

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ**

ΦΩΤΕΙΝΗ Α. ΚΡΑΝΙΑ

Μοριακός Βιολόγος & Γενετίστρια, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος
Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Καρδίτσα 2015

© 2015 Κρανιά Φωτεινή

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Κτηνιατρικής της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των
απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Στους ανθρώπους μου...

«Η επιστήμη πάντοτε κάνει λάθη.
Ποτέ δεν έλυσε ένα πρόβλημα, χωρίς να θέσει ένα άλλο.»
George Bernard Shaw - Θεατρικός Συγγραφέας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση των μεθόδων της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (*in vitro* embryo production, IVP) στην Κτηνιατρική αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την επιτάχυνση του ρυθμού γενετικής βελτίωσης πληθυσμών των αγροτικών ζώων μέσω της αύξησης των παραγόμενων εμβρύων από επιλεγμένες δότριες, καθώς και τη συνεπακόλουθη σύμπτυξη του μεσοδιαστήματος γενεών. Επιπλέον, η πειραματική εφαρμογή των μεθόδων συμβάλλει στη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη λειτουργία της αναπαραγωγής. Η IVP απαιτεί την ολοκλήρωση τριών βιολογικών σταδίων: της ωρίμανση των ωαρίων, της γονιμοποίησής τους και της καλλιέργειας των εμβρύων έως και το στάδιο της βλαστικής κύστης (βλαστοκύστης). Η βελτιστοποίηση των μεθόδων της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η παραγωγή γενετικά βέλτιστων και υγιών, τελικά, μόσχων, αλλά και η κατανόηση των φυσιολογικών διεργασιών της αναπαραγωγής, από το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων έως και την εγκατάσταση των εμβρύων στη μήτρα αποτελούν βασικούς στόχους της IVP. Ένα τεράστιο εύρος φυσικών, βιοχημικών, ενζυμικών, μοριακών και ανοσολογικών παραγόντων επηρεάζουν την ανάπτυξη τόσο των ωαρίων όσο και την εξέλιξη των εμβρύων· μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται και το σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης ή, όπως αλλιώς είναι γνωστό, το ινωδολυτικό σύστημα.

Το πρωτεολυτικό σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης (PAs / PL system) αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα ενζυμικό σύστημα με σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές ή φυσιοπαθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αναπαραγωγής. Η συντονισμένη λειτουργία του συστήματος περιλαμβάνει τη μετατροπή του αδρανούς προενζύμου –πλασμινογόνο- στην ενεργή του μορφή, την πλασμίνη, ένα ισχυρότατο πρωτεολυτικό ένζυμο της κατηγορίας της θρυψίνης. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Υπάρχουν δύο τουλάχιστον, πολύ καλά χαρακτηρισμένοι τύποι ενεργοποιών του πλασμινογόνου, ο ενεργοποιός του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (tissue-type plasminogen activator, t-PA) και ο ενεργοποιός του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (urokinase-type plasminogen activator, u-PA). Η δράση του συστήματος ελέγχεται τοπικά με την απελευθέρωση ειδικών αδρανοποιών, οι οποίοι δρουν είτε έναντι των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitors, PAIs) είτε έναντι της πλασμίνης (plasmin

inhibitors, PIs). Οποιαδήποτε διαταραχή της ισορροπίας της έκφρασης ή/και της δραστηριότητας των μελών του συστήματος αυτού οδηγεί σε εντοπισμένη διαφοροποίηση της πρωτεόλυσης.

Στην παρούσα διατριβή μελετάται η επίδραση της τροποποίησης των *in vitro* υποστρωμάτων της γονιμοποίησης και της καλλιέργειας των εμβρύων με t-PA και u-PA, αντίστοιχα, στα ποσοστά παραγωγής των βλαστοκύστεων, αλλά και στην ποιότητά τους, αναλύοντας την έκφραση μιας σειράς γονιδίων που συνδέονται με την ικανότητα ενός εμβρύου να επιβιώσει ή να διακόψει την ανάπτυξή του. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται σε σημαντικά μονοπάτια της ανάπτυξης των εμβρύων, όπως είναι ο μεταβολισμός, η οξειδωση, η εγκατάσταση και η απόπτωση. Προσδιορίστηκε, επίσης, η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (plasminogen activator activity, PAA) και των αδρανοποιών τους (plasminogen activator inhibition, PAI), με τη βοήθεια φασματοφωτομετρικής μεθόδου και τη χρήση χρωμογόνου υποστρώματος, στα υποστρώματα της *in vitro* γονιμοποίησης (*in vitro* fertilization, IVF) και της *in vitro* καλλιέργειας (*in vitro* culture, IVC), όλων των πειραματικών ομάδων.

Στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής περιγράφονται τα χαρακτηριστικά της δομής και της λειτουργίας όλων των μελών του συστήματος PAs / PL, καθώς και τα σημεία έκφρασης, παραγωγής και πρόσδεσής τους στα διάφορα θηλαστικά, δίνοντας έμφαση στις βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν στα κύτταρα της αναπαραγωγής. Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας φαίνεται ότι το υπό μελέτη σύστημα κατά την αναπαραγωγική διαδικασία διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στην εξέλιξη των *in vivo* διεργασιών, μερικές από τις οποίες είναι η σπερματογένεση, η ωοθυλακιορρηξία, η γονιμοποίηση, η ανάπτυξη και η εγκατάσταση των εμβρύων. Έτσι, η χρήση των συστημάτων καλλιέργειας εμβρύων *in vitro* δίνει τη δυνατότητα για περαιτέρω εμβάθυνση στους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που διέπουν τα προαναφερθέντα φαινόμενα. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα για διερεύνηση της επίδρασης των μελών του συστήματος PAs / PL, στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων, μετά την προσθήκη τους στα *in vitro* υποστρώματα καλλιέργειας.

Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην IVP, στην εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων μέσω ανάλυσης της έκφρασης σημαντικών γονιδίων, στον ενζυμικό προσδιορισμό των PAA και PAI στα παραγόμενα υποστρώματα και στη διαφορική χρώση των

κυττάρων των βλαστοκύστεων. Στο 1^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν, συνολικά, 2016 συμπλέγματα ωαρίων-κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (COCs), τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες, ανάλογα με την τροποποίηση του υποστρώματος της IVF: την ομάδα μαρτύρων [control], την ομάδα της οποίας τα υποστρώματα τροποποιήθηκαν με προσθήκη t-PA [t-PA], την ομάδα που εκτός από t-PA, ίδιας δραστηριότητας με την προηγούμενη, περιείχε και τον αναστολέα της πλασμίνης και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ε-ACA) [t-PA+ε-ACA], και την ομάδα στην οποία η τροποποίηση αφορούσε μόνο στην προσθήκη ε-ACA [ε-ACA]. Το 2^ο πείραμα περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες πειραμάτων, όπου η επίδραση της προσθήκης του u-PA μελετήθηκε σε απογυμνωμένα έμβρυα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ημι-καθορισμένες συνθήκες (πείραμα 2.α, συνολικά 1631 πιθανά ζυγωτά) και σε έμβρυα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε μη-καθορισμένες συνθήκες και με την παρουσία μίας μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (πείραμα 2.β, συνολικά 629 πιθανά ζυγωτά). Εκτός ορισμένων παραλλαγών ανά πειραματισμό, οι οποίες επισημαίνονται στο κυρίως κείμενο της διατριβής, η διαδικασία της IVP που ακολουθήθηκε για την εξωσωματική παραγωγή των εμβρύων ακολουθεί ένα κοινό πρωτόκολλο και περιλαμβάνει τη συλλογή των ωοθηκών αγελάδων αμέσως μετά τη σφαγή τους, την αναρρόφηση των ωοθυλακίων τους –διαμέτρου 2-8 mm–, την επιλογή των COCs και την 24^{ωρη} ωρίμανσή τους σε υπόστρωμα TCM-199 εμπλουτισμένο με επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) ή/και ορό εμβρύου μόσχου (FCS), κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επώασης (39 °C, 5% CO₂, 20% O₂ και μέγιστη υγρασία). Η γονιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο υπόστρωμα IVF, με καταψυγμένο/αποψυγμένο σπέρμα ταύρου, στο οποίο οι γαμέτες συνεπώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες, για 22 ώρες. Οι πιθανοί ζυγώτες καλλιεργούνταν σε ομάδες των 25 σε συνθετικό υγρό του ωαγωγού (SOF) εμπλουτισμένο με FCS (εκτός του 2.α πειράματος). Η καλλιέργεια των εμβρύων γινόταν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (39 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ και μέγιστη υγρασία) για 7 ή/και 8 ημέρες. Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και την εκτίμηση της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων, τα έμβρυα που παράχθηκαν από τις τροποποιημένες και μη-τροποποιημένες ομάδες εμβάπτιστηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους –80 °C. Τα έμβρυα ήταν βλαστοκύστες ημέρας 7 (D7), αλλά και πρώιμα έμβρυα, τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο του μοριδίου [μορίδια 3^{ης} και 4^{ης} ημέρας (D3 και D4), μόνο για το 1^ο πείραμα]. Αμέσως μετά την απόψυξη των εμβρύων έγινε σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με τη

βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time Polymerase Chain Reaction, real-time PCR). Η αξιολόγηση της ποιότητας των παραγόμενων D7 βλαστοκύστεων έγινε με τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PLAC8*, *AKR1B1*, *BIRC5* ή *survivin*, *BBC3* ή *PUMA*, *PTGS-2* ή *COX-2*, *BCL2L1*, *SLC2A5* ή *GLUT-5*, *MnSOD*, *PLG* και *PLAUR*, των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται ανάλογα με την ποιότητα των εμβρύων. Για την γονιδιακή ανάλυση των μοριδίων ημέρας 3 και 4 ελέγχθηκαν τα γονίδια *BAX*, *BCL2L1*, *PIPOX*, *G6PD*, *SLC2A5*, *MnSOD* και *KAT2B* ή *PCAF*. Σε κάθε πειραματική φάση επιλέχθηκαν τα τρία σταθερότερα γονίδια αναφοράς και για τις δύο ομάδες εμβρύων (τροποποιημένων και μη-τροποποιημένων), των οποίων η έκφραση δεν μεταβάλλεται από την τροποποίηση και χρησιμοποιήθηκαν για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της IVP μεταξύ των ομάδων, της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης, της PAA και PAI και της διαφορικής χρώσης των κυττάρων του εμβρύου χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι: ανάλυση της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), δοκιμασία του χ^2 , t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα και ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης.

Τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος έδειξαν ότι η προσθήκη μόνο του t-PA (τελική δραστηριότητα 500 IU/ml) στο υπόστρωμα της IVF προκάλεσε σημαντική μείωση των ποσοστών αυλάκωσης (control: 84,8% ; t-PA: 65,8%) και σχηματισμού βλαστοκύστεων 7 (control: 30,1% ; t-PA: 13,3%) και 8 ημερών (control: 35% ; t-PA: 15,8%), ενώ η παράλληλη προσθήκη των t-PA και ε-ACA επανέφερε τα ποσοστά στα ίδια επίπεδα με εκείνα της ομάδας των μαρτύρων (αυλάκωση: 84,7% ; D7: 31,3% ; D8: 32,7%). Στην ομάδα του ε-ACA δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων (αυλάκωση: 84,3% ; D7: 27,4% ; D8: 29,5%). Κατά τη γονιδιακή ανάλυση των μοριδίων παρατηρήθηκαν σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων *BAX* και *KAT2B*, στα D3 μορίδια της ομάδας των εμβρύων που γονιμοποιήθηκαν παρουσία t-PA, σε σχέση με αυτών της ομάδας μαρτύρων. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την επαγωγή της απόπτωσης και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και ενδεχομένως οι παραπάνω μεταβολές της έκφρασής τους να εξηγούν τη μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης των εμβρύων της ομάδας του t-PA. Κατά την ανάλυση των D7 βλαστοκύστεων, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου του πλασμινογόνου, το οποίο δεν εκφράζεται στα στάδια αυτά και υποέκφραση του αντι-αποπτωτικού

γονιδίου *BCL2L1* στην ομάδα των εμβρύων t-PA, σε σχέση με εκείνων της ομάδας των μαρτύρων. Η αυξημένη PAA στην ομάδα του t-PA μειώθηκε, σημαντικά, με την παράλληλη προσθήκη του ε-ACA στο υπόστρωμα της IVF, χωρίς όμως τα επίπεδα της να επανέρχονται στα αντίστοιχα της ομάδας των μαρτύρων. Ωστόσο, η προσθήκη μόνο του αναστολέα δεν μετέβαλε τα επίπεδα της PAA σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές της PAI στα υποστρώματα και των 4 υπό μελέτη ομάδων.

Στο 2^ο πείραμα, η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με u-PA, στη δεδομένη τελική δραστηριότητα (5 IU/ml) που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή, δεν επηρέασε τα ποσοστά της IVP ή την ποιότητα των παραγόμενων τροποποιημένων εμβρύων, όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των δέκα σημαντικών mRNA μεταγράφων (*survivin*, *BBC3*, *BCL2L1*, *GLUT-5*, *PLAC8*, *MnSOD*, *AKR1B1*, *COX-2*, *PLG*, *PLAUR*). Σύμφωνα με τη μέθοδο της διαφορικής χρώσης των κυττάρων που εφαρμόστηκε στις παραγόμενες βλαστοκύστες και των δύο ομάδων του 2.α πειράματος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο συνολικό αριθμό των κυττάρων των παραγόμενων εμβρύων, στο λόγο των κυττάρων που προέρχονται από την έσω κυτταρική στιβάδα (εμβρυοβλάστη - ICM) και την τροφοβλάστη (TE) και στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των PAA και PAI προέκυψαν τα εξής: Για το πείραμα 2.α, εκτός από τα αυξημένα επίπεδα της PAA στην ομάδα u-PA, παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικά αυξημένα επίπεδα της PAI έναντι του t-PA, ενδεχομένως λόγω της απελευθέρωσης PAI στο καλλιεργητικό περιβάλλον του εμβρύου. Στο πείραμα 2.β δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην PAA και PAI μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και u-PA, αν και η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC ήταν αποτελεσματική, όπως αποδείχθηκε από τον ενζυμικό προσδιορισμό των υποστρωμάτων πριν την έναρξη της καλλιέργειας των εμβρύων (ημέρα 0). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την ανάγκη του εμβρύου να αναπτύσσεται μέσα σε κατάλληλο περιβάλλον καλλιέργειας, όπου ενεργοποιεί του πλασμινογόνου και οι αδρανοποιημένοι βρίσκονται σε ισορροπία.

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η προσθήκη εξωγενούς t-PA στο υπόστρωμα της IVF προκαλεί μείωση των ποσοστών αυλάκωσης και παραγωγής εμβρύων βοοειδών. Όταν η εξωγενής αυτή PAA μειώνεται με την προσθήκη του αναστολέα του συστήματος, τα αποτελέσματα της IVP επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα. Από την ανάλυση της έκφρασης των

επιλεγμένων γονιδιακών μαρτύρων αποκαλύφθηκε ότι, η τροποποίηση με την προσθήκη εξωγενούς t-PA ενδεχομένως επηρεάζει αρνητικά και την ποιότητα των παραγόμενων πρώιμων εμβρύων, καθώς σε αυτά βρέθηκαν να επάγονται φαινόμενα, όπως η απόπτωση και η διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Από την άλλη πλευρά, στο 2^ο πείραμα, η τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας των εμβρύων με προσθήκη u-PA, δεν επηρέασε την εξωσωματική παραγωγή και την ποιότητα των εμβρύων βοοειδών, είτε αυτά καλλιεργήθηκαν απογυμνωμένα από τη στιβάδα των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και σε υπόστρωμα ημι-καθορισμένων συνθηκών, είτε σε συγκαλλιέργεια σε μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και παρουσία ορού. Μολονότι η προσθήκη των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου στα υποστρώματα της IVP δεν ευνόησε τα ποσοστά παραγωγής των εμβρύων βοοειδών, καθώς και την ποιότητα αυτών, αλλά αντιθέτως τα δυσχέραине στην πρώτη πειραματική διαδικασία, περισσότερα πειράματα απαιτούνται για τη διαλεύκανση του επακριβούς ρόλου του συστήματος στην IVP. Σε κάθε περίπτωση προκύπτει ότι, οι δυο ενεργοποιοί αποτελούν παράγοντες που συμμετέχουν στη γονιμοποίηση και στην ανάπτυξη των εμβρύων, καθιστώντας ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα την αναζήτηση των πιθανών μηχανισμών δράσης και των αλληλεπιδράσεων τους κατά τη διάρκεια των παραπάνω διαδικασιών.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Σ. Παππάς

Εργαστήριο Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αναπληρωτής Ερευνητής Κωνσταντίνος Α. Ρέκκας

Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ Θεσσαλονίκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Γ.Χ. Φθενάκης

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Ι.Α. Ταϊτζόγλου

Τμήμα Κτηνιατρικής,

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αν. Καθηγήτρια Μ.Π. Τσανταρλιώτου

Τμήμα Κτηνιατρικής,

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Επικ. Καθηγητής Ι.Α. Τσακμακίδης

Τμήμα Κτηνιατρικής,

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Καθηγητής Γ.Σ. Αμοιρίδης

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αν. Καθηγητής Ι.Σ. Παππάς

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αν. Ερευνητής Κ.Α. Ρέκκας

Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πλήρεις ερευνητικές εργασίες που έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή περιοδικά

1. Krania F, Dovolou E, Rekkas CA, Heras S, Pappas I, Van Soom A, Amiridis GS (2015): Urokinase-type plasminogen activator does not affect *in vitro* bovine embryo development and quality. *Acta Vet. Hung.* 63, in press.
2. Krania F, Dovolou E, Rekkas CA, Theodosiadou EK, Pappas I, Amiridis GS (2015): Effects of Addition of Tissue-Type Plasminogen Activator in *In Vitro* Fertilization Medium on Bovine Embryo Development and Quality. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 112-120.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή και Εθνικά Συνέδρια

1. Φ. Κρανιά, Ε. Ντόβολου, Α. Θεοδοσιάδου, Ι.Σ Παππάς, Κ.Α Ρέκκας, και Γ.Σ Αμοιρίδης: Η προσθήκη του ενεργοποιού του πλασμινογόνου-ιστικού τύπου (t-PA) στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης (IVF): επίδραση στα ποσοστά και στην ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων βοοειδών. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και Υγιεινής Τροφίμων (Ιωάννινα, 2-4 Μαΐου 2014). Σελ.: 25-26 *Προφορική ανακοίνωση*
2. F Krania, E Dovolou, CA Rekkas, IS Pappas and GS Amiridis: Inclusion of tissue type plasminogen activator (t-PA) in IVF medium induces alterations in gene expression and affects blastocyst formation rate in bovine IVP. 29th Annual Meeting of A.E.T.E (Istanbul-Turkey, 6th and 7th September, 2013). p. 162 *Γραπτή και Προφορική Ανακοίνωση. Επιλογή της εργασίας για συμμετοχή στο student's competition.*

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY SCIENCE

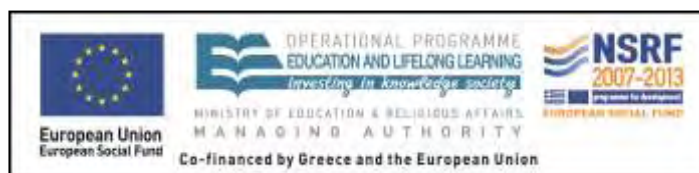


**EFFECTS OF PLASMINOGEN ACTIVATORS / PLASMIN SYSTEM ON
THE *IN VITRO* BOVINE EMBRYO PRODUCTION AND QUALITY**

FOTINI A. KRANIA
Molecular Biologist & Genetist, MSc

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

Work carried out in the Clinic of Obstetrics and Reproduction, Veterinary Faculty,
University of Thessaly



Karditsa 2015

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) techniques provide veterinary science with a powerful tool that could allow acceleration of genetic improvement, by suppressing generation interval through outnumbered *in vivo* production of offspring from elite donors. It could also contribute to further comprehension of the functional mechanisms being involved in reproduction. IVP entails the completion of three biological steps; *in vitro* oocyte maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) of embryos up to the blastocyst stage. Apart from massive production of superior offspring, IVP methods could deepen our understanding on the reproductive physiology from follicular development to embryo implantation. Both oocyte and embryo development can be affected by a wide range of physical, biochemical, enzymatic, molecular and immunological factors including the plasminogen activators / plasmin system, which is also known as fibrinolytic system.

The plasminogen activators / plasmin system (PAs / PL system) is an important extracellular proteolytic system being involved in many *in vivo* physiological processes including reproduction. The orchestrated functionality of the system involves the conversion of the inactive proenzyme plasminogen to plasmin (an active trypsin-like serine protease) by the plasminogen activators (PAs). There are at least two well described types of PAs, the tissue-type plasminogen activator (t-PA) and the urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Extracellular proteolytic activity of the system is readily controlled either by plasminogen activator inhibitors (PAIs) or by plasmin inhibitors (PIs). Failure of the system to maintain its members' expression and/or activity balance leads to localized modifications of proteolytic activity.

Here, we examined the effects of IVF and IVC media modification with the addition of t-PA and u-PA, respectively, on bovine embryo development and quality, assessed by quantification of various genes' expression used as markers of embryo viability. Those genes characterize several important physiological processes such as metabolism, oxidation, implantation and apoptosis. Plasminogen activator activity (PAA) and plasminogen activator inhibition (PAI) were measured in all IVF and IVC spent media by a spectrophotometric method, using a chromogenic substrate.

In chapter 1 the structural and functional characteristics of PAs / PL members are demonstrated. PAs / PL system plays pivotal role in regulating several mammalian

reproductive functions such as spermatogenesis, ovulation, fertilization, embryo development and implantation. Use of *in vitro* embryo culture systems enables a) further understanding of the proteolytic mechanisms being involved in the above procedures and b) investigating whether PAs / PL members affect embryo yield and quality after IVP media modification.

The methodology we followed for IVP, gene expression, PAA / PAI analysis and blastocysts' differential cell staining are described in detail, in chapter 2. In experiment 1, after conventional IVM, 2016 cumulus-oocyte complexes (COCs) were divided into 4 groups with modified composition of the IVF medium containing t-PA and/or its inhibitor epsilon-aminocaproic acid (control, t-PA, t-PA+ ϵ -ACA, ϵ -ACA). t-PA was used at a final activity of 500 IU/ml, while inhibitor's final concentration was 10 mM. The 2nd experiment is divided into two subgroups, where the effect of IVC medium modification with 5 IU/ml of u-PA is examined on denuded embryos cultured in semi-defined synthetic oviductal fluid (SOF) for seven days (experiment 2.a, 1631 putative zygotes) and on embryos co-cultured on cumulus cells monolayer in serum-containing SOF medium (experiment 2.b, 629 putative zygotes). Bovine embryos were produced using a common IVP protocol, except for slight modifications that are referred to the main text; bovine ovaries were collected from abattoir material and COCs were obtained by 2-8 mm follicle aspiration. COCs were matured for 24 hours into TCM199 maturation media enriched with epidermal growth factor (EGF) and/or fetal calf serum (FCS), at 39 °C under 5% CO₂ in air and max humidity. Matured oocytes were inseminated with frozen / thawed bull sperm and gametes were co-incubated for 22 hours in standard IVF medium, at the same incubational conditions. Presumptive zygotes (groups of 25) were cultured in SOF medium containing FCS (except for 2.a experiment) and incubated for 7 and/or 8 days at 39 °C, under an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. For gene expression analysis, embryos of each group were snap frozen into liquid nitrogen and were stored at – 80 °C. Gene expression studies were carried out on Day 7 blastocysts and Day 3 / Day 4 morulae (only for experiment 1). Relative quantification of all mRNA transcripts was performed using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). To evaluate the quality of produced embryos (Day 7 blastocysts), a set of genes has been selected to be analyzed (*PLAC8*, *AKR1B1*, *BIRC5* or *survivin*, *BBC3* or *PUMA*, *PTGS-2* or COX-2, *BCL2L1*, *SLC2A5* or *GLUT-5*, *MnSOD*, *PLG* and *PLAUR*); their expression is indicative of embryo quality. For Day 3 and Day 4 embryo gene

analysis, another group of genes was selected to be studied (*BAX*, *BCL2L1*, *PIPOX*, *G6PD*, *SLC2A5*, *MnSOD* and *KAT2B* or *PCAF*). For each experiment, the three most stable reference genes were used for data normalization, as their expression was unaffected by media modification. Embryo development (cleavage and blastocyst formation rates), relative mRNA abundance, PAA / PAI analysis and blastocysts' differential cell staining results were further analyzed using one-way repeated measures ANOVA, Chi-square test, Independent samples test (T-test) and Linear regression analysis.

In experiment 1, exogenous t-PA alone significantly suppressed cleavage (control: 84.8%; t-PA: 65.8%) and blastocyst formation rates (D7 control: 30.1%; t-PA: 13.3% and D8 control: 35%; t-PA: 15.8%), but this effect was neutralized by the addition of ϵ -ACA (t-PA+ ϵ -ACA, cleavage: 84.7%; D7: 31.3%; D8: 32.7%). No significant differences were found between control and ϵ -ACA groups (cleavage: 84.3%; D7: 27.4%; D8: 29.5%). Significant differences were detected in the expression of genes related to apoptosis and/or cell cycle arrest (*BAX* and *KAT2B*) between D3 morulae produced in t-PA modified media and controls, giving an overall notion that the inferior developmental competence of treated embryos might be attributed to apoptotic phenomena induced by t-PA. In t-PA group, gene expression analysis of D7 blastocysts showed that *PLG* and the anti-apoptotic gene, *BCL2L1* were significantly up-regulated and down-regulated, respectively, compared to controls. PAA in the treated group was significantly reduced by ϵ -ACA, but without total elimination. However, there was no significant difference in PAA results between ϵ -ACA and control groups. Based on the PAI results, no significant difference was found among all groups.

In experiment 2, IVC media modification with u-PA had no effect either on *in vitro* embryo production rates or on embryo quality as revealed by gene expression analysis of ten important mRNA transcripts (*survivin*, *BBC3*, *BCL2L1*, *GLUT-5*, *PLAC8*, *MnSOD*, *AKR1B1*, *COX-2*, *PLG*, *PLAUR*). According to differential cell staining of the produced blastocysts from both studied groups, no differences were found on embryo total cell number, inner cell mass/trophoblast cells ratio and apoptotic cell ratio. PAA and PAI results for the 2.a and 2.b showed the following: In 2.a, except for the higher PAA levels in the u-PA treated IVC media, a significant increase in PAI against t-PA was also recorded indicating that excessive u-PA or plasmin activity might be physiologically restrained by a plasminogen activator

inhibitor release. On the other hand, in experiment 2.b, no significant differences were recorded either in PAA or PAI results between untreated and u-PA treated spent media; although IVC media was successfully modified with u-PA as revealed by PAA measurements in u-PA treated media before embryos added in culture (day 0). All aforementioned results signified the need of a well-balanced plasminogen activators and inhibitors culture environment for embryo development.

In conclusion, under our experimental conditions, it appears that exogenously added t-PA to IVF media, suppresses cleavage and bovine blastocyst formation rates. The low IVP rates were reversed, when t-PA activity was reduced by ϵ -ACA addition. Apoptosis or cell cycle arrest at early stage embryos (morulae) may be favored by this modification reflecting a possible negative effect of t-PA addition on embryo quality. In the 2nd experiment, despite u-PA's significant role in early and late embryo development, the inclusion of exogenous u-PA in the *in vitro* bovine embryo culture medium did not have any effect on embryo yield and/or quality under our experimental culture conditions. However, much research is needed to unveil the mechanism by which t-PA and u-PA are involved in *in vitro* embryo production systems. Even though the above experiments did not favor IVP results and embryo quality, those two activators are definitely involved into fertilization and embryo culture necessitating further investigation of their possible mechanisms and interactions into these processes.

ADVISORY COMMITTEE

Supervisor: Professor Georgios S. Amiridis

Clinic of Obstetrics and Reproduction, Veterinary Faculty, University of Thessaly

Members of the Advisory committee:

Associate Professor Ioannis S. Pappas

Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary Faculty, University of Thessaly

Associate Researcher Constantinos A. Rekkas

Veterinary Research Institute, HAO-‘DEMETER’ - Thessaloniki

EXAMINATION BOARD

Professor G.C Fthenakis	Veterinary Faculty, University of Thessaly
Professor I.A. Taijoglou	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Associate Professor M.P. Tsantarliotou	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Assistant Professor I.A. Tsakmakidis	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Professor G.S. Amiridis	Veterinary Faculty, University of Thessaly
Associate Professor I.S. Pappas	Veterinary Faculty, University of Thessaly
Associate Researcher C.A. Rekkas	Veterinary Research Institute of Thessaloniki

Ευχαριστίες

Η διεξαγωγή και η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν αποτελεί μόνο καρπό προσωπικού αγώνα, αλλά κυρίως πολλών θετικών συγκυριών που μου «επέτρεψαν» ή καλύτερα μου έδωσαν την ευκαιρία να ξεκινήσω την ερευνητική μου δραστηριότητα στον τομέα της Αναπαραγωγής. Γι' αυτό, πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διατριβής μου, κ. Γεώργιο Σ. Αμοιρίδη, Καθηγητή του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος όχι μόνο με επέλεξε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια, αλλά φρόντιζε, εξ αρχής, τη χρηματοδότησή μου, γεγονός σπάνιο για τις εποχές που διανύουμε. Από την αρχή έως και το τέλος αυτής της διατριβής, η συνεχής του εμπιστοσύνη, που μου έδειξε σε όλα τα προκύπτοντα θέματα, αποτέλεσαν για μένα σημαντικό εργαλείο για την διεύρυνση της ερευνητικής μου σκέψης. Η καθοδήγησή του σε όλες τις πειραματικές φάσεις και η ενθάρρυνσή του σε όλη τη συγγραφική περίοδο με εμπλούτισαν με επιστημονικές γνώσεις και εφόδια, τα οποία πάντα θα με ακολουθούν στα μετέπειτα βήματά μου. Θα του είμαι πάντα ευγνώμων για την αμέριστη υποστήριξή του όλο αυτό το διάστημα, το οποίο αν και δύσκολο, ήταν ιδιαίτερα εποικοδομητικό.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Α. Ρέκκα, αναπληρωτή ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, του οποίου ο ρόλος ήταν καταλυτικός για την επιστημονική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και για την κατανόηση των μηχανισμών του υπό μελέτη συστήματος. Η συμβολή του στην απόκτηση κριτικής σκέψης και στην διαχείριση διαφόρων επιστημονικών εμποδίων ήταν καθοριστική.

Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Ιωάννη Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής, για την καθοδήγησή του στην διεξαγωγή των γενετικών πειραμάτων και την διάθεση όλου του εργαστηριακού του εξοπλισμού.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου της Γάνδης, κα Ann Van Soom, η οποία δέχτηκε τη συνεργασία μας και την διεξαγωγή μέρους των πειραμάτων αυτής της διατριβής στο εργαστήριό της, καθώς και των μελών του εργαστηρίου αυτού και μετέπειτα φίλων μου, Sonia, Bart, Eline και Petra, οι οποίοι με βοήθησαν στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και μου συμπαραστάθηκαν σε όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο Βέλγιο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην συνεργάτιδα και φίλη, Λένα Ντόβολου για την βοήθειά της στην εκμάθηση των μεθόδων της εξωσωματικής, την πρακτική και κυρίως την ηθική συμπαράστασή της, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της που πολλές φορές βοήθησαν στο να ξεπερνάω τα όσα εμπόδια προέκυπταν. Επίσης, ευχαριστώ τον συνάδελφο και φίλο, Θωμά Χουζούρη για την τεράστια υπομονή του και την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους παρακάτω ανθρώπους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής:

Την κα Αικατερίνη Θεοδοσιάδου, Επίκουρη Καθηγήτρια της Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη βοήθειά της στην πραγματοποίηση των ενζυμικών αναλύσεων και την ηθική συμπαράστασή της.

Την κ.α Σ. Μπουκουβάλα και τον κ. Γ. Φακή, Επικουρικούς Καθηγητές του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, οι οποίοι με δέχτηκαν χωρίς δεύτερη σκέψη στο εργαστήριό τους, παραχωρώντας μου απλόχερα την τεχνογνωσία και την επιστημονική τους γνώση σε θέματα Γενετικής και έκφρασης των γονιδίων.

Τον κτηνίατρο κ. Σάκη Κουκούλη, για την έγκαιρη ενημέρωση και τη διευκόλυνση της πρόσβασής μου στο σφαγείο της Καρδίτσας.

Τον κ. Κώστα Παπαθεοχάρη για την τεράστια βοήθεια, την υπομονή και, πάντα, την καλή του διάθεση κατά τη συλλογή των ωοθηκών.

Ευχαριστώ πολύ του φίλους μου, που είτε γνώστες ή μη του αντικειμένου μου, στέκονταν πάντα στο πλευρό μου και συνέβαλλαν συνεχώς στη διατήρηση της απαιτούμενης ισορροπίας κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη και ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και τον αδελφό μου, που χωρίς την αγάπη τους και τη συνεχή κατανόηση, η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν εφικτή.

Ευχαριστώ πολύ το σύντροφό μου Γιάννη Καρελά, ο οποίος πολύ υπομονετικά στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες και τις ευχάριστες στιγμές της σταδιοδρομίας μου· η βαθειά του πίστη σε μένα και η συνεχής ενθάρρυνση όλων των προσπαθειών μου ήταν καταλυτικές, ώστε να ξεπερνάω όλα τα εμπόδια και να συνεχίζω με χαμόγελο την κάθε ημέρα.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<i>Σελίδα</i>
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	10
ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	10
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ.....	11
Πλήρεις ερευνητικές εργασίες που έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή περιοδικά	11
Ανακοινώσεις σε Διεθνή και Εθνικά Συνέδρια	11
ABSTRACT	13
ADVISORY COMMITTEE	17
EXAMINATION BOARD	17
Ευχαριστίες	18
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	25
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	28
1.1 ΤΟ ΙΝΩΔΟΛΥΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ Ή ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ / ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ	28
1.1.1 Το Προένζυμο Πλασμινογόνο (Plasminogen, PLG)	29
1.1.2 Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (Plasminogen activators, PAs)	31
1.1.2.α Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (tissue-type plasminogen activator, t-PA)	32
1.1.2.β Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (urokinase-plasminogen activator, u-PA)	33
1.1.2.γ Υποδοχέας του u-PA (receptor of urokinase plasminogen activator, u-PAR)	34
1.1.3 Πλασμίνη (Plasmin, PL).....	36
1.1.4 Αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL (PAIs - PIs)	38
1.1.4.α Αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen activator inhibitors, PAIs)	38
Ο αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-1 ή ενδοθηλιακής προέλευσης (PAI-1)	38
Ο αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-2 (PAI-2)...	39
Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-3 ή	

πρωτεΐνης C (PAI-3 ή PCI)	39
Πρωτεΐνωση Νεξίνη-1 (Protase Nexin-1 ή PN-1)	40
1.1.4.β Αδρανοποιοί της πλασμίνης (Plasmin inhibitors, PIs)	40
1.1.4.γ Συνθετικοί (<i>in vitro</i>) αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL.....	41
1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ PAs / PL ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ...	42
1.2.1 Συμμετοχή του συστήματος PAs / PL στην ωοθυλακιορρηξία	42
1.2.2 Συμμετοχή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στη γονιμοποίηση του ωαρίου	44
1.2.3 Ο ρόλος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου κατά την ανάπτυξη του εμβρύου	46
1.3 IN VITRO ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ (IN VITRO EMBRYO PRODUCTION, IVP)	48
1.3.1 Πλεονεκτήματα χρήσης των βοοειδών ως ζώο-μοντέλο για τη μελέτη της αναπαραγωγής	50
1.3.2 Εκτίμηση της ποιότητας των <i>in vitro</i> παραγόμενων εμβρύων	51
1.3.2.α Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού της ποιότητας των εμβρύων.	53
1.3.3 Στάδια ανάπτυξης του εμβρύου και γονίδια-μάρτυρες της ποιότητάς του που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα	58
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	67
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	69
2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	69
2.2 ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ (IN VITRO EMBRYO PRODUCTION, IVP)	69
2.2.1 Συλλογή Ωοθηκών – Ωαρίων	69
2.2.2 <i>In vitro</i> ωρίμανση ωαρίων (<i>In vitro</i> Maturation, IVM)	71
2.2.3 Επεξεργασία σπέρματος και ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων	72
2.2.4 <i>In vitro</i> γονιμοποίηση (<i>In vitro</i> Fertilization, IVF)	75
2.2.5 <i>In vitro</i> καλλιέργεια (<i>In vitro</i> Culture, IVC) των εμβρύων	75
2.2.6 Προετοιμασία μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells monolayer)	76
2.2.7 Ταχεία κατάψυξη και αποθήκευση μοριδίων ή/και βλαστοκύστεων για μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης	77
2.2.8 Διατήρηση των υποστρωμάτων IVF ή IVC στους – 20 °C για τον	

προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών τους (PAI)	78
2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΈΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real-time PCR).....	78
2.3.1. Στάδιο 1 ^ο : Απομόνωση RNA (RNA isolation) και δράση της δεοξυριβονουκλεάσης I (DNase I) για εξάλειψη εξωγενούς DNA στα δείγματα εμβρύων	78
2.3.2. Στάδιο 2 ^ο : Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (Reverse Transcription of RNA into cDNA)	79
2.3.2.α Προετοιμασία πηκτής αгарόζης- Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....	80
2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών (primers)	82
2.3.4 Μελέτη της σταθερότητας και επιλογή γονιδίων αναφοράς (reference genes / housekeeping genes, HK genes) για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης	82
2.3.5 Στάδιο 3 ^ο : Εκτίμηση της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων με τη βοήθεια της real-time PCR	83
2.4 ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	87
2.4.1 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Activity, PAA)	87
2.4.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibition, PAI)..	88
2.5 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (DIFFERENTIAL CELL STAINING) ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	89
2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	91
2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	92
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	94
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ <i>IN VITRO</i> ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ t-PA (500 IU/ML). ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IVP ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	94

3.1.1 Επίδραση της προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl στο υπόστρωμα της IVF στα αποτελέσματα της IVP	94
3.1.2 Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος της IVF με την προσθήκη t-PA, ε-ACA και συνδυασμού t-PA με ε-ACA, στα αποτελέσματα της IVP	95
3.1.3 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων της ποιότητας των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7)	96
3.1.4 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων της ποιότητας των εμβρύων πρώιμου σταδίου [μορίδια ημέρας 3 και 4 (D3 και D4)]	98
3.1.5 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών (PAI) τους στα υποστρώματα (spent media) της IVF	100
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ u-PA (5 IU/ML), ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΟΧΙ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΩΟΦΟΡΟΥ ΔΙΣΚΟΥ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IVP ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	102
3.2.1 Πείραμα 2.α: Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος IVC με την προσθήκη u-PA, χωρίς την παρουσία ορού και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων	102
3.2.2 Πείραμα 2.β: Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος IVC με την προσθήκη u-PA, παρουσία ορού και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων	103
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
4.1 Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με προσθήκη t-PA.	107
4.2 Τροποποίηση του υποστρώματος της καλλιέργειας με προσθήκη u-PA.	113
4.3 Γενική Συζήτηση	119
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	125
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, η μεταφορά εμβρύων (embryo transfer, ET) στα βοοειδή και η διάθεσή τους με σκοπό την ταχεία γενετική βελτίωση των πληθυσμών, έχει εξελιχθεί σε ένα ταχύτατα διογκούμενο επιστημονικό πεδίο και ταυτόχρονα έχει προσελκύσει τεράστιο εμπορικό ενδιαφέρον. Σύμφωνα με την επιτροπή ανάκτησης δεδομένων και στατιστικής της διεθνούς κοινότητας μεταφοράς εμβρύων (International Embryo Transfer Society, IETS), το 2011, η ετήσια παγκόσμια παραγωγή των μεταφέρσιμων εμβρύων βοοειδών ανερχόταν στις 921836. Η κύρια μέθοδος παραγωγής εμβρύων ακολουθεί την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και την *in vivo* διατραχηλική συλλογή των εμβρύων την 6^η -7^η ημέρα μετά την τεχνητή σπερματέγχυση. Τα συλλεγόμενα έμβρυα βρίσκονται στο στάδιο του μοριδίου ή της νεαρής βλαστικής κύστης (βλαστοκύστης), και μεταφέρονται διατραχηλικά -νωπά ή και καταψυγμένα/αποψυχθέντα- σε συγχρονισμένες δέκτριες (Gordon, 1994). Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα παραγωγής υγιών εμβρύων μεγάλης γενετικής αξίας, με ελαχιστοποιημένο τον κίνδυνο μεταφοράς παθογόνων παραγόντων από το έμβρυο στην αγελάδα, διασφαλίζεται η πώληση κρυοδιατηρημένων εμβρύων από χώρα σε χώρα, και παρακάμπτονται πολλά συνοδά προβλήματα σχετικά με την ευζωία των ζώων. Με τη μεταφορά των εμβρύων επιτυγχάνεται επιτάχυνση του ρυθμού γενετικής βελτίωσης, μέσω της σύμπτυξης του μεσοδιαστήματος γενεών των ζώων υψηλής γενετικής αξίας. Πέραν της εμπορικής αξιοποίησης των εμβρύων, οι μέθοδοι και οι διαδικασίες παραγωγής τους συντελούν και στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών της αναπαραγωγής, όπως είναι ο προεμφυτευτικός έλεγχος, ο προσδιορισμός του φύλου των εμβρύων, η ανάπτυξη νέων μεθόδων κρυοδιατήρησης κλπ (Gordon, 1994).

Παγκοσμίως, το 15% των εμβρύων που προορίζονται προς μεταφορά, προέρχονται από εξωσωματική (*in vitro*) μέθοδο παραγωγής. Το 2012, σε 20 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, από τα 93291 έμβρυα που μεταφέρθηκαν, τα 9409 παράχθηκαν *in vitro*, εκ των οποίων τα 2357 είχαν προηγουμένως καταψυχθεί [δεδομένα από 29th Annual Meeting A.E.T.E. (European Embryo Transfer Society) – Istanbul, Turkey, 6th – 7th September 2013].

Από πολύ νωρίς έγινε αντιληπτό ότι η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών της γονιμοποίησης των θηλαστικών θα διευκολυνόταν με την *in vitro* μελέτη του παραπάνω φαινομένου. Απαραίτητη προϋπόθεση για αυτό είναι να αναπτυχθούν οι κατάλληλες συνθήκες *in vitro*, οι οποίες θα προσομοιάζουν σε εκείνες του ωαγωγού και θα επιτρέπουν τη διατήρηση των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων στην πλήρη λειτουργική τους κατάσταση. Η συλλογή των ανώριμων ωαρίων από ωοθήκες δότριων διαφορετικής ηλικίας ή φάσης του οιστρικού κύκλου αποτελεί μια εξαιρετική πηγή εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων για ερευνητικούς, κατά κύριο λόγο, σκοπούς (Galli και Lazzari, 1996). Εκτός από τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού εμβρύων, η μέθοδος αυτή, απλοποιεί όλα τα βήματα της παραγωγής, ταυτοποίησης και κρυοδιατήρησης των εμβρύων, καθιστώντας το κόστος παραγωγής τους σχετικά χαμηλό. Η συνεχής πρόοδος της τεχνολογίας της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (*in vitro* embryo production, IVP) και των συναφών τεχνολογιών της αναπαραγωγής, σε συνδυασμό με τη μοριακή βιολογία, άνοιξε νέους ορίζοντες στη βιοτεχνολογία της αναπαραγωγής. Η IVP, πέρα από τις σημαντικές της εφαρμογές, αποτελεί και ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο της βασικής έρευνας. Τέλος, η αξιοποίηση των μοντέλων των ζώων (animal models), επιτρέπει τη βελτίωση του σχεδιασμού και την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, την προεμφυτευτική διάγνωση και την πρόληψη ασθενειών του ανθρώπου.

Ωστόσο, παρόλη την τεράστια πρόοδο που σημειώνει η IVP, ένα μεγάλο ποσοστό ωαρίων ή/και εμβρύων βοοειδών διακόπτουν την εξέλιξή τους κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της (Loneragan και συν., 2003α). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ποσοστό των εμβρύων που είναι κατάλληλα προς μεταφορά να είναι τελικά λιγότερο από 40% του αρχικού αριθμού των ωαρίων που χρησιμοποιούνται στην IVP.

Πληθώρα παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας της IVP. Ως τέτοιοι θεωρούνται η κατάσταση της δότριας, η ποιότητα των ωαρίων, καθώς και οι γενικές συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων (Faber και συν., 2003). Είναι γνωστό ότι τα *in vivo* παραγόμενα έμβρυα διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης σε σχέση με αυτά που παρήχθησαν *in vitro* (Loneragan και συν., 2003α). Παρά την τεράστια πρόοδο της IVP, υπάρχουν ακόμα αρκετοί τομείς της, οι οποίοι χρήζουν περαιτέρω βελτίωσης. Ενδεικτικά αναφέρονται, καινοτόμες μέθοδοι κατάψυξης των ωαρίων και εμβρύων (Vajta, 2000· Rodriguez και Farin, 2004), η

χρήση των υποστρωμάτων καλλιέργειας καθορισμένης σύστασης – χωρίς την παρουσία ορού – (Yamashita και συν., 1999), η διερεύνηση των παραγόντων που θα οδηγήσει σε βελτίωση της ποιότητας των ωαρίων και η καλλιέργεια των ωοθυλακίων αρχικών σταδίων ανάπτυξης (Gutierrez και συν., 2000). Η δυναμική επίδραση του περιβάλλοντος των διαφόρων ανατομικών περιοχών του γεννητικού συστήματος του θηλυκού, σε αντίθεση με το στατικό *in vitro* περιβάλλον, μέσα στο οποίο καλλιεργούνται τα έμβρυα, οδήγησε στη συνεχή έρευνα για βελτίωση των *in vitro* συνθηκών καλλιέργειας. Έτσι, έχει γίνει πλέον αποδεκτή η χρήση των διαδοχικών υποστρωμάτων (sequential media), η χρήση των υποστρωμάτων καθορισμένης σύστασης [(semi-) defined media], αλλά και η τροποποίησή τους, εξωγενώς, με ουσίες, οι οποίες φυσιολογικά παρέχονται *in vivo* στο γεννητικό σύστημα και εκλείπουν από τα *in vitro* θρεπτικά υποστρώματα. Μεταξύ αυτών των ουσιών περιλαμβάνεται και το σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης, του οποίου τα μέλη κατέχουν σημαντικό ρόλο σε πολλά από τα στάδια της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Στόχος της βελτίωσης των αποδόσεων της IVP δεν είναι μόνο η αύξηση του ρυθμού παραγωγής των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων, αλλά και η βαθύτερη κατανόηση των φυσιολογικών διεργασιών της αναπαραγωγής, από το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων έως και την εγκατάσταση των εμβρύων.

1 . Ε Ι Σ Α Γ Ω Γ Η

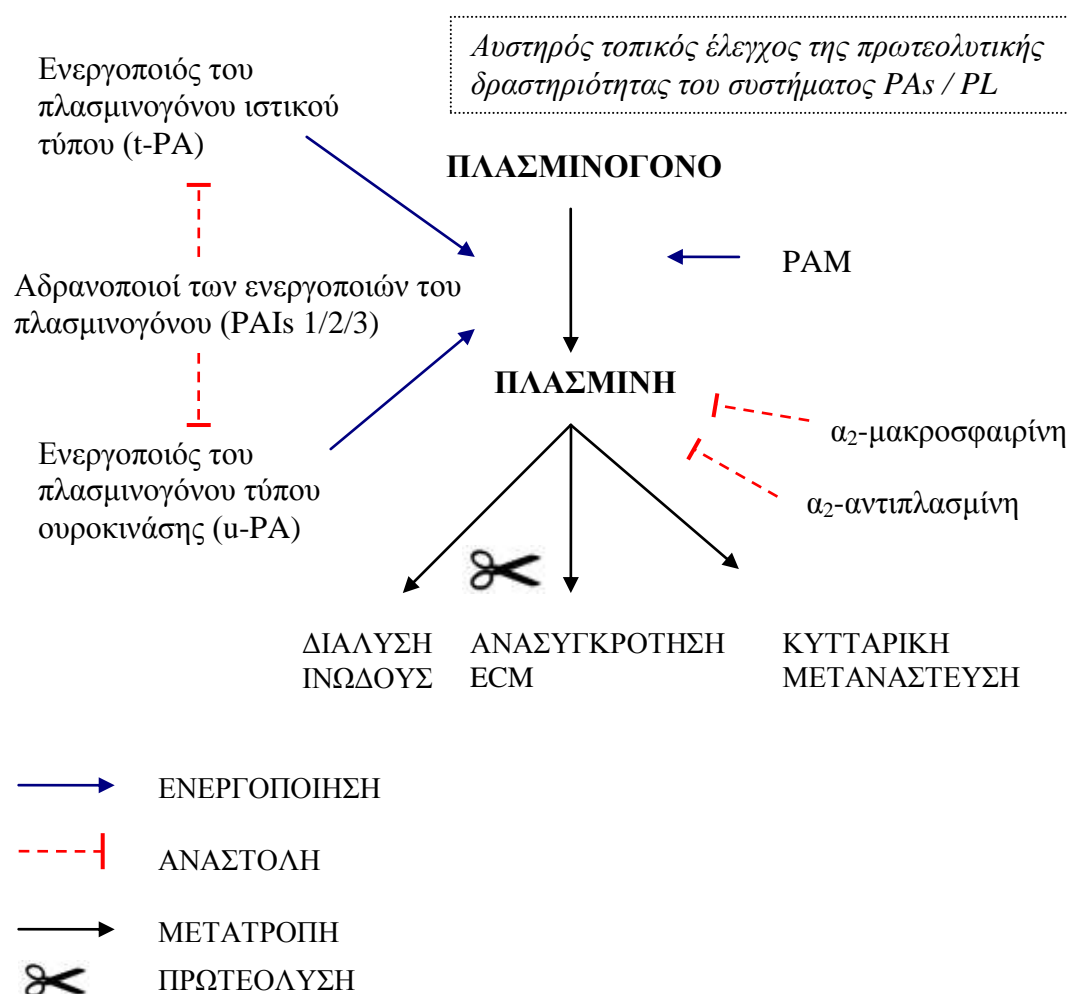
1.1 ΤΟ ΙΝΩΔΟΛΥΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ Ή ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ / ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ

Το ενζυμικό σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης (Plasminogen Activators / Plasmin system, PAs / PL system), είναι ένα πρωτεολυτικό σύστημα που συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Ονομάζεται και ινωδολυτικό σύστημα, λόγω του σημαντικότητας ρόλου του στην αποδόμηση του ινώδους (Collen, 1980· Σμοκοβίτης, 2014) και επομένως στην αιμοστατική ισορροπία του οργανισμού. Πέραν της ινωδόλυσης, ο ρόλος του συστήματος είναι σημαντικός σε όλες εκείνες τις φυσιολογικές ή παθολογικές διεργασίες, οι οποίες απαιτούν ελεγχόμενη και τοπική εξωκυτταρική πρωτεόλυση, όπως εκείνες που σχετίζονται με την ανασυγκρότηση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας-συνδετικού ιστού, καθώς και με τη μετανάστευση, αναγέννηση, πολλαπλασιασμό ή/και διαφοροποίηση στο επίπεδο των κυττάρων ή των ιστών (Danø και συν., 1985· Saksela, 1985· Σμοκοβίτης, 2014).

Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των μελών του συστήματος αυτού έχει διαπιστωθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως σε καρδιαγγειακές ανωμαλίες (Blombäck, 1996), σε φλεγμονές (Del Rosso και συν., 2011), σε μεταστάσεις νεοπλασματικών κυττάρων (Kwaan και McMahon, 2009), σε εκφυλιστικές αλλοιώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, σε περιπτώσεις υπογονιμότητας (Ebisch και συν., 2008) κ.ά.

Κεντρικό συστατικό του συστήματος είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, το πλασμινογόνο, το οποίο συντίθεται και απελευθερώνεται κυρίως από το ήπαρ. Το πλασμινογόνο είναι ένα ανενεργό προένζυμο που βρίσκεται σε αφθονία στο πλάσμα του αίματος και στα υπόλοιπα εξωκυτταρικά υγρά. Η συντονισμένη λειτουργία του συστήματος περιλαμβάνει τη μετατροπή του πλασμινογόνου στην ενεργή του μορφή, την πλασμίνη, η οποία είναι ένα ισχυρότατο πρωτεολυτικό ένζυμο της κατηγορίας της θρυψίνης. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με τη δράση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Saksela, 1985). Υπάρχουν δύο τουλάχιστον πολύ καλά χαρακτηρισμένοι τύποι του ενεργοποιού του πλασμινογόνου, ο ενεργοποιός του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (tissue-type plasminogen activator, t-PA) και ο

ενεργοποιός του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (urokinase-type plasminogen activator, u-PA) (Saksela, 1985). Η πρωτεολυτική δραστηριότητα του συστήματος ελέγχεται τοπικά από διάφορες ανασταλτικές ουσίες (αδρανοποιοί) που δρουν είτε στο επίπεδο των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitors, PAIs), είτε στο επίπεδο της πλασμίνης (plasmin inhibitors, PIs) (Saksela, 1985· Sprengers και Kluft, 1987). Η ρύθμιση της δραστηριότητας των μελών του συστήματος PAs / PL για τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη περιγράφονται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Το πρωτεολυτικό σύστημα ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης. **ECM:** εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM), **PAM:** πρωτεΐνη του *Streptococcus pyogenes* (plasminogen-binding group A streptococcal M protein).

1.1.1 Το Προένζυμο Πλασμινογόνο (Plasminogen, PLG)

Το γονίδιο του ανθρώπινου πλασμινογόνου εντοπίζεται στο 6^ο χρωμόσωμα και κωδικοποιεί πρωτεΐνη που αποτελείται από 810 αμινοξέα (NP_000292.1) και έχει

μοριακό βάρος 91 kDa. Το γονίδιο του βόειου πλασμινογόνου (*PLG*) εντοπίζεται στο 9^ο χρωμόσωμα (Εικόνα 2) και μεταφράζεται στην πρόδρομη μορφή του πλασμινογόνου, η οποία αποτελείται από 812 αμινοξέα (NP_776376) και έχει μοριακό βάρος 92 kDa. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη, η δομή της οποίας περιλαμβάνει 5 συντηρημένες συμπαγείς και αυτοτελείς δομικές περιοχές (επικράτειες, domains) τύπου Kringle, μία επικράτεια PAN-APPLE (πρόσδεσης του συνδέτη) και μία επικράτεια με ενεργότητα S1 πεπτιδάσης. Οι δομές Kringle είναι ολιγοπεπτίδια, τα οποία εξυπηρετούν την πρόσδεση του πλασμινογόνου με μεγαλομοριακά (ινώδες, βακτηριακές πρωτεΐνες και κυτταρικές μεμβράνες), αλλά και άλλα υποστρώματα (C1 και αμινοξέα) βοηθώντας στην ενεργοποίησή του στη δραστική πρωτεΐνάση πλασμίνη. Η αποκωδικοποίηση του βόειου γονιδιώματος αποκάλυψε πολλές ομοιότητες σε λειτουργικές και σε δομικές περιοχές ανάμεσα στο βόειο και το ανθρώπινο πλασμινογόνο (Schaller και συν., 1985). Σε αντίθεση με το βόειο, μία σημαντική διαφορά είναι η δυνατότητα ενεργοποίησης του ανθρώπινου πλασμινογόνου σε πλασμίνη από τη στρεπτοκινάση, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Wulf και Mertz, 1969). Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να αποδοθεί στις μικρές διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων του πλασμινογόνου μεταξύ των δύο ειδών.

Η πρόδρομη μορφή του βόειου πλασμινογόνου διατηρείται στην κυκλοφορία με τη μορφή Asp-plasminogen, αντί Glu-plasminogen του ανθρώπου, καθώς στο αμινοτελικό του άκρο φέρει ασπαρτικό οξύ αντί για γλουταμινικό οξύ. Η πλασμίνη με τη σειρά της διασπώντας τον δεσμό Lys⁷⁷-Arg⁷⁸ μετατρέπει το Asp-plasminogen σε Arg-plasminogen (Schaller και συν., 1985). Μετά τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του πλασμινογόνου γίνεται ενεργοποίησή του σε πλασμίνη μέσω διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού μετά την Arg⁵⁸³ (παρουσία αδρανοποιών) και μέσω προσθήκης N-ακετυλογλυκοζαμινών σε κατάλοιπα Asn, Ser και Thr (γλυκοζυλίωση), με αποτέλεσμα να προκύπτει μία δομή δύο αλυσίδων, οι οποίες συνδέονται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (Schaller και συν., 1985). Η διάσπαση αυτή προκύπτει με τη βοήθεια των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (u-PA και t-PA), αλλά μπορεί να προκύψει και από ορισμένες βακτηριακές πρωτεΐνες, όπως η PAM (plasminogen-binding group A streptococcal M protein) του *Streptococcus pyogenes* (Berge και Sjöbring, 1993) (Εικόνα 1).

Εκτός από το ήπαρ, το πλασμινογόνο παράγεται στους όρχεις (Saksela και Vihko, 1986) και στα κύτταρα της επιδερμίδας (Isseroff και Rifkin, 1983). Πέραν των

ενεργοποιών του, το πλασμινογόνο συνδέεται, επίσης, με πολλά μόρια πρωτεϊνικής φύσης, όπως η λαμινίνη, η ινοδονεκτίνη, το ινώδες, η θρομβοσπονδίνη, η τετρανεκτίνη, η κυτοκερατίνη κ.ά. Οι υποδοχείς του πλασμινογόνου εκφράζονται στην επιφάνεια κυττάρων του αίματος (Miles και Plow, 1987· Silverstein και συν., 1988) και του ενδοθηλίου (Hajjar και συν., 1986). Οι δύο κύριοι υποδοχείς του είναι η α-ενολάση (Miles και συν., 1991) και η ανεξίνη-II (Hajjar και συν., 1994). Σε αντίθεση με την ελεύθερη πλασμίνη, η ειδική πρόσδεση του πλασμινογόνου στον κυτταρικό του υποδοχέα και η τοπική παραγωγή της πλασμίνης ευνοεί την μεταβίβαση της δραστηριότητας απευθείας στο κύτταρο και αποτρέπει την πιθανή απενεργοποίηση της πλασμίνης από ειδικούς αναστολείς (Ellis και συν., 1990).

Πειράματα σε μύες, στους οποίους αφαιρέθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το πλασμινογόνο, απέδειξαν ότι η έλλειψη του γονιδίου αυτού δεν επηρεάζει την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των εμβρύων και την ικανότητα για αναπαραγωγή. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα ζώα αντιμετωπίζουν σοβαρά προβλήματα: θρομβώσεων, δυσλειτουργίας διαφόρων οργάνων, μειωμένης ικανότητας επούλωσης τραυμάτων του δέρματος και αυξημένη νοσηρότητα (Bugge και συν., 1995).

1.1.2 Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (Plasminogen activators, PAs)

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου είναι ειδικές πρωτεΐνες σερίνης, οι οποίες μετατρέπουν το προένζυμο πλασμινογόνο στο δραστικό ένζυμο πλασμίνη (Collen, 1980· Saksela, 1985). Στον οργανισμό των θηλαστικών απαντούν δύο τουλάχιστον τύποι ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (t-PA) και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (u-PA), οι οποίοι διαφέρουν τόσο στη δομή τους όσο και στη λειτουργία τους (Danø και συν., 1985). Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου έχουν απομονωθεί σχεδόν από όλα τα κύτταρα του οργανισμού και απαντούν σε όλα τα υγρά του σώματος, τις εκκρίσεις και τις απεκκρίσεις. Ένας τύπος κυττάρου μπορεί να συνθέτει τον έναν από τους δύο ή και τους δύο τύπους των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Η σύνθεση και η απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από ποικίλους φυσιολογικούς ή παθολογικούς παράγοντες. Το ίδιο το κύτταρο, επίσης, μπορεί να συνθέτει και να παράγει και αδρανοποιητές των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, οι οποίοι μπορούν να επηρεάζονται από διάφορους

φυσιολογικούς ή/και παθολογικούς παράγοντες, ακόμη και ανεξάρτητα από τους ενεργοποιούς που συνθέτει και παράγει το κύτταρο.

1.1.2.α Ενεργοποιός του πλασμινογόνου του ιστικού τύπου (*tissue-type plasminogen activator, t-PA*)

Ο t-PA του ανθρώπου αποτελείται από 530 αμινοξέα. Το γονίδιο για τη σύνθεσή του εντοπίζεται στο 8^ο χρωμόσωμα και απομονώθηκε για πρώτη φορά από ενδοθηλιακά κύτταρα. Στα βοοειδή, το γονίδιο του t-PA (*PLAT*) εντοπίζεται στο 27^ο χρωμόσωμα του γονιδιώματος (Εικόνα 2), από το οποίο παράγεται ένα και μόνο μετάγραφο και προκύπτει μια πρωτεΐνη 566 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί πρόδρομη μορφή του ώριμου και ενεργού ενζύμου t-PA, το οποίο είναι ένα ετεροδιμερές δύο αλυσίδων (Α και Β) ενωμένων με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Η τριτοταγής δομή του t-PA διαφέρει κατά πολύ από αυτή του u-PA. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Α αλυσίδα) φέρει μία επικράτεια τύπου δακτύλου (*finger domain*) ακολουθούμενη από μία επικράτεια τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και στο τέλος δύο Kringle επικράτειες. Το καρβοξυτελικό του άκρο περιέχει την επικράτεια με ενεργότητα πρωτεϊνάση σερίνης, καθώς και ο t-PA αποτελεί μέλος της οικογένειας των S1 πεπτιδασών και είναι μια πρωτεϊνάση σερίνης (Ny και συν., 1984).

Μέχρι σήμερα, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος υψηλής συγγένειας υποδοχέας του t-PA στην κυτταρική μεμβράνη. Υποδοχείς του t-PA μπορεί να αποτελέσουν πολυάριθμες πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης (Myöhänen και Vaheri, 2004). Έχει βρεθεί ότι, ο t-PA προσδένεται στο ινώδες λόγω υψηλής συγγένειας. Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση τέτοιας συγγένειας έχουν οι επικράτειες δακτύλου και Kringle (Collen, 1999). Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου μέσω του t-PA μπορεί να πραγματοποιηθεί 100 φορές πιο δραστικά όταν γίνεται παρουσία ινώδους (Collen, 1999). Συνεπώς, το ινώδες μπορεί να θεωρηθεί ένας παράγοντας που συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα του t-PA. Έχουν αναφερθεί και άλλα σημεία πρόσδεσης του t-PA, όπως σε ηπατοκύτταρα τρωκτικών (Bakhit και συν., 1987), στον εγκέφαλο μυών (Verrall και Seeds, 1989), σε ανθρώπινες καλλιέργειες κυττάρων του ενδοθηλίου (Fukao και συν., 1997), αλλά και σε εμβρυϊκά κύτταρα πρώιμων εμβρύων μυών (Carroll και συν., 1993).

1.1.2.β Ενεργοποιός του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (*urokinase-plasminogen activator, u-PA*)

Ο u-PA του ανθρώπου αποτελείται από 411 αμινοξέα. Το γονίδιο για τη σύνθεσή του εντοπίζεται στο 10^ο χρωμόσωμα και απομονώθηκε πρώτη φορά από το ούρο (ουροκινάση). Στα βοοειδή, το γονίδιο του u-PA (*PLAU*) εντοπίζεται στο 28^ο χρωμόσωμα (Εικόνα 2). Από το *PLAU* προκύπτει ένα και μόνο μετάγραφο 11 εξονίων, τα οποία κωδικοποιούν mRNA μήκους 2355 ζευγών βάσεων (Ravn και συν., 1995). Στα βοοειδή, το *PLAU* είναι συντηρημένο (conserved) με άλλους οργανισμούς όπως του ανθρώπου, του χιμπατζή, του πιθήκου Rhesus, του σκύλου, του μυός, του επίμου, της όρνιθας αλλά και του ψαριού-ζέβρα (zebrafish, *Danio rerio*). Στα βοοειδή, το mRNA του *PLAU* μεταφράζεται σε μία μονόκλωνη πεπτιδική αλυσίδα 433 αμινοξέων, η οποία αποτελεί το προένζυμο του u-PA (pro-uPA). Το μονόκλωνο πολυπεπτίδιο, pro-uPA, αμέσως μόλις εκκριθεί, συνδέεται στον υποδοχέα του u-PA (u-PAR), διασπάται από την πλασμίνη (Danø και συν., 1985· Tapiovaara και συν., 1993) και, τελικά, παράγεται η ενεργή μορφή του ενζύμου, ο u-PA. Ο u-PA έχει μοριακό βάρος 50 kDa και αποτελείται από δύο αλυσίδες (A και B), οι οποίες ενώνονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων έδειξαν ότι η ενεργοποίησή του μπορεί, επίσης, να προκληθεί και από άλλες πρωτεΐνες, όπως η καλλικρεΐνη του πλάσματος του αίματος, ο παράγοντας πήξης του αίματος XIIa και οι καθεψίνες (Andreassen και συν., 1997). Ωστόσο, η δράση αυτών των πρωτεϊνών, *in vivo*, δεν έχει ακόμα πλήρως διασαφηνιστεί και η πιθανή ενεργοποιητική τους δράση παραμένει ακόμα ασαφής. Σε αντίθεση με την ενεργή μορφή του u-PA, το pro-uPA διαθέτει λίγη ή και καθόλου πρωτεολυτική δραστηριότητα στα συνηθισμένα υποστρώματα πλασμινογόνου (Petersen και συν., 1988).

Η τεταρτοταγής δομή του u-PA περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές επικράτειες. Στο αμινοτελικό άκρο της A αλυσίδας παρατηρείται μία επικράτεια όμοια με αυτή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, δίπλα στην οποία υπάρχει μία Kringle επικράτεια (Blasi και συν., 1987). Αυτές οι δύο δομές είναι γνωστές και ως αμινοτελικό τμήμα (amino terminal fragment, ATF). Στον άνθρωπο, στο τμήμα αυτό, το οποίο είναι μη καταλυτικό, έχει εντοπιστεί το σημείο πρόσδεσης του ενζύμου στον υποδοχέα του (Appella και συν., 1987). Στο καρβοξυτελικό τμήμα του ενζύμου (B αλυσίδα) εντοπίζεται η επικράτεια της πρωτεΐνάσης σερίνης. Όπως και η πλασμίνη, ο u-PA ανήκει στην οικογένεια των S1 πεπτιδασών και είναι μια πρωτεΐνάση σερίνης. Πέρα από το πλασμινογόνο, ο u-PA ενεργοποιεί τον αυξητικό παράγοντα των

ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF), ενώ έχει τη δυνατότητα να διασπά και να ενεργοποιεί τον ίδιο τον αναστολέα του, τον PAI-1 (Nielsen και συν., 1986· Naldini και συν., 1992).

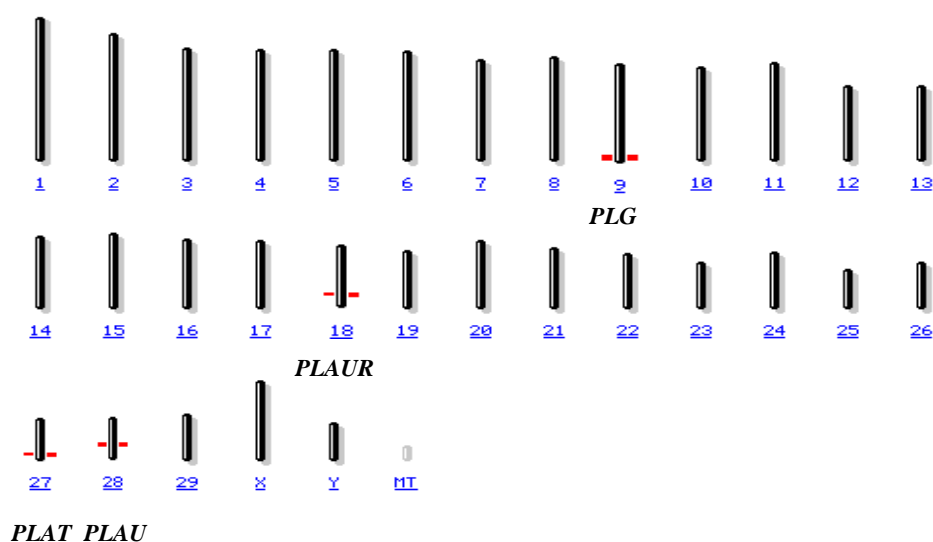
Ο u-PA σχετίζεται με αρκετές φυσιολογικές ή/και παθολογικές διεργασίες, όπως εκφυλιστικές αλλοιώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, φλεγμονές και νεοπλασίες. Στον άνθρωπο, έχει διαπιστωθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα (μαστός, έντερο, ωοθήκες, τράχηλος, ενδομήτριο, ουροδόχος κύστη, νεφρός και εγκέφαλος) παρατηρείται υπερέκκριση του u-PA σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα (Andreassen και συν., 1997). Σε καλλιέργειες κυττάρων με κακοήθεια διαπιστώθηκε ότι ο προσδεδεμένος στον υποδοχέα του u-PA, σε αντίθεση με τον ελεύθερο u-PA, προάγει την αποδόμηση της βασικής μεμβράνης (Cohen και συν., 1991) και τη διείδυση των καρκινικών κυττάρων (Ossowski και συν., 1991).

1.1.2.γ Υποδοχέας του u-PA (receptor of urokinase plasminogen activator, u-PAR)

Στον άνθρωπο, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του u-PA βρίσκεται στο 19^ο χρωμόσωμα, αποτελείται από 11 εξώνια και από αυτό προκύπτουν 16 εναλλακτικά μετάγραφα. Η πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης που μεταφράζεται αποτελείται από 355 αμινοξέα. Στα βοοειδή, το γονίδιο του υποδοχέα του u-PA (*PLAUR*) εντοπίζεται στο 18^ο χρωμόσωμα (Εικόνα 2), από το οποίο παράγεται ένα και μόνο μετάγραφο 7 εξονίων. Στη συνέχεια, μεταφράζεται σε μία πρόδρομη πρωτεΐνη 330 αμινοξέων, η οποία ωριμάζει με τη διάσπαση ενός εικοσαπεπτιδίου. Η ώριμη πρωτεΐνη διαθέτει έξι πιθανές N- θέσεις γλυκοζυλίωσης και είναι πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης (9% της αλληλουχίας) (Reuning και συν., 1993). Πρόκειται για ένα μόριο υψηλής γλυκοζυλίωσης, στο καρβοξυτελικό άκρο του οποίου συνδέεται ομοιοπολικά μία υδρόφοβη δομή γλυκολιπιδίου, η οποία ονομάζεται άγκυρα γλυκοζυλο- φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI anchor) (Krättschmar και συν., 1993). Αυτή η δομή βοηθά στη συγκράτηση του u-PAR στην κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης είναι εκείνη πάνω στην οποία προσδένεται ο u-PA και είναι κατά 54% όμοια με την αντίστοιχη περιοχή του ανθρώπινου u-PAR (Reuning και συν., 1993). Η ειδική πρόσδεση του u-PA στον υποδοχέα του (u-PAR) εμπλέκεται, κυρίως, στη στοχευμένη πρωτεόλυση μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος PAs / PL (Blasi και συν., 1987· Estreicher και συν., 1989). Αν και για πολλά χρόνια επικρατούσε η θεωρία ότι ο υποδοχέας u-PAR

διευκολύνει μόνο την πρόσδεση του u-PA στην κυτταρική μεμβράνη, αποδείχτηκε αργότερα ότι αυτό δεν αποτελεί τη μοναδική λειτουργία του. Εκτός από τον u-PA, ο υποδοχέας αυτός έχει την ικανότητα να προσδένει και άλλα εξωκυτταρικά μόρια, όπως είναι η βιτρονεκτίνη (Wei και συν., 1994) και β_2 -ιντεγκρίνες. Μάλιστα, εκτός από την πρωτεόλυση, μελέτες υποστηρίζουν ότι μέσω της σύνδεσης του u-PA και της βιτρονεκτίνης στον υποδοχέα αυτό επάγεται η ενδοκυτταρική σηματοδότηση, ρυθμίζοντας την προσκόλληση, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Blasi και Carmeliet, 2002).

Η έκφραση του mRNA του u-PAR ανιχνεύθηκε πρωτίστως σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και της έσω και έξω θήκης του ωοθυλακίου. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και του υποδοχέα u-PAR, καθώς και η δραστηριότητα αυτών, διαπιστώθηκε ότι επάγονται μετά από την επίδραση της επεισοδιακής έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο των βοοειδών, με τρόπο ανάλογο του χρόνου και του τύπου δράσης τους. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα παρατηρήθηκαν στον παρακείμενο ωοθηκικό ιστό, μετά από 24^{ωρη} επαγωγή του ωοθυλακίου με γοναδοτρόπες ορμόνες (Dow και συν., 2002).



Εικόνα 2: Χαρτογράφηση των γονιδίων των t-PA (*PLAT*), u-PA (*PLAU*), u-PAR (*PLAUR*) και PLG στα χρωμοσώματα του γονιδιώματος των βοοειδών.

1.1.3 Πλασμίνη (Plasmin, PL)

Η πλασμίνη είναι μια πρωτεΐνωση σερίνης της οικογένειας των S1 πεπτιδωών. Συγκεκριμένα, ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνωών του τύπου της θρυψίνης, οι οποίες διασπούν τον πεπτιδικό δεσμό μετά από αμινοξέα με θετικά φορτισμένες πλάγιες αλυσίδες, όπως η αργινίνη και η λυσίνη. Η ειδικότητά της καθορίζεται από το ασπαραγινικό οξύ που υπάρχει στον πυθμένα της θήκης S1, το οποίο προσβάλλει και σταθεροποιεί την αργινίνη ή τη λυσίνη του υποστρώματος (Berg, 2004).

Η βασική λειτουργία της πλασμίνης είναι η αποδόμηση του ινώδους. Επίσης, δρα ως πρωτεολυτικός παράγοντας σε διαδικασίες, όπως είναι η ανάπτυξη του εμβρύου, η ανακατασκευή/αναδιοργάνωση των ιστών, η νεοπλασματική μετάσταση, η φλεγμονή κ.ά. Κατά την ωοθυλακιωρηξία, η πλασμίνη συντελεί στη λείπτυνση του τοιχώματος του ώριμου γρααφιανού ωοθυλακίου. Ενεργοποιεί τον ενεργοποιό του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης και τις κολλαγενάσες. Διασπά, επίσης, πρωτεΐνες όπως η ινοδονεκτίνη και η λαμινίνη, συντελώντας στην αποκόλληση και στην απόπτωση των κυττάρων. Άλλες πρωτεΐνες στόχοι της είναι το ινώδες, η θρομβοσπονδίνη, καθώς και ο παράγοντας πήξης του αίματος von Willebrand (<http://www.uniprot.org/uniprot/P06868>). Επιπλέον, αποτελεί έμμεσα, βασικό ρυθμιστή της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενεργοποιώντας αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι συντίθενται και εκκρίνονται ως αδρανείς πρόδρομες μορφές πρωτεϊνών (Rifkin και συν., 1990). Μεταξύ άλλων, έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το βασικό ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (basic fibroblast growth factor, bFGF), ο οποίος σχετίζεται με την αγγειογένεση, την αναγέννηση των περιφερικών νεύρων και την επούλωση των τραυμάτων, αλλά και τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού -β (transforming growth factor beta, TGF-β), ο οποίος ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την αγγειογένεση και άλλες διαδικασίες (Taipale και συν., 1992). Η ενεργοποίηση αυτών των αυξητικών παραγόντων αποτρέπεται από ανάλογα της λυσίνης, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τη συμμετοχή του πλασμινογόνου και της πλασμίνης σε αυτή τη διαδικασία. Οι παραπάνω ενεργοποιημένοι παράγοντες με τη σειρά τους συμμετέχουν στην τροποποίηση της κυτταρικής συμπεριφοράς.

Η ενζυμική δραστηριότητα της διαλυτής πλασμίνης στο πλάσμα έχει ένα εξαιρετικά σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής (περίπου 2 ώρες), εξαιτίας της πολύ γρήγορης απενεργοποίησής της από τον αναστολέα της, την α₂-αντιπλασμίνη.

Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε, η πλασμίνη που παράγεται μετά από την πρόσδεση του προενζύμου πλασμινογόνου στον κυτταρικό υποδοχέα, προστατεύεται από τη δράση των εξωκυτταρικών αναστολέων της (Plow και συν., 1986· Hall και συν., 1991). Παρόλα αυτά, είναι γεγονός πως η απομάκρυνση της πλασμίνης που είναι συνδεδεμένη με το κύτταρο, λόγω της χαμηλής της συγγένειας με την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί ταχύτατα την εξουδετέρωσή της από την α₂-αντιπλασμίνη, προσφέροντας έτσι τα πρώτα στοιχεία σχετικά με το βασικό μηχανισμό δράσης και ελέγχου της προσδεδεμένης πλασμίνης (Plow και συν., 1995).

Σημαντικός επίσης θεωρείται ο ρόλος της πλασμίνης στην εντοπισμένη και ελεγχόμενη εξωκυτταρική πρωτεόλυση και συγκεκριμένα στην άμεση ή έμμεση αποδόμηση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας-συνδετικού ιστού. Η εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM), η οποία περιβάλλει τα κύτταρα, είναι υπεύθυνη τόσο για το διαχωρισμό των διάφορων τύπων κυττάρων, όσο και για τη φυσική υποστήριξη των ιστών και των οργάνων. Συγκεκριμένα, η πλασμίνη, η οποία σχηματίζεται τοπικά με την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου του περικυτταρικού υγρού από τους ενεργοποιούς του, μπορεί να προκαλέσει άμεση αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας και έμμεση πρωτεόλυση, εφ' όσον ενεργοποιεί την προκολλαγενάση, οπότε το δραστικό ένζυμο κολλαγενάση αποδομεί το κολλαγόνο και την προελαστίνη και το δραστικό ένζυμο ελαστίνη αποδομεί την ελαστίνη (Σμοκοβίτης, 2014).

Σε στενή συνεργασία με το ενζυμικό σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης φαίνεται να βρίσκονται και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι οποίες εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς. Πρόκειται για ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες στο ενεργό τους κέντρο διαθέτουν κατιόντα ψευδαργύρου. Έχει βρεθεί ότι εκφράζονται, κυρίως, σε περιπτώσεις αρθρίτιδας αλλά και μεταστατικών όγκων (Birkedal-Hansen και συν., 1993). Οι περισσότερες MMPs εκκρίνονται ως πρόδρομες μορφές και η ενεργοποίησή τους απαιτεί την πρωτεολυτική αφαίρεση πεπτιδίου από το αμινοτελικό άκρο εξωκυτταρικά. Η διαδικασία αυτή *in vivo* πραγματοποιείται από άλλες πρωτεϊνάσες, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονται η πλασμίνη και ο u-PA (Kleiner και Stetler-Stevenson, 1993· Okumura και συν., 1997· Monea και συν., 2002). Εκτενής αναφορά πειραμάτων σχετικά με το ρόλο του συστήματος PAs / PL στην ενεργοποίηση των MMPs υποδεικνύουν τη σημαντικότητα του πρώτου (Saksela και Rifkin, 1988· Ny και συν., 2002).

1.1.4 Αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL (PAIs - PIs)

Η ανεξέλεγκτη πρωτεολυτική δραστηριότητα της πλασμίνης μπορεί να απειλήσει τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Ως μία μορφή προστασίας των κυττάρων από την ανεξέλεγκτη πρωτεολυτική δραστηριότητα και για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού, τα κύτταρα εκκρίνουν περίσσεια αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου ή/και πλασμίνης, ώστε να διασφαλιστεί εντοπισμένη και ελεγχόμενη πρωτεόλυση. Γενικότερα, αδρανοποιοί των πρωτεϊνών έχουν ανιχνευθεί σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τα φυτά έως και τον άνθρωπο. Κάποιοι μπορεί να είναι τόσο εξειδικευμένοι, ώστε να απενεργοποιούν μία και μόνο πρωτεΐνη, ενώ άλλοι μπορούν και στοχεύουν σε μία ομάδα πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο, οι αδρανοποιοί των πρωτεϊνών αποτελούν το 10% των πρωτεϊνών του πλάσματος του αίματος (Travis και Salvesen, 1983). Οι αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL μπορούν να παρεμποδίσουν τη δράση, τόσο των ενεργοποιών του πλασμινογόνου όσο και της ίδιας της πλασμίνης, ελέγχοντας έτσι, τόσο την παραγωγή όσο και τη δράση της τελευταίας. Να σημειωθεί ότι διάφοροι παράγοντες, όπως ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες, ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και των αδρανοποιών τους μέσω της τροποποίησης της γονιδιακής τους έκφρασης (Danø και συν., 1985· Hsueh και συν., 1988).

1.1.4.α Αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Plasminogen activator inhibitors, PAIs)

Συνολικά, έχουν εντοπιστεί τέσσερις αδρανοποιοί των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitors, PAIs), οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων των πρωτεϊνών σερίνης (serine protease inhibitors, SERPINs). Οι PAIs φέρουν στο ενεργό τους κέντρο ένα κατάλοιπο αργινίνης και διαφέρουν ως προς την πρόσδεσή τους σε διαφορετικά ένζυμα-στόχους (Vassalli και συν., 1991). Γενικότερα, οι SERPINs είναι ειδικοί αδρανοποιοί με ταχεία δράση που ανιχνεύονται σε αφθονία στα περισσότερα υγρά του σώματος, σε ιστούς και σε κυτταρικές σειρές. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί οι κατωτέρω τέσσερις αδρανοποιοί:

Ο αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-1 ή ενδοθηλιακής προέλευσης (PAI-1): Πρόκειται για τον αδρανοποιό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία έχει υψηλή συγγένεια

τόσο με τον t-PA (πρόδρομη και ώριμη μορφή) όσο και με τον u-PA. Αυτό οφείλεται στο ότι διαθέτει ένα κατάλοιπο αργινίνης στο ενεργό του κέντρο. Εκκρίνεται ως ένας ενεργός αναστολέας πρωτεϊνών, ο οποίος γρήγορα μπορεί να απενεργοποιηθεί (Schneiderman και Loscutoff, 1991). Επίσης, συχνά, συνδέεται με μία γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος του αίματος, τη βιτρονεκτίνη. Το σύμπλοκο αυτό είναι ιδιαίτερα σταθερό, ενώ παράλληλα διατηρεί την ενεργότητα του αναστολέα (Seiffert και συν., 1990). Ο PAI-1 απομονώθηκε αρχικά από τα κύτταρα του ενδοθηλίου, γι' αυτό και η αρχική του ονομασία ήταν endothelial cell-type PA-inhibitor, αλλά αργότερα επικράτησε η ονομασία PAI-1. Ωστόσο, εντοπίζεται σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως στις λείες μυϊκές ίνες, στους ινοβλάστες, στα ηπατοκύτταρα, σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, στα αιμοπετάλια, σε κύτταρα του πλακούντα κ.ά. Στους επίμυς, τα κύτταρα της έσω και έξω θήκης αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή παραγωγής δραστηριότητας PAI-1 στην ωοθήκη, καθώς επίσης υπολογίσιμη δραστηριότητα βρέθηκε να παράγεται από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells) και τα κύτταρα του ωχρού σωματίου (Liu, 2004). Αντίθετα, ο PAI-1 δεν εκκρίνεται από το ωάριο και η παραγωγή του βρέθηκε να είναι αμελητέα στα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells) (Liu και Hsueh, 1987· Liu, 2004).

Ο αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-2 (PAI-2): Έχει βρεθεί ότι ο PAI-2 αναστέλλει κυρίως τη δράση του u-PA, ωστόσο εμποδίζει με λιγότερη αποτελεσματικότητα και τη δράση της ώριμης μορφής του t-PA (Andreasen και συν., 1990). Ο PAI-2 παράγεται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης με αποτέλεσμα, να ανιχνεύεται στο αίμα μόνο κατά τη διάρκεια της κυοφορίας. Η πρόσδεση του u-PA στον υποδοχέα του μπορεί να ανασταλεί τόσο από τον PAI-1 όσο και από τον PAI-2, οδηγώντας στην αναστολή της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Έχει βρεθεί ότι στο παραπάνω σύμπλοκο, η ανασταλτική δραστηριότητα του PAI-2 είναι 15 φορές λιγότερο αποτελεσματική από αυτήν του PAI-1 (Ellis και συν., 1990). Ο PAI-2 ανήκει στις α₂-σφαιρίνες και στον ανθρώπινο οργανισμό συναντάται σε δύο μορφές: τη γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική του μορφή (60 kDa) και αυτήν με την οποία εντοπίζεται στον ενδοκυτταρικό χώρο (43 kDa).

Αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου-3 ή πρωτεΐνης C (PAI-3 ή PCI): Αρχικά, ο αναστολέας αυτός εντοπίστηκε στο πλάσμα του αίματος ως αδρανοποιός της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, ενός αντιπηκτικού προενζύμου, του οποίου η δράση εξαρτάται από τη βιταμίνη K. Ο PCI εκκρίνεται στο ούρο ως σύμπλοκο με τον u-PA και γι' αυτόν το λόγο ονομάστηκε ως ο τρίτος αναστολέας

των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI-3) (Suzuki, 2008). Οι ανασταλτικές του ιδιότητες είναι διαφορετικές από τις άλλες SERPINs του πλάσματος του αίματος (PAI-1 και PAI-2), καθώς πρόκειται για ασθενέστερο αναστολέα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Ωστόσο, παρουσία της ηπαρίνης, η ανασταλτική του δράση ενισχύεται, κυρίως έναντι στον u-PA (Suzuki, 2008). Η συμμετοχή του στη γονιμοποίηση έχει συζητηθεί αρκετά, καθώς βρέθηκε πως αναστέλλει το ειδικό αντιγόνο του προστάτη (PSA) (España και συν., 1991) αλλά και την ακροσίνη του σπέρματος (Hermans και συν., 1994).

Πρωτεΐνωση Νεξίνη-1 (Protease Nexin-1 ή PN-1): Σε αντίθεση με τους PAI-1 και PAI-2, οι οποίοι είναι αναστολείς μεγάλης ειδικότητας, η PN-1 είναι αναστολέας ευρέους φάσματος (Schneiderman και Loscutoff, 1991). Η PN-1 σχηματίζει σύμπλοκα με πολλές πρωτεΐνες σερίνης του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, καθώς και με πρωτεΐνες κυστεΐνης. Με τη θρομβίνη σχηματίζει ταχύτατα σύμπλοκο, αναστέλλοντας τη δράση της (διεργασία που επιταχύνεται δραματικά με την παρουσία ηπαρίνης), όμως η αναστολή των t-PA, u-PA και πλασμίνης, που επιτυγχάνει, δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική (Baker και συν., 1980). Μολονότι, σε φυσιολογικές συνθήκες δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα, εντοπίζεται σε αρκετά όργανα και παράγεται από τα περισσότερα κύτταρα. Σε αντίθεση με τον PAI-1, η έκφραση της PN-1 εντοπίστηκε αποκλειστικά στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου ωοθυλακίων μυών (Häggglund και συν., 1996), επίμυων (Hasan και συν., 2002) και βοοειδών (Bédard και συν., 2003).

1.1.4.β Αδρανοποιοί της πλασμίνης (Plasmin inhibitors, PIs)

Η α_2 -αντιπλασμίνη και η α_2 -μακροσφαιρίνη είναι οι σημαντικότεροι αδρανοποιοί της πλασμίνης. 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.

Η α_2 -αντιπλασμίνη ανήκει, επίσης, στην οικογένεια των πρωτεϊνών σερίνης (SERPINs), παράγεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα και ανιχνεύεται στο πλάσμα του αίματος και σε άλλα οργανικά υγρά. Αν και η α_2 -αντιπλασμίνη ποσοτικά στο πλάσμα του αίματος δεν είναι ο κυρίαρχος αναστολέας της πλασμίνης, σε *in vivo* συνθήκες μπορεί να την αδρανοποιεί γρήγορα και αποτελεσματικά, εκτός και αν η θέση πρόσδεσης του ενζύμου είναι κατειλημμένη, οπότε η αναστολή μειώνεται σημαντικά

(Longstaff και Gaffney, 1991). Από την άλλη πλευρά, η α₂-μακροσφαιρίνη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τη δράση των περισσότερων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και της πλασμίνης, καθώς και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Myöhanen και Vaheiri, 2004). Κατά συνέπεια, ο κύριος ρόλος της στον οργανισμό δεν φαίνεται να είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας της πλασμίνης, αλλά αναλαμβάνει το ρόλο αυτό στις περιπτώσεις που εξαντλούνται τα αποθέματα της α₂-αντιπλασμίνης, όπως έχει παρατηρηθεί στον άνθρωπο μετά από παρατεταμένη θρομβολυτική θεραπεία με στρεπτοκινάση (Collen, 1980).

1.1.4.γ Συνθετικοί (in vitro) αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL

Οι συνθετικοί αδρανοποιοί του συστήματος PAs / PL ή αντι-ινωδολυτικά φάρμακα είναι μια κατηγορία αιμοστατικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για την αποτροπή της υπερβολικής απώλειας αίματος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (epsilon-aminocaproic acid, ε-ACA), το τρανεξαμικό οξύ (tranexamic acid, TXA) και η απροτινίνη (Prentice, 1980). Η απροτινίνη είναι ένα φυσικό πολυπεπτίδιο και έχει ευρεία δράση κατά πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η πλασμίνη, η θρυψίνη και η καλλικρεΐνη (Dubber και συν., 1968). Οι αδρανοποιοί ε-ACA και TXA είναι ανάλογα λυσίνης και αναστέλλουν ειδικότερα τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη (Prentice, 1980). Η κύρια δράση του ε-ACA, ως ανάλογο λυσίνης, είναι η ανταγωνιστική κατάληψη των θέσεων δέσμησης της λυσίνης του πλασμινογόνου και της πλασμίνης, με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου από τον u-PA, τον t-PA και τη στρεπτοκινάση, αλλά και την αναστολή της πλασμίνης (Alkjaersig και συν., 1959· Griffin και Ellman, 1978· Prentice, 1980).

1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ PAs / PL ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος της *in vivo* πρωτεόλυσης έχει μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό και αναμφισβήτητα η συμμετοχή των μελών του συστήματος PAs / PL είναι καθοριστική για πολλά βιολογικά φαινόμενα της αναπαραγωγής, όπως είναι η σπερματογένεση, η ωρίμανση των ωαρίων, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων, η ωοθυλακιορρηξία, η γονιμοποίηση του ωαρίου, η εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο, η πρόωπη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η παλινδρόμηση της μήτρας κατά τη λοχεία, η λύση του ωχρού σωματίου καθώς και η παλινδρόμηση του μαστικού αδένα (Shimada και συν., 1985· Busso και συν., 1989· Dow και συν., 2002· Liu, 2007). Για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού, η εξωκυτταρική εντοπισμένη και ελεγχόμενη πρωτεόλυση σε όλες τις παραπάνω διεργασίες είναι απαραίτητο να διεξαχθεί με μεγάλη ακρίβεια και επιτυγχάνεται με αυστηρή ρύθμιση της βιοσύνθεσης όλων των μελών που συμμετέχουν στο σύστημα PAs / PL, αλλά και της αλληλεπίδρασης των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

1.2.1 Συμμετοχή του συστήματος PAs / PL στην ωοθυλακιορρηξία

Το ωοθυλάκιο είναι το δομικό τμήμα του ωοθηκικού ιστού στο οποίο λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του ωαρίου, το οποίο με την ωοθυλακιορρηξία απελευθερώνεται στον κώδωνα του ωαγωγού. Τα ωοθυλάκια παρουσιάζουν ταχεία κατά κύματα ανάπτυξη, ορισμένα υφίστανται ωοθυλακιορρηξία, ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν ατρητικά. Μετά την ωοθυλακιορρηξία σχηματίζεται το ωχρο σωματίο, το οποίο αν δεν μεσολαβήσει γονιμοποίηση ύστερα από ορισμένες ημέρες παλινδρομεί. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται σε κάθε ωοθηκικό κύκλο και περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών διεργασιών (κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κυττάρων, ωρίμανση του ωοκυττάρου και σχηματισμός ώριμου ωοθυλακίου, ρήξη του τελευταίου και σχηματισμός του ωχρού σωματίου). Όλες οι παραπάνω διαδικασίες απαιτούν την αποδόμηση των συστατικών της φλοιώδους μοίρας της ωοθήκης από το εξωκυτταρικό πρωτεολυτικό σύστημα. Από πολύ νωρίς βρέθηκε ότι το ωοθυλακικό υγρό περιέχει πλασμινογόνο και τους ενεργοποιούς του, και πως η πλασμίνη συμμετέχει στη λέπτυνση του τοιχώματος του ωοθυλακίου (Beers, 1975). Καθώς οι υποδοχείς των γοναδοτρόπων ορμονών έχουν εντοπιστεί στα επιθηλιακά κύτταρα της ωοθήκης τόσο στα τρωκτικά όσο και στους χοίρους (Danø

και συν., 1985), λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία η έκφραση και η παραγωγή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου επάγονται από τις ορμόνες αυτές (Smokonitis και συν., 1988· Peng και συν., 1993). Στο πρόβατο, η επώαση των επιφανειακών κυττάρων της ωοθήκης με LH προκάλεσε την έκκριση των ενεργοποιών του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης από αυτά (Murdoch και συν., 1999). Επίσης, η χορήγηση αδρανοποιών του συστήματος ή αντι-ορού LH κατέστειλε την ωοθυλακιορρηξία στον επίμυ και στο πρόβατο (Tsafiriri και συν., 1989· Colgin και Murdoch, 1997). Βρέθηκε ότι έγχυση του ε-ACA σε ώριμα ωοθυλάκια προβάτων προκαλεί τη μείωση του ποσοστού ωοθυλακιορρηξίας σε σχέση με τα ωοθυλάκια – μάρτυρες, ενώ αντίθετα αύξηση του ποσοστού ωοθυλακιορρηξίας παρατηρήθηκε μετά από έγχυση της πλασμίνης (Smokonitis και συν., 1989). Μελέτες έδειξαν πως τα ωάρια τρωκτικών, πιθήκων rhesus και ανθρώπων διαθέτουν την ικανότητα να συνθέτουν t-PA, η σύνθεση του οποίου ρυθμίζεται από γοναδοτρόπες και άλλες ορμόνες (Huarte και συν., 1985· Liu και συν., 1986; Bicsak και συν., 1989). Στον επίμυ, η δραστηριότητα του t-PA των ωαρίων αυξήθηκε δραματικά πριν και μετά την ωοθυλακιορρηξία, υποδεικνύοντας τη σημαντικότητά του στην ωρίμανση του συμπλέγματος κυττάρων ωοφόρου δίσκου-ωαρίου (cumulus-oocyte complexes, COCs) (Liu και Hsueh, 1987). Η ανίχνευση της δραστηριότητας του t-PA στα δευτερογενή ωοκύτταρα τρωκτικών 5 ώρες μετά την αποδόμηση του βλαστικού κυστιδίου (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD), και όχι στα πρωτογενή υποδηλώνει το γεγονός πως η διεργασία της ωρίμανσης προάγει τη μετάφραση του mRNA του t-PA που ήταν συγκεντρωμένο στα πρωτογενή ωοκύτταρα (Huarte και συν., 1985). Τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, η δράση των γοναδοτροπινών προκάλεσε την ενδοκυτταρική αύξηση του t-PA και την έκκριση αυτού τόσο στα ωάρια όσο και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, πιθανόν με ένα μηχανισμό δράσης όπου τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου διαμεσολαβούν στην μεταβίβαση του σήματος των ορμονών στο ωάριο (Liu και συν., 1986· Liu και Hsueh, 1987). Η απαλοιφή των γονιδίων και των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA), σε γενετικά τροποποιημένους μύες, έδειξε πως η ωοθυλακιορρηξία εμποδίστηκε μόνο σε ποσοστό 26%, γεγονός που υποδηλώνει πως η πλασμίνη δεν είναι ο μοναδικός πρωτεολυτικός παράγοντας για την ολοκλήρωση της ωοθυλακιορρηξίας (Häggglund και συν., 1996). Ωστόσο, η δραστηριότητα των μελών του συστήματος PAs / PL αναμφισβήτητα συμμετέχει στην ολοκλήρωση της ωοθυλακιορρηξίας και στην απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου στον ωαγωγό.

1.2.2 Συμμετοχή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στη γονιμοποίηση του ωαρίου

Στα θηλαστικά, η γονιμοποίηση είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών βιολογικών σταδίων. Σε αυτά περιλαμβάνονται η μετακίνηση των σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού, η ενεργοποίησή τους, η προσέγγιση και η διέλευσή τους διαμέσου των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, η σύνδεση και η διάτρηση της διαφανούς ζώνης του ωαρίου και τέλος η σύζευξή του με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου και η σύντηξη των δύο πυρήνων (Wassarman, 1999· Yanagimachi, 1994· 2012). Για την πραγματοποίηση των παραπάνω είναι απαραίτητη η συμμετοχή πολλών πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η ακροσίνη, η υαλουρονιδάση, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθώς και το σύστημα των PAs / PL (Lee και Wei, 1994· Kim και συν., 2008· Ferrer και συν., 2012).

Η παρουσία ή η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου έχει διαπιστωθεί τόσο στα ωάρια (Huarte και συν., 1985· Liu και συν., 1986· Rekkas και συν., 2002) όσο και στα σπερματοζωάρια (Smokovitis και συν., 1987· 1992). Επίσης, δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (plasminogen activator activity, PAA) ανιχνεύθηκε σε διάφορα βιολογικά υγρά και κύτταρα του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του ωοθυλακικού υγρού (Smokovitis και συν., 1988· 1989), του υγρού του ωαγωγού (Gabler και συν., 2001), του συμπλέγματος των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου-ωαρίου (Liu και Hsueh, 1987· Yamada και συν., 1996), καθώς και των καλλιέργειών των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Karakji και Tsang, 1995· Yamada και συν., 1996).

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αλλά και η αντίδραση του ακροσώματος, επηρεάζονται από τη δράση της εξωγενούς πλασμίνης (Taitzoglou και συν., 2003· 2004) ή του προστιθέμενου u-PA (Zheng και συν., 2001). Από την άλλη, η προσθήκη πλασμίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης (*in vitro* fertilization, IVF) δεν είχε καμία επίπτωση στα ποσοστά της γονιμοποίησης και στην πρώιμη ανάπτυξη των εμβρύων βοοειδών (Papanikolaou και συν., 2008). Η προσθήκη πλασμινογόνου στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης προκάλεσε αύξηση των γονιμοποιημένων ωαρίων μυών (Huarte και συν., 1993), ενώ καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στα ποσοστά *in vitro* παραγωγής πρώιμων εμβρύων βοοειδών (Papanikolaou και συν., 2008). Η παρουσία και των δύο ενεργοποιών στην κυτταρική και εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων σε διάφορα είδη (Smokovitis και συν., 1987· 1992), φανερώνει την πιθανή εμπλοκή τους στην

ωρίμανση, στην ενεργοποίηση ή/και στην αντίδραση του ακροσώματος του σπερματοζωαρίου (Liu και συν., 1996), καθώς επίσης, στην αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου. Εκτός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, η ανίχνευση της δραστηριότητας των αδρανοποιών τους σε σπερματοζωάρια ταύρου και ανθρώπου (Smokonitis και συν., 1992) υποδεικνύει ότι η γονιμοποίηση προϋποθέτει ισορροπημένη και τοπικά ελεγχόμενη πρωτεόλυση. Επίσης, βρέθηκε ότι τα ωάρια μυών ή επίμυων, μετά την ωοθυλακιορρηξία απελευθερώνουν t-PA, γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του ενζύμου στη γονιμοποίηση (Liu και συν., 1986· Zhang και συν., 1992). Στα βοοειδή, κατά την ωρίμανση του ωαρίου *in vitro*, βρέθηκε ότι η δραστηριότητα του t-PA ήταν αυξημένη στα εκχυλίσματα εκκριτικών κοκκίων των ωοκυττάρων, φανερώνοντας έναν ακόμη φυσιολογικό ρόλο του ενζύμου στην όλη διαδικασία της γονιμοποίησης και των γεγονότων που συμβαίνουν μετά από αυτή (Rekkas και συν., 2002). Χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοσήμανσης σε ωάρια βοοειδών και χοίρων πριν και μετά την γονιμοποίηση, οι Mondejar και συν. (2012) παρατήρησαν ότι το σήμα ανίχνευσης των ενεργοποιών του πλασμινογόνου μειώθηκε αμέσως μετά τη γονιμοποίηση. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η δραστηριότητα/συμμετοχή του PAs / PL συστήματος είναι καταλυτικής σημασίας για την ολοκλήρωση της γονιμοποίησης. Σε προηγούμενη μελέτη, η οποία αφορούσε ωάρια βοοειδών, βρέθηκε ότι η προσθήκη t-PA, δραστηριότητας ανάλογης με αυτήν του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακικού υγρού, στο υπόστρωμα της IVF προκάλεσε αύξηση του ποσοστού αυλάκωσης των παραγόμενων εμβρύων (Papanikolaou και συν., 2004· 2008).

Όλα τα παραπάνω δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου βρίσκονται στο *in vivo* περιβάλλον της γονιμοποίησης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτήν. Ωστόσο, οι παράγοντες αυτοί εκλείπουν από τα υποστρώματα της *in vitro* γονιμοποίησης ή είναι παρόντες σε αδιευκρίνιστες δραστηριότητες.

1.2.3 Ο ρόλος των ενεργοποιών του πλασμινογόνου κατά την ανάπτυξη του εμβρύου

Η γονιμοποίηση και η φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου αποτελούν τα δύο κύρια συστατικά της γονιμότητας. Κατά τη μετακίνησή του προς τη μήτρα, στο γονιμοποιημένο ωάριο συμβαίνουν μιτωτικές διαιρέσεις [οι μιτώσεις αυτές ονομάζονται αυλακώσεις (cleavage)] με ρυθμό που ποικίλλει στα διάφορα είδη θηλαστικών. Οι διαιρέσεις αυτές δεν συνοδεύονται από κυτταρική αύξηση, αλλά υποδιαίρουν το νεαρό έμβρυο σε μικρότερα θυγατρικά κύτταρα, τα οποία ονομάζονται βλαστομερίδια (blastomeres). Από τις συνεχείς διαιρέσεις στο γονιμοποιημένο ωάριο προκύπτει το μορίδιο· στο στάδιο αυτό το πρώιμο έμβρυο αποτελείται από 16-32 βλαστομερίδια (Van Soom και συν., 1992). Ήδη, από το στάδιο των 8 κυττάρων, μέχρι το οποίο τα κύτταρα είναι σφαιρικά και συνδέονται συνεκτικά μεταξύ τους, αρχίζει συμπίεση των κυττάρων αναπτύσσοντας μία από τα έσω προς τα έξω πολικότητα, η οποία μεγιστοποιεί τη διακυτταρική επαφή μεταξύ των βλαστομεριδίων στο κέντρο της μάζας. Η εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων γίνεται κυρτή, ενώ η εσωτερική κοίλη. Αυτή η αναδιοργάνωση ονομάζεται σύμπτυξη (compaction) και ολοκληρώνεται περίπου στο στάδιο των 32 κυττάρων. Στα βοοειδή, την τέταρτη μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης που το μορίδιο αποτελείται από περίπου 32 κύτταρα, αυτό απορροφά υγρό, το οποίο αποθηκεύεται στα υπάρχοντα κενοτόπια των βλαστομεριδίων και στη συνέχεια μεταξύ των κυττάρων. Στο εσωτερικό του μοριδίου, η υδροστατική πίεση αυξάνεται και σχηματίζεται μια μεγάλη κοιλότητα, η οποία είναι η κοιλότητα της βλαστοκύστης (βλαστοκοίλη). Κατά το σχηματισμό της βλαστοκύστης (64-128 κύτταρα), τα κύτταρα του εμβρύου διαφοροποιούνται και ορισμένα από αυτά εντοπίζονται σε ένα πόλο του εμβρύου, ενώ άλλα στην περιφέρειά του (Van Soom και συν., 1997). Τα κύτταρα του πόλου θα αποτελέσουν την έσω κυτταρική στιβάδα (inner cell mass, ICM), ενώ αυτά που βρίσκονται στην περιφέρεια θα αποτελέσουν την έξω κυτταρική στιβάδα (outer cell mass). Η έσω κυτταρική στιβάδα αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου, από την οποία θα σχηματισθεί ο νέος οργανισμός, γι' αυτό και ονομάζεται εμβρυοβλάστη ή εμβρυϊκός κόμβος, ενώ από την έξω κυτταρική στιβάδα, η οποία ονομάζεται τροφοβλάστη, δημιουργούνται κυρίως οι εμβρυϊκοί υμένες και ο πλακούντας. Καθ' όλη τη διάρκεια των παραπάνω διαιρέσεων, το έμβρυο περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη. Στα βοοειδή, η ρήξη της διαφανούς ζώνης γίνεται περίπου κατά την 8^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και ονομάζεται εκκόλαψη, κατά την οποία παρατηρείται έντονη μεταναστευτική

δραστηριότητα των κυττάρων της εμβρυοβλάστης και της τροφοβλάστης διαμέσου του εξωκυτταρικού φλοιού, με στόχο την εγκατάστασή τους στο ενδομήτριο. Σε όσα είδη ζώων η βλαστοκύστη εμφωλεύεται (εμφύτευση) μέσα στο ενδομήτριο (και δεν εγκαθίσταται απλώς), αυτό γίνεται με τη διαβρωτική επίδραση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων της τροφοβλάστης. Κατά την εγκατάσταση/εμφώλευση του εμβρύου στο ενδομήτριο, οι συνεχείς ειδικές αλληλεπιδράσεις των εμβρυϊκών κυττάρων με τις γλυκοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (ινοδονεκτίνη, βιτρονεκτίνη και λαμινίνη) διευκολύνονται από πρωτεολυτικά ένζυμα, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το σύστημα PAs / PL (Strickland και συν., 1976· Teesalu και συν., 1996· Zhang και συν., 1996).

Στα έμβρυα μυών, η παραγωγή του u-PA από τα κύτταρα της τροφοβλάστης συμπίπτει με τη χρονική στιγμή της διείσδυσής τους στο ενδομήτριο, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στην εγκατάσταση και στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Sappino και συν., 1989). Σε *in vitro* καλλιέργειες όψιμων εμβρύων βοοειδών, τα οποία παρήχθησαν *in vivo* και τοποθετήθηκαν προς καλλιέργεια όταν παρήλθαν 12-14 ημέρες, εντοπίστηκε μόνο δραστηριότητα του u-PA, η παραγωγή του οποίου ανιχνεύθηκε, κυρίως, στα τροφοβλαστικά κυστίδια (έμβρυα χωρίς τα κύτταρα του εμβρυϊκού δίσκου, trophoblastic vesicles) και όχι τόσο στα κύτταρα του εμβρυϊκού δίσκου (Berg και Menino, 1992). Στον επίμυ, βρέθηκε ότι και οι δύο ενεργοποιοί του πλασμινογόνου εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, από το στάδιο του ζυγωτού έως αυτό της βλαστοκύστης, σε έμβρυα που προέκυψαν είτε *in vivo* είτε *in vitro* (Afflalo και συν., 2005). Από το στάδιο των 2 κυττάρων, στο οποίο ανιχνεύθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου, η δραστηριότητα του u-PA βρέθηκε να αυξάνεται καθώς το έμβρυο αναπτυσσόταν μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, τα επίπεδα έκφρασης του u-PA ήταν χαμηλότερα στα έμβρυα, τα οποία προέκυψαν *in vitro* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των *in vivo* πειραματισμών (Afflalo και συν., 2004). Στα έμβρυα επίμυων, το mRNA του u-PA ανιχνεύεται, πρώτη φορά στο στάδιο των 2 κυττάρων έως και το στάδιο της βλαστοκύστης. Από την άλλη, η έκφραση του mRNA του t-PA περιορίζεται στο ωάριο και στα έμβρυα 2 κυττάρων (Zhang και συν., 1994). Στην ίδια μελέτη, η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) ανιχνεύθηκε σε όλα τα καλλιεργητικά υποστρώματα των ωαρίων και εμβρύων. Το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στα υποστρώματα

οφειλόταν στην παρουσία του u-PA, καταδεικνύοντας την καθοριστικής σημασίας δράση του για την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου και την εμφύτευση. Στα βοοειδή, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του u-PA ήταν αυξημένα στο στάδιο του ζυγωτού, μειωμένα κατά τη διάρκεια του σταδίου ανάπτυξης του εμβρύου 2-4 κυττάρων, και ξανά αυξημένα στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης· η PAA ανιχνεύθηκε σε όλα τα *in vitro* καλλιεργητικά υποστρώματα των εμβρύων, το 60% της οποίας οφειλόταν στη δραστηριότητα του u-PA (Whiteside και συν., 2001) και το υπόλοιπο 40% στη δραστηριότητα του t-PA. Σε έμβρυα ανθρώπων στο στάδιο της βλαστοκύστης, τα οποία παρήχθησαν *in vitro*, εντοπίστηκε το mRNA και ενζυμική δραστηριότητα του u-PA (Khamisi και συν., 1996). Η προσθήκη εξωγενούς u-PA, δραστηριότητας ανάλογης με αυτήν του προ-ωοθυλακιωρρηκτικού ωοθυλακικού υγρού, στο καλλιεργητικό θρεπτικό υπόστρωμα εμβρύων βοοειδών, τα οποία περικλείονταν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, προκάλεσε σημαντική βελτίωση των ποσοστών της πρόωμης ανάπτυξης των εμβρύων (έμβρυα σταδίου 4 κυττάρων) (Papanikolaou και συν., 2004· 2008).

1.3 *IN VITRO* ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ (*IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION, IVP)

Η τεχνολογία της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (*in vitro* embryo production, IVP) αποτελεί μία σημαντική και, παράλληλα, οικονομική πηγή εμβρύων, τα οποία χρησιμοποιούνται στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης των πληθυσμών, στη βασική έρευνα της φυσιολογίας της ανάπτυξης, στην κλωνοποίηση και στη παραγωγή των διαγονιδιακών ζώων (Nandi και συν., 2002). Η IVP περιλαμβάνει την ολοκλήρωση τριών βιολογικών βημάτων, πολύ καλά μελετημένων στα βοοειδή: την ωρίμανση των ωαρίων, τη γονιμοποίησή τους και την καλλιέργεια των εμβρύων. Η χρήση των κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων και συνθηκών επιτρέπει την ολοκλήρωση των παραπάνω σταδίων της IVP, ωστόσο επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων. Η ηλικία και η κατάσταση του ζώου, το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης του ωοθυλακίου, η μέθοδος συλλογής του ωαρίου, η ποιότητα των ωαρίων αλλά και των COCs και οι συνθήκες καλλιέργειας, όπως είναι η θερμοκρασία, η διάρκεια της ωρίμανσης (18 ή 24 ώρες), η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων με προσθήκη ή όχι ορμονών και ορού αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ωρίμανσης των ωαρίων *in vitro* (Gordon, 1994). Η *in vitro*

γονιμοποίηση των ωαρίων με τη χρήση καταψυγμένου σπέρματος, του οποίου η γονιμοποιητική ικανότητα είναι αποδεδειγμένη *in vivo*, επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι οι συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ φωτισμός, θερμοκρασία σύσταση των αερίων του επωαστικού κλιβάνου), η ποιότητα των ωαρίων, ο χρόνος της γονιμοποίησης, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και η αναλογία τους με τα ωάρια, η παρουσία βοηθητικών κυττάρων στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης και η παρουσία ουσιών που προάγουν την κίνηση των σπερματοζωαρίων (Gordon, 1994). Η *in vitro* καλλιέργεια των εμβρύων πραγματοποιείται σε θρεπτικά υποστρώματα, των οποίων η σύσταση είναι σύνθετη και περιλαμβάνει ένα πλήθος ουσιών, όπως άλατα, βιταμίνες, συνδυασμός αμινοξέων, πρωτεϊνών και ορμονών που δίνουν τη δυνατότητα στο έμβρυο να αναπτυχθεί έως και το στάδιο της βλαστοκύστης (Gordon, 1994). Οι αποδόσεις της καλλιέργειας των εμβρύων, ως εκ τούτου και της IVP, δεν επηρεάζονται μόνο από τη σύσταση του υποστρώματος που χρησιμοποιείται, αλλά και από τις συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων, όπως είναι ο φωτισμός, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των αερίων του επωαστικού κλιβάνου (Gordon, 1994).

Τόσο η γονιμοποίηση των ωαρίων όσο και η πρόωγη ανάπτυξη του εμβρύου λαμβάνουν χώρα σε απροσπέλαστα τμήματα του γεννητικού συστήματος των θηλαστικών, με αποτέλεσμα η μελέτη των διεργασιών αυτών σε πραγματικό χρόνο, να είναι μάλλον αδύνατη. Κατά συνέπεια, η εφαρμογή των *in vitro* τεχνικών αποτελούν πρώτη και πλέον αξιόπιστη επιλογή για τη μελέτη των παραπάνω βιολογικών φαινομένων. Ωστόσο, σε μια στατική καλλιέργεια, οι συνθήκες του *in vitro* περιβάλλοντος, στο οποίο εκτίθενται γαμέτες και έμβρυα, δεν είναι ίδιες με τις αντίστοιχες που επικρατούν *in vivo*. Στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού, η διαρκής μετακίνηση του εμβρύου, με τη βοήθεια του κροσσώτου επιθηλίου, επιτρέπει τη συνεχή αλληλεπίδρασή του με θρεπτικά μέσα διαφορετικής σύστασης. Παράγοντες με παρακρινική δράση, οι οποίοι παράγονται από τα κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως οι κυτταροκίνες, προσδένονται σε υποδοχείς του εμβρύου και είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την εγκατάστασή του. Ομοίως, ανάλογοι παράγοντες εκκρίνονται και από το ίδιο το έμβρυο, οι οποίοι επηρεάζουν τον ωαγωγό ή/και τη μήτρα (Orsi και Tribe, 2008). Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν πως οι συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* είναι «ακατάλληλες», «στρεσογόνες» και «κατώτερες ποιοτικά» σε σύγκριση με αυτές *in vivo* (Rizos και συν., 2002α· 2002β· Lonergan και συν., 2003β). Παρόλα αυτά η χρήση των *in vitro*

συστημάτων αποτελεί, αυτήν τη στιγμή, μονόδρομο για τη δυνατότητα διενέργειας μελετών με σκοπό τη διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου.

Η διερεύνηση σε βάθος των παραγόντων, οι οποίοι εμπλέκονται ή επηρεάζουν τις *in vivo* διαδικασίες, όπως είναι η γονιμοποίηση και η ανάπτυξη των εμβρύων, αποτελούν αντικείμενο πολλών επιστημονικών μελετών. Σε πολλές περιπτώσεις, ο έλεγχός τους, σε *in vitro* συνθήκες, συντελεί στην κατανόηση του ρόλου τους *in vivo*, αλλά και παράλληλα στην βελτίωση των *in vitro* καλλιιεργητικών υποστρωμάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται στην IVP. Η ορθή πειραματική προσέγγιση απαιτεί τη δημιουργία ενός καλά οργανωμένου πειραματικού μοντέλου, το οποίο θα στηρίζεται σε μεγάλο αριθμό παρατηρήσεων. Οι προϋποθέσεις αυτές είναι δυνατόν να διασφαλισθούν με την αξιοποίηση ζώων εργαστηρίου (μυς), τα οποία αναπαράγονται σε μεγάλους αριθμούς και σε σύντομο χρονικό διάστημα, προσφέροντας τεράστιο αριθμό ωαρίων, ή με την δημιουργία ενός μοντέλου βασισμένου σε ωάρια βοοειδών, τα οποία συλλέγονται αμέσως μετά τη σφαγή (Ménézo και Herubel, 2002· Van Soom και συν., 2011).

1.3.1 Πλεονεκτήματα χρήσης των βοοειδών ως ζώο-μοντέλο για τη μελέτη της αναπαραγωγής

Τα βοοειδή αποτελούν ένα αντιπροσωπευτικό ζώο-μοντέλο για τη μελέτη των βιολογικών φαινομένων κατά την αναπαραγωγή, καθώς παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο και υπερτερεί σε σύγκριση με αυτό των ζώων εργαστηρίου (μυς), σε κάποια βασικά σημεία (Ménézo και Herubel, 2002· Van Soom και συν., 2011). Πιο αναλυτικά, το ανθρώπινο πρωτέωμα εμφανίζει μεγαλύτερη ομολογία, στην αμινοξική αλληλουχία των περισσότερων πρωτεϊνών, με το αντίστοιχο των βοοειδών, σε σύγκριση με αυτό των μυών. Επίσης, η οργάνωση των χρωμοσωμάτων και η ρύθμιση της πολυαδενυλίωσης του mRNA εμφανίζει μεγαλύτερες ομοιότητες στα βοοειδή και στον άνθρωπο, παρά στον άνθρωπο και στα ζώα εργαστηρίου. Οι ομοιότητες στην εγκατάσταση του εμβρύου και η αναγνώριση της κυοφορίας ανάμεσα στα βοοειδή και στον άνθρωπο, σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος του γεννητικού συστήματος της αγελάδας και τη δυνατότητα της εύκολης απόκτησής του από τα σφαγεία, δίνουν τη δυνατότητα να μελετηθούν το γονιδίωμα,

μεταγράφομα ή πρωτέωμα του μητρικού γεννητικού συστήματος και των εμβρύων, ελέγχοντας πιθανές επιγενετικές επιδράσεις (Van Soom και συν., 2011).

Οι συνθήκες καλλιέργειας των ανθρώπινων εμβρύων, όπως και των βοοειδών, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες, κάτι που δεν συμβαίνει στον ίδιο βαθμό με τα έμβρυα των μυών (Vajta και συν., 2010). Τα έμβρυα των μυών μπορούν και ρυθμίζουν τις αλλαγές του pH του καλλιεργητικού υποστρώματος με τη βοήθεια του ενζύμου MCT₄ (H⁺-monocarboxylate co-transport 4, H⁺-μονοκαρβοξυτελικός συµμεταφορέας 4,) (Gibb και συν., 1997) και να επιβιώσουν από την εμφάνιση μίας ενδεχόμενης τοξικότητας της γλυκόζης (Ménézo και Khatchadourian, 1990). Στον άνθρωπο και στα βοοειδή, η προσθήκη αμινοξέων στο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι απαραίτητη, με την ποσότητα και την αναλογία τους να είναι εξίσου σημαντικές. Από τη άλλη πλευρά, οι μυς εμφανίζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην εσωτερική ρύθμιση των αναλογιών των αμινοξέων με την έλλειψη αυτών να δημιουργεί μικρότερο πρόβλημα στην ανάπτυξη των εμβρύων (Sellens και συν., 1981). Τέλος, η κατάψυξη των εμβρύων των μυών είναι ιδιαίτερα εύκολη και δεν μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο μοντέλο για τον άνθρωπο (Van den Abbeel και Van Steirteghem, 1987). Αντίθετα, η κατάψυξη ωαρίων και εμβρύων του ανθρώπου στηρίζεται στις γνώσεις από την κατάψυξη ωαρίων και εμβρύων βοοειδών, τα οποία προέρχονται από IVM, IVF και IVC πειραματισμούς (Ménézo και Veiga, 1997).

Αν και ο μυς θεωρείται ένα πολύ σημαντικό πειραματικό μοντέλο, που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα χρήσης για τη βασική έρευνα, πολλοί ερευνητές έχουν στραφεί στο μοντέλο των βοοειδών, το οποίο ήδη χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση τεχνικών και μεθόδων της IVP και τη διερεύνηση της αναπαραγωγής στα θηλαστικά (Ménézo και Herubel, 2002· Van Soom και συν., 2011).

1.3.2 Εκτίμηση της ποιότητας των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων

Παρ' όλες τις συνεχείς τροποποιήσεις των πρωτοκόλλων της IVP, όπως η προσθήκη ή όχι ορού ή/και η συγκαλλιέργεια των εμβρύων με σωματικά κύτταρα, οι οποίες έχουν ως στόχο τη βελτιστοποίηση των αποδόσεων της, τα ποσοστά της *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών παραμένουν ακόμη χαμηλά (30-40%) (Lonergan και Fair, 2008). Όταν τα έμβρυα της IVP συγκρίνονται με τα αντίστοιχα *in vivo*, παρατηρούνται πολλές διαφορές στη μορφολογία τους (αριθμός και ποιότητα βλαστομεριδίων, μέγεθος, πυκνότητα), στο χρόνο ανάπτυξής τους, στα βιοχημικά

τους χαρακτηριστικά, στη σταθερότητα της διαφανούς ζώνης αλλά και στην ανθεκτικότητά τους στην κρυοδιατήρηση (Loneragan και συν., 2006). Σε σχέση με τα *in vivo*, τα έμβρυα που παράγονται *in vitro*, τυπικά, διαθέτουν σκοτεινότερο κυτταρόπλασμα με χαμηλότερη πυκνότητα (buoyant density), ως αποτέλεσμα της αυξημένης περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια, πιο εύθραυστη διαφανή ζώνη, μειωμένη έκφραση των ενδοκυτταρικών μηχανισμών σηματοδότησης, διαφορές στο μεταβολισμό και αυξημένη εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών (Loneragan και συν., 2006). Για τον παραπάνω λόγο, μία σειρά κριτηρίων αξιολόγησης (παρεμβατικών ή μη), ενδεικτικών της ποιότητας των IVP εμβρύων, χρησιμοποιούνται για τη διασφάλιση των μεθόδων παραγωγής τους (Van Soom και συν., 2003).

Η ικανότητα της βλαστοκύστης να εγκατασταθεί και από αυτή να προκύψει κυοφορία και γέννηση ενός υγιούς μόσχου αποτελεί αδιαμφισβήτητο το ιδανικότερο κριτήριο για την εκτίμηση της ποιότητάς της, το οποίο βέβαια σε πειραματικό επίπεδο δεν είναι εφικτό να εφαρμοστεί. Η ταχύτητα ανάπτυξης του εμβρύου, η μορφολογία και η ανθεκτικότητά του σε μεθόδους κρυοδιατήρησης ή υαλοποίησης (vitrification), αποτελούν συνήθη και ευρέως χρησιμοποιούμενα κριτήρια για την επιλογή του. Η εκτίμηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των εμβρύων, παρ'όλα τα μειονεκτήματά της, αποτελεί την πλέον δημοφιλή μέθοδο επιλογής εμβρύων πριν από τη μεταφορά τους στα βοοειδή και στον άνθρωπο. Κριτήρια, όπως είναι ο αριθμός των κυττάρων και ο βαθμός κατάτμησης των βλαστομεριδίων αποτελούν τα πλέον συνήθη μορφολογικά κριτήρια, για την επιλογή των ανθρώπινων εμβρύων (Van Royen και συν., 2001). Στα βοοειδή, εκτός από τα παραπάνω, μελετάται επίσης το χρώμα των βλαστομεριδίων, η έκταση της σύμπληξης του μοριδίου, η κινητική της ανάπτυξης, ο χρόνος σχηματισμού της βλαστοκύστης, καθώς και ο βαθμός διάτασης και η διάμετρος της βλαστοκύστης (Loneragan και συν., 2006). Υπάρχει μια σαφής σχέση μεταξύ της ποιότητας του εμβρύου και της κινητικής των πρώιμων αυλακώσεων, καθώς βρέθηκε σε πολλά είδη, μεταξύ αυτών και στα βοοειδή, ότι τα ταχύτερα διαιρούμενα γονιμοποιημένα ωάρια έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης από ότι τα εκείνα που διαιρούνται βραδέως (στα βοοειδή: Loneragan και συν., 1999). Ωστόσο, καμία διαφορά στο ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης δεν παρατηρήθηκε μετά από τη μεταφορά βλαστοκύστεων, οι οποίες προήλθαν είτε από ταχέως (έως τις 30 h) είτε από βραδέως (μετά τις 36 h) διαιρούμενα έμβρυα (Enright και συν., 2000).

1.3.2.α Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού της ποιότητας των εμβρύων

1. Διαφορική χρώση (differential staining)

Η τεχνική της διαφορικής χρώσης των κυττάρων (differential cell staining) του εμβρύου αποτελεί μια πρόσφατα ανεπτυγμένη και πολλά υποσχόμενη μέθοδο αξιολόγησης της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων, καθώς επιτρέπει την παράλληλη εκτίμηση της απόπτωσης και της αναλογίας των κυττάρων της έσω κυτταρικής στιβάδας (ICM) προς εκείνων της τροφοβλάστης (TE) ενός εμβρύου (Fouladi-Nashta και συν., 2005· Wydooghe και συν., 2011). Ο εντοπισμός των πυρήνων των κυττάρων που ανήκουν σε διαφορετικά εμβρυϊκά διαμερίσματα, αλλά και εκείνων που έχουν υποστεί απόπτωση, γίνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, τα οποία δεσμεύονται με μεγάλη ειδικότητα στα συγκεκριμένα κύτταρα του εμβρύου, καθώς και δευτέρων αντισωμάτων, τα οποία ανιχνεύουν τα πρώτα με τη βοήθεια φθορίζουσών ουσιών. Έτσι, με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού υπολογίζονται ταυτόχρονα ο συνολικός αριθμός των κυττάρων (total cell number, TCN), η αναλογία των κυττάρων της έσω κυτταρικής στιβάδας (ICM) προς αυτών της τροφοβλάστης (TE) και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (apoptotic cell ratio, ACR) ενός εμβρύου.

2. Ομικές Τεχνολογίες (Omics)

Οι τεχνολογίες που γενικώς χαρακτηρίζονται ως «Omics» (genomics, transcriptomics, proteomics και metabolomics) χρησιμοποιούνται επίσης για την εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων, αλλά και για την κατανόηση των μηχανισμών της εμβρυογένεσης. Πρόκειται για πολλά υποσχόμενες και πρωτοποριακές τεχνικές, οι οποίες στηρίζονται σε μια γενικότερη μοριακή ανάλυση του ωαρίου (και των σωματικών κυττάρων που το περιβάλλουν), καθώς και του περιβάλλοντος (καλλιεργητικό μέσο) μέσα στο οποίο αναπτύσσεται το έμβρυο. Έτσι, μπορεί να επιλεγούν προς μεταφορά τα έμβρυα που παρουσιάζουν την καλύτερη ανάπτυξη και μπορεί να οδηγήσουν σε επιτυχή κυοφορία. Μετά την εμφάνιση των «Omics» (genomics, transcriptomics, proteomics και metabolomics) έχει αλλάξει ο τρόπος μελέτης της φυσιολογίας της αναπαραγωγής των θηλαστικών, εφόσον οι ανωτέρω τεχνικές αποτελούν σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία για την επιλογή εκείνου του ωαρίου/εμβρύου με τις καλύτερες προοπτικές επιβίωσης (Brison και συν., 2007· Seli και συν., 2010· Montag και συν., 2013).

Η πλέον επεμβατική των παραπάνω μεθόδων, η ανάλυση του μεταγραφώματος (transcriptomics) του εμβρύου, ίσως αποτελεί την πιο ευαίσθητη και πλούσια σε πληροφορίες μέθοδο μελέτης της ικανότητας ανάπτυξης του εμβρύου, καθώς επιτρέπει την ανάλυση του RNA/DNA περιεχομένου ενός και μόνο κυττάρου (Saliba και συν., 2014). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων, αλλά και των εμβρύων βοοειδών, μέσω της ταυτοποίησης ειδικών γονιδιακών μαρτύρων (Wrenzycki και συν., 2007). Κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου ανάπτυξης, η ανάλυση του εμβρυϊκού γονιδιακού προφίλ αποτελεί το πρώτο βήμα για την ταυτοποίηση εκείνων των γονιδίων που μαρτυρούν την κατάσταση του εμβρύου μετά την επίδραση συνθηκών καταπόνησης. Μέθοδοι ανάλυσης της έκφρασης του εμβρυϊκού γονιδιώματος, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time Polymerase Chain Reaction, real-time PCR), η μικροσυστοιχία γονιδίων (microarrays), ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του RNA (RNA-Seq) και η μέθοδος υβριδισμού SSH (suppression subtractive hybridization, SSH), χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση διαφορών της γονιδιακής έκφρασης των υπό μελέτη εμβρύων (*in vivo* και *in vitro*, τροποποιημένων και μη, φυσιολογικών και παθολογικών). Μάλιστα, η τεχνολογία του RNA-Seq υπερτερεί έναντι των μεθόδων υβριδοποίησης, όπως είναι οι μικροσυστοιχίες, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση cDNA αλληλουχιών μέσα από εκατομμύρια μικρά τμήματα του μεταγραφώματος και διακρίνει ποια από αυτά (cDNA) είναι μητρικής ή πατρικής προέλευσης μέσω της αναγνώρισης/ανίχνευσης συγκεκριμένων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ή άλλων γενετικών μαρτύρων (Malone και Oliver, 2011).

2.α Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time Polymerase Chain Reaction, real-time PCR)

Μολονότι οι τρεις τελευταίες μέθοδοι παρέχουν σημαντικό όγκο πληροφοριών για τη συγκριτική έκφραση όλου ή μέρους του εμβρυϊκού γονιδιώματος (El-Sayed και συν., 2006· Rekik και συν., 2011· Graf και συν., 2014), αποτελούν τεχνικές μεγάλου κόστους, απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου, η real-time PCR αποτελεί ίσως την πιο διαδεδομένη προσέγγιση για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων στα ωάρια και έμβρυα των βοοειδών (Wrenzycki και συν., 1999· Lechniak, 2002).

Η real-time PCR είναι ένας τύπος ποσοτικής PCR που μετρά την πραγματική ποσότητα του DNA ή του mRNA ενός δείγματος. Το δείγμα αυτό μπορεί να είναι ένας πληθυσμός κυττάρων (όπως ιστός ή κυτταροκαλλιέργεια) ή ακόμα και ένα μόνο κύτταρο. Η πραγματοποίηση της PCR σε πραγματικό χρόνο συνήθως αποσκοπεί στο να καθορίσει την έκφραση του mRNA ενός γονιδίου, καθώς και τα επίπεδα έκφρασής του (αριθμός αντιγράφων του mRNA) κατά τη διάρκεια ορισμένων συνθηκών, όπως η έκθεση των κυττάρων σε μια εξωγενή ουσία. Επίσης, η real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνει φυσιολογικά με παθολογικά δείγματα, παρέχοντας πληροφορίες ως προς τις αλλαγές έκφρασης που εμφανίζονται με την παθογένεση της νόσου. Η real-time PCR, λόγω της ευαισθησίας της, χρησιμοποιείται επίσης στην ανίχνευση παθογόνων οργανισμών, όπως οι ιοί, σε βιολογικά υγρά. Δίνει επίσης τη δυνατότητα να παρακολουθείται η πορεία της αντίδρασης ακριβώς όπως συμβαίνει σε πραγματικό χρόνο (on-line and real-time fluorescence monitoring), καθώς τα δεδομένα της αντίδρασης μπορούν να συλλεχθούν όχι μόνο μετά το πέρας της, αλλά και κατά τη διάρκειά της. Λόγω του ότι δεν χρειάζονται επιπλέον διαδικασίες για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης (ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης), ο συνολικός χρόνος της διαδικασίας μειώνεται σημαντικά (Klein, 2002).

Η real-time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR, ακόμη και στα αρχικά στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση), μετρώντας έτσι την κινητική των αντιδράσεων στην αρχική τους φάση. Από την άλλη, στη συμβατική PCR η ανίχνευση του τμήματος που ενισχύεται γίνεται (με ανάλυση σε πηκτή αгарόζης) στην τελική φάση της αντίδρασης ή αλλιώς όταν τα προϊόντα φτάσουν σε ένα ανώτατο επίπεδο (plateau). Στην αρχική, λογαριθμική φάση μίας αντίδρασης, το προϊόν το οποίο συσσωρεύεται σε κάθε κύκλο αντιστοιχεί ακριβώς στο διπλάσιο του τμήματος του προηγούμενου κύκλου. Στην τελική φάση, plateau, η αντίδραση έχει σταματήσει, δεν παράγεται επιπλέον προϊόν και αν συνεχιστεί και για περισσότερους κύκλους το προϊόν θα αποδομηθεί. Συνεπώς, τα αποτελέσματα για την απλή PCR είναι διαφορετικά από δείγμα σε δείγμα και η διάκρισή τους εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα της πηκτής αгарόζης, η οποία βασίζεται στη διαφορά μεγέθους του τμήματος και δεν είναι και τόσο ακριβής. Επίσης, τα αποτελέσματα της πηκτής αгарόζης δεν υπολογίζουν τον ακριβή αριθμό των αντιγράφων, σε αντίθεση με τη real-time PCR (Bustin, 2000). Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος στο

τέλος κάθε κύκλου, όμως όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας-χρωστικής, η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Από τις πιο δημοφιλείς ετικέτες είναι η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, η οποία προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA και με αυτόν τον τρόπο ποσοτικοποιούνται τα προϊόντα της PCR, τα οποία συντίθενται κατά τη διάρκεια της real-time PCR.

Ένας τρόπος για να διαπιστωθεί η ειδικότητα της μεθόδου real-time PCR αλλά και ταυτοποίησης των προϊόντων της αντίδρασης είναι η καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve) των πολλαπλασιαζόμενων μορίων (ενισχυμένων αλληλουχιών, amplicons). Πρόκειται για μία γραφική παράσταση που μετρά το φθορισμό των πολλαπλασιαζόμενων μορίων σε σχέση με τη θερμοκρασία. Η αλλαγή στο φθορισμό εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της χρωστικής SYBR Green με το δίκλωνο DNA. Η ανάλυση αυτής της γραφικής παράστασης δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, όπως τα διμερή εκκινητών (Ririe και συν., 1997). Η προσμέτρηση αυτών των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης μπορεί να επηρεάζουν την ακρίβεια των δεδομένων της αντίδρασης. Συνήθως, η θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m) του ειδικού προϊόντος της αντίδρασης είναι πάνω από 80 °C, σε αντίθεση με τα διμερή των εκκινητών που έχουν χαρακτηριστικά χαμηλό T_m , περίπου στους 75 °C. Τα διμερή των εκκινητών ανιχνεύονται συνήθως στην αντίδραση αρνητικού ελέγχου (Non Template Control, NTC). Η παρουσία μη ειδικών προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί με ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο, με τη καμπύλη αποδιάταξης είναι δυνατή η ταυτοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης, καθώς το T_m είναι μία θερμοκρασία που χαρακτηρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία.

Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με απόλυτες τιμές ή με συγκριτικό τρόπο. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση αντιστοιχεί τον παραγόμενο φθορισμό -σήμα της PCR- σε σύγκριση με τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων, τα οποία προστέθηκαν στην αντίδραση, χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη αντίδρασης. Η σχετική ποσοτικοποίηση αποδίδει τη σχετική αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του mRNA μεταξύ δύο διαφορετικών δειγμάτων. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση στηρίζεται σε πολλούς σημαντικούς παράγοντες και παραμέτρους, οι οποίοι πρέπει να ληφθούν υπόψιν, όπως είναι η ακρίβεια της γραμμικότητας των πρότυπων καμπυλών όλων των ελεγχόμενων γονιδίων, η επάρκεια, αλλά και ο καθορισμός της ποσότητας του βιολογικού υλικού που μελετάται. Η σχετική ποσοτικοποίηση δεν απαιτεί τη χρήση πρότυπης καμπύλης, γεγονός που την καθιστά μέθοδο επιλογής όταν πρόκειται να

μελετηθεί η σχετική ποσοτική διαφορά της γονιδιακής έκφρασης ενός γονιδίου στόχου σε φυσιολογικά δείγματα μάρτυρες και σε τροποποιημένα ή παθολογικά δείγματα (καρκινικά δείγματα, έμβρυα που παρήχθησαν μετά από τροποποίηση υποστρωμάτων κ.α.) (Pffaf, 2006).

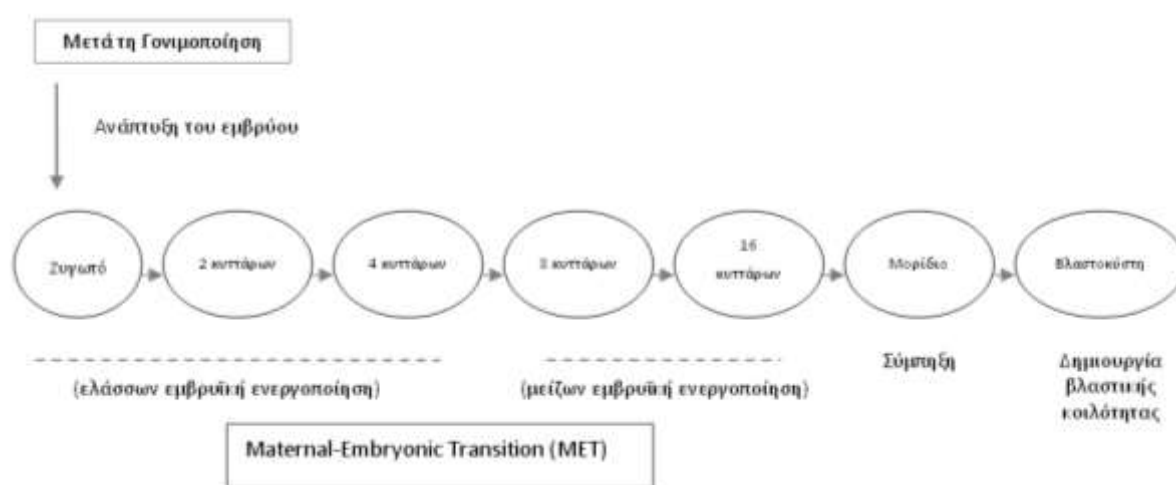
Η κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων της real-time PCR, γίνεται χρησιμοποιώντας γονίδια αναφοράς (reference ή housekeeping genes). Πρόκειται για ιδιοστατικά γονίδια, των οποίων η έκφραση είναι απαραίτητη για βασικές κυτταρικές λειτουργίες και τα οποία εκφράζονται σταθερά σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού τόσο κάτω από φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες. Η επιλογή των κατάλληλων γονιδίων αναφοράς, των οποίων η έκφραση παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από τον πειραματισμό, είναι ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία καθώς δεν υπάρχει ένα κοινό γονίδιο αναφοράς, σταθερά εκφραζόμενο σε όλους τους ιστούς ή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου (Kubista και συν., 2006). Επίσης, για τη σωστή επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς απαιτείται να ληφθούν υπόψιν διάφορες παράμετροι, όπως το ζωϊκό μοντέλο που χρησιμοποιείται αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο των εμβρύων που εξετάζεται. Μέχρι πρόσφατα, ο εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης (κανονικοποίηση) γινόταν χρησιμοποιώντας ένα και μόνο γονίδιο αναφοράς. Νεότερα δεδομένα αποδεικνύουν πως η χρήση ενός ή πολλών μη σταθερών γονιδίων αναφοράς μπορεί να οδηγήσει σε πολύ σοβαρά λάθη κατά την κανονικοποίηση (Dheda και συν., 2005). Για τον παραπάνω λόγο, για την ασφαλή και αξιόπιστη σύγκριση των σχετικών επιπέδων έκφρασης χρησιμοποιείται το πρόγραμμα geNorm που περιγράφηκε από τους Vandesompele και συν (2002), όπου μέσα από ένα σύνολο αντιπροσωπευτικών γονιδίων αναφοράς επιλέγονται εκείνα τα οποία εκφράζονται σταθερότερα στα υπό μελέτη δείγματα.

1.3.3 Στάδια ανάπτυξης του εμβρύου και γονίδια-μάρτυρες της ποιότητάς του που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα

Επί σειρά ετών, η ταυτοποίηση ειδικών γονιδιακών μαρτύρων, ενδεικτικών της ποιότητας των εμβρύων, αποτελεί αντικείμενο μελέτης των γενετιστών, καθώς έχει βρεθεί ότι η γονιδιακή έκφραση επηρεάζει άμεσα την ικανότητα ανάπτυξης των εμβρύων των θηλαστικών (Wrenzycki και συν., 2005· Duranthon και συν., 2008). Στα βοοειδή, οι περισσότεροι γονιδιακοί μάρτυρες, οι οποίοι έχουν ταυτοποιηθεί αφορούν στις βλαστοκύστες, καθώς οι τελευταίες αποτελούν το ιδανικό στάδιο για την ανάλυση της επίδρασης των συσσωρευμένων «λαθών» κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων καλλιέργειας. Οι αλλαγές στο γενετικό προφίλ των παραγόμενων εμβρύων μπορούν να οφείλονται στις συνθήκες και τις μεθόδους της IVP, όπως η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), η κλωνοποίηση κ.ά.. Πιο αναλυτικά, οι συνθήκες της IVC είναι δυνατόν να προκαλέσουν τη μόνιμη αποσιώπηση γονιδίων (gene silencing) ή ακόμα τη συνεχή έκφραση ορισμένων γονιδίων, τα οποία είναι πολύ σημαντικά για την ανάπτυξη του εμβρύου (Niemann και Wrenzycki, 2000). Τα παραπάνω, πολλές φορές, έχουν ως αποτέλεσμα τον πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο, καθώς οι διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA, επαγωγή της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων κ.α (Niemann και Wrenzycki, 2000). Συνεπώς, οποιαδήποτε διαφοροποίηση της βλαστοκύστης είναι πιθανόν να προέρχεται από τροποποιήσεις του *in vitro* περιβάλλοντος μετά τη γονιμοποίηση, οι οποίες επηρεάζουν την ταχύτητα των πρώτων αυλακώσεων (Loneragan και συν., 1999), την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Memili και First, 1999), τη σύμπτυξη του μοριδίου και την κυτταρική διαφοροποίηση της βλαστοκύστης (Watson και συν., 2004).

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από το στάδιο της βλαστοκύστης μελετήθηκε επίσης το πρότυπο έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μαρτύρων κατά την εμβρυομητρική μεταβατική περίοδο (maternal-embryonic transition, MET), δηλαδή κατά την περίοδο που ο έλεγχος της σύνθεσης του mRNA παύει σταδιακά να γίνεται από το μητρικό γονιδίωμα και αρχίζει να πραγματοποιείται από το εμβρυϊκό (Memili και First, 1999· 2000· Dieleman και συν., 2002). Στα βοοειδή, η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος διακρίνεται σε δύο στάδια, την ελάσσονα και τη μείζονα ενεργοποίηση (minor and major genome activation), με την πρώτη να παρατηρείται

σε έμβρυα 1-4 κυττάρων και τη δεύτερη σε έμβρυα 8-16 κυττάρων (Εικόνα 3). Τα μετάγραφα και οι πρωτεΐνες μητρικής προέλευσης συσσωρεύονται στο ωάριο και είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση των πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων των εμβρύων βοοειδών (ελάσσων εμβρυϊκή ενεργοποίηση) έως ότου ξεκινήσει το 2^ο στάδιο της μείζονος ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Dieleman και συν., 2002). Στο στάδιο αυτό η οποιαδήποτε ανεπάρκεια κυτταροπλασματικών ή/και μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει τη διακοπή της ανάπτυξης των εμβρύων (Meirelles και συν., 2004).



Εικόνα 3: Στάδια ανάπτυξης των εμβρύων βοοειδών, στα οποία γίνεται η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Dieleman και συν., 2002, τροποποίηση).

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί μάρτυρες (δείκτες) της ποιότητας των εμβρύων, τα οποία συσχετίζονται με διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες που ελέγχουν την ανάπτυξη των εμβρύων βοοειδών πριν την εγκατάσταση (Wrenzycki και συν., 2007). Οι Niemann και Wrenzycki (2000) παρατήρησαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης 100 γονιδίων, ανάμεσα σε έμβρυα που παρήχθησαν *in vivo* και *in vitro*. Οι διαφορές αυτές τα καθιστούν πιθανούς γονιδιακούς δείκτες της ποιότητας και της βιωσιμότητας των εμβρύων, αλλά και της διαδικασίας εγκατάστασης.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης σημαντικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε μεταβολικές οδούς και στις διαδικασίες απόπτωσης, εγκατάστασης και οξειδωτικού stress. Για τις ανάγκες της παρούσας

έρευνας επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν τα κατωτέρω γονίδια ως ακολούθως: Στο στάδιο της βλαστοκύστης (7 ημερών) 10 γονίδια (*PLAC8*, *AKR1B1*, *BIRC5* ή *survivin*, *BBC3* ή *PUMA*, *PGHS-2* ή *COX-2*, *BCL2L1*, *SLC2A5* ή *GLUT-5*, *MnSOD*, *PLG* και *PLAUR*). Στο στάδιο των 8-16 κυττάρων (έμβρυα 3 και 4 ημερών, αντίστοιχα) 7 γονίδια (*BAX*, *BCL2L1*, *PIPOX*, *G6PD*, *SLC2A5*, *MnSOD* και *KAT2B* ή *PCAF*).

Κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου ανάπτυξης των εμβρύων, η τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP) χρησιμοποιείται από το έμβρυο ως βιολογικός συσσωρευτής ενέργειας για την περαιτέρω ανάπτυξή του. Η παραγωγή της ATP στηρίζεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, μέσω της οξείδωσης του πυροσταφυλικού οξέος και των αμινοξέων (Gardner και συν., 1993). Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος, η χρήση του πυροσταφυλικού οξέος σταματά να αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του εμβρύου και τη θέση αυτού καταλαμβάνει η γλυκόζη (Rieger και συν., 1992· Khurana και Niemann, 2000). Άλλωστε, έχει μελετηθεί *in vitro* ότι στα περισσότερα είδη εμβρύων η παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι επιζήμια στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους, αλλά απαραίτητη για τη φυσιολογική περαιτέρω ανάπτυξή τους από μορίδιο σε βλαστοκύστη (Leese, 1995· Barnett και Bavister, 1996). Μεταγενέστερες έρευνες επαλήθευσαν την αρχική υπόθεση, καθώς έδειξαν ότι η γλυκόζη είναι απαραίτητο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των εμβρύων βοοειδών, συγκεκριμένα μετά το στάδιο της σύμπτυξης (Gutierrez-Adan και συν., 2001).

Η μεταφορά της γλυκόζης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στα κύτταρα των θηλαστικών μπορεί να γίνεται ενεργητικά και παθητικά. Η ενεργητική μεταφορά γίνεται από τους συµμεταφορείς της και πραγματοποιείται με την κατανάλωση της χημικής ενέργειας που προκύπτει από βαθμιδώσεις συγκέντρωσης ιόντων νατρίου (SGLT, sodium glucose linked transporter). Η παθητική μεταφορά (διευκολυνόμενη μεταφορά) πραγματοποιείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (μεταφορείς). Μέχρι στιγμής, η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών-μεταφορέων αποτελείται από εννέα ισομορφές (*GLUT 1-9*), οι οποίοι διαθέτουν κοινή δομική σύνθεση 12 διαμεμβρανικών τμημάτων. Οι *GLUT-1* και *GLUT-3*, οι οποίοι είναι παρόντες σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών, είναι υπεύθυνοι για τη βασική πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα με μία σταθερή ταχύτητα. Ο *GLUT-5* ή *SLC2A5* (solute carrier family 2 -facilitated glucose/fructose transporter- member 5) απαντά στο λεπτό

έντερο και λειτουργεί πρωταρχικά ως μεταφορέας της φρουκτόζης. Επίσης, έχει εντοπιστεί στους νεφρούς, στο μυϊκό ιστό, στον εγκέφαλο και στο λιπώδη ιστό.

Το πρότυπο έκφρασης των μεταφορέων της γλυκόζης έχει μελετηθεί σε αρκετά είδη κατά το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης. Με τη βοήθεια της real-time PCR και της ανοσοϊστοχημείας εντοπίστηκε έκφραση του μεταφορέα της φρουκτόζης *GLUT-5* από το στάδιο των 8-16 κυττάρων (Augustin και συν., 2001). Όπως αναφέρθηκε, ο *GLUT-5* έχει υψηλή συγγένεια δέσμευσης της φρουκτόζης. Αν και ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι πολύ καλά μελετημένος κατά τη διάρκεια της αρχικής ανάπτυξης του εμβρύου σε διάφορα είδη ζώων (Khurana και Niemann, 2000), λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στο υπόστρωμα της φρουκτόζης και στις επιπτώσεις της στην ανάπτυξη του εμβρύου (Sakkas και συν., 1993). Η φρουκτόζη αποτελεί ένα από τα συστατικά του περιβάλλοντος της μήτρας (Casslen και Nilsson, 1984), ωστόσο, δεν έχει ακόμα μελετηθεί η επίδρασή της στο μεταβολισμό των εμβρύων *in vitro*. Η πολύ υψηλή συγγένεια του *GLUT-5* με τη φρουκτόζη υποδεικνύει την ικανότητα του εμβρύου να μεταφέρει αυτό το ενεργειακό υπόστρωμα. Με την έναρξη της μεταγραφής του εμβρυϊκού γονιδιώματος, οι απαιτήσεις του εμβρύου σε νουκλεοτίδια και φωσφορική ριβόζη (απαραίτητη για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων) είναι υψηλές (Augustin και συν., 2001). Στα αρχικά στάδια αυλάκωσης των εμβρύων διαφορετικών ειδών, ο μεταβολισμός των ενεργειακών υποστρωμάτων γίνεται, κυρίως, μέσω της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης και όχι μέσω αυτής του Embden-Meyerhof (Rieger και συν., 1992). Επομένως, η έναρξη της έκφρασης του μεταγράφου *GLUT-5*, στο στάδιο των 8-16 κυττάρων, συμπίπτει με την αλλαγή στη μεταβολική οδό της φωσφορικής πεντόζης για την πρόσληψη της φρουκτόζης και την μετατροπή της σε φωσφορική-5-ριβόζη.

Το ένζυμο της γλυκοζο-6-φωσφορική δεϋδρογονάση (glucose-6-phosphate dehydrogenase, *G6PD*) καταλύει το πρώτο και μη αντιστρεπτό βήμα της γλυκόλυσης, μέσω της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης και επιτρέπει τη μετατροπή του γλυκοζο-6-φωσφορικού σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ, με παράλληλη αναγωγή του φωσφορικού νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, *NADP*) σε *NADPH*. Το γονίδιο *G6PD* αποτελεί αισθητήρα των κυττάρων για το οξειδωτικό stress. Η υπερέκφραση του *G6PD* συνδέεται με αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και αυξημένη αναερόβια γλυκόλυση (Loneragan και συν., 2003β).

Το ειδικό γονίδιο του πλακούντα-8 (placenta-specific 8, *PLAC8*) είναι ένα ειδικό γονίδιο εγκατάστασης και βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται (>26 φορές) σε βλαστοκύστες, οι οποίες καταλήγουν σε γέννηση μοσχαριού (El-Sayed και συν., 2006). Επίσης, το γονίδιο αυτό βρέθηκε να εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο ενδομήτριο των εγκύων αγελάδων από ότι στις μη έγκυες, υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του στην ανάπτυξη του πλακούντα και στην αλληλεπίδραση μητέρας-εμβρύου (Galaviz-Hernandez και συν., 2003· Klein και συν., 2006).

Το γονίδιο της αναγωγής της αλδόξης-κετόξης της οικογένειας 1 (aldo-keto reductase family 1 member B1, *AKR1B1*) μεταφράζεται στο ένζυμο 20α-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό της προγεστερόνης (σημαντικός για την εγκατάσταση-επιβίωση του εμβρύου) και βοηθά στη σύνθεση της προσταγλανδίνης PGF_{2α} (τερματισμός/διακοπή της κυοφορίας). Το γονίδιο *AKR1B1* βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε βιοψίες βλαστοκύστεων που τελικά δεν κατέληξαν σε εγκυμοσύνη (El-Sayed και συν., 2006). Η ισχυρή έκφρασή του στο ενδομήτριο των βοοειδών τη στιγμή της ωχρινόλυσης υποδηλώνει τον πιθανά αρνητικό του ρόλο στη διατήρηση της εγκυμοσύνης (Madore και συν., 2003).

Η συνθετάση των προσταγλανδινών ή κυκλοοξυγενάση-2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase, *PGHS-2* ή *COX-2*) είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του αραχινοδικού οξέος σε προσταγλανδίνες. Είναι γνωστό ότι συγκεκριμένες προσταγλανδίνες συμμετέχουν στη διαδικασία της εγκατάστασης και παράγονται, κυρίως, από το ενδομήτριο, αλλά και από τη βλαστοκύστη (Snabes και Harper, 1984). Οι Charpigny και συν. (1997) έδειξαν ότι η *COX-2* εκφράζεται στην τροφοβλάστη των εμβρύων προβάτων και όχι στην ICM. Το παραπάνω υποστηρίζει το γεγονός ότι το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για τη διαδικασία της εγκατάστασης, η οποία είναι αποτέλεσμα του έντονου πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η έκφρασή του επάγεται αξιοσημείωτα από τις κυτταροκίνες, διάφορους μιτογόνους παράγοντες ή υποκινητές καρκινογένεσης, καθώς και παράγοντες οι οποίοι επάγονται από το stress (Herschman, 1996). Σε βιοψίες εμβρύων βοοειδών, μετά τη μεταφορά των οποίων προέκυψε κυοφορία και γέννηση μόσχου, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *COX-2* βρέθηκαν αυξημένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των αρνητικών μαρτύρων (El Sayed και συν., 2006). Συνεπώς, η έκφραση του γονιδίου του αυτού ίσως αποτελεί ένδειξη της ικανότητας των εμβρύων να εγκατασταθούν στο ενδομήτριο. Ωστόσο, εκτός από την εγκατάσταση, το ένζυμο αυτό βρέθηκε ότι εμπλέκεται και στη διαδικασία της απόπτωσης, καθώς η αναστολή του από ειδικούς *COX-2* αναστολείς,

προκάλεσε εκτός από μειωμένη ικανότητα εγκατάστασης των εμβρύων μυών και μείωση της απόπτωσης, μέσω της αναστολής των κασπασών-3 από COX-2 προερχόμενες προσταγλανδίνες I2 (Pakrasi και Jain, 2008).

Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται γενετικά από πολλά προ-αποπτωτικά ή αντι-αποπτωτικά γονίδια, η έκφραση των οποίων καθορίζει την επιβίωση ή όχι των εμβρύων (Jurisicova και Acton, 2004). Διάφορα προ- και αντι-αποπτωτικά γονίδια εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων θηλαστικών, ως απάντηση σε πιθανές συνθήκες stress, όπως είναι ο κατακερματισμός του DNA ή η έλλειψη κυτταροκινών (Yang και Rajamahendran, 2002). Ανάλογα με το ερέθισμα, το κύτταρο ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί το γενετικό μηχανισμό της απόπτωσης, και με αυτό τον τρόπο ελέγχεται η διαδικασία της επιβίωσης ή του θανάτου του κυττάρου (Ellis και συν., 1991).

Μία αντιπροσωπευτική ομάδα γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην απόπτωση είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 (στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί τουλάχιστον 15 μέλη της οικογένειας αυτής), οι οποίες εντοπίζονται στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες και εμπλέκονται είτε στην πυροδότηση είτε στη ρύθμιση της απόπτωσης με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων (κασπάσες). Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των *BCL2L1* ή *BCL2-like 1* (αντι-αποπτωτικό γονίδιο), *BBC3* ή *BCL2 binding component 3* ή *Puma* και *BAX* (προ-αποπτωτικά γονίδια). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *BAX* είναι ενδεικτικά της επίσπευσης των αποπτωτικών φαινομένων στα κύτταρα (Yang και Rajamahendran, 2002), εάν και εφ' όσον δεν εξισορροπηθούν με την αντι-αποπτωτική δράση πρωτεϊνών, όπως η BCL-2, ή άλλων μελών της οικογένειας (BCL2L1). Το γονίδιο *BCL2L1* είναι ένα πολύ σημαντικό αντι-αποπτωτικό γονίδιο και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί καταστέλλει δραστικά την απόπτωση σχηματίζοντας ετεροδιμερή με διάφορα προ-αποπτωτικά μέλη της ίδιας οικογένειας. Ωστόσο, η ιδιότητα του BCL2L1 να αποτρέπει το σχηματισμό ομοδιμερών των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τη διόγκωση των μιτοχονδρίων με το σχηματισμό των μεμβρανικών πόρων και την αύξηση της διαπερατότητάς τους, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ρυθμιστών της απόπτωσης (Cory και συν., 2003). Επίσης, οι μικροεγχύσεις ανασυνδυασμένης BCL2L1 πρωτεΐνης σε IVP έμβρυα μυών ενίσχυσαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των παραγόμενων εμβρύων, εμποδίζοντας την πρόωμη διακοπή της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η οποία προκαλείται μέσω αυξημένων αποπτωτικών φαινομένων, τα οποία επάγονται από τη συσσώρευση δραστικών

μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), φαινόμενα που συχνά ενοχοποιούνται για τις χαμηλές αποδόσεις της IVP (Liu και συν., 2011).

Ο 3ος παράγοντας πρόσδεσης BCL-2 (BCL2 binding component 3, BBC3 ή Puma), ο οποίος συνδέεται απευθείας, μέσω της BH3 επικράτειάς του, στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2, επιλέχθηκε να αναλυθεί στη παρούσα διατριβή, καθώς αποτελεί δείκτη της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας ή/και της βλάβης του DNA του κυττάρου (Hikisz και Kilianśka, 2012). Η υπερέκφραση αυτού του πρωτο-ογκογονιδίου, η οποία εντοπίζεται συχνά σε πολλούς τύπους νεοπλασιών στον άνθρωπο, βρέθηκε ότι επάγει την παραγωγή του Hdm2, ενός αναστολέα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, ρυθμίζοντας την έκφραση της τελευταίας (Kashatus και συν., 2006). Ωστόσο, εκτός από διαμεσολαβητής της απόπτωσης, δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με το πρότυπο έκφρασής του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων. Η μεταγραφή του προ-αποπτωτικού γονιδίου *BBC3* επάγεται μετά από κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, όπως είναι οι παράγοντες που προκαλούν καταστροφή του DNA ή η στέρηση ορού σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων, ενώ αναστέλλεται όταν εκτεθεί σε αντι-αποπτωτικούς παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) ή ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) (Han και συν., 2001).

Στην ομάδα των γονιδίων τα οποία ελέγχθηκαν για την απόπτωση συμπεριλαμβάνεται και αυτό της πρωτεΐνης survivin (baculoviral IAP- repeat containing 5, *BIRC-5*). Η πρωτεΐνη survivin συνδέεται με τις κασπάσες και αναστέλλει άμεσα τη δραστηριότητα της κασπάσης-3, καταστέλλοντας την απόπτωση (Tamm και συν., 1998· Shin και συν., 2001). Στα έμβρυα προ-εμφυτευτικού σταδίου, η έκφρασή της είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την καταστολή της απόπτωσης σε αυτά (Park και συν., 2007) και, ως εκ τούτου, πολύ σημαντική στη διαδικασία ανάπτυξης των βλαστοκύστεων των βοοειδών. Ωστόσο, η survivin, εκτός από αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, αποτελεί και ρυθμιστή της κυτταρικής διαίρεσης. Η αποσιώπηση του γονιδίου αυτού χρησιμοποιώντας την τεχνολογία στοχευμένης αδρανοποίησης της γονιδιακής έκφρασης (RNA interference, RNAi) προκάλεσε μείωση του ποσοστού των παραγόμενων βλαστοκύστεων στα βοοειδή, αλλά και αύξηση των αποπτωτικών τους κυττάρων, υποδηλώνοντας το σημαντικό του ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των εμβρύων (Park και συν., 2007).

Το οξειδωτικό stress αποτελεί ακόμα μία παράμετρο η οποία εξετάζεται στην περίπτωση των IVP εμβρύων, καθώς οι συνθήκες καλλιέργειας, όπως η υψηλή θερμοκρασία ή τα αυξημένα ποσοστά O₂, ευνοούν την παραγωγή ROS, προκαλώντας καθυστέρηση ή/και διακοπή της ανάπτυξης του εμβρύου μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων τα οποία επάγουν την απόπτωση ή/και τη γήρανση των κυττάρων (Gordon, 1994· Rizos και συν., 2002α). Τα γονίδια που είναι ενδεικτικά του stress ή σχετίζονται με την αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου αποτελούν ισχυρούς γονιδιακούς μάρτυρες της βιωσιμότητας των εμβρύων. Το γονίδιο της μιτοχονδριακής Mn-δισμουτάσης του υπεροξειδίου-2 (superoxide dismutase [Mn], mitochondrial, *MnSOD* ή superoxide dismutase 2, mitochondrial, *SOD-2*) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της αντιοξειδωτικής προστασίας των εμβρύων (Lonergan και συν., 2003β). Είναι ενδεικτικό της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, αλλά επίσης συμμετέχει ενεργά στην προστασία των εμβρύων από οξειδωτικές βλάβες. Στα έμβρυα βοοειδών τα επίπεδα μεταγραφής της *MnSOD* πιθανόν να αποτελούν ένδειξη της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων, καθώς παρατηρήθηκε ότι εκείνα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις O₂, εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της *MnSOD* σε σχέση με όσα είχαν παραχθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O₂ (Balasubramanian και συν., 2007)· συνεπώς, η έκφρασή του μεταβάλλεται από τις εκάστοτε συνθήκες επώασης. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυτού, τα οποία ανιχνεύθηκαν στα *in vivo* παραγόμενα έμβρυα (*in vivo* derived embryos, IVD) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την IVP (Lonergan και συν., 2003β), υποστηρίζουν την παραπάνω δράση του ως θετικό μάρτυρα της ποιότητας των εμβρύων. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *MnSOD* έχουν συσχετιστεί επίσης με έμβρυα καλύτερης ποιότητας (Rizos και συν., 2002α· Lonergan και συν., 2003β). Σε αντίθεση με την *MnSOD*, το γονίδιο της υπεροξειδάσης του σαρκοσινικού ή L-πιπεκολικού οξέος (pipecolic acid oxidase, *PIPOX* ή peroxisomal sarcosine oxidase, *SOX*) υπερεκφράζεται στα IVP σε σύγκριση με τα IVD έμβρυα (Rizos και συν., 2002β), με αποτέλεσμα να αποτελεί έναν πιθανό δείκτη οξειδωτικού stress. Η υπεροξειδάση αυτή είναι ευαίσθητη σε συνθήκες stress, σχετίζεται με τα υπεροξειδοσωμάτια και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων (Guerin και συν., 2001). Η έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου αυτού από την πρώτη κιόλας μέρα της ανάπτυξης δείχνει ότι το έμβρυο, σε πολύ πρώιμο στάδιο, μπορεί και αντιδρά ενάντια σε συνθήκες stress (Gutiérrez-Adán και συν., 2004).

Στα 8 κυττάρων έμβρυα ανιχνεύθηκαν 300 και πλέον σημαντικά μετάγραφα, τα οποία εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα κατά τη χρονική διάρκεια της αντικατάστασης του ελέγχου που ασκεί το μητρικό γονιδίωμα από το αντίστοιχο του εμβρυϊκού (Vigneault και συν., 2009). Μεταξύ αυτών και το γονίδιο *KAT2B* ((K)λυσίνη ακετυλτρανσφεράση 2B, K(lysine) acetyltransferase 2B), γνωστό και ως *PCAF* (p300/CFBP-σχετιζόμενος παράγοντας, p300/CBP-associated factor). Το *KAT2B* ακετυλιώνει τις ιστόνες και συσχετίζεται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τη μεταγραφική ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των καλλιιεργούμενων κυττάρων (Yamauchi και συν., 2000). Ο ρυθμιστικός του ρόλος στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση έχει περιγραφεί κάτω από συνθήκες υποξίας, τροποποιώντας τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα του p53, καθώς και του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1α) (Xenaki και συν., 2008). Κατά τη μετάβαση από το μητρικό στο εμβρυϊκό γονιδίωμα, τα έμβρυα που τροποποιήθηκαν με α-αμανιτίνη (αναστολέας μεταγραφής) παρουσίασαν μείωση της έκφρασης του *KAT2B*, κατά 16 φορές, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη τροποποιημένα (Vigneault και συν., 2009). Επιπλέον, τα *in vitro* έμβρυα εμφανίζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *KAT2B* συγκριτικά με τα αντίστοιχα *in vivo* (Kerkova και συν., 2011). Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω δεδομένα, το γονίδιο αυτό θεωρείται πιθανός δείκτης της βιωσιμότητας των εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να εξεταστεί στην παρούσα έρευνα.

Τέλος, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του πλασμινογόνου (*PLG*) και του υποδοχέα του u-PA (plasminogen activator urokinase receptor, *PLAUR*) πραγματοποιείται για πρώτη φορά σε βλαστοκύστες (7 ημερών) βοοειδών. Ο έλεγχος της μεταγραφής των παραπάνω γονιδίων δεν χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων, αλλά για τη μελέτη της επίδρασης των προστιθέμενων ουσιών-ενζύμων στη μετα-μεταγραφική δραστηριότητα των άμεσα συσχετιζόμενων γονιδίων.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η συμμετοχή των μελών του πρωτεολυτικού συστήματος PAs / PL στην αναπαραγωγική διαδικασία αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος πολλών επιστημονικών ομάδων με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου τους και των πιθανών μηχανισμών δράσης τους στις διάφορες φάσεις της αναπαραγωγής. Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η πρωτεολυτική δραστηριότητα του συστήματος είναι σημαντική για τη σπερματογένεση, την ωρίμανση του ωοθυλακίου και την ωοθυλακιόρρηξία, την ωρίμανση του ωαρίου, τη γονιμοποίηση, την πρόιμη ανάπτυξη του εμβρύου και την εγκατάστασή του, αλλά και σε πολλά άλλα στάδια της αναπαραγωγής. Είναι γνωστό ότι, με τη βοήθεια των *in vitro* τεχνικών, δίνεται η δυνατότητα της εν τω βάθει μελέτης του ρόλου του συστήματος, πραγματοποιώντας πολλές πειραματικές επαναλήψεις, χωρίς μεγάλο κόστος και με άριστο έλεγχο των συνθηκών της υπό μελέτη διαδικασίας. Επιπλέον, οι διαδικασίες, όπως είναι η ωρίμανση, η γονιμοποίηση, η καλλιέργεια και η εγκατάσταση των εμβρύων, είναι δύσκολο να μελετηθούν *in vivo*, καθώς όλες λαμβάνουν χώρα σε μη προσπελάσιμο περιβάλλον του γεννητικού συστήματος του θήλεος. Η μελέτη των παραπάνω φαινομένων διευκολύνονται από την τεχνολογία της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων (IVP), κατά την οποία η προσθήκη διαφόρων ουσιών μπορεί να τροποποιήσει το περιβάλλον καλλιέργειας, εξομοιώνοντάς το με τις *in vivo* συνθήκες. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Papanikolaou και συν., 2008), σύμφωνα με τα οποία η τροποποίηση του υποστρώματος της IVF με t-PA και η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με u-PA ευνόησαν τα ποσοστά αυλάκωσης των πρώιμων εμβρύων βοοειδών, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των δύο παραπάνω τροποποιήσεων στο ποσοστό και στην ποιότητα των παραγόμενων βλαστοκύστεων. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης των παραπάνω ενζύμων στα αποτελέσματα της IVP, αναπροσαρμόζοντας το πειραματικό πρωτόκολλο σύμφωνα με τα σύγχρονα δεδομένα της IVP. Σύμφωνα με τις σύγχρονες τάσεις, η δοκιμή νέων ουσιών ή γενικά παρεμβάσεων που έχουν ως στόχο τη βελτιστοποίηση των IVP πρωτοκόλλων, συνίσταται να γίνεται σε θρεπτικά υποστρώματα καθορισμένης ή ημι-καθορισμένης σύστασης, τα οποία έχουν σχεδόν αντικαταστήσει τα μη-καθορισμένης σύστασης καλλιεργητικά υποστρώματα. Η περιεκτικότητα των τελευταίων σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, αμινοξέα, νιτρώδη, ορμόνες κ.α. είναι άγνωστη, εξαιτίας της

συμμετοχής ορού εμβρύου μόσχου και βόειας αλβουμίνης ορού, τα οποία έχουν ακαθόριστη -εν πολλοίς- σύσταση. Ωστόσο, θα πρέπει να τονισθεί ότι αυτή η στρατηγική/προσέγγιση δεν προσομοιάζει το δυναμικό περιβάλλον της μήτρας.

Η υπόθεση της παρούσας έρευνας ήταν ότι τροποποιώντας τα υποστρώματα γονιμοποίησης και καλλιέργειας με παράγοντες του ενζυμικού συστήματος, θα ήταν πιθανό να επηρεασθεί η ποσοτική ή/και ποιοτική απόδοση της IVF. Έτσι, στόχος των πειραμάτων που ακολουθούν ήταν να μελετηθεί:

A) Η επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος γονιμοποίησης με προσθήκη t-PA (πείραμα 1^ο), και

B) Η επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων [είτε σε υπόστρωμα ημι-καθορισμένης σύστασης (πείραμα 2.α), είτε σε μη-καθορισμένης με την παρουσία ορού εμβρύου μόσχου και συγκαλλιέργεια σε μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (πείραμα 2.β)], στο ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων.

Γ) Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων, και των δύο πειραμάτων, αναλύοντας το πρότυπο έκφρασης σημαντικών μεταγράφων για την βιωσιμότητά τους. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε να μελετηθούν γονίδια, τα οποία εμπλέκονται σε θεμελιώδη μονοπάτια για τη διατήρηση της ομοιοστασίας και της επιβίωσης του εμβρύου, όπως είναι η απόπτωση, ο μεταβολισμός η πρωτεόλυση και η εγκατάστασή του, αλλά και γονίδια, των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται ως απάντηση στην ανάπτυξη συνθηκών οξειδωτικού stress.

Δ) Η συνολική δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών τους σε όλα τα υποστρώματα, είτε μετά το τέλος της γονιμοποίησης είτε της καλλιέργειας των εμβρύων, αντίστοιχα, ώστε να διερευνηθούν τυχόν αλλαγές της δραστηριότητας των μελών του συστήματος στο θρεπτικό μέσο, οι οποίες ακόμα και αν δεν είναι φαινοτυπικά αντιληπτές στο αποτέλεσμα, πιθανόν να μπορούν να το επηρεάσουν.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια και υποστρώματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αγοράσθηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (Taufkirchen-Munich, Germany), εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή όλων των υποστρωμάτων ήταν ειδικό για χειρισμούς εμβρύων (water for embryo transfer, Sigma W1503). Η αποστείρωση όλων των διαλυμάτων γινόταν με τη δίοδο όλων των υποστρωμάτων διαμέσου ηθμού μίας χρήσης, διαμέτρου 0,22 μm (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Germany) σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Horizontal laminar flow, Mini-H Telstar, Spain).

Η σύνθεση και παρασκευή όλων των υποστρωμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

2.2 ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ (*IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION, IVP)

Τα πειράματα της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων και η συλλογή των αντίστοιχων βλαστοκύστεων και των καλλιεργητικών υποστρωμάτων του 2.α πειράματος πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο IVF του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου της Γάνδης (Γάνδη, Βέλγιο). Τα υπόλοιπα πειράματα της IVP (πειράματα 1 και 2.β) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο IVF της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.2.1 Συλλογή Ωοθηκών – Ωαρίων

Για κάθε πείραμα της IVP, χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες αγελάδων, των οποίων η συλλογή πραγματοποιήθηκε από τοπικά σφαγεία (Καρδίτσας για όλα τα πειράματα και σφαγεία Rekkem-Βέλγιο για το πείραμα 2.α). Μετά τον εκσπλαχνισμό των αγελάδων, γινόταν άμεση συλλογή των ωοθηκών σε ισοθερμικό δοχείο, το οποίο

περιείχε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl, ισοτονικό διάλυμα για ενδοφλέβια χρήση, ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα) και 0,1% γενταμυκίνη (ενέσιμη 5% θειική γενταμυκίνη, Gentamycin sulphate 5% injection, BREMER PHARMA GMBH, Germany), σε θερμοκρασία 37 °C. Η συνήθης διάρκεια της διαδικασίας, από τη συλλογή της πρώτης ωοθήκης μέχρι και τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, ήταν περίπου 1½ ώρα. Για να αποφευχθεί η ανάπτυξη αυξημένου μικροβιακού φορτίου στις ωοθήκες (από πιθανή επιμόλυνσή τους στο σφαγείο), πραγματοποιούνταν διαδοχικές εκπλύσεις των ωοθηκών σε φρέσκο διάλυμα φυσιολογικού ορού (37 °C) και επιφανειακή απολύμανσή τους με γάζα, η οποία ήταν εμποτισμένη σε διάλυμα αλκοόλης 70%. Μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας της αναρρόφησης, οι ωοθήκες διατηρούνταν σε γυάλινο δοχείο με φυσιολογικό ορό, σε υδατόλουτρο, στους 37 °C.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν η αναρρόφηση των ωοθυλακίων (Εικόνα 4). Η συλλογή γινόταν από ωοθυλάκια διαμέτρου 2-8 mm, με διαυγές τοίχωμα και εκτεταμένη αγγείωση χρησιμοποιώντας σύριγγα των 10 ml και βελόνα 18G x 1 1/2" (KDL®, Hamburg, Germany), η κωνική αιχμή της οποίας διασφαλίζει την αποτελεσματική αναρρόφηση των ωοθυλακίων. Η τοποθέτηση της βελόνας γινόταν υπό γωνία 45° κάτω από την επιφάνεια των ωοθυλακίων, έτσι ώστε το ωάριο να συμπαρασυρθεί κατά την αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού (Εικόνα 4). Η συλλογή του ωοθυλακικού υγρού γινόταν σε σωλήνες πολυπροπυλενίου falcon των 50 ml (Cellstar® Tubes, greiner bio-one, Germany), οι οποίοι καθ' όλη τη διάρκεια της αναρρόφησης παρέμεναν σε υδατόλουτρο (37 °C). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το falcon με το ωοθυλακικό υγρό τοποθετούταν σε επωαστικό κλίβανο 5% CO₂, στους 39 °C και μέγιστη υγρασία (SHEL LAB 5215, Oregon, U.S.A.) για 10-15 λεπτά, προκειμένου τα συμπλέγματα ωαρίων-ωοφόρου δίσκου (Cumulus-Oocytes Complexes, COCs) να καθιζάνουν. Στη συνέχεια, το διαυγές υπερκείμενο υγρό αφαιρούταν προσεκτικά από το σωλήνα και το υπόλοιπο του περιεχομένου του τοποθετούταν σε μικροβιολογικό τρυβλίο (petri dish) διαμέτρου 9,4 cm (greiner bio-one, Germany).

Όλες οι εργασίες, οι οποίες ακολουθούσαν τη συλλογή του ωοθυλακικού υγρού γινόταν στον θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής.

Η επιλογή και η συλλογή των καλής ποιότητας COCs γινόταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (Stereoscopic Zoon Microscope SMZ1500, Nikon) προσαρμόζοντας κατάλληλα την εστίαση του μεγεθυντικού φακού (0,75x έως 11,25x) (Εικόνα 4). Τα μορφολογικά κριτήρια για την επιλογή των COCs, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε

κάθε πείραμα ήταν ενδεικτικά της ποιότητας των ωαρίων, έτσι ώστε να επιλέγονται μόνο τα 1^{ης} και 2^{ης} κατηγορίας COCs, σύμφωνα με τα κριτήρια των de Loos και συν. (1989) και Younis και συν. (1989): όσα ωάρια διέθεταν ομοιογενές και διαυγές ή ομοιόμορφο σκοτεινόχρωμα ωόπλασμα, το οποίο περιβαλλόταν από συμπαγές πολύστιβο περίβλημα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου ανήκαν στην 1^η κατηγορία, ενώ τα ωάρια της 2^{ης} κατηγορίας εμφανίζονταν με λιγότερο διαυγές ωόπλασμα, περικλειόμενο από τουλάχιστον τρεις στιβάδες κυττάρων του ωοφόρου δίσκου. Μετά την επιλογή, τα COCs τοποθετούνταν σε μικροβιολογικά τρυβλία, διαμέτρου 3,5 cm, όπου και διενεργούνταν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις τους σε διάλυμα PBS και δύο σε υπόστρωμα ωρίμανσης, εξασφαλίζοντας έτσι την πλήρη απομάκρυνση άλλων κυττάρων (προερχόμενων κατά την αναρρόφηση των ωοθυλακίων) και την αποφυγή πρόσμιξης υπολειμμάτων του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS) στο υπόστρωμα ωρίμανσης.



Εικόνα 4: Αναρρόφηση των ωοθυλακίων διαμέτρου 2-8 mm (A), επιλογή, συλλογή και έκπλυση των καλής ποιότητας COCs (1^{ης} και 2^{ης} κατηγορίας) με τη βοήθεια στερεοσκοπίου σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (B).

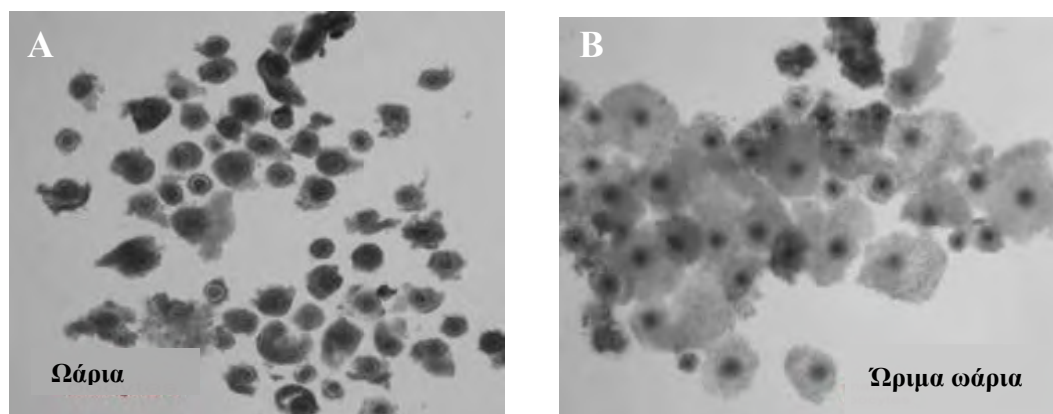
2.2.2 *In vitro* ωρίμανση ωαρίων (*In vitro* Maturation, IVM)

Η ωρίμανση των ωαρίων γινόταν σε ομάδες των 50-55, μετά από τυχαία επιλογή, σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 4-βοθρίων (4-well dishes, Nunc- Thermofisher Scientific, Denmark), στα οποία περιέχονταν 500 µl υποστρώματος ωρίμανσης TCM-199 εμπλουτισμένου με 10 ng/ml επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και 10% ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS). Στην περίπτωση του πειράματος 2.α, το υπόστρωμα ωρίμανσης δεν περιείχε FCS· αντ’

αυτού χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα TCM-199 εμπλουτισμένο με 20 ng/ml EGF και 50 mg/ml γενταμικίνης.

Το υπόστρωμα ωρίμανσης προετοιμαζόταν 1 ώρα, και όχι νωρίτερα, πριν από τη χρήση του και διατηρούταν σε επωαστικό κλίβανο CO₂ στους 39 °C με 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία. Ο λόγος της αυστηρής τήρησης του χρονικού περιορισμού στην παρασκευή του υποστρώματος είναι η εξαιρετική ευαισθησία της γλουταμίνης σε αλλαγές θερμοκρασίας ή/και pH, ενώ η παρατεταμένη παραμονή της στο θρεπτικό μέσο μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμησή της.

Η ωρίμανση των COCs (Εικόνα 5) γινόταν σε επωαστικό κλίβανο CO₂ στους 39 °C με 5% CO₂, και μέγιστη υγρασία για 24 ώρες.



Εικόνα 5: COCs πριν (A) και μετά (B) την *in vitro* ωρίμανση. Η διάταση του ωοφόρου δίσκου είναι εμφανής αμέσως μετά την ωρίμανση των COCs.

2.2.3 Επεξεργασία σπέρματος και ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων

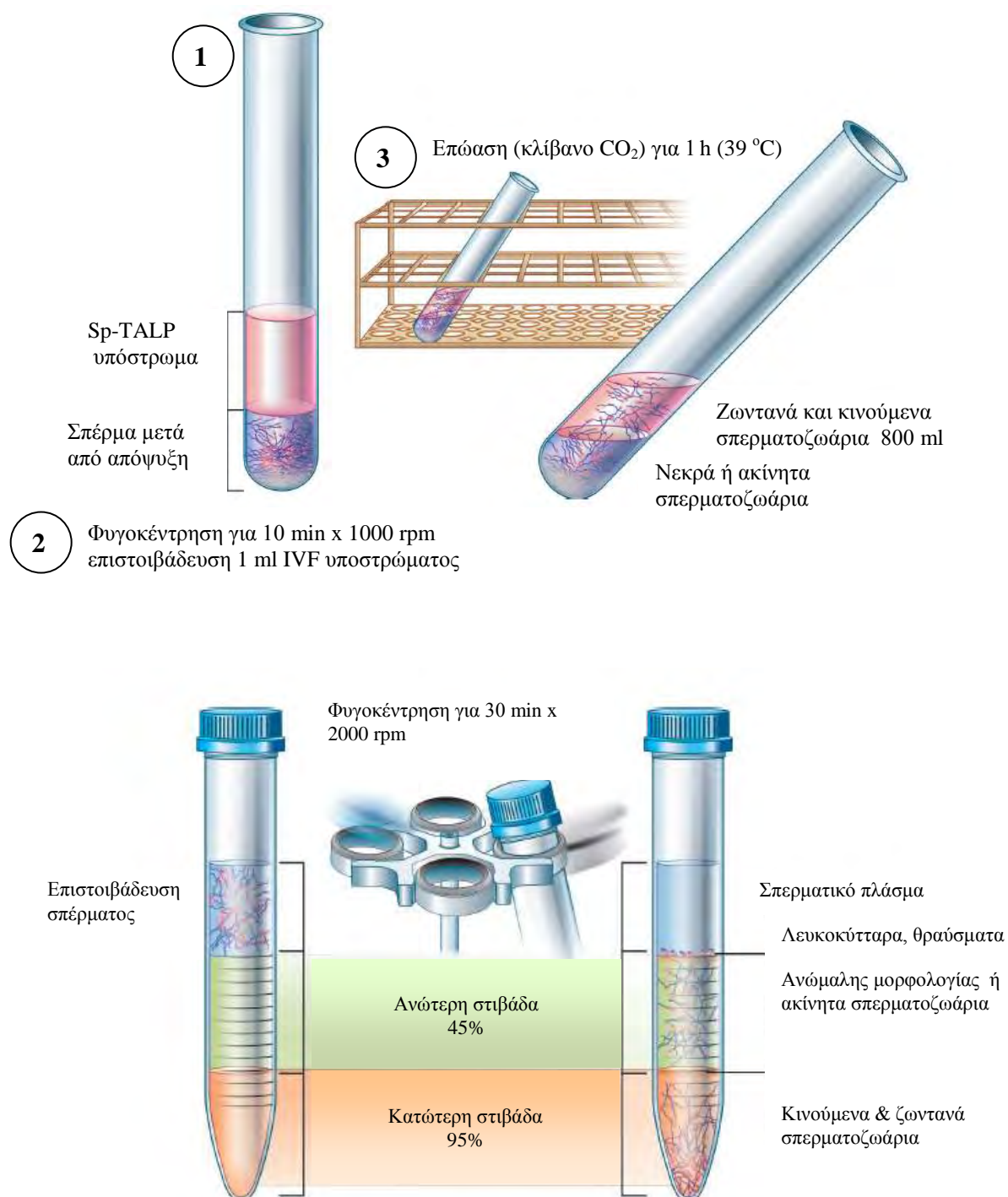
Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε καταψυγμένο σπέρμα ταύρου φυλής Holstein, γνωστής *in vivo* και *in vitro* γονιμότητας, από το ίδιο εκσπερμάτισμα. Η αποθήκευση του σπέρματος γινόταν μέσα σε ειδικά πλαστικά σωληνάρια (ministraws), χωρητικότητας 0,25 ml, σε υγρό άζωτο. Η αναβίωση των σπερματοζωαρίων επιτυγχανόταν με την απόψυξη των σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C επί 1 λεπτό. Στη συνέχεια, το σπέρμα τοποθετούταν σε σωλήνες των 15 ml, οι οποίοι περιείχαν 3 ml διαλύματος Sp-TALP και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (1000 x rpm, 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου). Με τη διαδικασία αυτή γινόταν αφ' ενός αφαίρεση όλων των συστατικών, τα οποία χρησιμοποιούνταν

για την κατάψυξη του σπέρματος (έκπλυση) και αφ' ετέρου καθίζηση των σπερματοζωαρίων.

Για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και τον εμπλουτισμό του διαλύματος με σπερματοζώαρια προοδευτικής κίνησης επιλέχθηκε η μέθοδος του swim-up (Εικόνα 6), όπως περιγράφηκε από τους Parrish και συν. (1986). Μετά την προσεκτική αφαίρεση της υπερκείμενης φάσης, γινόταν επιστοιβάδευση 1 ml διαλύματος IVF στο ιζημα και ο σωλήνας τοποθετούταν σε επωαστικό κλίβανο CO₂ με γωνία 45°, για 1 ώρα. Τα ζωντανά και με ισχυρή προοδευτική κίνηση σπερματοζώαρια μετακινούνταν στην άνω στιβάδα του διαλύματος IVF. Στη συνέχεια, χωρίς να διαταραχθεί το διάλυμα, τα 800 μl της επιφάνειας του διαλύματος αφαιρούνταν και τοποθετούταν σε αποστειρωμένο σωληνάριο (1,5 ml erpendorf), όπου και διατηρούνταν στους 39 °C, μέχρι τη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Στο πείραμα 2.α, ο διαχωρισμός και η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων γινόταν με φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας (Percoll, 45-95%, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) (Εικόνα 6). Μετά την απόψυξη του σπέρματος, γινόταν προσεκτική επιστοιβάδυσή του στο διάλυμα Percoll και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 2000 x rpm. Αμέσως μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, ακολουθούσαν 2 διαδοχικές εκπλύσεις του ιζήματος, στο οποίο περιέχονταν τα σπερματοζώαρια, με 5 ml διαλύματος Sp-TALP (+BSA) και φυγοκέντρηση στις 750 x rpm για 10 λεπτά.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων πραγματοποιούνταν σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer χρησιμοποιώντας αραιωμένο δείγμα (1/10) σε νερό βρύσης. Η μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος γινόταν με 10 x / 0,25 μεγεθυντικό φακό (Zeiss A-Plan, Germany) χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar Plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Το σπέρμα αραιωνόταν περαιτέρω με προσθήκη υποστρώματος γονιμοποίησης σε τελική συγκέντρωση 1×10^6 σπερματοζώαρια ανά ml.



Εικόνα 6: Μέθοδοι διαχωρισμού κινούμενων σπερματοζωαρίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα 1, 2.β (μέθοδος swim-up) και 2.α (φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας).

Πηγή: Beydola και συν., 2013 (τροποποίηση).

2.2.4 *In vitro* γονιμοποίηση (*In vitro* Fertilization, IVF)

Αμέσως μετά την 24^{ωρη} ωρίμανση των ωαρίων και πριν από τη διαδικασία της γονιμοποίησης, γινόταν έκπλυση των COCs δύο φορές με διάλυμα PBS και δύο με τυποποιημένο υπόστρωμα IVF. Ανάλογα με τον τύπο του πειράματος, τα COCs τοποθετούταν σε τρυβλίο 4-βοθρίων, καθένα από τα οποία περιείχε 250 μl τροποποιημένου ή τυποποιημένου υποστρώματος, αντίστοιχα (Βλέπε πειραματικό σχεδιασμό 2.6).

Τα ωάρια επωάζονταν με κατάλληλη ποσότητα από το τελικό διάλυμα του επεξεργασμένου σπέρματος (1×10^6 σπερματοζωάρια/ml) για 22-24 ώρες, σε κλίβανο CO₂ (39 °C, 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία). Ο τελικός όγκος του υποστρώματος γονιμοποίησης όλων των ομάδων ήταν 500 μl. Η κάλυψη με παραφινέλαιο δεν απαιτούταν τόσο κατά τη διάρκεια της IVM όσο και της IVF.

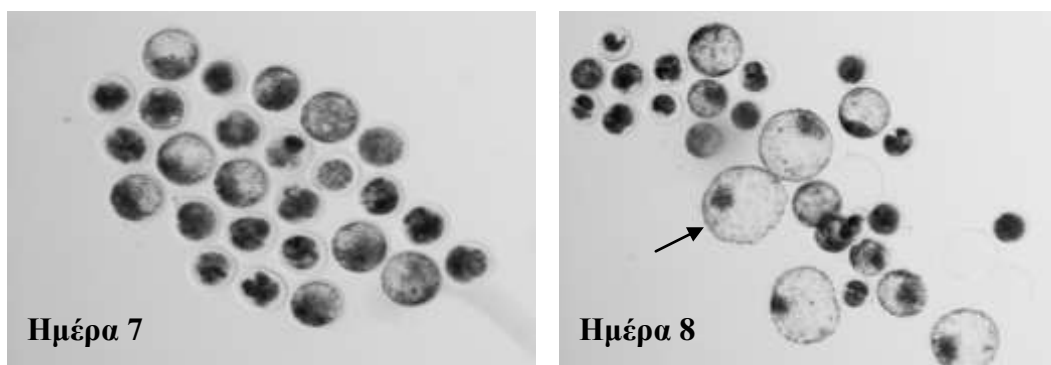
2.2.5 *In vitro* καλλιέργεια (*In vitro* Culture, IVC) των εμβρύων

Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, όλα τα εν δυνάμει γονιμοποιημένα ωάρια (πιθανά ζυγωτά) της κάθε ομάδας αφαιρούνταν από το υπόστρωμα της IVF και μεταφέρονταν σε διαφορετικά φιαλίδια τύπου falcon των 15 ml, τα οποία περιείχαν 2 ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια, γινόταν η απογύμνωση των ωαρίων από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου με τη βοήθεια συσκευής ανατάραξης (vortex, FALC instruments, Treviglio-Italy) επί 2-3 λεπτά. Η εύρεση όλων των ωαρίων, γονιμοποιημένων και μη, γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση σε μικροβιολογικό τρυβλίο petri και ακολουθούσαν 3-4 διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα PBS και 2 φορές σε υπόστρωμα SOF.

Για την καλλιέργεια των εμβρύων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία ιστοκαλλιέργειας, διαμέτρου 3,5 cm αποστειρωμένα και ελεύθερα από DNAσες, RNAσες ή ανθρώπινο εξωγενές DNA (CellStar, greiner bio-one, Germany). Τα υποστρώματα καλλιέργειας SOF, οι μικροσταγόνες των 25 μl (1^ο πείραμα) και το υπόστρωμα των 400 μl (2^ο πείραμα), ετοιμάζονταν 12-15 ώρες νωρίτερα και καλύπτονταν με παραφινέλαιο, προκειμένου να εξισορροπηθεί το pH του διαλύματος και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμισή του κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των εμβρύων.

Η καλλιέργεια των εμβρύων διαρκούσε έως και 8 ημέρες σε επωαστικό κλίβανο τριών αερίων (SANYO MCO-5M, Osaka, Japan). Οι συνθήκες επώασης

ήταν 39 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ με τη μέγιστη υγρασία. Η εκτίμηση του ποσοστού αυλάκωσης (cleavage rate) των εμβρύων πραγματοποιούνταν 48 ώρες μετά από τη γονιμοποίηση (post insemination, pi) και του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων 7 ή 8 μέρες pi, ανάλογα με το πείραμα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Παρατήρηση βλαστοκύστεων την ημέρα 7 (αριστερά) και 8 (δεξιά) με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (μεγέθυνση 6x) και εκτίμηση του ποσοστού παραγωγής τους. Στη δεξιά εικόνα παρατηρούνται οι εκκολαφθείσες βλαστοκύστες (βέλος).

2.2.6 Προετοιμασία μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (*cumulus cells monolayer*)

Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Goonaerts και συν. (2009), με μερικές παραλλαγές, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία της μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (πείραμα 2.β), είχε ως εξής:

Μία ομάδα COCs (50-55), αμέσως μετά την IVM, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, τα οποία περιβάλλουν τα ώριμα ωάρια. Η απομόνωση περιλάμβανε τη μεταφορά των COCs σε αποστειρωμένο τρυβλίο με διάλυμα PBS (2-3 ml), στο οποίο η απογύμνωση των ωαρίων γινόταν μηχανικά, με τη βοήθεια ειδικής εύκαμπτης πιπέτας διαμέτρου 130 μm (denudation pipette, Cook Medical, Bloomington, IN-U.S.A). Η επιλογή της παραπάνω μεθόδου απογύμνωσης προτιμήθηκε από το εναλλακτικό πρωτόκολλο ανατάραξης των COCs με vortex επί 8 λεπτά, καθώς οι ήπιοι χειρισμοί των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου αυξάνουν την πιθανότητα επιβίωσής τους. Μετά την αφαίρεση όλων των απογυμνωμένων ωαρίων από το διάλυμα, γινόταν συλλογή του τελευταίου σε αποστειρωμένο κωνικό erppendorf (1,5 ml) και ήπια φυγοκέντρωση επί 10 λεπτά στις 750 x rpm. Στη συνέχεια, πολύ προσεχτικά και χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα,

αφαιρούνταν το υπερκείμενο διάλυμα. Η επανασύσταση του ιζήματος γινόταν σε SOF (εμπλουτισμένο με FCS), από το οποίο τα 500 μ l τοποθετούταν σε τρυβλίο 4-βοθρίων χωρίς να καλύπτονται με παραφινέλαιο. Το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας προετοιμαζόταν την προηγούμενη ημέρα του πειράματος (την ημέρα 0 της καλλιέργειας ή την ημέρα της γονιμοποίησης) και παρέμενε σε κλίβανο CO₂, έτσι ώστε, κατά τη χρήση του, είχαν ήδη εξισορροπηθεί η θερμοκρασία και το pH του (39 °C, pH 7,2). Η επώαση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου γινόταν σε κλίβανο CO₂ επί 24 ώρες. Μία ημέρα μετά, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, παρατηρούταν η προσκόλληση των ζωντανών κυττάρων στον πυθμένα των βοθρίων. Για την απομάκρυνση των νεκρών αιωρούμενων κυττάρων, γινόταν αλλαγή του υποστρώματος με 400 μ l νέου διαλύματος SOF+5% FCS (το οποίο περιείχε ή όχι u-PA, ανάλογα με την ομάδα) και η καλλιέργεια καλυπτόταν με 500 μ l προεπωασμένου (20 ώρες σε κλίβανο 5% CO₂) παραφινέλαιου. Στο παραπάνω υπόστρωμα, στο οποίο είχε αναπτυχθεί η μονοστιβάδα των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, τοποθετούνταν τα απογυμνωμένα εν δυνάμει έμβρυα (25 έμβρυα ανά ομάδα).

2.2.7 Ταχεία κατάψυξη και αποθήκευση μοριδίων ή/και βλαστοκύστεων για μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των παραγόμενων βλαστοκύστεων ή/και μοριδίων ακολουθήθηκε η διαδικασία της ταχείας κατάψυξης σε υγρό άζωτο (snap freezing method). Στην περίπτωση της κατάψυξης βλαστοκύστεων 7 ημερών (D7), ομάδες των 10 εμβρύων από κάθε ομάδα, παρόμοιου μεγέθους και καλής μορφολογίας, επιλέχθηκαν από 4 επαναλήψεις πειραμάτων και τοποθετήθηκαν διαδοχικά 3-4 φορές σε διάλυμα PBS (39 °C). Αμέσως μετά, μεταφέρθηκαν σε σταγόνα PBS (10 μ l) μέσα σε σωλήνα (χωρητικότητας 0,5 ml), το οποίο ταχύτατα εμβαπτίστηκε σε δοχείο με υγρό άζωτο. Τέλος, όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν σε βαθειά κατάψυξη (– 80 °C) έως ότου αναλυθούν.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση κατάψυξης μοριδίων (έμβρυα 3^{ων} και 4^{ων} ημερών, D3 και D4), με τη διαφορά ότι 6 D3 (έμβρυα 8 κυττάρων) και 5 D4 έμβρυα (8-16 κύτταρα) αποθηκεύτηκαν από 4 διαφορετικές επαναλήψεις του 1^{ου} πειράματος.

2.2.8 Διατήρηση των υποστρώματων IVF ή IVC στους – 20 °C για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών τους (PAI)

Τα υποστρώματα της IVF (1^ο πείραμα μετά το τέλος της γονιμοποίησης, περίπου 450 μl) και της IVC (2^ο πείραμα μετά τις 7 ημέρες καλλιέργειας των εμβρύων, περίπου 350 μl) μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά κωνικά erppendorfs (1,5 ml) και φυγοκεντρήθηκαν επί 20 λεπτά στις 1000 x rpm προκειμένου να απομονωθεί μόνο η υγρή φάση των διαλυμάτων, στα οποία εκτιμήθηκε η δραστηριότητα των PAs και PAIs, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.4 (σελίδες 87-88). Όλα τα υποστρώματα μεταγγίστηκαν σε νέο αποστειρωμένο erppendorf (0,5 ml) και διατηρήθηκαν στους – 20 °C έως ότου γίνει η ανάλυσή τους.

Για λόγους εσωτερικού ελέγχου του εργαστηρίου μας και επιβεβαίωσης της αποτελεσματικής τροποποίησης των υποστρώματων με u-PA, σε κάθε επανάληψη του 2^{ου} πειράματος, μέρος (περίπου 500 μl) του προ-παρασκευαζόμενου τροποποιημένου υποστρώματος καλλιέργειας διατηρούνταν στους – 20 °C και τα δείγματα αυτά (Day 0, D0) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της αρχικής PAA και PAI.

2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΈΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)

Όλα τα πειράματα για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των εμβρύων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.3.1 Στάδιο 1^ο: Απομόνωση RNA (RNA isolation) και δράση της δεοξυριβονουκλεάσης I (DNase I) για εξάλειψη εξωγενούς DNA στα δείγματα εμβρύων

Η απομόνωση του ολικού RNA, από κάθε ομάδα εμβρύων, τα οποία είχαν προηγουμένως καταψυχθεί, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικού kit απομόνωσης RNA δειγμάτων για μικροποσότητες γενετικού υλικού (Pico Pure RNA isolation kit, Arcturus, CA, U.S.A.). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/1268200.pdf> και

περιλάμβανε διαδοχικές επώσεις και φυγοκεντρήσεις με ειδικά αντιδραστήρια για εκχύλιση, απομόνωση, έκπλυση και έκλουση του RNA χρησιμοποιώντας ειδικές στήλες (Εικόνα 8). Τελικά, το RNA εκλουόταν σε 30 μl διαλύματος έκλουσης (κατεργασμένο και απαλλαγμένο από νουκλεάσες).

Η πιθανή παρουσία γενωμικού DNA (gDNA) στα δείγματα εξαλείφθηκε με τη βοήθεια του ενζύμου DNase I, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA (αναλυτική περιγραφή στις οδηγίες του kit). Έτσι, μεταξύ των σταδίων έκπλυσης του RNA, 80 μl διαλύματος (DNase buffer και νερό απαλλαγμένο από RNases), στο οποίο είχε προστεθεί 1 Unit (μονάδα) DNase I (Invitrogen, U.S.A.), κάλυπταν τη στήλη δέσμευσης του RNA για 20-25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 15 sec στα 8000 x g, εξασφαλίζοντας την πλήρη απομάκρυνση της DNase από τα δείγματα. Η απομάκρυνση της DNase είναι απαραίτητη καθώς η παρατεταμένη δράση της είναι πιθανόν να κατακερματίσει και το επιθυμητό απομονωθέν RNA. Ο όγκος του διαλύματος, ο χρόνος εφαρμογής του στη στήλη, καθώς και η δράση της DNase I σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης DNA, βελτιστοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για την εξασφάλιση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου.

2.3.2 Στάδιο 2^ο: Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (Reverse Transcription of RNA into cDNA)

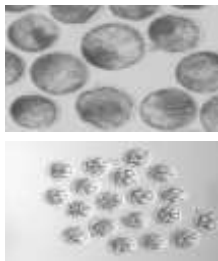
Αμέσως μετά τη διαδικασία έκλουσης, το ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν για τη μετατροπή του σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), ακολουθώντας τις οδηγίες χρήσης του High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, U.S.A.). Η αντίδραση που προετοιμαζόταν για κάθε δείγμα, σε τελικό όγκο 30 μl, περιείχε 15 μl διαλύματος RNA και 15 μl 2x ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) αντίστροφης μεταγραφής Reverse Transcription (RT) buffer [1x RT διάλυμα, 4 mM μίγμα dNTPs, 1x RT τυχαίων εκκινήτων (random primers) για την αποτελεσματική έναρξη του μονόκλωνου cDNA, 1 Unit αναστολέα των RNAsών και 1 Unit Αντίστροφη Μεταγραφάση (RTase)]. Για κάθε δείγμα ετοιμάστηκαν δύο αντιδράσεις: μία θετική (RT⁺) που περιείχε RTase και μια αρνητική χωρίς RTase (RT⁻), ως εσωτερικός έλεγχος, για την ανίχνευση τυχόν επιμόλυνσης των δειγμάτων με gDNA. Οι αντιδράσεις ετοιμάστηκαν στον πάγο (4 °C) και ακολούθησε επώασή τους σε θερμοκυκλοποιητή (25 °C επί 10 λεπτά, 37 °C επί 2 ώρες, 85 °C επί 5 λεπτά και διατήρηση στους 4 °C έως την αποθήκευση των δειγμάτων στους -20 °C).

Τέλος, με τη βοήθεια της συμβατικής PCR, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των RT⁺ και RT⁻ αντιδράσεων όλων των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας 0,4 μM εκκινητές (primer) για το γονίδιο αναφοράς *18srRNA*, ώστε να αποδειχθεί ότι τα δείγματα δεν είχαν επιμολυνθεί με gDNA (το RT⁻ δεν πρέπει να δώσει προϊόν στην PCR). Στην περίπτωση αυτή, 2 μl cDNA (δείγματα: RT⁺ ή RT⁻) αναμίχθηκαν με μίγμα PCR (200 μM από κάθε dNTPs, 0,625 Unit Taq πολυμεράση, 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μM κάθε ζεύγος εκκινητών *18srRNA* και το υπόλοιπο νερό) και οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή με τις εξής συνθήκες επώασης: 1) 95 °C επί 3 λεπτά (ενεργοποίηση DNA πολυμεράσης), 2) 95 °C επί 30 sec (αποδιάταξη DNA), 3) 55 °C επί 30 sec (πρόσδεση των εκκινητών), 4) 72 °C επί 1 λεπτό (επιμήκυνση των εκκινητών-σύνθεση DNA), επανάληψη των 2-4 σταδίων για 35 φορές και 5) 72 °C επί 5 λεπτά (τελική επιμήκυνση όλων των τμημάτων DNA). Όλα τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε 1% πηκτή αγαρόζης (agarose gel), όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.

2.3.2.α Προετοιμασία πηκτής αγαρόζης- Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

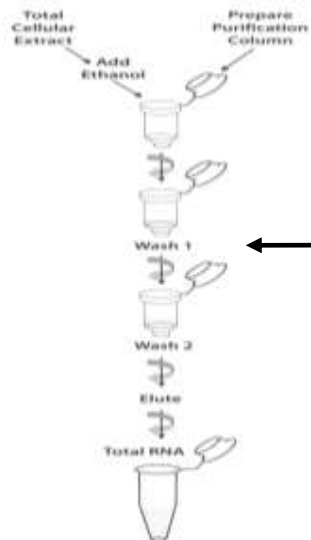
Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης γινόταν σε κωνική φιάλη, όπου 50 ml [1x TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM οξικού οξέος, 1 mM EDTA, pH 8,5)] αναμιγνύονταν με την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (Biorad, CA, U.S.A.), ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση της πηκτής (για 1% πηκτή χρησιμοποιήθηκε 0,5 g αγαρόζης). Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετούταν σε φούρνο μικροκυμάτων για 1-2 λεπτά υπό σταδιακή ανάδευση, έως την πλήρη διάλυση της αγαρόζης και τον σχηματισμό φυσαλίδων. Στο διάλυμα αγαρόζης γινόταν προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 1 μg/ml) λίγο πριν από τη μετατροπή του σε πηκτή, με πολύ καλή ανάδευση έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως. Έπειτα, ακολουθούσε η προσθήκη του στο καλούπι (casting tray), με τοποθετημένα τα ειδικά «χτενάκια» για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων (πηγαδάκια) όπου και παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια η πηκτή καλυπτόταν με 1 x TAE διάλυμα και ακολουθούσε η φόρτωση των προϊόντων της PCR [10 μl προϊόντος της PCR με 5 μl χρωστική (1% SDS δωδεκακυλικόθειϊκό νάτριο, 1 g 50% Γλυκερόλης Sigma Ultra και 0,05% κυανού της βρωμοφαινόλης)]. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης κυμαινόταν περί τα 15 λεπτά (ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων) στα 70 Volt – 70 mA.

Στάδιο 1^ο: Απομόνωση και έκλυση ολικού RNA εμβρύων



Βλαστοκύστες (N=10) ή μορίδια (N=5 ή 6) σε PBS

1. Φυγοκέντρηση 3000 x g για 3 min
2. Αφαίρεση υπερκείμενου
3. Προσθήκη διαλύματος έκλυσης
4. Επώαση στους 42 °C για 30 min



DNase treatment

Εξάλειψη πιθανού gDNA με τη δράση της DNase I

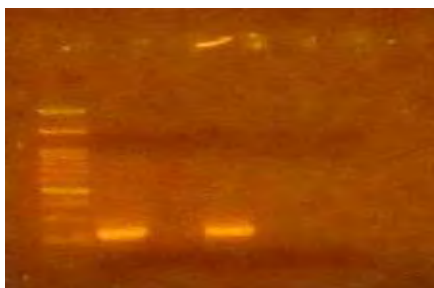
Στάδιο 2^ο: Αντίστροφη μεταγραφή (RT)



Total RNA
1x RT διάλυμα
4 mM μίγμα dNTPs
1x RT τυχαίων εκκινητών
1 U αναστολέα των RNασών
1 U RTase για RT⁺ (όχι για RT⁻)

Επώαση σε κατάλληλες συνθήκες

Τυχαίοι εκκινητές



Ladder RT⁺ RT⁻ RT⁺ RT⁻ NTC

2 αντιδράσεις RT (RT⁺ και RT⁻), με προσθήκη του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάσης ή όχι.
Έλεγχος τυχόν επιμόλυνσής των δειγμάτων.

Εικόνα 8: Συνοπτική απεικόνιση των διαδικασιών των σταδίων 1 και 2.

2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών (*primers*)

Οι εκκινητές (Vbc Biotech, Βιέννη, Αυστρία), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού PRIMER 3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Εικόνα 9). Η ειδικότητά τους ως προς το γονίδιο στόχο ελέγχθηκε με βοήθεια του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, βασικό υπολογιστικό εργαλείο αναζήτησης τοπικών στοιχίσεων), χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα της αγελάδας (*Bos taurus*). Η αλληλουχία των primers, το μέγεθος του προϊόντος της PCR και ο κωδικός πρόσβασης στην GenBank κάθε μετάγραφου περιγράφονται στον Πίνακα 1.

2.3.4 Μελέτη της σταθερότητας και επιλογή γονιδίων αναφοράς (*reference genes / housekeeping genes, HK genes*) για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης

Η επιλογή των γονιδίων αναφοράς (*housekeeping genes*), τα οποία χρησιμοποιούνται για τη σχετική ποσοτικοποίηση (κανονικοποίηση) της έκφρασης των γονιδίων, αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της real-time PCR, καθώς η προσθήκη ουσιών-ενζύμων στα υποστρώματα γονιμοποίησης ή καλλιέργειας μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Το πρόγραμμα που περιγράφηκε από τους Vandesompele και συν. (2002) αποτελεί μια χρήσιμη στρατηγική επιλογής των πιο σταθερών γονιδίων αναφοράς, το οποίο παράλληλα υποδεικνύει τον ελάχιστο αριθμό γονιδίων που απαιτούνται έτσι ώστε να υπολογιστεί ένας αξιόπιστος παράγοντας κανονικοποίησης (*normalization factor, NF*).

Στην περίπτωση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, αρχικά επιλέχθηκαν 5 γονίδια αναφοράς (*18srRNA*, *H2a.z*, *GAPDH*, *YWHAZ* και *SDHA*), τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες γονιδίων και δεν ρυθμίζονται από ίδιους μηχανισμούς, προκειμένου στη συνέχεια να εντοπισθούν αυτά που είναι απαραίτητα για την κανονικοποίηση των δεδομένων σε κάθε πείραμα. Επίσης, τα παραπάνω γονίδια βρέθηκε ότι εκφράζονται σταθερότερα μεταξύ άλλων, σε έμβρυα βοοειδών διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (Goossens και συν., 2005).

Αμέσως μετά την real-timePCR, χωρίς καμία επεξεργασία των δεδομένων, και σύμφωνα με το μαθηματικό τύπο: $Q = E^{(\Delta C_t)}$: όπου E (Efficiency) η αποδοτικότητα της real-time PCR, η οποία πλησίαζε το 100% (E=2), και $\Delta C_t = C_{t\text{sample}} - C_{t\text{min}}$, υπολογίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς. Με τη βοήθεια

της εφαρμογής geNorm Visual Basic σε Microsoft excel 2000 (έκδοση: 3,5) και ακολουθώντας τις οδηγίες, οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στο http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf, προέκυψε ο κατάλληλος αριθμός των γονιδίων αναφοράς αλλά και μια τιμή M (M value), η οποία ήταν ενδεικτική της σταθερότητάς τους (Εικόνες 9 και 12).

2.3.5 Στάδιο 3^ο: Εκτίμηση της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων με τη βοήθεια της *real-time PCR*

Η αξιολόγηση της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων (D7 βλαστοκύστες) έγινε με τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης ορισμένων γονιδίων μαρτύρων (*PLAC8*, *AKR1B1*, *BIRC5* ή *survivin*, *BBC3* ή *PUMA*, *PGHS-2* ή *COX-2*, *BCL2L1*, *SLC2A5* ή *GLUT-5*, *MnSOD*, *PLG* και *PLAUR*), ενδεικτικών της ποιότητάς τους, σε έμβρυα τα οποία καλλιεργήθηκαν ή γονιμοποιήθηκαν σε τροποποιημένα ή μη υποστρώματα. Πρόκειται για γονίδια τα οποία ελέγχουν μονοπάτια μεταβολισμού, απόπτωσης, εγκατάστασης και οξειδωτικού στρες. Για τη γονιδιακή ανάλυση των μοριδίων (D3 και D4 εμβρύων), τα οποία γονιμοποιήθηκαν σε τροποποιημένο ή μη υπόστρωμα (1^ο πείραμα), επιλέχθηκαν τα γονίδια *BAX*, *BCL2L1*, *PIPOX*, *G6PD*, *SLC2A5*, *MnSOD* και *KAT2B* ή *PCAF*.

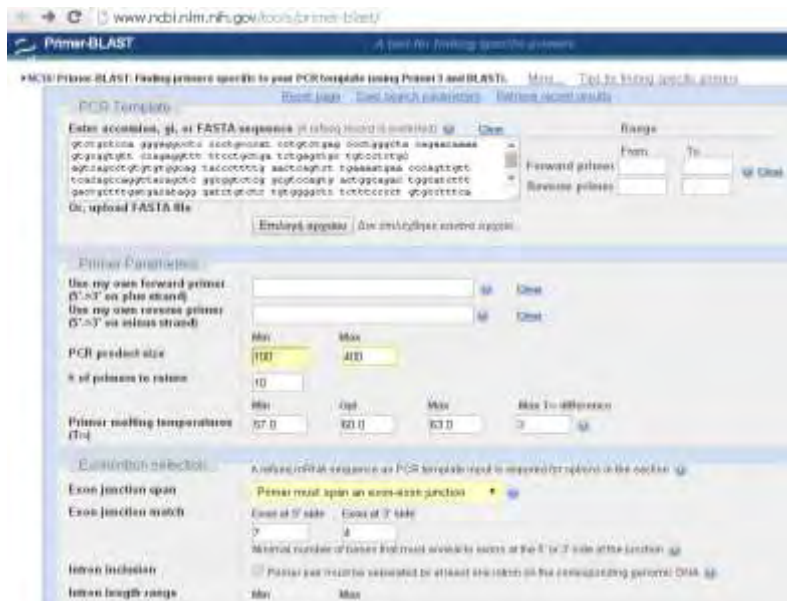
Η σχετική ποσοτικοποίηση των παραπάνω μεταγράφων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (LightCycler® 2.0 Carousel-Based System, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, η οποία έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο DNA. Η προετοιμασία των αντιδράσεων (V_{τελ}=20 μl) πραγματοποιήθηκε στον πάγο (4 °C), ακολουθώντας τις οδηγίες πρωτοκόλλου του kit (Kapa SYBR® Fast qPCR kit, Kapa Biosystems, MA, U.S.A.). Για τη μείωση του ακούσιου ενοφθαλμισμού των αντιδράσεων σε κάθε γυάλινο τριχοειδές σωληνάριο αντίδρασης (glass capillary, 20 μl, Roche Applied Science, Penzberg, Germany), πάντα σε κάθε δείγμα ετοιμαζόταν ένα PCR mix με όλα τα κοινά αντιδραστήρια (Εικόνα 9). Κάθε αντίδραση περιείχε 1 μl εμβρυϊκού cDNA ίδιας συγκέντρωσης, 200 nM από κάθε ζεύγος εκκινητών, 1x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix–Universal και 250 ng/μl BSA (New England Biolabs, Ipswich MA, U.S.A.), το οποίο εμποδίζει την προσκόλληση της DNA πολυμεράσης στα γυάλινα τριχοειδή σωληνάκια (Εικόνα 9).

Το πρωτόκολλο της PCR, το οποίο ακολουθήθηκε σε όλα τα πειράματα, περιλάμβανε ένα αρχικό βήμα ενεργοποίησης του ενζύμου (95 °C επί 10 λεπτά), διαδεχόμενο από 55 κύκλους των εξής βημάτων: αποδιάταξη DNA (95 °C επί 10 sec), πρόσδεση εκκινητών (58 °C επί 10 sec) και επιμήκυνση των εκκινητών-σύνθεση DNA (72 °C επί 15 sec). Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω κύκλων, ακολούθησε το πρόγραμμα για τη δημιουργία καμπύλης αποδιάταξης/τήξης των προϊόντων (melting curve analysis), σύμφωνα με την οποία οι αλληλουχίες-στόχοι μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το πρόγραμμα ανάλυσης της καμπύλης αποδιάταξης/τήξης (melting curve analysis) αποτελούταν από τα εξής τρία τμήματα: 95 °C (0 sec), 65 °C (15 sec) και 95 °C (0 sec). Ξεκινώντας από τους 65 °C και καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 0,1 °C/sec, έως τους 95 °C, οι μετρήσεις του φθορισμού, οι οποίες καταγράφονται από το μηχάνημα τελικά δίνουν την καμπύλη αποδιάταξης του εκάστοτε προϊόντος. Στο τέλος του προγράμματος, τα δείγματα παρέμεναν στους 40 °C επί 30 sec. Παράλληλα με τη μοναδική κορυφή στην ανάλυση του melting curve, έγινε επιπλέον ταυτοποίηση των επιθυμητών προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε 2% πηκτική αгарόζης.

Όλες οι αντιδράσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε δύο πανομοιότυπες επαναλήψεις και, για κάθε ζεύγος εκκινητών, μία αντίδραση που δεν περιείχε δείγμα διασφάλιζε την καθαρότητα των αντιδραστηρίων (εσωτερικός έλεγχος DNA επιμόλυνσης) και την αξιολόγηση των σχηματιζόμενων διμερών primers. Η σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων mRNA προέκυψε από τις μετρήσεις των τεσσάρων επιμέρους πειραματικών επαναλήψεων χρησιμοποιώντας τα τρία σταθερότερα γονίδια αναφοράς (πιο αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.3.4.). Οι συνθήκες της PCR που αναφέρονται παραπάνω, βελτιστοποιήθηκαν προκειμένου η αποτελεσματικότητα της μεθόδου να πλησιάζει το 100% (PCR efficiency, $E=2$) και οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των τροποποιημένων ή μη εμβρύων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Η ακολουθία των μεθόδων για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης αναφέρεται επιγραμματικά στην Εικόνα 9.

Στάδιο 3^ο: Real-time PCR

1) Σχεδιασμός εκκινητών όλων των υπό μελέτη γονιδίων



2) Επιλογή των τριών σταθερότερων γονιδίων αναφοράς σε κάθε πείραμα (geNorm)

Gene	H19	H19	H19	H19	H19	geNorm	Normalization Factor
H19	1.00E+00	4.35E+01	6.74E+01	4.32E+01	8.73E+01	0.4511	0.4511
H19	5.87E+01	1.80E+00	7.04E+01	6.50E+01	8.89E+01	0.9461	0.9461
H19	8.88E+01	5.27E+01	1.88E+00	1.08E+00	1.08E+00	1.7178	1.7178
geNorm	0.798	0.675	0.425	0.545	0.697		

3) Προετοιμασία των αντιδράσεων της real-time PCR και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων

Πρώτα προστίθεται το ζεύγος των εκκινητών για κάθε υπό μελέτη γονίδιο



Master Mix
(εμβρυϊκό cDNA,
KAPA SYBR FAST
qPCR Master Mix-Universal,
BSA, ddH₂O)



Real-time PCR πρόγραμμα:

- 1) ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών
- 2) δημιουργία καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων

Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Εικόνα 9: Συνοπτική απεικόνιση των διαδικασιών του σταδίου 3.

Πίνακας 1. Πληροφορίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR

HK: Γονίδιο Αναφοράς

Γονίδια	Πλήρης ονομασία γονιδίου	Αριθ. πρόσβασης GenBank	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος PCR προϊόντος (bp)
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HK)	NM_001034034	(F) 5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3' (R) 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	123
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex, subunitA flavoprotein tyrosine 3-monooxygenase/	NM_174178.2	(F) 5'-GCAGAACCTGATGCTTTGTG-3' (R) 5'-CGTAGGAGAGCGTGTGCTT-3'	185
<i>YWHAZ</i>	tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	NM_174814.2	(F) 5'-GCATCCCACAGACTATTTCC-3' (R) 5'-GCAAAGACAATGACAGACCA-3'	120
<i>18srRNA</i>	18s ribosomal RNA (HK)	NR_036642	(F) 5'-CCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGT-3' (R) 5'-CGCCGATCCAAGAATTCACCTCT -3'	222
<i>H2a.z</i>	H2A histone family, member Z (HK)	NM_174809	(F) 5'-AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG-3' (R) 5'-CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG-3'	208
<i>PLAC8</i>	placenta-specific 8	NM_001076987	(F) 5'-AATGAATGCTGTCTGTGCGGAAC-3' (R) 5'-AGTGCGATTGGCTCTCCTTCTG-3'	167
<i>AKR1B1</i>	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	NM_001012519	(F) 5'-AGGAGAAAGTGGTGAAGCGTGAG-3' (R) 5'-ATGAGGTAGAGGTCCAGGTAGTCC-3'	138
<i>BIRC5 ή survivin</i>	baculoviral IAP repeat containing 5	NM_001001855	(F) 5'-GCCGTCAACCGCTGGATTG-3' (R) 5'-CGTTCTCAGTGGGACAGTGGATG-3'	198
<i>BBC3 ή PUMA</i>	BCL2 binding component 3	XM_002695182.2	(F) 5'-CATGAAGAGCAAATGAGCCAAACG-3' (R) 5'-GCAGAGCACAGGATTCACAGTC-3'	193
<i>PTGS-2 ή COX-2</i>	Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase 2	NM_174445	(F) 5'-TCTGGTGCCTGGTCTGATGATG-3' (R) 5'-GGATTAGCCTGCTTGTCTGGAAC-3'	127
<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	NM_001077486	(F) 5'-TGAAGTGTGGCTGGTGTGGTTC-3' (R) 5'-CAATGGTGGCTGGACGGAGAG-3'	123
<i>SLC2A5 ή GLUT-5</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	NM_001101042	(F) 5'-ATAGCTGCCTTTGGGTGCTC-3' (R) 5'-CAGCAAGGTTCTTTCTGCC-3'	243
<i>SOD2 ή MnSOD</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_201527	(F) 5'-GCACCACAGCAAGCACAC-3' (R) 5'-GGGCTCAGATTTGTCCAGAAGATG-3'	156
<i>PLG</i>	plasminogen	NM_173951	(F) 5'-GGCGGTGGTGTTCCTACTTCTC-3' (R) 5'-GTCTGTCTCCTCCTCACACTTGG-3'	163
<i>Bax</i>	BCL2-associated X protein	NM_173894.1	(F) 5'-ACATGGAGCTGCAGAGGATG-3' (R) 5'-CTGATCAACTCGGGCACCTT-3'	184
<i>PIPOX</i>	pipecolic acid oxidase or peroxisomal sarcosine oxidase	NM_001014878.2	(F) 5'-TGACGCCATTGTGATCGGG-3' (R) 5'-GTCCAGTCTGCCTGTATAATTGG-3'	251
<i>G6PD</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_001244135.1	(F) 5'-CTCCTACAAGCGCCTCAACA-3' (R) 5'-ACGGCTTCTCCACGATGATG-3'	170
<i>PLAUR</i>	Plasminogen activator, urokinase receptor	NM_174423.3	(F) 5'-GTCCTGAGTGTGTGGGAAGG-3' (R) 5'-CAGTAGCATCTCGACCAGGG-3'	177
<i>KAT2B ή PCAF</i>	K (lysine) acetyltransferase 2B	XM_002684716.3	(F) 5'-TCTACCCGGGACTTTCCTGT-3' (R) 5'-GCGCTTTGATGGCTCTTCAC-3'	184

2.4 ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ο ενζυμικός προσδιορισμός των υποστρωμάτων της IVP πραγματοποιήθηκε στα Εργαστήρια του Τομέα Αναπαραγωγής του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης του ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

2.4.1 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (*Plasminogen Activator Activity, PAA*)

Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου προσδιορίστηκε στα τροποποιημένα ή μη υποστρώματα (IVF και IVC) με φασματοφωτομετρική μέθοδο (Shimada και συν., 1981· Smokovitis και συν., 1987, 1988), με τη βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251 (Chromogenix, Μιλάνο, Ιταλία). Για κάθε δείγμα ετοιμάζονταν 500 µl διαλύματος (κύριος σωλήνας, Reaction Tube) που αποτελούταν (με σειρά προσθήκης) από 200 µl διαλύματος του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251 [σε Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) τελική συγκέντρωση 0.73 mM], 100 µl Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4), 100 µl διαλύματος βόειου πλασμινογόνου [σε Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) τελική συγκέντρωση 0,5 CU/ml] και 100 µl δείγματος (IVF ή IVC). Στη συνέχεια, ο κύριος σωλήνας επωαζόταν στους 37 °C επί 30 λεπτά και ακολουθούσε τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη 1 ml διαλύματος οξικού οξέος 50%. Για κάθε κύριο σωλήνα ετοιμαζόταν και ένας σωλήνας μάρτυρας, στον οποίο η προσθήκη των 100 µl δείγματος γινόταν μετά τον τερματισμό της αντίδρασης. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του κύριου σωλήνα γινόταν σε φασματοφωτόμετρο (UV-mini 1240 Shimadzu, Τόκυο, Ιαπωνία), σε μήκος κύματος 405 nm, αφού προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί μηδενισμός του οργάνου με τη βοήθεια του αντίστοιχου σωλήνα μάρτυρα. Η προκύπτουσα απορρόφηση εκφραζόταν σε IU t-PA ή IU u-PA ανά 0,1 ml υποστρώματος, με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών, οι οποίες σχεδιάστηκαν με τη χρήση 1-50 IU t-PA ή 0.01-0.5 IU u-PA.

2.4.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (*Plasminogen Activator Inhibition, PAI*)

Η δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο (Juhan-Vague και συν., 1984· Smokovitis και συν., 1987 και 1988· Rekkas και συν., 2002), χρησιμοποιώντας το χρωμογόνο υπόστρωμα S-2251. Ο όγκος τόσο των δειγμάτων όσο και των αντιδραστηρίων του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε, μειώθηκε στο 1:10, λόγω του περιορισμένου όγκου των δειγμάτων. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε βοθρία 96 θέσεων (96-well plate) και η οπτική πυκνότητά τους μετρήθηκε στα 405 nm.

Αρχικά, ετοιμαζόταν ο κύριος σωλήνας, ο οποίος περιείχε 0,5 IU t-PA ή 0,005 IU u-PA (10 μ l) και 10 μ l δείγματος, τα οποία αναμιγνύονταν με 10 μ l Tris-HCl· το μίγμα αυτό επωαζόταν επί 5 λεπτά στους 37 °C. Σε κάθε αντίδραση προσθέτονταν 10 μ l διαλύματος HCl (0,16 M) και ακολουθούσε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να καταστραφούν οι αδρανοποιοί της πλασμίνης. Η αποκατάσταση του pH του διαλύματος στο 7,4 γινόταν με προσθήκη 10 μ l διαλύματος NaOH (0,16 M). Έπειτα, ακολουθούσε η προσθήκη 10 μ l διαλύματος βόειου πλασμινογόνου (0,5 CU/ml) και 20 μ l διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος S-2251. Το παραπάνω μίγμα επωαζόταν επί 30 λεπτά στους 37 °C και η αντίδραση τερματιζόταν με προσθήκη 100 μ l οξικού οξέος 50%. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην προετοιμασία του σωλήνα αναφοράς, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ίσος όγκος διαλύματος Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) αντί της προσθήκης των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (t-PA ή u-PA) στο δείγμα. Τέλος, η διαδικασία του σωλήνα αναφοράς επαναλήφθηκε και για το σωλήνα μάρτυρα, με μόνη διαφορά την προσθήκη των 10 μ l δείγματος μετά τον τερματισμό της αντίδρασης.

Η διαφορά απορρόφησης, σε μήκος κύματος 405 nm, μεταξύ του κύριου σωλήνα και του αθροίσματος των απορροφήσεων του σωλήνα μάρτυρα και του σωλήνα αναφοράς αποδιδόταν στην παρουσία των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου. Η παραπάνω διαφορά εκφραζόταν σε t-PA IU ή u-PA IU/0,1 ml δείγματος, με τη χρήση πρότυπων καμπυλών.

2.5 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (DIFFERENTIAL CELL STAINING) ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Η διαδικασία χρώσης των εμβρύων βοοειδών περιλάμβανε τη συλλογή ίδιου αριθμού βλαστοκύστεων 7 ημερών (n=10) από την ομάδα των μαρτύρων και των τροποποιημένων με u-PA σε διάλυμα PBS που περιείχε 0,5% BSA. Στη συνέχεια, γινόταν μονιμοποίηση των βλαστοκύστεων σε διάλυμα παραφορμαλδεϋδης (4%) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά τα έμβρυα διατηρούνταν σε διάλυμα PBS-BSA στους 4 °C, έως ότου γίνει η χρώση. Προκειμένου οι βλαστοκύστες να γίνουν διαπερατές στη χρώση, αυτές επωάζονταν σε διάλυμα PBS που περιείχε 0,5% Triton-X και 0,05% Tween στους 4 °C για 12-18 ώρες. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η έκπλυσή τους σε διάλυμα PBS-BSA (τρεις φορές) και τοποθετούνταν διαδοχικά σε διάλυμα HCl (2N) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε διάλυμα Tris-HCl (100mM) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει η αποδιάταξη του DNA των βλαστομεριδίων και πρόσδεση των φθορίζουσών ουσιών. Αμέσως μετά την αποδιάταξη, τα έμβρυα μεταφέρονταν σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (blocking solution), το οποίο περιείχε 10% ορό αιγός και 0,05% Tween και επωάζονταν σε αυτό στους 4 °C για 12-18 ώρες. Μια ομάδα εμβρύων διατηρούταν σε αυτό έως το τέλος της διαδικασίας και αποτελούσε την ομάδα των αρνητικών μαρτύρων. Τα υπό μελέτη έμβρυα αφού μεταφέρονταν τρεις φορές σε διάλυμα PBS-BSA και παρέμεναν σε αυτό για 2 λεπτά την κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετούνταν στο διάλυμα που περιείχε το πρώτο αντίσωμα CDX-2 (Biogenex, San Ramon, U.S.A.) για 1-3 ημέρες στους 4 °C. Το αντίσωμα αυτό είναι ειδικό για το μεταγραφικό παράγοντα CDX-2, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό και τη διαφοροποίηση ειδικώς των κυττάρων της τροφοβλάστης (TE) (Beck και συν., 1995). Στη συνέχεια, οι βλαστοκύστες μεταφέρονταν δύο φορές σε διάλυμα PBS-BSA και παρέμεναν σε αυτό για 15 λεπτά τη φορά σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά σε 1:500 αραιωμένου διαλύματος του πρώτου αντισώματος anti-caspase-3 (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), παραμένοντας σε αυτό για 12-18 ώρες στους 4 °C. Το αντίσωμα αυτό δεσμεύεται σε επίτοπο της δραστηκής μορφής της κασπάσης-3, η οποία αποτελεί βασικό παράγοντα της απόπτωσης, καθώς εμπλέκεται σε όλα τα μονοπάτια της (Earnshaw και συν., 1999). Η χρήση του αντισώματος της κασπάσης-3 (anti-caspase-3) σε συνδυασμό με την χρώση του DNA και την παρακολούθηση της μορφολογίας του πυρήνα αποτελεί μια

από τις καλύτερες μεθόδους εκτίμησης της απόπτωσης των εμβρύων και των ιστών (Gjorret και συν., 2007). Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία έκπλυσης των βλαστοκύστεων (2 φορές σε PBS-BSA για 15 λεπτά), τόσο τα υπό μελέτη έμβρυα όσο και αυτά που χρησιμοποιούνταν ως αρνητικοί μάρτυρες της τεχνικής μεταφέρονταν σε αραιωμένο διάλυμα (1:100) που περιείχε το δεύτερο αντίσωμα goat-anti mouse TexRed -φθορίζουσα κόκκινη χρωστική- (20 ng/ml σε blocking solution, Molecular Probes, Merelbeke, Belgium), το οποίο είναι ικανό να δεσμεύεται στο πρώτο αντίσωμα CDX-2, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά την παραπάνω επώαση και την έκπλυση των εμβρύων, με τον ίδιο τρόπο, αυτά μεταφέρονταν στο αραιωμένο διάλυμα (1:200) του δεύτερου αντισώματος goat anti-Rabbit FITC -φθορίζουσα πράσινη χρωστική- (10 µg/ml σε blocking solution, Molecular Probes, Merelbeke, Belgium) που είναι ικανό να δεσμεύεται στο πρώτο αντίσωμα anti caspase-3, για μια επιπλέον ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά τις δύο εκπλύσεις των βλαστοκύστεων για 15 λεπτά, αυτά μεταφέρονταν στο διάλυμα που περιείχε τη χρωστική Hoechst 33,342 (50 µg/ml σε PBS-BSA, Molecular Probes, Merelbeke, Belgium) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ένα ή δύο έμβρυα τοποθετούνταν ανά μικροσταγόνα διαλύματος συγκόλλησης, το οποίο περιέχει έναν αντι-αλλοιωτικό παράγοντα χρώσης (1,4 διαζαδικυκλο οκτάνιο, DABCO), πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύπτονταν με καλυπτρίδα. Η εκτίμηση των εμβρύων γινόταν την επόμενη ημέρα σε μικροσκόπιο φθορισμού που περιείχε ένα τριπλό φίλτρο φθορισμού για τις φθορίζουσες ουσίες DAPI, FITC και Texas Red (U-M3DAFITR, Olympus). Η παραπάνω διαδικασία της χρώσης αλλά και της εκτίμησης των εμβρύων πραγματοποιούνταν σε σκοτεινό δωμάτιο.

2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Σε όλους τους πειραματισμούς, η τελική δραστηριότητα των t-PA και u-PA που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση των υποστρωμάτων της IVF και IVC, αντίστοιχα, επιλέχθηκε σύμφωνα με αυτές που ανιχνεύθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, καθώς και στο υγρό των ωαγωγών (Papanikolaou και συν., 2004).

1^ο πείραμα: Τροποποίηση του υποστρώματος γονιμοποίησης με t-PA

Στον πειραματισμό αυτό πέραν της τροποποίησης του υποστρώματος γονιμοποίησης με t-PA χρησιμοποιήθηκε και ο ειδικός αναστολέας πλασμίνης και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ε-ACA) (Griffin και Ellman, 1978· Prentice, 1980). Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 2016 ώρια, τα οποία χωρίστηκαν σε 4 υπο-ομάδες: την ομάδα μαρτύρων (control, n=488), την ομάδα t-PA (τελική δραστηριότητα t-PA 500 IU/ml, n=632, T5451-ανθρώπινο), την ομάδα ε-ACA (τελική συγκέντρωση ε-ACA 10 mM, n=378) και τέλος, την ομάδα t-PA και ε-ACA (t-PA+ε-ACA, ίδιες τελικές συγκεντρώσεις με την ομάδα t-PA και ε-ACA, n=518). Μετά την IVF όλα τα ώρια, γονιμοποιημένα και μη, καλλιεργήθηκαν περαιτέρω. Εφόσον, η τροποποίηση πραγματοποιήθηκε σε προγενέστερο στάδιο από αυτό της IVC, η επιλογή μόνο των γονιμοποιημένων ωαρίων θα προκαλούσε σύγχυση στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δράση του t-PA. Συνολικά, το παραπάνω πείραμα περιλάμβανε δέκα επαναλήψεις. Για την εκτίμηση της ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων, βλαστοκύστες 7 ημερών (D7, n=10), αλλά και μορίδια 3^{ov} ημερών (<8 κυττάρων) και 4^{ov} ημερών (8-16 κυττάρων) (D3 n=6 και D4 n=5) από κάθε ομάδα, αναλύθηκαν με τη βοήθεια της real-time PCR, ως προς την έκφραση γονιδίων-μαρτύρων, ενδεικτικών της ποιότητάς τους.

Για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου του Tris-HCl στην IVP (χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του t-PA) διενεργήθηκαν τέσσερις πειραματικές επαναλήψεις. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά, 736 ώρια, τα οποία χωρίστηκαν σε δύο υπο-ομάδες: την ομάδα των μαρτύρων (control, n=388) και την ομάδα, στην οποία το υπόστρωμα της IVF τροποποιήθηκε με προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (Tris-HCl, n=348, Cτελ=0,002 M, pH 7,4). Η δράση του Tris-HCl ελέγχθηκε για το εάν αποτελεί κατάλληλο διαλύτη του t-PA, χωρίς να παρεμβαίνει στα

αποτελέσματα της IVP (ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων 7 και 8 ημερών).

2^ο πείραμα: Τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων με u-PA

Μελετήθηκε η επίδραση του u-PA (5 IU/ml, U0633- ουροκινάση από ανθρώπινο ούρο) στο υπόστρωμα καλλιέργειας εμβρύων σε δύο ανεξάρτητους πειραματισμούς. Ο πρώτος πειραματισμός αφορούσε στη μελέτη της δράσης του u-PA σε απογυμνωμένα έμβρυα, τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από ημι-καθορισμένες συνθήκες (SOF χωρίς FCS). Ο ορός αντικαταστάθηκε με 5 µg/ml ινσουλίνη, 5 µg/ml τρανσφερίνη, 5 ng/ml σελήνιο και 0,4% βόεια αλβουμίνη ορού. Ο δεύτερος πειραματισμός αφορούσε στην παραγωγή εμβρύων, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου κάτω από μη προσδιορισμένες συνθήκες καλλιέργειας (SOF παρουσία FCS). Για διευκρινιστικούς λόγους, ο πρώτος πειραματισμός θα αναφέρεται ως 2.α (CC⁻ / semi-defined culture conditions), ενώ ο δεύτερος ως 2.β (CC⁺ / serum-containing culture conditions). Αμέσως μετά την απογύμνωση των εν δυνάμει γονιμοποιημένων ωαρίων, επιλέγονταν μόνο εκείνα, τα οποία είχαν γονιμοποιηθεί. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οχτώ επαναλήψεις του 2.α πειράματος και χρησιμοποιήθηκαν 1631 πιθανά ζυγωτά. Αντίστοιχα, στο 2.β πείραμα πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις και χρησιμοποιήθηκαν 629 πιθανά ζυγωτά. Τέλος, αξιολογήθηκε το ποσοστό απόπτωσης αλλά και η αναλογία των κυττάρων ICM/TE στις παραγόμενες βλαστοκύστες και των δύο ομάδων, από συνολικά τρεις πειραματικές επαναλήψεις του 2.α πειράματος.

2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 17,0). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

1) Για το πείραμα 1, τυχόν διαφοροποιήσεις στα ποσοστά διαίρεσης των εμβρύων και σχηματισμού βλαστοκύστεων μεταξύ των τεσσάρων υπό μελέτη ομάδων ελέγχθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης διασποράς με ένα παράγοντα (one-way

ANOVA). Στις περιπτώσεις που το αποτέλεσμα της ANOVA ήταν σημαντικό, γινόταν επιμέρους σύγκρισεις μεταξύ των ομάδων, χρησιμοποιώντας τους ελέγχους κατά Duncan και κατά Tukey (τεχνικές πολλαπλών συγκρίσεων, post hoc tests). Επίσης, η one-way ANOVA χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση ανάλυσης των αποτελεσμάτων PAA/ PAI.

2) Η δοκιμασία του χ^2 (chi square test) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο διαφορών στα ποσοστά αυλάκωσης και σχηματισμού βλαστοκύστεων των δύο υπό μελέτη ομάδων του πειράματος 2.α και 2.β, καθώς και για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ANOVA στα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής εμβρύων του 1^{ου} πειράματος, ελέγχοντας όλες τις ομάδες, τροποποιημένες και μη, ανά ζεύγη.

3) Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονιδιακής έκφρασης και της διαφορικής χρώσης των κυττάρων του εμβρύου μεταξύ των τροποποιημένων και μη ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα [Student's t-test (independent)].

4) Στην περίπτωση των αποτελεσμάτων PAA/PAI ελέγχθηκε η πιθανότητα γραμμικής συσχέτισης των δύο μεταβλητών με την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης (Linear regression analysis).

5) Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος geNorm, για την επιλογή των πιο σταθερών γονιδίων αναφοράς, στηρίχθηκε στην ανάλυση της διακύμανσης ανά ζεύγη (pairwise variation analysis). Όταν η προσθήκη ενός επιπλέον γονιδίου εμφανίζει μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα του παράγοντα κανονικοποίησης (NF_n με NF_{n+1}), αυξάνεται η πιθανότητα προσθήκης του γονιδίου αυτού για το υπολογισμό ενός αξιόπιστου NF. Το ανώτατο όριο τιμής της διακύμανσης που ορίζεται είναι το 0,15· τιμές χαμηλότερες από 0,15 δεν απαιτούν την προσθήκη επιπλέον γονιδίων αναφοράς για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

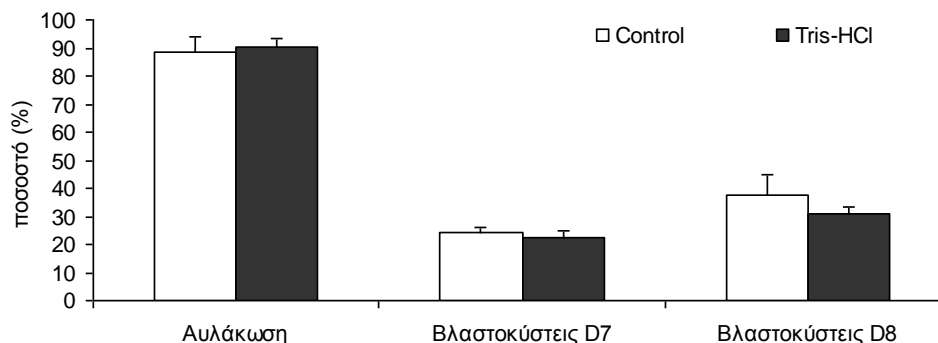
Σε όλες τις περιπτώσεις, όταν η τιμή P ήταν μικρότερη του 0,05 ($P < 0,05$), η διαφορά θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Σε κάθε περίπτωση έγινε έλεγχος της ομοιογένειας των πληθυσμών με τη βοήθεια του τεστ του Levene.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ *IN VITRO* ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ t-PA (500 IU/ML). ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IVP ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

3.1.1 Επίδραση της προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl στο υπόστρωμα της IVF στα αποτελέσματα της IVP

Στις συνθήκες καλλιέργειας του εργαστηρίου μας, όπως ήδη έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 2, η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (pH 7,4) στο υπόστρωμα της IVF δεν επηρέασε τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων σε σχέση με τα αντίστοιχα της ομάδας των μαρτύρων (control) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Επίδραση των αποτελεσμάτων της IVP μετά την προσθήκη Tris-HCl (Cτελ=0,002 M, pH 7,4) στο υπόστρωμα της IVF. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά (μέσος όρος των ποσοστών \pm τυπική απόκλιση των 4^{ων} πειραματικών επαναλήψεων). Τα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7 και 8 (D7 και D8), αντίστοιχα, δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη 2 mM Tris-HCl (pH 7,4), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του t-PA ($P > 0,05$).

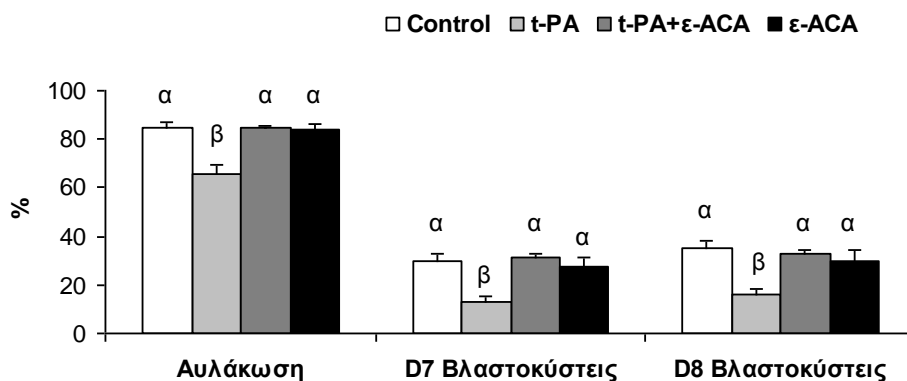
3.1.2 Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος της IVF με την προσθήκη t-PA, ε-ACA και συνδυασμού t-PA με ε-ACA, στα αποτελέσματα της IVP

Η προσθήκη του t-PA στο υπόστρωμα της IVF επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των εμβρύων. Συγκεκριμένα, στην ομάδα του t-PA παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($P < 0,05$) των ποσοστών αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων, σε σχέση με τις ομάδες control, t-PA+ε-ACA και ε-ACA. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων τριών ομάδων. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται λεπτομερώς στον Πίνακα 2 και την Εικόνα 11. Από τη μικροσκοπική παρατήρηση των εμβρύων που παρουσίαζαν αυλάκωση (την 1^η ημέρα καλλιέργειας ή 48 h pi) δεν εντοπίστηκαν σημαντικές μεταβολές στην ταχύτητα ανάπτυξης των εμβρύων (2 κυττάρων, 4 κυττάρων και >4 κυττάρων) σε όλες τις υπό μελέτη ομάδες. Από τη μέτρηση της διαμέτρου των παραγόμενων βλαστοκύστεων, και των τεσσάρων ομάδων που μελετήθηκαν, δεν βρέθηκαν σημαντικές μεταβολές στο μέγεθός τους (μm) (Πίνακας 3).

Πίνακας 2. Επίδραση της προσθήκης t-PA, t-PA+ε-ACA και ε-ACA στο υπόστρωμα της IVF στα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων

Ομάδα	Αριθ. Ζυγωτών	Αυλάκωση (%)	D7 Βλαστοκύστες (%)	D8 Βλαστοκύστες (%)
Control	488	84.8 ± 2.5 ^a	30.1 ± 2.9 ^a	35 ± 2.9 ^a
t-PA	632	65.8 ± 3.8 ^b	13.3 ± 2.2 ^b	15.8 ± 2.4 ^b
t-PA + ε-ACA	518	84.7 ± 1.1 ^a	31.3 ± 1.7 ^a	32.7 ± 1.4 ^a
ε-ACA	378	84.3 ± 2 ^a	27.4 ± 4.2 ^a	29.5 ± 4.7 ^a

^{a- b} Τα διαφορετικά γράμματα με τη μορφή εκθετών, τα οποία ακολουθούν τις τιμές κάθε στήλης, υποδεικνύουν τις σημαντικές διαφορές των ομάδων ($P < 0,001$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά, τα οποία προκύπτουν από το μέσο όρο των ποσοστών ± τυπικό σφάλμα των 10 επαναλήψεων.



Εικόνα 11: Αποτελέσματα της IVP. Κάθε στήλη του γραφήματος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των ποσοστών \pm τυπική απόκλιση (10 επαναλήψεων) κάθε ομάδας. Σε κάθε υπό μελέτη στάδιο τα διαφορετικά γραμματικά σύμβολα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 3. Διάμετρος των παραγόμενων βλαστοκύστεων ημέρας 7 όλων των υπό μελέτη ομάδων

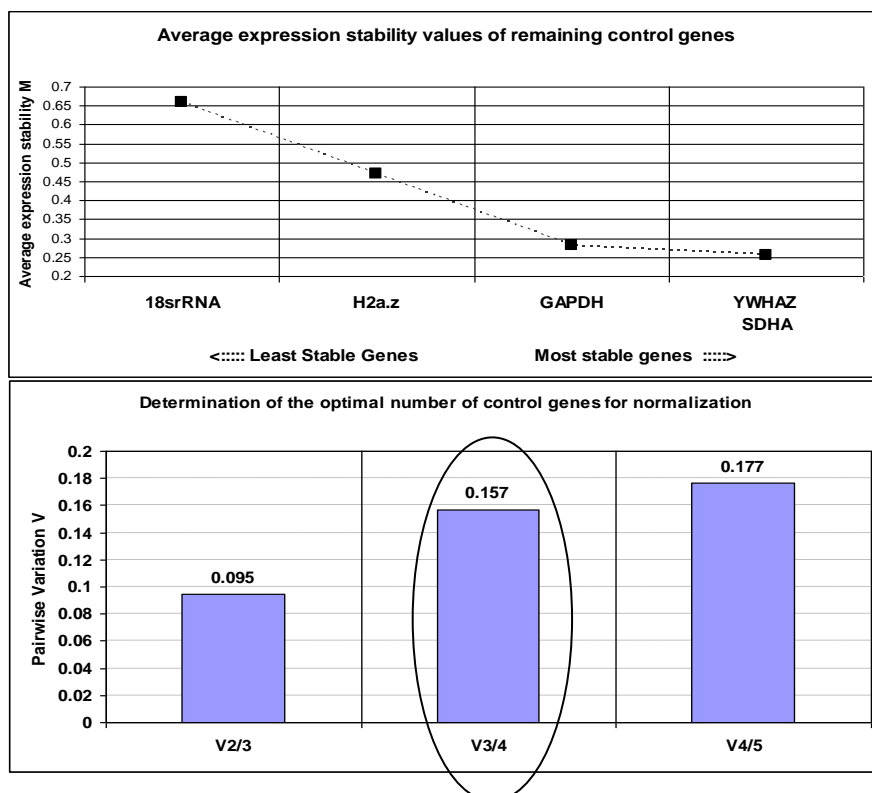
Ομάδα	Αριθμός βλαστοκύστεων	Διάμετρος (μm)
Control	26	186,1 \pm 5,8
t-PA	19	194,5 \pm 8,6
t-PA+ε-ACA	38	194,7 \pm 4,5
ε-ACA	18	191,5 \pm 7,9

Τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα προκύπτουν από το μέσο όρο των διαμέτρων (μm) \pm τυπικό σφάλμα του συνόλου των βλαστοκύστεων ημέρας 7.

3.1.3 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων της ποιότητας των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7)

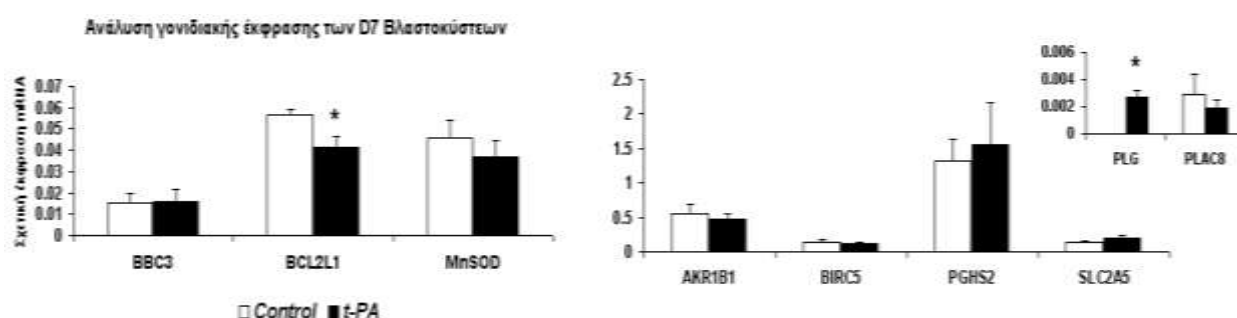
Τα αποτελέσματα του προγράμματος geNorm, τα οποία αφορούν στη σταθερότητα και στον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό των γονιδίων αναφοράς παρουσιάζονται στην Εικόνα 12. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 12 και εφόσον η τιμή απόκλισης (pairwise variation) μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} προστιθέμενου γονιδίου αναφοράς (V2/3) είναι 0,095 (<0,15 ανώτατο όριο τιμής του V), δύο γονίδια κρίνονται επαρκή για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης. Ωστόσο, η στρατηγική χρήσης τριών γονιδίων αναφοράς είναι περισσότερο αξιόπιστη από τη χρήση ενός ή δύο. Στη δική μας περίπτωση, η προσθήκη και τρίτου γονιδίου αναφοράς δεν

επηρεάζει την τιμή απόκλισης ($V_{3/4} = 0,157$), συνεπώς, για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της γονιδιακής μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα τρία πιο σταθερά γονίδια αναφοράς (τα πιο σταθερά βρίσκονται στη δεξιά πλευρά της Εικόνας 11). Από τα πέντε γονίδια αναφοράς που ελέγχθηκαν συνολικά, τα *YWHAZ*, *SDHA* και *GAPDH* είναι περισσότερο σταθερά και χρησιμοποιήθηκαν για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων.



Εικόνα 12: Επιλογή του ελάχιστου απαιτούμενου αριθμού και των σταθερότερων γονιδίων αναφοράς, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. **Πάνω γράφημα:** Η τιμή M κάθε γονιδίου αποτελεί το μέσο όρο απόκλισης της έκφρασής του σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια αναφοράς και εκείνα με τη μικρότερη τιμή M (σταθερότερα γονίδια) βρίσκονται στη δεξιά πλευρά του γραφήματος. **Κάτω γράφημα:** Η σταδιακή προσθήκη ενός γονιδίου μεταβάλλει την απόκλιση των μέσων όρων έκφρασης μεταξύ δύο διαδοχικών παραγόντων κανονικοποίησης (normalization factor, NF) και αυτό ορίζεται ως V. Μεγάλη απόκλιση σημαίνει ότι το προστιθέμενο γονίδιο επηρεάζει σημαντικά τον NF και συνεπώς πρέπει να συμπεριληφθεί για τον υπολογισμό ενός αξιόπιστου NF. Η ανώτατη τιμή του V έχει θεωρηθεί 0,15, η οποία όμως δεν αποτελεί αυστηρό κριτήριο για την επιλογή του αριθμού των γονιδίων αναφοράς.

Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων φαίνονται στην Εικόνα 13. Στα περισσότερα γονίδια, τα οποία μελετήθηκαν για την εκτίμηση της ποιότητας των βλαστοκύστεων (control και t-PA), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της έκφρασή τους, εκτός των γονιδίων *BCL2L1* και *PLG*. Το μεταγράφο του *BCL2L1* γονιδίου υποεκφράζονταν στις βλαστοκύστες της t-PA ομάδας σε σχέση με τις αντίστοιχες της ομάδας control ($P = 0,01$). Από την άλλη πλευρά, ενώ η μεταγραφή του *PLG* δεν ανιχνεύθηκε στις D7 βλαστοκύστες της ομάδας control, παρατηρήθηκε υπερέκφρασή του στην ομάδα t-PA ($P = 0,032$).

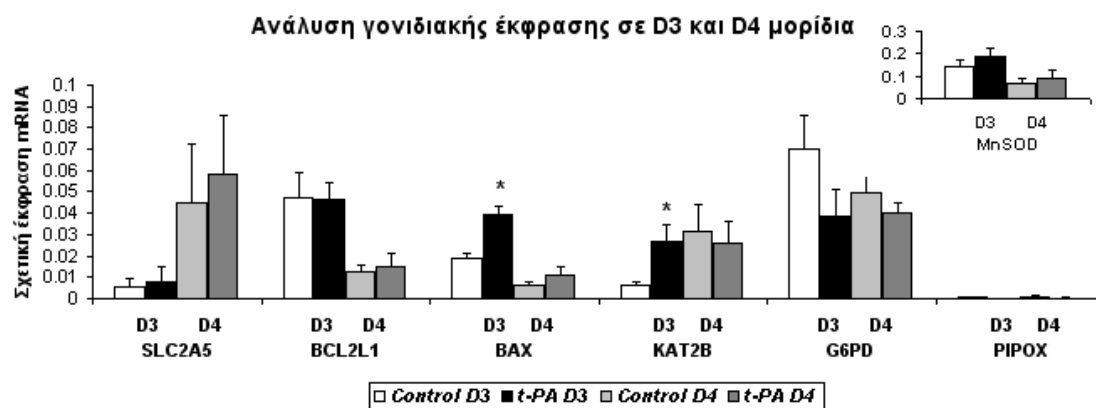


Εικόνα 13: Εκτίμηση της ποιότητας των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7) μετά την προσθήκη του t-PA στο υπόστρωμα της IVF. Τρεις διαφορετικές κλίμακες έκφρασης δημιουργήθηκαν εξαιτίας των διαφορών στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των γονιδίων-στόχων. Στα γραφήματα, οι σημαντικές διαφορές κατά την ανάλυση της σχετικής έκφρασης των mRNA μεταξύ των ομάδων control και t-PA επισημαίνονται με αστερίσκο.

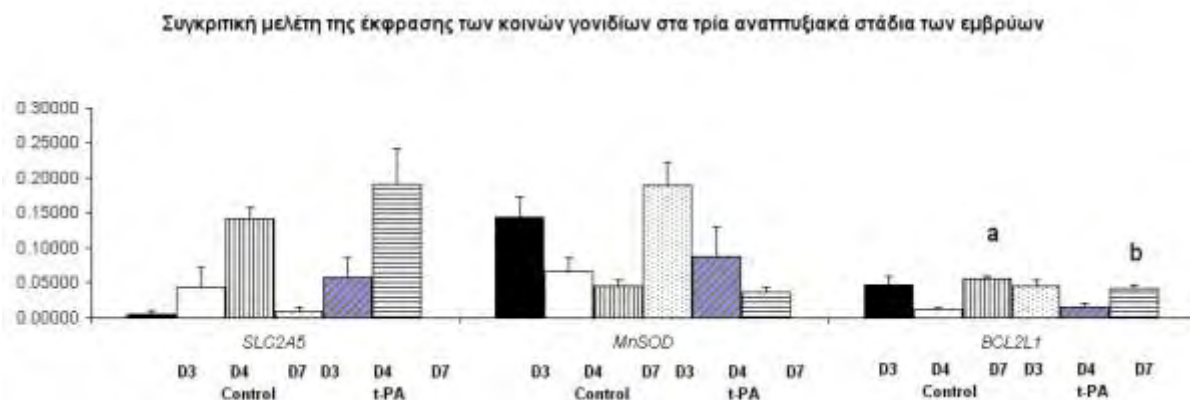
3.1.4 Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων της ποιότητας των εμβρύων πρώιμου σταδίου [μορίδια ημέρας 3 και 4 (D3 και D4)]

Οι διαφορές μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις δύο υπό μελέτη ομάδες των πρώιμων εμβρύων (control και t-PA) παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Συνολικά μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης επτά γονιδίων, από τα οποία μόνο τα *BAX* και *KAT2B* (ή αλλιώς *PCAF*) βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στα μορίδια ημέρας 3 (D3), της ομάδας t-PA ($P = 0,039$ και $P = 0,037$, αντίστοιχα). Πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου *PIPOX* (πολύ υψηλό Ct) παρατηρήθηκαν τις ημέρες 3 και 4, τόσο στην ομάδα control όσο και t-PA (ακόμα πιο αδύναμο σήμα στη real-time PCR). Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η συγκριτική μελέτη της

έκφρασης τριών γονιδίων (*SLC2A5*, *MnSOD* και *BCL2L1*), τα οποία μελετήθηκαν στα τρία στάδια ανάπτυξης των εμβρύων.



Εικόνα 14: Μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης επτά μεταγράφων, σε μορίδια ημέρας 3 και 4 (ομάδες control και t-PA). Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης για κάθε γονίδιο έγινε μεταξύ των δύο ομάδων, control και t-PA, κάθε σταδίου (D3 και D4), αντίστοιχα. Οι σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με αστερίσκο.



Εικόνα 15: Συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *SLC2A5*, *MnSOD* και *BCL2L1*. Η σύγκριση έγινε στο μέσο όρο έκφρασης του κάθε γονιδίου μεταξύ των δύο ομάδων εμβρύων (control και t-PA), των τριών υπό μελέτη αναπτυξιακών σταδίων. Στο σχήμα, τα διαφορετικά γραμματικά σύμβολα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά και οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών έκφρασης που προέκυψαν από τις τέσσερις πειραματικές επαναλήψεις.

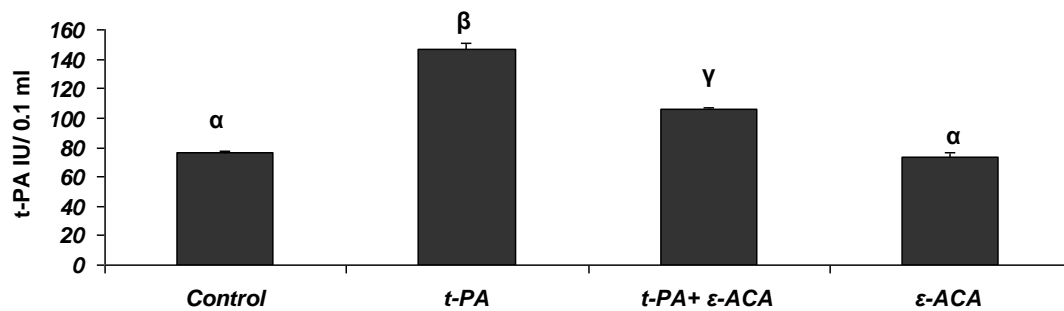
3.1.5 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών (PAI) τους στα υποστρώματα (spent media) της IVF

Η δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα της ομάδας του t-PA σε σχέση με τις υπόλοιπες. Η προσθήκη του αναστολέα, ε-ACA, στο υπόστρωμα, το οποίο περιείχε και t-PA, προκάλεσε σημαντική μείωση της PAA σε σχέση με την ομάδα του t-PA, παρ' ότι δεν κατόρθωσε να την επαναφέρει στα επίπεδα της ομάδας των μαρτύρων ($P < 0,0001$). Δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στην PAA μεταξύ των ομάδων ε-ACA και control. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά τον προσδιορισμό της PAI δεν προέκυψαν διαφορές στη δραστηριότητα των αδρανοποιών των PAs, μεταξύ των ομάδων. Τα παραπάνω ευρήματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4 και στις Εικόνες 16 και 17.

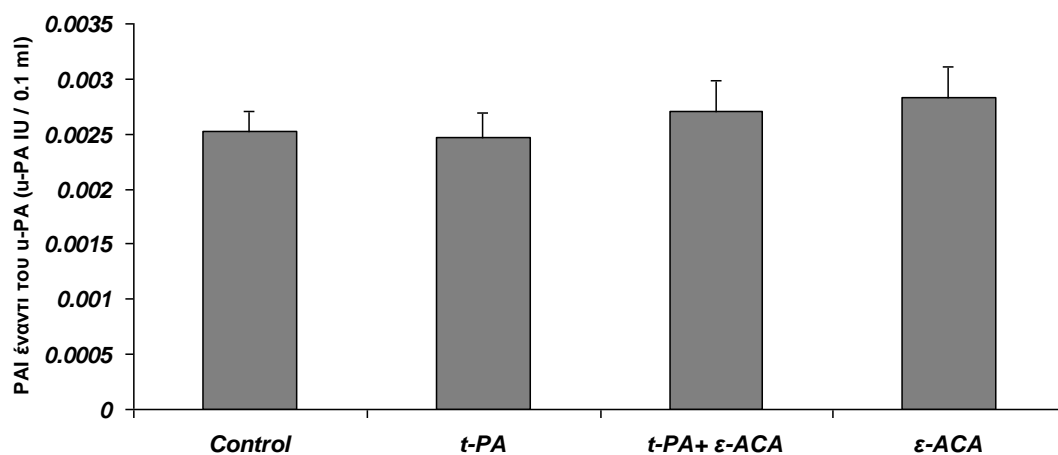
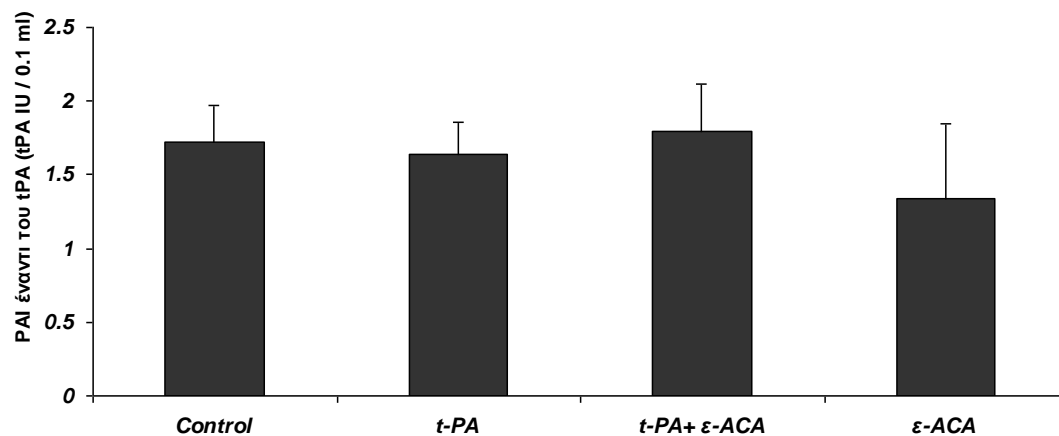
Πίνακας 4. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών τους (PAI) στα υποστρώματα της IVF. Δίνονται οι μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα (SEM)

Ομάδα	PAA (t-PA IU/0.1 ml)	PAI (t-PA IU/0.1 ml)	PAI (u-PA IU/0.1 ml)
Control	76.4 ± 0.9^a	1.7 ± 0.2	0.0025 ± 0.0002
t-PA	147.1 ± 3.2^b	1.6 ± 0.2	0.0025 ± 0.0002
t-PA+ε-ACA	105.8 ± 0.8^y	1.8 ± 0.3	0.0027 ± 0.0003
ε-ACA	73.7 ± 2.3^a	1.3 ± 0.5	0.0028 ± 0.0003

* Οι παραπάνω τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τιμών \pm τυπικό σφάλμα όλων των πειραματικών επαναλήψεων. Με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών, τα αποτελέσματα της PAA εκφράστηκαν σε μονάδες t-PA IU / 0,1 ml και της PAI σε μονάδες t-PA ή/και u-PA IU / 0,1 ml. ^{a-β} Τα διαφορετικά γράμματα με τη μορφή εκθετών, τα οποία ακολουθούν τις τιμές κάθε στήλης, υποδεικνύουν τις σημαντικές διαφορές των ομάδων ($P < 0,001$).



Εικόνα 16: Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών τους (PAI) στα υποστρώματα της IVF. Διαφορετικά γραμματικά σύμβολα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά.



Εικόνα 17: Τα αποτελέσματα της PAI φαίνονται στην εικόνα με τη μορφή δύο γραφημάτων. Καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην PAI μεταξύ των τεσσάρων υπό μελέτη ομάδων.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο: ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ u-PA (5 IU/ML), ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΟΧΙ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΩΟΦΟΡΟΥ ΔΙΣΚΟΥ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IVP ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

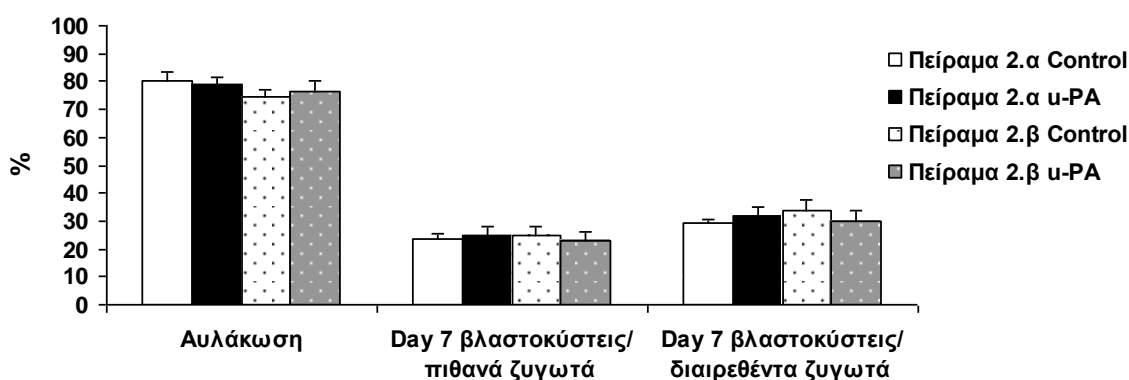
3.2.1 Πείραμα 2.α: Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος IVC με την προσθήκη u-PA, χωρίς την παρουσία ορού και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων

Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC [ημι-καθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, χωρίς την παρουσία κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (FCS⁺/CC⁺)] με 5 IU/ml u-PA, δεν επηρέασε τα ποσοστά αυλάκωσης ή/και παραγωγής βλαστοκύστεων 7 ημερών (D7). Τα αποτελέσματα της IVP παρουσιάζονται στην Εικόνα 18 ή/και στον Πίνακα 5. Ομοίως, το πρότυπο έκφρασης των 10 υπό μελέτη γονιδίων δεν μεταβλήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων των εμβρύων (Εικόνα 19). Η συνολική δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) ήταν σημαντικά αυξημένη στην ομάδα u-PA, σε σχέση με αυτή του μάρτυρα ($P < 0.0001$). Σε ό,τι αφορά την PAI έναντι του u-PA (u-PAI), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Τα αντίστοιχα επίπεδα της PAI έναντι του t-PA (t-PAI) βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα u-PA. Τα επίπεδα της PAA μεταβάλλονταν, αλλά όχι σημαντικά ($P = 0.075$), μεταξύ των D0 δειγμάτων (πριν από την καλλιέργεια των εμβρύων, Day 0) και των υποστρωμάτων καλλιέργειας των εμβρύων 7 ημερών (Day 7). Τα παραπάνω αποτελέσματα, τα οποία προέκυψαν από τον προσδιορισμό της PAA και PAI, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο συνολικό αριθμό των κυττάρων των παραγόμενων εμβρύων, στην αναλογία των κυττάρων ICM/TE και στο ποσοστό απόπτωσης μεταξύ των μαρτύρων και των τροποποιημένων με u-PA εμβρύων, όπως αποκαλύφθηκε από τη μέτρηση των κυττάρων όλων των εμβρύων με την τεχνική της διαφορικής χρώσης ($P > 0,05$) (Εικόνες 21 και 22).

3.2.2 Πείραμα 2.β: Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος IVC με την προσθήκη u-PA, παρουσία ορού και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, στα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων

Όταν η καλλιέργεια των εμβρύων πραγματοποιήθηκε παρουσία μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και 5% FCS (πείραμα 2.β), καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων 7 ημερών, μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και τροποποιημένων με u-PA (Εικόνα 18 ή/και Πίνακας 5). Το πρότυπο έκφρασης των 10 υπό μελέτη γονιδίων, μεταξύ των δύο ομάδων, δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές (Εικόνα 20). Αξίζει να σημειωθεί ότι, τόσο στο πείραμα 2.α όσο και 2.β, η έκφραση του γονιδίου *PLG* δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις δύο ομάδες εμβρύων (control και u-PA). Το παραπάνω διαπιστώθηκε, επίσης, στα έμβρυα της ομάδας των μαρτύρων του 1^{ου} πειράματος (Εικόνα 13). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της PAA και της PAI στα καλλιεργητικά υποστρώματα δεν διέφεραν σημαντικά στις δύο υπό μελέτη ομάδες ($P > 0,05$). Η αποτελεσματικότητα της προσθήκης του ενζύμου στην καλλιέργεια επιβεβαιώθηκε από τα υψηλά επίπεδα της PAA των υποστρωμάτων της ημέρας 0 (D0), τα οποία τροποποιήθηκαν με προσθήκη u-PA, σε σχέση με τα αντίστοιχα των υποστρωμάτων που προέκυψαν μετά την επταήμερη καλλιέργεια των εμβρύων. Τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

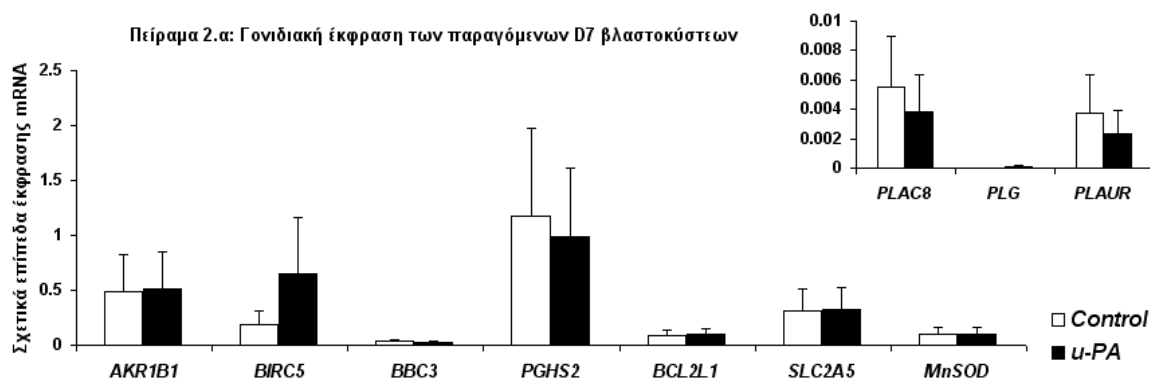


Εικόνα 18: Επίδραση του u-PA στα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων την ημέρα 7 (D7), μετά την τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας (Πείραμα 2.α και 2.β). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων control και u-PA ($P > 0,05$) στα δύο υπό μελέτη στάδια ανάπτυξης των εμβρύων.

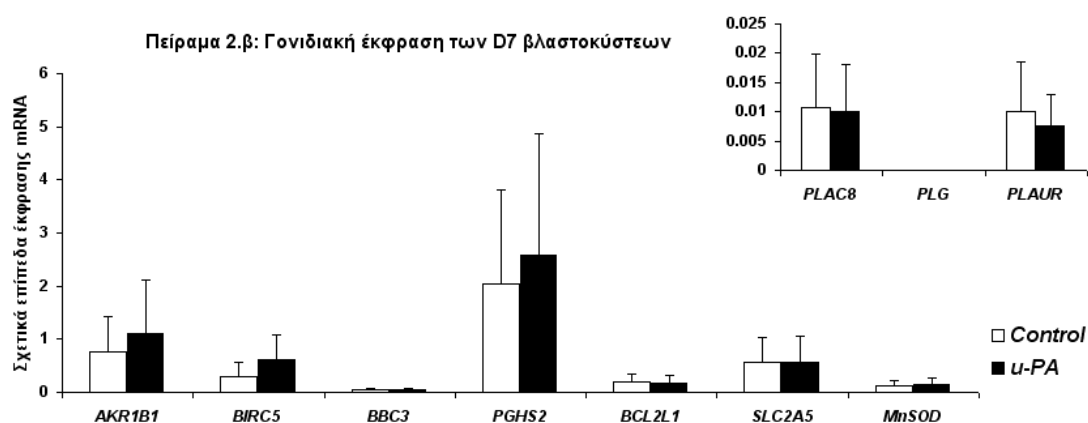
Πίνακας 5. Επίδραση της προσθήκης 5 IU/ml u-PA στο υπόστρωμα της IVC στα ποσοστά της IVP. Πείραμα 2.α: υπόστρωμα ημι-καθορισμένης σύστασης χωρίς την παρουσία κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (FCS⁻/CC⁻). Πείραμα 2.β: υπόστρωμα, το οποίο περιείχε ορό εμβρύου μόσχου, παρουσία μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (FCS⁺/CC⁺).

Πείραμα	Ομάδα	Αρ. πιθανών ζυγωτών	Αυλάκωση (%)	Day 7 βλαστοκύστες/πιθανά ζυγωτά (%)	Day 7 βλαστοκύστες/διαιρεθέντα ζυγωτά (%)
2.α	Control	775	80.1 ± 3.4	23.5 ± 1.8	29.2 ± 1.6
	u-PA	856	78.7 ± 2.8	25.1 ± 2.7	32.0 ± 2.9
2.β	Control	310	74.2 ± 2.7	25.1 ± 2.9	33.9 ± 3.7
	u-PA	319	76.2 ± 4.0	22.8 ± 3.1	30.0 ± 3.9

*Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά (%), τα οποία προέκυψαν από το σύνολο των πειραματικών επαναλήψεων (μέσος όρος ποσοστών ± τυπικό σφάλμα). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα ποσοστά αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7 μεταξύ των ομάδων τροποποιημένων και μη υποστρωμάτων. Το ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7 υπολογίστηκε τόσο με βάση το συνολικό αριθμό των προστιθέμενων πιθανών ζυγωτών στην IVC όσο και των διαιρεθέντων ζυγωτών.



Εικόνα 19: Επίδραση της τροποποίησης του IVC υποστρώματος με u-PA στην ποιότητα των παραγόμενων βλαστοκύστεων (πείραμα 2.α). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μέτρησης δημιουργήθηκαν δύο γραφήματα διαφορετικής κλίμακας, εξαιτίας των διαφορών στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των γονιδίων-στόχων. Κάθε στήλη του γραφήματος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο έκφρασης των τεσσάρων πειραματικών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των μαρτύρων και των εμβρύων που αναπτύχθηκαν σε τροποποιημένο με u-PA υπόστρωμα ($P > 0,05$).



Εικόνα 20: Επίδραση της τροποποίησης με προσθήκη u-PA του υποστρώματος της IVC (παρουσία FCS) στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των εμβρύων, τα οποία συγκαλλιεργήθηκαν με κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA 10 γονιδίων. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ($P > 0,05$).

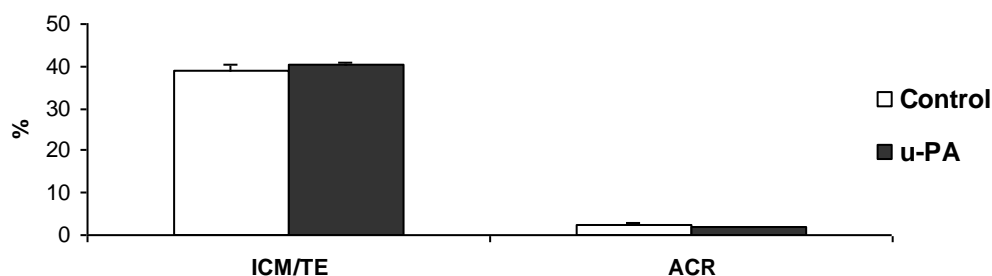
Πίνακας 6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών τους (PAI) στα υποστρώματα της IVC

Πείραμα	Ομάδα	PAA	PAI	PAI
		(u-PA IU/0,1 ml)	(t-PA IU/0,1 ml)	(u-PA IU/0,1 ml)
2.α	Control	1.5 ± 0.1^a	22.3 ± 1.7^a	0.24 ± 0.02
	u-PA (D7)	7.1 ± 0.5^b	30.1 ± 1.5^b	0.28 ± 0.04
	u-PA (D0)	8.2 ± 0.3^b	32.2 ± 0.9^b	0.36 ± 0.04
2.β	Control	0.9 ± 0.1	16.6 ± 0.7	0.17 ± 0.02
	u-PA (D7)	0.8 ± 0.1^a	15.2 ± 0.7	0.15 ± 0.01
	u-PA (D0)	1.4 ± 0.1^b	17.4 ± 0.9	0.16 ± 0.01

*Οι παραπάνω τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των δραστηριοτήτων \pm τυπικό σφάλμα.

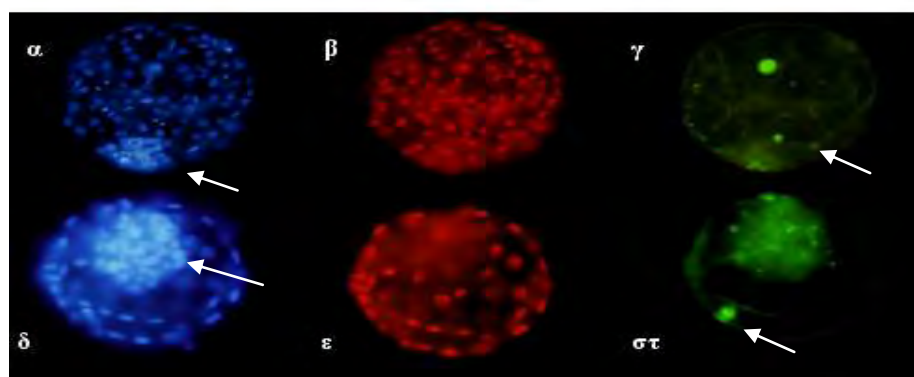
Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν για το μεν 2.α πείραμα $n=8$ για το δε 2.β πείραμα $n=6$.

^{a,b} Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη υποδηλώνουν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων σε κάθε πείραμα ($P < 0,0001$). Τα τροποποιημένα καλλιεργητικά υποστρώματα (D0) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα για τον εσωτερικό έλεγχο της αποτελεσματικής τροποποίησης.



Ομάδα	Αρ. Βλαστοκύστεων	TCN	ICM/TE (%)	ACR (%)
Control	40	117 ± 9	38,9 ± 1,4	2,9 ± 0,6
u-PA	40	105 ± 5	40,1 ± 0,5	1,8 ± 0,3

Εικόνα 21: Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο συνολικό αριθμό κυττάρων του εμβρύου (total cell number, TCN), στην αναλογία των κυττάρων της έσω κυτταρικής στιβάδας (ICM) προς εκείνων της τροφοβλάστης (TE) (ICM/TE) και στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (apoptotic cell ratio, ACR) μεταξύ των δύο ομάδων των εμβρύων. Οι παραπάνω τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ποσοστών ± τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 22: Εκτίμηση της διαφορικής χρώσης των κυττάρων των βλαστοκύστεων της ομάδας των μαρτύρων (α,β και γ) και της τροποποιημένης με u-PA (δ, ε και στ), που προήλθαν από τρεις επαναλήψεις του 2.α πειράματος. Οι πυρήνες των κυττάρων της τροφοβλάστης (TE) και της έσω κυτταρικής στιβάδας (ICM) εντοπίζονται με μπλε μετά από χρώση τους με τη χρωστική Hoechst (α και δ, με άσπρα βέλη διαφαίνεται η ICM). Το κόκκινο σήμα του φθορισμού προέρχεται μόνο από τα κύτταρα της τροφοβλάστης, καθώς το αντίσωμα του CDX-2 είναι έμμεσα σημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία Texas Red (β και ε). Τα αποπτωτικά κύτταρα (στ: με άσπρα βέλη) εντοπίζονται με πράσινο φθορίζον σήμα διότι το αντίσωμα της κασπάσης-3 είναι έμμεσα σημασμένο με FITC (γ και στ).

4 . Σ Υ Ζ Η Τ Η Σ Η

4.1 Τροποποίηση του υποστρώματος της γονιμοποίησης με προσθήκη t-PA

Στις συνθήκες της παρούσας μελέτηςδείχθηκε για πρώτη φορά ότι, η προσθήκη του ενεργοποιού του πλασμινογόνου του ιστικού-τύπου στο υπόστρωμα της IVF επηρεάζει την *in vitro* ανάπτυξη των εμβρύων βοοειδών και προκαλεί μεταβολές της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ποιοτικοί μάρτυρες της επιβίωσης των εμβρύων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, στα βοοειδή, η προσθήκη του t-PA στο υπόστρωμα της IVF προκάλεσε σημαντική μείωση της γονιμοποίησης, εκφραζόμενη ως ποσοστό αυλάκωσης των εμβρύων (cleavage), και ως ποσοστό παραγωγής/σχηματισμού βλαστοκύστεων ημέρας 7 και 8, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν μεταβολές στο πρότυπο έκφρασης σημαντικών γονιδίων-μαρτύρων των παραγόμενων μοριδίων και βλαστοκύστεων. Η τελική δραστηριότητα του t-PA (500 IU/ml), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση του υποστρώματος της IVF, επιλέχθηκε έτσι ώστε η ενζυμική δραστηριότητα στο θεραπευτικό υπόστρωμα να προσομοιάζει με αυτή που παρατηρείται στο υγρό του ωαγωγού των βοοειδών και στο ωοθυλακικό υγρό στον περί την ωοθυλακιορρηξία χρόνο.

Η προσθήκη του αναστολέα της πλασμίνης και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου ε-ACA, καθώς και του συνδυασμού των ε-ACA με t-PA στο υπόστρωμα της IVF δεν επηρέασε τα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα μαρτύρων. Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώνει εμμέσως το αρχικό εύρημα, ότι η προσθήκη του t-PA κατά τη διάρκεια της IVF, πιθανόν δυσχεραίνει την ικανότητα ανάπτυξης των εμβρύων. Ωστόσο, σε προηγούμενη μελέτη, αναφέρθηκε πως ο εμπλουτισμός του υποστρώματος IVF με t-PA βελτίωσε το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης, καθώς επίσης, ότι η προσθήκη του ε-ACA προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης και της πρώιμης ανάπτυξης των εμβρύων (Papanikolaou και συν., 2008). Είναι πολύ πιθανόν, τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο ερευνών να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα. Στην περίπτωση των Papanikolaou και συν. (2008), η ωρίμανση των COCs πραγματοποιήθηκε σε τροποποιημένο υπόστρωμα κατά Parker (Modified Parker's

Medium, MPM), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με FSH (22 $\mu\text{g/ml}$) και 10% ορού αγελάδας σε οίστρο (oestrus cow serum, OCS), ενώ η καλλιέργεια των εμβρύων γινόταν παρουσία των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, σε 400 μl υποστρώματος MPM (400 μl για κάθε ομάδα 15-20 εμβρύων) και κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (10% O_2). Στις ίδιες συγκεντρώσεις O_2 (10%) πραγματοποιήθηκε και η *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις O_2 κατά τη διάρκεια της IVP ευνοούν την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οξειδωτικών ενζύμων με συνεπακόλουθο σχηματισμό και συσσώρευση των ROS, οι οποίες επηρεάζουν την εξέλιξη των εμβρύων. Στα βοοειδή, και όχι μόνο, η μείωση του O_2 κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την ανάπτυξη των εμβρύων (Liu και Foote, 1995). Αντίθετα, υποστηρίζεται ότι στο πρόβατο η μείωση του O_2 στο περιβάλλον της IVF επιταχύνει την κινητική των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων, η οποία αποτυπώνεται με αυξημένα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων την 6^η ημέρα· η τάση αυτή όμως αντιστρέφεται για τις ημέρες 7 και 8 (Leoni και συν., 2007). Η ίδια πειραματική προσέγγιση στον άνθρωπο δεν απέδωσε θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα για την IVP, υποδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός ROS κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης των γαμετών, ενδεχομένως ευνοεί τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων (de Lamirande και Gagnon 1993· de Lamirande και συν., 1997). Σύμφωνα με μελέτες, η καλύτερη αντιμετώπιση του φαινομένου υπερπαραγωγής ROS, κατά τη διάρκεια της IVP, επιτυγχάνεται με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στην οποία η συγκέντρωση του O_2 ρυθμίζεται για την μεν ωρίμανση και γονιμοποίηση των ωαρίων στο 20%, για τη δε καλλιέργεια στο 5% (Gordon, 1994· Vajta και συν., 2010).

Στους επίμυς, η προσθήκη FSH ή EGF σε καλλιέργειες κυττάρων του ωοφόρου δίσκου βρέθηκε ότι επάγει τη μεταγραφή και τη δραστηριότητα του t-PA, με τρόπο ανάλογο και εξαρτώμενο από τη δόση και το χρόνο δράσης τους. Βέβαια, η δράση τους ασκείται διαμέσου διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών, τα οποία εξαρτώνται ή όχι από τις πρωτεϊνικές κινάσες A (Ny και συν., 1985· Galway και συν. 1989). Στα βοοειδή, η FSH ενισχύει την έκφραση του mRNA του t-PA σε καλλιέργειες κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ο EGF τη δραστηριότητά του. Επίσης, βρέθηκε ότι η έκφραση και η δραστηριότητα του αναστολέα των πρωτεϊνικών σερίνης -E2 (SERPINE2, δραστικός αναστολέας της πλασμίνης και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου) αυξήθηκαν σημαντικά με την προσθήκη της FSH, ενώ, αντιθέτως, αναστάλησαν από την αντίστοιχη του EGF (Cao και συν., 2006).

Κατά τη διάρκεια της IVC τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου διαθέτουν την ικανότητα να τροφοδοτούν τα έμβρυα εκκρίνοντας διάφορους παράγοντες με παρακρινική δράση, όπως αυξητικούς παράγοντες, στεροειδή και άλλες ορμόνες, που ενδεχομένως συμβάλλουν στη βέλτιστη ανάπτυξη των εμβρύων (Thomas και Seidel, 1993· Orsi και Reischl, 2007). Αναμφισβήτητα, η παρουσία των σωματικών κυττάρων στην καλλιέργεια των εμβρύων συντελεί στην απομάκρυνση τοξικών ουσιών-μεταβολιτών των υποστρωμάτων (Orsi και Reischl, 2007). Η χρήση τους συχνά αποφεύγεται, για λόγους προστασίας της καλλιέργειας από επιμολύνσεις ωστόσο, η πιθανότητα μεταφοράς ιών ή βακτηρίων σε αυτή μειώνεται με τη χρήση αυτόλογων κυττάρων, δηλαδή εκείνων των κυττάρων που είναι ίδιας προέλευσης και περιβάλλουν το ίδιο το ωάριο (Broussard και συν., 1994). Η επιλογή των ατμοσφαιρικών συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων αυτών αποτελεί, επίσης, θέμα διχογνωμίων, καθώς οι βέλτιστες συνθήκες συγκέντρωσης οξυγόνου (5% ή 20%) δεν έχουν ακόμα προσδιορισθεί (Lim και συν., 1999· Corrêa και συν., 2008). Επομένως, οι τεράστιες διαφορές στην πειραματική προσέγγιση του ίδιου ερωτήματος, καθιστούν ανασφαλής κάθε προσπάθεια σύγκρισης των αποτελεσμάτων των δύο ερευνών.

Κατά την ανάλυση των υποστρωμάτων της IVF παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) μετά την προσθήκη t-PA. Ωστόσο, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στη δραστηριότητα των αναστολέων τους (PAI). Τα επίπεδα της PAA μειώθηκαν, σημαντικά, στην ομάδα t-PA+ε-ACA σε σχέση με εκείνα της ομάδας t-PA, ωστόσο, παρέμεναν σημαντικά υψηλότερα από αυτά της ομάδας μαρτύρων. Στηριζόμενοι στα βελτιωμένα αποτελέσματα της IVP, τα οποία παρατηρήθηκαν στην ομάδα t-PA+ε-ACA σε σχέση με την αντίστοιχη t-PA, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτή η μικρή μείωση των επιπέδων της PAA ενδεχομένως ευνόησε τη βιωσιμότητα των εμβρύων. Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη του αναστολέα ε-ACA (σε συγκέντρωση 10mM) παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια αναστολής της πλασμίνης ή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (Alcjaersig και συν., 1959). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε επίσης ότι, ακόμα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (16 mM) του αναστολέα αυτού επάγεται η αναστολή της πλασμίνης κατά περίπου 60%. Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη του ε-ACA δεν φαίνεται να επηρεάζει την ενδογενή PAA, η οποία διαπιστώνεται στο καθ' αυτό υπόστρωμα της IVF, καθώς η συνολική PAA του IVF υποστρώματος της 4^{ης} υπό μελέτη ομάδας (ε-ACA) δεν διέφερε από την αντίστοιχη της ομάδας

μαρτύρων. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι, η παρουσία του ε-ACA εμποδίζει την αποτελεσματική πρόσδεση του Glu-πλασμινογόνου στην κυτταρική μεμβράνη, ωστόσο, ο σχηματισμός της πλασμίνης στην επιφάνεια του κυττάρου διευκολύνεται από το u-PA, ο οποίος απελευθερώνεται από τα κύτταρα (Dejournencel και συν., 2010). Η παραπάνω διαπίστωση βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, καθώς ο σχηματισμός της πλασμίνης δεν εξουδετερώθηκε πλήρως από την προσθήκη του ε-ACA, υποδηλώνοντας την πιθανή ενεργοποίηση ενός εναλλακτικού μονοπατιού παραγωγής της πλασμίνης. Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, είναι πιθανό να υπάρχει ένα κατώφλι στη δραστηριότητα του ενζύμου, πάνω από το οποίο να εμφανίζεται/ασκείται η επίδραση του t-PA στα ποσοστά αυλάκωσης ή σχηματισμού βλαστοκύστεων. Εναλλακτικά, η προσθήκη του αναστολέα, ε-ACA ενδέχεται να εμποδίζει τη δραστηριότητα του συστήματος PAs / PL, κυρίως μέσω αναστολής της δραστηριότητας της πλασμίνης, προστατεύοντας τα έμβρυα από μια πιθανή γενικευμένη πρωτεόλυση.

Ιδιαίτερος ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι η προσθήκη του t-PA στο υπόστρωμα της IVF, δεν προκάλεσε μόνο μειωμένα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων, αλλά και διακοπή της ανάπτυξης των περισσότερων από αυτά στο στάδιο του μοριδίου. Το αξιοσημείωτο αυτό φαινόμενο, μας οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση της δράσης του t-PA στην εμβρυϊκή μεταγραφική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της εμβρυογένεσης, ακριβώς μετά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος. Στα βοοειδή, η έναρξη της μεταγραφής του εμβρυϊκού γονιδιώματος εμφανίζεται στο στάδιο των 8-16 κυττάρων, το οποίο περιλαμβάνει την αύξηση του μεταγραφόμενου εμβρυϊκού mRNA και την εμφανή αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών (Niemann και Wrenzycki 2000· Memili και First, 2000· Sirard, 2010). Στο στάδιο αυτό εμφανίζεται, πολύ συχνά, το φαινόμενο διακοπής της ανάπτυξης των εμβρύων (γνωστό ως “embryo arrest”), το οποίο προκαλείται από ανεπάρκεια κυτταροπλασματικών παραγόντων και πρωτεϊνών του ωαρίου ή/και αδυναμία μεταγραφής του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Eyestone και First, 1991· Meirelles και συν., 2004). Κατά την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των πρώιμων εμβρύων, 3^{ov} και 4^{ov} ημερών (D3 και D4 έμβρυα), παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *BAX* και *KAT2B*, μεταξύ των δύο ομάδων D3 εμβρύων. Το προ-αποπτωτικό γονίδιο *BAX* ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών *BCL-2*· τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου αυτού δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο στο μονοπάτι της απόπτωσης (Yang και

Rajamahendran, 2002· Fear και Hansen, 2011). Στα έμβρυα, η διαδικασία της απόπτωσης επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας. Το γονίδιο *BAX* βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα έμβρυα, τα οποία παρήχθησαν με *in vitro* μεθόδους, σε σχέση με τα αντίστοιχα *in vivo* έμβρυα (Lonergan και συν., 2003β). Η παρουσία του ορού εμβρύου μόσχου (FCS) στο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού σε σχέση με τα έμβρυα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καθορισμένης σύστασης (Rizos και συν., 2003). Επίσης, αυξημένη έκφραση του *BAX* παρατηρήθηκε στα *in vivo* έμβρυα, τα οποία διαιρέθηκαν πιο αργά, σε σχέση με τα ταχέως διαιρούμενα. Ακόμη, η μεταγραφή του ανιχνεύθηκε νωρίτερα (την ημέρα 2) στα *in vitro* έμβρυα από ότι στα *in vivo* (την ημέρα 4) (Gutiérrez-Adán και συν., 2004). Αντίστοιχη επίσπευση της μεταγραφής του *BAX* παρατηρήθηκε και στα δικά μας πειράματα (στα έμβρυα 3^{ov} ημερών), ενώ η περαιτέρω αύξηση της μεταγραφής του στην ομάδα t-PA ίσως αποτελεί ένδειξη χαμηλής ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο 1^ο κεφάλαιο, η πρωτεΐνη *BCL2L1* λειτουργεί ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας της οικογένειας των πρωτεϊνών *BCL-2*, η οποία εκλύεται και αλληλεπιδρά με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες σε απάντηση του ενδοκυτταρικού stress, το οποίο μπορεί να προκληθεί σε καταστάσεις όπως είναι η καταστροφή του DNA ή η ανεπάρκεια κυτταροκινών (Cory και συν., 2003). Ο λόγος της έκφρασης των γονιδίων *BAX/BCL2L1* δεν διέφερε μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων στις ημέρες 3 και 4. Την 3^η ημέρα, το mRNA του μεταγράφου *BCL2L1* βρισκόταν σχεδόν στα ίδια επίπεδα έκφρασης μεταξύ των εμβρύων και των δύο υπό μελέτη ομάδων.

Ο παράγοντας, KAT2B ((K)λυσίνη ακετυλτρανσφεράση 2B), γνωστός και ως PCAF (p300/CFBP-σχετιζόμενος παράγοντας), ακετυλιώνει τις ιστόνες και συσχετίζεται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τη μεταγραφική ενεργοποίηση και την κυτταρική διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων κυττάρων (Yamauchi και συν., 2000). Ο ρυθμιστικός του ρόλος στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση έχει περιγραφεί σε συνθήκες υποξίας, τροποποιώντας τη σταθερότητα και δραστηριότητα του p53 καθώς και του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1α) (Xenaki και συν., 2008). Κατά τη μετάβαση από το μητρικό στο εμβρυϊκό γονιδίωμα, τα έμβρυα, τα οποία τροποποιήθηκαν με α-αμανιτίνη (ένας μεταγραφικός αναστολέας), παρουσίασαν

μείωση της έκφρασης του *KAT2B*, 16 φορές λιγότερη, σε σχέση με τα αντίστοιχα μη-τροποποιημένα έμβρυα (Vigneault και συν., 2009). Επιπλέον, τα έμβρυα, τα οποία καλλιεργούνται *in vitro*, εμφανίζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *KAT2B* σε σχέση με τα αντίστοιχα των *in vivo* (Kerkona και συν., 2011). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, το γονίδιο αυτό αποτελεί έναν πιθανό μάρτυρα της βιωσιμότητας των εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων. Μελετώντας τη γονιδιακή έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ανήκουν στην ίδια κατηγορία με αυτή του *KAT2B*, σε ωάρια και έμβρυα βοοειδών διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (GV ωάρια, ωάρια στη μετάφαση II, έμβρυα 2 κυττάρων, 4 κυττάρων, 8 κυττάρων και βλαστοκύστες), βρέθηκε πως η έκφρασή τους στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των εμβρύων σταδιακά μειώνεται, ιδιαίτερα στο στάδιο των 8 κυττάρων, και αυξάνεται ραγδαία στο στάδιο της βλαστοκύστης (Vigneault και συν., 2004). Πιθανολογείται λοιπόν ότι, το mRNA διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως στη δική μας περίπτωση ο *KAT2B*, θα μπορούσε να είναι μητρικής προέλευσης και να παρέμεναν αποθηκευμένοι στο ωάριο ή αργότερα στο πρώιμο έμβρυο έως τη χρονική στιγμή της μετάφρασής τους κατά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (MET). Σύμφωνα με τους Vigneault και συν. (2004), η διαθεσιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στο στάδιο της MET ενδεχομένως να είναι περιορισμένη (rate-limiting). Στην παρούσα διατριβή, στο στάδιο των 8 κυττάρων, τα έμβρυα της t-PA ομάδας διέθεταν σημαντικά αυξημένη έκφραση του μεταγράφου *KAT2B* σε σχέση με τα έμβρυα της ομάδας των μαρτύρων. Οποσδήποτε, η αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του *KAT2B* δεν μεταφράζεται και ως αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα, ωστόσο, η τροποποίηση του υποστρώματος της IVF με t-PA βρέθηκε να αλλάζει το πρότυπο έκφρασης αυτού του σημαντικού μεταγραφικού παράγοντα στα έμβρυα της 3^{ης} ημέρας και όχι αυτών της 4^{ης} ημέρας.

Στις βλαστοκύστες 7 ημερών, τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης της έκφρασης των δέκα υπό μελέτη γονιδίων, μεταξύ των εμβρύων που προέκυψαν με ή χωρίς τροποποίηση, έδειξαν ότι το γονίδιο *BCL2L1* υποεκφραζόταν στα έμβρυα της t-PA ομάδας, ενώ το μετάγραφο *PLG* βρέθηκε να υπερκφράζεται ($P < 0,05$). Αντίθετα από τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης στα πρώιμα έμβρυα, τα επίπεδα έκφρασης του *BCL2L1* μειώθηκαν στην t-PA ομάδα, πιθανόν, υποδηλώνοντας τη μειωμένη αντίσταση των εμβρύων στην αποπτωτική διαδικασία. Πέραν του *BCL2L1*, μελετήθηκαν, επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του 3^{ου}

παράγοντα πρόσδεσης BCL-2 (*BBC3* ή *Puma*). Η έκφραση του γονιδίου αυτού επιλέχθηκε να αναλυθεί βάσει της ιδιότητάς του να προσδένεται σε αντι-αποπτωτικούς παράγοντες της οικογένειας BCL, με αποτέλεσμα την επαγωγή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και την ενεργοποίηση των κασπασών (Hikisz και Kilianška, 2012). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του *BBC3* mRNA ανάμεσα στα έμβρυα των δύο υπό μελέτη ομάδων (control και t-PA). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των εμβρύων, υποθέτουμε ότι η ποιότητα των εμβρύων της ομάδας t-PA πιθανόν να επηρεάζεται από επαγόμενα αποπτωτικά φαινόμενα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να εξεταστούν περισσότερα γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την απόπτωση, για την αποφυγή λαθεμένων συμπερασμάτων.

Στην παρούσα διατριβή, για πρώτη φορά, γίνεται έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου του πλασμινογόνου (*PLG*) στα έμβρυα βοοειδών. Το γονίδιο του *PLG* δεν ανιχνεύθηκε στις βλαστοκύστες μάρτυρες (7 ημερών), ενώ, αντίθετα, στα έμβρυα της t-PA ομάδας εντοπίστηκαν χαμηλά, αλλά ανιχνεύσιμα, επίπεδα έκφρασής του. Απροσδόκητα, η παρουσία του t-PA στο υπόστρωμα της IVF, η οποία διήρκησε για 24 ώρες προκάλεσε αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα του πλασμινογόνου στο μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης των βλαστοκύστεων. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν οι παραπάνω αλλαγές στη μεταγραφή του πλασμινογόνου επηρέασαν την έκφραση και άλλων μελών του συστήματος PAs / PL, τα οποία, αναμφισβήτητα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα του εμβρύου, στην εκκόλαψη και στην εγκατάστασή του. Περισσότερα πειράματα, τα οποία θα διαλευκάνουν την πιθανή επίδραση της παραπάνω υπερκίεφρασης του *PLG* στην ανάπτυξη των εμβρύων ή και στην εγκατάσταση αυτών, κρίνονται απαραίτητα.

4.2 Τροποποίηση του υποστρώματος της καλλιέργειας με προσθήκη u-PA

Η συμμετοχή του ενεργοποιητού του πλασμινογόνου του τύπου ουροκινάσης (u-PA) στην πρόιμη ανάπτυξη και εγκατάσταση των εμβρύων αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών. Η παρουσία της δραστηριότητας του u-PA αλλά και της μεταγραφής του γονιδίου του (*PLAU*) σε *in vivo* και *in vitro* έμβρυα, από το στάδιο του ζυγωτού έως και αυτό της βλαστοκύστης (Zhang και συν., 1994), ενέτεινε το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την περαιτέρω μελέτη και την κατανόηση του ρόλου του στην πρόιμη ανάπτυξη των εμβρύων. Η διαρκώς αναπτυσσόμενη

τεχνολογία της IVP επιβάλλει τη βελτιστοποίηση των καλλιεργητικών υποστρωμάτων της χρησιμοποιώντας ουσίες οι οποίες πιθανόν βελτιώνουν τα αποτελέσματά της. Το 2008, οι Papanikolaou και συν., στην προσπάθειά τους να μελετήσουν τη συμμετοχή των μελών του PAs / PL συστήματος στην IVP, παρατήρησαν ότι η προσθήκη του u-PA στο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων βοοειδών βελτίωσε μετά από 48 h καλλιέργειας το ποσοστό των εμβρύων 4 κυττάρων, που περικλείονταν στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Στην παρούσα διατριβή, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης (Papanikolaou και συν., 2008) και αναπροσαρμόζοντας πλήρως το πειραματικό πρωτόκολλο, σύμφωνα με τα σύγχρονα δεδομένα της IVP, παρουσιάζονται δύο εναλλακτικές πειραματικές προσεγγίσεις για τη μελέτη της δράσης του u-PA στην IVC. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, στόχος μας δεν ήταν η προσομοίωση των καλλιεργητικών συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω μελέτη, αλλά η διερεύνηση της δράσης του u-PA στα ποσοστά παραγωγής των βλαστοκύστεων, κάτω από δύο διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, που πλέον έχουν υιοθετηθεί διεθνώς (Rizos και συν., 2003· George και συν., 2008). Έτσι, βρέθηκε ότι στα βοοειδή η προσθήκη του u-PA σε ημι-καθορισμένο (semi-defined) υπόστρωμα καλλιέργειας, το οποίο περιέχει βόεια αλβουμίνη ορού, δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές στο ποσοστό αυλάκωσης των εμβρύων και στο ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7. Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν η τροποποίηση με u-PA πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα καλλιέργειας μη-καθορισμένης σύστασης (παρουσία FCS), στο οποίο είχε εγκατασταθεί μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου.

Η συγκαλλιέργεια των εμβρύων με διάφορους τύπους κυττάρων αποτελούσε πάντα θέμα διαφωνίας της επιστημονικής κοινότητας, ωστόσο έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Quinn και Margalit, 1996· Parikh και συν., 2006). Αν και η παρουσία των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, σε εμπλουτισμένο καλλιεργητικό υπόστρωμα με επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού (oviduct epithelial cell-conditioned culture medium) ευνόησε τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις των παραγόμενων ζυγωτών των βοοειδών *in vitro* (Thomas και Seidel, 1993), τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου είναι μεταβολικά ενεργά και, συνεπώς, όταν χρησιμοποιούνται είναι απαραίτητο να διαλευκανθούν όλες οι πιθανές, αλλά πολύπλοκες, αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και των εμβρύων. Αν και τα σωματικά κύτταρα τείνουν να μην χρησιμοποιούνται πια στην καλλιέργεια των εμβρύων

βοοειδών, η χρήση τους στην παρούσα διατριβή δεν αποσκοπεί στη βελτίωση των αποτελεσμάτων της παραγωγής των εμβρύων, αλλά κυρίως, στη μελέτη της επίδρασης του u-PA στην ανάπτυξη των εμβρύων διαμέσου πιθανής επίδρασής τους στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Άλλωστε, έχει προταθεί ότι η δραστηριότητα του u-PA που ανιχνεύθηκε σε υπόστρωμα ωρίμανσης προέρχεται από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και όχι από τα ίδια τα ωάρια (Yamada και συν., 1996· Park και συν., 1999), συνεπώς, τα κύτταρα αυτά, ενδεχομένως, να αποτελούν διαμεσολαβητές για τη δράση του u-PA. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η οποιαδήποτε προσπάθειά μας να καλλιεργήσουμε τα έμβρυα περιβαλλόμενα από κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, χωρίς την απογύμνωσή τους με μηχανικό τρόπο, μας οδήγησε σε πολύ χαμηλά ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων, τόσο στην ομάδα των μαρτύρων όσο και στην τροποποιημένη με u-PA (ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7: περίπου 10-12%, τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Για τον παραπάνω λόγο, η καλλιέργεια των εμβρύων πραγματοποιήθηκε σε μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, δηλαδή εκείνων των κυττάρων που πιθανόν να φέρουν τον υποδοχέα του u-PA. Με τη βοήθεια της real-time PCR, η έκφραση του υποδοχέα u-PAR ανιχνεύθηκε στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Ωστόσο, περισσότερες μοριακές τεχνικές απαιτούνται για την ταυτοποίηση της παρουσίας μίας ενεργής και λειτουργικής μορφής του υποδοχέα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PAA και της PAI ανάλυσης των υποστρωμάτων της IVC του 2.α πειράματος, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των PAs και των PAIs έναντι του t-PA (t-PAI), στην τροποποιημένη με u-PA ομάδα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα των μαρτύρων. Παρατηρήθηκε επίσης μία θετική σχέση των επιπέδων της PAA με τα επίπεδα της PAI έναντι του t-PA ($P < 0,0001$). Αντίθετα, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στην PAI έναντι του u-PA (u-PAI) μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων. Τα αυξημένα επίπεδα της PAI έναντι του t-PA, και όχι έναντι του u-PA, στο τροποποιημένο υπόστρωμα καλλιέργειας (7 ημερών) αποτελούν ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα, καθώς υποδηλώνουν την πιθανή απελευθέρωση ενός συγκεκριμένου αδρανοποιού των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, ενδεχομένως για την εξουδετέρωση της υπερβολικής δραστηριότητας του u-PA ή/ και της πλασμίνης του υποστρώματος. Με τη βοήθεια πειραμάτων κινητικής των ενζύμων διαπιστώθηκε ότι ο αδρανοποιός των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, PAI-2, είναι σχετικά ασθενέστερος αδρανοποιός του t-PA σε σχέση με τον PAI-1 και η ταχύτητα δέσμευσής του με τον «δίκλωνο» u-

PA είναι 400 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τον «δίκλωνο» t-PA (Thorsen και συν., 1988). Έτσι, λοιπόν, στη δική μας περίπτωση, η αύξηση των επιπέδων της PAI έναντι του t-PA ενδεχομένως αντανακλά την αύξηση της δραστηριότητας του αδρανοποιού PAI-1. Ουσίες όπως η ινσουλίνη και το σελήνιο, οι οποίες εμπλουτίζουν το ημι-καθορισμένης σύστασης καλλιεργητικό υπόστρωμα, βρέθηκε ότι επηρεάζουν τη σύνθεση και την έκφραση του PAI-1 και u-PA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, το σελήνιο, το οποίο συμπεριλήφθηκε στο υπόστρωμα καλλιέργειας ως ένα ουσιώδες βιολογικό στοιχείο ικανό να υποστηρίξει την ανάπτυξη των εμβρύων, έχει διαπιστωθεί ότι αναστέλλει τη διεισδυτικότητα των ανθρώπινων, μικρής κακοήθειας, σαρκωματικών κυττάρων HT1080 και ότι μειώνει την έκφραση του u-PA, καθώς και των μεταλλοπρωτεϊνών τύπου -2 και -9 (Yoon και συν., 2001). Επιπλέον, η ινσουλίνη επάγει τη σύνθεση του PAI-1 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ηπατοκυττάρων (Hep G2) (Alessi και συν., 1988). Συνεπώς, το σελήνιο ή/και η ινσουλίνη, τα οποία περιέχονται στο ημι-καθορισμένο υπόστρωμα της IVC, ενδεχομένως να εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων u-PA και PAI-1

Σε ότι αφορά το πείραμα 2.β δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα αποτελέσματα των αναλύσεων των PAA και PAI μεταξύ των τροποποιημένων και μη-τροποποιημένων υποστρωμάτων. Ωστόσο, στα τροποποιημένα υποστρώματα καλλιέργειας, τα επίπεδα της PAA παρουσίασαν μια θετική συσχέτιση με εκείνα της PAI έναντι του t-PA ($P < 0,05$). Οι εκκρινόμενοι αδρανοποιοί (PAIs) είναι απαραίτητοι για την αναστολή της περίσσειας δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, οι οποίοι παράγονται στο καλλιεργητικό υπόστρωμα. Ενδεχομένως, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου να συμβάλλουν στην αύξηση παραγωγής PAA κατά την ανάπτυξη των εμβρύων. Ο ρυθμός έκκρισης των PAs ή/και των PAIs μπορεί να μεταβληθεί από διάφορες ορμόνες ή ουσίες με ορμονική δράση, όπως είναι οι γοναδοτρόπες ορμόνες, τα στεροειδή, οι προσταγλανδίνες E_1 ή E_2 , διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, αλλά και ουσίες, οι οποίες αυξάνουν το ενδοκυττάριο cAMP (Saksela, 1985· Danø και συν., 1985· Blasi και συν., 1987· Saksela και Rifkin, 1988). Όλες οι παραπάνω ουσίες είναι πιθανόν να παρέχονται σε αδιευκρίνιστες συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια μέσω της προσθήκης του FCS. Τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells), κάτω από ορμονική ρύθμιση, είναι ικανά να συνθέτουν και να παράγουν PAs ή/και PAIs (Strickland και Beers, 1976). Ομοίως, οι Canipari και συν. (1995) παρατήρησαν ότι οι γοναδοτρόπες ορμόνες επάγουν την παραγωγή των PAs και από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells). Ωστόσο, στην ίδια

μελέτη βρέθηκε ότι στους μυς το mRNA του u-PA παράγεται ισόποσα τόσο από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, όσο και από τα κοκκώδη κύτταρα. Σε πρωτογενείς καλλιέργειες των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού, το mRNA του u-PA υπερεκφραζόταν παρουσία της προγεστερόνης (100 ng/ml), σε αντίθεση με την 17-β-οιστραδιόλη (100 pg/ml) (Roldán-Olarte και συν., 2012). Η παραπάνω αύξηση της έκφρασης, σύμφωνα με τους συγγραφείς, φαίνεται να αντισταθμίζεται είτε από τη δραστηριότητα του PAI-1 είτε μέσω της πρόσδεσης του u-PA στον υποδοχέα του. Ωστόσο, όταν η προγεστερόνη χρησιμοποιήθηκε στις ίδιες υψηλές συγκεντρώσεις (100 ng/ml), σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών, η παραγωγή του u-PA καταστάλθηκε, πιθανόν λόγω της βιο-φυσιολογικής ιδιότητας της προγεστερόνης να επάγει την αποβολή του u-PA μέσω των κυστιδίων εξωκύττωσης (McDonnell και Murdoch, 2001). Υποθέτουμε, λοιπόν, ότι η παρουσία των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, αλλά και του ορού, στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, πιθανόν να επηρεάζει τα επίπεδα της PAA μέσω της απελευθέρωσης ενεργοποιών του πλασμινογόνου ή/και αδρανοποιών τους. Σύμφωνα με το σενάριο αυτό, μπορεί να ερμηνευθεί γιατί τα επίπεδα της PAA και της PAI στα τροποποιημένα υποστρώματα δεν παρέκλιναν από τα υποστρώματα της ομάδας των μαρτύρων.

Τα επίπεδα της PAA και PAI προσδιορίστηκαν επίσης στα τροποποιημένα υποστρώματα, την ημέρα έναρξης της καλλιέργειας (ημέρα 0) ή την 1^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, πριν ακόμα τα έμβρυα τοποθετηθούν στην καλλιέργεια. Τα δείγματα της ημέρας 0 (D0) χρησιμοποιήθηκαν για τον εσωτερικό έλεγχο της αποτελεσματικότητας της τροποποίησης του υποστρώματος με u-PA. Κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων PAA και PAI των παραπάνω δειγμάτων βρέθηκε ότι η PAA ήταν σημαντικά αυξημένη στα τροποποιημένα με u-PA υποστρώματα, σε σχέση με αυτήν των αντίστοιχων δειγμάτων, τα οποία συλλέχθηκαν την 7^η ημέρα. Αντίθετα, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα της PAI. Έτσι, με δεδομένη τη σύσταση των D0 δειγμάτων (SOF υπόστρωμα εμπλουτισμένο με FCS, το οποίο έχει τροποποιηθεί με u-PA), η αυξημένη PAA αποδεικνύει την επιτυχή τροποποίηση του υποστρώματος με u-PA και την παρουσία του ενζύμου κατά την έναρξη της καλλιέργειας των εμβρύων.

Το πρότυπο της σχετικής έκφρασης δέκα μεταγράφων, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα βιολογικά μονοπάτια της ανάπτυξης των εμβρύων, μελετήθηκε σε βλαστοκύστες ημέρας 7, οι οποίες προέκυψαν τόσο από την τροποποιημένη ομάδα u-PA όσο και την ομάδα των μαρτύρων. Η επιλογή των παραπάνω γονιδίων και η

σημασία τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων αναλύθηκε στην εισαγωγή. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι συνθήκες που επικρατούν *in vitro* μετά τη γονιμοποίηση αποτελούν ίσως την πιο κρίσιμη περίοδο της δυναμικής ανάπτυξης των εμβρύων, και ως εκ τούτου, η ανάλυση της έκφρασης γονιδίων-σημαντικών κατά την ανάπτυξη των εμβρύων- αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της ποιότητάς τους (Rizos και συν., 2008). Τόσο στο πείραμα 2.α όσο και στο 2.β, κατά τη ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονιδιακής έκφρασης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων των εμβρύων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταγραφή του πλασμινογόνου, *PLG*, δεν ανιχνεύθηκε σε καμία ομάδα εμβρύων, το οποίο είναι σύμφωνο και με την περίπτωση των εμβρύων ελέγχου του 1^{ου} πειράματος (Krania και συν., 2015). Επίσης, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα του u-PA, *PLAUR*, μεταξύ των δύο ομάδων εμβρύων, παρά μόνο μια τάση υποέκφρασής του, στατιστικά μη σημαντική, στα τροποποιημένα με u-PA έμβρυα και των δύο πειραματικών προσεγγίσεων του 2^{ου} πειράματος. Η παραπάνω μείωση, αν και μη σημαντική, πιθανόν να υποδεικνύει μια αποσταθεροποίηση της έκφρασης του υποδοχέα από την προσθήκη του u-PA, η οποία, ωστόσο, δεν αποδεικνύεται εδώ. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των u-PA, u-PAR, PAI-1 και PAI-2, μεταβάλλεται από την παρουσία διαφόρων αυξητικών παραγόντων ή λακτογόνων ορμονών (όπως ο EGF, ο IGF-1 και η ινσουλίνη), σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων των βοοειδών (Theodorou και συν., 2011). Αν και δεν αποκλείεται αυτή η μείωση της μεταγραφής να προέρχεται από τις τρέχουσες συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας, η πιθανότητα να οφείλεται στην προσθήκη του u-PA πρέπει, επίσης, να λαμβάνεται υπόψη. Τέλος, αξιολογήθηκε το ποσοστό απόπτωσης, αλλά και η αναλογία των κυττάρων ICM/TE στις παραγόμενες βλαστοκύστες και των δύο ομάδων, από συνολικά τρεις πειραματικές επαναλήψεις του παραπάνω πειράματος. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο συνολικό αριθμό των κυττάρων των παραγόμενων εμβρύων, στην αναλογία των κυττάρων που προέρχονται από την ICM/TE και στο ποσοστό της απόπτωσης. Η παραπάνω μέθοδος αξιολόγησης της ποιότητας των εμβρύων επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης των εμβρύων, στην οποία επίσης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές.

4.3 Γενική Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύουν ότι η αρχική μας υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε, καθώς η προσθήκη του t-PA στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης δεν απέδωσε τα αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα στην IVP. Είναι όμως σημαντικό να αναφερθεί ότι επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή του ενζυμικού συστήματος ενεργοποιού του πλασμινογόνου / πλασμίνη στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Επιχειρήθηκε η μελέτη ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου φαινομένου της αναπαραγωγικής διαδικασίας και με βάση τα πειράματα που διενεργήθηκαν στην παρούσα διατριβή δεν αποφασηνίστηκε πλήρως εάν οι αλλαγές στην ποσότητα και στην ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων οφείλονται στην επίδραση του t-PA στα σπερματικά κύτταρα, στα ωάρια, στην αλληλεπίδραση αυτών ή στην πρόωμη ανάπτυξη των εμβρύων. Τόσο οι γαμέτες, οι οποίοι εκτέθηκαν άμεσα στη δράση του t-PA, όσο και τα έμβρυα, τα οποία εκτέθηκαν έμμεσα, υποδεικνύουν την ανάγκη διενέργειας περισσότερων και ιδιαίτερα στοχευμένων πειραματισμών με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου του t-PA στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Όπως ήδη αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1.2.4), με τη βοήθεια τεχνικών ανοσοφθορισμού, το σήμα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου εντοπίστηκε στη διαφανή ζώνη και περιφερειακά του ωοπλάσματος στα ώριμα ωάρια των βοοειδών, του οποίου η ένταση μειώθηκε σημαντικά (συγκεκριμένα εξαφανίστηκε για τον u-PA) μετά το τέλος της γονιμοποίησης (Mondejar και συν., 2012). Βέβαια, είναι γνωστό ότι τόσο οι ενεργοποιοί του πλασμινογόνου όσο και η πλασμίνη δρουν εξωκυτταρικά και ο εντοπισμός τους στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου πιθανόν να εξηγείται από προηγούμενη μελέτη του Rekkas και συν. (2002), στην οποία βρέθηκε αυξημένη δραστηριότητα του t-PA στα εκκριτικά κοκκία που απομονώθηκαν μετά την ωρίμανση των ωαρίων. Φυσικά, δεν αμφισβητείται η παρουσία και του u-PA κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, ωστόσο, η σταδιακή αύξηση τόσο της μεταγραφής του όσο και της δραστηριότητάς του από το στάδιο των 2 κυττάρων έως και το στάδιο της βλαστοκύστης στα βοοειδή (Zhang και συν., 1994), καθιστά το ένζυμο αυτό βασικό πρωτεολυτικό ενεργοποιό του πλασμινογόνου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων. Η προσθήκη εξωγενούς πλασμινογόνου (150 μg/ml) στην IVF μείωσε το ποσοστό εκείνων των σπερματοζωαρίων που προσδένονται και διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου, αυξάνοντας τη μονοσπερμία, γεγονός που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον κυρίως για τα έμβρυα των χοίρων, στα οποία το φαινόμενο της πολυσπερμίας είναι ιδιαίτερα συχνό (Mondejar και συν., 2012).

Από την ίδια επιστημονική ομάδα πρόσφατα προτάθηκε ένας μηχανισμός δράσης του συστήματος PAs / PL στη γονιμοποίηση, σύμφωνα με τον οποίο η παρουσία των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στην επιφάνεια των γαμετών ενεργοποιούν το διαθέσιμο πλασμινογόνο του περιβάλλοντος του ωαγωγού και η παραγόμενη πλασμίνη απομακρύνει/αφαιρεί τα επιπλέον σπερματοζωάρια που είναι προσκολλημένα στη διαφανή ζώνη (Grullon και συν., 2013). Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι η συμμετοχή των ενεργοποιών του πλασμινογόνου, με ενδεχομένως περισσότερο αυτού του ιστικού τύπου, είναι σημαντική για τη διαδικασία της γονιμοποίησης. Στην παρούσα μελέτη η προσθήκη του στο *in vitro* περιβάλλον της γονιμοποίησης όχι μόνο δεν ωφέλησε την δυναμική ανάπτυξης των εμβρύων, αλλά μάλλον τη δυσχέραινε. Όμως θα πρέπει να τονισθεί ότι το ένζυμο αυτό είναι παρόν κατά τη διάρκειά της *in vivo*, υποδηλώνοντας την τεράστια σημασία του περιβάλλοντος γονιμοποίησης και την αδυναμία εξομοίωσης των *in vivo* συνθηκών στο *in vitro* περιβάλλον. Σίγουρα, όμως, η μεμονωμένη προσθήκη του t-PA *in vitro*, στη δεδομένη δραστηριότητα, πρέπει μάλλον να αποφευχθεί. Ωστόσο, για τη διαλεύκανση του παραπάνω αποτελέσματος θα ήταν χρήσιμο να εφαρμοστούν περισσότερες μοριακές τεχνικές, ώστε να αποσαφηνιστεί εάν η παραπάνω τροποποίηση είναι απόρροια ενεργοποίησης αποπτωτικών διαδικασιών ή παρεμβαίνει στην κυτταρική διαίρεση των εμβρύων. Επίσης, η πιθανότητα επιρροής των αποτελεσμάτων από την παρουσία των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου στο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων αποτελεί ακόμα μια παράμετρο/πιθανή εκδοχή για περαιτέρω μελέτη.

Σύμφωνα με τη δεύτερη πειραματική διαδικασία, δεν επιβεβαιώθηκε η προαναφερθείσα θετική συμβολή του u-PA στο υπόστρωμα της καλλιέργειας (Papanikolaou και συν., 2008). Όπως ήδη συζητήθηκε παραπάνω (κεφάλαιο 4.2), στόχος μας δεν ήταν η επανάληψη του ακριβούς πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε σε παλαιότερη εργασία, καθώς στη διαρκώς αναπτυσσόμενη τεχνολογία της IVP, τα συστατικά και οι συνθήκες της καλλιέργειας των εμβρύων σταδιακά επανεξετάζονται, με αποτέλεσμα πολλές από τις συνθήκες να εγκαταλείπονται, να θεωρούνται παρωχημένες και να εισάγονται νέες προοπτικές καλλιέργειας. Είναι γεγονός, στοχεύοντας στο βέλτιστο περιβάλλον καλλιέργειας των εμβρύων, ότι η χρήση του υποστρώματος καθορισμένης χημικής σύστασης βοηθά στη βαθύτερη κατανόηση του μεταβολισμού των εμβρύων, αλλά και των απαιτήσεών τους σε ενεργειακά υποστρώματα και άλλα απαραίτητα στοιχεία. Πολλά από τα

καλλιεργητικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην IVC είναι ημι-καθορισμένης χημικής σύστασης γιατί εμπεριέχουν μια πηγή πρωτεϊνών, όπως είναι η BSA. Η συνεισφορά των πρωτεϊνών, ή ακόμα και των αμινοξέων, στην πρόωμη ανάπτυξη των εμβρύων βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Όπως προτάθηκε από τους Flood και Shirley (1991), μια πιθανή λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως η BSA, είναι ο σχηματισμός συμπλόκων με διάφορους εμβρυοτοξικούς παράγοντες, προστατεύοντας τα έμβρυα από τις αρνητικές επιδράσεις των τελευταίων, οι οποίοι εμπεριέχονται στο θρεπτικό υπόστρωμα. Ωστόσο, πολλές φορές δημιουργείται η ανάγκη υποστήριξης της καλλιέργειας των εμβρύων με την προσθήκη ορού, όπως συνέβη και στη δική μας περίπτωση. Από τις πρώτες πειραματικές επαναλήψεις του 2.α πειράματος έγινε αντιληπτό ότι στα απογυμνωμένα έμβρυα, η προσθήκη του u-PA στο υπόστρωμα της καλλιέργειας δεν επηρέαζε τα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων. Η επιλογή του υποστρώματος ημι-καθορισμένης σύστασης μας έδωσε τη δυνατότητα να αποκλείσουμε οποιαδήποτε εξωγενή επίδραση άλλων μελών του συστήματος, αλλά και παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το φαινοτυπικό αποτέλεσμα της ανάπτυξης των εμβρύων. Βέβαια, από την ανάλυση των υποστρωμάτων, μετά την επτάμερη καλλιέργεια των εμβρύων για τον προσδιορισμό της PAA και PAI, επιβεβαιώνεται ο αυστηρά ρυθμισμένος έλεγχος της δραστηριότητας των μελών του συστήματος PAs / PL προκειμένου να αποφευχθεί μια γενικευμένη πρωτεόλυση στο πολύ ευαίσθητο περιβάλλον της ανάπτυξης των εμβρύων, μέσω της απελευθέρωσης αδρανοποιών του συστήματος για την αναστολή της αυξημένης δραστηριότητας που προκλήθηκε. Παρόλα αυτά, δεν είναι εφικτό να αποσαφηνιστεί, βάσει των πειραμάτων που διεξήχθησαν εδώ, εάν η παραγωγή των αδρανοποιών του συστήματος πραγματοποιήθηκε από τα ίδια τα έμβρυα, ως μια μορφή απάντησής τους στην αύξηση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου στο καλλιεργητικό τους περιβάλλον. Τούτο διότι τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία αποτελούν μια σημαντική πηγή παραγωγής της δραστηριότητάς τους (Liu, 2004), είχαν αφαιρεθεί κατά το πείραμα αυτό. Πολύ ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη της έκφρασης του PAI-1 στα παραγόμενα έμβρυα, καθώς έχει βρεθεί ότι αποτελεί σημαντικό μάρτυρα της κυτταρικής γήρανσης μέσω της εμπλοκής του στο μονοπάτι ελέγχου του κυτταρικού κύκλου p53 (Kortlever και συν., 2006).

Στο δεύτερο τμήμα της 2^{ης} πειραματικής φάσης (πείραμα 2.β), όπως ήδη αναφέρθηκε ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο συγκαλλιέργειας των εμβρύων βοοειδών, παρουσία μονοστιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, η οποία προετοιμάστηκε μία

ημέρα πριν από την έναρξη της καλλιέργειας. Πρόκειται για ετερόλογα κύτταρα που προήλθαν από καλής ποιότητας COCs του ίδιου πειράματος και χρησιμοποιήθηκαν μόνο γι' αυτό το σκοπό. Η έκφραση του υποδοχέα του u-PA *PLAUR* στα κύτταρα αυτά εντοπίστηκε με τη μέθοδο της *real-time PCR*, ωστόσο η ταυτοποίηση μιας ενεργούς μορφής της πρωτεΐνης αυτής, με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων αποτελεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον θέμα μελέτης, καθώς δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα *in vitro*.

Αν και η προσθήκη των δύο ενεργοποιών του πλασμινογόνου δεν επέφερε κάποιο ευνοϊκό αποτέλεσμα στην *in vitro* παραγωγή των εμβρύων βοοειδών, αλλά το αντίθετο για την περίπτωση του 1^{ου} πειράματος, είναι ήδη γνωστό πως η αυξημένη δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου *in vivo* στο γεννητικό σύστημα των θηλαστικών συνδέεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ενδομητρίτιδα στις αγελάδες (Moraitis και συν., 2004), η ενδομητρίωση στη γυναίκα (Bruse και συν., 1998), η αζωοσπερμία στον άνδρα (Maier και συν., 1991) και γενικότερα σε καταστάσεις υπογονιμότητας που μπορεί να προέρχονται και από τα δύο φύλα. Επίσης, βρέθηκε ότι στον άνθρωπο, τα αυξημένα πρωτεϊνικά και μεταγραφικά επίπεδα του PAI-1 συσχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας (Morgan και συν., 2013), με πολλαπλές επιπλοκές για την μητέρα και το έμβρυο (εγκεφαλική αιμορραγία, ηπατικές και νεφρικές βλάβες, πνευμονικό οίδημα, πρόωρος τοκετός, ενδομήτριος εμβρυϊκός θάνατος, πρόωρη αποκόλληση πλακούντα). Στις περισσότερες από τις παραπάνω περιπτώσεις υπογονιμότητας, η αδυναμία γονιμοποίησης ή/και ο πρόωρος εμβρυϊκός θάνατος αποτελούν το αίτιο-αποτέλεσμα της παθογένεσης. Όπως φάνηκε, η αύξηση των επιπέδων της PAA, η οποία οφείλεται στην προσθήκη της δραστηριότητας του t-PA στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης επηρέασε αρνητικά τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων ημέρας 7 και 8, και από την άλλη η αυξημένη PAA στο υπόστρωμα της καλλιέργειας των εμβρύων μετά από την τροποποίηση με u-PA δεν επηρέασε την αναπτυξιακή δυναμική των εμβρύων. Ωστόσο, τα έμβρυα προεμφυτευτικού σταδίου παρουσιάζουν μια εξαιρετική προσαρμοστικότητα και ανθεκτικότητα στις τροποποιήσεις του καλλιεργητικού περιβάλλοντος, που τα καθιστούν ικανά να συνεχίζουν την εξέλιξή τους μετά από τη μεταφορά και από αυτά να προκύπτουν υγιείς απόγονοι. Γι' αυτό, ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα που προέκυψαν *in vitro*, η *in vivo* μεταφορά εκείνων των τροποποιημένων εμβρύων που καταφέρνουν τελικώς να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης και η μελέτη του ποσοστού γέννησης υγιών μοσχαριών θα βοηθήσει στην κατανόηση της δράσης των ενεργοποιών του

πλασμινογόνου κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της IVP. Βέβαια, πρόκειται για μια χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία, της οποίας η εφαρμογή συνοδεύεται από πολλές αδυναμίες, καθώς είναι γνωστό ότι τα πρώιμα έμβρυα των μηρυκαστικών παρουσιάζουν μια ευαισθησία στο *in vitro* καλλιεργητικό περιβάλλον, τα οποία μετά τη μεταφορά τους οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου του μεγάλου απογόνου (large offspring syndrome) (Wrenzycki και συν., 2004· Greve και Callesen, 2005· Badr και συν., 2007).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, λοιπόν, σύμφωνα με τις συνθήκες που ακολουθήθηκαν στο εργαστήριό μας, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δείχνουν ότι:

- η προσθήκη του t-PA, σε τελική δραστηριότητα 500 IU/ml, στο υπόστρωμα της γονιμοποίησης επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς μειώνει τα ποσοστά αυλάκωσης και σχηματισμού των βλαστοκύστεων.
- η παραπάνω τροποποίηση ενδεχομένως επηρεάζει αρνητικά και την ποιότητα των παραγόμενων πρώιμων εμβρύων, καθώς σε αυτά επάγονται φαινόμενα, όπως η απόπτωση, η ενεργοποίηση της μεταγραφής ή διακοπής του κυτταρικού κύκλου.
- η παραπάνω τροποποίηση προκαλεί σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) -χωρίς να μεταβάλλεται η δραστηριότητα των αδρανοποιών τους (PAI)- η οποία μειώνεται όταν στο υπόστρωμα της IVF προστίθεται και ο αναστολέας ε-ACA, παραμένοντας ωστόσο σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της ομάδας των μαρτύρων.
- σε ημι-καθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με την προσθήκη εξωγενούς u-PA σε τελική δραστηριότητα 5 IU/ml, δεν επηρεάζει τα ποσοστά παραγωγής ή/ και την ποιότητα των εμβρύων βοοειδών.
- η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με u-PA δεν μετέβαλλε τα ποσοστά της IVP και την ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων, όταν στο

υπόστρωμα της IVC συμπεριλαμβάνεται μονοστιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ορός εμβρύου μόσχου.

- τα αποτελέσματα της PAA/PAI ανάλυσης επιβεβαιώνουν τη σημαντικότητα του καλλιεργητικού περιβάλλοντος των εμβρύων να διατηρήσουν την ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών τους, καθώς η αύξηση της συνολικής δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) μετά την προσθήκη του u-PA προκαλεί την αύξηση της PAI στο υπόστρωμα καλλιέργειας.
- Η αποκωδικοποίηση του ρόλου του συστήματος PAs / PL στη γονιμοποίηση – ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου απαιτεί περαιτέρω στοχευμένους πειραματισμούς με σκοπό τη διαλεύκανση του επακριβούς ρόλου των μελών του συστήματος και των μηχανισμών δράσης τους σε κάθε στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Το PBS χρησιμοποιήθηκε, κυρίως, για την έκπλυση ωαρίων, ζυγωτών και εμβρύων σε όλα τα στάδια της IVP.

Η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος γινόταν ως εξής:

<i>1^ο Διάλυμα</i>		<i>2^ο Διάλυμα</i>	
Υλικό	g/500 ml	Υλικό	g/500 ml
NaCl	4.000	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.070
KCl	0.100	MgCl ₂ *6H ₂ O	0.100
KH ₂ PO ₄	0.100		
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0.715		

Ακολούθησε πολύ καλή διάλυση των παραπάνω σε 250 ml (1^ο Διάλυμα) και 50 ml (2^ο Διάλυμα) για την αποφυγή κατακρήμνισης. Στη συνέχεια, τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν και προστέθηκαν τα εξής:

<i>1^ο + 2^ο Διάλυμα</i>	
Υλικό	g/500ml
D- γλυκόζη	0.500
Πυροσταφυλικό νάτριο (πυρουβικό)	0.018
Γενταμυκίνη	2.5 ml
Προσθήκη νερού έως Vτελ=500ml	
BSA (τέλος)	0.25

Μετά από καλή ανάδευση όλων των χημικών, προέκυπτε το τελικό διάλυμα PBS, το pH του οποίου κυμαινόταν από 7,2 - 7,4 και η οσμωτική πίεση ήταν περίπου 280 mOsm.

Tyrode's Medium ή TALP

Η παρασκευή του διαλύματος Tyrode's περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Bavister και Yanagimachi (1977) και τροποποιήθηκε αργότερα από τον Parrish και συν., 1988.

<i>Βασικό διάλυμα 1 - Διάλυση σε 150 ml H₂O</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση (mM)	g/250 ml
NaCl	100	1.666
KCl	3.1	0.060
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0.3	0.010

<i>Βασικό διάλυμα 2 - Διάλυση σε 100 ml H₂O</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση (mM)	g/250 ml
CaCl ₂ *2H ₂ O	2.0	0.075
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.4	0.025

Μετά από πολύ καλή ανάδευση των δύο βασικών διαλυμάτων, γινόταν προσθήκη 0,0025 g ερυθρού της φαινόλης (χρωστική ένδειξης pH). Η ωσμωτική πίεση του διαλύματος υπολογιζόταν στα 230 mOsm. Το διάλυμα διατηρούταν στους 4 °C και μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για 1 μήνα.

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

Για την προετοιμασία των διαλυμάτων Sp-TALP και Fert-TALP, αρχικά ένα κοινό διάλυμα ετοιμαζόταν και για τα δύο υποστρώματα, χρησιμοποιώντας 20 ml Tyrode's medium, ως βασικό διάλυτη. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες.

<i>Κοινό διάλυμα για Sp-TALP και Fert-TALP</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Διτανθρακικό νάτριο (NaHCO ₃)	25.29 mM	0,043 g
Πυροσταφυλικό νάτριο	1 mM	0,0022 g
Σιρόπι του DL- γαλακτικού νατρίου (60% w/w)	36 mM	61,3 μl
Γενταμυκίνη (10 mg/ml σε ddH ₂ O)		100 μl
Διάλυση όλων σε Tyrode's media		20 ml

Το παραπάνω διάλυμα χωριζόταν σε δύο αποστειρωμένα δοχεία (10 ml το καθένα) για να ετοιμαστούν τα τελικά υποστρώματα Sp-TALP και Fert-TALP:

<i>Swim up medium (10ml)</i>		<i>IVF medium(10ml)</i>	
Υλικό	Ποσότητα	Υλικό	Ποσότητα
Βόεια αλβουμίνη ορού (>98% ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης)	0,060 g	Βόεια αλβουμίνη ορού (>98% ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης)	0,060 g
Hepes	0.024 g	Διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων – MEMaa (100x)*	
		Διάλυμα αμινοξέων- BMEaa (50x)*	200 μl
		Ηπαρίνη (2 mg/ml)	50 μl
		Υποταυρίνη (100 mg/ml)	100 μl

*Τα διαλύματα MEM και BME ήταν έτοιμα προς χρήση, κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργεια και δεν περιείχαν L-γλουταμίνη. Το BME διάλυμα περιέχει τα εξής αμινοξέα: L-αργινίνη, L-κυστεΐνη, L-ιστιδίνη, L-ισολευκίνη, L-λευκίνη, L-λυσίνη, L-Μεθειονίνη, L-Φαινυλαλανίνη, L-θρεονίνη, L-τρυπτοφάνη, L-τυροσίνη και L-βαλίνη. Επίσης, στο διάλυμα αυτό περιλαμβάνονται και κάποιες βιταμίνες όπως η D-βιοτίνη, η μυο-ινοσιτόλη, η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη και άλλες που αναγράφονται στο ειδικό φυλλάδιο προσδιορισμού του προϊόντος. Από την άλλη, το διάλυμα MEM εκτός από βιταμίνες (όπως παραπάνω -εκτός από D-βιοτίνη) και κάποια ανόργανα άλατα, φέρει τα εξής αμινοξέα: L-ασπαργίνη, L-αλανίνη, L-ασπαρτικό, L-γλουταμικό, γλυκίνη, L-προλίνη και L-σερίνη.

Η ωσμωτική πίεση των παραπάνω διαλυμάτων ρυθμιζόταν στα 290-300 mOsm και το pH στο 7,35-7,4. Η παρασκευή τους γινόταν μία μέρα πριν από την *in vitro* γονιμοποίηση, τοποθετούνταν στον επωαστικό κλίβανο CO₂ για εξισορρόπηση του pH και διατήρηση της θερμοκρασίας του στους 39 °C, πριν από τη χρήση του.

Συνθετικό υπόστρωμα καλλιέργειας εμβρύων ωαγωγού (Synthetic oviductal fluid, SOF)

Για την προετοιμασία του SOF προηγείται η παρασκευή τεσσάρων βασικών διαλυμάτων:

<i>Βασικό Διάλυμα Α (Διάλυση σε 49,7 ml H₂O)</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
NaCl	107,63 mM	3,145 g
KCl	7,16 mM	0,267 g
KH ₂ PO ₄	1,19 mM	0,081 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,51 mM	0,091 g
DL-γαλακτικό νάτριο (60% w/w)	5,35 mM	0,300 ml
<i>Βασικό Διάλυμα Β (Διάλυση σε 50 ml H₂O)</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
NaHCO ₃	25,00 mM	1,050 g
Ερυθρό της φαινόλης	10,00 µg/ml	0,005 g
<i>Βασικό Διάλυμα Γ (Διάλυση σε 10 ml H₂O)</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Πυροσταφυλικό νάτριο	7,27 mM	0,080 g
<i>Βασικό Διάλυμα Δ (Διάλυση σε 50 ml H₂O)</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,78 mM	1,310 g

Η συντήρηση των βασικών διαλυμάτων (Α, Β και Δ) μπορεί να διαρκέσει στους 4 °C έως και 1 μήνα, ενώ η αντίστοιχη του διαλύματος Γ μόνο 1 εβδομάδα.

<i>Holm-Synthetic oviductal fluid ή Holm-SOF (Holm και συν., 1999)</i>		
Υλικό	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
H ₂ O		78 ml
Κιτρικό νάτριο	0,34 mM	0,010 g
Μυο-ινοσιτόλη	2,77 mM	0,050 g
Βασικό διάλυμα Α		10 ml
Βασικό διάλυμα Γ		1 ml
Βασικό διάλυμα Δ		1 ml
Διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων –MEMaa	5,0 µl/ml	1 ml
Διάλυμα αμινοξέων- BMEaa	45,00 µl/ml	3 ml
L-γλουταμίνη	0,20 mM	100 µl
Γενταμικίνη	50,0 µg/ml	500 µl
Βασικό διάλυμα Β		10 ml

Μετά τον έλεγχο της ωσμωτικής πίεσεως του τελικού διαλύματος (275-285 mOsm), ανάλογα με το πείραμα (1-2.β ή 2.α), ακολουθούσε η προσθήκη 3 mg/ml ή 4 mg/ml βόειας αλβουμίνης (BSA, A9647). Η διατήρησή του γινόταν στους 4 °C έως και 2 εβδομάδες. Στις περιπτώσεις που επιλέγεται η ενσωμάτωση 5% ορού εμβρύου μόσχου (FCS) στο υπόστρωμα καλλιέργειας (*serum-containing culture media*), αυτός προστίθεντο στο διάλυμα Holm-Sof, το οποίο και τοποθετούταν στον κλίβανο CO₂ για τη σταθεροποίηση του pH και της θερμοκρασίας του.

Στο 2.α πείραμα, η παρασκευή του υποστρώματος καλλιέργειας ημι-καθορισμένης σύστασης (*semi-defined culture media*) διέφερε στα εξής σημεία: Αμέσως μετά την παρασκευή του Holm-SOF υποστρώματος, σε αυτό προστίθεντο 4 mg/ml BSA (όπως ήδη αναφέρεται παραπάνω) και αποστείρωση του διαλύματος μέσω διέλευσής του σε ηθμό (0,22 µm). Στη συνέχεια, στο παραπάνω διάλυμα γινόταν προσθήκη: 5 µg/ml ινσουλίνης, 5 µg/ml τρασφερίνης και 5 ng/ml σεληνίου (George και συν., 2008). Το υπόστρωμα καλλιέργειας τοποθετούταν στον κλίβανο CO₂ (τουλάχιστον για 18 ώρες) για την εξισορρόπηση του pH και της θερμοκρασίας του.

Αδρανοποίηση του ορού εμβρύου μόσχου

Η χρήση του FCS απαιτεί προηγούμενη αδρανοποίηση· η διαδικασία περιλάμβανε τη σταδιακή απόψυξη του αρχικού διαλύματος FCS (2-6 °C για περίπου 24 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου) και αμέσως μετά, θέρμανση στους 56 °C επί 30 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η απενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν τη λύση των κυττάρων, πιθανών αναστολέων της κυτταρικής ανάπτυξης και μυκοπλασμάτων που ενδεχομένως να εμπεριέχονται μέσα στον ορό. Τέλος, το διάλυμα κατανεμήθηκε σε φιαλίδια τύπου eppendorf (1 ml διαλύματος), διατηρήθηκε στους -20 °C και η ίδια παρτίδα του FCS χρησιμοποιήθηκε στο σύνολο των πειραματισμών (1 και 2.β) διασφαλίζοντας την ομοιομορφία των τελευταίων.

5 . Β Ι Β Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α

- Σμοκοβίτης Α (2014): Φυσιολογία, Εκδόσεις Δέσποινα Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 8^η εκδ..
- 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 (Suppl 1), 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.
- Alessi MC, Juhan-Vague I, Kooistra T, Declerck PJ, Collen D (1988): Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. Thromb. Haemost. 60, 491-494.
- Alkjaersig N, Fletcher AP, Sherry S (1959): xi-Aminocaproic acid: an inhibitor of plasminogen activation. J. Biol. Chem. 234, 832-837.
- Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN (1990): Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. Mol. Cell Endocrinol. 68, 1-19.
- 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.
- Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, Blasi F (1987): The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. J. Biol. Chem. 262, 4437-4440.
- Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001): Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. Mol. Reprod. Dev. 60, 370-376.
- Badr H, Bongioni G, Abdoon AS, Kandil O, Puglisi R (2007): Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. Zygote 15, 355-367.

- Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD (1980): Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* 21, 37-45.
- Bakhit C, Lewis D, Billings R, Malfroy B (1987): Cellular catabolism of recombinant tissue-type plasminogen activator. Identification and characterization of a novel high affinity uptake system on rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 8716-8720.
- Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, Choe SY, Rho GJ (2007): Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 68, 265-275.
- Barnett DK, Bavister BD (1996): Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? *Hum. Reprod.* 11, 177-183.
- 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.
- Beck F, Erler T, Russell A, James R (1995): Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* 204, 219-227.
- Bédard 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.
- Berg DA, Menino AR Jr (1992): Bovine embryos produce a urokinase-type plasminogen activator. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 14-19.
- Berg MJ, Tymoczko JL, Stryer L (2004): Βιοχημεία τόμος Ι (Μετάφραση), Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο-Κρήτης.

- Berge A, Sjöbring U (1993): PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 268, 25417-25424.
- Beydola T, Sharma RK, Lee W, Agarwal A (2013): Sperm preparation and selection techniques. In: *Male Infertility Practice*. Editors. Botros Rizk, Nabil Aziz and Ashok Agarwal, New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 244-251.
- Bicsak TA, Cajander SB, Peng XR, Ny T, LaPolt 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.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993): Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197-250.
- Blasi F, Vassalli JD, Danø K (1987): Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104, 801-804.
- Blasi F, Carmeliet P (2002): uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 932-943.
- Blombäck B (1996): Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.* 83, 1-75.
- Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre R (2007): Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod. Biomed. Online* 15, 296-302.
- Broussard JR, Thibodeaux JK, Myers MW, Roussel JD, Prough SG, Blackwell J, Godke RA (1994): Frozen-thawed cumulus-granulosa cells support bovine embryo development during coculture. *Fertil. Steril.* 62, 176-180.
- 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.

- Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL (1995): Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev.* 9, 794-807.
- 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.
- Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- 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.
- Cao M, Nicola E, Portela VM, Price CA (2006): Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. *Matrix Biol.* 25, 342-354.
- 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.
- Casslen B, Nilsson B (1984): Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150, 877-881.
- Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Guillomot M (1997): Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol. Reprod.* 57, 1032-1040.
- Cohen RL, Xi XP, Crowley CW, Lucas BK, Levinson AD, Shuman MA (1991): Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood* 78, 479-487.
- 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.
- Collen D (1980): On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb. Haemost.* 43, 77-89.
- Collen D (1999): The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb. Haemost.* 82, 259-270.
- Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA (2008): Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 132-142.
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Danø K, Andreassen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985): Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44, 139-266.
- de Lamirande E, Gagnon C (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 21-25.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997): Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 175-194.
- de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA (1989): Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24, 197-204.
- Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, Anglés-Cano E (2010): Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood* 115, 2048-2056.
- Del Rosso M, Margheri F, Serrati S, Chilla A, Laurenzana A, Fibbi G (2011): The urokinase receptor system, a key regulator at the intersection between inflammation, immunity, and coagulation. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1924-1943.

- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A (2005): The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal. Biochem.* *344*, 141-143.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL (2002): Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* *57*, 5-20.
- Dow MP, Bakke LJ, Cassar CA, Peters MW, Pursley JR, Smith GW (2002): 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.
- Dubber AH, McNicol GP, Uttley D, Douglas AS (1968): *In vitro* and *in vivo* studies with trasylol, an anticoagulant and a fibrinolytic inhibitor. *Br. J. Haematol.* *14*, 31-49.
- Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P (2008): Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* *135*, 141-150.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 383-424.
- Ebisch IM, Thomas CM, Wetzels AM, Willemsen WN, Sweep FC, Steegers-Theunissen RP (2008): Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil. Steril.* *90*, 2340-2350.
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D (2006): Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genomics* *28*, 84-96.
- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* *7*, 663-698.

- Ellis V, Wun TC, Behrendt N, Ronne E, Danø K (1990): Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**, 9904-9908.
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* **54**, 659-673.
- España F, Gilabert J, Estellés A, Romeu A, Aznar J, Cabo A (1991): Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thromb. Res.* **64**, 309-320.
- 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.
- Eyestone WH, First NL (1991): Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* **35**, 613-624.
- Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferré LB (2003): Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* **59**, 125-138.
- Fear JM, Hansen PJ (2011): Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biol. Reprod.* **84**, 43-51.
- Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R (2012): MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* **349**, 881-895.
- Flood LP, Shirley B (1991): Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.* **30**, 226-231.
- Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KH, Webb R (2005): Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online* **10**, 497-502.

- Fukao H, Ueshima S, Takaishi T, Okada K, Matsuo O (1997): Enhancement of tissue-type plasminogen activator (t-PA) activity by purified t-PA receptor expressed in human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1356, 111-120.
- 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.
- Galaviz-Hernandez C, Stagg C, de Ridder G, Tanaka TS, Ko MS, Schlessinger D, Nagaraja R (2003): Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene* 309, 81-89.
- Galli C, Lazzari G (1996): Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 371-379.
- Galway AB, Oikawa M, Ny T, Hsueh AJ (1989): Epidermal growth factor stimulates tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells: mediation by pathways independent of protein kinases-A and -C. *Endocrinology* 125, 126-135.
- Gardner DK, Lane M, Batt P (1993): Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 313-319.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I (2008): Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology* 69, 612-623.
- Gibb CA, Poronnik P, Day ML, Cook DI (1997): Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H(+)-lactate cotransport and Na⁺/H⁺ exchange. *Am. J. Physiol.* 273 (2 pt 1), C404-419.
- Gjorret JO, Fabian D, Avery B, Maddox-Hyttel P (2007): Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine *in vitro* produced pre-implantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 961-971.

- Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ (2005): Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev. Biol.* 5, 27.
- Gordon I (1994): Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, Oxon U.K., 1st ed..
- Goovaerts IG, Leroy JL, Van Soom A, De Clercq JB, Andries S, Bols PE (2009): Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology* 71, 729-738.
- Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E (2014): Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim. Reprod. Sci.* 149, 46-58.
- Greve T, Callesen H (2005): Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 24, 405-412.
- Griffin JD, Ellman L (1978): Epsilon-aminocaproic acid (EACA). *Semin. Thromb. Hemost.* 5, 27-40.
- Grullón LA, Gadea J, Mondéjar I, Matas C, Romar R, Coy P (2013): How is plasminogen/plasmin system contributing to regulate sperm entry into the oocyte? *Reprod. Sci.* 20, 1075-1082.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175-189.
- Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B, De La Fuente J (2001): Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 13, 361-365.
- Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2004): Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 441-448.

- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R (2000): Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62, 1322-1328.
- Hägglund 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, Harpel PC, Jaffe EA, Nachman RL (1986): Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261, 11656-11662.
- 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.
- Hall SW, Humphries JE, Gonias SL (1991): Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by alpha 2-antiplasmin and alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 266, 12329-12336.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T (2001): Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11318-11323.
- Hasan S, Hosseini G, Princivale 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.
- Hermans JM, Jones R, Stone SR (1994): Rapid inhibition of the sperm protease acrosin by protein C inhibitor. *Biochemistry* 33, 5440-5444.
- Herschman HR (1996): Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 125-140.
- Hikisz P, Kiliańska ZM (2012): PUMA, a critical mediator of cell death-one decade

- on from its discovery. *Cell Mol. Biol. Lett.* 17, 646-669.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H (1999): High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.
- Hsueh AJ, Liu YX, Cajander SB, Ny T (1988): Molecular mechanisms in the hormonal regulation of plasminogen activator activity in ovarian granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 267, 227-257.
- 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.
- Isseroff RR, Rifkin DB (1983): Plasminogen is present in the basal layer of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 80, 297-299.
- Juhan-Vague I, Moerman B, De Cock F, Aillaud MF, Collen D (1984): Plasma levels of a specific inhibitor of tissue-type plasminogen activator (and urokinase) in normal and pathological conditions. *Thromb. Res.* 33, 523-530.
- Juriscova A, Acton BM (2004): Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction* 128, 281-191.
- Karakji EG, Tsang BK (1995): Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol. Reprod.* 53, 1302-1310.
- Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS (2006): Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev.* 20, 225-235.
- Kepkova KV, Vodicka P, Toralova T, Lopatarova M, Cech S, Dolezel R, Havlicek V, Besenfelder U, Kuzmany A, Sirard MA, Laurincik J, Kanka J (2011): Transcriptomic analysis of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos revealed a

- developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology* 75, 1582-1595.
- Khamsi F, Armstrong DT, Zhang X (1996): Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 273-276.
- Khurana NK, Niemann H (2000): Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 62, 847-856.
- Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S, Baba T (2008): Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 677-682.
- Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HH, Schmidt SE, Reichenbach HD, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E (2006): Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol. Reprod.* 74, 253-264.
- Klein D (2002): Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* 8, 257-260.
- Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG (1993): Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 891-897.
- Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R (2006): Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.* 8, 877-884.
- Krania F, Dovolou E, Rekkas CA, Theodosiadou E, Pappas I, Amiridis GS (2015): Effects of Addition of Tissue-Type Plasminogen Activator in *In Vitro* Fertilization Medium on Bovine Embryo Development and Quality. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 112-120.
- Krätzschmar J, Haendler B, Kojima S, Rifkin DB, Schleuning WD (1993): Bovine urokinase-type plasminogen activator and its receptor: cloning and induction by retinoic acid. *Gene* 125, 177-183.

- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95-125.
- Kwaan HC, McMahon B (2009): The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res.* 148, 43-66.
- Lechniak D (2002): Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. *Reprod. Biol.* 2, 229-241.
- Lee SL, Wei YH (1994): The involvement of extracellular proteinases and proteinase inhibitors in mammalian fertilization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19 (Pt 1), 31-40.
- Leese HJ (1995): Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum. Reprod. Update* 1, 63-72.
- Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S (2007): A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 299-304.
- Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W (1999): Development of *in-vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Hum. Reprod.* 14, 458-464.
- Liu K, Liu YX, Du Q, Zhou HM, Lin X, Hu ZY, Zhang GY, Zhang GH (1996): Preliminary studies on the role of plasminogen activator in seminal plasma of human and rhesus monkey. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 99-104.
- Liu X, Fernandes R, Gertsenstein M, Perumalsamy A, Lai I, Chi M, Moley KH, Greenblatt E, Jurisica I, Casper RF, Sun Y, Jurisicova A (2011): Automated microinjection of recombinant BCL-X into mouse zygotes enhances embryo development. *PLOS One* 6, e21687.
- 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, 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 (2004): Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front. Biosci.* 9, 3356-3373.
- Liu YX (2007): Involvement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 29-40.
- Liu Z, Foote RH (1995): Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.* 53, 786-790.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP (1999): Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159-167.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP (2003 α): Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 259-267.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP (2003 β): Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 69, 1424-1431.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC (2006): Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65, 137-152.
- Lonergan P, Fair T (2008): *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17-22.
- Longstaff C, Gaffney PJ (1991): Serpin-serine protease binding kinetics: alpha 2-antiplasmin as a model inhibitor. *Biochemistry* 30, 979-986.

- Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, Fortier MA (2003): An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J. Biol. Chem.* 278, 11205-11212.
- Maier U, Kirchheimer JC, Hienert G, Christ G, Binder BR (1991): Fibrinolytic parameters in spermatozoas and seminal plasma. *J. Urol.* 146, 906-908.
- Malone JH, Oliver B (2011): Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 9, 34.
- McDonnell AC, Murdoch WJ (2001): High-dose progesterone inhibition of urokinase secretion and invasive activity by SKOV-3 ovarian carcinoma cells: evidence for a receptor-independent nongenomic effect on the plasma membrane. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 185-191.
- Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, Garcia SM (2004): Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 13-20.
- Memili E, First NL (1999): Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol. Reprod.* 61, 1198-1207.
- Memili E, First NL (2000): Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8, 87-96.
- Ménézo Y, Khatchadourian C (1990): [Implication of glucose 6 phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) activity in blocking segmentation of the mouse ovum at the 2 cell stage *in vitro*]. *C. R. Acad. Sci. III* 310, 297-301.
- Ménézo Y, Veiga A (1997): Cryopreservation of blastocyst. *In vitro* fertilization and assisted reproduction. Xth World Congress on *in vitro* fertilization and assisted reproduction, 49-53.
- Ménézo YJ, Herubel F (2002): Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod. Biomed. Online* 4, 170-175.

- Miles LA, Plow EF (1987): Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb. Haemost.* 58, 936-942.
- 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.
- Mondéjar I, Grullón LA, García-Vázquez FA, Romar R, Coy P (2012): Fertilization outcome could be regulated by binding of oviductal plasminogen to oocytes and by releasing of plasminogen activators during interplay between gametes. *Fertil. Steril.* 97, 453-461.
- Monea S, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P (2002): Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J. Cell Physiol.* 192, 160-170.
- Montag M, Toth B, Strowitzki T (2013): New approaches to embryo selection. *Reprod. Biomed. Online* 27, 539-546.
- Moraitis S, Taitzoglou IA, Tsantarliotou MP, Boscós CM, Kaldrimidou E, Saratsis P (2004): Involvement of the plasminogen activation system in cow endometritis. *Theriogenology* 61, 337-349.
- Morgan JA, Bombell S, McGuire W (2013): Association of plasminogen activator inhibitor-type 1 (-675 4G/5G) polymorphism with pre-eclampsia: systematic review. *PLoS One* 8, e56907.
- 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.
- Myöhänen H, Vaheri A (2004): Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 2840-2858.
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM (1992): Extracellular proteolytic cleavage

- by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* *11*, 4825-4833.
- Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS (2002): Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos *in vitro*: premises and promises. *Reprod. Domest. Anim.* *37*, 65-74.
- Nielsen LS, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Skriver L, Danø K (1986): Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass. *FEBS Lett.* *196*, 269-273.
- Niemann H, Wrenzycki C (2000): Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* *53*, 21-34.
- Ny T, Elgh F, Lund B (1984): The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 5355-5359.
- 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.
- Okumura Y, Sato H, Seiki M, Kido H (1997): Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Lett.* *402*, 181-184.
- Orsi NM, Reischl JB (2007): Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology* *67*, 441-458.
- Orsi NM, Tribe RM (2008): Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 462-469.
- 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.
- Pakrasi PL, Jain AK (2008): Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *79*, 27-33.
- Papanikolaou T, Amiridis GS, Vainas E, Samartzi F, Rekkas C (2004): The Activity of Follicular Fluid Plasminogen Activator/ Plasmin Proteolytic System is Affected by the Maturational Stage of the Bovine Follicle. *Proceedings of 8th Conference of ESDAR*, P68.
- Papanikolaou T, Amiridis GS, Dimitriadis I, Vainas E, Rekkas C (2008): Effect of plasmin, plasminogen activators and a plasmin inhibitor on bovine *in vitro* embryo production. *Reprod. Fertil. Dev.* *20*, 320-327.
- Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA (2006): Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* *86*, 839-847.
- 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.
- Park SY, Kim EY, Jeon K, Cui XS, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH (2007): Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* *74*, 582-590.
- 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.
- Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Danø K, Skriver L (1988): One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J. Biol. Chem.* 263, 11189-11195.
- Pfaffl MW (2006): Relative quantification. In: *Real-Time PCR*. Published by Taylor & Francis Group (Editor: T. Dorak), 63-82.
- Plow EF, Freaney DE, Plescia J, Miles LA (1986): The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell Biol.* 103, 2411-2420.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995): The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* 9, 939-945.
- Prentice CR (1980): Basis of antifibrinolytic therapy. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 14, 35-40.
- Quinn P, Margalit R (1996): Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13, 9-14.
- Ravn P, Berglund L, Petersen TE (1995): Cloning and characterization of the bovine plasminogen activators uPA and tPA. *Int. Dairy J.* 5, 605-617.
- Rekik W, Dufort I, Sirard MA (2011): Analysis of the gene expression pattern of bovine blastocysts at three stages of development. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 226-240.
- 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.
- Reuning U, Little SP, Dixon EP, Johnstone EM, Bang NU (1993): Molecular cloning of cDNA for the bovine urokinase-type plasminogen activator receptor. *Thromb. Res.* 72, 59-70.

- Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ (1992): Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* *4*, 547-557.
- Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P, Flaumenhaft R, Mignatti P (1990): Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ. Dev.* *32*, 313-318.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* *245*, 154-160.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A (2002 α): Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* *66*, 589-595.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002 β): 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.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* *68*, 236-243.
- Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-Adan A (2008): Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* *43 (Suppl 4)*, 44-50.
- Rodriguez KF, Farin CE (2004): Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology* *61*, 1499-1511.
- Roldán-Olarte M, García DC, Jiménez-Díaz M, Valdecantos PA, Miceli DC (2012): *In vivo* and *in vitro* expression of the plasminogen activators and urokinase type

- plasminogen activator receptor (u-PAR) in the pig oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* *136*, 90-99.
- Sakkas D, Uner F, Ménéz Y, Leppens G (1993): Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* *49*, 1288-1292.
- Saksela O (1985): Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* *823*, 35-65.
- Saksela O, Vihko KK (1986): Local synthesis of plasminogen by the seminiferous tubules of the testis. *FEBS Lett.* *204*, 193-197.
- Saksela O, Rifkin DB (1988): Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* *4*, 93-126.
- Saliba AE, Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2014): Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res.* *42*, 8845-8860.
- 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.
- Schaller J, Moser PW, Danneegger-Muller GA, Rosselet SJ, Kampfer U, Rickli EE (1985): Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* *149*, 267-278.
- Schneiderman J, Loskutoff DJ (1991): Plasminogen activator inhibitors. *Trends Cardiovasc. Med.* *1*, 99-102.
- Seiffert D, Wagner NN, Loskutoff DJ (1990): Serum-derived vitronectin influences the pericellular distribution of type 1 plasminogen activator inhibitor. *J. Cell Biol.* *111*, 1283-1291.
- Seli E, Robert C, Sirard MA (2010): OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 513-530.
- Sellens MH, Stein S, Sherman MI (1981): Protein and free amino acid content in

- preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions. *J. Reprod. Fertil.* *61*, 307-315.
- Shimada H, Mori T, Takada A, Takada Y, Noda Y, Takai I, Kohda H, Nishimura T (1981): Use of chromogenic substrate S-2251 for determination of plasminogen activator in rat ovaries. *Thromb. Haemost.* *46*, 507-510.
- 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.
- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH (2001): An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* *40*, 1117-1123.
- 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 (2010): Activation of the embryonic genome. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* *67*, 145-158.
- 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, Alexaki-Tzivanidou E (1988): 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.* *16*, 285-294.
- 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, Kokolis N, Taitzoglou I, Rekkas C (1992): Plasminogen activator: the identification of an additional proteinase at the outer acrosomal membrane of human and boar spermatozoa. *Int. J. Fertil.* *37*, 308-314.
- Snabes MC, Harper MJ (1984): Site of action of indomethacin on implantation in the

- rabbit. J. Reprod. Fertil. 71, 559-565.
- Sprengers ED, Kluft C (1987): Plasminogen activator inhibitors. Blood 69, 381-387.
- 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, Reich E, Sherman MI (1976): Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell 9, 231-240.
- Suzuki K (2008): The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. J. Thromb. Haemost. 6, 2017-2026.
- Taipale J, Koli K, Keski-Oja J (1992): Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. J. Biol. Chem. 267, 25378-25384.
- 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.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC (1998): IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res. 58, 5315-5320.
- Tapiovaara H, Stephens RW, Vaheri A (1993): Persistence of plasmin-mediated pro-urokinase activation on the surface of human monocytoid leukemia cells *in vitro*. Int. J. Cancer 53, 499-505.
- Teesalu T, Blasi F, Talarico D (1996): Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and alpha 2MR/LRP genes. Mech. Dev. 56, 103-116.

- Theodorou G, Pecorini C, Rebucci R, Saccone F, Lecchi C, Politis I, Baldi A (2011): Effect of growth factors and lactogenic hormones on expression of plasminogen activator-related genes and cell proliferation in a bovine mammary epithelial cell line. *J. Dairy Res.* 78, 365-372.
- Thomas WK, Seidel GE Jr (1993): Effects of cumulus cells on culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 71, 2506-2510.
- Thorsen S, Philips M, Selmer J, Lecander I, Astedt B (1988): Kinetics of inhibition of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator by plasminogen-activator inhibitor type 1 and type 2. *Eur. J. Biochem.* 175, 33-39.
- Travis J, Salvesen GS (1983): Human plasma proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 655-709.
- Tsafiriri 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.
- Vajta G (2000): Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 357-364.
- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J (2010): Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod. Biomed. Online* 20, 453-469.
- Van den Abbeel E, Van Steirteghem AC (1987): Cryopreservation of *in vitro* cultured mouse preimplantation embryos. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 45, 460-463.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J (2001): Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum. Reprod.* 16, 326-332.
- 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, Boerjan ML, Bols PE, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A

- (1997): Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biol. Reprod.* 57, 1041-1049.
- Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A (2003): Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online* 7, 664-670.
- Van Soom A, Wydooghe E, Heras S, Vandaele L (2011): Alternative models for the study of embryo-maternal cross-talk and signaling molecules from fertilisation to implantation. *Reprod. Fertil. Dev.* 23 , iii-v.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D (1991): The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88, 1067-1072.
- Verrall S, Seeds NW (1989): Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* 109, 265-271.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA (2004): Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol. Reprod.* 70, 1701-1709.
- Vigneault C, Gravel C, Vallee M, McGraw S, Sirard MA (2009): Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition. *Reproduction* 137, 245-257.
- Wassarman PM (1999): Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96, 175-183.
- Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC (2004): Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 583-592.
- Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA (1994): Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J.*

Biol. Chem. 269, 32380-32388.

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.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1999): Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 8-18.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H (2004): Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 593-603.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H (2005): Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 23-35.

Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H (2007): Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 68 (Suppl 1), S77-83.

Wulf RJ, Mertz ET (1969): Studies on plasminogen. 8. Species specificity of streptokinase. *Can. J. Biochem.* 47, 927-931.

Wydooghe E, Vandaele L, Beek J, Favoreel H, Heindryckx B, De Sutter P, Van Soom A (2011): Differential apoptotic staining of mammalian blastocysts based on double immunofluorescent CDX2 and active caspase-3 staining. *Anal. Biochem.* 416, 228-230.

Xenaki G, Ontikatzis T, Rajendran R, Stratford IJ, Dive C, Krstic-Demonacos M, Demonacos C (2008): PCAF is an HIF-1alpha cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* 27, 5785-5796.

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.
- Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999): A serum-free culture system for efficient *in vitro* production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 31, 123-131.
- Yamauchi T, Yamauchi J, Kuwata T, Tamura T, Yamashita T, Bae N, Westphal H, Ozato K, Nakatani Y (2000): Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11303-11306.
- Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: "The Physiology of Reproduction" 2nd ed. Editors Knobil E. and Neill JD. New York Raven Press 1, 189-317.
- Yanagimachi R (2012): Fertilization studies and assisted fertilization in mammals: their development and future. *J. Reprod. Dev.* 58, 25-32.
- Yang MY, Rajamahendran R (2002): Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 70, 159-169.
- Yoon SO, Kim MM, Chung AS (2001): Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 20085-20092.
- Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA (1989): Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23, 189-201.
- Zhang X, Rutledge J, Khamisi 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.
- Zhang X, Kidder GM, Zhang C, Khamisi F, Armstrong DT (1994): Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 101, 235-240.

Zhang X, Shu MA, Harvey MB, Schultz GA (1996): Regulation of urokinase plasminogen activator production in implanting mouse embryo: effect of embryo interaction with extracellular matrix. *Biol. Reprod.* 54, 1052-1058.

Zheng P, Zou RJ, Liu YX (2001): [Source of plasminogen activator in rhesus monkey semen and its possible role in sperm capacitation]. *Sheng Li Xue Bao [Acta physiologica Sinica]* 53, 45-50.

<http://www.uniprot.org/uniprot/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/1268200.pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf