



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

---

## ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΟΚΥΤΤΑΡΩΝ *IN VITRO*

Μετφορμίνη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΟΛΥΜΠΙΑ ΠΙΚΙΟΥ

BSc Γενετικής, MSc Τοξικολογίας

MMedSci στην Τεχνολογία της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

ΛΑΡΙΣΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

© 2012 Ολυμπία Πικίου

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

στον πατέρα μου που έδωσε το έναυσμα ...

... στη γιαγιά μου που ήταν πάντοτε δίπλα μου ...

... στη μητέρα μου, τον ήρωα της ζωής μου

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη και με την πολύτιμη βοήθεια της κας Άννας Βασιλάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του ίδιου τμήματος.

Η εργασία αυτή αφορά την εγκαθίδρυση των τεχνικών της *in vitro* ωρίμανσης και γονιμοποίησης συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου βοοειδών καθώς επίσης και της *in vitro* καλλιέργειας εμβρύων βοοειδών στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης (έως 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση). Η εφαρμογή των τεχνικών αυτών μας έδωσε τη δυνατότητα (i) να μελετήσουμε τη δράση του φαρμάκου μετοφορμίνη στη δημιουργία εμβρύων βοοειδών και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (ρυθμός διαίρεσης εμβρύων) και (ii) να διερευνήσουμε ανοσοκυτταρολογικά τον πιθανό μηχανισμό δράσης του φαρμάκου.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν, ο καθένας σε διαφορετικό επίπεδο, στην υλοποίηση της.

Καταρχήν, ευχαριστώ θερμά τον Επιστημονικό Υπεύθυνο του έργου Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος, καθώς επίσης και την επιστημονική του συμβολή και καθοδήγησή όλα αυτά τα χρόνια.

Οφείλω να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Άννα Βασιλάκη της οποίας η καθοδήγηση τα τρία τελευταία χρόνια υπήρξε καθοριστική ενώ η τεράστια εμπειρία της ήταν σταθερά ένα ασφαλές καταφύγιο στις καθημερινές δυσκολίες του ερευνητικού έργου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής Καθηγητή Βιολογίας κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο για τις παρατηρήσεις και την ενθάρρυνση που έλαβα από μέρους του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους και όλα τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή: κ.κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-

*Γυναικολογίας, Ασπασία Τσέζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Κωνσταντίνο Νταφόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Μάρκο Σγάντζο, Επίκουρο Καθηγητή Ανατομίας.*

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον υπό διορισμό Λέκτορα Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Λεονταρίτη για την αμέριστη βοήθεια του σε επιστημονικό επίπεδο όσο και για την ηθική του υποστήριξη καθώς επίσης και τον Δρ. Ηλία Μπέγα, Επιστημονικό και Τεχνικό Προσωπικό του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, για τη βοήθεια του στην προσπάθεια μου να διεγείρω ορμονικά ωοθήκες επιμύων.

Ειδικές ευχαριστίες οφείλω στη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Θεσσαλίας και ιδιαίτερα προς τους κ.κ. Κτηνιάτρους Ελένη Ζώτου, Κωνσταντίνο Τσώνη, Αχιλλέα Καλόγηρο, Δημήτριο Καραμήτσο, Αθανάσιο Έξαρχο, Χριστόδουλο Χαραλαμπίδη, Λεωνίδα Καραβά, Κλεοπάτρα Καποδίστρια και Μαρία Σκούφα για την τεράστια στήριξη και βοήθεια τους στην συλλογή των ωοθηκών βοοειδών από τα Σφαγεία της Γυρτώνης Λάρισας. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χαράλαμπο Καούνα Σπερματεγχύτη της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής που μου παρείχε κατεψυγμένο σπέρμα τούρου καθώς και τον Κτηνίατρο κ. Δημήτρη Βαφειάδη για τις πληροφορίες που μου παρείχε σχετικά με το σπέρμα αυτό από τα αρχεία του Εργαστηρίου Σπέρματος Βοοειδών του Ινστιτούτου Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης Θεσσαλονίκης.

Δεν θα μπορούσα να παραβλέψω την πολύτιμη βοήθεια στη συλλογή των ωοθηκών βοοειδών και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν οι κ.κ. Ηλίας Κοταρέλας, Αποστόλης Παπαδόντας και Γιάννης Αλιματίρης από τα Σφαγεία Γυρτώνης Λάρισας, Οιχαλίας Τρικάλων και Χαλάστρας Θεσσαλονίκης, αντίστοιχα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους Κωνσταντίνο Σκοτεινιώτη και Παπαδημητρίου Δημήτριο που μου έδιδαν πάντα λύσεις οποτεδήποτε και αν αυτές χρειάζονταν καθώς και τις Γραμματείς της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κ.κ. Γεωργία Κόκκα και Σοφία Καρυώτου για τη σημαντική και αγόγγυστη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ολυμπία Πικίου

Ιούλιος 2012

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>Ιστορική αναδρομή εξωσωματικής γονιμοποίησης.....</b>	<b>1</b>
<b>Ωογένεση .....</b>	<b>10</b>
Περίοδος πολλαπλασιασμού ωογονίων .....	10
Ανάπτυξη ωοκυττάρων.....	13
Ανάπτυξη ωοθυλακίων .....	16
<b>Ωρίμανση ωοκυττάρων .....</b>	<b>18</b>
Πυρηνική ωρίμανση .....	19
Κυτταροπλασματική ωρίμανση .....	22
<b><i>In vitro</i> ωρίμανση ωοκυττάρων .....</b>	<b>25</b>
Πλεονεκτήματα της <i>in vitro</i> ωρίμανσης.....	30
<b>Μετφορμίνη .....</b>	<b>31</b>
Μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης.....	32
Η μετφορμίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας: πιθανοί μηχανισμοί δράσης .....	34
Αναστολή της ανάπτυξης του κυττάρου .....	35
Σηματοδότηση μέσω του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης .....	37
Έκφραση και σηματοδότηση του HER-2 (erbB-2).....	37
Αγγειογένεση και φλεγμονή.....	38
Απόπτωση και p53.....	38
Παύση του κυτταρικού κύκλου.....	39
Αναστολή στο μονοπάτι του mTOR.....	40
<b>mTOR .....</b>	<b>41</b>
Δίκτυο σηματοδότησης του mTOR.....	41

Ο TOR ως κεντρικός ρυθμιστής της ανάπτυξης του κυττάρου .....	41
Ρυθμιστές προς τα πάνω του TOR στο δίκτυο σηματοδότησης .....	42
Αυξητικοί παράγοντες .....	43
Θρεπτικά συστατικά .....	44
Ενέργεια .....	46
Στρες .....	46
 Επίδραση της μετφορμίνης στην <i>in vitro</i> ωρίμανση και γονιμοποίηση ωοκυττάρων .....	47
 Ερωτήσεις προς απάντηση .....	49
 Σκοπός της εργασίας .....	51
  ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	52
Πειραματικός σχεδιασμός .....	52
Α' φάση - επίδραση της μετφορμίνης στη δημιουργία και το ρυθμό διαίρεση εμβρύων βοοειδών .....	52
Β' φάση - μελέτη της επίδρασης της μετφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών .....	53
Βιολογικά Υλικά .....	54
Επιλογή του σπερματοδότη ταύρου .....	54
Επιλογή των αγελάδων δοτριών ωοθηκών .....	55
Όργανα, Συσκευές και Αντιδραστήρια .....	55
Μέθοδοι εξωσωματικής γονιμοποίησης .....	56

Συλλογή, μεταφορά και επεξεργασία των ωοθηκών - Ωοληψία.....	56
Συλλογή των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου .....	56
Ωρίμανση των ωοκυττάρων .....	57
Απόψυξη σπέρματος .....	58
Εμπλουτισμός του πληθυσμού των σπερματοζωαρίων .....	58
Απομάκρυνση των παραγόντων απενεργοποίησης .....	59
Εκτίμηση συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων .....	60
Επιλογή και προετοιμασία τω συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου για γονιμοποίηση .....	61
Συγκαλλιέργεια σπερματοζωαρίων και συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου .....	61
In vitro καλλιέργεια των πρώιμων εμβρύων .....	62
Έλεγχος κατά την καλλιέργεια και εκτίμηση .....	63
<b>Ανοσοκυτταροχημικές μελέτες .....</b>	<b>64</b>
Επιλογή αντισωμάτων.....	64
Μέθοδος ανοσοφθορισμού .....	65
<b>Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας .....</b>	<b>67</b>
<b>Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....</b>	<b>68</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>70</b>
<b>Α' φάση - επίδραση της μετφορμίνης στη δημιουργία και το ρυθμό διαίρεση εμβρύων βοοειδών .....</b>	<b>70</b>



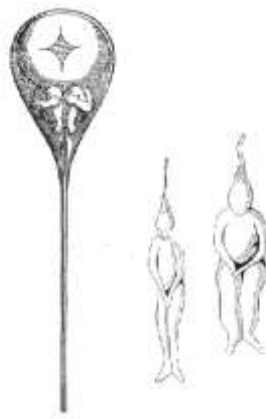
<b>Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μεταφορμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου .....</b>	<b>71</b>
Χορήγηση μεταφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων.....	71
Χορήγηση μεταφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.....	72
<b>Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μεταφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών .....</b>	<b>73</b>
Χορήγηση μεταφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων.....	73
Χορήγηση μεταφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.....	77
<b>Β' φάση - μελέτη της επίδρασης της μεταφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών</b>	<b>81</b>
<b>Μελέτη της έκφρασης του TSC2 και της ενεργοποίησης του από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών .....</b>	<b>81</b>
Μελέτη της έκφρασης του TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών.....	81
Μελέτη των επιπέδων ενεργοποίησης του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών .....	83
<b>Μελέτη της επίδραση της μεταφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών.....</b>	<b>84</b>
Χορήγηση μεταφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων.....	84
Χορήγηση μεταφορμίνης στο στάδιο της γονιμοποίησης .....	84
<b>Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του TSC2 και της ενεργοποίησης του από την AMPK μετά από τη διαφορετική χορήγηση μεταφορμίνης στα διάφορα στάδια παραγωγής εμβρύων .....</b>	<b>86</b>

<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>89</b>
<b>Επίδραση μεταφωμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου .....</b>	<b>90</b>
<b>Επίδραση μεταφωμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών .....</b>	<b>91</b>
<b>Μελέτη της έκφρασης του TSC2 και της επίδραση της μεταφωμίνης στην ενεργοποίηση του από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών .....</b>	<b>93</b>
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>94</b>
 <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	 <b>95</b>
 <b>ABSTRACT .....</b>	 <b>97</b>
 <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	 <b>99</b>
 <b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....</b>	 <b>115</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ιστορική αναδρομή εξωσωματικής γονιμοποίησης

Λέγεται συχνά ότι, ο **Nicolas Hartsoeker** (1656-1725) μαθηματικός και φυσικός Ολλανδικής καταγωγής, παρατηρώντας ανθρώπινο σπέρμα στο απλό μικροσκόπιο το οποίο εφεύρε (1694) νόμισε πως είδε «μικροσκοπικούς ανθρώπους» τους οποίους ονόμασε «homunculi». Ωστόσο, ο ίδιος αξίωσε την ύπαρξη τους μόνο μέσα από τη θεωρία του περί σύλληψης γνωστή ως «Spermist» και δεν παραδέχτηκε ποτέ ότι πραγματικά τους είχε δει. Η εσφαλμένη αντίληψη βασίστηκε σε μία σχηματική αναπαράσταση (Σχήμα-1) η οποία βρέθηκε στα γραπτά του (Hill, 1985).



**Σχήμα-1:** Σκίτσο με μολύβι που απεικονίζει ένα «homunculus» όπως σχεδιάστηκε από τον Hartsoeker το 1695 και δημοσιεύτηκε στην εργασία του, η οποία ήταν γραμμένη στη γαλλική γλώσσα, με τίτλο *"Essai de Dioptrique"*. Η εργασία περιέγραφε νέες επιστημονικές παρατηρήσεις που θα μπορούσαν να γίνουν με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού.

Η σωστή κατανόηση των μηχανισμών κληρονομικότητας ήρθε από τον Αυστριακό επιστήμονα **Johann Mendel** (1822-1884), ο οποίος πήρε το όνομα *Gregor* μετά την είσοδο του στην ασκητική ζωή. Ο Mendel, γνωστός και ως «πατέρας της σύγχρονης γενετικής» ήταν εκείνος ο οποίος πραγματοποίησε πειράματα σε μπιζέλια καταδεικνύοντας ότι η κληρονομικότητα ορισμένων χαρακτηριστικών ακολουθεί

συγκεκριμένα πρότυπα (νόμοι της κληρονομικότητας του Mendel). Η δουλειά του Mendel σε συνδυασμό με τη θεωρία περί φυσικής επιλογής (1859) του Charles Robert Darwin (1809-1882) αποτέλεσαν τη βάση της σύγχρονης εξελικτικής βιολογίας.

Η ανάπτυξη της αναπαραγωγικής βιολογίας βρήκε εφαρμογή στις ιατρικές, κτηνιατρικές και βιοτεχνολογικές πρακτικές. Στην ιατρική επιστήμη, η τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αναπτύχθηκε κυρίως για την άμβλυνση της υπογονιμότητας, ενώ στις κτηνιατρικές επιστήμες οι αυξανόμενες ανάγκες των πληθυσμών έδωσαν την ώθηση για βελτίωση της αποτελεσματικότητας της ζωικής παραγωγής.

Στα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα, ο **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799) βιολόγος και φυσιολόγος Ιταλικής καταγωγής μελέτησε πειραματικά την αναπαραγωγή των ζώων κάνοντας έτσι γνωστή την ύπαρξη τόσο του σπερματοζωαρίου όσο και ωοκυττάρου ως απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία απογόνων και υπήρξε πρωτοπόρος στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς εφάρμοσε για πρώτη φορά την τεχνική της τεχνητής γονιμοποίηση σε σκύλο με επιτυχία (1783). Παράλληλα, ο Άγγλος βιολόγος **Robert Bakewell** (1725-1795), ιδρυτής της επιστήμης της ελεγχόμενης ζωικής αναπαραγωγής, δημιούργησε αρκετές νέες ράτσες κτηνοτροφικών ζώων. Ενώ ο Ρώσος βιολόγος **Ilya Ivanovich Ivanov** (1870-1932), τελειοποίησε τις τεχνικές τεχνητής γονιμοποίησης και με την πρακτική της χρήση στην εκτροφή αλόγων απέδειξε πως η συγκεκριμένη τεχνολογία επιτρέπει σε έναν επιβήτορα να γονιμοποιήσει έως 500 φορές.

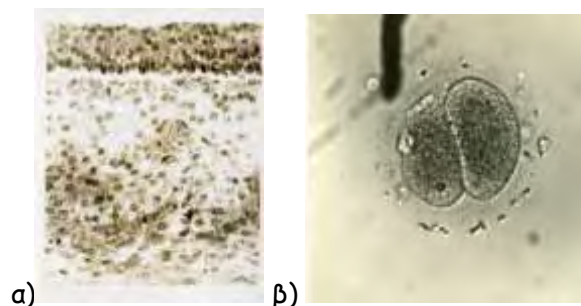
Οι ανακαλύψεις στον τομέα της κυτταρολογίας την περίοδο 1870-1900 έφτασαν στο αποκορύφωμά τους με τις αξιοσημείωτες έρευνες του Βέλγου βιολόγου **Edouard Joseph Marie Van Beneden** (1846-1910) στο νηματώδες *Ascaris megalocephala*, οι οποίες αφορούσαν τις εξελικτικές διεργασίες εντός του πυρήνα κατά την διάρκεια της γονιμοποίησης ωοκυττάρου (1883-1884, 1887). Στα πειράματα αυτά φάνηκε για πρώτη φορά ότι τα χρωμοσώματα του ζυγωτού προέρχονται σε ίδιο αριθμό από τους πυρήνες των δύο αρχικών γεννητικών κυττάρων και επομένως και από τους δύο γονείς (Beneden Van, 1883, Hamoir, 1992).

Η ιστορία της μεταφοράς εμβρύων χρονολογείται από το 1890 όταν ο **Walter Heape** (1855-1929), καθηγητής Ιατρικής στο πανεπιστήμιο του Cambridge της Αγγλίας

πραγματοποίησε την πρώτη μετεμφύτευση (μετά από φυσιολογική γονιμοποίηση) εμβρύων κουνελιού σε αρχικά στάδια διαίρεσης από μία μητέρα σε άλλη, που είχε ως αποτέλεσμα τη γέννηση έξι απογόνων, δύο εκ των οποίων είχαν τα χαρακτηριστικά της δότριας (Heape, 1890, Biggers, 1991).

Ο **Gregory Pincus** (1903-1967), βιολόγος Αμερικανικής καταγωγής, ένας από τους τρεις "πατέρες" του χαπιού αντισύλληψης, ήταν αυτός που ερεύννησε για πρώτη φορά (1934) την πιθανότητα *in vitro* γονιμοποίησης ωοκυττάρων κουνελιών, με θετικά αποτελέσματα (Pincus και Enzmann, 1934). Δεκατέσσερα χρόνια αργότερα, το 1948, ο **John Rock** (1890-1984) καθηγητής γυναικολογίας στο πανεπιστήμιο του Harvard με τον βιολόγο **Miriam Menkin** δημοσίευσαν αποτελέσματα των ερευνών τους πάνω σε *in vitro* γονιμοποιημένα ωάρια, περιλαμβάνοντας διάφορες φωτογραφίες εμβρύων (Εικόνα-1β) σε πολύ αρχικά στάδια διαίρεσης (Menkin και Rock, 1948<sup>a</sup>, 1948<sup>b</sup>). Η έρευνα τους θεωρήθηκε ιστορικής σημασίας καθώς ήταν η πρώτη φορά που καταγράφηκαν ανθρώπινα έμβρυα σε αρχικά στάδια ανάπτυξης, χωρίς όμως την γέννηση απογόνων.

Το κορυφαίο επίτευγμα του βιολόγου Κινεζικής καταγωγής **Chang Min Chueh** (1908-1991), ήρθε το 1959 με την ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων κουνελιού σε μήτρα θηλυκού, ανάκτηση και χρήση τους για την εξωσωματική γονιμοποίηση ωοκυττάρων κουνελιού και μεταφορά των εμβρύων σε άλλο θηλυκό με αποτέλεσμα τη γέννηση ενός απογόνου (Chang, 1959). Για πολλά χρόνια ο Chang και οι συνεργάτες του συνέχισαν να θέτουν τις προϋποθέσεις που απαιτούνται για την εξωσωματική γονιμοποίηση στα διάφορα είδη. Το 1963 ο Chang δημοσίευσε την πρώτη επιτυχημένη *in vitro* γονιμοποίηση ωοκυττάρων από ινδικό χοιρίδιο *Golden* (*Mesocricetus auratus*) που έγινε με ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια μέσω μήτρας θηλυκού, επωασμένα σε ωοθηκικό υγρό από ινδικό χοιρίδιο (Yanagimachi και Chang, 1963). Το 1969 ο ίδιος ερευνητής δημοσίευσε την *in vitro* γονιμοποίηση ωοκυττάρων ποντικίου από *in vitro* ενεργοποιημένο σπέρμα ποντικίου, σε ωοθηκικό υγρό βοοειδούς (Iwamatsu και Chang, 1969) και την *in vitro* γονιμοποίηση ωοκυττάρων ινδικού χοιριδίου *Chinese* (*Cricetulus griseus*) που έγινε με *in vitro* ενεργοποιημένο σπέρμα ινδικού χοιριδίου *Chinese*, σε ωοθηκικό υγρό από ινδικό χοιρίδιο *Syrian* (Pickworth και Chang, 1969). Το 1973-1974 γονιμοποίησε επιτυχώς ωοκύτταρα αρουραίων (Miyamoto και Chang, 1973, Toyota και Chang, 1974).



**Εικόνα-1:** Αριστερά (α) φαίνεται μέρος ιστού γρασφιανού ωοθυλακίου γυναίκας 38 ετών από το οποίο ανακτήθηκε ωκύτταρο για γονιμοποίηση από ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Μεγέθυνση  $\times 400$ . Τα πειράματα διεξήχθησαν από τους Menkin και Rock (1948<sup>a</sup>) οι οποίοι πειραματίστηκαν σε περισσότερα από 800 ανθρώπινα ωκύτταρα, 138 εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για *in vitro* γονιμοποίηση. Δεξιά (β) φαίνεται ανθρώπινο έμβρυο σε στάδιο 2-κυττάρων, αποτέλεσμα *in vitro* γονιμοποίησης με επώαση 45 ωρών. Το ωκύτταρο προήλθε από γυναίκα 31 ετών. Μεγέθυνση  $\times 300$ .

Ήταν με βάση αυτά τα δεδομένα σε ζώα που ο **Sir Robert Geoffrey Edwards** (1925 - Βρετανός φυσιολόγος και πρωτοπόρος στην αναπαραγωγική ιατρική και *in vitro* γονιμοποίηση) και ο μαιευτήρας χειρουργός Βρετανικής καταγωγής **Patrick Christopher Steptoe** (1913-1988) πρωτοστάτησαν με επιτυχία στη σύλληψη μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης σε ανθρώπινα ζώα. Η εξωσωματική αυτή γονιμοποίηση οδήγησε στη γέννηση ορόσημο του πρώτου μωρού του «δοκιμαστικού σωλήνα» παγκοσμίως, της Louise Joy Brown (Εικόνα-2) στις 25 Ιουλίου του 1978 στο Oldham της Μεγάλης Βρετανίας (Steptoe και Edwards, 1978).

Η βασική έρευνα του Robert Edwards στη βιολογία της αναπαραγωγής ξεκίνησε στη δεκαετία του 1950. Από το 1955 και μετά διεύρυνε τη γνώση του σχετικά με τον αναπαραγωγικό κύκλο των ποντικών και την επίδραση των διαφόρων φαρμάκων γονιμότητας στη διέγερση των ωοθηκών (Edwards και Gates, 1959). Το 1964 ξεκίνησε έρευνες στην *in vitro* γονιμοποίηση ωοκυττάρων κουνελιών (Cole *et al.*, 1965, Edwards, 1965). Το 1965 περιέγραψε επιτυχείς προσπάθειες *in vitro* ωρίμανσης ανθρώπινων ωοκυττάρων από ωοθηκικό ιστό (Εικόνα-3, Edwards, 1965).

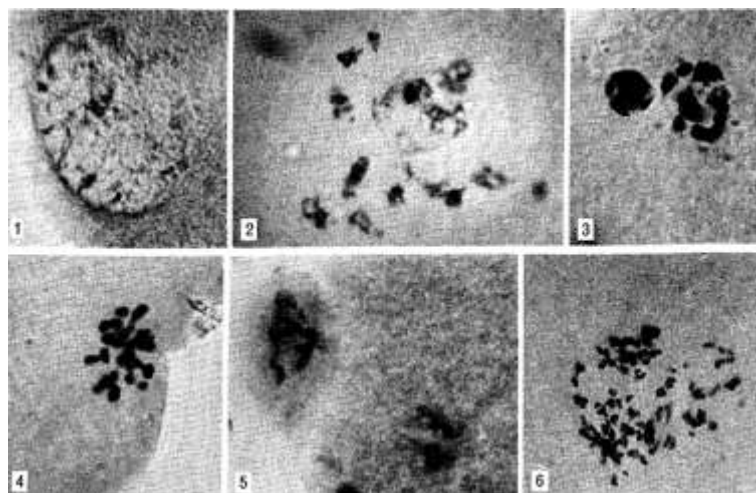


**Εικόνα-2:** Η Louise Joy Brown, κρατώντας αγκαλιά το χιλιοστό παιδί που γεννήθηκε μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης στην κλινική Bourn Hall της Μεγάλης Βρετανίας (Johnson, 2011).

Ο Edwards, σύντομα συνειδητοποίησε ότι η γονιμοποίηση των ωοκυττάρων εξωσωματικά μπορούσε να αποτελέσει πιθανή θεραπεία της υπογονιμότητας. Ακολούθησαν προσπάθειες για γονιμοποίηση των *in vitro* ωριμασμένων ωοκυττάρων, ωστόσο με μικρή επιτυχία (Edwards *et al.*, 1966). Το 1969, οι προσπάθειες του στέφθηκαν με επιτυχία όταν, για πρώτη φορά, κατάφερε να γονιμοποιήσει εξωσωματικά ένα ανθρώπινο ωοκύτταρο (Edwards *et al.*, 1969). Παρά την επιτυχία αυτή, ένα μεγάλο πρόβλημα παρέμεινε. Το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο δεν αναπτύχθηκε πέραν της μίας κυτταρικής διαίρεσης, προκαλώντας στον Edwards την υποψία ότι τα ωοκύτταρα θα λειτουργούσαν καλύτερα αν είχαν ωριμάσει στις ωοθήκες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αναζητήσει τρόπους για την ασφαλή απόκτηση τέτοιων ωοκυττάρων. Ο Steptoe ήταν ένας από τους πρωτοπόρους στη λαπαροσκόπηση (Steptoe, 1968), μίας τεχνικής που ήταν νέα και αμφιλεγόμενη εκείνη την εποχή και ήταν αυτός που απομόνωσε για λογαριασμό του Edwards ωοκύτταρα από ωοθήκες. Με αυτό τον τρόπο, κατάφεραν να απομονώσουν και να γονιμοποιήσουν ωοκύτταρα καθώς και να δημιουργήσουν έμβρυα μέχρι το στάδιο των 8-κυττάρων (Edwards *et al.*, 1970, Steptoe και Edwards, 1970). Το 1971 αποτελεί ορόσημο στην ιστορία της εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς αναφέρθηκε η πρώτη ανθρώπινη βλαστοκύστη μετά από καλλιέργεια *in vitro* (Shettles *et al.*, 1971, Steptoe *et al.*, 1971).

Ο Edwards, θέλοντας να αποκτήσει κάποιο έλεγχο του έμμηνου κύκλου και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων χορήγησε ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotrophin - hCG) με σκοπό την υπερδιέγερση των ωοθηκών και την

πρόκληση ωορρηξίας. Αναφέρθηκαν 14 επιτυχημένες μεταφορές εμβρύων με τη βοήθεια καθετήρα μέσω του τραχήλου, οι οποίες όμως δεν κατέληξαν σε εμφύτευση (Edwards και Sterptoe, 1974), με αποτέλεσμα να εγκαταλειφθεί η ωοθηκική διέγερση.



**Εικόνα-3:** Ωοθήκες ή κομμάτια ωοθηκών αφαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια εγχειρήσεων εξαιτίας διαφόρων κλινικών καταστάσεων και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ωοκυττάρων (Edwards, 1965). Τα ωοκύτταρα (133) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό 199 με ορό εμβρύου μόσχου, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και δικαρβονικό νάτριο. (1) Πυρήνας ωοκυττάρου. Είναι ορατά αποδιαταγμένα χρωμοσώματα. Η πυρηνική μεμβράνη είναι ορατή μέχρι τις 20 ώρες καλλιέργειας. (2) Ωοκύτταρο στο στάδιο της διακίνησης (πρόφαση I σε προχωρημένο στάδιο) μετά από 27 ώρες καλλιέργειας. Το περίγραμμα του πυρήνα εμφανίζεται ως η ωχρή περιοχή που περιβάλλει τα χρωμοσώματα. Η πρόφαση σε προχωρημένα στάδια παρατηρείται στις 25-28 ώρες καλλιέργειας. (3) Συμπύκνωση χρωμοσωμάτων εντός του πυρήνα μετά από 25 ώρες καλλιέργειας. (4) Πρώιμη μετάφαση I. Η πλειοψηφία των ωοκυττάρων διανύει τη μετάφαση I στις 28-35 ώρες καλλιέργειας. (5) Πρώτο πολικό σωματίο και μετάφαση II σε ωοκύτταρο μετά από 48 ώρες καλλιέργειας. Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται στις 36-43 ώρες καλλιέργειας. (6) Χρωμοσώματα σε μετάφαση II, σε ωοκύτταρο μετά από 35 ώρες καλλιέργειας και 24 ώρες στις σάλπιγγες κουνελιού.

Στις αρχές του 1980 εισήχθησαν τεχνικές υπερήχων για την απεικόνιση των ωοθυλακίων (de Crespigny *et al.*, 1981). Η εφαρμογή των υπερήχων βοήθησε στη λήψη ωοκυττάρων, αρχικά διακουστικά με διακοιλιακή ή διουρυθρική προσπέλαση (Lenz & Lauritsen, 1982, Parsons *et al.*, 1987) και αργότερα διακολπικά (Feichtinger και Kemeter, 1986), καθιστώντας πλέον περιττή τη λαπαροσκόπηση και την ολική νάρκωση, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή της μεθόδου χωρίς την ανάγκη για εισαγωγή της ασθενούς.



Η εφαρμογή των υπερήχων είχε ως αποτέλεσμα την επανένταξη της υπερδιέγερσης των ωοθηκών στις τακτικές εξωσωματικής, καθώς ήταν πλέον εφικτή η παρακολούθηση και ο έλεγχος της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Hoult *et al.*, 1981). Για τη διέγερση των ωοθηκών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (human menopausal gonadotropin - hMG). Το πρώτο παρασκεύασμα hMG, το οποίο περιείχε μείγμα ωοθυλακιotropου ορμόνης (follicle stimulating hormone - FSH) και ωχρινotropου ορμόνης (luteinizing hormone - LH) καταχωρήθηκε για κλινική χρήση το 1950 (Lunenfeld, 2004). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανακοίνωσε την επιθυμία για ένα διεθνές πρότυπο ποιοτικού ελέγχου και κατά συνέπεια ορίστηκε μία διεθνή σταθερά (WHO, 1973). Το πρώτο υψηλής καθαρότητας παρασκεύασμα FSH (hpFSH), ένα παρασκεύασμα χωρίς μολυσματικές πρωτεΐνες, εισήλθε στην αγορά τη δεκαετία του '90. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ανασυνδυασμένη FSH (Howles, 1996).

Τα πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών είχαν ως αποτέλεσμα την ανάκτηση το ανώτατο τεσσάρων ωοκυττάρων ανά κύκλο. Σύντομα, διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά εγκυμοσύνης σχετίζονταν με το συνολικό αριθμό των ληφθέντων ωοκυττάρων και το συνολικό αριθμό εμβρύων που μεταφέρονταν. Με τη μεταφορά τριών εμβρύων το ποσοστό εγκυμοσύνης αυξήθηκε στο 27% (Craft *et al.*, 1984, Seppala, 1985, Wood και Trounson, 1985). Ωστόσο, επιβαλλόταν βελτίωση στα πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών.

Το 1984, δημοσιεύτηκε έρευνα που έγινε σε έντεκα γυναίκες χαμηλής ανταπόκρισης, οι οποίες έλαβαν προ-θεραπεία δεκαπέντε ημερών με ανάλογα-ορμόνης έκλυσης των γοναδοτροφινών (γοναδοτροπινών, gonadotrophins releasing hormone - GnRH) ακολουθούμενη από διέγερση των ωοθηκών με hMG ή hpFSH. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση υψηλότερου αριθμού ωοκυττάρων (Porter *et al.*, 1984). Αυτό αποτέλεσε την αφετηρία για την εκτεταμένη χρήση GnRH-αναλόγων στη θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης, παγκοσμίως. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κυρίως GnRH-αγωνιστές (Fleming *et al.*, 1982). Μελέτες έδειξαν πράγματι σημαντική αύξηση του συνολικού αριθμού ωοκυττάρων που ανακτώνται μετά την καταστολή με GnRH-αγωνιστές (Fleming *et al.*, 1988, Hughes *et al.*, 1992). Η χρήση των GnRH-αγωνιστών έγινε ο χρυσός κανόνας στους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, με την προϋπόθεση παρουσίας εξωγενούς μορφής

υποστήριξης της ωχρινικής φάσης, ώστε να ξεπεραστεί η διαταραχή στην παραγωγή της προγεστερόνης, απαραίτητη για την εμφύτευση του εμβρύου, ως συνέπεια της χρήσης των GnRH-αγωνιστών (Daya και Gunby, 2004).

Το 1999, δόθηκε η άδεια για την εμπορική χρήση του πρώτου GnRH-ανταγωνιστή (Gordon και Hodgen, 1992, Reissmann *et al.*, 1995, Griesinger *et al.*, 2005). Αναμενόταν ότι οι GnRH-ανταγωνιστές θα αντικαθιστούσαν γρήγορα τους GnRH-αγωνιστές στην κλινική πράξη, καθώς θα μειωνόταν η διάρκεια και το κόστος θεραπείας και θα αυξανόταν η διευκόλυνση της ασθενούς (Al-Inany και Aboulghar, 2002). Ωστόσο, όταν συγκεντρώθηκαν σε μία Cochrane μετα-ανάλυση όλα τα διαθέσιμα δεδομένα από τυχαιοποιημένες δοκιμές βρέθηκε χαμηλότερο ποσοστό κυήσεων και γεννήσεων στις γυναίκες που έλαβαν θεραπεία με GnRH-ανταγωνιστές συγκριτικά με αυτές που έλαβαν θεραπεία με GnRH-αγωνιστές (Al-Inany και Aboulghar, 2002).

Η διατήρηση των εμβρύων για περιορισμένο χρονικό διάστημα επιτρέπει τη μεταφορά λιγότερων εμβρύων και επομένως το πρόβλημα της πολλαπλής κύησης μπορεί να ελαχιστοποιηθεί. Προεμφυτευτικά έμβρυα κρυοσυντηρήθηκαν με επιτυχία σε πολλά είδη ζώων. Η ευαισθησία των εμβρύων στις συνθήκες κατάψυξης ποικίλλει μεταξύ των ειδών και των σταδίων της ανάπτυξης των εμβρύων (Whittingham, 1977, Mohr και Trounson, 1981). Το 1982 επιτεύχθηκε η πρώτη κύηση μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση κρυοσυντηρημένου εμβρύου στο στάδιο των 8-κυττάρων (Trounson και Mohr, 1983). Η κρυοσυντήρηση είχε διάρκεια τεσσάρων μηνών, κατέληξε όμως σε αποβολή.

Το 1983 χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην εξωσωματική γονιμοποίηση ανθρώπινα ανώριμα ωκύτταρα μετά από *in vitro* ωρίμανση, με αποτέλεσμα την επίτευξη οχτώ κλινικών κυήσεων (Veck *et al.*, 1983). Το 1991, καταγράφηκε τρίδυμη κύηση η οποία προήλθε από ανώριμα ανθρώπινα ωκύτταρα δότριας (Cha *et al.*, 1991). Τα ωκύτταρα συλλέχτηκαν μετά από αφαίρεση ωθηκών, ωρίμασαν και γονιμοποιήθηκαν *in vitro* και τα έμβρυα μεταφέρθηκαν σε γυναίκα με πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια. Η ανάκτηση των ανώριμων ωκυττάρων με σκοπό την *in vitro* ωρίμανση τους προτάθηκε ως πιθανή μέθοδος για τη θεραπεία των γυναικών με υπογονιμότητα λόγω πολυκυστικών

ωοθηκών, καθώς τα ωκύτταρα αυτών των ασθενών διατηρούν την ικανότητα τους να ωριμάσουν και να αναπτυχθούν (Trounson *et al.*, 1994).

Κατά τη δεκαετία του '80, εφαρμόστηκαν και άλλες εναλλακτικές μέθοδοι της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης, μεταξύ των οποίων η ενδομήτρια μεταφορά γαμετών (Craft *et al.*, 1982) και η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών ή ζυγωτών με λαπαροσκοπική (Asch *et al.*, 1986, Tzafettas *et al.*, 1989) ή διακολπική προσπέλαση (Jansen και Anderson, 1987).

Εξαιρετικά χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων, μειωμένη κινητικότητα και/ή μη φυσιολογική μορφολογία αντιπροσωπεύουν τις κύριες αιτίες αποτυχημένης γονιμοποίησης στην κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα καθιερώθηκαν τεχνικές με βάση τον μικροχειρισμό των γαμετών. Η εξέλιξη των τεχνικών αυτών ξεκίνησε από μερική διατομή της διαφανούς ζώνης, ακολουθούμενη από την έγχυση σπερματοζωαρίων κάτω από τη διαφανή ζώνη και τελικά οδήγησε στην ενδοκυτταροπλασματική σπερματέγχυση. Το 1992, επιτεύχθηκε η πρώτη ανθρώπινη κύηση και η γέννηση ενός απογόνου μετά από ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection: ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος, Palermo *et al.*, 1992). Στη συνέχεια αναφέρθηκαν υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης (Van Steirteghem *et al.*, 1993<sup>a</sup>) και εμφύτευσης (Van Steirteghem *et al.*, 1993<sup>b</sup>) μετά από ICSI σε σχέση με SUZI (Subzonal injection of sperm: υποζώνια έγχυση σπέρματος).

Η υπογονιμότητα είναι ένα εξαιρετικά οδυνηρό πρόβλημα για μεγάλο αριθμό ατόμων και μπορεί κανείς να κατανοήσει την ανησυχία των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία.

## Ωογένεση

Το ωάριο είναι ένα εξαιρετικά διαφοροποιημένο κύτταρο το οποίο έχει την ικανότητα να γονιμοποιείται και να εξελίσσεται σε ένα νέο οργανισμό. Η ανάπτυξη των ωαρίων περιλαμβάνει την περίοδο του πολλαπλασιασμού των ωογονίων, την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων καθώς και τον σχηματισμό των ωοθυλακίων, μέσα στα οποία περιέχονται τα ώριμα ωάρια.

### Περίοδος πολλαπλασιασμού ωογονίων

Τα γονοκύτταρα, προέρχονται από το λεκιθικό ασκό του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Ο αριθμός των γονοκυττάρων αυξάνει από περίπου 100 την 8<sup>η</sup> μέρα σε 2500-5000 την 12<sup>η</sup> μέρα (Chiquione, 1954, Spiegelman και Bennett, 1973, McCoshen και McCallion, 1975). Στο ανθρώπινο έμβρυο, μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις κατά μήκος του μεσεντερίου την 24<sup>η</sup> μέρα και καταλήγουν στη γεννητική ταινία (Everret, 1943, Witschi, 1948). Εκεί, τα γονοκύτταρα διαφοροποιούνται είτε σε ωογόνια ή σε σπερματογόνια. Λίγο πριν ή μετά τον τοκετό, τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται με μίτωση, αναπτύσσονται σε μέγεθος και έτσι διαφοροποιούνται σε ωοκύτταρα 1<sup>ης</sup> τάξης (Σχήμα-2).



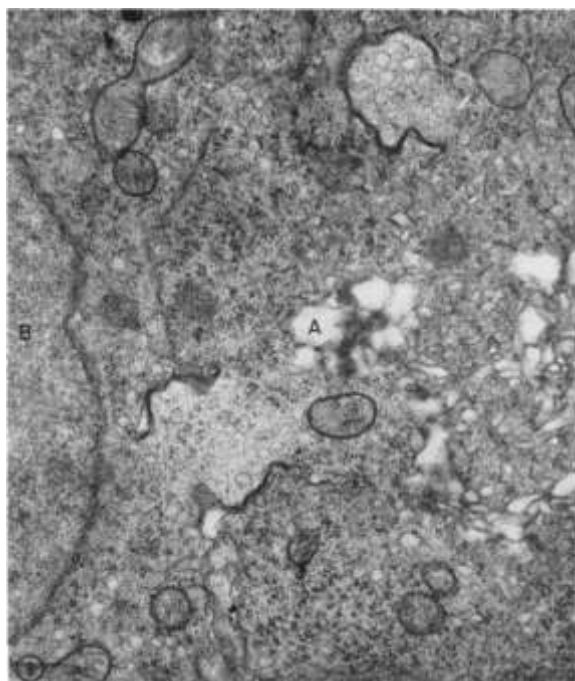
Τροποποίηση από Ulrich Drews, *Color Atlas of Embryology*, 1995

**Σχήμα-2:** Ανάπτυξη γαμετών θήλεος.

Έρευνες με τη χρήση μικροσκοπίου σε ποντίκια, ανθρώπους και κουνέλια έχουν δείξει ότι τα ωγόνια βρίσκονται διατεταγμένα σε μικρές ομάδες και συνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια μεσοκυττάρων γεφυρών (Εικόνα-4, Ruby *et al.*, 1969, Spiegelman και Bennett, 1973, Gondos *et al.*, 1971, Zamboni και Gondos, 1968). Μεσοκυττάριας γέφυρες έχουν βρεθεί μεταξύ ωγονίων σε μεσόφαση καθώς και σε μιτωτικά ωγόνια ενώ επίσης εμφανίζονται μεταξύ ωκυττάρων σε μειωτικό στάδιο καθώς και στις αρχές του εκφυλισμού (Zamboni και Gondos, 1968).

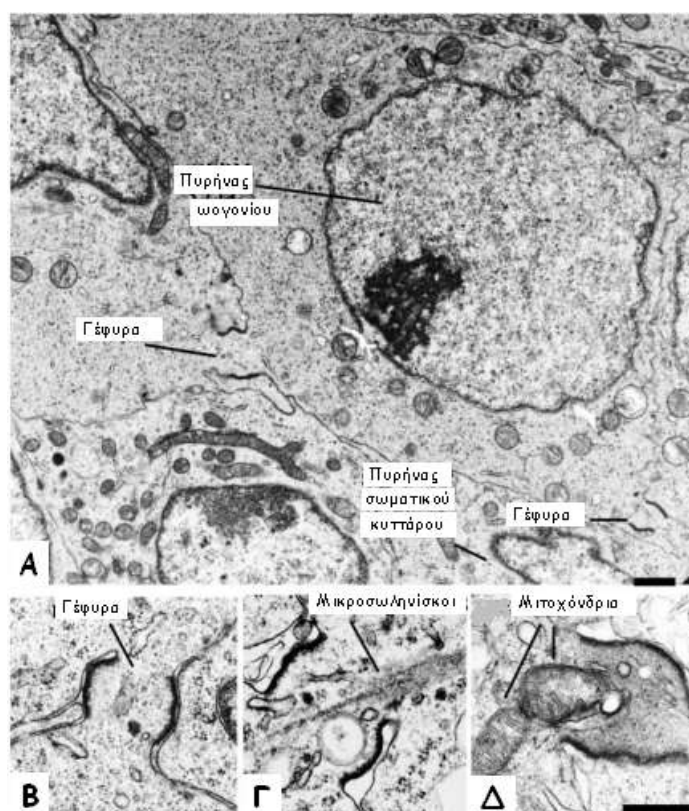
Έχει προταθεί, ότι η σπουδαιότητα των μεσοκυττάρων γεφυρών στην ωοθήκη οφείλεται σε τρεις λειτουργίες τους (Franchi και Mandl, 1962, Zamboni και Gondos, 1968, Gondos *et al.*, 1971, Gondos, 1973<sup>a</sup>, 1973<sup>b</sup>, 1987):

- Συγχρονισμό μιτωτικών διαιρέσεων στα ωγόνια και έναρξη μείωσης στα ωκύτταρα
- Εκφυλισμό ωγονίων
- Μεσοκυττάρια μεταφορά οργανιδίων



**Εικόνα-4:** Ένα ωγόνιο (A) συνδέεται με γειτονικά κύτταρα μέσω δύο γεφυρών. Μόνο ένα από τα συνδεδεμένα κύτταρα (B) φαίνεται στην εικόνα αφού η πλάγια κοπή της ανώτερης γέφυρας δεν επιτρέπει την απεικόνιση του άλλου. Μεγέθυνση x25,000 (Zamboni και Gondos, 1968).

Τα ωοκύτταρα που συνδέονται με μεσοκυττάρια γέφυρες παρουσιάζουν πολύ ανεπτυγμένο σύστημα Golgi, το οποίο συχνά εντοπίζεται στην περιοχή των κυτταροπλασματικών συνεχειών. Κυστιδία προερχόμενα από τη συσκευή Golgi παρατηρούνται τακτικά εντός των ορίων των γεφυρών (Ruby *et al.*, 1969). Άλλα κυτταροπλασματικά οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων του αδρού και λείου ενδοπλασματικού δικτύου, των ριβοσωμάτων και των μιτοχονδρίων έχουν επίσης παρατηρηθεί στις γέφυρες (Εικόνα-5, Perling και Spradling, 1998). Η παρουσία τέτοιων κυστιδίων και οργανιδίων εντός των μεσοκυττάρια γεφυρών υποδηλώνει ότι αυτές οι συνδέσεις μπορούν να παρέχουν ένα μέσο για τη μεταφορά των οργανιδίων και άλλων ουσιών από το ένα ωοκύτταρο στο άλλο.



**Εικόνα-5:** Τα ωογόνια συνδέονται με δακτυλιοειδή κανάλια (ring canals). (Α) Ωογόνιο ωοθήκης ποντικού με δύο μεσοκυττάρια γέφυρες. Τα υπόλοιπα ωογόνια που είναι συνδεδεμένα μαζί του δεν είναι ορατά σε αυτή την απεικόνιση. Παρουσιάζονται πυρήνες ωογονίων και σωματικών κυττάρων. Κλίμακα, 0.75  $\mu\text{m}$ . (Β) Μεσοκυττάρια γέφυρα ωοθήκης ποντικού που δείχνει το χείλος της γέφυρας. (Γ) Μεσοκυττάρια γέφυρα ωοθήκης ποντικού που δείχνει τη διέλευση μικροσωληνίσκων από τη γέφυρα. (Δ) Μεσοκυττάρια γέφυρα ωοθήκης ποντικού. Φαίνεται η παρουσία ενός μιτοχονδρίου εντός της γέφυρας και ενός δεύτερου έξω και δίπλα σε αυτήν. Κλίμακα για Β-Δ, 0.5  $\mu\text{m}$  (Perling και Spradling, 1998).

Η έναρξη της μείωσης δεν αποτελεί μία συγχρονισμένη διαδικασία καθώς όλα τα ωγόνια δεν εισέρχονται στη μειωτική πρόφαση την ίδια στιγμή. Έτσι, στις νεαρές ωοθήκες παρατηρούνται ωγόνια και ωκύτταρα ταυτόχρονα (Peters και McNatty, 1980). Ο χρόνος που μεσολαβεί για την μετατροπή των ωγονίων σε ωκύτταρα ποικίλει μεταξύ των ειδών και είναι για παράδειγμα τέσσερις ημέρες στο ποντίκι (Borum, 1961), και πέντε μήνες στον άνθρωπο (Baker, 1963). Καθώς το σήμα για την έναρξη της ωογένεσης δεν φτάνει σε όλα τα ωγόνια την ίδια στιγμή, η επικοινωνία μέσω των μεσοκυττάρων γεφυρών θα μπορούσε να εξηγήσει πως τα κύτταρα εντός μίας οποιαδήποτε ομάδας βρίσκονται σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης ενώ άλλες ομάδες βρίσκονται σε διαφορετικά.

Επομένως, οι γέφυρες αυτές φαίνεται να είναι σημαντικές για τη θρέψη και την ωρίμανση ορισμένων ωοκυττάρων καθώς επίσης και το συγχρονισμό των γεγονότων της μείωσης.

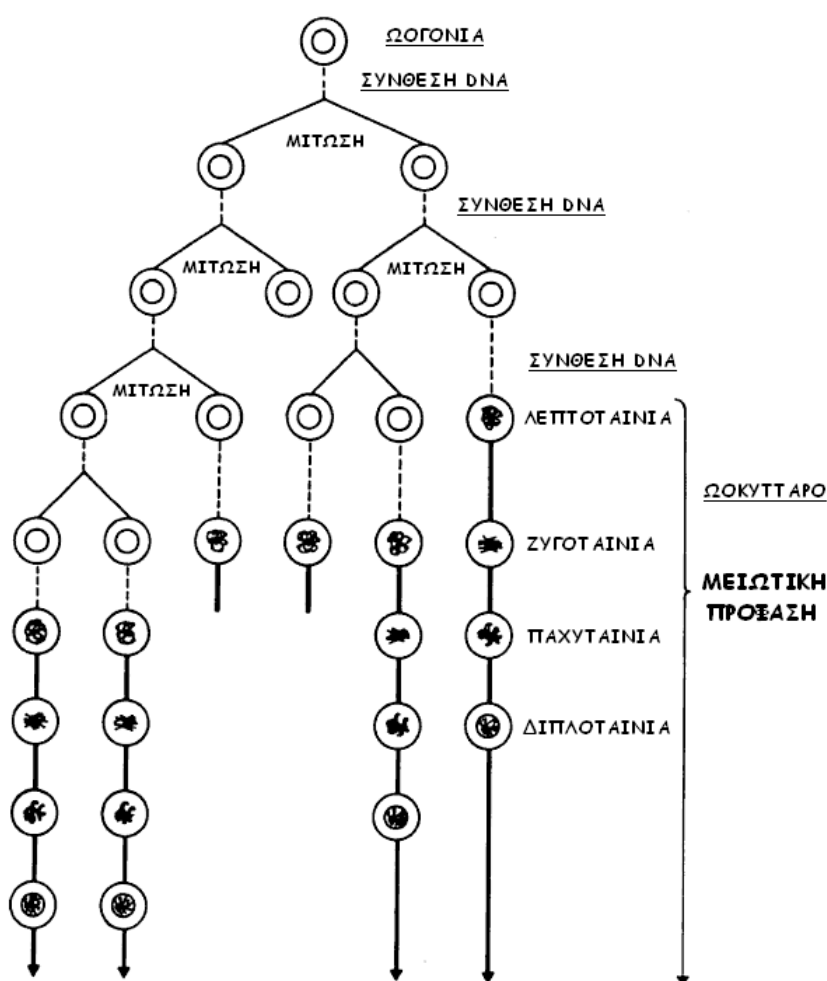
### ***Ανάπτυξη ωοκυττάρων***

Το γεννητικό κύτταρο πριν εισέλθει στη μειωτική πρόφαση αποτελεί ένα μιτωτικά διαιρούμενο ωγόνιο, αρχικά συνθέτει DNA κατά τη φάση 'S' της μεσόφασης και στη συνέχεια προχωρά μέσα από μία σύντομη πρόφαση και μετάφαση στη μιτωτική διαίρεση. Όταν το ωγόνιο εισέρχεται στη μείωση ο κυτταρικός κύκλος μεταβάλλεται. Η πρόφαση παρατείνεται και ακολουθούν δύο διαιρέσεις στον πυρήνα του κυττάρου. Το DNA αυτού του κυττάρου, δηλαδή του ωοκυττάρου, συντίθεται κατά τη μεσόφαση που έχει προηγηθεί η οποία αποτελεί την τελευταία προ-μειωτική μεσόφαση (Σχήμα-3).

Κατά τη φάση της ανάπτυξης του ωοκυττάρου ο πυρήνας βρίσκεται στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (McLaren και Southee, 1997). Στη συνέχεια, οι πυρηνίσκοι και η πυρηνική μεμβράνη εξαφανίζονται. Το κεντρόσωμα διαιρείται σε δύο κεντριόλια, γύρω από τα οποία εμφανίζονται οι σχηματισμοί της κεντρικής ατράκτου. Τα χρωματοσώματα συντάσσονται στην κεντρική ζώνη του

ωοκυττάρου σε διπλοειδή ζεύγη, το ένα δίπλα στο άλλο, σχηματίζοντας έτσι την ισημερινή πλάκα.

Στη συνέχεια, το ωοκύτταρο 1<sup>ης</sup> τάξης υφίσταται δύο μειωτικές διαιρέσεις. Κατά την πρώτη διαίρεση προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα, το καθένα από τα οποία περιέχει τον ίδιο (διπλοειδή) αριθμό χρωμοσωμάτων. Το ένα θυγατρικό κύτταρο διατηρεί όλο σχεδόν το πρωτόπλασμα (ωοκύτταρο 2<sup>ης</sup> τάξης), ενώ το άλλο, που είναι πολύ μικρότερο, αποτελεί το πρώτο πολικό σωματίο.

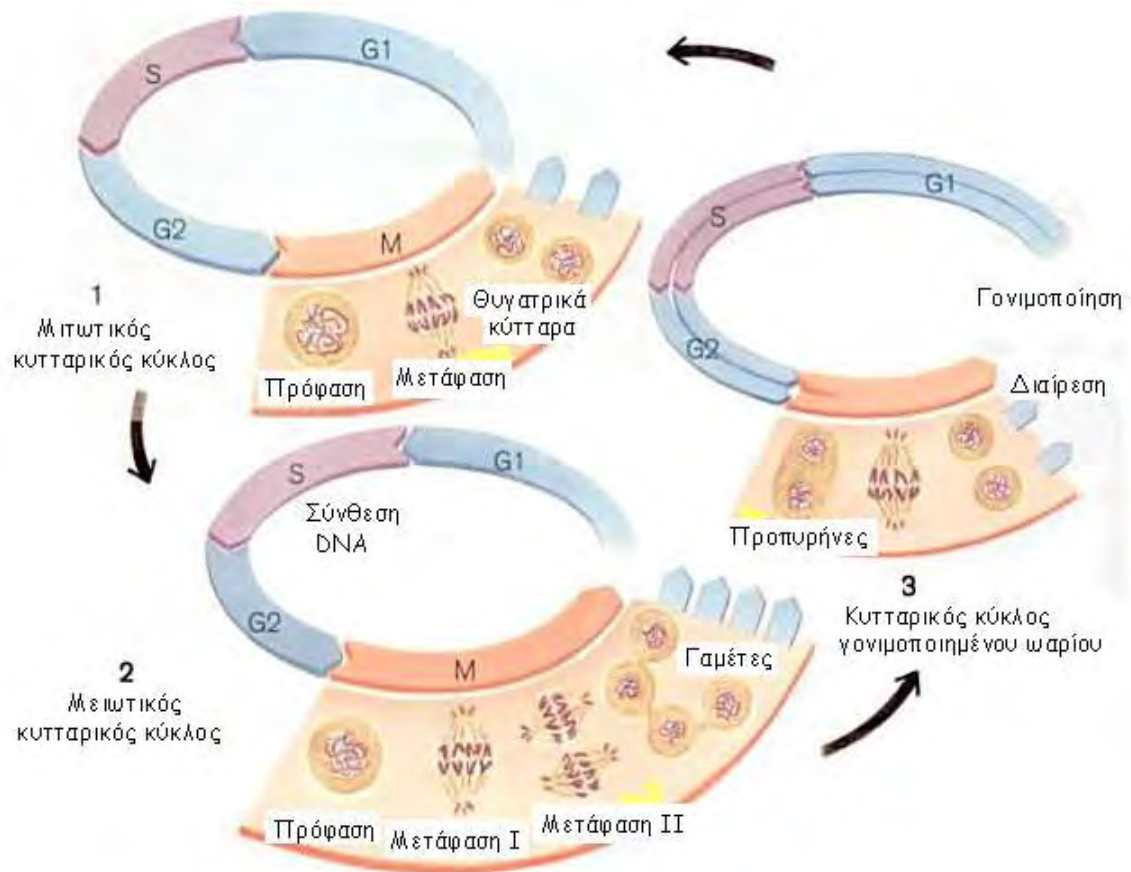


Τροποποίηση από Peters και McNatty, 1980

**Σχήμα-3:** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του DNA στα γεννητικά κύτταρα. Στα μιτωτικά διαιρούμενα ωογόνια το DNA συντίθεται κατά τη μεσόφαση μεταξύ δύο διαιρέσεων. Το DNA που περιέχεται στα ωοκύτταρα συντίθεται στην τελευταία προ-μειωτική μεσόφαση.



Κατά τη δεύτερη διαίρεση το ωοκύτταρο 2<sup>ης</sup> τάξης διαιρείται στο ώριμο ωάριο (προπυρήνας) και στο δεύτερο πολικό σωματίο. Το καθένα τώρα περιέχει το μισό (απλοειδή) αριθμό χρωματοσωμάτων. Τα δύο πολικά σωματίια τελικά εκφυλίζονται.



Τροποποίηση από Ulrich Drews, *Color Atlas of Embryology*, 1995

**Σχήμα-4:** Κυτταρικός κύκλος γεννητικών κυττάρων.

Η πρώτη μειωτική διαίρεση συμβαίνει λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία, ενώ η δεύτερη (που εξελίσσεται μέχρι το στάδιο της μετάφασης κατά το χρόνο της καθόδου του ωοκυττάρου 2<sup>ης</sup> τάξης κατά μήκος του ωαγωγού) ολοκληρώνεται μόνο αφού προηγουμένως γίνει η γονιμοποίηση του ωοκυττάρου από το σπερματοζώαριο (Σχήμα-4). Έτσι, το δεύτερο πολικό σωματίο και ο θηλυκός προπυρήνας σχηματίζονται κατά τη γονιμοποίηση.

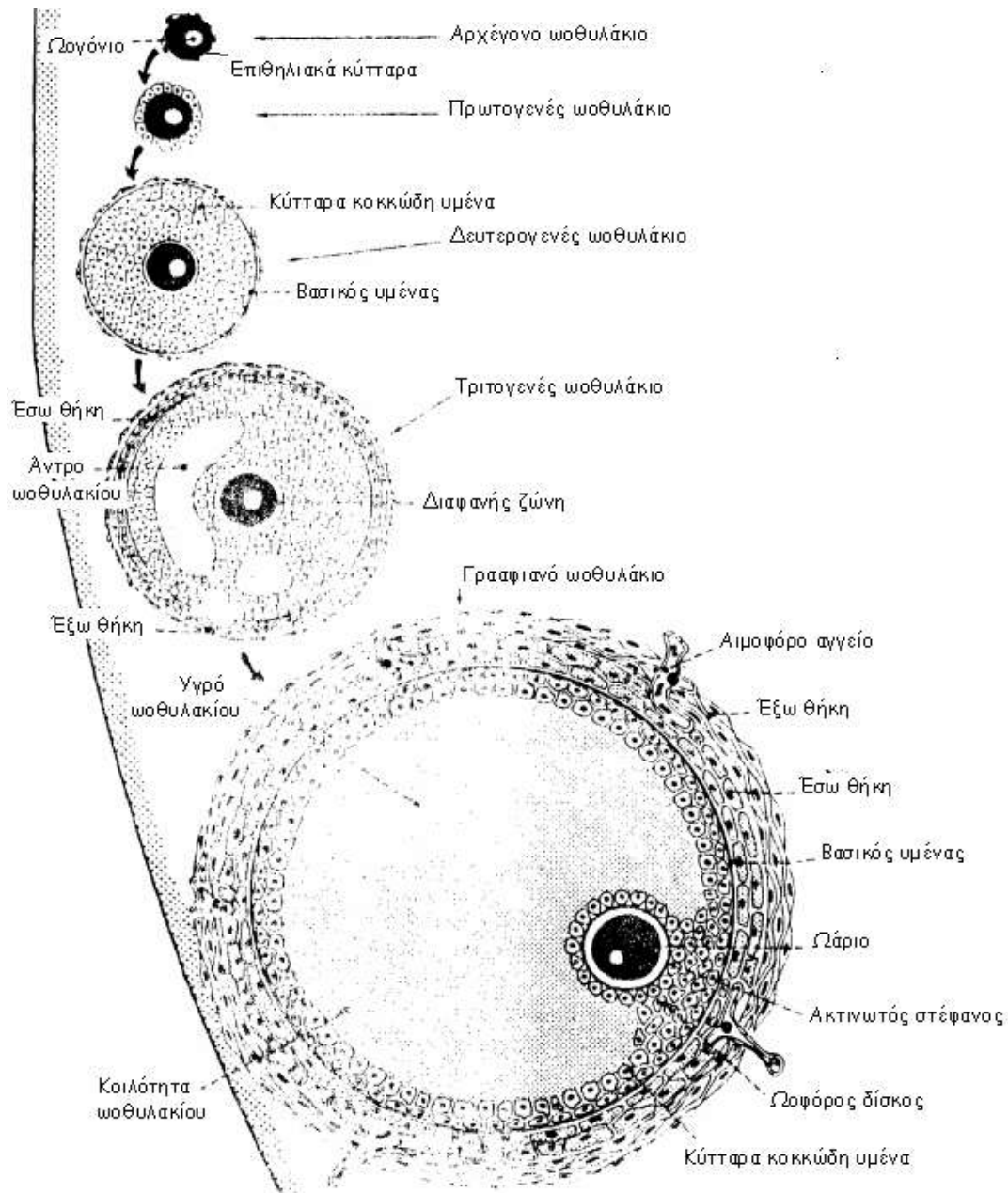
### ***Ανάπτυξη ωοθυλακίων***

Η έναρξη της δημιουργίας των ωοθυλακίων ποικίλλει στα διάφορα είδη, με τη διαμόρφωση τους να συμβαίνει στην εμβρυική ζωή, τη νεογνική περίοδο ή ακόμα αργότερα, δηλαδή κατά τη δεύτερη ή τρίτη εβδομάδα της ζωής (Peters και McNatty, 1980). Στον άνθρωπο, κατά το τέλος της ενδομήτριας ζωής όπου παρατηρείται πολλαπλασιασμός των ωογονίων μέσω μιτωτικής διαίρεσης, κάθε ωογόνιο περιβάλλεται από ένα στοίχο επιθηλιακών κυττάρων, μαζί με τα οποία αποτελεί το αρχέγονο ωοθυλάκιο (Σχήμα-5). Η ανάπτυξη των αρχέγονων ωοθυλακίων γίνεται σε διαδοχικά στάδια υπό την επίδραση των γοναδοτρόπων ορμονών της υπόφυσης. Η ανάπτυξη αυτή παρατηρείται ήδη στην εμβρυική ηλικία, πριν και μετά την ενήβωση και κατά τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου.

Κατά το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου, το ωοκύτταρο του αρχέγονου ωοθυλακίου αναπτύσσεται σε όγκο, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα που το περιβάλλουν γίνονται κυβοειδή ή κυλινδρικά (Weakley, 1966, Baca και Zamboni, 1967).

Κατά το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου, το ωοκύτταρο αυξάνεται περισσότερο σε όγκο, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας γύρω από αυτό ένα πολύστοιβο στρώμα (κοκκώδης υμένας). Μεταξύ του στρώματος αυτού των επιθηλιακών κυττάρων και του ωοκυττάρου αναπτύσσεται μια στοιβάδα, η διαφανής ζώνη (Chiquoine, 1960). Τα κύτταρα του κοκκώδη υμένα του ωοθυλακίου περιβάλλονται από κύτταρα του συνδετικού στρώματος της φλοιώδους ουσίας της ωοθήκης, τα οποία αποτελούν τη θήκη του ωοθυλακίου (Σχήμα-5).

Κατά το στάδιο του τριτογενούς ωοθυλακίου, μεταξύ των κυττάρων του κοκκώδη υμένα εμφανίζονται κενοί χώροι, που γεμίζουν με υγρό (Zachariae, 1957). Στο ώριμο ωοθυλάκιο (γρσαφιανό ωοθυλάκιο) οι κενοί αυτοί χώροι συνενώνονται σε ενιαία κοιλότητα, την κοιλότητα ή άντρο του ωοθυλακίου.



Τροποποίηση από Vaissaire, 1995

**Σχήμα-5:** Ωοθυλακιόγνεση.

Η θήκη του ωοθυλακίου διακρίνεται στην έξω θήκη, που αποτελείται από τη στοιβάδα του συνδετικού στρώματος της ωοθήκης, και στην έσω θήκη, που αποτελείται από πολλούς στοιχείους μεγάλων και υποστρογγύλων κυττάρων (Dubreuil, 1957). Κατά το στάδιο σχηματισμού της έξω και της έσω θήκης, τα αγγεία της φλοιώδους μοίρας της ωοθήκης αναπτύσσονται και σχηματίζουν ένα δίκτυο από αιμοφόρα αγγεία, τα οποία

περιβάλλουν το ωοθυλάκιο και ιδιαίτερα την έσω θήκη (Bassett, 1943, Moor *et al.*, 1975).

Τα κύτταρα της έσω θήκης διαχωρίζονται από τα κύτταρα του κοκκώδη υμένα από μια λεπτή μεμβράνη, το βασικό υμένα. Ο κοκκώδης υμένας παρουσιάζει τον ωοφόρο δίσκο, ο οποίος περιέχει το ωάριο και προέχει στην κοιλότητα του ωοθυλακίου. Τα κύτταρα του κοκκώδη υμένα που περιβάλλουν το ωάριο αποτελούν τον ακτινωτό στέφανο. Τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου παρουσιάζουν πρωτοπλασματικές προσεκβολές, οι οποίες διαπερνώντας τη διαφανή ζώνη παρέχουν στο ωάριο τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση και την ανάπτυξη του.

Το υγρό που γεμίζει την κοιλότητα του ωοθυλακίου εκκρίνεται από τα κύτταρα του κοκκώδη υμένα και από τα κύτταρα της έσω θήκης και είναι πλούσιο σε στεροειδή (οιστρογόνα, προγεστερόνη), βλεννοπρωτεΐνες, λιπίδια, κτλ.

Το ωοθυλάκιο αποκτά το μεγαλύτερο του μέγεθος λίγο πριν από την ωοθυλακιορρηξία. Ο ρυθμός αύξησης και ο αριθμός των ωοθυλακίων, που τελικά ωριμάζουν, εξαρτώνται από την ποσότητα των γοναδοτρόπων ορμονών της υπόφυσης.

## **Ωρίμανση ωοκυττάρων**

Κατά τη γέννηση, κάθε ωοθήκη έχει ~500.000 υγιή μη-αναπτυσσόμενα ή αρχέγονα ωοθυλάκια (Baker, 1963). Καθ'όλη την αναπαραγωγική ζωή της γυναίκας, ομάδες ωοκυττάρων απομακρύνονται από αυτή τη μη-αναπτυσσόμενη συστάδα και ξεκινούν την ανάπτυξη. Κοντά στην ολοκλήρωση της ανάπτυξης, τα ωοκύτταρα αποκτούν τη δυνατότητα να επανεκκινήσουν τη διαδικασία της μειωτικής διαίρεσης (Pincus και Enzmann, 1935) και να ωριμάσουν σε ωάρια.

Η ωρίμανση του ωοκυττάρου περιλαμβάνει τρεις αναπτυξιακές φάσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενός ωαρίου ικανό να υποστεί γονιμοποίηση και στη συνέχεια εμβρυογένεση. Οι διεργασίες αυτές είναι οι εξής:

- Πυρηνική ωρίμανση, η οποία περιλαμβάνει την επανεκκίνηση και ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης καθώς και την παύση στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης
- Επιγενετική ωρίμανση, η οποία συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του ωοκυττάρου και έχει ως αποτέλεσμα γενωματικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τις εκφράσεις των γονιδίων
- Κυτταροπλασματική ωρίμανση, οριζόμενη ως η διαδικασία που συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα του αναπτυσσόμενου ωοκυττάρου απαραίτητη για τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη.

### ***Πυρηνική ωρίμανση***

Η μείωση είναι μία μοναδική κυτταρική διαίρεση που εμφανίζεται αποκλειστικά σε γαμέτες με σκοπό να μειώσει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων από διπλοειδή (2n) σε απλοειδή (n). Η μετάβαση από το στάδιο του δευτερογενούς προκοιλοτικού ωοθυλακίου στο κοιλοτικό είναι μία σημαντική καμπή κατά την οποία το ωοκύτταρο αποκτά την ικανότητα να επανεκκινήσει τη μειωτική διαίρεση (Sorensen και Wassarman, 1976). Τα ωοκύτταρα που παραμένουν στο στάδιο της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης εμφανίζουν ανέπαφη πυρηνική μεμβράνη. Η πιο προφανής εκδήλωση της επανεκκίνησης της μειωτικής διαδικασίας είναι η διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης, η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, καθώς και η συναρμογή μιας διπολικής ατράκτου (Voronina και Wessel, 2003).

Το ωοκύτταρο υφίσταται διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης όταν αυξηθεί σε μέγεθος, όμως δεν είναι ικανό να ολοκληρώσει την ωρίμανση σε αυτό το στάδιο και ως εκ τούτου σταματά στο στάδιο της μετάφασης I. Μόνο με την περαιτέρω ανάπτυξη του ωοκυττάρου μπορεί αυτό να προχωρήσει μέσω της μετάφασης I στη μετάφαση II ώστε να ωριμάσει (Sorensen και Wassarman, 1976, Iwamatsu και Yanagimachi, 1975, Szybek, 1972). Ωστόσο έχει αναφερθεί διάλυση μεμβράνης μη-εξαρτώμενη από το μέγεθος του ωοκυττάρου (Canipari *et al.*, 1984).

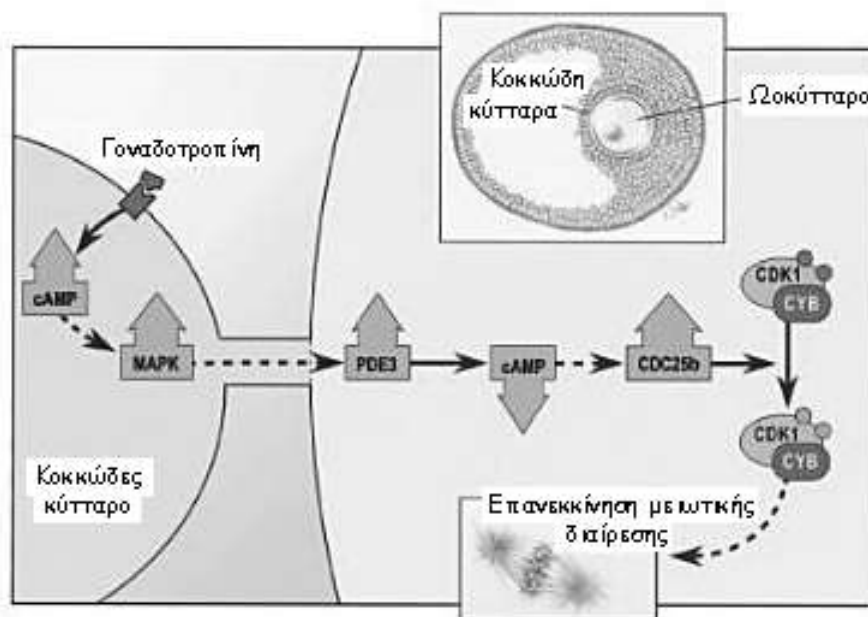
Πολλοί πιθανοί παράγοντες μεσολαβούν στον έλεγχο της διάλυσης της πυρηνικής μεμβράνης του ωοκυττάρου από τα κοκκώδη κύτταρα. Σύμφωνα με διάφορες έρευνες, υψηλά επίπεδα της cAMP (cyclic adenosine monophosphate: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) και της υποξανθίνης της πουρίνης στο καλλιεργητικό μέσο εμποδίζουν τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης (Heller *et al.*, 1981, Downs *et al.*, 1985, Eppig *et al.*, 1985, Hillensjo *et al.*, 1985, Tornell και Hillensjo, 1993).

Μελέτες σε ζωικά (Stern *et al.*, 1972, Schultz και Wassarman, 1977, Sirard και First, 1988, Sirard *et al.*, 1989) αλλά και ανθρώπινα (Gifford *et al.*, 1987, Schiltz *et al.*, 1988) ωοκύτταρα έχουν δείξει ότι η σύνθεση πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης, καθώς το μοτίβο των πρωτεϊνών αλλάζει πριν και μετά τη διάλυση της μεμβράνης. Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι απαραίτητη στα ωοκύτταρα για τη μετάβαση στο στάδιο της μετάφασης II, όπως επίσης και για τη διατήρηση της παύσης σε αυτό το στάδιο (Clarke και Masui, 1983, Gerhart *et al.*, 1984). Η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης έχει ως αποτέλεσμα τη μη-ενεργοποίηση του MPF (maturation promoting factor: παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης, Masui και Clarke, 1979, Maller, 1985, Hashimoto και Kishimoto, 1988). Σήμερα είναι γνωστό ότι η πυρηνική ωρίμανση στα ωοκύτταρα ρυθμίζεται από τον MPF και τον CSF (cytostatic factor: κυτταροστατικός παράγοντας, Shibuya και Mashui, 1989).

Η επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης στο πλήρως ανεπτυγμένο ωοκύτταρο συμβαίνει όταν αυτό δεχθεί την κατάλληλη επίδραση της LH (luteinizing hormone: ωχρινοποιητική ή ωχρινοτρόπος ορμόνη). Δεδομένου ότι το ωοκύτταρο δεν έχει υποδοχείς της LH, η δράση της LH στην ωρίμανση πρέπει να διαμεσολαβείται από τα κοκκώδη κύτταρα (Dekel, 1988).

Για το μηχανισμό δράσης της LH στην ωρίμανση έχουν προταθεί δύο υποθέσεις. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, η LH οδηγεί στην αποσυναρμολόγηση των χασμοσυνδέσμων μεταξύ των τοιχωματικών κοκκωδών κυττάρων και αυτών που περιβάλλουν το ωοκύτταρο. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της ροής προς το ωοκύτταρο των παραγόντων που συμμετέχουν στην παύση της μειωτικής διαδικασίας και ως εκ τούτου την επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης για τη μετάβαση προς τη μετάφαση II. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η αποσυναρμολόγηση των χασμοσυνδέσμων

σχετίζεται χρονικά με την έναρξη της διάλυσης της πυρηνικής μεμβράνης (Wert και Larsen, 1990). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι η ωρίμανση επανεκκινείται όταν το σύμπλεγμα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου διαχωρίζεται πειραματικά από το ωοθυλάκιο (Tsafriri και Channing, 1975, Racowski και Baldwin, 1989).



Τροποποίηση από Leung και Adashi, *The Ovary*, 2004, p.119

**Σχήμα-6:** Υπόθεση για το μηχανισμό επανεκκίνησης της μειωτικής διαίρεσης όπως προκαλείται από τις γοναδοτροπίνες. cAMP (cyclic adenosine monophosphate: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη). MAPK (mitogen-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από τη μίτωση). PDE3 (phosphodiesterase-3: φωσφοδιεστεράση-3). CDC25b (cell division cycle 25 homolog b: ομόλογο β της φωσφατάσης που επάγει την κυτταρική διαίρεση 25). CDK1 (cyclin-dependent kinase 1: κινάση εξαρτώμενη από την κυκλίνη 1). CYB (cytochrome B: κυτόχρωμα B). Βέλη δείχνουν αύξηση ή μείωση στη δραστηριότητα ή το επίπεδο των αναφερόμενων μορίων. Διακεκομμένες γραμμές δείχνουν ότι πολλαπλά βήματα θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην εξέλιξη των παρακάτω γεγονότων. Η διέγερση που προκαλεί η γοναδοτροπίνη αυξάνει τα επίπεδα του cAMP στα κοκκώδη κύτταρα επιφέροντας αυξημένη δραστηριότητα της MAPK. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός άγνωστου σήματος από τα κοκκώδη κύτταρα, το οποίο διασχίζει τους χασμοσυνδέσμους που ενώνουν τα σωματικά κύτταρα και το ωοκύτταρο. Το σήμα αυτό αυξάνει τη δραστηριότητα της PDE3 μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της cAMP στο ωοκύτταρο.

Η δεύτερη υπόθεση είναι ότι η LH προκαλεί εντός των κοκκωδών κυττάρων την παραγωγή σήματος, υπεύθυνου για την πρόκληση της ωρίμανσης, το οποίο μεταφέρεται στο ωοκύτταρο μέσω των χασμοσυνδέσμων (Σχήμα-6, Downs *et al.*, 1988). Η

κινητοποίηση του ασβεστίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαίρεσης (Berridge και Irvine, 1984, Twigg *et al.*, 1988, Kojima *et al.*, 1988). Επομένως, ένας υποψήφιος διαμεσολαβητής του σήματος που παράγεται στα κοκκώδη κύτταρα και προκαλεί την επανεκκίνηση της ωρίμανσης μετά τη διέγερση από την LH είναι το ασβέστιο, ή μία ουσία που κινητοποιεί το ασβέστιο, τα ιόντα του οποίου μπορούν να εισαχθούν στο ωκύτταρο μέσω των χασμοσυνδέσμων. Δύο παρατηρήσεις είναι συνεπείς με αυτή την ιδέα. Πρώτον, οι γοναδοτροπίνες προκαλούν στα κοκκώδη κύτταρα αύξηση του ελεύθερου ασβεστίου και των ουσιών που το κινητοποιούν (Asem *et al.*, 1987, Leung και Wang, 1989, Flores *et al.*, 1990). Δεύτερον, η αύξηση του ελεύθερου ασβεστίου στο ωκύτταρο έχει ως αποτέλεσμα τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης δεδομένου ότι ανάλογα της cAMP, αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης της cAMP (Pawers και Paleos, 1982, Racowski, 1986) ή αναστολείς της καλμοδουλίνης αναστέλλουν την αυθόρμητη ωρίμανση (Bornslaeger, 1984). Επιπλέον, έκθεση άθικτων ωοθυλακίων σε ιοντοφόρο ασβεστίου προκαλεί ωρίμανση στα ωκύτταρα (Goren *et al.*, 1990).

### **Κυτταροπλασματική ωρίμανση**

Η κυτταροπλασματική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από ανακατατάξεις του χώρου και της υπερδομής του κυτταροπλάσματος (Hyttel *et al.*, 1997) καθώς και από χημικές μεταβολές των μορίων που είναι αποθηκευμένα σε αυτό (Brevini-Gandolfi και Gandolfi, 2001). Σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει τη συσσώρευση mRNA (αγγελιοφόρο ριβονουκλεικό οξύ), πρωτεϊνών και θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωκυττάρου, η οποία σχετίζεται με την αναπτυξιακή ικανότητα του εμβρύου (Brevini-Gandolfi και Gandolfi, 2001, Krisher, 2004, Sirard *et al.*, 2006).

Κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωκυττάρων υπάρχει σύνθεση και αποθήκευση προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά συντηρούν την ανάπτυξη μετά τη γονιμοποίηση, μέχρι το εμβρυϊκό γονιδίωμα να γίνει μεταγραφικά ενεργό. Το μεγαλύτερο μέρος του RNA που βρίσκεται στα ωκύτταρα των θηλαστικών συντίθεται και



συσσωρεύεται κατά την περίοδο της ανάπτυξης του ωοκυττάρου (Bachvarova, 1974, Jahn *et al.*, 1976, Bachvarova και DeLeon, 1980, Sternlicht και Schultz, 1981, Piko και Clegg, 1982). Η σύνθεση του RNA συνεχίζεται σε χαμηλά επίπεδα για έως και μία ώρα από τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης ενώ μέρος του RNA ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα πριν από τη διάλυση της μεμβράνης (Bloom και Mukherjee, 1972, Rodman και Bachvarova, 1976, Wassarman και Letourneau, 1976). Η μεταγραφή και αποθήκευση του μητρικού mRNA παύει να υφίσταται όταν η πυρηνική μεμβράνη υποβάλλεται σε διάλυση (Brevini-Gandolfi και Gandolfi, 2001, Piccioni *et al.*, 2005). Μέχρι το έμβρυο να ξεκινήσει τη μεταγραφή των εμβρυϊκών γονιδίων (*embryonic genes*) η ανάπτυξη του εξαρτάται από το αποθηκευμένο μητρικό mRNA, με κορύφωση της μεταγραφικής δραστηριότητα στο στάδιο των 2-κυττάρων στα ποντίκια (Brevini-Gandolfi και Gandolfi, 2001, Gosden, 2002), των 4/8-κυττάρων στους ανθρώπους και των 8/16-κυττάρων στα βοοειδή (Telford *et al.*, 1990, Thompson *et al.*, 2000). Μεγάλης κλίμακας μείωση του μητρικού mRNA συμβαίνει κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου, όπως επίσης και αύξηση στην αποαδενυλίωση του mRNA. Περαιτέρω απώλειες μητρικού mRNA συμβαίνουν κατά τα αρχικά στάδια της αυλάκωσης του εμβρύου (Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999, Brevini-Gandolfi και Gandolfi, 2001, Piccioni *et al.*, 2005). Σε γενικές γραμμές, η πολυαδενυλίωση συνδέεται με την ενεργοποίηση της μετάφρασης ενώ η αποαδενυλίωση με τη σιγή της μετάφρασης (Piccioni *et al.*, 2005).

Σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση μιας συντονισμένης πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ωρίμανσης φαίνεται να παίζει η διαμερισματοποίηση του κυτταροπλάσματος του ωοκυττάρου (Combelles και Albertini, 2001). Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα και η κατανομή των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα μπορεί να αποτελέσει έναν εύκολα ανιχνεύσιμο δείκτη κυτταροπλασματικής διαμερισματοποίησης. Τα μιτοχόνδρια, τα οποία κληρονομούνται από τη μητέρα, ελέγχουν την παραγωγή ενέργειας και το μεταβολισμό επηρεάζοντας την ανάπτυξη του εμβρύου (Maro *et al.*, 1986). Το σχήμα και η μεσοκυττάρια κατανομή των μιτοχονδρίων είναι γνωστό ότι σχετίζονται με το επίπεδο του μεταβολισμού, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του κυττάρου για την παραγωγή απαραίτητης ενέργειας, η οποία απαιτείται σε κρίσιμες περιόδους του κυτταρικού κύκλου (Matsumoto *et al.*, 1998).

Το μοτίβο της κατανομής των μιτοχονδρίων και η μεταβολική τους δραστηριότητα αλλάζουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, όπως έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένων των ποντικών (Van Blerkom και Runner, 1984, Calarco, 1995), των βοοειδών (Stojkovic *et al.*, 2001), του ανθρώπου (Wilding *et al.*, 2001) και του χοίρου (Sun *et al.*, 2001). Η μεταφορά των μιτοχονδρίων εντός διαφορετικών περιοχών του κυττάρου διαμεσολαβείται από ένα κυτταροσκελετικό δίκτυο μικροσωληνίσκων (Van Blerkom, 1991). Σε ωκύτταρα χοίρου τα οποία εκτέθηκαν σε πολυχλωριωμένες διφαινόλες παρατηρήθηκε εκτεταμένη αλλαγή στη μετεγκατάσταση των μιτοχονδρίων κατά την ωρίμανση, η οποία συνδέθηκε με έλλειψη δικτύου μικροσωληνίσκων στο κυτταρόπλασμα (Brevini *et al.*, 2004). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι ωκύτταρα που εκτέθηκαν σε πολυχλωριωμένες διφαινόλες δεν εμφάνισαν μοτίβο διάχυτης κατανομής μικροσωληνίσκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έλλειψη τέτοιου μοτίβου οφείλεται σε αδυναμία σχηματισμού δικτύου μικροσωληνίσκων παρά σε αδυναμία των μιτοχονδρίων να μεταναστεύσουν κατά μήκος των μικροσωληνίσκων (Brevini *et al.*, 2004).

Σε διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί φυσιολογικός σχηματισμός μικροσωληνίσκων στον πυρήνα ο οποίος επιτρέπει σωστό διαχωρισμό χρωμοσωμάτων κατά τη μειωτική διαίρεση και παράλληλα, έλλειψη δικτύου μικροσωληνίσκων στο κυτταρόπλασμα η οποία εμποδίζει τη σωστή μετεγκατάσταση των μιτοχονδρίων (Brevini *et al.*, 2004). Η τελευταία παρατήρηση υποδηλώνει ότι η ελαττωματική ικανότητα των ωκυττάρων να αναπτυχθούν οφείλεται στην αποσύνδεση της πυρηνικής από την κυτταροπλασματική ωρίμανση.

Αν η κυταροπλασματική ωρίμανση δεν λάβει χώρα κατάλληλα, το ωκύτταρο δεν θα μπορέσει να γονιμοποιηθεί και να αναπτυχθεί με επιτυχία (Thibault *et al.*, 1975, Thibault, 1977). Τα κοκκώδη κύτταρα που περιβάλλουν το ωκύτταρο είναι γνωστό ότι εκκρίνουν διάφορες ουσίες. Οι ουσίες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυταροπλασματική ωρίμανση. Ευεργετικές επιδράσεις των κοκκωδών κυττάρων έχουν αναφερθεί στην πρώιμη ανάπτυξη των ανθρώπινων ωκυττάρων (Kennedy και Donahue, 1969). Στα βοοειδή (Chian *et al.*, 1994) και τους χοίρους (Mattioli *et al.*, 1988), η δημιουργία αρσενικού προπυρήνα εντός του γονιμοποιημένου ωκυττάρου εξαρτάται από την παρουσία κοκκωδών κυττάρων κατά την ωρίμανση. Τα αποτελέσματα αυτά

υποδεικνύουν ότι η ικανότητα για σχηματισμό αρσενικού προπυρήνα αποκτάται στα προχωρημένα στάδια της ωοθυλακιογένεσης. Η σύνθεση των πρωτεϊνών παρουσιάζει διαφορετικό μοτίβο μεταξύ των ωοκυττάρων με κοκκώδη και των ωοκυττάρων χωρίς κοκκώδη (Chian και Sirard, 1995).

Η διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο οδηγεί σε δύο σημαντικά γεγονότα, τα οποία σηματοδοτούν την ενεργοποίηση και την είσοδο του ωοκυττάρου στο πρόγραμμα της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το ενεργοποιημένο ωοκύτταρο προκαλεί την εξωκύττωση φλοιωδών κυστιδίων για την αποφυγή της πολυσπερμίας καθώς και την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης ώστε να ξεκινήσει η πρώτη εμβρυϊκή μίτωση. Εκσεσημασμένη αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  στο ωοκύτταρο μεσολαβεί και τα δύο αυτά γεγονότα (Kline και Kline, 1992, Whitaker και Swann, 1993). Η ικανότητας του ωοκυττάρου να ελευθερώνει ιόντα ασβεστίου σε απάντηση των σπερματοζωαρίων είναι ένα σημαντικό βήμα στην ωρίμανση των ωοκυττάρων (για ανασκόπηση βλ. Carroll *et al.*, 1996).

### ***In vitro* ωρίμανση ωοκυττάρων**

Η πρώτη αναφορά των Pincus και Enzmann (1935) στην ικανότητα των ωοκυττάρων κουνελιών να ωριμάσουν αυθόρμητα και να γονιμοποιηθούν ενώ ευρίσκοντο σε καλλιεργητικό μέσο -μετά την αφαίρεση τους από το φυσιολογικό ωοθηκικό τους περιβάλλον- καθώς και η μετέπειτα παρόμοια αναφορά του Edwards σε ανθρώπινα ωοκύτταρα (1965) αποτέλεσαν τη βάση για την εφαρμογή της *in vitro* ωρίμανσης ωοκυττάρων σε κλινικό πλαίσιο, ώστε να διασωθούν και να χρησιμοποιηθούν ανώριμα ωοκύτταρα τα οποία έχουν ανακτηθεί από κύκλους ωοθηκικής διέγερσης.

Εντούτοις, αυτά τα διασωθέντα ανώριμα ωοκύτταρα είναι συχνά απογυμνωμένα από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν, με σκοπό την εξακρίβωση της κατάστασης ωρίμανσης στην οποία βρίσκονται και, ως εκ τούτου, καλλιεργούνται απουσία των κυττάρων αυτών. Έρευνες έχουν δείξει ότι αυτή η τεχνική διάσωσης παράγει ωάρια και/ή

έμβρυα με περιορισμένη ικανότητα γονιμοποίησης και ανάπτυξης, αντίστοιχα (Schroeder και Eppig, 1984, De Vos *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2000). Η μειωμένη αναπτυξιακή ικανότητα αυτών των εμβρύων ήταν αναμενόμενο εύρημα, μια και είναι γνωστό ότι η μη επαρκής κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου επηρεάζει αρνητικά τη δημιουργία αρσενικού προπυρήνα, αυξάνοντας έτσι τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά τη γονιμοποίηση (Thibault *et al.*, 1975, DeScisciolo *et al.*, 2000, Nogueira *et al.*, 2000, Emery *et al.*, 2005).

Σήμερα, η τεχνολογία της *in vitro* ωρίμανσης ωοκυττάρων έχει απομακρυνθεί από την πρακτική της διάσωσης και χρησιμοποιείται για την εκ προθέσεως ανάκτηση ανώριμων ωοκυττάρων από μη διεγερμένα ή ελάχιστα διεγερμένα μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια και την καλλιέργεια αυτών σε κατάλληλο μέσο. Σε διάφορα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης έχουν επιτευχθεί εγκυμοσύνες με τη βοήθεια της *in vitro* ωρίμανσης των ανθρώπινων ωοκυττάρων (Veek *et al.*, 1983, Prins *et al.*, 1987, Cha *et al.*, 1991, 1992, Paulson *et al.*, 1994, Trounson *et al.*, 1994, Barnes *et al.*, 1995, 1996, Nagy *et al.*, 1996, Edirisinghe *et al.*, 1997, Jaroudi *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1997, Russell *et al.*, 1997). Είναι πλέον σαφές ότι η προσθήκη των γοναδοτροφινών (FSH, LH) στο μέσο καλλιέργειας είναι ωφέλιμη για την *in vitro* κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Η ποιότητα των ωαρίων αποτελεί τη βάση ενός προγράμματος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, καθώς ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι κλινικές εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι η αναγνώριση της κατάστασης των ωαρίων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ακριβώς επειδή τα ανώριμα ωοκύτταρα τα οποία έχουν ανακτηθεί μπορούν να μεταβούν αυθόρμητα σε μετάφαση II δεν σημαίνει ότι έχουν αναπτυξιακή ικανότητα. Απαιτείται προσεκτικός συγχρονισμός μεταξύ της ωρίμανσης του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος προκειμένου τα ωοκύτταρα να είναι ικανά να αναπτυχθούν. Σε αντίθεση με την πυρηνική, η κυτταροπλασματική ωρίμανση είναι πολύ πιο δύσκολο να εκτιμηθεί μικροσκοπικά και η μη ολοκληρωμένη ωρίμανση τείνει να διαπιστώνεται αργότερα βάση της μειωμένης ανάπτυξης των εμβρύων ή της αποτυχίας εμφύτευσης (Moor *et al.*, 1998).

Ένας από τους κύριους στόχους στην τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η ανάκτηση μεγάλου αριθμού ωαρίων. Στην τυποποιημένη εξωσωματική γονιμοποίηση χρησιμοποιούνται εξωγενώς χορηγούμενες γοναδοτροπίνες με σκοπό τη διάσωση μικρών ωοθυλακίων, η ανάπτυξη των οποίων διαφορετικά θα είχε ανασταλεί εξαιτίας του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Κατά την *in vitro* ωρίμανση των ωοκυττάρων, η επικρατούσα πρακτική επιβάλλει τα ανώριμα ωοκύτταρα να ανακτηθούν πριν δεχτούν αρνητικές ενδοκρινικές και παρακρινικές επιρροές από το αυξανόμενο κυρίαρχο ωοθυλάκιο (Anderiesz και Trounson, 1995, Baker και Spears, 1999). Ιδανικά, η ανάκτηση των ωοκυττάρων θα πρέπει να γίνεται κατά το χρονικό διάστημα της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου.

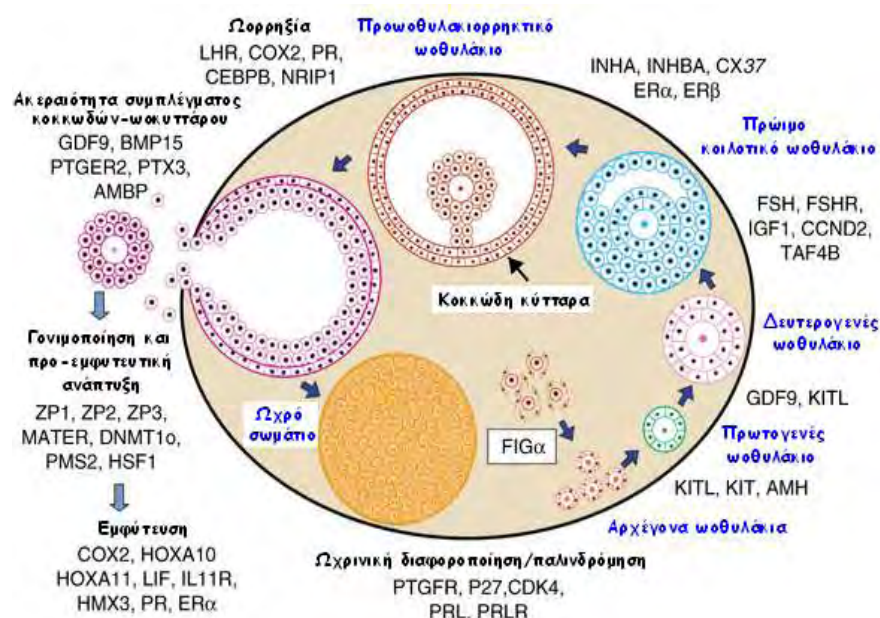
Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι τα ωοκύτταρα που βρίσκονται εντός κατώτερων ωοθυλακίων και στερούνται της FSH, υφίστανται μορφολογικές αλλαγές παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στα προ-ωορρηκτικά ωοκύτταρα μετά από έκθεση σε υψηλά επίπεδα LH (Assey *et al.*, 1994, Barnes και Sirard, 2000). Οι αλλαγές αυτές που παρατηρούνται σε κατώτερα ωοθυλάκια έχουν χαρακτηριστεί ως ψευδο-ωρίμανση δεδομένου ότι πυροδοτείται η επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης στα πρωτογενή ωοκύτταρα που υποβάλλονται σε ατρησία. Μπορεί να είναι κατά τα αρχικά στάδια αυτής της διαδικασίας που τα ανώριμα ωοκύτταρα αποκτούν την ικανότητα να ωριμάσουν και αποτελούν κατάλληλη πηγή ωοκυττάρων για *in vitro* ωρίμανση. Ως εκ τούτου, η χρονική στιγμή κατά την οποία ανακτώνται τα ανώριμα ωοκύτταρα φαίνεται να είναι κρίσιμης σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου αυτής.

Ο μηχανισμός που είναι απαραίτητος για την επίτευξη της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ωρίμανσης ενός ωοκυττάρου εξελίσσεται σταδιακά κατά την ανάπτυξη του κυττάρου (Picton *et al.*, 1998). Το ανθρώπινο ωοκύτταρο φτάνει το ώριμο μέγεθος του (100-120μm) στο στάδιο του κοιλοτικού ωοθυλακίου, ενώ το ίδιο το ωοθυλάκιο δεν έχει παρά ένα μέρος της τελικής διαμέτρου πριν την ωορρηξία (Moltik *et al.*, 1986). Η ικανότητα του ωοκυττάρου να επανεκκινήσει τη μειωτική διαίρεση φαίνεται να αποκτάται όταν το μέγεθος του ωοθυλακίου είναι μόλις στο 10% της υποτιθέμενης διαμέτρου που έχει κατά την ωορρηξία ή περίπου 2mm (Gilchrist *et al.*, 1995). Ως εκ τούτου, θεωρητικά, φαίνεται τα ανώριμα ωοκύτταρα τα οποία ανακτώνται από μικρά

κοιλοτικά ωοθυλάκια (2-3mm) να κατέχουν το μηχανισμό που απαιτείται ώστε να ολοκληρώσουν την ωρίμανση. Στην πράξη, έχει αποδειχθεί ότι η κατώτατη διάμετρος που μπορεί να έχει ένα ωοθυλάκιο για την παραγωγή ενός ικανού ωοκυττάρου είναι γύρω στα 5mm (Wygn *et al.*, 1998). Αν και η πραγματική διαδοχή των σημάτων τα οποία ενεργοποιούν την ωρίμανση των ωοκυττάρων που έχουν ανακτηθεί είναι άγνωστη, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση της πυρηνικής και της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης είναι πιθανό να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χρονική στιγμή κατά την οποία ανακτώνται τα ωοκύτταρα και το μέγεθος των ωοθυλακίων από τα οποία προέρχονται.

Οι μηχανισμοί που αφορούν την ωρίμανση των ωοκυττάρων *in vivo* και *in vitro* στα ζώα είναι περισσότερο γνωστοί από ότι στους ανθρώπους. Μελέτες σε μοντέλα βοοειδών έχουν δείξει ότι τα ωοκύτταρα που ανακτώνται από ωοθυλάκια τα οποία βρίσκονται σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μορίων μιτοχονδριακού mRNA σε σχέση με τα ωοκύτταρα που προέρχονται από λιγότερο ανεπτυγμένα ωοθυλάκια, συσχετιζόμενο με την καλή ποιότητα ανάπτυξης των εμβρύων (Lonergan *et al.*, 2003, Humblot *et al.*, 2005). Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες προερχόμενοι από το ωοκύτταρο που συμβάλλουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπως η Dnmt1 (DNA methyltransferase: DNA μεθυλτρανσφεράση 1, Σχήμα-7, Matzuk και Lamb, 2002, Albertini *et al.*, 2003). Πειραματικά δεδομένα σε ζώα υποδεικνύουν ότι η αστάθεια στο mRNA και η απουσία ή αφθονία ορισμένων μεταγραφημάτων στα κοκκώδη κύτταρα που προέρχονται από μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια μπορούν να αποτελέσουν μέσο πρόβλεψης για την ποιότητα των ωοκυττάρων (Zheng *et al.*, 2005, Calder *et al.*, 2003, 2005). Άλλα βασικά στοιχεία που έχουν περιγραφεί σε τρωκτικά, όπως η GDF-9 (growth differentiation factor-9: αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης-9) και η BMP-15 (bone morphogenetic protein-15: οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-15) συμμετέχουν σε διάφορες βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στα ωοκύτταρα ώστε να εξασφαλιστεί η φυσιολογική εξέλιξη των γεγονότων μετά τη μειωτική διαίρεση (Σχήμα-7, Matzuk και Lamb, 2002). Ο εντοπισμός της έκφρασης του mRNA τέτοιων γονιδίων-δεικτών και του προφίλ των πρωτεϊνών στα ωοκύτταρα πριν και μετά την *in vitro* ωρίμανση μπορεί να αποδειχτεί εξαιρετικά κατατοπιστικός ως προς το μέγεθος της επίδρασης των συνθηκών καλλιέργειας στην ευνοϊκή ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Ενώ πολλοί διαφορετικοί τύποι καλλιεργητικών μέσων κατάλληλων για την *in vitro* ωρίμανση ωοκυττάρων έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικές με τη συμβολή των μέσων αυτών στην επιτυχή έκβαση της τεχνικής της *in vitro* ωρίμανση ωοκυττάρων (Trounson *et al.*, 1994, 2001). Κάθε νέα γνώση που αποκτάται σχετικά με τους παράγοντες που ρυθμίζουν την ποιότητα των ωοκυττάρων μπορεί να εφαρμοστεί με σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου της *in vitro* ωρίμανσης των ωοκυττάρων και επομένως να παράσχει νέες δυνατότητες για τη θεραπεία της υπογονιμότητας. Μέχρι στιγμής, τα ποσοστά επιτυχίας στους ανθρώπους είναι πολύ χαμηλότερα από ότι στα ζώα, γεγονός που έχει περιορίσει την ευρεία κλινική εφαρμογή της μεθόδου αυτής. Τα ποσοστά επιτυχίας βελτιώνονται με το χρόνο. Περαιτέρω βελτίωση στην αποδοτικότητα της *in vitro* ωρίμανσης των ωοκυττάρων μπορεί να φέρει επανάσταση στην τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, καθώς κύκλοι *in vitro* γονιμοποίησης σε συνδυασμό με *in vitro* ωρίμανση θα μπορούσαν να αποτελέσουν την πρώτη γραμμή θεραπείας της ανθρώπινης υπογονιμότητας (Chian *et al.*, 2004, Edwards, 2007).



Τροποποίηση από Matzuk και Lamb, 2002

**Σχήμα-7:** Βασικές πρωτεΐνες που λειτουργούν σε διάφορα στάδια του σχηματισμού των ωοθυλακίων, στην ωοθυλακιογένεση, την ωορρηξία και σε γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την ωορρηξία.

## Πλεονεκτήματα της *in vitro* ωρίμανσης

Εμφανή πλεονεκτήματα της *in vitro* ωρίμανσης ωοκυττάρων απορρέουν από τα μειονεκτήματα των εξωγενώς χορηγούμενων γοναδοτροπινών που χρησιμοποιούνται σε κύκλους διέγερσης και τα υψηλά ποσοστά υπογόνιμων ασθενών οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται καλά στις θεραπείες εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τα μειονεκτήματα αυτά περιλαμβάνουν:

- Το κόστος των γοναδοτροπινών
- Τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών
- Τη σωματική ταλαιπωρία, το χρόνο και το κόστος που απαιτούνται για την εναλλασσόμενη ή καθημερινή παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovary syndrome: PCOS) είναι μία από τις πιο συνηθισμένες διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας. Οι γυναίκες με PCOS συχνά εμφανίζουν ανωοθυλακιωρηκτική υπογονιμότητα, η οποία σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορεί να αμβλυνθεί με τη θεραπεία γοναδοτροπινών. Σε ασθενείς με PCOS στις οποίες η χορήγηση γοναδοτροπινών διεγείρει την ωοθυλακιογένεση με επιτυχία, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Bergh και Navot, 1992).

Κατά μέσο όρο, περίπου το 15% των περιπτώσεων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ακυρώνονται λόγω ακατάλληλης διέγερσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εάν δεν μπορεί να βρεθεί κατάλληλη αγωγή, πολλές φορές η μόνη άλλη επιλογή είναι η δωρεά ωαρίων. Αυτή η ομάδα ασθενών μπορεί επίσης να επωφεληθεί από την ωρίμανση των ωοκυττάρων *in vitro*.

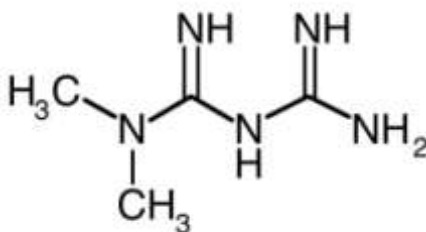
Τέλος, νέες γυναίκες που υποβάλλονται σε αντικαρκινική θεραπεία, ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία, συχνά χάνουν τη λειτουργικότητα των γονάδων και τη γονιμότητα τους εξαιτίας ιατρογενούς υπογοναδισμού. Με βάση τα αυξανόμενα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο είναι εύκολο να αναγνωρίσουμε ότι πολλές από αυτές θα επιθυμούσαν να αποκτήσουν παιδιά μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας τους. Αυτό αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για προσδιορισμό μέσων κρυοσυντήρησης ωοκυττάρων και



ωοθηκικού ιστού. Η προοπτική απομόνωσης ανώριμων ωοκυττάρων, κατάψυξη τους και αργότερη απόψυξη σε συνδυασμό με *in vitro* ωρίμανση και γονιμοποίηση είναι ελκυστική.

## Μετφορμίνη

Η μετφορμίνη (Σχήμα-8) ένα παράγωγο της διγουανίδης, είναι ένα ευρέως συνταγογραφούμενο φάρμακο που χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Matthaei *et al.*, 1991, Bailey, 1997, Hundal και Inzucchi, 2003, Leverne *et al.*, 2003) και στη θεραπεία του PCOS (Nardo και Rai, 2001, Lord *et al.*, 2003). Σε γυναίκες με PCOS, η θεραπεία με μετφορμίνη αυξάνει το ρυθμό ωορρηξίας, βελτιώνει την έμμηνο περιοδικότητα και μειώνει τα επίπεδα των ανδρογόνων στο αίμα και το ποσοστό των αποβολών (Velazquez *et al.*, 1997, Vandermolen *et al.*, 2001, Jakubowicz *et al.*, 2002, Neveu *et al.*, 2007).



**Σχήμα-8:** Δομή μετφορμίνης.

Οι κύριες δράσεις της μετφορμίνης είναι η αναστολή της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και η μείωση αντίστασης στην ινσουλίνη από περιφερικούς ιστούς, οδηγώντας σε αυξημένη πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης από τους σκελετικούς μυς (Bailey, 1992, Scheen, 1997). Οι δράσεις αυτές της μετφορμίνης, μειώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης και της ινσουλίνης στην κυκλοφορία βελτιώνοντας την μακροχρόνια ρύθμιση της γλυκόζης και μειώνοντας την περίπτωση επιπλοκών που συνδέονται με το διαβήτη. Η μετφορμίνη

είναι ένα φθινό και ασφαλές φάρμακο, με μικρές γαστρεντερικές ενοχλήσεις, με πιο κοινή την τοξικότητα. Η πιο σοβαρή τοξικότητα είναι η γαλακτική οξέωση που εμφανίζεται σε 3/100.000 ασθενείς, ο κίνδυνος της οποίας μειώνεται σημαντικά αν η μετφορμίνη αποφεύγεται σε ασθενείς με ηπατική, καρδιακή και νεφρική ανεπάρκεια και σε ασθενείς ηλικίας άνω των 80 ετών.

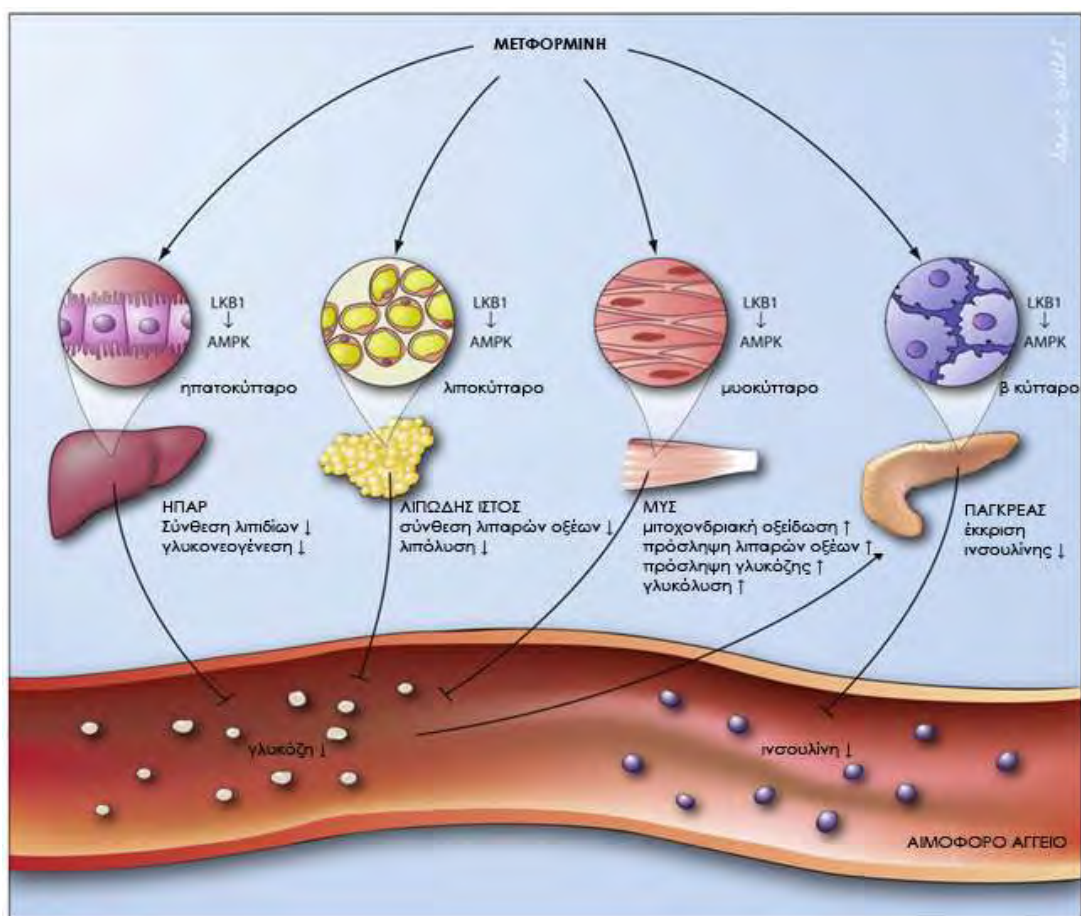
### **Μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης**

Ο κύριος διαμεσολαβητής της δράσης της μετφορμίνης ως παράγοντας μείωσης της γλυκόζης και της ινσουλίνης είναι η AMPK [AMP-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη), Σχήμα-9] μέσω ενεργοποίησης της ανωφερούς LKB1 (liver kinase B1: ηπατική κινάση B1), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της γλυκονεογένεσης (Shaw *et al.*, 2005). Η AMPK είναι ο κεντρικός αισθητήρας των επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο, ο οποίος ανταποκρίνεται στην αύξηση του λόγου AMP/ATP (adenosine monophosphate/adenosine triphosphate: μονοφωσφορική/τριφωσφορική αδενοσίνη, Stapleton *et al.*, 1996, Carling, 2004, Hardie, 2004, Hardie *et al.*, 2003).

Το σύστημα της AMPK ενεργοποιείται από φαρμακολογικά στρες που προκαλούνται στο κύτταρο και εξαντλούν την ATP, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολικών δηλητηρίων και παραγόντων αποσύζευξης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η AMPK ενεργοποιείται επίσης από παθολογικές συνθήκες που προκαλούν στρες, όπως είναι η έλλειψη γλυκόζης, η ισχαιμία, η υποξία, το οξειδωτικό στρες και το υπεροσμωτικό στρες. Με εξαίρεση το τελευταίο (Fryer *et al.*, 2002) όλα τα προηγούμενα συνδέονται με αύξηση του λόγου AMP/ATP. Κατά συνέπεια η ενεργοποίηση της AMPK οδηγεί στην αναστολή των διαδικασιών που καταναλώνουν ενέργεια και την προαγωγή των διαδικασιών που παράγουν ενέργεια με αποτέλεσμα την αποκατάσταση των επιπέδων της ATP (Σχήμα-9, Towler και Hardie, 2007).

Ένα μεταβολικό στρες που ενεργοποιεί την AMPK υπό φυσιολογικές συνθήκες αυξάνοντας την κατανάλωση της ATP είναι η άσκηση (Winder και Hardie, 1996) ή η

συστολή στους σκελετικούς μυς (Hutber *et al.*, 1997). Ο βαθμός ενεργοποίησης της AMPK στην περίπτωση αυτή εξαρτάται από την ένταση της άσκησης και πιστεύεται ότι προκαλείται από τις αλλαγές του λόγου AMP/ATP και κρεατίνης/φωσφοκρεατίνης (για ανασκόπηση βλ. Aschenbach *et al.*, 2004). Ωστόσο, η άσκηση ενεργοποιεί επίσης την AMPK στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό, το οποίο προκαλείται εν μέρει από την απελευθέρωση μορίων από τους μυς όπως είναι η ιντερλευκίνη 6 (Kelly *et al.*, 2004).



Τροποποίηση από Jalving *et al.*, 2010

**Σχήμα-9:** Επίδραση της μετφορμίνης σε φυσιολογικούς ιστούς ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. LKB1 (liver kinase B1: ηπατική κινάση B1). AMPK (AMP-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη). Η μετφορμίνη ενεργοποιεί την LKB1 η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την AMPK καταλήγοντας σε διαφορετικές δράσεις σε ποικίλους ιστούς. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των επιδράσεων είναι η προς τα κάτω ρύθμιση των διαδικασιών που καταναλώνουν ενέργεια και η προς τα πάνω ρύθμιση των διαδικασιών που παράγουν ενέργεια έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα.

Ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια ρύθμισης της ανάπτυξης που ελέγχεται από την AMPK είναι αυτό του mTOR (mammalian target of rapamycin: στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά) και τα κατωφερή του υποστρώματα, όπως η S6K1 (ribosomal S6 kinase: S6 ριβοσωμική κινάση, Shaw *et al.*, 2004). Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει την πρωτεϊνική μετάφραση ρυθμιστών της ανάπτυξης των κυττάρων όπως είναι η κυκλίνη D1 και ο HIF-1α (hypoxia inducible factor-1α: ο παράγοντας που επάγεται από την ισχαιμία-1α), οι οποίοι ελέγχουν διαδικασίες όπως είναι η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, η ανάπτυξη των κυττάρων και η αγγειογένεση (Guertin και Sabatini, 2007). Σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 η ενεργοποίηση της AMPK από την μετφορμίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μερική αναστροφή των μεταβολικών διαταραχών, όπως είναι η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη.

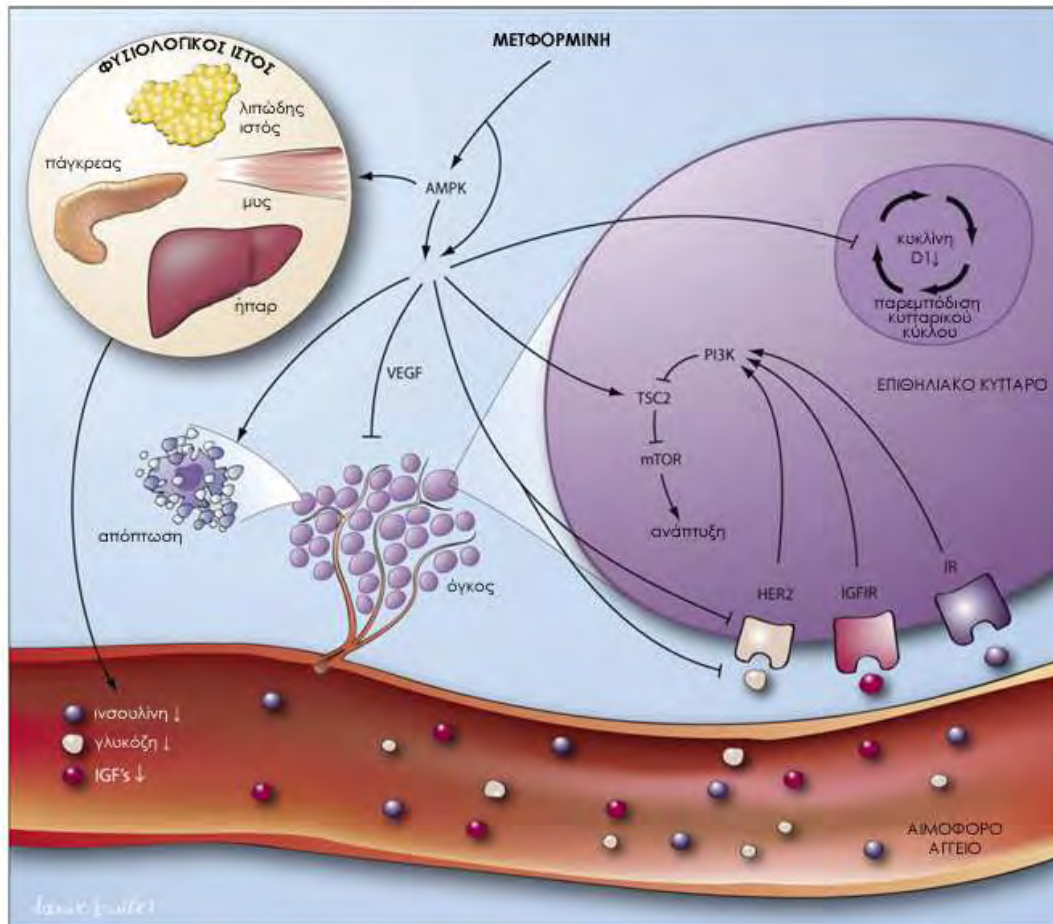
#### ***Η μετφορμίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας: πιθανοί μηχανισμοί δράσης***

Η διαλεύκανση του ρόλου της AMPK στο μεταβολισμό, σε συνδυασμό με ολόένα και περισσότερες ενδείξεις οι οποίες συνδέουν τις σχετιζόμενες με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μεταβολικές ανωμαλίες με τον καρκίνο (Maatela *et al.*, 1994, Everhart και Wright, 1995, Weiderpass *et al.*, 1997, Hu *et al.*, 1999, Saydah *et al.*, 2003, Michels *et al.*, 2003) οδήγησαν στην υπόθεση ότι η μετφορμίνη έχει πιθανά αντικαρκινική δράση (Evans *et al.*, 2005, Bowker *et al.*, 2006). Μια σειρά από μελέτες υποδεικνύουν ότι η μείωση της ινσουλίνης, του IGF-I (insulin-like growth factor 1: αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης 1), και της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα HER-2 (human epithelial growth factor receptor 2: ανθρώπινος υποδοχέας του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2) αποτελούν μερικούς από τους σημαντικότερους αντικαρκινικούς μηχανισμούς δράσης της μετφορμίνης. Επίσης, στους μηχανισμούς αυτούς συγκαταλέγονται η αναστολή της αγγειογένεσης, η αναστολή της σηματοδότησης μέσω του mTOR καθώς επίσης και η παύση του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση (Σχήμα-10).

### *Αναστολή της ανάπτυξης του κυττάρου*

Η μετφορμίνη αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Ben Sahra *et al.*, 2008, Alimona *et al.*, 2009). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Alimona και τους συνεργάτες του (2009) η μετφορμίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μειώνει το σχηματισμό αποικιών και προκαλεί μερική διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση σε ποικίλες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Ενώ, σύμφωνα με τον Ben Sahra και τους συνεργάτες του (2008) η μετφορμίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στην G0/G1 φάση και μειώνει την πιθανότητα επιβίωσης κυτταρικών σειρών καρκίνου προστάτη κατά 50%. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η μετφορμίνη ενισχύει τη δράση του χημειοθεραπευτικού σισπλατίνη σε κυτταρικές σειρές OVCAR-3 και OVCAR-4 γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή συνδυαστική της χρήση κατά τη χημειοθεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών (Gotlieb *et al.*, 2008).

Επιπλέον, η αποικοδόμηση του mRNA της AMPK με τη βοήθεια μικρών RNA παρεμβολής (small interfering RNAs) ή η παρουσία αναστολέων της AMPK αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη, αποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο της AMPK (Zakikhani *et al.*, 2006). Η έκφραση της LKB1 είναι ουσιαστικής σημασίας για την ενεργοποίηση της AMPK από τη μετφορμίνη. Η μετφορμίνη δεν αναστέλλει την ανάπτυξη σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την LKB1, επιβεβαιώνοντας την απαίτηση για λειτουργική (functional) LKB1 από την ενεργοποίηση της AMPK μέσω της μετφορμίνης (Zakikhani *et al.*, 2006).



Τροποποίηση από Jalving et al., 2010

**Σχήμα-10:** Αντικαρκινικές δράσεις της μετφορμίνης. IGF-I (insulin-like growth factor 1: αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης 1). IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor: υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης-1). IR (insulin receptor: υποδοχέας ινσουλίνης). VEGF (vascular endothelial growth factor: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας). AMPK (AMP-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη)). HER2 (human epidermal growth factor receptor 2: υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2). PI3K (phosphoinositide 3-kinase: κινάση της φωσφοινοσιτόλης 3). TSC2 (tuberous sclerosis complex 2: σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης 2). mTOR (mammalian target of rapamycin: στόχος της ραπαμικίνης στα θηλαστικά). Η μετφορμίνη ενεργοποιεί την AMPK στο συκώτι, τους μύες, το λιπώδη ιστό και το πάγκρεας μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της ινσουλίνης και του IGF-I. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε μείωση της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού ανάπτυξης μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Η μετφορμίνη, μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων ή μη-εξαρτώμενων της AMPK μπορεί να έχει διάφορες αντικαρκινικές δράσεις. Πρώτον, η μετφορμίνη μπορεί να αναστείλει τη σηματοδότηση του mTOR μέσω φωσφορυλίωσης και σταθεροποίησης του TSC2. Δεύτερον, η μετφορμίνη μπορεί να καταστείλει την πρωτεϊνική έκφραση του HER2 και να αναστείλει την ενεργοποίηση της HER2 πρωτεϊνικής κινάσης με αποτέλεσμα να μειωθεί η σηματοδότηση μέσω κατωφερών μονοπατιών. Τρίτον, η μετφορμίνη μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του VEGF με αποτέλεσμα την αναστολή της αγγειογένεσης. Τέταρτον, η μετφορμίνη μπορεί να επάγει την απόπτωση μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων ή μη-εξαρτώμενων του p-53. Τέλος, η μετφορμίνη μπορεί να παρεμποδίσει την παύση τον κυτταρικό κύκλο, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω μείωσης στην έκφραση της κυκλίνης D1.

### *Σηματοδότηση μέσω του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης*

Η μετφορμίνη μέσω της επίδρασης της στην ομοιόσταση της γλυκόζης, αναστρέφει την υπερινσουλιναιμία τόσο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 όσο και σε μη-διαβητικούς ασθενείς και μπορεί να έχει αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις μέσω αυτού του μηχανισμού (Goodwin *et al.*, 2008). Μέσω της επίδρασης της μετφορμίνης στα επίπεδα της ινσουλίνης και τα επίπεδα των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την ινσουλίνη μπορεί έμμεσα να μειώσει και τα επίπεδα της IGF-I (Σχήμα-10, Pollak, 2008). Επιπλέον, η μετφορμίνη μπορεί να μειώσει τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού του IGF, αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση του IRS-1 (insulin receptor substrate-1: υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-1) στη σερίνη-794 με αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης του μορίου σε υπολείμματα τυροσίνης (Ning και Clemmons, 2010) και συνέπεια τη διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ ινσουλίνης/IGF-I υποδοχέων και των συστημάτων των υποδοχέων που συνδέονται με τις G-πρωτεΐνες (Rozengurt *et al.*, 2010).

### *Έκφραση και σηματοδότηση του HER-2 (erbB-2)*

Ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER-2) υπερεκφράζεται σε περίπου 20% των καρκίνων του μαστού και αποτελεί σημαντικό παράγοντα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Έχει διαπιστωθεί ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία φέρουν το HER-2 ογκογονίδιο και κατά συνέπεια εμφανίζουν αυθόρμητη ανάπτυξη όγκων μαστού η μετφορμίνη όχι μόνο καθυστερεί την ανάπτυξη των όγκων αλλά ακόμα και όταν οι όγκοι αυτοί εμφανίζονται έχουν μικρότερο μέγεθος (Anisimov *et al.*, 2005, 2008). Επιπλέον, η μετφορμίνη μειώνει την έκφραση της HER-2 πρωτεΐνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού μέσω της αναστολής της mTOR (Vazquez-Martin *et al.*, 2009<sup>a</sup>). Παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι η μετφορμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει τη δράση του HER-2 ως κινάση (Σχήμα-10). Η ενεργοποίηση της AMPK επιτρέπει στα καρδιακά κύτταρα να επιβιώσουν στις τοξικές

επιδράσεις της αντι-HER-2 θεραπείας (Shell *et al.*, 2008, Vazquez-Martin *et al.*, 2009<sup>b</sup>). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι συνδυαστική θεραπεία με χορήγηση μετφορμίνης και παραγόντων που στοχεύουν/αναστέλλουν τον HER-2 μπορεί να έχει συνεργιστικά αποτελέσματα.

### *Αγγειογένεση και φλεγμονή*

Η αναστολή της αγγειογένεσης είναι ένας ακόμα προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της μετφορμίνης (Σχήμα-10). Η μετφορμίνη μειώνει τα αγγειογενετικά σήματα στον ορό των ασθενών με PCOS που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη και επίσης μειώνει τα επίπεδα του VEGF (vascular endothelial growth factor: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) σε παχύσαρκους ασθενείς με διαβήτη (Ersoy *et al.*, 2008).

Επιπλέον, κλινικές μελέτες σε μη-παχύσαρκους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στους οποίους δεν είχε ποτέ χορηγηθεί ινσουλίνη έχουν δείξει ότι η μετφορμίνη μειώνει σημαντικά τα επίπεδα διαφόρων μη-γλυκαιμικών βιοδεικτών που σχετίζονται με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (Lund *et al.*, 2008). Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο TNF-α (tumour necrosis factor alpha: παράγοντας νέκρωσης όγκων-α), το ιστοειδικό αντιγόνο του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue-type plasminogen activator antigen), το αντιγόνο του αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (plasminogen activator inhibitor-1 antigen), και ο παράγοντας von Willebrand (Lund *et al.*, 2008).

### *Απόπτωση και p53*

Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA. Η έκφραση του p53 στο λιπώδη ιστό φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, η οποία ως γνωστό εμπλέκεται σε σχετιζόμενες με την ηλικία καρδιαγγειακές και μεταβολικές διαταραχές.



Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε σε ζωικό μοντέλο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ότι δίαιτα υψηλής θερμιδικής αξίας προκαλεί συσσώρευση οξειδωτικού στρες στο λιπώδη ιστό και επάγει αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία όπως η αυξημένη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης, η αυξημένη έκφραση του p53 και η αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών (Minamino *et al.*, 2009).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η AMPK, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το p53 προκαλώντας αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα που αντιμετωπίζουν χαμηλές θρεπτικές συνθήκες (Thoreen και Sabatini, 2005). Η συσχέτιση αυτή της AMPK με το p53 και την απόπτωση επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και με τη συνδυασμένη χορήγηση μετφορμίνης και 2-δεοξυ-γλυκόζης σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (Σχήμα-10, Ben Sahra *et al.*, 2010).

Η επαγωγή της απόπτωσης από τη μετφορμίνη είναι ένας ενδιαφέρων μηχανισμός δράσης της, αλλά οι συνθήκες κάτω από τις οποίες συμβαίνει πρέπει να προσδιοριστούν. Η έκφραση του p53 στο λιπώδη ιστό εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη και κατά συνέπεια η επαγόμενη από τη μετφορμίνη έκφραση του p53 αναμένεται να αυξήσει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η μη-αποπτωτική δράση της μετφορμίνης επί της επαγόμενης από το p53 αντίστασης στην ινσουλίνη δεν έχει περιγραφεί, αν υπάρχει, το γεγονός αυτό πιθανά συγκαλύπτεται από την εκσεσημασμένη μείωση στην αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία οφείλεται στη βελτίωση της μετάδοσης σήματος μέσω των υποδοχέων ινσουλίνης.

### *Παύση του κυτταρικού κύκλου*

Η παύση του κυτταρικού κύκλου είναι ένας ακόμα πιθανός μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης της μετφορμίνης (Σχήμα-10). Έκθεση ανθρώπινων καρκινικών σειρών προστάτη σε μετφορμίνη είχε ως αποτέλεσμα τη δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού τους, η οποία συνοδεύτηκε από ισχυρή μείωση της έκφρασης της κυκλίνης-D1, φωσφορυλίωση της pRb και αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p27 (Ben Sahra *et al.*, 2008). Γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν επίσης δείξει ότι η μετφορμίνη όχι μόνο ρυθμίζει

προς τα κάτω γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη σύνθεση μακρομορίων (ριβοσωμικές πρωτεΐνες) αλλά καταστέλλει επίσης πολλαπλές οικογένειες γονιδίων όπως αυτές των τουμπουλινών, των ιστονών και των κινασών *aurora*, οι οποίες ως γνωστό σχετίζονται με τη μίτωση (Oliveras-Ferran *et al.*, 2009).

Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται προκειμένου να προσδιοριστεί η σημασία αυτού του μηχανισμού δράσης της μετφορμίνης σε μια ποικιλία ανθρώπινων όγκων, δεδομένου ότι η παύση του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από τη μετφορμίνη απαιτεί την παρουσία αναστολέων κινασών που εξαρτώνται από την κυκλίνη, οι οποίοι σε πολλούς καρκίνους εκλείπουν ή ρυθμίζονται προς τα κάτω.

#### *Αναστολή στο μονοπάτι του mTOR*

Το μεγαλύτερο μέρος της ανασταλτικής δράσης της μετφορμίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων διαμεσολαβείται μέσω της αναστολής του μονοπατιού του παράγοντα mTOR (Σχήμα-10, Zakikhani *et al.*, 2006, βλ. επόμενο κεφάλαιο). Η ενεργοποίηση της AMPK από τη μετφορμίνη έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και σταθεροποίηση του TSC2 (tuberous sclerosis complex 2: σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης 2) γνωστού και ως τουμπερίνη (tuberin), το οποίο ολοκληρώνει ρυθμιστικά σήματα και τα μεταδίδει στον mTOR. Αυτά τα ρυθμιστικά σήματα περιλαμβάνουν μονοπάτια σηματοδότησης εξαρτώμενα από αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι το μονοπάτι της PI3K (phosphoinositide 3-kinase: κινάση της φωσφοινοσιτόλης 3) και της MAPK (mitogen-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση η οποία ενεργοποιείται από τη μίτωση) και σήματα εξαρτώμενα από το οξυγόνο (Inoki *et al.*, 2003).

Ο mTOR φωσφορυλιώνει κατωφερείς διαμεσολαβητές που οδηγούν στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της ανάπτυξης των κυττάρων και της αγγειογένεσης. Στους περισσότερους ανθρώπινους καρκίνους η σηματοδότηση του mTOR αυξάνεται και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής μετάφρασης που εξαρτάται από αυτόν σχετίζεται με πρόοδο της κακοήθειας, δυσμενή πρόγνωση και αντοχή τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και τη στοχευμένη θεραπεία, όπως για παράδειγμα αυτή με τη χρήση

του φαρμάκου trastuzumab (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HER2 υποδοχέα, Morgensztern και McLeod, 2005).

## mTOR

### *Δίκτυο σηματοδότησης του mTOR*

Στη δεκαετία του 1970, σε δείγμα εδάφους από το Νησί του Πάσχα βρέθηκε να περιέχεται ένα βακτηριακό στέλεχος, τον *Streptomyces hygroscopicus*, το οποίο παράγει έναν ισχυρό αντιμυκητιακό μεταβολίτη. Ο μεταβολίτης αυτός απομονώθηκε και διαπιστώθηκε ότι είναι μια μακροκυκλική λακτόνη, η οποία πήρε το όνομα ραπαμυκίνη, από το όνομα της περιοχής που ανακαλύφθηκε. Αργότερα, η ραπαμυκίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στα θηλαστικά και ότι έχει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Αυτές οι ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις οδήγησαν σε περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον τρόπο δράσης της ραπαμυκίνης.

Βιοχημικές μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών οδήγησαν στη ταυτοποίηση και την κλωνοποίηση του mTOR (για ανασκόπηση βλ. Fingar και Blenis, 2004, Hay και Sonenberg, 2004). Μέχρι σήμερα, κάθε ευκαρυωτικό γονιδίωμα που εξετάστηκε περιέχει γονίδιο για τον TOR. Σε αντίθεση με τους ζυμομύκητες, οι οποίοι σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν δύο γονίδια TOR, οι ανώτεροι οργανισμοί διαθέτουν μόνο ένα (Crespo και Hall, 2002, Lee *et al.*, 2005<sup>a</sup>, Crespo *et al.*, 2005).

### *Ο TOR ως κεντρικός ρυθμιστής της ανάπτυξης του κυττάρου*

Η αύξηση των κυττάρων (συσσώρευση της μάζας) είναι μια ευρέως συντονισμένη διαδικασία που ρυθμίζεται τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο. Παρουσία θρεπτικών

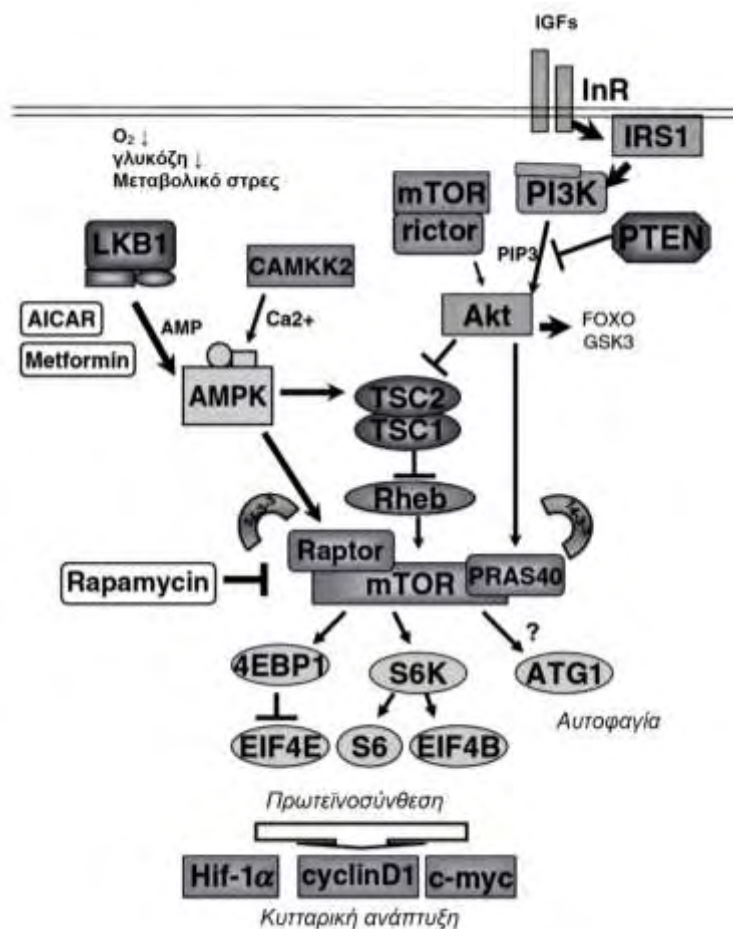
στοιχείων και κατάλληλων ερεθισμάτων ανάπτυξης, τα κύτταρα αυξάνουν τη σύνθεση μακρομορίων και έτσι αυξάνονται σε μέγεθος και μάζα. Η ανάπτυξη των κυττάρων υπόκειται σε περιορισμό χώρου, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι πολλά κύτταρα δεν αναπτύσσονται ισοτροπικά αλλά εναποθέτουν μάζα σε συγκεκριμένα σημεία. Μελέτες σε ζυμομύκητες έχουν δείξει ότι ο TOR εκτελεί δύο βασικές λειτουργίες στον οργανισμό: ο TORC1 (ευαίσθητος στην ραπαμυκίνη) ρυθμίζει το πότε ένα κύτταρο αναπτύσσεται και ο TORC2 (χωρίς ευαισθησία στην ραπαμυκίνη) ρυθμίζει το που αυτό το κύτταρο αναπτύσσεται (για ανασκόπηση βλ. Loewith και Hall, 2004).

Όταν οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη, ο TOR είναι ενεργός και τα κύτταρα του ζυμομύκητα διατηρούν υψηλό ρυθμό βιογένεσης ριβοσωμάτων, έναρξης μετάφρασης και ενσωμάτωσης θρεπτικών συστατικών. Ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα ζυμομύκητα στα οποία χορηγείται ραπαμυκίνη, στερούνται θρεπτικών υλικών ή δεν διαθέτουν τόσο τον TOR1 όσο και TOR2 μειώνουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών, αυξάνουν την μακρο-αυτοφαγία και ενεργοποιούν διάφορους παράγοντες μεταγραφής που απαντούν στο στρες. Έτσι, όταν το επιτρέψουν οι συνθήκες για ανάπτυξη, η ευαίσθητη στην ραπαμυκίνη σηματοδότηση μέσω TOR προάγει τις αναβολικές διεργασίες στο κύτταρο και παρεμποδίζει τις καταβολικές.

### ***Ρυθμιστές προς τα πάνω του TOR στο δίκτυο σηματοδότησης***

Ο TOR ολοκληρώνει διάφορα σήματα ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, τα κυριότερα των οποίων είναι τα εξής (Σχήμα-11):

- οι αυξητικοί παράγοντες
- τα θρεπτικά συστατικά
- η ενέργεια
- το στρες



Shaw, 2009

**Σχήμα-11:** Θρεπτικά στοιχεία και αυξητικοί παράγοντες συγκλίνουν στη ρύθμιση του mTORC1 στα κύτταρα των θηλαστικών - Μοντέλο του δικτύου σηματοδότησης του mTOR.

### Αυξητικοί παράγοντες

Το μονοπάτι του mTOR ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες μέσω του μονοπατιού της PI3K (Σχήμα-11). Η δέσμευση της ινσουλίνης ή αυξητικών παραγόντων τύπου ινσουλίνης (IGFs) στους υποδοχείς τους οδηγεί στην ενεργοποίηση και τη φωσφορυλίωση του IRS και στην επακόλουθη ενεργοποίηση της PI3K. Η δεσμευμένη στην IRS PI3K, μετατρέπει την PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-phosphate: 4,5-φωσφορική φωσφατίδυλο ινοσιτόλη) στην κυτταρική μεμβράνη σε PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate: 3,4,5-φωσφορική φωσφατίδυλο ινοσιτόλη). Η συσσώρευση της PIP3 παρεμποδίζεται από τη λιπιδιακή φωσφατάση PTEN (phosphate

and tensin homolog: ομόλογο φωσφόρου και τενσίνης/τασίνης). Η PIP3 στρατολογεί το PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1: ισοένζυμο 1 της πυρουβικής αφυδρογονάσης κινάσης) και την Akt/PKB (Akt/protein kinase B: Akt/πρωτεϊνική κινάση B) στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της Akt/PKB από το PDK1. Ο mTOR εμπλέκεται στο μονοπάτι της PI3K μέσω του TSC1 (hamartin) και του TSC2. Το TSC1 και το TSC2 δρουν ως ένα ετεροδιμερές το οποίο ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση του mTOR. Το TSC2 φωσφορυλιώνεται και αδρανοποιείται από την Akt σε απάντηση στην ινσουλίνη (για ανασκόπηση βλ. Manning, 2004).

Το TSC2 δρα ως GAP (GTPase-activating protein: πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί την GTPάση) για το Rheb (ras homolog enriched in brain: ομόλογο της ras πλούσιο στον εγκέφαλο, για ανασκόπηση βλ. Li *et al.*, 2004). Το Rheb δεσμεύει άμεσα την περιοχή κινάσης του mTOR και ενεργοποιεί το mTOR με ένα GTP εξαρτώμενο τρόπο (Long *et al.*, 2005).

### Θρεπτικά συστατικά

Τα θρεπτικά συστατικά (Σχήμα-11), ιδιαίτερα τα αμινοξέα, ρυθμίζουν τη σηματοδότηση του mTOR. Η έλλειψη αμινοξέων και συγκεκριμένα της λευκίνης, οδηγεί σε ταχεία αποφωσφορυλίωση των τελεστών του mTORC1, που είναι η S6K1 και η 4E-BP1 (4E-binding protein: πρωτεΐνη σύνδεσης-4E), ενώ η επαναπροσθήκη των αμινοξέων αποκαθιστά τη φωσφορυλίωση των S6K1 και 4E-BP1, με τρόπο εξαρτώμενο από το mTORC1 (Hay και Sonenberg, 2004).

Έχει προταθεί ότι τα αμινοξέα ενεργοποιούν το mTORC1 μέσω αναστολής του συμπλέγματος των TSC1-TSC2 ή εναλλακτικά μέσω διέγερσης του Rheb. Έρευνες έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του TSC2 καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στην έλλειψη αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αμινοξέα σηματοδοτούν μέσω του συμπλέγματος TSC1-TSC2 (Gao *et al.*, 2002). Άλλες έρευνες έχουν προτείνει ένα μοντέλο στο οποίο τα αμινοξέα σηματοδοτούν μέσω του mTORC1 ανεξάρτητα από το

TSC2. Η αφαίρεση των αμινοξέων ρυθμίζει προς τα κάτω τη σηματοδότηση του mTORC1 σε κύτταρα στα οποία λείπει η TSC2 (Smith *et al.*, 2005) και η υπερέκφραση του Rheb στη Δροσόφιλα και τα κύτταρα των Θηλαστικών επιτρέπει τη σηματοδότηση του mTORC1 απουσία των αμινοξέων (Saucedo *et al.*, 2003, Garami *et al.*, 2003). Σαφώς, απαιτείται περαιτέρω μελέτη σχετικά με τον μηχανισμό σηματοδότησης του mTORC ανάλογα με το επίπεδο θρεπτικών συστατικών στο κύτταρο.

Η ανάπτυξη των κυττάρων (συσσώρευση της μάζας των κυττάρων) σχετίζεται με την αύξηση του ρυθμού σύνθεσης των πρωτεϊνών και, κατά συνέπεια, απαιτεί υψηλό επίπεδο κυτταρικής ενέργειας. Ο mTORC1 ελέγχει την κατάσταση ενέργειας του κυττάρου μέσω της AMPK. Όπως προαναφέρθηκε, η AMPK ενεργοποιείται σε απάντηση των χαμηλών επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο, αντιδρώντας σε αυξήσεις του λόγου AMP/ATP. Η ενεργοποιημένη AMPK ρυθμίζει προς τα κάτω τις ενεργειακά απαιτητικές διαδικασίες, όπως είναι η πρωτεϊνόςύνθεση και προς τα πάνω τις διαδικασίες παραγωγής ATP, όπως είναι η οξείδωση των λιπαρών οξέων (Towler και Hardy, 2007, Luo *et al.*, 2010). Η ενεργοποίηση της AMPK από την AICAR (5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside: 5-άμινο-ημιδαζόλ-4-κάρβοξυαμίδιο-1-β-D-ρίβο-φουρανοσίδη), ένα ανάλογο της AMP, αναστέλλει την εξαρτώμενη από τον mTORC1 φωσφορυλίωση των S6K1 και 4E-BP1. Η ενεργοποιημένη AMPK φωσφορυλιώνει άμεσα το TSC2 (Σχήμα-11) και ως εκ τούτου ενισχύει τη δραστηριότητα της ως GAP γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της σηματοδότησης του mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Δεδομένου ότι, η LKB1 έχει αναγνωριστεί ως μία ανωφερή κινάση της AMPK έχει προταθεί ότι η ογκοκατασταλτική αυτή πρωτεΐνη συνδέεται με το TSC-mTORC1 μονοπάτι σηματοδότησης. Πράγματι έχει διαπιστωθεί ότι, LKB1 μεταλλαγμένα κύτταρα παρουσιάζουν υπερενεργό mTORC1 κύκλωμα σηματοδότησης (Corradetti *et al.*, 2004, Shaw *et al.*, 2004). Έτσι, όταν παρουσιάζεται μείωση στα επίπεδα της ενέργειας η LKB1 ενεργοποιεί την AMPK, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το TSC2, με αποτέλεσμα την αναστολή του mTORC1.

## Ενέργεια

Η ρύθμιση των επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο μπορεί επίσης να είναι ένας μηχανισμός ενεργοποίησης του mTORC1. Έχει αναφερθεί ότι η Akt ενεργοποιεί τον mTORC1 όχι μόνο μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης του TSC2 αλλά και μέσω της ρύθμισης της ενέργειας στο κύτταρο (Σχήμα-11, Hahn-Windgassen *et al.*, 2005). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η Akt διατηρεί υψηλά τα επίπεδα της ATP προκαλώντας μείωση του λόγου AMP/ATP, γεγονός που αποτρέπει την διαμεσολαβούμενη από την AMPK φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της TSC2. Ο τρόπος με τον οποίο η Akt διατηρεί υψηλά τα επίπεδα ενέργειας στα κύτταρα περιλαμβάνει, τουλάχιστον εν μέρει, τη διατήρηση της πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών (Edinger και Thompson, 2002).

## Στρες

Τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικό στρες, όπως η υποξία. Σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου η σηματοδότηση του TOR αναστέλλεται και ως εκ τούτου, η πρωτεϊνσύνθεση ρυθμίζεται προς τα κάτω. Γνώσεις σχετικά με τη ρύθμιση του mTORC1 σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου αποκτήθηκαν από μελέτες στη Δροσόφιλα και σε κύτταρα θηλαστικών (Σχήμα-11, Brugarolas *et al.*, 2004, Reiling και Hafen, 2004).

Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την υποξία και την LKB1-AMPK είναι πιθανά αλληλένδετα, καθώς η παρατεταμένη υποξία θα μπορούσε τελικά να οδηγήσει στην εξάντληση της ATP και την ενεργοποίηση της AMPK. Άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν προς τα κάτω τη σηματοδότηση του mTOR περιλαμβάνουν βλάβες στο DNA και οξειδωτικές συνθήκες. Όταν προκαλείται βλάβη στο DNA το p53 ενεργοποιείται, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του mTOR μέσω του AMPK-TSC2 μονοπατιού σηματοδότησης (Feng *et al.*, 2005).



## Επίδραση της μετφορμίνης στην *in vitro* ωρίμανση και γονιμοποίηση ωοκυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύριος διαμεσολαβητής της δράσης της μετφορμίνης είναι η AMPK. Υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών σχετικά με το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της AMPK σε ωοκύτταρα (Downs *et al.*, 2002, Mayes *et al.*, 2007, Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007). Μελέτες σε ωοκύτταρα βοοειδών έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της AMPK από τη μετφορμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των mM ελέγχει την πυρηνική ωρίμανση, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου τα οποία φτάνουν στο στάδιο της μετάφασης II της μειωτικής διαίρεσης (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007). Είναι γνωστό ότι, η ανασταλτική δράση της μετφορμίνης στη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης μπορεί να αναστραφεί μετά την αφαίρεση της από το μέσο καλλιέργειας (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, μετά από 7 ώρες καλλιέργειας με σκοπό την ωρίμανση, η παρουσία μετφορμίνης (2mM) μειώνει τον αριθμό συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου και απογυμνωμένων ωοκυττάρων τα οποία φτάνουν στο στάδιο της μετάφασης II (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007). Η αναστολή τη διάλυσης της πυρηνικής μεμβράνης από τη μετφορμίνη αναστρέφεται όταν συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ή απογυμνωμένα ωοκύτταρα καλλιεργούνται για 7 ώρες παρουσία μετφορμίνης και ακολούθως μεταφέρονται σε μέσο-ελέγχου για 16 ώρες (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007). Αντίθετα, μετά από 21-22 ώρες καλλιέργειας παρουσία μετφορμίνης η ουσία αυτή μειώνει μόνο τον αριθμό των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου τα οποία φτάνουν στο στάδιο της μετάφασης II και όχι των απογυμνωμένων ωοκυττάρων (2mM: Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, 5 και 10mM: Tosca *et al.*, 2007).

Μελέτες σε ωοκύτταρα χοίρων συμφωνούν με εκείνες σε βοοειδή, καθώς σύμφωνα με τον Mayes και τους συνεργάτες του (2007) η παρουσία μετφορμίνης στο μέσο ωρίμανσης σε συγκέντρωση 1mM οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που δεν πραγματοποιούν τη διάλυση της πυρηνικής

μεμβράνης. Σε ό,τι αφορά την *in vitro* εμβρυϊκή ανάπτυξη στους χοίρους, σύμφωνα με τον Lee και τους συνεργάτες του (2005<sup>b</sup>) η παρουσία μετφορμίνης (10μΜ) στο μέσο καλλιέργειας κατά την περίοδο *in vitro* ωρίμανσης ή μετά τη γονιμοποίηση δεν έχει καμία επίδραση στη δημιουργία βλαστοκύστεων.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως ο Hong και οι συνεργάτες του (2009) διαπίστωσαν ότι η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης μετφορμίνης (10μΜ) σε μέσο ωρίμανσης που δεν περιέχει ορό, ορμόνες και αναπτυξιακούς παράγοντες δεν επηρεάζει την πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων βοοειδών. Σε ό,τι αφορά την *in vitro* εμβρυϊκή ανάπτυξη στα βοοειδή, σύμφωνα με τον Hong και τους συνεργάτες του (2009) η χορήγηση μετφορμίνης (10μΜ) στο ίδιο μέσο καλλιέργειας κατά την περίοδο της *in vitro* ωρίμανσης αυξάνει τον αριθμό των εμβρύων που παραμένουν στο στάδιο των 2-κυττάρων.

## Ερωτήσεις προς απάντηση

Με βάση τα ως σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν μια σειρά από ερωτήματα τα οποία παραμένουν αναπάντητα σχετικά με την πιθανή δράση της μετφορμίνης σε ωκύτταρα και έμβρυα καθώς επίσης και με τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στη δράση αυτή.

Συγκεκριμένα:

- Ενώ έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών στις οποίες διερευνήθηκε η δράση της μετφορμίνης (σε υψηλές συγκεντρώσεις) στην ωρίμανση των ωοκυττάρων (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007, Mayes *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2009) δεν είναι γνωστή η **πιθανή δράση της μετφορμίνης στην *in vitro* γονιμοποίηση ωαρίων**, καθώς επίσης και
- **η πιθανή δράση του φαρμάκου αν χορηγηθεί καθ' όλη τη διαδικασία της *in vitro* παραγωγής εμβρύων**

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η μετφορμίνη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM, επηρεάζει αρνητικά την πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2009). Τίθεται λοιπόν το ερώτημα εάν:

- **η *in vitro* χορήγηση σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετφορμίνης, δηλαδή συγκεντρώσεις σε επίπεδα αντίστοιχα αυτών που μπορεί να φτάσει το φάρμακο στις ωοθήκες ασθενών με PCOS θα είχε ανάλογα αρνητικά αποτελέσματα στην ωρίμανση των ωοκυττάρων**

Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η δράση της μετφορμίνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της AMPK (Downs *et al.*, 2002, Mayes *et al.*, 2007, Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007). Είναι επίσης γνωστό ότι ένας από τους κύριους στόχους

της AMPK είναι ο mTORC1, ο οποίος ρυθμίζει το πότε ένα κύτταρο αναπτύσσεται (για ανασκόπηση βλ. Loewith και Hall, 2004). Η ανασταλτική δράση της AMPK στον TORC1 διαμεσολαβείται από το TSC2 (για ανασκόπηση βλ. Manning, 2004). Τέλος, γνωρίζουμε ότι, στα ωκύτταρα ζώων που δεν εκφράζουν το TSC2 (TSC2<sup>-/-</sup>) παρατηρείται πρόωρη ενεργοποίηση αρχέγονων ωθυλακίων εξαιτίας αυξημένης δραστηριότητας του mTORC1 (Adhikari *et al.*, 2009) γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή παρουσία του TSC2 στα ωκύτταρα. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, τα ερωτήματα που τίθενται είναι:

- **εκφράζεται το TSC2 στα έμβρυα βοοειδών; και αν ναι,**
- **η όποια δράση της μετορμίνης σε ωκύτταρα/έμβρυα διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της TSC2 από την AMPK;**

## Σκοπός της εργασίας

Προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω η δράση της μετφορμίνης σε ωκύτταρα/έμβρυα κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση καθώς επίσης και τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτή τη δράση εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο *in vitro* παραγωγής εμβρύων βοοειδών, όπου μελετήθηκε η επίδραση της μετφορμίνης:

- ✓ στη δημιουργία των εμβρύων,
- ✓ την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και,
- ✓ την ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης:

- στη δημιουργία εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου
- στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων.

Ενώ επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί:

- η παρουσία του TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών και,
- η πιθανή ενεργοποίηση του μορίου αυτού μέσω της AMPK μετά από έκθεση των κυττάρων στη μετφορμίνη.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στη δημιουργία εμβρύων (embryo production) βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων και στην πιθανή ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK στα έμβρυα. Το πειραματικό μέρος της παρούσης μελέτης ολοκληρώθηκε σε δύο φάσεις.

#### Α' φάση - επίδραση της μετφορμίνης στη δημιουργία και το ρυθμό διαίρεση εμβρύων βοοειδών

Εξετάστηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στη δημιουργία εμβρύων βοοειδών και στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε σύμφωνα με 2 διαφορετικά πρωτόκολλα:

- 1nM, 0.1μM, 1μM και 10μM μετφορμίνης χορηγήθηκαν σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων (IVM: *in vitro* maturation, *in vitro* ωρίμανση ωκυττάρων, IVF: *in vitro* fertilization, *in vitro* γονιμοποίηση ωαρίων και IVC: *in vitro* culture, *in vitro* καλλιέργεια εμβρύων). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας, μέσα στο οποίο γινόταν η προσθήκη της μετφορμίνης. Συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου χρησιμοποιούνταν για ωρίμανση *in vitro*, γονιμοποιούνταν με αναβιωμένα σπερματοζώαρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργούνταν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C. Πραγματοποιήθηκαν 5-9 επαναλήψεις, με συνολικό αριθμό 83-183 συμπλέγματα ανά πειραματική ομάδα.

- 1nM, 0.1μM, και 10μM μετφορμίνης χορηγήθηκαν μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν οι ίδιες με παραπάνω. Πραγματοποιήθηκαν 6-12 επαναλήψεις, με συνολικό αριθμό 116-218 συμπλέγματα ανά πειραματική ομάδα.

**Β' φάση - μελέτη της επίδρασης της μετφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών**

Εξετάστηκε η επίδραση 10μM μετφορμίνης σε έμβρυα βοοειδών ως προς τη ρύθμιση του TSC2. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε

- σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων (IVM, IVF και IVC)
- μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μέσο καλλιέργειας, μέσα στο οποίο γινόταν η προσθήκη της μετφορμίνης. Συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου χρησιμοποιούνταν για ωρίμανση *in vitro*, γονιμοποιούνταν με αναβιωμένα σπερματοζωάρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργούνταν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με σκοπό την εκτίμηση:

- της παρουσίας TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών
- πιθανής ενεργοποίησης του TSC2 μέσω της AMPK, [φωσφορυλίωση του TSC2 στη σερίνη 1387 (S1387) από την AMPK, Corradetti *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004].

Τα αντισώματα ενάντια της ανθρώπινης πρωτεΐνης TSC2 επιλέχθηκαν με βάση τις ομοιότητες στις αμινοξικές ακολουθίες μεταξύ ανθρώπινης και βοοειδούς TSC2, όπως επιβεβαιώνεται από τη βάση δεδομένων Universal Protein Resource (UniProt; <http://www.uniprot.org>). Πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις, με συνολικό αριθμό 55-58 συμπλέγματα ανά πειραματική ομάδα.

## Βιολογικά Υλικά

Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της παρούσης έρευνας ήταν τα σπερματοζωάρια εκσπερμάτισης ενός συγκεκριμένου ταύρου (βλ. παρακάτω) τα οποία προμηθευτήκαμε σε ειδικές παγιέτες μέσα σε υγρό άζωτο καθώς επίσης και τα ωάρια από ωοθήκες αγελάδων, που είχαν σφαγιασθεί.

### *Επιλογή του σπερματοδότη ταύρου*

Η αρχική ομοιογένεια του πληθυσμού των σπερματοζωαρίων διασφαλίστηκε με τη χρησιμοποίηση, σε όλους τους πειραματισμούς, αναβιωμένων σπερματοζωαρίων ενός ταύρου, μιας συγκεκριμένης ημερομηνίας κατάψυξης.

Η επιλογή του ταύρου (Οδυσσέας Μπλόντ, φυλής *Blonde d'Aquitaine*, Ινστιτούτο Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης Θεσσαλονίκης) στηρίχτηκε στο υψηλό ποσοστό μη επιστροφών των αγελάδων σε οίστρο 60 ημέρες μετά από τεχνητή σπερματέγχυση, το οποίο κυμαίνεται στο 70%.

Όπως προκύπτει από τα αρχεία του Εργαστηρίου Σπέρματος Βοοειδών του Ινστιτούτου, τα χαρακτηριστικά του σπέρματος κατά τη σπερματοληψία ήταν: όγκος 7ml, συγκέντρωση  $850 \times 10^6$  σπερματοζωάρια/ml, ζωτικότητα 70% και κινητικότητα 4. Για την αραιώση του σπέρματος στην τελική πυκνότητα των  $50 \times 10^6$  σπερματοζωαρίων/ml χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο αραιωτικό κρόκου αβγού - κιτρικού - TRIS (Κουτσούρης, 1989) και ως κρυοπροστατευτική ουσία η γλυκερόλη, σε τελική αναλογία 6% κατ'όγκο. Κατά τον έλεγχο αναβίωσης των σπερματοζωαρίων μετά από την κατάψυξη τους, η ζωτικότητα ανερχόταν σε 55% και η κινητικότητα στο 3,5.



### **Επιλογή των αγελάδων δοτριών ωοθηκών**

Ως τόπος συλλογής των ωοθηκών επιλέχθηκαν τα σφαγεία Χαλάστρας-Θεσσαλονίκης, Γυρτώνης-Λάρισας και Οιχαλίας-Τρικάλων, τα οποία πλεονεκτούσαν έναντι άλλων σφαγείων σε αριθμό σφαζόμενων αγελάδων.

Όλα τα θηλυκά ζώα στα οποία διαπιστωνόταν φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών, θεωρούνταν κατάλληλα ως δότες, ανεξάρτητα από την ηλικία, τη θρεπτική κατάσταση ή το λόγο σφαγής. Ως ακατάλληλοι δότες ωοθηκών θεωρούνταν τα ζώα που αξιοποιούνταν αναγκαστικά κατά την εφαρμογή των προγραμμάτων εκρίζωσης της βρουκέλλωσης και της φυματίωσης.

### **Όργανα, Συσκευές και Αντιδραστήρια**

Τα όργανα, οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις επιμέρους εργασίες της παρούσης έρευνας παραθέτονται στις αντίστοιχες παραγράφους του υποκεφαλαίου των μεθόδων. Οι συσκευές και τα όργανα ελέγχονταν ως προς την κανονικότητα της λειτουργίας τους σύμφωνα με το πρόγραμμα ελέγχου του εκάστοτε εργαστηρίου.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής χημικής καθαρότητας και ελεγμένα από τον κατασκευαστή για πιθανή κυτταροτοξικότητα. Επίσης, όπως επισημαίνεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, δόθηκε προσοχή ώστε οι ανάγκες σε κάθε αντιδραστήριο να καλυφθούν από την ίδια σειρά παραγωγής. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μέσων καλλιέργειας των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, εμβρύων και σπερματοζωαρίων προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich Corp (Germany), πλην εξαιρέσεων, οπότε αυτές και μόνον θα δηλωθούν κατά περίπτωση.

## Μέθοδοι εξωσωματικής γονιμοποίησης

Οι καλλιέργειες των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, εμβρύων και σπερματοζωαρίων έγιναν σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Adamiaik *et al.*, 2006; Kwong *et al.*, 2010).

### *Συλλογή, μεταφορά και επεξεργασία των ωοθηκών - Ωοληψία*

Η συλλογή των ωοθηκών γινόταν κατά το δυνατόν άσηπτα αμέσως μετά τη διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας κάθε σφαγίου. Οι ωοθήκες που συλλέγονταν πλένονταν σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) και τοποθετούνταν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε το ίδιο διάλυμα σε θερμοκρασία 38.8°C.

Οι ωοθήκες μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Πριν από την έναρξη της διαδικασίας συλλογής των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ψεκάζονταν με 70% αιθανόλη και πλένονταν δύο φορές με θερμό Dulbecco Phosphate Buffer Saline (PBS). Όλοι οι χειρισμοί των ωοθηκών και των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου γίνονταν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής για τη διασφάλιση στειρών συνθηκών καλλιέργειας.

### *Συλλογή των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου*

Με τη βοήθεια σύριγγας 10ml μιας χρήσης στην οποία προσαρμοζόταν βελόνη 21G, γινόταν αναρρόφηση του περιεχομένου των επιφανειακών ωοθυλακίων διαμέτρου 2 έως 8mm, εκτός αυτών που θεωρούνται ατρητικά. Το περιεχόμενο της σύριγγας μεταφερόταν σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης 15ml (BD Falcon™) που περιείχε 2ml κατάλληλου καλλιεργητικού μέσου και αφηνόταν για 15 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C, ώστε τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου να συγκεντρωθούν στον πυθμένα του σωλήνα, λόγω καθίζησης.

Το μέσο καλλιέργειας αποτελείτο από M-199 με  $26.2\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  και γλουταμίνη (Biochrom AG, Berlin, Germany), 5% v/v ορό εμβρύου βοός (FBS: fetal bovine serum) και 0.5% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το pH του καλλιεργητικού μέσου ρυθμιζόταν στο 7,3-7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 290-300mOsm με την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  ή NaCl. Το μέσο καλλιέργειας παρασκευαζόταν πάντα την ημέρα της χρήσης του και αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm (Corning). Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Το ίζημα από τον αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης μεταφερόταν σε αποστειρωμένο τρυβλίο χωρίς βοθρίο 60mm (BD Falcon™). Ο εντοπισμός και η επιλογή των κατάλληλων συμπλεγμάτων ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση. Η εκτίμηση της ποιότητας των συμπλεγμάτων γινόταν με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τόσο του ωκυττάρου όσο και του ωοφόρου δίσκου. Κατάλληλα για ωρίμανση θεωρούνταν τα ωκύτταρα με ομοιογενές και λεπτόκοκκο κυτταρόπλασμα που περιβάλλονταν από τον ακτινωτό στέφανο και 4-5 στρώματα κοκκωδών κυττάρων σε πυκνή διάταξη (Hazeleger *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001). Τα ωκύτταρα που εμφάνιζαν ανομοιογενές ή συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα καθώς και εκείνα των οποίων ο ωοφόρος δίσκος ή / και ο ακτινωτός στέφανος είχαν υποστεί φθορές ή εκφύλιση θεωρούνταν ακατάλληλα. Τα συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που επιλέγονταν, πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας (BD Falcon™, τεσσάρων βοθρίων 60mm), τα οποία περιείχαν 450μl από το παραπάνω καλλιεργητικό μέσο.

### ***Ωρίμανση των ωκυττάρων***

Τα συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας τα οποία περιείχαν 450μl καλλιεργητικού μέσου αποτελούμενου από M-199 με  $26.2\text{mmol l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  και γλουταμίνη (Biochrom AG,

Berlin, Germany), 10% v/v FBS, 20U I<sup>-1</sup> Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH: Follicle Stimulating Hormone), 20U I<sup>-1</sup> Ωχρινοποιητική ορμόνη (LH: Luteinizing Hormone) και 0.5% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το pH του μέσου καλλιέργειας ρυθμιζόταν στο 7,3-7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 290-300mOsmo με την προσθήκη H<sub>2</sub>O ή NaCl. Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν πάντα την ημέρα της χρήσης του και αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm. Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Τα συμπλέγματα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο τρυβλίο 60mm με ένα βοθρίο (BD Falcon™), το οποίο περιείχε 450μl από το παραπάνω καλλιεργητικό μέσο. Τα τρυβλία τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

### ***Απόψυξη σπέρματος***

Η απόψυξη του σπέρματος γινόταν με εμβάπτιση των πλαστικών σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35°C για 30-60 δευτερόλεπτα. Τα σωληνάρια ψεκάζονταν και καθαρίζονταν με 70% αιθανόλη. Το περιεχόμενο τους ελευθερωνόταν σε θερμό αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης 15ml. Με τη λήψη μικρού δείγματος προσδιοριζόταν η συγκέντρωση και το ποσοστό των κινουμένων σπερματοζωαρίων.

### ***Εμπλουτισμός του πληθυσμού των σπερματοζωαρίων***

Για τον εμπλουτισμό του πληθυσμού των σπερματοζωαρίων σε ζωντά κινούμενα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του 'swim up'. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή 125μl αναβιωμένου σπέρματος τοποθετούνταν στον πυθμένα αποστειρωμένου σωλήνα φυγοκέντρησης 15ml που περιείχε 3ml μέσου καλλιέργειας. Ο σωλήνας τοποθετούνταν με

κλίση 30° σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C για 45 λεπτά. Ο χρόνος αυτός ήταν κατάλληλος ώστε τα ζωηρά κινούμενα σπερματοζωάρια να μεταναστεύσουν από το κρυοπροστατευτικό διάλυμα στο υπερκείμενο μέσο καλλιέργειας.

Το καλλιεργητικό μέσο αποτελείτο από 110.4mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 2.7mmol l<sup>-1</sup> KCl, 25mmol l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.4mmol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5mmol l<sup>-1</sup> HEPES, 0.00002% w/v ερυθρό της φαινόλης, 1mmol l<sup>-1</sup> πυροσταφυλικό Na, 6.9mmol l<sup>-1</sup> γλυκόζη, 16mmol l<sup>-1</sup> γαλακτικό Na, 0.6% w/v αλβουμίνη βοείου ορού (BSA: Bovine Serum Albumin) και 0.5% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν και διατηρούνταν στο ψυγείο για μία εβδομάδα. Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,3-7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 290-310mOsmo με την προσθήκη H<sub>2</sub>O ή NaCl. Το μέσο καλλιέργειας αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm. Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Μετά την επώαση, αφαιρούνταν τα υπερκείμενα 2,8ml του μέσου καλλιέργειας στα οποία είχαν μετακινηθεί τα ζωηρώς κινούμενα σπερματοζωάρια, αφήνοντας στον πυθμένα το κρυοπροστατευτικό διάλυμα και το σπερματικό πλάσμα. Το υπερκείμενο του μέσου καλλιέργειας μεταφερόταν σε θερμό αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης 15ml.

### ***Απομάκρυνση των παραγόντων απενεργοποίησης***

Για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων *ex vivo* είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των παραγόντων απενεργοποίησης. Για το σκοπό αυτό, γινόταν φυγοκέντρηση του καλλιεργητικού μέσου, όπως βρισκόταν στο θερμό αποστειρωμένο σωλήνα, για 10 λεπτά στα 1500rpm (300xg). Στη συνέχεια, αφαιρούνταν προσεκτικά το υπερκείμενο του μέσου καλλιέργειας και γινόταν ανασύσταση του ιζήματος με την προσθήκη μικρής ποσότητας θερμού καλλιεργητικού μέσου.

### **Εκτίμηση συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων**

Αφαιρούνταν 10μl δείγματος από το σωλήνα και αναμιγνύονταν με 90μl H<sub>2</sub>O με τη βοήθεια vortex. Από εκεί, αφαιρούνταν 10μl αραιωμένου δείγματος και τοποθετούνταν με μια πιπέτα σε κάθε πλευρά της βελτιωμένης κυτταρομετρικής αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Η μεταφορά γινόταν προσεκτικά ώστε να μην υπερχειλίσει ο κάθε θάλαμος. Ο θάλαμος αφηνόταν για 15 λεπτά ώστε να επιτραπεί στα σπερματοζωάρια να κατακαθίσουν στο πλέγμα του θαλάμου μέτρησης. Η μέτρηση γινόταν με τη χρήση 40X αντικειμενικού φακού. Για τον προσδιορισμό κάθε μεγάλου τετραγώνου πάντα χρησιμοποιούνταν ως όρια οι επάνω και αριστερές πλευρές. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων μετριοταν ενδεικτικά στο πάνω μεγάλο αριστερό τετράγωνο του θαλάμου και ανάλογα με το αποτέλεσμα ακολουθούσε μέτρηση σε 5 τετράγωνα (εφόσον >40 σπερματοζωάρια), σε 10 (εφόσον 10-40 σπερματοζωάρια) ή σε 25 τετράγωνα (εφόσον <10 σπερματοζωάρια) του κάθε θαλάμου. Ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων στους δύο θαλάμους διαιρούνταν με το 2 ώστε να υπολογιστεί ο μέσος όρος. Στη συνέχεια ο μέσος όρος διαιρούνταν με τον όγκο όλων των τετραγώνων μέσα στα οποία μετρήθηκαν (για 5 τετράγωνα = 20nl, 10 = 40nl και 25 τετράγωνα = 100nl). Το αποτέλεσμα ήταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανα nl που ισοδυναμούσε με αριθμό των σπερματοζωαρίων σε εκατομμύρια ανά ml (σπερματοζωάρια / 10<sup>-9</sup> l = σπερματοζωάρια Χ 10<sup>6</sup> / 10<sup>-3</sup> l). Τέλος, λόγω της αραιώσης του αρχικού δείγματος ο αριθμός αυτός πολλαπλασιαζόταν με τον συντελεστή αραιώσης (π.χ. αραιώση 1+9 αντιστοιχεί σε συντελεστή 10), οπότε παίρναμε τον τελικό αριθμό των σπερματοζωαρίων (εγχειρίδιο της ΠΟΥ, 2000). Η τελική πυκνότητα των σπερματοζωαρίων που χρησιμοποιούνταν στη συγκαλλιέργεια τους με τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου με σκοπό τη γονιμοποίηση ήταν 1x10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια/ml καλλιεργητικού μέσου.

### ***Επιλογή και προετοιμασία των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου για γονιμοποίηση***

Τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ελέγχονταν ως προς την ποιότητα της ωρίμανσης και επιλέγονταν μόνο εκείνα που εμφάνιζαν διόγκωση και επέκταση του ωοφόρου δίσκου. Πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας τα οποία περιείχαν 450μl καλλιεργητικού μέσου αποτελούμενου από 114mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 3.2mmol l<sup>-1</sup> KCl, 2mmol l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.4mmol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 10mmol l<sup>-1</sup> HEPES, 0.0001% w/v ερυθρό της φαινόλης, 0.5mmol l<sup>-1</sup> πυροσταφυλικό Na, 16μmol l<sup>-1</sup> γαλακτικό Na, 0.3% w/v BSA και 0.5% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα συμπλέγματα στροβιλίζονταν προσεκτικά σε γυάλινη πιπέτα με σκοπό τη μείωση των εξωτερικών στοιβάδων των κυττάρων στα 2-3 στρώματα.

Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν και διατηρούνταν στο ψυγείο για μία εβδομάδα. Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,3-7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCl ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 270-290mOsmο με την προσθήκη H<sub>2</sub>O ή NaCl. Το μέσο καλλιέργειας αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm. Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

### ***Συγκαλλιέργεια σπερματοζωαρίων και συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου***

Τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας τα οποία περιείχαν 450μl καλλιεργητικού μέσου κατάλληλου για γονιμοποίηση, αποτελούμενο από 93.1mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 3.1mmol l<sup>-1</sup> KCl, 26.2mmol l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 1.4mmol l<sup>-1</sup> καφεΐνη, 0.3mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5.3mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 9.1mmol l<sup>-1</sup> πυροσταφυλικό Na, 10μmol l<sup>-1</sup> γαλακτικό Na, 0.6% w/v BSA, 0.5% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, ≥1400U l<sup>-1</sup> ηπαρίνη, 4.6μmol l<sup>-1</sup> υποταυρίνη και 2.7μmol l<sup>-1</sup> επινεφρίνη. Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν και διατηρούνταν στο

ψυγείο για μία εβδομάδα. Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,8 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 270-290mOsmo με την προσθήκη H<sub>2</sub>O ή NaCl. Το καλλιεργητικό μέσο αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm. Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Τα συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου μεταφέρονταν σε σταγόνες 46μl του ίδιου καλλιεργητικού μέσου, σε αποστειρωμένο τρυβλίο 60mm χωρίς βοθρίο. Οι σταγόνες ήταν από πριν καλυμμένες με παραφινέλαιο. Στις σταγόνες συμπληρωνόταν η κατάλληλη ποσότητα επεξεργασμένων σπερματοζωαρίων (παραπομπή σε προηγούμενο κεφάλαιο με τίτλο: 'εκτίμηση συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων'). Τα τρυβλία τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

### ***Ιn vitro καλλιέργεια των πρώιμων εμβρύων***

Τα πιθανώς γονιμοποιημένα ζυγωτά καθαρίζονταν με μηχανικό τρόπο από κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (κοκκώδη κύτταρα) και σπερματοζωάρια σε αποστειρωμένα τρυβλία 60mm με ένα βοθρίο το οποίο περιείχε 450μl καλλιεργητικού μέσου αποτελούμενου από 107.6mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 7.2mmol l<sup>-1</sup> KCl, 1.2mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5mmol l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 7.3mmol l<sup>-1</sup> πυροσταφυλικό Na, 0.2mmol l<sup>-1</sup> L-γλουταμίνη, 0.3mmol l<sup>-1</sup> κιτρικό Na<sub>3</sub>, 1.8mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.001% w/v ερυθρό της φαινόλης, 4μmol l<sup>-1</sup> γαλακτικό Na, 5mmol l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 2mmol l<sup>-1</sup> HEPES, 0.5% v/v MEM μη απαραίτητα αμινοξέα και 0.3% w/v BSA. Στο τέλος του καθαρισμού πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας τα οποία περιείχαν 450μl του ίδιου καλλιεργητικού μέσου. Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν και διατηρούνταν στο ψυγείο για δύο εβδομάδες. Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 270-290mOsmo με την προσθήκη H<sub>2</sub>O ή NaCl. Το καλλιεργητικό μέσο αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm.



Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Τα ζυγωτά πλένονταν σε αποστειρωμένα βοθρία ειδικού τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας τα οποία περιείχαν 450μl καλλιεργητικού μέσου αποτελούμενου από 107.6mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 7.2mmol l<sup>-1</sup> KCl, 1.2mmol l<sup>-1</sup>  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5mmol l<sup>-1</sup>  $\text{MgSO}_4$ , 7.3mmol l<sup>-1</sup> πυροσταφυλικό Na, 0.2mmol l<sup>-1</sup> L-γλουταμίνη, 0.3mmol l<sup>-1</sup> κιτρικό  $\text{Na}_3$ , 1.8mmol l<sup>-1</sup>  $\text{CaCl}_2$ , 0.001% w/v ερυθρό της φαινόλης, 4μmol l<sup>-1</sup> γαλακτικό Na, 25mmol l<sup>-1</sup>  $\text{NaHCO}_3$ , 2.8mmol l<sup>-1</sup> μυοϊνοσιτόλη, 4.5% v/v απαραίτητα αμινοξέα, 0.5% v/v μη απαραίτητα αμινοξέα και 0.3% w/v BSA. Το καλλιεργητικό μέσο παρασκευαζόταν και διατηρούνταν στο ψυγείο για δύο εβδομάδες. Το pH του ρυθμιζόταν στο 7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 270-290mOsmo με την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}$  ή NaCl. Το καλλιεργητικό μέσο αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου 0.2μm. Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

Τα ζυγωτά μεταφέρονταν σε ομάδες των 20 σε σταγόνες 50μl του ίδιου καλλιεργητικού μέσου, σε αποστειρωμένο τρυβλίο 60mm (35mm) χωρίς βοθρίο. Οι σταγόνες ήταν από πριν καλυμμένες με παραφινέλαιο. Τα τρυβλία τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία 38.8°C.

### ***Έλεγχος κατά την καλλιέργεια και εκτίμηση***

Η εκτίμηση της παρουσίας ή όχι εμβρύων γινόταν 36-48 ώρες μετά τη σπερματέγχυση, όπου γινόταν καταγραφή του αριθμού των εμβρύων που δημιουργούνται. Τα μη-γονιμοποιημένα ωάρια αφαιρούνταν και τα έμβρυα μεταφέρονταν σε σταγόνες 50μl φρέσκου καλλιεργητικού μέσου, σε αποστειρωμένο τρυβλίο 60mm χωρίς βοθρίο.

Το pH του καλλιεργητικού μέσου ρυθμιζόταν στο 7,4 με την προσθήκη διαλύματος 0,1M HCL ή 0,1M NaOH και η οσμωτική πίεση ρυθμιζόταν στο 270-290mOsmo με την

προσθήκη  $H_2O$  ή  $NaCl$ . Το καλλιεργητικό μέσο αποστειρωνόταν με διήθηση μέσω φίλτρου μιας χρήσης με πόρους διαμέτρου  $0.2\mu m$ . Τοποθετούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση του σε επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $CO_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία  $38.8^\circ C$ .

Μετά τη μεταφορά των εμβρύων, το τρυβλίο τοποθετούνταν για 20-24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο με ατμόσφαιρα 5%  $CO_2$  σε αέρα, κορεσμένη σε υδρατμούς και σε θερμοκρασία  $38.8^\circ C$ . Η εκτίμηση της κατάστασης των αναπτυσσόμενων εμβρύων (πρόοδος κυτταροδιαίρέσεων) γινόταν στο τέλος των 24 ωρών (δηλαδή 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση), όπου με τη βοήθεια στερεοσκοπίου καταγραφόταν ο αριθμός των βλαστομεριδίων κάθε εμβρύου και γινόταν φωτογράφιση των εμβρύων κάθε πειραματικής ομάδας.

## Ανοσοκυτταροχημικές μελέτες

### Επιλογή αντισωμάτων

Για τη μελέτη της παρουσίας του TSC2 στα έμβρυα καθώς επίσης και της παρουσίας της ενεργοποιημένης από την AMPK TSC2 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα, ανεπτυγμένα σε κουνέλι, πολυκλωνικά αντισώματα έναντι:

- του άμινο- τελικού άκρου της ανθρώπινης πρωτεΐνης TSC2 (αντίσωμα έναντι της ολικής TSC2 σε συγκέντρωση 1:100, Abcam plc., UK) και
- ενός συνθετικού φωσφοπεπτιδίου που αντιστοιχεί στην περιοχή γύρω από τη σερίνη 1387 (S1387) της ανθρώπινης πρωτεΐνης TSC2 (αντι-Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:100, Cell Signaling Technology, Inc., USA). Επισημαίνεται ότι, η S1387 αποτελεί το αμινοξύ στόχο της AMPK η φωσφορυλίωση του οποίου οδηγεί στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK.

Τα παραπάνω αντισώματα επιλέχθηκαν βάσει της ομοιότητας της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της ανθρώπινης TSC2 με αυτή της TSC2 βοοειδών όπως αυτή επιβεβαιώθηκε από την βάση δεδομένων Universal Protein Resource database (UniProt: <http://www.uniprot.org>, Εικόνα-6).

### **Μέθοδος ανοσοφθορισμού**

Οι μελέτες ανοσοφθορισμού των εμβρύων έγιναν σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Goossens *et al.*, 2011; Vasilaki *et al.*, 2004), κατά τι τροποποιημένα. Εν συντομία, τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M PBS και επώαστηκαν στους 4°C για 1 ώρα σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδη (PFA: paraformaldehyde) σε 0,1M PBS. Στη συνέχεια, τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε 0,1M PBS και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 0.5% Triton X-100 σε 0,1M PBS προκειμένου να γίνουν διαπερατά στα αντισώματα. Τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε 0,1M PBS και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 10% FBS σε 0,1M PBS, για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμησης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε 0,1M PBS και επώαστηκαν σε 4°C για 16-18 ώρες με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0,1M PBS το οποίο περιείχε 0.5% FBS. Μετά από αυτό, τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε 0,1M PBS και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρα με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη [αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού, σε συγκέντρωση 1:200, Chemicon Int., USA], το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0,1M PBS. Τέλος, τα έμβρυα ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε 0,1M PBS, μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού το οποίο περιείχε ιωδιούχο προπιδίο (PI: Propidium Iodide, Abcam plc., UK), προκειμένου να γίνει χρώση των πυρήνων. Τα έμβρυα παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού. Για τον εντοπισμό πιθανής μη ειδικής δέσμησης των αντισωμάτων, καθώς επίσης και πιθανού αυτο-φθορισμού των εμβρύων έγιναν πειράματα ελέγχου απουσία πρώτων αντισωμάτων.

### Α. Πρωτεϊνική Αλληλουχία του αμινο-τελικού άκρου της TSC2

1	MAKPTSKDSGLKEKFKILLGLGTPRPNPRSAEGKQTEFIITAEILRELSMECGLNNRIRMIGQICEVAKT	70	P49815	TSC2_HUMAN
1	MAKPASKDSGLKEKFKILLGLGTPRPNPRSAEGKQTEFIITAEILRELSVECGLNNRIRVIGQICEVART	70	E1BNT2	E1BNT2_BOVIN
1	MAKPTSKDSGLKEKFKILLGLGTSRPNPRCAEGKQTEFIITSEILRELSGECGLNNRIRMIGQICDVAKT	70	Q61037	TSC2_MOUSE
1	MAKPTSKDSGLKEKFKILLGLGTSRPNPRCAEGKQTEFIITAEILRELSGECGLNNRIRMIGQICDVAKT	70	P49816	TSC2_RAT
	****.*****.*****.*****.***** *****.*****.***.*			

### Β. Πρωτεϊνική Αλληλουχία της περιοχής γύρω από τη σερίνη 1387 της ανθρώπινης TSC2

1329	--RTDAYSRSSSVSSQEEKSLHAEELVGRGIPIERVVSSEGGPRSDLSFQPSQPLSKSSSSPELQTLQD	1396	P49815	TSC2_HUMAN
1308	CGRSDAFSRSSSTSSQEEKSFHAEELPPGGIPIERAVS-EGSRASVDLAFQPSQPLSKSSSSPELQTLQD	1376	E1BNT2	E1BNT2_BOVIN
1329	CQRPDTYSRSSSASSQEEKS-HLEELAAGGIPIERAISSSEGARPAVDLSFQPSQPLSKSSSSPELQTLQD	1397	Q61037	TSC2_MOUSE
1330	CQRPDAYSRSSSASSQEEKS-HLEELAAGGIPIERAISSSEGARPTVDLSFQPSQPLSKSSSSPELQTLQD	1398	P49816	TSC2_RAT
	*.*.:*****.***** * *** *****.* **.*.:***.*****			

**Εικόνα-6:** Σύγκριση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της ανθρώπινης πρωτεΐνης TSC2 με αυτή άλλων ειδών στην περιοχή του αμινο-τελικού άκρου της πρωτεΐνης (Α) και στην περιοχή γύρω από τη σερίνη 1387 της ανθρώπινης πρωτεΐνης TSC2 (Β). Παρατηρείται η εκτεταμένη διατήρηση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης μεταξύ των ειδών. (\*): όμοια αμινοξέα, (:): ανάλογα αμινοξέα, (.): αμινοξέα που παρουσιάζουν διαφορές, S: σερίνη 1387 της ανθρώπινης αλληλουχίας του TSC2 και αντίστοιχα αμινοξέα στην αλληλουχία των υπόλοιπων ειδών, SSSPE: αμινοξική αλληλουχία έναντι της οποίας δημιουργήθηκε το αντι-Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας.

## Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας

Όλες οι μελέτες εξωσωματικής γονιμοποίησης σε συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου και έμβρυα έγιναν με τη χρήση στερεοσκοπίου (Nikon, SMZ-U, Zoom 1:10, ED Plan 1x, Japan). Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν με κάμερα Nikon, Coolpix P5100 (12.1 Megapixels, με φακό Nikkor 3.5x optical zoom, 7.5-26.3mm, 1:2.7-5.3). Η εκτίμηση συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων έγινε με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου [μικροσκόπιο Zeiss Axiovert 40C (Zeiss), με φακό LD A-Plan x40/ 0.50, Germany].

Οι παρατηρήσεις των εμβρύων μετά τις μελέτες ανοσοφθορισμού έγιναν σε συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75; Oberkochen, Germany]. Η επεξεργασία των φωτογραφιών (RGB εικόνες) έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα MacBiotronics Image J (Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004) κατά πανομοιότυπο τρόπο.

Συγκριμένα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση πιθανών πειραματικών διαφοροποιήσεων, το φόντο (BG, background, περιοχή της φωτογραφίας γύρω από το έμβρυο) κάθε εικόνας αφαιρέθηκε από την περιοχή που μας ενδιέφερε (ROI, region of interest) δηλαδή το έμβρυο. Το BG επιλέχθηκε με το εργαλείο επιλογής ελεύθερης σχεδίασης (freehand selection tool) και αφαιρέθηκε από την ROI μέσω της εντολής "Plugins/ROI/BG Subtraction from ROI". Στη συνέχεια, καταγράφηκε η μέση ένταση σήματος κάθε εμβρύου με την εκτέλεση της εντολής "Analyze/Histogram". Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές της έντασης του σήματος αποτελούν ακέραιους αριθμούς μιας κλίμακας με τιμές από 0 έως 255. Το 0 αντιστοιχεί στην ελάχιστη, ενώ το 255 στη μέγιστη, φωτεινότητα που μπορεί να έχει η ένταση του σήματος.

## Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Όλα τα πειραματικά δεδομένα εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα [mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean)]. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism έκδοση 4.00 για Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Στη σύγκριση των δεδομένων, τιμές  $p$  μικρότερες του 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Στα πειράματα εξωσωματικής γονιμοποίησης, η σύγκριση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων έγινε με ανάλυση διακύμανσης [One-Way Analysis of Variance (one-way ANOVA)] ακολουθούμενη από:

- μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett (Dunnett's multiple comparison test), με σκοπό να συγκριθούν τα έμβρυα τα οποία είχαν επωαστεί παρουσία μετφορμίνης με τα έμβρυα ελέγχου και
- μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης (post-test for linear trend), με σκοπό να εξεταστεί η τάση για αύξηση ή μείωση των τιμών του ποσοστού δημιουργίας εμβρύων από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ή του ρυθμού διαίρεσης των εμβρύων, με την αύξηση της συγκέντρωσης της μετφορμίνης.

Στα πειράματα ανοσοφθορισμού, τα επίπεδα έκφρασης της ολικής TSC2 και της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση της μέσης έντασης σήματος των εμβρύων που επωάστηκαν απουσία πρώτου αντισώματος (TSC2 ή Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2) προκειμένου να αφαιρεθεί πιθανό σήμα το οποίο προερχόταν είτε από τη μη ειδική δέσμευση των πρώτων αντισωμάτων ή από πιθανό αυτό-φθορισμό των εμβρύων. Επίσης, σε όλες τις πειραματικές ομάδες υπολογίστηκε η αναλογία της μέσης έντασης σήματος της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 προς την ολική TSC2. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA ακολουθούμενη από:

- μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett, με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση του χρόνου έκθεσης στη μετφορμίνη στην έκφραση του TSC2 και στην ενεργοποίηση του από την AMPK καθώς και,

- μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης, με σκοπό να εξεταστεί η τάση για αύξηση ή μείωση των τιμών όσο αυξανόταν η έκθεση των κυττάρων στη μετφορμίνη.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στη δημιουργία εμβρύων (embryo production) βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων και στην πιθανή ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK στα έμβρυα. Το πειραματικό μέρος της παρούσης μελέτης ολοκληρώθηκε σε δύο φάσεις.

### Α' φάση - επίδραση της μετφορμίνης στη δημιουργία και το ρυθμό διαίρεση εμβρύων βοοειδών

Σε αυτή τη φάση εξετάστηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης (1nM, 0.1μM, 1μM και 10μM):

- στη δημιουργία εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου και,
- το ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων.

Η μετφορμίνη χορηγήθηκε σύμφωνα με 2 διαφορετικά πρωτόκολλα:

- σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων (IVM, IVF και IVC) και,
- μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.

Τα συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που απομονώνονταν από το ωοθυλακικό υγρό υποβάλλονταν στη διαδικασία της ωρίμανσης *in vitro*, γονιμοποιούνταν με αναβιωμένα σπερματοζωάρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργούνταν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση.



## Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου

### Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων

Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της μετφορμίνης που χορηγήθηκαν σε όλα τα στάδια παραγωγής των εμβρύων δεν εμφάνισαν καμία επίδραση στο ποσοστό των ωοκυττάρων που εξελίχθηκαν σε έμβρυα (Πίνακας-1). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου ( $77.6 \pm 4.1$ ) μετά από ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett (Dunnett's multiple comparison test).

**Πίνακας-1:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου - χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής των εμβρύων (IVM, IVF και IVC).

Πειραματικές ομάδες	N	Έμβρυα (% καλλιεργημένων συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου)
Μάρτυρας	183	$77.6 \pm 4.1$
1nM	83	$64.8 \pm 9.3$
0.1μM	115	$75.5 \pm 4.5$
1μM	116	$64.3 \pm 2.7$
10μM	168	$76.6 \pm 2.7$

n: αριθμός πειραμάτων.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 5-9 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων έγινε με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett, σύμφωνα με το οποίο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

**Χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης**

Όπως φαίνεται στον Πίνακα-2, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης μόνο στο καλλιεργητικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη γονιμοποίηση των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, μετά από την *in vitro* ωρίμανση τους, δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό δημιουργίας των εμβρύων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου ( $75.4 \pm 3.3$ ) μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett.

**Πίνακας-2:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου - χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης (IVF).

Πειραματικές ομάδες	N	Έμβρυα (% καλλιεργημένων συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου)
Μάρτυρας	218	$75.4 \pm 3.3$
1nM	116	$80.3 \pm 3.2$
0.1μM	141	$76.3 \pm 3.0$
10μM	147	$76.4 \pm 4.4$

n: αριθμός πειραμάτων

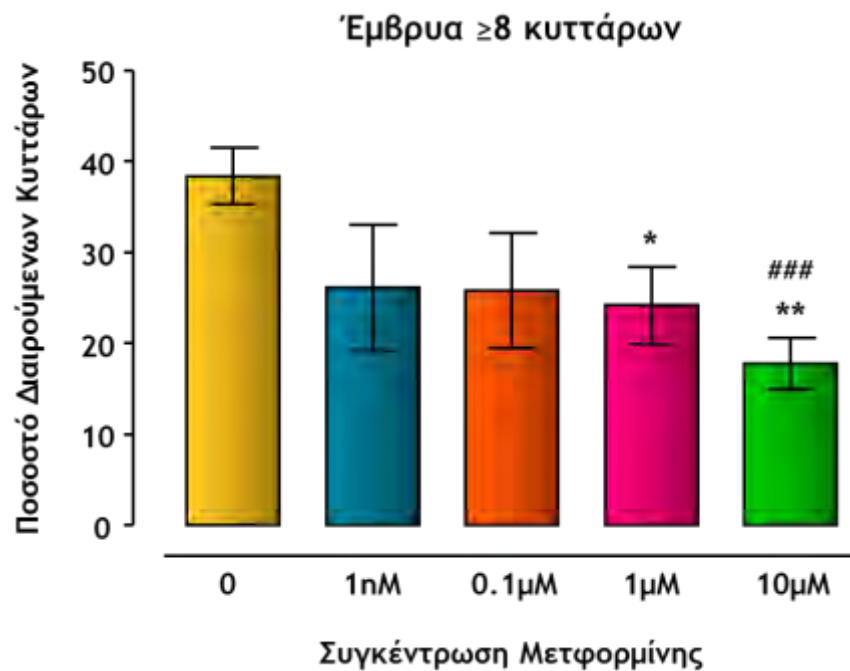
Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 6-12 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων έγινε με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett, σύμφωνα με το οποίο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

## Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών

### *Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων*

Η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της παραγωγής εμβρύων (IVM, IVF και IVC) επηρέασε το ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου, η οποία έγινε με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett, το ποσοστό των εμβρύων που έφτασαν το στάδιο των  $\geq 8$ -κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου ( $38.4 \pm 3.2\%$ ) μετά τη χορήγηση μετφορμίνης σε συγκέντρωση  $1\mu\text{M}$  ( $24.2 \pm 4.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) και  $10\mu\text{M}$  ( $17.8 \pm 2.8\%$ ,  $p < 0.01$ , Σχήμα-12). Η μείωση αυτή στο ποσοστό των εμβρύων  $\geq 8$ -κυττάρων συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των εμβρύων 2-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση μετφορμίνης σε συγκέντρωση  $10\mu\text{M}$  προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο ποσοστό των εμβρύων 2-κυττάρων ( $27.8 \pm 6.4\%$ ,  $p < 0.01$ ) σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου ( $10.7 \pm 2.1\%$ , Σχήμα-14). Η δόσο-εξαρτώμενη επίδραση της μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης (post-test for linear trend), σύμφωνα με το οποίο παρατηρείται τάση αύξησης του ποσοστού εμβρύων 2-κυττάρων και μείωσης του ποσοστού εμβρύων  $\geq 8$ -κυττάρων όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της μετφορμίνης ( $p < 0.001$ , Σχήμα-12, 13).

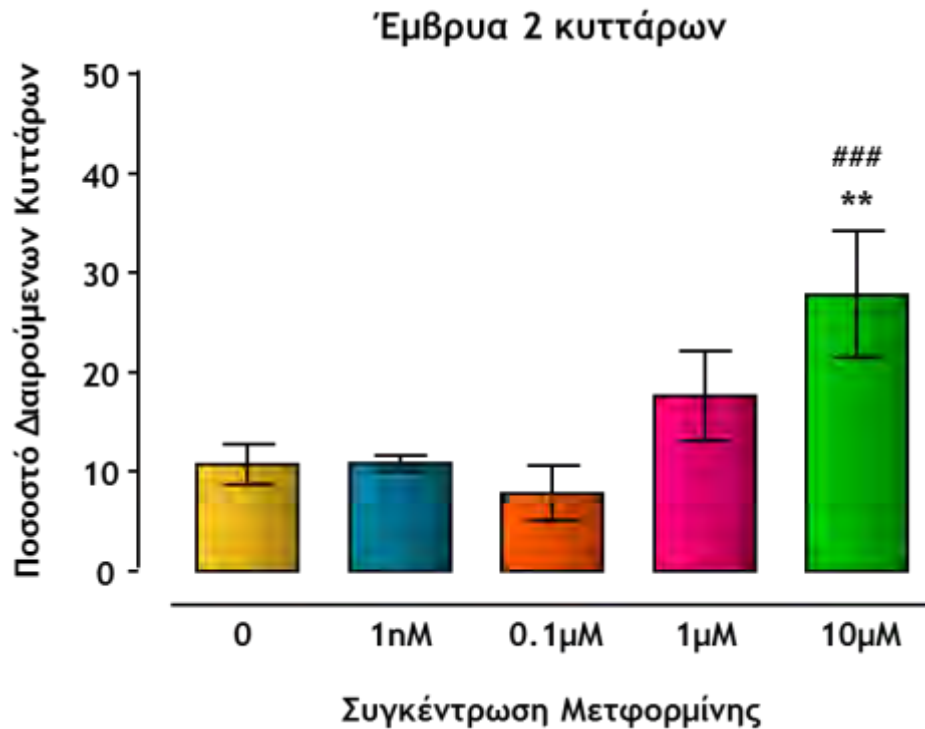
Στην Εικόνα-7 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα ενός από τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων *in vitro*.



**Σχήμα-12:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων. Έμβρυα  $\geq 8$ -κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 5-9 επαναλήψεων, σε σύνολο 83-183 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

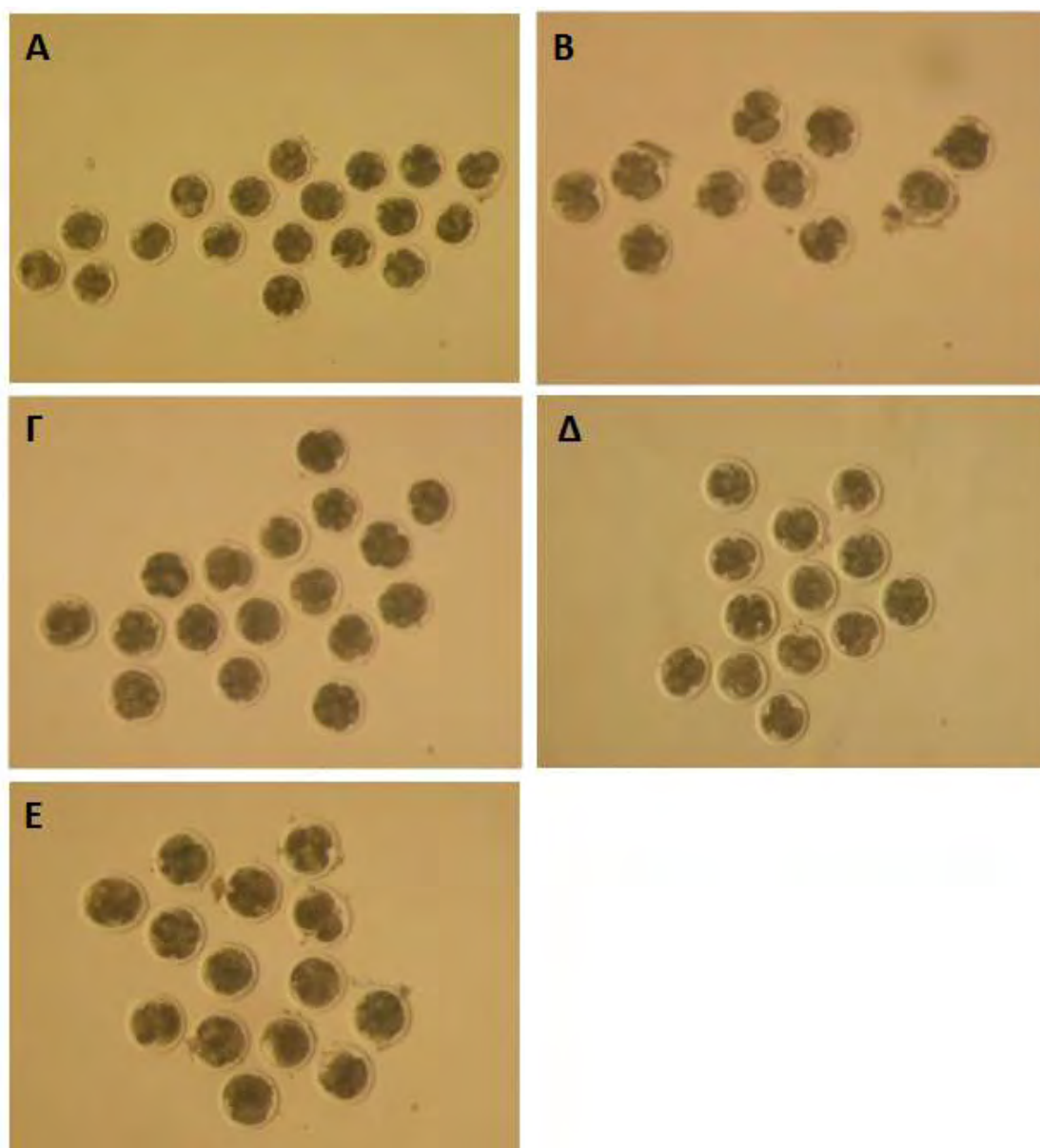
#### $p < 0.001$ : στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.



**Σχήμα-13:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων. Έμβρυα 2-κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 5-9 επαναλήψεων, σε σύνολο 83-183 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

**\*\* $p < 0.01$ :** στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

**### $p < 0.001$ :** στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.

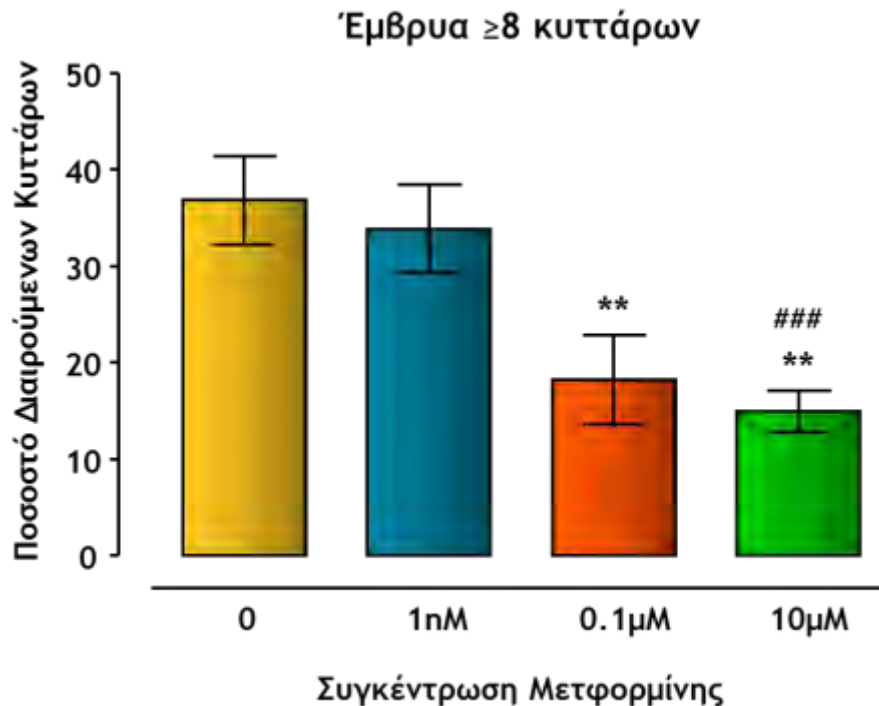


**Εικόνα-7:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων. (Α): Πειραματική ομάδα ελέγχου, (Β-Ε): Πειραματικές ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν μετφορμίνη (Β): 1nM, (Γ): 0.1μM, (Δ): 1μM και (Ε): 10μM.

### *Χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης*

Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετφορμίνης που χορηγήθηκαν μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης (IVF) εμφάνισαν επίδραση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου, η οποία έγινε με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunnett, το ποσοστό των εμβρύων που έφτασαν το στάδιο των  $\geq 8$ -κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου ( $36.9 \pm 4.6\%$ ) για τη χορήγηση μετφορμίνης σε συγκέντρωση  $10\mu\text{M}$  ( $15.0 \pm 2.1\%$ ,  $p < 0.01$ ) και  $0.1\mu\text{M}$  ( $18.2 \pm 4.6\%$ ,  $p < 0.01$ , Σχήμα-14). Η μείωση αυτή στο ποσοστό των εμβρύων  $\geq 8$ -κυττάρων συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των εμβρύων 2-κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της χορήγησης της μετφορμίνης σε όλα τα στάδια. Η χορήγηση μετφορμίνης σε συγκέντρωση  $10\mu\text{M}$  παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο ποσοστό των εμβρύων 2-κυττάρων ( $29.2 \pm 4.5\%$ ,  $p < 0.05$ ) σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου ( $15.1 \pm 2.8\%$ , Σχήμα-15). Η δόσο-εξαρτώμενη επίδραση της μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων, όταν αυτή χορηγείται μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης, επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης, σύμφωνα με το οποίο παρατηρείται τάση αύξησης του ποσοστού εμβρύων 2-κυττάρων και μείωσης του ποσοστού εμβρύων  $\geq 8$ -κυττάρων όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της μετφορμίνης (έμβρυα 2-κυττάρων:  $p < 0.01$ , έμβρυα  $\geq 8$ -κυττάρων:  $p < 0.001$ , Σχήμα-14, 15).

Στην Εικόνα-8 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα ενός από τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης κατά το στάδιο της γονιμοποίησης.

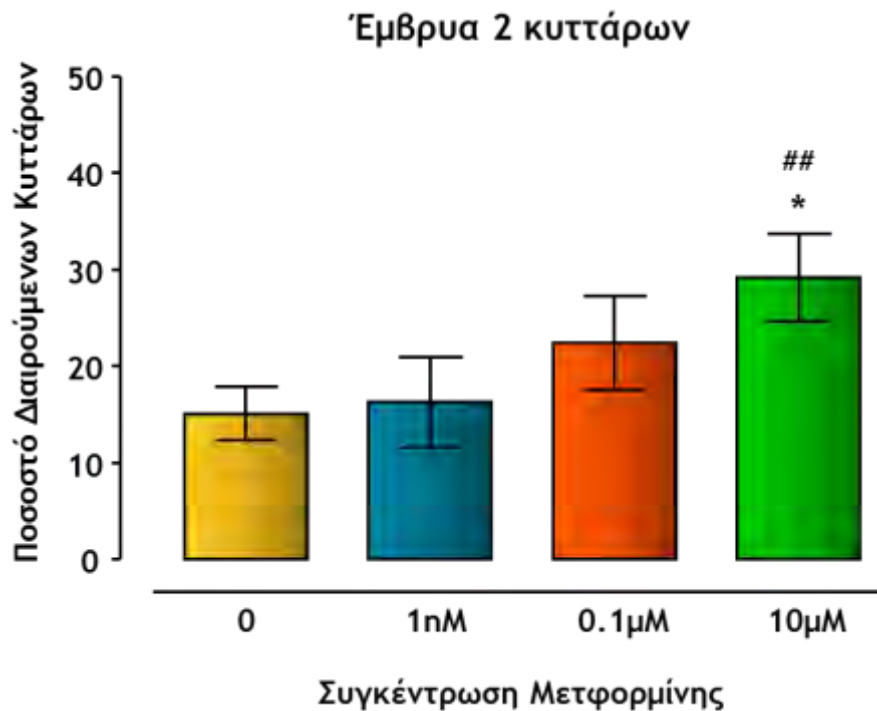


**Σχήμα-14:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης (IVF). Έμβρυα  $\geq 8$ -κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 6-12 επαναλήψεων, σε σύνολο 147-218 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

\*\* $p < 0.01$ : στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

#### $p < 0.001$ : στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.

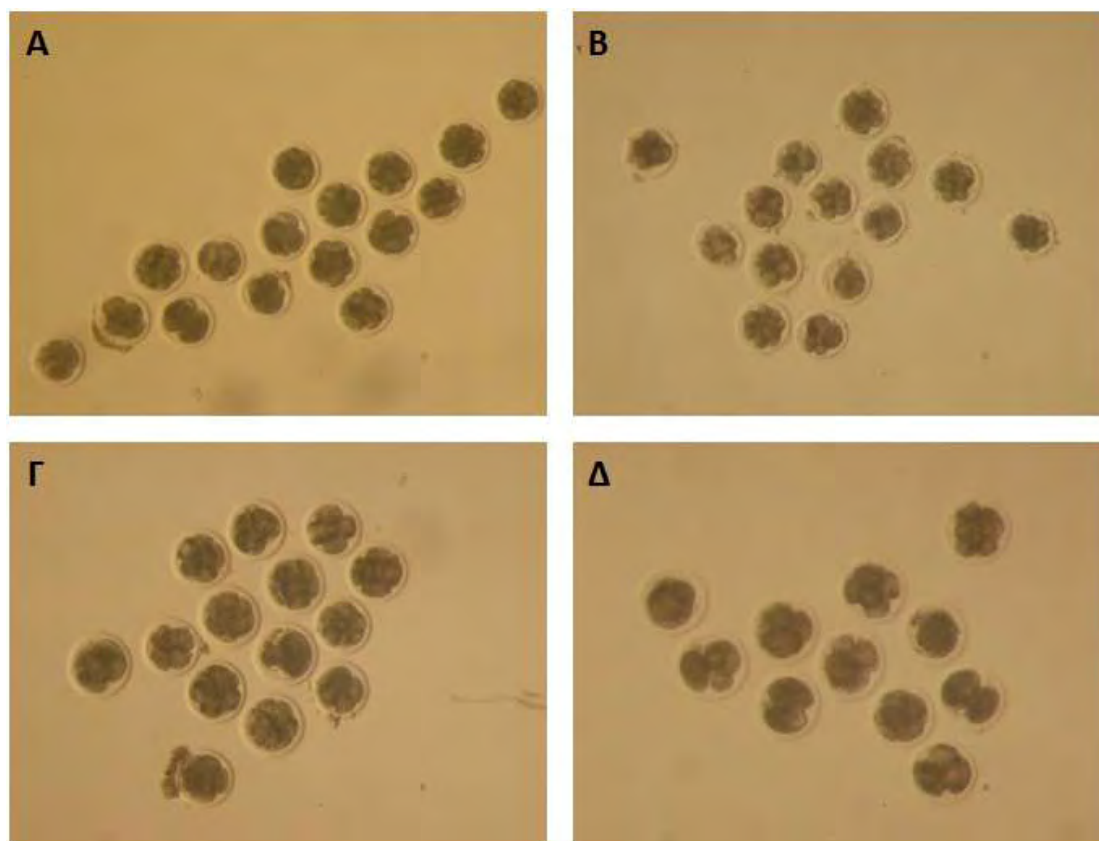




**Σχήμα-15:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης (IVF). (Α) έμβρυα  $\geq 8$ -κυττάρων και (Β) έμβρυα 2-κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 6-12 επαναλήψεων, σε σύνολο 147-218 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

\* $p < 0.05$ : στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

## $p < 0.01$ : στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.



**Εικόνα-8:** Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών - Χορήγηση μετφορμίνης μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης. (Α): Πειραματική ομάδα ελέγχου, (Β-Δ): Πειραματικές ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν μετφορμίνη (Β): 1nM, (Γ): 0.1μM και (Δ): 10μM.

### **Β' φάση - μελέτη της επίδρασης της μετφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών**

Σε αυτή τη φάση εξετάστηκε η επίδραση 10μΜ μετφορμίνης σε έμβρυα βοοειδών ως προς τη ρύθμιση του TSC2. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε σύμφωνα με 2 διαφορετικά πρωτόκολλα:

- σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων και,
- μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.

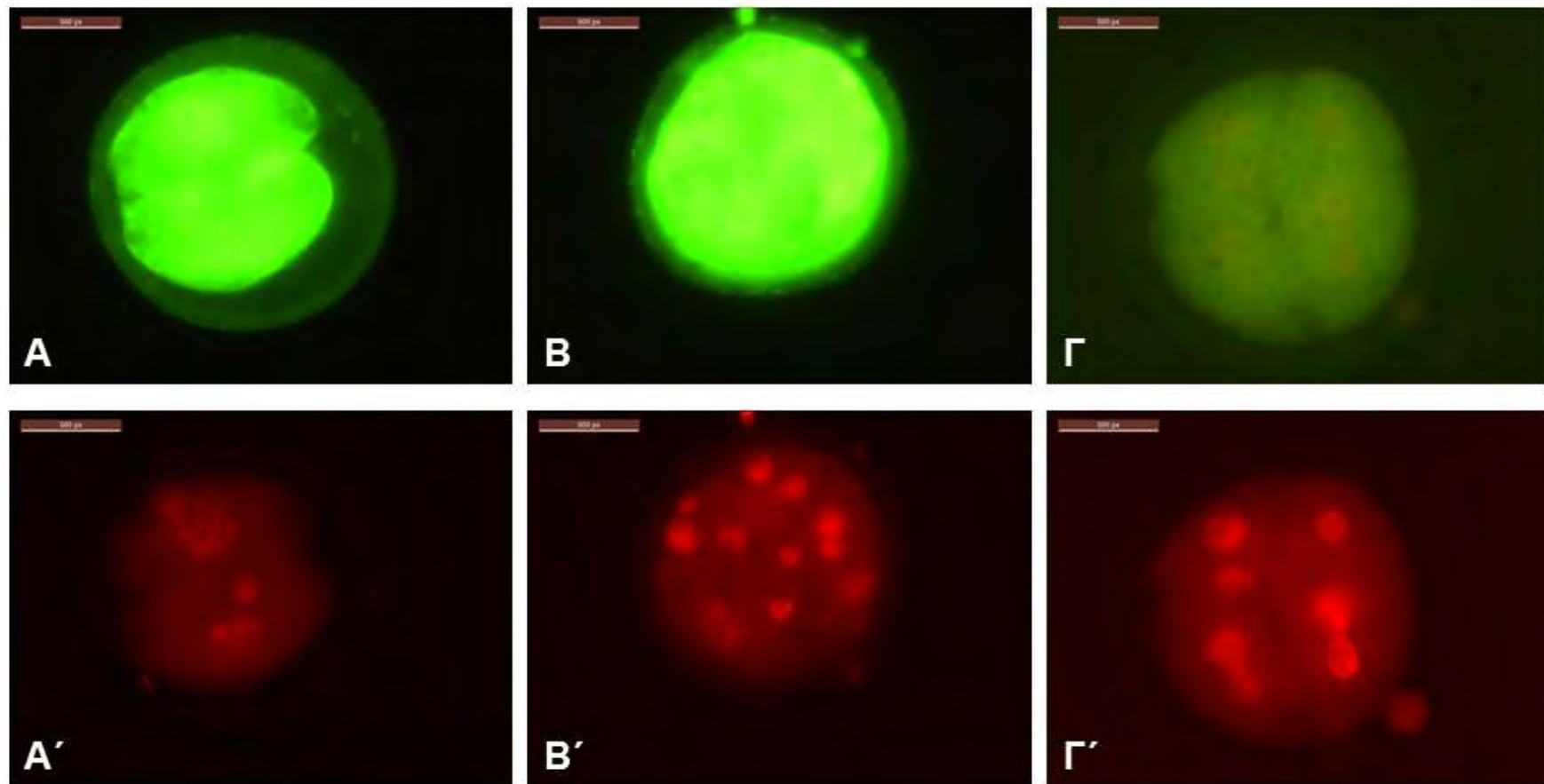
Τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που απομονώνονταν από το ωοθυλακικό υγρό υποβάλλονταν στη διαδικασία της ωρίμανσης *in vitro*, γονιμοποιούνταν με αναβιωμένα σπερματοζωάρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργούνταν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με σκοπό την εκτίμηση:

- της παρουσίας TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών
- πιθανής ενεργοποίησης του μορίου αυτού μέσω της AMPK, (φωσφορυλίωση του TSC2 στη Ser1387 από την AMPK) [Corradetti *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004].

### **Μελέτη της έκφρασης του TSC2 και της ενεργοποίησης του από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών**

#### ***Μελέτη της έκφρασης του TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών***

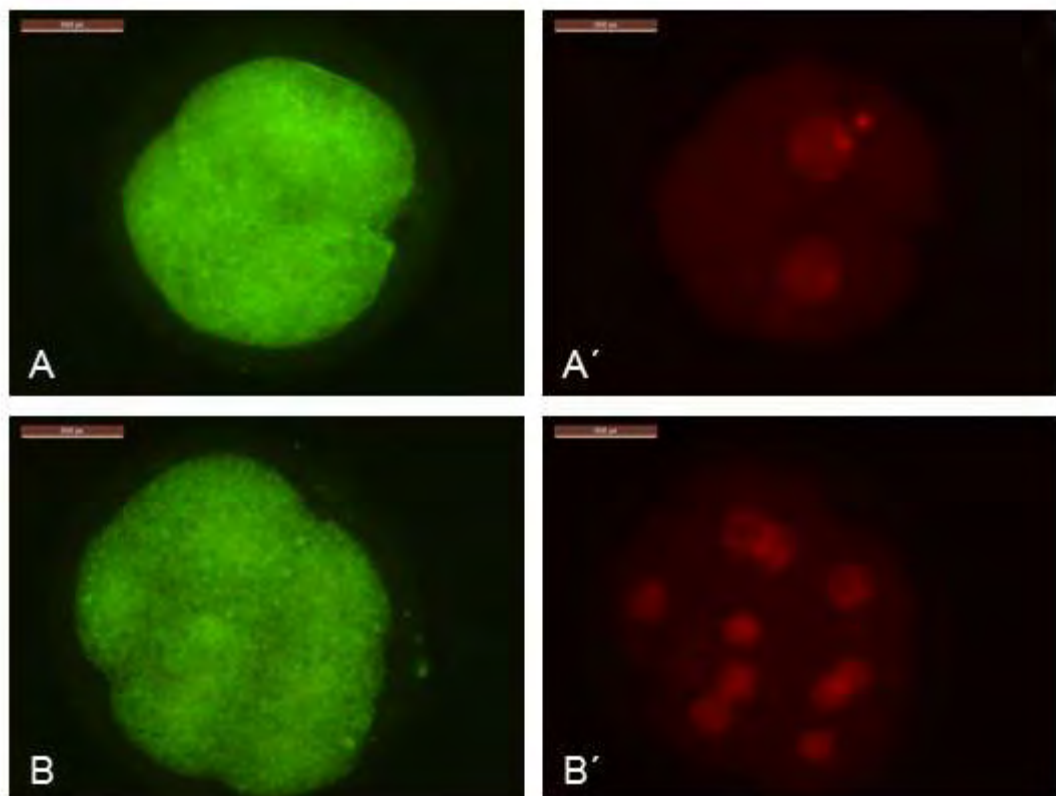
Κατά τα πρώτα στάδια της *in vitro* ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών παρατηρήθηκε έκφραση του TSC2 (4 επαναλήψεις, σε σύνολο n=55 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, Εικόνα-9). Η έκφραση του ενζύμου δεν φαίνεται να διαφοροποιείται στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων τα οποία μελετήθηκαν. Επώαση των κυττάρων απουσία του εκλεκτικού αντισώματος έναντι του άμινο-τελικού άκρου του TSC2 επιβεβαίωσε την ειδικότητα της χρώσης (Εικόνα-9Γ).



**Εικόνα-9:** Έκφραση του TSC2 σε έμβρυα βοοειδών. (A, B): TSC2-ανοσοδραστικότητα σε διάφορα στάδια διαίρεσης των εμβρύων (Γ): Επώαση των κυττάρων απουσία του εκλεκτικού αντισώματος έναντι του άμινο-τελικού άκρου του TSC2. (A'-Γ'): χρώση των πυρήνων των κυττάρων των φωτογραφιών Α-Γ με προπίδιο ιωδίου (PI).

**Μελέτη των επιπέδων ενεργοποίησης του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών**

Κατά τα πρώτα στάδια της *in vitro* ανάπτυξη εμβρύων βοοειδών παρατηρήθηκε η παρουσία χαμηλών επιπέδων ενεργοποιημένης από την AMPK TSC2 (Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2, Εικόνα-10). Η έκφραση του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 δεν φαίνεται να διαφοροποιείται στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων τα οποία μελετήθηκαν.



**Εικόνα-10:** Έκφραση του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 σε έμβρυα βοοειδών. TSC2-ανοσοδραστικότητα σε έμβρυα 2 (A) και ≥8 κυττάρων (B), (A', B'): χρώση των πυρήνων των κυττάρων των φωτογραφιών A και B με προπύδιο ιωδίου (PI).

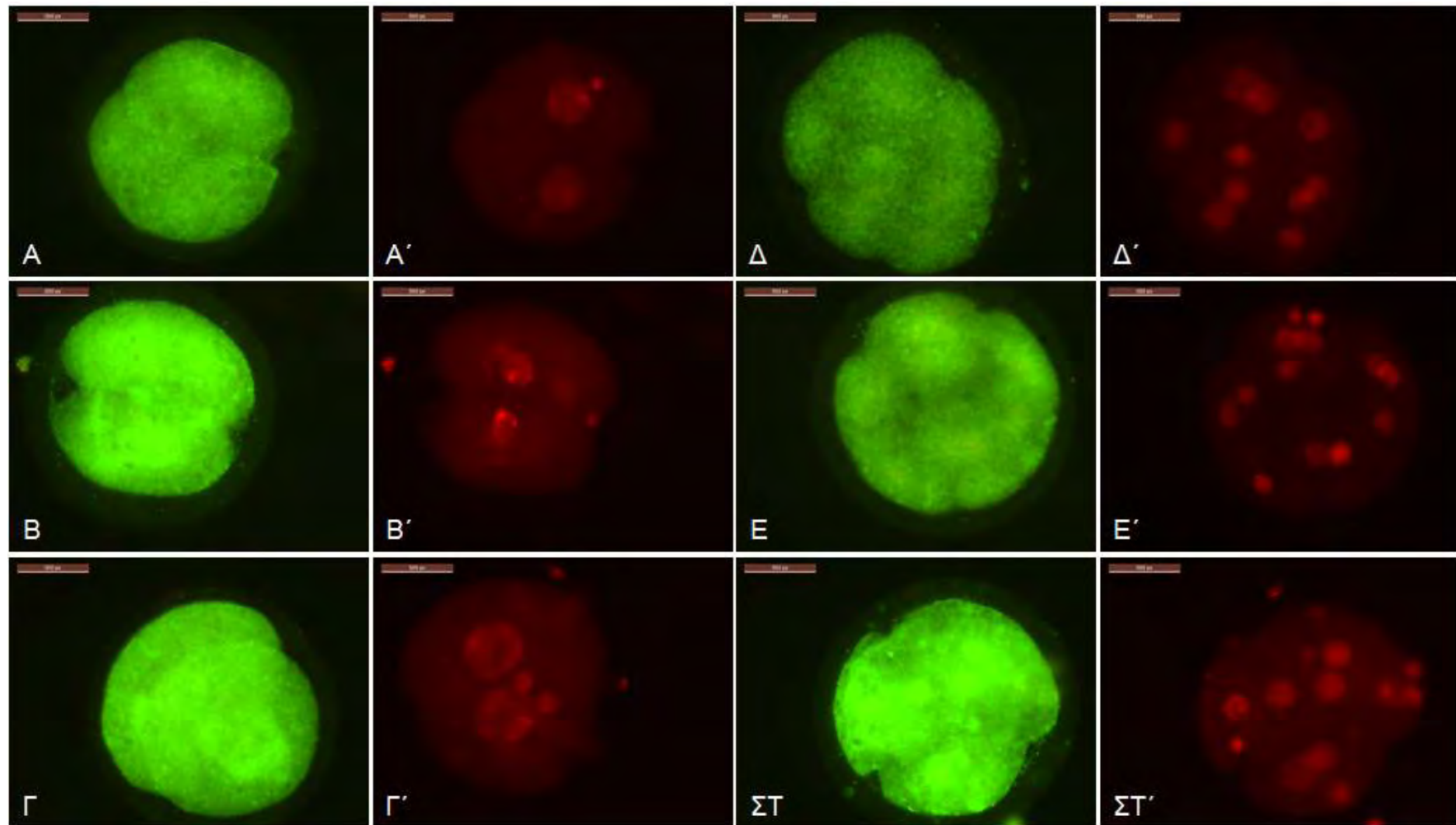
## **Μελέτη της επίδραση της μετφορμίνης στην ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών**

### ***Χορήγηση μετφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων***

Χορήγηση 10μΜ μετφορμίνης σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων βοοειδών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας σε σχέση με κύτταρα ελέγχου τα οποία καλλιεργήθηκαν απουσία του φαρμάκου (Εικόνα-11).

### ***Χορήγηση μετφορμίνης στο στάδιο της γονιμοποίησης***

Χορήγηση 10μΜ μετφορμίνης στο στάδιο της γονιμοποίησης εμβρύων βοοειδών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας σε σχέση με κύτταρα ελέγχου τα οποία καλλιεργήθηκαν απουσία του φαρμάκου (Εικόνα-11).



**Εικόνα-11:** Επίδραση της μετφορμίνης στην έκφραση ανοσοδραστικότητας του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 σε έμβρυα βοοειδών. Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 ανοσοδραστικότητα σε έμβρυα 2 (Α-Γ) και ≥8 (Δ-ΣΤ) κυττάρων απουσία (Α, Δ) ή παρουσία 10μΜ μετφορμίνης στο στάδιο της *in vitro* γονιμοποίησης (Β, Ε) ή σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων (Γ, ΣΤ). (Α'-ΣΤ'): χρώση των πυρήνων των κυττάρων των φωτογραφιών Α-ΣΤ με ΡΙ.

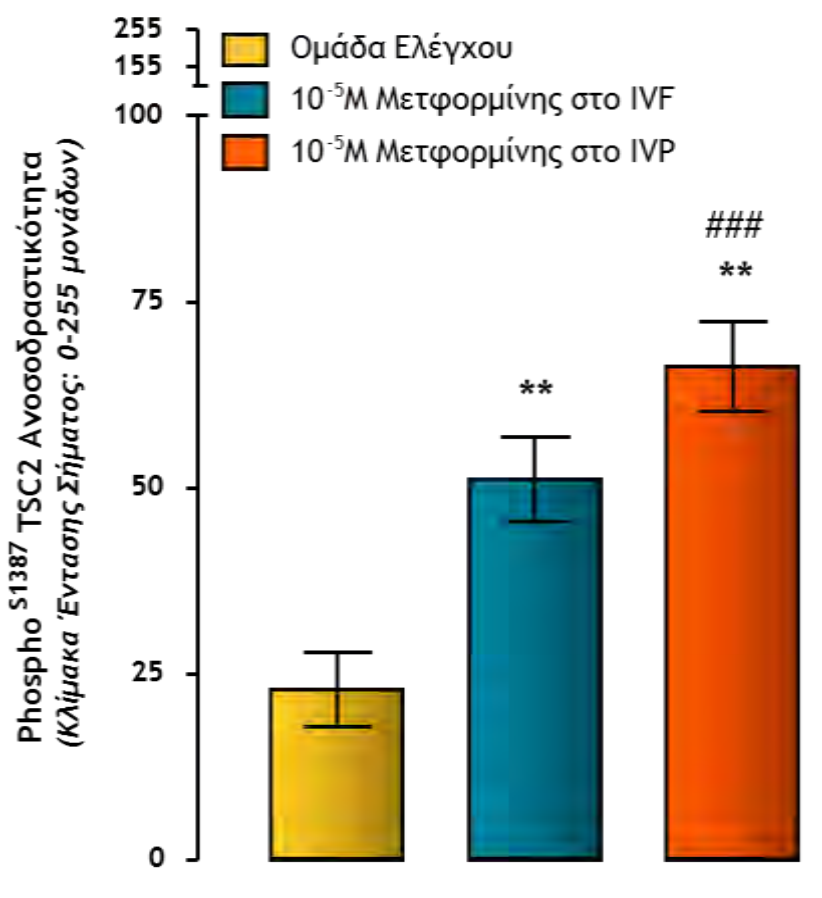
## Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του TSC2 και της ενεργοποίησης του από την AMPK μετά από τη διαφορική χορήγηση μετφορμίνης στα διάφορα στάδια παραγωγής εμβρύων

Ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett έδειξε ότι χορήγηση 10μΜ μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων βοοειδών αύξησε στατιστικώς σημαντικά την ανοσοδραστικότητα του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 έως  $289.1 \pm 26.29\%$  ( $p < 0.01$ ) σε σχέση με κύτταρα ελέγχου. Ανάλογα αποτελέσματα είχε η χορήγηση του φαρμάκου κατά την *in vitro* γονιμοποίηση των εμβρύων μια και οδήγησε σε αύξηση της ανοσοδραστικότητας του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 ως  $223.0 \pm 24.5\%$  ( $p < 0.01$ ) σε σχέση με κύτταρα ελέγχου (Σχήμα-16).

Η αύξηση της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας η οποία παρατηρήθηκε με τη χορήγηση μετφορμίνης φαίνεται να σχετίζεται με αντίστοιχη αύξηση του λόγου Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 : ολική TSC2. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα ελέγχου ο λόγος αυτός ήταν  $0.25 \pm 0.05$ . Μετά τη χορήγηση μετφορμίνης κατά την *in vitro* γονιμοποίηση των εμβρύων ο λόγος αυτός έφτασε στο  $0.94 \pm 0.10$  ( $p < 0.01$ ) ενώ με τη χορήγηση του φαρμάκου σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων στο  $0.99 \pm 0.09$  ( $p < 0.01$ , Σχήμα-17).

Η ανάλυση των δεδομένων με ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης υπέδειξε ότι τα επίπεδα του Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας και ο λόγος Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 : ολική TSC2 αυξάνουν καθώς αυξάνει ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στο φάρμακο (Σχήματα 17, 18).



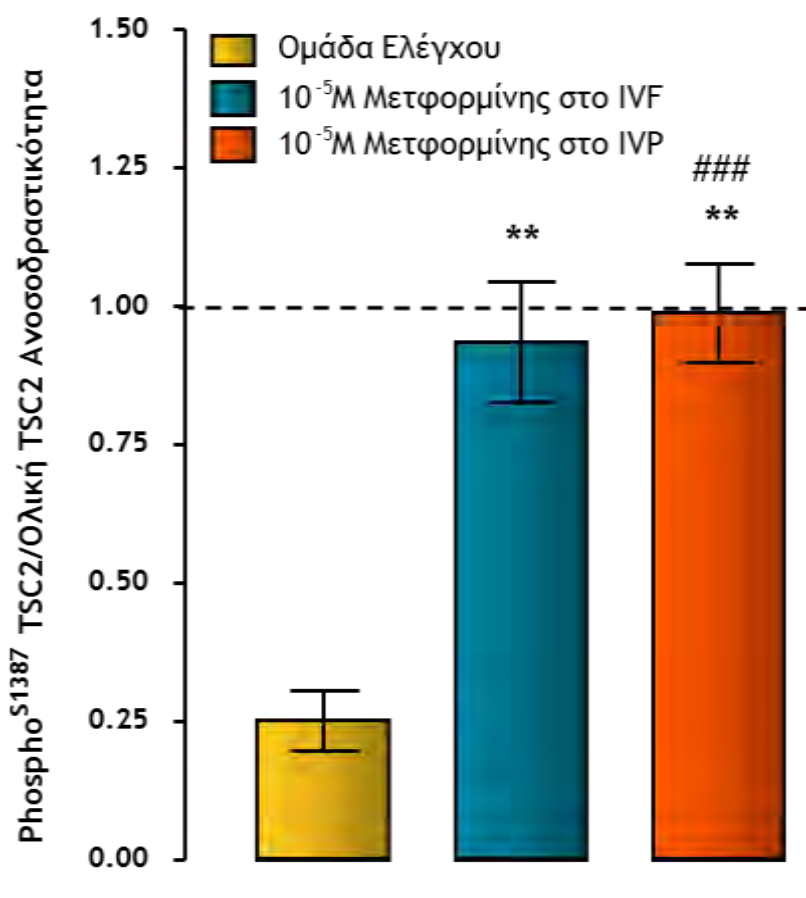


**Σχήμα-16:** Επίδραση της χορήγησης της μετφορμίνης κατά την *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) ή σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων (IVP: *in vitro* production) στα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης από την AMPK TSC2.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών  $\pm$  τυπικό σφάλμα 4 επαναλήψεων, σε σύνολο 55-58 συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

\*\* $p < 0.01$ : στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

\*\*\* $p < 0.001$ : στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.



**Σχήμα-17:** Επίδραση της χορήγησης της μετφορμίνης κατά την *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) ή σε όλα τα στάδια παραγωγής εμβρύων (IVP) στο λόγο Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 : ολική TSC2.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσων τιμών ± τυπικό σφάλμα 4 επαναλήψεων, σε σύνολο 55-58 συμπλεγμάτων ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ανά πειραματική ομάδα.

\*\*p<0.01: στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων σύμφωνα με τον Dunnett.

###p<0.001: στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου μετά από ανάλυση διακύμανσης ακολουθούμενη από μετα-ανάλυση για την ανίχνευση γραμμικής τάσης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μετφορμίνη είναι ενεργοποιητής της AMPK, ενός βασικού ρυθμιστικού ενζύμου καλά χαρακτηρισμένο σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των μυών, των πνευμόνων, της καρδιάς, των νεφρών, του εγκεφάλου (Starleton *et al.*, 1996) και των ωοθηκών (Tosca *et al.*, 2005; 2006<sup>a</sup>; 2006<sup>b</sup>). Η AMPK φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες-στόχους, οι οποίες συμμετέχουν σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια (Hardie και Carling, 1997). Υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών σχετικά με το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της AMPK σε ωοκύτταρα (Downs *et al.*, 2002, Mayes *et al.*, 2007, Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007). Μελέτες σε ωοκύτταρα βοοειδών έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της AMPK από τη μετφορμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των mM ελέγχει την πυρηνική ωρίμανση, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου τα οποία φτάνουν στο στάδιο της μετάφασης II της μειωτικής διαίρεσης (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2009). Είναι επίσης γνωστό ότι, η ανασταλτική δράση της μετφορμίνης στη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης μπορεί να αντιστραφεί μετά την αφαίρεση της από το μέσο καλλιέργειας (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007).

Με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου της μετφορμίνης στα ωοκύτταρα/έμβρυα, εξετάστηκε η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης (0-10μM) (i) στη δημιουργία εμβρύων (embryo production) βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου και, (ii) στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί (i) η παρουσία του TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών και, (ii) η πιθανή ενεργοποίηση του μορίου αυτού μέσω της AMPK μετά από έκθεση των κυττάρων στην μετφορμίνη (φωσφορυλίωση του TSC2 στη Ser1387 από την AMPK, Corradetti *et al.*, 2004, Shaw *et al.*, 2004).

## Επίδραση μετφορμίνης στο ποσοστό δημιουργίας εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου

Τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που απομονώθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό υποβλήθηκαν στη διαδικασία της ωρίμανσης *in vitro*, γονιμοποιήθηκαν με αναβιωμένα σπερματοζωάρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργήθηκαν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε: (i) σε όλα τα στάδια παραγωγής των εμβρύων (IVM, IVF και IVC) ή (ii) μόνο στο στάδιο της γονιμοποίησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της μετφορμίνης που χορηγήθηκαν σε όλα τα στάδια παραγωγής των εμβρύων δεν είχαν καμία επίδραση στο ποσοστό των ωοκυττάρων που εξελίχθηκαν σε έμβρυα. Ομοίως, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μετφορμίνης μόνο στο καλλιεργητικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη γονιμοποίηση των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου μετά την *in vitro* ωρίμανση τους δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό δημιουργίας των εμβρύων. Η απουσία δράσης που παρατηρήθηκε δείχνει ότι η χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων μετφορμίνης της τάξεως του 1nM-10μM δεν επηρεάζει τη γονιμοποίηση των ωαρίων. Επίσης, η παρατήρηση ότι η μετφορμίνη δεν επηρεάζει τον αριθμό των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου που εξελίσσονται σε έμβρυα, όταν αυτή χορηγείται από το στάδιο του IVM, είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε βοοειδή σύμφωνα με τις οποίες χορήγηση 10μM και 100μM μετφορμίνης δεν έχει καμία επίδραση στην πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων (Hong *et al.*, 2009; Tosca *et al.*, 2007). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι χορήγηση υψηλότερων συγκεντρώσεων μετφορμίνης (2-10mM) παρεμποδίζει την επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης, αναστέλλοντας τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007; Tosca *et al.*, 2007).

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας σε συνδυασμό με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η μετφορμίνη δεν ασκεί αρνητική επίδραση στην ωρίμανση των ωοκυττάρων όταν χορηγείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

## Επίδραση μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης εμβρύων βοοειδών

Παρόλο που σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας η χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων μετφορμίνης δεν επηρέαζε το ποσοστό των συμπλεγμάτων ωοκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, που εξελίσσονται σε έμβρυα, η χορήγηση της σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων είχε αρνητική δόσο-εξαρτώμενη δράση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Συγκεκριμένα, παρουσία μετφορμίνης σε συγκέντρωση 1μM και 10μM, το ποσοστό των εμβρύων που έφτασαν στο στάδιο των ≥8-κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση, σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου. Η μείωση αυτή στο ποσοστό των εμβρύων ≥8-κυττάρων συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των εμβρύων 2-κυττάρων.

Παρόμοια δράση του φαρμάκου παρατηρήθηκε από τον Hong και συν. (2009). Ωστόσο, η ομάδα αυτών των ερευνητών ανέφερε αύξηση του αριθμού των εμβρύων που παραμένουν στο στάδιο των 2-κυττάρων, η οποία σε αντίθεση με την παρούσα έρευνα δεν συσχετίστηκε με μείωση στα έμβρυα 8-κυττάρων. Μολονότι θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί ότι η έλλειψη δράσης της μετφορμίνης στα έμβρυα ≥8-κυττάρων είναι απλώς ένα αποτέλεσμα που σχετίζεται με το στάδιο στο οποίο χορηγήθηκε η μετφορμίνη (ο Hong και συν. χορήγησε το φάρμακο μόνο κατά το στάδιο του IVM), η πιο πιθανή ερμηνία αυτής της διαφοράς είναι ότι η ομάδα αυτή χρησιμοποίησε μέσο ωρίμανσης που δεν περιείχε ορό, ορμόνες και αναπτυξιακούς παράγοντες, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά την ωρίμανση των ωοκυττάρων και τη μετέπειτα ανάπτυξη τους.

Η δράση της μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων τεκμηριώθηκε περαιτέρω με μία ακόμα σειρά πειραμάτων, όπου η μετφορμίνη χορηγήθηκε μόνο κατά το στάδιο της γονιμοποίησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η χορήγηση της μετφορμίνης στο στάδιο της *in vitro* γονιμοποίησης είχε αρνητική δόσο-εξαρτώμενη δράση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Συγκεκριμένα, παρουσία μετφορμίνης σε συγκέντρωση 0,1μM και 10μM, το ποσοστό των εμβρύων που έφτασαν στο στάδιο των ≥8-κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση, σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου. Η μείωση αυτή στο ποσοστό των εμβρύων ≥8-κυττάρων συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των εμβρύων 2-κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε και στην

περίπτωση της χορήγησης της μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μετφορμίνη μπορεί να δράσει τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μέσω της ενεργοποίησης της AMPK (Zhou *et al.*, 2001, Musi *et al.*, 2002, Shaw *et al.*, 2005, Towler και Hardie, 2007). Η μετφορμίνη που χορηγείται κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης των ωοκυττάρων σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM ενεργοποιεί την AMPK, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ωρίμανση των ωοκυττάρων των βοοειδών (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007, Tosca *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης σε συνδυασμό με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η μετφορμίνη ασκεί αρνητική επίδραση στην ωρίμανση των ωοκυττάρων μόνο όταν η χορήγηση της γίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, όσον αφορά στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο ρυθμός διαίρεσης των εμβρύων επηρεάζεται ακόμα και αν χορηγηθούν χαμηλές συγκεντρώσεις μετφορμίνης. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η χορήγηση της μετφορμίνης μόνο κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης έχει το ίδιο αποτέλεσμα, όπως όταν χορηγείται σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων, αποτελεί ένδειξη ότι η ενεργοποίηση της AMPK παίζει σημαντικότερο ρόλο στην κυτταρική διαίρεση από ότι στη διαδικασία της ωρίμανσης.

Η αρνητική επίδραση που έχει η μετφορμίνη στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων είναι παρόμοια είτε το φάρμακο χορηγείται καθ' όλη τη διάρκεια της παραγωγής των εμβρύων είτε κατά τη γονιμοποίηση μόνο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τη σημασία της ρύθμισης της δραστηριότητας της AMPK κατά την *in vitro* παραγωγή εμβρύων και δείχνουν ότι κάθε μεταβολή στα επίπεδα της δραστηριότητας του ενζύμου μπορεί να έχει αρνητικό αποτέλεσμα για την ανάπτυξη των εμβρύων.

## Μελέτη της έκφρασης του TSC2 και της επίδραση της μετφορμίνης στην ενεργοποίηση του από την AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης εμβρύων βοοειδών

Για την ανάπτυξη του εμβρύου απαιτούνται μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Η δραστηριότητα της AMPK κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου πιθανώς σχετίζεται με τη λειτουργία που έχει ως κεντρικός αισθητήρας των επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο, ανταποκρινόμενος στην αύξηση του λόγου AMP/ATP (Starpleton *et al.*, 1996, Towler και Hardie, 2007, Luo *et al.*, 2010). Είναι γνωστό ότι υπό συνθήκες στέρησης ενέργειας η AMPK φωσφορυλιώνει το TSC2 και ενισχύει τη δραστηριότητα του (Inoki *et al.*, 2003). Πρόσφατες γενετικές μελέτες έδειξαν ότι το TSC2 εκφράζεται σε ωοκύτταρα και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων σε καταστολή (dormancy) μέσω της αναστολής της δραστηριότητας του mTORC1 (Adhikari *et al.*, 2009).

Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή του TSC2 στις δράσεις της μετφορμίνης στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη εξετάστηκαν: (i) η παρουσία του TSC2 στα έμβρυα βοοειδών και (ii) η πιθανή ενεργοποίηση του μέσω της AMPK, παρουσία ή απουσία μετφορμίνης, καθ' όλη τη διάρκεια της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων ή κατά τη γονιμοποίηση μόνο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, το TSC2 εκφράζεται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων βοοειδών, ενώ η έκφραση του ενζύμου δεν φαίνεται να διαφοροποιείται στα στάδια ανάπτυξης που μελετήθηκαν. Η παρουσία TSC2-ανοσοδραστικότητας σε έμβρυα βοοειδών αναφέρεται για πρώτη φορά.

Είναι γνωστό ότι, η φωσφορυλίωση του TSC2 από την AMPK στη συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων ειδών σερίνη 1387, οδηγεί σε ενεργοποίηση του TSC2 (Corradetti *et al.*, 2004, Shaw *et al.*, 2004). Όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση της μετφορμίνης είτε σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων είτε μόνο κατά το στάδιο της γονιμοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK. Η έκφραση του φωσφορυλιωμένου TSC2 δεν φαίνεται να διαφοροποιείται στα

διάφορα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων τα οποία μελετήθηκαν. Το φωσφορυλιωμένο TSC2, μετά τη χορήγηση μετφορμίνης, αντιστοιχεί στην ολική ποσότητα TSC2 πρωτεΐνης στα κύτταρα γεγονός που προκύπτει τόσο από την αύξηση της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας όσο και από την αύξηση του λόγου Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 : ολική TSC2 η οποία παρατηρήθηκε.

## Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι:

- η μετφορμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν έχει επίδραση στην ωρίμανση των ωοκυττάρων βοοειδών
- η μετφορμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει αρνητική δόσο-εξαρτώμενη επίδραση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων βοοειδών
- η επίδραση της μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης είναι η ίδια είτε το φάρμακο χορηγείται καθ' όλη τη διάρκεια της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων είτε μόνο κατά το στάδιο της γονιμοποίησης
- δεδομένου ότι η μετφορμίνη είναι ενεργοποιητής της AMPK, τα αποτελέσματα αυτά σηματοδοτούν τη σπουδαιότητα της ρύθμισης της δραστηριότητας της AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων και δείχνουν ότι κάθε μεταβολή των επιπέδων δραστηριότητας του ενζύμου αυτού μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη τους
- στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η έκφραση της TSC2 σε έμβρυα βοοειδών, τέλος
- το μοριακό μονοπάτι που εμπλέκεται στην προκαλούμενη από τη μετφορμίνη μείωση του ρυθμού διαίρεσης των εμβρύων βοοειδών *in vitro* περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετφορμίνη, ένα παράγωγο της διγουανίδης, χρησιμοποιείται ως θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και στη θεραπεία του PCOS. Οι κύριες δράσεις της μετφορμίνης είναι η αναστολή της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και η μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη από περιφερικούς ιστούς, οδηγώντας σε αυξημένη πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης από τους σκελετικούς μυς. Ο κύριος διαμεσολαβητής της δράσης της μετφορμίνης είναι η AMPK [AMP-activated protein kinase: πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από την AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη)]. Η AMPK είναι ο κεντρικός αισθητήρας των επιπέδων ενέργειας στο κύτταρο, ο οποίος ανταποκρίνεται στην αύξηση του λόγου AMP/ATP (adenosine monophosphate/adenosine triphosphate: μονοφωσφορική/τριφωσφορική αδενοσίνη). Μελέτες σε ωκύτταρα βοοειδών έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της AMPK από τη μετφορμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των mM ελέγχει την πυρηνική ωρίμανση. Το TSC2 (tuberous sclerosis complex 2: σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης 2) έχει αναγνωριστεί ως ο κατωφερής στόχος της AMPK.

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης χαμηλών συγκεντρώσεων μετφορμίνης (1nM-10μM) (i) στη δημιουργία εμβρύων βοοειδών από συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου, (ii) το ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων και, (iii) την πιθανή ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK. Τα συμπλέγματα ωκυττάρου-ωοφόρου δίσκου ωρίμαζαν *in vitro*, γονιμοποιούνταν με αναβιωμένα σπερματοζωάρια ταύρου και τα ζυγωτά καλλιεργούνταν συνολικά για 72 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε σε όλα τα στάδια της παραγωγής των εμβρύων ή μόνο κατά το στάδιο της γονιμοποίησης. Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία της TSC2 κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων και η πιθανή ενεργοποίηση του μορίου αυτού μέσω της AMPK πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η χορήγηση της μετφορμίνης είχε δόσο-εξαρτώμενη επίδραση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων. Συγκεκριμένα, παρουσία

μετφορμίνης σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων σε συγκέντρωση 1μΜ και 10μΜ ή μόνο στο στάδιο της *in vitro* γονιμοποίησης σε συγκέντρωση 0,1μΜ και 10μΜ, το ποσοστό των εμβρύων που έφτασαν στο στάδιο των ≥8-κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση, σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου. Η μείωση αυτή στο ποσοστό των εμβρύων ≥8-κυττάρων συνοδεύτηκε από αύξηση του ποσοστού των εμβρύων 2-κυττάρων. Η μετφορμίνη δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό των ωοκυττάρων που εξελίχθηκαν σε έμβρυα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το TSC2 εκφράζεται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων βοοειδών. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι, η χορήγηση 10μΜ μετφορμίνης είτε σε όλα τα στάδια της *in vitro* παραγωγής εμβρύων ή μόνο κατά το στάδιο της *in vitro* γονιμοποίησης είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του TSC2 μέσω της AMPK. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι, τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου TSC2, μετά τη χορήγηση μετφορμίνης, αντιστοιχούν στην ολική ποσότητα TSC2 πρωτεΐνης στα κύτταρα γεγονός που προκύπτει τόσο από την αύξηση της Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-ανοσοδραστικότητας όσο και από την αύξηση του λόγου Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2 : ολική TSC2 η οποία παρατηρήθηκε.

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι, η μετφορμίνη δεν έχει καμία επίδραση στο ποσοστό των ωοκυττάρων που εξελίσσονται σε έμβρυα και κατά συνέπεια δεν επηρεάζει την ωρίμανση των ωοκυττάρων όταν χορηγείται σε συγκεντρώσεις της τάξεως των μΜ. Εντούτοις, η μετφορμίνη σε αυτές τις συγκεντρώσεις έχει αρνητική δόσο-εξαρτώμενη επίδραση στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων βοοειδών. Η δράση αυτή της μετφορμίνης στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων είναι η ίδια είτε το φάρμακο χορηγείται καθ' όλη τη διάρκεια της *in vitro* παραγωγής των εμβρύων είτε μόνο κατά το στάδιο της *in vitro* γονιμοποίησης. Επιπλέον, δεδομένου ότι η μετφορμίνη είναι ενεργοποιητής της AMPK, τα αποτελέσματά μας σηματοδοτούν τη σπουδαιότητα της ρύθμισης της δραστηριότητας της AMPK κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων και δείχνουν ότι κάθε μεταβολή των επιπέδων δραστηριότητας του ενζύμου αυτού μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των εμβρύων. Τέλος, από τα αποτελέσματά μας μπορεί να συναχθεί ότι το μοριακό μονοπάτι το οποίο εμπλέκεται στη μείωση του ρυθμού διαίρεσης των εμβρύων από τη μετφορμίνη περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του TSC2 από την AMPK.

## ABSTRACT

Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride) is widely used in the treatment of diabetes mellitus type 2 and in polycystic ovary syndrome. The exact mechanism of action of metformin is uncertain. Its glucose- and insulin-lowering effects are mediated, at least in part, by activation of AMPK through activation of the upstream kinase liver kinase B1 (LKB1). AMPK is a key regulatory enzyme well characterized in many tissues, including the liver, muscle, lung, heart, kidney, brain and ovary. AMPK acts as a cellular energy sensor, responding to increases in the AMP/ATP ratio. Studies on bovine oocytes have revealed that activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) by mM concentrations of metformin controls nuclear maturation. Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) has been identified as a downstream target of AMPK.

The objective of this study was to investigate the effects of low concentrations of metformin (1nM-10μM) on the percentage of cultured cumulus-oocyte complexes (COC) giving embryos, embryo cleavage rate and AMPK-mediated TSC2 activation. Metformin was supplemented throughout *in vitro* embryo production (IVP) or during *in vitro* fertilization (IVF) alone. COC were matured *in vitro*, inseminated, and presumptive zygotes cultured further -72h post-insemination-before the percentage of COC giving embryos and embryo cleavage rate (as indicated by the cell-stage of embryos at that time) were assessed. The presence of TSC2 in bovine embryos and its possible AMPK-induced activation were assessed immunocytochemically.

Metformin had a dose-dependent effect on the cleavage rate of embryos. Drug treatment throughout IVP or during IVF alone decreased the percentage of ≥8-cell embryos produced 72 hours post-insemination and increased that of 2-cell embryos, in a statistical significant manner. The percentage of cultured COC giving embryos was not affected by metformin. TSC2 is expressed in early embryos. Metformin (10μM) increased AMPK-induced Phospho<sup>S1387</sup>-TSC2-immunoreactivity

when added during IVF and throughout all IVP stages and this increase corresponded to the total TSC2 protein levels expressed in the cells.

We report here for the first time that: (1) there is a dose-dependent negative effect of metformin on the cleavage rate of bovine embryos, (2) TSC2 is expressed in bovine embryos and (3) is possibly the mediator of metformin effect.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamiak SJ, Powell K, Rooke JA, Webb R, Sinclair KD: Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 2006, 131: 247-258.
- Adhikari D, Flohr G, Gorre N, Shen Y, Yang H, Lundin E, Lan Z, Gambello MJ, Liu K: Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular Human Reproduction* 2009, 15: 765-70.
- Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM: Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive Biomedicine Online* 2003, 6: 410-415.
- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD: Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle* 2009, 8: 909-915.
- Al-Inany H, Aboulghar M: GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Human Reproduction* 2002, 17: 874-885.
- Anderiesz C, Trounson AO: Fertilization and early embryology: The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes *in vitro*. *Human Reproduction* 1995, 10: 2377-2381.
- Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semenchko AV, Provinciali M, Re F, Franceschi C: Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Experimental Gerontology* 2005, 40: 685-693.
- Anisimov VN, Egormin PA, Bershtein LM, Zabezhinskii MA, Piskunova TS, Popovich IG, Semenchko AV: Metformin decelerates aging and development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005, 139: 721-723.
- Asch RH, Balmaceda JP, Wong PC, Ellsworth LR, Daich EA, Zuo WL, Remorgida V, Santos R, Garcia M: Gamete intrafallopian transfer (GIFT): use of minilaparotomy and an individualized regimen of induction of follicular development. *Acta Europaea Fertilitatis* 1986, 17: 187-193.
- Aschenbach WG, Sakamoto K, Goodyear LJ: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, metabolism and exercise. *Sports Medicine* 2004, 34: 91-103.
- Asem EK, Molnar M, Hertelendy F: Luteinizing hormone-induced intracellular calcium mobilization in granulosa cells: comparison with forskolin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1987, 120: 853-859.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B: Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development* 1994, 37: 335-344.
- Baca M, Zamboni L: The fine structure of human follicular oocytes. *Journal of Ultrastructure Research* 1967, 19: 354-381.
- Bachvarova R, De Leon V: Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Developmental Biology* 1980, 74: 1-8.
- Bachvarova R: Incorporation of tritiated adenosine into mouse ovum RNA. *Developmental Biology* 1974, 40: 52-58.
- Bailey CJ: Metformin and its role in the management of type II diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 1997, 4: 40-47.
- Bailey CJ: Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 1992, 15: 755-772.
- Baker SJ, Spears N: The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Human Reproduction Update* 1999, 5: 153-165.

- Baker TG: A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences* 1963, 158: 417-433.
- Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO: Blastocyst development and birth after *in-vitro* maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction* 1995, 10: 3243-3247.
- Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A: Production of embryos from *in vitro*-matured primary human oocytes. *Fertility and Sterility* 1996, 65: 1151-1156.
- Barnes FL, Sirard MA: Oocyte maturation. *Seminars in Reproductive Medicine* 2000, 18: 123-131.
- Bassett DL: The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *American Journal of Anatomy* 1943, 73: 251-291.
- Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, Le Marchand-Brustel Y, Giorgetti-Peraldi S, Cormont M, Bertolotto C, Deckert M, Auburger P, Tanti JF, Bost F: Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Research* 2010, 70: 2465-2475.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F: The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008, 27: 3576-3586.
- Beneden Van E: Recherches sur la maturation de l'oeuf, la fecundation et la division cellulaire. *Archives de Biologie* 1883, 4: 265-640.
- Bergh PA, Navot D: Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1992, 9: 429-438.
- Berridge MJ, Irvine RF: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984, 312: 315-321.
- Biggers JD: Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *Journals of Reproduction and Fertility* 1991, 93: 173-186.
- Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ: Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 2007, 74: 1021-1034.
- Bloom AM, Mukherjee BB: RNA synthesis in maturing mouse oocytes. *Experimental Cell Research* 1972, 74: 577-582.
- Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM: Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology* 1984, 105: 488-499.
- Borum K: Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental Cell Research* 1961, 24: 495-507.
- Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA: Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 2006, 29: 254-258.
- Brevini TA, Vassena R, Paffoni A, Francisci C, Fascio U, Gandolfi F: Exposure of pig oocytes to PCBs during *in vitro* maturation: effects on developmental competence, cytoplasmic remodelling and communications with cumulus cells. *European Journal of Histochemistry* 2004, 48: 347-356.
- Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F: Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during *in vitro* maturation of bovine oocytes and their

- relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 1999, 52: 427-433.
- Brevini-Gandolfi TA, Gandolfi F: The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001, 55: 1255-1276.
- Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG Jr: Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes and Development* 2004, 18: 2893-2904.
- Calarco PG: Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Developmental Genetics* 1995, 16: 36-43.
- Calder MD, Caveney AN, Sirard MA, Watson AJ: Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertility and Sterility* 2005, 83(Suppl1): 1077-1085.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ: Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, 1: 14-25.
- Canipari R, Palombi F, Riminucci M, Mangia F: Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Developmental Biology* 1984, 102: 519-524.
- Carling D: The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences* 2004, 29: 18-24.
- Carroll J, Jones KT, Whittingham DG: Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Reviews of Reproduction* 1996, 1: 137-143.
- Cha KY, Do BR, Chi HJ, Yoon TK, Choi DH, Koo JJ, Ko JJ: Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 1992, 4: 695-701.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK: Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility and Sterility* 1991, 55: 109-113.
- Chang MC: Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 1959, 184: 466-467.
- Chian RC, Buckett WM, Abdul Jahil AK, Son WY, Sylvestre C, Rao D, Tan SL: Natural-cycle *in vitro* fertilization combined with *in vitro* maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertility and Sterility* 2004, 82: 1675-1678.
- Chian RC, Niwa K, Sirard MA: Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994, 41: 1499-1508.
- Chian RC, Sirard MA: Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during *in vitro* maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 1995, 42: 425-431.
- Chiquione A: The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anatomical Record* 1954, 118: 135-145.
- Chiquoine AD: The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *American Journal of Anatomy* 1960, 106: 149-169.
- Clarke HJ, Masui Y: The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology* 1983, 97: 291-301.
- Cole RJ, Edwards RG, Paul J: Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocyst of the rabbit. *Experimental Cell Research* 1965, 37: 501-504.

- Combelles CM, Albertini DF: Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of gamma-tubulin. *Developmental Biology* 2001, 239: 281-294.
- Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL: Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes and Development* 2004, 18: 1533-1538.
- Craft I, Berbard A, Djahanbakhch O, Mcleod F: Embryo transfer catheter material. *Lancet* 1982, 1: 680.
- Craft I, Porter R, Green S, Tucker M, Smit B, Twigg H, Ahuja K, Whittingham D: Success of fertility, embryo number and *in-vitro* fertilization. *Lancet* 1984, 323: 732.
- Crespo JL, Díaz-Troya S, Florencio FJ: Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 2005, 139: 1736-1749.
- Crespo JL, Hall MN: Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, 66: 579-591.
- Daya S, Gunby J: Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, (3): CD004830.
- de Crespigny LJ, O'Herlihy C, Hoult IJ, Robinson HP: Ultrasound in an *in vitro* fertilization program. *Fertility and Sterility* 1981, 35: 25-28.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A: *In-vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1999, 14: 1859-1863.
- Dekel N: Spatial relationship of follicular cells in the control of meiosis. *Progress in Clinical and Biological Research* 1988, 267: 87-101.
- DeScisciolo C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ, Lanzendorf SE: Human embryos derived from *in vitro* and *in vivo* matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology. *Journal of Assisted and Reproduction Genetics* 2000, 17: 284-292.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ: Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 1985, 82: 454-458.
- Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ: Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *Journal of Experimental Zoology* 1988, 245: 86-96.
- Downs SM, Hudson ER, Hardie DG: A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Developmental Biology* 2002, 245: 200-212.
- Draws U: 1995 Color Atlas of Embryology. Thieme, 421p.
- Dubreuil G: Le determinisme de la grande thecale de l'ovaire. *Acta Anatomica* 1957, 30: 269-274.
- Edinger AL, Thompson CB: Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Molecular Biology of the Cell* 2002, 13: 2276-2288.
- Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL: Birth from cryopreserved embryos following *in-vitro* maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1997, 12: 1056-1058.



- Edwards RG: Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965<sup>a</sup>, 208: 349-351.
- Edwards RG: Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965<sup>b</sup>, 2: 926-927.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC: Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature* 1969, 221: 632-635.
- Edwards RG, Donahue RP, Baramki Ta, Jones HW Jr: Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1966, 96: 192-200.
- Edwards RG, Gates AH: Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. *The Journal of Endocrinology* 1959, 18: 292-304.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM: Fertilization and cleavage *in vitro* of human oocytes matured *in vivo*. *Nature* 1970, 227: 1307-1309.
- Edwards RG, Steptoe PC: Control of human ovulation, fertilization and implantation. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1974, 67: 30-34.
- Edwards RG: Are minimal stimulation IVF and IVM set to replace routine IVF? *Reproductive Biomedicine Online* 2007, 14: 267-270.
- Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT: *In vitro* oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. *Fertility and Sterility* 2005, 84: 1027-1029.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL: Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biology of Reproduction* 1985, 33: 1041-1049.
- Ersoy C, Kiyici S, Budak F, Oral B, Guclu M, Duran C, Selimoglu H, Erturk E, Tuncel E, Imamoglu S: The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008, 81: 56-60.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005, 330: 1304-1305.
- Everett NB: Observational and experimental evidences relating to the origin and differentiation of the definite germ cells in mice. *Journal of Experimental Zoology* 1943, 92: 49-91.
- Everhart J, Wright D: Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 1995, 273: 1605-1609.
- Feichtinger W, Kemeter P: Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertility and Sterility* 1986, 45: 722-725.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S: The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102: 8204-8209.
- Fingar DC, Blenis J: Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004, 23: 3151-3171.
- Fleming R, Adam AH, Barlow DH, Black WP, MacNaughton MC, Coutts Jr: A new systematic treatment for infertile women abnormal hormone profiles. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1982, 89: 80-83.
- Fleming R, Jamieson ME, Hamilton MP, Black WP, Macnaughton MC, Coutts JR: The use of GnRH analogues in combination with exogenous gonadotropins in infertile women. *Acta endocrinologica Supplementum* 1988, 288: 77-84.

- Flores JA, Veldhuis JD, Leong DA: Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentrations in single ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology* 1990, 127: 3172-3179.
- Franchi LL, Mandl AM: The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proceedings of the Royal Society of London* 1962, 157: 99-114.
- Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D: The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 25226-25232.
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D: Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature Cell Biology* 2002, 4: 699-704.
- Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G: Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell* 2003, 11: 1457-1466.
- Gerhart J, Wu M, Kirschner M: Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *The Journal of Cell Biology* 1984, 98: 1247-1255.
- Gifford DJ, Fleetham JA, Mahadevan MM, Taylor PJ, Schultz GA: Protein synthesis in mature human oocytes. *Gamete Research* 1987, 18: 97-107.
- Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK: Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biology of Reproduction* 1995, 52: 1234-1243.
- Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ: Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1971, 110(5): 644-652.
- Gondos B: Comparative studies of normal and neoplastic ovarian germ cells: 1. Ultrastructure of oogonia and intercellular bridges in the fetal ovary. *International Journal of Gynecological Pathology* 1987, 6: 114-123.
- Gondos B: Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 1973<sup>a</sup>, 138: 23-30.
- Gondos B: Intercellular bridges and mammalian germ cell differentiation. *Differentiation* 1973<sup>b</sup>, 1: 177-182.
- Goodwin PJ, Pritchard KI, Ennis M, Clemons M, Graham M, Fantus IG: Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clinical Breast Cancer* 2008, 8: 501-505.
- Goossens K, Vandaele L, Wydooghe E, Thys M, Dewulf J, Peelman LJ, Van Soom A: The importance of adequate fixation for immunofluorescent staining of bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 2011, 46: 1098-1103.
- Gordon K, Hodgen GD: Will GnRH antagonists be worth the wait? *Reproductive Medicine Review* 1992, 1: 189-194.
- Goren S, Oron Y, Dekel N: Rat oocyte maturation: role of calcium in hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1990, 72: 131-138.
- Gosden RG: Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, 186: 149-153.
- Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, Bruchim I: *In vitro* metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2008, 110: 246-250.
- Griesinger G, Felberbaum R, Diedrich K: GnRH antagonists in ovarian stimulation: a treatment regimen of clinician's second choice? Data from the German national IVF registry. *Human Reproduction* 2005, 20: 2373-2375.
- Guertin DA, Sabatini DM: Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007, 12: 9-22.

- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N: Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280: 32081-32089.
- Hamoir G: The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity. *International Journal of Developmental Biology* 1992, 36: 9-15.
- Hardie DG, Carling D: The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry* 1997, 246: 259-273.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER: Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters* 2003, 546: 113-120.
- Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science* 2004, 117: 5479-5487.
- Hashimoto N, Kishimoto T: Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology* 1988, 126: 242-252.
- Hay N, Sonenberg N: Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development* 2004, 18: 1926-1945.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS: Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 1995, 43: 509-522.
- Heape W: Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within a Uterine Foster-Mother. *Proceedings of the Royal Society of London* 1905, 48: 457-458.
- Heller DT, Cahill DM, Schultz RM: Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Developmental Biology* 1981, 84: 455-464.
- Hill KA: Hartsoeker's homunculus: a corrective note. *Journal of the History of the Behavioral Sciences* 1985, 21: 178-179.
- Hillensjö T, Brännström M, Chari S, Daume E, Magnusson C, Nilsson L, Sjögren A, Törnell J: Oocyte maturation as regulated by follicular factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1985, 442: 73-79.
- Hong SG, Jang G, Oh HJ, Koo OJ, Park JE, Park HJ, Kang SK, Lee BC: The effects of brain-derived neurotrophic factor and metformin on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Zygote* 2009, 17: 187-193.
- Hoult IJ, de Crespigny LC, O'Herlihy C, Speirs AL, Lopata A, Kellow G, Johnston I, Robinson HP: Ultrasound control of clomiphene/human chorionic gonadotropin stimulated cycles for oocyte recovery and *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 1981, 36: 316-319.
- Howles CM: Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Human Reproduction Update* 1996, 2: 172-191.
- Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E: Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute* 1999, 91: 542-547.
- Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA: The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility* 1992, 58: 888-896.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Hermann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H: Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005, 63: 1149-1166.

- Hundal RS, Inzucchi SE (2003) Metformin: new understandings, new uses. *Drugs*, 63: 1879-1894.
- Hutber CA, Hardie DG, Winder WW: Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. *The American Journal of Physiology* 1997, 272: E262-E266.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997, 47: 23-32.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003, 115: 577-590.
- Iwamatsu T, Chang MC: *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature* 1969, 224: 919-920.
- Iwamatsu T, Yanagimachi R: Maturation *in vitro* of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, 45: 83-90.
- Jahn CL, Baran MM, Bachvarova R: Stability of RNA synthesized by the mouse oocyte during its major growth phase. *The Journal of Experimental Zoology* 1976, 197: 161-171.
- Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE: Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, 87: 524-529.
- Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, de Vries EG: Metformin: taking away the candy for cancer? *European Journal of cancer* 2010, 46: 2369-2380.
- Jansen RP, Anderson JC: Catheterisation of the fallopian tubes from the vagina. *Lancet* 1987, 2: 309-310.
- Jaroudi KA, Hollanders JM, Sieck UV, Roca GL, El-Nour AM, Coskun S: Pregnancy after transfer of embryos which were generated from *in-vitro* matured oocytes. *Human Reproduction* 1997, 12: 857-859.
- Johnson RE: Robert Edwards: the path to IVF. *Reproductive Biomedicine Online* 2011, 23: 245-262.
- Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralto M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB: AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 320: 449-454.
- Kennedy JF, Donahue RP: Human oocytes: maturation in chemically defined media. *Science* 1969, 164: 1292-1293.
- Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH: *In vitro* maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertility and Sterility* 2000, 74: 1153-1158.
- Kline D, Kline JT: Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology* 1992, 149: 80-89.
- Kojima I, Matsunaga H, Kurokawa K, Ogata E, Nishimoto I: Calcium influx: an intracellular message of the mitogenic action of insulin-like growth factor-I. *Journal of Biological Chemistry* 1988, 263: 16561-16567.
- Krisher RL: The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 2004, 82(Suppl13): E14-E23.
- Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R, Sinclair KD: Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction* 2010, 139: 1-12.

- Lee S, Comer FI, Sasaki A, McLeod IX, Duong Y, Okumura K, Yates JR 3rd, Parent CA, Firtel RA: TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in *Dictyostelium*. *Molecular Biology of the Cell* 2005<sup>a</sup>, 16: 4572-4583.
- Lee MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS: The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction* 2005<sup>b</sup>, 73: 1264-1268.
- Lenz S, Lauritsen JG: Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia: a new method of collecting oocytes for *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 1982, 38: 673-677.
- Leung PC, Wang J: The role of inositol lipid metabolism in the ovary. *Biology of Reproduction* 1989, 40: 703-708.
- Leverve XM, Guigas B, Demaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF (2003) Mitochondrial metabolism and type 2 diabetes: a specific target for metformin. *Diabetes and Metabolism*, 29: 6588-6594.
- Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL: TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 2004, 29: 32-38.
- Liu J, Katz E, Garcia JE, Compton G, Baramki TA: Successful *in vitro* maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertility and Sterility* 1997, 67: 566-568.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN: Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* 2002, 10: 457-468.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP: Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction* 2003, 69: 1424-1431.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J: Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology* 2005, 15: 702-713.
- Lord JM, Flight IHK, Norman RJ (2003) Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 327: 951-955.
- Lund SS, Tarnow L, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Teerlink T, Gram J, Winther K, Frandsen M, Smidt UM, Pedersen O, Parving HH, Vaag AA: Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology* 2008, 158: 631-641.
- Lunenfeld B: Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Human Reproduction Update* 2004, 10: 453-467.
- Luo Z, Zang M, Guo W: AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncology* 2010, 6: 457-470.
- Maatela J, Aromaa A, Salmi T, Pohja M, Vuento M, Grönroos M: The risk of endometrial cancer in diabetic and hypertensive patients: a nationwide record-linkage study in Finland. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Supplementum* 1994, 208: 20-24.
- Maller JL: Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differentiation* 1985, 16: 211-221.
- Manning BD: Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *The Journal of Cell Biology* 2004, 167: 399-403.
- Maro B, Howlett SK, Webb M: Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *The Journal of Cell Biology* 1985, 101: 1665-1672.
- Masui Y, Clarke HJ: Oocyte maturation. *International Review of Cytology* 1979, 57: 185-282.

- Matsumoto H, Shoji N, Sugawara S, Umezu M, Sato E: Microscopic analysis of enzyme activity, mitochondrial distribution and hydrogen peroxide in two-cell rat embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1998, 113: 231-238.
- Matthaei S, Hamann A, Klein HH, Benecke H, Kreymann G, Flier JS, Greten H (1991) Association of metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes*, 40: 850-857.
- Mattioli M, Galeati G, Seren E: Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Research* 1988, 20: 177-183.
- Matzuk MM, Lamb DJ: Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Cell Biology and Nature Medicine* 2002, 4(Suppl1): S41-S49.
- Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ: Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 2007, 76: 589-597.
- McCoshen JA, McCallion DJ: A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steele mutant mice. *Experientia* 1975, 31: 589-590.
- McLaren A, Southee D: Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology* 1997, 187: 107-113.
- Menkin MF, Rock J: Human ovarian ova fertilized *in vitro*; 2-cell and 3-cell stages. *Anatomical Record* 1948<sup>a</sup>, 100: 695-696.
- Menkin MF, Rock J: *In vitro* fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1948<sup>b</sup>, 55: 440-452.
- Michels KB, Solomon CG, Hu FB, Rosner BA, Hankinson SE, Colditz GA, Manson JE: Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes Care* 2003, 26: 1752-1758.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I: A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine* 2009, 15: 1082-1087.
- Miyamoto H, Chang MC: *In vitro* fertilization of rat eggs. *Nature* 1973, 241: 50-52.
- Mohr LR, Trounson AO: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 1981, 25: 1009-1025.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr: Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction Update* 1998, 4: 223-226.
- Moor RM, Hay MF, Seamark RF: The sheep ovary: regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, 45: 595-604.
- Morgensztern D, McLeod HL: PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drug* 2005, 16: 797-803.
- Motlik J, Fulka J, Flechon JE: Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986, 76: 31-37.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ: Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51: 2074-2081.
- Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Van Steirteghem A: Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertility and Sterility* 1996, 65: 1047-1050.

- Nardo LG, Rai R (2001) Metformin therapy in the management of polycystic ovary syndrome: endocrine, metabolic and reproductive effects. *Gynecological Endocrinology*, 15: 373-380.
- Neveu N, Granger L, St-Michel P, Lavoie HB: Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2007, 87: 113-120.
- Nicolas Hartsoeker, *Essai de Dioptrique*, 1694, Jean Anisson, p230.
- Ning J, Clemmons DR: AMP-activated protein kinase inhibits IGF-I signaling and protein synthesis in vascular smooth muscle cells via stimulation of insulin receptor substrate 1 S794 and tuberous sclerosis 2 S1345 phosphorylation. *Molecular Endocrinology* 2010, 24: 1218-1229.
- Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A: Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Fertility and Sterility* 2000, 74: 295-298.
- Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Menendez JA: Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. *Cell Cycle* 2009, 8: 1633-1636.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340: 17-18.
- Parsons JH, Bolton VN, Wilson L, Campbell S: Pregnancies following *in vitro* fertilization and ultrasound-directed surgical embryo transfer by perurethral and transvaginal techniques. *Fertility and Sterility* 1987, 48: 691-693.
- Paulson RJ, Sauer MV, Francis MM, Macaso TM, Lobo RA: Factors affecting pregnancy success of human *in-vitro* fertilization in unstimulated cycles. *Human Reproduction* 1994, 9: 1571-1575.
- Pepling ME, Spradling AC: Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 1998, 125: 3323-3328.
- Peters H, McNatty KP: 1980 The ovary: a correlation of structure and function in mammals. University of California Press, 175p.
- Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti A: Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *Comptes Rendus Biologies* 2005, 328: 863-881.
- Pickworth S, Chang MC: Fertilization of Chinese hamster eggs *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 1969, 19: 371-374.
- Picton H, Briggs D, Gosden R: The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998, 145: 27-37.
- Pikó L, Clegg KB: Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Developmental Biology* 1982, 89: 362-378.
- Pincus G, Enzmann EV: The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine* 1935, 62: 665-675.
- Pincus G, Enzmann EV: Can mammalian eggs undergo normal development *in vitro*? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1934, 20: 121-122.
- Pollak M: Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8: 915-928.
- Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS: Induction of ovulation for *in vitro* fertilization using buserelin and gonadotropins. *Lancet* 1984, 324: 1284-1285.
- Powers RD, Paleos GA: Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *Journal of Reproduction and Fertility* 1982, 66: 1-8.

- Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A: Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured *in vitro*. *Fertility and Sterility* 1987, 47: 1035-1037.
- Racowsky C, Baldwin KV: *In vitro* and *in vivo* studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrane/cumulus granulosa cell contact. *Developmental Biology* 1989, 134: 297-306.
- Racowsky C: The releasing action of calcium upon cyclic AMP-dependent meiotic arrest in hamster oocytes. *The Journal of Experimental Zoology* 1986, 239: 263-275.
- Reiling JH, Hafen E: The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes and Development* 2004, 18: 2879-2892.
- Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Human Reproduction* 1995, 10: 1974-1981.
- Rodman TC, Bachvarova R: RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. *The Journal of Cell Biology* 1976, 70: 251-257.
- Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Kisfalvi K: Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 2010, 16: 2505-2511.
- Ruby JR, Dyer RF, Skalko RG: The occurrence of intercellular bridges during oogenesis in the mouse. *Journal of Morphology* 1969, 127: 307-339.
- Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA: Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertility and Sterility* 1997, 67: 616-620.
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA: Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nature Cell Biology* 2003, 5: 566-571.
- Saydah SH, Loria CM, Eberhardt MS, Brancati FL: Abnormal glucose tolerance and the risk of cancer death in the United States. *American Journal of Epidemiology* 2003, 157: 1092-1100.
- Scheen AJ: Drug treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the 1990s. *Drugs* 1997, 54: 355-368.
- Schroeder AC, Eppig JJ: The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Developmental Biology* 1984, 102: 493-497.
- Schultz GA, Gifford DJ, Mahadevan MM, Fleetham JA, Taylor PJ: Protein synthetic patterns in immature and mature human oocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988, 541: 237-247.
- Schultz RM, Wassarman PM: Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74: 538-541.
- Seppala M: The world collaborative report on *in vitro* fertilization and embryo replacement: current state of the art in January 1984. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1985, 442: 558-563.
- Shaw RJ: LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiologica* 2009, 196: 65-80.
- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC: The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signalling. *Cancer Cell* 2004, 6: 91-99.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC: The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005, 310: 1642-1646.



- Shell SA, Lyass L, Trusk PB, Pry KJ, Wappel RL, Bacus SS: Activation of AMPK is necessary for killing cancer cells and sparing cardiac cells. *Cell Cycle* 2008, 7: 1769-1775.
- Shettles LB: Human blastocyst grown *in vitro* in ovulation cervical mucus. *Nature* 1971, 229: 343.
- Shibuya EK, Masui Y: Molecular characteristics of cytostatic factors in amphibian egg cytosols. *Development* 1989, 106: 799-808.
- Sirard MA, First NL: *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biology of Reproduction* 1988, 39: 229-234.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL: Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 1989, 40: 1257-1263.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006, 65: 126-136.
- Smith EM, Finn SG, Tee AR, Browne GJ, Proud CG: The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280: 18717-18727.
- Sorensen RA, Wassarman PM: Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 1976, 50: 531-536.
- Spiegelman M, Bennett D: A light and electron microscopic study of primordial germ cells in the early mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1973, 30: 97-118.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE: Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 611-614.
- Stephoe PC, Edwards RG, Purdy JM: Human blastocysts grown in culture. *Nature* 1971, 229: 132-133.
- Stephoe PC, Edwards RG: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978, 12: 366.
- Stephoe PC, Edwards RG: Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1970, 1: 683-689.
- Stephoe PC: Laparoscopy and ovulation. *Lancet* 1968, 292: 913.
- Stern S, Rayyis A, Kennedy JF: Incorporation of amino acids during maturation *in vitro* by the mouse oocyte: effect of pyromycin on protein synthesis. *Biology of Reproduction* 1972, 7: 341-346.
- Sternlicht AL, Schultz RM: Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *The Journal of Experimental Zoology* 1981, 215: 191-200.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Eckhard W: Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction* 2001, 64: 904-909.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H: Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction* 2001, 122: 155-163.
- Szybek K: *In vitro* maturation of oocytes from sexually immature mice. *The Journal of Endocrinology* 1972, 54: 527-528.

- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* 1990, 26: 90-100.
- Thibault C, Gerald M, Menezo Y: Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, 45: 605-610.
- Thibault C: Hammond Memorial Lecture. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *Journal of Reproduction and Fertility* 1977, 51: 1-15.
- Thompson JG, McNaughton C, Gasparrini B, McGowan LT, Tervit HR: Effects of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000, 118: 47-55.
- Thoreen CC, Sabatini DM: AMPK and p53 help cells through lean times. *Cell Metabolism* 2005, 1: 287-288.
- Törnell J, Hillensjö T: Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex. *Human Reproduction* 1993, 8: 737-739.
- Tosca L, Froment P, Solhais P, Ferré P, Foulle F, Dupont J: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005, 146: 4500-4513.
- Tosca L, Solhais P, Ferré P, Foulle F, Dupont J: Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2006<sup>a</sup>, 75: 342-351.
- Tosca L, Crochet S, Ferré P, Foulle F, Tesseraud S, Dupont J: AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *The Journal of Endocrinology* 2006<sup>b</sup>, 190: 85-97.
- Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J: Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* 2007, 77: 452-465.
- Towler MC, Hardie DG: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research* 2007, 100: 328-341.
- Toyota Y, Chang MC: Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *Journal of Reproduction and Fertility* 1974, 36: 9-22.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G: Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* 2001, 121: 51-75.
- Trounson A, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305: 707-709.
- Trounson A, Wood C, Kausche A: *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertility and Sterility* 1994, 62: 353-362.
- Tsafiri A, Channing CP: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology* 1975, 96: 922-927.
- Turner CD: 1966 General Endocrinology. WB Saunders Company, 579p.
- Twigg J, Patel R, Whitaker M: Translational control of InsP3-induced chromatin condensation during the early cell cycles of sea urchin embryos. *Nature* 1988, 332: 366-369.
- Tzafettas JM, Mukherjee A, Stephanatos A, Papaloucas AC: The purpose of prelaparoscopy transvaginal retrieval and evaluation of oocytes in a modified GIFT procedure. *Human Reproduction* 1989, 4: 762-765.
- Vaissare JP: 1977 Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Maloine, 457p.

- Van Blerkom J, Runner MN: Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *The American Journal of Anatomy* 1984, 171: 335-355.
- Van Blerkom J: Microtubule mediation of the cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88: 5031-5035.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Human Reproduction* 1993<sup>a</sup>, 8: 1055-1060.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1993<sup>b</sup>, 8: 1061-1066.
- Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE: Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertility and Sterility* 2001, 75: 310-315.
- Vasilaki A, Papadaki T, Notas G, Kolios G, Mastrodimitou N, Hoyer D, Tsimbaris M, Kouroumalis E, Pallikaris I, Thermos K: Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004, 45: 1499-1506.
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA: The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* 2009<sup>a</sup>, 8: 88-96.
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA: The antidiabetic drug metformin: a pharmaceutical AMPK activator to overcome breast cancer resistance to HER2 inhibitors while decreasing risk of cardiomyopathy. *Annals of Oncology* 2009<sup>b</sup>, 20: 592-595.
- Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 1983, 39: 594-602.
- Velázquez E, Acosta A, Mendoza SG: Menstrual cyclicity after metformin therapy in polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology* 1997, 90: 392-395.
- Voronina E, Wessel GM: The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology* 2003, 58: 53-110.
- Wassarman PM, Kinloch RA: Gene expression during oogenesis in mice. *Mutation Research* 1992, 296: 3-15.
- Wassarman PM, Letourneau GE: RNA synthesis in fully-growth. *Nature* 1976, 261: 73-74.
- Weakley BS: Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Anatomy* 1966, 100: 503-534.
- Weiderpass E, Gridley G, Nyrén O, Ekblom A, Persson I, Adami HO: Diabetes mellitus and risk of large bowel cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1997, 89: 660-661.
- Wert SE, Larsen WJ: Preendocytotic alterations in cumulus cell gap junctions precede meiotic resumption in the rat cumulus-oocyte complex. *Tissue and Cell* 1990, 22: 827-851.
- Whitaker M, Swann K: Lighting the fuse at fertilization. *Development* 1993, 117: 1-12.
- Whittingham DG: Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *Journal of Reproduction and Fertility* 1977, 49: 89-94.
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction 2000.

- Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G: Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction* 2001, 16: 909-917.
- Winder WW, Hardie DG: Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *The American Journal of Physiology* 1996, 270: E299-E304.
- Witschi E: Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. *Contributions to Embryology* 1948, 32: 67-80.
- Wood C, Trounson A: Current state and future of IVF. *Clinics in Obstetrics and Gynaecology* 1985, 12: 753-766.
- World Health Organization 1973 Agents stimulating gonadal function in human. *Technical Report Series 514* Geneva.
- Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gorden RG: Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by *in-vitro* maturation. *Human Reproduction* 1998, 13: 3132-3138.
- Yanagimachi R, Chang MC: Fertilization of hamster eggs *in vitro*. *Nature* 1963, 200: 281-282.
- Zachariae F: Studies on the mechanism of ovulation; autoradiographic investigations on the uptake of radioactive sulfate ( $^{35}\text{S}$ ) into the ovarian follicular mucopolysaccharides. *Acta Endocrinologica* 1957, 26: 215-224.
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M: Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Research* 2006, 66: 10269-10273.
- Zamboni L, Gondos B: Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. *Journal of Cell Biology* 1968, 36: 276-282.
- Zheng P, Patel B, McMenamin M, Moran E, Paprocki AM, Kihara M, Schramm RD, Latham KE: Effects of follicle size and oocyte maturation conditions on maternal messenger RNA regulation and gene expression in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biology of Reproduction* 2005, 72: 890-897.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation* 2001, 108: 1167-1174.
- Κουτσουρής ΧΔ Η τεχνητή σπερματέγχυση στις αγελάδες Ινστιτούτο Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης, Υπουργείο Γεωργίας.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΚΑΛΑΜΑ 37 & ΝΕΣΤΟΥ  
ΛΑΡΙΣΑ  
41335

ΤΗΛ: 6944 041 045  
e-mail: toffeeekos@hotmail.com

# Ολυμπία Πικίου

### Εκπαίδευση

2005 – σήμερα

**Υποψήφια Διδάκτωρ. Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα: «Ωρίμανση ωοκυττάρων *in vitro* - Μετφορμίνη».** Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

2002 -2003

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Τεχνολογία της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Master of Medical Science in Assisted Reproduction Technology).** Academic Division of Obstetrics and Gynaecology, School of Human Development, University of Nottingham, UK.

2000 – 2002

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Τοξικολογία (Master of Science in Toxicology).** School of Biomedical and Life Sciences, University of Surrey, UK.

1996 – 2000

**Πτυχίο Γενετικής (Bachelor of Science in Genetics).** School of Biosciences, University of Wales, Cardiff.

### Μετεκπαίδευση

**Εκπαίδευση στη μέθοδο συλλογής και ωρίμανσης ωαρίων *in vitro*.** Huddinge University Hospital, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2005.

**Εκπαίδευση στην ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση Κυκλοποιητή Αληθινού Χρόνου.** Εφαρμογή σε προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΓΔ) μεσογειακών συνδρόμων. Νοσοκομείο Παιδών “Αγία Σοφία”, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Αθήνα, 2004.

**Εργαστηριακή  
Εμπειρία**

Φεβρουάριος 2005 – Σήμερα

**Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα: «Ωρίμανση ωοκυττάρων *in vitro* - Μετφορμίνη».** Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Απρίλιος 2004 – Οκτώβριος 2004

**Εκτίμηση κινητικότητας, ζωτικότητας, συγκέντρωσης και μορφολογίας σπέρματος, επεξεργασία σπέρματος για IVF (swim up method), επεξεργασία σπέρματος για ICSI και σπερματέγχυση (density gradient centrifugation method).** Ινστιτούτο Γυναικολογίας και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής “In Vitro Fertilization & Genetics”, Χαλάνδρι, Αθήνα (Διευθύντρια: Dr Έλενα Κοντογιάννη)

Ιανουάριος 2005 – Σεπτέμβριος 2007

**Εκτίμηση κινητικότητας, ζωτικότητας, συγκέντρωσης και μορφολογίας σπέρματος, επεξεργασία σπέρματος για IVF (swim up method), επεξεργασία σπέρματος για ICSI και σπερματέγχυση (density gradient centrifugation method) και προετοιμασία τριβλίων.** Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική (Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης)

**Ξένες γλώσσες/HY**

- Άριστη γνώση Αγγλικών
- Μέτριος χειρισμός Γαλλικών
- Εμπειρία Microsoft Word, Excel, PowerPoint, ImageJ, GraphPad Prism

**Εργαστηριακές  
Τεχνικές**

- Εκτίμηση κινητικότητας, ζωτικότητας, συγκέντρωσης και μορφολογίας σπέρματος, επεξεργασία σπέρματος για IVF (swim up method), επεξεργασία σπέρματος για ICSI και σπερματέγχυση (density gradient centrifugation method), κατάψυξη και απόψυξη σπέρματος, κατάψυξη και απόψυξη ωαρίων, επεξεργασία ωαρίων (hyaluronidase), γονιμοποίηση *in vitro* (IVF), καλλιέργεια εμβρύων, προετοιμασία τριβλίων
- Ανοσοκυτταροχημεία (φθορισμός), διάφοροι τύποι οπτικών μικροσκοπίων (ανάστροφο, μικροσκόπιο φθορισμού και στερεοσκόπιο), ανάλυση εικόνας
- Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και PCR, TUNEL, χρώσεις:

## Haematoxylin and Eosin, Methylene Blue, Periodic Acid Schiff

- Χρωματογραφία επί χάρτου, φασματομετρία, αποστειρωμένη μεταφορά στη μικροβιολογία, τεχνικές κρυστάλλωσης, απόσταξης και τιτλοδότησης, απομόνωση DNA, καθαρισμό, πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

## Δημοσιεύσεις

## Συνέδρια

## Εργασίες

Pikiou O., Vasilaki A., Leondaritis G., Vamvakopoulos, Messinis I.E. Effects of metformin on bovine embryo cleavage rate - Possible N. Involvement of AMPK-mediated TSC2 activation. *Zygote, προς δημοσίευση*

“Κρυοσυντήρηση ωαρίων και ωθηθικού ιστού για την επαναφορά της γονιμότητας μετά από χημειοθεραπεία” περιοδικό “Ογκολογική Ενημέρωση” (Ελένη Κοντογιάννη & Ολυμπία Πίκιου, Τόμος 6ος, Τεύχος 3, σελ 140-146, Ιούλιος-Σεπτέμβριος 2004)

Τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μου εργασίας (MMedSci) αποτέλεσαν μέρος δουλειάς η οποία παρουσιάστηκε στο Συνέδριο “Fertility 2003” που πραγματοποιήθηκε στο Aberdeen, Μεγάλη Βρετανία (13η Ιουλίου - 17η Ιουλίου 2003) (Marsters P. et al., Reproduction, Abstract series 30, Abstract 048, page 29, July 2003)

Μεταπτυχιακή εργασία: Mevalonate kinase expression in bovine granulosa and theca cells. Academic Division of Obstetrics and Gynaecology, School of Human Development, University of Nottingham, UK.

Μεταπτυχιακή εργασία: The effects of short term administration of cholic acid and deoxycholic acid on the colon of male Wistar Albino rats. School of Biomedical and Life Sciences, University of Surrey, UK.

Πτυχιακή εργασία: Identification of phytoplankton from flow cytometric data. School of Biosciences, University of Wales, Cardiff.