

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro*
παραγωγής εμβρύων βοοειδών με την προσθήκη
παραγόντων του πρωτεολυτικού ενζυμικού συστήματος
ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη**

ΘΩΜΑΣ Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Καρδίτσα 2007

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εφαρμογή *in vitro* τεχνικών στην αναπαραγωγή των αγροτικών ζώων και, ειδικότερα, η *in vitro* παραγωγή εμβρύων βοοειδών παρέχει τη δυνατότητα εντατικής αξιοποίησης ζώων υψηλών αποδόσεων, καθώς και επιτάχυνσης του ρυθμού γενετικής βελτίωσης. Όμως, οι τελικές αποδόσεις σε έμβρυα ικανά να μεταφερθούν σε ζώα-δέκτες, βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα, γεγονός που επιβαρύνει το τελικό κόστος ανά έμβρυο. Σήμερα, οι σημαντικότεροι στόχοι στο επίπεδο της παραγωγής εμβρύων βοοειδών είναι η μείωση της χρονικής διάρκειας εκτέλεσης των *in vitro* τεχνικών, με ταυτόχρονη βελτίωση της ποσότητας και ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων.

Στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων, για τους χειρισμούς των γαμετών και των παραγόμενων εμβρύων χρησιμοποιούνται υγρά υποστρώματα. Η σύνθεση των υποστρωμάτων αυτών μιμείται, κατά το δυνατόν, τη σύνθεση των βιολογικών τους αντίστοιχων, δηλαδή του ωοθυλακικού υγρού, του υγρού του ωαγωγού και του περιβάλλοντος της μήτρας. Οι μειωμένες αποδόσεις της *in vitro* παραγωγής εμβρύων αποδίδονται, σε μεγάλο βαθμό, στη σύνθεση αυτών των υποστρωμάτων. Διεθνώς, επιχειρείται βελτίωση του ποσοστού απόδοσης των τεχνικών με τροποποιήσεις της σύνθεσης των υποστρωμάτων.

Στις προσπάθειες αυτές δεν έχει διερευνηθεί πλήρως ο πιθανός ρόλος του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη», που συμμετέχει, *in vivo*, στη διαμόρφωση του περιβάλλοντος του ωαρίου, της γονιμοποίησης και του εμβρύου. Αυτό έχει ως πιθανό αποτέλεσμα τυχαίες παρεμβάσεις, σε σχέση με το ενζυμικό σύστημα, στο περιβάλλον των γαμετών και των εμβρύων. Δραστηριότητα του συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» έχει ανιχνευθεί στην ωοθήκη, στα ωοθυλάκια, στα κοκκώδη κύτταρα, στο ωάριο, στον ωαγωγό, στο σπέρμα, στο έμβρυο και στη μήτρα των βοοειδών. Το σύστημα αυτό φαίνεται ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, στην ωρίμανση των γαμετών, στη γονιμοποίηση, στην αντίδραση της διαφανούς ζώνης, στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην εγκατάστασή του στη μήτρα.

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, με την προσθήκη παραγόντων του

ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, στην αποτελεσματικότητα των επιμέρους σταδίων της IVP στα βοοειδή.

Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη» στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου και του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, καθώς και στα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων (IVP) βοοειδών. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης ουσιών που μετέχουν ή επηρεάζουν το ενζυμικό σύστημα [βόειου πλασμινογόνου, ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA), πλασμίνης και ε-αμινοκαπροϊκού οξέος, ε-aminocaproic acid, ε-ACA] στην ωρίμανση των ωαρίων, στην *in vitro* γονιμοποίησή τους και στην *in vitro* ανάπτυξη των εμβρύων.

Για τους σκοπούς της μελέτης έγινε αρχικά συλλογή ωοθυλακικού υγρού από προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια αγελάδων, καθώς και από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Σε αυτά τα βιολογικά υγρά, καθώς και στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης (IVM), γονιμοποίησης (IVF) των ωαρίων και καλλιέργειας των εμβρύων (IVC) προσδιορίστηκε, με φασματοφωτομετρική μέθοδο, η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών της πλασμίνης. Στα βιολογικά υγρά πραγματοποιήθηκε ακόμη ταυτοποίηση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Για την μελέτη της επίδρασης της προσθήκης βόειου πλασμινογόνου, ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA), πλασμίνης και ε-αμινοκαπροϊκού οξέος στην ωρίμανση των ωαρίων, στην *in vitro* γονιμοποίησή τους και στην *in vitro* ανάπτυξη των εμβρύων βοοειδών χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10639 ωάρια (Κατηγορία Α). Η τροποποίηση των υποστρωμάτων της IVP γινόταν σε κάθε στάδιο (IVM, IVF, IVC) ξεχωριστά και περιλάμβανε την προσθήκη 5 CU/0,1ml πλασμινογόνου, 0,5 IU/0,1ml u-PA, 50 IU/0,1ml t-PA, πλασμίνης (5 CU/0,1ml πλασμινογόνου + 1 IU/0,1ml u-PA) ή 10mM ε-ACA. Σε κάθε πειραματισμό περιλαμβανόταν, εκτός του τροποποιημένου ως προς ένα συγκεκριμένο παράγοντα υποστρώματος, ένα τυποποιημένο υπόστρωμα και ένα τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα. Για τη μελέτη της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVM πραγματοποιήθηκαν επώσεις διάρκειας 18 και 24 ωρών, που ακολουθούνταν είτε από εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων είτε από εκτίμηση της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης μέσω αξιολόγησης του

ποσοστού της γονιμοποίησης και της μετέπειτα εμβρυικής ανάπτυξης. Η μελέτη της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVF περιελάμβανε επώσεις διάρκειας 24 ωρών σε τυποποιημένο IVM υπόστρωμα, 24 ωρών στο τροποποιημένο υπόστρωμα της IVF και εκτίμηση του ποσοστού γονιμοποίησης και εξέλιξης των εμβρύων μετά από 48ωρη επώαση σε τυποποιημένο IVC υπόστρωμα. Για τη μελέτη της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVC στην εξέλιξη των εμβρύων τις επώσεις 24ωρης διάρκειας στα υποστρώματα της IVM και IVF ακολουθούσε 48ωρη καλλιέργεια των εμβρύων και εκτίμηση του ποσοστού που αναπτύχθηκε.

Η στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδήγησε στις παρακάτω διαπιστώσεις:

- α) Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου είναι σημαντικά αυξημένη στο υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου σε σχέση με αυτή που ανιχνεύθηκε στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων.
- β) Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών της πλασμίνης στα τυποποιημένα υποστρώματα είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτή που ανιχνεύθηκε στο ωοθυλακικό υγρό τόσο του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου όσο και του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Στο ωοθυλακικό υγρό ταυτοποιήθηκαν και οι δύο ενεργοποιοί του πλασμινογόνου.
- γ) Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVM με την προσθήκη ε-ACA προκάλεσε σημαντική καθυστέρηση στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων τόσο μετά από 18ωρης όσο και μετά από 24ωρης διάρκειας επώσεις. Μετά από 18ωρη επώαση των ωαρίων παρατηρήθηκε, επίσης, σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησής τους. Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVM με την προσθήκη πλασμίνης οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων και της γονιμοποίησης μετά από 18ωρη επώαση, τόσο σε σχέση με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο όσο και με το τυποποιημένο υπόστρωμα.
- δ) Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVF με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού της γονιμοποίησης, καθώς και της μετέπειτα ανάπτυξης των εμβρύων σε σχέση, τόσο με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο

όσο και με το τυποποιημένο υπόστρωμα. Η προσθήκη t-PA στο υπόστρωμα της IVF οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης σε σχέση τόσο με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο όσο και με το τυποποιημένο υπόστρωμα.

ε) Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων σε σχέση τόσο με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο όσο και με το τυποποιημένο υπόστρωμα. Η προσθήκη u-PA στο υπόστρωμα της IVC οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων σε σχέση, τόσο με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο όσο και με το τυποποιημένο υπόστρωμα.

Από τη μελέτη αυτή συμπεραίνονται τα παρακάτω:

- 1) Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στο υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου των βοοειδών εμφανίζεται αυξημένη σε σχέση με αυτή του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για τη συμμετοχή του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη στην ωρίμανση του ωαρίου. Παράλληλα, η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος στα υποστρώματα της IVP είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με αυτή που επικρατεί στις *in vivo* συνθήκες.
- 2) Η αδρανοποίηση του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου πλασμίνη με την προσθήκη ε-ACA, στο περιβάλλον της IVP επηρεάζει αρνητικά την ωρίμανση και γονιμοποίηση των ωαρίων αλλά και την εξέλιξη των εμβρύων.
- 3) Η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της IVM, t-PA στο υπόστρωμα της IVF ή u-PA στο υπόστρωμα της IVC επηρεάζει θετικά την ωρίμανση, την γονιμοποίηση και την εξέλιξη των εμβρύων, αντίστοιχα και πιθανώς η χρησιμοποίησή τους θα μπορούσε να συμβάλει στη βελτίωση των αποδόσεων της IVP.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

| | |
|---|--------------------------------|
| Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος Καθηγητής | Επιβλέπων |
| Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας | |
| Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής | Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής |
| Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας | |
| Κ. Ρέκκας, Αναπληρωτής Ερευνητής | Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής |
| Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης | |

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

| | |
|--------------------------------------|---|
| Ν. Κοκόλης, Καθηγητής | Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης |
| Κ. Μπόσκος, Καθηγητής | Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης |
| Φ. Σαράτσης, Καθηγητής | Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης |
| Ι. Μενεγάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής | Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| Ι. Ταϊτζόγλου, Αναπληρωτής Καθηγητής | Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης |
| Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής | Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος Καθηγητής | Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**Modification of the *in vitro* bovine embryo production
media using members of the plasminogen
activator/plasmin proteolytic system**

THOMAS G. PAPANIKOLAOU
DVM

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

Karditsa, Greece 2007

ABSTRACT

It is generally accepted that the *in vitro* embryo production (IVP) protocols are still far from ideal. The development of optimal conditions for IVP has been a step upon step procedure. The understanding of the mechanisms governing basic biological processes is necessary in this procedure.

Plasminogen is an extracellular proenzyme, abundant in blood plasma and most extracellular fluids. Plasminogen activators (PAs) are proteolytic enzymes, capable of converting plasminogen into the broad-spectrum, trypsin-like proteinase, plasmin. The precise temporal and spatial regulation of plasminogen activator(s) or plasmin activity is controlled by plasminogen activator inhibitors and plasmin inhibitors, respectively. In many animal species and the bovine, members of the plasminogen activators/plasmin system or their activity have been shown in follicular fluid, cumulus-oocyte complexes (COCs), oocytes, and cumulus-cell cultures. Plasminogen activators and other members of the plasmin proteolytic system or their activity have been also shown in oviduct, in whole sperm extracts and in sperm plasma and outer acrosomal membrane extracts. Members of the plasmin system or their activity have been found in embryos from the zygote until the hatched blastocyst stage.

Extracellular proteolysis, linked with plasminogen activator/plasmin system activity, is probably implicated in physiological processes, such as cumulus-cell layer expansion, oocyte maturation, fertilization, zona reaction and embryo implantation.

These findings provide evidence for a role of plasmin system in reproduction. Considering that *in vitro* embryo production (IVP) media emulate, to a degree, the *in vivo* conditions, the plasminogen activator/plasmin system presence and/or activity in the IVP procedure is possibly a factor that could affect IVP outcome. The aim of the present study was to examine the role of addition of urokinase plasminogen activator (u-PA), tissue type plasminogen activator (t-PA), plasmin or plasmin inhibitor (ϵ -ACA) into the different stages of bovine IVP procedure.

In the first part of this study plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in preovulatory and mid-cycle dominant follicle follicular fluid, as well as in *in vitro* maturation, fertilization and embryo culture media were determined. In follicular fluid samples PAs activity was identified. In the second

part of this study four major categories of experiments using 10.639 COCs were conducted. In the first one *in vitro* maturation medium was modified by addition of plasminogen (5 CU/0.1ml), u-PA (0.5 IU/0.1ml), t-PA (50 IU/0.1ml), plasmin (5 CU/0.1ml plasminogen + 1 IU/0.1ml u-PA and preincubation for 30 min) or ϵ -ACA (10 mM). After 18 or 24 hour incubation, oocytes were fixed and stained, in order to estimate the effect of IVM medium modification on nuclear maturation. In the second category after 18 or 24 hour incubation, as above, the oocytes underwent IVF and IVC, in order to estimate the effect of IVM medium modification on cytoplasmic maturation. In the third category, IVF medium was modified by addition of plasminogen (5 CU/0.1ml), u-PA (0.5 IU/0.1ml), t-PA (50 IU/0.1ml), plasmin (5 CU/0.1ml plasminogen + 1 IU/0.1ml u-PA and preincubation for 30 min) or ϵ -ACA (10 mM). After 24 hour incubation in the IVF medium, presumptive embryos were transferred in control IVC medium and 48 hour later incubation was terminated, in order to estimate the effect of IVF medium modification on fertilization and subsequent embryo development. In the fourth category IVC medium was modified by the addition of plasminogen (5 CU/0.1ml), u-PA (0.5 IU/0.1ml), t-PA (50 IU/0.1ml), plasmin (5 CU/0.1ml plasminogen + 1 IU/0.1ml u-PA and preincubation for 30 min) or ϵ -ACA (10 mM). After 24h incubation in controls IVM and IVF media presumptive embryos were transferred in the modified IVC medium. The estimation of embryo development was made at 48h of incubation. In each experiment, one standardized medium served as control, while a second plasminogen-supplemented medium was also included. The modification of the media was performed only to one phase of IVP each time.

Our results are as follows:

- 1) a. PAA of preovulatory and mid-cycle dominant follicle follicular fluid was significantly higher compared to PAA detected in IVM, IVF and IVC media. PAI and PI of preovulatory and mid-cycle dominant follicle follicular fluid were significantly higher compared to PAI and PI detected in IVM, IVF and IVC media.
- b. PAA and PAI of the follicular fluid of preovulatory follicle were significantly higher compared to PAA and PAI of mid-cycle dominant follicle follicular fluid.
- c. In follicular fluid samples both plasminogen activators were identified.

- 2)
 - a. Addition of plasmin in the IVM medium significantly increased the percentage of matured and cleaved oocytes after 18 hour incubation compared to control or plasminogen-modified groups.
 - b. Addition of t-PA in the IVF medium significantly increased the percentage of cleavage compared to control or plasminogen-modified groups.
 - c. Addition of u-PA in the IVC medium significantly increased embryo development rates compared to control and plasminogen-modified groups.
 - d. Addition of ϵ -ACA in the IVM medium significantly decreased the percentage of matured oocytes, regardless of the incubation period, compared to control or plasminogen-modified groups. At 18 hour incubation period addition of ϵ -ACA in the IVM medium significantly decreased the percentage of cleavage compared to control or plasminogen-modified groups.
 - e. Addition of ϵ -ACA in the IVF medium significantly decreased the percentage of cleavage and embryo development compared to control or plasminogen-modified groups.
 - f. Addition of ϵ -ACA in the IVC medium significantly decreased the embryo development rates compared to control or plasminogen-modified groups.

In conclusion, the plasminogen activator/plasmin system activity in standard IVP media does not resemble to in vivo conditions. When approaching ovulation, follicular fluid PAA and PAI are increased suggesting a role of the plasminogen activator/plasmin system in oocyte maturation. The inhibition of the plasminogen activator/plasmin system by addition of ϵ -ACA adversely affected the outcome of IVM, IVF and IVC procedures. This finding provides evidence for the significant role of the plasminogen activator/plasmin system in the IVP procedure. Our findings showed that u-PA, t-PA and plasmin effects vary among the different stages of IVP. These findings suggest that members of plasminogen activator/plasmin system have a multilevel action, which might be possibly due to an interaction with binding sites, specific receptors and activation of metabolic and biochemical signalling pathways.

ADVISORY COMMITTEE

Assistant professor G.S. Amiridis

Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Supervisor

Associate professor G.C. Fthenakis

Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Member of the advisory committee

Associate Researcher C. Rekkas

Veterinary Research Institute, N.A.G.R.E.F.

Member of the advisory committee

EXAMINATION BOARD

Professor N. Kokolis

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor C. Boscov

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor Ph. Saratsis

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Associate professor I. Menegatos

Agricultural University of Athens

Associate professor I. Taitzoglou

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Associate professor G.C. Fthenakis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Assistant professor G.S. Amiridis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 2 |
| ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ | 6 |
| ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ..... | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| ADVISORY COMMITTEE..... | 11 |
| EXAMINATION BOARD..... | 11 |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | 12 |
| Κατάλογος συντομογραφιών..... | 16 |
| Κατάλογος πινάκων – εικόνων..... | 18 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 23 |
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ | 25 |
| 1.1 Ωρίμανση - γονιμοποίηση ωαρίων και ανάπτυξη εμβρύων βοοειδών | 26 |
| 1.2 Το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» στο γεννητικό σύστημα | 35 |
| 1.3 Το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» | 38 |
| 1.3.1 Πλασμινογόνο | 41 |
| 1.3.2 Ενεργοποιό του πλασμινογόνου | 42 |
| 1.3.3 Πλασμίνη | 45 |
| 1.3.4 Αδρανοποιό των ενεργοποιών του πλασμινογόνου | 46 |
| 1.3.4.1 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 1 (PAI-1)..... | 47 |
| 1.3.4.2 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 2 (PAI-2)..... | 48 |
| 1.3.4.3 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 3 (PAI-3)..... | 48 |
| 1.3.4.4 Πρωτεϊνάση νεξίνη (PN-1)..... | 48 |
| 1.3.5 Αδρανοποιό της πλασμίνης..... | 49 |
| 1.3.5.1 α ₂ -αντιπλασμίνη | 50 |
| 1.3.5.2 α ₂ -μακροσφαιρίνη..... | 50 |
| 1.3.6 Τεχνητοί-συνθετικοί αδρανοποιό του συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη. | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4 Ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη» | 51 |
| Σκοπός της Διατριβής..... | 53 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 56 |
| 2.1 Πειραματικός σχεδιασμός..... | 56 |
| 2.2 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP των βοοειδών..... | 57 |
| 2.2.1 Συλλογή βιολογικών υγρών | 57 |
| 2.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων των υποστρωμάτων της IVP..... | 58 |
| 2.2.3 Ενζυμικοί προσδιορισμοί..... | 58 |
| 2.3 Παραγωγή εμβρύων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> embryo production, IVP)..... | 61 |
| 2.3.1 Συλλογή ωοθηκών-ωαρίων | 61 |
| 2.3.2 Ωρίμανση ωαρίων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> oocyte maturation, IVM) | 63 |
| 2.3.3 Εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων | 63 |
| 2.3.4 Προετοιμασία του σπέρματος (εμπλουτισμός του σπέρματος και ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων)..... | 67 |
| 2.3.5 Γονιμοποίηση ωαρίων <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> fertilization, IVF)..... | 68 |
| 2.3.5.1 Εκτίμηση της <i>in vitro</i> γονιμοποίησης των ωαρίων | 68 |
| 2.3.6 Εξέλιξη των εμβρύων- <i>in vitro</i> καλλιέργεια των εμβρύων (<i>in vitro</i> embryo culture-IVP) | 69 |
| 2.3.6.1 Συγκαλλιέργεια με κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. | 69 |
| 2.3.6.2 Εκτίμηση της <i>in vitro</i> εξέλιξης των εμβρύων | 69 |
| 2.3.7 Παρασκευή υλικών και υποστρωμάτων | 72 |
| 2.3.7.1 Νερό | 72 |
| 2.3.7.2 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων κατά Dulbecco (PBS) και υπόστρωμα έκπλυσης | 72 |
| 2.3.7.3 Υπόστρωμα ωρίμανσης ωαρίων | 73 |
| 2.3.7.3.1 MPM | 73 |
| 2.3.7.3.2 Ορός αγελάδας σε οίστρο (Oestrus Cow Serum, OCS)..... | 74 |
| 2.3.7.3.3 Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη | 74 |
| 2.3.7.4 Υπόστρωμα ενεργοποίησης σπερματοζωαρίων | 75 |
| 2.3.7.4.1 Υπόστρωμα Sperm TL-stock..... | 75 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.7.5 Υπόστρωμα γονιμοποίησης | 76 |
| 2.3.7.5.1 Υπόστρωμα TL-Stock..... | 76 |
| 2.3.7.5.2 Ηπαρίνη..... | 77 |
| 2.3.7.6 Υπόστρωμα καλλιέργειας ζυγωτών-εμβρύων | 77 |
| 2.3.7.7 Παραφινέλαιο | 77 |
| 2.3.7.8 Χρώση παρασκευασμάτων-Παρασκευή διαλύματος ορκεΐνης | 78 |
| 2.3.7.8.1 Παρασκευή διαλύματος ορκεΐνης..... | 78 |
| 2.3.8 Αποστείρωση υλικών και υποστρωμάτων | 78 |
| 2.3.9 Τροποποιήσεις υποστρωμάτων | 79 |
| 2.4 Πρωτόκολλο πειραματισμών | 79 |
| 2.5 Στατιστική ανάλυση..... | 83 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 84 |
| 3.1 Δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη στο ωθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. | 84 |
| 3.2 Τροποποίηση των υποστρωμάτων της in vitro ωρίμανσης των ωαρίων | 87 |
| 3.2.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα της in vitro ωρίμανσης | 87 |
| 3.2.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA στο υπόστρωμα της in vitro ωρίμανσης | 87 |
| 3.2.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης στο υπόστρωμα της in vitro ωρίμανσης..... | 88 |
| 3.2.4 Επίδραση της προσθήκης ε-ACA στο υπόστρωμα της in vitro ωρίμανσης | 88 |
| 3.3 Τροποποίηση των υποστρωμάτων της in vitro γονιμοποίησης | 103 |
| 3.3.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα της in vitro γονιμοποίησης..... | 103 |
| 3.3.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA στο υπόστρωμα της in vitro γονιμοποίησης | 103 |
| 3.3.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης στο υπόστρωμα της in vitro γονιμοποίησης..... | 103 |
| 3.3.4 Προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα της in vitro γονιμοποίησης..... | 103 |
| 3.4 Τροποποίηση των υποστρωμάτων της in vitro ανάπτυξης-καλλιέργειας των εμβρύων | 108 |
| 3.4.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα της in vitro καλλιέργειας των εμβρύων | 108 |
| 3.4.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA στο υπόστρωμα της in vitro καλλιέργειας των εμβρύων | 108 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης στο υπόστρωμα της in vitro καλλιέργειας των εμβρύων | 108 |
| 3.4.4 Προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα της in vitro καλλιέργειας των εμβρύων. | 108 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 111 |
| 4.1 Δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στα ωοθυλάκια..... | 113 |
| 4.2 Τροποποίηση του υποστρώματος της in vitro ωρίμανσης των ωαρίων | 115 |
| 4.3 Τροποποίηση του υποστρώματος της in vitro γονιμοποίησης | 125 |
| 4.4 Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης/καλλιέργειας των εμβρύων | 133 |
| Γενικά συμπεράσματα της μελέτης..... | 142 |
| Προοπτικές της έρευνας..... | 143 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 145 |

Κατάλογος συντομογραφιών

ANOVA: *analysis of variance*/ ανάλυση διακύμανσης

cAMP: *cyclic adenosine monophosphate*/ κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

COCs: *cumulus-oocyte complexes* / συμπλέγματα ωαρίων –ωοφόρων δίσκων

ε-ACA: ε- aminocaproic acid / ε- αμινοκαπροϊκό οξύ

EGF: *epidermal growth factor*/ επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

FSH: *follicle-stimulating hormone*/ ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη

GV: *germinal vesicle*/ βλαστικό κυστίδιο

IGFs: *insulin-like growth factors* / αυξητικοί παράγοντες τύπου ινσουλίνης, παρόμοιοι της ινσουλίνης αυξητικοί παράγοντες.

IGFBPs*: *insulin like growth factor binding proteins*/ πρωτεΐνες που δεσμεύουν τους IGFs.

IVC: *in vitro culture*/ *in vitro* καλλιέργεια

IVF: *in vitro fertilization*/ *in vitro* γονιμοποίηση

IVM: *in vitro maturation*/ *in vitro* ωρίμανση

IVP: *in vitro embryo production*/ *in vitro* παραγωγή εμβρύων

KL*: *kit ligand* ή *Steel factor* ή *Stem cell factor*/

LH: *luteinizing hormone*/ ωχρινοποιητική ορμόνη

MAPKs*: *mitogen-activated protein kinases*/

MAS*: *mitogenic activating sterol*

MMP-system: *matrix metalloproteinase system*/ σύστημα των μεταλλοπρωτεϊνών της διάμεσης ουσίας

MMPs* : *matrix metalloproteinases*/ μεταλλοπρωτεϊνάσες της διάμεσης ουσίας, ένζυμα του MMP-system

MPF*: *maturation promoting factor*/ ενισχυτικός παράγοντας ωρίμανσης

MPM: *modified Parker's medium*/ τροποποιημένο υπόστρωμα κατά Parker

OCS: *oestrous cow serum*/ ορός αγελάδας σε οίστρο

PAA: *plasminogen activator activity*/ δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

PAI: *plasminogen activator inhibition*/ δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

PAIs: *plasminogen activator inhibitors*/ αδρανοποιεί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

PAs: *plasminogen activators*/ ενεργοποιεί του πλασμινογόνου

PI: *plasmin inhibition*/ δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης

PKC: *protein kinase C* / πρωτεϊνική κινάση C

PLC: *phospholipase C*/ φωσφολιπάση C

PN-1: *protease nexin I*/ πρωτεϊνάση νεξίνη

RIA: *radioimmunoassay* / ραδιοανοσολογική μέθοδος

TCM199: *tissue culture medium 199*/ θρεπτικό υπόστρωμα 199

TGFβ*: *transforming growth factor β* / μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β και μέλη της οικογένειας αυτού

TNF*: *tumor necrosis factor*/ παράγοντας νέκρωσης των νεοπλασιών

t-PA: *tissue-type plasminogen activator*/ ενεργοποιός του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου

tPAI: *PAI against t-PA*/ έναντι του t-PA δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

u-PA: *urokinase-type plasminogen activator*/ ενεργοποιός του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης

uPAI: *PAI against u-PA*/ έναντι του u-PA δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

uPAR: *u-PA receptor*/ υποδοχέας της κυτταρικής μεμβράνης για τον ενεργοποιό του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης

* δεν έχει ακόμη καθιερωθεί έγκυρος ελληνικός όρος

Κατάλογος πινάκων – εικόνων

Πίνακες

Σελ.

| | | |
|-----------|---|-----------|
| Πίνακας 1 | α. Κατανομή των ωαρίων που καλλιεργήθηκαν σε 18ωρη και 24ωρη IVM για την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων στην ωρίμανση του πυρήνα τους. β. Κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVM (18ωρης και 24ωρης) στην κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων. γ. Κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της IVF και IVC..... | 82 |
| Πίνακας 2 | Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA), των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (tPAI, uPAI) και των αδρανοποιών της πλασμίνης (PI) στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. Δίνονται οι μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση (sd)..... | 85 |
| Πίνακας 3 | Ταυτοποίηση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA, u-PA) στο ωοθυλακικό υγρό με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων (αντι- t-PA IgG και αντι- u-PA IgG). Εξουδετέρωση της δραστηριότητας του u-PA με τη χρήση αμιλορίδης. Παρέχονται τα όρια της εξουδετέρωσης της δραστηριότητας %..... | 85 |
| Πίνακας 4 | Επίδραση των u-PA και t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη τους στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 90 |
| Πίνακας 5 | Επίδραση των u-PA και t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη τους στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 91 |

| | | |
|------------|--|------------|
| Πίνακας 6 | Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 93 |
| Πίνακας 7 | Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 94 |
| Πίνακας 8 | Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 95 |
| Πίνακας 9 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 96 |
| Πίνακας 10 | Επίδραση των u-PA, t-PA ή της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 97 |
| Πίνακας 11 | Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 97 |
| Πίνακας 12 | Επίδραση των u-PA, t-PA, της πλασμίνης ή του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 100 |
| Πίνακας 13 | Επίδραση του u-PA ή της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVF..... | 104 |
| Πίνακας 14 | Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF..... | 106 |
| Πίνακας 15 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF..... | 107 |
| Πίνακας 16 | Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVC | 109 |
| Πίνακας 17 | Επίδραση του t-PA ή της πλασμίνης στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVC | 109 |
| Πίνακας 18 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVC | 109 |

Εικόνες

| | | |
|-----------|--|-----------|
| Εικόνα 1 | Το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη..... | 40 |
| Εικόνα 2 | Ωάρια που συλλέχθηκαν μετά την αναρρόφηση (α) (x50). Επιλογή των Α κατηγορίας COCs (β) (x75)..... | 65 |
| Εικόνα 3 | Ωάρια πριν από την έναρξη της IVM (α). Ωάρια μετά από την IVM, όπου διακρίνεται η επέκταση του ωοφόρου δίσκου (β) (x100)..... | 65 |
| Εικόνα 4 | Ωάρια μετά από 18ωρη ή 24ωρη IVM. Μονιμοποίηση και χρώση με ορκεΐνη 2%. Διακρίνονται τα χρωματοσώματα στο στάδιο της μετάφασης I (α), της ανάφασης I (β), της τελόφασης I (γ) και της μετάφασης II (δ) (x1000). Ωριμα χαρακτηρίστηκαν τα ωάρια των δύο τελευταίων σταδίων..... | 66 |
| Εικόνα 5 | Έμβρυα στο τέλος της 48ωρης IVC (α) (x100). Εκτίμηση της γονιμοποίησης των ωαρίων και της εξέλιξης των εμβρύων μετά την απογύμνωσή τους σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 2,96% (β) (x200)..... | 71 |
| Εικόνα 6 | Ωάριο που δεν παρουσίασε αυλάκωση-αγονιμοποίητο (α) (x400). Γονιμοποιημένο ωάριο στο στάδιο των προπυρήνων (β) (x400). Έμβρυα στο στάδιο των 2 (βέλος) και των 4 κυττάρων (γ) (x200). Έμβρυα στο στάδιο των 8-16 κυττάρων (δ) (x400). Τα έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα θεωρούνταν αναπτυγμένα..... | 71 |
| Εικόνα 7 | Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) στο ωοθυλακικό υγρό και στα υποστρώματα της IVP..... | 86 |
| Εικόνα 8 | Δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI) στο ωοθυλακικό υγρό και στα υποστρώματα της IVP..... | 86 |
| Εικόνα 9 | Δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης (PI) στο ωοθυλακικό υγρό και στα υποστρώματα της IVP..... | 87 |
| Εικόνα 10 | Επίδραση του u-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 90 |
| Εικόνα 11 | Επίδραση του t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 91 |
| Εικόνα 12 | Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 92 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| Εικόνα 13 | Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 92 |
| Εικόνα 14 | Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 93 |
| Εικόνα 15 | Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 94 |
| Εικόνα 16 | Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 95 |
| Εικόνα 17 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM..... | 96 |
| Εικόνα 18 | Επίδραση του u-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 98 |
| Εικόνα 19 | Επίδραση του t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 98 |
| Εικόνα 20 | Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 99 |
| Εικόνα 21 | Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 99 |
| Εικόνα 22 | Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 101 |
| Εικόνα 23 | Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 101 |
| Εικόνα 24 | Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 102 |
| Εικόνα 25 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης IVM..... | 102 |
| Εικόνα 26 | Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα IVF..... | 105 |
| Εικόνα 27 | Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα IVF..... | 105 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| Εικόνα 28 | Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα IVF..... | 106 |
| Εικόνα 29 | Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα IVF..... | 107 |
| Εικόνα 30 | Επίδραση της προσθήκης των u-PA (α), t-PA (β), πλασμίνης (γ) ή ε-ACA (δ) στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVC..... | 110 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι τεχνικές της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών έχουν σημειώσει αξιοσημείωτη πρόοδο στα πλαίσια της προσπάθειας εντατικής εκμετάλλευσης αγελάδων υψηλής γενετικής αξίας και της επιτάχυνσης του ρυθμού γενετικής βελτίωσης ενός πληθυσμού. Ωστόσο, παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί στις εφαρμοζόμενες τεχνικές, οι επιμέρους απώλειες στα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών οδηγούν αθροιστικά σε χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, σε σχέση με την αντίστοιχη αναπαραγωγική διαδικασία *in vivo*. Η σύνθεση των υποστρωμάτων θεωρείται μία από τις πιθανότερες αιτίες των χαμηλών αποδόσεων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων. Σε *in vivo* συνθήκες το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη φαίνεται πως συμμετέχει στην ωρίμανση των ωαρίων, στην γονιμοποίησή τους αλλά και στην ανάπτυξη των εμβρύων. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, με την προσθήκη παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, στην αποτελεσματικότητα των επιμέρους σταδίων της IVP, στα βοοειδή.

Η παρούσα διατριβή αποτελεί προϊόν συνεργασίας της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης.

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

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

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον αναπληρωτή ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Κ. Ρέκκα για την σημαντική καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια που προσέφερε σε κάθε στάδιο της παρούσας μελέτης.

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

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την τακτική ερευνήτρια και Διευθύντρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Σ. Κουρλετάκη-Μπελιμπασάκη, που συνέβαλε στην εκπόνηση μεγάλου μέρους της διατριβής στο Ινστιτούτο.

Στην εντεταλμένη ερευνήτρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Φ. Σαμαρτζή εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την ιδιαίτερα σημαντική συμβολή της στην εκμάθηση εργαστηριακών τεχνικών, καθώς και για την πάντα πρόθυμη και πολύτιμη βοήθειά της.

Ευχαριστώ τον διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, συνάδελφο, συνεργάτη και φίλο κ. Ι. Δημητριάδη για την άψογη συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθειά του ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραματισμών.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Μαριάννα Φλώρου και σε όλους εκείνους, που με στήριζαν σε όλο το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την εταιρεία ΦΑΓΕ για την οικονομική στήριξη που παρείχε στην προσπάθεια αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αγάπη, την υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η έρευνα για την ανάπτυξη και την εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων στην αναπαραγωγή των βοοειδών έχει ως στόχο την ποιοτική και ποσοτική βελτίωση των αποδόσεων της με το μικρότερο δυνατό κόστος. Στη διαδικασία της επιτάχυνσης του ρυθμού της γενετικής βελτίωσης, ο στόχος της αύξησης των αναπαραγωγικών αποδόσεων κατέχει σημαίνοντα ρόλο. Παράλληλα, η μείωση του μεσοδιαστήματος των γενεών, η παραγωγή μεγάλου αριθμού απογόνων από υψηλής γενετικής αξίας ζώα, καθώς και η εξυπηρέτηση των αναγκών της έρευνας μπορούν σήμερα να στηριχθούν, σε σημαντικό βαθμό, στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων.

Η διαδικασία της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (*in vitro* embryo production, IVP) περιλαμβάνει την *post mortem* ή *in vivo* συλλογή ωαρίων από ωοθήκες ζώων, την *in vitro* ωρίμανση (*in vitro* maturation, IVM) και γονιμοποίησή τους (*in vitro* fertilization, IVF), καθώς και την καλλιέργεια των παραγόμενων εμβρύων (*in vitro* embryo culture, IVC) μέχρι το στάδιο της βλαστικής κύστης (βλαστοκύστης).

Η απόδοση της διαδικασίας της IVP παραμένει μέχρι σήμερα αρκετά χαμηλή. Εκτιμάται ότι 15 έως 20% των καλλιεργούμενων ωαρίων ή 25 έως 30% των γονιμοποιημένων ωαρίων εξελίσσονται σε μορίδια ή βλαστοκύστες (Gordon 1994, Hendriksen και συν. 2000, Rizos και συν. 2002, Ward και συν. 2002, Kniijn και συν. 2003). Τα υπόλοιπα εκφυλίζονται και υφίστανται κυτταρικό θάνατο σε κάποιο στάδιο της IVP (Betteridge 1988, Merton και συν. 2003).

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στις επιμέρους τεχνικές παραγωγής εμβρύων, η υπεροχή των *in vivo* σε σχέση με τις *in vitro* μεθόδους, παραμένει σημαντική. Η βελτίωση των αποδόσεων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων προϋποθέτει κατανόηση των φυσιολογικών διεργασιών της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, της ωοθυλακιορρηξίας, της ωρίμανσης και της γονιμοποίησης του ωαρίου, καθώς και της ανάπτυξης του πρώιμου εμβρύου.

1.1 Ωρίμανση - γονιμοποίηση ωαρίων και ανάπτυξη εμβρύων βοοειδών

- Ωρίμανση των ωαρίων *in vivo*

Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, τα ωοκύτταρα εισέρχονται στην μείωση και η εξέλιξή τους αναστέλλεται στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Στο στάδιο αυτό χαρακτηρίζονται ως πρωτογενή ωοκύτταρα και διακρίνονται από την παρουσία ενός μεγάλου σφαιρικού πυρήνα, του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV). Το ωοκύτταρο και ο ένας στοίχος αδιαφοροποίητων επιθηλιακών κυττάρων (πρόδρομων των κυττάρων του κοκκώδους υμένα) που το περιβάλλουν, αποτελούν το αρχέγονο ωοθυλάκιο (Erikson 1966, Eppig 1991, Μιχαήλ 1996). Σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του θηλυκού, ομάδες πρωτογενών ωοκυττάρων εισέρχονται στη φάση της ανάπτυξης. Η όλη διαδικασία της ανάπτυξης ενός ωοκυττάρου περιλαμβάνει αλλαγές στη μορφολογία και στον αριθμό των επιθηλιακών κυττάρων που το περιβάλλουν, με αποτέλεσμα την δημιουργία του πρωτογενούς και του δευτερογενούς ωοθυλακίου. Παράλληλα, καθώς το ωοθυλάκιο αναπτύσσεται, το ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα σύνθετο στρώμα γλυκοπρωτεϊνικής φύσης, τη διαφανή ζώνη.

Στο τριτογενές ωοθυλάκιο ανευρίσκονται δύο πληθυσμοί κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης. Ο πρώτος συγκροτεί τον κοκκώδη υμένα και αποτελεί το εσωτερικό τοίχωμα του ωοθυλακίου και ο δεύτερος πληθυσμός κυττάρων σχηματίζει τον ωοφόρο δίσκο και αποτελεί έπαρμα του κοκκώδους υμένα, που περιβάλλει το ωάριο. Τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα εξωτερικά έρχονται σε επαφή με το βασικό υμένα. Η θήκη σχηματίζεται από κύτταρα του συνδετικού στρώματος του φλοιού (φλοιώδης ουσία) της ωοθήκης και διακρίνεται στην έξω και στην έσω θήκη, στην οποία αναπτύσσεται το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων, που εξυπηρετεί τις ανάγκες του ωοθυλακίου. Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, που περιβάλλουν τη διαφανή ζώνη, σχηματίζουν τον ακτινωτό στέφανο και φέρουν κυτταροπλασματικές προεκβολές, που διαπερνούν τη διαφανή ζώνη και εξυπηρετούν τις μεταβολικές ανάγκες του ωαρίου (Buccione και συν. 1990, Μιχαήλ 1996). Παράλληλα, τα κοκκώδη κύτταρα έρχονται σε επαφή μεταξύ τους μέσω χασματοσυνδέσεων, με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της επικοινωνίας μεταξύ τους, καθώς και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωαρίου (De Loos και συν. 1991).

Η ωρίμανση του ωοθυλακίου είναι, κυρίως, το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) στα κύτταρα του ωοθυλακίου (Gordon 1994). Η δράση αυτή των γοναδοτροπινών οδηγεί στη διέγερση των κυττάρων του ωοθυλακίου, τα οποία παράγουν οιστρογόνα, προγεστερόνη καθώς και μη στεροειδείς ουσίες, όπως ενεργοποιούς του πλασμινογόνου, διάφορες γλυκοπρωτεΐνες κ.λπ. Κατά την περίοδο ωρίμανσης του ωοθυλακίου και πριν από την ωοθυλακιορρηξία ο όγκος και η σύσταση του ωοθυλακικού υγρού μεταβάλλονται διαρκώς, ενώ σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν και στα κύτταρα του ωοθυλακίου. Οι αλλαγές αυτές φαίνεται ότι εξυπηρετούν τόσο τη διαδικασία της ωοθυλακιορρηξίας όσο και την ανάπτυξη και ωρίμανση του ωαρίου (Espey και Lipner 1994, Σμοκοβίτης 1996).

Η προωοθυλακιορρηκτική έκκριση της LH *in vivo* σηματοδοτεί την επανέναρξη της διαδικασίας της μείωσης και γενικότερα της ωρίμανσης του ωαρίου. Η ωρίμανση του ωαρίου είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει αλλαγές στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και προετοιμάζει τα ωάρια να υποστηρίξουν τη γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Gordon 1994). Το ερέθισμα για την έναρξη της ωρίμανσης φαίνεται ότι προέρχεται από τα κύτταρα του ωοθυλακίου, δεδομένου ότι υποδοχείς της LH δεν έχουν ανιχνευθεί στο ωάριο. Ωρίμανση του πυρήνα του ωαρίου χαρακτηρίζεται η μετάβαση από το στάδιο του GV σε αυτό της μετάφασης II της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, η οποία ολοκληρώνεται μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου (Thibault και συν. 1987, Downs 1995, van den Hurk και Zhao 2005). Τελικά, η ωρίμανση του πυρήνα οδηγεί στη δημιουργία του θηλυκού γαμέτη, ο οποίος στην αγελάδα περιέχει 30 χρωματοσώματα και ολοκληρώνεται περίπου 24 ώρες μετά την έναρξη της προωοθυλακιορρηκτικής έκκρισης της LH. Η κυτταροπλασματική ωρίμανση περιλαμβάνει όλες εκείνες τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές του ωαρίου οι οποίες, λαμβάνοντας χώρα *in vivo* παράλληλα με την ωρίμανση του πυρήνα, οδηγούν στην ολοκλήρωση της δυνατότητας γονιμοποίησης του ωαρίου και ανάπτυξης του εμβρύου, που προκύπτει από αυτό (Hyttel και συν. 1986α, Hyttel και συν. 1986β, Shamsuddin και συν. 1993, Ducibella και συν. 1994, Calarco 1995, Duranthon και Renard 2001). Η εκτίμηση της προόδου της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης γίνεται έμμεσα, με εκτίμηση παραμέτρων, όπως είναι η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλει το ωάριο, η αύξηση των διαστάσεων του περιλεκιθικού χώρου και, σε

συνδυασμό με την ωρίμανση του πυρήνα, η έξοδος του πολικού σωματίου από το ωάριο (Kruip και συν. 1983).

Όπως αναφέρθηκε, η επανέναρξη της μείωσης πυροδοτείται από την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH. Στη διαδικασία αυτή, καθώς και στην ολοκλήρωση της ωρίμανσης του ωαρίου, συμμετέχει ένα πλήθος παραγόντων και διεργασιών. Μερικοί μόνο από τους παράγοντες που έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στην επανέναρξη της μείωσης και στην ωρίμανση του ωαρίου, είναι ο ενισχυτικός παράγοντας ωρίμανσης (maturation promotion factor, MPF), οι «mitogen-activated protein kinases» (MAPKs), η «mitogenic activating sterol» (MAS), τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) στα κοκκώδη κύτταρα και στο ωάριο, η πρωτεϊνική κινάση C (Protein kinase C, PKC) και οι εξαρτώμενες από τα ιόντα ασβεστίου βιοχημικές οδοί (Thibault και συν. 1987, Eppig 1993, Downs 1995, van den Hurk και Zhao 2005). Παράλληλα, η συνεργασία του ωαρίου με τα κύτταρα του κοκκώδη υμένα είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και την διαφοροποίησή του. Τα κοκκώδη κύτταρα (κύτταρα του ωοφόρου δίσκου) διαμέσου των χασματοσυνδέσεων εξυπηρετούν τις μεταβολικές ανάγκες του ωαρίου και παρέχουν όλες εκείνες τις απαραίτητες ουσίες που εξασφαλίζουν την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων, ενώ αλληλεπιδρώντας με το ωάριο ρυθμίζουν τη σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών από αυτό. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ωαρίου τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου υφίστανται σημαντικές αλλαγές. Η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων χαρακτηρίζεται από την έκκριση υαλουρονικού οξέος και τη δημιουργία ενός βλεννώδους στρώματος εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η διαδικασία αυτή επηρεάζει την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και του ωαρίου, οδηγεί σε διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου και συνεπάγεται, τελικά, την έναρξη όλων εκείνων των βιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στην ωρίμανση του ωαρίου. Η διαδικασία αυτή αποτελεί ισχυρή ένδειξη της ομαλής εξέλιξης και ολοκλήρωσης της ικανότητας ανάπτυξης του ωαρίου (Kruip και συν. 1983, Gordon 1994, Downs 1995, Zhang και συν. 1995).

- Ωρίμανση των ωαρίων *in vitro*

Η *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων βοοειδών είναι δυνατή με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων και συνθηκών καλλιέργειας.

Οι Pincus και Enzmann (1935) ανέφεραν ότι η βίαιη απομάκρυνση ενός ωαρίου μαζί με τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου από το περιβάλλον του ωοθυλακίου μπορεί να αποτελέσει επαρκές ερέθισμα για την επανέναρξη της ωρίμανσής του μέχρι το στάδιο της μετάφασης II, με την προϋπόθεση ότι θα βρεθεί σε κατάλληλο περιβάλλον *in vitro*. Η βίαιη αυτή απομάκρυνση του ωαρίου από το ωοθυλάκιο εκτιμάται πως αντιστοιχεί με το χρόνο της έναρξης της προωθυλακιορρηκτικής έκκρισης της LH *in vivo* (Sirard και συν. 1989). Στη συνέχεια, η εξέλιξη του πυρήνα *in vitro* ακολουθεί ανάλογη πορεία με αυτήν που παρατηρείται σε συνθήκες *in vivo*.

Έχει διαπιστωθεί ότι οι ποιοτικές και ποσοτικές αποδόσεις της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων βοοειδών επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται η ηλικία και η κατάσταση (π.χ. εγκυμοσύνη) του ζώου, το μέγεθος, το στάδιο ανάπτυξης και η «υγεία» του ωοθυλακίου, η μέθοδος συλλογής των ωαρίων, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ωαρίου και του συμπλέγματος ωαρίου-ωοφόρου δίσκου και οι συνθήκες καλλιέργειας (διάρκεια ωρίμανσης, θερμοκρασία, θρεπτικά υποστρώματα, προσθήκη ορμονών και ορού) (Gordon 1994).

Η πρόοδος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων ακολουθεί γενικά τα ίδια πρότυπα με την *in vivo*. Παρόλα αυτά, κατά την πρόοδο της διαδικασίας της *in vitro* ωρίμανσης παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές, οι οποίες θεωρείται πως έχουν αρνητική επίδραση στην ικανότητα ανάπτυξης του ωαρίου. Η διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών, που εφαρμόζεται διεθνώς, κυμαίνεται μεταξύ 18 ή 24 ωρών, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και την ποιότητα των συλλεγόμενων ωαρίων (Gordon 1994). Στις *in vitro* συνθήκες η ωρίμανση του πυρήνα του ωαρίου κατά κανόνα δεν συμβαδίζει με αυτή του κυτταροπλάσματος και συνήθως συμβαίνει με ταχύτερο ρυθμό. Αντίθετα, η ωρίμανση του κυτταροπλάσματος φαίνεται ότι επιτυγχάνεται πλησιέστερα στις 24 ώρες της καλλιέργειας (Gordon 1994). Επιπρόσθετα, τα ωάρια που ωριμάζουν σε *in vitro* συνθήκες παρουσιάζουν διαφορές στις δομικές, λειτουργικές και μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στον πυρήνα, κυρίως δε στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα ωάρια που ωριμάζουν *in vivo* (Gordon 1994, Hyttel και συν. 1997). Οι διαφορές στο χρόνο και στις διεργασίες που διέπουν την ωρίμανση μεταξύ *in vitro* και *in vivo* συνθηκών και η ασύγχρονη ωρίμανση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος αποτελούν σημαντικές παραμέτρους, που πιθανώς οδηγούν στη μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων που ωριμάζουν *in vitro*. Παράλληλα, θεωρείται πως η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών

κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες υπολείπεται της παρατηρούμενης *in vivo* και επηρεάζει αρνητικά την πρόοδο της ωρίμανσης του ωαρίου (Suzuki και συν. 1996, Hendriksen και συν. 2000).

- Γονιμοποίηση του ωαρίου *in vivo*

Η ωρίμανση και η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων, καθώς και η αντίδραση του ακροσώματος αποτελούν απαραίτητα βήματα για την επίτευξη της γονιμοποίησης του ωαρίου *in vivo*. Τα σπερματοζωάρια κατά την ωρίμανσή τους στην επιδιδυμίδα αποκτούν την ικανότητα να κινούνται και η κυτταρική μεμβράνη τους υφίσταται σημαντικές μεταβολές (απομάκρυνση ή μεταβολή μεγαλομοριακών ουσιών, προσκόλληση ή ενσωμάτωση νέων μακρομορίων κ.λπ.). (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996).

Τα σπερματοζωάρια μετά την εκσπερμάτιση πρέπει να παραμείνουν κάποιο χρονικό διάστημα στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού πριν να αποκτήσουν ικανότητα γονιμοποίησης. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα αυτή τη χρονική περίοδο αφορούν κυρίως την κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων και περιγράφονται με τον όρο «ενεργοποίηση». Η απομάκρυνση ή η μεταβολή ουσιών που έχουν προσροφηθεί ή ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων κατά την ωρίμανση τους στην επιδιδυμίδα αλλά και κατά την επαφή τους με το πλάσμα του σπέρματος αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μέρος της ενεργοποίησης. Η μεταβολή αυτού του προστατευτικού στρώματος της κυτταρικής μεμβράνης και η απομάκρυνση των ανασταλτικών παραγόντων της ενεργοποίησης φαίνεται πως την ευαισθητοποιεί ως προς το ωάριο (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996). Κατά την περίοδο της ενεργοποίησης παρατηρείται προσκόλληση και νέων ουσιών (π.χ. ενζύμων) στην κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου, στις οποίες αποδίδεται και η ενεργοποίηση.

Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων ολοκληρώνεται με την αντίδραση του ακροσώματος αν και ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν τα δύο αυτά φαινόμενα ανεξάρτητα. Κατά την αντίδραση του ακροσώματος ελευθερώνεται το περιεχόμενο του ακροσώματος.

Η προσέγγιση της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου από το σπερματοζωάριο προϋποθέτει τη δίοδο του σπερματοζωαρίου από στρώματα γλυκοπρωτεϊνών, που περιβάλλουν το ωάριο. Η διείσδυση του σπερματοζωαρίου μέσω του ωοφόρου δίσκου (στην αγελάδα ο ωοφόρος δίσκος αποπίπτει *in vivo* λίγο πριν ή μετά από την

ωοθυλακιορρηξία) αλλά και της διαφανούς ζώνης διευκολύνεται από την αντίδραση του ακροσώματος και την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων. Γενικά, η αντίδραση του ακροσώματος καθιστά το σπερματοζωάριο ικανό να διέλθει τη διαφανή ζώνη του ωαρίου και να συνενωθεί με το ωάριο (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996).

Η αντίδραση του ακροσώματος προκαλείται από ουσίες της διαφανούς ζώνης και ενδεχομένως και του ωοφόρου δίσκου, ενώ έχει βρεθεί ότι δεκάδες ουσίες μπορούν να την προκαλέσουν *in vitro*. Γενικά, κάθε παράγοντας που αυξάνει άμεσα ή έμμεσα τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ενός ενεργοποιημένου σπερματοζωαρίου, στην περιοχή του ακροσώματος, σε ιόντα (κυρίως Ca^{+2} αλλά και Na^{+}) μπορεί να πυροδοτήσει την αντίδραση του ακροσώματος (Yanagimachi 1994). Σε περίπτωση που η αντίδραση του ακροσώματος ολοκληρωθεί πριν από την προσέγγιση στον ωοφόρο δίσκο το σπερματοζωάριο δεν μπορεί να διέλθει μέσω αυτού. Παράλληλα, η ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας είναι απαραίτητη προκειμένου το ωάριο να διέλθει τη διαφανή ζώνη. Η διόδος από τη διαφανή ζώνη φαίνεται πως συνδυάζει μηχανικά και ενζυμικά μέσα (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996).

Η είσοδος του σπερματοζωαρίου στο ωάριο πυροδοτεί μια σειρά αλλαγών της διαφανούς ζώνης, που τελικά οδηγούν στη δημιουργία ενός προστατευτικού «φραγμού», που παρεμποδίζει την είσοδο άλλων σπερματοζωαρίων. Το φαινόμενο αυτό καλείται αντίδραση της διαφανούς ζώνης. Σε αρκετά θηλαστικά ανάλογος φραγμός εντοπίζεται και στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου. Κατά τη συγχώνευση των κυτταρικών μεμβρανών σπερματοζωαρίου-ωαρίου, ενεργοποιούνται οι διάλυτοι ιόντων Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου, με επακόλουθη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των Ca^{+2} και ενεργοποίηση του ωαρίου (Yanagimachi 1994). Πλήθος παραγόντων μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του ωαρίου και όλοι προκαλούν ενδοκυτταρική αύξηση των Ca^{+2} (Yanagimachi 1994). Την ενεργοποίηση του ωαρίου ακολουθούν διάφορες βιοχημικές και μορφολογικές διεργασίες, οι οποίες οδηγούν στην αντίδραση της διαφανούς ζώνης, στην ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και τελικά στην δημιουργία του ζυγωτού (Crozet 1993, Yanagimachi 1994).

- Γονιμοποίηση των ωαρίων βοοειδών *in vitro*

Στα συστήματα εξωσωματικής γονιμοποίησης ωαρίων βοοειδών έχει καθιερωθεί η χρήση κατεψυγμένου σπέρματος με αποδεδειγμένη γονιμοποιητική ικανότητα, *in vivo*

(Bondioli και Wright 1983, Critser και συν. 1984, Gordon 1994). Στην *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων βοοειδών εφαρμόζεται συνήθως η τεχνική «swim up», με σκοπό την επιλογή των σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση (Parrish και συν. 1986, Gordon 1994). Σημαντική παράμετρο για την επιτυχία της *in vitro* γονιμοποίησης αποτελεί η διαδικασία ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Έχει βρεθεί ότι επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις των σπερματοζωαρίων, χρήση ειδικών υποστρωμάτων, κατάλληλη οσμωτική πίεση (290 έως 310 mOsm), καθώς και ρύθμιση του pH (7,4-7,8), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Gordon 1994). Για την *in vitro* ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων βοοειδών χρησιμοποιείται, επίσης, η βόεια αλβουμίνη του ορού, στην οποία αποδίδεται η απομάκρυνση ουσιών (π.χ. χοληστερόλη, Zn^{+2}) που σταθεροποιούν την κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων (Dow και Bavister 1989, Gordon 1994). Επιπρόσθετα, η χρήση ηπαρίνης και άλλων γλυκοζαμινογλυκανών συμβάλλει στην τροποποίηση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, στην αύξηση της διαπερατότητάς της σε Ca^{+2} και στην αύξηση του ενδοκυτταρικού pH και διευκολύνει την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Gordon 1994). Η δράση αυτή της ηπαρίνης και των άλλων γλυκοζαμινογλυκανών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωσή τους, τη συγκέντρωση των Ca^{+2} και τη θερμοκρασία του υποστρώματος (Lenz και συν. 1983, Parrish και συν. 1986, Gordon 1994). Η επίτευξη βέλτιστων συνθηκών για τη διασφάλιση της *in vitro* ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας. Η υστέρηση των ποσοστών της *in vitro* γονιμοποίησης σε σχέση με τις *in vivo* συνθήκες αποδίδεται, σε μεγάλο βαθμό, στα προβλήματα που παρουσιάζονται κατά τη διαδικασία της *in vitro* ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων (Gordon 1994, Yanagimachi 1994).

Στους παράγοντες που επηρεάζουν την *in vitro* γονιμοποίηση, συγκαταλέγονται συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. φωτισμός, θερμοκρασία, σύσταση των αερίων του επωαστικού κλιβάνου), η προέλευση (*in vivo* ή *in vitro* ωρίμανση) και η ποιότητα των ωαρίων, ο χρόνος που διατίθεται για την ωρίμανση ή/και γονιμοποίηση, το υπόστρωμα γονιμοποίησης, η αναλογία σπερματοζωαρίων/ωαρίου, η παρουσία βοηθητικών κυττάρων (π.χ. κυττάρων του ωαγωγού) και η παρουσία κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Gordon 1994). Η ανάγκη βελτίωσης των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* γονιμοποίηση έχει ως στόχο την αύξηση των αποδόσεων και εντοπίζεται, κυρίως, στην

προσπάθεια βελτίωσης της σύνθεσης των υποστρωμάτων και στη μελέτη της επίδρασης της παρουσίας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου στην όλη διαδικασία (Gordon 1994).

- Ανάπτυξη των εμβρύων *in vivo*

Ο ωαγωγός της αγελάδας εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες για τη μεταφορά και την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων, τη μεταφορά και τη γονιμοποίηση του ωαρίου και την υποστήριξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα πρώτα στάδια (Gordon 1994). Η σύσταση και η ποσότητα των εκκρίσεων εξαρτάται από την φάση του οιστρικού κύκλου και από την ανατομική περιοχή του ωαγωγού (κώδωνας, λήκυθος, ισθμός) (Buhí και συν. 1997, Leese και συν. 2001). Φαίνεται πως ο ωαγωγός προμηθεύει στο έμβρυο συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξή του, όπως πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες κ.λπ. (Bavister 1988, Gandolfi και συν. 1993). Η σύσταση του υγρού του ωαγωγού και ο ρόλος των ουσιών που εντοπίζονται σε αυτόν, δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως (Gordon 1994).

Σε *in vivo* συνθήκες, η πρώτη μιτωτική διαίρεση-αυλάκωση και ο σχηματισμός του εμβρύου 2 κυττάρων συμβαίνει 24 έως 30 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. Ακολουθεί η δεύτερη διαίρεση και ο σχηματισμός του εμβρύου 4 κυττάρων, περίπου 12 ώρες αργότερα (Parrish και First 1993).

Οι διαιρέσεις συνεχίζονται και 4 έως 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, από τη συνεχή διαίρεση του γονιμοποιημένου ωαρίου προκύπτει το μορίδιο. Στο στάδιο αυτό το πρώιμο έμβρυο αποτελείται από 16-32 κύτταρα (Seidel 1983, Prather και First 1988, Van Soom και συν. 1992). Κατά τον σχηματισμό του μοριδίου η διάκριση των βλαστομεριδίων-κυττάρων του εμβρύου είναι αδύνατη. Αμέσως μετά, ξεκινά η διαφοροποίηση των κυττάρων του εμβρύου, καθώς και μια σειρά μορφολογικών και μεταβολικών αλλαγών που θα οδηγήσουν στο σχηματισμό της βλαστοκύστης (Gualtieri και συν. 1992, Koyama και συν. 1993, Gordon 1994). Κατά το σχηματισμό της βλαστοκύστης ολοκληρώνεται η διαφοροποίηση των κυττάρων του εμβρύου, με το σχηματισμό της τροφοβλάστης και του εμβρυϊκού κόμβου.

- Ανάπτυξη των εμβρύων *in vitro*

Η ανάπτυξη των εμβρύων *in vitro* πραγματοποιείται σε σύνθετα υποστρώματα που περιέχουν διαλύματα αλάτων, συνδυασμούς αμινοξέων και βιταμινών, καθώς και

άλλες ουσίες (Bracket και Zuelke 1993, Gordon 1994). Ως πηγές ενέργειας, χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες, όπως το πυροσταφυλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και η γλυκόζη (Gordon 1994). Σημαντικές πηγές πρωτεϊνών αποτελούν η βόεια αλβουμίνη, ο ορός εμβρύου μόσχου ή ο ορός αγελάδας σε οίστρο (Gordon 1994). Στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όμως φαίνεται ότι εμπλέκονται και ορμόνες (π.χ. ινσουλίνη), καθώς και πλήθος αυξητικών παραγόντων μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται τρεις ομάδες: οι παρόμοιοι της ινσουλίνης αυξητικοί παράγοντες (insulin-like growth factors, IGFs), ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας βήτα (transforming growth factor-beta, TGF-β) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) (Gordon 1994).

Σε μια προσπάθεια μίμησης των *in vivo* συνθηκών και βελτίωσης των αποδόσεων της *in vitro* ανάπτυξης των εμβρύων αναπτύχθηκαν τεχνικές συγκαλλιέργειας των εμβρύων *in vitro* με κύτταρα του ωαγωγού, της μήτρας, της ωοθήκης και άλλων οργάνων (Gandolfi και Moor 1987, Rexroad και Powell 1987, Feng και συν. 1996). Η παραγωγή θρεπτικών-ενεργειακών ουσιών, ορμονών και αυξητικών παραγόντων, καθώς και η «εξουδετέρωση» ουσιών, που στα υποστρώματα της καλλιέργειας δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των εμβρύων (Bavister και συν. 1992, Gordon 1994), αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες συνεισφοράς των σωματικών κυττάρων. Στα εργαστήρια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής γίνεται χρήση σε σημαντικό βαθμό της συγκαλλιέργειας με κύτταρα του κοκκώδους υμένα ή κυττάρων του ωοφόρου δίσκου. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της χρήσης των κοκκωδών κυττάρων είναι ότι τα κύτταρα μπορούν να συλλεχθούν εύκολα, φέρουν υποδοχείς γοναδοτρόπων και στεροειδών ορμονών, διατηρούν την ικανότητα βιοσύνθεσης στεροειδών -όταν καλλιεργούνται *in vitro* παρουσία ορού- και αποτελούν σημαντική πηγή του TGF-β (Hsueh και συν. 1984, Kim και Schomberg 1989, Gordon 1994).

Η εκτίμηση της ανάπτυξης και της ποιότητας των εμβρύων γίνεται υπό στερεοσκοπική παρατήρηση. Συγκεκριμένα, για την εκτίμηση της ανάπτυξης των εμβρύων λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των βλαστομεριδίων-κυττάρων του εμβρύου σε σχέση με τον αναμενόμενο στο συγκεκριμένο στάδιο εξέτασης. Θεωρείται ότι η ανάπτυξη των εμβρύων πέραν του σταδίου των 4 κυττάρων μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της δυνατότητας ανάπτυξης των εξεταζόμενων εμβρύων (Van Soom και συν. 1992, 1997, Grisart 1994) και αποτελεί

ενδεικτικό στοιχείο ομαλής πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Gordon 1994). Ανεξάρτητα από το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθείται, η παραγωγή βλαστοκύστεων και κυρίως η γέννηση υγιών μόσχων μετά τη μεταφορά των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων σε ζώα δέκτες αποτελούν το τελικό σημείο εκτίμησης των αποδόσεων των *in vitro* τεχνικών.

1.2 Το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» στο γεννητικό σύστημα

Η καλύτερη κατανόηση των φυσιολογικών διεργασιών της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, της ωοθυλακιορρηξίας, της ωρίμανσης και της γονιμοποίησης του ωαρίου, καθώς και της ανάπτυξης του εμβρύου θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για τη βελτίωση των αποδόσεων της IVP. Η αποσαφήνιση του ρόλου των διάφορων παραγόντων, όπως του πρωτεολυτικού ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη», που πιθανόν εμπλέκονται στην αναπαραγωγική διαδικασία θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο σε αυτή την κατεύθυνση.

Η κοιλότητα ή άντρο του ωοθυλακίου είναι γεμάτη από το υγρό του ωοθυλακίου (Μιχαήλ 1996). Το ωοθυλακικό υγρό σχηματίζεται από ουσίες, που είτε προέρχονται από το πλάσμα του αίματος, είτε παράγονται τοπικά. Η σύσταση του ωοθυλακικού υγρού μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και, κυρίως, πριν από την ωοθυλακιορρηξία (Edwards 1974, Σμοκοβίτης 1996). Το υγρό αυτό συμμετέχει στην ρύθμιση του εσωτερικού περιβάλλοντος του ωοθυλακίου, στην ανάπτυξη και στην ωρίμανση του ωαρίου. Στο ωοθυλακικό υγρό απαντάται μεγάλος αριθμός ουσιών, μεταξύ των οποίων, συγκαταλέγονται οι ενεργοποιό του πλασμινογόνου, καθώς και άλλοι παράγοντες του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» (Beers 1975, Smokonitis και συν. 1988β, 1989, Σμοκοβίτης 1996).

Η συνεχής ανάπτυξη ωοθυλακίων και οι αλλαγές που συμβαίνουν σε κάθε οιστρικό κύκλο (ανάπτυξη και ατρησία ωοθυλακίων, ωοθυλακιορρηξία, σχηματισμός ωχρού σωματίου) χαρακτηρίζονται από σημαντική αναδιοργάνωση ιστών και από αγγειογένεση. Σε αυτές τις διεργασίες, που απαιτούν απόλυτα ελεγχόμενη εντοπισμένη πρωτεόλυση, συμμετέχει το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» (Espey και Lipner 1994, Tsafiriri 1995, Liu 2004). Σήμερα, στα διάφορα είδη

ζώων και κυρίως στα θηλαστικά, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την συμμετοχή του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη» στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Liu και συν. 1991, Chun και συν. 1992, Peng και συν. 1993, Hagglund και συν. 1996), στην ωοθυλακιορρηξία (Beers 1975, Reich και συν. 1986, Kokolis και συν. 1987, Liu και συν. 1987, 1992, 2004, O'Connell και συν. 1987, Smokovitis και συν. 1988β, 1989, Tsafiriri και συν. 1989, Li και συν. 1997, Dow και συν. 2002β), στο σχηματισμό του ωχρού σωματίου (Liu και συν. 1996, Dow και συν. 2002α, Ny και συν. 2002), στην παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου (Liu 2004) και στην ανάπτυξη της ατρησίας των ωοθυλακίων (Bicsak και συν. 1989, Ny και συν. 2002, Liu 2004).

Στον ωαγωγό της αγελάδας «διακινούνται» και ενεργοποιούνται τα σπερματοζώαρια, μεταφέρεται και γονιμοποιείται το ωάριο αλλά και πραγματοποιούνται τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Σε όλα τα παραπάνω, το μικροπεριβάλλον (υγρό και επιθήλιο) του ωαγωγού φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Σμοκοβίτης 1996). Το υγρό του ωαγωγού προέρχεται από τα εκκριντικά επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού και περιέχει διάφορες ουσίες. Η σύσταση, καθώς και η ποσότητα του υγρού μεταβάλλονται ανάλογα με το στάδιο του οιστρικού κύκλου και την ανατομική περιοχή του ωαγωγού (κώδωνα, λήκυθος, ισθμός) (Buhí και συν. 1997, Leese και συν. 2001). Παράγοντες του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει βρεθεί ότι συντίθενται και εκκρίνονται στον ωαγωγό στα βοοειδή (Gabler και συν. 2001) και σε διάφορα θηλαστικά (Buhí και συν. 2000, Jimenez Diaz και συν. 2000, Kouba και συν. 2000α, Kouba και συν. 2000β, Roldan-Olarte και συν. 2005, Tsantarliotou και συν. 2005).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, το σπερματοζώαριο για να καταστεί ικανό να γονιμοποιήσει το ωάριο πρέπει να υποστεί μια σειρά μεταβολών. Αυτές οι φυσιολογικές λειτουργίες του σπερματοζωαρίου ελέγχονται ή/και εκφράζονται, ως ένα βαθμό, από την δράση διαφόρων ενζύμων (Meizel 1985, Yanagimachi 1994). Η συμμετοχή πρωτεολυτικών ενζύμων του σπερματοζωαρίου φαίνεται ότι είναι σημαντική στις διάφορες φάσεις της γονιμοποίησης στα θηλαστικά. Έτσι, στην αντίδραση του ακροσώματος, φαίνεται ότι συμβάλλουν ένζυμα του ίδιου του σπερματοζωαρίου (π.χ. ακροσίνη) και του περιβάλλοντός του (πρωτεολυτικά ένζυμα του τύπου της θρυψίνης) (Meizel και Lui 1976, Shinohara και συν. 1985). Παράλληλα, η προσκόλληση του σπερματοζωαρίου στην διαφανή ζώνη (Saling 1981, Benau και Storey 1987, 1988) και η

είσοδός του σε αυτή (Fraser 1982, Brown 1983) αποτελούν διαδικασίες, όπου συμμετέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου και άλλοι παράγοντες του πρωτεολυτικού αυτού ενζυμικού συστήματος έχουν διαπιστωθεί στα σπερματοζώαρια και στο πλάσμα του σπέρματος διαφόρων ζώων (ταύρου, κριού, κάπρου) και του ανθρώπου (Smokonitis και συν. 1987, 1992α, 1992β, Rekkas και συν. 1991, 1993, 2000). Έχει διαπιστωθεί, μάλιστα, ότι παράγοντες του ενζυμικού αυτού συστήματος απελευθερώνονται από τα σπερματοζώαρια κατά την αντίδραση του ακροσώματος (Taitzoglou και συν. 1996).

Η αλληλεπίδραση του ωαρίου με τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα (κοκκώδη κύτταρα) είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του πρώτου (Buccione και συν. 1990, Chen και συν. 1990, Downs 1995). Πριν από την ωοθυλακιορρηξία, ξεκινά η διαδικασία της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής ωρίμανσης του ωαρίου (Eppig 1993). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ωαρίου, τα κοκκώδη κύτταρα υφίστανται σημαντικές μεταβολές, που επηρεάζουν την ωρίμανση του ωαρίου. Σε αυτές τις μεταβολές περιλαμβάνονται η παραγωγή υαλουρονικού οξέος και η δημιουργία ενός βλενώδους στρώματος θεμέλιας ουσίας (διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων), το οποίο διατηρεί σε επαφή τα κοκκώδη κύτταρα μεταξύ τους και με το ωάριο (Chen και συν. 1990, Canipari και συν. 1995, Zhuo και Kimata 2001). Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωάριο περιβάλλεται από κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία απομακρύνονται σταδιακά κατά τη διόδό του διαμέσου του ωαγωγού (Buccione και συν. 1990, Chen και συν. 1990, Canipari και συν. 1995). Συνεπώς, είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι δραστηριότητα ή παρουσία του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιοί του πλασμινογόνου-πλασμίνη» έχει διαπιστωθεί σε συμπλέγματα ωαρίων-κοκκωδών κυττάρων σε διάφορα είδη θηλαστικών (Liu και συν. 1986, Liu και Hsueh 1987, Yamada και συν. 1996, Park και συν. 1999, D'Alessandris και συν. 2001), σε ωάρια (Huarte και συν. 1985, 1987, 1993, Liu και συν. 1986, Liu και Hsueh 1987, Strickland και συν. 1988, Liu 1989, Bicsak και συν. 1989, Bicsak και Hsueh 1989, Kim και Menino 1995), σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων (Liu και Hsueh 1987, Karakji και Tsang 1995α, 1995γ, 1995δ) και στα εκκριτικά κοκκία των ωαρίων (Rekkas και συν. 2002). Το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιοί του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στη διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων (Canipari και συν. 1995). Πρωτεολυτικά ένζυμα (Gwatkin και συν. 1973, Bleil και συν. 1981, Moller και

Wassarman 1989, Schroeder και συν. 1990, Rekkas και συν. 2002), μεταξύ των οποίων πιθανόν και παράγοντες του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη (Cannon και Menino 1998, Zhang και συν. 1992, Jimenez-Diaz και συν. 2002, Rekkas και συν. 2002) συμμετέχουν στην αντίδραση της διαφανούς ζώνης.

Η εμβρυογένεση συνδέεται με εκτεταμένη αναδιάρθρωση ιστών και κυτταρική μετανάστευση. Αυτό το φυσιολογικό φαινόμενο απαιτεί τοπική και ελεγχόμενη διάβρωση της μεσοκυττάριας ουσίας, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη συμμετοχή πρωτεολυτικών ενζύμων. Έτσι, το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, φαίνεται ότι μπορεί να συμμετέχει σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του εμβρύου. Συγκεκριμένα - όσον αφορά στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, που συνδέονται άμεσα με την *in vitro* παραγωγή εμβρύων- παρουσία ή δραστηριότητα παραγόντων του ενζυμικού συστήματος έχει ανευρεθεί σε διάφορα είδη ζώων (Leidholm και Astedt 1975, Strickland και συν. 1976, Fazleabas και συν. 1983, Menino και Williams 1987, Menino και συν. 1989). Παρά το γεγονός ότι ο ακριβής ρόλος του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη δεν είναι εξακριβωμένος, η παρουσία ή/και η δραστηριότητά του από τη δημιουργία του ζυγωτού έως και την εκκολαφθείσα βλαστοκύστη έχει επιβεβαιωθεί (Menino και συν. 1989, Dyk και Menino 1991, Berg και Menino 1992, Zhang και συν. 1992, 1994, Bartlett και Menino 1993, Carroll και συν. 1993, Whiteside και συν. 2001). Επίσης, το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εγκατάστασης του εμβρύου στη μήτρα (Strickland και συν. 1976, Sappino και συν. 1989, Loskutoff και συν. 1989, Kruithof 1990, Zhang και συν. 1994, Aflalo και συν. 2005). Στα βοοειδή, ειδικότερα, η διάταση της κοιλότητας και η εκκόλαψη της βλαστοκύστης, φαίνεται πως επηρεάζονται από την παρουσία του συστήματος (Menino και Williams 1987). Σε *in vitro* συνθήκες, έμβρυα βοοειδών με μειωμένη ικανότητα παραγωγής ενεργοποιών του πλασμινογόνου δεν ήταν ικανά να εκκολαφθούν (Kaaekuahiwi και Menino 1990).

1.3 Το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη»

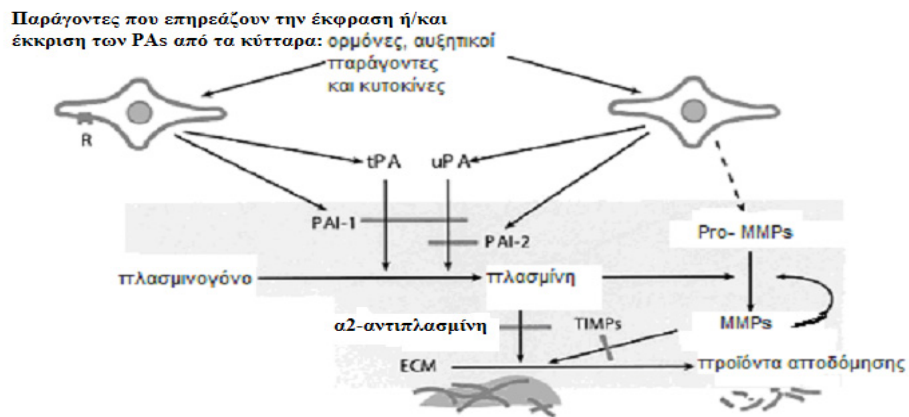
Το ενζυμικό σύστημα «ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη» συγκροτείται από το προένζυμο **πλασμινογόνο**, από τους **ενεργοποιούς του πλασμινογόνου**

(Plasminogen Activators, PAs), από την **πλασμίνη**, από τους **αδρανοποιούς των ενεργοποιών του πλασμινογόνου** (Plasminogen Activator Inhibitors, PAIs), από τους **αδρανοποιούς της πλασμίνης** (Plasmin Inhibitors, PIs), καθώς και από τους **κυτταρικούς υποδοχείς των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και του πλασμινογόνου**. Οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου μετατρέπουν το προένζυμο πλασμινογόνο, που βρίσκεται σε αφθονία σε όλα τα υγρά του σώματος, στο δραστικό πρωτεολυτικό ένζυμο του τύπου της θρυψίνης, την πλασμίνη. Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, άρα και η ρύθμιση παραγωγής της πλασμίνης, ελέγχεται από τους αδρανοποιούς των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Η ίδια η δραστηριότητα της πλασμίνης ελέγχεται από διαφορετικά μόρια, τους αδρανοποιούς της πλασμίνης (Collen 1980, Saksela 1985).

Το σύστημα αυτό ονομάζεται και «ινωδολυτικό σύστημα», γιατί το πρώτο φυσιολογικό φαινόμενο με το οποίο συσχετίστηκε, ήταν η λύση του ινώδους. Το ινωδολυτικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει λύση των θρόμβων ινώδους, καθώς η πλασμίνη αποδομεί το ινώδες (Müllertz 1988). Εκτός όμως από τη λύση του ινώδους, το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιοί του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει διαπιστωθεί ότι συμβάλλει και σε άλλους φυσιολογικούς και φυσιοπαθολογικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν τοπική και ελεγχόμενη εξωκυτταρική πρωτεόλυση. Η πλασμίνη μπορεί να αποδομήσει άμεσα διάφορα διαλυτά και αδιάλυτα πεπτίδια και πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και βασικά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας, όπως είναι οι πρωτεογλυκάνες, η ινοδονεκτίνη, η λαμινίνη, η βιτρονεκτίνη κ.λπ. Η πλασμίνη μπορεί να συμμετέχει και έμμεσα στην εξωκυτταρική πρωτεόλυση, καθώς έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει τα προένζυμα προκολλαγενάση και προελαστάση στις ενεργές μορφές τους, κολλαγενάση και ελαστάση, που αποδομούν τα βασικά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας κολλαγόνο και ελαστίνη, αντίστοιχα (Dano και συν. 1985, Σμοκοβίτης 1996).

Η δράση του ενζυμικού αυτού συστήματος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συνδυαστεί, σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, με αυτήν ενός άλλου πρωτεολυτικού συστήματος, του συστήματος «των μεταλλοπρωτεϊνών της διάμεσης ουσίας» (matrix metalloproteinase system, MMP-system). Η πλασμίνη, μάλιστα, έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει ορισμένα προένζυμα του συστήματος των MMP στις ενεργές μορφές τους (Saksela και Rifkin 1988, Matrisian 1990, Mignatti και Rifkin 1993, Ny και συν. 2002).

Η πρωτεολυτική δράση του συστήματος είναι τοπικά περιορισμένη (εντοπισμένη) και ελεγχόμενη, αφού διάφορες ανασταλτικές ουσίες (αδρανοποιοί) δρουν είτε στο επίπεδο των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, είτε στο επίπεδο της πλασμίνης. Έτσι, ο φυσιολογικός ρόλος του συστήματος αυτού στον οργανισμό μπορεί να επεκτείνεται σε όλα εκείνα τα φυσιολογικά (αλλά και φυσιοπαθολογικά) φαινόμενα, όπου απαιτείται τοπική και ελεγχόμενη διάβρωση της μεσοκυττάριας ουσίας (Σμοκοβίτης 1996).



Εικόνα 1: Το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη

R: θέσεις δέσμευσης παραγόντων του ενζυμικού συστήματος στην κυτταρική επιφάνεια, PAI-1 & PAI-2: αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, Pro-MMPs: προένζυμα του ενζυμικού συστήματος των MMPs, TIMPs: αδρανοποιοί των MMPs, ECM: εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. (Ny και συν. 2002 τροποποιημένο)

Όπως προαναφέρθηκε, φυσιολογικά φαινόμενα, στα οποία έχει υποστηριχθεί το ενδεχόμενο συμμετοχής του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, είναι η ωοθυλακιορρηξία, η γονιμοποίηση του ωαρίου και η εγκατάσταση του εμβρύου στη μήτρα. Άλλα φαινόμενα, που αφορούν στο γεννητικό σύστημα και στα οποία φαίνεται πως συμμετέχει αυτό το ενζυμικό σύστημα, είναι η παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου (Dow και συν. 2002α, 2002β, Ny και συν. 2002, Murdoch και Gottsch 2003, Liu 2004), η σπερματογένεση (Vihko και συν. 1984), η παλινδρόμηση της μήτρας μετά τον τοκετό (Shimada και συν. 1985) και η παλινδρόμηση του μαστικού αδένου (Saksela 1985, Busso και συν. 1989).

Μερικά από τα φυσιοπαθολογικά φαινόμενα στα οποία εμπλέκεται το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη είναι η μετάσταση των νεοπλασματικών κυττάρων (Dano και συν. 1985, Saksela και Rifkin 1988, Andreassen και συν. 1997, Duffy και συν. 1999), η ενδομητρίωση στη γυναίκα (Bruse και συν. 1998, Guan και συν. 2002), η οστεοαρθρίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Cerinic και συν. 1998), η ενδομητρίτιδα (Moraitis και συν. 2004) και άλλες φλεγμονώδεις εξεργασίες (Dano και συν. 1985).

1.3.1 Πλασμινογόνο

Το προένζυμο πλασμινογόνο είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος του αίματος, που στα βοοειδή αποτελείται από 812 αμινοξέα (Malinowski και συν. 1984) και έχει μοριακό βάρος 90 έως 92kDa (Miyashita και συν. 1988). Το πλασμινογόνο παράγεται, κυρίως, στο ήπαρ (Raum και συν. 1980), στα επιθηλιακά κύτταρα των σπερματικών σωληναρίων (Saksela και Vihko 1986), στα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας (Isseroff και Rifkin 1983) και πιθανώς και σε άλλα σημεία του οργανισμού.

Όπως αναφέρθηκε, το πλασμινογόνο απαντά σε όλα τα υγρά του σώματος και μπορεί να δεσμευθεί σε διάφορα μόρια, όπως η λαμινίνη, η ινοδονεκτίνη, το ινώδες, η θρομβοσπονδίνη, η τετρανεκτίνη και η κυτοκερατίνη 8 (Irigoyen και συν. 1999). Υποδοχείς του πλασμινογόνου έχουν βρεθεί στην κυτταρική μεμβράνη διάφορων κυττάρων (π.χ. λεμφοκυττάρων) (Miles και Plow 1987, Silverstein και συν. 1988). Η α-ενολάση και η ανεξίνη-2 (anexin 2) φαίνεται πως είναι δύο από τους κυριότερους υποδοχείς του πλασμινογόνου (Miles και συν. 1991, Hajjar και συν. 1994). Η αλληλεπίδραση του πλασμινογόνου με τους υποδοχείς του επιταχύνει τη μετατροπή του σε πλασμίνη (Ellis και συν. 1991). Η παρουσία πλασμινογόνου διαπιστώθηκε στη μεσοκυττάρια ουσία συμπλεγμάτων ωαρίου-ωοφόρου δίσκου (συμπλεγμάτων κοκκωδών κυττάρων-ωαρίων, cumulus-oocyte complexes, COCs) των κρικητών, καθώς και στην διαφανή ζώνη των ωαρίων τους (Jimenez-Diaz και συν. 2002). Όταν τα ωάρια είχαν μετακινηθεί στους ωαγωγούς, το πλασμινογόνο ήταν σαφώς προσκολλημένο στην κυτταρική μεμβράνη τους (Jimenez-Diaz και συν. 2002). Επίσης, πλασμινογόνο ανιχνεύθηκε στη μεσοκυττάρια ουσία των COCs, στην διαφανή ζώνη αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη των ωαρίων του χοίρου (Roldan-Olarte και συν. 2005). Η παρουσία πλασμινογόνου στην κυτταρική μεμβράνη των ωαρίων κρικητών (Jimenez-Diaz και συν.

2002), χοίρων (Roldan-Olarte και συν. 2005) αλλά και ποντικών (Carroll και συν. 1993) θεωρείται το αποτέλεσμα της απορρόφησης του από τη διαφανή ζώνη.

1.3.2 Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου

Στον οργανισμό των θηλαστικών έχουν βρεθεί δύο τουλάχιστον τύποι ενεργοποιητών του πλασμινογόνου: ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (tissue-type Plasminogen Activator, t-PA) και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (urokinase-type Plasminogen Activator, u-PA). Ο u-PA απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως προενεργοποιητής και μετατρέπεται σε ενεργοποιητή εξωκυτταρικά (van Hinsbergh και συν. 1988, Σμοκοβίτης 1996). Εκτός από τους δύο ενεργοποιητές, ενεργοποίηση του πλασμινογόνου μπορεί, επίσης, να προκαλέσει και μια βακτηριακής προέλευσης πρωτεΐνη, η στρεπτοκινάση (Müllertz 1988).

Ο t-PA είναι ένα πολυπεπτίδιο, που αποτελείται στα βοοειδή από 566 αμινοξέα (Ravn και συν. 1995), ενώ ο u-PA αποτελείται (στον άνθρωπο) από 411 αμινοξέα και απαντά σε δύο μορφές, διαφορετικής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, μοριακού βάρους 30 kDa ή 54kDa (Saksela 1985).

Σημαντικό στοιχείο του ενζυμικού συστήματος αποτελεί ο υποδοχέας της κυτταρικής μεμβράνης για τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (uPA receptor, uPAR). Στα βοοειδή, ο uPAR αποτελείται από 330 αμινοξέα και είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 55-70 kDa, που προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη (Ploug και συν. 1991). Η πρωτεολυτική δράση του συστήματος μπορεί να επικεντρωθεί στον περικυτταρικό χώρο και στην επιφάνεια του κυττάρου μετά τη δέσμευση του u-PA στον υποδοχέα του, ενώ ο βαθμός ενεργοποίησης του προενεργοποιητή αυξάνεται τουλάχιστον είκοσι φορές μετά τη δέσμευσή του στον υποδοχέα (Estreicher και συν. 1989, Stephens και συν. 1989).

Δραστηριότητα ή παρουσία, τόσο του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (t-PA), όσο και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (u-PA), έχει διαπιστωθεί σε όλα σχεδόν τα υγρά του σώματος, καθώς και σε πολλούς τύπους φυσιολογικών ή νεοπλασματικών κυττάρων (Dano και συν. 1985).

Σε ό,τι αφορά στο γεννητικό σύστημα, δραστηριότητα ή παρουσία των δύο ενεργοποιητών έχει διαπιστωθεί σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων και στα κύτταρα της θήκης της ωοθήκης. Ο t-PA φαίνεται ότι είναι ο κυρίαρχος ενεργοποιητής στα κοκκώδη

κύτταρα του επίμυ και ο u-PA στα κοκκώδη κύτταρα του ποντικού και στα κύτταρα της θήκης (Canipari και Strickland 1985, Ny και συν. 1985, Canipari και συν. 1987). Επίσης, ο t-PA είναι αυτός που κυρίως ανιχνεύεται στα κύτταρα του ωοθυλακίου της σούς (Politis και συν. 1990), ενώ ο u-PA είναι ο κυρίαρχος ενεργοποιός στα προωθυλακιόρρηκτικά ωοθυλάκια του ποντικού, του προβάτου, καθώς και στα κύτταρα της ωοθήκης του προβάτου (Hagglund και συν. 1996, Colgin και Murdoch 1997, Murdoch και συν. 1999). Στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο (κύτταρα της θήκης, κύτταρα του κοκκώδη υμένα, ωοθυλακικό υγρό) της αγελάδας διαπιστώθηκε η ύπαρξη και των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Dow και συν. 2002b).

Δραστηριότητα ή παρουσία των ενεργοποιών του πλασμινογόνου διαπιστώθηκε, επίσης, στους δύο γαμέτες. Έτσι, t-PA ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου του επίμυ (Huarte και συν. 1985, Liu και συν. 1986, Liu και Hsueh 1987, Bicsak και Hsueh 1989, Bicsak και συν. 1989), του ποντικού (Huarte και συν. 1987, Stutz και συν. 1998), του χοίρου (Kim και Menino 1995), καθώς και στα εκκριτικά κοκκία του ωαρίου των βοοειδών (Rekkas και συν. 2002). Ακόμη, οι δύο ενεργοποιοί του πλασμινογόνου έχουν εντοπιστεί στην κυτταρική μεμβράνη και στην εξωτερική ακροσωμιακή μεμβράνη του σπερματοζωαρίου του ανθρώπου και του κάπρου (Liedholm 1975, Smokonitis και συν. 1987, 1992a).

Η παρουσία ή/και η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου επιβεβαιώθηκε και στον ωαγωγό διαφόρων ζώων. Έτσι, στον ωαγωγό του κρικητού βρέθηκαν και οι δύο ενεργοποιοί του πλασμινογόνου, με σημαντικότερη την παρουσία του t-PA (Jimenez Diaz και συν. 2000). Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου ανιχνεύθηκε σε δείγματα ιστών και έκπλυσης ωαγωγού χοίρου (Roldan-Olarte 2005a), ενώ η παρουσία u-PA mRNA επιβεβαιώθηκε σε κύτταρα του ωαγωγού και σε όλα τα τμήματά του εκτός του κώδωνα (Tsantarliotou και συν. 2005). Στον ωαγωγό των βοοειδών έχει αναφερθεί η δραστηριότητα u-PA (Gabler και συν. 2001). Τέλος, η παρουσία και των δύο ενεργοποιών έχει επιβεβαιωθεί στα έμβρυα του επίμυ (Liedholm και Astedt 1975, Bicsak και συν. 1989, Zhang και συν. 1994, Aflalo και συν. 2004, 2005), του ποντικού (Strickland και συν. 1976), του χοίρου (Fazolebas και συν. 1983), του προβάτου (Menino και συν. 1989, Bartlett και Menino 1993), της αγελάδας (Menino και Williams 1987, Berg και Menino 1992, Whiteside και συν. 2001) και του

ανθρώπου (Khamsi και συν. 1996) από το στάδιο του ζυγωτού έως και το στάδιο της εκκολαφθείσας βλαστοκύστης.

Ποικίλοι φυσιολογικοί παράγοντες, όπως διάφορες ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση και την απελευθέρωση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου από τα κύτταρα (Smokonitis και Binder 1980, Smokonitis και συν. 1981α, 1981β, 1985α, 1990, Kruihof 1988, Kokolis 1990). Στην ωοθήκη του επίμου, για παράδειγμα, από τα κοκκώδη κύτταρα παράγονται ενεργοποιοί του πλασμινογόνου μετά την αύξηση των γοναδοτρόπων ορμονών, που προηγείται της ωοθυλακιορρηξίας, ενώ σε άνηβα ζώα οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου παράγονται μετά από εξωγενή χορήγηση είτε ωοθυλακιοτρόπου (FSH) είτε ωχρινοποιητικής (LH) ορμόνης (Beers και συν. 1975, Strickland και Beers 1976). Σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επίμου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της δραστηριότητας του t-PA στο υπόστρωμα καλλιέργειας, παρουσία είτε ωοθυλακιοτρόπου είτε ωχρινοποιητικής ορμόνης (Strickland και Beers 1976, Canipari και Strickland 1985). Αύξηση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και της πλασμίνης παρατηρήθηκε επίσης στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια βοοειδών μετά την προωθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτροπινών (Dow και συν. 2002β). Τη δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στην ωοθήκη του ποντικού φαίνεται πως επηρεάζει ανασταλτικά η προλακτίνη (Hu και Liu 1993, Hu και Liu 1995). Η ιντερλευκίνη-1β διεγείρει τη δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου σε καλλιέργειες αδιαφοροποίητων κοκκωδών κυττάρων του επίμου και την αναστέλλει στα διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα (Karakji και Tsang 1995δ). Αντίθετα, σε καλλιέργειες εμβρύων βοοειδών, η παραγωγή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου αυξήθηκε από την προσθήκη προγεστερόνης, οιστραδιόλης ή δεξαμεθαζόνης μετά τις πρώτες 24 ώρες της καλλιέργειας (al-Hozab και Menino 1992).

Η σύνθεση και η απελευθέρωση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου από διάφορους τύπους κυττάρων επηρεάζονται επίσης και από άλλους παράγοντες όπως είναι διάφορες βιταμίνες, φαρμακευτικές ουσίες, το *stress*, η σωματική άσκηση και ποικίλοι άλλοι φυσιολογικοί ή φυσιοπαθολογικοί παράγοντες (Smokonitis και συν. 1976, 1985β, 1988α, 1991β, Smokonitis 1980, Smokonitis και Astrup 1980, Kokolis και συν. 1989, Σμοκοβίτης, 1996).

1.3.3 Πλασμίνη

Το πλασμινογόνο, που βρίσκεται σε αφθονία σε όλα τα υγρά του σώματος, απαντάται ως Glu-πλασμινογόνο (περιέχει γλουταμινικό οξύ στο αμινοτελικό άκρο του) (Saksela 1985). Το Glu-πλασμινογόνο μετατρέπεται σε Glu-πλασμίνη μετά από διάσπαση ενός πεπτιδικού δεσμού αργινίνης-βαλίνης που βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου του. Την διάσπαση αυτή προκαλεί η δράση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Η Glu-πλασμίνη με τη σειρά της προκαλεί τη διάσπαση ενός πεπτιδικού δεσμού στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου του πλασμινογόνου. Έτσι, το Glu-πλασμινογόνο μετατρέπεται σε Lys-πλασμινογόνο (λυσίνη στο αμινο-τελικό άκρο) (Miyashita και συν. 1988). Το Lys-πλασμινογόνο ενεργοποιείται ταχύτερα από το Glu-πλασμινογόνο και έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το ινώδες. Η Lys-πλασμίνη, που παράγεται μετά από την ενεργοποίηση του Lys-πλασμινογόνου, αντιπροσωπεύει τελικά το κύριο μέρος της συνολικά παραγόμενης πλασμίνης (Jespersen 1988, Takada και Takada 1988).

Πολλές πρωτεΐνες αποτελούν φυσιολογικό υπόστρωμα της πλασμίνης. Έτσι, η πλασμίνη έχει τη δυνατότητα να αποδομεί το ινώδες, καθώς και διάφορα βασικά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας, όπως η λαμινίνη και η ινοδονεκτίνη (Dano και συν. 1985). Επίσης, η πλασμίνη έχει ακόμη τη δυνατότητα να αποδομεί το ινωδογόνο, την καζεΐνη, τη ζελατίνη, τους παράγοντες V και VIII της πήξης του αίματος, την ινσουλίνη, την επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη, την αυξητική ορμόνη κ.ά., ενώ μπορεί να διασπά το μόριο ορισμένων προορμονών, ελευθερώνοντας, έτσι, την ορμόνη (Dano και συν. 1985, Σμοκοβίτης, 1996).

Στις διαδικασίες ωρίμανσης και εξέλιξης των εμβρύων θεωρείται ότι συμμετέχουν σε διάφορο βαθμό αυξητικοί παράγοντες (Gordon 1994). Η πλασμίνη έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί τις αδρανείς μορφές του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα βήτα (transforming growth factor-beta, TGF-β) και να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των παρόμοιων της ινσουλίνης αυξητικών παραγόντων (insulin-like growth factors, IGFs) μέσω της πρωτεόλυσης που μπορεί να προκαλέσει στις

δεσμευτικές πρωτεΐνες των IGFs (IGFs binding proteins, IGFBPs) (Lyons και συν. 1988, Sato και Rifkin 1989, Lalou και συν. 1994, Manes και συν. 1999, Annes και συν. 2003).

1.3.4 Αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου

Η σύνθεση των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitors, PAIs) έχει διαπιστωθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων, που, κατά κανόνα, παράγουν και ενεργοποιούς του πλασμινογόνου. Οι PAIs φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου αμέσως μετά την απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα (Astedt και συν. 1987). Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου.

Ορισμένες ορμόνες (Sprengers και Kluft 1987, Kruithof 1988, Lecander και συν. 1988, Kokolis 1990, Smokovitis και συν. 1990, 1991β, Rekkas και συν. 1991), η πρωτεΐνη C (Kruithof 1988), η ενδοτοξίνη (Smokovitis και συν. 1988), η ιντερλευκίνη-1 (Schleef και Loskutoff 1988), αποτελούν μερικούς μόνο από τους παράγοντες, που μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση και απελευθέρωση των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου από τα κύτταρα. Το ίδιο φαίνεται πως προκαλεί και η κατανάλωση αλκοόλης (Smokovitis και συν. 1991α).

Σε πειραματισμούς, η ωχρινοποιητική ορμόνη και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη προκάλεσαν, πριν από την ωοθυλακιορρηξία, αύξηση της έκφρασης του PAI-1 mRNA στα κοκκώδη κύτταρα και στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου του επίμυ (Liu και συν. 1991, Chun και συν. 1992). Η ιντερλευκίνη-1β αλλά και ο παράγοντας νέκρωσης των νεοπλασιών (tumor necrosis factor, TNF) διεγείρουν, σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επίμυ, τη δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου παρουσία της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Karakji και Tsang 1995γ, 1995δ). Η προλακτίνη διεγείρει *in vitro* την έκκριση του PAI-1 από τα κοκκώδη κύτταρα του επίμυ, ειδικά παρουσία της LH (Liu και συν. 1998). Στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια βοοειδών το mRNA των PAI-1 και PAI-2 αυξάνεται ανάλογα με το είδος των κυττάρων (κύτταρα της θήκης ή/και κοκκώδη) και η μέγιστη έκφραση των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου απαντάται κατά το σχηματισμό του ωχρού σωματίου (Dow και συν. 2002α). Η προγεστερόνη διεγείρει επίσης την παραγωγή αδρανοποιών από τη μήτρα του χοίρου (Mullins και συν. 1980).

Η απομάκρυνση των συμπλόκων ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-αδρανοποιεί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου από την κυκλοφορία φαίνεται ότι γίνεται, κυρίως, από το ήπαρ (Sprengers και Kluft 1987).

1.3.4.1 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 1 (PAI-1)

Ο PAI-1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται στα βοοειδή από 402 αμινοξέα (Pepper και συν. 1990). Ο PAI-1 έχει απομονωθεί από ενδοθηλιακά κύτταρα, ηπατικά κύτταρα, κύτταρα του κοκκώδη υμένα του ωοθυλακίου, λείες μυϊκές ίνες, αιμοπετάλια, από τον πλακούντα, το πλάσμα του αίματος και από διάφορους τύπους νεοπλασματικών κυττάρων (Sprengers και Kluft 1987).

Δραστηριότητα του PAI-1 ανιχνεύθηκε στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης του επίμου (Ny και συν. 1985), του ανθρώπου (Jones και συν. 1988), του πιθήκου (Liu και συν. 2004) και του χοίρου (Politis και συν. 1990). Η κύρια δραστηριότητα του PAI-1 στον επίμου και στον πίθηκο εντοπίζεται στα κύτταρα της θήκης (Peng και συν. 1993, Liu 1999), ενώ το mRNA του αδρανοποιού μειώνεται στα ωοθυλάκια του επίμου κατά την περίοδο πριν από την ωοθυλακιορρηξία (Liu και συν. 1991, Peng και συν. 1993). Επίσης, η δραστηριότητα του PAI-1 μειώνεται στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια του χοίρου (Politis και συν. 1990), ενώ στον ποντικό αυξάνεται μετά την ωοθυλακιορρηξία (Leonardsson και συν. 1995, Hagglund και συν. 1996). Στην αγελάδα η κύρια έκφραση του PAI-1 mRNA εντοπίστηκε στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου και λιγότερο στο επιθήλιο που σχηματίζουν τα κοκκώδη κύτταρα, ενώ αυξημένη έκφρασή του παρατηρήθηκε στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια και στο ωχρο σωματίο (Dow και συν. 2002α). Δραστηριότητα του PAI-1 ανιχνεύθηκε στον ωαγωγό του χοίρου σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε τμήμα του, με σημαντικά υψηλότερη τη δραστηριότητα στον ισθμό (Kouba και συν. 2000α), καθώς και στον ωαγωγό της αγελάδας (Gabler και συν. 2001).

Ο PAI-1 αδρανοποιεί πολύ γρήγορα και αποτελεσματικά και τους δύο ενεργοποιούς του πλασμινογόνου (t-PA, u-PA) και θεωρείται ο αποτελεσματικότερος αδρανοποιός τους (Kruithof 1988).

1.3.4.2 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 2 (PAI-2)

Ο PAI-2 συναντάται στον οργανισμό με δύο μορφές. Η μία πρωτεΐνη είναι κυρίως ενδοκυτταρική, μη γλυκοζυλιωμένη, μοριακού βάρους 43 έως 48kDa και η άλλη είναι εξωκυτταρική, γλυκοζυλιωμένη, με μοριακό βάρος 60 έως 70kDa. Ο PAI-2 αδρανοποιεί, κυρίως, τον u-PA, αλλά και τον t-PA, με ρυθμό σημαντικά βραδύτερο σε σύγκριση με τον PAI-1 (Astedt και συν. 1987, Kruihof και συν. 1995).

Ο PAI-2 έχει απομονωθεί από επιθηλιακά κύτταρα της τροφοβλάστης του πλακούντα, από αμνιακό υγρό και από το πλάσμα του αίματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καθώς και από μακροφάγα, νεοπλασματικά κύτταρα κ.λπ. (Astedt και συν. 1987, Sprengers και Kluft 1987). Ο PAI-2 ανιχνεύθηκε σε ιστούς-κύτταρα της ωοθήκης του ανθρώπου και του πιθήκου (Piquette και συν. 1993, Leonardsson και συν. 1995).

Στα βοοειδή αύξηση του PAI-2 mRNA παρατηρήθηκε στα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια (Dow και συν. 2002α) και η μεγαλύτερη έκκρισή του κατά τη διάρκεια σχηματισμού του ωχρού σωματίου (Dow και συν. 2002α).

1.3.4.3 Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου 3 (PAI-3)

Ο PAI-3 είναι μια πρωτεΐνη, που στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι έχει μοριακό βάρος 51kDa. Έχει ανιχνευθεί στο ούρο και στο πλάσμα του αίματος. Αντιδρά γρήγορα με τον u-PA, ενώ ακόμη μπορεί να αναστείλει και τη δράση της θρομβίνης (Stump και συν. 1986). Ο PAI-3 μάλλον ταυτίζεται με τον αδρανοποιό της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (Heeb και συν. 1987), ο οποίος στα βοοειδή αποτελείται από 404 αμινοξέα (Yuasa και συν. 2000).

1.3.4.4 Πρωτεΐνάση νεξίνη (PN-1)

Η πρωτεΐνάση νεξίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 47kDa (Kruihof 1988) ή 43kDa (Sprengers και Kluft 1987), η οποία έχει απομονωθεί από ινοβλάστες, καρδιακές μυϊκές ίνες, επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού κ.α. Η PN-1 έχει ευρύ ανασταλτικό φάσμα, καθώς μπορεί να αδρανοποιεί σε σημαντικότερο βαθμό από τον t-PA και τον u-PA, τη θρομβίνη και τη θρυψίνη, ενώ μπορεί να αναστέλλει τη δράση της πλασμίνης και του παράγοντα Χα (ενεργοποιημένος παράγοντας X) της πήξης του

αίματος (Scott και Baker 1983, Scott και συν. 1985). Η πρωτεΐνάση νεξίνη στον οργανισμό φαίνεται πως ελέγχει γενικότερα την εντοπισμένη δραστηριότητα πρωτεϊνών και όχι μόνο αυτή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Schleef και Loskutoff 1988).

Η PN-1 εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα στον ποντικό (Hagglund και συν. 1996) και στα βοοειδή (Bedard και συν. 2003). Στον ποντικό, κατά την περίοδο γύρω από την ωοθυλακιόρρηξία, διαπιστώθηκαν, στα κοκκώδη κύτταρα, υψηλά επίπεδα PN-1 mRNA, που δεν επηρεάζονταν από τις γοναδοτροπίνες (Hagglund και συν. 1996). Η έκφραση του PN-1 mRNA είναι μειωμένη στα κοκκώδη κύτταρα, που εντοπίζονται στο βασικό υμένα και αυξημένη στα κοκκώδη κύτταρα που εντοπίζονται κοντά στο ωάριο (Hagglund και συν. 1996).

Στον επίμυ έχει διαπιστωθεί αυξημένη παρουσία του PN-1 mRNA στις ωοθήκες και στη μήτρα κατά τη διάρκεια της περιόδου εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα και στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης. Μάλιστα, η έκφραση του PN-1 mRNA ήταν υψηλότερη στις ωοθήκες από ότι στη μήτρα (Kim και συν. 2001). Η έκφραση του PN-1 mRNA μειώθηκε στον επίμυ μετά από χορήγηση ωοθυλακιόρρηκτικής δόσης ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (Hasan και συν. 2002), ενώ, κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε σε ποντικούς (Hagglund και συν. 1996). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του PN-1 mRNA και έκκρισης της PN-1 ήταν χαμηλότερα στα κοκκώδη επιθηλιακά κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων σε σχέση με εκείνα των μεγάλων, τόσο σε τρωκτικά όσο και σε βοοειδή (Hagglund και συν. 1996, Bedard και συν. 2003, Cao και συν. 2004). Στα προωοθυλακιόρρηκτικά ωοθυλάκια των βοοειδών και λίγο πριν την ωοθυλακιόρρηξία, η PN-1 αυξάνεται μετά από χορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης και στη συνέχεια μειώνεται, ενώ τα επίπεδα της PN-1 είναι υψηλότερα στα μη ατρητικά σε σχέση με τα ατρητικά ωοθυλάκια (Cao και συν. 2006).

1.3.5 Αδρανοποιό της πλασμίνης

Οι παράγοντες, που είναι σε θέση να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών αποτελούν περίπου το 10% των πρωτεϊνών του ορού, όπως διαπιστώθηκε στον άνθρωπο. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν τη δυνατότητα να αδρανοποιούν την πλασμίνη. Ποσοτικά, η α_2 -μακροσφαιρίνη είναι ο σημαντικότερος

αδρανοποιός της πλασμίνης στον οργανισμό, αλλά το βασικό ανασταλτικό ρόλο φαίνεται να παίζει η α_2 -αντιπλασμίνη. Ο α_1 -αδρανοποιός των πρωτεϊνών, η αντιθρομβίνη III και άλλοι παράγοντες είναι δυνατόν να προκαλέσουν αδρανοποίηση της πλασμίνης, αλλά η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της δραστηριότητάς της, *in vivo*, φαίνεται ότι είναι ελάχιστη ή μηδαμινή (Saksela 1985).

Η δραστηριότητα των κυριότερων αδρανοποιών της πλασμίνης (α_2 -αντιπλασμίνη, α_2 -μακροσφαιρίνη) επηρεάζεται από παρεμβάσεις, όπως η ορχεκτομή (Kokolis 1990), η ωοθηκεκτομή (Smokonitis και συν. 1990) και η επινεφριδιεκτομή (Smokonitis και συν. 1991b), από διάφορες ουσίες: π.χ. η ενδοτοξίνη, η ασπιρίνη (Smokonitis και συν. 1988γ), η αλκοόλη (Smokonitis και συν. 1991α), καθώς και από διάφορες παθολογικές καταστάσεις: π.χ. νεοπλασίες, σοβαρές παθήσεις του ήπατος (Collen 1980, Saksela 1985) κ.λπ.

1.3.5.1 α_2 -αντιπλασμίνη

Η α_2 -αντιπλασμίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται στα βοοειδή από 492 αμινοξέα (Christensen και συν. 1994) παράγεται, κυρίως, στο ήπαρ και μπορεί να αδρανοποιεί γρήγορα και αποτελεσματικά την πλασμίνη (Travis και Salvesen 1983). Η αδρανοποίηση αυτή γίνεται με το σχηματισμό ενός πολύ σταθερού συμπλόκου μεταξύ της πλασμίνης και της α_2 -αντιπλασμίνης, το οποίο στερείται ενζυμικής δραστηριότητας (Collen 1980). Η α_2 -αντιπλασμίνη ανευρίσκεται στο πλάσμα του αίματος και σε άλλα υγρά του σώματος (Σμοκοβίτης 1996).

Παρά το γεγονός ότι η α_2 -αντιπλασμίνη έχει τη δυνατότητα να αδρανοποιεί και άλλες πρωτεΐνες, όπως τη θρυψίνη, τον t-PA, την καλλικρεΐνη του πλάσματος, τη χυμοθρυψίνη, τη θρομβίνη κ.ά., ο ρυθμός που τις αδρανοποιεί (με εξαίρεση την θρυψίνη) είναι τόσο βραδύς, ώστε δε φαίνεται πιθανό να παίζει κάποιο φυσιολογικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Travis και Salvesen 1983).

1.3.5.2 α_2 -μακροσφαιρίνη

Η α_2 -μακροσφαιρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 725kDa, που απαρτίζεται από τέσσερις όμοιες υποομάδες, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται στον

άνθρωπο από 1.450 περίπου αμινοξέα. Η α₂-μακροσφαιρίνη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τη δράση των περισσότερων γνωστών πρωτεϊνασών, μεταξύ των οποίων και της πλασμίνης, καθώς και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Κατά συνέπεια, ο κύριος ρόλος της α₂-μακροσφαιρίνης στον οργανισμό προφανώς δεν είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας της πλασμίνης (Travis και Salvesen 1983). Είναι, όμως, πιθανόν η α₂-μακροσφαιρίνη να αναλαμβάνει τέτοιο ρόλο σε περίπτωση που εξαντλούνται τα αποθέματα της α₂-αντιπλασμίνης, όπως για παράδειγμα συμβαίνει μετά από παρατεταμένη θεραπεία με στρεπτοκινάση στον άνθρωπο (Collen 1980).

1.3.6 Τεχνητοί-συνθετικοί αδρανοποιοί του συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη.

Στη θεραπευτική του ανθρώπου χρησιμοποιούνται κάποιοι συνθετικοί παράγοντες ως αντι-ινωδολυτικά. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται και ορισμένα αμινοξέα, όπως είναι το ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ε-aminocaproic acid, ε-ACA) και το τρανεξαμικό οξύ (Okamoto και συν. 1968). Η κύρια δράση του ε-ACA έγκειται στην ανταγωνιστική δέσμευσή του σε θέσεις δέσμευσης της λυσίνης του πλασμινογόνου και της πλασμίνης. Το ε-ACA αναστέλλει την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη από τον u-PA και τον t-PA, ενώ παράλληλα μπορεί να αδρανοποιεί και την πλασμίνη (Prentice 1980). Η δράση του ε-ACA έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η έγχυση ε-ACA σε ωοθυλάκια μείωσε σημαντικά το ποσοστό των ωοθυλακιόρρηξιών σε προβατίνες, ενώ, αντίθετα, η έγχυση πλασμίνης το αύξησε σημαντικά (Smokonitis και συν. 1989).

1.4 Ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος «ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη»

Ο πολυεπίπεδος και αποτελεσματικός τρόπος ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη συνιστά ένα από τα σημαντικότερα βιολογικά του χαρακτηριστικά. Η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη από τους ενεργοποιούς του πλασμινογόνου ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα

άλλων ουσιών, που μπορούν να αδρανοποιούν τους ενεργοποιούς του πλασμινογόνου (αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου). Η πρωτεολυτική δραστηριότητα της ήδη σχηματισμένης πλασμίνης ελέγχεται από άλλες ουσίες, οι οποίες μπορούν να αδρανοποιούν την πλασμίνη (αδρανοποιοί της πλασμίνης). Ακόμη, το ενζυμικό σύστημα επηρεάζεται από το ρυθμό με τον οποίο συντίθενται αλλά και απελευθερώνονται από τα κύτταρα οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου, οι αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, καθώς και οι αδρανοποιοί της πλασμίνης. Σημαντικός είναι, επίσης, ο ρυθμός της ενεργοποίησης των αδρανών προενζυμικών μορφών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, όπως του u-PA. Όπως αναφέρθηκε, οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου συνδέονται με υποδοχείς της μεμβράνης των κυττάρων, με διάφορες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, ακόμη και με την πλασμίνη, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και να ενισχύεται η δράση τους και, κατά συνέπεια, να επηρεάζεται όλο το σύστημα από το ρυθμό σύνδεσής τους. Ένα άλλο καθοριστικό στοιχείο, που επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος, είναι και ο ρυθμός με τον οποίο αδρανοποιούνται οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου αλλά και ο ρυθμός απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό, κυρίως μέσω του ήπατος (Collen 1980, Dano και συν. 1985, Saksela 1985, Σμοκοβίτης 1996).

Γενικά, εάν μία ή περισσότερες από τις διεργασίες, που προαναφέρθηκαν, επηρεαστεί από κάποιον παράγοντα, τότε επηρεάζεται ολόκληρο το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιοί του πλασμινογόνου-πλασμίνη (Σμοκοβίτης 1996). Όλοι εκείνοι, λοιπόν, οι φυσιολογικοί αλλά και φυσιοπαθολογικοί παράγοντες, που μπορούν να επηρεάσουν οποιονδήποτε επιμέρους παράγοντα του συστήματος, μπορούν να επηρεάσουν τη συνολική δραστηριότητά του.

Σκοπός της Διατριβής

Η *in vitro* παραγωγή εμβρύων βοοειδών δίνει τη δυνατότητα εντατικής εκμετάλλευσης αγελάδων υψηλής γενετικής αξίας, καθώς και επιτάχυνσης του ρυθμού γενετικής βελτίωσης ενός πληθυσμού. Όμως, οι τελικές αποδόσεις της συλλογής ωαρίων, της *in vitro* ωρίμανσης και γονιμοποίησής τους και της *in vitro* καλλιέργειας εμβρύων υπολείπονται σημαντικά σε σχέση με τις *in vivo* αποδόσεις, γεγονός που επιβαρύνει το κόστος εφαρμογής τους. Σήμερα, στο επίπεδο της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών, σημαντικό στόχο αποτελεί η μείωση της χρονικής διάρκειας των επιμέρους σταδίων διενέργειας των τεχνικών, με σκοπό τη μείωση του κόστους τους. Παράλληλα, επιχειρείται η εξάλειψη των ανεπιθύμητων διεργασιών (π.χ. οξειδωτικό stress, γήρανση των ωαρίων, αρνητική επίδραση προϊόντων μεταβολισμού των κυττάρων), με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας των παραγόμενων εμβρύων (Gordon 1994, Rizos και συν. 2002, Ward και συν. 2002, Merton και συν. 2003).

Όπως αναφέρθηκε, δραστηριότητα του συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει ανιχνευθεί στην ωοθήκη, στα ωοθυλάκια, στα κοκκώδη κύτταρα, στο ωάριο, στον ωαγωγό, στο σπέρμα (πλάσμα σπέρματος και σπερματοζώαριο), στο έμβρυο και στην μήτρα. Επίσης, το σύστημα αυτό φαίνεται πως συμμετέχει στην ωρίμανση του ωοθυλακίου, στην ωρίμανση των γαμετών, στη γονιμοποίηση, στην αντίδραση της διαφανούς ζώνης, στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην εγκατάστασή του στη μήτρα.

Σε σχέση με τις *in vitro* συνθήκες, στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης, γονιμοποίησης των ωαρίων και καλλιέργειας των εμβρύων προστίθενται παράγωγα αίματος (ορός αγελάδας σε οίστρο, ορός εμβρύου μόσχου), στα οποία έχει διαπιστωθεί δραστηριότητα κυρίως αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Collen 1980, Dano και συν. 1985, Saksela 1985, Σμοκοβίτης 1996). Επίσης, όπως αναφέρθηκε, η παρουσία του συστήματος έχει βρεθεί στους δύο γαμέτες, στα κοκκώδη κύτταρα, καθώς και στο έμβρυο. Στα υποστρώματα της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, υπάρχουν και παράγοντες (π.χ. ορμόνες) που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν, σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, τη ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος.

Σε ό,τι αφορά την *in vitro* παραγωγή εμβρύων, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που αναδεικνύουν την πιθανή θετική επίδραση του ενζυμικού συστήματος στα επιμέρους στάδιά της. Πιο αναλυτικά, στον άνθρωπο έχει βρεθεί σε *in vitro* μελέτες ότι στο ωοθυλακικό υγρό και στα κοκκώδη επιθηλιακά κύτταρα ωοθυλακίων των οποίων τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν, η δραστηριότητα του ενεργοποιού του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με εκείνη των ωοθυλακίων των οποίων τα ωάρια δεν γονιμοποιήθηκαν (Deutinger και συν. 1988, Milwidsky και συν. 1989). Η προσθήκη αδρανοποιών διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων (μεταξύ των οποίων και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου) στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων επίμυος ελάττωσε το ποσοστό αυτόματης εμφάνισης της αντίδρασης της διαφανούς ζώνης (Zhang και συν. 1991, 1992). Η παρουσία αδρανοποιών πρωτεϊνών του τύπου της θρυψίνης και αδρανοποιών της πλασμίνης στο περιβάλλον της γονιμοποίησης οδήγησε σε μείωση τόσο της δέσμευσης των σπερματοζωαρίων στη διαφανή ζώνη όσο και του ποσοστού γονιμοποίησης (Saling 1981, Beyler και Zaneveld 1982, Benau και Storey 1987, 1988). Στον ποντικό η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης αύξησε το ποσοστό των γονιμοποιημένων ωαρίων, ενώ η προσθήκη αδρανοποιών της πλασμίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης (Huarte και συν. 1993). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στα έμβρυα του επίμυ, όταν αναπτύσσονται *in vitro* η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου είναι χαμηλότερη σε σχέση με των εμβρύων που αναπτύσσονται *in vivo* και αυτό συσχετίζεται επίσης και με τα χαμηλότερα ποσοστά επιτυχούς εγκατάστασης του εμβρύου στο ενδομήτριο, που παρατηρούνται σε *in vitro* παραχθέντα έμβρυα (Aflalo 2004, 2005). Σε καλλιέργεια εμβρύων ποντικού, όταν το υπόστρωμα, που χρησιμοποιήθηκε περιείχε πλασμινογόνο ή πλασμίνη, επιτεύχθηκε εκκόλαψη μεγαλύτερου ποσοστού βλαστοκύστεων (Menino και O'Claray 1986). Στα βοοειδή, αυξημένη παρουσία πλασμινογόνου στα υποστρώματα, επιτάχυνε την ανάπτυξη των εμβρύων (έως το στάδιο της εκκόλαψης της βλαστοκύστης) σε σχέση με τις μειωμένες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η παρουσία του συστήματος συσχετίζεται θετικά με την διάταση της κοιλότητας και την εκκόλαψη της βλαστοκύστης, καθώς βλαστοκύστες, που δεν οδηγήθηκαν σε εκκόλαψη εμφάνιζαν μικρότερη δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Menino και Williams 1987, Kaaekuahiwi και Menino 1990).

Όπως είναι γνωστό, το ωοθυλακικό υγρό και το περιβάλλον του ωαγωγού αποτελούν τα βιολογικά αντίστοιχα των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων. Για την καλύτερη προσομοίωση των *in vivo* συνθηκών γίνονται διαρκώς προσπάθειες τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, αφού οι μειωμένες *in vitro* αποδόσεις αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στη σύνθεση αυτών των υποστρωμάτων (Gordon 1994, Grippo και συν. 1995, Bevers και συν. 1997, Kruip και συν. 2000, Rizos και συν. 2002, Galli και συν. 2003, Merton και συν. 2003). Στις προσπάθειες αυτές δεν έχει, ακόμη, διερευνηθεί πλήρως ο πιθανός ρόλος του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη, παρά την ύπαρξη των δεδομένων, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, για τη συμμετοχή του στην διαδικασία της αναπαραγωγής. Αυτό, ενδεχομένως, έχει ως αποτέλεσμα οι τυχαίες παρεμβάσεις, σε σχέση με το ενζυμικό σύστημα, στο περιβάλλον των γαμετών και των εμβρύων να επηρεάζουν τη λειτουργική ακεραιότητά τους.

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, με την προσθήκη παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιό του πλασμινογόνου-πλασμίνη, στην αποτελεσματικότητα των επιμέρους σταδίων της IVP στα βοοειδή. Για το λόγο αυτό διενεργήθηκαν πειραματισμοί κατά τους οποίους προστέθηκαν, στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης και γονιμοποίησης ωαρίων και ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών, βόειο πλασμινογόνο, ενεργοποιό του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA), πλασμίνη και ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ουσία που αδρανοποιεί συνολικά το ενζυμικό αυτό σύστημα). Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης των παραγόντων αυτών στην ωρίμανση των ωαρίων, στην *in vitro* γονιμοποίησή τους και στα πρώιμα στάδια της *in vitro* ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Οι πειραματισμοί της παρούσας μελέτης διακρίνονται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε συγκριτικός προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών της πλασμίνης στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου και του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, καθώς και στα τυποποιημένα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης (IVM) και γονιμοποίησης (IVF) των ωαρίων αλλά και της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων (IVC). Επίσης, στο ωοθυλακικό υγρό ταυτοποιήθηκαν οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου.

Για την πραγματοποίηση της δεύτερης φάσης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10.639 ωάρια (κατηγορίας A). Σε κάθε πειραματισμό περιλαμβάνονταν, εκτός του τροποποιημένου με ένα συγκεκριμένο παράγοντα υποστρώματος, ένα τυποποιημένο υπόστρωμα (μάρτυρας) και ένα τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα. Το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα λειτουργούσε ως ενδιάμεσος μάρτυρας. Για κάθε παράγοντα του συστήματος ενεργοποιοί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, που εξετάσθηκε, έγιναν πειραματισμοί που αφορούσαν στην τροποποίηση των υποστρωμάτων της ωρίμανσης και της γονιμοποίησης των ωαρίων καθώς και της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων. Οι πειραματισμοί για τον έλεγχο της ωρίμανσης περιελάμβαναν 18ωρης και 24ωρης διάρκειας επώσεις των ωαρίων. Η συνεπώαση των γαμετών στη γονιμοποίηση ήταν πάντοτε διάρκειας 24 ωρών, ενώ η γονιμοποίηση των ωαρίων και η ανάπτυξη των εμβρύων ελέγχονταν 48 ώρες μετά τη μεταφορά των ωαρίων από το υπόστρωμα της IVF στο υπόστρωμα της IVC.

- Τροποποίηση του υποστρώματος της IVM

Στην *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με επώσεις διάρκειας 18 και 24 ωρών, που περιελάμβαναν -σε κάθε περίπτωση-, την εκτίμηση της ωρίμανσης των ωαρίων με βάση το στάδιο ωρίμανσης του πυρήνα τους. Σε άλλη ομάδα πειραματισμών, την IVM ακολουθούσε ολοκλήρωση των IVF και IVC και εκτίμηση της

επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματός της στην κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων, με κριτήρια τη μετέπειτα γονιμοποίηση και εμβρυική ανάπτυξη.

- Τροποποίηση του υποστρώματος της IVF

Για τον έλεγχο της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* γονιμοποίησης τα ωάρια επωάζονταν πάντοτε για 24 ώρες σε τυποποιημένο υπόστρωμα IVM. Η IVF αφορούσε 24ωρης διάρκειας συνεπώαση των γαμετών και το αποτέλεσμα της τροποποίησης του υποστρώματός της ελέγχονταν μετά από *in vitro* καλλιέργεια των εμβρύων για 48 επιπλέον ώρες σε τυποποιημένο υπόστρωμα της IVC.

- Τροποποίηση του υποστρώματος της IVC

Για τον έλεγχο της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων προηγούνταν 24ωρης διάρκειας ωρίμανση των ωαρίων και 24ωρης διάρκειας IVF στα αντίστοιχα τυποποιημένα υποστρώματα. Η IVC αφορούσε 48ωρη καλλιέργεια των εμβρύων, την οποία ακολουθούσε έλεγχος της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματός της στην εξέλιξη των εμβρύων.

2.2 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP των βοοειδών

2.2.1 Συλλογή βιολογικών υγρών

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών της πλασμίνης στο ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων χρησιμοποιήθηκαν 6 αγελάδες, φυλής Holstein ηλικίας 4-6 ετών. Όλα τα ζώα ήταν υγιή. Στα ζώα αυτά έγινε συγχρονισμός οίστρου με ενδομυϊκή χορήγηση 2 δόσεων προσταγλανδίνης F2α (cloprostenol, Estrumat, Shering-Plough, ΗΠΑ) με μεσοδιάστημα 11 ημερών. Μετά τον οίστρο (ημέρα 0) οι ωοθήκες ελέγχονταν καθημερινά με υπερηχογραφική εξέταση (Aquila, Pie Medical, κεφαλή γραμμικής σάρωσης 6,5MHz, Maastricht, Ολλανδία, 6.5MHz convex transducer) για την αναγνώριση του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των

ωοθυλακίων. Την ημέρα 7 έγινε αναρρόφηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου με υπερηχογραφική καθοδήγηση (Amiridis και συν. 1999).

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιή του πλασμινογόνου-πλασμίνη στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, χρησιμοποιήθηκαν 8 υγιείς αγελάδες φυλής Holstein, ηλικίας 4-5 ετών, που ήταν σε οίστρο. Ο οίστρος προκλήθηκε μετά από ενδομυϊκή χορήγηση 2 δόσεων προσταγλανδίνης F2α με μεσοδιάστημα 12 ημερών. Τα ζώα οδηγήθηκαν στο βιομηχανικό σφαγείο της Χαλάστρας του Νομού Θεσσαλονίκης και η θανάτωσή τους έγινε 54 ώρες μετά τη δεύτερη χορήγηση προσταγλανδίνης.

Οι ωοθήκες, συλλέχθηκαν από τα ζώα αυτά σε διάστημα μίας ώρας και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 20 έως 30', συντηρούμενες σε θερμοκρασία 15 °C. Ακολούθησε η αναρρόφηση του περιεχομένου του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου (διαμέτρου >1 cm) από κάθε αγελάδα με σύριγγα μιας χρήσης στην οποία είχε προσαρμοστεί βελόνα 21 G.

Το ωοθυλακικό υγρό, που συλλέχθηκε, διηθήθηκε μέσω ηθμού με πόρους διαμέτρου 0,22 μm (Millipore), ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα και το ωάριο και αποθηκεύθηκε στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή του.

2.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων των υποστρωμάτων της IVP

Η δραστηριότητα των παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιή του πλασμινογόνου-πλασμίνη προσδιορίστηκε στα τυποποιημένα υποστρώματα, όπως αυτά παρασκευάζονταν πριν από τη χρήση τους.

2.2.3 Ενζυμικοί προσδιορισμοί

Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Activity, PAA) προσδιορίστηκε στα βιολογικά υγρά και στα τυποποιημένα υποστρώματα με φασματοφωτομετρική μέθοδο (Pέκκας 1992), με τη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251 (Chromogenix, Μιλάνο, Ιταλία). Ένας συνολικός όγκος 500 μl διαλύματος, που αποτελούνταν (με σειρά προσθήκης τους) από 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, pH 7,4, 100 μl δείγματος, 100 μl διαλύματος βόειου πλασμινογόνου (τελική συγκέντρωση 0,5 CU/ml, Sigma Chemicals, St. Louis, ΗΠΑ) και

200 μl χρωμογόνου υποστρώματος S-2251 (τελική συγκέντρωση 0,73 mM), επωαζόταν στους 37°C, για 30 λεπτά (“κύριος σωλήνας”). Η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 1 ml διαλύματος οξικού οξέος 50%. Για κάθε “κύριο σωλήνα” χρησιμοποιήθηκε και ένας “σωλήνας μάρτυρας”, στον οποίο γινόταν προσθήκη 100 μl δείγματος μετά την προσθήκη του οξικού οξέος. Η μέτρηση της απορρόφησης γινόταν σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu, Τόκιο, Ιαπωνία), σε μήκος κύματος 405 nm. Η PAA εκφραζόταν σε διεθνείς μονάδες t-PA ή u-PA με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών, που χαράχθηκαν με τη χρήση t-PA (t-PA, Sigma Chemicals, St. Louis, ΗΠΑ) ή u-PA (u-PA, Sigma Chemicals, St. Louis, ΗΠΑ). Η PAA εκφραζόταν σε t-PA IU ή u-PA IU/0,1ml οοθυλακικού υγρού ή υποστρώματος.

Η δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibition, PAI) προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο (Ρέκκας 1992), με τη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251. Για το σκοπό αυτό σε 100μl δείγματος προσθέτονταν 100 μl, 5 IU διαλύματος t-PA ή 100 μl, 0,05 IU διαλύματος u-PA και το διάλυμα επωαζόταν στους 37 °C, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, για να καταστραφούν οι αδρανοποιοί της πλασμίνης, προσθέτονταν 100 μl διαλύματος HCl 0,16 M και ακολουθούσε επώαση επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αποκατάσταση του pH στο 7,4 γινόταν με την προσθήκη 100 μl διαλύματος NaOH 0,16M. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl 0,5 CU/ml διαλύματος βόειου πλασμινογόνου και 200 μl χρωμογόνου υποστρώματος S-2251. Το μίγμα επωαζόταν στους 37 °C για 30 λεπτά και η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 1 ml διαλύματος οξικού οξέος 50%. Ο σωλήνας αυτός αποτελούσε τον “κύριο σωλήνα”. Σε ένα άλλο σωλήνα, το “σωλήνα αναφοράς” ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι ο ενεργοποιός του πλασμινογόνου (t-PA ή u-PA) είχε αντικατασταθεί από 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4). Σε ένα τρίτο σωλήνα, τον “σωλήνα μάρτυρα”, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή του “σωλήνα αναφοράς”, με τη διαφορά ότι η προσθήκη των 100 μl δείγματος γινόταν μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Η διαφορά απορρόφησης, σε μήκος κύματος 405 nm, μεταξύ του “κύριου σωλήνα” και του “σωλήνα αναφοράς” αποδιδόταν στην παρουσία των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και εκφραζόταν σε t-PA IU ή u-PA IU/0,1ml δείγματος.

Η δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης (Plasmin Inhibition, PI) προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο (Ρέκκας 1992), με τη χρήση του

χρωμογόνου υποστρώματος S-2251. Για το σκοπό αυτό στον “κύριο σωλήνα” προστέθηκαν 100 μl δείγματος και 100 μl διαλύματος ανθρώπινης πλασμίνης (0,1 IU/ml, Sigma Chemical, St. Louis, ΗΠΑ). Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (pH 7,4). Το μίγμα επωαζόταν στους 37°C για 2 λεπτά και προσθέτονταν 100 μl του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251 (0,3 mM), με σκοπό να προσδιορισθεί η δραστηριότητα της πλασμίνης που απέμενε μετά την επώαση της εξωγενούς πλασμίνης με το δείγμα. Έπειτα, ακολουθούσε επώαση του μίγματος στους 37°C για 5 λεπτά. Η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 200 μl διαλύματος οξικού οξέος 50%. Στο “σωλήνα μάρτυρα” σε σχέση με τον “κύριο σωλήνα” η προσθήκη του δείγματος γινόταν μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, ενώ στο “σωλήνα αναφοράς” αντί του δείγματος προστίθετο ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Η δραστηριότητα των αδρανοποιηών της πλασμίνης προσδιοριζόταν από τη διαφορά απορρόφησης, σε μήκος κύματος 405 nm, μεταξύ του “κύριου σωλήνα” και του “σωλήνα αναφοράς” και εκφραζόταν σε χιλιοστά διεθνών μονάδων πλασμίνης με τη χρήση πρότυπης καμπύλης πλασμίνης.

Οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA) ταυτοποιήθηκαν με ανοσολογικές μεθόδους (Ρέκκας 1992). Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα πολυκλωνικά αντισώματα, δηλαδή αντι-t-PA IgG και αντι-u-PA IgG (Biorpool, Σουηδία). Πριν από τη χρήση τους τα αντισώματα διαλύονταν (0,1-0,2 mg/ml η αντι-t-PA IgG και 0,1-0,3 mg/ml η αντι-u-PA IgG) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffered saline, PBS). Ο “κύριος σωλήνας” περιείχε 100 μl δείγματος ωοθυλακικού υγρού και 100 μl από το διάλυμα του αντισώματος. Ο “σωλήνας μάρτυρας” και ο “σωλήνας αναφοράς” περιείχαν 100 μl PBS αντί για το διάλυμα του αντισώματος. Το μίγμα επωαζόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 90 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, γινόταν η προσθήκη 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl pH 7,4, 100 μl διαλύματος ομόλογου (βόειου) πλασμινογόνου και 200 μl διαλύματος χρωμογόνου S-2251. Στο “σωλήνα μάρτυρα”, το S-2251 προστίθετο μετά το τέλος της αντίδρασης. Οι σωλήνες επωαζόνταν (37 °C για 30 λεπτά) και η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 1 ml διαλύματος οξικού οξέος 50%. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν σε μήκος κύματος 405 nm. Η αναστολή της δραστηριότητας των ενεργοποιοών του πλασμινογόνου αποδιδόταν στην παρουσία των αντισωμάτων,

προσδιοριζόταν από τη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ του “σωλήνα αναφοράς” και του “κύριου σωλήνα” και εκφραζόταν ως αναστολή επί τοις εκατό.

Η ανθρώπινη αντι-u-PA IgG δεν δεσμεύει σε ικανοποιητικό βαθμό τον u-PA και για την ταυτοποίηση του χρησιμοποιήθηκε και η αμιλορίδη (Sigma Chemical, St. Louis, ΗΠΑ), που εξουδετερώνει εκλεκτικά τη δράση του (Vassalli και Belin 1987). Κάθε σωλήνας περιείχε 100 μl δείγματος και 100 μl από ένα υδατικό διάλυμα αμιλορίδης (4 mM). Ο “σωλήνας μάρτυρας” και ο “σωλήνας αναφοράς” περιείχαν 100 μl H₂O αντί της αμιλορίδης. Οι σωλήνες προεπαζόνταν στους 37 °C για 30 λεπτά και κατόπιν προσθέτονταν ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH 7,4), πλασμινογόνο και διάλυμα του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251. Ακολουθούσε επώαση όλων των σωλήνων στους 37 °C για 30 λεπτά. Η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 1 ml διαλύματος οξικού οξέος 50% και ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 405 nm. Ο βαθμός αναστολής της δραστηριότητας του u-PA, που προκαλούσε η προσθήκη της αμιλορίδης καθοριζόταν με βάση τη διαφορά της οπτικής πυκνότητας μεταξύ του “σωλήνα αναφοράς” και του σωλήνα που περιείχε αμιλορίδη και εκφραζόταν ως αναστολή επί τοις εκατό.

2.3 Παραγωγή εμβρύων *in vitro* (in vitro embryo production, IVP)

2.3.1 Συλλογή ωοθηκών-ωαρίων

Για τις ανάγκες του πειραματισμού χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες αγελάδων και μοσχίδων από τα βιομηχανικά σφαγεία της Χαλάστρας και της Χαλκηδόνας του Νομού Θεσσαλονίκης. Οι ωοθήκες συλλέγονταν ανεξάρτητα από το στάδιο του οιστρικού κύκλου, την ηλικία του ζώου και την αιτία σφαγής του. Δεν χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες ζώων προσβεβλημένων από φυματίωση ή βρουκέλλωση.

Μετά τον εκπλαχνισμό, οι ωοθήκες συλλέγονταν με κάθε δυνατό μέτρο ασηψίας και πραγματοποιούνταν δύο διαδοχικές πλύσεις σε ισοθερμικά δοχεία που περιείχαν υπόστρωμα έκπλυσης (τμήμα 2.3.7.2) σε θερμοκρασία 25 έως 30 °C. Το pH του διαλύματος ήταν 7,2 και η ωσμωτική πίεσή του κυμαινόταν μεταξύ 285 και 295 mOsm. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε από τη θανάτωση (αφαίμαξη) του ζώου

μέχρι και τη συλλογή του ζεύγους ωοθηκών του κυμαινόταν μεταξύ 40 και 50 λεπτών. Μετά το τέλος της συλλογής, οι ωοθήκες μεταφέρονταν στο εργαστήριο σε χρόνο που κυμαινόταν μεταξύ 20 και 30 λεπτών.

Οι χειρισμοί που ακολουθούσαν έγιναν σύμφωνα με όσα περιγράφουν οι Lutterbach και συν. (1987), Βαϊνάς και συν. (1994) και Lonergan και συν. (1999). Στο εργαστήριο όλοι οι χειρισμοί των ωοθηκών γίνονταν σε στείρο περιβάλλον, σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής. Πριν από την έναρξη της συλλογής των ωαρίων πραγματοποιούνταν εκ νέου τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των ωοθηκών με υπόστρωμα έκπλυσης, για την περαιτέρω μείωση του εξωτερικού μικροβιακού φορτίου τους (τμήμα 2.3.7.2).

Η συλλογή των ωαρίων γινόταν με βελόνα 18G και με τη βοήθεια αντλίας αναρρόφησης, που δημιουργούσε υποπίεση 100 mmHg (Medela Vario, Ελβετία). Οι σωλήνες συλλογής περιείχαν 1 ml υποστρώματος έκπλυσης και διατηρούνταν σε υδατόλουτρο (37 °C). Η συλλογή των συμπλεγμάτων ωαρίων-ωοφόρου δίσκου (Cumulus-Oocyte Complexes, COCs) γινόταν από ωοθυλάκια διαμέτρου 2 mm έως 8 mm με διαυγές τοίχωμα και καλή ανάπτυξη της αγγείωσης, τα οποία έχουν σημαντικές πιθανότητες να μην είναι ατρητικά (Hendriksen και συν. 2000). Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής, μεταφερόταν σε τρυβλίο Petri ιστοκαλλιέργειας διαμέτρου 10 cm, όπου γινόταν, υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (x75) (εικ.2), η εντόπιση και η εκτίμηση της ποιότητας των συλλεγόμενων COCs.

Από το σύνολο των COCs επιλέγονταν όσα ανήκαν στην κατηγορία Α κατά Leibfried και First 1979, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεπτόκκοκου και ομοιογενούς κυτταροπλάσματος, που περιβάλλεται από ισχυρά προσκολλημένο ακέραιο και συμπαγή ωοφόρο δίσκο (εικ.2β). Μετά από την επιλογή των COCs, ακολουθούσε έκπλυσή τους με διαδοχικές διόδους από δύο τρυβλία Petri ιστοκαλλιέργειας διαμέτρου 3 cm, που περιείχαν 3 ml υποστρώματος ωρίμανσης (τμήμα 2.3.7.3).

Η διαδικασία συλλογής, επιλογής και έκπλυσης διαρκούσε από 60 έως 90 λεπτά.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 3.738 ωοθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν 33.268 αναρροφήσεις (8,9 αναρροφήσεις/ωοθήκη) και συλλέχθηκαν 19.361 (ποσοστό συλλογής 58,2%) COCs, από τα οποία 10.639 (2,85 κατάλληλα ωάρια/ωοθήκη) επιλέχθηκαν ως ανήκοντα στην κατηγορία Α και χρησιμοποιήθηκαν στους πειραματισμούς.

2.3.2 Ωρίμανση ωαρίων *in vitro* (in vitro oocyte maturation, IVM)

Πραγματοποιήθηκαν 18ωρες και 24ωρες επώασεις των COCs, που ακολουθούνταν από εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων ή από γονιμοποίηση και ανάπτυξη των εμβρύων, που προέκυπταν, *in vitro*.

Τα COCs, που επιλέγονταν ως κατάλληλα για ωρίμανση *in vitro* (εικ.2β), χωρίζονταν τυχαία σε ομάδες των 15 έως 20 και τοποθετούνταν σε χωριστά βοθρία ειδικών τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας (4 βοθρίων χωρητικότητας 1 ml/βοθρίο, Nunclon, Δανία), που περιείχαν είτε τυποποιημένο (μάρτυρας) (τμήμα 2.3.7.3), είτε τροποποιημένο (τμήμα 2.3.9), με παράγοντες του συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, υπόστρωμα ωρίμανσης. Στη συνέχεια, η ελεύθερη επιφάνεια του υγρού σε κάθε βοθρίο καλύπτονταν με 400 μl παραφινέλαιο (τμήμα 2.3.7.7).

Η ωρίμανση των COCs γινόταν με στατικό σύστημα σε επωαστικό κλίβανο δύο αερίων (P Selecta, Ισπανία) για 18 ή 24 ώρες, ανάλογα με τον πειραματισμό, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν. 1994, Lonergan και συν. 1999).

2.3.3 Εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων

Τα ωάρια που επιλέγονταν ως κατάλληλα για ωρίμανση *in vitro*, επώάζονταν για 18 ή 24 ώρες σε τυποποιημένο ή τροποποιημένο υπόστρωμα, ανάλογα με τον πειραματισμό (εικ.3α).

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης (εικ. 3β), πραγματοποιούνταν η εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η διαδικασία αυτή (Gradl 1988, Kinis και συν. 1989, Βαϊνάς και συν. 1994) περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Μετά το τέλος της IVM, τα ωάρια απογυμνώνονταν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που τα περιέβαλαν, μετά από μεταφορά τους σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 2,96% (w/v) και ισχυρή ανακίνησή τους σε κυκλομίκτη για 4 λεπτά περίπου.

- Αμέσως μετά, τα απογυμνωμένα ωάρια, μεταφέρονταν σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 3 cm που περιείχε 3 ml υπότονου διαλύματος KCL (0,075 M), στο οποίο παρέμεναν για

7 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C, προκειμένου να διευρυνθεί η απόσταση μεταξύ των χρωματοσωμάτων τους.

- Στη συνέχεια, τα ωάρια μεταφέρονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μονιμοποιούνταν με στάγδην εναπόθεση και υπό στερεοσκοπική παρατήρηση, ψυχρού μονιμοποιητικού διαλύματος (οξικό οξύ/μεθανόλη 1:3, v/v). Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνονταν ρήξη της διαφανούς ζώνης και σταθεροποίηση των ωαρίων στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

- Τα παρασκευάσματα αφήνονταν σε συνθήκες περιβάλλοντος για 24 ώρες και ακολουθούσε χρώση τους με διάλυμα ορκεΐνης 2% (τμ. 2.3.7.8).

Η εκτίμηση της εξέλιξης της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων γινόταν σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού (x1000). Κατά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων των ωαρίων ο πυρήνας τους αναμενόταν να βρίσκεται σε ένα από τα παρακάτω στάδια:

- Πρόφαση I (PI)

- Μείωση I

 - Μετάφαση I (MI)

 - Ανάφαση I (AI)

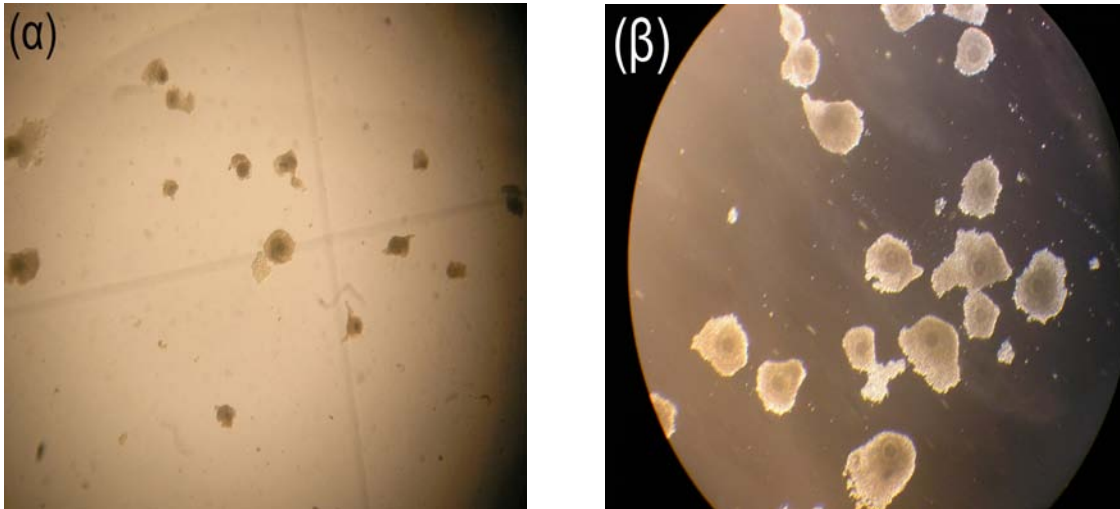
 - Τελόφαση I (TI)

- Μείωση II

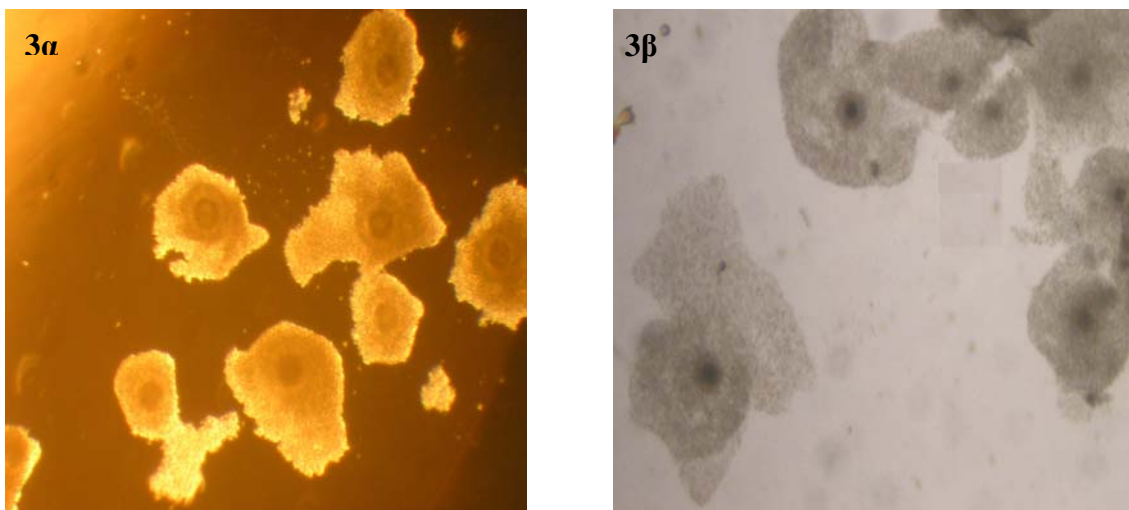
 - Μετάφαση II (MII)

Ως ώριμα θεωρούνταν τα ωάρια που βρίσκονταν στο στάδιο είτε της τελόφασης I είτε της μετάφασης II (Leibfried-Rutledge και συν. 1986, Chian και συν. 1992, Dominko και First 1997). Τα ωάρια που βρίσκονταν στο στάδιο της τελόφασης I προσμετρήθηκαν στα ώριμα ωάρια (Chian και συν. 1992, Dominko και First 1997), επειδή στους πειραματισμούς αυτής της μελέτης επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μόνο ωάρια που έφεραν συμπαγή και ακέραιο ωοφόρο δίσκο. Στα ωάρια αυτά, όπως υποστηρίζουν οι Spiropoulos και Long (1989), είναι δυνατό να παρατηρηθεί καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, η οποία όμως ολοκληρώνεται κατά την έναρξη της IVF, χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητα γονιμοποίησής τους. Τα ωάρια, στα οποία δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί το στάδιο μειωτικής διαίρεσης με βάση την εξέλιξη του πυρήνα χαρακτηρίζονταν ως αδιευκρίνιστα. Στην εικόνα 4 απεικονίζονται τα βασικά στάδια της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων, όπως αυτά παρατηρήθηκαν στους

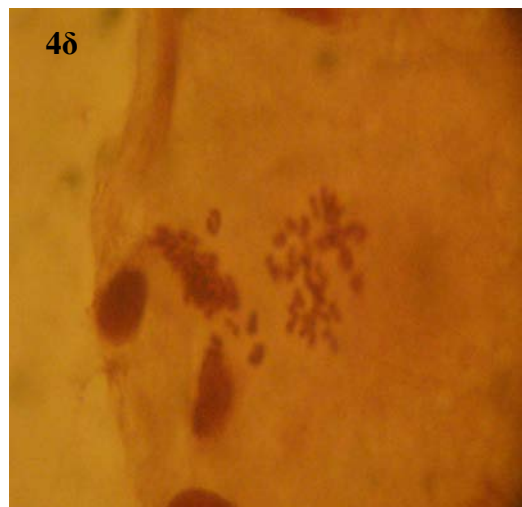
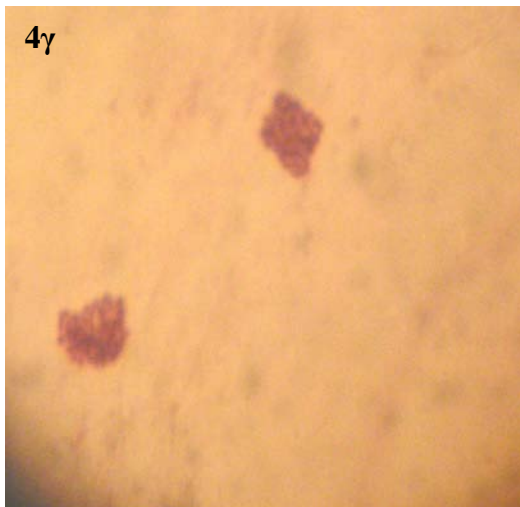
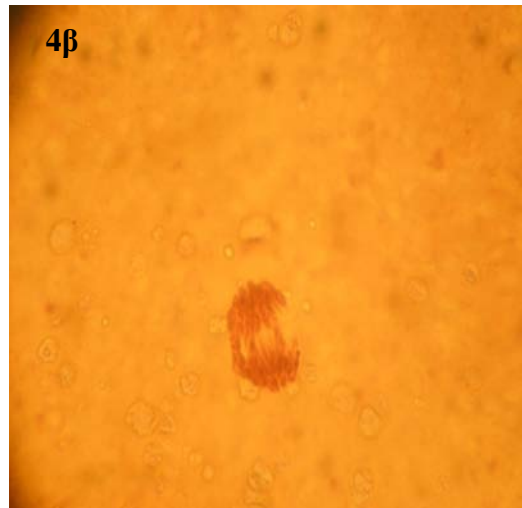
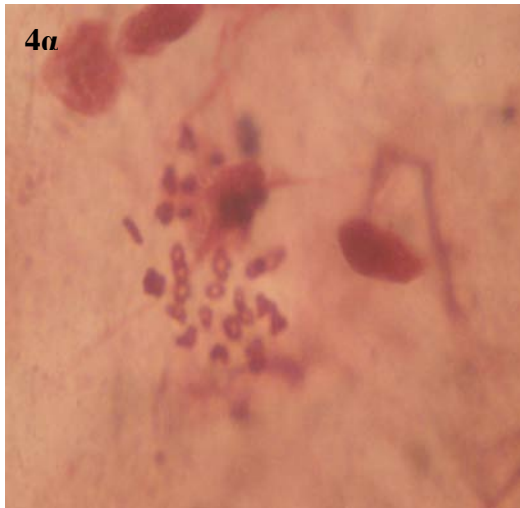
πειραματισμούς της παρούσας εργασίας και χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της IVM.



Εικόνα 2. α) Ωάρια που συλλέχθηκαν μετά την αναρρόφηση (x50), β) COCs Α κατηγορίας (x75).



Εικόνα 3. Ωάρια πριν από την έναρξη της IVM (3α) και μετά από την IVM (3β), όπου διακρίνεται η επέκταση του ωοφόρου δίσκου (x100).



Εικόνα 4. Ωάρια μετά από 18ωρη ή 24ωρη IVM. Μονιμοποίηση και χρώση με ορκεΐνη 2%. Διακρίνονται τα χρωματοσώματα στο στάδιο της μετάφασης I (4α), της ανάφασης I (4β), της τελόφασης I (4γ) και της μετάφασης II (4δ) (x1000). Ωριμα χαρακτηρίστηκαν τα ωάρια των δύο τελευταίων σταδίων.

2.3.4 Προετοιμασία του σπέρματος (εμπλουτισμός του σπέρματος και ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων)

Σε όλους τους πειραματισμούς που περιελάμβαναν *in vitro* γονιμοποίηση, χρησιμοποιήθηκε κατεψυγμένο σπέρμα μιας σπερματοληψίας, ταύρου φυλής Holstein του Ινστιτούτου Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης Θεσσαλονίκης, αποδεδειγμένης γονιμότητας. Η ζωτικότητα και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων του πριν από την κατάψυξη ήταν 75% και 4, αντίστοιχα και μετά την αναβίωση ήταν κατά μέσο όρο 60% και 3,5, αντίστοιχα.

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

Η αναβίωση των σπερματοζωαρίων γινόταν με εμβάπτιση των πλαστικών σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 38 έως 39 °C για 25 δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια γινόταν εμπλουτισμός σε σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση με την εφαρμογή της τεχνικής του εμπλουτισμού μετά από επώαση του σπέρματος σε υπόστρωμα ενεργοποίησης και απομάκρυνση των παραγόντων της απενεργοποίησης. Η τεχνική που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω (Parrish και συν. 1986, 1988, Gordon 1994).

- Στον πυθμένα δοκιμαστικού σωλήνα φυγοκέντρησης που περιείχε 1 ml υποστρώματος ενεργοποίησης (τμήμα 2.3.7.4) τοποθετούνταν 210 μ l σπέρματος και επωάζονταν για 1 ώρα στον επωαστικό κλίβανο (5% CO₂ σε αέρα, θερμοκρασία 39 \pm 0,1 °C και υγρασία >95%). Ανάλογα με τον αριθμό των βοθρίων του εκάστοτε πειραματισμού, αντιστοιχούσε ένας περίπου κωνικός δοκιμαστικός σωλήνας ανά βοθρίο.

- Στην συνέχεια, από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα συλλεγόταν το ανώτερο κλάσμα του υποστρώματος (περίπου 900 μ l), το οποίο και περιείχε ζωντανά με προοδευτική κίνηση σπερματοζωάρια σε υψηλό ποσοστό (>90%). Αυτό μεταφερόταν σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθούσε φυγοκέντρησή του για 10 λεπτά στα 200 g.

- Μετά τη φυγοκέντρωση, ακολουθούσε η απομάκρυνση του υπερκείμενου υποστρώματος και στον πυθμένα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα απέμεναν περίπου 0,1 έως 0,2 ml εναιωρήματος εμπλουτισμένου σε ζωντανά σπερματοζωάρια.

- Ακολουθούσε η συγκέντρωση του εναιωρήματος σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και ο προσδιορισμός της πυκνότητας των σπερματοζωαρίων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου Neubauer.

Στον τελικό όγκο του εναιωρήματος η πυκνότητα των σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση κυμαινόταν από 25 έως 35 x10⁶ σπερματοζωάρια ανά ml.

2.3.5 Γονιμοποίηση ωαρίων *in vitro* (in vitro fertilization, IVF)

Τα ωάρια μετά την ωρίμανσή τους *in vitro*, μεταφέρονταν (ως COCs), σε ομάδες των 15 έως 20 σε τετράβοθρα τρυβλία ιστοκαλλιέργειας, που περιείχαν είτε 400 μl τυποποιημένου (μάρτυρας) υποστρώματος γονιμοποίησης (τμήμα 2.3.7.5) είτε τροποποιημένο υπόστρωμα. Ακολουθούσε η προσθήκη 20 μl διαλύματος ηπαρίνης (τμήμα 2.3.7.5).

Κατόπιν, γινόταν η προσθήκη ανάλογης ποσότητας από το τελικό εναιώρημα σπερματοζωαρίων σε αναλογία 18.000 σπερματοζωαρίων ανά ωάριο. Τέλος, το περιεχόμενο κάθε βοθρίου καλυπτόταν με παραφινέλαιο (τμήμα 2.3.7.7).

Η συνεπάωση των γαμετών διαρκούσε 24 ώρες και γινόταν σε κλίβανο τριών αερίων (Narco 7100, ΗΠΑ) με ατμόσφαιρα 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ σε θερμοκρασία 39±0,1°C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν. 1994, Lonergan και συν. 1999).

2.3.5.1 Εκτίμηση της *in vitro* γονιμοποίησης των ωαρίων

Η εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της γονιμοποίησης των ωαρίων γινόταν 72 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας της γονιμοποίησης. Η εκτίμηση βασιζόταν κυρίως στην παρουσία των κυτταρικών διαιρέσεων (ποσοστό αυλάκωσης) (τμήμα 2.3.6.2).

2.3.6 Εξέλιξη των εμβρύων-*in vitro* καλλιέργεια των εμβρύων (*in vitro* embryo culture-IVC)

Η εξέλιξη των εμβρύων *in vitro* γινόταν με συγκαλλιέργειά τους με κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (κοκκώδη κύτταρα). Η καλλιέργεια διαρκούσε 48 ώρες και γινόταν σε κλίβανο τριών αερίων (Narco 7100, ΗΠΑ) με ατμόσφαιρα 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ (θερμοκρασία 39±0,1°C, υγρασία >95%). Η εκτίμηση της ανάπτυξης των εμβρύων *in vitro* γινόταν μετά από 48 ώρες καλλιέργειας (εικ. 5).

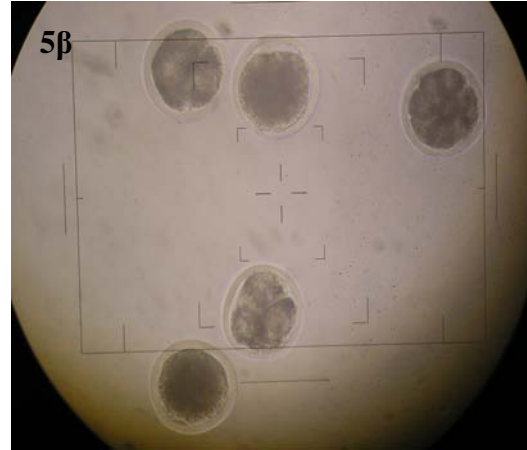
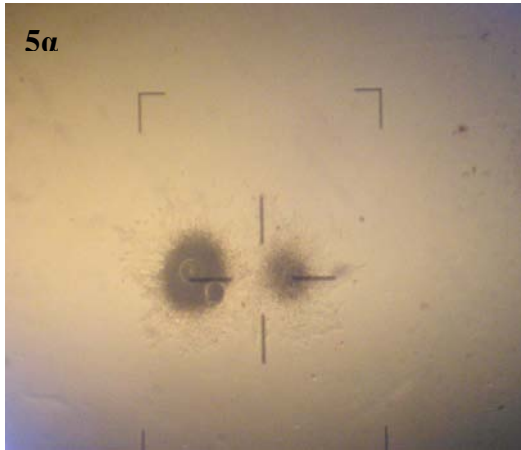
2.3.6.1 Συγκαλλιέργεια με κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Μετά την ωρίμανση και τη γονιμοποίησή τους τα ωάρια-ζυγωτά, μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιέβαλαν, μεταφέρονταν στις ίδιες πάντα ομάδες των 15 έως 20 σε βοθρία τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας, που το τυποποιημένο ή το τροποποιημένο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων. Πριν από τη μεταφορά τους, μεσολαβούσαν 3 διαδοχικές αναρροφήσεις διαμέσου πιπέτας (διαμέτρου 120 μm), ώστε τα ωάρια-ζυγωτά να εκπλυθούν από τα μη προσκολλημένα σπερματοζωάρια. Το περιεχόμενο κάθε βοθρίου καλυπτόταν με παραφινέλαιο. Ακολουθούσε η καλλιέργεια τους για 48 ώρες στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν.

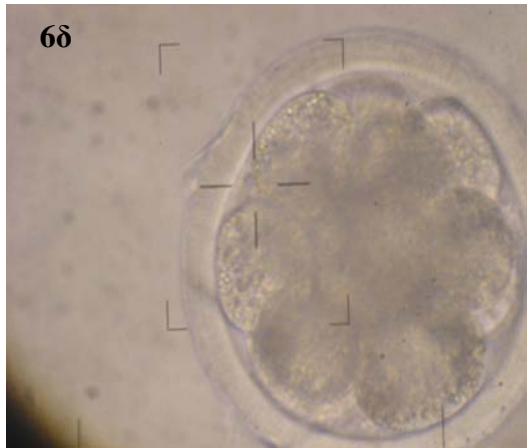
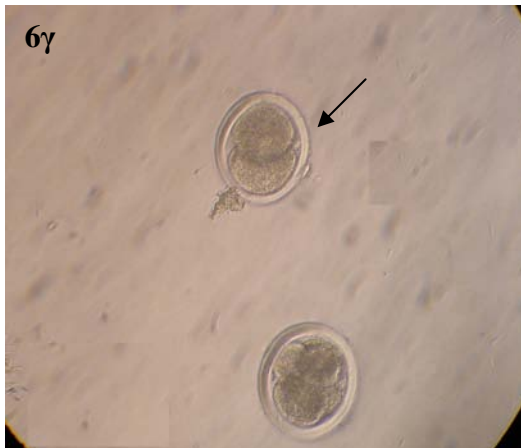
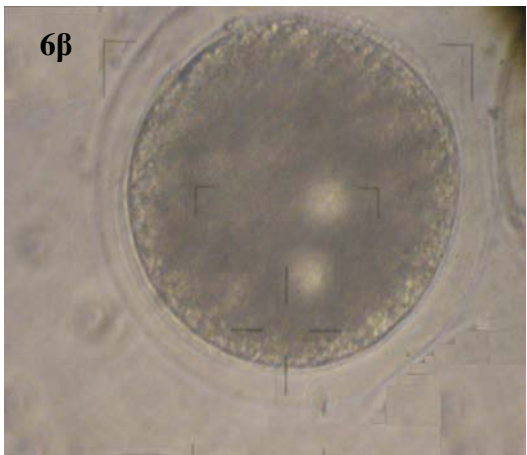
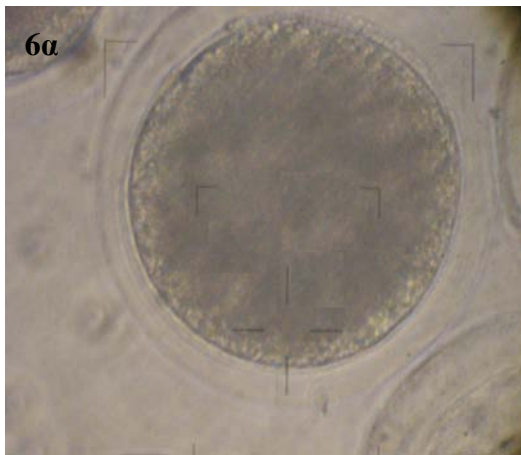
2.3.6.2 Εκτίμηση της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων

Η εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων, στα διάφορα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, γινόταν 48 ώρες μετά από τη μεταφορά τους στο υπόστρωμα της καλλιέργειας (εικ. 5α). Για το σκοπό αυτό, γινόταν μηχανική απογύμνωση των αγονιμοποίητων ωαρίων και των εμβρύων από τα κοκκώδη κύτταρα, που τα περιέβαλαν (εικ. 5β), με ανακίνησή τους σε κυκλομίκτη μέσα σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 2,96% (Kinis και συν, 1989). Η εκτίμηση της προόδου των κυτταρικών διαιρέσεων (εικ.6) και της ποιότητας των εμβρύων γινόταν σε ανάστροφο στερεομικροσκόπιο (μεγέθυνση x200 και x400). Τα έμβρυα με περισσότερα από 4 βλαστομερίδια θεωρούνταν ικανά για περαιτέρω ανάπτυξη (Gradl 1988, Van Soom και συν. 1992, Βαϊνάς και συν. 1994, Gordon 1994).

Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρούνταν αυλάκωση και ήταν αδύνατος ο υπό στερεοσκοπική παρατήρηση διαχωρισμός των αγονιμοποίητων από τα γονιμοποιημένα ωάρια, γινόταν μονιμοποίηση και χρώση τους, με την τεχνική που προαναφέρθηκε για την εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων (τμήμα 2.3.3). Ο διαχωρισμός τους γινόταν με κριτήριο την ύπαρξη προπυρήνων, πολικών σωματίων, ή την εκτίμηση του σταδίου της μείωσης των ωαρίων (Gradl 1988, Gordon 1994), σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού (x1000).



Εικόνα 5. Έμβρυα στο τέλος της 48ωρης IVC (x100) (5α). Εκτίμηση της γονιμοποίησης των ωαρίων και της εξέλιξης των εμβρύων μετά την απογύμνωσή τους σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 2,96% (x200) (5β).



Εικόνα 6. Αγονιμοποιητό ωάριο (χωρίς αλάκωση) (x400) (6α). Γονιμοποιημένο ωάριο στο στάδιο των προπυρήνων (x400) (6β). Έμβρυα στο στάδιο των 2 (βέλος) και των 4 κυττάρων (x200) (6γ). Έμβρυο στο στάδιο των 8-16 κυττάρων (x400) (6δ). Τα έμβρυα με περισσότερα από 4 κύτταρα θεωρούνταν αναπτυγμένα.

2.3.7 Παρασκευή υλικών και υποστρωμάτων

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που αναφέρονται αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Chemical (Γερμανία), εκτός εάν επισημαίνεται διαφορετικά, και ήταν ελεγμένα από την εταιρεία για την απουσία τοξικότητας στα έμβρυα (embryo tested).

2.3.7.1 Νερό

Για την παρασκευή όλων των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό υψηλής καθαρότητας που παράχθηκε σε σύστημα αντίστροφης ώσμωσης και Milli-Q της εταιρείας Millipore (ΗΠΑ).

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

Το PBS χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των ωοθηκών και, με κάποιες τροποποιήσεις (υπόστρωμα έκπλυσης), για την πλύση τους πριν από την έναρξη συλλογής των ωαρίων. Το υπόστρωμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε για την συλλογή και διατήρηση των COCs κατά τις αναρροφήσεις των ωοθυλακίων. Αρχικά παρασκευάζονταν δύο χωριστά διαλύματα που είχαν την ακόλουθη σύνθεση:

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

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

Στη συνέχεια τα διαλύματα αυτά αναμιγνύονταν σε αναλογία 1:1 και το τελικό διάλυμα (1000 ml) αποτελούσε το PBS. Το υπόστρωμα έκπλυσης παρασκευαζόταν από το PBS με επιπλέον προσθήκη των ακόλουθων:

| Υλικό | Ποσότητα | Κωδικός Εταιρείας |
|---------------------------|-----------|-------------------|
| Πυροσταφυλικό νάτριο | 36 mg | P 3662 |
| Άλας πενικιλίνης με κάλιο | 20mg | P 7794 |
| Θειική στρεπτομυκίνη | 40 mg | S 9137 |
| Γλυκόζη | 1 g | G 6152 |
| PBS | qs1000 ml | |

Η αποστείρωση του διαλύματος γινόταν με δίοδο του διαμέσου ηθμού μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0,22 μm (Millipore) με τη χρησιμοποίηση ειδικής συσκευής στην οποία η απαραίτητη υποπίεση επιτυγχανόταν με αντλία κενού. Το pH του τελικού διαλύματος ήταν 7,2 και η ωσμωτική πίεσή του 285-295 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν σε 4 °C έως 30 ημέρες μετά την παρασκευή του.

2.3.7.3 Υπόστρωμα ωρίμανσης ωαρίων

Το υπόστρωμα ωρίμανσης των ωαρίων παρασκευαζόταν την ημέρα της χρήσης του και είχε την ακόλουθη σύνθεση:

- Τροποποιημένο κατά Parker υπόστρωμα (Modified Parker's Medium, MPM).
- Ορό αγελάδας σε οίστρο (OCS) 10% (v/v).
- Ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) σε συγκέντρωση 21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ υποστρώματος.

Η ωσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στα 280-300 mOsm. Αρχικά γινόταν η προσθήκη 400 μl (360 μl MPM+ 40 μl OCS) σε κάθε βοθρίο, χωρίς FSH. Το pH (7,4) ρυθμιζόταν, πριν από την έναρξη της ωρίμανσης με την παραμονή του υποστρώματος στον επωαστικό κλίβανο με 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον (Lutterbach και συν. 1987, Vergos 1990, Βαϊνάς και συν. 1994). Η προσθήκη της FSH γινόταν αμέσως πριν από εκείνη των ωαρίων.

2.3.7.3.1 MPM

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

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

2.3.7.3.2 Ορός αγελάδας σε οίστρο (Oestrus Cow Serum, OCS)

Για τη συλλογή του ορού χρησιμοποιήθηκε αίμα αγελάδων που βρίσκονταν σε οίστρο. Η επιβεβαίωση του οίστρου στηριζόταν στις κλινικές εκδηλώσεις και στα ευρήματα της ψηλάφησης του γεννητικού συστήματος διαμέσου του απευθυσμένου. Μετά τη φυγοκέντρηση του αίματος (1200 g για 15 λεπτά) γινόταν εργαστηριακός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και των οιστρογόνων στον ορό με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA). Ο ορός θεωρήθηκε κατάλληλος και χρησιμοποιήθηκε μόνον όταν η τιμή της προγεστερόνης ήταν μικρότερη από 0,2 ng/ml (Βαϊνάς και συν. 1994).

Ο ορός μοιραζόταν σε ποσότητες του 1 ml και η συντήρησή του γινόταν στους -20°C για 3 μήνες. Πριν από τη χρησιμοποίησή του γινόταν «αδρανοποίησή» του με θέρμανση στους 56 °C για 30 λεπτά (Lu και Gordon 1987).

2.3.7.3.3 Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη

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

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

2.3.7.4 Υπόστρωμα ενεργοποίησης σπερματοζωαρίων

Το υπόστρωμα ενεργοποίησης παρασκευαζόταν την ημέρα γονιμοποίησης των ωαρίων και περιείχε τα παρακάτω υλικά (Gradl 1988, Parrish και συν. 1988, Βαϊνάς και συν. 1994):

| <u>Υλικό</u> | <u>Ποσότητα</u> | <u>Κωδικός Εταιρείας</u> |
|----------------------|-----------------|--------------------------|
| Βόεια αλβουμίνη ορού | 600 mg | A 7906 |
| Γενταμικίνη | 5 mg | G 3632 |
| Πυροσταφυλικό νάτριο | 11 mg | P 3662 |
| Sperm TL- stock | qs 100 ml | |

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35-7,4 και η ωσμωτική πίεσή του στα 290-300 mOsm.

2.3.7.4.1 Υπόστρωμα Sperm TL-stock

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

| <u>Υλικό</u> | <u>Ποσότητα</u> | <u>Κωδικός Εταιρείας</u> |
|--|-----------------|--------------------------|
| NaCl | 580 mg | S 5886 |
| KCl | 23 mg | P 5405 |
| NaHCO ₃ | 209 mg | S 5761 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 4 mg | S 9638 |
| Hepes | 238 mg | H 6147 |
| Ερυθρό της φαινόλης | 1 mg | P 2167 |
| Σιρόπι γαλακτικού νατρίου (60% w/w) | 365 μl | L 7900 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 31 mg | M 2393 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 38,4 mg | C 7902 |
| H ₂ O | qs 100 ml | |

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35-7,4 και η ωσμωτική πίεσή του στα 290-300 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν σε θερμοκρασία 4°C για διάρκεια ενός μήνα από την παρασκευή του.

2.3.7.5 Υπόστρωμα γονιμοποίησης

Το υπόστρωμα γονιμοποίησης παρασκευαζόταν την ημέρα γονιμοποίησης των ωαρίων *in vitro* και είχε την ακόλουθη σύνθεση:

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

Η ωσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στα 295-300 mOsm. Ακολουθούσε η διανομή 400 μl από το παραπάνω υπόστρωμα ανά βοθρίο και το pH ρυθμιζόταν στο 7,35-7,4, πριν από την έναρξη της επώασης, με την παραμονή του υποστρώματος στον κλίβανο με 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον (Lutterbach και συν. 1987, Lonergan και συν. 1999). Τέλος, το υπόστρωμα γονιμοποίησης ήταν έτοιμο κατόπιν προσθήκης 20 μl διαλύματος ηπαρίνης (τμήμα 2.3.7.5.2).

2.3.7.5.1 Υπόστρωμα TL-Stock

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

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

Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,35-7,4 και η ωσμωτική πίεσή του στα 290-300 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν σε θερμοκρασία 4°C έως 15 ημέρες μετά την παρασκευή του.

2.3.7.5.2 Ηπαρίνη

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

| Υλικό | Ποσότητα | Κωδικός Εταιρείας |
|----------|----------|-------------------|
| TL-Stock | qs 5 ml | |
| Heparin | 1 mg | H 3149 |

Λίγο πριν την έναρξη της συνεπάωσης των γαμετών, γινόταν η προσθήκη 20 μl από το διάλυμα σε κάθε βοθρίο, ώστε η τελική συγκέντρωση της ηπαρίνης στο υπόστρωμα γονιμοποίησης να είναι 9,5 μg/ml (Parrish και συν. 1988, Lonergan και συν. 1999).

2.3.7.6 Υπόστρωμα καλλιέργειας ζυγωτών-εμβρύων

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

2.3.7.7 Παραφινέλαιο

Το παραφινέλαιο (M8410) χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των υποστρωμάτων επώασης σε ποσότητα 300 μl ανά βοθρίο. Τουλάχιστον 4 ώρες πριν από την επικάλυψη γινόταν έκπλυση της ποσότητας του παραφινέλαιου που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί (2-3 ml) με ίσο όγκο του αντίστοιχου υποστρώματος της εκάστοτε επώασης και τοποθέτηση του στον επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα (Lu και Gordon 1987). Η χρήση του παραφινέλαιου αποσκοπούσε στην αποφυγή της εξάτμισης των υποστρωμάτων και της μόλυνσης καθώς και στον περιορισμό των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας και περιεκτικότητας σε αέρια των υποστρωμάτων μεταξύ των χειρισμών στο εξωτερικό περιβάλλον και της επώασης μέσα στον κλίβανο (Gordon 1994).

2.3.7.8 Χρώση παρασκευασμάτων-Παρασκευή διαλύματος ορκεΐνης

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες επί των οποίων τοποθετήθηκαν και μονιμοποιήθηκαν τα ωάρια, 24 ώρες μετά, τοποθετούνταν σε διάλυμα ορκεΐνης 2% για 45 λεπτά. Στη συνέχεια γινόταν έκπλυση των παρασκευασμάτων με διαδοχική εμβάπτισή τους στην ακόλουθη σειρά διαλυμάτων:

- α) οξικό οξύ 45%
- β) αιθυλική αλκοόλη 70%
- γ) αιθυλική αλκοόλη 96%
- δ) αιθυλική αλκοόλη 100%
- ε) αιθυλική αλκοόλη 100%
- στ) ξυλόλη 100%
- ζ) ξυλόλη 100%

2.3.7.8.1 Παρασκευή διαλύματος ορκεΐνης

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

| <u>Υλικό</u> | <u>Ποσότητα</u> | <u>Κωδικός Εταιρείας</u> |
|----------------------|-----------------|--------------------------|
| ορκεΐνη | 5 gr | MERCK 7100 |
| CH ₃ COOH | 150 ml | MERCK 2511 |
| H ₂ O | 100 ml | |

Για την παρασκευή του διαλύματος ορκεΐνης, 5 gr ορκεΐνης διαλύονταν σε 150 ml οξικού οξέος, που είχε προθερμανθεί μέχρι την εμφάνιση των πρώτων φυσαλίδων βρασμού. Ακολουθούσε ανάδευση και προσθήκη 100 ml νερού σε αντίστοιχη θερμοκρασία. Το διάλυμα διατηρείτο σε ερμητικά κλειστή γυάλινη φιάλη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και γινόταν χρήση του για 2 μήνες. Πριν από τη χρήση γινόταν διήθηση του διαλύματος (με απλό διηθητικό χαρτί).

2.3.8 Αποστείρωση υλικών και υποστρωμάτων

Η αποστείρωση των γυάλινων σκευών γινόταν σε ξηρό κλίβανο, σε θερμοκρασία 240 °C για 4 ώρες. Η αποστείρωση όλων των υποστρωμάτων, τελικών διαλυμάτων και

του OCS γινόταν με δίοδο διαμέσου ηθμού μιας χρήσης (Millipore) με πόρους διαμέτρου 0,22 μm σε στείρο περιβάλλον (θάλαμος οριζόντιας νηματικής ροής). Τα ρύγχη των πιπετών καθώς και ο σωλήνας αναρρόφησης αποστειρώνονταν σε υγρό κλίβανο, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1 bar για 45'. Όλα τα τρυβλία ήταν μιας χρήσης αποστειρωμένα και ελεγμένα από τον κατασκευαστή για απουσία κυτταροτοξικότητας (tissue culture tested ή embryo tested).

2.3.9 Τροποποιήσεις υποστρωμάτων

Για τις τροποποιήσεις των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες: πλασμινογόνο, ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ε-ACA), ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (u-PA και t-PA) και πλασμίνη. Η διάλυση των ουσιών γινόταν σε TCM199. Όλες οι ουσίες, που αναφέρονται αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Chemical, εκτός εάν επισημαίνεται διαφορετικά. Οι τροποποιήσεις των υποστρωμάτων έγιναν ως εξής:

- Το βόειο πλασμινογόνο (P9156) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 CU/0,1 ml σε όλα τα υποστρώματα.
- Το ε-ACA (A7824) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10 mM σε συνδυασμό με προσθήκη 5 CU/0,1 ml πλασμινογόνου.
- Ο u-PA (U0633) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,5 IU/0,1ml.
- Ο t-PA (T7776) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 50 IU/0,1 ml.
- Η πλασμίνη παρασκευαζόταν μέσα σε κάθε βοθρίο με την προσθήκη 5 CU/0,1 ml πλασμινογόνου και 1 IU/0,1 ml u-PA και προεπώαση του τρυβλίου Petri στους 37°C για 30 λεπτά πριν την τοποθέτηση των ωαρίων, των γαμετών ή των εμβρύων, ανάλογα με την περίπτωση.

2.4 Πρωτόκολλο πειραματισμών

Οι πειραματισμοί της παρούσας μελέτης μπορούν να καταταχθούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι ενζυμικοί προσδιορισμοί που πραγματοποιήθηκαν στα βιολογικά υγρά (προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο και ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων) και στα τυποποιημένα υποστρώματα.

Στην δεύτερη κατηγορία εντάσσονται οι πειραματισμοί, στους οποίους ελέγχθηκε η επίδραση της τροποποίησης των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων με την προσθήκη παραγόντων του συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη. Υπενθυμίζεται ότι, για την τροποποίηση των υποστρωμάτων της IVM, της IVF και της IVC χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες: πλασμινογόνο, u-PA, t-PA, πλασμίνη και ε-ACA. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 10.639 COCs, από τα οποία στα 3.896 εκτιμήθηκε μικροσκοπικά η εξέλιξη της ωρίμανσης του πυρήνα μετά το τέλος της IVM, ενώ στα υπόλοιπα ακολούθησε IVF και IVC. Σε κάθε πειραματισμό περιλαμβανόταν ένα επιπλέον βοθρίο, εκτός του μάρτυρα, στο οποίο γίνονταν τροποποίηση του υποστρώματος με προσθήκη πλασμινογόνου.

Σε σχέση με κάθε έναν από τους παράγοντες που μελετήθηκαν (πίνακας 1) χρησιμοποιήθηκαν 2.565 COCs στους πειραματισμούς που περιελάμβαναν προσθήκη u-PA, 2.675 COCs σε αυτούς που περιελάμβαναν προσθήκη t-PA, 2.639 COCs σε αυτούς που περιελάμβαναν προσθήκη πλασμίνης και 2.760 COCs σε αυτούς που περιελάμβαναν προσθήκη ε-ACA. Αναλυτικότερα οι πειραματισμοί που διενεργήθηκαν ήταν οι εξής:

- Η μικροσκοπική εκτίμηση της παρουσίας των u-PA, t-PA, πλασμίνης ή ε-ACA στο υπόστρωμα της IVM στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων, τόσο σε σχέση με τον μάρτυρα όσο και σε σχέση με το υπόστρωμα που περιείχε πλασμινογόνο, πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της 18ωρης ή 24ωρης διάρκειας ωρίμανσης και αφού γινόταν μονιμοποίηση και χρώση των ωαρίων (πίνακας 1^α).
- Για τον έλεγχο της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVM στην κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων (πίνακας 1^β), την 18ωρη ή 24ωρη διάρκεια ωρίμανσης, ακολουθούσε 24ωρης διάρκειας IVF (σε τυποποιημένο υπόστρωμα) και εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος 48ωρης διάρκειας IVC (σε τυποποιημένο υπόστρωμα).
- Για τον έλεγχο της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVF (πίνακας 1^γ), με την προσθήκη u-PA, t-PA, πλασμίνης ή ε-ACA πραγματοποιήθηκαν 24ωρης διάρκειας επώσεις των ωαρίων σε τυποποιημένο υπόστρωμα IVM. Ο έλεγχος της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVF γινόταν με βάση το ποσοστό γονιμοποίησης και επακόλουθης ανάπτυξης

των εμβρύων μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος 48ωρης IVC, σε τυποποιημένο υπόστρωμα.

- Ο έλεγχος της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVC, με την προσθήκη u-PA, t-PA, πλασμίνης ή ε-ACA, στην ανάπτυξη των εμβρύων γινόταν μετά από στερεοσκοπική παρατήρηση στο τέλος 48ωρης IVC και αφού είχαν προηγηθεί 24ωρης διάρκειας επώσεις σε τυποποιημένα υποστρώματα της IVM και IVF (πίνακας 1^γ).

Πίνακας 1

α. Κατανομή των ωαρίων που καλλιεργήθηκαν για 18 ή 24 ώρες στην IVM με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων στην ωρίμανση του πυρήνα τους.

| Διάρκεια επώασης | Αριθμός ωαρίων σε ομάδες πειραματισμών ανάλογα με την ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση του υποστρώματος της IVM | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|-----|------|--------|-----|-----|------|--------|-----|-----|---------|--------|-----|-----|-------|--------|
| | C | P | u-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | t-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | Plasmin | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | ε-ACA | ΣΥΝΟΛΟ |
| 18 ώρες | 136 | 140 | 175 | 451 | 142 | 139 | 157 | 438 | 141 | 160 | 186 | 487 | 182 | 176 | 202 | 560 |
| 24 ώρες | 132 | 143 | 135 | 410 | 154 | 159 | 165 | 478 | 144 | 138 | 238 | 520 | 165 | 157 | 230 | 552 |

β. Κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης του υποστρώματος της IVM (18ωρης και 24ωρης) στην κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων.

| Διάρκεια επώασης | Αριθμός ωαρίων σε ομάδες πειραματισμών ανάλογα με την ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση του υποστρώματος της IVM | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|-----|------|--------|-----|-----|------|--------|-----|-----|---------|--------|-----|-----|-------|--------|
| | C | P | u-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | t-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | Plasmin | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | ε-ACA | ΣΥΝΟΛΟ |
| 18 ώρες | 154 | 137 | 166 | 457 | 177 | 168 | 173 | 518 | 108 | 116 | 146 | 370 | 136 | 122 | 152 | 410 |
| 24 ώρες | 130 | 111 | 152 | 393 | 156 | 126 | 148 | 430 | 152 | 142 | 198 | 492 | 162 | 140 | 162 | 464 |

γ. Κατανομή των ωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της επίδρασης της τροποποίησης των υποστρωμάτων της IVF και IVC.

| Τροποποίηση υποστρώματος | Αριθμός ωαρίων σε ομάδες πειραματισμών ανάλογα με την ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση των υποστρωμάτων της IVF και IVC | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--|-----|------|--------|-----|-----|------|--------|-----|-----|---------|--------|-----|-----|-------|--------|
| | C | P | u-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | t-PA | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | Plasmin | ΣΥΝΟΛΟ | C | P | ε-ACA | ΣΥΝΟΛΟ |
| IVF | 132 | 126 | 170 | 428 | 137 | 126 | 152 | 415 | 129 | 144 | 171 | 444 | 135 | 148 | 176 | 459 |
| IVC | 138 | 113 | 175 | 426 | 126 | 109 | 161 | 396 | 106 | 96 | 124 | 326 | 107 | 102 | 106 | 315 |

Ο διαφορετικός χρωματισμός δηλώνει μια ομάδα πειραματισμών ανάλογα με την ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση των αντίστοιχων υποστρωμάτων.
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με πλασμινογόνο.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

1. Για τη διερεύνηση τυχόν διαφοροποιήσεων ως προς την PAA, την PAI (αντι-uPA και αντι-tPA) και την PI μεταξύ των βιολογικών υγρών (ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης και του προωθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου) και των τυποποιημένων υποστρωμάτων (υποστρώματα IVM, IVF, IVC) διενεργήθηκε ανάλυση της διακύμανσης (one-way ANOVA). Οι διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν με το Duncan's F-range test, που εκτελέστηκε στις περιπτώσεις που το αποτέλεσμα της ANOVA ήταν σημαντικό.
2. Για τη διερεύνηση τυχόν διαφορών μεταξύ των συστημάτων καλλιέργειας με τροποποιημένα και τυποποιημένα υποστρώματα ως προς:
 - Το βαθμό εξέλιξης της ωρίμανσης του πυρήνα ωαρίων που ωρίμασαν *in vitro*.
 - Το ποσοστό των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν *in vitro*.
 - Το ποσοστό των εμβρύων που αναπτύχθηκαν *in vitro*.

διενεργήθηκε η δοκιμή χ^2 (chi-square test).

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP

Στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVM, της IVF και της IVC διαπιστώθηκε δραστηριότητα ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA), αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου [PAI έναντι του t-PA (tPAI), PAI έναντι του u-PA (uPAI)] και αδρανοποιών της πλασμίνης (PI) (πίνακας 2).

Μεταξύ των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVP δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές (πιν. 2, εικόνα 7, 8, 9) στην PAA, στην t-PAI, στην uPAI και στην PI.

Διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) στην PAA, την PAI και την PI, μεταξύ των τυποποιημένων υποστρωμάτων της IVP και του ωοθυλακικού υγρού, τόσο του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων όσο και του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου. Πιο συγκεκριμένα, η PAA στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP (πιν. 2, εικ. 7) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν που ανιχνεύθηκε στο ωοθυλακικό υγρό, τόσο του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων όσο και του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου. Η tPAI και η uPAI στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP (πιν. 2, εικ. 8) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν που ανιχνεύθηκε στο ωοθυλακικό υγρό τόσο του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων όσο και του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου. Επίσης, στα τυποποιημένα υποστρώματα ανιχνεύθηκε, σημαντικά χαμηλότερη δραστηριότητα των PIs (πιν. 2, εικ. 9) σε σχέση με το ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, καθώς και του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου.

Η PAA και η PAI στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων (πιν. 2, εικ. 7 και 8), ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάλογη διακύμανση ως προς την PI (πιν. 2, εικ. 9).

Η PAA του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου αλλά και του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης οφειλόταν τόσο στον t-PA όσο και στον

u-PA, όπως αυτό δείχθηκε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων ή της αμιλορίδης, η οποία, όπως αναφέρθηκε, εξουδετερώνει εκλεκτικά τη δράση του u-PA (πιν. 3).

Πίνακας 2. Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA), των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (tPAI, uPAI) και των αδρανοποιών της πλασμίνης (PI) στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP. Δίνονται οι μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση (sd)

| Δείγμα | PAA ± sd (t-PA IU/0,1ml) | tPAI ± sd (t-PA IU/0,1ml) | uPAI ± sd (u-PA IU/0,1ml) | PI ± sd (Plasmin mIU/0,1ml) |
|--------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| ΥΠΩ | 90,83 ± 21,3 ^(ω) | 49,21 ± 9,9 ^(δ) | 0,27 ± 0,19 ^(η) | 95,57 ± 7,9 ^(κ) |
| ΥΚΩ | 70,19 ± 4,01 ^(β) | 19,57 ± 3,5 ^(ε) | 0,15 ± 0,017 ^(θ) | 97,32 ± 5,53 ^(κ) |
| IVMm | 13,07 ± 2,22 ^(γ) | 6,31 ± 1,45 ^(ζ) | 0,065 ± 0,026 ^(ι) | 2,19 ± 0,115 ^(λ) |
| IVFm | 6,65 ± 1,55 ^(γ) | 6,54 ± 1,92 ^(ζ) | 0,08 ± 0,03 ^(ι) | 2,23 ± 0,94 ^(λ) |
| IVCm | 12,3 ± 2,21 ^(γ) | 6,56 ± 1,43 ^(ζ) | 0,06 ± 0,0147 ^(ι) | 2,36 ± 0,7 ^(λ) |

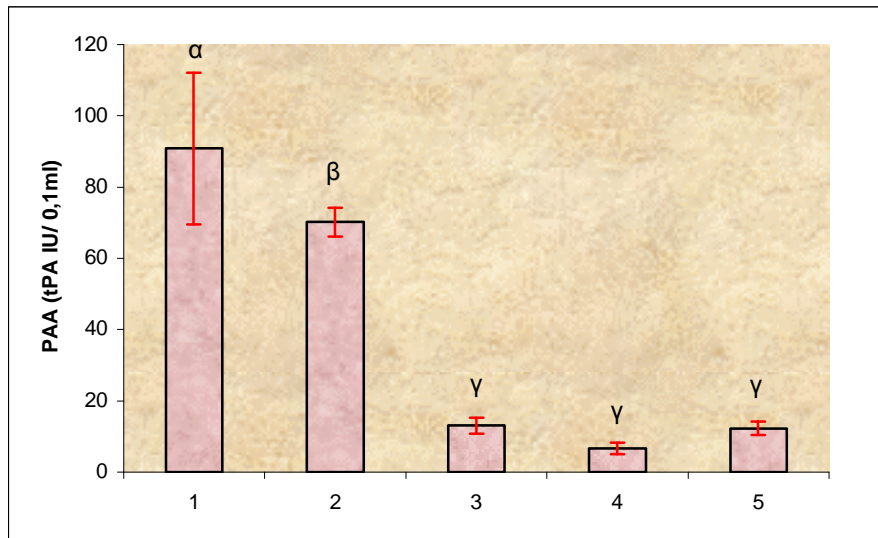
ΥΠΩ: ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, ΥΚΩ: ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, IVMm, IVFm, IVCm: τυποποιημένα υποστρώματα της IVM, της IVF και της IVC, αντίστοιχα, όπως αυτά παρασκευάζονται πριν από τη χρήση τους. PAA: δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, εκφρασμένη σε t-PA IU/0,1ml, tPAI: δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου έναντι του t-PA, εκφρασμένη σε t-PA IU/0,1ml, uPAI: δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου έναντι του u-PA, εκφρασμένη σε u-PA IU/0,1ml, PI: δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης, εκφρασμένη σε mIU πλασμίνης/0,1ml. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια στήλη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (p<0,05).

Πίνακας 3. Ταυτοποίηση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA, u-PA) στο ωοθυλακικό υγρό με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων (αντι- t-PA IgG και αντι- u-PA IgG). Εξουδετέρωση της δραστηριότητας του u-PA με τη χρήση αμιλορίδης. Παρέχονται τα όρια της εξουδετέρωσης της δραστηριότητας %

| Δείγμα | αντι- t-PA IgG % | αντι- u-PA IgG % | Αμιλορίδη % |
|--------|---------------------|---------------------|----------------|
| ΥΠΩ | 6-12 | 3-5 | 12-16 |
| ΥΚΩ | 4-12 | 3-5 | 10-15 |

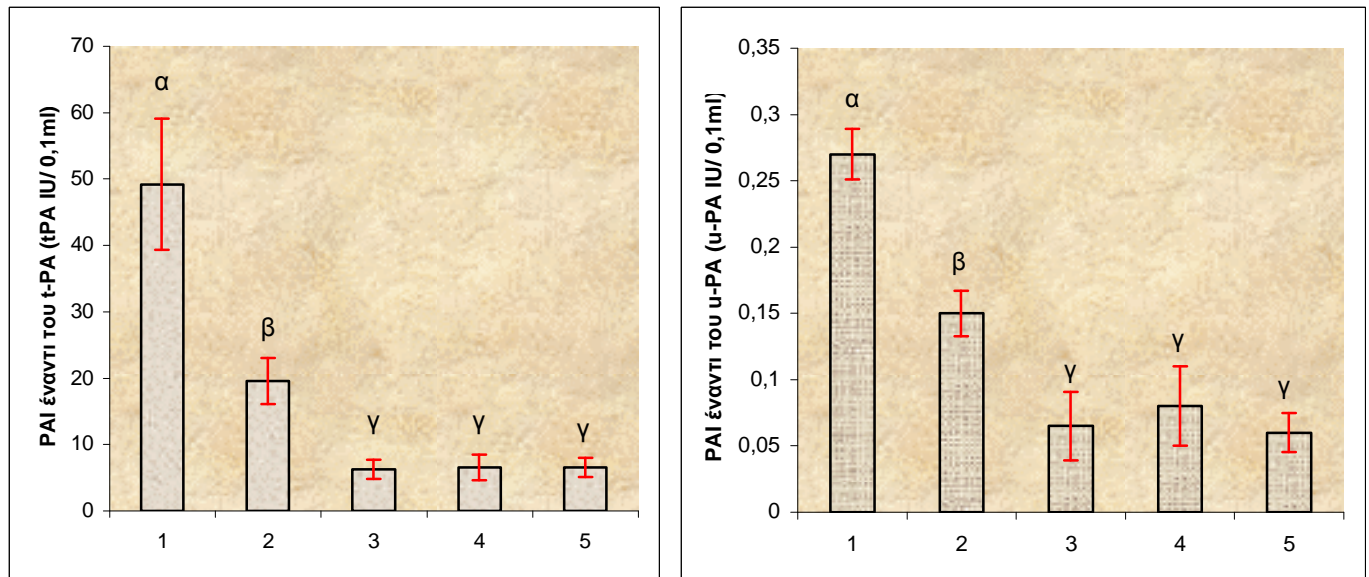
ΥΠΩ: ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, ΥΚΩ: ωοθυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων.

Εικόνα 7. Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) στο ωθυλακικό υγρό και στα υποστρώματα της IVP



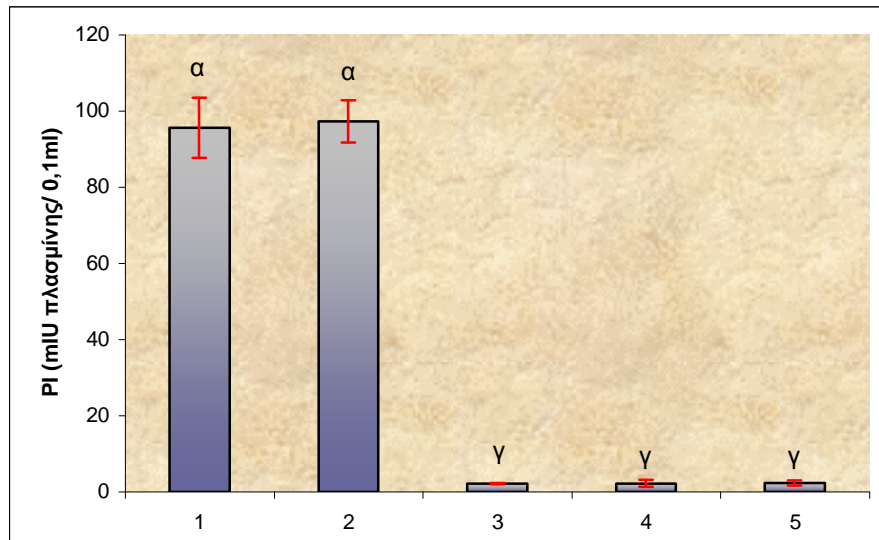
1: ωθυλακικό υγρό προωθυλακιορρηκτικού ωθυλακίου, 2: ωθυλακικό υγρό κυρίαρχου ωθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωθυλακίων, 3: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVM, 4: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVF, 5: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVC. Η PAA εκφράστηκε σε t-PA IU/0,1ml. Τα διαφορετικά γραμματικά σύμβολα κάθε στήλης υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Εικόνα 8. Δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI) στο ωθυλακικό υγρό και στα υποστρώματα της IVP



1: ωθυλακικό υγρό προωθυλακιορρηκτικού ωθυλακίου, 2: ωθυλακικό υγρό κυρίαρχου ωθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωθυλακίων, 3: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVM, 4: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVF, 5: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVC. Η δραστηριότητα PAI έναντι του t-PA εκφράστηκε σε t-PA IU/0,1ml. Τα διαφορετικά γραμματικά σύμβολα κάθε στήλης υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Εικόνα 9. Δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης (PI) στο ωοθυλακικό υγρό και στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP



1: ωοθυλακικό υγρό προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, 2: ωοθυλακικό υγρό κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, 3: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVM, 4: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVF, 5: τυποποιημένο υπόστρωμα της IVC. Η PI εκφράστηκε σε mIU πλασμίνης/0,1ml. Τα διαφορετικά γραμματικά σύμβολα κάθε στήλης υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

3.2 Τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων

3.2.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων με προσθήκη 0,5 IU/0,1 ml u-PA δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (πίνακας 4 και 10, εικόνα 12 και 18), του ποσοστού της γονιμοποίησης (πιν. 5 και 12, εικ. 12 και 22) και του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 5 και 12, εικ. 12 και 22) σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (5 CU/0,1 ml), τόσο μετά από 18 όσο και μετά από 24 ώρες καλλιέργειας.

3.2.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων με την προσθήκη 50 IU/0,1ml t-PA σε 18ωρης ή 24ωρης διάρκειας IVM δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (πιν.4 & 10, εικ.11 & 19), του ποσοστού της γονιμοποίησης (πιν. 5 & 12, εικ. 13 & 23) και του

ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 5 & 12, εικ.13 & 23), σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με 5 CU/0,1 ml πλασμινογόνο υπόστρωμα.

3.2.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων με την προσθήκη πλασμίνης (5 CU/0,1 ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1 ml u-PA) σε 18ωρης διάρκειας IVM οδήγησε σε:

- i. Σημαντική αύξηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (55,4%) σε σχέση με το τυποποιημένο (μάρτυρας) υπόστρωμα (39%, $p=0,0002$) αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (41,9%, $p=0,0073$) (πιν. 6, εικ. 14).
- ii. Σημαντική αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης (72,6%) σε σχέση με το τυποποιημένο (51,9%, $p=0,0006$) αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (55,2%, $p=0,003$) (πιν.7, εικ.15). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων στο τροποποιημένο με πλασμίνη υπόστρωμα, σε σχέση με τον μάρτυρα και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (πιν. 7, εικ. 15).

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων με την προσθήκη πλασμίνης σε 24ωρης διάρκειας IVM δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων (πιν. 10, εικ. 20), στο ποσοστό της γονιμοποίησης (πιν. 12, εικ. 24) και στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 12, εικ. 24) σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα.

3.2.4 Επίδραση της προσθήκης ε-ACA

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης των ωαρίων με την προσθήκη 10mM ε-ACA σε 18ωρης διάρκειας IVM οδήγησε σε:

- i. Σημαντική μείωση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (10,9%) σε σχέση με το τυποποιημένο (μάρτυρας) υπόστρωμα (41,2%, $p<0,0001$), καθώς και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (46,6%, $p<0,0001$) (πιν. 8, εικ. 16).
- ii. Σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης (39,5%) σε σχέση με το τυποποιημένο (64,7%, $p<0,0001$) και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο

υπόστρωμα (54,9%, $p=0,01$) (πιν. 9, εικ. 17). Παρά το γεγονός, ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων, τα έμβρυα αυτά ήταν λιγότερα ($p=0,09$) όταν τα ωάρια από τα οποία προέρχονταν είχαν ωριμάσει, *in vitro*, παρουσία ε-ACA (23,3%), σε σχέση με εκείνα που είχαν ωριμάσει στο τυποποιημένο υπόστρωμα (36,4%) (πιν. 9, εικ. 17).

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης των ωαρίων με την προσθήκη ε-ACA σε 24ωρης διάρκειας IVM οδήγησε σε:

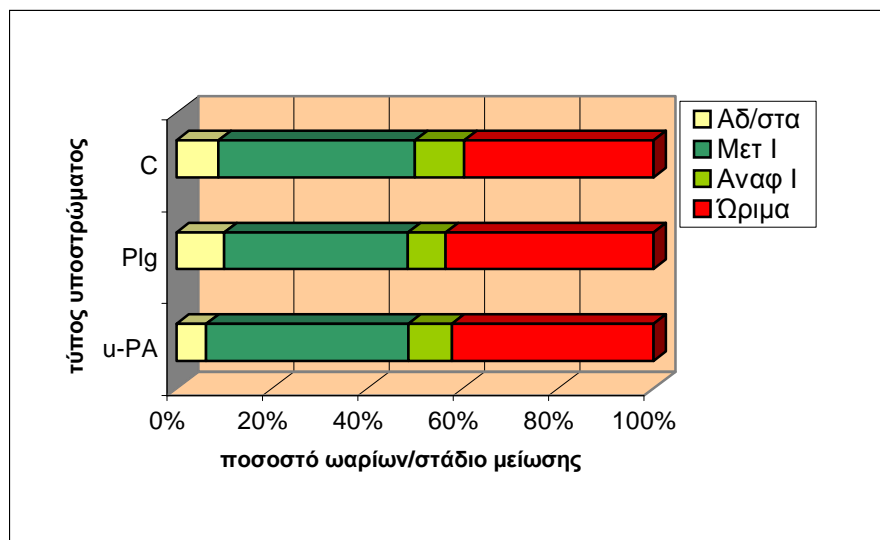
Σημαντική μείωση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων (48,3%) σε σχέση με το τυποποιημένο (μάρτυρας) υπόστρωμα (73,4%, $p<0,0001$), καθώς και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (77,1%, $p<0,0001$) (πιν. 11, εικ. 21). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης, ούτε του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων στο τροποποιημένο με ε-ACA υπόστρωμα σε σχέση με το μάρτυρα και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (πιν. 12, εικ. 25).

Πίνακας 4. Επίδραση των u-PA και t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη τους στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM

| Υπ/μα | Μετ I (%) | Αναφ I (%) | Ωριμα (%) ΤελI + ΜετII | Αδ/στα (%) | <u>Σύνολο ωαρίων</u> |
|-------|-----------|------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| C | 56 (41,2) | 14 (10,3) | 54 (39,7) | 12 (8,8) | 136 |
| Plg | 54 (38,5) | 11 (7,9) | 61 (43,6) | 14 (10) | 140 |
| u-PA | 74 (42,3) | 16 (9,1) | 74 (42,3) | 11 (6,3) | 175 |
| C | 65 (45,8) | 6 (4,2) | 56 (39,4) | 15 (10,6) | 142 |
| Plg | 65 (46,8) | 13 (9,4) | 54 (38,8) | 7 (5) | 139 |
| t-PA | 63 (40,1) | 14 (8,9) | 71 (45,3) | 9 (5,7) | 157 |

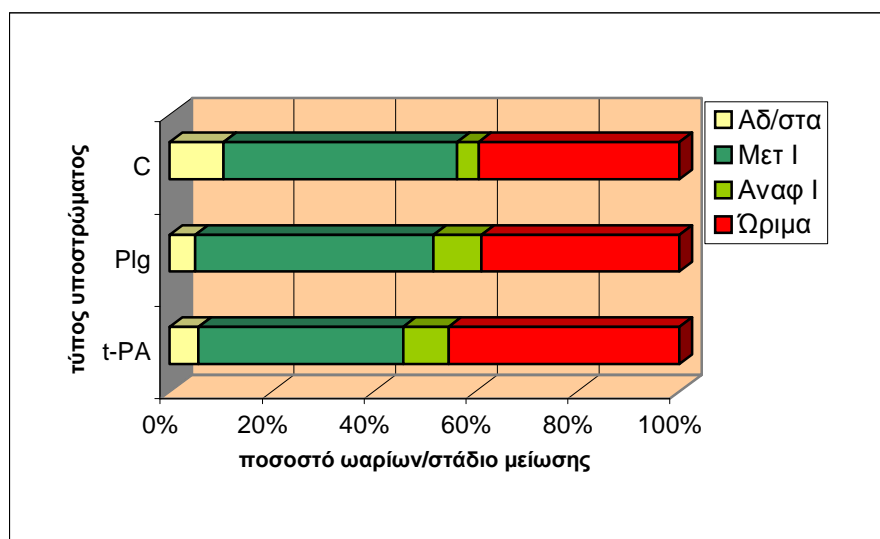
Υπ/μα: τύπος υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την τροποποίησή του, C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA. ΜετI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση I, ΑναφI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην ανάφαση I, Ωριμα (%): το άθροισμα και το ποσοστό των ωαρίων που βρίσκονταν στην τελόφαση I ή στην μετάφαση II, Αδ/στα: αριθμός και ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων.

Εικόνα 10. Επίδραση του u-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης IVM



C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα.

Εικόνα 11. Επίδραση του t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



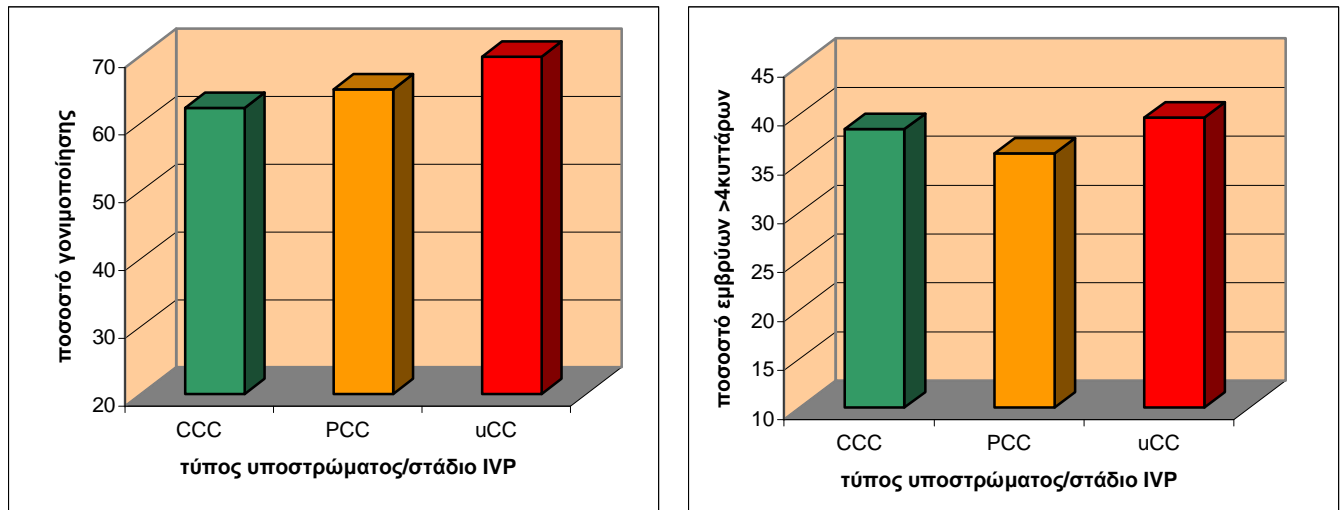
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα.

Πίνακας 5. Επίδραση των u-PA και t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη τους στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|--------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 18ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 154 | 96 (62,3) | 37 (38,5) |
| Plg | C | C | 137 | 89 (65) | 32 (36) |
| u-PA | C | C | 166 | 116 (69,9) | 46 (39,7) |
| C | C | C | 177 | 99 (55,9) | 30 (30,3) |
| Plg | C | C | 168 | 92 (54,8) | 31(33,7) |
| t-PA | C | C | 173 | 108 (62,4) | 39 (36,1) |

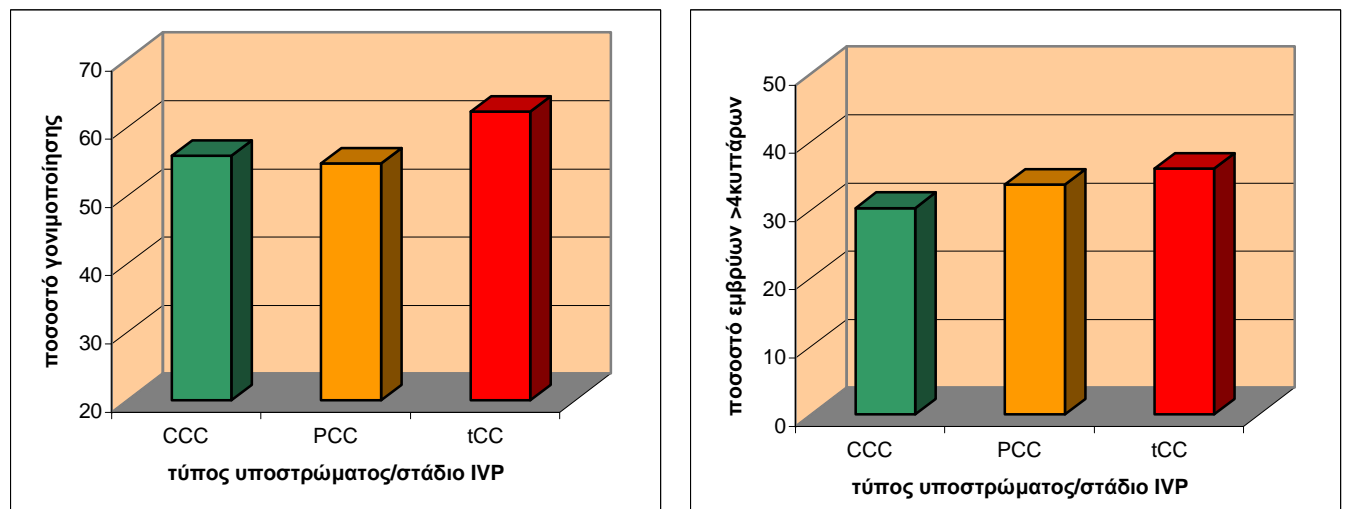
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA στην IVM, , t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA στην IVM. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4Κ: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα.

Εικόνα 12. Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και u: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA.

Εικόνα 13. Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



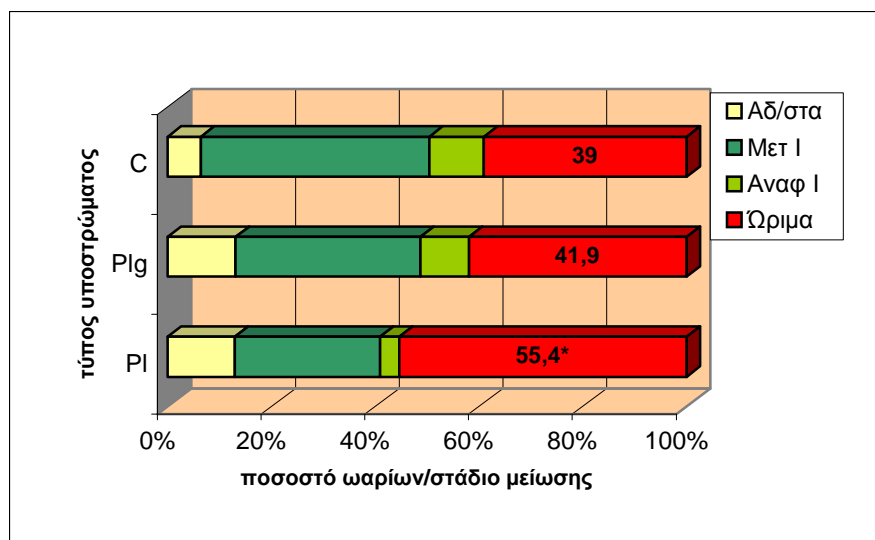
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και t: υπόστρωμα με 50 IU/ml t-PA.

Πίνακας 6. Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM.

| Υπ/μα | Μετ I (%) | Αναφ I (%) | Ωριμα (%) ΤελI + ΜετII | Αδ/στα (%) | <u>Σύνολο ωαρίων</u> |
|-------|-----------|------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| C | 62 (44) | 15(10,6) | 55 (39) ^a | 9(6,4) | 141 |
| Plg | 57 (35,6) | 15(9,4) | 67 (41,9) ^a | 21 (13,1) | 160 |
| PI | 52 (28) | 7(3,7) | 103 (55,4) ^β | 24 (12,9) | 186 |

Υπ/μα: τύπος υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την τροποποίησή του, C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA). ΜετI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση I, ΑναφI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην ανάφαση I, Ωριμα (%): το άθροισμα και το ποσοστό των ωαρίων που βρίσκονταν στην τελόφαση I ή στην μετάφαση II, Αδ/στα: αριθμός και ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$).

Εικόνα 14. Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



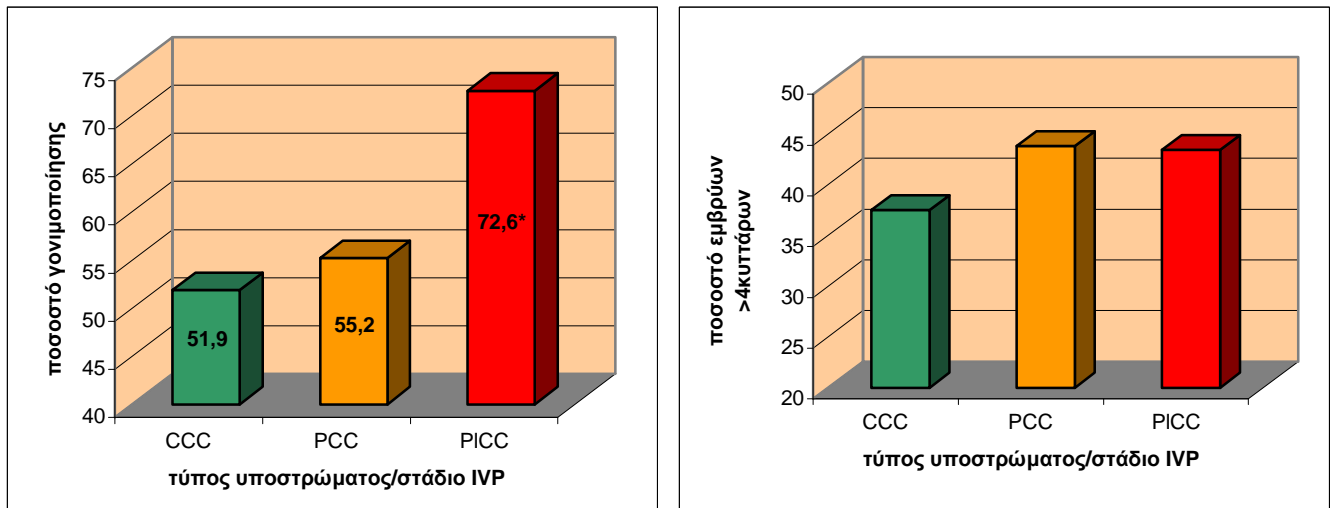
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA). Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα. * → $p < 0,05$.

Πίνακας 7. Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|-------------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 18ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 108 | 56 (51,9) ^a | 21 (37,5) |
| Plg | C | C | 116 | 64 (55,2) ^a | 28 (43,8) |
| Pl | C | C | 146 | 106 (72,6) ^b | 46 (43,4) |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA) στην IVM. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4Κ: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$).

Εικόνα 15. Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη της στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



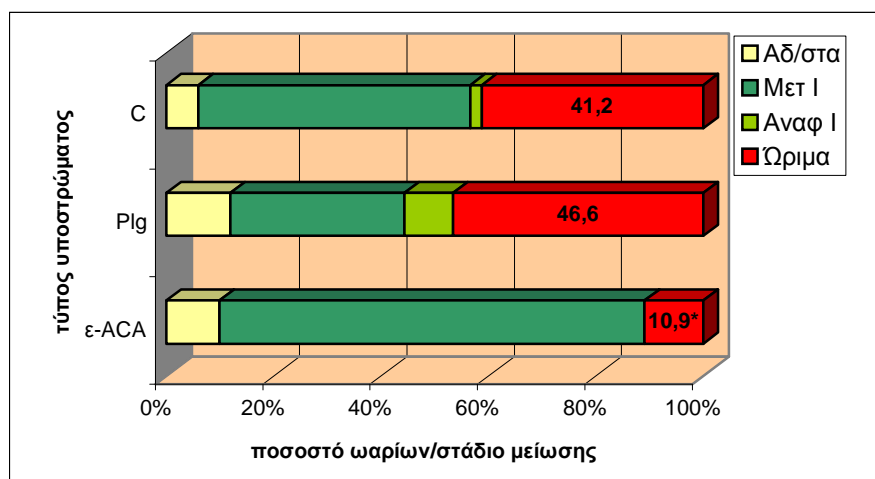
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA). * → $p < 0,05$.

Πίνακας 8. Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM.

| Υπ/μα | Μετ I (%) | Αναφ I (%) | Ωριμα (%) ΤελI + ΜετII | Αδ/στα (%) | <u>Σύνολο ωαρίων</u> |
|-------|------------|------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| C | 92 (50,6) | 4 (2,2) | 75 (41,2) ^a | 11 (6) | 182 |
| Plg | 57 (32,4) | 16 (9,1) | 82 (46,6) ^a | 21 (11,9) | 176 |
| ε-ACA | 160 (79,2) | - | 22(10,9) ^β | 20 (9,9) | 202 |

Υπ/μα: τύπος υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την τροποποίησή του, C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. ΜετI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση I, ΑναφI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην ανάφαση I, Ωριμα (%): το άθροισμα και το ποσοστό των ωαρίων που βρίσκονταν στην τελόφαση I ή στην μετάφαση II, Αδ/στα: αριθμός και ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$).

Εικόνα 16. Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από προσθήκη του σε 18ωρης διάρκειας IVM



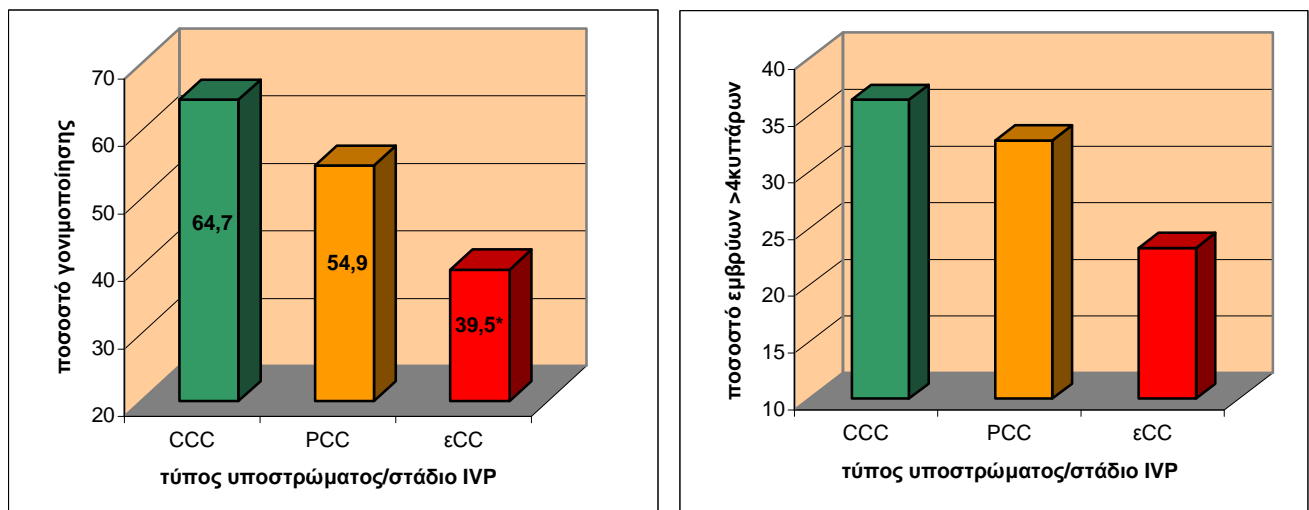
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα. * → $p < 0,05$.

Πίνακας 9. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|------------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 18ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 136 | 88 (64,7) ^α | 32 (36,4) |
| P1g | C | C | 122 | 67 (54,9) ^α | 22 (32,8) |
| ε-ACA | C | C | 152 | 60 (39,5) ^β | 14 (23,3) |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P1g: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο. ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA στην IVM. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4Κ: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$).

Εικόνα 17. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από προσθήκη του στο υπόστρωμα 18ωρης διάρκειας IVM



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. * → $p < 0,05$.

Πίνακας 10. Επίδραση των u-PA, t-PA ή της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM.

| Υπ/μα | Μετ I (%) | Αναφ I (%) | Ωριμα (%) ΤελI + ΜετII | Αδ/στα (%) | <u>Σύνολο ωαρίων</u> |
|-------|-----------|------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| C | 21 (15,9) | - | 102 (77,3) | 9 (6,8) | 132 |
| Plg | 30 (21) | 4 (2,8) | 96 (67,1) | 13 (9,1) | 143 |
| u-PA | 18 (13,3) | - | 100 (74,1) | 17 (12,6) | 135 |
| C | 28 (18,2) | - | 112 (72,7) | 14 (9,1) | 154 |
| Plg | 32 (20,1) | 6 (3,8) | 109 (68,6) | 12 (7,5) | 159 |
| t-PA | 41 (24,8) | - | 111 (67,3) | 13 (7,9) | 165 |
| C | 28(19,4) | - | 104 (72,2) | 10 (6,9) | 144 |
| Plg | 31 (22,5) | - | 94 (68,1) | 13 (9,4) | 138 |
| PI | 45 (18,9) | 5 (2,1) | 177 (74,4) | 11 (4,6) | 238 |

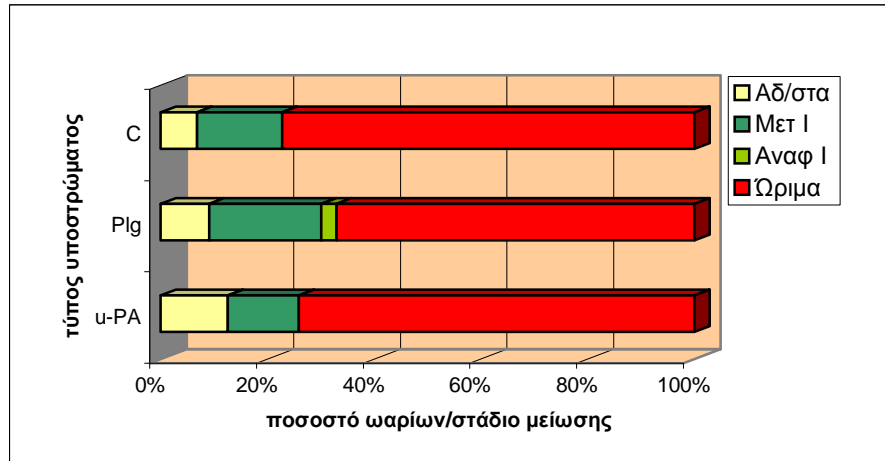
Υπ/μα: τύπος υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την τροποποίησή του, C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml ενεργοποιό του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml ενεργοποιό του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA). ΜετI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση I, ΑναφI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην ανάφαση I, Ωριμα (%): το άθροισμα και το ποσοστό των ωαρίων που βρίσκονταν στην τελόφαση I ή στην μετάφαση II, Αδ/στα: αριθμός και ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων.

Πίνακας 11. Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM.

| Υπ/μα | Μετ I (%) | Αναφ I (%) | Ωριμα (%) ΤελI + ΜετII | Αδ/στα (%) | <u>Σύνολο ωαρίων</u> |
|-------|-----------|------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| C | 35 (21,2) | 2 (1,2) | 121 (73,4) ^α | 7 (4,2) | 165 |
| Plg | 24 (15,3) | - | 121 (77,1) ^α | 12 (7,6) | 157 |
| ε-ACA | 83 (36) | 25 (10,9) | 111 (48,3) ^β | 11 (4,8) | 230 |

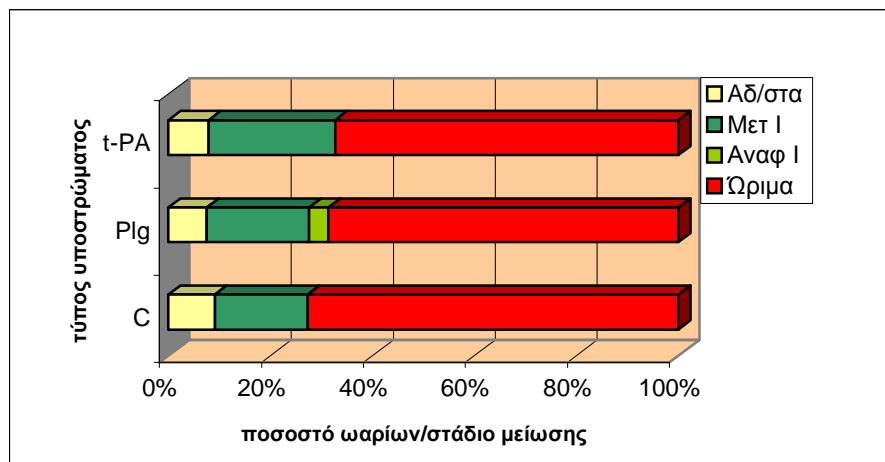
Υπ/μα: τύπος υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την τροποποίησή του, C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. ΜετI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην μετάφαση I, ΑναφI (%): αριθμός και ποσοστό ωαρίων που βρίσκονταν στην ανάφαση I, Ωριμα (%): το άθροισμα και το ποσοστό των ωαρίων που βρίσκονταν στην τελόφαση I ή στην μετάφαση II, Αδ/στα: αριθμός και ποσοστό των αδιευκρίνιστων ωαρίων. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (p<0,05).

Εικόνα 18. Επίδραση του u-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



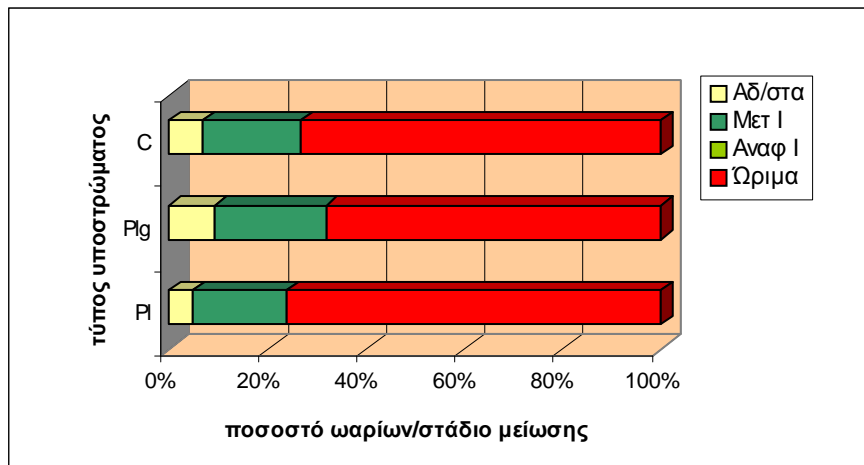
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα.

Εικόνα 19. Επίδραση του t-PA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



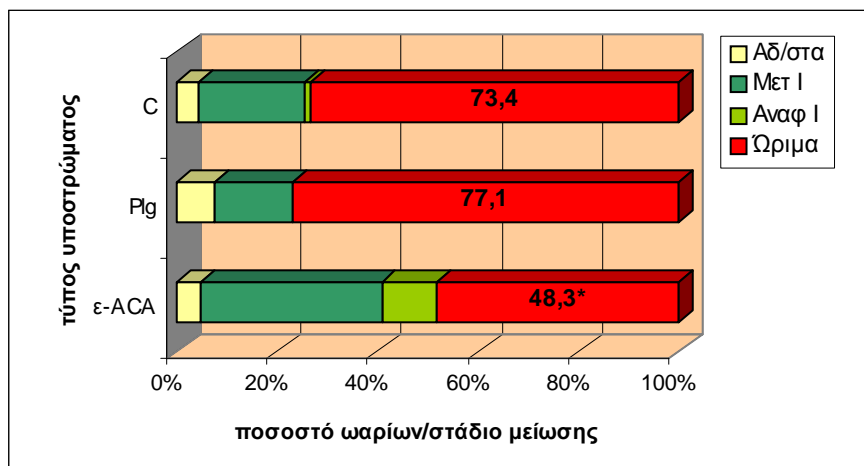
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα.

Εικόνα 20. Επίδραση της πλασμίνης στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA). Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα.

Εικόνα 21. Επίδραση του ε-ACA στην ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



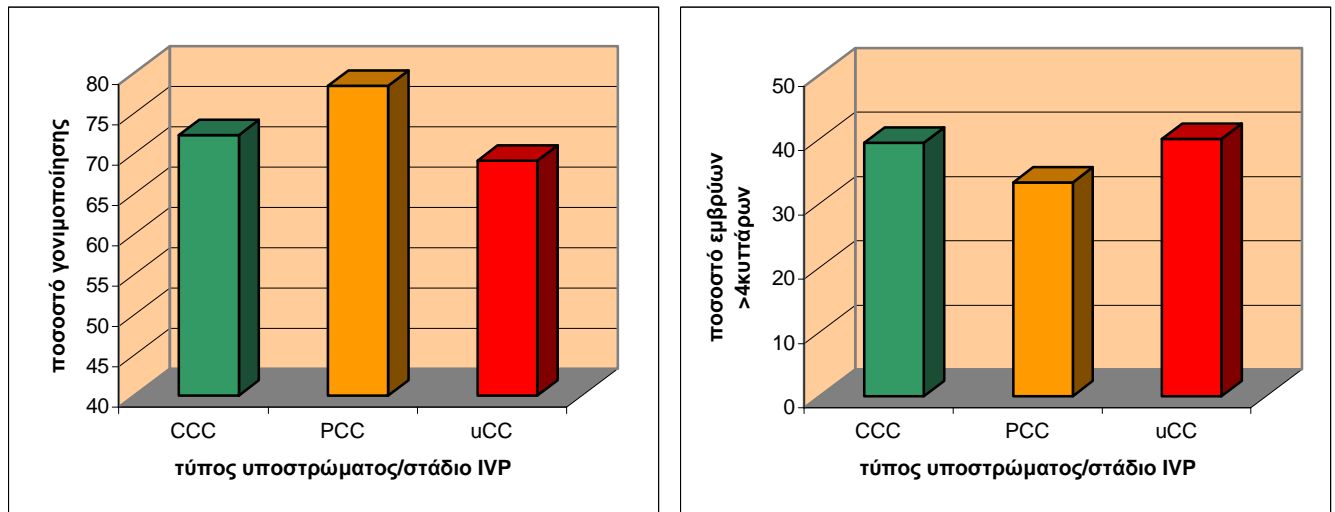
C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. Το άθροισμα των ωαρίων στα στάδια της τελόφασης I και της μετάφασης II θεωρήθηκαν ώριμα. * → $p < 0,05$.

Πίνακας 12. Επίδραση των u-PA, t-PA, πλασμίνης ή του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|--------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 130 | 94 (72,3) | 37 (39,4) |
| Plg | C | C | 111 | 87 (78,4) | 29 (33,3) |
| u-PA | C | C | 152 | 105 (69,1) | 42 (40) |
| C | C | C | 156 | 115 (73,7) | 46 (40) |
| Plg | C | C | 126 | 99 (78,6) | 30 (30,3) |
| t-PA | C | C | 148 | 103 (69,6) | 36 (35) |
| C | C | C | 152 | 112 (73,7) | 54 (48,2) |
| Plg | C | C | 142 | 117 (82,4) | 48 (41) |
| Pl | C | C | 198 | 162 (81,8) | 72 (44,4) |
| C | C | C | 162 | 120 (74,1) | 60 (50) |
| Plg | C | C | 140 | 104 (74,3) | 52 (50) |
| ε-ACA | C | C | 162 | 111(68,5) | 50 (45) |

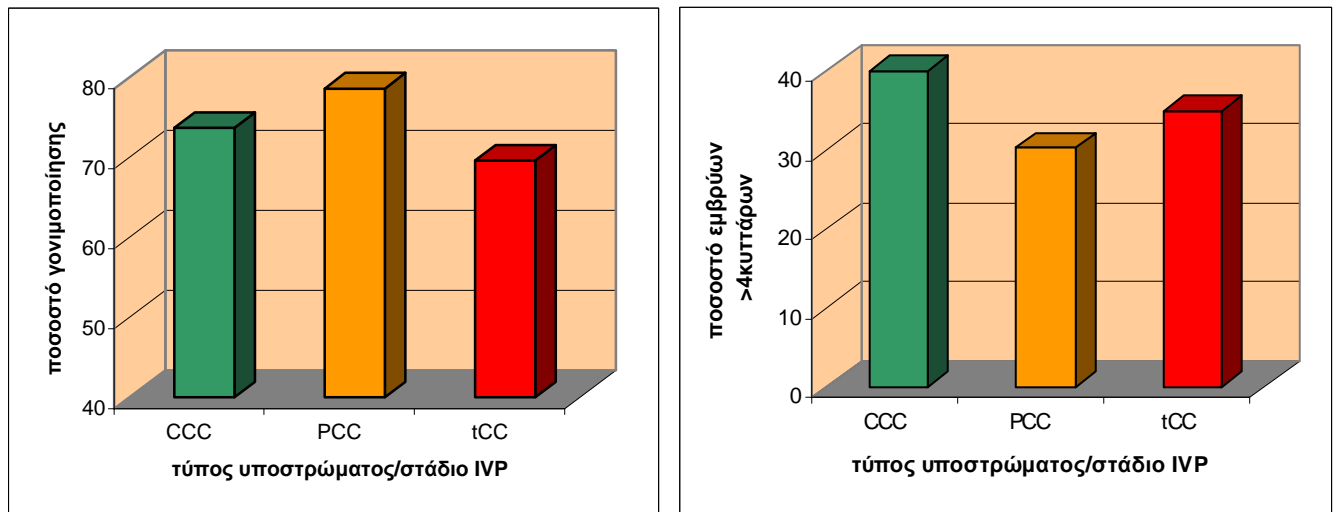
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml ενεργοποιό του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης στην IVM, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml ενεργοποιό του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου στην IVM, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA) στην IVM, ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA στην IVM. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4K: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα.

Εικόνα 22. Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



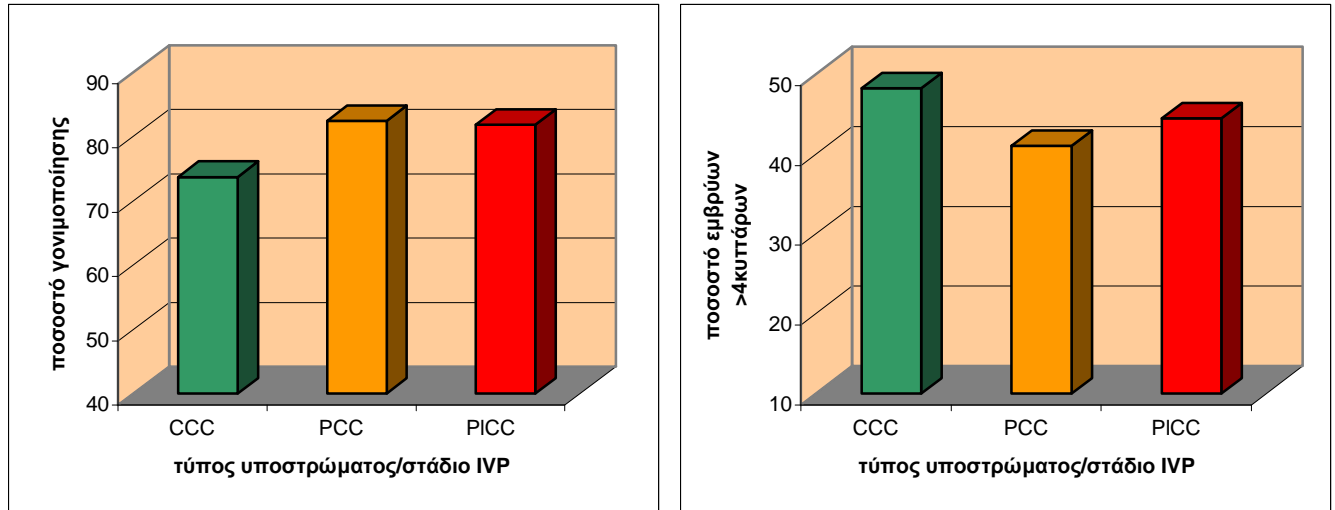
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και u: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA.

Εικόνα 23. Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



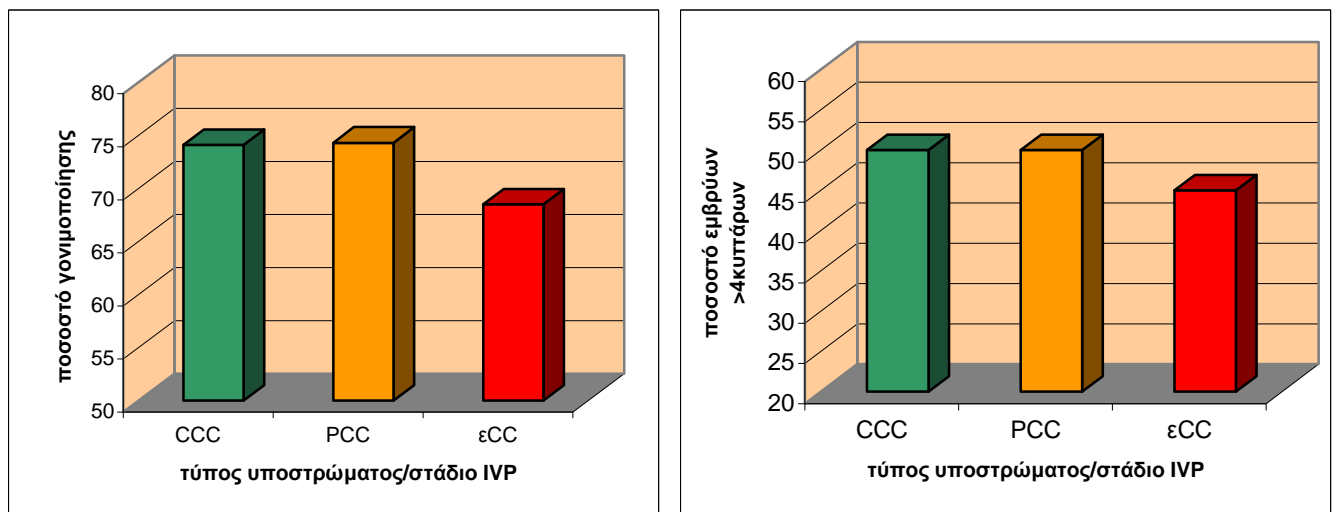
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και t: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA.

Εικόνα 24. Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA).

Εικόνα 25. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα 24ωρης διάρκειας IVM



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA.

3.3 Τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro* γονιμοποίησης

3.3.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά από την τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη u-PA στο ποσοστό της γονιμοποίησης (πιν. 13, εικ. 26) και στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 13, εικ. 26) σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα.

3.3.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης

Διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση, από την τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη t-PA, στο ποσοστό της γονιμοποίησης (84,2%) σε σχέση με το τυποποιημένο (70,1%, $p=0,004$) αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (71,4%, $p=0,009$) (πιν. 14, εικ. 28). Στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 14, εικ. 28) σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά.

3.3.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά από την τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη πλασμίνης στο ποσοστό της γονιμοποίησης (πιν. 13, εικ. 27) και στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 13, εικ. 27) σε σχέση με το τυποποιημένο και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα.

3.3.4 Προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε:

- i. Σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης (50,6%) σε σχέση με το τυποποιημένο (70,4%, $p=0,0004$) αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (71,6%, $p=0,0001$) (πιν. 15, εικ. 29).

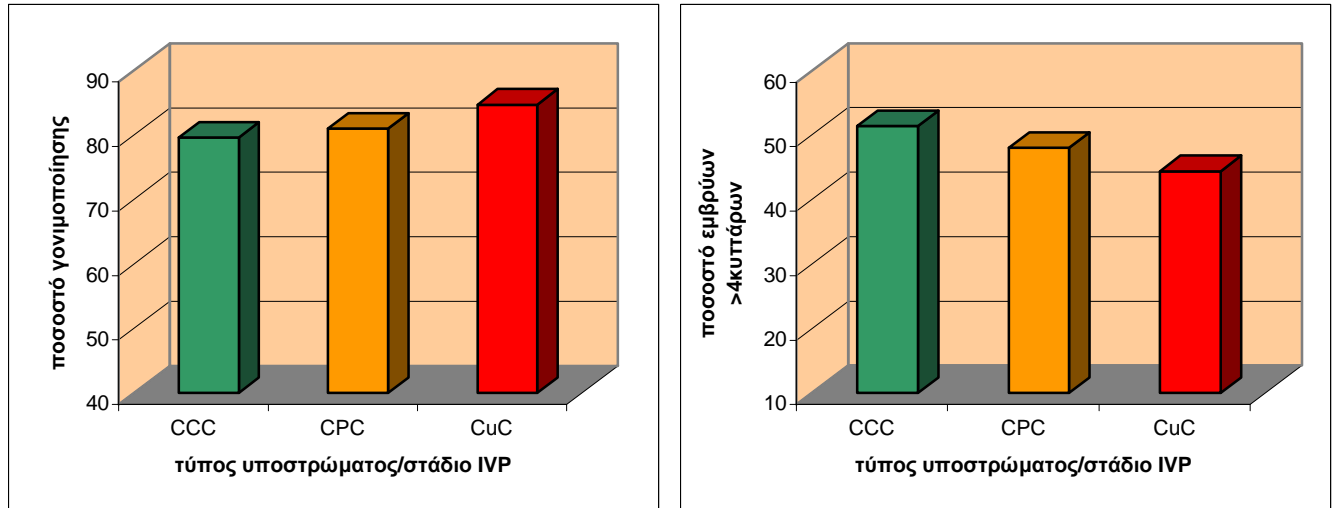
ii. Σημαντική μείωση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων στο τροποποιημένο με ε-ACA υπόστρωμα (24,7%) σε σχέση με το μάρτυρα (50,5%, $p < 0,0001$) και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (57,6%, $p < 0,0001$) (πιν. 15, εικ. 29).

Πίνακας 13. Επίδραση του u-PA ή της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVF.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|------------------|-----------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 132 | 105 (79,6) | 54 (51,4) |
| C | Plg | C | 126 | 102 (81) | 49 (48) |
| C | u-PA | C | 170 | 144 (84,7) | 64 (44,4) |
| C | C | C | 129 | 90 (69,8) | 45 (50) |
| C | Plg | C | 144 | 106 (73,6) | 66 (62,3) |
| C | Pl | C | 171 | 131 (76,6) | 76 (58) |

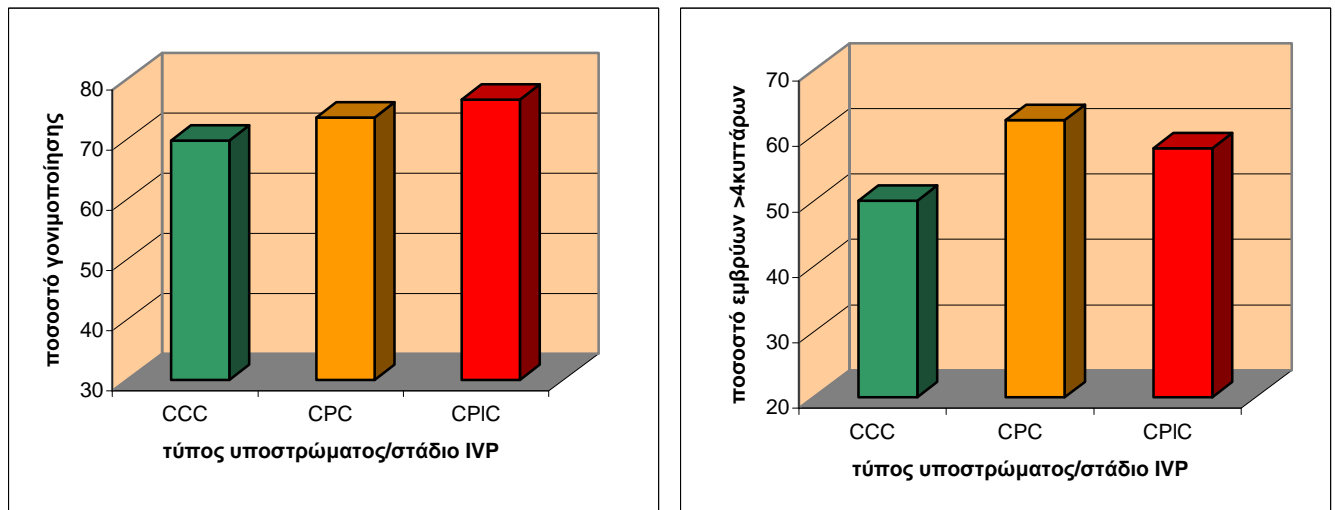
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA στην IVF, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA) στην IVF. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4K: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα.

Εικόνα 26. Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF.



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και u: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA.

Εικόνα 27. Επίδραση της πλασμίνης στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη της στο υπόστρωμα της IVF



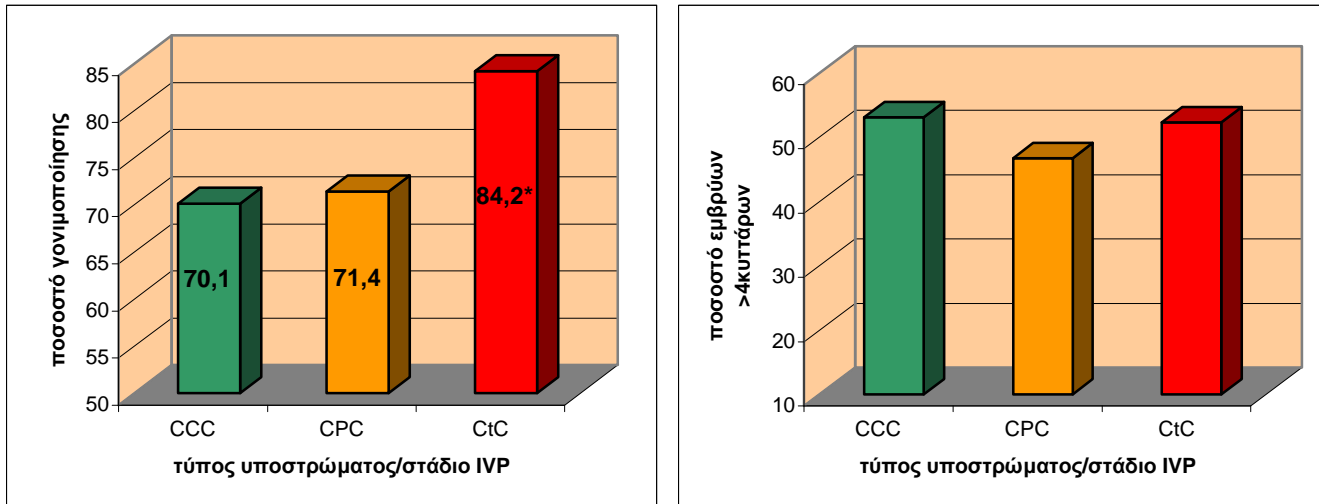
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, Pl: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA).

Πίνακας 14. Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|-------------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 137 | 96 (70,1) ^α | 51 (53,1) |
| C | Plg | C | 126 | 90 (71,4) ^α | 42 (46,7) |
| C | t-PA | C | 152 | 128 (84,2) ^β | 67 (52,3) |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA στην IVF. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΩΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4Κ: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Εικόνα 28. Επίδραση του t-PA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF



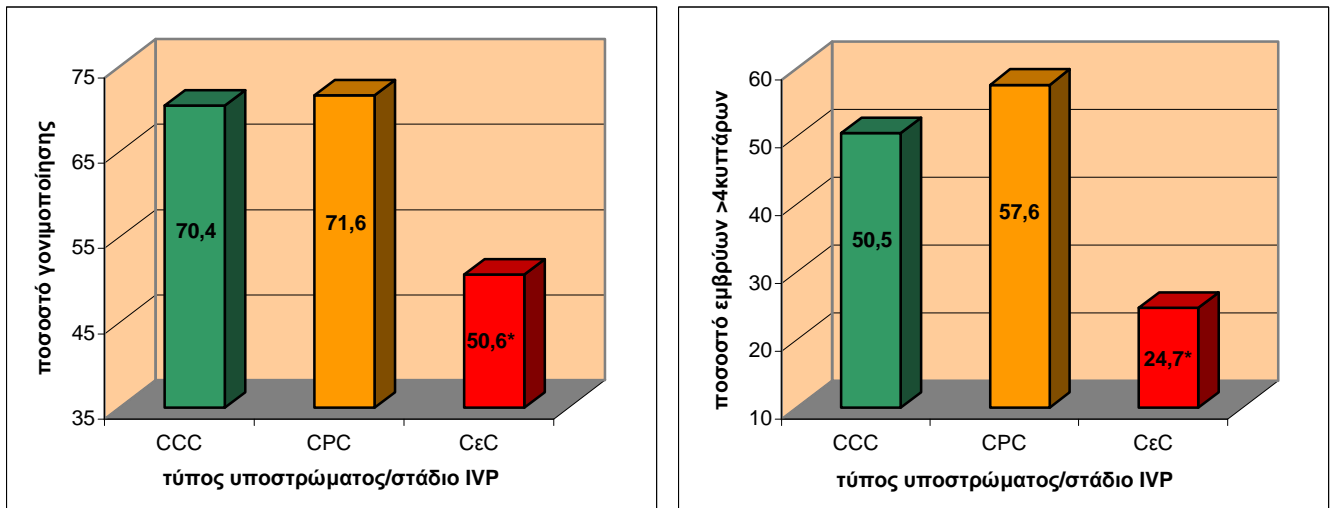
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο και t: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA. * → $p < 0,05$.

Πίνακας 15. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΩΑΡΙΩΝ | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|---------------|-------------------------|------------------------|
| IVM | IVF | IVC | | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | | |
| C | C | C | 135 | 95 (70,4) ^a | 48 (50,5) ^γ |
| C | Plg | C | 148 | 106 (71,6) ^a | 61 (57,6) ^γ |
| C | ε-ACA | C | 176 | 89 (50,6) ^β | 22 (24,7) ^δ |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο. ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA στην IVF. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4Κ: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Εικόνα 29. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVF και της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVF



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, ε: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. * → p<0,05.

3.4 Τροποποίηση των υποστρώματων της *in vitro* ανάπτυξης-καλλιέργειας των εμβρύων

3.4.1 Επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη u-PA οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων (72,5%) σε σχέση με τον μάρτυρα (51,4%, $p=0,0006$) και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (54,6%, $p=0,005$) (πιν. 16, εικ. 30α).

3.4.2 Επίδραση της προσθήκης t-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά από την τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη πλασμίνης στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 17, εικ. 30β), σε σχέση με το τυποποιημένο αλλά και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα.

3.4.3 Επίδραση της προσθήκης πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων

Δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά από την τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη πλασμίνης στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων (πιν. 17, εικ. 30γ), σε σχέση με το τυποποιημένο και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα. Παρά το γεγονός αυτό, τα έμβρυα που αναπτύχθηκαν στο τροποποιημένο με πλασμίνη υπόστρωμα της IVC (61,7%) ήταν περισσότερα ($p=0,07$) από αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα μάρτυρας (48,1%).

3.4.4 Προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων

Διαπιστώθηκε ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων (29,4%), σε σχέση με το μάρτυρα (51,2%, $p=0,0037$) και με το τροποποιημένο με πλασμινογόνο υπόστρωμα (48,8%, $p=0,005$) (πιν. 18, εικ. 30δ).

Πίνακας 16. Επίδραση του u-PA στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVC.

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|
| IVM | IVF | IVC | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | |
| C | C | C | 111 (80,4) | 57 (51,4) ^a |
| C | C | Plg | 88 (77,8) | 48 (54,6) ^a |
| C | C | u-PA | 138 (78,9) | 100 (72,5) ^b |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u-PA: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA στην IVC. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4K: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Πίνακας 17. Επίδραση του t-PA ή της πλασμίνης στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVC

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|-----------------------|--------------|
| IVM | IVF | IVC | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | |
| C | C | C | 93 (73,4) | 45 (48,4) |
| C | C | Plg | 82 (75,1) | 40 (48,8) |
| C | C | t-PA | 120 (74,5) | 54 (45) |
| C | C | C | 77 (72,8) | 37 (48,1) |
| C | C | Plg | 68 (70,8) | 37 (54,4) |
| C | C | PI | 94 (75,7) | 58 (61,7) |

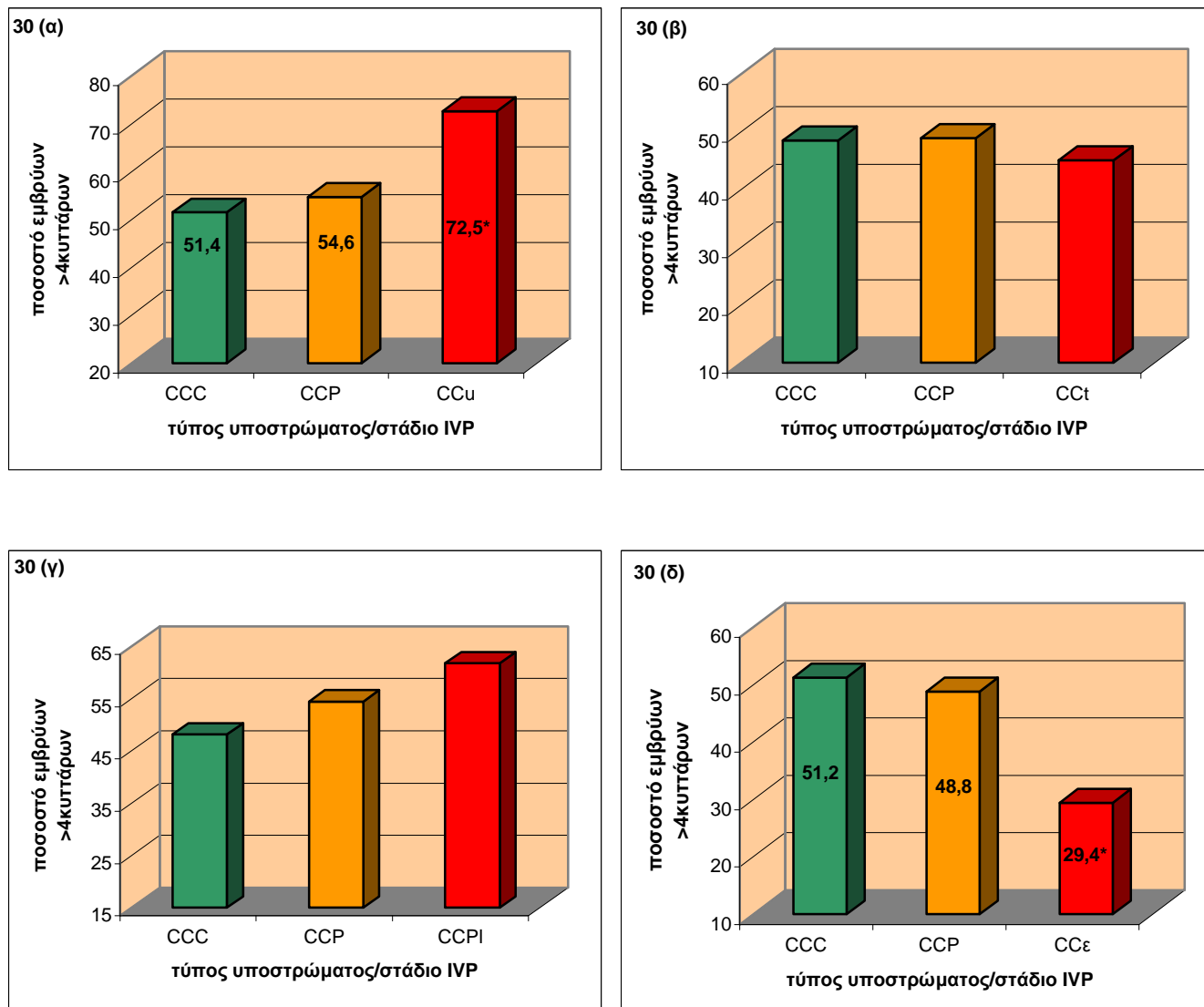
Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, t-PA: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA στην IVC, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA) στην IVC. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4K: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα.

Πίνακας 18. Επίδραση του ε-ACA στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη του στο υπόστρωμα της IVC

| ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ | | | ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ (%) | > 4 κυτ. (%) |
|------------------|-------|-------|-----------------------|------------------------|
| IVM | IVF | IVC | | |
| 24ωρη | 24ωρη | 48ωρη | | |
| C | C | C | 86 (81,1) | 44 (51,2) ^a |
| C | C | Plg | 84 (82,3) | 41 (48,8) ^a |
| C | C | ε-ACA | 85(79,5) | 25 (29,4) ^b |

Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα. Plg: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο. ε-ACA: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA στην IVC. ΣΥΝΟΛΟ ΓΟΝ/ΝΩΝ: αριθμός και ποσοστό ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, >4K: αριθμός και ποσοστό εμβρύων με περισσότερα από 4 κύτταρα. Οι τιμές που έχουν διαφορετικούς εκθέτες εντός της ίδιας στήλης διαφέρουν σημαντικά (P<0,05).

Εικόνα 30. Επίδραση της προσθήκης των u-PA, t-PA, πλασμίνης ή ε-ACA στην απόδοση της IVC μετά από την προσθήκη τους στο υπόστρωμα της IVC



Κάθε γραμματικό σύμβολο αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα, όπου έγινε διαδοχικά η επώαση στο εκάστοτε στάδιο της IVP, δηλαδή την IVM, IVF και IVC αντίστοιχα. C: τυποποιημένο υπόστρωμα, P: υπόστρωμα με 5 CU/0,1ml πλασμινογόνο, u: υπόστρωμα με 0,5 IU/0,1ml u-PA, t: υπόστρωμα με 50 IU/0,1ml t-PA, PI: υπόστρωμα με πλασμίνη (5 CU/0,1ml πλασμινογόνο + 1 IU/0,1ml uPA) και ε: υπόστρωμα με 10mM ε-ACA. * → $p < 0,05$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής συνοψίζονται ως εξής:

- Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στο προωθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο σε σχέση με το κυρίαρχο ωοθυλάκιο του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Δεν υπήρχε, αντίστοιχα, σημαντική διαφορά στην δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης (PI).
- Στο ωοθυλακικό υγρό, τόσο του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου όσο και του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης, η PAA που ανιχνεύθηκε οφειλόταν στην παρουσία και των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA, u-PA).
- Στα τυποποιημένα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην IVP ανιχνεύθηκε δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών της πλασμίνης. Η δραστηριότητα αυτή ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν του υγρού του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου και εκείνη του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης.
- Η τροποποίηση των υποστρωμάτων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων με προσθήκη πλασμινογόνου δεν οδήγησε σε διαφοροποιήσεις των ποσοστών ωρίμανσης και γονιμοποίησης των ωαρίων καθώς και της εξέλιξης των εμβρύων, σε σχέση με τα τυποποιημένα υποστρώματα.
- Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με προσθήκη u-PA οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων. Η προσθήκη του u-PA στα υπόλοιπα υποστρώματα δεν οδήγησε σε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους εκάστοτε μάρτυρες.
- Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη t-PA οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού της γονιμοποίησης. Δεν ανευρέθηκαν διαφοροποιήσεις από την προσθήκη του t-PA στα υπόλοιπα υποστρώματα σε σχέση με τους εκάστοτε μάρτυρες.

- Η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων, καθώς και του ποσοστού γονιμοποίησης σε σχέση με το μάρτυρα μετά από 18 ώρες ωρίμανσης. Δεν υπήρξε διαφοροποίηση από τον μάρτυρα όταν η πλασμίνη προστέθηκε στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης ή της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων.
- Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε καθυστέρηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων τόσο ύστερα από 18 όσο και ύστερα από 24 ώρες καλλιέργειας. Επίσης, οδήγησε σε μείωση του ποσοστού της γονιμοποίησης των ωαρίων μετά από 18ωρη ωρίμανση στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.
- Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη ε-ACA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης και του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων στην IVC που ακολούθησε.
- Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων.

Από τα αποτελέσματά αυτά γίνεται φανερό, ότι το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη συμμετέχει στις διαδικασίες της *in vitro* ωρίμανσης και γονιμοποίησης των ωαρίων, καθώς και στα πρώτα στάδια της *in vitro* ανάπτυξης των εμβρύων βοοειδών, αφού η αδρανοποίησή του, με την προσθήκη ε-ACA, μείωσε σημαντικά τις αντίστοιχες αποδόσεις της IVM, της IVF και της IVC. Η ενίσχυση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη με την προσθήκη πλασμίνης στην IVM, t-PA στην IVF και u-PA στην IVC βελτίωσε τις αποδόσεις της IVP.

4.1 Δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στα ωοθυλάκια

Στην παρούσα μελέτη η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης στα βιολογικά υγρά ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή που ανιχνεύθηκε στα τυποποιημένα υποστρώματα. Παράλληλα, η δραστηριότητα του ενζυμικού αυτού συστήματος επηρεάστηκε σαφώς από την φάση ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Έτσι, τόσο η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAs), όσο και η δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAIs) ήταν σημαντικά αυξημένη στο υγρό του προωθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου σε σχέση με του κυρίαρχου ωοθυλακίου του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Στο ωοθυλακικό υγρό επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη και των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου.

Το ενζυμικό σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης θεωρείται ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Strickland και Beers 1976, Liu και συν. 1986, 1991, Bicsak και συν. 1989, Karakji και Tsang 1995α), την ωρίμανση του ωαρίου (Liu και συν. 1986, Milwidsky και συν. 1989, Dow και συν. 2002α, 2002β), καθώς και την ωοθυλακιορρηξία (Beers 1975, Smokonitis και συν. 1989, Colgin και Murdoch 1997, Dow και συν. 2002α, 2002β). Η επίδραση αυτή είναι είτε άμεση μέσω της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της πλασμίνης, είτε έμμεση μέσω της ενεργοποίησης άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως είναι οι MMPs, που συμμετέχουν στα παραπάνω φαινόμενα (Bicsak και συν. 1989, Li και συν. 1997, Liu 1999). Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε δραστηριότητα τόσο του u-PA όσο και του t-PA στο ωοθυλακικό υγρό και το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα ευρήματα των Cao και συν. (2006) και των Dow και συν. (2002β). Το εύρημα της παρούσας μελέτης, ότι η PAA στο ωοθυλακικό υγρό των προωθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την PAA στα κυρίαρχα ωοθυλάκια του πρώτου κύματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων, υποστηρίζει την υπόθεση ότι προσεγγίζοντας το χρόνο της ωοθυλακιορρηξίας και κάτω από την επίδραση ορμονών (π.χ. γοναδοτροπίνες) αυξάνεται σημαντικά η σύνθεση ή/και η έκκριση των PAs από τα κοκκώδη κύτταρα (Strickland και Beers 1976, Canipari και Strickland 1985, Ny και συν. 1985, Liu και συν. 1987, 1991,

Bicsak και συν. 1989, Stephens και συν. 1989, Hagglund και συν. 1996, Colgin και Murdoch 1997, Dow και συν. 2002α, 2002β). Η αύξηση της δραστηριότητας των PAs στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου έχει αναφερθεί στα βοοειδή (Dow και συν. 2002β), στον χοίρο (Politis και συν. 1990), στον αρουραίο (Strickland και Beers 1976, Peng και συν. 1993) και στον πίθηκο (Liu και συν. 2004).

Παρόλα αυτά οι Jones και συν. (1989) ανέφεραν αυξημένη δραστηριότητα των PAIs και μειωμένη δραστηριότητα των PAs στο ωοθυλακικό υγρό του προωθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου στον άνθρωπο. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στη μελέτη των Jones και συν. (1989) χρησιμοποιήθηκε ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες με προβλήματα του γεννητικού συστήματος (ενδομητρίωση, ανεξήγητη υπογονιμότητα, διαταραχές της ωοθυλακιόρρηξιας), ενώ παράλληλα εφαρμόστηκε πρωτόκολλο πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιόρρηξιας. Σε προγενέστερη μελέτη των Weimer και συν. (1984), η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιόρρηξιας, με τη χορήγηση της ίδιας αγωγής με αυτήν των Jones και συν. (1989), οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στο ωοθυλάκιο σε σχέση με τη αυτή που παρατηρήθηκε στα άτομα που δεν είχαν λάβει την αγωγή. Παράλληλα, οι Weimer και συν. (1984) ανέφεραν ότι με την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιόρρηξιας μπορεί να διαταραχθεί η λεπτή ισορροπία στην έκκριση των PAs και των στεροειδών ορμονών.

Το εύρημα της σημαντικά αυξημένης δραστηριότητας των PAs και των PAIs στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο σε σχέση με οποιαδήποτε φάση ανάπτυξης των ωοθυλακίων είναι σύμφωνο με άλλες έρευνες (Strickland και Beers 1976, Politis και συν. 1990, Peng και συν. 1993, Dow και συν. 2002β) και θα μπορούσε να ερμηνευθεί με την υπόθεση ότι η αύξηση της δραστηριότητας των PAs στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο είναι τέτοια που υπερβαίνει την αυξημένη δραστηριότητα των PAIs. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν διαπιστώθηκε διαφοροποίηση στην δραστηριότητα των αδρανοποιών της πλασμίνης (Plasmin Inhibitors, PIs) στο ωοθυλακικό υγρό των ωοθυλακίων που εξετάστηκαν. Μολοταύτα, σε προηγούμενο πειραματισμό μας, διαφορές στα επίπεδα της δραστηριότητας των PIs στο ωοθυλακικό υγρό, παρατηρήθηκαν σε έγκυα ζώα αλλά και σε ωοθυλάκια μοσχαριών ανάλογα με την ηλικία τους. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των PIs ήταν σημαντικά αυξημένη σε ωοθυλάκια

μόσχων ηλικίας 4 μηνών σε σχέση με των 2, 3, 5, 6 και 7 μηνών, ενώ ήταν μειωμένη στα κυρίαρχα ωοθυλάκια εγκύων ζώων (αδημοσίευτα στοιχεία). Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση της δραστηριότητας των PIs στο ωοθυλάκιο μάλλον συνδυάζεται με καταστάσεις που επηρεάζουν γενικότερα των οργανισμό (ηλικία μοσχарιών, εγκυμοσύνη) και όχι με τη φάση του οιστρικού κύκλου. Κάτι τέτοιο πιθανόν συμβαίνει, καθώς η έκκριση των PIs γίνεται κυρίως στο ήπαρ και οι PIs υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος (Collen 1980, Travis και Salvesen 1983, Saksela 1985).

Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται πως η αύξηση της PAA συμπίπτει με αύξηση της δραστηριότητας των PAIs, ώστε να ενεργοποιηθούν μηχανισμοί που θα αποτρέψουν την υπερβολική δραστηριότητα των PAs. Όμως, η αύξηση της PAA στο ωοθυλακικό υγρό, προφανώς αντανακλά τη γενικότερη αύξηση της PAA στο ωοθυλάκιο, η οποία μπορεί να συμβάλει στην απαιτούμενη αναδιάρθρωση ιστών, που συμβαίνει κατά την ωοθυλακιόρρηξη. Ενδεχομένως, η αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα του ωοθυλακικού υγρού συμμετέχει στην εξέλιξη και άλλων φυσιολογικών διεργασιών, καθώς το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί το φυσιολογικό «υπόστρωμα» ωρίμανσης των ωαρίων.

Αν και η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε τη δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη στα τυποποιημένα υποστρώματα, τόσο η PAA όσο και η δραστηριότητα των PAIs και PIs, που προσδιορίστηκε σε αυτά ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του ωοθυλακικού υγρού. Το αποτέλεσμα του σημαντικού αυτού ελλείμματος στη δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη στα τυποποιημένα υποστρώματα ενδεχομένως επηρεάζει αρνητικά τις αποδόσεις της IVP.

4.2 Τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων

Η προσθήκη ενός εκ των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA, u-PA) ή πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση στην ωρίμανση των ωαρίων σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα, η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης είχε ως

αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των ώριμων ωαρίων αλλά και του ποσοστού γονιμοποίησής τους ύστερα από 18ωρης διάρκειας επώαση, σε σύγκριση με το μάρτυρα και με το πλασμινογόνο. Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών με προσθήκη ε-ACA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των ωαρίων, που εμφάνιζαν χαρακτηριστικά ωρίμανσης του πυρήνα, τόσο μετά από 18 όσο και μετά από 24 ώρες επώασης. Μετά τις 18 ώρες *in vitro* ωρίμανσης τα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία ε-ACA παρουσίασαν, επίσης, χαμηλά ποσοστά *in vitro* γονιμοποίησης.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει αλλαγές σε πυρηνικό και κυτταροπλασματικό επίπεδο. Οι αλλαγές αυτές καθιστούν το ωάριο ικανό για γονιμοποίηση επηρεάζοντας, ταυτόχρονα, την περαιτέρω εξέλιξη του εμβρύου (Downs 1995).

Το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει αναφερθεί ότι ενδέχεται να εμπλέκεται στη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων ποντικών, αρουραίων, βοοειδών και των ανθρώπων μέσω της επίδρασης στο σύμπλεγμα ωαρίου-κοκκωδών κυττάρων ή/και μέσω της ενεργοποίησης παραγόντων που προάγουν την ωρίμανση (Liu και συν. 1986, , Bicsak και συν. 1989, , Park και συν. 1999, D'Alessandris και συν. 2001, Dow και συν. 2002β). Την υπόθεση αυτή υποστηρίζουν και δεδομένα από μελέτες στον άνθρωπο, που συνδύασαν αυξημένα ποσοστά γονιμοποίησης με ωάρια που προέρχονται από ωοθυλακικό υγρό με αυξημένη PAA (Deutinger και συν. 1988, Milwidsky και συν. 1989). Στο ωοθυλακικό υγρό απαντώνται οι ενεργοποιεί του πλασμινογόνου, καθώς και άλλοι παράγοντες του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη (Beers 1975, Smokonitis, και συν. 1988β, 1989α, Σμοκοβίτης 1996). Στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο αγελάδων, στο ωοθυλάκιο δηλαδή από το οποίο θα παραχθεί το ωάριο το οποίο προορίζεται για γονιμοποίηση, η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη φάση ανάπτυξης των ωοθυλακίων (ευρήματα της παρούσας μελέτης).

Στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης, γονιμοποίησης των ωαρίων, καθώς και καλλιέργειας των εμβρύων προστίθενται παράγωγα αίματος (ορός αγελάδας σε οίστρο, ορός εμβρύου αγελάδας), στα οποία έχει διαπιστωθεί δραστηριότητα ενεργοποιών του

πλασμινογόνου και κυρίως αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Collen 1980, Dano και συν. 1985, Saksela 1985, Σμοκοβίτης 1996). Δραστηριότητα των PAs, των PAIs και των PIs διαπιστώθηκε και στα τυποποιημένα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι στο ωοθυλακικό υγρό και στα κοκκώδη επιθηλιακά κύτταρα ωοθυλακίων των οποίων τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν, η δραστηριότητα του t-PA ήταν πολύ υψηλότερη από εκείνη των ωοθυλακίων των οποίων τα ωάρια δεν γονιμοποιήθηκαν (Deutinger και συν. 1988, Milwidsky και συν. 1989). Ακόμη, η προσθήκη αδρανοποιών διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων (μεταξύ των οποίων και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου) στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων ποντικού ελάττωσε το ποσοστό αυτόματης εμφάνισης της αντίδρασης της διαφανούς ζώνης (Zhang και συν. 1991, 1992).

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης με την προσθήκη u-PA, t-PA ή πλασμινογόνου

Η προσθήκη ενός εκ των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA ή u-PA) στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση, στις αποδόσεις της IVP, σε σχέση με το μάρτυρα και το πλασμινογόνο. Το εύρημα αυτό δε συμφωνεί με εκείνα που προέκυψαν από μελέτες σε ανθρώπους (Deutinger και συν. 1988, Milwidsky και συν. 1989), που έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης παρουσίας ή δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, στο ωοθυλακικό υγρό και στα κοκκώδη κύτταρα, και της γονιμοποίησης των αντίστοιχων ωαρίων. Κάτι τέτοιο, μπορεί να οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των ειδών, στο διαφορετικό πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και κυρίως στην διαφορά που υπάρχει μεταξύ *in vivo* και *in vitro* συνθηκών. Πρέπει, όμως, να αναφερθεί ότι η αυξημένη τελικά δημιουργία πλασμίνης, από την αύξηση της PAA και την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων πλασμινογόνου στις *in vivo* συνθήκες, μπορεί να αποτελεί την κοινή συνισταμένη που οδηγεί τελικά στην θετική επίδραση του ενζυμικού συστήματος στην ωρίμανση των ωαρίων. Παράλληλα, η τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης με την προσθήκη πλασμινογόνου δεν παρουσίαζε διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Η προσθήκη ενεργοποιών του πλασμινογόνου ή πλασμινογόνου μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία πλασμίνης, από την υπάρχουσα δραστηριότητα παραγόντων του

συστήματος (πλασμινογόνου και ενεργοποιών του πλασμινογόνου αντίστοιχα) στο περιβάλλον της *in vitro* ωρίμανσης. Φαίνεται, όμως, πως τα επίπεδα της δραστηριότητας της πλασμίνης που μπορεί να παραχθεί δεν είναι τέτοια ώστε να επηρεάζουν καθοριστικά την διαδικασία της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων. Έτσι, η πλασμίνη, που δημιουργήθηκε, θα μπορούσε να ενεργοποιήσει μια σειρά μεταβολικών και βιοχημικών διεργασιών στα κοκκώδη κύτταρα και στο ωάριο αλλά η δράση της αυτή δεν είναι τέτοια ώστε να διαφοροποιεί το αποτέλεσμα της ωρίμανσης σε σχέση με τον μάρτυρα.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης με την προσθήκη πλασμίνης

Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* ωρίμανσης με την προσθήκη πλασμίνης σε 18ωρης διάρκειας επώσεις είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική επιτάχυνση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων, καθώς και την αύξηση του ποσοστού των γονιμοποιημένων ωαρίων. Η επίδραση αυτή δεν εμφανιζόταν ύστερα από 24 ώρες *in vitro* ωρίμανσης παρουσία πλασμίνης.

Η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων αποτελεί σημαντική παράμετρο στην διαδικασία της ωρίμανσης του ωαρίου (Kruip και συν. 1983, Goto και συν. 1988, Gordon 1994, Homburg και Shelef 1995, Hull 1995). Σε *in vivo* συνθήκες η διαδικασία της διόγκωσης της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων πυροδοτείται από την προωθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτροπινών (Downs, 1995), η οποία, παράλληλα, φαίνεται πως προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας της πλασμίνης και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στο ωοθυλάκιο (Dow και συν. 2002β). Σε *in vitro* συνθήκες, η FSH, η οποία προστίθεται στο υπόστρωμα της ωρίμανσης, μπορεί να οδηγήσει στην διόγκωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των κοκκωδών κυττάρων (Eppig 1980α, 1980β). Μολοταύτα, η διόγκωση που επιτυγχάνεται *in vitro* δεν είναι τόσο εκτεταμένη σε σχέση με ό,τι επικρατεί σε *in vivo* συνθήκες (Suzuki και συν. 1996, Hendriksen και συν. 2000), γεγονός που έχει συνδεθεί με τα χαμηλότερα ποσοστά *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων αλλά και την γενικότερη ελλειμματική ανάπτυξη των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Rizos και συν. 2002).

Τα χαρακτηριστικά ενός ώριμου ωαρίου είναι η έξοδος του πρώτου πολικού σωματίου και η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων (Hull 1995). Η διαδικασία αυτή, όπως αναφέρθηκε περιλαμβάνει αλλαγές στην εξωκυτταρική θεμέλια

ουσία, στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων και στην παραγωγή πρωτεϊνών, αύξηση του υαλουρονικού οξέος στη θεμέλια ουσία και τελικά διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων (Buccione και συν. 1990, Chen και συν. 1990, Downs 1995, Zhuo και Kimata 2001). Στη διαδικασία της διόγκωσης της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, μεταξύ των οποίων και αυξητικοί παράγοντες, όπως είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), οι παρόμοιοι της ινσουλίνης αυξητικοί παράγοντες (IGFs), ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας βήτα (TGF-β) (Gordon 1994, Bieser και συν. 1998, Zhuo και Kimata 2001).

Από τους Liu και συν. (1986) έχει προταθεί ότι η πλασμίνη μπορεί να συμμετέχει στη διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων. Λαμβάνοντας, λοιπόν υπόψη όλα τα παραπάνω η προσθήκη πλασμίνης θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναδιάταξη του συμπλέγματος των κοκκωδών κυττάρων, είτε απευθείας μέσω της αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως της λαμινίνης ή της ινοδονεκτίνης (Zhuo και Kimata 2001), είτε μέσω της μετατροπής της προκολλαγενάσης και προελαστάσης στις ενεργές τους μορφές, κολλαγενάση και ελαστάση, που αποδομούν, αντίστοιχα, τα βασικά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας κολλαγόνο και ελαστίνη (Dano και συν. 1985, Σμοκοβίτης 1996). Παράλληλα, είναι γνωστό πως η πλασμίνη έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί προένζυμα του ενζυμικού συστήματος των MMPs (Ny και συν. 2002), τα οποία επίσης εμπλέκονται στην διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων και της διόγκωσης της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων (Bieser και συν. 1998, Hagglund και συν. 1999, Liu 2004). Τόσο η πλασμίνη όσο και το ενζυμικό σύστημα των MMPs έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν τις αδρανείς μορφές του TGF-β και να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των IGFs μέσω της πρωτεόλυσης που μπορούν να προκαλέσουν στις δεσμευτικές πρωτεΐνες των IGFs (IGFs binding proteins, IGFBPs) (Lyons και συν. 1988, Sato και Rifkin 1989, Lalou και συν. 1994, Manes και συν. 1999, Appes και συν. 2003). Οι αυξητικοί παράγοντες έχει βρεθεί πως μπορούν να παραχθούν από τα κοκκώδη κύτταρα, αλλά και να αποτελούν συστατικά του ορού που προστίθεται στην *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων (Kim και Schomberg 1989, Gordon 1994). Η παρουσία και η ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης συσχετίζεται θετικά με την ωρίμανση των ωαρίων και την διόγκωση της

στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων (Stephens και συν. 1989, Gordon 1994, Kobayashi και συν. 1994, Lorenzo και συν. 1994, Bieser και συν. 1998.).

Μολοταύτα, στη διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων απαιτείται και αντιπρωτεολυτική δραστηριότητα, η οποία θα εξασφαλίσει την ακεραιότητα του συμπλέγματος κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου (Zhuo και Kimata 2001). Η διόγκωση και η σταθερότητα της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων οφείλονται κατά κύριο λόγο στην παραγωγή υαλουρονικού οξέος από τα κοκκώδη κύτταρα (Salustri και συν. 1992), αλλά και στην εναπόθεση συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας (πρωτεογλυκάνες, λαμνίνη, ινοδονεκτίνη) στο σύμπλεγμα αυτό, διαδικασίες που ενεργοποιούνται 2-3 ώρες μετά τη διέγερση με γοναδοτροπίνες (Zhuo και Kimata 2001). Τις διαδικασίες αυτές φαίνεται πως μπορεί να τις ενισχύσει η παρουσία αυξητικών παραγόντων (π.χ. TGF- β) (Tirone και συν. 1997), ενώ η ολοκλήρωση τους συμπίπτει με το χρόνο που απαιτείται για την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων (18-24 ώρες μετά την έκκριση των γοναδοτροπινών σε *in vivo* συνθήκες). Παράλληλα, ο TGF- β χαρακτηρίζεται από αντιπρωτεολυτική δράση, αφού διεγείρει την έκκριση PAI-1 και αδρανοποιών του συστήματος των MMPs (Rifkin 1997), ενώ και η προσθήκη ορού αυξάνει την παρουσία των αδρανοποιών στο περιβάλλον της *in vitro* ωρίμανσης (Collen 1980, Dano και συν. 1985, Saksela 1985, Σμοκοβίτης 1996).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η πλασμίνη φαίνεται ότι μπορεί να επιταχύνει τις απαραίτητες διαδικασίες αναδιάρθρωσης του συμπλέγματος των κοκκωδών κυττάρων, μέσω της αποδόμησης συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας. Επίσης, η πλασμίνη μέσω της επίδρασής της στην διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να διευκολύνει τον τερματισμό της επικοινωνίας μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και ωαρίου (Liu και συν. 1986), διαδικασία που θεωρείται απαραίτητο βήμα για την συνολική πρόοδο και κυρίως για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ωρίμανσης των ωαρίων (Buccione και συν. 1990, Chen και συν. 1990, Downs 1995, Thomas και συν. 2004). Ακόμη, η πλασμίνη θα μπορούσε να προάγει την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων μέσω της ενεργοποίησης παραγόντων του ενζυμικού συστήματος των MMPs και αυξητικών παραγόντων. Η προσθήκη πλασμίνης θα μπορούσε να οδηγήσει άμεσα ή έμμεσα και στην αύξηση της παραγωγής δομικών συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας, αλλά και PAIs που αδρανοποιούν τους υπάρχοντες ενεργοποιούς και τελικά διασφαλίζουν την

μεγαλύτερη διόγκωση αλλά και σταθερότερη δομή του συμπλέγματος των κοκκωδών κυττάρων.

Πέραν των ανωτέρω, η πλασμίνη έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ενεργοποιεί εξαρτώμενες από τα ιόντα ασβεστίου βιοχημικές οδούς (Ca^{+2} -related signaling pathways). Αυτές συμπεριλαμβάνουν την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (phospholipase C, PLC) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC) μέσω της πρωτεΐνης G (G protein) και μπορεί να επηρεάσουν τελικά και την παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) (Schafer και συν. 1986, Penny και Ware 1992, Ishii-Watabe και συν. 2001). Παράλληλα, σε *in vitro* μελέτες, σε νεοπλασματικά κύτταρα έχει δειχθεί ότι η πλασμίνη μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της PKC (Chikahisa και συν. 1997, Diaz και συν. 2006). Τα ιόντα ασβεστίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ωαρίων των θηλαστικών (Collas και συν. 1993α, 1993β, Homa και συν. 1993, Homa 1995). Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου θεωρείται απαραίτητη για την ωρίμανση ωαρίων ποντικού και χοίρου (Downs 1995), ενώ στην ωρίμανση ωαρίων βοοειδών αρχικά σημειώνεται αύξηση στην κινητοποίηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου, η οποία ακολουθείται από αύξηση στην εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου (Davis και συν. 1987). Στο τυποποιημένο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης, η ύπαρξη Ca^{+2} , διασφαλίζει την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, αφού χωρίς αυτό παρατηρείται μείωση στα ποσοστά εξόδου του πολικού σωματίου και στην ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (Jagiello και συν. 1982). Η παράλληλη ενεργοποίηση του βιοχημικού μονοπατιού της PKC θεωρείται ότι μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος του ωαρίου (Jaken 1996, Jones 1998) και μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για την ενεργοποίηση της διαδικασίας της μείωσης (Downs 1995). Επίσης, έχει αναφερθεί πως η PKC έχει τη δυνατότητα να διατηρεί ανοιχτό το διάυλο ιόντων Ca^{2+} μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων (Jones 2005). Έτσι, η παρουσία της πλασμίνης στο υπόστρωμα της ωρίμανσης, μέσω της ταχύτερης ενεργοποίησης των βιοχημικών οδών των ιόντων Ca^{2+} και της PKC, θα μπορούσε να συμβάλει στην επικοινωνία μεταξύ ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος του ωαρίου. Τελικά το αποτέλεσμα θα ήταν η έναρξη βιοχημικών διεργασιών που θεωρείται πως προάγουν την διαδικασία της ωρίμανσης. Με αυτόν τον τρόπο, ενδέχεται

να οδηγεί σε ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ωαρίων, μετά από 18ωρη IVM.

Στα COCs των αγελάδων έχει εντοπιστεί, τόσο στα κοκκώδη κύτταρα όσο και στο ωάριο, δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης (Kuyt και συν. 1988), από την οποία συντίθεται η cAMP. Η ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού των Ca^{2+} μπορεί να οδηγήσει σε διέγερση της αδενυλικής κυκλάσης να παράγει cAMP. Θεωρείται, επίσης, ότι σε συμπλέγματα ωαρίων-ωοφόρου δίσκου αντιστρέφει τις ανασταλτικές της μείωσης επιδράσεις του cAMP (Downs 1995). Αν και η παρουσία υψηλών επιπέδων cAMP στο ωάριο συνδυάζεται με αναστολή της διαδικασίας της μείωσης, η ταυτόχρονη αύξησή της στα κοκκώδη κύτταρα προωθεί την διαδικασία της μείωσης, αφού φαίνεται ότι το ωάριο δεν είναι ικανό αποτρέψει την έναρξη της διαδικασίας της ωρίμανσης που πυροδοτείται από την αύξηση της cAMP στα κοκκώδη κύτταρα (Brackett και Zuelke 1993, Downs 1995, Tatemoto και Terada 1995, Richard και Sirard 1996, Saeki και συν. 1998).

Η πλασμίνη, όμως, παράλληλα με την αύξηση των επιπέδων cAMP, βοηθάει στην διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων και στην επακόλουθη διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ του ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων (Liu και συν. 1986). Η παράλληλη αύξηση των επιπέδων cAMP στα κοκκώδη κύτταρα θεωρείται πως προωθεί τη διαδικασία της μείωσης ανεξάρτητα από τα επίπεδα cAMP στο ωάριο μέσω «σημάτων» (signals) που πυροδοτούν τη μείωση, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί εάν τα κοκκώδη κύτταρα προμηθεύουν με cAMP το ωάριο ή εάν πυροδοτούν την παραγωγή του από αυτό (Bilodeau και συν. 1993). Με τον τρόπο αυτό η πλασμίνη φαίνεται πως αρχικά πυροδοτεί την απαραίτητη για την έναρξη της ωρίμανσης, παραγωγή cAMP από τα κοκκώδη κύτταρα, ενώ στην πορεία της διαδικασίας της μείωσης, μέσω της διακοπής της επικοινωνίας κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου, τα κοκκώδη κύτταρα σταματούν την προμήθεια cAMP στο ωάριο, κάτι το οποίο θα προκαλούσε αναστολή της διαδικασίας της μείωσης (Eppig 1982). Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι μία μείωση των χασματοσυνδέσεων στο 40% περίπου των αρχικών σχετίζεται με την επανέναρξη της ωρίμανσης του πυρήνα του ωαρίου (Thomas και συν. 2004), ενδεχομένως διότι μειώνονται τα ανασταλτικά για την ωρίμανση του πυρήνα επίπεδα του cAMP (Luciano και συν. 2004). Έτσι, η πλασμίνη μέσω αυτού του μηχανισμού είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ταχύτερη ολοκλήρωση της μειωτικής διαδικασίας. Φαίνεται, λοιπόν, πως η συνδυασμένη αλλά και ανεξάρτητη

ενεργοποίηση διαφόρων βιοχημικών οδών από την πλασμίνη πιθανόν οδηγεί σε επιτάχυνση της διαδικασίας της ωρίμανσης.

Η προσθήκη πλασμίνης στην 24ωρης διάρκειας ωρίμανση δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων, ούτε του ποσοστού της γονιμοποίησης σε σχέση με το μάρτυρα. Φαίνεται, πως η πλασμίνη απλώς επιταχύνει τη διαδικασία της ωρίμανσης του πυρήνα στα ωάρια που διαθέτουν την ικανότητα εξέλιξης, σε τέτοιο βαθμό ώστε σε 18 ώρες να επιτυγχάνεται ωρίμανση αντίστοιχη με εκείνη που επιτυγχάνεται μετά από ωρίμανση διάρκειας 24 ωρών. Φαίνεται όμως ότι δεν έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει ωάρια, ανίκανα να ωριμάσουν σε 24 ώρες σε ικανά. Έτσι, ο μάρτυρας ύστερα από 24 ώρες ωρίμανσης εμφανίζει παρόμοια ποσοστά ωρίμανσης και κυρίως γονιμοποίησης με τα τροποποιημένα με πλασμίνη υποστρώματα. Βέβαια, στο περιβάλλον του μάρτυρα, υπήρχε τόσο δραστηριότητα παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, που μπορεί να προήλθε από τον ορό και το σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου όσο και παράγοντες που την επηρεάζουν (FSH, αυξητικοί παράγοντες). Κάτι τέτοιο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πλασμίνης και την ενεργοποίηση μεταβολικών και βιοχημικών διεργασιών αλλά αυτό ενδεχομένως συμβαίνει με σημαντικά βραδύτερο ρυθμό και σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με ότι συμβαίνει στο τροποποιημένο με πλασμίνη υπόστρωμα.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ωρίμανσης με την προσθήκη ε-ACA

Η προσθήκη του ε-ACA, ενός παράγοντα γνωστού για την ικανότητά του να αδρανοποιεί συνολικά την δράση του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση στα ποσοστά της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων στις συνθήκες του παρόντος πειραματισμού. Η αδρανοποίηση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης στο περιβάλλον της *in vitro* ωρίμανσης με την προσθήκη ε-ACA, οδηγεί έμμεσα στο συμπέρασμα ότι η συμμετοχή του συστήματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα όχι μόνο για την επιτάχυνση της ωρίμανσης των ωαρίων αλλά και για την ολοκλήρωσή της. Η αρνητική επίδραση της προσθήκης του ε-ACA, στην έναρξη ή/και την ολοκλήρωση της εξόδου του πολικού σωματίου (τελόφαση I και μετάφαση II),

ήταν ανεξάρτητη της διάρκειας της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων. Στις 18 ώρες της ωρίμανσης των ωαρίων υπό την επίδραση του ε-ACA η καθυστέρηση στην ωρίμανση των ωαρίων (πυρηνική και κυτταροπλασματική) επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της *in vitro* παραγωγής εμβρύων, αφού το ποσοστό της γονιμοποίησης ήταν σημαντικά χαμηλότερο. Η περαιτέρω ανάπτυξη των εμβρύων στην περίπτωση αυτή δεν φαίνεται να επηρεάστηκε αν και πρέπει να σημειωθεί ότι στο τροποποιημένο με ε-ACA υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης υπήρξε, μη στατιστικά σημαντική, καθυστέρηση στην ανάπτυξη των εμβρύων. Ύστερα από 24 ώρες IVM, αντίθετα, τα ποσοστά της γονιμοποίησης και της ανάπτυξης των εμβρύων δεν επηρεάστηκαν.

Το ε-ACA, το οποίο αδρανοποιεί το σύστημα ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη, λειτουργεί ανασταλτικά στη δημιουργία και τη δραστηριότητα της πλασμίνης και, πιθανώς, και στη διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων, αφού ανταγωνίζεται τη δέσμευση του πλασμινογόνου και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στους υποδοχείς τους. Παράλληλα, φαίνεται ότι η δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια των κυττάρων δεν την προστατεύει από το ε-ACA σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τους φυσικούς αδρανοποιούς, όπως είναι η α_2 -αντιπλασμίνη (Prentice 1980, Diaz και συν. 2006). Κάτι τέτοιο, θα είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των διαδικασιών που πυροδοτεί η πλασμίνη σε σχέση με την διόγκωση των κοκκωδών κυττάρων και τη μείωση του ποσοστού της ωρίμανσης των ωαρίων, αφού η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη στα COCs και γενικά στο περιβάλλον της *in vitro* ωρίμανσης αναστέλλεται.

Επιπλέον, το ε-ACA μπορεί να επηρεάζει έμμεσα, μέσω της αδρανοποίησης της πλασμίνης, την αντλία ιόντων Ca^{2+} , την ενεργοποίηση της PKC και την παραγωγή cAMP. Η δράση του ε-ACA στις 18 και στις 24 ώρες της ωρίμανσης πιθανώς έγκειται σε αναστολή της εξόδου του πρώτου πολικού σωματίου σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ωαρίων σε σχέση με το μάρτυρα και σε μείωση του ποσοστού των γονιμοποιημένων ωαρίων μόνο όταν έχει προηγηθεί ωρίμανση 18 ωρών. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε αρνητική επίδραση στην λειτουργία της αντλίας ασβεστίου ή στη διατήρηση υψηλών επιπέδων cAMP μέσα στο ωάριο και μείωση της παραγωγής του από τα κοκκώδη κύτταρα. Έχει διαπιστωθεί ότι η ωρίμανση των ωαρίων σε υπόστρωμα χωρίς Ca^{2+} οδηγεί σε αναστολή εξόδου του πολικού σωματίου και αδυναμία ολοκλήρωσης της μείωσης I

(Jagiello και συν. 1982). Παράλληλα, είναι γνωστό ότι η διατήρηση υψηλών επιπέδων cAMP εντός των ωαρίων έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο ποσοστό από αυτά να παραμένει στην μετάφαση I (Homa 1988). Τα υψηλά επίπεδα cAMP ενδοκυτταρικά ενδέχεται να οφείλονται στη διατήρηση της επικοινωνίας μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων μέσω των ανοιχτών χασματοσυνδέσεων (Luciano και συν. 2004).

Η αύξηση όμως της cAMP μέσα στο ωάριο οδηγεί σε προσωρινή μόνον αναστολή της διαδικασίας της μείωσης. Έτσι, μετά από 24 ώρες επώασης η αύξηση αυτή δεν φαίνεται ικανή να συγκρατήσει το ωάριο στη μετάφαση I (Homa 1988). Το γεγονός αυτό ίσως μπορεί να εξηγήσει την απουσία διαφοράς στα ποσοστά γονιμοποίησης, όταν αυτή πραγματοποιείται μετά από 24ωρη ωρίμανση των ωαρίων. Ενδεχομένως, τα COCs διαθέτουν αντισταθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι ενεργοποιούνται σε χρονικό σημείο κοντά στις 24 ώρες της επώασης. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα ωάρια συνεχίζουν να ωριμάζουν στο τυποποιημένο πλέον υπόστρωμα της IVF, φαίνεται ότι υπάρχει χρόνος να καλύψουν την καθυστέρηση, που προκαλεί η επίδραση του ε-ACA, στην επώαση της IVM. Σε αυτήν την περίπτωση, όταν πραγματοποιείται επώαση 18 ωρών η μεταφορά των ωαρίων στο τυποποιημένο υπόστρωμα της IVF από μόνη της δεν είναι δυνατόν να ισοσκελίσει την καθυστέρηση στην πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση που έχει ήδη προκληθεί.

4.3 Τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης

Η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης δεν οδήγησε σε διαφοροποιήσεις στα ποσοστά γονιμοποίησης σε σχέση με το μάρτυρα. Η προσθήκη t-PA οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των γονιμοποιημένων ωαρίων. Η προσθήκη u-PA ή πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης είχε ως αποτέλεσμα μη σημαντική αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης. Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη ε-ACA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού της γονιμοποίησης των ωαρίων, καθώς και της *in vitro* ανάπτυξης των εμβρύων, που προέκυψαν από αυτή.

Σε προηγούμενες μελέτες, προτάθηκε η συμμετοχή του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου-πλασμίνη στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Όπως

ειπώθηκε ήδη, οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου και άλλα μέλη του ινωδολυτικού συστήματος έχουν βρεθεί στα σπερματοζωάρια διαφόρων ζώων (ταύρου, κριού, κάπρου) και του ανθρώπου (Rekkas και συν. 1991, 1993, 2000, Smokonitis και συν. 1987, 1992α, 1992β) και στο πλάσμα του σπέρματος (Smokonitis και συν. 1987, Rekkas και συν. 1993). Επίσης, έχει διαπιστωθεί, ότι τα ένζυμα αυτά απελευθερώνονται από τα σπερματοζωάρια κατά την αντίδραση του ακροσώματος. (Taitzoglou και συν. 1996), ενώ η πλασμίνη είναι δυνατόν να επηρεάσει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και να επιταχύνει την αντίδραση του ακροσώματος σε ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια (Taitzoglou και συν. 2003, 2004). Στον ποντικό η προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης οδήγησε σε μείωση αντίστοιχα του ποσοστού των γονιμοποιημένων ωαρίων (Huarte και συν. 1993).

• Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με την προσθήκη πλασμινογόνου

Η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης δεν οδήγησε σε διαφοροποιήσεις στα ποσοστά γονιμοποίησης σε σχέση με το μάρτυρα. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με ευρήματα των Huarte και συν. (1993), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι, στον ποντικό, η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της IVF οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν. Η ασυμφωνία αυτή πιθανόν οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των δύο ζωικών ειδών (ποντικός, βοοειδή), στη χρήση υποστρωμάτων με διαφορετική, εν γένει, σύσταση αλλά και στη διαφορετική προέλευση του σπέρματος (κατεψυγμένο-νωπό). Το εύρημα της παρούσας μελέτης μπορεί να αποδοθεί είτε στο ότι στο μάρτυρα τα επίπεδα της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου παρέμεναν σταθερά είτε στο ότι τα επίπεδα της συγκέντρωσης του πλασμινογόνου στο περιβάλλον του μάρτυρα (τα οποία προκύπτουν από τα βιολογικά υλικά που είναι παρόντα στην επώαση), ενδεχομένως αρκούν ώστε να μη διαφοροποιηθεί σημαντικά η δραστηριότητα του όλου ενζυμικού συστήματος.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με την προσθήκη u-PA ή t-PA

Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη t-PA είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ποσοστού της γονιμοποίησης. Σε μελέτες στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα του t-PA βρισκόταν σε

σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στο ωοθυλακικό υγρό και στα κοκκώδη επιθηλιακά κύτταρα ωοθυλακίων των οποίων τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν *in vitro*, σε σχέση με τα ωοθυλάκια των οποίων τα ωάρια δεν γονιμοποιήθηκαν (Deutinger και συν. 1988, Milwidsky και συν. 1989). Στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο της αγελάδας έχει διαπιστωθεί δραστηριότητα και των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Dow και συν. 2002b, Cao και συν. 2006, ευρήματα της παρούσας μελέτης). Στον ωαγωγό των βοοειδών έχει αναφερθεί η δραστηριότητα κυρίως του u-PA (Gabler και συν. 2001). Φαίνεται, λοιπόν, ότι στο περιβάλλον της γονιμοποίησης (στο οποίο συμπεριλαμβάνεται και ωοθυλακικό υγρό από το ωοθυλάκιο που έχει ρηχθεί) στα βοοειδή υπάρχουν και οι δύο ενεργοποιοί. Η αύξηση του ποσοστού της *in vitro* γονιμοποίησης που παρατηρήθηκε παρουσία του t-PA είναι σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα από τον άνθρωπο και θα πρέπει να διερευνηθεί εάν αποτελεί φαινόμενο που αντανακλά και σε *in vivo* συνθήκες ή εάν πρόκειται για φαινόμενο που παρατηρείται στις πολύ διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων.

Είναι γνωστό, ότι οι δύο ενεργοποιοί του πλασμινογόνου εμφανίζουν εκλεκτικότητα στην δράση τους. Ο u-PA συμμετέχει, κυρίως, σε διαδικασίες κυτταρικής μετανάστευσης και αναδιάρθρωσης ιστών, ενώ ο t-PA κυρίως σε ινωδολυτικές διαδικασίες στο κυκλοφορικό σύστημα (Plow και συν. 1995, Myohanen και Vaheri 2004). Παράλληλα, για τον t-PA, σε αντίθεση με τον u-PA, δεν έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένοι υποδοχείς στη μεμβράνη των κυττάρων αλλά φαίνεται πως ο ρόλος αυτός μπορεί να ανλαμβάνεται από μακρομόρια (πρωτεΐνες) των κυτταρικών μεμβρανών (Myohanen και Vaheri 2004). Έτσι, ο t-PA έχει τη δυνατότητα να δεσμεύεται σε πολλές πρωτεΐνες και στο ινώδες και θεωρείται ότι αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν κατά ένα τρόπο τους υποδοχείς του t-PA στον οργανισμό. Επίσης, ο t-PA μπορεί να δεσμευθεί σε συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως είναι η λαμινίνη και η ινοδονεκτίνη (Myohanen και Vaheri 2004). Η διαφορά εκλεκτικότητας, λοιπόν, στη δράση των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου και ο διαφορετικός τρόπος δέσμευσής τους (Plow και συν. 1995, Myohanen και Vaheri 2004) είναι πιθανόν να εξηγεί την απουσία διαφοροποίησης στο ποσοστό γονιμοποίησης σε σχέση με το μάρτυρα, μετά την προσθήκη u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης.

Οι Huarte και συν. (1993) συσχέτισαν θετικά την παρουσία πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που δεσμεύτηκαν στη διαφανή ζώνη. Η ίδια ομάδα θεώρησε ότι η δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια της διαφανούς ζώνης ενδεχομένως να διευκολύνεται από την παρουσία δεσμευμένου σε αυτήν t-PA. Η προσθήκη t-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης ενδεχομένως οδηγεί σε δέσμευσή του από πρωτεΐνες της διαφανούς ζώνης και σε μεταβολή των ιδιοτήτων τους. Παράλληλα, σε ωάρια ποντικού και χοίρου έχει εντοπιστεί η παρουσία πλασμινογόνου τόσο στη μεσοκυττάρια ουσία των COCs, όσο και στη διαφανή ζώνη των ωαρίων (Jimenez-Diaz και συν. 2002, Roldan-Olarte και συν. 2005), γεγονός που θα μπορούσε και στην παρούσα μελέτη να οδηγεί στη δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια της διαφανούς ζώνης. Αποτελέσματα άλλων μελετών (Saling 1981, Beyler και Zaneveld 1982, Benau και Storey 1987, 1988) έδειξαν ότι αδρανοποιοί πρωτεολυτικών ενζύμων του τύπου της θρυψίνης και αδρανοποιοί της πλασμίνης μειώνουν τη δέσμευση των σπερματοζωαρίων στη διαφανή ζώνη και τελικά το ποσοστό γονιμοποίησης. Όλα τα παραπάνω, υποστηρίζουν τη διαπίστωση ότι η προσθήκη t-PA είναι δυνατόν να αυξήσει το ποσοστό γονιμοποίησης.

Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων περιλαμβάνει μια σειρά αλλαγών, οι οποίες θα οδηγήσουν στην αντίδραση του ακροσώματος (Yanagimachi 1994). Στην διαδικασία της ενεργοποίησης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η απομάκρυνση ή η μεταβολή ουσιών που έχουν προσροφηθεί ή ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη κατά την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα ή κατά την επαφή τους με το πλάσμα του σπέρματος (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996). Η απομάκρυνση ή η μεταβολή του προστατευτικού αυτού «στρώματος» από την κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων φαίνεται πως την ευαισθητοποιεί ως προς το ωάριο (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996). Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων έχει αποδοθεί μεταξύ άλλων και σε διάφορες ενζυμικές ουσίες, όπως είναι διάφορες πρωτεϊνάσες, η β-αμυλάση, η β-γλυκουρονιδάση, η καρβονική ανυδράση, οι γλυκοζαμινογλυκάνες κ.λπ. (Yanagimachi 1994, Σμοκοβίτης 1996).

Τα χαμηλά ποσοστά της γονιμοποίησης σε *in vitro* συνθήκες αποδίδονται, εκτός από ένα πλήθος άλλων παραγόντων, και σε παράγοντες προερχόμενους από τα σπερματοζωάρια και πιο συγκεκριμένα στην αδυναμία επιτυχούς ενεργοποίησης ενός

σημαντικού ποσοστού από αυτά (Gordon 1994). Γενικά, πολλά από τα συστατικά του σπερματικού πλάσματος, όπως γλυκοπρωτεΐνες πολυπεπίδια και παρόμοιες της ινοδονεκτίνης πρωτεΐνες (fibronectin-like proteins), φαίνεται πως είναι ισχυρά προσκολλημένα στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων. Αυτή η προσκόλληση είναι τόσο ισχυρή, ώστε ακόμα και επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις δεν οδηγούν σε αποκόλληση των ουσιών αυτών (Yanagimachi 1994). Παράλληλα, *in vitro* μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει ότι σπερματοζωάρια που προέρχονται από την επιδιδυμίδα και επομένως δεν έχουν εκτεθεί στο πλάσμα του σπέρματος, διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα γονιμοποίησης των ωαρίων (Yanagimachi 1994). Ο t-PA, μέσω της δέσμευσής του σε πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, θα μπορούσε να οδηγήσει σε απομάκρυνση πρωτεϊνών από την κυτταρική μεμβράνη και τελικά στη διευκόλυνση και προώθηση της διαδικασίας της ενεργοποίησης, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των γονιμοποιημένων ωαρίων.

Έχει βρεθεί ότι ο t-PA στα νευρικά κύτταρα μπορεί να διαθέτει ιδιότητες διάφορες από την πρωτεολυτική του δράση (Kim και συν. 1999, Siddiq και Tsirka 2004). Έτσι, μπορεί να προκαλεί εξασθένηση της δράσης των δισθενών μεταλλικών ιόντων Zn^{+2} και Fe^{+2} και είναι πολύ πιθανό να διαθέτει ήπιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Kim και συν. 1999, Siddiq και Tsirka 2004). Η παρουσία δισθενών ιόντων μετάλλων, μεταξύ των οποίων Zn^{+2} και Fe^{+2} θεωρείται ότι προκαλεί σταθεροποίηση των μεμβρανών του σπερματοζωαρίου, μείωση της κινητικότητάς του και καθυστέρηση στην έναρξη της ενεργοποίησής του (Aonuma και συν. 1981, Steven και συν. 1982, Andrews και Bavister 1989, Riffo και συν. 1992, Andrews και συν. 1994). Μεταξύ των βιολογικών λειτουργιών των μετάλλων αυτών συγκαταλέγονται η αναστολή της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων, η μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου από αυτά και γενικότερα η διατήρηση μειωμένης κινητικότητας μέχρι τα σπερματοζωάρια να φτάσουν στο κατάλληλο σημείο όπου θα ενεργοποιηθούν (Riffo και συν. 1992, Andrews και συν. 1994, Gordon 1994).

Στα υποστρώματα της *in vitro* ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων και της γονιμοποίησης υπάρχουν ουσίες, όπως η αλβουμίνη, που εμποδίζουν την ανασταλτική επίδραση των μεταλλικών ιόντων και ειδικά του Zn^{+2} στην κινητικότητα και στην ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Foresta και συν. 1990, Gordon 1994). Δεν

υπάρχουν όμως δεδομένα για το εάν οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται μπορούν να αναστείλουν συνολικά τη δράση των δισθενών μεταλλικών ιόντων. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, πιστεύεται, ότι για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων απαιτείται ένα «ήπιο» οξειδωτικό στρες (Aitken και συν. 1998α, 1998β). Η έκθεση, όμως, των γαμετών σε συνθήκες «υψηλού» οξειδωτικού στρες, κατά τους χειρισμούς στο εργαστήριο και κατά την επώασή τους, είναι δυνατόν να επηρεάσει αρνητικά τη γονιμοποίηση (Kitagawa και συν. 2004). Μάλιστα αυτό μπορεί να συμβαίνει παρόλο που οι γαμέτες διαθέτουν ενδοκυτταρικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και λαμβάνεται μέριμνα ώστε τα υποστρώματα να περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το ερυθρό της φαινόλης, το HEPES, η αλβουμίνη ανθρώπινης ή βόειας προέλευσης (Ermilov και συν. 1999) και το πυροσταφυλικό οξύ σε συνδυασμό ή όχι με γαλακτικό οξύ (de Lamirande και Gagnon 1992). Λαμβάνοντας υπόψη αυτά σε συνδυασμό με την παράλληλη δράση του t-PA ως μέλους του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, ο t-PA θα μπορούσε να ενισχύσει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, να οδηγήσει στην ενεργοποίηση μεγαλύτερου ποσοστού αυτών και να μειώσει το οξειδωτικό στρες που υφίστανται οι δύο γαμέτες. Επομένως, η πολυδιάστατη δραστηριότητα του t-PA είναι πιθανό να συνέβαλε στην αύξηση του ποσοστού της γονιμοποίησης, που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με την προσθήκη πλασμίνης

Η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης δεν οδήγησε σε σημαντική διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το μάρτυρα. Φαίνεται ότι η πλασμίνη του υγρού περιβάλλοντος της IVF δεν δρα άμεσα στη διαδικασία της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων και επομένως δεν παρέχει τη δυνατότητα σημαντικής αύξησης του ποσοστού της γονιμοποίησης, μέσω της αύξησης του ποσοστού των ενεργοποιημένων σπερματοζωαρίων. Όμως, η προσθήκη t-PA στο υπόστρωμα της IVF, που πιθανώς οδηγεί στη δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, των σπερματοζωαρίων και της διαφανούς ζώνης (μέσω της δέσμευσης του t-PA σε πρωτεΐνες), φαίνεται πως αποτελεί σημαντική παράμετρο στον τρόπο δράσης της πλασμίνης και τελικά, στη διαφοροποίηση των ποσοστών γονιμοποίησης. Μολοταύτα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης, η οποία ενδεχομένως

οφειλόταν στην ικανότητα της πλασμίνης να επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και να προκαλεί αντίδραση του ακροσώματος σε ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια (Taitzoglou και συν. 2003, 2004). Στην περίπτωση αυτή, η πλασμίνη είναι λογικό να οδηγεί σε μικρή αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης εξαιτίας της ενίσχυσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και ίσως της πυροδότησης της αντίδρασης του ακροσώματος.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με την προσθήκη ε-ACA

Η προσθήκη του ε-ACA οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού της γονιμοποίησης και της επακόλουθης ανάπτυξης των εμβρύων, παρέχοντας έτσι μια έμμεση επιβεβαίωση, ότι το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη και συνολικά η πρωτεόλυση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της γονιμοποίησης. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την θεωρία των Huarte και συν. (1993), σύμφωνα με την οποία η αναστολή δράσης του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη οδηγεί σε μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης.

Είναι γνωστό ότι συστατικά του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη μπορούν να δεσμευθούν σε κυτταρικές μεμβράνες και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Vassalli και συν. 1991). Επομένως, η δράση του ε-ACA μπορεί να οφείλεται στην ανταγωνιστική δέσμευσή του από υποδοχείς στη διαφανή ζώνη και από παρεμπόδιση της μετατροπής του Glu- σε Lys- πλασμινογόνο το οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί ταχύτερα. Ακόμη, το ε-ACA θα μπορούσε να δράσει και μέσω της παρεμπόδισης της διαδικασίας ενεργοποίησης σπερματοζωαρίων που συνεχίζεται στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης με την εμπλοκή του σε μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν. Μέσω αυτών των οδών, το ε-ACA θα μπορούσε να ανταγωνιστεί ή/και να καθυστερήσει τη δημιουργία πλασμίνης, ενώ θα μπορούσε και να αναστείλει απευθείας τη δράση της (Prentice 1980, Diaz και συν. 2006). Οι Huarte και συν. (1993) απέδειξαν ότι η παρουσία πλασμίνης στο υπόστρωμα γονιμοποίησης αύξανε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που δεσμεύονταν στη διαφανή ζώνη. Επίσης, άλλοι ερευνητές (Saling 1981, Beyler και Zaneveld 1982, Benau και Storey 1987, 1988) ανέφεραν ότι αδρανοποιεί πρωτεολυτικών ενζύμων του τύπου της θρυψίνης και αδρανοποιεί της

πλασμίνης μειώνουν τη δέσμευση του σπέρματος στη διαφανή ζώνη και τελικά την γονιμοποίηση. Σε *in vivo* συνθήκες, τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν μειωμένη κινητικότητα και αναστολή της αντίδρασης του ακροσώματος στον ισθμό του ωαγωγού (Suarez και συν. 1990, Harper, 1994), όπου ο κυριότερος αδρανοποιός των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου, ο PAI-1 εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα (Kouba και συν. 2000α). Έτσι, είναι πιθανόν η δραστηριότητα της πλασμίνης σε αυτή την περιοχή του ωαγωγού να μειώνεται. Στον ωαγωγό των βοοειδών έχει επίσης ανιχνευθεί δραστηριότητα του PAI-1 (Gabler και συν. 2001) και σε *in vitro* συνθήκες η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ήταν χαμηλότερη όταν έγινε επώασή τους σε προερχόμενο από τον ισθμό υγρό του ωαγωγού σε σχέση με αυτό της ληκύθου.

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν τόσο τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει η αδρανοποίηση του ενζυμικού συστήματος στο ποσοστό της γονιμοποίησης όσο και ένα πιθανό τρόπο δράσης του ε-ACA. Στα παραπάνω ίσως θα έπρεπε να προστεθεί και η πιθανή δράση του ε-ACA στη μετακίνηση των ιόντων ασβεστίου μέσω της αδρανοποίησης της πλασμίνης. Η πλασμίνη θεωρείται πως ενεργοποιεί βιοχημικές οδούς συνδεδεμένες με την αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών σε Ca^{2+} (Penny και Ware 1992) και *in vitro* πυροδοτεί την αντίδραση του ακροσώματος σε ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια τούρου (Taitzoglou και συν. 2004). Είναι γνωστό ότι κάθε παράγοντας που αυξάνει άμεσα ή έμμεσα τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ενός σπερματοζωαρίου στην περιοχή του ακροσώματος μπορεί να πυροδοτήσει την αντίδραση του ακροσώματος (Yanagimachi 1994). Επίσης, έχει υποστηριχθεί ότι αλλαγές στην cAMP αλλά και μεταβολές σε ενδοκυτταρικά ιόντα (π.χ Ca^{2+}) μπορούν να επηρεάσουν και την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και την κινητικότητά τους (Yanagimachi 1994). Έτσι, το ε-ACA αδρανοποιώντας την πλασμίνη πιθανόν καθυστερεί τις διαδικασίες αυτές που καθιστούν το σπερματοζωάριο ικανό για γονιμοποίηση. Το γεγονός ότι το ε-ACA απλά μειώνει και δεν εξαλείφει το ποσοστό γονιμοποίησης μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη και άλλων μηχανισμών που πυροδοτούν την ενεργοποίηση και την αντίδραση του ακροσώματος στα σπερματοζωάρια, ενώ δεν πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα η συγκέντρωση που επιλέχθηκε στον συγκεκριμένο πειραματισμό να μην ήταν επαρκής για να προκαλέσει κάτι τέτοιο.

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η καθυστέρηση στην ανάπτυξη των εμβρύων που παρατηρήθηκε με την προσθήκη του ε-ACA στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης. Υποστηρίζεται ότι κατά τη συγχώνευση των κυτταρικών μεμβρανών σπερματοζωαρίου-ωαρίου, ενεργοποιούνται οι διάλυτοι ιόντων Ca^{+2} της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου, με επακόλουθη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των Ca^{+2} και ενεργοποίηση του ωαρίου (Yanagimachi 1994). Έχει βρεθεί ότι ένα πλήθος παραγόντων μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του ωαρίου και όλοι τους προκαλούν ενδοκυτταρική αύξηση των Ca^{+2} (Yanagimachi 1994). Παρότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, μέσω της αδρανοποίησης της πλασμίνης, το ε-ACA μπορεί να επηρεάζει την αντλία ιόντων Ca^{+2} και με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση βιοχημικών μονοπατιών, που προάγουν την επακόλουθη γονιμοποίηση και ανάπτυξη των εμβρύων. Είναι, λοιπόν, πιθανό η προσθήκη ε-ACA στο υπόστρωμα να οδηγεί σε επιβράδυνση στην πυροδότηση της ενεργοποίησης του ωαρίου κατά την συγχώνευση των δύο γαμετών. Η αντιγραφή του DNA των δύο προπυρήνων αρχίζει 14-15 ώρες μετά την έναρξη της συνεπώσεως των γαμετών και διαρκεί για 8-10 ώρες (Laurincik και συν. 1998). Έτσι, η ανασταλτική επίδραση του ε-ACA ενδέχεται να αντιστρέφεται μετά από τη μεταφορά των ωαρίων στο τυποποιημένο υπόστρωμα της IVC, αλλά η προκληθείσα καθυστέρηση τόσο στην ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής και της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης, όσο και στην επακόλουθη εμβρυική ανάπτυξη παραμένουν εμφανείς.

4.4 Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης/καλλιέργειας των εμβρύων

Η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων δεν οδήγησε σε διαφοροποίηση στο ποσοστό των αναπτυγμένων εμβρύων σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα, η προσθήκη u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των ανεπτυγμένων εμβρύων. Η προσθήκη t-PA ή πλασμίνης στο υπόστρωμα της καλλιέργειας δεν οδήγησε σε διαφοροποιήσεις στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση, όμως, της τροποποίησης του υποστρώματος της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων με την προσθήκη πλασμίνης υπήρχε μια αξιοσημείωτη αλλά όχι στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων. Η

τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη ε-ACA είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των εμβρύων.

Η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη έχει διαπιστωθεί στην ανάπτυξη των εμβρύων διαφόρων ζωικών ειδών αλλά παρόλα αυτά ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Η παρουσία ή/και η δραστηριότητά του έχει επιβεβαιωθεί σε γονιμοποιημένα ωάρια και έμβρυα 2 κυττάρων έως και στην εκκολαφθείσα βλαστοκύστη (Menino και συν. 1989, Dyk και Menino 1991, Berg και Menino 1992, Zhang και συν. 1992, 1994, Bartlett και Menino 1993, Carroll και συν. 1993, Whiteside και συν. 2001). Το σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία εγκατάστασης του εμβρύου στη μήτρα (Strickland και συν. 1976, Loskutoff και συν. 1989, Sappino και συν. 1989, Kruithof 1990, Zhang και συν. 1994, Aflalo και συν. 2005). Στα βοοειδή, ειδικότερα, η διάταση της κοιλότητας και η εκκόλαψη της βλαστοκύστης, φαίνεται ότι επηρεάζονται από την παρουσία παραγόντων του συστήματος αυτού (Menino και Williams 1987). Σε *in vitro* συνθήκες, έμβρυα βοοειδών με μειωμένη παραγωγή ενεργοποιών του πλασμινογόνου δεν κατέστη δυνατό να εκκολαφθούν (Kaaekuahiwi και Menino 1990). Στον ωαγωγό των βοοειδών, όπου και αναπτύσσεται το πρώιμο έμβρυο έχει αναφερθεί η δραστηριότητα κυρίως u-PA αλλά και t-PA (Gabler και συν. 2001).

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης των εμβρύων με την προσθήκη πλασμινογόνου

Η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων δεν οδήγησε σε διαφοροποίηση στο ποσοστό ανάπτυξης των εμβρύων σε σχέση με το μάρτυρα. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας των εμβρύων, γεγονός που καθιστά πιθανό έναν εξαιρετικά περιορισμένο ρυθμό ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου εμφανίζεται αυξημένη στο υπόστρωμα της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων μετά από τις πρώτες 48 ώρες (Whiteside και συν. 2001), δηλαδή σε χρόνο, ο οποίος δεν αξιολογήθηκε στην

παρούσα μελέτη. Παρόλα αυτά, η παρουσία πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της εξέλιξης των εμβρύων έχει συσχετιστεί θετικά με την ανάπτυξή τους, τον αριθμό των κυττάρων τους, τη διάταση και την εκκόλαψη της βλαστοκύστης σε καλλιέργειες εμβρύων κουνελιών (Grobner και Menino 1994), προβάτων (Menino και συν. 1989) και βοοειδών (Menino και Williams 1987). Πιθανόν, λοιπόν, θα ήταν χρήσιμη η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας πλασμινογόνου σε μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης των εμβρύων.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης των εμβρύων με την προσθήκη u-PA

Ο u-PA στην παρούσα μελέτη επηρέασε θετικά την ανάπτυξη των εμβρύων σε σχέση τόσο με το μάρτυρα όσο και με τις υπόλοιπες τροποποιήσεις των υποστρωμάτων. Όπως είναι γνωστό, η εμβρυογένεση αποτελεί ένα φαινόμενο, που συνδέεται με εκτεταμένη αναδιάρθρωση ιστών και με κυτταρική μετανάστευση. Στο φυσιολογικό αυτό φαινόμενο τοπικής και ελεγχόμενης διάβρωσης της μεσοκυττάριας ουσίας συμμετέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Σε *in vitro* καλλιέργειες εμβρύων αρουραίου έχει παρατηρηθεί μικρότερη δραστηριότητα u-PA από τα έμβρυα μετά το στάδιο των 4 κυττάρων σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται *in vivo* (Aflalo και συν. 2004, 2005). Αυτό πιθανόν οφείλεται στη μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα έμβρυα αυτά (Krisher και συν. 1999). Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα έμβρυα βοοειδών παράγουν u-PA από τα πρώτα στάδια (2-4 κύτταρα) της ανάπτυξής τους (Whiteside και συν. 2001). Η θετική επίδραση της παρουσίας u-PA στο υπόστρωμα της ανάπτυξης των εμβρύων θα μπορούσε να συνδεθεί με τη δέσμευσή του από υποδοχείς (uPAR) στην κυτταρική μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων. Η δέσμευση αυτή, ενδεχομένως, οδηγεί σε αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων και στα σημεία επαφής τους με τη μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία. Η διαδικασία αυτή μπορεί, επίσης, να προκαλέσει αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας λόγω της αυξημένης δραστηριότητας των ενζύμων σε συγκεκριμένα σημεία, ενώ παράλληλα, η δέσμευση του u-PA σε υποδοχείς του θα οδηγούσε στην ενεργοποίηση διαφόρων βιοχημικών οδών (Ossowski 1988, Ossowski και συν. 1991). Ο u-PA, που προστίθεται στο υπόστρωμα, μπορεί να οδηγήσει σε ευκολότερη διείσδυσή του στο διογκωμένο (μετά την ωρίμανση) και «πυκνό» σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου και τελικά στην εντοπισμένη ενζυμική δραστηριότητα στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων και στη διαφανή ζώνη

του εμβρύου. Έτσι, η διασπορά του u-PA και οι όποιες επιδράσεις του είναι σαφώς πιο εκτεταμένες. Ο παραπάνω τρόπος δράσης του u-PA αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη αιτία διαφοροποίησης των αποτελεσμάτων στην εξέλιξη των εμβρύων σε σχέση με την πλασμίνη.

Ακόμη, ο u-PA μπορεί να δεσμεύεται από το πλασμινογόνο που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες των κοκκωδών κυττάρων και στη διαφανή ζώνη των εμβρύων (Vassalli και συν. 1991, Carroll και συν. 1993, Roldan-Olarte και συν. 2005) και να δημιουργείται πλασμίνη, δεδομένου ότι η χρήση στρεπτοκινάσης είχε ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του δεσμευμένου στη διαφανή ζώνη πλασμινογόνου σε πλασμίνη (Jimenez-Diaz και συν. 2002). Τόσο η δέσμευση του u-PA στον υποδοχέα του, όσο και η δέσμευσή του στο πλασμινογόνο θα είχαν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων και στη διαφανή ζώνη των εμβρύων με πολύ ταχύτερο ρυθμό και με δυνατότητα προστασίας από τους αδρανοποιούς της (Vassalli και συν. 1991).

Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, δεν είναι δυνατό να αγνοηθούν η παρουσία των κοκκωδών κυττάρων, καθώς και η προσθήκη ορού αίματος στο υπόστρωμα της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων. Τα κοκκώδη κύτταρα φέρουν υποδοχείς γοναδοτρόπων και στεροειδών ορμονών και διατηρούν την ικανότητα βιοσύνθεσης στεροειδών, όταν καλλιεργούνται, *in vitro*, σε υποστρώματα που περιέχουν ορό αίματος (Hsueh και συν. 1984). Επίσης, θεωρείται ότι αποτελούν σημαντική πηγή αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF- β (Kim και Schomberg 1989) και οι IGFs (Gordon 1994). Παράλληλα, είναι γνωστή η ικανότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και του συστήματος των MMPs να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων (π.χ. insulin-like growth factors, IGFs) (Whiteside και συν. 2001). Στη βιοδιαθεσιμότητα των IGFs συμβάλλουν οι δεσμευτικές πρωτεΐνες των IGF (IGFs binding proteins, IGFBPs), αφού η δέσμευσή τους στους IGFs οδηγεί σε μείωση της βιοδιαθεσιμότητάς των τελευταίων. Η πρωτεόλυση των IGFBPs έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των IGFs. Η πρωτεόλυση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη του u-PA μέσω της δημιουργίας πλασμίνης, η οποία έχει δειχθεί ότι μπορεί να αποδομήσει IGFBPs (Lalou και συν. 1994). Επίσης, ο u-PA έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί *in vivo* την ανενεργή μορφή της πρωτεΐνάσης MMP-9 του συστήματος των

MMPs (Behrendtsen και συν. 1992, Kleiner και Stetler-Stevenson 1993). Η πρωτεΐνάση αυτή έχει τη δυνατότητα να αποδομεί IGFPs (Manes και συν. 1999), έχει βρεθεί δε ότι εκκρίνεται από έμβρυα βοοειδών (Whiteside και συν. 2001). Έτσι, η προσθήκη του u-PA μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας των IGFs, μέσω συνδεδεμένων με την πλασμίνη ή αυτόνομων πρωτεολυτικών διεργασιών. Η παρουσία IGFs στο περιβάλλον της εξέλιξης των εμβρύων θεωρείται ότι μπορεί να ενισχύσει τη σύνθεση πρωτεϊνών από το έμβρυο και να διεγείρει το ρυθμό των κυτταρικών διαιρέσεων και την επακόλουθη εμβρυική ανάπτυξη (Gordon 1994).

Ο TGF-β παράγεται ως αδρανής αυξητικός παράγοντας και απαιτείται η δράση της πλασμίνης και του u-PA για την ενεργοποίησή του (Lyons και συν. 1988, Sato και Rifkin 1989, Annes και συν. 2003). Επίσης, θεωρείται πως κύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν τον u-PAR δεν είναι ικανά να παράγουν TGF-β (Rifkin 1997). Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση της παρουσίας του υποδοχέα του u-PA στα κοκκώδη κύτταρα. Η αδρανής μορφή του TGF-β είναι δυνατόν να εντοπιστεί τόσο στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία όσο και στην επιφάνεια των κυττάρων (Rifkin 1997). Η ενεργοποίηση του TGF-β μπορεί να γίνει απευθείας από την πλασμίνη ή εμμέσως και στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω της δέσμευσης του u-PA στον υποδοχέα του (Odekon και συν. 1994). Η δημιουργία πλασμίνης στην επιφάνεια των κυττάρου συμβαίνει με πολύ ταχύτερο ρυθμό και παρέχει τη δυνατότητα προστασίας από τους αδρανοποιητές της (Vassalli και συν. 1991), οι οποίοι θα ήταν δυνατόν να αποτρέψουν την ενεργοποίηση του TGF-β (Rifkin 1997).

Οι Herbert και Carmeliet (1998) επιβεβαίωσαν τη σημασία του u-PA στην ενεργοποίηση του TGF-β, αφού σε καλλιέργειες μυικών κυττάρων από ποντικούς με ανεπάρκεια σύνθεσης u-PA (u-PA deficient SMC), ήταν αδύνατη η ενεργοποίηση των αδρανών μορφών του TGF-β. Έτσι, η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων με την προσθήκη u-PA είναι δυνατόν να οδηγήσει στην δημιουργία πλασμίνης στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ή εναλλακτικά μέσω της δέσμευσης του u-PA στον υποδοχέα του, στην επιφάνεια των κυττάρων. Από τα παραπάνω φαίνεται πως η δέσμευση του u-PA στην επιφάνεια των κυττάρων αποτελεί σημαντική παράμετρο στην ενεργοποίηση των αδρανών μορφών του TGF-β. Στο γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται και η διαφοροποίηση που παρατηρείται σε σχέση με την

προσθήκη πλασμίνης. Η ενεργοποίηση και η παρουσία αυξητικών παραγόντων στο υπόστρωμα της *in vitro* ανάπτυξης των εμβρύων οδηγεί σε βελτίωση της εμβρυικής ανάπτυξης ειδικά στα πρώτα στάδια ακόμα και πριν την έναρξη ενεργοποίησης του εμβρυικού γονιδιώματος (4-8 κύτταρα) (Gordon 1994). Παράλληλα, με την επίδραση αυξητικών παραγόντων φαίνεται πως ενισχύεται η ανάπτυξη των εμβρύων κατώτερης ποιότητας, γεγονός ενδεχομένως, πολύ σημαντικό για το τελικό αποτέλεσμα της IVC (Gordon 1994).

Λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα προερχόμενα από νεοπλασματικά κύτταρα (Ossowski 1988, Ossowski και συν. 1991, Ossowski και Aguirre-Ghiso 2000) ο u-PA φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κυτταρική μετανάστευση (Herbert και Carmeliet 1998). Συνδυάζοντας τα παραπάνω, η παρουσία του u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων μέσω της δημιουργίας πλασμίνης ή/και ανεξάρτητα από αυτή θα μπορούσε να ενεργοποιήσει παράγοντες του συστήματος των MMPs, αυξητικούς παράγοντες, πρωτεολυτικές διαδικασίες αλλά και διαδικασίες κυτταρικής μετανάστευσης και τελικά να προάγει σε καθοριστικό βαθμό την εμβρυική ανάπτυξη.

Με βάση στοιχεία για τη δίοδο του πλασμινογόνου, αλλά όχι και της πλασμίνης, μέσω της διαφανούς ζώνης (Carroll και συν. 1993, Jimenez-Diaz και συν. 2002, Roldan-Olarte και συν. 2005) δεν πρέπει να αποκλειστεί πιθανή δίοδος του u-PA μέσω της διαφανούς ζώνης του εμβρύου, παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν κάτι τέτοιο. Η προσθήκη u-PA, είτε άμεσα είτε μέσω της περαιτέρω ενεργοποίησης βιοχημικών οδών (signalling pathways) (Gordon 1994, Ossowski και Aguirre-Ghiso 2000), φαίνεται πως τελικά θα μπορούσε να ενισχύσει την ανάπτυξη των εμβρύων πέραν του σταδίου των 4 κυττάρων, να προκαλέσει την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος που είναι απαραίτητο να συμβεί μεταξύ του σταδίου των 4 και 8 κυττάρων και τελικά να διεγείρει την μεταβολική του δραστηριότητα (Gordon 1994). Κατά την διαίρεση των εμβρυικών κυττάρων η διάμεση ουσία βρίσκεται σε συνεχή αναδιοργάνωση. Η έγκαιρη ενεργοποίηση της έκκρισης των ενεργοποιών από το έμβρυο ή ακόμα και η δίοδος του u-PA μέσω της διαφανούς ζώνης, θα ήταν δυνατόν να συνδεθούν με τη διευκόλυνση αυτής της διαδικασίας και τελικά με την προώθηση της εμβρυικής ανάπτυξης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται εάν ληφθούν

υπόψη οι ομοιότητες στην ανάπτυξη των εμβρύων και των νεοπλασμάτων (Strickland και συν. 1976, Fazleabas και συν. 1983, Ossowski 1988, Kaaekuahiwi και Menino 1990, Ossowski και συν. 1991).

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης των εμβρύων με την προσθήκη t-PA

Η τροποποίηση του υποστρώματος της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων με την προσθήκη tPA δεν οδήγησε σε διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων από τον μάρτυρα. Κάτι τέτοιο, πιθανόν οφείλεται στις διαφορετικές λειτουργίες που φαίνεται πως επιτελούν οι δύο ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (Herbert και Carmeliet 1998) και κυρίως στην παρουσία του u-PAR στις κυτταρικές μεμβράνες των κοκκωδών κυττάρων, η οποία και τελικά διευκολύνει και ενισχύει την δραστηριότητα αλλά και την διασπορά του u-PA. Βέβαια, η μετατροπή ποσοτήτων πλασμινογόνου σε πλασμίνη αναπόφευκτα πραγματοποιείται και σε αυτή την περίπτωση και είναι λογικό επίσης να ενεργοποιούνται αυξητικοί παράγοντες μέσω της πλασμίνης. Όμως, κάτι τέτοιο φαίνεται ότι συμβαίνει σε σημαντικό μικρότερο βαθμό και κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των COCs. Ο TGF- β είναι δυνατόν να διεγείρει την έκφραση του PAI-1 αλλά και αδρανοποιών των MMPs από τα κοκκώδη κύτταρα και να εμποδίζει την έκφραση του u-PA και των MMPs (Rifkin 1997). Κάτι τέτοιο, θα είχε ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του t-PA, γεγονός που θα μπορούσε να ενισχύεται και από την προσθήκη ορού στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, στον οποίο έχει διαπιστωθεί κυρίως δραστηριότητα των PAIs (Collen 1980, Dano και συν. 1985, Saksela 1985, Σμοκοβίτης 1996). Επίσης, η παρουσία μη δεσμευμένης πλασμίνης θα οδηγούσε σε ευκολότερη αδρανοποίησή της από τους αδρανοποιούς της. Το γεγονός αυτό φαίνεται να μην επηρέασε το αποτέλεσμα από την προσθήκη u-PA στο υπόστρωμα της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων, διότι ο u-PA, ενδεχομένως, δεσμεύθηκε από τους υποδοχείς του και υπήρξε πολύ ταχύτερη δημιουργία πλασμίνης προστατευμένης από αδρανοποιούς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η δεσμευμένη πλασμίνη, σε συνδυασμό με την ελεύθερη, θα μπορούσε να οδηγήσει σε απελευθέρωση του βασικού ινοβλαστικού παράγοντα (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) ή παρόμοιων παραγόντων από την εξωκυττάρια ουσία και την επιφάνεια των κυττάρων. Ο bFGF διεγείρει την δραστηριότητα του u-PA (Herbert και Carmeliet 1998) γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εξισορρόπηση των πρωτεολυτικών

διεργασιών. Παράλληλα, η ταχύτερη και μόνο δημιουργία πλασμίνης, η σημαντικότερη συμβολή του u-PA στην ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων, η ενεργοποίηση του TGF- β στα αρχικά στάδια *in vitro* καλλιέργειας κυττάρων (Sato και συν. 1990) και γενικότερα οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης, που προαναφέρθηκαν, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων της παρουσίας των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου στην *in vitro* ανάπτυξη των εμβρύων.

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης των εμβρύων με την προσθήκη πλασμίνης

Η απουσία στατιστικώς σημαντικής επίδρασης της πλασμίνης στην ανάπτυξη των εμβρύων θα μπορούσε να οφείλεται, πέραν της παρουσίας υποδοχέων u-PA, στην εντοπισμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα στην επιφάνεια των κυττάρων και στη δυνατότητα αδρανοποίησης της πλασμίνης που δεν είναι δεσμευμένη. Παρόλα αυτά, δεν πρέπει να αγνοηθεί η θετική τάση στην ανάπτυξη των εμβρύων που παρατηρήθηκε από την προσθήκη πλασμίνης. Κρίνεται πως θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή δράση της σε μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης των εμβρύων και κυρίως στην ικανότητα εκκόλαψης των βλαστοκύστεων, καθώς και στη διαφανή ζώνη των εμβρύων, μιας και προγενέστερες μελέτες υποστηρίζουν το θετικό ρόλο της πλασμίνης στις παραπάνω διαδικασίες (Menino και Williams 1987, Kaaekuahiwi και Menino 1990, Coates και Menino 1994, Cannon και Menino 1998, Whiteside και συν. 2001).

• Τροποποίηση του υποστρώματος της ανάπτυξης των εμβρύων με την προσθήκη ε-ACA

Στην περίπτωση της τροποποίησης του υποστρώματος της *in vitro* εξέλιξης των εμβρύων με την προσθήκη ε-ACA, διαπιστώθηκε σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των εμβρύων σε σχέση με το μάρτυρα. Το ε-ACA οδηγεί σε συνολική αδρανοποίηση του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης και κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να οδηγήσει σε παρεμπόδιση της ενεργοποίησης αυξητικών παραγόντων, καθώς και σε αναστολή της έκκρισής τους από τα κύτταρα. Σε *in vitro* συγκαλλιέργειες ενδοθηλιακών και μυικών κυττάρων, η προσθήκη αδρανοποιών της πλασμίνης, απροτινίνης (αναστολέας του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης) και άλλων παραγόντων που αναστέλλουν τη

δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης οδήγησε σε αναστολή της δημιουργίας TGF-β από τα κύτταρα (Rifkin 1997). Έτσι, το ε-ACA μπορεί να επηρεάσει πρωτεολυτικές διεργασίες, καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων και να οδηγήσει στην καθυστέρηση και στην αναστολή ανάπτυξης των εμβρύων μετά το στάδιο των 4 κυττάρων. Στο μέλλον θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν η επίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή μετά από απομάκρυνση του ε-ACA, αφού η συντριπτική πλειοψηφία του μικρού ποσοστού εμβρύων που αναπτύχθηκαν βρισκόταν στο κρίσιμο στάδιο των 4-8 κυττάρων, όπου ξεκινά η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος και αυξάνεται η μεταβολική δραστηριότητα του εμβρύου. Κάτι τέτοιο, θα παρείχε σημαντικά στοιχεία για την σημασία του ενζυμικού συστήματος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-πλασμίνης στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου.

Γενικά συμπεράσματα της μελέτης

Τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης συνοψίζονται στα παρακάτω:

- 1) Η δραστηριότητα του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη στα τυποποιημένα υποστρώματα της IVP είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν που ανιχνεύεται στο ωοθυλακικό υγρό, γεγονός που ενδέχεται να έχει επιπτώσεις στις αποδόσεις τις *in vitro* παραγωγής εμβρύων.
- 2) Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου είναι σημαντικά αυξημένη στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο των βοοειδών σε σχέση με το κυρίαρχο ωοθυλάκιο της μέσης του κύκλου. Αυτή η αύξηση της δραστηριότητας των PAs στο προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο αποτελεί ισχυρή ένδειξη της συμμετοχής του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, στη διαμόρφωση του περιβάλλοντος και στις διαδικασίες της ωρίμανσης του ωαρίου που προορίζεται για γονιμοποίηση *in vivo*.
- 3) Η αδρανοποίηση, με τη χρήση ε-ACA, του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη στα υποστρώματα της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των ποσοστών ωρίμανσης και γονιμοποίησης των ωαρίων αλλά και ανάπτυξης των εμβρύων. Έτσι, ισχυροποιείται η υπόθεση ότι το ενζυμικό σύστημα ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της IVP.
- 4) Η τροποποίηση των υποστρωμάτων της IVM, IVF και IVC με την προσθήκη παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη οδηγεί σε βελτίωση των αποδόσεων της IVP και η επίδραση αυτή σε κάθε στάδιο της IVP συσχετίζεται με διαφορετικό παράγοντα του ενζυμικού συστήματος.
- 5) Η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της IVM θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ώστε να επιτευχθεί μείωση του απαιτούμενου χρόνου ωρίμανσης

- των ωαρίων με ποσοστά γονιμοποίησης σημαντικά υψηλότερα από αυτά του αντίστοιχου μάρτυρα, που δεν υπολείπονται και από αυτά του μάρτυρα της 24ωρης IVM.
- 6) Η προσθήκη t-PA στο υπόστρωμα της IVF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην βελτίωση των ποσοστών της *in vitro* γονιμοποίησης.
 - 7) Η προσθήκη u-PA στο υπόστρωμα της IVC θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των αναπτυγμένων εμβρύων σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η IVP στα βοοειδή, παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί στις τεχνικές και στα μέσα που χρησιμοποιούνται στα διάφορα εργαστήρια, επιδέχεται βελτίωση. Η χρησιμοποίηση παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική παράμετρο στην προσπάθεια βελτίωσης των υποστρωμάτων και τελικά των αποδόσεων της IVP, πολύ περισσότερο αν ληφθεί υπόψη η παρουσία του ενζυμικού συστήματος στις αντίστοιχες *in vivo* συνθήκες.

Προοπτικές της έρευνας

Η παρούσα μελέτη ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω μελέτες, σε σχέση με την επίδραση των παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη στην απόδοση σε έμβρυα και τη βιωσιμότητα αυτών μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Παράλληλα, η μεταφορά των παραγόμενων εμβρύων σε ζώα δέκτες και η εκτίμηση των ποσοστών των υγιών μοσχαριών που θα γεννηθούν, θα αποτελέσουν το τελικό κριτήριο ώστε οι παράγοντες αυτοί να καθιερωθούν ως συστατικά των τυποποιημένων υποστρωμάτων.

Παράλληλα, η προσθήκη των παραγόντων του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιεί του πλασμινογόνου-πλασμίνη, σε διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα εργαστήρια αλλά και στα διαφορετικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται [με την χρήση ή όχι βοηθητικών κυττάρων (π.χ κοκκώδη) αλλά και ορού],

είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα, που αφορούν τη συμμετοχή αλλά και τη λειτουργία του ενζυμικού συστήματος στις διαδικασίες της ωρίμανσης της γονιμοποίησης αλλά και της ανάπτυξης των εμβρύων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βαϊνάς Ε, Βαφειάδης Δ, Μπόσκος Κ, Τσακάλωφ Π, 1994: In vitro ωρίμανση και γονιμοποίηση ωαρίων αγελάδας και καλλιέργεια ζυγωτού. Δελτίον Ελλην. Κτην. Εταιρείας 45 31-36.

Μιχαήλ Σ, 1996: Ιστολογία, Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Ρέκκας ΚΑ, 1992: Παράγοντες που επηρεάζουν τη Δραστηριότητα των Ενεργοποιών του Πλασμινογόνου, των Αδρανοποιών των Ενεργοποιών του Πλασμινογόνου και των Αδρανοποιών της Πλασμίνης στα Σπερματοζώρια και στο Πλάσμα του Σπέρματος του Κριού. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Σμοκοβίτης Α, 1996: Φυσιολογία, Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G, Har-Vardi I, 2004: Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertil Steril* 81 780-785.

Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G, Har-Vardi I, 2005: Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 3 7-15.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS, 1998α: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59 1037-1046.

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS, 1998β: A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 111 645-

656.

al-Hozab A, Menino AR Jr, 1992: Lack of effect of hormones and inducers of intracellular messengers on plasminogen activator production by bovine embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 96 79-90.

Amiridis GS, Robertson L, Reid S, Boyd JS, O'Shaughnessy PJ, Jeffcoate IA, 1999: Plasma estradiol FSH and LH concentration after dominant follicle aspiration in the cow. *Theriogenology* 52 995-1003.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ, 1997: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72 1-22.

Andrews JC, Bavister BD, 1989: Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein-free culture medium. *Gamete Res* 23 159-170.

Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister BD, 1994: Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biol Reprod* 51 1238-1247.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB, 2003: Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116 217-224.

Aonuma S, Okabe M, Kawaguchi M, Kishi Y, 1981: Zinc effects on mouse spermatozoa and in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 63 463-466.

Astedt B, Lecander I, Ny T, 1987: The placental type plasminogen activator inhibitor, PAI-2. *Fibrinolysis* 1 203-208.

Bartlett SE, Menino AR Jr, 1993: Partial characterization of the plasminogen activator produced by ovine embryos in vitro. *Biol Reprod* 49 381-386.

Bavister BD, 1988: Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 33 143-154.

Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummnter T, 1992: Development of in vitro matured in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37 127-146.

Bavister BD, Yanagimachi R, 1977: The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 16 228-237.

Bedard J, Brule S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG, 2003: Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 64 152-165.

Beers WH, 1975: Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6 379-386.

Beers WH, Strickland S, Reich E, 1975: Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell* 6 387-394.

Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z, 1992: Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114 447-456.

Benau DA, Storey BT, 1987: Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 36 282-292.

Benau DA, Storey BT, 1988: Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pellucida. *Biol Reprod* 39 235-244.

Berg DA, Menino AR Jr, 1992: Bovine embryos produce a urokinase-type plasminogen activator. *Mol Reprod Dev* 31 14-19.

Betteridge KJ, 1988: The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 29 155-187.

Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F, 1997: Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 47 13-22.

Beyler SA, Zaneveld LJ, 1982: Inhibition of in-vitro fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *J Reprod Fertil* 66 425-431.

Bicsak TA, Cajander SB, Peng XR, Ny T, LaPolc PS, Lu JK, Kristensen P, Tsafiriri A, Hsueh AJ, 1989: Tissue-type plasminogen activator in rat oocytes: expression during the periovulatory period, after fertilization, and during follicular atresia. *Endocrinology* 124 187-194.

Bicsak TA, Hsueh AJ, 1989: Rat oocyte tissue plasminogen activator is a catalytically efficient enzyme in the absence of fibrin. Endogenous potentiation of enzyme activity. *J Biol Chem* 264 630-634.

Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R, 1998: Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 59 801-806.

Bilodeau S, Fortier MA, Sirard MA, 1993: Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 97 5-11.

Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM, 1981: Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev Biol* 86 189-197.

Bondioli KR, Wright RW, 1983: In vitro fertilization of bovine oocytes by sperm capacitated in vitro. *J Anim Sci* 57 1001-1005.

Brackett BG, Zuelke KA, 1993: Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 39 43-64.

Brown CR, 1983: Purification of mouse sperm acrosin, its activation from proacrosin and effect on homologous egg investments. *J Reprod Fertil* 69 289-295.

Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B, 1998: Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril* 70 821-826.

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ, 1990: Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43 543-547.

Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ, 1997: Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil* 52 285-300.

Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ, 2000: Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* 166 165-179.

Busso N, Huarte J, Vassalli JD, Sappino AP, Belin D, 1989: Plasminogen activators in the mouse mammary gland. Decreased expression during lactation. *J Biol Chem* 264 7455-7457.

Calarco PG, 1995: Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet* 16 36-43.

Canipari R, Epifano O, Siracusa G, Salustri A, 1995: Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Dev Biol* 167 371-378.

Canipari R, O'Connell ML, Meyer G, Strickland S, 1987: Mouse ovarian granulosa cells produce urokinase-type plasminogen activator, whereas the corresponding rat cells produce tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* 105 977-981.

Canipari R, Strickland S, 1985: Plasminogen activator in the rat ovary. Production and gonadotropin regulation of the enzyme in granulosa and thecal cells. *J Biol Chem* 260 5121-5125.

Cannon MJ, Menino AR Jr, 1998: Changes in the bovine zona pellucida induced by plasmin or embryonic plasminogen activator. *Mol Reprod Dev* 51 330-338.

Cao M, Buratini J Jr, Lussier JG, Carriere PD, Price CA, 2006: Expression of protease nexin-1 and plasminogen activators during follicular growth and the periovulatory period in cattle. *Reproduction* *131* 125-137.

Cao M, Sahmi M, Lussier JG, Price CA, 2004: Plasminogen activator and serine protease inhibitor-E2 (protease nexin-1) expression by bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* *71* 887-893.

Carroll PM, Richards WG, Darrow AL, Wells JM, Strickland S, 1993: Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue-plasminogen activator. *Development* *119* 191-198.

Cerinic MM, Generini S, Partsch G, Pignone A, Dini G, Kontinen YT, Del Rosso M, 1998: Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sci* *63* 441-453.

Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ, 1990: Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* *26* 236-247.

Chian RC, Niwa K, Nakahara H, 1992: Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* *96* 73-78.

Chikahisa L, Matsuo K, Yamada Y, 1997: Modulation of tumor cell motility by plasmin. *Invasion Metastasis* *17* 323-333.

Christensen S, Berglund L, Sottrup-Jensen L, 1994: Primary structure of bovine alpha 2-antiplasmin. *FEBS Lett* *343* 223-228.

Chun SY, Popliker M, Reich R, Tsafiriri A, 1992: Localization of preovulatory expression of plasminogen activator inhibitor type-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase type-1 mRNAs in the rat ovary. *Biol Reprod* *47* 245-253.

Coates AA, Menino AR Jr, 1994: Effects of blastocoelic expansion and plasminogen activator activity on hatching and zona pellucida solubility in bovine embryos in vitro. *J Anim Sci* 72 2936-2942.

Colgin DC, Murdoch WJ, 1997: Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Anim Reprod Sci* 47 197-204.

Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL, 1993 α : Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 34 212-223.

Collas P, Sullivan EJ, Barnes FL, 1993 β : Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 34 224-231.

Collen D, 1980: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 43 77-89.

Critser ES, Leibfried ML, First NL, 1984: The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 21 625-631.

D'Alessandris C, Canipari R, Di Giacomo M, Epifano O, Camaioni A, Siracusa G, Salustri A, 2001: Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. *Endocrinology* 142 3033-3040.

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L, 1985: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44 139-266.

Davis JS, Weakland LL, Farese RV, West LA, 1987: Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. *J Biol Chem* 262 8515-8521.

de Lamirande E, Gagnon C, 1992: Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13 379-386.

De Loos F, Kastrop P, Van Maurik P, Van Beneden TH, Kruip TAM, 1991: Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 28 255-259.

Deutinger J, Kirchheimer JC, Reinthaller A, Christ G, Tatra G, Binder BR, 1988: Elevated tissue type plasminogen activator in human granulosa cells correlates with fertilizing capacity. *Hum Reprod* 3 597-599.

Diaz VM, Hurtado M, Kort EJ, Resnati M, Blasi F, Thomson T, Paciucci R, 2006: Requirement of the enzymatic and signaling activities of plasmin for phorbol-ester-induced scattering of colon cancer cells. *Exp Cell Res* 312 2203-2213.

Dominko T, First NL, 1997: Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47 456-467.

Dow MP, Bakke LJ, Cassar CA, Peters MW, Pursley JR, Smith GW, 2002 α : Gonadotrophin surge-induced upregulation of mRNA for plasminogen activator inhibitors 1 and 2 within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Reproduction* 123 711-719.

Dow MP, Bakke LJ, Cassar CA, Peters MW, Pursley JR, Smith GW, 2002 β : Gonadotropin surge-induced up-regulation of the plasminogen activators (tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator) and the urokinase plasminogen activator receptor within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biol Reprod* 66 1413-1421.

Dow MPD, Bavister BD, 1989: Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Res* 23 171-180.

Downs SM, 1995: Control of the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. In: Grudzinskas JG, Yovich JL (eds). *Gametes-The Oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 150-193.

Ducibella T, Duffy P, Buetow J, 1994: Quantification and localization of cortical

granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50 467-473.

Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N, 1999: Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol* 71 130-135.

Duranthon V, Renard JP, 2001: The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55 1277-1289.

Dyk AR, Menino AR Jr, 1991: Electrophoretic characterization of the plasminogen activator produced by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 93 483-489.

Edwards RG, 1974: Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37 189-219.

Ellis V, Behrendt N, Dano K, 1991: Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 266 12752-12758.

Eppig JJ, 1980a: Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod* 22 629-633.

Eppig JJ, 1980b: Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 23 545-552.

Eppig JJ, 1982: The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 89 268-272.

Eppig JJ, 1991: Mammalian oocyte development. In: Hillier SG (ed). *Ovarian Endocrinology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, pp 107-131.

Eppig JJ, 1993: Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In: Adashi EY and Leung PC (eds). *The Ovary*. Raven Press, New York, USA, pp 185-209.

Erikson BH, 1966: Development and senescence of the post natal bovine ovary. *J Anim Sci* 25 800-805.

Ermilov A, Diamond MP, Sacco AG, Dozortsev DD, 1999: Culture media and their

components differ in their ability to scavenge reactive oxygen species in the plasmid relaxation assay. *Fertil Steril* 72 154-157.

Espey LL, Lipner H, 1994: Ovulation. In: Knobil E, Neill JD (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, USA, pp 725–780.

Estreicher A, Wohlwend A, Belin D, Schleuning WD, Vassalli JD, 1989: Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 264 1180-1189.

Fazleabas AT, Geisert RD, Bazer FW, Roberts RM, 1983: Relationship between release of plasminogen activator and estrogen by blastocysts and secretion of plasmin inhibitor by uterine endometrium in the pregnant pig. *Biol Reprod* 29 225-238.

Feng HL, Wen XH, Preser SC, 1996: Effect of different co-culture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 11 1525-1528.

Foresta C, De Carlo E, Zorzi M, Rossato M, Finelli L, 1990: Possible significance of seminal zinc on human spermatozoa functions. *Acta Eur Fertil* 21 305-308.

Fraser LR, 1982: p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 65 185-194.

Gabler C, Killian GJ, Einspanier R, 2001: Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 122 121-130.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G, 2003: Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59 599-616.

Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Bianchi R, Passani L, 1993: Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reprod Dom Anim* 28 189-192.

Gandolfi F, Moor RM, 1987: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 81 23-28.

Gordon I, 1994: Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International: Wallingford, UK.

Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K, 1988: Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 83 753-758.

Gradl E, 1988: In vitro Produktion von Rinderembryonen. Munchen, Diss Med Vet.

Grippio AA, Way AL, Killian GJ, 1995: Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 105 57-64.

Grisart B, Massip A, Dessy F, 1994: Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil* 101 257-264.

Grobner MA, Menino AR Jr, 1994: Plasminogen activator production and enhanced development in medium containing plasminogen or plasmin by rabbit embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 101 467-475.

Gualtieri R, Santella L, Dale B, 1992: Tight junctions and cavitation in the human embryo. *Mol Reprod Dev* 32 81-87.

Guan YM, Carlberg M, Bruse C, Carlstrom K, Bergqvist A, 2002: Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81 389-397.

Gwatkin RB, Williams DT, Hartmann JF, Kniazuk M, 1973: The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *J Reprod Fertil* 32 259-265.

Hagglund AC, Ny A, Leonardsson G, Ny T, 1999: Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology* 140 4351-4358.

Hagglund AC, Ny A, Liu K, Ny T, 1996: Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology* 137 5671-5677.

Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J, 1994: An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269 21191-21197.

Harper MJK, 1994: Gamete and Zygote Transport. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press: New York, USA, pp 123–188.

Hasan S, Hosseini G, Princivalle M, Dong JC, Birsan D, Cagide C, de Agostini AI, 2002: Coordinate expression of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans and serine protease inhibitors in the rat ovary: a potent system of proteolysis control. *Biol Reprod* 66 144-158.

Heeb MJ, Espana F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH, 1987: Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 262 15813-15816.

Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ, 2000: Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53 11-20.

Herbert JM, Carmeliet P, 1998: Urokinase mediates bFGF-induced vascular smooth muscle cell migration under the control of TGF β . *Fibrinolysis Proteol* 12 89-96.

Homa ST, 1988: Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J Exp Zool* 248 222-231.

Homa ST, 1995: Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 40 122-134.

Homa ST, Carroll J, Swann K, 1993: The role of calcium in mammalian oocyte

maturation and egg activation. *Hum Reprod* 8 1274-1281.

Homburg R, Shelef M, 1995: Factors affecting oocyte quality. In: Grudzinkas JG and Yovich JL (eds). *Gametes-The Oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 277- 291.

Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr, 1984: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinol Rev* 5 76-127.

Hu ZY, Liu YX, 1993: Prolactin inhibits gonadotropin-induced increase in ovarian plasminogen activator activity and ovulation in mouse. *Sheng Li Xue Bao* 45 abstract.

Hu ZY, Liu YX, 1995: Effect of prolactin on gonadotropin-induced ovarian estrogen and progesterone production in mouse. *Sheng Li Xue Bao* 47 abstract.

Huarte J, Belin D, Vassalli A, Strickland S, Vassalli JD, 1987: Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev* 1 1201-1211.

Huarte J, Belin D, Vassalli JD, 1985: Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: induction during meiotic maturation. *Cell* 43 551-558.

Huarte J, Vassalli JD, Belin D, Sakkas D, 1993: Involvement of the plasminogen activator/plasmin proteolytic cascade in fertilization. *Dev Biol* 157 539-546.

Hull MGR. 1995: Clinical disorders affecting ovulation and oocyte quality. In: Grudzinkas JG and Yovich JL (eds). *Gametes-The Oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 292-328.

Hyttel P, Callesen H, Greve T, 1986 α : Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil* 76 645-656.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T, 1997: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47 23-32.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T, 1986 β : Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78 615-625.

Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y, 1999: The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56 104-132.

Ishii-Watabe A, Uchida E, Mizuguchi H, Hayakawa T, 2001: Involvement of a calcium-independent pathway in plasmin-induced platelet shape change. *Life Sci* 69 945-960.

Isseroff RR, Rifkin DB, 1983: Plasminogen is present in the basal layer of the epidermis. *J Invest Dermatol* 80 297-299.

Jagiello G, Ducayen MB, Downey R, Jonassen A, 1982: Alterations of mammalian oocyte meiosis I with divalent cations and calmodulin. *Cell Calcium* 3 153-162.

Jaken S, 1996: Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8 168-173.

Jespersen J, 1988: Pathophysiology and clinical aspects of fibrinolysis and inhibition of coagulation. Experimental and clinical studies with special reference to women on oral contraceptives and selected groups of thrombosis prone patients. *Dan Med Bull* 35 1-33.

Jimenez-Diaz M, Giunta S, Valz-Gianinet J, Pereyra-Alfonso S, Flores V, Miceli D, 2000: Proteases with plasminogen activator activity in hamster oviduct. *Mol Reprod Dev* 55 47-54.

Jimenez-Diaz M, Roldan M, Miceli DC, 2002: Localization of plasminogen in the extracellular matrix of hamster eggs: exogenous activation by streptokinase. *Mol Reprod Dev* 61 528-535.

Jones KT, 1998: Protein kinase C action at fertilization: overstated or undervalued? *Rev Reprod* 3 7-12.

Jones KT, 2005: Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 130 813-823.

Jones PB, Muse KN, Wilson EA, Curry TE Jr, 1988: Expression of plasminogen activator

(PA) and a PA inhibitor in human granulosa cells from preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 67 857-860.

Jones PB, Vernon MW, Muse KN, Curry TE Jr, 1989: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 68 1039-1045.

Kaaekuahiwi MA, Menino AR Jr, 1990: Relationship between plasminogen activator production and bovine embryo development in vitro . *J Anim Sci* 68 2009-2014.

Karakji EG, Tsang BK, 1995 α : Growth hormone releasing factor and vasoactive intestinal peptide stimulate rat granulosa cell plasminogen activator activity in vitro during follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 107 105-112.

Karakji EG, Tsang BK, 1995 β : Follicular stage-dependent regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system by transforming growth factor-alpha in vitro. *Biol Reprod* 52 411-418.

Karakji EG, Tsang BK, 1995 γ : Tumor necrosis factor alpha inhibits rat granulosa cell plasminogen activator activity in vitro during follicular development. *Biol Reprod* 52 745-752.

Karakji EG, Tsang BK, 1995 δ : Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol Reprod* 53 1302-1310.

Khamsi F, Armstrong DT, Zhang X, 1996: Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 2 273-276.

Kim IC, Schomberg DW, 1989: The production of transforming growth factor-beta activity by rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* 124 1345-1351.

Kim NH, Menino AR Jr, 1995: Effects of stimulators of protein kinases A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocyte-cumulus cell complexes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 40 364-370.

Kim NK, Choi MJ, Chung HM, Sohn TJ, Hwang SG, Oh D, Lee HH, Lee YH, Ko JJ, 2001: Increased expression and localization of a serine protease inhibitor, protease nexin-1 (PN-1), in the ovary and uterus during implantation in rat. *Thromb Res* 103 135-142.

Kim YH, Park JH, Hong SH, Koh JY, 1999: Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science* 284 647-650.

Kinis A, Vergos V, Gallagher M, Gordon AC, 1989: Use of sodium citrate in the denudation of bovine oocytes prior to in vitro fertilization. Proceedings of the 5th Int Conf of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 162.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T, 2004: Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62 1186-1197.

Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG, 1993: Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 5 891-897.

Knijn HM, Gjørret JO, Vos PL, Hendriksen PJ, van der Weijden BC, Maddox-Hyttel P, Dieleman SJ, 2003: Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol Reprod* 69 1371-1378.

Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H, 1994: Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 100 439-446.

Kokolis NA, 1990: Effect of orchidectomy on tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition. *Haemostasis* 20 233-440.

Kokolis N, Alexaki-Tzivanidou E, Smokovitis A, 1987: The role of plasminogen activator activity in the ovulation of the sow. In: Roche JF, o'Callaghan D (eds). *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*. Martinus Nijhoff Publishers:

The Netherlands, pp. 215-220.

Kokolis N, Ploumis T, Smokovitis A, 1989: The effect of experimental chronic hypertension on tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition. *Thromb Res* 56 523-528.

Kouba AJ, Alvarez IM, Buhi WC, 2000 α : Identification and localization of plasminogen activator inhibitor-1 within the porcine oviduct. *Biol Reprod* 62 501-510.

Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC, 2000 β : Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Mol Reprod Dev* 56 378-386.

Koyama H, Yang X, Jiang S, Suzuki H, Foote RH, 1993: Analysis of polarity of bovine and rabbit blastomeres by scanning electron microscopy. *Theriogenology* 39 249.

Krisher RL, Lane M, Bavister BD, 1999: Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60 1345-1352.

Kruip TA, Bevers MM, Kemp B, 2000: Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53 611-618.

Kruip T, Cran D, Van Beneden T, Dieleman S, 1983: Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vitro. *Gam. Res.* 8 29-47.

Kruithof EK, 1988: Plasminogen activator inhibitors-a review. *Enzyme* 40 113-121.

Kruithof EKO, 1990: Plasminogen activator inhibitor type 2: biochemical and biological aspects. In Takada A, Shumama MM, Collen D (eds). *Protease inhibitors*. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands, pp 15-22.

Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL, 1995: Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 86 4007-4024.

Kuyt JR, Kruip TA, de Jong-Brink M, 1988: Cytochemical localization of adenylate cyclase in bovine cumulus-oocyte complexes. *Exp Cell Res* 174 139-145.

Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M, 1994: Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 135 2318-2326.

Laurincik J, Hyttel P, Baran V, Eckert J, Lucas-Hahn A, Pivko J, Niemann H, Brem G, Schellander K, 1998: A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure. *Mol Reprod Dev* 50 192-199.

Lecander I, Nilsson IM, Astedt B, 1988: Depression of plasminogen activator activity during pregnancy by the placental inhibitor PAI-2. *Fibrinolysis* 2 165-167.

Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ, 2001: Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121 339-346.

Leibfried L, First NL, 1979: Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48 76-86.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL, 1986: Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 35 850-857.

Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL, 1983: In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol Reprod* 29 173-179.

Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordstrom L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T, 1995: Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 12446-12450.

Li M, Karakji EG, Xing R, Fryer JN, Carnegie JA, Rabbani SA, Tsang BK, 1997:

Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. *Endocrinology* 138 2790-2799.

Liedholm P, 1975: On fibrinolysis in reproduction. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1 47.

Liedholm P, Astedt B, 1975: Fibrinolytic activity of the rat ovum, appearance during tubal passage and disappearance at implantation. *Int J Fertil* 20 24-26.

Liu K, Brandstrom A, Liu YX, Ny T, Selstam G, 1996: Coordinated expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during corpus luteum formation and luteolysis in the adult pseudopregnant rat. *Endocrinology* 137 2126-2132.

Liu YX, 1989: A factor from granulosa cells can stimulate oocyte tissue plasminogen activator activity. *Sci China B* 32 abstract.

Liu YX, 1999: Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biol Signals Recept* 8 160-177.

Liu YX, 2004: Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Biosci* 9 3356-3373.

Liu YX, Cajander SB, Ny T, Kristensen P, Hsueh AJ, 1987: Gonadotropin regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in rat granulosa and theca-interstitial cells during the periovulatory period. *Mol Cell Endocrinol* 54 221-229.

Liu YX, Feng Q, Hu ZY, 1992: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in mouse ovaries during preovulatory period. *Dev Reprod Biol Sinica* 1 abstract.

Liu YX, Hsueh AJ, 1987: Plasminogen activator activity in cumulus-oocyte complexes of gonadotropin-treated rats during the periovulatory period. *Biol Reprod* 36 1055-1062.

Liu YX, Liu K, Feng Q, Hu ZY, Liu HZ, Fu GQ, Li YC, Zou RJ, Ny T, 2004: Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 are coordinately expressed during ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology* 145 1767-

1775.

Liu YX, Ny T, Sarkar D, Loskutoff D, Hsueh AJ, 1986: Identification and regulation of tissue plasminogen activator activity in rat cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology* 119 1578-1587.

Liu YX, Peng XR, Liu HZ, Chen YJ, Ny T, 1998: Prolactin regulation of tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-I gene expression in eCG-primed rat granulosa cells in culture. *Biol Reprod* 59 409-416.

Liu YX, Peng XR, Ny T, 1991: Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen-activator-inhibitor type I and tissue-type plasminogen activator in the rat ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 195 549-555.

Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP, 1999: Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 51 1565-1576.

Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M, 1994: Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 101 697-701.

Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J, 1989: Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 9 87-115.

Lu KH, Gordon I, 1987: Effect of serum, hormones and cumulus cells on in vitro maturation of bovine oocytes. *Proceedings of the Society for the study of Fertility*, 81.

Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanese E, Lauria A, Gandolfi F, 2004: Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod* 70 465-472.

Lutterbach A, Koll RA, Brem G, 1987: In vitro maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. *Zuchthyg*

22 145-150.

Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL, 1988: Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106 1659-1665.

Malinowski DP, Sadler JE, Davie EW, 1984: Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human and bovine plasminogen. *Biochemistry* 23 4243-4250.

Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez AC, 1999: The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 274 6935-6945.

Matrisian LM, 1990: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6 121-125.

Meizel S, 1985: Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174 285-302.

Meizel S, Lui CW, 1976: Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 195 137-144.

Menino AR Jr, Dyk AR, Gardiner CS, Grobner MA, Kaaekuahiwi MA, Williams JS, 1989: The effects of plasminogen on in vitro ovine embryo development. *Biol Reprod* 41 899-905.

Menino AR Jr, O'Claray JL, 1986: Enhancement of hatching and trophoblastic outgrowth by mouse embryos cultured in Whitten's medium containing plasmin and plasminogen. *J Reprod Fertil* 77 159-167.

Menino AR Jr, Williams JS, 1987: Activation of plasminogen by the early bovine embryo. *Biol Reprod* 36 1289-1295.

Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ, 2003: Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo

technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59 651-674.

Mignatti P, Rifkin DB, 1993: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73 161-195.

Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF, 1991: Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30 1682-1691.

Miles LA, Plow EF, 1987: Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb Haemost* 58 936-942.

Milwidsky A, Kaneti H, Finci Z, Laufer N, Tsafiriri A, Mayer M, 1989: Human follicular fluid protease and antiprotease activities: a suggested correlation with ability of oocytes to undergo in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52 274-280.

Miyashita C, Wenzel E, Heiden M, 1988: Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis* 18 7-13.

Moller CC, Wassarman PM, 1989: Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 132 103-112.

Moraitis S, Taitzoglou IA, Tsantarliotou MP, Boscios CM, Kaldrimidou E, Saratsis P, 2004: Involvement of the plasminogen activation system in cow endometritis. *Theriogenology* 61 337-349.

Müllertz S, 1988: Fibrinolysis: general aspects characteristic features and perspectives. *Fibrinolysis* 1 3-12.

Mullins DE, Bazer FW, Roberts RM, 1980: Secretion of a progesterone-induced inhibitor of plasminogen activator by the porcine uterus. *Cell* 20 865-872.

Murdoch J, Van Kirk EA, Murdoch WJ, 1999: Hormonal control of urokinase plasminogen activator secretion by sheep ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 61 1487-1491.

Murdoch WJ, Gottsch ML, 2003: Proteolytic mechanisms in the ovulatory folliculo-luteal transformation. *Connect Tissue Res* 44 50-57.

Myohanen H, Vaheri A, 2004: Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci* 61 2840-2858.

Ny T, Bjersing L, Hsueh AJ, Loskutoff DJ, 1985: Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology* 116 1666-1668.

Ny T, Wahlberg P, Brandstrom IJ, 2002: Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol* 187 29-38.

O'Connell ML, Canipari R, Strickland S, 1987: Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. *J Biol Chem* 262 2339-2344.

Odekun LE, Blasi F, Rifkin DB, 1994: Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF-beta. *J Cell Physiol* 158 398-407.

Okamoto S, Oshiba S, Mihara H, Okamoto U, 1968: Synthetic inhibitors of fibrinolysis: in vitro and in vivo mode of action. *Ann N Y Acad Sci* 146 414-429.

Ossowski L, 1988: In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol* 107 2437-2445.

Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA, 2000: Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12 613-620.

Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, Blasi F, 1991: In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol* 115 1107-1112.

Park KW, Choi SH, Song XX, Funahashi H, Niwa K, 1999: Production of plasminogen activators (PAs) in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro: effects of epidermal growth factor on production of PAs in oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod* 61 298-304.

Parrish JJ, First NL, 1993: Fertilization. In: King GJ (ed) *Reproduction in Domesticated animals*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp 525-530.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL, 1986: Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25 591-600.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL, 1988: Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38 1171-1180.

Peng XR, Hsueh AJ, Ny T, 1993: Transient and cell-specific expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 results in controlled and directed proteolysis during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 214 147-156.

Penny WF, Ware JA, 1992: Platelet activation and subsequent inhibition by plasmin and recombinant tissue-type plasminogen activator. *Blood* 79 91-98.

Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD, 1990: Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111 743-755.

Pincus G, Enzmann EV, 1935: The comparative behavior of mammalian eggs in vitro and in vivo. *J Exp Med* 62 665-675.

Piquette GN, Crabtree ME, el-Danasouri I, Milki A, Polan ML, 1993: Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human cumulus and granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76 518-523.

Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K, 1991: Cellular receptor for

urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 266 1926-1933.

Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL, 1995: The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* 9 939-945.

Politis I, Srikandakumar A, Turner JD, Tsang BK, Ainsworth L, Downey BR, 1990: Changes in and partial identification of the plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor systems during ovarian follicular maturation in the pig. *Biol Reprod* 43 636-642.

Prather RS, First NL, 1988: A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. *J Anim Sci* 66 2626-2635.

Prentice CR, 1980: Basis of antifibrinolytic therapy. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 14 35-40.

Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE, 1980: Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208 1036-1037.

Ravn P, Berglund L, Petersen TE, 1995: Cloning and characterization of the bovine plasminogen activators uPA and tPA. *Int Dairy J* 5 605-617

Reich R, Miskin R, Tsafiriri A, 1986: Intrafollicular distribution of plasminogen activators and their hormonal regulation in vitro. *Endocrinology* 119 1588-1593.

Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, Vainas E, Brem G, 2002: Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 57 1897-1905.

Rekkas C, Belibasaki S, Taitzoglou I, Kokolis N, Smokovitis A, 1991: Increased plasminogen activator activity and plasminogen activator inhibition in spermatozoa and seminal plasma of the ram after serum gonadotrophin (PMSG) administration. Correlation with the increased level of testosterone in the blood. *Andrologia* 23 273-278.

Rekkas C, Kokolis N, Belibasaki S, Tsantarliotou M, Smokovitis A, 2000: Effect of alpha-tocopherol on plasma testosterone and plasminogen activator activity or inhibition in ram spermatozoa. *Theriogenology* 53 751-760.

Rekkas C, Kokolis N, Smokovitis A, 1993: Breed and seasonal variation of plasminogen activator activity and plasminogen activator inhibition in spermatozoa and seminal plasma of the ram in correlation with testosterone in the blood. *Andrologia* 25 101-109.

Rexroad CE Jr, Powell AM, 1987: Co-culture of single-cell sheep embryos on monolayers of oviductal, uterine and kidney cells. *J Anim Sci* 65 403 abstr.

Richard FJ, Sirard MA, 1996: Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 54 22-28.

Riffo M, Leiva S, Astudillo J, 1992: Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int J Androl* 15 229-237.

Rifkin DB, 1997: Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action. *Fibrinolysis Proteol* 11 3-9.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P, 2002: Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61 234-248.

Roldan-Olarte M, Jimenez-Diaz M, Miceli DC, 2005: Plasminogen detection in oocytes and plasminogen activator activities in the porcine oviduct during the estrous cycle. *Zygote* 13 115-123.

Saeki K, Nagao Y, Kishi M, Nagai M, Iritani A, 1998: Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development. *J Vet Med Sci* 60 523-526.

Saksela O, 1985: Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta* 823 35-65.

Saksela O, Rifkin DB, 1988: Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Ann Rev Cell Biol* 4 93-126.

Saksela O, Vihko KK, 1986: Local synthesis of plasminogen by the seminiferous tubules of the testis. *FEBS Lett* 204 193-197.

Saling PM, 1981: Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 6231-6235.

Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC, 1992: Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151 541-551.

Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassalli JD, 1989: Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 109 2471-2479.

Sato Y, Rifkin DB, 1989: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109 309-315.

Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB, 1990: Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* 111 757-763.

Schafer AI, Maas AK, Ware JA, Johnson PC, Rittenhouse SE, Salzman E, 1986: Platelet protein phosphorylation, elevation of cytosolic calcium, and inositol phospholipid breakdown in platelet activation induced by plasmin. *J Clin Invest* 78 73-79.

Schleef RR, Loskutoff DJ, 1988: Fibrinolytic system of vascular endothelial cells. Role of plasminogen activator inhibitors. *Haemostasis* 18 328-341.

Schroeder AC, Schultz RM, Kopf GS, Taylor FR, Becker RB, Eppig JJ, 1990: Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. *Biol Reprod* 43 891-897.

Scott RW, Baker JB, 1983: Purification of human protease nexin. *J Biol Chem* 258 10439-10444.

Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN, Barreda C, Watts S, Baker JB, 1985: Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 260 7029-7034.

Seidel GE Jr, 1983: Applications of microsurgery to mammalian embryos. *Theriogenology* 17 1-12.

Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, 1993: Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim Reprod Sci* 31 49-60.

Shimada H, Okamura H, Espey LL, Mori T, 1985: Increase in plasminogen activator in the involuting uterus of the postpartum rat. *J Endocrinol* 104 295-298.

Shinohara H, Yanagimachi R, Srivastava PN, 1985: Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by the proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin and chymo-trypsin. *Gamete Res* 174 285-302.

Siddiq MM, Tsirka SE, 2004: Modulation of zinc toxicity by tissue plasminogen activator. *Mol Cell Neurosci* 25 162-171.

Silverstein RL, Friedlander RJ Jr, Nicholas RL, Nachman RL, 1988: Binding of Lys-plasminogen to monocytes/macrophages. *J Clin Invest* 82 1948-1955.

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL, 1989: Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40 1257-1263.

Smokovitis A, 1980: A new hypothesis: possible mechanisms in the involvement of the increased plasminogen activator activity in branching regions of the aorta in the initiation of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 43 141-146.

Smokovitis A, Astrup T, 1980: The fibrinolytic response in injured animal tissues

normally low in fibrinolytic activity. *Haemostasis* 9 175-187.

Smokovitis A, Auerswald W, Binder BR, 1981 α : The effect of alloxan-induced diabetes on tissue plasminogen activator activity and plasmin inhibition in the rat. *Thromb Res* 23 421-434.

Smokovitis A, Auerswald W, Binder BR, 1981 β : Endothelial fibrinolytic activity in hypercholesterolemic and diabetic rats, effect of stanozolol, streptozotocin, dexamethasone and hypophysectomy. *Scot Med J* S53-S57.

Smokovitis A, Binder BR, 1980: The effect of the anabolic steroid stanozolol on tissue plasminogen activator activity and plasmin inhibition in the rat. *Experientia* 36 1079-1080.

Smokovitis A, Hattey E, Binder BR, 1985 α : Effect of hypophysectomy on the tissue and blood plasminogen activator activity in the rat. *Haemostasis* 15 151-156.

Smokovitis A, Kokolis N, Alexaki-Tzivanidou E, 1988 α : Fatty streaks and fibrous plaques in human aorta show increased plasminogen activator activity. *Haemostasis* 18 146-153.

Smokovitis A, Kokolis N, Alexaki-Tzivanidou E, 1988 β : The plasminogen activator activity is markedly increased mainly at the area of the rupture of the follicular wall at the time of ovulation. *Anim Reprod Sci* 10 285-294.

Smokovitis A, Kokolis N, Alexopoulos C, Alexaki E, Eleftheriou E, 1987: Plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in spermatozoa and seminal plasma of man and various animal species. Effect of plasmin on sperm motility. *Fibrinolysis* 1 253-257.

Smokovitis A, Kokolis N, Ploumis T, 1988 γ : Great variation in the response of tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition to endotoxin, aspirin and endotoxin after administration of aspirin. *Thromb Res* 50 495-505.

Smokovitis A, Kokolis N, Ploumis T, 1990: Variable effect of unilateral or bilateral

ovariectomy performed in young or adult animals on tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition. *Thromb Res* 58 153-162.

Smokovitis A, Kokolis N, Ploumis T, 1991 α : Enhancement of plasminogen activator activity in the gastric wall after chronic ethanol consumption. *Alcohol* 8 17-20.

Smokovitis A, Kokolis N, Rekkas C, Ploumis T, 1991 β : Variable response of tissue parameters of the fibrinolytic system to unilateral or bilateral adrenalectomy and unilateral or bilateral adrenal demedullation. *J Endocrinol Invest* 14 815-820.

Smokovitis A, Kokolis N, Taitzoglou I, Rekkas C, 1992 α : Plasminogen Activator: The Identification of an Additional Proteinase at the Outer Acrosomal Membrane of Human and Boar Spermatozoa. *Int J Fertil* 37 308-314.

Smokovitis A, Kouimtzis St, Koutsouris C, Kokolis N, Kouskoura Th, 1989: The effects of Intrafollicular Injections of Plasmin and E-aminocaproic Acid on the ovulation in the Ewe. *Fibrinolysis* 3 227-230.

Smokovitis A, Rekkas C, Vainas E, Kokolis N, Taitzoglou I, 1992 β : The effect of chromosomal anomalies on the plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in spermatozoa and seminal plasma. Part I. Chromosomal chimaerism XX/XY in the ram. *Anim Reprod Sci* 29 241-254.

Smokovitis A, Sugimoto M, Dannenberg AM Jr, Astrup T, 1976: A histochemical study of the fibrinolytic activity in dermal tuberculous lesions produced by BCG in rabbits. *Exp Mol Pathol* 25 236-241.

Smokovitis A, Wagner M, Starlinger M, Opitz A, Binder BR, 1985 β : Changes in plasminogen activator activity and plasmin inhibition in the pig during experimental hypovolaemia. *Thromb Haemost* 53 130-133.

Spiropoulos J, Long SE, 1989: Female meiosis in dairy cattle. *J Reprod Fertil* 3 48 abstract.

- Sprengers ED, Kluft C, 1987: Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69 381-387.
- Stephens RW, Pollanen J, Tapiovaara H, Leung KC, Sim PS, Salonen EM, Ronne E, Behrendt N, Dano K, Vaheiri A, 1989: Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol* 108 1987-1995.
- Steven FS, Griffin MM, Chantler EN, 1982: Inhibition of human and bovine sperm acrosin by divalent metal ions. Possible role of zinc as a regulator of acrosin activity. *Int J Androl* 5 401-412.
- Strickland S, Beers WH, 1976: Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J Biol Chem* 251 5694-5702.
- Strickland S, Huarte J, Belin D, Vassalli A, Rickles RJ, Vassalli JD, 1988: Antisense RNA directed against the 3' noncoding region prevents dormant mRNA activation in mouse oocytes. *Science* 241 680-684.
- Strickland S, Reich E, Sherman MI, 1976: Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 9 231-240.
- Stump DC, Thienpont M, Collen D, 1986: Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from human urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol Chem* 261 12759-12766.
- Stutz A, Conne B, Huarte J, Gubler P, Volkel V, Flandin P, Vassalli JD, 1998: Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes Dev* 12 2535-2548.
- Suarez SS, Drost M, Redfern K, Gottlieb W, 1990: Sperm motility in the oviduct. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds). *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia, pp 11-24.

Suzuki H, Presicce GA, Yang X, 1996. Analysis of bovine oocytes matured in vitro vs in vivo by scanning electron microscopy. *Theriogenology* 45 271 abstract.

Takada A, Takada Y, 1988: Physiology of plasminogen: with special reference to activation and degradation. *Haemostasis* 18 25-35.

Taitzoglou IA, Chapman DA, Killian GJ, 2003: Induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with plasmin. *Andrologia* 35 112-116.

Taitzoglou IA, Chapman DA, Zervos IA, Killian GJ, 2004: Effect of plasmin on movement characteristics of ejaculated bull spermatozoa. *Theriogenology* 62 553-561.

Taitzoglou I, Kokolis N, Smokovitis A, 1996: Release of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor from spermatozoa of man, bull, ram and boar during acrosome reaction. *Mol Androl*, 8: 187–197.

Tatemoto H, Terada T, 1995: Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 43 1107-1113.

Thibault C, Szollosi D, Gerard M, 1987: Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 27 865-896.

Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB, 2004: Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 70 548-556.

Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A, 1997: Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem* 272 4787-4794.

Travis J, Salvesen GS, 1983: Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 52 655-709.

Tsafri A, 1995: Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 377 121-140.

Tsafri A, Bicsak TA, Cajander SB, Ny T, Hsueh AJ, 1989: Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue-type plasminogen activator and alpha 2-antiplasmin. *Endocrinology* 124 415-421.

Tsantarliotou MP, Zervos IA, Vatzias G, Billinis C, Taitzoglou IA, Kokolis NA, 2005: Plasminogen activator activity in the porcine oviduct during the oestrous cycle. *Theriogenology* 64 1007-1015.

Van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 1717-1751.

Van Hinsbergh VW, Kooistra T, van den Berg EA, Princen HM, Fiers W, Emeis JJ, 1988: Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vitro and in rats in vivo. *Blood* 72 1467-1473.

Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A, 1992: Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38 905-919.

Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A, 1997: Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47 47-56.

Vassalli JD, Belin D, 1987: Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Letters* 214 187-191.

Vassalli JD, Sappino AP, Belin D, 1991: The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88 1067-1072.

Vergos E, 1990: In vitro fertilization and embryo culture in cattle. Phd Thesis. National University of Ireland, Dublin.

Vihko KK, Suominen JJ, Parvinen M, 1984: Cellular regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. *Biol Reprod* 31 383-389.

Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P, 2002: Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57 2105-2117.

Weimer SL, Campeau JD, Marrs RP, Dizerega GS, 1984: Alteration of human follicular fluid plasminogen activator activity by ovarian hyperstimulation. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1 263-266.

Whiteside EJ, Kan M, Jackson MM, Thompson JG, McNaughton C, Herington AC, Harvey MB, 2001: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and activity during early embryo development in the cow. *Anat Embryol (Berl)* 204 477-483.

Yamada M, Horiuchi T, Oribe T, Yamamoto S, Matsushita H, Gentry PA, 1996: Plasminogen activator activity in the bovine oocyte-cumulus complex and early embryo. *J Vet Med Sci* 58 317-322.

Yanagimachi R, 1994: Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, USA, pp 189–318.

Yuasa H, Tanaka H, Hayashi T, Wakita T, Nakamura H, Nishioka J, Kawarada Y, Suzuki K, 2000: Bovine protein C inhibitor has a unique reactive site and can transiently inhibit plasmin. *Thromb Haemost* 83 262-267.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA, 1995: Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40 38-44.

Zhang X, Kidder GM, Zhang C, Khamsi F, Armstrong DT, 1994: Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 101 235-240.

Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT, 1991: Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 28 292-296.

Zhang X, Rutledge J, Khamsi F, Armstrong DT, 1992: Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Mol Reprod Dev* 32 28-32.

Zhuo L, Kimata K, 2001: Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 26 189-196.