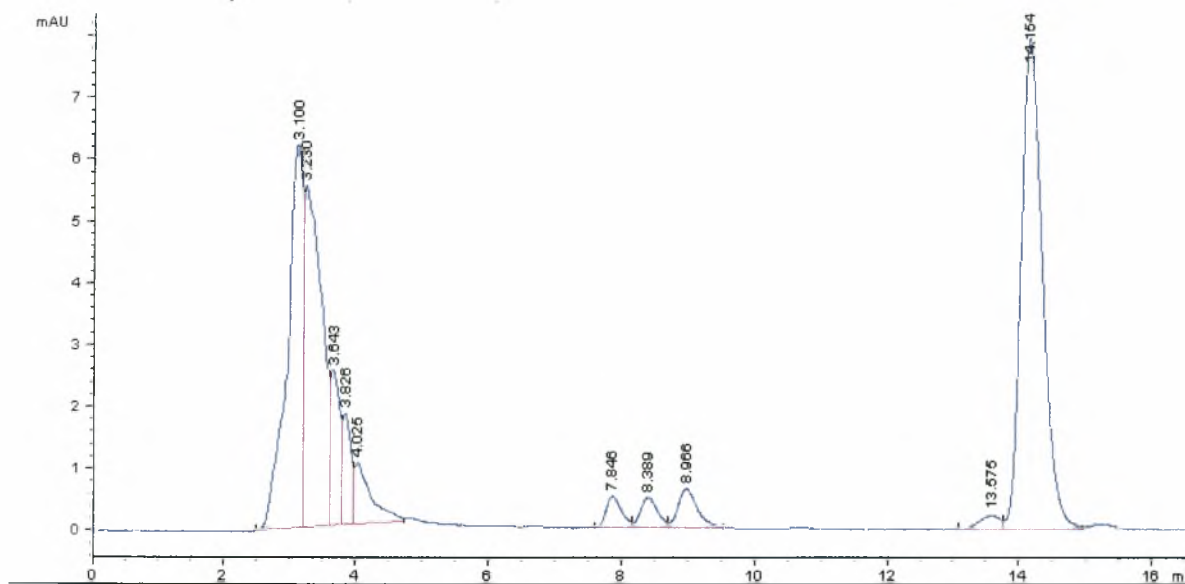
Δείγμα ωθυλακικού υγρού ή ορού (200-1000μl) τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα, στον οποίο προστίθεται ίσος όγκος ακετονιτριλίου (CH<sub>3</sub>CN). Το περιεχόμενο



του σωλήνα αναδεύεται σε vortex για 1min και κατόπιν φυγοκεντρείται για 10min στις 4000 στροφές. Μετά τη φυγοκέντρωση, 100μl από το υπερκείμενο εγχύονται στο σύστημα χρωματογραφίας HPLC. Μέχρι την ανάλυσή τους τα φυγοκεντρημένα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C.

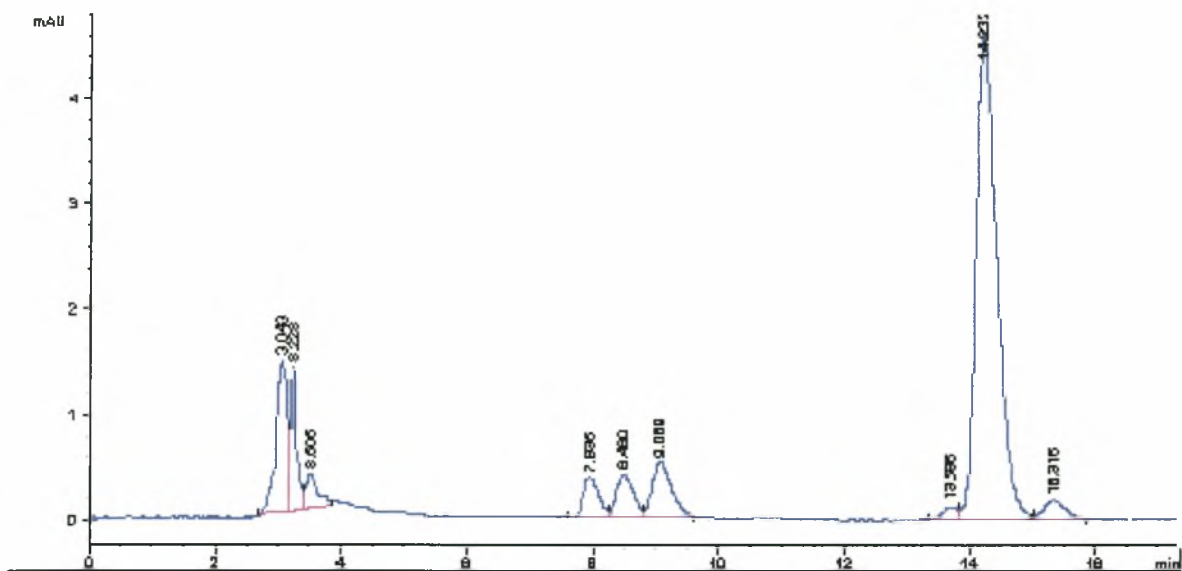
## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

- Η χρωματογραφική ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου με στήλη ανάστροφης φάσης Hypesil Betabasic C18, διαστάσεων 250mm\*4,6mm.
- Η ανάλυση έγινε κάτω από ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης με ροή 1ml/min.
- Η κινητή φάση συνίσταται από 15% Buffer (0,01M CH<sub>3</sub>COOH 0,2M, CH<sub>3</sub>COONa.2H<sub>2</sub>O), 7% THF, 35% MeOH, 43% CH<sub>3</sub>CN). Η τιμή της πίεσης είναι περίπου στα 100bar και τη στιγμή της έκλουσης από τη στήλη η ρετινόλη και οι μεταβολίτες της ανιχνεύονται από ένα ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους στα 350nm. Με τη βοήθεια Η/Υ παίρνουμε τα χρωματογραφήματα που παρατίθενται παρακάτω:



### Μείγμα ορού και spike:

Ανίχνευση του *13-cis* ρετινοϊκού οξέος, του *9-cis* ρετινοϊκού οξέος, του *all trans* ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης από τον UV ανιχνευτή (350nm) με χρόνους έκλουσης 7,848min, 8,389min, 8,966 min, 14,154 min. αντίστοιχα.



### Μείγμα Spike ρετινοϊκών οξέων και ρετινόλης

Ανίχνευση του *13-cis* ρετινοϊκού οξέος, του *9-cis* ρετινοϊκού οξέος, του *all trans* ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης από τον UV ανιχνευτή (350nm) με χρόνους έκλυσης 7,835min, 8,480min, 9,089 min και 14,232 min.

## ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΩΝ ΡΕΤΙΝΟΕΙΔΩΝ

Για τη μελέτη της ανάκτησης των ρετινοειδών παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα (ορού, ορού και spike, Spike). Το Spike αντιστοιχεί στο μείγμα Spike που παρασκευάσαμε για την πρότυπη καμπύλη.

Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε ως εξής :

- **Διάλυμα 1:** 500μl ορό + 500μl ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN)
- **Διάλυμα 2:** 500μl ορός + 100μl spike + 400μl ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN )
- **Διάλυμα 3:** 100μl spike + 900μl διαλύτη)

Ακολουθεί :

1. Ανάδευση των δειγμάτων σε vortex για 1min.
2. Φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 10min.
3. Ανάλυση των δειγμάτων στο χρωματογραφικό μηχάνημα.

Μετά την έκλυση των οξέων και της ρετινόλης, καταγράφονται τα ύψη των κορυφών (mAu) από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Οι τιμές παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

	<b>ROL</b>	<b>13-Cis</b>	<b>All-Trans</b>	<b>RAL</b>	<b>9-Cis</b>
<b>Δ/MA 1</b>	2,83	0,03	0,04	0,06	
<b>Δ/MA 2</b>	48,12	0,29	0,28	0,52	0,12
<b>Δ/MA 3</b>	46,95	0,3	0,25	0,62	0,12
<b>ΑΝΑΚΤΗΣΗ%</b>	97%	88%	97%	76%	100%

Υπολογισμός ανάκτησης :

Η ανάκτηση υπολογίζεται από το κλάσμα:

$[\Delta/MA\ 2 / (\Delta/MA\ 1 + \Delta/MA\ 3)]\%$

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε με τριπλή ανάλυση του διαλύματος 1, του διαλύματος 2 και 3 [σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις spike: 50,100,150 μl ]. Τα αντίστοιχα ύψη των κορυφών που καταγράφηκαν παρατίθενται στο παράρτημα 4.

Η τυπική απόκλιση (SD) και το CV% για τα οξέα και τη ρετινόλη ήταν :

	<b>Ρετινοϊκά Οξέα-Ρετινάλη</b>			<b>Ρετινόλη</b>		
	<b>Ορός</b>	<b>Spike</b>	<b>Ορός + spike</b>	<b>Ορός</b>	<b>Spike</b>	<b>Ορός + Spike</b>
<b>SD</b>	0,001	0,01	0,01	0,05	1	0,43-1
<b>CV%</b>	2%	3%	2%	2%	2%	4%

Ο υπολογισμός της ανάκτησης και της επαναληψιμότητας έγινε σε δείγματα ορού και ωοθυλακικών υγρών. Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κλινικά δείγματα.

Παραλήφθηκαν συνολικά 17 δείγματα, 14 δείγματα ορού και 3 ωοθυλακικά υγρά. Σε τρεις περιπτώσεις υπήρχαν όλα τα δείγματα, δηλαδή αρχής κύκλου, χορήγησης HCG, ωορρηξίας και ωοθυλακικό υγρό. Σε όλα τα δείγματα μετρήθηκαν τα επίπεδα της ρετινόλης (retinol), του 13-cis ρετινοϊκού οξέος (13-cis retinoic acid) και του all trans- ρετινοϊκού οξέος (all trans-retinoic acid). Για την κλινική μελέτη τηρήθηκαν από την κλινική οι κανόνες της ιατρικής δεοντολογίας.

### Ασθενείς και μέθοδοι

Στη μελέτη συμμετέχουν γυναίκες που τους γίνεται θεραπεία με GnRH αγωνιστή και FSH για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Ένας τυπικός κύκλος IVF αποτελείται από δύο θεραπευτικές φάσεις, αυτή της καταστολής και αυτή της διέγερσης. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται το λεγόμενο μακρύ πρωτόκολλο διέγερσης, όπου χρειάζονται περίπου δύο εβδομάδες καταστολής πριν αρχίσει η υπερδιέγερση. Σε άλλες περιπτώσεις εφαρμόζεται το βραχύ πρωτόκολλο, όπου η περίοδος καταστολής είναι μικρότερη, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η λήψη κατά το δυνατόν περισσότερων ωαρίων από τις γυναίκες των οποίων η ανταπόκριση στην ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη αναμένεται να είναι φτωχή.

Στην προσπάθεια ανάπτυξης πολλών ωαρίων χορηγούνται : 1) Ένα φάρμακο για καταστολή, ένας αγωνιστής της LH ορμόνης, για να σταματήσει την έκκριση της LH που παράγεται από την υπόφυση και προκαλεί ωορρηξία. 2) Ένα φάρμακο για διέγερση, το οποίο περιέχει τις ίδιες ορμόνες που παράγονται φυσιολογικά, προκειμένου να διεγερθούν οι ωοθήκες και να ξεκινήσει η ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

Η χορήγηση του αγωνιστή, στο μεν βραχύ πρωτόκολλο θα αρχίσει τη 2<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου ταυτόχρονα με την FSH, στο δε μακρύ την 1<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου και η FSH μετά την αποευσθητοποίηση της υπόφυσης (12-14 ημέρες αργότερα).

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε ως εξής:

Μακρύ πρωτόκολλο: Πρώτο δείγμα πριν από την έναρξη της θεραπείας με GnRH, δεύτερο δείγμα πριν από την έναρξη θεραπείας με FSH, τρίτο δείγμα πριν τη χορήγηση της HCG (κατά τη φάση διέγερσης για την πρόκληση ωορρηξίας) και το τέταρτο κατά την ωοληψία.

Στο βραχύ πρωτόκολλο: Λήψη τριών δειγμάτων αίματος, το πρώτο πριν την έναρξη της φαρμακευτικής θεραπείας, το δεύτερο πριν τη χορήγηση της HCG και το τρίτο κατά την ωοληψία.



## Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων και διαγράμματα ακολουθούν :

### Πίνακας 1

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα προσδιορισμού ρετινοειδών στον ορό και το ωοθυλακικό υγρό σε διάφορες φάσεις του κύκλου.

α/α	Ασθενής	Περιγραφή / Φάση	Ημερομηνία	Δείγμα	Retinol (ng/ml)	13-cis retinoic acid (ng/ml)	all-trans retinoic acid (ng/ml)
1	MMM	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	12/5/2004	ορός	202,8	0,66	1,72
2	DDD	ΠΡΙΝ FSH	26/4/2004	ορός	299,5	1,09	2,12
3	DDD	HCG	10/5/2004	ορός	315,7	0,61	2,03
4	DDD	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	12/5/2004	ορός	267,3	0,75	2,40
5	NNN	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	15/5/2004	ορός	321,1	0,68	1,78
6	AAA		16/5/2004	ορός	240,4	0,68	2,81
7	AAA	HCG	28/5/2004	ορός	229,7	0,64	0,98
8	AAA	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	30/5/2004	ορός	288,8	0,79	1,63
9	BBB	ΠΡΙΝ FSH	21/5/2004	ορός	304,9	0,77	1,38
10	BBB	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	3/6/2004	ορός	288,8	0,50	1,50
11	KKK.		9/1/2004	ορός	245,8	1,00	1,69
12	CCC	ΠΡΙΝ FSH	18/5/2004	ορός	326,4	0,70	1,60
13	CCC	HCG	28/5/2004	ορός	224,3	0,52	1,35
14	CCC	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	30/5/2004	ορός	304,9	1,36	0,91
15	AAA	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	30/5/2004	Ω.Υ	278,0	0,77	2,00
16	BBB	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	3/6/2004	Ω.Υ	197,4	0,37	1,47
17	CCC	ΩΟΡΡΗΞΙΑ	30/5/2004	Ω.Υ	208,2	0,48	1,88

### Ρετινόλη

### Πίνακας 2

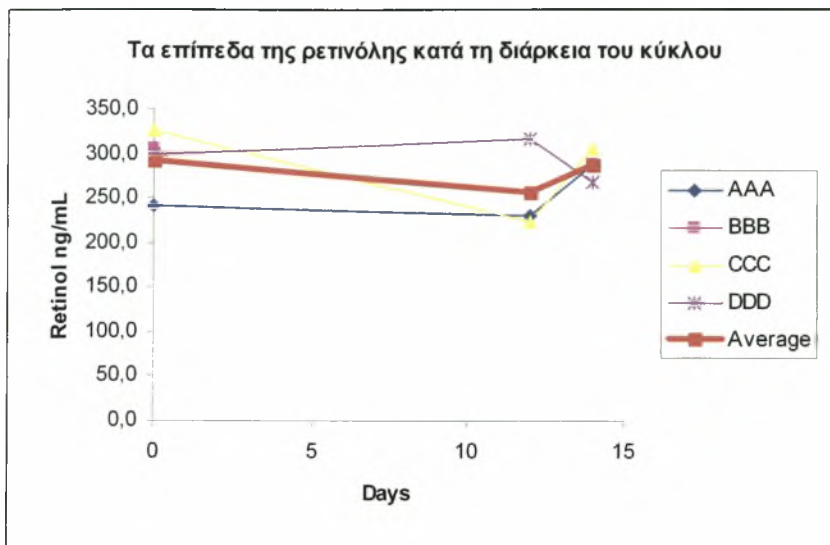
Συγκεντρώσεις της ρετινόλης (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου

Ημέρα	0	12	14
AAA	240,4	229,7	288,8
BBB	304,9		288,8
CCC	326,4	224,3	304,9
DDD	299,5	315,7	267,3
Average	292,8	256,5	287,5

Με την εξαίρεση του δείγματος BBB κατά τη χορήγηση HCG, η ρετινόλη ανιχνεύτηκε σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα. ο μέσος όρος της συγκέντρωσής της στην αρχή του κύκλου είναι 292,8 ng/mL, 256,5 ng/mL κατά την ωρίμανση του ωοθυλακίου και δύο μέρες πριν την ωορρηξία και 287,5 ng/mL κατά την ωορρηξία.

## Διάγραμμα 1

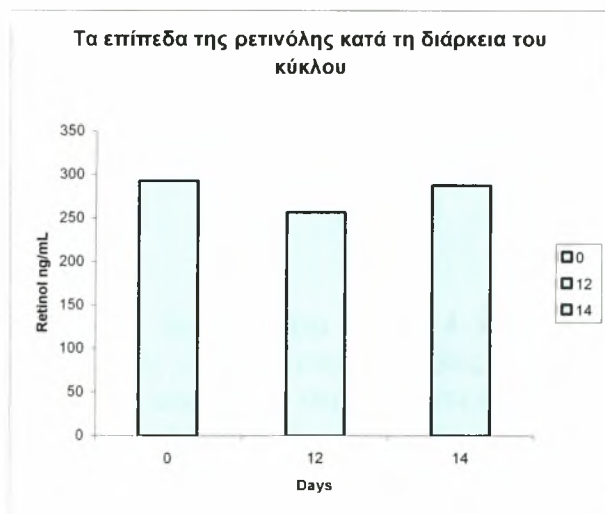
Συγκεντρώσεις της ρετινόλης (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου



Παρατηρείται μια μικρή πτώση των επιπέδων της ρετινόλης από την 1<sup>η</sup> έως τη 12<sup>η</sup> περίπου ημέρα του κύκλου, απ' όπου η ρετινόλη σταδιακά αρχίζει να αυξάνεται προσεγγίζοντας την αρχική της συγκέντρωση, κάτι που είναι εμφανές και στο διάγραμμα 2 που ακολουθεί.

## Διάγραμμα 2

Μέσες συγκεντρώσεις της ρετινόλης (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου



## 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ

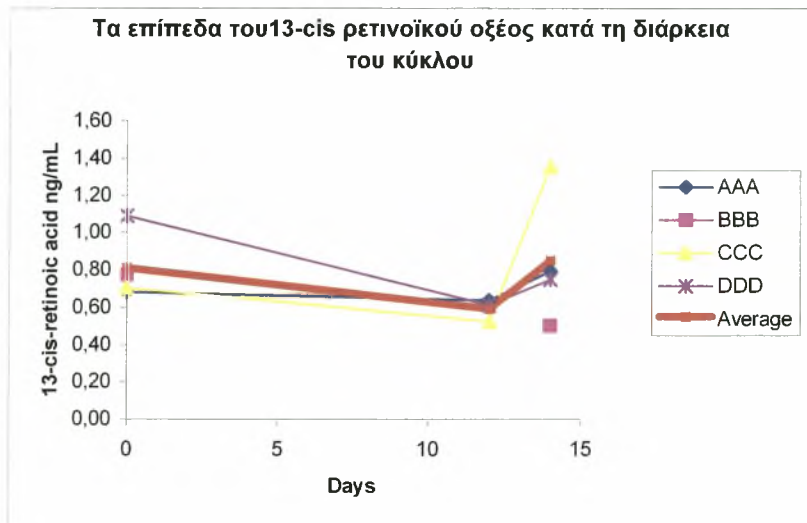
### Πίνακας 3

Συγκεντρώσεις του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου

Ημέρα	0	12	14
AAA	0,68	0,64	0,79
BBB	0,77		0,50
CCC	0,70	0,52	1,36
DDD	1,09	0,61	0,75
Average	0,8	0,6	0,9

### Διάγραμμα 3

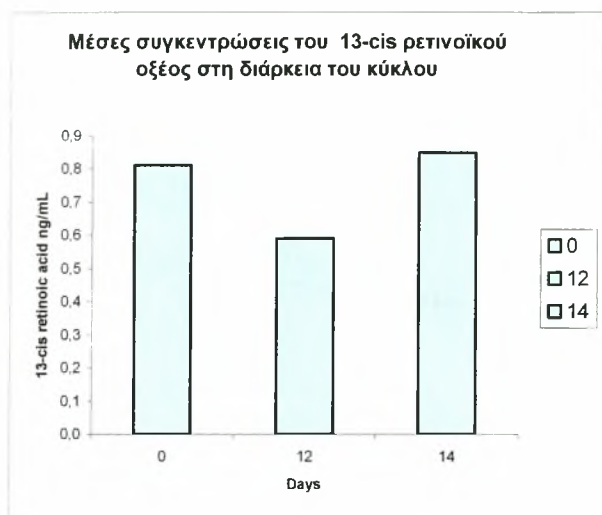
Συγκεντρώσεις του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου.



Στα διαγράμματα 3 και 4 είναι ξεκάθαρη η μείωση της συγκέντρωσης (ng/mL) του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος από την αρχή έως δύο περίπου ημέρες πριν την έναρξη της ωορρηξίας και μετέπειτα αύξηση των επιπέδων του από τη 14<sup>η</sup> ημέρα και μετά.

#### Διάγραμμα 4

Μέσες συγκεντρώσεις του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου



#### *All trans* - ρετινοϊκό οξύ

#### Πίνακας 4

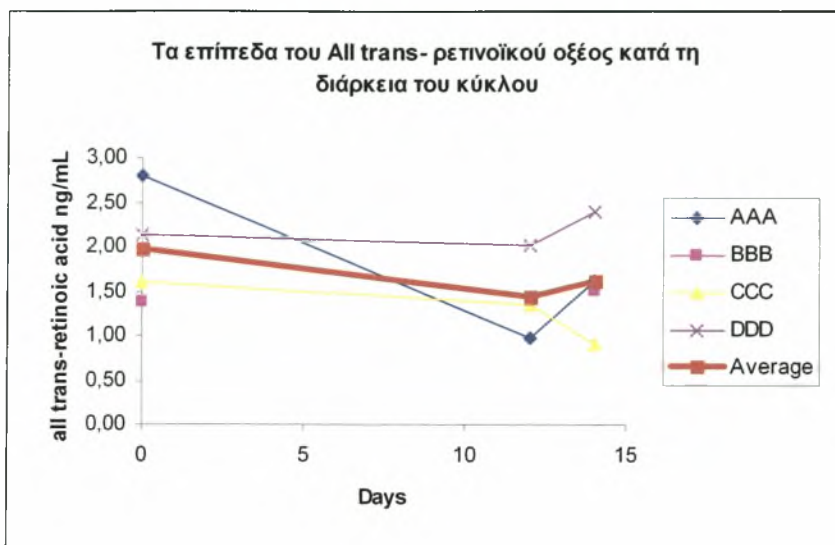
Συγκεντρώσεις του *all trans*- ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου

Ημέρα	0	12	14
AAA	2,81	0,98	1,63
BBB	1,38		1,50
CCC	1,60	1,35	0,91
DDD	2,12	2,03	2,40
Average	2,0	1,5	1,6



## Διάγραμμα 5

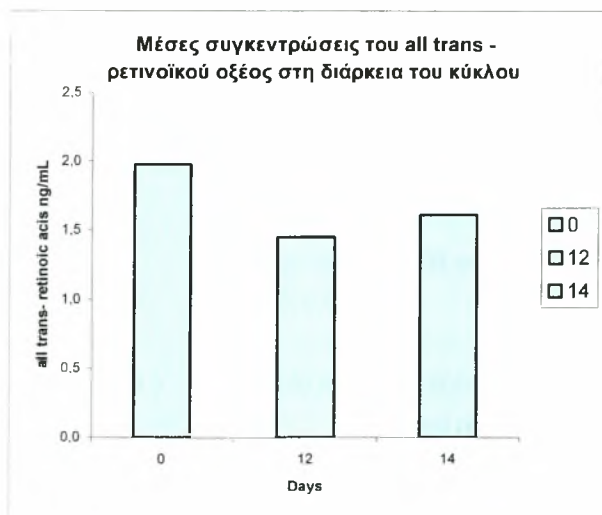
Συγκεντρώσεις του *all trans*- ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου



Στα διαγράμματα 5 και 6 είναι εμφανής η μείωση στη συγκέντρωση του *all trans*- ρετινοϊκού οξέος από την 1<sup>η</sup> έως τη 12<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου. Μετά τη 14<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται μια μικρή αύξηση όμως η τελική συγκέντρωση δεν ξεπερνά αυτή στις αρχές του κύκλου.

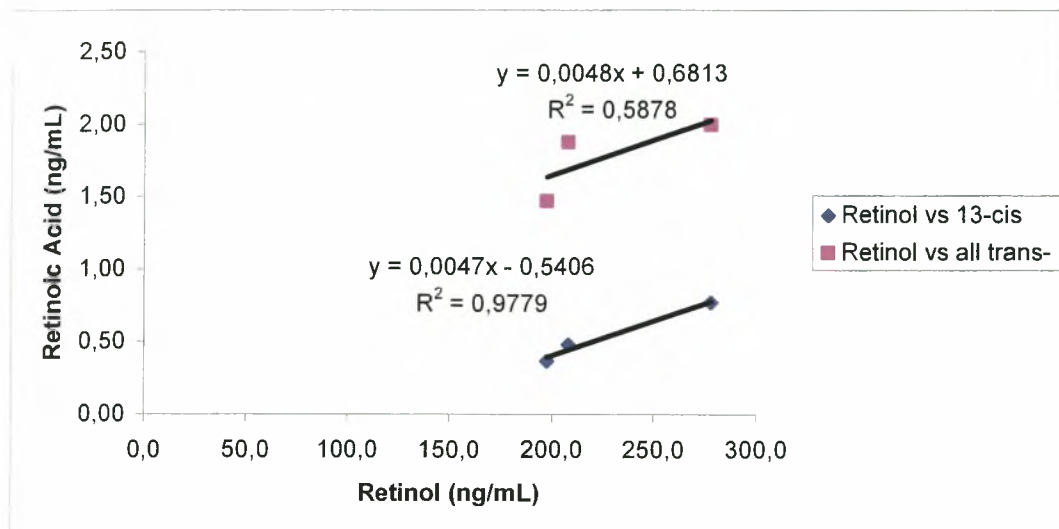
## Διάγραμμα 6

Μέσες συγκεντρώσεις του *all trans*- ρετινοϊκού οξέος (ng/mL) στη διάρκεια του κύκλου



## Διάγραμμα 7

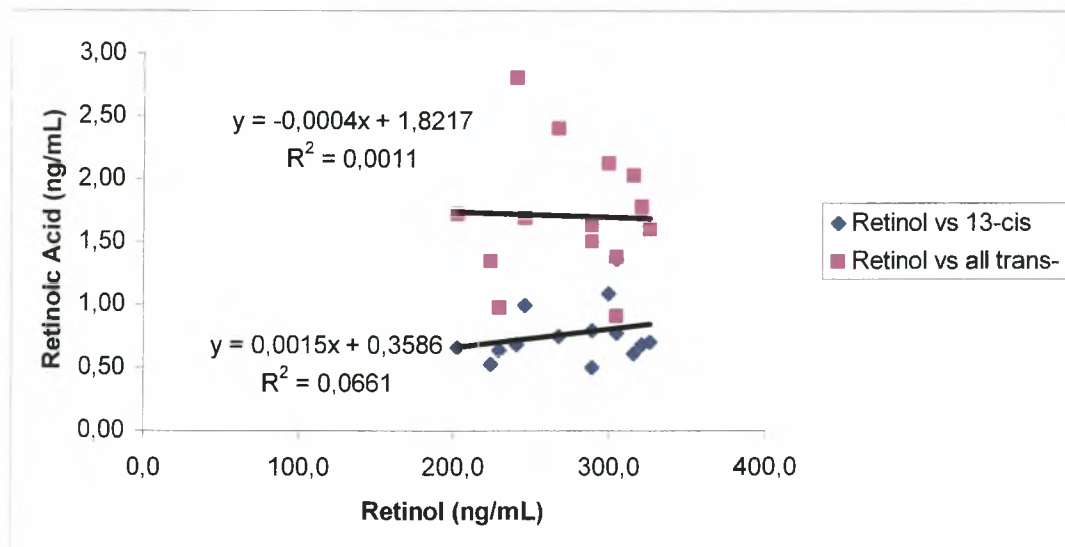
Συσχέτιση ρετινόλης και ισομερών του ρετινοϊκού οξέος στο ωοθυλακικό υγρό.



Επιπλέον, μελετήθηκε η συσχέτιση της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος στο ωοθυλακικό υγρό (διάγραμμα 7) και στον ορό (διάγραμμα 8). Στον ορό συσχέτιση υπάρχει μόνο όσον αφορά το 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ.

## Διάγραμμα 8

Συσχέτιση ρετινόλης και ισομερών του ρετινοϊκού οξέος στον ορό.



## Κλινικά δείγματα

Εξετάστηκαν συνολικά 16 δείγματα ωοθυλακικών υγρών προβάτων από τα οποία 4 ήταν υποτελή, 5 ήταν κυρίαρχα, 1 κύστη, 3 δείγματα των οποίων η φάση ανάπτυξης είναι απροσδιόριστη και 3 μείγματα υπολειπόμενων ωοθυλακίων.

Η λήψη των δειγμάτων έγινε λαπαροσκοπικά. Η λαπαροσκόπηση είναι μια τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται η ορατότητα της περιτοναϊκής κοιλότητας μετά των διαφόρων οργάνων που βρίσκονται εντός αυτής χωρίς να γίνει λαπαροτομία.

Απαραίτητα όργανα για τη λαπαροσκόπηση είναι:

1. η οπτική του λαπαροσκοπίου που μπορεί να συνδεθεί με φωτιστική συσκευή μέσω ειδικού καλωδίου. Στην οπτική προσαρμόζεται ειδική κάμερα που επιτρέπει μέσω monitor (οθόνης) τη μεγέθυνση του αντικειμένου και την καλύτερη παρακολούθηση της επέμβασης από όλο το προσωπικό του χειρουργείου. Είναι δυνατή επίσης και η μαγνητοσκόπηση της επέμβασης μέσω της ειδικής αυτής κάμερας
2. συσκευή τέλεσης πνευμονοπεριτοναίου
3. ειδικές βελόνες για εισαγωγή του CO<sub>2</sub> στην περιτοναϊκή κοιλότητα (Verres needle)

### Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων:

#### Πίνακας 5

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα προσδιορισμού ρετινοειδών στο ωοθυλακικό υγρό σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης των ωοθυλακίων κατά τον οιστρικό κύκλο των αγελάδων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΤΥΠΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	13-CIS	ALL-TRANS	ROL
A/A		C (ng/mL)	C (ng/mL)	C (ng/mL)
1	ΚΥΡΙΑΡΧΟ	0,19	1,22	90,1
2	ΚΥΡΙΑΡΧΟ	0,28	0,54	14,3
3	ΚΥΡΙΑΡΧΟ	1,45	1,19	25,3
4	ΚΥΡΙΑΡΧΟ	0,19	0,73	79,6
<b>AV</b>		<b>0,52</b>	<b>0,92</b>	<b>52,32</b>
5	ΥΠΟΤΕΛΕΣ	0,66	0,51	126,9
1	ΥΠΟΤΕΛΕΣ	0,16	0,60	74,3
4	ΥΠΟΤΕΛΕΣ			90,1
4	ΥΠΟΤΕΛΕΣ	0,52	0,70	10,6
6	ΥΠΟΤΕΛΕΣ	0,37	0,39	216,4
<b>AV</b>		<b>0,43</b>	<b>0,55</b>	<b>103,66</b>
7	ΚΥΣΤΗ	0,43	0,54	126,9
1	ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ	0,37	0,63	79,6
8	ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ	0,61	0,54	111,1
9	ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ	0,28	0,79	142,7
<b>AV</b>		<b>0,42</b>	<b>0,65</b>	<b>111,1</b>
4	ΜΕΙΓΜΑ ΥΠΟΤΕΛΩΝ	1,31	0,73	79,6
4	ΜΕΙΓΜΑ ΥΠΟΤΕΛΩΝ	0,82	0,60	90,1
4	ΜΕΙΓΜΑ ΥΠΟΤΕΛΩΝ	0,91	1,01	48,0
<b>AV</b>		<b>1,01</b>	<b>0,78</b>	<b>72,5</b>

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ρετινοειδή (retinoids) είναι ουσίες με δράση βιταμίνης Α. Η βιταμίνη Α είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, λίγα όμως είναι γνωστά για την ύπαρξή της στο ωοθυλακικό υγρό και τον πιθανό ρόλο της στη διαδικασία ωρίμανσης του ωαρίου. Υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή του *all trans* ρετινοϊκού οξέος στη διαδικασία της αναπαραγωγής και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.<sup>(14,26)</sup> Τα επίπεδα του β-καροτένιου στο πλάσμα, στο ωοθυλακικό υγρό και στο ωχρό σωματίο σχετίζονται με τα επίπεδα της προγεστερόνης στο πλάσμα.<sup>(13)</sup> Πειράματα που διεξήχθησαν σε λαγούς των οποίων τα επίπεδα της βιταμίνης Α στο αίμα ήταν υψηλά, παρήγαγαν περισσότερα ωοκύτταρα κατά την ωορρηξία από τους λαγούς των οποίων ο ορός περιείχε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης.<sup>(20)</sup> Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση των ρετινοειδών κατά την είσοδο των θηλυκών γαμετών στη μειωτική πρόφαση και αποδείχτηκε ότι το ρετινοϊκό οξύ επισπεύδει τη διαδικασία της μειωτικής πρόφασης στις ωοθήκες εμβρύων ποντικών.<sup>(27)</sup> Το ρετινοϊκό οξύ επιταχύνει την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος στα θηλυκά ιαπωνικά ορτύκια, κάτι που συμβαίνει και με την ωρίμανση των όρχεων στα αρσενικά ορτύκια.<sup>(10,12)</sup> Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν πως τα ρετινοειδή επηρεάζουν τη στερεοειδογένεση μέσα στην ωοθήκη. Συγκεκριμένα, η προγεστερόνη του ορού και των ωοθηκών μειώνεται σε περίπτωση έλλειψης της βιταμίνης Α στα ποντίκια.<sup>(15,25)</sup> Στον άνθρωπο υπάρχει μόνο μια εργασία στην οποία έχουν μετρηθεί τα επίπεδα της ρετινόλης σε ωοθυλακικά υγρά, ενώ υπάρχουν μελέτες με ζώα.<sup>(34)</sup> Δεν έχει αναφερθεί ως τώρα ανίχνευση ρετινοϊκού οξέος σε ωοθυλακικό υγρό στον άνθρωπο.

Σε μία προσπάθεια να κατανοηθεί η πιθανή συμμετοχή των ρετινοειδών στη διαδικασία ωρίμανσης του ωαρίου έγινε ο προσδιορισμός των επιπέδων των ρετινοειδών στο ωοθυλακικό υγρό και στον ορό γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, καθώς και στο ωοθυλακικό υγρό αγελάδων.

Αρχικά, τα 19 δείγματα που παραλήφθηκαν από τις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, αναλύθηκαν με τη μέθοδο της HPLC με σκοπό το διαχωρισμό της ρετινόλης, του *13-cis* και του *all trans*- ρετινοϊκού οξέος. Το *9-cis* ρετινοϊκό οξύ δεν ήταν ανιχνεύσιμο, κάτι που μπορεί να αποδοθεί στη μικρή συγκέντρωσή του στον ορό. Τα δείγματα ορού αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές φάσεις του κύκλου (την έναρξη, τη 12<sup>η</sup> μέρα, δηλαδή δύο ημέρες πριν την ωορρηξία και κατά την ωορρηξία τη 14<sup>η</sup> μέρα).

Σε έναν τυπικό κύκλο IVF (in vitro fertilization), η ανεύρεση της ημέρας που αρχίζει η χορήγηση των γοναδοτροπινών, για τη φάση διέγερσης των ωοθηκών, βασίζεται στο γεγονός ότι το προς ωρίμανση ωοθυλάκιο στο φυσιολογικό κύκλο επιλέγεται τις πρώτες μέρες του κύκλου. (Συνήθως ορίζεται η 3<sup>η</sup> μέρα του κύκλου ως η 1<sup>η</sup> μέρα χορήγησης γοναδοτροπινών). Η χορήγησή τους γίνεται για την πρόκληση περισσότερων του ενός ωοθυλακίων.

Η αντίδραση των γυναικών καθορίζεται από την καθημερινή μέτρηση της οιστραδιόλης του αίματος και από την υπερηχογραφική μέτρηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Όταν οι τιμές της οιστραδιόλης παρουσιάζουν συνεχή άνοδο, τότε διακόπτεται η χορήγηση γοναδοτροπινών και 24-30 ώρες αργότερα χορηγείται χοριονική γοναδοτροπίνη (hCG).

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης γοναδοτροπινών για την πρόκληση πολλαπλής ωορρηξίας, σε πολλές γυναίκες η έκκριση της ενδογενούς LH συνεχίζεται προκαλώντας πρόωμο ωχρινόπωση του ωοθυλακίου. Η χορήγηση των αναλόγων GnRH καταστέλλει την ενδογενή παραγωγή LH με αποτέλεσμα την καλύτερη ωρίμανση των ωαρίων και την αύξηση του αριθμού κυήσεων στα προγράμματα



εξωσωματικής γονιμοποίησης. Στο πρωτόκολλο μεγάλης διάρκειας η χορήγηση των αναλόγων GnRH γίνεται από την 21<sup>η</sup> μέρα του προηγούμενου κύκλου, ενώ στο μικρής διάρκειας αρχίζει από τη 2<sup>η</sup> μέρα του ίδιου κύκλου που αρχίζει η χορήγηση των γοναδοτροπινών. Και στις δύο περιπτώσεις η χορήγηση GnRH αναλόγων διακόπτεται την ημέρα χορήγησης της χοριονικής γοναδοτροπίνης.

Στις γυναίκες που συμμετείχαν στο πρόγραμμα έγινε λήψη αίματος τρεις φορές. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις τρεις αιμοληψίες συνοψίζονται παρακάτω:

- 1<sup>η</sup> Αιμοληψία : Στο δείγμα AAA η πρώτη αιμοληψία πραγματοποιείται στη αρχή του κύκλου, πριν την έναρξη της φαρμακευτικής θεραπείας. Στο δείγμα BBB η πρώτη αιμοληψία αντιστοιχεί στη φάση του κύκλου πριν τη χορήγηση της γοναδοτροπίνης FSH, δηλαδή στο διάστημα μεταξύ 1<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας του κύκλου. Στο δείγμα CCC , όπως και στο δείγμα DDD λαμβάνεται αίμα στην αρχή του κύκλου πριν τη χορήγηση της FSH.
- 2<sup>η</sup> Αιμοληψία : Στο δείγμα AAA η δεύτερη αιμοληψία λαμβάνει χώρα κατά τη φάση διέγερσης των ωοθηκών, τη 12<sup>η</sup> μέρα του κύκλου, λίγο πριν τη χορήγηση της χοριονικής γοναδοτροπίνης hCG. Στο δείγμα BBB κατά τη 12<sup>η</sup> μέρα του κύκλου δεν πραγματοποιείται αιμοληψία. Στα δείγματα CCC και DDD, όπως και στο AAA η αιμοληψία γίνεται πριν τη χορήγηση hCG.
- 3<sup>η</sup> Αιμοληψία : Η τρίτη αιμοληψία και στα τέσσερα δείγματα πραγματοποιείται τη 14<sup>η</sup> μέρα του κύκλου, κατά την ωορρηξία.

Από τη μέτρηση των επιπέδων της ρετινόλης στις τρεις φάσεις του κύκλου, παρατηρείται μείωση της τιμής της μέσης συγκέντρωσής της από την 1<sup>η</sup> (292,8 ng/ml) μέχρι τη 12<sup>η</sup> μέρα του κύκλου (256,5 ng/ml). Στο χρονικό διάστημα μεταξύ 12<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> μέρας η μέση συγκέντρωση της ρετινόλης αυξάνει (287,5 ng/ml) προσεγγίζοντας την τιμή που είχε στη αρχή του κύκλου.

Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος είναι 0,8 ng/mL στην αρχή του κύκλου, μειώνεται στα 0,6 ng/mL δύο ημέρες πριν την ωορρηξία, ενώ κατά την ωορρηξία αυξάνεται και παίρνει την τιμή 0,9 ng/mL, ξεπερνώντας τη συγκέντρωση στην αρχή του κύκλου.

Το *all trans*- ρετινοϊκό οξύ μειώνεται σταδιακά από την αρχή έως και δύο ημέρες πριν την ωορρηξία, ενώ κατά τη 14<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου η συγκέντρωσή του αυξάνεται κατά μέσο όρο 0,1 ng/mL.

Γενικότερα, κατά τη θυλακική φάση του κύκλου, η συγκέντρωση της ρετινόλης μειώνεται από την πρώτη έως τη 12<sup>η</sup> μέρα και στη συνέχεια αυξάνει σταδιακά μέχρι την ωορρηξία. Η αύξηση που παρατηρείται μετά την πρώτη βδομάδα της θυλακικής φάσης, έως την ημέρα της ωορρηξίας, είναι κάτι που συνδέεται με την αυξημένη ωοθηκική δραστηριότητα. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγουν και αναλύσεις που έγιναν στο πλάσμα και στα ωοθυλακικά υγρά βοοειδών, όπου η υψηλότερη συγκέντρωση της ρετινόλης εντοπίζεται στα στάδια του πρόοιστρου και του οίστρου. Τα επίπεδα του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέως μειώνονται με τη σειρά τους από την αρχή του κύκλου μέχρι τη 12<sup>η</sup> μέρα, ενώ η μέση τιμή της συγκέντρωσής του τη 14<sup>η</sup> μέρα ξεπερνά ελαφρώς την αρχική. Το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ παρουσιάζει μια συνεχή μείωση της μέσης συγκέντρωσής του, από την αρχή του κύκλου μέχρι την ημέρα της ωορρηξίας.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δεν επιτρέπουν τη σύγκριση μεταξύ των επιπέδων της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος του ορού και αυτών των ωοθυλακικών υγρών. Επιπλέον, δε φαίνεται να υπάρχουν πολύ μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των γυναικών όσον αφορά στις συγκεντρώσεις των ρετινοειδών στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των

επιπέδων της ρετινόλης και των ισομερών της ρετινοϊκών οξέων στο ωοθυλακικό υγρό. Αντίστοιχη συσχέτιση στον ορό υπήρχε μόνο για το *13-cis* ρετινοϊκό οξύ και ήταν ασθενής. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων των ουσιών που προσδιορίστηκαν μεταξύ ορού και ωοθυλακικού υγρού. Τέτοια συσχέτιση δεν κατέστη δυνατή και σε πειράματα άλλων ερευνών. Πειράματα στα βοοειδή εντόπισαν διαφορές στη συγκέντρωση της ρετινόλης μεταξύ του πλάσματος και του ωοθυλακικού υγρού μόνο κατά τη διάρκεια του οίστρου, δηλαδή στη φάση της ωορρηξίας, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα στάδια του ωοθηκικού κύκλου η διαφορά συγκέντρωσης ήταν ανεπαίσθητη. Επιπλέον τα επίπεδα της ρετινόλης στο πλάσμα ήταν υψηλότερα από αυτά του ωοθυλακικού υγρού, κυρίως κατά τη διάρκεια του δίοιστρου.<sup>(13)</sup>

Διάφορα συστατικά του πλάσματος μπορούν να διέλθουν ως ελεύθερα μόρια μέσω της βασικής μεμβράνης μεταξύ των ωοθηκών και του ωοθυλακικού υγρού. Στο ωοθυλακικό υγρό των βοοειδών έχει εντοπιστεί η ύπαρξη ρετινόλης και β-καροτενίου. Εκτός όμως από την ελεύθερη διάχυσή της, η ρετινόλη εισέρχεται στο ωοθυλακικό υγρό και μέσω της σύνδεσής της με τις ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς της, κάτι που πιθανόν να εξηγεί τη μη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ρετινόλης και των οξέων της στο πλάσμα και στο ωοθυλακικό υγρό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών, υπάρχει αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης της ρετινόλης και της ποιότητας του ωοθυλακίου όταν η συγκέντρωση της ρετινόλης στα υγιή ωοθυλάκια είναι 107 IU/dl, σε σχεδόν ατρητικά ωοθυλάκια 90 IU/dl και σε ατρητικά 60 IU/dl. Επιπλέον, αυτές οι συγκεντρώσεις της ρετινόλης μπορούν να συσχετιστούν με τις ενδο-ωοθυλακικές συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη για τον πιθανό ρόλο της βιταμίνης A στη ρύθμιση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, καθώς και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων.<sup>(37)</sup>

Σε πειράματα τεχνητής γονιμοποίησης σε βοοειδή, η χορήγηση ρετινόλης την πρώτη και τελευταία μέρα χορήγησης της FSH κατά τη φάση διέγερσης των ωοθηκών, είχε ως αποτέλεσμα έμβρυα, τα οποία στο στάδιο των 4-κυττάρων παρουσίαζαν αυξημένα ποσοστά ωρίμανσης κατά την *in vitro* ανάπτυξη.

Κατά την *in vitro* ωρίμανση (IVM) ωοκυττάρων βοοειδών, η προσθήκη *9-cis*-ρετινοϊκού οξέος επάγει την ανάπτυξη των βλαστοκύστεων. Η μετέπειτα εισαγωγή αυτών των βλαστοκύστεων στη μητέρα οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού επιτυχίας των κηύσεων. Στο μέλλον, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοκυττάρων κατά την *in vivo* γονιμοποίηση, μετά τη χορήγηση ρετινόλης.

Η βιταμίνη A και οι μεταβολίτες της ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τη μορφογένεση στα έμβρυα, καθώς και τη διαφοροποίηση πολλών τύπων κυττάρων. Τα ρετινοειδή κατέχουν κάποιο ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ενώ εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εμβρύου. Οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τα ρετινοειδή εστιάζουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Παρ' όλα αυτά ανωμαλίες κατά το χρονικό διάστημα πριν την ανάπτυξη του γαστριδίου και την οργανογένεση αποδίδονται στην έκθεση των ζυγωτών στο ρετινοϊκό οξύ.<sup>(12)</sup>

Στο παρόν πείραμα δεν είναι σταθερή η καθημερινή πρόσληψη της βιταμίνης A ώστε να παρακολουθήσουμε και να αξιολογήσουμε τη μεταβολική της πορεία. Συνεπώς δεν μπορούμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα της ρετινόλης και των ισομερών του ρετινοϊκού οξέος στις διάφορες φάσεις του κύκλου με την αυξομείωση των στεροειδών ορμονών. Αν όλα τα παραπάνω ήταν δυνατά, θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα που προέκυψε από προηγούμενη πειραματική μελέτη,

κατά την οποία *in vitro* χορήγηση ρετινοειδών προάγει τη στερεοειδογένεση. Επιπλέον, ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός για να εξαχθούν ασφαλή στατιστικά αποτελέσματα. Η μελλοντική ανάλυση δειγμάτων με μεγαλύτερο αριθμό, θα καταστήσει δυνατή τη στατιστική αξιολόγηση, καθώς και τη σύγκριση των επιπέδων των ρετινοειδών μεταξύ εγκύων και μη εγκύων γυναικών. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου της βιταμίνης Α στην ωρίμανση του ωαρίου και διαδικασία της αναπαραγωγής.

Τα 16 δείγματα των ωοθυλακικών υγρών των αγελάδων αναλύθηκαν με τη μέθοδο της HPLC με σκοπό τον προσδιορισμό της ρετινόλης, του *13-cis* και του *all-trans*- ρετινοϊκού οξέος. Δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του *9-cis* ρετινοϊκού οξέος. Τα δείγματα διαχωρίζονται σε πέντε υποκατηγορίες που αντιστοιχούν σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Έτσι τα ωοθυλάκια χαρακτηρίζονται ως κυρίαρχα ή υποτελή, υπάρχει μια ομάδα δειγμάτων των οποίων η κυριαρχία αμφισβητείται και χαρακτηρίζονται ως απροσδιόριστα. μία ομάδα που αποτελείται από μείγμα υποτελών ωοθυλακίων, καθώς και ένα δείγμα κύστης.

Κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο των αγελάδων από το μεγάλο αριθμό ωοθυλακίων (κύμα) που σχηματίζεται, επιλέγονται μόνο ορισμένα, τα οποία στη συνέχεια θα ολοκληρώσουν τη διαδικασία της διαφοροποίησης και θα παράγουν ένα ωάριο.

Η FSH είναι η κύρια ορμόνη που καθορίζει τα 2 ή 3 ωοθυλακικά "κύματα" (follicular waves) κατά τον οιστρικό κύκλο των αγελάδων. Κάθε "κύμα" διαρκεί 7-10 μέρες και χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση παρατηρείται σταδιακή αύξηση της FSH στον ορό. Η δεύτερη φάση χαρακτηρίζεται ως η φάση επιλογής και οδηγεί σε μείωση του αριθμού των προς ωρίμανση ωοθυλακίων, με τελικό αποτέλεσμα την ύπαρξη 6-7 ωοθυλακίων με διάμετρο μεγαλύτερη από 5 mm. Στην τρίτη φάση τα επίπεδα της FSH στον ορό μειώνονται και όλα τα ωοθυλάκια εκτός από ένα υπόκεινται σε ατρησία. Το εναπομένον ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται ως κυρίαρχο, σε αντιδιαστολή με τα ατρητικά υπολειπόμενα ωοθυλάκια. Η διάμετρός του προσεγγίζει τα 8-9 mm και είναι ικανό να παράγει ωάριο κατά τη φάση της ωχρινικής ύφεσης. Επιπλέον, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, αντίθετα με τα υπολειπόμενα, έχει αυξημένη ικανότητα παραγωγής οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την απόπτωση του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Τα τρία ωοθυλακικά κύματα διαδέχονται το ένα το άλλο. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο του πρώτου και δεύτερου κύματος υποστρέφονται. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο του τελικού κύματος (τρίτο κύμα) είναι συνήθως αυτό που απαντά στη μείωση της προγεστερόνης και το παλιρροιακό κύμα της LH, γεγονότα που του επιτρέπουν να εκκρίνει επαρκή ποσότητα οιστραδιόλης που θα οδηγήσει στην έκκριση LH/FSH και τελικά στην ωορρηξία του ωοθυλακίου. Έτσι, από τον αριθμό των κυρίαρχων ωοθυλακίων που κάνουν την εμφάνισή τους, επιλέγεται μόνο ένα το οποίο είναι ικανό για γονιμοποίηση.

Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο σχηματίζεται σε μία από τις δύο ωοθήκες 4-5 μέρες πριν την έναρξη του οίστρου του ζώου. Αμέσως μετά την έναρξη του οίστρου, ακολουθεί ρήξη του ωοθυλακίου και μεταφορά του στον ωαγωγό. Η ρήξη του ωοθυλακίου επάγεται από την εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης GnRH, η οποία επάγει την έκλυση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH. Σε περίπτωση που το επιλεγμένο ωοθυλάκιο δεν οδηγηθεί σε ωορρηξία μα συνεχίζει να αναπτύσσεται, ενδέχεται να σχηματιστεί μία κύστη. Κύστη μπορεί επίσης να δημιουργηθεί σε περίπτωση μη υποστροφής του ωχρού σωματίου, οπότε η παραγωγή προγεστερόνης συνεχίζεται κανονικά με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης άλλων ωοθυλακίων. Η



κύστη συνήθως χαρακτηρίζεται ως μια μεγάλη (έχει διάμετρο μεγαλύτερη από 2,5 cm), σφαιρική δομή σε μία από τις δύο ωοθήκες.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων είναι:

Ο μέσος όρος συγκέντρωσης της ρετινόλης στα κυρίαρχα ωοθυλάκια είναι 52,32 ng/mL, του *13-cis* ρετινοϊκού οξέος 0,52 ng/mL και του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος 0,92 ng/mL.

Στα υποτελή ωοθυλάκια οι αντίστοιχες τιμές είναι : 103,66 ng/mL για τη ρετινόλη, 0,43 ng/mL για το *13-cis* ρετινοϊκό οξύ και 0,55 ng/mL για το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ.

Στο δείγμα της κύστης τα επίπεδα της ρετινόλης είναι 129,6 ng/mL, του *13-cis* ρετινοϊκού οξέος 0,43 ng/mL, ενώ του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος είναι 0,54 ng/mL.

Στην ομάδα δειγμάτων των οποίων η κυριαρχία αμφισβητείται, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της ρετινόλης είναι 111,1 ng/mL, του *13-cis* 0,42 ng/mL και του *all-trans* 0,65 ng/mL.

Στο μείγμα πολλών υποτελών ωοθυλακίων η μέση τιμή των επιπέδων της ρετινόλης είναι 72,5 ng/mL, του *13-cis* 1,01 ng/mL και του *all-trans* 0,78 ng/mL.

Τα υψηλότερα επίπεδα της ρετινόλης είναι λογικό να εντοπίζονται στο δείγμα της κύστης, αφού το μέγεθός της ξεπερνά κατά πολύ αυτό των κυρίαρχων και υποτελών ωοθυλακίων. Όμως παραδόξως, η συγκέντρωση του *all-trans* και *13-cis* ρετινοϊκού οξέος είναι μικρότερη από αυτή των κυρίαρχων και υποτελών ωοθυλακίων. Συνεπώς ο ρυθμός μεταβολισμού της ρετινόλης είναι πολύ χαμηλός στο δείγμα της κύστης.

Από τη σύγκριση των επιπέδων των ρετινοειδών μεταξύ κυρίαρχων και υποτελών ωοθυλακίων προκύπτει ότι τα κυρίαρχα ωοθυλάκια διαθέτουν υψηλότερες συγκεντρώσεις *all-trans* και *13-cis* ρετινοϊκού οξέος, μα η συγκέντρωση της ρετινόλης είναι μικρότερη σε σχέση μ' αυτή των υπολειπόμενων ωοθυλακίων. Για την ακρίβεια η τιμή της συγκέντρωσης της ρετινόλης στα υποτελή ωοθυλάκια είναι σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη τιμή στα κυρίαρχα. Το γεγονός ότι η συγκέντρωση των οξέων είναι μεγαλύτερη στα κυρίαρχα ωοθυλάκια, δηλαδή τα ωοθυλάκια που είναι σε θέση να παράγουν ωάριο, αποτελεί μια ένδειξη του κρίσιμου ρόλου των ρετινοϊκών οξέων στην αναπαραγωγή. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα κυρίαρχα ωοθυλάκια διαθέτουν μεγάλες ποσότητες οιστραδιόλης. Έρευνες σε βοοειδή έχουν συσχετίσει την ανίχνευση των ρετινοϊκών οξέων στο ωοθυλακικό υγρό με αυξημένη παραγωγή στεροειδών ορμονών. Ενδεχομένως οι παρατηρήσεις αυτές να ερμηνεύουν τις αυξομειώσεις στη συγκέντρωση των οξέων στα δείγματα των προβάτων. Η μελλοντική ανάλυση περισσότερων δειγμάτων που θα αποφέρουν και στατιστικά αποτελέσματα, θα μπορέσει να επιβεβαιώσει έναν τέτοιο ισχυρισμό.

Στην εργασία αυτή μετρήθηκαν τα επίπεδα της ρετινόλης και των ρετινοϊκών οξέων στα ωοθυλακικά υγρά ανθρώπων και αγελάδων. Είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται η ύπαρξη ρετινοϊκού οξέος στο ωοθυλακικό υγρό και μετρώνται οι ποσότητές του. Η μελέτη αυτή μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση του πιθανού ρόλου των ρετινοειδών στην ωρίμανση του ωαρίου. Περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων οι οποίες πιθανόν να διερευνούν και την έκφραση γονιδίων θα συνεισφέρουν στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης των ρετινοειδών στην αναπαραγωγή.



## Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Τα ρετινοειδή (retinoids) είναι ουσίες με δράση βιταμίνης Α. Η βιταμίνη Α είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, λίγα όμως είναι γνωστά για την ύπαρξή της στο ωοθυλακικό υγρό και τον πιθανό ρόλο της στη διαδικασία ωρίμανσης του ωαρίου.<sup>(20)</sup> Στον άνθρωπο υπάρχει μόνο μια εργασία στην οποία έχουν μετρηθεί τα επίπεδα της ρετινόλης σε ωοθυλακικά υγρά.<sup>(34)</sup> Δεν έχει αναφερθεί ως τώρα ανίχνευση ρετινοϊκού οξέος σε ωοθυλακικό υγρό στον άνθρωπο ή σε ζώα.

Σκοπός της πειραματικής μελέτης είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των επιπέδων της ρετινόλης, του 13-*cis*-, του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος και του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος σε δείγματα ωοθυλακικών υγρών γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, καθώς και σε δείγματα ωοθυλακικών υγρών αγελάδων. Για την ανάλυση των δειγμάτων έγινε χρήση της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC), ενώ η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του ΤΖΠ του Τ.Ε.Ι. Λάρισας και έχει χρησιμοποιηθεί και για άλλες κλινικές μελέτες.

Δείγμα ωοθυλακικού υγρού ή ορού (200-1000μl) τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα, στον οποίο προστίθεται ίσος όγκος ακετονιτρίλιου (CH<sub>3</sub>CN). Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται σε vortex για 1min και κατόπιν φυγοκεντρείται για 10min στις 4000 στροφές. Μετά τη φυγοκέντρηση, 100μl από το υπερκείμενο εγχύονται στο σύστημα χρωματογραφίας HPLC. Μέχρι την ανάλυσή τους τα φυγοκεντρημένα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C.

Η χρωματογραφική ανάλυση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου με στήλη αναστροφής φάσης Hypesil Betabasic C18, διαστάσεων 250mm\*4,6mm. Η ανάλυση έγινε κάτω από ισοκρατικές συνθήκες έκλουσης με ροή 1ml/min. Η κινητή φάση συνίσταται από 15% Buffer (0,01M CH<sub>3</sub>COOH 0,2M, CH<sub>3</sub>COONa.2H<sub>2</sub>O), 7%THF, 35%MetOH, 43% CH<sub>3</sub>CN). Η τιμή της πίεσης είναι περίπου στα 100 bar και τη στιγμή της έκλουσης από τη στήλη η ρετινόλη και οι μεταβολίτες της ανιχνεύονται από ένα ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους στα 350nm. Οι χρόνοι έκλουσης του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του *all trans* ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης από τον UV ανιχνευτή (350nm) σε δείγματα ορού είναι 7,848min, 8,389min, 8,966 min, 14,154 min. αντίστοιχα. Το ποσοστό ανάκτησης της ρετινόλης είναι 97%, του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος 88%, του *all trans* ρετινοϊκού οξέος 97% και του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος 100%.

Παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ επιπέδων ρετινόλης και των ισομερών ρετινοϊκών οξέων στο ωοθυλακικό υγρό. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων των ουσιών που προσδιορίστηκαν στον ορό και στο ωοθυλακικό υγρό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών, υπάρχει αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης της ρετινόλης και των ενδο-ωοθυλακικών συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν να παρέχουν μια ένδειξη για το ρόλο της βιταμίνης Α στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Επιπλέον, το γεγονός ότι η συγκέντρωση του 13-*cis* και *all trans* είναι μεγαλύτερη στα κυρίαρχα ωοθυλάκια των προβάτων, δηλαδή τα ωοθυλάκια που είναι σε θέση να παράγουν ωάριο, είναι μια ένδειξη του κρίσιμου ρόλου των ρετινοϊκών οξέων στην αναπαραγωγή.

Η μελλοντική ανάλυση περισσότερων δειγμάτων θα αποφέρει στατιστικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου της βιταμίνης Α στην ωρίμανση του ωαρίου και διαδικασία της αναπαραγωγής.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Παράρτημα 1

Χημικά αναλώσιμα	Εταιρία
<i>13-cis</i> ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
<i>all trans</i> ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
<i>9-cis</i> ρετινοϊκό οξύ	Sigma, St. Louis, MO
ρετινόλη	Fluka (Buchs, Switzerland)
CH <sub>3</sub> COH	J.T.Baker HPLC Analyzed, Holland
CH <sub>3</sub> CN	Merck KGaA Darmstadt, Germany
HClO <sub>4</sub>	E.Merk, D-6100 Darmstadt, F.R.Germany
C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> ClNO <sub>4</sub>	Fluka, Switzerland
NaClO <sub>4</sub>	A Cros Organics, New Jersey, USA
CH <sub>3</sub> COOH	Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs
CH <sub>3</sub> COONa	PA Paureac, Barcelona, Espana
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	J.T. Baker, Holland
HNaO	Merk KGaA, Germany

### Παράρτημα 2

#### Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων βιταμίνης A

- Παρασκευή διαλύματος **stock** ROL συγκέντρωσης C:318.000 ngr/ml :  
Ζύγιση 31,8 mgr ROL σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη EtOH ως τα 100 ml.
- Παρασκευή διαλύματος **stock** *all-trans* συγκέντρωσης C:20.100ngr/ml:  
Ζύγιση 20,1 mgr *all-trans* σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη EtOH ως τα 100 ml. Λήψη 1 ml από και αραιώση του στα 10 ml με EtOH .
- Παρασκευή διαλύματος **stock** *13-cis* συγκέντρωσης C: 13.800 ngr/ml:  
Ζύγιση 13,8 mgr *13-cis* σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη EtOH ως τα 100 ml. Λήψη 1 ml από και αραιώση του στα 10 ml με EtOH .
- Παρασκευή διαλύματος **stock** *9-cis* συγκέντρωσης C: 20.000 ngr/ml:  
Ζύγιση 1 mgr *9-cis* σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη EtOH ως τα 100 ml.
- Παρασκευή διαλύματος **stock** RAL συγκέντρωσης C: 11.500 ngr/ml:  
Ζύγιση 11,5 mgr RAL σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθήκη EtOH ως τα 100 ml. Λήψη 1 ml από και αραιώση του στα 10 ml με EtOH .

## Παράρτημα 3

### Παρασκευή διαλύματος Spike

Προσθήκη σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml :

- 5 ml από το **stock ROL**
- 0,2 ml από το **stock all-trans**
- 0,2 ml από το **stock 13-cis**
- 0,2 ml από το **stock 9-cis**
- 0,2 ml από το **stock RAL**

Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου με CH<sub>3</sub>CN έως τα 50 ml.

### Παρασκευή διαλύματος ST1

Ανάμειξη:

- 1 ml από το διάλυμα Spike αναμειγνύεται με
- 0,7 ml Μεθανόλη και
- 0,3 ml buffer σύστασης (pH 5,4 (0,02M AcOH, 0,1M AcONa)).

## Παράρτημα 4

### Επαναληψιμότητα της μεθόδου

	ROL	13-cis	9-cis	all-trans	RAL
	50 μl spike σε 950μl διαλύτη				
	26,1	0,16	0,11	0,13	0,36
	26,8	0,16	0,12	0,14	0,35
	27,4	0,18	0,13	0,15	0,37
	26,8	0,16	0,12	0,14	0,35
	26,8	0,17	0,12	0,14	0,35
	27,1	0,17	0,12	0,15	0,34
<b>AV</b>	<b>26,83</b>	<b>0,17</b>	<b>0,12</b>	<b>0,14</b>	<b>0,35</b>
<b>SD</b>	0,43	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>CV%</b>	2%	5%	5%	5%	3%
	100 μl spike σε 900μl διαλύτη				
	45,6	0,28	0,2	0,23	0,61
	45,8	0,28	0,2	0,24	0,6
	47,1	0,3	0,22	0,25	0,62
	47,9	0,31	0,22	0,25	0,63
	47,2	0,3	0,22	0,25	0,61
	48,1	0,32	0,22	0,26	0,62
<b>AV</b>	<b>46,95</b>	<b>0,3</b>	<b>0,21</b>	<b>0,25</b>	<b>0,62</b>
<b>SD</b>	1,04	0,02	0,01	0,01	0,01
<b>CV%</b>	2%	5%	5%	4%	2%
	150 μl spike σε 850μl διαλύτη				
	72	0,43	0,33	0,38	0,94
	72,5	0,42	0,31	0,37	0,95
	76,2	0,45	0,34	0,4	0,99
	74,2	0,44	0,33	0,39	0,95

	75,2	0,44	0,33	0,39	0,94
	75,3	0,44	0,34	0,39	0,93
<b>AV</b>	<b>74,23</b>	<b>0,44</b>	<b>0,33</b>	<b>0,39</b>	<b>0,95</b>
<b>SD</b>	1,669331	0,010328	0,01	0,010328	0,020976
<b>CV%</b>	2%	2%	3%	3%	2%
50 µl spike σε 450µl CH <sub>3</sub> CN				+500µl	
				Ω.Υ	
	25,4	0,16	0,12	0,14	0,21
	25,9	0,17	0,13	0,15	0,22
	26,4	0,17	0,12	0,15	0,23
	24,7	0,16	0,11	0,14	0,21
	25,1	0,15	0,12	0,13	0,21
	27,2	0,18	0,13	0,15	0,23
<b>AV</b>	<b>25,78</b>	<b>0,17</b>	<b>0,12</b>	<b>0,14</b>	<b>0,22</b>
<b>SD</b>	0,915241	0,010488	0,007528	0,008165	0,009832
<b>CV%</b>	4%	6%	6%	6%	5%
100 µl spike σε 400µl CH <sub>3</sub> CN και 500µl Ω.Υ.					
	50,8	0,3	0,25	0,29	0,5
	50,1	0,3	0,24	0,28	0,53
	49,4	0,3	0,23	0,29	0,54
	46,8	0,27	0,22	0,27	0,53
	46	0,28	0,23	0,28	0,51
	45,6	0,27	0,22	0,27	0,5
<b>AV</b>	<b>48,12</b>	<b>0,29</b>	<b>0,23</b>	<b>0,28</b>	<b>0,52</b>
<b>SD</b>	2,250704	0,015056	0,01169	0,008944	0,017224
<b>CV%</b>	5%	5%	5%	3%	3%
150 µl spike σε 350µl CH <sub>3</sub> CN και 500µl Ω.Υ.					
	60,8	0,48	0,3	0,39	0,65
	60,1	0,49	0,3	0,41	0,67
	60,4	0,48	0,31	0,39	0,67
	61,4	0,49	0,3	0,4	0,65
	61,2	0,47	0,3	0,41	0,69
	60,8	0,48	0,31	0,39	0,68
<b>AV</b>	<b>60,78</b>	<b>0,48</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,67</b>
<b>SD</b>	0,483391	0,007528	0,005	0,009832	0,016021
<b>CV%</b>	1%	2%	2%	2%	2%
500µl CH <sub>3</sub> CN και		500µl ΩΥ			
	2,8	0,028		0,037	0,058
	2,9	0,03		0,037	0,059
	2,8	0,028		0,038	0,057
	2,8	0,029		0,039	0,058
	2,9	0,027		0,038	0,059
	2,8	0,027		0,038	0,056
<b>AV</b>	<b>2,83</b>	<b>0,03</b>		<b>0,04</b>	<b>0,06</b>
<b>SD</b>	0,05164	0,001169		0,000753	0,001169
<b>CV%</b>	2%	4%		2%	2%



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. David Zakim, Thoma D. Boyer: Hepatology a textbook of liver disease. Part 7: 215-243 (1996)
2. Risk Assessment: Vitamin A (Retinol), 2003: 110-126
3. Maria C. Linder: Nutritional Biochemistry and metabolism with clinical applications. 2<sup>nd</sup> Edition, International Edition
4. Heinz Nau and William S. Blaner: Retinoids the biochemical and molecular basis of Vitamin A and retinoid action. Volume 139 (1999)
5. Carsten K. Schmidt, Abraham Brouwer, Heinz Nau, 2002: Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Analytical Biochemistry* 315, 36-48
6. Παπανικολάου Γ. 1997, Σύγχρονη διατροφή και διατολογία. Εκδόσεις Θυμάρι
7. Florian J. Schweigert, Beate Steinhagen, Jens Raila, Anette Siemman, David Peet, Ulrich Buscher, 2003: Concentrations of carotenoids, retinol and  $\alpha$ -tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reproduction* 18, 1259-1264
8. M.A. Livrea: Vitamin A and retinoids: An update of biological aspects and clinical applications: 17-28. Iowa press
9. Joseph L. Napoli: Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. *J. Clinical Immunology and Immunopathology* Vol. 80, No. 3, September 1996, pp S52-S62
10. Zhengwei Fu, Hisanori Kato, Kunio Sugahara, Tatsuo Kubo, 2000: Retinoic acid accelerates the development of reproductive organs and egg production in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Biology of reproduction* 63, 1795-1800
11. Lee Russel McDowell: Vitamins in animal and human nutrition. Chapter 2: 16-82. 2<sup>nd</sup> Edition, Iowa State University Press.
12. C. Hildago, C. Diez, P. Duque, A. Rodriguez, F. Goyache, I. Fernandez, N. Facal, S. Ikeda, C. Alonso-Montes, E. Gomez, 2005: Oocytes recovered from cows treated with retinol become unviable as blastocysts produced in vitro. *Society of reproduction and fertility*, 411-421
13. S. Haliloglu, N. Baspinar, B. Serpek, H. Erdem, Z. Bulut, 2002: Vitamin A and  $\beta$ -Carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 96-99
14. Margaret Clagget-Dame, Hector F. DeLuca, 2002: The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 347-381
15. Wen Li Zheng, Richard A. Bucco, Elaine Sierra-Riviera, Kevin G. Osteen, Michael H. Melner, David E. Ong, 1999: Synthesis of retinoic acid by rat ovarian cells that express cellular retinoic acid-binding protein II. *Biology of reproduction* 60, 110-114
16. Ronald Wyss, 1995: Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *Journal of chromatography B* 671, 381-425
17. Jonathan T. Goldstein, Agnieszka Dobrzyn, Margaret Clagget-Dame, J. Wesley Pike, Hector F. DeLuca, 2003: Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X-receptor. *Archives of biochemistry and Biophysics* 420, 185-193
18. Noa Noy, 2000: Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochemical Society*, 481-494
19. A.N. Moulas, I.A. Zevros, I.A. Taitzoglou, M.P. Tsantarliotou, N.A. Botsoglou, 2003: Simultaneous determination of retinoic acid, retinol and retinyl palmitate in ram plasma by liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 26, 559-572
20. Whaley SL., Hedgpeth VS., Farin CE., Martus NS., Jayes FC., Britt JH., 2000: Influence of vitamin A injection before mating on oocyte development, follicular hormones and ovulation in gilts fed high energy diets. *J. Anim Sci* 78(6), 1598-15607
21. Julie Bastien and Cécile Rochette-Egly, 2004: Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *J. Gene* (328), 1-16
22. Δημήτριος Ε. Λώλης: Γυναικολογία και μαιευτική, 2<sup>ος</sup> Τόμος. Κεφάλαιο 7. Σελ. 79-92, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρηγόριος Παρισσιανός (1998)

23. Δημήτριος Ε. Λώλης: Γυναικολογία και μαιευτική, 1<sup>ος</sup> Τόμος. Κεφάλαια 4,6, 8. Σελ.88-92, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρηγόριος Παρισσιανός (1995)
24. Guyton & Hall: Ιατρική Φυσιολογία, 2<sup>ος</sup> τόμος, 9<sup>η</sup> έκδοση. Κεφάλαιο 81 Σελ.1211-1219. Κεφάλαιο 82 Σελ.1238-1239, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρηγόριος Παρισσιανός (1998)
25. J. Alison Brown, Dawn M. Eberhardt, F. Neal Schrick, Mary P. Roberts, James D. Godkin, 2003: Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. *Molecular reproduction and development* 64, 261-269
26. Maria Berrgren Soderlund, Goran A. Fex, Peter Nilsson-Ehle, 2005: Concentrations of retinoids in early pregnancy and in newborns and their mothers. *Am. J. Nutr.* 81, 633-636
27. Livera G., Rouiller-Fabre V., J. Valla, R. Habert, 2000: Effects of retinoids on the meiosis in the fetal ovary in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 165, 225-231
28. Yutaka Morita, Jonathan L. Tilly, 1999: Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. *Endocrinology* 140 (No 6), 2696-2703
29. S.L. Whaley, V.S. Hedgpeth, C.E. Farin, N.S. Martus, F.C.L. Jayes, J.H. Britt, 2000: Influence of vitamin A injection before mating on oocyte development, follicular hormones and ovulation in gilts fed high-energy diets. *American society of animal science* 78, 1598-1607
30. Vander, Sherman, Luciano, Μ. Τσακόπουλος : Φυσιολογία του ανθρώπου, Τόμος ΙΙ, έκδοση 8<sup>η</sup>, Κεφάλαιο 19, Σελ. 857-859, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης (2001)
31. Αθ. Σμοκοβίτης : Φυσιολογία, Κεφάλαιο 13 Σελ. 436-490, Εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη (1999)
32. C. Lanvers, G. Hempel, G. Blaschke, J. Boos, 1996: Simultaneous determination of all-trans, 13-cis and 9-cis retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans retinol in human plasma by HPLC. *Journal of chromatography B* 685, 233-240
33. A.K. Sakhi, T.E. Gundersen, S.M. Ulven, R. Blomhoff, E. Lundanes, 1998: Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by HPLC with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *Journal of chromatography A* 828, 451-460
34. Palan PR., Cohen BL., Barad DH, Romney SL., 1995: Effects of smoking on the levels of antioxidant beta carotene, alpha tocopherol and retinol in human ovarian follicular fluid. *Gynecol. Obstet. Invest.* 39, 43-46
35. Μ.Α. Κουπαρή, Θ.Π. Χατζηιωάννου : Ενόργανη Ανάλυση, Κεφάλαιο 20, Σελ. 482-491, Αθήνα (2000)
36. Lester Packer, Ute Obermuller-Jervis, Claus Kraemer, Helmut Fies : Carotenoids and retinoids, chapter 1, AOCS Press (2004).
37. Shuntaro Ikeda, Masayuki Kitagawa, Hiroshi Imai, Masayasu Yamada, 2005: The roles of Vitamin A for cytoplasmatic maturation of bovine oocytes. *Journal of reproduction and development*, vol51, No1, 23-35.