

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ

ΘΩΜΑΣ-ΜΑΡΚΟΣ ΧΟΥΖΟΥΡΗΣ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Καρδίτσα, 2018

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

VETERINARY FACULTY

DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND REPRODUCTION



**A STUDY ON THE EFFECTS OF GHRELIN ON
REPRODUCTION OF DAIRY COWS**

THOMAS-MARKOS CHOUZOURIS, DVM

A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy

Karditsa, 2018

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

Στη γιαγιά μου Δήμητρα,
που με έκανε τον άνθρωπο που είμαι σήμερα...

Έχουν πει ότι ανακάλυψη είναι ένα τυχαίο γεγονός
που συναντά ένα προετοιμασμένο μυαλό

Albert von Szent-Gyorgyi, 1893-1986,
Ούγγρος φυσιολόγος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης, Επιβλέπων

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Γεώργιος Χ. Φθενάκης, Μέλος

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επίκουρη Καθηγήτρια Ειρήνη Βαλάση, Μέλος

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Γεώργιος Χ. Φθενάκης

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επίκουρη Καθηγήτρια Ειρήνη Βαλάση

Εργαστήριο Φυσιολογίας,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη Κ. Θεοδοσιάδου

Εργαστήριο Φυσιολογίας,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική,
Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καθηγητής Ιωάννης Ταϊτζόγλου

Εργαστήριο Φυσιολογίας,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης

Επίκουρος Καθηγητής Ιωάννης Τσακμακίδης

Κλινική Παραγωγικών Ζώων,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε τα έτη 2014-2018 στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εκπόνησή της αποτέλεσε για εμένα μία εξαιρετικά πολύτιμη εμπειρία και ευκαιρία να εμπλουτίσω και να διευρύνω τις γνώσεις μου στον τομέα της μαιευτικής και της αναπαραγωγής των αγελάδων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Καθηγητή κ. Γεώργιο Σ. Αμοιρίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, με την ένταξή μου στην επιστημονική του ομάδα και την παραχώρηση του Εργαστηρίου για τα πειράματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επίσης, τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπληρώσω ένα μεγάλο μου όνειρο, με την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Η καθοδήγηση και η επίβλεψή του από το στάδιο της επιλογής του θέματος έως και τη συγγραφή της διατριβής ήταν αδιάλειπτη και ουσιαστική. Θέλω ακόμη να του εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, για την αμέριστη βοήθειά του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή των εργασιών, αλλά και για την δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω σε συνέδρια παγκόσμιας εμβέλειας και ακτινοβολίας. Περισσότερο από όλα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί στάθηκε πηγή έμπνευσης και πρότυπο για εμένα, καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής, αποτελώντας το σημείο αναφοράς μου ως νέος επιστήμονας.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος Κτηνιατρικής, και Διευθυντή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής κ. Γεώργιο Χ. Φθενάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές του, ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθ' όλη τη διάρκεια αυτής τη διατριβής.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα ακόμη να εκφράσω στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής κ. Ειρήνη Βαλάση, η οποία ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, συνέβαλε με τη διακριτική καθοδήγησή της στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω:

Στον κ. Ιωάννη Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή Κτηνιατρικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής, για την πολύτιμη βοήθειά του στη μέτρηση των πρωτεϊνών και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Στον κ. Κωνσταντίνο Χ. Νταφόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής του Τμήματος Ιατρικής, για την πολύτιμη βοήθειά του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή των εργασιών.

Στον κ. Παναγιώτη Γεωργούλια, Αναπληρωτή Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής, ο οποίος μου διέθεσε το Εργαστήριο για τις δοκιμές ραδιοανοσολογίας (RIA).

Στον κ. Κωνσταντίνο Α. Ρέκκα, Αναπληρωτή Ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛ.Γ.Ο. «ΔΗΜΗΤΡΑ», για την πολύτιμη συμμετοχή του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς και στην ερμηνεία αυτών.

Στην κ. Αικατερίνη Κ. Θεοδοσιάδου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής, για τις πολύτιμες συμβουλές της και για τη βοήθειά της στη συγγραφή και στις τελικές διορθώσεις της διατριβής.

Στον κ. Αθανάσιο Κουκούλη, κτηνίατρο των σφαγείων για την αποδοχή μας στο χώρο των σφαγείων και τη βοήθειά του στη διαδικασία συλλογής των ωοθηκών.

Στις διδάκτορες, συναδέλφους και φίλες Ελένη Ντόβολου και Φωτεινή Κρασιά, για τη βοήθειά τους στα πειράματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης, για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία των δειγματοληψιών και για τη στοχευμένη καθοδήγησή τους, ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη που θα στοίχιζαν σε χρόνο και οικονομικούς πόρους.

Στους ιδιοκτήτες των κτηνοτροφικών μονάδων, στις οποίες διεξήχθησαν οι πειραματισμοί, κ.κ. Σωτήρη και Βασίλη Αγγελίτη, Κωνσταντίνο Νασέλο και Γεώργιο Παπακώστα, για τη διάθεση των ζώων, αλλά και για την αμέριστη βοήθειά τους, κατά τη διαδικασία των πολύωρων δειγματοληψιών.

Στις φίλες και υποψήφιες διδάκτορες της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Ναταλία-Γαβριέλα Βασιλείου και Κατερίνα Ιωαννίδη, για τη σημαντική βοήθειά τους, κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, αλλά για την ανταλλαγή γνώσεων και απόψεων στο δύσκολο δρόμο της εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης, στους φίλους μου, οι οποίοι με το δικό τους τρόπο κατάφεραν να με στηρίξουν και να με βοηθήσουν στην προσπάθεια που κατέβαλλα.

Στον κ. Κωνσταντίνο Τριανταφύλλου, για τη βοήθειά του στη συντακτική διόρθωση του τελικού κειμένου και για τις πολύ σημαντικές συμβουλές του κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Στη σύντροφό μου Ελένη Τριανταφύλλου, για τη συμπαράστασή της τα τέσσερα αυτά δύσκολα χρόνια. Η ηθική υποστήριξη, η κατανόηση και η αγάπη που μου προσέφερε ήταν ανεκτίμητη, ενώ μου παρείχε λύσεις σε δυσκολίες και εμπόδια, τα οποία φάνταζαν ανυπέρβλητα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, για την οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη και ιδιαίτερα τη γιαγιά μου Δήμητρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	12
ABSTRACT	18
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: Εισαγωγή	24
1.1. Η αναπαραγωγή στις αγελάδες υψηλών αποδόσεων	24
1.2. Ανασκόπηση του ωοθηκικού κύκλου των αγελάδων	26
1.2.1. Ωοθυλακιογένεση-ωογένεση-ωρίμανση του ωαρίου	26
1.2.2. Πρότυπο ανάπτυξης των ωοθυλακίων (<i>follicular dynamics</i>)	28
1.2.3. Ρύθμιση του ωοθηκικού κύκλου	31
1.2.3.α. Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες	31
1.2.3.β. Μεταβολικά σήματα και ενδοκρινής ρύθμιση της αναπαραγωγής	34
1.3. Νευροπεπτίδια και ρυθμιστικά μόρια	35
1.3.1. Λεπτίνη	35
1.3.2. Κισπεπτίνες	38
1.3.3. Νευροπεπτίδιο Υ	39
1.3.4. Μελανοκορτίνες	40
1.3.5. <i>Agouti-related</i> πεπτίδια	42
1.4. Γκρελίνη	43
1.4.1. Η ανακάλυψη της γκρελίνης	43
1.4.2. Μη ακυλιωμένη γκρελίνη	45
1.4.3. Όργανα σύνθεσης της γκρελίνης	46
1.4.4. Όργανα έκφρασης του <i>GHSR-1α</i> και εναλλακτικοί υποδοχείς της γκρελίνης	47

1.4.5. Βιολογικές δράσεις της γκρελίνης	48
1.4.5.α. Απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης	48
1.4.5.β. Διέγερση της όρεξης	48
1.4.5.γ. Γαστρεντερικές λειτουργίες	50
1.4.6. Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος της γκρελίνης	51
1.4.7. Η γκρελίνη ως ρυθμιστής της αναπαραγωγής	52
1.4.7.α. Ο ρόλος της γκρελίνης στην ενήβωση	52
1.4.7.β. Επίδραση στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών	53
1.4.7.γ. Η γκρελίνη στην ωοθήκη	55
1.4.7.δ. Επίδραση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων	56
1.4.7.ε. Η γκρελίνη κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη	59
1.5. Σκοπός της διατριβής	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Η γκρελίνη καταστέλλει, την επαγόμενη από την GnRH, προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών σε μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής	62
2.1. Εισαγωγή	62
2.2. Υλικά και μέθοδοι	63
2.3. Αποτελέσματα	67
2.4. Συζήτηση	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: Η επίδραση της κυοφορίας και της βραχείας διάρκειας νηστείας στη συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης και των μεταβολικών παραμέτρων σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής	79
3.1. Εισαγωγή	79
3.2. Υλικά και μέθοδοι	80
3.3. Αποτελέσματα	84
3.4. Συζήτηση	92

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: Μελέτη της γκρελίνης και της ωχρινοποιητικής ορμόνης, υπό συνθήκες σύντομης στέρησης τροφής και κατά τη διάρκεια της περιοριστικής περιόδου, σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής	100
4.1. Εισαγωγή	100
4.2. Υλικά και μέθοδοι	102
4.3. Αποτελέσματα	105
4.4. Συζήτηση	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: Οι επιδράσεις της γκρελίνης στην ενεργοποίηση των μονοπατιών των Akt1 και ERK1/2, κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών	118
5.1. Εισαγωγή	118
5.2. Υλικά και μέθοδοι	124
5.3. Αποτελέσματα	130
5.4. Συζήτηση	134
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	141

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής διενεργήθηκαν τέσσερις διακριτοί πειραματισμοί που είχαν στόχο να διευκρινίσουν τη δράση της γκρελίνης ως δείκτη μεταβολισμού σε διάφορες λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος των αγελάδων. Οι πειραματισμοί εστίασαν: α) στη μελέτη των επιδράσεων της χορήγησης της γκρελίνης σε καθοριστικές αναπαραγωγικές παραμέτρους, β) στον έλεγχο της αντίδρασης στο στρες της στέρησης τροφής, σε έγκυες και μη-έγκυες μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής, γ) στη μελέτη της γκρελίνης, κατά την περιοριστική περίοδο, σε αγελάδες και μοσχίδες και δ) στη μελέτη των πιθανών μοριακών μονοπατιών, μέσω των οποίων η γκρελίνη επιταχύνει την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων. Ακόμη, μελετήθηκε το πρότυπο έκκρισης της γκρελίνης, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και μοσχίδες. Η διατριβή χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια και ακολουθούν τα συμπεράσματα.

Το κεφάλαιο I περιλαμβάνει τη γενική εισαγωγή που διακρίνεται σε 5 μέρη. Στο πρώτο μέρος γίνεται λόγος για την αναπαραγωγή σε αγελάδες υψηλών αποδόσεων. Στο δεύτερο μέρος γίνεται ανασκόπηση του ωοθηκικού κύκλου των αγελάδων, όπου περιλαμβάνονται τα στάδια ανάπτυξης του ωαρίου, το πρότυπο ανάπτυξης των ωοθυλακίων και η ρύθμιση του ωοθηκικού κύκλου των αγελάδων. Στο τρίτο μέρος αναφέρεται πώς διάφορα νευροπεπτίδια και ρυθμιστικά μόρια, όπως η λεπτίνη, οι κισπεπτίνες, το νευροπεπτίδιο Υ, οι μελανοκορτίνες και τα Agouti-related πεπτίδια, συμμετέχουν στη ρύθμιση λειτουργιών της αναπαραγωγής. Στο τέταρτο μέρος, γίνεται εκτενής αναφορά στη γκρελίνη, από την ανακάλυψη της ορμόνης έως τα όργανα έκφρασης και τις βιολογικές δράσεις της, με έμφαση στο ρόλο της ορμόνης στην αναπαραγωγή. Τέλος, στο πέμπτο μέρος του κεφαλαίου περιγράφεται ο σκοπός της διατριβής.

Στο κεφάλαιο II αναλύεται ο πρώτος πειραματισμός, ο στόχος του οποίου ήταν η μελέτη των επιδράσεων της χορήγησης της γκρελίνης, στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) και της ωοθυλακιότροπου

ορμόνης (FSH), καθώς και των επιπτώσεων της στην ωχρινική λειτουργία του επερχόμενου ωοθηκικού κύκλου. Για το σκοπό αυτό, οι ωοθηκικοί κύκλοι οκτώ μοσχίδων, συγχρονίστηκαν με τη χρήση ενδοκολπικών εμφυτευμάτων προγεστερόνης και η ωοθυλακιορρηξία προκλήθηκε με έγχυση απελευθερωτικής ορμόνης της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH). Στη συνέχεια, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες (n=4). Στα ζώα της πρώτης ομάδας (ομάδα Ghr) χορηγήθηκε $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη, ενώ στα ζώα της δεύτερης ομάδας (ομάδα C) χορηγήθηκε η ίδια δόση φυσιολογικού ορού. Οι δειγματοληψίες ξεκίνησαν αμέσως μετά την πρώτη έγχυση της γκρελίνης· στις επόμενες 4 ώρες συλλέχτηκαν 13 δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, της GH, της FSH και της LH. Οι δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης ξεκίνησαν αμέσως μετά την εμφάνιση του οίστρου και συνεχίστηκαν κάθε δεύτερη ημέρα, έως και την εμφάνιση του επόμενου οίστρου. Στην ομάδα Ghr, η συγκέντρωση της γκρελίνης αυξήθηκε σημαντικά 15 λεπτά μετά την πρώτη έγχυση και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα έως και 90 λεπτά μετά την τελευταία. Κατά τη χρονική στιγμή της τρίτης στη σειρά έγχυσης γκρελίνης, η συγκέντρωση της GH ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα Ghr σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν και στις τρεις επόμενες δειγματοληψίες, οι οποίες διενεργήθηκαν 15, 30 και 60 λεπτά αργότερα, αλλά όχι στα 90 λεπτά. Στην ομάδα Ghr, οι υπό την καμπύλη περιοχές για την LH και για την FSH ήταν σημαντικά μειωμένες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της ομάδας των μαρτύρων. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, οι συγκεντρώσεις των LH και FSH ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα Ghr σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (15, 30, 45, 75 και 90, καθώς και 60, 75, 90, 120 και 150 λεπτά μετά τη χορήγηση GnRH για τον έλεγχο LH και FSH, αντίστοιχα). Ο ωοθηκικός κύκλος που επακολούθησε της έγχυσης, ήταν σημαντικά βραχύτερος στην ομάδα Ghr συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο της ομάδας των μαρτύρων. Επιπροσθέτως, τις ημέρες 4, 6, 8, 10 και 14, η συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα Ghr συγκρινόμενη με την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Ομοίως, η υπό την καμπύλη περιοχή της προγεστερόνης για την ομάδα Ghr, ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ασφαλείς

ενδείξεις ότι η γκρελίνη δρα στην υπόφυση, αμβλύνοντας το εύρος της απάντησης στο ερέθισμα της GnRH, ενώ είναι πιθανόν να επιδρά και στην ωχρινοποίηση του κυτταρικού τμήματος του προ-ωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου, ή/και να καταστέλλει τη στεροειδογενετική ικανότητα των ωχρινικών κυττάρων.

Στο κεφάλαιο III περιγράφονται δύο επιμέρους πειράματα, τα οποία απέβλεπαν στη μελέτη: α) των αλλαγών στο πρότυπο έκκρισης της LH σε μοσχίδες που ακολουθούσαν διαφορετικά προγράμματα διατροφής και β) της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης, κατά τη διάρκεια του οίστρου, σε αγελάδες και μοσχίδες. Στο πρώτο πείραμα, 12 μοσχίδες, στις οποίες είχε προηγηθεί συγχρονισμός των ωοθηκικών κύκλων, χωρίστηκαν σε 3 ομάδες (R- μάρτυρες με κανονική χορήγηση τροφής, F- ζώα σε νηστεία και F-F ζώα σε νηστεία, τα οποία στη συνέχεια ταΐστηκαν). Την ημέρα 8, τα ζώα των ομάδων F και F-F δεν ταΐστηκαν για 24 ώρες, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε παράθεση τροφής στα ζώα της ομάδας F-F και ταυτόχρονη έγχυση GnRH στα ζώα όλων των ομάδων. Διενεργήθηκε συστηματική αιματοληψία για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, της LH και της κορτιζόλης. Η νηστεία προκάλεσε σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης στα ζώα των ομάδων F και F-F σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας R. Στο δεύτερο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν αγελάδες και μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής. Κατά την ημέρα 9 του κύκλου, χορηγήθηκε σε όλα τα ζώα προσταγλανδίνη $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) για την πρόκληση οίστρου. Δείγματα αίματος συλλέγονταν δύο φορές την ημέρα, με εκκίνηση 24 ώρες πριν τη χορήγηση $PGF_{2\alpha}$, έως και την τρίτη ημέρα μετά την εκδήλωση οίστρου, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης, της οιστραδιόλης-17β, της γκρελίνης, της γλυκόζης και του β-υδροξυβουτυρικού οξέος (BHBA). Οι συγκεντρώσεις στεροειδών ορμονών και BHBA, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Στις αγελάδες, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης, κατά την περιοιστρική περίοδο, αυξήθηκαν σημαντικά για 36 ώρες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές κατά το μέσο στάδιο της ωχρινικής φάσης, γεγονός το οποίο δεν διαπιστώθηκε στις μοσχίδες. Τα αποτελέσματα των πειραματισμών του παρόντος κεφαλαίου δείχνουν ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης μπορεί να ασκήσει κατασταλτική επίδραση στην έκκριση της LH, ακόμη και ύστερα από την επαναφορά των συγκεντρώσεών της στα

βασικά επίπεδα. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια του οίστρου, η έκκριση της γκρελίνης ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο στις αγελάδες από ότι στις μοσχίδες και είναι πιθανόν ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης-17β. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι απαιτείται διενέργεια περαιτέρω έρευνας, ώστε να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν σε διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της έκκρισης της γκρελίνης σε αγελάδες και μοσχίδες.

Στο κεφάλαιο IV παρουσιάζεται ο τρίτος πειραματισμός (που αποτελείται από δύο μέρη), ο οποίος είχε ως στόχο αρχικά να εκτιμηθούν οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, τόσο σε αγελάδες όσο και σε μοσχίδες και εν συνεχεία να συγκριθεί η αντίδραση στο στρες της στέρησης τροφής, σε έγκυες και μη-έγκυες μοσχίδες. Στο πρώτο μέρος, δείγματα αίματος συλλέγονταν (1 στην αρχή κάθε μήνα της κυοφορίας) από τις αγελάδες (n=5) και τις μοσχίδες (n=5), ώστε να ελεγχθεί η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης. Εν συγκρίσει με τις τιμές πριν από τη γονιμοποίηση, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης έδειχναν την τάση να είναι υψηλότερες κατά τον 3^ο μήνα της κυοφορίας στις μοσχίδες και κατά τον 7^ο, 8^ο και 9^ο μήνα της κυοφορίας στις αγελάδες. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις αγελάδες και στις μοσχίδες. Στο δεύτερο μέρος, έγκυες (n=4) και μη-έγκυες (n=4) μοσχίδες υποβλήθηκαν σε πλήρη νηστεία για 24 ώρες. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν τις ώρες 0, 4, 8, 12, 16 και 24 μετά την απομάκρυνση της τροφής και αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ινσουλίνης, της γλυκόζης, της κορτιζόλης, του BHBA και των μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFA) και τις ώρες 0, 8, 16 και 24, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης. Η σύγκριση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης μεταξύ των ομάδων πριν και μετά τη νηστεία, έδειξε σημαντική αύξηση στις 8, 16 και 24 ώρες μετά την απομάκρυνση της τροφής στις έγκυες και στις 8 ώρες στις μη-έγκυες μοσχίδες. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα έγκυα και στα μη-έγκυα ζώα. Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στις έγκυες μοσχίδες ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των μη-έγκυων. Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης εμφάνισαν σημαντική πτώση στις 4 και 8 ώρες της νηστείας στις έγκυες μοσχίδες, αλλά παρέμειναν ανεπηρέαστες στις μη-έγκυες. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης αυξήθηκαν σημαντικά

μετά την 4^η ώρα και παρέμειναν σε αυξημένα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών στα έγκυα ζώα, ενώ στα μη-έγκυα κορυφώθηκαν την 24^η ώρα της νηστείας. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται ότι οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης αυξάνουν ως ανταπόκριση στον περιορισμό της τροφής. Τα αποτελέσματα δείχνουν, επίσης, ότι: α) κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυοφορίας, η έκκριση της ολικής γκρελίνης λαμβάνει χώρα με διαφορετικό πρότυπο στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής σε σύγκριση με τις μοσχίδες και β) τα έγκυα ζώα είναι πιο ευαίσθητα στο στρες της στέρησης τροφής σε σύγκριση με τα μη-έγκυα ζώα.

Στο κεφάλαιο V παρατίθεται ο τέταρτος πειραματισμός, στον οποίο μελετήθηκαν τα πιθανά μοριακά μονοπάτια, μέσω των οποίων η γκρελίνη επιταχύνει την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων. Συμπλέγματα ωαρίων-ωοφόρου δίσκου (COCs) αγελάδων, ύστερα από ωρίμανση 18 ή 24 ωρών, με ή χωρίς την προσθήκη 800 pg ml⁻¹ βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης, αξιολογούνταν ως προς την ωρίμανση του πυρήνα και υποβάλλονταν σε *in vitro* γονιμοποίηση σε καλλιεργητικά υποστρώματα (standard media)· τα ζυγωτά που προέκυπταν, καλλιεργούνταν εν συνεχεία *in vitro* για 8 ημέρες. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Akt1 και ERK1/2 (MAPK1/3) αξιολογήθηκαν σε υποομάδες COCs, κατά τις ώρες 0, 6, 10, 18 και 24 της *in vitro* ωρίμανσης (IVM). Στην ομάδα, όπου είχε γίνει προσθήκη γκρελίνης, δεν παρουσιάστηκε καμιά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των ώριμων ωαρίων μεταξύ των ωρών 18 και 24. Σε αντίθεση, στις 24 ώρες ωρίμανσης, στην ομάδα των μαρτύρων, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός ώριμων ωαρίων από ότι στις 18. Η ωρίμανση των ωαρίων για 24 ώρες, υπό την παρουσία γκρελίνης, οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων συγκριτικά τόσο με την ομάδα ωαρίων που ωρίμασε για 18 ώρες παρουσία γκρελίνης, όσο και με τις δύο ομάδες των μαρτύρων. Στα ωάρια, στα οποία είχε γίνει προσθήκη γκρελίνης, το ποσοστό φωσφορυλίωσης της Akt1 ήταν σημαντικά χαμηλότερο την 10^η ώρα της *in vitro* ωρίμανσης, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στο ποσοστό φωσφορυλίωσης της ERK1/2 την 6^η και τη 10^η ώρα της IVM σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των μαρτύρων. Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, το ποσοστό φωσφορυλίωσης της Akt1 ήταν σημαντικά υψηλότερο την 18^η και την 24^η

ώρα της *in vitro* ωρίμανσης, στην ομάδα που είχε γίνει προσθήκη γκρελίνης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά της ομάδας των μαρτύρων. Το συμπέρασμα της συγκεκριμένης μελέτης, είναι ότι η γκρελίνη δρα με διαφορετικό χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των βοοειδών, τροποποιώντας τη φωσφορυλίωση των Akt1 και ERK1/2, γεγονός που επιταχύνει τη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων.

Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται ως ακολούθως:

1. Η γκρελίνη επιδρά στην υπόφυση, αμβλύνοντας την απόκρισή της στο ερέθισμα της GnRH και διαταράσσοντας τη διαδικασία ωχρινοποίησης των κυττάρων του ωοθυλακίου ή/και της στεροειδογενετικής ικανότητας των ωχρινικών κυττάρων.
2. Σε σύγκριση με τα μη έγκυα, τα έγκυα βοοειδή αντιδρούν εντονότερα στο στρες της στέρησης τροφής απελευθερώνοντας ταχύτερα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γκρελίνης.
3. Η στέρηση της τροφής προκαλεί αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, οι οποίες αμβλύνουν την επαγόμενη έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, ακόμα και μετά την αποκατάσταση της συγκέντρωσης της γκρελίνης στα βασικά επίπεδα.
4. Κατά τη διάρκεια της κυοφορίας οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης διακυμαίνονται με καθορισμένο πρότυπο στις αγελάδες, αλλά όχι στις μοσχίδες.
5. Η περιοιστρική περίοδος των αγελάδων, αλλά όχι των μοσχίδων, χαρακτηρίζεται από υπεργκρελιναιμία.
6. Η γκρελίνη επιδρά διαφορετικά στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, επιφέροντας επιτάχυνση στη διαδικασία ωρίμανσης των ωαρίων, μέσω της τροποποίησης της φωσφορυλίωσης των Akt1 και ERK1/2.

ABSTRACT

For the accomplishment of this PhD thesis, four distinct experiments were conducted. The aim of these experiments was to elucidate the effects of ghrelin, as metabolic index, in various aspects of the reproductive system of cows. The experiments were focused on studying: a) the effects of ghrelin administration on reproductive parameters, b) the stress reaction in feed restricted pregnant and non-pregnant animals, c) ghrelin concentration in periestrous period in cows and heifers and d) the possible molecular pathways through which ghrelin accelerates *in vitro* embryo maturation. Further, we investigated the pattern of ghrelin secretion during pregnancy in lactating cows and heifers. This PhD thesis is separated in five chapters followed by the concluding remarks.

Chapter I is the general introduction, which is separated in 5 parts. The first part refers to the reproduction and fertility of high yielding cows. The second part reports on physiology of the bovine estrous cycle, briefly describing endocrinology, oogenesis and folliculogenesis. In the third part, the role of a number of metabolic neuropeptides and regulatory molecules such as leptin, kisspeptins, neuropeptide Y, melanocortins and agouti-related peptides in regulating various reproductive functions, is analysed. In part four there is a detailed report on ghrelin and its biological actions with respect to the specific role of ghrelin on reproduction; finally, in part five the aims of the PhD thesis are stated.

In chapter II the experimental phase is detailed. The aims of these experiments were to study the effects of ghrelin administration, on the secretion of growth hormone (GH), luteinising hormone (LH), follicle stimulation hormone (FSH), and on luteal function of the following estrous cycle, in cows. To this end the estrous cycles of eight Holstein heifers were synchronized with PRID and ovulation was induced with GnRH. Four animals were treated with bovine acylated ghrelin ($1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) on 4 occasions and the remaining heifers were treated with saline. Starting concurrently with the first ghrelin injection, 13 blood samples were collected over a 4 hour period

for the determination of GH, LH and FSH concentration. Progesterone levels were measured in samples collected every other day after estrus expression. Ghrelin induced a strong but short lasting GH release, but it significantly suppressed the preovulatory gonadotropin surge. The duration of the following estrous cycle, as well as, the secretory ability of treated animals were significantly reduced compared to controls. These results imply that ghrelin acts on pituitary causing impaired response to the GnRH stimulus, and it is likely to affect luteinization of the cellular compartment of the preovulatory follicle, and/or suppresses steroidogenetic activity of the luteal cells.

In chapter III two experiments are described, in which we studied: a) the changes of LH secretion in heifers under different feeding schedules, and b) the fluctuations of total ghrelin concentrations during estrus in cows and heifers. In experiment one, synchronized heifers were allocated in 3 groups (R, regularly fed controls; F, fasted; and F-F fasted - fed). On day 8, group F and F-F animals stayed without feed for 24 hours; thereafter, feed was provided to F-F cattle and GnRH was administered to all animals. Blood samples were collected for ghrelin, LH, and cortisol concentrations. Fasting caused increase of ghrelin concentration in groups F and F-F, while in response to GnRH, LH surge was significantly attenuated in groups F and F-F compared to that of group R. In experiment 2, lactating cows and heifers were used. On day 9 of a synchronized cycle, PGF_{2α} was administered and blood samples were collected twice daily until the third day after estrus, and analyzed for progesterone, estradiol-17β, ghrelin, glucose and Beta Hydroxybutyric Acid (BHBA) concentrations. No difference was recorded between groups in steroids and BHBA concentrations. In comparison to mid luteal values, ghrelin concentrations significantly increased at periestrual period in cows, but not in heifers. This study provides evidence that, starving induced elevated ghrelin concentrations can have suppressing effect on LH secretion, even after ghrelin's restoration to basal values, and that during estrus, ghrelin secretion is differently regulated in cows and heifers, likely being independent from estradiol-17β concentrations. Further research is required to identify the determining factor(s) that drive the different regulation of ghrelin secretion in cows and heifers.

Chapter IV reports on the third experimental phase aiming to compare total ghrelin concentration throughout pregnancy between lactating cows and heifers, and to study the response to acute feed restriction in pregnant or non-pregnant heifers. In the first experiment, blood samples were collected each month of pregnancy from cows (n=5) and heifers (n=5) and analyzed for total ghrelin concentration. Compared to pre-conception values, ghrelin concentrations tended to be greater during the 3rd month of pregnancy in heifers, whereas they were higher in the 7th, 8th and 9th months in lactating cows, but no difference was detected between lactating cows and heifers. In the second experiment, pregnant (n=4) and non-pregnant (n=4) heifers were fasted for 24 hours. Blood samples were collected 0, 4, 8, 12, 16 and 24 hours of fasting and were assayed for, insulin, glucose, cortisol, BHBA and Non-esterified Fatty Acids (NEFA) concentrations, and at time points 0, 8, 16 and 24 for total ghrelin determination. Compared to satiety, ghrelin concentrations were higher at the 8th, 16th and 24th hour of fasting in pregnant, and at the 8th hour in non-pregnant animals, but no difference was detected between pregnant and non-pregnant heifers. Pregnant heifers had lower glucose concentrations than non-pregnant ones. Insulin concentrations were reduced at the 4th and the 8th hour of fasting in pregnant heifers, and stayed unaffected in non-pregnant ones. Cortisol concentrations increased after the 4th hour and remained elevated throughout the sampling period in pregnant heifers, while they increased at the 24th hour in non-pregnant animals. Here, we provide evidence that total ghrelin concentrations rise in response to feed restriction. Albeit no group effect was evident, our results imply that: a) during the last trimester of pregnancy total ghrelin is secreted in different pattern between lactating cows and heifers and b) pregnant animals are more responsive than non-pregnant ones to hunger induced stress.

In chapter V, the fourth experiment is presented. The purpose of this experiment was to investigate the possible molecular pathways through which ghrelin accelerates *in vitro* oocyte maturation. Bovine, cumulus oocyte complexes (COCs), after 18 or 24 hours maturation in the absence or the presence of 800 pg ml⁻¹ bovine acylated ghrelin were either assessed for nuclear maturation or underwent *in vitro* fertilization in standard media and putative zygotes were cultured *in vitro* for 8 days.

In a subset of COCs the levels of phosphorylated Akt1 and ERK1/2 (MAPK1/3) were assessed at the 0th, 6th, 10th, 18th and 24th hour of *in vitro* maturation (IVM). At 18 and 24 hours no difference existed in the proportion of matured oocytes in the ghrelin treated group, while in the control group more matured oocyte were found at 24 hours. Oocyte maturation for 24 hours in the presence of ghrelin resulted in substantially reduced blastocyst yield in comparison to that obtained after 18 hours or to both control groups. Ghrelin treated oocytes expressed lower Akt1 phosphorylation rate at the 10th hour and higher ERK1/2 at the 6th and 10th hour of IVM compared to controls. In cumulus cells, at the 18th and 24th hour of IVM, Akt1 phosphorylation rate was higher in ghrelin treated groups compared to controls. Our results imply that ghrelin acts in different time-dependent manner on bovine oocytes and cumulus cells modulating Akt1 and ERK1/2 phosphorylation, which brings about acceleration of the oocyte maturation process.

The main findings of the present PhD Thesis are summarized as following:

1. Acting at pituitary level, ghrelin is able to blunt hypophesial response to GnRH; as a consequence luteinization of the follicular cells and/or steroidogenic capacity of luteal cells are disrupted.
2. Fasting induced stress accompanied by elevated ghrelin concentrations is expressed earlier and more profoundly in pregnant than in non-pregnant heifers.
3. Fasting brings about increased ghrelin levels that are able to depress the induced gonadotropins' concentrations, even after ghrelin is restored at basal levels.
4. During pregnancy, ghrelin concentrations fluctuate at a determined pattern in multiparous cows, but not in heifers.
5. Periestrual period is characterized by hyperghrelinaemia in cows, but not in heifers.
6. Ghrelin is acting differently on oocytes and on cumulus cells accelerating oocyte maturation by altering the phosphorylation pattern of Akt1 and ERK1/2.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πλήρη Άρθρα σε Διεθνή Περιοδικά

1. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, K. Dafopoulos, P. Georgoulas, N.G. Vasileiou, C.G. Fthenakis, G. Anifandis and G.S. Amiridis (2016): Ghrelin suppresses the GnRH-induced preovulatory gonadotropin surge in dairy heifers. *Theriogenology*, **86(6)**: 1615-1621.
2. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, F. Krania, I.S. Pappas, K. Dafopoulos, I.E. Messinis, G. Anifandis and G.S. Amiridis (2017): Effects of ghrelin on activation of Akt1 and ERK1/2 pathways during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Zygote*, **25(2)**: 183-189.
3. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, P. Georgoulas, C.A. Rekkas, K. Dafopoulos, L. Athanasiou, G.C. Fthenakis and G.S. Amiridis (2018): Effects of pregnancy and short-lasting acute feed restriction on total ghrelin concentration and metabolic parameters in dairy cattle. *Theriogenology*, **106(1)**: 141-148.
4. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, C.A. Rekkas, P. Georgoulas, L. Athanasiou and G.S. Amiridis (2018): Study on total ghrelin, and luteinizing hormone under short-lasting food deprivation, and during periestrual period, in dairy cattle. (*under review*)

Ανακοινώσεις σε Διεθνή και Εθνικά Συνέδρια

1. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, K. Dafopoulos, P. Georgoulas, N.G. Vasileiou, G.C. Fthenakis, G. Anifandis and G.S. Amiridis (2016): Ghrelin suppresses the GnRH-induced gonadotropin surge in dairy heifers. *Oral and poster presentations* at the 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Le Vinci in Tours, France, June 26-30th 2016. *ABSTRACT BOOK*, p. 396, June 2016.

2. T.M. Chouzouris, E. Dovolou, F. Krania, I.S. Pappas, K. Dafoopoulos, G. Anifandis and G.S. Amiridis (2016): Effects of ghrelin on activation of Akt1 and ERK1/2 pathways during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Poster presentation* at the 32nd Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, September 9th and 10th 2016. *Animal Reproduction*, **13(3)**: 502, 2016.
3. Θ.Μ. Χουζούρης, Ε. Ντόβολου, Π. Γεωργούλιας, Κ. Νταφόπουλος, Λ. Αθανασίου και Γ.Σ. Αμοιρίδης (2017): Επίδραση της βραχείας διάρκειας νηστείας στην έκκριση γκρελίνης και LH σε μοσχίδες. *Προφορική ανακοίνωση* στο 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και Υγιεινής Τροφίμων, Βόλος, Ελλάδα, 12-14 Μαΐου 2017.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή

1.1. Η αναπαραγωγή στις αγελάδες υψηλών αποδόσεων

Η εντατική γενετική επιλογή, σε συνδυασμό με τα βελτιωμένα προγράμματα διατροφής και διαχείρισης, έχουν συνεισφέρει ώστε τα τελευταία χρόνια πολλές αγελάδες της φυλής Holstein να ξεπερνούν κατά πολύ την παραγωγή των 10.000 λίτρων γάλακτος σε 305 ημέρες (Dobson et al. 2007). Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 30 ετών, όμως, ταυτόχρονα με την αύξηση της παραγωγής, καταγράφηκε διεθνώς μία ανησυχητική μείωση της γονιμότητας των ζώων αυτών (Lucy 2007). Παρά το γεγονός ότι η υψηλή αναπαραγωγική απόδοση των αγελάδων αποτελεί την εγγύηση για τη βιωσιμότητα και την κερδοφορία των εκμεταλλεύσεων, φαίνεται ότι η διεθνής κοινότητα έχει, αναπόφευκτα, συμβιβαστεί με τη μείωση της γονιμότητας, δεδομένου ότι ο επιθυμητός μέσος ετήσιος ρυθμός κυοφορίας (pregnancy rate) προσδιορίζεται πλέον στο περί το 25% (Norman et al. 2009), γεγονός που αποδεικνύει ότι υπό βέλτιστες συνθήκες ανίχνευσης οίστρων (80%), η απόδοση της τεχνητής σπερματέγχυσης (Τ.Σ.) σε κυοφορία δύσκολα αναμένεται να υπερβεί το 30%. Ιστορική αναδρομή στη βιβλιογραφία των προηγούμενων δεκαετιών δείχνει ότι στη δεκαετία του 1970 στο Ηνωμένο Βασίλειο, η επιτυχία στην πρώτη Τ.Σ. ήταν 55,6% και υποχώρησε στη δεκαετία του 1990 στο 39,7% (Royal et al. 2000), ενώ στο αντίστοιχο διάστημα στις Η.Π.Α. το ποσοστό παρουσίαζε μία ετήσια μείωση της τάξης του 0,5% (Beam and Butler 1999).

Ενώ η αρνητική συσχέτιση μεταξύ ύψους γαλακτοπαραγωγής και γονιμότητας είναι υπεράνω αμφισβήτησης, δεν υπάρχει κοινή παραδοχή ως προς τις αιτίες που

οδηγούν σε αυτή. Η ευθεία γενετική συσχέτιση γαλακτοπαραγωγής και γονιμότητας απορρίπτεται από ορισμένους ερευνητές, με κύριο επιχείρημα ότι στην περίοδο της ύφεσης της γονιμότητας των αγελάδων, η γονιμότητα των μοσχίδων παρέμεινε αμετάβλητη και σταθερά σε υψηλά επίπεδα (Pryce et al. 2004). Σε αντίθεση, άλλοι υποστηρίζουν ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών, στηριζόμενοι στο διαφορετικό ρυθμό σύλληψης (Conception Rate, CR) μεταξύ μοσχίδων υψηλής (64%) και μέσης (71%) γενετικής αξίας (Pryce et al. 2002).

Από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα παρατηρείται διεθνώς μία αναθεώρηση των βασικών κριτηρίων γενετικής επιλογής, με αποτέλεσμα κλασικά παραγωγικά χαρακτηριστικά να παραμερίζονται προς όφελος λειτουργικών μη-παραγωγικών χαρακτηριστικών, όπως η υγεία και η γονιμότητα (Miglior 2005). Αποτέλεσμα της αλλαγής των προτεραιοτήτων επιλογής ήταν μία διαφαινόμενη βελτίωση στη γονιμότητα των αγελάδων (Norman et al. 2009, Walsh et al. 2011), χωρίς, όμως, αυτή να πλησιάζει τις αναπαραγωγικές αποδόσεις των προηγούμενων δεκαετιών. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να αγνοηθεί ότι, στο ίδιο χρονικό διάστημα, ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στην εν γένει διαχείριση των αγελάδων, του περιβάλλοντος και των συνθηκών διαβίωσής τους. Επί παραδείγματι, αναδείχθηκαν: α) ο ρόλος της διατροφής και ιδιαίτερα αυτός του ισοζυγίου ενέργειας στη ρύθμιση της γονιμότητας των αγελάδων (Butler 2014), β) η σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος, όχι μόνο στην προάσπιση της μήτρας κατά τη διάρκεια της λοχείας, αλλά και στην εμφάνιση μεταβολικών νοσημάτων (Roche 2006), καθώς και στην ενδοκρινολογία της αναπαραγωγής (Dobson et al. 2007), γ) οι μηχανισμοί δράσης και οι συνέπειες της θερμικής καταπόνησης στην αναπαραγωγική απόδοση (Wolfenson et al. 2000, Rensis and Scaramuzzi 2003), δ) ο καταλυτικός ρόλος των παραγόντων καταπόνησης, εμμέσως της ευζωίας, στη λειτουργικότητα του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη (Dobson et al. 2001, 2003). Έτσι, φαίνεται να επιβεβαιώνεται η θέση του Leblanc (2010) ότι πέραν των επιλογών, με βάση συγκεκριμένα γενετικά χαρακτηριστικά, παράγοντες όπως η πλημμελής διατροφή, η γενική διαχείριση και το περιβάλλον, οι οποίοι έχουν βαρύνοντα ρόλο στη γονιμότητα των αγελάδων, δεν αξιολογούνται σε αρκετές μελέτες, επηρεάζοντας την αξιοπιστία και την αμεροληψία των αποτελεσμάτων.

1.2. Ανασκόπηση του ωοθηκικού κύκλου των αγελάδων

Παρά τη γενετική πρόοδο που έχει συντελεστεί στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των αγελάδων και τις επιπτώσεις που αυτή επέφερε στη γονιμότητα των ζώων, οι μηχανισμοί ρύθμισης του ωοθηκικού κύκλου και η κλασική φυσιολογία της αναπαραγωγής παραμένουν αμετάβλητες. Επιπλέον, η μείωση της γονιμότητας λειτούργησε ως ένα επιπλέον ερέθισμα για την εντατικοποίηση και την εμβάθυνση της έρευνας σε παράγοντες που λειτουργούν ως δυνητικοί ή άμεσοι ρυθμιστές της αναπαραγωγής.

Σε απουσία κυοφορίας, οι ένηβες υγιείς αγελάδες εκδηλώνουν κατ' επανάληψη ωοθηκικούς κύκλους, μέσης διάρκειας 21 ημερών, κατά τη διάρκεια των οποίων ωοθυλάκια αναπτύσσονται σε ένα κυματοειδές πρότυπο, το ζώο εμφανίζει οίστρο, γίνεται η ωοθυλακιορρηξία και αναπτύσσεται το ωχρο σωματίο.

1.2.1. Ωοθυλακιογένεση-ωογένεση-ωρίμανση του ωαρίου

Στο νεαρό έμβρυο, διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα, αποικίζουν τη γεννητική ταινία, πολλαπλασιάζονται μιτωτικά και διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τα ωογόνια. Στη συνέχεια, τα ωογόνια αυξάνουν σε μέγεθος και εκκινούν, χωρίς ορμονική υποστήριξη, τη Μείωση, μετεξελισσόμενα έτσι σε πρωτοταγή ωάρια. Στα βοοειδή, η Μείωση ξεκινά περί την 82^η ημέρα της κύησης. Στο στάδιο αυτό το ωάριο περιτοιχίζεται από ένα στοίχο πεπλατυσμένων προ-κοκκωδών κυττάρων. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί το αρχέγονο ωοθυλάκιο, το οποίο ανιχνεύεται περί την 90^η ημέρα της κυοφορίας (Picton 2001). Τα αρχέγονα ωοθυλάκια σχηματίζονται στην επιφάνεια της ωοθήκης, αλλά κατά τη μετέπειτα φάση της ανάπτυξής τους μεταναστεύουν προς το κέντρο της. Στη συνέχεια αναπτύσσονται εξελισσόμενα σε πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή ωοθυλάκια, με τα τελευταία να χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη της κοιλότητας -άντρου- και να ανιχνεύονται στην επιφάνεια της ωοθήκης. Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του, το ωάριο παραμένει στο στάδιο της διπλοταινίας της Πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, με τον πυρήνα να βρίσκεται σε στατική φάση που ονομάζεται βλαστικό κυστίδιο (Germinal Vesicle, GV). Το ωάριο στο στάδιο αυτό είναι ένα διπλοειδές (2n)

κύτταρο και παραμένει σε μειωτική στασιμότητα (meiotic arrest) για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο μειωτικός πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει, δύο διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις, αλλά μόνο έναν διπλασιασμό του DNA. Έτσι, από ένα διπλοειδές κύτταρο προκύπτουν τέσσερα απλοειδή. Η ωρίμανση του ωαρίου είναι μία πολύπλοκη διαδικασία, η οποία αφορά τη μετάβαση του ωαρίου από το στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής διαίρεσης στη Μετάφαση II· η διαδικασία αυτή ονομάζεται διακίνηση. Τα ερεθίσματα, τα οποία επάγουν την επανέναρξη της Μείωσης από τη φάση της στασιμότητας, είναι η πρώτη προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση της LH, ή η απομάκρυνση του ωαρίου από το ωοθυλάκιο. Το τελευταίο αποδεικνύει ότι τοπικοί παράγοντες συντελούν στην αναστολή της εξέλιξης του ωαρίου (Edwards 1965). Κατά τη διάρκεια της διακίνησης, το βλαστικό κυστίδιο υφίσταται σημαντικές μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξάλειψη των πόρων, πτύχωση, κατακερματισμό και εξαφάνιση της μεμβράνης. Η κατάσταση αυτή, στην οποία περιέρχεται το ωάριο αποτελεί το πρώτο ανιχνεύσιμο στοιχείο της επανέναρξης της Μείωσης και χαρακτηρίζεται ως «κατακερματισμός του βλαστικού κυστιδίου» (Germinal Vesicle Break down, GVBD). Στις αγελάδες, η GVBD συμβαίνει μέσα σε λίγες ώρες μετά από την προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση της LH ή την αναρρόφηση του ωαρίου από το ωοθυλάκιο. Τα στάδια από τα οποία πρέπει να περάσει το ωάριο μέχρι να αποκτήσει πλήρη πυρηνική ωρίμανση είναι: η συμπύκνωση των χρωματοσωμάτων, η δημιουργία της ατράκτου στη Μετάφαση I (MI), ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωματοσωμάτων, η εξώθηση του πρώτου πολικού σωματίου και η είσοδος και η στατική παραμονή (*arrest*) στη Μετάφαση II (MII) (Kubelka et al. 1988, Albertini et al. 2001). Έτσι, μέχρι την πλήρη πυρηνική του ωρίμανση, το ωάριο πρέπει να περάσει δύο στατικές φάσεις. Η πρώτη στατική φάση διακόπτεται από την έκκριση της LH και η δεύτερη από την είσοδο του σπερματοζωαρίου σε αυτό. Παρά το γεγονός ότι η LH δίνει το έναυσμα της επανέναρξης της Μείωσης ούτε το ωάριο, ούτε τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου έχουν υποδοχείς για την LH (Peng et al. 1991) και συνεπώς εικάζεται ότι κάποιοι παρακρινείς παράγοντες ενεργοποιούνται και επάγουν τη δράση της LH στο σύμπλοκο ωάριο-ωοφόρος δίσκος. Στην πρώτη φάση το ωάριο παραμένει στη στατική φάση, εξαιτίας διάχυσης cAMP, το οποίο προέρχεται από τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα του ωοθυλακίου. Υπό τη δράση της LH τροποποιείται η συνοχή

των χασματοσυνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του ωαρίου και του ωοφόρου δίσκου, αλλάζοντας τη διαπερατότητα σε ιόντα Ca^{2+} και K^+ , προκαλώντας αποπόλωση των μεμβρανών και αλλαγή του ενδοκυτταρικού pH (Edwards et al. 1999). Οι αλλαγές αυτές πιθανόν να αποτελούν το έναυσμα δράσης δύο κινασών, του παράγοντα προαγωγής της ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, MPF) και της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK), οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της Μείωσης. Ο MPF είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, αποτελούμενη από μία ρυθμιστική υπομονάδα, την κυκλίνη B και μία καταλυτική υπομονάδα, την p34cdc2 και συμβάλει στη φωσφορυλίωση των MAPK και ERK1/2, δίνοντας το σήμα για την έναρξη της ωρίμανσης των ωαρίων (Fissore et al. 1996). Η δράση του MPF ξεκινάει αμέσως μετά την GVBD, φτάνει στα μέγιστα επίπεδα κατά τη MI, στη συνέχεια μειώνεται διαρκώς έως πριν την MII, για να αυξηθεί εκ νέου στη φάση MII, υποδηλώνοντας ότι η μετάβαση από την MI στην MII σχετίζεται με τη μείωση της δραστηριότητάς του (Gordon 2003). Η συμβολή του MPF στη διαδικασία ωρίμανσης είναι αδιαμφισβήτητη, ενώ μελέτες από τους Gordo και συνεργάτες (2001) έδειξαν ότι η δραστηριότητα της MAPK είναι απαραίτητη για την αναστολή της Μετάφασης II, τη διατήρηση της δραστηριότητας του MPF, καθώς και την οργάνωση των μικροσωληναρίων. Σε *in vitro* πειραματισμούς, όπου η απομάκρυνση του ωαρίου αποτελεί ικανή συνθήκη για την επανέναρξη της Μείωσης, αποδείχθηκε, με τη χρήση αναστολέων του MPF (βουτυρολακτόνη I και ροσκοβιτίνη), ότι τα ωάρια διατηρούνται για τουλάχιστον 24 ώρες στη στατική φάση και ανακτούν την ικανότητα απενεργοποίησης της Μείωσης, μετά την απομάκρυνση του αναστολέα από το υπόστρωμα ωρίμανσης, χωρίς να επηρεάζεται ούτε η εξέλιξη, αλλά ούτε και η γονιμότητά τους (Mermillod et al. 2000, Ponderato et al. 2001, 2002, Vigneron et al. 2004).

1.2.2. Πρότυπο ανάπτυξης των ωοθυλακίων (*follicular dynamics*)

Η ανάπτυξη-ωρίμανση των ωοθυλακίων αποτελεί θεμελιώδη λειτουργία της αναπαραγωγής που συντελείται υπό την επίδραση των γοναδοτρόπων ορμονών (FSH και LH) του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.

Το πρότυπο ανάπτυξης των ωοθυλακίων στα βοοειδή, έχει μελετηθεί διεξοδικά μετά από την ευρεία χρήση της υπερηχογραφίας στο είδος αυτό (Sirois and Fortune 1988, Ginther et al. 1989, Savio et al. 1990). Έχει πλέον αποσαφηνιστεί πλήρως ότι σε κάθε ωοθηκικό κύκλο αναπτύσσονται 2, 3 και σπανίως 4 κύματα ωοθυλακίων στις ωοθήκες των αγελάδων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων δεν διακόπτεται κατά τη διάρκεια της κύησης (Ginther et al. 1996). Στη διάρκεια κάθε κύματος, επιλέγεται αρχικά μία ομάδα (2-5) μικρών ωοθυλακίων, τα οποία αναπτύσσονται ταυτόχρονα, μέχρι να αποκτήσουν διάμετρο 5-9 mm. Στη συνέχεια, επιλέγεται ένα ωοθυλάκιο, το οποίο αναπτύσσεται καταστέλλοντας την ανάπτυξη των υπολοίπων, τα οποία γίνονται ατρητικά. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είτε παλινδρομεί, αν η ανάπτυξη του γίνεται στο δίοιστρο, είτε ρήγνυται, αν η ανάπτυξή του συμπίπτει με τα τελικά στάδια του δίοιστρου ή/και τον πρόοιστρο. Η εξάρτηση των ωοθυλακίων από τις γοναδοτρόπες ορμόνες και κατά κύριο λόγο από την FSH εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξής τους. Έτσι, κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης, τα ωοθυλάκια δεν εξαρτώνται από τις γοναδοτρόπες ορμόνες. Στη συνέχεια, αποκτούν τη δυνατότητα να ανταποκρίνονται στις γοναδοτρόπες ορμόνες (gonadotropin responsive) και, φτάνοντας σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης (διάμετρο περίπου 4 mm), καταλήγουν να είναι πλήρως εξαρτώμενα από αυτές (gonadotropin dependent) (Campbell et al. 1995, Gong et al. 1995).

Η ανάδυση του κύματος των ωοθυλακίων συνοδεύεται από πρόσκαιρη (διάρκειας 1-2 ημερών) αύξηση της συγκέντρωσης της FSH, η οποία με τη σειρά της προκαλεί ενίσχυση της δράσης της αρωματάσης στα κύτταρα του κοκκώδους υμένα των ωοθυλακίων ($P_{450arom}$), μέσω της οποίας τα ανδρογόνα μετατρέπονται σε οιστρογόνα (Hillier 1994). Το επιλεγθέν κυρίαρχο ωοθυλάκιο, παράλληλα με την αύξηση του μεγέθους του, παράγει αυξημένες συγκεντρώσεις οιστρογόνων και ανασταλτίνης, οι οποίες καταστέλλουν την έκκριση της FSH σε βασικά επίπεδα (Sunderland et al. 1994, Ginther et al. 2000a). Η αρχικά κρατούσα άποψη για τον μηχανισμό εγκατάστασης της κυριαρχίας ήταν ότι, κάτω από τέτοιες συνθήκες (χαμηλή FSH), το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ανταποκρίνεται περισσότερο στην LH και συνεχίζει αδιατάρακτη ανάπτυξη σε περιβάλλον χαμηλής FSH, εξαιτίας της εμφάνισης υποδοχέων LH (Ginther et al. 2000b). Σύντομα, όμως, αποδείχθηκε ότι η

πρόσκτηση υποδοχέων LH δεν είναι κομβικής σημασίας για την κυριαρχία, διότι αυτή συμβαίνει μετά και όχι πριν από την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Fortune et al. 2001). Φαίνεται ότι παράγοντες του σωματοτρόπου άξονα, ιδιαίτερα ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (IGF-1) και οι πρωτεΐνες σύνδεσής του (IGFBP) δρουν στα ωοθυλάκια πριν από τη μορφολογική επιλογή, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του IGF-1, ο οποίος επιδρά τελικά στη δυνατότητα του κυρίαρχου ωοθυλακίου να παράξει αυξημένες συγκεντρώσεις οιστρογόνων (Fortune et al. 2001).

Οι βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιδράσεις της διατροφής, του μεταβολισμού και του σωματοτρόπου άξονα στην ωοθυλακιογένεση αποτέλεσαν πεδίο συστηματικής μελέτης (Scaramuzzi and Murray 1995). Οι Gutierrez και συνεργάτες (1995) έδειξαν ότι το επίπεδο διατροφής προκαλεί σημαντικές αλλαγές στον αριθμό των μικρών ωοθυλακίων και ότι βραχυπρόθεσμες αλλαγές στη διατροφή είναι ικανές να επηρεάσουν τη δυναμική ανάπτυξης των ωοθυλακίων στις αγελάδες, χωρίς ταυτόχρονη αλλαγή στις συγκεντρώσεις των γοναδοτρόπων ορμονών (Gutierrez et al. 2000). Η πρόσληψη ενέργειας και πρωτεϊνών πιστεύεται ότι επηρεάζει τη λειτουργία του συστήματος των IGFs της ωοθήκης, με επακόλουθη επίδραση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και κατά συνέπεια στην ποιότητα των ωαρίων. Προτάθηκε ότι αλλαγές στον IGF-1, οι οποίες προέρχονται από τη διατροφή, αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητά του στο εσωτερικό του ωοθυλακίου και ακολούθως αυξάνουν την ευαισθησία του ωοθυλακίου στην FSH. Σε αντίθεση με τις επιδράσεις στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, υπερβολική παροχή θρεπτικών συστατικών υποβαθμίζει την ποιότητα των ωαρίων, εξαιτίας των αυξημένων συγκεντρώσεων της ουρίας στο αίμα (Armstrong et al. 2001). Οι Boland και συνεργάτες (2001) υποστήριξαν ότι οι αγελάδες με μειωμένη πρόσληψη ενέργειας εμφανίζουν μικρότερο μέγεθος κυρίαρχου ωοθυλακίου και πιο συχνά κύκλους τριών κυμάτων ωοθυλακίων σε σύγκριση με αγελάδες υψηλότερης ενεργειακής πρόσληψης. Επιπλέον, οι Comin και συνεργάτες (2002) απέδειξαν ότι ο απότομος περιορισμός τροφής προκαλεί ουσιαστικές αλλαγές στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο, λειτουργώντας ως δυνητικός παράγοντας μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας. Φαίνεται κατά συνέπεια ότι, παράγοντες του μεταβολισμού και του σωματοτρόπου

άξονα επηρεάζουν, ταυτόχρονα με τις γοναδοτρόπες ορμόνες, το πρότυπο ανάπτυξης των ωοθυλακίων.

1.2.3. Ρύθμιση του ωοθηκικού κύκλου

1.2.3.α. Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες

Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, ελέγχεται από ένα πολύπλοκο σύστημα (loop) παλίνδρομων ρυθμίσεων. Αρχικά, εθεωρείτο ότι στο θηλυκό ζώο οι βασικοί και ίσως οι μοναδικοί συντελεστές στο σύστημα αυτό ήταν οι πέντε κλασικές ορμόνες της αναπαραγωγής, η υποθαλαμική προέλευσης απελευθερωτική ορμόνη της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH), οι γοναδοτρόπες ορμόνες της υπόφυσης [ωχρινοποιητική ορμόνη (LH) και ωοθυλακιότροπος ορμόνη (FSH)] και τα στεροειδή της ωοθήκης [(προγεστερόνη (P_4) και οιστραδιόλη-17 β (E_2)). Η GnRH απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο στο μέσο έπαρμα και, μέσω του υποφυσιαίου πυλαίου συστήματος μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου συνδέεται με εξειδικευμένους υποδοχείς (GnRHR), προκαλώντας την παραγωγή ή/και την απελευθέρωση των γοναδοτρόπων ορμονών (Plant and Zeleznik 2014). Οι γοναδοτρόπες ορμόνες, δρώντας σε ειδικούς υποδοχείς στις γονάδες, ρυθμίζουν τη σύνθεση και την απελευθέρωση των στεροειδών από αυτές. Στη συνέχεια, τα στεροειδή ολοκληρώνουν το κύκλωμα της αρνητικής ή θετικής παλίνδρομης ρύθμισης, αναστέλλοντας την καταστολή ή την απελευθέρωση της GnRH (Blair et al. 2015). Στο θηλυκό ζώο, η GnRH εκκρίνεται κατά δύο διαφορετικά πρότυπα, το τονικό, το οποίο λειτουργεί υποστηρικτικά σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου και το επεισοδιακό, το οποίο επάγει την προ-ωοθυλακιορρηκτική κορύφωση των γοναδοτρόπων ορμονών και την ωοθυλακιορρηξία (Moenter et al. 1991). Η διαπίστωση ότι η LH εκκρίνεται κατά κύματα, με εύρος και συχνότητα που παραλλάσσει κατά τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου, απέδειξε ότι η εκκριτική λειτουργία της ωοθήκης δεν εξαρτάται μόνο από τις απόλυτες συγκεντρώσεις των γοναδοτρόπων ορμονών, αλλά και από τη συχνότητα της έκκρισής τους (Knobil et al. 1980). Η εμβληματική δημοσίευση των Clarke και Cummings (1982) απέδειξε ότι η κάθε κορύφωση της LH επάγεται από την

αντίστοιχη κορύφωση της GnRH. Όμως, η GnRH παρουσιάζει διαφοροποιημένη επαγωγική δράση για την έκκριση της LH και της FSH (Millar et al. 2004). Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στον τρόπο αποθήκευσης των LH και FSH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς γοναδοτρόπων κυττάρων και στη διαφορετική ευαισθησία των κυττάρων αυτών στην GnRH (Pincus et al. 1998). Κυρίως, όμως, η διαφορά θα πρέπει να αποδοθεί στον ρόλο που διαδραματίζουν τα πεπτίδια της ωοθήκης (ανασταλίνη, ακτιβίνη και φολλιστατίνη) στη ρύθμιση αποκλειστικά της FSH (Xiao et al. 1990, Kaneko et al. 2002, Parker et al. 2003).

Η αρνητική και θετική παλίνδρομη ρύθμιση της E_2 και της P_4 είναι οι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη διατήρηση της κυκλικότητας του αναπαραγωγικού άξονα. Δρώντας ως ο βασικός ανασταλτικός παράγοντας, η P_4 καταστέλλει καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου την έκκριση της GnRH και της LH, ενώ χορηγούμενη μαζί με την E_2 προλαμβάνει τη θετική παλίνδρομη ρύθμιση της E_2 στον υποθάλαμο (Dierschke et al. 1973, Kasa-Vubu et al. 1992).

Το 2000, ανακαλύφθηκε σε ορτύκια, ένα άγνωστο νευροπεπτίδιο του υποθαλάμου, το οποίο έχει ανασταλτική επίδραση στην απελευθέρωση των γοναδοτρόπων ορμονών και για τον παραπάνω λόγο ονομάστηκε ανασταλτική ορμόνη της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών (Gonadotropin Inhibitory Hormone, GnIH) (Tsutsui et al. 2000). Σύντομα, διαπιστώθηκε ότι ο παράγοντας αυτός υπάρχει στον υποθάλαμο πολλών θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των μηρυκαστικών (Fukusumi et al. 2001, Yoshida et al. 2003, Clarke et al. 2008). Ο υποδοχέας της GnIH, ο οποίος ονομάστηκε GPR147, αναγνωρίστηκε ως ένας υποδοχέας G-συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Οι νευρώνες της GnRH εκφράζουν τον υποδοχέα GPR147 και κατ' επέκταση η GnIH, θεωρείται ότι αναστέλλει τη σύνθεση και έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, μέσω της μείωσης της δραστηριότητας των νευρώνων GnRH-I, καθώς, επίσης, και μέσω της άμεσης δράσης της στα γοναδοτρόπα κύτταρα. Η GnIH καταστέλλει εν μέρει λειτουργίες της αναπαραγωγής, δρώντας ανασταλτικά στους νευρώνες GnRH-II. Πέραν, της άμεσης δράσης της GnIH στην υπόφυση, φαίνεται ότι η GnIH δρα υποστηρικτικά καθ' όλη τη διάρκεια του δίοιστρου στην αρνητική παλίνδρομη δράση των στεροειδών και, κυρίως, της οιστραδιόλης-17β,

ενώ στην περί προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση της LH, η δράση της GnIH μειώνεται δραστικά, επιτρέποντας έτσι την αδιατάρακτη θετική παλίνδρομη δράση των οιστρογόνων και την ολοκλήρωση της ωοθυλακιορρηξίας (Gibson et al. 2008). Πέραν, όμως, της αμιγούς δράσης στον άξονα, φαίνεται ότι η GnIH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά πληροφοριών, σχετικά με την ενεργειακή κατάσταση του οργανισμού, σε κεντρικό επίπεδο ρύθμισης της έκκρισης των LH και FSH. Έχει διαπιστωθεί ότι στο πρόβατο, οι GnIH νευρώνες προβάλλουν στα κύτταρα με υποδοχείς νευροπεπτιδίου Y (NPY), ορεξίνης, και μελανίνης (Clarke et al. 2009, Qi et al. 2009). Πέραν της δράσης της σε κεντρικό επίπεδο, η GnIH και ο υποδοχέας της εκφράζονται και στις γονάδες (Ubuka et al. 2013). Επιπλέον, εφόσον η χορήγησή της σε ζώα εργαστηρίου αυξάνει την πρόσληψη τροφής, εικάζεται ότι η GnIH συμμετέχει στη ρύθμιση ορισμένων μεταβολικών διεργασιών (Johnson et al. 2007).

Παρά το γεγονός ότι τα στεροειδή των γονάδων έχουν καταλυτικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH, φαίνεται ότι η πλήρης λειτουργικότητα του υποθαλάμου απαιτεί βασικά νευρικά ερεθίσματα από άλλα δίκτυα, ξένα προς τα στεροειδή. Αυτό γίνεται περισσότερο εμφανές μετά την ανακάλυψη ότι οι υποθαλαμικοί νευρώνες στερούνται υποδοχέα-α των οιστρογόνων (ERα) (Herbison and Theodosis 1992). Συγκεκριμένα, τα οιστρογόνα έχουν υποδοχείς, οι οποίοι έχουν οριστεί ως υποδοχείς άλφα (ERα) και βήτα (ERβ) (Green et al. 1986, Kuiper et al. 1996), οι οποίοι έχουν διαφορετική κατανομή στις περιοχές του υποθαλάμου. Παρόλο που οι ERβ συναντώνται στους νευρώνες της GnRH, δεν συμμετέχουν στη ρύθμιση του προ-ωοθυλακιορρηκτικού κύματος της LH που επάγεται ως αντίδραση στις αυξημένες συγκεντρώσεις των οιστρογόνων (Herbison and Pape 2001, Dorling et al. 2003, Wintermantel et al. 2006). Επομένως, η δράση των οιστρογόνων μπορεί να μην αφορά άμεσα τους υποθαλαμικούς νευρώνες της GnRH, αλλά να επιτυγχάνεται/επάγεται μετά την παρεμβολή διάμεσου συστήματος νευρώνων, οι οποίοι φέρουν τους αντίστοιχους υποδοχείς. Η ανακάλυψη του νευροενδοκρινούς ρόλου του συστήματος της κισπεπτίνης βοήθησε να αποκρυπτογραφηθούν σκοτεινές, μέχρι πρότινος, πλευρές της ρύθμισης της λειτουργίας του αναπαραγωγικού άξονα. Έως το 2003, οι κισπεπτίνες και ο ρόλος τους στον έλεγχο του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες βρίσκονταν υπό αμφισβήτηση. Τη

συγκεκριμένη χρονική στιγμή, ανακοινώθηκε σχεδόν ταυτόχρονα από δύο ανεξάρτητες ομάδες ότι σε μέλη συγκεκριμένης οικογένειας, τα οποία εμφάνισαν υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και απουσία εμφάνισης ήβης, διαγνώσθηκε μετάλλαξη του υποδοχέα της κισπεπτίνης-KiSS1R (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003), γεγονός που ενοχοποιήθηκε για τη μη λειτουργικότητα του μηχανισμού παραγωγής επεισοδιακών εκκρίσεων GnRH/LH (Plant and Ramaswamy 2009).

Οι νευρώνες που εκφράζουν το *KiSS1* στον υποθάλαμο των γυναικών και των θηλυκών πιθήκων, εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στον τοξοειδή πυρήνα. Τα στεροειδή των ωθηκών καταστέλλουν την έκφραση του *KiSS1* στον υποθάλαμο τόσο στις γυναίκες, όσο και στους θηλυκούς πιθήκους. Αποδείχθηκε ότι ο αριθμός των νευρώνων που εκφράζουν το mRNA του *KiSS1* είναι σημαντικά αυξημένος σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, καθώς και σε ωθηκεκτομημένους πιθήκους σε σύγκριση με γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση και φυσιολογικούς πιθήκους, αντίστοιχα. Επιπλέον, χορήγηση οιστρογόνων και προγεστερόνης σε πιθήκους, μετά από διενέργεια ωθηκεκτομής, οδηγεί σε καταφανή μείωση της έκφρασης του *KiSS1* (Rometo et al. 2007). Συνεπώς, φαίνεται ότι ένα μέρος της αρνητικής παλίνδρομης δράσης των οιστρογόνων ή/και της προγεστερόνης, προάγεται, μέσω των διάμεσων νευρώνων που φέρουν υποδοχείς κισπεπτίνης (Plant and Ramaswamy 2009), ή μέσω άλλων νευρώνων που είναι φορείς υποδοχέων άλλων μεταβολικών σημάτων. Έτσι, τα τελευταία χρόνια η μελέτη του συστήματος της κισπεπτίνης έχει προσελκύσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον ενός μεγάλου αριθμού ερευνητικών ομάδων (Navarro and Tena-Sempere 2011). Η συνεχώς συσσωρευόμενη γνώση αποδεικνύει ότι, παρά τον αδιαμφισβήτητο ρόλο των στεροειδών στη ρύθμιση του αναπαραγωγικού άξονα, άλλα σήματα, τα οποία αποτυπώνουν, κυρίως, μεταβολική κατάσταση, είναι οι βασικοί ρυθμιστές του αναπαραγωγικού άξονα δρώντας πρωταρχικά στον υποθάλαμο.

1.2.3.β. Μεταβολικά σήματα και ενδοκρινής ρύθμιση της αναπαραγωγής

Η αδιατάρακτη έκφραση των λειτουργιών της αναπαραγωγής απαιτεί διαθεσιμότητα ενέργειας, ιδιαίτερα για τη διατήρηση της κυοφορίας, την κάλυψη

των ενεργειακών απαιτήσεων του αναπτυσσόμενου εμβρύου και την παραγωγή γάλακτος για τη διατροφή του νεογνού. Κατά τη μακράιωνη διάρκεια της εξέλιξης, έχουν αναπτυχθεί αμυντικοί μηχανισμοί που αποσκοπούν στην καταστολή των αναπαραγωγικών διαδικασιών σε περιόδους μειωμένης διαθεσιμότητας τροφής. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν αναπτυχθεί δίαυλοι επικοινωνίας μεταξύ περιφερικών ιστών ή ενεργειακών αποθηκών με τον κεντρικό ρυθμιστή του αναπαραγωγικού άξονα, δηλαδή τον υποθάλαμο (Roa et al. 2010).

Από σειρά πειραματισμών αλλά και κλινικών παρατηρήσεων, καθίσταται πλέον αναμφισβήτητο το γεγονός ότι καταστάσεις που συνδέονται με οξύ ενεργειακό έλλειμμα ή πλεόνασμα, διαταραχές μεταβολισμού, έντονη κατανάλωση ενέργειας, λόγω εξουθενωτικής άσκησης ή υψηλής γαλακτοπαραγωγής, οδηγούν σε διαταραχές της αναπαραγωγικής έκφρασης που εκδηλώνονται με υπογονιμότητα σε ενήλικα άτομα ή καθυστέρηση του χρόνου ενήβωσης σε νεαρά (Sartin et al. 1988, Schneider 2004, Leroy et al. 2008, Purcell and Moley 2011, Garcia-Garcia 2012).

Μεταξύ των μη κλασικών σημάτων της αναπαραγωγής συμπεριλαμβάνονται το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), η ανασταλτική ορμόνη της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών (GnIH), η λεπτίνη, οι μελανοκορτίνες, τα agouti-related πεπτίδια (AgRP) και η γκρελίνη. Στα επόμενα τμήματα του κεφαλαίου αυτού γίνεται σύντομη περιγραφή των μηχανισμών δράσης καθενός από τους προαναφερθέντες παράγοντες στην αναπαραγωγή, ενώ για την γκρελίνη, η οποία αποτελεί και το θέμα της παρούσας διατριβής, γίνεται ευρεία ανασκόπηση του ρόλου της στη ρύθμιση της αναπαραγωγής.

1.3. Νευροπεπτίδια και ρυθμιστικά μόρια

1.3.1. Λεπτίνη

Στα μέσα της δεκαετίας του 90, οι γνώσεις για τους ενδοκρινείς μηχανισμούς ελέγχου του σωματικού βάρους αυξήθηκαν κατακόρυφα. Προς αυτή την κατεύθυνση συνέβαλλε, κυρίως, η ανακάλυψη της λεπτίνης, μίας ορμόνης με

μοριακό βάρος 16.000 Da, η οποία προέρχεται από τα λευκά λιποκύτταρα (Friedman and Halaas 1998, Rosenbaum and Leibel 1998, Casanueva and Dieguez 1999, Ahima et al. 2000). Αρχικά, η λεπτίνη έγινε γνωστή από τη δράση της στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής, καθώς υψηλές συγκεντρώσεις καταστέλλουν την όρεξη (Foster and Nagatani 1999). Σήμερα, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη λεπτίνη εστιάζεται στην ικανότητα ρύθμισης της ενεργειακής ομοιοστασίας και της αναπαραγωγικής λειτουργίας (Clarke 1999, Williams et al. 2002). Την ταυτοποίηση της λεπτίνης, ακολούθησε η δημοσίευση πολλών επιστημονικών μελετών, με σκοπό τον προσδιορισμό της δομής, της ρυθμιστικής δράσης, των βιολογικών επιδράσεων, καθώς και των κύριων μηχανισμών δράσης της λεπτίνης στον μακροπρόθεσμο έλεγχο της πρόσληψης τροφής και της ενεργειακής ομοιοστασίας (Friedman and Halaas 1998, Rosenbaum and Leibel 1998, Casanueva and Dieguez 1999, Ahima et al. 2000, Wauters et al. 2000, Sahu 2004).

Χορήγηση λεπτίνης, κεντρικά ή περιφερικά, μειώνει την πρόσληψη τροφής και το σωματικό βάρος. Ανεπάρκεια λεπτίνης, οφειλόμενη σε μεταλλάξεις του γονιδίου που την κωδικοποιεί, είτε σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της, σχετίζεται με εμφάνιση παχυσαρκίας σε ανθρώπους και τρωκτικά (Friedman and Halaas 1998, O’Rahilly et al. 2003). Επιπλέον, η λεπτίνη αποκαθιστά μεταβολικά και ενδοκρινικά προβλήματα, τα οποία σχετίζονται με την παχυσαρκία σε ob/ob ποντίκια (παχύσαρκα διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία έχει προκληθεί μετάλλαξη στο γονίδιο της λεπτίνης) και αμβλύνει ανωμαλίες που προκαλούνται, λόγω της ασιτίας, στους άξονες των γονάδων, των επινεφριδίων και του θυρεοειδούς αδένου (Ahima et al. 1996, Friedman and Halaas 1998).

Η πλειονότητα των επιδράσεων της λεπτίνης στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής ασκούνται στον εγκέφαλο και, κυρίως, στον υποθάλαμο. Η λεπτίνη μεταφέρει το σήμα της θρεπτικής κατάστασης σε σημαντικά ρυθμιστικά κέντρα του υποθαλάμου, ο οποίος θεωρείται περιοχή ρύθμισης της ενεργειακής ομοιοστασίας (Campfield et al. 1995, Friedman and Halaas 1998, Kalra et al. 1999, Schwartz et al. 2000, Sahu 2003, Zigman and Elmquist 2003). Στον υποθάλαμο, η λεπτίνη επιδρά σε ορεξιογόνους νευρώνες, κυρίως, εκείνους που συνεκφράζουν το νευροπεπτίδιο Y και τα agouti-related πεπτίδια (νευρώνες NPY/AgRP), αλλά και σε μη-ορεξιογόνους

που συνεκφράζουν τις προ-οπιομελανοκορτίνες και το ρυθμιζόμενο από κοκαΐνη και αμφεταμίνη μετάγραφο (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) στους POMC/CART νευρώνες (Zigman and Elmquist 2003, Sahu 2004). Η ταυτοποίηση των νευρώνων παραγωγής ορεξιόγόνων και μη-ορεξιόγόνων πεπτιδίων, ως σημεία κατάληξης του σήματος της λεπτίνης, ώθησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι ο υποθάλαμος αποτελεί τον πρωταρχικό τόπο δράσης της λεπτίνης στη διαδικασία ρύθμισης του σωματικού βάρους. Οι νευρώνες-στόχοι της λεπτίνης, βρίσκονται, κυρίως, στον τοξοειδή πυρήνα, στον πλάγιο υποθάλαμο και στον παρακοιλιακό πυρήνα. Οι συγκεκριμένες περιοχές είναι ήδη γνωστές ως κύρια σημεία παραγωγής και ενσωμάτωσης νευρικών σημάτων που εμπλέκονται στην ενεργειακή ομοιοστασία. Από τους νευρώνες που είναι ευαίσθητοι στη δράση της λεπτίνης, οι NPY/AgRP και POMC/CART νευρώνες έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι NPY/AgRP νευρώνες είναι ορεξιόγονοι και διεγείρονται από τη λεπτίνη, ενώ αντιθέτως οι POMC/CART είναι μη-ορεξιόγονοι και η δραστηριότητά τους αναστέλλεται από τη λεπτίνη (Schwartz et al. 2000, Sahu 2003, Zigman and Elmquist 2003). Η δράση της λεπτίνης στους POMC νευρώνες, πιθανόν εμπλέκει τη μείωση της απελευθέρωσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος και των AgRP από τους NPY/AgRP νευρώνες (Cowley et al. 2001). Ένας πολύ σημαντικός ρόλος των νευρώνων POMC/CART είναι η προαγωγή των δράσεων της λεπτίνης. Το παραπάνω αποδεικνύεται, από το ότι οι νευρώνες POMC ανταποκρίνονται στις μεταβολές της γλυκόζης και εκφράζουν τα κανάλια K^+ -ATP και επιπλέον, η λεπτίνη ενεργοποιεί τα κανάλια K^+ -ATP στους συγκεκριμένους νευρώνες (Ibrahim et al. 2003). Τα προαναφερθέντα ορεξιόγονα και μη-ορεξιόγονα μονοπάτια, υπόκεινται σε ρύθμιση και από έναν αριθμό ρυθμιστικών παραγόντων της πρόσληψης τροφής και της ενεργειακής ισορροπίας, οι οποίοι δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά με τις δράσεις της λεπτίνης στην ενεργειακή ομοιοστασία (Zigman and Elmquist 2003). Θεωρείται ότι μέσω της λεπτίνης, ασκείται ένας βαθμός νευροενδοκρινούς ελέγχου της σύνδεσης διαφόρων βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της αναπαραγωγής, με την κατάσταση των ενεργειακών αποθεμάτων του οργανισμού (Tena-Sempere 2007). Σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν προκύψει ενδείξεις ότι η λεπτίνη αποτελεί έναν πιθανό διεγέρτη της κεντρικής έκκρισης της GnRH και των γοναδοτρόπων ορμονών (Yu et al. 1997, McCann et al. 1998), ενώ έχει αποδειχθεί και η άμεση επίδραση της

ορμόνης στην ωοθήκη, δρώντας ανασταλτικά στη διαδικασία της στεροειδογένεσης (Spicer 2001, Kendall et al. 2004,).

Στις αγελάδες η λεπτίνη εκκρίνεται κατά κύματα, ενώ σταδιακές ή απότομες αλλαγές στη διατροφή επηρεάζουν τη συγκέντρωσή της στη συστηματική κυκλοφορία (Ehrhardt et al. 2000). Επιπλέον, η παραγωγή λεπτίνης συνδέεται με τις συγκεντρώσεις της ινσουλίνης, καθώς η ινσουλίνη διεγείρει την έκκριση λεπτίνης και προάγει τη διαδικασία της λιπογένεσης (Poretsky et al. 1999). Σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων στα αρχικά στάδια της γαλακτοπαραγωγής προκαλεί υποδιπλασιασμό της συγκέντρωσης της λεπτίνης, ο οποίος συσχετίζεται θετικά με τις συγκεντρώσεις της ινσουλίνης και της γλυκόζης και αρνητικά με αυτές της αυξητικής ορμόνης και των NEFA (Block et al. 2001). Οι Amstalden και συνεργάτες (2000) βρήκαν ότι μικρής διάρκειας νηστεία (48 ώρες) σε μοσχίδες που βρίσκονταν στη μεταβατική περίοδο, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης που συμπίπτει τόσο με τη μείωση της συγκέντρωσης ινσουλίνης και IGF-I στην κυκλοφορία του αίματος, όσο και με τη μείωση της συχνότητας των επεισοδιακών εκκρίσεων της LH. Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι η λεπτίνη αποτελεί έναν ισχυρό συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην ενεργειακή ισορροπία και στην αναπαραγωγική λειτουργία.

1.3.2. Κισπεπτίνες

Η κισπεπτίνη ανακαλύφθηκε το 1996 ως αναστολέας της μετάστασης σε κυτταρικές γραμμές μελανώματος (Lee et al. 1996). Οι κισπεπτίνες αποτελούν μοριακά τμήματα -θραύσματα- πεπτιδίων με σημαντικές μορφολογικές ομοιότητες που όλα προέρχονται από το γονίδιο *KISS1/kiss1*. Όλα τα πεπτίδια της οικογένειας σχηματίζονται με διαφοροποιημένη πρωτεόλυση ενός κοινού πρόδρομου μορίου, της προ-προ-κισπεπτίνης. Ο υποδοχέας της κισπεπτίνης ανακαλύφθηκε 4 χρόνια αργότερα και αρχικά έγινε γνωστός με την ονομασία GPR54 (Gottsch et al. 2009).

Σε πολλά είδη, παρατηρείται παρακείμενη εντόπιση των νευρώνων της κισπεπτίνης με τους αντίστοιχους της GnRH (Rance et al. 1994, Clarkson and Herbison 2006) και έκφραση του υποδοχέα της κισπεπτίνης από τους τελευταίους (de Tassigny et al.

2008, Herbison et al. 2010). Οι νευρώνες κισπεπτίνης προβάλλουν στο κυτταρικό σώμα των νευρώνων GnRH στην προοπτική περιοχή και στο μέσο έπαρμα, πολύ κοντά στις νευρικές απολήξεις των νευρώνων GnRH (Gottsch et al. 2004, Clarkson and Herbison 2006, Uenoyama et al. 2011). Φαίνεται ότι η κισπεπτίνη διεγείρει τους νευρώνες GnRH, ώστε να απελευθερώσουν GnRH στην υποθάλαμο-υποφυσιαία πυλαία κυκλοφορία, προκαλώντας στη συνέχεια την απελευθέρωση των γοναδοτρόπων ορμονών από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (Messenger et al. 2005). Από πειράματα σε ζώα και από μελέτες στον άνθρωπο, αποδείχθηκε ότι τόσο η κεντρική, όσο και η περιφερική χορήγηση κισπεπτίνης οδηγεί σε αύξηση των συγκεντρώσεων της LH (Gottsch et al. 2004, Thompson et al. 2004, Dhillon et al. 2005, 2007). Όμως, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, η διεγερτική δράση της κισπεπτίνης στους νευρώνες της GnRH (Irwig et al. 2004, Liu et al. 2008, Novaira et al. 2009), αναστέλλεται ύστερα από τη χορήγηση ακυλίνης, η οποία αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα της GnRH (Shahab et al. 2005). Από πρόσφατους πειραματισμούς διαφαίνεται ότι η δράση της κισπεπτίνης στην έκκριση της GnRH απαιτεί την παρουσία οιστρογόνων, εφόσον η ωοθηκεκτομή σε ένηβους πιθήκους αναστέλλει την απελευθέρωση GnRH που προκαλείται από την κισπεπτίνη, ενώ η αναπλήρωση των συγκεντρώσεων οιστρογόνων την επαναφέρει εν μέρει (Guerriero et al. 2012).

1.3.3. Νευροπεπτίδιο Υ

Το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), ένας νευροδιαβιβαστής αποτελούμενος από 36 αμινοξέα, είναι το ισχυρότερο εν δυνάμει ορεξιογόνο πεπτίδιο (Clarke 1999). Το πεπτίδιο έχει διττή λειτουργία, καθώς πέρα από τη ρύθμιση της όρεξης εμπλέκεται και σε λειτουργίες της αναπαραγωγής, κυρίως, καταστέλλοντας την έκκριση της LH (McDonald et al. 1989, Barker-Gibb et al. 1995, Houseknecht et al. 1998, Clarke et al. 2005, Wójcik-Gładysz and Polkowska 2006).

Κατά τη διάρκεια ελλιπούς διατροφής, οι συγκεντρώσεις του NPY αυξάνονται σημαντικά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ, μετά από *icv* (intracerebroventricular) χορήγησή του μειώνεται η έκκριση της LH (Gazal et al. 1998). Η δράση του NPY στην έκκριση της LH επάγεται και από προηγούμενη δράση του στον υποθάλαμο, εφόσον

ισυν χορήγηση του NPY σε ωθηκεκτομημένες αγελάδες, στις οποίες είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί εμφυτεύματα οιστραδιόλης, κατέστειλε την έκκριση της LH και μείωσε το εύρος και τη συχνότητα των επεισοδιακών εκκρίσεων της GnRH. Φαίνεται συνεπώς ότι το NPY είναι ένας νευροδιαβιβαστής, ο οποίος ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις της διατροφής, της αναπαραγωγής και του μεταβολισμού (Diskin and Mackey 2003).

1.3.4. Μελανοκορτίνες

Το σύστημα της μελανοκορτίνης ή μελανοχρωστικοτρόπου ορμόνης αποτελείται από: 1) πεπτίδια μελανοκορτίνης και συγκεκριμένα τις α-, β- και γ- ορμόνες διέγερσης των μελανοκυττάρων (α-, β-, γ- Melanocyte Stimulating Hormone, MSH) και την επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη ή κορτικοτροπίνη (ACTH), 2) μία οικογένεια πέντε υποδοχέων μελανοκορτίνης και 3) ενδογενείς ανταγωνιστές μελανοκορτίνης, τις agouti και agouti-related πρωτεΐνες (AgRP). Επιπλέον, δύο επικουρικές πρωτεΐνες, οι mahogany και syndecan-3, έχει βρεθεί ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη δραστηριότητα των πεπτιδίων μελανοκορτίνης (Gantz and Fong 2003). Η κύρια πηγή μελανοκορτινών είναι η υπόφυση. Ωστόσο το γονίδιο της προ-οπιόμελανοκορτίνης (POMC) εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, όπως και σε έναν αριθμό περιφερικών ιστών, με κυρίαρχο το δέρμα. Αρχικά οι μελανοκορτίνες έγιναν γνωστές για τον ρόλο τους στην παραγωγή των στεροειδών των επινεφριδίων και στον χρωματισμό του δέρματος. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση άλλων νευροπεπτιδίων, οι μελανοκορτίνες συμμετέχουν και σε άλλες λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της πρόσληψης τροφής, η μνήμη, η συμπεριφορά, η φλεγμονώδης αντίδραση, ο έλεγχος εμπύρετων καταστάσεων, η αρτηριακή πίεση, η αντίληψη του πόνου, η ανάπτυξη και αναγέννηση των νεύρων και, τέλος, η επίδραση σε γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κοντά στον τοκετό (Schiöth and Watanobe 2002). *In situ* μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας MC3 εντοπίζεται, κατά κύριο λόγο, στον υποθάλαμο. Η έκφραση του mRNA του υποδοχέα MC3 είναι ιδιαίτερα υψηλή στον τοξοειδή πυρήνα, όπου εδράζεται ο κύριος πληθυσμός των POMC νευρώνων του εγκεφάλου (Gantz et al. 1993, Roselli-Rehfuss et al. 1993). Ο μεταβολικός ρόλος των

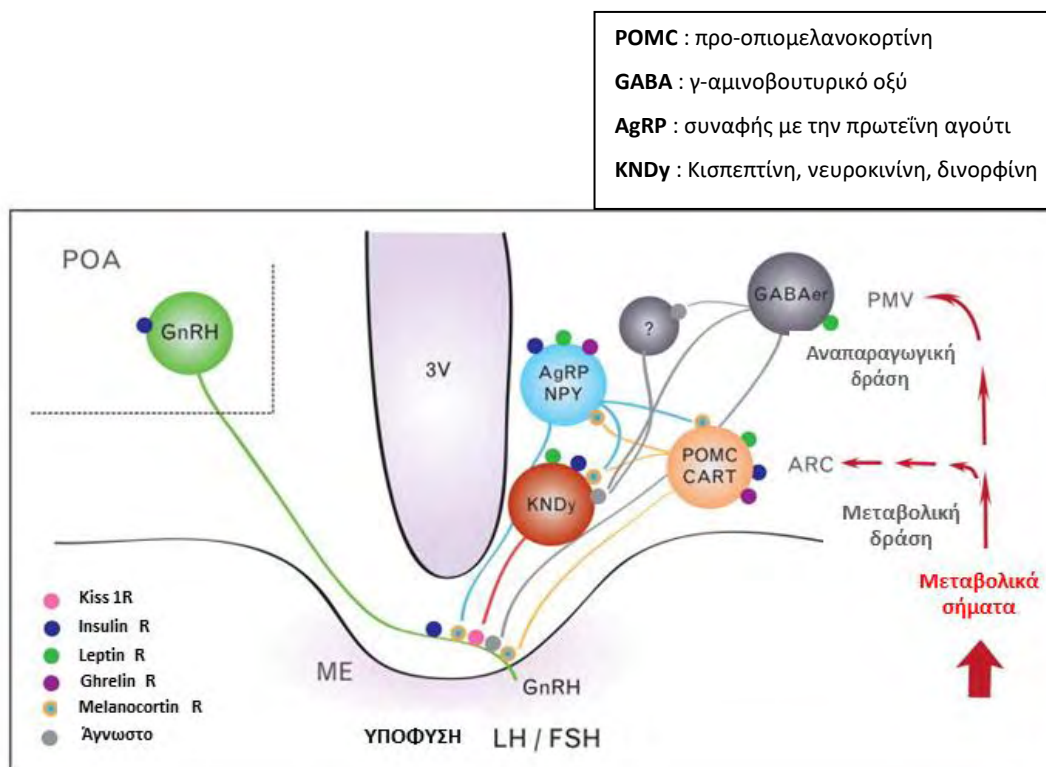
μελανοκορτινών αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ο αποκλεισμός του υποδοχέα MC3, σε θηλυκά ποντίκια, προκαλεί αύξηση του λιπώδους ιστού και μείωση του μυϊκού ιστού (Chen et al. 2000).

Επιπλέον, χορήγηση μη-εκλεκτικού ανταγωνιστή των υποδοχέων μελανοκορτινών προκαλεί αναστολή των δράσεων της λεπτίνης στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (Hruby et al. 1995, Schiöth et al. 1997, 1998). Η λεπτίνη παρεμβαίνει στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιοστασίας και της αναπαραγωγής, μέσω των νευρώνων του υποθαλάμου, οι οποίοι απελευθερώνουν το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), τα agouti-related πεπτίδια (AgRP), την προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC) κ.ά. (Israel and Chua 2010). Η υπερέκφραση των NPY και AgRP, σε συνδυασμό με τη μείωση του σήματος των μελανοκορτινών, αποτελούν θεμελιώδη χαρακτηριστικά της ανεπάρκειας του σήματος της λεπτίνης. Τα NPY και AgRP αναστέλλουν την έκκριση της LH (Catzeflis et al. 1993, Pierroz et al. 1996, Schiöth et al. 2001, Vulliamoz et al. 2005), με την υπερέκφρασή τους να θεωρείται βασικός μηχανισμός, ο οποίος οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα και συνδέεται άμεσα με την ανεπάρκεια του σήματος της λεπτίνης.

Οι μελανοκορτίνες διεγείρουν τη λειτουργία του αναπαραγωγικού άξονα σε πολλά είδη όπως ποντίκια, πρόβατα και ανθρώπους (Schiöth and Watanobe 2002). Μελέτες σε αδύνατα ωθηκεκτομημένα πρόβατα έδειξαν ότι οι αγωνιστές μελανοκορτίνης παρακάμπτουν τον υπογοναδισμό αυτών των ζώων, διεγείροντας την έκκριση της LH (Backholer et al. 2008). Ομοίως, κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης, όταν οι συγκεντρώσεις των γοναδοτρόπων ορμονών καταστέλλονται, λόγω της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της/των προγεστερόνης/οιστρογόνων, η χορήγηση μελανοκορτινών καταστέλλει τη συγκεκριμένη αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση (negative clamp) (Backholer et al. 2010). Δεδομένου, ότι τα κύτταρα POMC είναι σημαντικά για τη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας (McShane et al. 1993, Mizuno et al. 1998) και οι μελανοκορτίνες συνδέονται λειτουργικά με τη λεπτίνη, το σύστημα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα λειτουργικό τμήμα του μηχανισμού, μέσω του οποίου συνδέεται η ενεργειακή κατάσταση με την αναπαραγωγή.

1.3.5. *Agouti-related πεπτίδια*

Τα *Agouti-related* πεπτίδια (AgRP) αποτελούν ενδογενείς ανταγωνιστές των υποδοχέων μελανοκορτίνης (Ollmann et al. 1997). Ανήκουν στην κατηγορία των ορεξιογόνων νευροπεπτιδίων, τα οποία, όπως και το NPY, όταν χορηγούνται κεντρικά, αυξάνουν την πρόσληψη τροφής σε τρωκτικά και πιθήκους (Clark et al. 1984, Rossi et al. 1998, Larsen et al. 1999, Koegler et al. 2001). Τα AgRP και το NPY εντοπίζονται στους ίδιους νευρώνες του τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου (Hahn et al. 1998) και η έκφραση του mRNA τους αυξάνεται σε καταστάσεις ενεργειακής στέρησης, κατά τη διάρκεια των οποίων αμβλύνεται η λειτουργικότητα του άξονα της αναπαραγωγής (Hahn et al. 1998, Korner et al. 2001, Swart et al. 2001). Μελέτες σε ωθηκεκτομημένους πιθήκους απέδειξαν ότι η χορήγηση AgRP απευθείας στην τρίτη κοιλία, κατέστειλε σημαντικά τη συχνότητα των επεισοδιακών εκκρίσεων, όπως και τη μέση συγκέντρωση της LH (Vulliémoz et al. 2005). Η κεντρική δράση των ορεξιογόνων νευροπεπτιδίων AgRP και NPY εντοπίζεται στο σύστημα παραγωγής των επεισοδιακών εκκρίσεων της GnRH στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου, προτάθηκε δε ότι αμφότερα τα νευροπεπτίδια έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του αναπαραγωγικού άξονα των πρωτεύοντων, μέσω της ρύθμισης της GnRH (Kaynard et al. 1990, Vulliémoz et al. 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες σε τρωκτικά που προτείνουν πως μία κεντρική χορήγηση AgRP ασκεί ισχυρή επίδραση στην πρόσληψη τροφής (Hagan et al. 2000, Kim et al. 2002, Goto et al. 2003), ενώ αντιθέτως η *in* χορήγηση NPY, ακόμη και σε πολύ υψηλές δόσεις, έχει μικρή έως ουδέτερη επίδραση στην πρόσληψη τροφής, μετά το πέρας 24 ωρών (Flynn et al. 1999). Αυτές οι διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες των δύο ορεξιογόνων νευροπεπτιδίων πιθανόν να αποδίδονται στο ότι η δράση τους ασκείται, μέσω διαφορετικών μονοπατιών (Vulliémoz et al. 2005).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των νευρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταβολικών και αναπαραγωγικών λειτουργιών, με πιθανά σημεία δράσης της ΛΕΠΤΙΝΗΣ της ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ και της ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ, για τη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH. (Αμοιρίδης, ΕΚΕ, Μάρτιος 2017, με τροποποιήσεις)

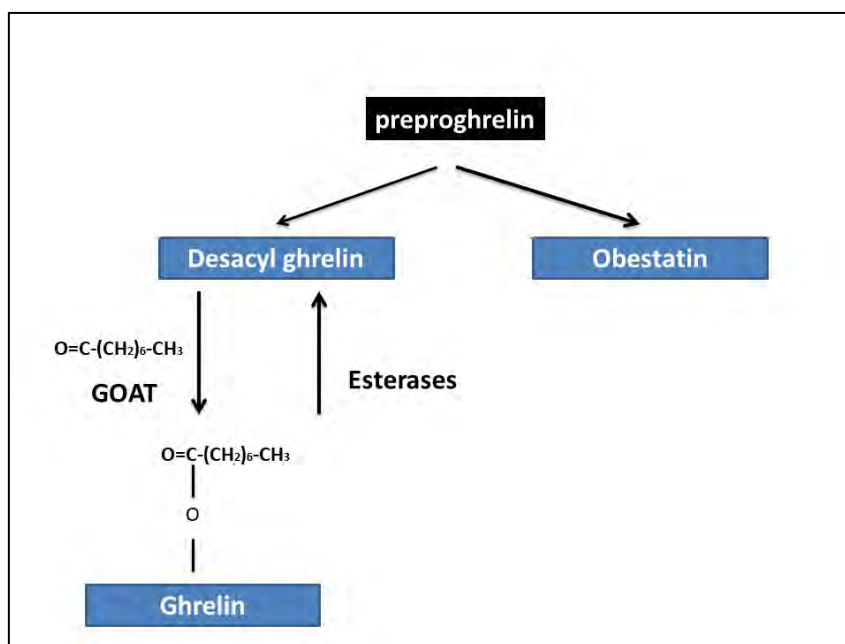
1.4. Γκρελίνη

1.4.1. Η ανακάλυψη της γκρελίνης

Το 1999, κατά τη διάρκεια μελέτης μικρών συνθετικών μορίων που λειτουργούν ως επαγωγείς της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Secretagogues, GHSs) από την υπόφυση, ανακαλύφθηκε από τους Kojima και συνεργάτες (1999) μία νέα πεπτιδική ορμόνη, η οποία παράγεται στον στόμαχο και ονομάστηκε γκρελίνη. Η δράση της γκρελίνης, όπως και των άλλων GHSs, ασκείται, μέσω ενός υποδοχέα που ανήκει στην ομάδα των G-συνδεδεμένων πρωτεϊνών (GHS-R), για τον οποίο, μέχρι εκείνη τη στιγμή, δεν είχε βρεθεί ο παράγοντας σύνδεσης. Αποδείχθηκε ότι η γκρελίνη, ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων, είναι ο ενδογενής παράγοντας σύνδεσης του υποδοχέα επαγωγής της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (Kojima et al. 1999).

Η γκρελίνη προέρχεται από μία μετά-μεταφραστική διαδικασία μίας πρόδρομης πρωτεΐνης 117 αμινοξέων (πρε-προ-γκρελίνη). Η πρε-προ-γκρελίνη μετατρέπεται σε προ-γκρελίνη που αποτελείται από 94 αμινοξέα, μετά από διάσπαση του μορίου της στη θέση 23. Η προ-γκρελίνη στη συνέχεια μετατρέπεται σε γκρελίνη με μία εκ νέου διάσπαση του μορίου στη θέση αργινίνη-28. Η μετατροπή αυτή συντελείται με τη βοήθεια του ενζύμου κονβερτάση των προ-ορμονών (PC) 1/3 (Date et al. 2000b). Η γκρελίνη τροποποιείται από μία ακυλική ομάδα στη θέση σερίνη-3. Η ακυλική ομάδα είναι μία οκτανοϊκή ομάδα, οκτώ, ή σε σπάνιες περιπτώσεις δέκα ατόμων άνθρακα (εικόνα 2).

Στην κυκλοφορία του αίματος η γκρελίνη συναντάται σε ακυλιωμένη (ΑΓ) και μη ακυλιωμένη μορφή (ΜΑΓ), το άθροισμα των οποίων αποτελεί την ολική γκρελίνη (Date et al. 2000b, Patterson et al. 2005). Το ένζυμο ή τα ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ακυλίωση της γκρελίνης, παραμένουν άγνωστα. Η πορκιουπίνη, ένα ένζυμο με δομικές ομοιότητες με τις MBOAT (Membrane Bound O-acyl Transferases), θεωρείται πλέον ως ο πιθανότερος παράγοντας για την οκτανοϊκή τροποποίηση στη θέση σερίνη-3 (ακυλίωση) (Tanaka et al. 2003, Takada et al. 2006, Gutierrez et al. 2008).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας μεταγραφικής παραγωγής της γκρελίνης.

1.4.2. Μη ακυλιωμένη γκρελίνη

Η ΜΑΓ, είναι η κύρια κυκλοφορούσα μορφή γκρελίνης (Hosoda et al. 2000). Υπολογίζεται ότι η συγκέντρωσή της στο πλάσμα του αίματος είναι 2,5 φορές υψηλότερη αυτής της ΑΓ (Broglia et al. 2004). Θεωρείται ότι η ΜΑΓ στερείται ικανότητας σύνδεσης με τον GHS-R1α, καθώς και πρόκλησης απελευθέρωσης της GH (Bednarek et al. 2000, Muccioli et al. 2001, Broglia et al. 2003a) και εξαιτίας αυτού, έως πρόσφατα, θεωρούνταν βιολογικά αδρανής. Υποστηρίχθηκε ότι η ΜΑΓ είναι είτε μία προ-τροποποιημένη μορφή της γκρελίνης, είτε ένα μόριο γκρελίνης, από το οποίο έχει απλώς αφαιρεθεί η οκτανοϊκή ομάδα (Date et al. 2000b). Εκτός από την αποδόμηση του μορίου στο ήπαρ και στους νεφρούς, η γκρελίνη από-ακυλιώνεται σε ΜΑΓ, από εστεράσες του αίματος και των ιστών, με κυριότερη την βουτυρυλ-χολινεστεράση (BuChE) (De Vriese et al. 2004). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ΜΑΓ είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της ΑΓ. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος του μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής της ολικής γκρελίνης, του αθροίσματος δηλαδή των ΑΓ και ΜΑΓ μορφών της (Tong et al. 2013).

Μελέτες αποδεικνύουν ότι η ΜΑΓ εμπλέκεται σε ποικίλες δραστηριότητες του συστήματος της γκρελίνης, ιδιαίτερα στον μεταβολισμό, δρώντας συχνά ανταγωνιστικά στη δράση της ΑΓ. Για παράδειγμα, σε ανθρώπους, η ΑΓ αυξάνει τις συγκεντρώσεις γλυκόζης και ινσουλίνης στην κυκλοφορία του αίματος (Broglia et al. 2004), ωστόσο η ταυτόχρονη χορήγηση ΑΓ και ΜΑΓ ανταγωνίζεται αυτή τη διαβητογόνο επίδραση της ΑΓ (Gauna et al. 2004). Πειραματισμοί σε ανθρώπους έχουν δείξει θετική συσχέτιση μεταξύ ευαισθησίας στην ινσουλίνη και ΜΑΓ (Barazzoni et al. 2007, Cederberg et al. 2012) και επιπλέον, θεραπεία με ΜΑΓ φαίνεται ότι βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Benso et al. 2012). Επιπλέον, ταυτόχρονη χορήγηση ΑΓ και ΜΑΓ, αναστέλλει την αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων που προκαλείται από την ακυλιωμένη γκρελίνη (Barazzoni et al. 2007), ενώ συνεχής χορήγηση ΜΑΓ μειώνει τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε φυσιολογικά άτομα (Benso et al. 2012). Στα τρωκτικά, η ΜΑΓ επιδρά άμεσα στην έκφραση γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν λιπογενετικά ένζυμα στον λιπώδη και σε άλλους ιστούς (Delhanty et al. 2010). Διαγονιδιακά ποντίκια, με υπερέκφραση της ΜΑΓ, εμφανίζουν μείωση της μάζας του λευκού λιπώδους ιστού, αύξηση του

σωματικού βάρους και βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Asakawa et al. 2005, Zhang et al. 2008a). Η πιθανή επίδραση της MAΓ στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων. Η MAΓ επιδρά στον μεταβολισμό των λιπιδίων, ρυθμίζοντας την ανοσολογική αντίδραση στην παχυσαρκία, καθώς και τη λειτουργία του φαιού λιπώδους ιστού (Lowell et al. 1993, Matthias et al. 2000, Wu et al. 2006, Lumeng and Saltiel 2011, Ravussin and Galgani 2011, Delhanty et al. 2013). Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι η MAΓ δεν είναι ένα αδρανές πεπτίδιο, αλλά πιθανότατα δρα, μέσω των υποδοχέων GHS που αναγνωρίζουν το μόριο της γκρελίνης, ανεξάρτητα από τη διενέργεια ή μη της ακυλίωσης.

1.4.3. Όργανα σύνθεσης της γκρελίνης

Μετά τη σύνθεσή της στον στόμαχο η γκρελίνη φθάνει, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου προάγει την έκκριση της GH (Kojima et al. 1999). Η γκρελίνη συντίθεται, επίσης, σε μικρό αριθμό νευρώνων του τοξοειδούς πυρήνα του υποθαλάμου και φτάνει, μέσω του υποφυσιαίου πυλαίου συστήματος, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (Guan et al. 1997).

Με βάση υπερδομικά και ανοσοϊστοχημικά κριτήρια, τα ECL (enterochromaffin-like) αποτελούν τον σημαντικότερο τύπο ενδοκρινικών κυττάρων της οξυντικής βλέννας. Άλλα κύτταρα της οξυντικής βλέννας είναι τα D, τα EC, τα X/A-like κύτταρα, τα D1 και τα P. Στη βλέννα του άντρου του στομάχου εντοπίζονται τα D, τα G και τα EC κύτταρα (Bordi et al. 2000). Τα X/A-like είναι τα περισσότερα πολυπληθή κύτταρα (Date et al. 2000b) και απαντώνται, κυρίως, στον οξυντικό αδένα και, σε μικρότερο αριθμό, στον πυλωρικό αδένα και στο λεπτό έντερο, ενώ έχουν ανιχνευθεί και στον στόμαχο, στο έντερο, στο πάγκρεας και στους πνεύμονες εμβρύων ανθρώπου (Date et al. 2000b, Rindi et al. 2002). Οι αντίστοιχες πληροφορίες για τα βοοειδή λείπουν, ωστόσο είναι γνωστό ότι η γκρελίνη παράγεται στο ήνυστρο και στη μεγάλη κοιλία (Hayashida et al. 2001).

1.4.4. Όργανα έκφρασης του GHSR-1α και εναλλακτικοί υποδοχείς της γκρελίνης

Οι δύο τύποι των υποδοχέων της γκρελίνης, οι οποίοι έχουν απομονωθεί, επάγονται από κοινό γονίδιο. Από αυτούς ο GHSR-1α θεωρείται ως ο σημαντικότερος, ενώ ο GHSR-1β είναι φαρμακολογικά αδρανής και αποτελείται από μικρότερο αριθμό αμινοξέων (Howard et al. 1996).

Δύο κυτταρικές περιοχές του εγκεφάλου σχετίζονται με την έκφραση του GHSR-1α. Η πρώτη περιοχή είναι η υπόφυση, όπου ο υποδοχέας εκφράζεται, κυρίως, στα σωματοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού και η δεύτερη περιοχή είναι ο υποθάλαμος, όπου η έκφραση του GHS-R1α λαμβάνει χώρα, κυρίως, στον τοξοειδή πυρήνα, μία περιοχή κρίσιμης σημασίας για την νευροενδοκρινή και ορεξιογόνο δράση της γκρελίνης (Tannenbaum et al. 1998, Willeesen et al. 1999, Korbonits et al. 2004, Van der Lely et al. 2004).

Παρά την έκφραση του GHS-R1α σε κεντρικούς νευροενδοκρινείς ιστούς, τα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα έχουν εντοπισθεί σε πλήθος περιφερικών ιστών που περιλαμβάνουν τον θυρεοειδή αδένα, το πάγκρεας, τον σπλήνα, το μυοκάρδιο, τα επινεφρίδια, τους όρχεις, τις ωοθήκες, τον στόμαχο, καθώς και τα νευρικά κύτταρα του εντέρου (Gnanapavan et al. 2002, Dass et al. 2003, Gaytan et al. 2003, 2004, 2005, Kageyama et al. 2005). Αυτή ακριβώς η διάχυτη κατανομή του υποδοχέα σε περιφερικούς ιστούς, ενισχύει την άποψη ότι η γκρελίνη έχει πλειοτροπική δράση, πέραν της ρύθμισης της έκκρισης της GH και της ενεργειακής ομοιοστασίας. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονιστεί η ύπαρξη συμπληρωματικών υποτύπων GHS-R, οι οποίοι εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και εμφανίζονται να συμμετέχουν σε ορισμένες μη-ενδοκρινείς λειτουργίες της γκρελίνης. Τέτοιου είδους μη-ενδοκρινείς λειτουργίες είναι ο κυτταρικός θάνατος διαφόρων τύπων κυττάρων (Baldanzi et al. 2002), η σύνθεση και έκκριση της γκρελίνης από τα χονδροκύτταρα (Camino et al. 2005), τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, κ.ά. (Pettersson et al. 2002, Iglesias et al. 2004).

1.4.5. Βιολογικές δράσεις της γκρελίνης

1.4.5.α. Απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης

Η δράση της γκρελίνης στους GHS-R έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , διεγείροντας έτσι την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης (GH), με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* (Kojima et al. 1999, Peino et al. 2000, Takaya et al. 2000). Μετά από ενδοφλέβια ή *icv* έγχυση σε ποντίκια τόσο η υπό την καμπύλη περιοχή, όσο και η μέση μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της GH, είναι ανάλογες με την αύξηση που προκαλεί η χορήγηση της GHRH στο είδος αυτό (Kojima et al. 1999, Arvat et al. 2000, Date et al. 2000a, Peino et al. 2000, Takaya et al. 2000). Η μέγιστη συγκέντρωση της GH στο πλάσμα του αίματος παρατηρείται εντός 5-15 λεπτών από τη χορήγηση της γκρελίνης, ενώ στα επόμενα 60 λεπτά η GH επιστρέφει σε βασικές συγκεντρώσεις (Kojima et al. 1999). Ενδοφλέβια έγχυση υψηλών δόσεων γκρελίνης σε ανθρώπους, φάνηκε να προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της ACTH, της προλακτίνης και της κορτιζόλης (Takaya et al. 2000, Arvat et al. 2001).

1.4.5.β. Διέγερση της όρεξης

Οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, αυξάνονται σημαντικά πριν από κάθε γεύμα και μειώνονται στα βασικά επίπεδα κατά την πρώτη ώρα μετά από τη λήψη του γεύματος (Cummings et al. 2001, Tschöp et al. 2001), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η γκρελίνη αποτελεί ένα ισχυρό σήμα για την πρόσληψη τροφής (Kojima and Kangawa 2005). Με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικών τεχνικών, έχει αποδειχθεί η παρουσία της γκρελίνης σε νευρώνες του τοξοειδούς πυρήνα του υποθαλάμου μία περιοχή του εγκεφάλου, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη ρύθμιση της όρεξης (Kojima et al. 1999, Lu et al. 2002).

Επιπλέον, η γκρελίνη εκφράζεται σε νευρώνες του υποθαλάμου, άγνωστους μέχρι πρότινος, παρακείμενους της τρίτης κοιλίας του εγκεφάλου, ανάμεσα στον ραχιαίο, τον κοιλιακό, τον παρακοιλιακό (PVN) και τον τοξοειδή (ARC) πυρήνα του υποθαλάμου. Στον ARC, από τους νευρώνες που περιέχουν γκρελίνη ξεκινούν

φυγόκεντρες νευρικές ίνες τόσο προς τους νευρώνες που εκφράζουν τα NPY και AgRP, ώστε να διεγείρουν την απελευθέρωση αυτών των ορεξιογόνων πεπτιδίων, όσο και προς τους νευρώνες που εκφράζουν το μη-ορεξιογόνο πεπτίδιο POMC, ώστε να καταστείλουν την απελευθέρωσή του (Cowley et al. 2003, Leblanc 2010). Το νευρικό δίκτυο της γκρελίνης στον PVN είναι περισσότερο πολύπλοκο. Φυγόκεντρες νευρικές ίνες της γκρελίνης ξεκινούν προς τους νευρώνες του νευροπεπτιδίου Y που συμμετέχουν στην καταστολή της απελευθέρωσης του GABA, συντελώντας στη διέγερση των νευρώνων που εκφράζουν την απελευθερωτική ορμόνη της έκκρισης της κορτικοτροπίνης (CRH), με απώτερο σκοπό την απελευθέρωση της ACTH και της κορτιζόλης (Kojima and Kangawa 2005).

Ο ρυθμός, με τον οποίο η γκρελίνη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, είναι πολύ χαμηλός (Horvath et al. 2001, Banks et al. 2002). Η ακυλίωση της γκρελίνης, πέρα από το ότι είναι σημαντική για τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα, θεωρείται κρίσιμο σημείο στη διαδικασία προσπέλασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Muccioli et al. 2001, Broglio et al. 2003a). Γενικά, τα πεπτίδια που χορηγούνται περιφερικά δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έτσι, θα πρέπει να υποτεθεί ότι η περιφερική γκρελίνη θα πρέπει να ενεργοποιήσει τις κατάλληλες περιοχές του υποθαλάμου, μέσω ενός έμμεσου μονοπατιού. Ο εντοπισμός των υποδοχέων γκρελίνης σε προσαγωγούς νευρώνες γαγγλίων του πνευμονογαστρικού νεύρου ποντικών, ίσως αποτελεί ένδειξη ότι η μεταφορά του σήματος από τον στόμαχο στον εγκέφαλο γίνεται, μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου (Date et al. 2000a, Sakata et al. 2003, Zhang et al. 2004). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το ότι, η εκτομή του πνευμονογαστρικού νεύρου παρεμποδίζει την ικανότητα της γκρελίνης να διεγείρει την πρόσληψη τροφής και την απελευθέρωση GH (Date et al. 2000a, Andrews and Sanger 2002).

Η ορεξίνη είναι ένα ακόμη ορεξιογόνο νευροπεπτίδιο του υποθαλάμου που εμπλέκεται στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και στη σεξουαλική διέγερση (Sakurai et al. 1998, Chemelli et al. 1999). Έχει βρεθεί ότι ενώ η γκρελίνη διεγείρει τους νευρώνες της ορεξίνης, η γλυκόζη και η λεπτίνη τους καταστέλλουν (Yamanaka et al. 2003). Η ορεξιογόνος δράση της γκρελίνης μειώνεται σε ποντίκια με έλλειψη ορεξίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διατροφική συμπεριφορά ρυθμίζεται, εν

μέρει, από τη συνεργική δραστηριότητα γκρελίνης και ορεξίνης (Kojima and Kangawa 2005).

Η άμεση απόδειξη της ορεξιογόνου δράσης της γκρελίνης προκύπτει από την αυξημένη πρόσληψη τροφής που προκαλεί η *in* χορήγησή της (Tschöp et al. 2000, Kamegai et al. 2001, Nakazato et al. 2001, Shintani et al. 2001, Wren et al. 2001a). Έτσι, η γκρελίνη θεωρείται, πλέον, ως το πιο ισχυρό, μεταξύ όλων των ορεξιογόνων πεπτιδίων (Kojima and Kangawa 2005).

1.4.5.γ. Γαστρεντερικές λειτουργίες

Η γκρελίνη ασκεί προστατευτική δράση στον βλεννογόνο του στομάχου, σε συνδυασμό με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και ορισμένες προσταγλανδίνες (PGFs) που δρουν, μέσω της αύξησης της ροής του αίματος (Peeters 2005). Επίσης, προκαλεί αύξηση της έκκρισης του υδροχλωρικού οξέος του στομάχου, με ταυτόχρονη διέγερση της κινητικότητάς του (Masuda et al. 2000, Dornonville de la Cour et al. 2004). Η ταυτοποίηση παγκρεατικών κυττάρων που εκφράζουν τη γκρελίνη, όπως και ο ρόλος της γκρελίνης στην έκκριση της ινσουλίνης, παραμένουν αμφιλεγόμενα. Τα πειραματικά αποτελέσματα ορισμένων εργασιών δείχνουν διέγερση, ενώ άλλων καταστολή της έκκρισης της ινσουλίνης (Broglia et al. 2001, Adeghate and Ponery 2002, Date et al. 2002, Lee et al. 2002, Reimer et al. 2003). Τα αντικρουόμενα ευρήματα πιθανόν οφείλονται σε διαφορές στο είδος των πειραματόζων ή/και στον πειραματικό σχεδιασμό.

Οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης, όπως και της ινσουλίνης, επηρεάζονται από τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης του αίματος. Θεωρείται ότι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης που διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης, καταστέλλουν την έκκριση γκρελίνης. Οι Date και συνεργάτες (2002) έδειξαν ότι η γκρελίνη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης, υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (8,3 mM), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν την απελευθέρωση ινσουλίνης από κυτταροκαλλιέργειες (Date et al. 2002). Ομοίως, οι Kojima και Kangawa (2005) έδειξαν ότι όταν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης βρίσκονται στα βασικά επίπεδα (2,8

mM), η γκρελίνη δεν επιδρά στην απελευθέρωση της ινσουλίνης. Συνεπώς, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης αποτελούν καθοριστικό παράγοντα στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων της γκρελίνης με άλλους μεταβολικούς παράγοντες (Kojima and Kangawa 2005).

1.4.6. Οξειδωτικό στρες και ο ρόλος της γκρελίνης

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε μία σημαντική αύξηση στο βαθμό κατανόησης του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην αιτιολογία διαφόρων ασθενειών. Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), απομάκρυνσης των ROS και επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων μοριακών συμπλεγμάτων. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, παρατηρείται αύξηση της παραγωγής των ROS ή/και μείωση των επιπέδων ή/και της δραστικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών μορίων. Η ανεξέλεγκτη παραγωγή ελευθέρων ριζών συμμετέχει στην παθογένεση διαφόρων καταστάσεων, όπως είναι η αθηρωμάτωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, τα εγκεφαλικά επεισόδια, διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες, ορισμένες νεοπλασίες και η επιληψία (Fantone and Ward 1982, Oberley 1988, Plachta et al. 1992, Wu and Cederbaum 2003).

Σχετικά πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι η γκρελίνη εμπλέκεται σε νοσήματα, η εμφάνιση των οποίων συσχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (Tesauro et al. 2005). Η γκρελίνη ασκεί την *in vivo* αντιοξειδωτική της δράση, μέσω της αύξησης των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) (Nazoury et al. 2014). Έχει αποδειχθεί ότι η γκρελίνη μειώνει τον σχηματισμό ROS και αναστέλλει τόσο την παραγωγή υπεροξειδίων στα αγγεία, όσο και την εμφάνιση οξειδωτικού στρες σε υπερτασικά ποντίκια, λειτουργία που συμβάλλει καθοριστικά στη μείωση της αρτηριακής πίεσης σε αυτά (Kawczynska-Drozdz et al. 2006). Οι Xu και συνεργάτες (2008) παρατήρησαν, ότι σε κυτταροκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και σε *ex vivo* πειραματισμούς σε άθικτα αιμοφόρα αγγεία, η γκρελίνη ενεργοποιεί τη συνθετάση NO του ακέραιου ενδοθηλίου (eNOS). Η ενεργοποίηση της eNOS έχει ως αποτέλεσμα την άμεση δράση της γκρελίνης στα

τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO σε ανθρώπους και ζώα (Obay et al. 2007, Xu et al. 2008). Η γκρελίνη επιδρά, επίσης, στη ρύθμιση των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid Reactive Substances, TBARS), ενός δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως και στην παρεμπόδιση της μείωσης των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH), η οποία αποτελεί δείκτη εκτίμησης του βαθμού της οξειδωτικής βλάβης σε διάφορους ιστούς (Obay et al. 2008).

1.4.7. Η γκρελίνη ως ρυθμιστής της αναπαραγωγής

Η γκρελίνη ασκεί πλειοτροπική δράση σε πολλές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, με επιδράσεις που μπορεί να είναι μακροχρόνιες, ή να ρυθμίζουν λεπτές βραχυχρόνιες ισορροπίες και αλληλεπιδράσεις. Σε γενικές γραμμές, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, η δράση της γκρελίνης στις λειτουργίες της αναπαραγωγής έχει μάλλον κατασταλτικό ρόλο. Από πληθώρα μελετών έχει αποδειχθεί ο ρυθμιστικός ρόλος της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών. Αρχικά, πιστευόταν ότι η δράση της γκρελίνης αφορά μόνο τον υποθάλαμο, ρυθμίζοντας τη συχνότητα και το εύρος των επεισοδιακών εκκρίσεων της GnRH. Στη συνέχεια, με σειρά μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα είδη ζώων, έχει αποδειχθεί ότι τόσο η υπόφυση, όσο και οι γονάδες αποτελούν ιστούς-στόχους της ορμόνης.

1.4.7.α. Ο ρόλος της γκρελίνης στην ενήβωση

Χορήγηση γκρελίνης σε ποντίκια, στην περίοδο πριν από την ενήβωση, μετέβαλε το χρόνο ενήβωσης και στα δύο φύλα, στα μεν θηλυκά τροποποιώντας τα πρότυπα έκκρισης γοναδοτρόπων ορμονών και οιστρογόνων, στα δε αρσενικά μειώνοντας τις συγκεντρώσεις LH και τεστοστερόνης (Fernández-Fernández et al. 2005a). Σε αντίθεση με τη λεπτίνη, τα θηλυκά άτομα φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα σε σύγκριση με τα αρσενικά, στις επιδράσεις της γκρελίνης στην ενήβωση (Tena-Sempere 2007). Αξιοσημείωτο είναι ότι αμφότερες οι μορφές της γκρελίνης (ΑΓ και

ΜΑΓ), πέρα από τις παρόμοιες δράσεις στην έκκριση της LH, έχουν και ανάλογη δράση στο χρόνο εμφάνισης της ήβης, υποδεικνύοντας πιθανή ύπαρξη ενός, ανεξάρτητου από τον GHSR-1α, μηχανισμού στον άξονα των γοναδοτρόπων ορμονών (Martini et al. 2006).

1.4.7.β. Επίδραση στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών

Βραχυχρόνια ενδοφλέβια έγχυση γκρελίνης, τροποποιεί το πρότυπο των επεισοδιακών εκκρίσεων της GnRH, με αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας έκκρισης της LH (Furuta et al. 2001, Fernández-Fernández et al. 2004, Vulliémoz et al. 2004, Lanfranco et al. 2006, Tena-Sempere 2007).

Παρόμοια ισχυρά ανασταλτικό αποτέλεσμα στην έκκριση της LH, είχε και η *in* χορήγηση γκρελίνης σε νεαρά και ενήλικα αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, καθώς και σε θηλυκά που είχαν προηγουμένως υποστεί γοναδεκτομή, υποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός δράσης της γκρελίνης δεν εξαρτάται απόλυτα από τα στεροειδή των γονάδων (Fernández-Fernández et al. 2004, 2005a). Τα μονοπάτια, μέσω των οποίων η περιφερικά παραγόμενη γκρελίνη μπορεί να επηρεάζει τους κεντρικά εντοπισμένους νευρώνες της GnRH, δεν έχουν ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί (Vulliémoz et al. 2004). Πιθανολογείται ότι το NPY και οι AgPR μεσολαβούν στην εκδήλωση των ανασταλτικών επιδράσεων της γκρελίνης στο σύστημα παραγωγής των επεισοδιακών εκκρίσεων της GnRH, διότι οι υποδοχείς τους εντοπίζονται σε κοινούς νευρώνες του ARC πυρήνα (Hahn et al. 1998). Επίσης, η έκφραση του NPY, των AgPR και της γκρελίνης αυξάνεται μετά από τον περιορισμό της τροφής (Hahn et al. 1998), μία κατάσταση που προκαλεί μείωση της συχνότητας της έκκρισης της LH σε ανθρώπους και σε άλλα είδη (Sisk and Bronson 1986, Gualillo et al. 2002, Whisnant and Harrell 2002, Loucks and Thuma 2003).

Προσπαθώντας να αποκωδικοποιήσουν τους μηχανισμούς, μέσω των οποίων η γκρελίνη εμπλέκεται στην αναπαραγωγή, οι Fernández-Fernández και συνεργάτες (2004) απέδειξαν ότι η γκρελίνη είναι ρυθμιστής της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών σε άνηβα θηλυκά και αρσενικά ποντίκια, καθώς: α) προκαλεί μείωση τόσο

της βασικής, όσο και της μετά από ορχεκτομή, έκκρισης της LH *in vivo*, χωρίς να επηρεάζει την έκκριση της FSH, β) συντελεί στην *in vitro* διέγερση της έκκρισης και των δύο γοναδοτρόπων ορμονών και γ) ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο την *in vitro* επίδραση της GnRH στις γοναδοτρόπες ορμόνες, μειώνοντας την ανταπόκριση της LH και βελτιώνοντας αυτήν της FSH. Η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της LH *in vivo* μπορεί να εξηγηθεί με τη μειωμένη ανταπόκριση της υπόφυσης στην GnRH, κάτι που παρατηρήθηκε και σε *in vitro* πειραματισμούς. Σε αντίθεση με τα δεδομένα που προέκυψαν για την LH, κάποια από τα πειραματικά δεδομένα συγκλίνουν στο ότι η *in vivo* έκκριση της FSH είναι ανεξάρτητη από τη δράση της γκρελίνης, εφόσον στις μελέτες αυτές η κεντρική χορήγηση του πεπτιδίου δεν επέδρασε στην έκκριση της FSH σε πειραματόζωα και γυναίκες διαφόρων ηλικιών και αναπαραγωγικής φάσης (Takaya et al. 2000, Fernández-Fernández et al. 2004).

Η μελέτη της επίδρασης της γκρελίνης στον αναπαραγωγικό άξονα, όσον αφορά τα μηρυκαστικά, επικεντρώθηκε κατά κύριο λόγο στα πρόβατα. Αποδείχθηκε ότι η συνεχής επί τριημέρου χορήγηση πρόβειας γκρελίνης στην τρίτη κοιλία του εγκεφάλου προβάτων, επέδρασε στις συγκεντρώσεις LH στο πλάσμα του αίματος. Ομοίως, χορήγηση 1, 5 και 20 μg ανθρώπινης γκρελίνης προκάλεσαν σημαντική μείωση της έκκρισης LH (Iqbal et al. 2006). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τους Harisson και συνεργάτες (2008), όπως και από τους Kirszt και συνεργάτες (2017), μετά από *icv* χορήγηση γκρελίνης σε πρόβατα, κατά την περίοδο του έτους με μικρότερη διάρκεια ημέρας. Ταυτόχρονη χορήγηση GnRH και ανθρώπινης ακυλιωμένης γκρελίνης σε πρόβατα κατά την περιοριστική περίοδο (μετά από συγχρονισμό των ωοθηκικών κύκλων και 12-18 ώρες πριν την αναμενόμενη προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών), προκάλεσε μείωση του εύρους της έκκρισης της LH και της FSH, χωρίς επίδραση στις συγκεντρώσεις των οιστρογόνων (Donolou et al. 2013), υποδεικνύοντας άμεση επίδραση της γκρελίνης στην υπόφυση, χωρίς υποχρεωτική μεσολάβηση του υποθαλάμου, του οποίου η δράση είχε παρακαμφθεί από την εξωγενή GnRH. Σε αντίθεση με τα *in vivo* αποτελέσματα, η *in vitro* χορήγηση γκρελίνης, σε καλλιέργειες γοναδοτρόπων κυττάρων, προάγει την έκκριση τόσο της LH, όσο και

της FSH, με έναν άγνωστο και μάλλον ανεξήγητο μηχανισμό (Fernández-Fernández et al. 2004).

Παλαιότερα, υπήρχε η πεποίθηση ότι η παρουσία του υποδοχέα της γκρελίνης GHS-R δεν υφίσταται στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης και εικαζόταν ότι η γκρελίνη έχει την ιδιότητα να τροποποιεί τα σήματα που εμπλέκονται στον παρακρινή έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών από την υπόφυση. Το NO θεωρείται ένας πιθανός διαμεσολαβητής της επίδρασης της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, διότι διεγείρει την έκκριση των LH και FSH, μέσω ενός ασβέστιο-εξαρτώμενου και ταυτόχρονα μη-εξαρτώμενου από το σύστημα cGMP (cyclic guanosine monophosphate) μηχανισμού (Pinilla et al. 1998). Επιπλέον, η *in vitro* διεγερτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, απευθείας σε επίπεδο υπόφυσης, θα μπορούσε να εξηγηθεί, μέσω αλλαγών στην έκφραση τοπικά παραγόμενων πεπτιδίων, όπως η ακτιβίνη, η ανασταλίνη και η φολλιστατίνη (Meunier et al. 1988, Kogawa et al. 1991). Τελικά, η ανακάλυψη, με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας, των υποδοχέων του GHSR-1α σε υποφυσιακά κύτταρα (Miller et al. 2005), αποδεικνύει ότι η γκρελίνη συνδέεται απευθείας στην υπόφυση και ότι οι προηγούμενοι προταθέντες μηχανισμοί έχουν μάλλον δευτερεύοντα ή επικουρικό ρόλο.

Σήμερα, είναι αδιαμφισβήτητο ότι η γκρελίνη αποτελεί δυνητικό ρυθμιστή της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών, με δράση που δεν είναι γνωστό, αν είναι γενικευμένη ή απλώς ασκείται σε περιπτώσεις που συνδέονται με διαταραχές του μεταβολισμού. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η υφιστάμενη γνώση για το ρόλο της γκρελίνης στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών στα βοοειδή είναι πολύ περιορισμένη.

1.4.7.γ. Η γκρελίνη στην ωοθήκη

Η παρουσία του mRNA της γκρελίνης στην ωοθήκη του ανθρώπου επιβεβαιώθηκε από τους Gnanapavan και συνεργάτες (2002). Το πρότυπο έκκρισης της γκρελίνης στα ποντίκια, στους χοίρους και στον άνθρωπο δείχνει ότι το mRNA της γκρελίνης

έχει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στον πρόοιστρο και τα υψηλότερα κατά τη διάρκεια του δίοιστρου (Camínos et al. 2003) και ότι τα ανοσοαντιδρώντα κύτταρα εντοπίζονται, κατά κύριο λόγο, στο ωχρό σωματίο και στα κύτταρα του κοκκώδους υμένα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων (Zhang et al. 2008b).

Σε αντίθεση, η ορμόνη δεν φαίνεται να εκφράζεται στα ωάρια και στα σωματικά κύτταρα των ωοθυλακίων. Ο υποδοχέας εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα μικρά ωοθυλάκια και σε μικρότερο βαθμό σε ωοθυλάκια μεγαλύτερου μεγέθους. Επιπλέον, παρατηρήθηκε έκφραση του υποδοχέα στα κύτταρα της θεμελιακής ουσίας των ωοθυλακίων, με το πρότυπο έκφρασης να συνδέεται με την ωοθυλακική ανάπτυξη (Gaytan et al. 2003).

Η ταυτοποίηση της έκφρασης της γκρελίνης και του λειτουργικού της υποδοχέα στις γονάδες, ισχυροποίησε την πιθανότητα της άμεσης επίδρασης της ορμόνης στον έλεγχο της λειτουργίας αυτών (Tena-Sempere et al. 2002). Επιπλέον, η δυναμική της έκφρασης της γκρελίνης υποδεικνύει την ύπαρξη πιθανών αυτοκρινών/παρακρινών δράσεων στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας, των οποίων η φυσιολογική συσχέτιση δεν έχει ακόμη πλήρως αποκρυπτογραφηθεί.

1.4.7.δ. Επίδραση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων

Με την εργασία των Suzuki και συνεργατών (2010), προέκυψαν οι πρώτες ενδείξεις για την κατασταλτική επίδραση της γκρελίνης στη διαδικασία της Μείωσης, καθώς και στην κατανομή του κυτταροσκελετού στα ωάρια των θηλαστικών. Μετά από χορήγηση γκρελίνης σε καλλιέργειες ωαρίων χοίρων, διαπιστώθηκε μείωση της πυκνότητας κατανομής του κυτταροσκελετού τόσο υπό την παρουσία κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, όσο και χωρίς. Προτάθηκε ότι η γκρελίνη, μέσω της μείωσης της πυκνότητας του κυτταροσκελετού, πιθανότατα παρεμβαίνει στη δομική ακεραιότητα των μετέπειτα βλαστοκύστεων. Στη συνέχεια, οι Bai και συνεργάτες (2012) έδειξαν ότι η γκρελίνη επηρεάζει θετικά την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων προβάτων, ρυθμίζοντας τα μονοπάτια της ERK1/2 και της ριβοσωμικής κινάσης p90rsk που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ωαρίων, προάγοντας

τα συνολικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK1/2. Η συγκεκριμένη κινάση, έχει φανεί ότι είναι ιδιαίτερα ενεργή στον κυτταροσκελετό των ωαρίων, αλλά και κατά τη διάρκεια διαφόρων διεργασιών, όπως η GVBD, η συμπύκνωση της χρωματίνης και η αναστολή της ωρίμανσης κατά το στάδιο της MII. Επιπλέον, η έκφραση της ERK1/2 στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένης τόσο της φωσφορυλιωμένης, όσο και της μη-φωσφορυλιωμένης μορφής της, έχει αποδειχθεί ότι παραμένει σε σταθερά επίπεδα (Yamashita et al. 2009). Η φωσφορυλιωμένη μορφή, συνήθως, συναντάται ελάχιστα πριν ή ελάχιστα μετά την GVBD, ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή της παρατηρείται στο στάδιο της MII. Στους χοίρους και στις αγελάδες η διαδικασία της φωσφορυλίωσης λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της GVBD (Inoue et al. 1995, Fissore et al. 1996), ενώ στα πρόβατα και στα ποντίκια ξεκινάει μετά το τέλος του συγκεκριμένου σταδίου (Verlhac et al. 1994, Bai et al. 2012).

Προσθήκη γκρελίνης στο υπόστρωμα της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών (5 mg ml^{-1}) προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης των ERK1 και ERK2 (Popelkova et al. 2006). Οι Dashtizad και συνεργάτες (2011), σε παρόμοια μελέτη, αλλά με πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις γκρελίνης ($5 \text{ και } 50 \text{ ng ml}^{-1}$), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γκρελίνη αυξάνει το ποσοστό των ωαρίων που φτάνουν στο στάδιο της MII και ταυτόχρονα βελτιώνει αισθητά το ποσοστό της ωρίμανσης των πυρήνων τους. Το γεγονός πιθανολογείται ότι οφείλεται στη θετική ρύθμιση (upregulation) των ισόμορφων της MAPK.

Δύο ισόμορφα της MAPK, η ERK1 και ERK2 εκφράζονται ευρέως στα ωάρια των θηλαστικών (Ohashi et al. 2003). Έρευνες της τελευταίας δεκαετίας αποκάλυψαν ότι το βιοχημικό μονοπάτι της MAPK διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της Μείωσης. Μετά την GVBD, η MAPK εμπλέκεται στη ρύθμιση της διάταξης των μικροσωληναρίων και των μειωτικών μικρονηματίων (Fan and Sun 2004). Η ενεργοποίηση της MAPK είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της αναστολής της ωρίμανσης στη MII, ενώ η απενεργοποίησή της είναι βασικό προαπαιτούμενο για τον σχηματισμό του προ-πυρήνα είτε μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου, είτε ύστερα από αυτόματη ενεργοποίηση της εν λόγω κινάσης. Μετά τη χορήγηση στα ωάρια mRNA MKP-1, μίας εξειδικευμένης κινάσης, η οποία έχει την ιδιότητα να

αναστέλλει την ενεργοποίηση της MAPK, παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση και διασπορά των μικρονηματίων (Gordo et al. 2001). Μελέτες σε ωάρια χοίρων από τους Sirotkin και συνεργάτες (2011), έδειξαν ότι η παρουσία της γκρελίνης στο υπόστρωμα ωρίμανσης αυξάνει τη συγκέντρωση της MAPK τόσο σε ώριμα, όσο και σε ανώριμα ωάρια, χωρίς ωστόσο να υπάρχει διαφορά στην αναλογία των ώριμων ωαρίων σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Dashtizad και συνεργατών (2011), οι Wang και συνεργάτες (2013) σε *in vitro* μελέτες που διεξήγαγαν σε ωάρια προβάτων, έδειξαν ότι η προσθήκη γκρελίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (50 ng ml^{-1}) στα υποστρώματα καλλιέργειας και ωρίμανσης, ενισχύει το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων, ενώ αντιθέτως η χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων, επιδρά αρνητικά στην επιβίωση των εμβρύων.

Σε σχετικά πρόσφατη έρευνα του Εργαστηρίου μελετήθηκε η συμμετοχή της γκρελίνης στη διαδικασία ωρίμανσης και στη μετέπειτα εξελικτική ικανότητα των παραγόμενων βλαστοκύστεων. Χρησιμοποιώντας 3 μικρές συγκεντρώσεις γκρελίνης ($200, 800$ και 2000 pg ml^{-1}), μόνο στο υπόστρωμα ωρίμανσης, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της απόδοσης σε βλαστοκύστες. Όμως, το ποσοστό εκκόλαψης των βλαστοκύστεων ήταν βελτιωμένο για τα έμβρυα, τα οποία προέκυψαν από ωάρια που εκτέθηκαν κατά την ωρίμανσή τους σε γκρελίνη. Το χαμηλό ποσοστό απόδοσης σε βλαστοκύστες αποδόθηκε σε γήρανση των ωαρίων, τα οποία ωρίμασαν υπό την παρουσία γκρελίνης. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την υπερέκφραση του γονιδίου που επάγει την κυκλίνη B (*CCNB1*) (Donolou et al. 2014b).

Σε δεύτερο πειραματισμό διαπιστώθηκε ότι η μείωση του χρόνου ωρίμανσης (από 24 σε 18 ώρες) υπό την παρουσία γκρελίνης, αποκαθιστά την απόδοση σε βλαστοκύστες και βελτιώνει την ποιότητα των εμβρύων, όπως αυτή αποτυπώνεται στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό (*GAPDH, LDHA, H6PD*), την οξειδωση (*GPX1, SOD2*), την αποπτωτική διαδικασία (*BAX*) και τη δυνατότητα εγκατάστασης του εμβρύου (*BREM1*) (Donolou et al. 2014a).

1.4.7.ε. Η γκρελίνη κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η γνώση σχετικά με τη δράση της γκρελίνης στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, ειδικά των βοοειδών, είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Ως χημικός μεταβιβαστής, η γκρελίνη, προάγει την ενδοκυτταρική επικοινωνία και πιθανόν εμπλέκεται στη διαδικασία μετάδοσης σημάτων. Το mRNA του μορίου της γκρελίνης, αλλά και του υποδοχέα της GHSR-1, έχουν ανιχνευθεί κατά το στάδιο του μοριδίου, καθώς και σε μεταγενέστερα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, σε συγκεντρώσεις που διαφέρουν αναλόγως του εξελικτικού σταδίου (Du et al. 2010). Με την ενσωμάτωση σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων γκρελίνης (5 ng ml^{-1}) στο υπόστρωμα καλλιέργειας εμβρύων χοίρου, επιτεύχθηκε βελτίωση της απόδοσης σε βλαστοκύστες, όμως ο δεκαπλασιασμός ή ο υποδεκαπλασιασμός της συγκέντρωσης δεν επηρέασε την απόδοση (Zhang et al. 2007), γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της γκρελίνης ασκείται σε περιορισμένο εύρος συγκεντρώσεων. Η τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων βοοειδών με τη συμμετοχή 800 pg ml^{-1} γκρελίνης μείωσε δραματικά (από 25,9% σε 8,8%) το ποσοστό βλαστοκύστεων την ημέρα 7 (Donolou et al. 2014b). Όταν, όμως το καλλιεργητικό υπόστρωμα αντικαθίστατο καθημερινά, η γκρελίνη δεν επέδρασε στην απόδοση βλαστοκύστεων, ενώ παράλληλα βελτίωσε την ποιότητα των εμβρύων. Το τελευταίο στηρίχθηκε στην μειωμένη επαγωγή έκφρασης του γονιδίου IGF2R, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για την εμφάνιση του συνδρόμου του υπερμεγέθους απογόνου (Large Offspring Syndrome, LOS), του DNMT3A που συνδέεται με βελτιωμένη ικανότητα ανάπτυξης/εξέλιξης του εμβρύου και με αυξημένη επαγωγή των γονιδίων G6PD, SOD2 και SLC2A1, τα οποία ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την αντιοξειδωτική προστασία και το στρες, αντίστοιχα (Donolou et al. 2014a).

Χωρίς να έχουν ακόμα αποσαφηνισθεί πλήρως οι συγκεντρώσεις, ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης της γκρελίνης στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου, φαίνεται ότι η γκρελίνη, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες/προϋποθέσεις, μπορεί να υποστηρίξει την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου, γεγονός που αντιτίθεται στη γενικευμένη πεποίθηση ότι το πεπτίδιο αυτό έχει αποκλειστικά και μόνο αρνητικό ρόλο στην αναπαραγωγή.

1.5. Σκοπός της διατριβής

Η παρούσα διατριβή εντάσσεται στα ερευνητικά ενδιαφέροντα της ομάδας της Μαιευτικής Κλινικής που από το 2008 ασχολείται με τη μελέτη της γκρελίνης στην αναπαραγωγή των μηρυκαστικών. Αποτελεί φυσική συνέχεια προηγούμενης διδακτορικής διατριβής και ερευνών που εστιάστηκαν στον ρόλο της γκρελίνης στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων βοοειδών και στη μελέτη της ενδοκρινολογίας του προβάτου.

Η διαλεύκανση του ρόλου και των πιθανών μηχανισμών δράσης των μεταβολικών ορμονών -σημάτων- στη διαδικασία της αναπαραγωγής συγκεντρώνει παγκόσμια έντονο ενδιαφέρον. Η γκρελίνη αποτελεί τον ενδογενή παράγοντα σύνδεσης του υποδοχέα τύπου 1α, των επαγωγών έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GHSR-1α) από την υπόφυση και ενέχει ρόλο πλειοτροπικού ρυθμιστή διαφόρων βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της ενεργειακής ομοιοστασίας και της αναπαραγωγής. Ο κύριος όγκος της επιστημονικής πληροφορίας, σχετικά με το ρόλο της γκρελίνης στην αναπαραγωγή, προέρχεται από πειράματα σε ποντίκια, ένα μικρότερο μέρος σε πρόβατα και χοίρους και από μελέτες σε ανθρώπους. Σε αντίθεση, τα δεδομένα που αφορούν τα βοοειδή είναι μάλλον περιορισμένα, αφήνοντας πολλά ερωτηματικά για το ρόλο της γκρελίνης στο συγκεκριμένο είδος.

Η γκρελίνη κατέχει σημαίνουσα θέση στον σωματοτρόπο άξονα, ρυθμίζοντας την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, ενώ παράλληλα έχει ρόλο ισχυρού μεταβολικού και ορεξιογόνου σήματος. Από την άλλη πλευρά, υπεισέρχεται στη ρύθμιση της αναπαραγωγής, δρώντας είτε κεντρικά στον εγκέφαλο, επιδρώντας στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, είτε περιφερικά στην ωθήκη-ωαγωγό επηρεάζοντας το ωάριο και το νεαρό έμβρυο.

Ο μεταβολισμός και η ενεργειακή επάρκεια αναγνωρίζονται σήμερα ως βασικοί, αν όχι οι βασικότεροι, καθοριστικοί παράγοντες για τη γονιμότητα των αγελάδων. Στο είδος αυτό, η υψηλή γαλακτοπαραγωγή, σε συνδυασμό με την εφαρμογή μεθόδων διαχείρισης που υπαγορεύονται, κυρίως, από οικονομικά κριτήρια, λειτουργεί απορρυθμιστικά τόσο για την ενδοκρινολογία της αναπαραγωγής, όσο και για τη γονιμότητα του θηλυκού γαμέτη και την ικανότητα εξέλιξης του πρώιμου εμβρύου.

Η βασική υπόθεση της έρευνας ήταν ότι η αυξημένη συγκέντρωση γκρελίνης είτε αυτή είναι φυσικά επαγόμενη μετά από μικρής διάρκειας νηστείας, είτε μετά από εξωγενή χορήγηση, διαταράσσει την κλασική ενδοκρινολογία της αναπαραγωγής και η διαταραχή αυτή διαφοροποιείται ανάλογα με: α) την ηλικία-φάση ανάπτυξης των ζώων, β) την κατάσταση της κυοφορίας και γ) το στάδιο του ωθητικού κύκλου.

Για τον σκοπό αυτό διενεργήθηκαν πειραματισμοί, οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικά στα αντίστοιχα κεφάλαια και αφορούν στη μελέτη:

α) της επαγόμενης υπεργκρελιναιμίας, μετά από χορήγηση εξωγενούς γκρελίνης, στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών και στη λειτουργικότητα του ωχρού σωματίου,

β) της συγκέντρωσης της γκρελίνης

1. σε αγελάδες και μοσχίδες κατά τη διάρκεια της κυοφορίας,
2. μετά από μικρής διάρκειας νηστεία σε έγκυες και μη έγκυες μοσχίδες,

γ) της συγκέντρωσης της γκρελίνης

1. κατά τη διάρκεια του οίστρου σε αγελάδες και μοσχίδες, καθώς και
2. του τρόπου και του χρόνου δράσης της επαγόμενης, από βραχεία νηστεία, υπεργκρελιναιμίας στη ρύθμιση της έκκρισης της LH και, τέλος

δ) των μηχανισμών δράσης της γκρελίνης στην *in vitro* ωρίμανση ωαρίων βοοειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Η γκρελίνη καταστέλλει, την επαγόμενη από την GnRH, προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών σε μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής

2.1. Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο, η γκρελίνη είναι ένας μεταβολικός παράγοντας με πολυεπίπεδη δράση και ταυτόχρονα ιδιαίτερα σημαντικός ρυθμιστής του νευροενδοκρινούς συστήματος και των λειτουργιών της αναπαραγωγής, στις οποίες περιλαμβάνονται η έναρξη της ήβης (Tena-Sempere 2007), η έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών (Fernández-Fernández et al. 2004, Lanfranco et al. 2008, Vulliémoz et al. 2008, Kluge et al. 2012, Donolou et al. 2013), η ωρίμανση των ωαρίων (Donolou et al. 2014b) και η ανάπτυξη του εμβρύου (Donolou et al. 2014a), κατέχοντας για τις λειτουργίες αυτές έναν ιδιαίτερα κατασταλτικό ρόλο (Veldhuis and Bowers 2010).

Μελέτες σε πρόβατα και τρωκτικά, έδειξαν ότι η *in* χορήγηση γκρελίνης καταστέλλει την έκκριση της LH (Iqbal et al. 2006, Harrison et al. 2008, Vulliémoz et al. 2008), πιθανότατα εξαιτίας, εν μέρει, της αναστολής της έκκρισης της GnRH. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι η γκρελίνη ασκεί, κυρίως, κεντρική επίδραση σε επίπεδο υποθαλάμου (García et al. 2007). Πρόσφατα αποδείχθηκε, επίσης, ότι η γκρελίνη μπορεί να καταστείλει την, επαγόμενη από την GnRH, έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών σε πρόβατα, στα οποία είχε προηγουμένως διενεργηθεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία (Donolou et al. 2013). Σε ανθρώπους, η χορήγηση γκρελίνης μετριάξει τις επεισοδιακές εκκρίσεις της LH και μειώνει τη βασική συγκέντρωση της LH και της FSH στο αίμα (Lanfranco et al. 2008, Kluge et al. 2009, 2012).

Το κεφάλαιο αυτό δημοσιεύθηκε ως πλήρες άρθρο στο περιοδικό: Theriogenology, 86(6): 1615-1621, 2016

Η άμεση επίδραση της γκρελίνης στην υπόφυση έχει αποδειχθεί και σε ποντίκια, μετά από αναστολή, της επαγόμενης από την GnRH, έκκριση της LH (Fernández-Fernández et al. 2005b). Η μειωμένη γονιμότητα είναι πιθανότατα το σημαντικότερο πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει ο τομέας της εκτροφής αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, το οποίο κατά κύριο λόγο αποδίδεται στην εμμονή για επίτευξη συνεχούς αύξησης της γαλακτοπαραγωγής (Berry et al. 2003). Όμως, η γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής είναι συνυφασμένη τόσο με τα διαθέσιμα ενεργειακά αποθέματα, όσο και με τις μεταβολικές αντιδράσεις σε σχέση με τη διατροφή. Επομένως η εμπλοκή σηματοδοτικών μορίων και ορμονών που ασκούν έλεγχο στον καταμερισμό της ενέργειας ή/και των θρεπτικών συστατικών και ταυτόχρονα εκφράζονται στον υποθάλαμο ή στην υπόφυση, θα πρέπει να εξεταστούν με πολύ προσοχή ως δυνητικοί ρυθμιστές της αναπαραγωγής. Από πλήθος ερευνητικών αναφορών, παρέχονται στοιχεία για το ρόλο της γκρελίνης, ως μόριο διέγερσης της πρόσληψης τροφής (Wertz-Lutz et al. 2007), προαγωγής της έκκρισης της ινσουλίνης (Takahashi et al. 2006, ThidarMyint et al. 2006) ή της αυξητικής ορμόνης (ThidarMyint et al. 2006, Bradford and Allen 2008, Fukumori et al. 2013) και καταστολής της οξείδωσης των λιπιδίων (Tschöp et al. 2000). Ωστόσο, από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, μέχρι στιγμής, δεν έχει ελεγχθεί ο ρόλος της συγκεκριμένης ορμόνης στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών στις αγελάδες. Συνεπώς, στόχος του κεφαλαίου αυτού ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της γκρελίνης: α) στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και β) στα χαρακτηριστικά του οίστρου που ακολούθησε την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις γκρελίνης σε μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

Όλες οι διαδικασίες που περιγράφονται εφεξής στην παρούσα διατριβή, βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τις αρχές και τις οδηγίες που ορίζονται από την Ε.Ε. και όλοι οι πειραματισμοί διενεργήθηκαν μετά από έγκριση από την αρμόδια Επιτροπή Δεοντολογίας Χρήσης Ζώων (ΕΔΕΧΖΩ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ζώα και πειραματισμοί

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οκτώ μοσχίδες της φυλής Holstein, ηλικίας 11 έως 11,5 μηνών, στις οποίες είχαν προηγουμένως καταγραφεί τουλάχιστον δύο έκδηλοι οίστροι. Το σωματικό βάρος των ζώων ανερχόταν σε $281 \pm 28,1$ kg (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). Ένα μήνα πριν από τον προγραμματισμένο πειραματισμό, τοποθετήθηκε ηλεκτρονικό περιλαίμιο μέτρησης και αυτόματης ανάλυσης των δεδομένων φυσικής δραστηριότητας (κινητικότητας) και μηρυκασμού (Heatime® Pro System, SCR, Israel) και τα ζώα μετακινήθηκαν σε ξεχωριστό χώρο, όπου δένονταν για τουλάχιστον 8 ώρες την ημέρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, στα ζώα παρέχόταν τροφή δύο φορές την ημέρα, υπό μορφή ολικού σιτηρεσίου, αποτελούμενου από ενσίρωμα αραβοσίτου, άχυρο σιταριού, καρπό αραβοσίτου, σογιάλευρο, πίτυρα σιταριού και ένα πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων, σύμφωνα με τα δεδομένα του NRC. Η παροχή νερού γινόταν κατά βούληση. Στη συνέχεια, τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες (ομάδα Ghr, n=4 και ομάδα C, n=4) και ακολούθησε συγχρονισμός των ωοθηκικών κύκλων, με τη χρήση ενδοκολπικών συσκευών απελευθέρωσης προγεστερόνης (Delta Prid, 1,5 gr προγεστερόνης, CEVA, Santé Animal, Libourne, France) που παρέμειναν στον κόλπο για 8 ημέρες. Μία ημέρα πριν από την αφαίρεσή τους, έγινε ενδομυϊκή έγχυση ωχρινολυτικής δόσης προσταγλανδίνης $F_{2\alpha}$ (600 μ g, cloprostenol, Estrumate Intervet-Schering Plough, Fryesoythe, Germany).

Την προηγούμενη του κυρίως πειραματισμού, η αριστερή σφαγίτιδα φλέβα καθετηριάστηκε και ο καθετήρας πληρώθηκε με ηπαρινισμένο φυσιολογικό ορό (200 IU ml⁻¹). Μετά την παρέλευση 30 ωρών από την αφαίρεση του PRID και 45 λεπτών από το πρωινό τάισμα, στα ζώα της ομάδας Ghr διενεργήθηκε ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης (Anaspec, Fermont, U.S.A.), σε δόση 1,5 μ g kg⁻¹ σωματικού βάρους, η οποία επαναλήφθηκε 15 λεπτά αργότερα, με ταυτόχρονη ενδομυϊκή έγχυση αναλόγου GnRH (0,25 μ g kg⁻¹ σωματικού βάρους, buserelin, Receptal-Merck, Boxmeer, the Netherlands), με στόχο την πρόκληση προ-ωοθυλακιωρρηκτικής έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών. Ακολούθως, διενεργήθηκαν δύο επιπλέον εγχύσεις γκρελίνης ανά 15 λεπτά το πρόγραμμα

εγχύσεων ολοκληρώθηκε σε διάστημα μίας ώρας. Τις ίδιες χρονικές στιγμές στα ζώα της ομάδας C χορηγήθηκε αντί της γκρελίνης φυσιολογικός ορός.

Η διαδικασία ανίχνευσης οίστρου διενεργήθηκε, μέσω συνδυασμού συλλογής δεδομένων από το πρόγραμμα αυτόματης ηλεκτρονικής καταγραφής της φυσικής δραστηριότητας και αξιολόγησης των ευρημάτων της κλινικής παρατήρησης, διαδικασία που γινόταν δύο φορές ημερησίως (πρωί και βράδυ). Ζώα, τα οποία παρουσίασαν κλινικές εκδηλώσεις οίστρου, όπως λείξη άλλων ζώων, εξοίδηση της περιοχής του αιδοίου, απελευθέρωση τραχηλικής βλέννας και τελικώς αποδοχή της επίβασης, θεωρούνταν ότι βρίσκονταν σε οίστρο.

Δειγματοληψίες

Συνολικά από κάθε ζώο συλλέχθηκαν 13 ζεύγη δειγμάτων αίματος, σε φιαλίδια με και χωρίς αντιπηκτική ουσία. Το πρώτο δείγμα λήφθηκε πριν την αρχική έγχυση γκρελίνης (ομάδα Ghr) ή φυσιολογικού ορού (ομάδα C). Σε σχέση με τις εγχύσεις GnRH, τα δείγματα συλλέχθηκαν 15 λεπτά πριν την πρώτη, ταυτόχρονα, καθώς και 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180 και 240 λεπτά μετά την έγχυση. Τα φιαλίδια με την αντιπηκτική ουσία EDTA τοποθετήθηκαν σε θρυμματισμένο πάγο. Το πλάσμα διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση ($1900 \times g$, 8 λεπτά) μέσα σε διάστημα 20 λεπτών από τη συλλογή και αποθηκεύθηκε στους -20°C , έως τη στιγμή διενέργειας των εργαστηριακών δοκιμών. Τα δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν σε φιαλίδια, χωρίς αντιπηκτικό, αφέθηκαν στους 4°C , έως ότου σχηματιστεί θρόμβος και ο διαχωρισμός του ορού, έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Την ημέρα της εκδήλωσης του οίστρου, καθώς και κάθε δεύτερη ημέρα για τις επόμενες 28 ημέρες, γινόταν συλλογή δειγμάτων αίματος (συνολικά 15 δείγματα αίματος) από την κοκκυγική φλέβα κάθε ζώου, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης.

Εργαστηριακές αναλύσεις

Οι αναλύσεις όλων των δειγμάτων έγιναν σε ζεύγη του ιδίου δείγματος· αν η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ενός ζεύγους ήταν μεγαλύτερη της τάξεως του 5%, τα συγκεκριμένα δείγματα επανεξετάζονταν.

Οι συγκεντρώσεις των LH, FSH και GH στον ορό του αίματος προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο εμπορικά διαθέσιμο διαγνωστικό κιτ, με τη μέθοδο της ELISA (Abnova, Taipei, Taiwan). Σε όλες τις αναλύσεις, η απορρόφηση (οπτική πυκνότητα) μετρήθηκε στα 450 nm, με τη χρήση ενός ειδικού φασματοφωτομέτρου (MRC Scientific Instruments, Israel).

Οι συγκεντρώσεις της LH και της GH προσδιορίστηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ οι αντίστοιχες της FSH μετρήθηκαν, ύστερα από τροποποιήσεις, οι οποίες αφορούσαν τον διπλασιασμό του όγκου (200 μl αντί 100 μl) των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς των προς εξέταση δειγμάτων και αυτού του συζευγμένου ενζύμου (enzyme conjugate) και τον χρόνο επώασης (4 ώρες στους 39 °C στο σκοτάδι και υπό συνεχόμενη ήπια ανάδευση, αντί για 3 ώρες στους 37 °C).

Για τις LH και FSH, η ευαισθησία των δοκιμών ήταν 0,3 ng ml⁻¹ και 0,5 ng ml⁻¹, αντίστοιχα. Οι συντελεστές διακύμανσης μεταξύ των δοκιμών, αλλά και εντός της ίδιας δοκιμής δύο δειγμάτων ορού, τα οποία περιείχαν χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις της κάθε ορμόνης ήταν για την LH 6,4%, 8,9% και 8,8%, 9,7% και για την FSH 6,8%, 7,4% και 9,2%, 10,1%, αντίστοιχα. Η ευαισθησία για την GH ήταν 0,5 ng ml⁻¹ και οι διακυμάνσεις μεταξύ των δοκιμών, αλλά και στην ίδια δοκιμή, ήταν 5,9% και 7,7% για δύο δείγματα που περιείχαν χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση, αντίστοιχα.

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό του αίματος μετρήθηκαν με ELISA, χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο διαγνωστικό κιτ (NRG, Marburg, Germany). Η ευαισθησία της δοκιμής υπολογίστηκε στα 0,08 ng ml⁻¹ και οι διακυμάνσεις μεταξύ των δοκιμών, αλλά και στην ίδια δοκιμή, δύο δειγμάτων ορού τα οποία περιείχαν χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις, ήταν 5,4%, 6,8% και 5,6%, 9,7%, αντίστοιχα.

Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος μετρήθηκαν, με τη βοήθεια ενός διαγνωστικού τεστ (Diasource ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Belgium), με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA). Το συγκεκριμένο τεστ κατασκευάζεται για τον προσδιορισμό της ανθρώπινης γκρελίνης, ωστόσο το αντίσωμα εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με το μόριο της γκρελίνης των βοοειδών. Η ευαισθησία υπολογίστηκε στα 40 pg ml^{-1} και οι διακυμάνσεις μεταξύ των δοκιμών, αλλά και στην ίδια δοκιμή, ήταν 5,3% και 8,2%, αντίστοιχα. Για την επισήμανση του μορίου χρησιμοποιήθηκε το ισότοπο ιωδίου (^{125}I), με χρόνο ημίσειας ζωής ($T_{1/2}$) 60 ημέρες, 35,5 keV γ-ακτινοβολία και 27-32 keV Χ-ακτινοβολία. Ο προσδιορισμός της ισχύος της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας και ο εξ' αυτής υπολογισμός των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης έγινε σε αυτόματο μετρητή γ-ακτινοβολίας (γ-counter, Cobra II/5010; Packard, U.S.A.).

Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των ορμονών ακολουθούσαν κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov test). Η στατιστική ανάλυση, για συγκρίσεις τιμών εντός της ίδιας ομάδας, έγινε με τη μέθοδο της διακύμανσης επανειλημμένων τιμών μονής κατεύθυνσης (ANOVA), ενώ για συγκρίσεις τιμών μεταξύ διαφορετικών ομάδων, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Bonferroni post hoc testing και Student's t-test (independent). Η σύγκριση της διάρκειας του ωοθηκικού κύκλου, ανάμεσα στις δύο ομάδες, έγινε με τη βοήθεια του Student's t-test (independent). Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το NCSS 10 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, U.S.A.).

2.3. Αποτελέσματα

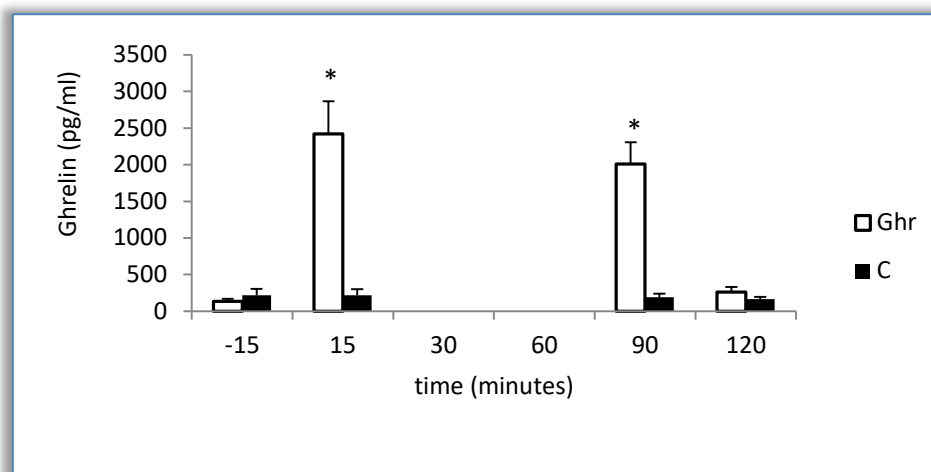
Συγκεντρώσεις γκρελίνης

Οι αλλαγές των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, μετά την έγχυση εξωγενούς βόειας γκρελίνης, εμφανίζονται στο διάγραμμα 1. Πριν από

την έγχυση της γκρελίνης δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (C: $133,3 \pm 68,8 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$ και Ghr: $216,7 \pm 87,2 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$, $p>0,05$). Δεκαπέντε λεπτά μετά από την πρώτη έγχυση της γκρελίνης, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ήταν σημαντικά υψηλότερες ($p<0,001$) στην ομάδα της γκρελίνης (Ghr: $2.421,2 \pm 446,6 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$) σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων (C: $218,0 \pm 83,8 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$). Αυτή η τάση συνεχίστηκε έως και 90 λεπτά από την τελευταία έγχυση της γκρελίνης· μετά από τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά, ανάμεσα στις δύο ομάδες (C: $261,3 \pm 70,8 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$ και Ghr: $166,3 \pm 29,1 \text{ pg ml}^{-1}$, $n=4$, $p>0,05$).

Διάγραμμα 1.

Συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, σε μοσχίδες, στις οποίες χορηγήθηκε γκρελίνη (Ghr, $n=4$) και σε μοσχίδες μάρτυρες (C, $n=4$). Στις μοσχίδες της ομάδας Ghr, έγινε ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης ($1,5 \text{ μg kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) σε τέσσερις χρονικές στιγμές (-15, 0, 15 και 30 λεπτά).



Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση με αστερίσκο δύο τιμών, σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p<0,001$).

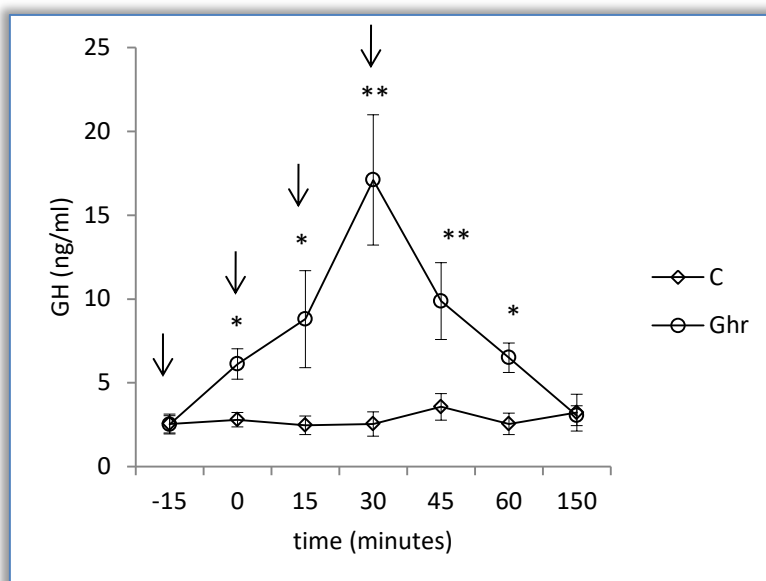
Συγκεντρώσεις αυξητικής ορμόνης

Οι συγκεντρώσεις της GH στον ορό του αίματος, μετά από την έγχυση της γκρελίνης, εμφανίζονται στο διάγραμμα 2. Στα ζώα της ομάδας Ghr, οι συγκεντρώσεις της GH αυξήθηκαν σημαντικά 15 λεπτά μετά από την πρώτη έγχυση της γκρελίνης (από

2,5±0,3 ng ml⁻¹ σε 6,1±0,4 ng ml⁻¹, $p<0,01$), ενώ η μέγιστη τιμή ανιχνεύθηκε κατά τη χρονική στιγμή της τέταρτης έγχυσης (17,1±1,9 ng ml⁻¹). Δεν διαπιστώθηκαν μεταβολές στον χρόνο μεταξύ των τιμών των δειγμάτων της ομάδας των μαρτύρων ($p>0,05$). Επιπλέον, σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν ανάμεσα στα ζώα των δύο ομάδων, έως και τη χρονική στιγμή 90 της δειγματοληψίας ($p<0,05$). Δύο ώρες μετά την τελευταία έγχυση της γκρελίνης (χρονικό σημείο 150), η συγκέντρωση της GH επέστρεψε στα βασικά επίπεδα.

Διάγραμμα 2.

Συγκεντρώσεις αυξητικής ορμόνης (GH) στον ορό του αίματος, σε μοσχίδες, στις οποίες χορηγήθηκε βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη (Ghr, n=4) και σε μοσχίδες μάρτυρες (C, n=4). Στις μοσχίδες της ομάδας Ghr, έγινε ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης (1,5 μg kg⁻¹ σωματικού βάρους) σε τέσσερις χρονικές στιγμές, ανά 15 λεπτά (σήμανση με βέλη).



Οι συγκεντρώσεις της GH παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση με αστερίσκο δύο τιμών, σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (** $p<0,001$ και * $p<0,05$).

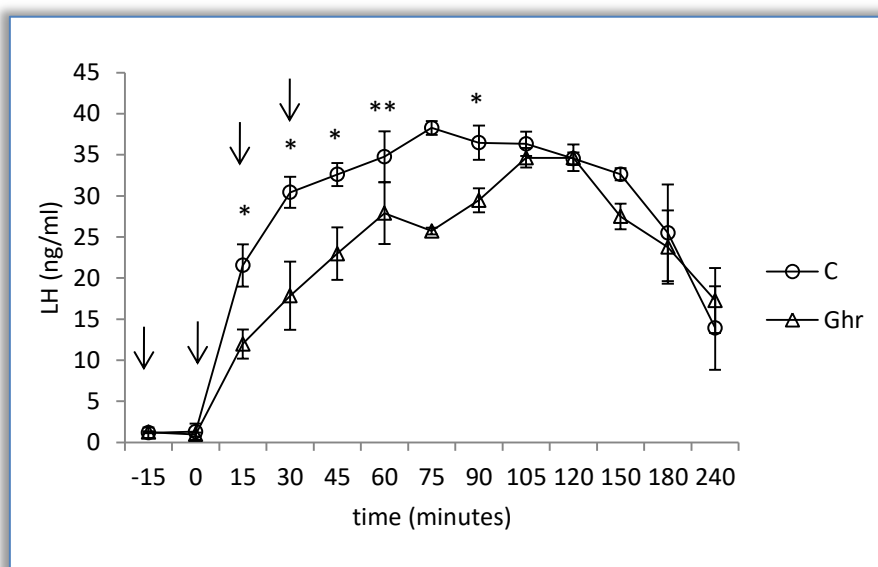
Συγκεντρώσεις ωχρινοποιητικής ορμόνης

Μετά από την έγχυση της γκρελίνης, καταγράφηκε σημαντική καταστολή της προ-ωοθυλακιορρηκτικής έκκρισης της LH στα ζώα της ομάδας Ghr σε σύγκριση με τα

ζώα της ομάδας C [εκφρασμένο ως η υπό την καμπύλη περιοχή (AUC): $266 \pm 10,3$ και $331,9 \pm 7,3$, για τις ομάδες Ghr και C, αντίστοιχα, $p=0,007$]. Τις χρονικές στιγμές που αντιστοιχούν σε 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτά μετά από την έγχυση της γκρελίνης η συγκέντρωση της LH ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα Ghr ($p<0,05$) σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας C (διάγραμμα 3).

Διάγραμμα 3.

Συγκεντρώσεις ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) στον ορό του αίματος, σε μοσχίδες, στις οποίες χορηγήθηκε βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη (Ghr, $n=4$) και σε μοσχίδες μάρτυρες (C, $n=4$). Στις μοσχίδες της ομάδας Ghr, έγινε ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης ($1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) σε τέσσερις χρονικές στιγμές, ανά 15 λεπτά (σήμανση με βέλη).



Οι συγκεντρώσεις της LH παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση με αστερίσκο δύο τιμών, σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (** $p<0,001$ και * $p<0,05$).

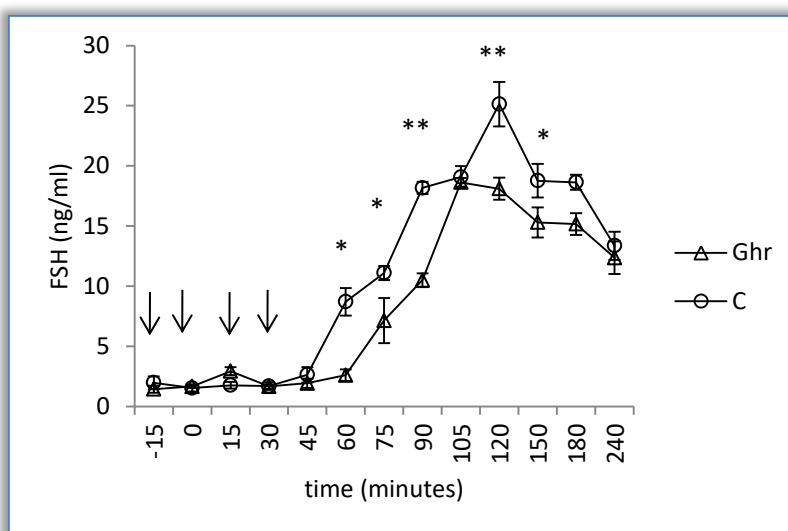
Συγκεντρώσεις ωοθυλακιotropου ορμόνης

Η υπό την καμπύλη περιοχή (AUC) για την FSH ήταν σημαντικά μειωμένη στα ζώα της ομάδας Ghr σε σύγκριση με την αντίστοιχη στα ζώα μάρτυρες ($102,3 \pm 2,0$ και $134,9 \pm 5,5$, για τις ομάδες Ghr και C, αντίστοιχα, $p<0,005$). Επιπλέον, 60, 75, 90, 120 και 150 λεπτά μετά από την έγχυση της γκρελίνης, η συγκέντρωση της FSH ήταν

σημαντικά χαμηλότερη στα ζώα της ομάδας Ghr ($p<0,05$) σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων (διάγραμμα 4).

Διάγραμμα 4.

Συγκεντρώσεις ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) στον ορό του αίματος, σε μοσχίδες, στις οποίες χορηγήθηκε βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη (Ghr, $n=4$) και σε μοσχίδες μάρτυρες (C, $n=4$). Στις μοσχίδες της ομάδας Ghr, έγινε ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης ($1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) σε τέσσερις χρονικές στιγμές, ανά 15 λεπτά (σήμανση με βέλη).



Οι συγκεντρώσεις της FSH παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση με αστερίσκο δύο τιμών, σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές (** $p<0,001$ και * $p<0,05$).

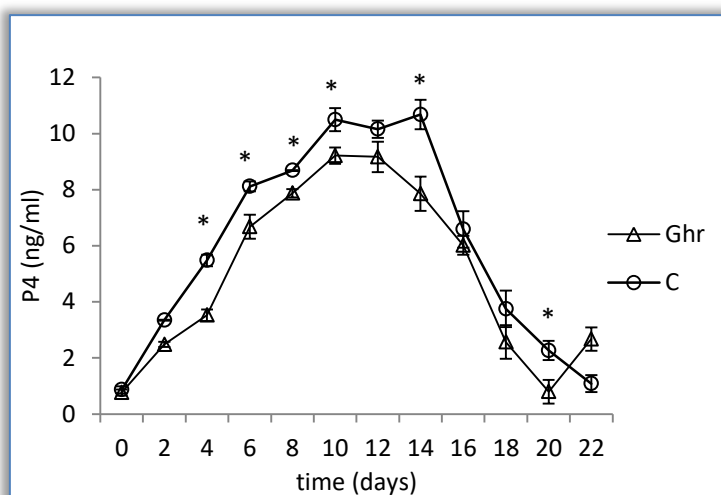
Διάρκεια ωοθηκικού κύκλου και συγκεντρώσεις προγεστερόνης

Τα ζώα της ομάδας Ghr εμφάνισαν συντομότερης ($p=0,005$) διάρκειας ωοθηκικό κύκλο ($19,0 \pm 0,4$ ημέρες) σε σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες ($21,7 \pm 0,5$ ημέρες). Η συγκέντρωση της προγεστερόνης διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p<0,05$). Η AUC για τη συγκέντρωση της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου, ο οποίος ακολούθησε τον πειραματισμό, ήταν $113,1 \pm 4,8$ και $141,1 \pm 4,8$ για τις ομάδες Ghr και C, αντίστοιχα ($p=0,007$). Οι ημερήσιες συγκεντρώσεις της προγεστερόνης έως και την 14^η ημέρα του ωοθηκικού κύκλου (εκτός από την τιμή της 12^{ης} ημέρας του κύκλου) ήταν συνεχώς υψηλότερες ($p<0,05$)

στα ζώα της ομάδας των μαρτύρων σε σύγκριση με τις αντίστοιχες της ομάδας Ghr (διάγραμμα 5). Η μέγιστη συγκέντρωση προγεστερόνης όλων των ζώων ανιχνεύθηκε την 10^η ημέρα του κύκλου και διέφερε σημαντικά ($p=0,04$) ανάμεσα στις δύο ομάδες ($9,2\pm0,6$ ng ml⁻¹ και $10,5\pm0,81$ ng ml⁻¹ για τις ομάδες Ghr και C, αντίστοιχα).

Διάγραμμα 5.

Συγκεντρώσεις προγεστερόνης (P₄) στον ορό του αίματος, σε μοσχίδες, στις οποίες χορηγήθηκε βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη (Ghr, n=4) και σε μοσχίδες μάρτυρες (C, n=4) κατά τη διάρκεια του ωθητικού κύκλου, ο οποίος ακολούθησε την ενδοφλέβια έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης ($1,5$ μg kg⁻¹ σωματικού βάρους).



Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση με αστερίσκο δύο τιμών, σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο, υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p<0,05$).

2.4. Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζονται, για πρώτη φορά, οι επιδράσεις της έγχυσης της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, καθώς και στην εκκριτική ικανότητα του ωχρού σωματίου του ωθητικού κύκλου, ο οποίος ακολούθησε την έγχυση της γκρελίνης σε μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής.

Στα ζώα της ομάδας Ghr, η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης αυξήθηκε πολύ σύντομα μετά την εξωγενή ενδοφλέβια έγχυση ομόλογης ακυλιωμένης γκρελίνης. Η χορηγούμενη δόση ($1,5$ μg kg⁻¹ σωματικού βάρους) είχε προηγουμένως βρεθεί ότι

προκαλεί έντονη αύξηση της έκκρισης της GH στις αγελάδες (Itoh et al. 2005, ThidarMyint et al. 2006). Η αυξημένη συγκέντρωση γκρελίνης στο αίμα διήρκησε για τουλάχιστον μία ώρα μετά από την τελική έγχυση. Η περίοδος αυτή είναι υψηλότερη από ότι είχε αναφερθεί σε προηγούμενη έρευνα, στην οποία, 15 λεπτά μετά την έγχυση, είχε παρατηρηθεί επιστροφή των συγκεντρώσεων της γκρελίνης στα βασικά επίπεδα (ThidarMyint et al. 2006). Η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανόν στην αυξημένη συχνότητα χορήγησης (τέσσερις χορηγήσεις συνολικά), καθώς και στη φύση της ακυλιωμένης γκρελίνης. Οι μετρήσεις που διενεργήθηκαν ήταν εξειδικευμένες στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης και συνεπώς, οι διαφορές στις τιμές, πριν και μετά την έγχυση, αποδίδονται αποκλειστικώς στη μέτρηση της ακυλιωμένης μορφής της ορμόνης που εγχύθηκε. Σε μία πρόσφατη μελέτη των φαρμακοκινητικών παραμέτρων όλων των μορφών γκρελίνης (ακυλιωμένης, μη-ακυλιωμένης και συνδυασμού αυτών) σε ανθρώπους, βρέθηκε ότι ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής της ακυλιωμένης μορφής είναι περίπου 9-11 λεπτά, ενώ εκείνος της μη-ακυλιωμένης είναι τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερος, αποδεικνύοντας τη σημαντική διαφορά στο ρυθμό μεταβολισμού ή/και απέκκρισης των δύο μορφών (Tong et al. 2013). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ακυλιωμένη γκρελίνη υπόκειται σε από-ακυλίωση από πολλά ένζυμα, ανάλογα με το είδος του οργανισμού π.χ. βουτυρυλοχολινεστεράση, ακετυλ-υδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και άλλες εστεράσες στους ανθρώπους ή καρβοξυλεστεράσες στα ποντίκια (De Vriese et al. 2004, 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, αποφασίστηκε η έγχυση τεσσάρων συνολικά δόσεων γκρελίνης, ώστε να επιτραπεί η παρατεταμένη έκθεση της υπόφυσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης του αίματος. Ωστόσο παραμένει ασαφές, αν οι επιδράσεις της έγχυσης γκρελίνης που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, προκλήθηκαν από την ακυλιωμένη μορφή της ορμόνης ή αν αντανακλούν μία συνδυασμένη επίδραση της ακυλιωμένης και της προϋπάρχουσας από-ακυλιωμένης μορφής.

Η γκρελίνη διεγείρει την έκκριση GH είτε ύστερα από σύνδεσή της στον εξειδικευμένο υποδοχέα (GHS-R1A), ο οποίος συναντάται στα σωματοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Kojima et al. 1999, Date et al. 2000a, Malagón et al. 2003),

είτε ύστερα από συνεργική δράση με την GHRH (Hataya et al. 2001, Osterstock et al. 2010). Ωστόσο, στη διεθνή βιβλιογραφία, καταγράφονται διαφωνίες επί της αποτελεσματικότητας της γκρελίνης στην πρόκληση έκκρισης GH. Για παράδειγμα, ο Itoh και οι συνεργάτες του (2005) ανέφεραν αυξημένη έκκριση GH σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, ως ανταπόκριση σε μία εφάπαξ μεγάλη δόση ενδοφλέβιας έγχυσης γκρελίνης ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους), με το βαθμό ανταπόκρισης να συσχετίζεται με την ηλικία και την κατάσταση της γαλακτοπαραγωγής των ζώων. Σε αίγες γαλακτοπαραγωγής, η ίδια δόση γκρελίνης είχε ουδέτερα αποτελέσματα και μόνον ο τριπλασιασμός της παραπάνω δόσης είχε εμφανή επίδραση στην έκκριση της GH (Hashizume et al. 2005). Οι Angram και συνεργάτες (2005), μετά από έρευνες σε ανθρώπους, απέτυχαν να αποδείξουν συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της γκρελίνης και στην έκκριση της GH, ενώ οι Muller και συνεργάτες (2002) έδειξαν ότι αλλαγές στις συγκεντρώσεις της γκρελίνης, κατά τη διάρκεια νηστείας, υγιών ανδρών φυσιολογικού βάρους, προκάλεσαν σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις της GH στο αίμα. Μετά τη χορήγηση γκρελίνης ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) σε υγιείς γυναίκες, οι συγκεντρώσεις της GH του αίματος ακολούθησαν ραγδαία αύξηση, φτάνοντας στις μέγιστες τιμές 30 λεπτά αργότερα (Messini et al. 2009). Επιπλέον, χορήγηση γκρελίνης ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) σε υγιή άτομα προκαλεί ισχυρή έκκριση GH, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλείται από την GHRH (Arvat et al. 2000). Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα που αφορούν, κυρίως, τις αντιδράσεις της GH στη χορήγηση της γκρελίνης, μπορούν να αποδοθούν σε πολλά αίτια, όπως οι διαφορετικές συνθήκες πειραματισμού, η φυσιολογική κατάσταση των ζώων ή των ανθρώπων που συμμετείχαν στους πειραματισμούς, καθώς και η προέλευση και η φύση της γκρελίνης που χρησιμοποιήθηκε. Σχετικά με το τελευταίο, έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια της γκρελίνης ανθρώπων, τρωκτικών ή μηρυκαστικών περιέχουν διαφορετική κατανομή αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal) (Dickin et al. 2004).

Τα αποτελέσματά μας, με βάση τη σύγκριση της AUC στις δύο ομάδες των ζώων, αποδεικνύουν ότι η έγχυση ομόλογης (βόειας) ακυλιωμένης γκρελίνης, σε δόση $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους, είναι ικανή να προκαλέσει αύξηση της έκκρισης της GH. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δημοσιευμένα

αποτελέσματα άλλων ερευνητών, σε ανθρώπους και ποντίκια (Arvat et al. 2000, Tolle et al. 2001, ThidarMyint et al. 2006). Η αυξητική ορμόνη έχει συσχετιστεί θετικά με τη γαλακτοπαραγωγή, το ρυθμό ανάπτυξης και τη σύνθεση του σφάγιου και επιπλέον μπορεί να θεωρηθεί ως σημαντικός δείκτης της αναπαραγωγής (Squires 2011). Συνεπώς, η τροποποίηση της έκκρισης της GH, μέσω του μονοπατιού της γκρελίνης, πιθανόν να αξιοποιηθεί ως μία εναλλακτική προσέγγιση για την αύξηση των αποδόσεων των ζώων, μετά από μελέτη και αξιολόγηση της μεθόδου και της συχνότητας παράθεσης τροφής ή/και της σύνθεσης του σιτηρεσίου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η βόεια ακυλιωμένη γκρελίνη έχει την ικανότητα να μετριάξει την επαγόμενη από την GnRH προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση της FSH και της LH στις αγελάδες. Σχετικά πρόσφατα, έρευνα του Εργαστηρίου έδειξε ότι η ανθρώπινη γκρελίνη καταστέλλει την έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών σε πρόβατα, στα οποία είχε προηγουμένως προκληθεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία (Donolou et al. 2013). Στον παραπάνω πειραματισμό είχε γίνει χορήγηση τετραπλάσιας δόσης ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους), από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα. Ο αριθμός των διαθέσιμων μελετών που αφορούν στην άμεση επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών από την υπόφυση, υστερεί κατά πολύ εκείνων που σχετίζονται με τις επιδράσεις της γκρελίνης στον υποθάλαμο. Η *in vivo* χορήγηση γκρελίνης σε τρωκτικά ή σε πρόβατα, προκαλεί σημαντική μείωση της έκκρισης της LH (Furuta et al. 2001, Iqbal et al. 2006, Harrison et al. 2008), υποδεικνύοντας ότι η γκρελίνη συγκαταλέγεται μεταξύ των δυνητικών ρυθμιστών της έκκρισης της GnRH (García et al. 2007). Ανοσοαντίδραση της γκρελίνης και του GHSR-1α έχει ανιχνευθεί στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης των μηρυκαστικών, με τον GHSR-1α να εμφανίζει κυτταροπλασματική και περιπυρηνική χρώση, σε κύτταρα της υπόφυσης που κατά πάσα πιθανότητα είναι γοναδοτρόπα (Miller et al. 2005). Ο ακριβής τρόπος δράσης της γκρελίνης στους νευρώνες του υποθαλάμου, αν και δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί, πιθανολογείται ότι πραγματοποιείται είτε απευθείας, είτε με συνεργική δράση του νευροπεπτιδίου Υ και της κισπεπτίνης, ώστε μέσω της CRH να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH (Vulliémoz et al. 2008, Forbes et al. 2009).

Η έκφραση του mRNA των Kiss1 και Kiss1r έχει αποδειχθεί στην υπόφυση πολλών ειδών, συμπεριλαμβανομένων και των βοοειδών (Amstalden et al. 2014). Επιπλέον, η ταυτόχρονη χορήγηση γκρελίνης και κισπεπτίνης, ενός πεπτιδίου που προάγει την έκκριση της LH, άμβλυσε την προκαλούμενη από την GnRH, έκκριση της LH (Bellingham et al. 2009). Στον παρόντα πειραματισμό, η έκκριση των LH και FSH που προκλήθηκε από την GnRH, βρέθηκε ότι ήταν μειωμένη στα ζώα, στα οποία έγινε έγχυση γκρελίνης. Ωστόσο, η επίδραση της έγχυσης της γκρελίνης στην έκκριση της LH ήταν περισσότερο εμφανής και διαπιστώθηκε σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με αυτήν στην έκκριση της FSH. Πειράματα σε ποντίκια, τα οποία είχαν υποστεί ωθηκεκτομή, έδειξαν ότι η γκρελίνη κατέστειλε την LH, χωρίς, όμως, να επιδράσει στην FSH (Fernández-Fernández et al. 2004). Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για την άμεση, αν και διαφοροποιημένη, επίδραση της γκρελίνης στα κύτταρα της υπόφυσης. Σε πειραματισμό με *in vitro* καλλιέργεια υποφυσιακών κυττάρων βρέθηκε ότι, καθ' όλη τη διάρκεια του ωθηκικού κύκλου, η γκρελίνη καταστέλλει την έκκριση της LH, αλλά το ίδιο αποτέλεσμα προκαλείται στην έκκριση της FSH μόνο από κύτταρα, τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του οίστρου (Fernández-Fernández et al. 2005b). Στον άνθρωπο, η έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών που προκαλείται από την GnRH, δεν επηρεάζεται από την έκθεση σε σταθερή έγχυση ακυλιωμένης γκρελίνης. Ωστόσο, η γκρελίνη φάνηκε να αναστέλλει την έκκριση της LH, ως αντίδραση στη ναλοξόνη, πιθανότατα, μέσω κεντρικής δράσης σε επίπεδο υποθαλάμου (Lanfranco et al. 2008). Σε αντίθεση, σειρά ενδοφλέβιων εγχύσεων μείωσε σημαντικά την έκκριση της LH (Kluge et al. 2012), επίδραση που δεν διαπιστώθηκε μετά από εφάπαξ χορήγηση μεγάλης δόσης της ορμόνης (Messini et al. 2009). Αυτές οι διαφορές μπορεί να σχετίζονται με διαφορές ανάμεσα στα είδη ή/και στον τρόπο χορήγησης. Οι γοναδοτρόπες ορμόνες συντίθενται στα κύτταρα της υπόφυσης (Currie and McNeilly 1995, Crawford and McNeilly 2002), αλλά ο τρόπος έκκρισης είναι αρκετά διαφορετικός, καθώς η έκκριση της LH ρυθμίζεται, σχεδόν αποκλειστικά, από τις επεισοδιακές εκκρίσεις της GnRH, ενώ η έκκριση της FSH απαιτεί συντονισμένη δράση των στεροειδών των γονάδων και των μικρών πεπτιδίων -ανασταλτίνη, ακτιβίνη, φολλιστατίνη- των ωοθυλακίων (Vale et al. 1987, Padmanabhan and McNeilly 2001). Επιπλέον, οι δύο γοναδοτρόπες ορμόνες έχουν διαφορετικό χρόνο ημίσειας ζωής, διαφορετικό τρόπο

ρύθμισης από τα στεροειδή ή την ανασταλίνη και επιπλέον διαφορετική ευαισθησία στην GnRH. Στις διαφορές αυτές αναφορικά με τις ιδιότητες και τους μηχανισμούς έκκρισης των δυο γοναδοτρόπων ορμονών, θα μπορούσε να αποδοθεί η παραλλακτικότητα που ανιχνεύθηκε στην έκκριση της LH και της FSH, ως ανταπόκριση στην έγχυση της γκρελίνης.

Στον ωθητικό κύκλο που ακολούθησε την έγχυση της γκρελίνης, στα ζώα της ομάδας Ghr, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης ήταν μικρότερες και η διάρκεια του ωθητικού κύκλου ήταν βραχύτερη σε σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η γκρελίνη επηρέασε τη διαδικασία ωχρινοποίησης των κυττάρων του ωθυλακίου ή/και τη στεροειδογενετική ικανότητα των ωχρινικών κυττάρων. Η έκφραση πλήρους λειτουργικότητας του υποδοχέα της γκρελίνης έχει αποδειχθεί στα ωθυλακικά και ωχρινικά κύτταρα πολλών ειδών (Rak-Mardyla 2013). Πειραματισμοί σε ωθήκες προβάτων απέδειξαν ότι η γκρελίνη εκφράζεται στα κύτταρα του κοκκώδους υμένα των ωθυλακίων όλων των σταδίων ανάπτυξης (αρχέγονων, πρωτογενών και δευτερογενών, με ή χωρίς την παρουσία άντρου) (Miller et al. 2005), καθώς, επίσης, και στα ωχρινικά κύτταρα (Furuta et al. 2001). Προσθήκη ανθρώπινης ακυλιωμένης γκρελίνης (10^{-11} με 10^{-7} mol l⁻¹) σε καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων που προέρχονται από γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας, προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης και των οιστρογόνων (Viani et al. 2008). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από πειραματισμούς σε κοκκώδη κύτταρα κουνελιών, ύστερα από προσθήκη γκρελίνης (Sirotkin et al. 2009), ενώ, *in vivo* πειραματισμοί σε ποντίκια έδειξαν ότι η *icv* χορήγηση της γκρελίνης στη δόση των 3 nmol, μειώνει τη συγκέντρωση οιστρογόνων και προγεστερόνης του αίματος, καθ' όλη τη διάρκεια του ωθητικού κύκλου (Fang et al. 2012).

Από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν άμεσα τη δράση της γκρελίνης στη διαδικασία της ωχρινοποίησης και της εκκριτικής ικανότητας του ωχρού σωματίου των βοοειδών. Προσπαθώντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας, αναφορικά με την περιορισμένη εκκριτική ικανότητα του ωχρού σωματίου και την περιορισμένη διάρκεια του ωθητικού κύκλου που καταγράφηκε στα ζώα, στα οποία εγχύθηκε γκρελίνη, πιθανολογούμε

ότι η άμβλυωση της προ-ωοθυλακιωρρηκτικής έκκρισης της LH, οδήγησε σε περιορισμένη ωχρινοποίηση των ρηχθέντων ωοθυλακίων. Το παραπάνω γεγονός εκδηλώθηκε με μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης στον επόμενο ωοθηκικό κύκλο, καθώς και με περιορισμένη διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου, το οποίο σε κάθε περίπτωση απέκτησε τα χαρακτηριστικά του ανεπαρκούς.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας υποδεικνύουν την ανάγκη διενέργειας περεταίρω πειραματισμών, με στόχο να διερευνηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί δράσης ενός εξόχου μεταβολικού παράγοντα, όπως η γκρελίνη, στη διαδικασία της ωοθυλακιωρρηξίας και της ωχρινοποίησης των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

Η επίδραση της κυοφορίας και της βραχείας διάρκειας νηστείας στη συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης και των μεταβολικών παραμέτρων σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής

3.1. Εισαγωγή

Κατά τα πρώιμα στάδια της γαλακτοπαραγωγής, οι αγελάδες εκδηλώνουν ραγδαία αύξηση της παραγωγής γάλακτος, κινητοποίηση των αποθηκών λίπους του σώματος, δραματικές αλλαγές στην έκκριση στεροειδών από τις ωοθήκες στην κυκλοφορία του αίματος, αυξημένη έκκριση της αυξητικής ορμόνης και μείωση του IGF-I και της λεπτίνης (Schams et al. 1991, Block et al. 2001, Liefers et al. 2003). Στις σύγχρονες και υψηλής παραγωγικότητας εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, η εγκατάσταση της κυοφορίας στα πρώιμα στάδια της γαλακτοπαραγωγής, αποτελεί προτεραιότητα υψίστης οικονομικής σημασίας. Ταυτόχρονα με τη γαλακτοπαραγωγή, η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών της κυοφορίας απαιτεί αυξημένη πρόσληψη ενέργειας από τη μητέρα, ώστε να υποστηριχθεί η ανάπτυξη του εμβρύου. Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα μεταβολικά σήματα, όπως η λεπτίνη, ο IGF-I και το NPY, μεταφέρουν πληροφορίες για την ενεργειακή ομοιοστασία και τη διαθεσιμότητα των ενεργειακών αποθεμάτων του σώματος σε κεντρικό και σε περιφερικό επίπεδο, μέσω των οποίων ρυθμίζονται οι λειτουργίες της αναπαραγωγής (Wathes et al. 2012, Butler 2014).

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, από μελέτες σε διάφορα είδη, αποδείχθηκε ότι η γκρελίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη γονιμότητα. Έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη ρύθμιση της έναρξης της ήβης (Tena-Sempere 2007), στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών (Lanfranco et al. 2008, Kluge et al. 2012,

Το κεφάλαιο αυτό δημοσιεύθηκε ως πλήρες άρθρο στο περιοδικό: Theriogenology, 106(1): 141-148, 2018

Donoιου et al. 2013), στην ωρίμανση των ωαρίων και στην ανάπτυξη του εμβρύου (Donoιου et al. 2014a, b). Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η γκρελίνη εκφράζεται στον πλακούντα ανθρώπων, προβάτων και ποντικών (Gualillo et al. 2001, Nakahara et al. 2006, Harrison et al. 2007). Παρά τη συσσωρευμένη γνώση γύρω από τις λειτουργικές ιδιότητες της συγκεκριμένης ορμόνης, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον τρόπο έκκρισης της γκρελίνης κατά τη διάρκεια της κυοφορίας. Στον χοίρο, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος κορυφώνονται την 30^η ημέρα της κυοφορίας και στη συνέχεια μειώνονται έως και το τελικό στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (Gononi et al. 2007). Στον άνθρωπο, οι μέγιστες συγκεντρώσεις της γκρελίνης παρατηρούνται κατά την 18^η εβδομάδα της κυοφορίας, ενώ οι ελάχιστες κατά το τελευταίο τρίμηνο (Fuglsang et al. 2005). Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης τη 10^η και 15^η ημέρα της κυοφορίας είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις σε μη-έγκυα, ωστόσο την 20^η ημέρα οι συγκεντρώσεις της ορμόνης ανεβαίνουν σε τιμές αντίστοιχες με αυτές των μη-έγκυων. Επιπλέον, ποντίκια που βρίσκονται στη φάση της γαλακτοπαραγωγής, εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γκρελίνης από άλλα, τα οποία είναι σε διαφορετική φάση, συμπεραίνοντας ότι σε διάφορα είδη ζώων το ερέθισμα του θηλασμού και όχι η προλακτίνη ή η ωκυτοκίνη αποτελεί τον πιθανότερο παράγοντα ελέγχου της έκκρισης της γκρελίνης κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής (Shibata et al. 2004). Από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, ο τρόπος έκκρισης της γκρελίνης σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής ή/και σε μοσχίδες δεν έχει αποτελέσει ακόμη αντικείμενο επιστημονικής έρευνας. Συνεπώς, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, αγελάδων γαλακτοπαραγωγής και μοσχίδων και η εξέταση τυχόν διαφορών στη διέγερση της έκκρισης της γκρελίνης, λόγω της νηστείας, ανάμεσα σε έγκυες και μη έγκυες αγελάδες.

3.2. Υλικά και μέθοδοι

Οι πειραματισμοί του παρόντος κεφαλαίου διεξήχθησαν σε εκτροφή αγελάδων γαλακτοπαραγωγής της κεντρικής Ελλάδας, ζωικού δυναμικού 250 αγελάδων φυλής

Holstein, με μέση ατομική παραγωγή 9.113 kg γάλακτος, ανά γαλακτική περίοδο. Τα ζώα εκτρέφονταν σε υπόστεγα ελεύθερου σταυλισμού, με ατομικές θέσεις ανάπαυσης και είχαν κατά βούληση παράθεση νερού. Τα ζώα ταΐζονταν με μίγμα ολικού σιτηρεσίου (TMR), αποτελούμενο από ενσίρωμα αραβόσιτου, άχυρο σιταριού και μίγμα συμπυκνωμένων τροφών, στις οποίες περιέχονταν καρπός αραβόσιτου, σόγια, πλακούντας ηλιόσπορου, πίτυρα σιταριού, καθώς και πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η σύνθεση του σιτηρεσίου, έγινε με βάση τα δεδομένα του NRC, ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες των ζώων, με βάση την ηλικία και το ύψος της γαλακτοπαραγωγής τους.

Πειραματισμός 1: Ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης καθ' όλη τη διάρκεια της κυοφορίας

Χρησιμοποιήθηκαν 5 μοσχίδες φυλής Holstein ηλικίας $15,3 \pm 0,3$ μηνών (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου), με δείκτη θρεπτικής κατάστασης $3,8 \pm 0,06$, και 5 αγελάδες της ίδιας φυλής, ηλικίας $42,1 \pm 1,6$ μηνών, με δείκτη θρεπτικής κατάστασης $3,4 \pm 0,07$ που διένυσαν τη δεύτερη γαλακτική περίοδο. Τις ημέρες 48 έως 50 μετά τον τοκετό, το γεννητικό σύστημα των αγελάδων εξεταζόταν με τη βοήθεια υπερηχογραφίας (Medison SV-2000, Seoul, Korea, κεφαλή linear, 7,5 MHz), ώστε να επιβεβαιωθεί η πλήρης και φυσιολογική παλινδρόμηση της μήτρας, καθώς και η επαναδραστηριοποίηση των ωοθηκών. Ο έλεγχος περιλάμβανε την επιβεβαίωση της απουσίας παθολογικού περιεχομένου στη μήτρα, τη συμμετρία των κεράτων, και τον εντοπισμό αυτής στο εσωτερικό της πυελικής κοιλότητας. Στις ωοθήκες ο έλεγχος περιλάμβανε την εκτίμηση του μεγέθους των ωοθυλακίων και του προτύπου ανάπτυξης αυτών (αριθμός και μέγεθος), καθώς και το σχήμα και το μέγεθος των ωχρών σωματίων. Σε απουσία παθολογικών ευρημάτων η διενέργεια της πρώτης Τ.Σ. γινόταν το χρονικό διάστημα μεταξύ 62^{ης} και 65^{ης} ημέρας μετά τον τοκετό. Οι ωοθηκικοί κύκλοι των ζώων που εντάχθηκαν στις δύο ομάδες του πειράματος, συγχρονίστηκαν με τη χρήση ενδοκολπικών συσκευών ελεγχόμενης απελευθέρωσης προγεστερόνης (PRID), οι οποίες παρέμειναν στον κόλπο για 7 ημέρες. Την ημέρα πριν την εξαγωγή των PRID, έγινε χορήγηση ωχρινολυτικής δόσης προσταγλανδίνης $F_{2\alpha}$ (Estrumate). Η ανίχνευση του οίστρου διενεργήθηκε με

οπτική παρατήρηση, τρεις φορές την ημέρα και ακολούθησε Τ.Σ. με καταψυγμένο σπέρμα του ίδιου ταύρου και εκσπερμάτισης (ημέρα 0). Την ημέρα 29, έγινε διάγνωση κυοφορίας, ύστερα από ανίχνευση της γλυκοπρωτεΐνης που σχετίζεται με την κυοφορία (DG29, Conception, Quebec, Canada), με τη μέθοδο ELISA και η κατάσταση κυοφορίας επιβεβαιώθηκε με ψηλάφηση από το απευθυσμένο την 45^η ημέρα. Η σύλληψη σε όλες τις αγελάδες πραγματοποιήθηκε με την πρώτη ή τη δεύτερη Τ.Σ. (μέσος όρος ημερών σε γαλακτοπαραγωγή $72,2 \pm 6,8$), ενώ στις μοσχίδες με την πρώτη. Όλες οι κυοφορίες εξελίχθηκαν χωρίς επιπλοκές και από κάθε ομάδα ζώων γεννήθηκαν τρεις αρσενικοί και δύο θηλυκοί μόσχοι.

Την ημέρα αφαίρεσης των PRID (P.r), καθώς και την πρώτη εβδομάδα μετά την ολοκλήρωση κάθε μήνα της κυοφορίας, συλλέγονταν δείγματα αίματος (10 ml) από την κοκκυγική φλέβα, σε φιαλίδια που περιείχαν αντιπηκτικό (EDTA) (συνολικά 10 δείγματα αίματος από κάθε ζώο). Τα δείγματα τοποθετούνταν απευθείας σε θρυμματισμένο πάγο, ο διαχωρισμός του πλάσματος γινόταν με φυγοκέντρηση (όπως και στον προηγούμενο πειραματισμό) και στη συνέχεια συντηρούνταν στους -20°C , μέχρι τη στιγμή προσδιορισμού της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης.

Πειραματισμός 2: Επίδραση της μικρής διάρκειας νηστείας στην έκκριση της γκρελίνης σε έγκυες και μη-έγκυες μοσχίδες

Οκτώ μοσχίδες ηλικίας $19,2 \pm 1,2$ μηνών, με παρόμοιο δείκτη θρεπτικής κατάστασης ($3,25 \pm 0,6$), χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες. Η ομάδα Α αποτελούνταν από έγκυες μοσχίδες (μέσο στάδιο κυοφορίας $69,5 \pm 4,8$ ημέρες), ενώ οι μοσχίδες της ομάδας Β δεν ήταν έγκυες. Είκοσι ημέρες πριν από τον προγραμματισμένο πειραματισμό, όλα τα ζώα προσαρμόστηκαν σε πρόγραμμα ταΐσματος που περιλάμβανε την παράθεση τροφής δύο φορές την ημέρα (6 π.μ. και 6 μ.μ.). Ο συγχρονισμός των ωοθηκικών κύκλων στα μη-έγκυα ζώα, καθώς και η διαδικασία ανίχνευσης του οίστρου, έγιναν με τον τρόπο που περιγράφεται στον πρώτο πειραματισμό. Το πρωί της ημέρας του πειράματος (ημέρα 8 ή 9 του κύκλου) τα ζώα ταΐστηκαν κανονικά, τα υπολείμματα τροφής απομακρύνθηκαν δύο ώρες αργότερα και τα ζώα έμειναν δίχως τροφή έως και τις 8 π.μ. της επόμενης ημέρας. Κατά τη

χρονική στιγμή της απομάκρυνσης των υπολειμμάτων (χρονική στιγμή 0), όπως και 4, 8, 12, 16 και 24 ώρες αργότερα, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος (7 ml) σε φιαλίδια, χωρίς την παρουσία αντιπηκτικής ουσίας. Τέσσερα επιπλέον δείγματα αίματος συλλέχθηκαν τις χρονικές στιγμές 0, 8, 16 και 24, σε φιαλίδια με αντιπηκτικό, για τον προσδιορισμό της ολικής γκρελίνης. Ο ορός και το πλάσμα του αίματος διαχωρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως τον προσδιορισμού της συγκέντρωσης των NEFA, της κορτιζόλης, της ινσουλίνης και της ολικής γκρελίνης. Σε κάθε χρονική στιγμή, στα δείγματα αίματος, έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του BHBA και της γλυκόζης με τη βοήθεια αντίστοιχων ειδικών ταινιών μίας χρήσης (FreeStyle Precision Xceed, Abbott, U.S.A.).

Εργαστηριακές αναλύσεις

Οι τιμές κάθε παραμέτρου που εκτιμήθηκε αποτελούν το μέσο όρο ζεύγους του ίδιου δείγματος. Αν η διαφορά, στο ζεύγος, ήταν μεγαλύτερη του 5%, τα συγκεκριμένα δείγματα επανεξετάζονταν.

Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης στα δείγματα του πλάσματος του αίματος προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ειδικό εμπορικό διαγνωστικό τεστ, με τη μέθοδο της RIA, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο II.

Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης στα δείγματα του ορού του αίματος προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα διαγνωστικό τεστ, με τη μέθοδο ELISA (Bovine insulin, Mercodia AB Uppsala, Sweden), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 450 nm, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (MRC Scientific Instruments, Israel). Ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των διαφορετικών δοκιμών ήταν 2,3-5,3% και της ίδιας δοκιμής ήταν 6,7-7% για δείγματα χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης, αντίστοιχα.

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στα δείγματα του ορού του αίματος προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια στερεής φάσης, ανοσοαντίδρασης ενζύμου ανταγωνιστικής χημειοφωταύγειας, με τη χρήση ειδικού διαγνωστικού τεστ (Cortisol, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd, U.K.), σε αυτόματο αναλυτή ανοσοαντιδράσεων (IMMULITE 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany).

Οι συγκεντρώσεις των NEFA στα δείγματα του ορού του αίματος προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια ειδικού διαγνωστικού τεστ (NEFA FS, DiaSys Diagnostics Systems GmbH, Holzheim, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, με τη χρήση ενός αυτόματου βιοχημικού αναλυτή ADVIA 1200 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, U.S.A.).

Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των ορμονών ακολουθούσαν κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov test). Επανειλημμένες μετρήσεις ANOVA (διπλής κατεύθυνσης) χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πιθανών επιδράσεων του χρόνου [μήνας (πειραματισμός 1) ή ώρα (πειραματισμός 2)], των ομάδων [μοσχίδες ή αγελάδες (πειραματισμός 1), έγκυες ή μη-έγκυες μοσχίδες (πειραματισμός 2)] και του συνδυασμού του χρόνου και της ομάδας, σε όλες τις παραμέτρους που λήφθηκαν υπόψη. Επανειλημμένες μετρήσεις ANOVA (μονής κατεύθυνσης), ακολουθούμενες από Bonferroni test, χρησιμοποιήθηκαν για συγκρίσεις μέσα στην ίδια ομάδα. Σε κάθε περίπτωση τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το IBM SPSS Statistics 23.

3.3. Αποτελέσματα

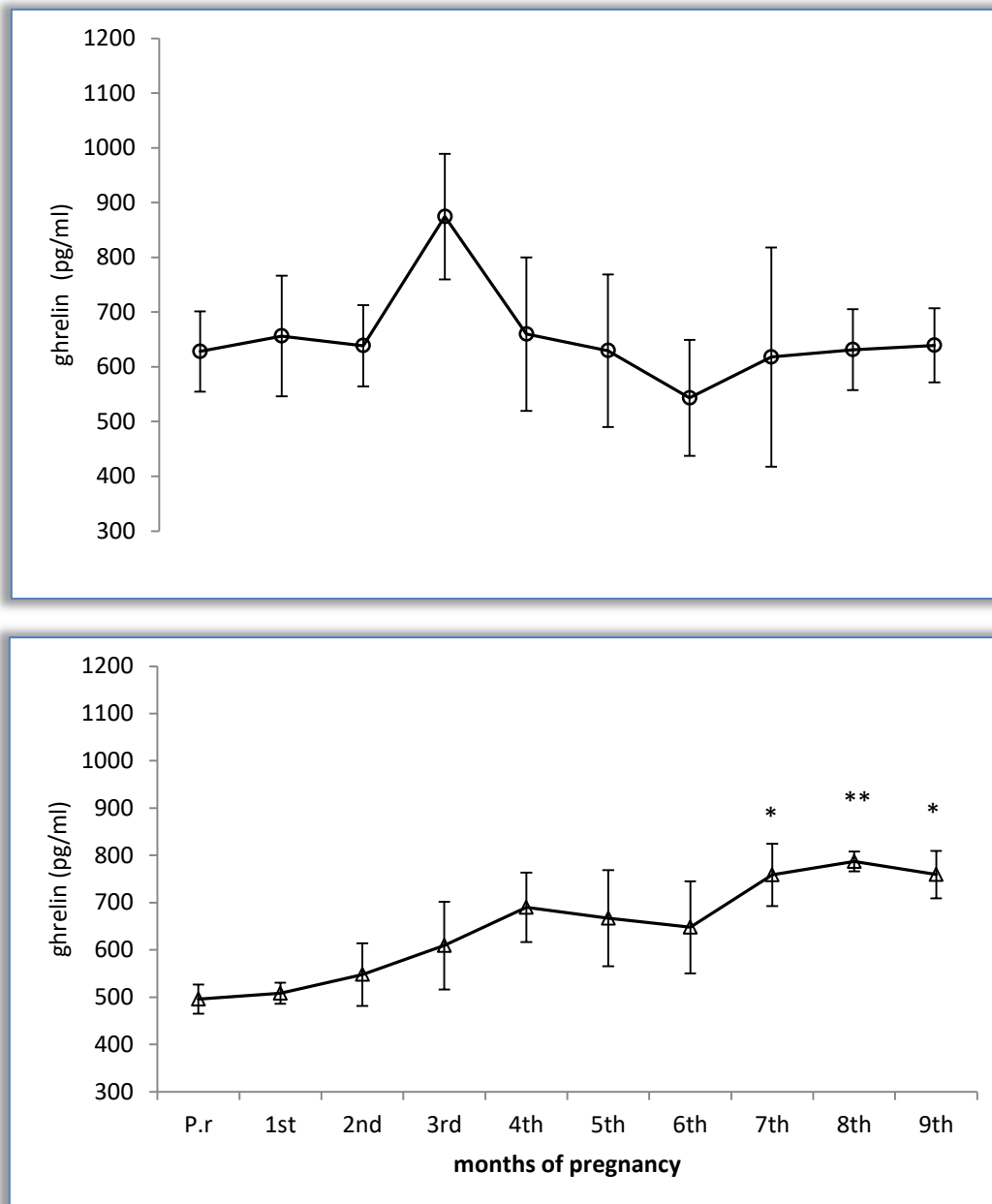
Πειραματισμός 1

Δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά στην τάση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, μεταξύ μοσχίδων και αγελάδων ($p < 0,05$). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της κυοφορίας το πρότυπο της ολικής γκρελίνης ήταν διαφορετικό μεταξύ αγελάδων και μοσχίδων ($p < 0,01$). Στις αγελάδες η συγκέντρωση της γκρελίνης αυξήθηκε κατά τον 7^ο ($p < 0,05$), 8^ο ($p < 0,005$) και 9^ο ($p < 0,05$) μήνα της κυοφορίας σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις πριν από τη σύλληψη, κατά 53,2%, 58,7% και 53,2%, αντίστοιχα. Στις μοσχίδες, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης κατά τον 3^ο μήνα της κυοφορίας είχαν την τάση να είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες πριν από τη σύλληψη (874.5 ± 114.8 pg ml⁻¹ και 628.0 ± 81.9 pg ml⁻¹, αντίστοιχα, $p = 0,08$). Δεν διαπιστώθηκε καμία άλλη

σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης, κατά τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά από τη σύλληψη ($p>0,05$). Τα δεδομένα των συγκεντρώσεων της γκρελίνης κατά την περίοδο της κυοφορίας των δύο ομάδων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 6.

Διάγραμμα 6.

Συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, σε 5 μοσχίδες (επάνω) και 5 αγελάδες (κάτω).



Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε σχεδιάγραμμα, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο και στο χρονικό σημείο P.r. (συγκέντρωση πριν τη σύλληψη). Όπου * $p<0,05$ και όπου ** $p<0,01$.

Πειραματισμός 2

Συγκεντρώσεις γκρελίνης

Η νηστεία προκάλεσε αύξηση της έκκρισης γκρελίνης και στις δύο ομάδες ($p < 0,02$). Στα έγκυα ζώα, μετά την 8^η ώρα της νηστείας, η συγκέντρωση της γκρελίνης ήταν συνεχώς υψηλότερη ($p < 0,05$) σε σύγκριση με εκείνη που μετρήθηκε κατά τη χρονική στιγμή απομάκρυνσης των υπολειμμάτων τροφής (χρονικό σημείο 0). Κατά την 8^η, 12^η και 24^η ώρα της νηστείας, η συγκέντρωση της γκρελίνης στις έγκυες μοσχίδες ήταν 24,8% ($p < 0,005$), 31,9% ($p = 0,05$) και 39,3% ($p < 0,05$) υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη πριν από τη νηστεία. Στα μη-έγκυα ζώα, μία σημαντική αύξηση της τάξης του 14,1% σημειώθηκε την 8^η ώρα της νηστείας σε σύγκριση με τη χρονική στιγμή 0 ($p < 0,05$), ενώ δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά από εκείνο το σημείο και έπειτα ($p > 0,05$).

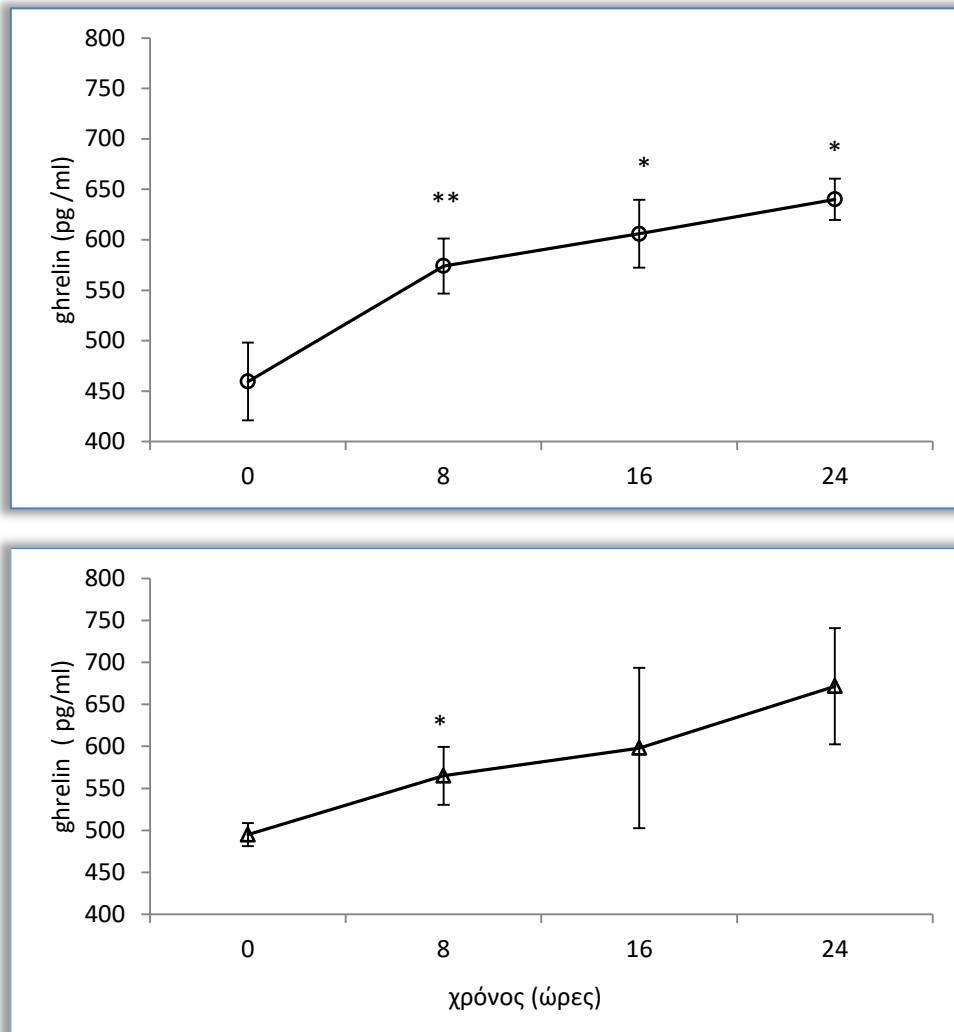
Σε κανένα χρονικό σημείο δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p > 0,05$). Τα δεδομένα των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, ύστερα από 24^{ωρη} νηστεία εμφανίζονται στο διάγραμμα 7.

Συγκεντρώσεις γλυκόζης

Δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις της γλυκόζης σε σχέση με τον χρόνο σε καμία από τις δύο ομάδες που μελετήθηκαν ($p > 0,05$). Ωστόσο οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης ήταν χαμηλότερες στα έγκυα ζώα σε σύγκριση με τα μη-έγκυα ($p < 0,002$). Επιπλέον, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στις μετέπειτα συγκεντρώσεις της γλυκόζης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του χρονικού σημείου 0 τόσο στα έγκυα, όσο και στα μη-έγκυα ζώα ($p > 0,05$). Τα δεδομένα των συγκεντρώσεων της γλυκόζης παρουσιάζονται στο διάγραμμα 8.

Διάγραμμα 7.

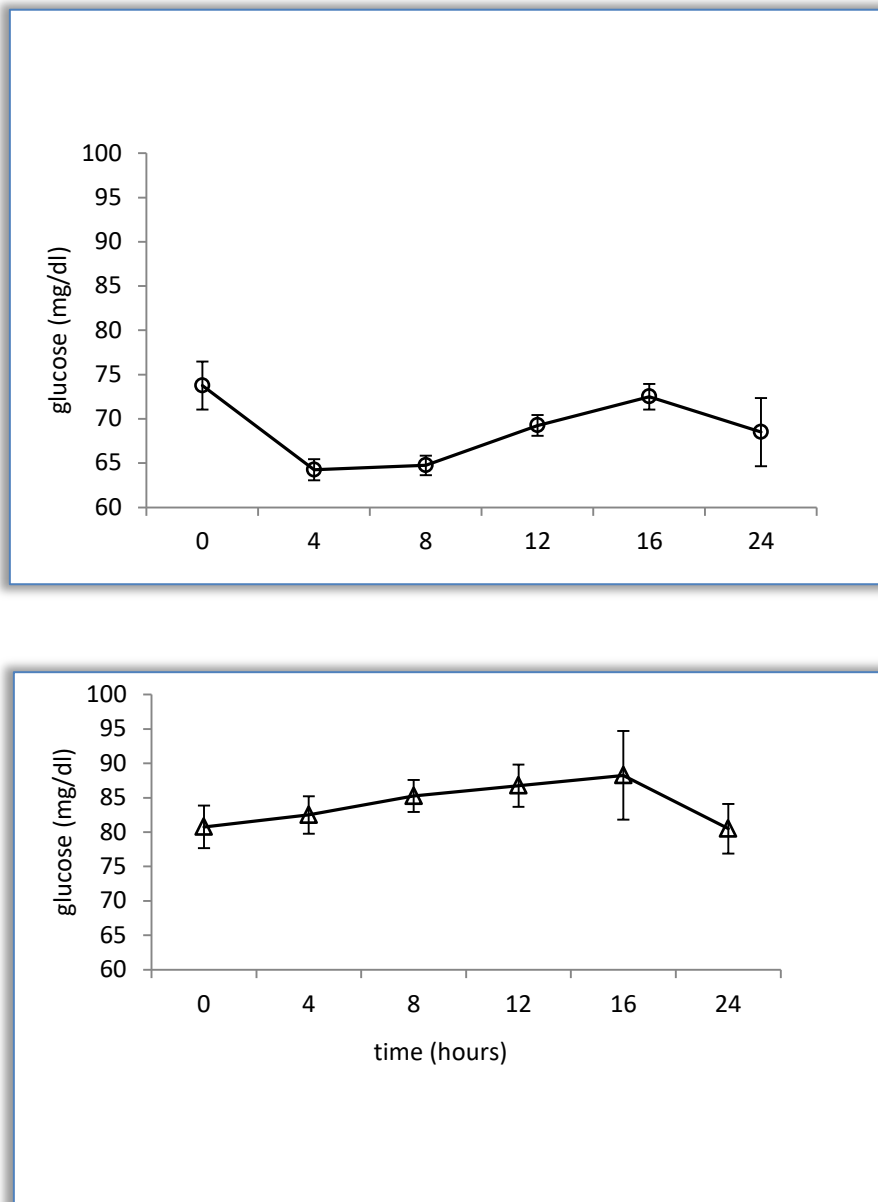
Συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, σε έγκυες (ομάδα Α, επάνω) και μη-έγκυες (ομάδα Β, κάτω) μοσχίδες, κατά τη διάρκεια νηστείας 24 συνολικά ωρών.



Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε σχεδιάγραμμα, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο και στο χρονικό σημείο 0. Όπου * $p < 0,05$ και όπου ** $p < 0,005$.

Διάγραμμα 8.

Συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα, σε έγκυες (ομάδα Α, επάνω) και μη-έγκυες (ομάδα Β, κάτω) μοσχίδες, κατά τη διάρκεια νηστείας 24 συνολικά ωρών.



Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

Συγκεντρώσεις ινσουλίνης

Διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις της ινσουλίνης σε σχέση με τον χρόνο ($p < 0,05$). Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p > 0,05$). Στην ομάδα των έγκυων μοσχίδων, οι συγκεντρώσεις της

ισουλίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερες την 4^η ($p<0,05$) και την 8^η ($p<0,05$) ώρα από την απομάκρυνση της τροφής. Στην ομάδα των μη-έγκυων ζώων, οι συγκεντρώσεις της ισουλίνης παρέμειναν σταθερές, κατά τη διάρκεια της περιόδου των δειγματοληψιών, κυμαινόμενες από 1,6 $\mu\text{IU ml}^{-1}$ έως και 1,9 $\mu\text{IU ml}^{-1}$. Τα δεδομένα των συγκεντρώσεων της ισουλίνης εμφανίζονται στο διάγραμμα 9.

Συγκεντρώσεις κορτιζόλης

Διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης σε σχέση με τον χρόνο και στις δύο ομάδες ($p<0,01$). Επιπλέον, αυτή η τάση εμφανίστηκε να είναι διαφορετική στην περίπτωση των έγκυων σε σύγκριση με τα μη-έγκυα ζώα ($p<0,05$). Στην περίπτωση της ομάδας των έγκυων ζώων, οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες κατά την 4^η ($p<0,05$), 8^η ($p<0,005$), 12^η ($p<0,005$) και 24^η ($p<0,05$) ώρα σε σύγκριση με την προ-νηστείας τιμή (χρονική στιγμή 0). Στην ομάδα των μη-έγκυων ζώων, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης κατά την 24^η ώρα ($p<0,05$) της νηστείας. Με την πάροδο του χρόνου, διαπιστώθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και στις δύο ομάδες, ωστόσο η αύξηση για τα έγκυα ζώα ξεκίνησε από την 4^η ώρα της νηστείας, ενώ για τα μη-έγκυα από την 24^η ώρα της νηστείας (διάγραμμα 10).

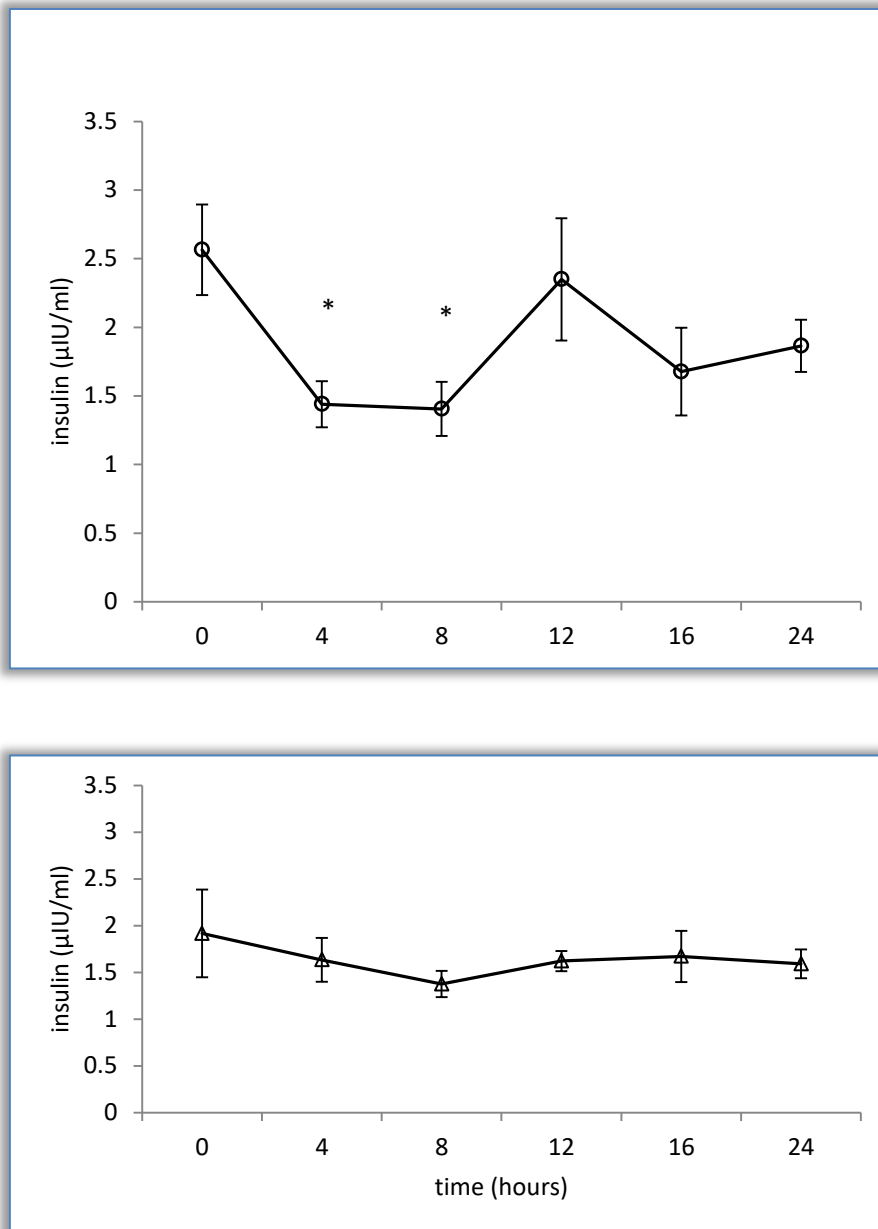
Συγκεντρώσεις BHBA και NEFA

Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις του BHBA ($p>0,05$) ούτε μεταξύ των δύο ομάδων, ούτε μεταξύ των ζώων της ίδιας ομάδας, με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 0,38 \pm 0,03 mM και 0,45 \pm 0,06 mM.

Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των NEFA μεταξύ των δύο ομάδων ($p>0,05$). Την 24^η ώρα, οι συγκεντρώσεις των NEFA και στις δύο ομάδες ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του χρονικού σημείου 0 [από 0,06 \pm 0,009 mM l^{-1} αυξήθηκε στα 0,27 \pm 0,07 mM l^{-1} ($p<0,05$) και από 0,05 \pm 0,01 mM l^{-1} στα 0,24 \pm 0,06 mM l^{-1} ($p<0,05$), για τα έγκυα και τα μη-έγκυα ζώα, αντίστοιχα].

Διάγραμμα 9.

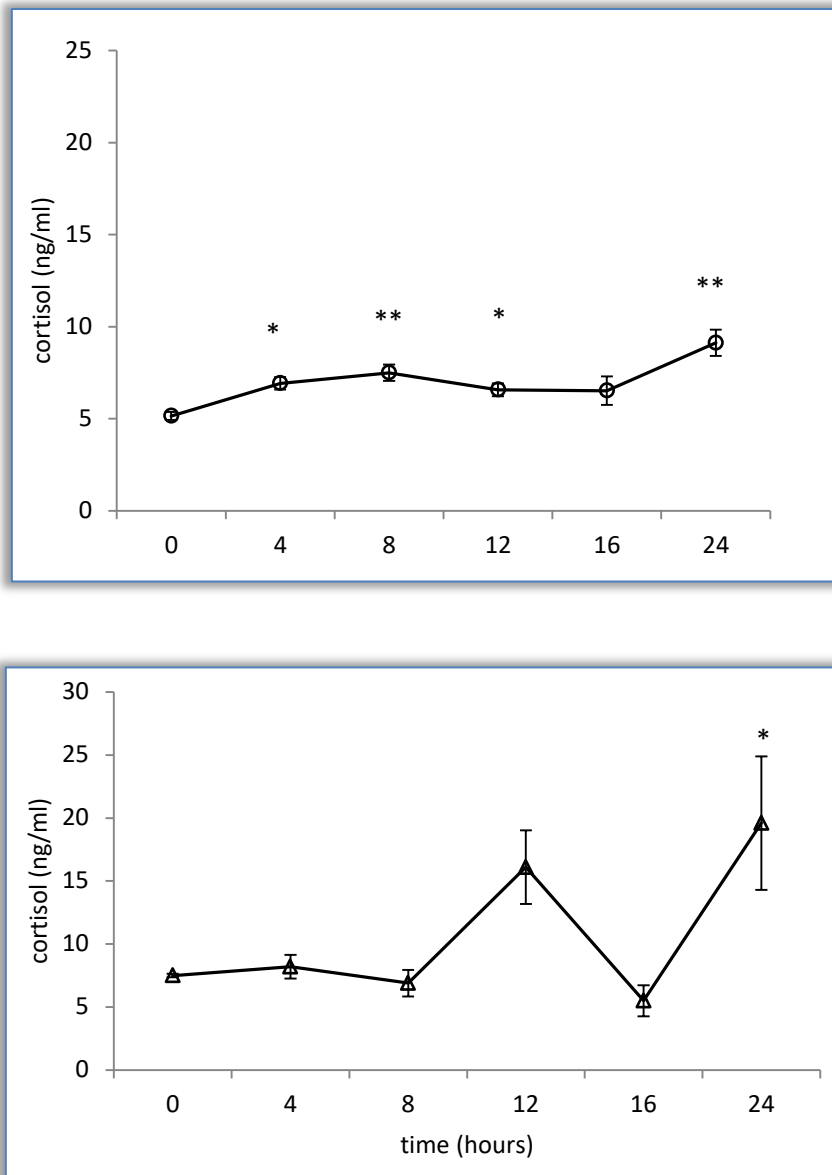
Συγκεντρώσεις ινσουλίνης στον ορό του αίματος, σε έγκυες (ομάδα Α, επάνω) και μη-έγκυες (ομάδα Β, κάτω) μωσχίδες, κατά τη διάρκεια νηστείας 24 συνολικά ωρών.



Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε σχεδιάγραμμα, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο και στο χρονικό σημείο 0 (* $p < 0,05$).

Διάγραμμα 10.

Συγκεντρώσεις κορτιζόλης στον ορό του αίματος, σε έγκυες (ομάδα Α, επάνω) και μη-έγκυες (ομάδα Β, κάτω) μοσχίδες, κατά τη διάρκεια νηστείας 24 συνολικά ωρών.



Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε σχεδιάγραμμα, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο και στο χρονικό σημείο 0 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

3.4. Συζήτηση

Από τους διενεργηθέντες πειραματισμούς του κεφαλαίου αυτού, προκύπτουν, για πρώτη φορά, αποδείξεις ότι η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αυξάνεται κατά τους τελευταίους τρεις μήνες της κυοφορίας, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρείται στις μοσχίδες της ίδιας φυλής. Αυτές οι διαφορές δεν μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική ηλικία των ζώων, καθώς δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων. Και στις δύο ομάδες, η αρχική αύξηση των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης συνέπεσε με την περίοδο των αυξημένων απαιτήσεων σε ενέργεια και πρωτεΐνες από το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Είναι γνωστό, από παλαιότερες μελέτες, ότι στον 4^ο περίπου μήνα της κυοφορίας, ο ρυθμός αποθήκευσης αζώτου και ενέργειας στην κυοφορούσα μήτρα παρουσιάζει αύξηση έως και τέσσερις φορές σε σύγκριση με προηγούμενα στάδια. Η συγκεκριμένη αύξηση δεν συσχετίζεται ούτε με το φύλο του εμβρύου, ούτε με την κατάσταση της γαλακτοπαραγωγής και την πρόσληψη ξηράς ουσίας από τη μητέρα (Ferrell et al. 1976, Wood et al. 2013) και θα μπορούσε, εν μέρει, να εξηγήσει τις αυξημένες συγκεντρώσεις της γκρελίνης στις μοσχίδες. Επιπλέον, η μετάβαση από το στάδιο της κυοφορίας σε εκείνο της γαλακτοπαραγωγής, χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη ξηράς ουσίας και κινητοποίηση των αποθεμάτων λίπους, ώστε να υποστηριχθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις της σύνθεσης του γάλακτος. Η γκρελίνη πιστεύεται ότι ελέγχει την πρόσληψη τροφής και τείνει να συσχετιστεί και με την κινητοποίηση λίπους, κατά τη γαλακτοπαραγωγή (Bradford and Allen 2008, Börner et al. 2013). Κατά τον πρώτο και δεύτερο μήνα της κυοφορίας, οι αγελάδες της παρούσας μελέτης βρίσκονταν στο μέγιστο επίπεδο της γαλακτοπαραγωγής τους. Μελέτες σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Itoh et al. 2005), χοίρους (Gononi et al. 2007) και ανθρώπους (Aydin et al. 2006), απέδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης αυξάνονται κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της γαλακτοπαραγωγής και στη συνέχεια με την πρόοδο της γαλακτοπαραγωγής μειώνονται. Αυτή η πρώιμη αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης, αντανakλά πιθανόν την ανεπαρκή πρόσληψη ενέργειας, ώστε να υποστηριχθεί η γαλακτοπαραγωγή, ή μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα της μείωσης του δείκτη θρεπτικής κατάστασης που συνήθως καταγράφεται στα αρχικά στάδια μετά τον τοκετό. Η ακόλουθη

μείωση της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης στο αίμα, πιθανόν να αποτελεί δείκτη προσαρμογής σε θετικό ισοζύγιο ενέργειας. Επισημαίνεται πάντως, ότι η πρώιμη αυτή αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης μετά τον τοκετό, δεν ταυτοποιήθηκε στον συγκεκριμένο πειραματισμό, καθώς οι δειγματοληψίες ξεκίνησαν σε επόμενα στάδια της γαλακτοπαραγωγής (τρίτος μήνας της γαλακτοπαραγωγής). Κατά τον 4^ο μήνα της κυοφορίας, η πλειονότητα των αγελάδων μεταβαίνει σε φάση προοδευτικά μειωμένης γαλακτοπαραγωγής και συνεπώς τα επίπεδα διατροφής τους προσαρμόζονται αναλόγως. Στην παρούσα μελέτη, 150 περίπου ημέρες από την έναρξη της γαλακτοπαραγωγής, το σιτηρέσιο των αγελάδων παρείχε με $1,1 \text{ MJ kg}^{-1}$ λιγότερη ενέργεια έως και το στάδιο της ξηράς περιόδου. Στο στάδιο της ξηράς περιόδου, έλαβε χώρα επιπλέον πτώση της παρεχόμενης ενέργειας, ύψους $1,2 \text{ MJ kg}^{-1}$. Η πιθανή ανεπαρκής πλήρωση της μεγάλης κοιλίας ή/και η απώλεια ενέργειας, είναι δυνατόν να αντανakλάται στις αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης καταγράφονται αρχικά στο στάδιο πριν από την ξηρά περίοδο, και συνεχίζονται και κατά τη διάρκεια αυτής, όπου η θερμιδική αξία της διατροφής είναι σημαντικά μειωμένη.

Οι διαφορές στον τρόπο έκκρισης της γκρελίνης, κατά τη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου της κυοφορίας, ανάμεσα στις αγελάδες και στις μοσχίδες είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Επιπλέον είναι δύσκολο να ερμηνευτεί η μεγάλη παραλλακτικότητα στις συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης στις μοσχίδες. Το τελευταίο θα μπορούσε να αποδοθεί στους διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης και επομένως στις διαφορετικές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά μεταξύ των ζώων της ομάδας. Μελέτες σε ποντίκια (Shibata et al. 2004) έδειξαν σταθερά αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης κατά το τελικό στάδιο της κυοφορίας, γεγονός το οποίο διαπιστώθηκε και στις αγελάδες. Ωστόσο, μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν αύξηση των συγκεντρώσεων της ολικής και της ακυλιωμένης γκρελίνης στα μέσα στάδια της κυοφορίας, οι οποίες στη συνέχεια μειώνονταν κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου (Makino et al. 2002, Fuglsang et al. 2005). Ανάλογο πρότυπο έκκρισης καταγράφηκε και στην περίπτωση των μοσχίδων, στην παρούσα μελέτη. Τα δεδομένα που αποκομίσθηκαν, αναφορικά με την έκκριση της ολικής γκρελίνης

κατά τη διάρκεια της κυοφορίας σε αγελάδες και μοσχίδες, έδειξαν ότι δεν είναι ξεκάθαρο αν οι διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες αντανακλούν την εμπλοκή της γκρελίνης στη διατήρηση της ενεργειακής ομοιοστασίας, ή αν απλώς αποτελούν αντίδραση των αγελάδων στην πιθανά ελλειμματικά παρεχόμενη ενέργεια.

Στον δεύτερο πειραματισμό χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της σύντομης διάρκειας νηστείας, ώστε να μελετηθεί η επίδραση που επιφέρει η στέρηση τροφής στη συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης, σε έγκυες και μη-έγκυες μοσχίδες. Η συσχέτιση της γκρελίνης με την πρόσληψη ξηράς ουσίας σε αγελάδες έχει αποδειχθεί κατά την περίοδο της ανάπτυξης (Foote et al. 2014). Φαίνεται ότι στις μοσχίδες, η ακυλιωμένη και η ολική γκρελίνη έχουν ομοίως συσχετιστεί με την πρόσληψη ξηράς ουσίας. Το παραπάνω στηρίχθηκε στο γεγονός ότι οι δύο μορφές γκρελίνης εμφάνισαν παρόμοια συνεισφορά στην απόκλιση που ερμηνεύθηκε από ένα συγκεκριμένο μοντέλο αξιολόγησης της πρόσληψης ξηράς ουσίας σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης (Foote et al. 2016).

Η ιδέα της συγκεκριμένης μελέτης προέκυψε μετά από επανειλημμένη παρατήρηση, κατά τη διάρκεια διαγνώσεων κυοφορίας ρουτίνας σε εκτροφές. Στις μονάδες αυτές οι μοσχίδες εκτρέφονται σε ομάδες παρόμοιας ηλικίας και σε χώρους, οι οποίοι διαθέτουν παγίδες κεφαλής, ο αριθμός των οποίων, όμως, ανέρχεται περίπου στο 1/3 των συνολικά σταβλισμένων ζώων. Τέσσερις έως πέντε ώρες πριν από την προγραμματισμένη εξέταση η τροφή απομακρυνόταν και στη συνέχεια παρατίθετο νέα, ώστε να προσελκυσθούν τα ζώα στην περιοχή των παγίδων. Παρατηρείτο ότι, σχεδόν πάντα, τα έγκυα ζώα ήταν τα πρώτα τα οποία εξετάζονταν, γεγονός που μας οδήγησε στην υπόθεση ότι, στα έγκυα ζώα το αίσθημα της πείνας εμφανιζόταν πιο γρήγορα από ότι στα μη-έγκυα. Τα στοιχεία που παρατίθενται δεν υποστηρίζουν απόλυτα την παραπάνω κλινική παρατήρηση, καθώς και στις δύο ομάδες οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης βρέθηκαν αυξημένες την 8^η ώρα της νηστείας. Ωστόσο τα αποτελέσματα έδειξαν την ευαισθησία των έγκυων ζώων στη νηστεία, εφόσον οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών.

Η κυοφορία είναι μία περίοδος που χαρακτηρίζεται από υπερβολική αύξηση του μεταβολισμού, κατά τη διάρκεια της οποίας το σωματικό βάρος της μητέρας αυξάνεται, με ταυτόχρονη συσσώρευση λίπους. Το παραπάνω γεγονός, επιτυγχάνεται, μέσω ελεγχόμενων προσαρμογών στις νευροενδοκρινείς μεταβολές και στις μεταβολές της ορμονικής κατάστασης, ώστε να διασφαλισθεί ο συντονισμένος έλεγχος του μεταβολισμού (Bauman and Currie 1980). Σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα του πρώτου πειραματισμού, δεν διαπιστώθηκε καμία μεταβολή στις συγκεντρώσεις της γκρελίνης ανάμεσα στις δύο ομάδες κατά την έναρξη (χρονική στιγμή 0) του πειράματος. Σε ώριμες, μη-έγκυες αγελάδες που υποβλήθηκαν σε νηστεία, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης αυξάνονται περίπου στον προγραμματισμένο χρόνο παράθεσης της τροφής (Miura et al. 2004). Έχει επαρκώς αποδειχθεί σε πολλά είδη ζώων ότι οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης αυξάνονται, ως αντίδραση στη στέρηση τροφής. Στα ποντίκια, η αυξημένη έκκριση γκρελίνης θα μπορούσε να αποφευχθεί παρεμποδίζοντας τους αδρενεργικούς νευροδιαβιβαστές, οι οποίοι προέρχονται από νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (Zhao et al. 2010). Μολονότι οι μηχανισμοί και οι αλληλεπιδράσεις, μέσω των οποίων γίνεται η ρύθμιση της έκκρισης της γκρελίνης, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί, θεωρείται ότι το φύλο, το στάδιο ανάπτυξης, οι ορμόνες της αναπαραγωγής (όπως τα οιστρογόνα) και οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στους δυνητικούς ρυθμιστές της έκκρισης της γκρελίνης (Gottero et al. 2004, García et al. 2007). Επιπλέον, το mRNA της γκρελίνης εκφράζεται στον πλακούντα ανθρώπων και ποντικών, με τα επίπεδα έκφρασης να ποικίλλουν, ανάλογα με το είδος και το στάδιο της κυοφορίας (Gualillo et al. 2001, Fuglsang et al. 2005). Καθημερινή χορήγηση γκρελίνης σε έγκυα ποντίκια μείωσε σημαντικά το μέγεθος του εμβρύου, χωρίς να επηρεάσει το ρυθμό κυοφορίας (Fernández-Fernández et al. 2005a). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η γκρελίνη στα πρώιμα στάδια της κυοφορίας, πιθανόν να λειτουργεί ως ένα ισχυρό σήμα ενεργειακής ανεπάρκειας είτε προκαλώντας την ενεργοποίηση μηχανισμών καταστολής της ενεργειακής απώλειας, είτε ενισχύοντας την κατανάλωση τροφής.

Αρχικά η συγκέντρωση της γλυκόζης δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, καθ' όλα τα χρονικά σημεία, μετά την απομάκρυνση της τροφής, η συγκέντρωση της γλυκόζης στα έγκυα ζώα ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή των μη-έγκυων. Στα μηρυκαστικά, η συγκέντρωση γλυκόζης ανέρχεται περίπου στο 50% της αντίστοιχης των μονογαστρικών (Fahey and Berger 1988) και η παράθεση τροφής δεν επηρεάζει δραματικά τη συγκέντρωσή της (Forbes 1995). Αυτό συμβαίνει, επειδή η γλυκόζη, σε καταστάσεις κορεσμού, προέρχεται από το μεταβολισμό του προπιονικού οξέος στο ήπαρ. Σε περίοδο νηστείας, καθώς το προπιονικό οξύ που θα χρησίμευε ως υπόστρωμα για τη γλυκονεογένεση μειώνεται, η λιγοστή πλέον γλυκόζη χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ομοιοστασίας (Blum et al. 1981).

Η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του κυήματος. Η πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης από τη μήτρα, ώστε να υποστηριχθεί η εμβρυϊκή ανάπτυξη, παραμένει απρόσκοπτη, παρά την πιθανότητα μειωμένων αποθεμάτων ενέργειας της μητέρας (Oddy et al. 1985). Η χρήση της γλυκόζης από την κυοφορούσα μήτρα υποστηρίζεται από μία σειρά μεταβολικών προσαρμογών των ιστών της μητέρας, γνωστή και ως «*επίδραση της μειωμένης γλυκόζης της κυοφορίας*», η οποία υποστηρίζεται από το αναπτυσσόμενο έμβρυο, μέσω της δράσης του στον πλακούντα, βελτιώνοντας έτσι την ικανότητα μεταφοράς της γλυκόζης (Gluckman and Harding 1997, Bell 2005). Όλα τα παραπάνω θα μπορούσαν να εξηγήσουν την πολύ πρώιμη και συνάμα απότομη μείωση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης στα νηστικά έγκυα ζώα. Σε αντίθεση, οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στα μη-έγκυα ζώα παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου νηστείας. Σε μία παλαιότερη μελέτη, οι Chelikani και συνεργάτες (2004), ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο δύο δειγματοληψιών ημερησίως, έδειξαν ότι σε μη-παραγωγικές έγκυες αγελάδες, οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης και της γλυκόζης στο αίμα μειώνονται μετά από 12 περίπου ώρες νηστείας και παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα για άλλες 12 ώρες. Επαναλαμβάνοντας το πείραμα σε μη-έγκυα ζώα, με πιο συχνές δειγματοληψίες, διαπίστωσαν ότι κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών της νηστείας τόσο η γλυκόζη, όσο και η ινσουλίνη παραμένουν σε σταθερά επίπεδα. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, με τη διαφορά της πιο πρώιμης πτώσης των συγκεντρώσεων

της γλυκόζης και της ινσουλίνης, η οποία φαίνεται να οφείλεται στο διαφορετικό πρωτόκολλο δειγματοληψιών (συχνότερες δειγματοληψίες) που ακολουθήθηκε. Ομοίως, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά των Werz-Lutz και συνεργατών (2006), οι οποίοι κατά τη μελέτη ευνουχισμένων μόσχων ανέφεραν σταθερές συγκεντρώσεις γλυκόζης και ινσουλίνης κατά τη διάρκεια νηστείας 14 ωρών.

Η χορήγηση γκρελίνης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις γλυκόζης, ινσουλίνης και κορτιζόλης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, με ένταση που σχετίζεται με τη φυσιολογική κατάσταση του ζώου (Itoh et al. 2006). Σε έγκυες, μη-αμελγόμενες αγελάδες φυλής Holstein, η χορήγηση γκρελίνης ($0,3 \text{ nmol kg}^{-1}$ σωματικού βάρους) προκάλεσε αύξηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και της ινσουλίνης, η οποία διήρκησε τρεις ώρες μετά τη χορήγηση, ωστόσο σε νεαρές μοσχίδες η ίδια δόση δεν επέφερε αποτέλεσμα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα ευρήματα της δικής μας μελέτης, καθώς η ενδογενής αύξηση των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης έδειξε να ακολουθείται από αύξηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και της ινσουλίνης. Οι επιδράσεις της γκρελίνης στην αύξηση της γλυκόζης του αίματος, οι οποίες συνοδεύονται από αυξημένη έκκριση ινσουλίνης έχουν αποδειχθεί και σε άλλα είδη, όπως ο άνθρωπος και τα τρωκτικά (Clark et al. 1997, Broglio et al. 2003b, Sun et al. 2007).

Ο ρόλος της γκρελίνης στη λειτουργία του παγκρέατος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Χορήγηση γκρελίνης (μίας εφάπαξ μεγάλης δόσης) σε ανθρώπους, οι οποίοι επρόκειτο να υποβληθούν σε δίαιτα, μείωσε τη συγκέντρωση της ινσουλίνης και ταυτόχρονα προκάλεσε υπεργλυκαιμία (Broglio et al. 2001). Ωστόσο, συνεχής χορήγηση προκάλεσε αντίδραση της ινσουλίνης σε δύο φάσεις, η οποία χαρακτηρίστηκε από αρχική μείωση, ακολουθούμενη από μία φάση αύξησης (Gauna et al. 2004). Σε αντίθεση, οι Vestergaard και συνεργάτες (2007) δεν διαπίστωσαν αλλαγές στη συγκέντρωση της ινσουλίνης, μετά από συνεχή χορήγηση γκρελίνης. Αυτές οι διαφωνίες εκφράζουν έμμεσα είτε την πιθανή δοσο-εξαρτώμενη επίδραση της γκρελίνης στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος, είτε την διαφορετική γλυκαιμική ή φυσιολογική κατάσταση των ατόμων που έλαβαν μέρος στους παραπάνω πειραματισμούς.

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, ώστε να αξιολογηθεί η αντίδραση των ζώων στο στρες, μετά την έκθεσή τους στη στέρηση της τροφής. Ανεξαρτήτως σταδίου κυοφορίας, η νηστεία διεγείρει την έκκριση της κορτιζόλης. Όμως, τα έγκυα ζώα αντέδρασαν νωρίτερα στη νηστεία σε σύγκριση με τα μη-έγκυα. Στα μη-έγκυα ζώα, παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης παρατηρήθηκε στις 24 ώρες νηστείας, ενώ στις έγκυες μοσχίδες οι σχεδόν σταθερά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της κορτιζόλης ξεκινούσαν ήδη από την 4^η ώρα της νηστείας. Αν και σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ανοχή της κορτιζόλης στη νηστεία, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε εκείνες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν είτε μη-έγκυα θηλυκά, είτε ευνουχισμένοι ταύροι (Van der Walt et al. 1993, Miura et al. 2014). Το πρότυπο έκκρισης της κορτιζόλης στην παρούσα μελέτη, οδηγεί εμμέσως στο συμπέρασμα ότι τα έγκυα ζώα είναι πιο ευάλωτα στο στρες της στέρησης τροφής από ότι τα μη-έγκυα. Στα έγκυα ζώα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της κορτιζόλης συνέπεσαν με την πρώτη αύξηση της γκρελίνης και ακολούθησε αύξηση των συγκεντρώσεων της ινσουλίνης και της γλυκόζης. Μία εφάπαξ μεγάλη δόση ανθρώπινης γκρελίνης (bolus injection, 0,3 nmol kg⁻¹ σωματικού βάρους), σε ώριμες αγελάδες και νεαρά μοσχάρια, είχε ως αποτέλεσμα τη διέγερση της έκκρισης της κορτιζόλης, η οποία διήρκεσε για τουλάχιστον 3 ώρες (Itoh et al. 2006). Από την άλλη πλευρά, έχει επαρκώς τεκμηριωθεί η ικανότητα της κορτιζόλης να προκαλεί υπεργλυκαιμία, με ενεργοποίηση μίας σειράς ενζύμων εμπλεκόμενων στην ηπατική γλυκονεογένεση, μέσω της παρεμπόδισης της πρόσληψης γλυκόζης από ιστούς της περιφέρειας, όπως οι σκελετικοί μύς (Dungan et al. 2009) και μέσω της αύξησης της έκκρισης της ινσουλίνης σε πολλά ζωικά είδη (Brockman and Laarveld 1986, Plat et al. 1996). Επομένως, υποθέσαμε ότι η αυξημένη έκκριση της γκρελίνης ήταν, εν μέρει, υπεύθυνη για τις αυξημένες συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της κορτιζόλης, οι οποίες παρατηρήθηκαν στις έγκυες μοσχίδες. Ωστόσο, είναι μάλλον αδύνατον να αποσαφηνιστεί, εάν η αύξηση της κορτιζόλης αποτέλεσε αντίδραση στη στέρηση τροφής, ή προκλήθηκε από την αυξημένη έκκριση της γκρελίνης ή ήταν μία συνεργική επίδραση των δύο παραγόντων.

Συμπερασματικά, από τα πειράματα του κεφαλαίου αυτού προκύπτουν αποδείξεις ότι η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης αυξάνεται κατά τους τελευταίους μήνες της

κυοφορίας στις αγελάδες, κάτι που δεν διαπιστώθηκε στις μοσχίδες. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο, αν αυτό αποτελεί φυσιολογικό χαρακτηριστικό ή είναι απλώς μία αντίδραση στη μεταβολική κατάσταση που συνδέεται με τη γαλακτοπαραγωγή. Επιπλέον, παρέχονται αποδείξεις ότι τα έγκυα ζώα αντιδρούν άμεσα στο στρες του περιορισμού της τροφής και η αντίδραση αυτή αποτυπώνεται στην αυξημένη έκκριση γκρελίνης, η οποία με τη σειρά της πιθανόν επάγει την αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης και της ινσουλίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Μελέτη της γκρελίνης και της ωχρινοποιητικής ορμόνης, υπό συνθήκες σύντομης στέρησης τροφής και κατά τη διάρκεια της περιοριστικής περιόδου, σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής

4.1. Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, η ακυλιωμένη γκρελίνη, εκτός από τη ρύθμιση της έκκρισης της GH, ασκεί άμεση διεγερτική επίδραση στην πρόσληψη τροφής, πιθανότατα, μέσω του NPY και του υποδοχέα Y1 (Shintani et al. 2001, Goto et al. 2006), δρώντας ως ορεξιογόνο σήμα στον υποθάλαμο (Gualillo et al. 2003, Korbonsits et al. 2004). Στο κεφάλαιο II της διατριβής αποδείξαμε, επίσης, ότι η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης, η οποία αποτελεί το άθροισμα της ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης μορφής της, αυξάνεται ως απόκριση στη μικρής διάρκειας στέρησης τροφής.

Κατά τη διάρκεια περιόδων μειωμένης πρόσληψης ξηράς ουσίας, η έκφραση του γονιδίου της γκρελίνης αυξάνεται (Tena-Sempere 2007), ενώ έχει προταθεί ότι η γκρελίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας και της ομοιοστασίας (Horvath et al. 2001). Ο GHS-R εντοπίζεται, κυρίως, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (υποθάλαμο και υπόφυση), ωστόσο σε πολλά είδη, έχει βρεθεί και σε άλλους ιστούς. Η ύπαρξη της γκρελίνης και του υποδοχέα της έχουν ταυτοποιηθεί στο ήπαρ, όπου αυξάνει τη γλυκονογένεση και μειώνει της πρόσληψη γλυκόζης (Rigault et al. 2007), ενώ προάγει την εναπόθεση λιπώδους ιστού, μέσω της μειωμένης χρήσης και του μειωμένου μεταβολισμού των λιπιδίων (Tschöp et al. 2000). Κατά τη διάρκεια μειωμένης ενεργειακής πρόσληψης, η γκρελίνη συμβάλλει στη διατήρηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης στο αίμα, μέσω αύξησης της έκκρισης GH, ή μέσω ενός άμεσου, αλλά αγνώστου προς το παρόν τρόπου δράσης (Zhao et al. 2010).

Το κεφάλαιο αυτό αποτελεί το περιεχόμενο πλήρους άρθρου, το οποίο βρίσκεται υπό κρίση

Όσον αφορά στην αναπαραγωγή, μία από τις κύριες λειτουργίες της γκρελίνης στα διάφορα ζωικά είδη, είναι η ικανότητά της να ελέγχει την έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών. Έρευνες σε ποντίκια, πιθήκους Rhesus, πρόβατα και αγελάδες έδειξαν ότι η χορήγηση γκρελίνης, περιορίζει την έκκριση της LH (Fernández-Fernández et al. 2004, Vulliémoz et al. 2004, Iqbal et al. 2006). Σε προηγούμενη μελέτη της Κλινικής, αποδείξαμε ότι η περιφερική έγχυση ακυλιωμένης γκρελίνης παρεμποδίζει την επαγόμενη από την GnRH έκκριση της LH και της FSH σε πρόβατα (Donolou et al. 2013), αποτελέσματα που επιβεβαιώθηκαν και για τις αγελάδες από τη μελέτη που περιγράφεται στο κεφάλαιο II της παρούσας διατριβής. Επίσης, από πειραματισμούς στην Κλινική, αποδείχθηκε ότι η ακυλιωμένη γκρελίνη επιταχύνει την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων και ταυτοχρόνως μειώνει τον ρυθμό σχηματισμού βλαστοκύστεων, μεταβάλλοντας την έκφραση μίας σειράς σημαντικών γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό, τη χρήση της γλυκόζης, την οξειδωση, την ανάπτυξη του πλακούντα και την απόπτωση στα ωάρια, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και στα έμβρυα (Donolou et al. 2014a, b).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, σε παγκόσμιο επίπεδο, η γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής μειώνεται διεθνώς. Ως αίτια της παρατηρούμενης υπογονιμότητας θεωρούνται η καθυστερημένη αποκατάσταση της κυκλικότητας των ωοθηκών, τα μειωμένα ποσοστά σύλληψης, κατά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης, καθώς, επίσης, και τα αυξημένα ποσοστά πρώιμων εμβρυϊκών θανάτων και αποβολών. Κατά ένα πολύ μεγάλο ποσοστό, όλοι αυτοί οι ανασταλτικοί παράγοντες της αναπαραγωγής αποδίδονται στη διατροφή και στον μεταβολισμό. Είναι γνωστό στους κτηνοτρόφους και έχει επιβεβαιωθεί ερευνητικά ότι κατά τη διάρκεια του οίστρου, οι αγελάδες παράγουν μικρότερες ποσότητες γάλακτος (Lopez et al. 2004), γεγονός που μπορεί να αιτιολογηθεί από ενδοκρινικές μεταβολές, αλλά, κυρίως, από τη μειωμένη πρόσληψη τροφής κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου σταδίου (Reith et al. 2014). Σε αντίθεση, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, οι ενεργειακές απαιτήσεις αυξάνονται κατακόρυφα και ο καταμερισμός της ενέργειας ευνοεί τη διατήρηση της κυοφορίας, ώστε να υποστηριχθεί η ανάπτυξη των ιστών του εμβρύου, εις βάρος της γαλακτοπαραγωγής, ή/και των

σωματικών αποθεμάτων της μητέρας. Καθώς ο πολυποίκιλος ρόλος της γκρελίνης περιλαμβάνει τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (Wertz-Lutz et al. 2007), την απελευθέρωση ινσουλίνης (Takahashi et al. 2006, ThidarMyint et al. 2006) και γλυκόζης (Itoh et al. 2005) και έχει αποδειχθεί ο ρυθμιστικός ρόλος της στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών (Donolou et al. 2013), ο σκοπός του συγκεκριμένου πειραματισμού ήταν να διερευνηθούν οι πιθανοί συσχετισμοί ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της γκρελίνης και των μεταβολικών παραμέτρων στην έκκριση της ωχρινοποιητικής ορμόνης: α) σε μοσχίδες γαλακτοπαραγωγής μετά από μικρής διάρκειας στέρησης τροφής και β) κατά τη διάρκεια του οίστρου (που αποτελεί περίοδο φυσιολογικής μείωσης της κατανάλωσης ξηράς ουσίας), σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και μοσχίδες.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

Οι πειραματισμοί διενεργήθηκαν σε μία εκτροφή γαλακτοπαραγωγών αγελάδων της Θεσσαλίας, δυναμικού 250 ζώων φυλής Holstein, με μέση παραγωγή 9.113 κιλά γάλα, ανά ζώο, ανά γαλακτική περίοδο.

Πειραματισμός 1: Επίδραση της βραχείας διάρκειας στέρησης τροφής στην έκκριση της γκρελίνης και της LH

Δώδεκα μοσχίδες φυλής Holstein (ηλικίας $14,9 \pm 0,8$ μηνών, $325,3 \pm 29,6$ kg σωματικού βάρους) χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ισάριθμες ομάδες ($n=4$): R (κανονική παράθεση τροφής, μάρτυρες), F (ζώα που υποβλήθηκαν σε στέρηση τροφής), F-F (ζώα με αρχική στέρηση τροφής, όπως στην ομάδα F, στα οποία στη συνέχεια παρατέθηκε τροφή). Η παράθεση της τροφής, υπό μορφή ολικού σιτηρεσίου (TMR), γινόταν δύο φορές την ημέρα (8 π.μ. και 8 μ.μ.) και περιελάμβανε ενσίρωμα αραβόσιτου, άχυρο σιταριού, αραβόσιτο, σογιάλευρο, πλακούντα ηλιόσπορου, βαμβακόσπορο, μελάσα, πίτυρα σιταριού, καθώς και πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Το σιτηρέσιο καταρτίσθηκε, ώστε να καλύπτονται οι διατροφικές ανάγκες των ζώων, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του NRC. Τα ζώα είχαν επί 24 ώρες ελεύθερη πρόσβαση σε πόσιμο νερό.

Οι ωοθηκικοί κύκλοι των ζώων συγχρονίστηκαν, όπως και στους προηγούμενους πειραματισμούς, με συνδυασμό PRID και PGF_{2α}. Η ανίχνευση του οίστρου διενεργήθηκε με οπτική παρατήρηση, τρεις φορές την ημέρα και η ημέρα αποδοχής της επίβασης ορίστηκε ως ημέρα 0. Την ημέρα 8 σε όλα τα ζώα τοποθετήθηκε ενδοφλέβιος καθετήρας στη σφαγίτιδα φλέβα, ώστε να επιτραπεί η συχνή δειγματοληψία, χωρίς την πρόκληση στρες. Την ίδια ημέρα τα ζώα των ομάδων F και F-F έμειναν νηστικά για 24 ώρες. Το πρωί της επόμενης ημέρας (ημέρα 9), η παράθεση της τροφής έγινε κανονικά στα ζώα της ομάδας F-F. Κατά την ημέρα 9, δύο ώρες μετά το πρωινό τάισμα (10 π.μ.) στα ζώα όλων των ομάδων, έγινε ενδομυϊκή έγχυση αναλόγου GnRH (0,25 μg kg⁻¹, buserelin), ώστε να προκληθεί προ-ωοθυλακιωρρηκτικού τύπου έκκριση LH. Ξεκινώντας από τη στιγμή της έγχυσης (χρονικό σημείο 0), καθώς και 30, 60, 90, 120, 150 και 180 λεπτά αργότερα, διενεργήθηκαν αιματοληψίες από όλα τα ζώα, σε φιαλίδια, χωρίς αντιπηκτικό. Επιπλέον, 3 δείγματα αίματος συλλέχθηκαν, αμέσως πριν την παράθεση τροφής, καθώς και 90 και 180 λεπτά μετά, σε φιαλίδια με EDTA, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν άμεσα σε θρυμματισμένο πάγο. Ο διαχωρισμός του ορού και του πλάσματος, έγινε όπως στους προηγούμενους πειραματισμούς και η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε στους -20 °C, μέχρι τη στιγμή των μετρήσεων.

Πειραματισμός 2: Αξιολόγηση της έκκρισης της γκρελίνης, κατά τη διάρκεια της περιοιστρικής περιόδου, σε αγελάδες και μοσχίδες

Στο πείραμα αυτό συμμετείχαν τρεις αγελάδες φυλής Holstein κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής (ομάδα 1) και τρεις ένηβες μοσχίδες της ίδιας φυλής (ομάδα 2). Όλα τα ζώα είχαν εκδηλώσει τουλάχιστον δύο διαδοχικούς και φυσιολογικής διάρκειας ωοθηκικούς κύκλους. Ο μέσος δείκτης σωματικής κατάστασης ήταν παρόμοιος και για τις δύο ομάδες (3,25±0,25). Οι αγελάδες βρίσκονταν στη δεύτερη γαλακτική περίοδο και συγκεκριμένα 65, 73 και 88 ημέρες μετά τον τοκετό, με μέση ημερήσια παραγωγή 37±0,7 κιλά γάλακτος, ενώ η ηλικία των μοσχίδων ήταν 14, 13,5 και 14 μηνών. Η διατροφή των ζώων περιελάμβανε ολικό σιτηρέσιο, σύμφωνα με τις απαιτήσεις τους, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω η δε παράθεση των

γευμάτων γινόταν δύο φορές την ημέρα, με χρονική διαφορά 12 ωρών. Οι ωοθηκικοί κύκλοι των ζώων συγχρονίστηκαν με τις ίδιες μεθόδους, όπως και στον προηγούμενο πειραματισμό, με τη συνδυασμένη χρήση PRID και PGF_{2α} και ακολούθησε η ανίχνευση του οίστρου. Από τη στιγμή της έγχυσης της PGF_{2α} και έως και την ημέρα 3 του κύκλου (ως ημέρα 0 ορίστηκε η ημέρα εμφάνισης του οίστρου) γινόταν αιματοληψίες ανά 12 ώρες. Η συλλογή, ο χειρισμός και η αποθήκευση των δειγμάτων αίματος έγιναν ακριβώς όπως στον προηγούμενο πειραματισμό. Αμέσως μετά τη λήψη κάθε δείγματος αίματος γινόταν προσδιορισμός της γλυκόζης και του BHBA με ειδικά διαγνωστικά τεστ (FreeStyle, Precision Neo, Glucose and Ketone αντίστοιχα, Abbot Diabetes Centre Witney, U.K.). Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -20 °C, μέχρι τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης, της οιστραδιόλης-17β και της ολικής γκρελίνης.

Εργαστηριακές αναλύσεις

Για τον προσδιορισμό των ορμονών χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη του ίδιου δείγματος, με τους ίδιους περιορισμούς που περιγράφονται στα προηγούμενα κεφάλαια.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ηλεκτροφωταύγειας (ECLIA), με τη βοήθεια εμπορικά διαθέσιμου διαγνωστικού τεστ, (ECLIA; Estradiol II, Elecsys, Roche, Mannheim, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων του τεστ έγινε με έναν αναλυτή ανοσολογικών δοκιμών (Roche Elecsys 2010). Η ευαισθησία της δοκιμής ανήλθε σε 12 pg ml⁻¹, ενώ οι διακυμάνσεις μεταξύ των δοκιμών αλλά και στην ίδια δοκιμή, ήταν 5,2% και 7,4%, αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της LH, της ολικής γκρελίνης, της κορτιζόλης και της προγεστερόνης, έγινε με τις ίδιες μεθόδους, όπως αυτές περιγράφονται σε προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής.

Στατιστική ανάλυση

Ανάλυση επιμήκων δεδομένων χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία επανειλημμένων στον χρόνο μετρήσεων. Η

δομή της μέσης τιμής επιλέχθηκε με τη χρήση ελέγχων λόγου πιθανότητας. Για να αναδειχθεί πιθανόν διαφορετική εξέλιξη στον χρόνο ανάμεσα στις διάφορες ηλικιακές ομάδες, καθώς και στις ομάδες διαφορετικού τρόπου παροχής τροφής, τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν επιδράσεις τρόπου παροχής της τροφής, ή της ηλικίας, χωρίς συνολικό σταθερό όρο. Οι επιδράσεις του χρόνου λήφθηκαν υπόψη μόνο σε σχέση με τις ομάδες τρόπου παροχής τροφής/ηλικίας. Αυτό επιτεύχθηκε με το να συμπεριληφθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του τρόπου παροχής τροφής/ηλικίας και του χρόνου. Για τον εντοπισμό πιθανής σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στις ομάδες χρησιμοποιήθηκαν F-έλεγχοι. Σε όλους τους ελέγχους η τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντική. Η σχέση της συγκέντρωσης της γκρελίνης με τον χρόνο ελέγχθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από το πείραμα II. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SAS έκδοση 9.04.

4.3. Αποτελέσματα

Πειραματισμός 1

Συγκεντρώσεις ωχρινοποιητικής ορμόνης

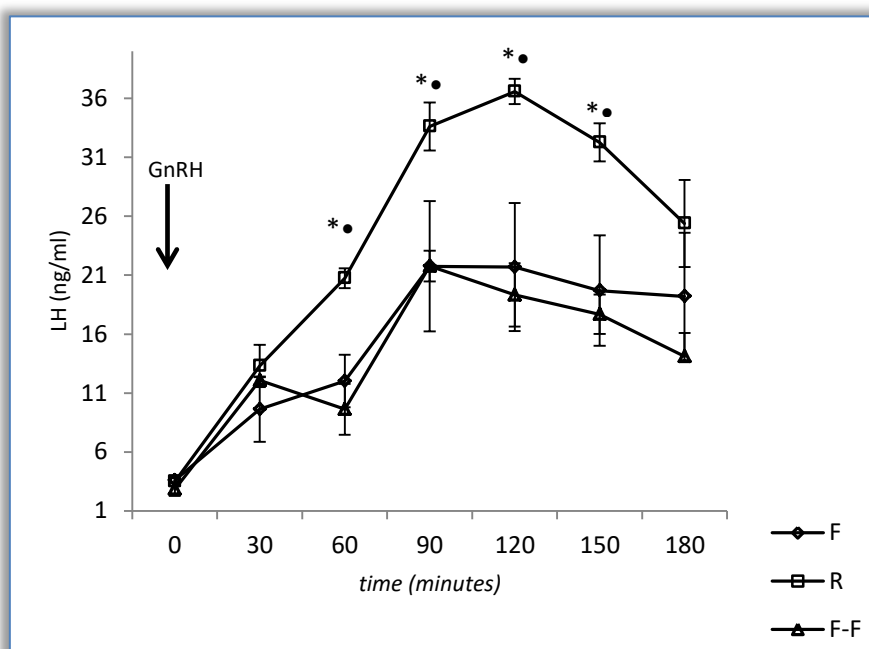
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχουν σαφείς ενδείξεις σταδιακής εξέλιξης των συγκεντρώσεων της LH στον χρόνο μεταξύ των διαφορετικών ομάδων διαφορετικής προσβασιμότητας στην τροφή, με τη μεγιστοποίηση των τιμών, σε όλες τις ομάδες, να λαμβάνει χώρα μεταξύ των χρονικών στιγμών 90 και 150 (τεστ τυχαίας αναλογίας $p < 0,0001$). Η αύξηση των συγκεντρώσεων της LH στην ομάδα R ήταν σημαντικά μεγαλύτερη αυτής των άλλων δύο ομάδων ($R > F$, $R > F-F$, $p < 0,0001$ και στις δύο περιπτώσεις).

Η χορήγηση GnRH προκάλεσε σε όλες τις ομάδες μία προ-ωοθυλακιωρρηκτικού τύπου αύξηση της συγκέντρωσης της LH. Κατά τη στιγμή της χορήγησης της GnRH (χρονικό σημείο 0), οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων της LH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων ($3,5 \pm 0,6 \text{ ng ml}^{-1}$, $3,4 \pm 0,1 \text{ ng ml}^{-1}$, $2,9 \pm 1,1 \text{ ng ml}^{-1}$, για τις ομάδες R, F και F-F, αντίστοιχα, $p > 0,05$). Η προκαλούμενη από την GnRH αύξηση

της συγκέντρωσης της LH, εκφρασμένη ως AUC ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα R των ζώων σε σύγκριση με εκείνη των ομάδων F και F-F ($166,7 \pm 8,3$, $94,0 \pm 6,5$ και $89,7 \pm 9,4$, για τις ομάδες R, F και F-F, αντίστοιχα, $p < 0,01$). Κατά το χρονικό σημείο 30, η συγκέντρωση της LH ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη του χρονικού σημείου 0, μόνο στα ζώα της ομάδας R ($3,5 \pm 0,6$ ng ml⁻¹ και $13,3 \pm 3,4$ ng ml⁻¹, για τις χρονικές στιγμές 0 και 30, αντίστοιχα, $p < 0,05$). Κατόπιν, σε κάθε χρονική στιγμή, οι συγκεντρώσεις της LH όλων των ομάδων ήταν σταθερά υψηλότερες από εκείνες κατά τη χρονική στιγμή 0 ($p < 0,05$). Επιπλέον, τις χρονικές στιγμές 60, 90, 120 και 150, οι συγκεντρώσεις της LH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα R, σε σύγκριση με τις ομάδες F και F-F ($p < 0,003$). Σε καμία χρονική στιγμή, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) στις συγκεντρώσεις της LH, μεταξύ των ομάδων F και F-F (διάγραμμα 11).

Διάγραμμα 11.

Συγκεντρώσεις ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) στον ορό του αίματος, μετά από ενδομυϊκή έγχυση αναλόγου GnRH (βέλος), σε ζώα μάρτυρες (ομάδα R), νηστικά για 24 ώρες (ομάδα F) και νηστικά για 24 ώρες, τα οποία στη συνέχεια ταΐστηκαν (ομάδα F-F).



Οι συγκεντρώσεις της LH παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Η σήμανση υποδηλώνει τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,003$) (• για συγκρίσεις ανάμεσα στις ομάδες R και F-F και * για συγκρίσεις ανάμεσα στις ομάδες R και F).

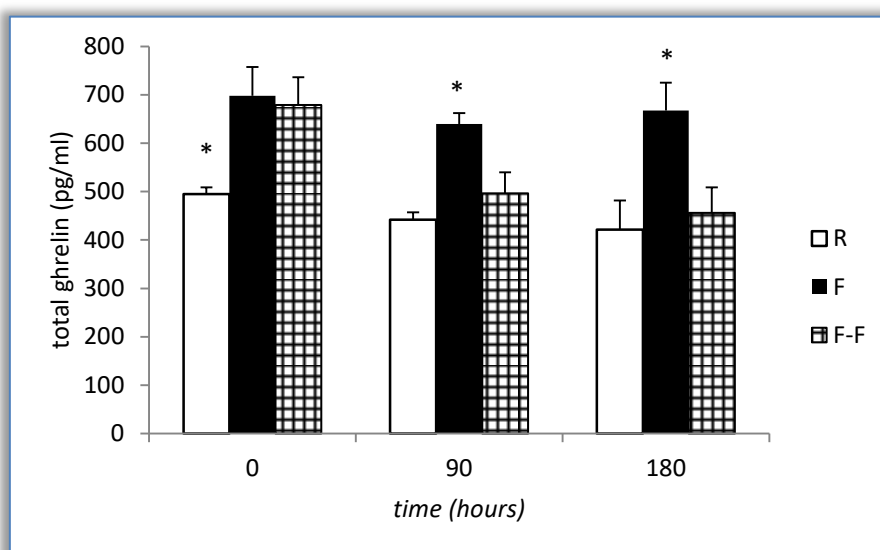
Συγκεντρώσεις γκρελίνης

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις σημαντικής σταδιακής αύξησης στον χρόνο μεταξύ των ομάδων διαφορετικής προσβασιμότητας στην τροφή και συγκεκριμένα μία γραμμική τάση (R: $T_0 > T_{90}$, F-F: $T_0 > T_{180}$, Τεστ τυχαίας αναλογίας, $p < 0,003$). Η εφαρμογή F-τεστ, απέδωσε σημαντικές διαφορές στην αύξηση των συγκεντρώσεων της γκρελίνης μεταξύ των ομάδων διαφορετικής προσβασιμότητας στην τροφή. Ειδικότερα, υπήρξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες R και F ($R < F$, $p < 0,003$), καθώς και ανάμεσα στις ομάδες R και F-F ($R < F-F$, $p < 0,04$).

Κατά το χρονικό σημείο 0 οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης ήταν στο χαμηλότερο επίπεδο στα ζώα της ομάδας R ($495,0 \pm 13,6 \text{ pg ml}^{-1}$, $698,5 \pm 59,6 \text{ pg ml}^{-1}$ και $679,5 \pm 57,1 \text{ pg ml}^{-1}$, για τις ομάδες R, F, και F-F, αντίστοιχα, $p < 0,02$), ενώ δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων F και F-F ($p > 0,05$). Τις χρονικές στιγμές 90 και 180, η συγκέντρωση της γκρελίνης ήταν στο υψηλότερο σημείο στην ομάδα F ($p < 0,02$), ενώ καμιά σημαντική διαφορά δεν διαπιστώθηκε ($p > 0,05$) ανάμεσα στις ομάδες R και F-F (διάγραμμα 12).

Διάγραμμα 12.

Συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, σε μοσχίδες μάρτυρες (ομάδα R, $n=4$), σε νηστικές για 24 ώρες (ομάδα F, $n=4$) και σε νηστικές για 24 ώρες, οι οποίες στη συνέχεια ταΐστηκαν (ομάδα F-F, $n=4$).



Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε χρονικό σημείο, οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p < 0,02$) ανάμεσα στις ομάδες.

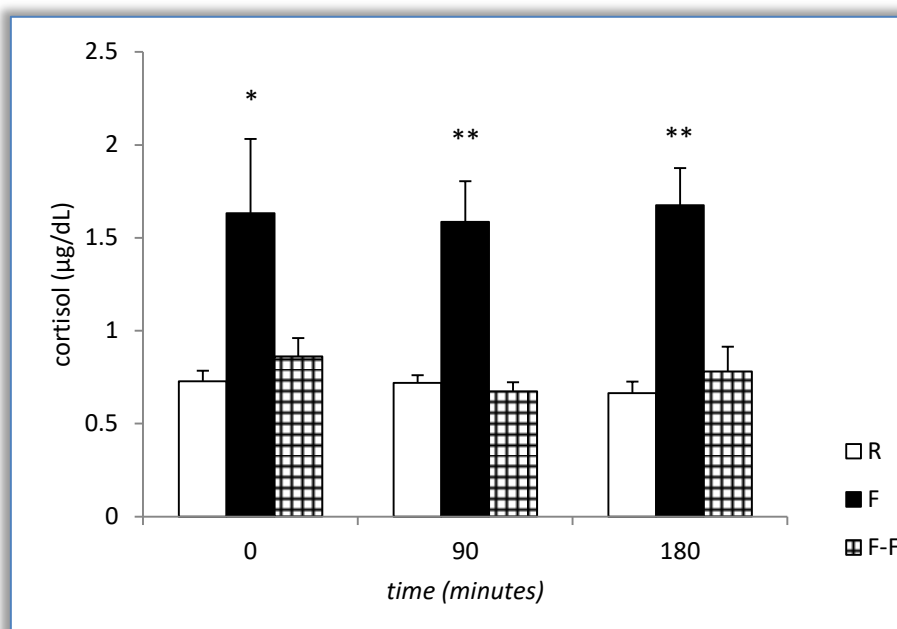
Συγκεντρώσεις κορτιζόλης

Δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στον χρόνο (τεστ τυχαίας αναλογίας $p>0,07$), σε καμία από τις τρεις κατηγορίες προσβασιμότητας στην τροφή. Η εφαρμογή F-τεστ απέδωσε σημαντικές διαφορές, στην ελάχιστη αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης μεταξύ των ομάδων F και R ($F>R$, $p<0,0005$) και F και F-F ($F>F-F$, $p<0,005$), ενώ δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων R και F-F ($p>0,25$).

Κατά τη χρονική στιγμή 0, η συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν υψηλότερη ($p<0,05$) στην ομάδα F ($1,6\pm0,3\mu\text{g dl}^{-1}$) σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας R ($0,7\pm0,05\mu\text{g dl}^{-1}$) και εκείνη της ομάδας F-F ($0,9\pm0,1\mu\text{g dl}^{-1}$) και παρέμεινε υψηλότερη, κατά τις χρονικές στιγμές 90 και 180 ($p<0,01$). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ($p>0,05$), ανάμεσα στις ομάδες R και F-F (διάγραμμα 13).

Διάγραμμα 13.

Συγκεντρώσεις κορτιζόλης στον ορό του αίματος, σε μοσχίδες μάρτυρες (ομάδα R, $n=4$), σε νηστικές για 24 ώρες (ομάδα F, $n=4$) και σε νηστικές για 24 ώρες, οι οποίες στη συνέχεια ταΐστηκαν (ομάδα F-F, $n=4$).



Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε χρονικό σημείο, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές (* $p<0,05$ και ** $p<0,01$), ανάμεσα στις ομάδες.

Πειραματισμός 2

Η εκτίμηση της καμπύλης απόκλισης αποκάλυψε μία ισχυρή ($F: 26,258, p < 0,0005, df: 39$) συσχέτιση του χρόνου με τη συγκέντρωση της γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος των αγελάδων (πίνακας 1), αλλά όχι των μοσχίδων.

Πίνακας 1.

Η εκτίμηση της καμπύλης απόκλισης των συγκεντρώσεων της γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος των αγελάδων σε συσχέτιση με τον χρόνο (λεπτά).

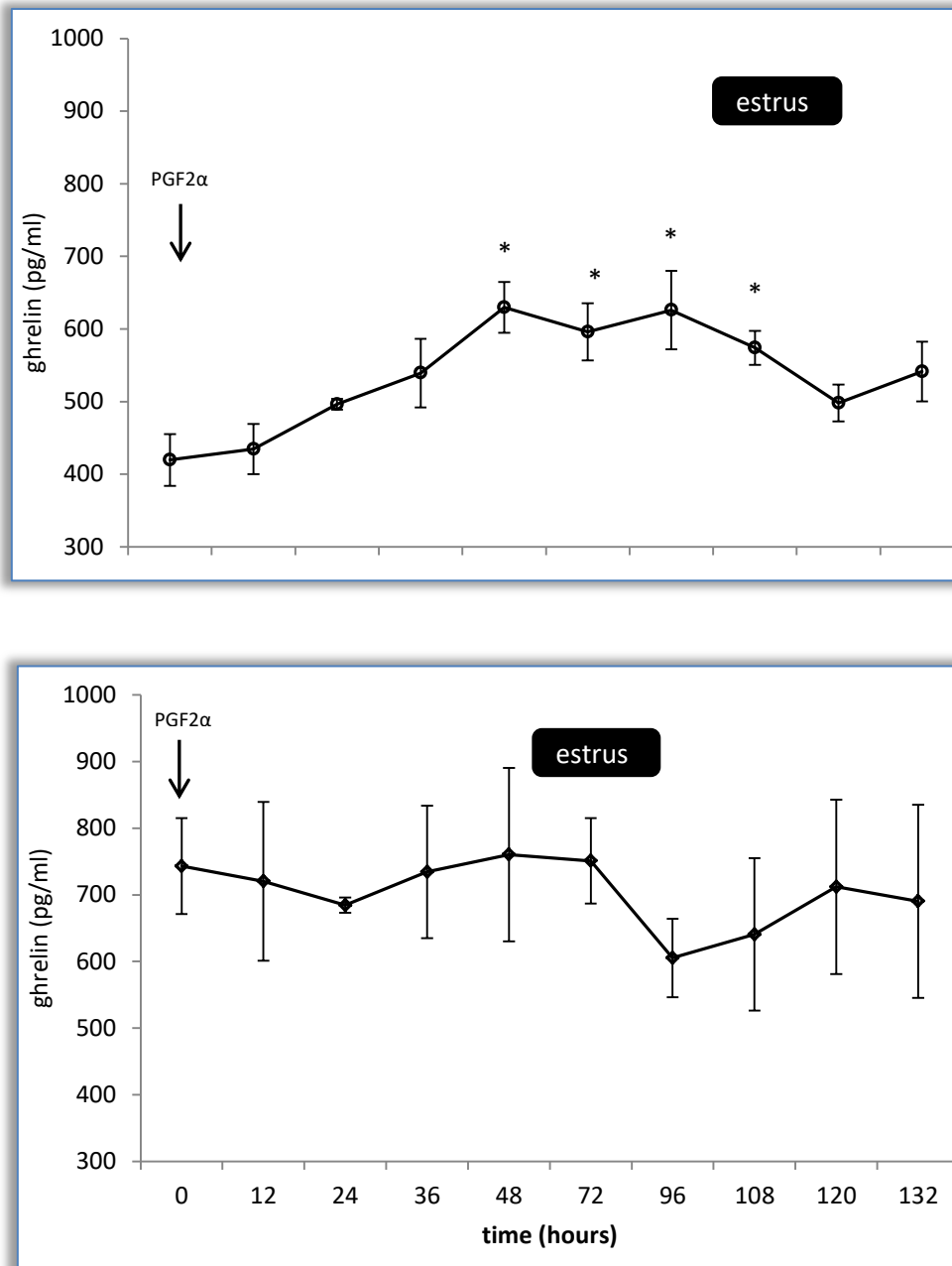
Σταθερά	$399,224 \pm 20,907$	t: 19,095
Χρόνος	$5,517 \pm 0,810$	t: 6,807
(Χρόνος) ²	$-0,036 \pm 0,006$	t: -6,009

Ως απόκριση στην έγχυση της $\text{PGF}_{2\alpha}$, οι μοσχίδες εκδήλωσαν οίστρο 24 ώρες νωρίτερα από τις αγελάδες. Κατά τη στιγμή της έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$ η μέση συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p = 0,013$) στις μοσχίδες ($726,8 \pm 72,6 \text{ pg ml}^{-1}$) από ότι στις αγελάδες ($419,7 \pm 35,5 \text{ pg ml}^{-1}$). Στις αγελάδες, 24 ώρες πριν από την εμφάνιση του οίστρου, η συγκέντρωση της γκρελίνης ήταν σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση κατά την έγχυση της $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p = 0,014$). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης διήρκησαν έως και 12 ώρες μετά το τέλος του οίστρου (διάγραμμα 14). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης στις μοσχίδες ($p > 0,05$).

Κατά την ημέρα του οίστρου, οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης δύο ημερήσιων δειγμάτων από αγελάδες και μοσχίδες ήταν $600,0 \pm 70,9 \text{ pg ml}^{-1}$ και $755,7 \pm 91,3 \text{ pg ml}^{-1}$, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές, ήταν 42,9% και 1,7% υψηλότερες από εκείνες κατά την ημέρα έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$, για τις αγελάδες και τις μοσχίδες, αντίστοιχα.

Διάγραμμα 14.

Συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης στο πλάσμα του αίματος, ύστερα από ενδομυϊκή έγχυση $\text{PGF}_{2\alpha}$ (βέλος), σε αγελάδες (n=3, επάνω) και μοσχίδες (n=3, κάτω).



Οι συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Σε κάθε διάγραμμα, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ανάμεσα στο σημασμένο χρονικό σημείο και στο χρονικό σημείο 0 (* $p < 0.05$).

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης-17β, κατά τη στιγμή της έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$, καθώς και κατά την ημέρα του οίστρου, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ($p>0,05$).

Την ημέρα έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$, η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p=0,012$) στις μοσχίδες από ότι στις αγελάδες, ενώ δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων την ημέρα του οίστρου ($p>0,05$).

Οι συγκεντρώσεις του ΒΗΒΑ ήταν σημαντικά υψηλότερες στις αγελάδες τόσο κατά την έγχυση της $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p=0,016$), όσο και κατά την ημέρα του οίστρου ($p=0,037$). Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης, της οιστραδιόλης-17β, της γλυκόζης και του ΒΗΒΑ παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2.

Συγκεντρώσεις προγεστερόνης, οιστραδιόλης-17β, γλυκόζης και ΒΗΒΑ στο αίμα τριών αγελάδων (ομάδα 1) και τριών μοσχίδων (ομάδα 2), κατά την ημέρα ενδομυϊκής έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ημέρα 9 του ωοθηκικού κύκλου) και κατά την ημέρα αποδοχής της επίβασης (ημέρα του οίστρου).

	Ημέρα έγχυσης της $\text{PGF}_{2\alpha}$		Ημέρα του οίστρου	
	<u>Ομάδα 1</u>	<u>Ομάδα 2</u>	<u>Ομάδα 1</u>	<u>Ομάδα 2</u>
Προγεστερόνη (ng ml^{-1})	5,3±1,0	4,8±0,3	0,4±0,2	0,5±0,1
Οιστραδιόλη-17β (pMol ml^{-1})	6,6±2,3	5,7±1,4	17,9±2,6	20,9±3,4
Γλυκόζη (mg dl^{-1})	56,5±3,8 ²	66,7±2,8 ¹	62,2±5,0	69,8±3,4
ΒΗΒΑ (mM)	0,72±0,1 ¹	0,5±0,1 ²	0,8±0,2 ¹	0,4±0,1 ²

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης, της οιστραδιόλης-17β, της γλυκόζης και του ΒΗΒΑ παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. Τα δεδομένα της ίδιας ημέρας, στην ίδια σειρά, με διαφορετικούς εκθέτες, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).

4.4. Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό, διερευνήθηκε ο ρόλος της ενδογενούς απελευθέρωσης ολικής γκρελίνης στην προκαλούμενη από την GnRH έκκριση της LH, υπό διαφορετικές συνθήκες γαστρικού κορεσμού. Ακολούθως, μελετήθηκαν οι πιθανές διαφορές στις συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης, κατά τη διάρκεια της περιοιστρικής περιόδου, ανάμεσα σε αγελάδες και μοσχίδες. Αποδείχθηκε, για πρώτη φορά, ότι η προκαλούμενη, από μικρής διάρκειας στέρηση τροφής, αύξηση των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης στο αίμα, είναι ικανή να μειώσει το βαθμό έκκρισης της LH απευθείας από την υπόφυση. Επιπλέον, η περιοιστρική περίοδος των αγελάδων χαρακτηρίζεται από αυξημένες συγκεντρώσεις ολικής γκρελίνης, κάτι που δεν διαπιστώθηκε στις μοσχίδες.

Πειραματισμός 1

Η στέρηση τροφής αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα καταπόνησης, στον οποίο το ζώο αντιδρά αυξάνοντας την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών (Fürl et al. 1993). Στον 1^ο πειραματισμό του κεφαλαίου αυτού διαπιστώθηκε ότι στα ζώα της ομάδας F η κορτιζόλη παρέμεινε σε υψηλές συγκεντρώσεις καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου των μετρήσεων, ενώ στα ζώα της ομάδας F-F, οι συγκεντρώσεις της επέστρεψαν στα βασικά επίπεδα σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά από την κατανάλωση τροφής. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές (Mudroň et al. 2005) και επιβεβαιώνουν ότι οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στο περιφερικό αίμα συνδέονται, πρωτίστως, με την ένταση του παράγοντα καταπόνησης -της πείνας στην προκειμένη περίπτωση- και σε μικρότερο βαθμό, με τη συνολική ενεργειακή κατάσταση του ζώου.

Υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που αποδεικνύουν ότι σε αρκετά είδη ζώων, η συγκέντρωση της ακυλιωμένης γκρελίνης του αίματος αυξάνεται πριν το γεύμα, λειτουργώντας ως διεγέρτης της όρεξης και συντόμως, μετά την κατανάλωση τροφής επιστρέφει στα βασικά επίπεδα (Wren et al. 2001a, Sugino et al. 2002, Harrison et al. 2008). Στις αγελάδες η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης, η οποία αποτελεί το άθροισμα ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης

μορφής, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νηστείας, με παρόμοιο τρόπο με εκείνον της ακυλιωμένης μορφής (Börner et al. 2013). Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν με τα αποτελέσματα του πρώτου πειραματισμού, καθώς οι διαφορές στη συγκέντρωση της γκρελίνης μεταξύ των ομάδων F-F και R, εκμηδενίστηκαν εντός μίας ώρας από την παράθεση τροφής, ενώ η συγκέντρωση της γκρελίνης στα νηστικά ζώα (ομάδα F) παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου των δειγματοληψιών.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ολικής γκρελίνης προκάλεσαν μία σημαντική μείωση της προκαλούμενης από την GnRH έκκριση της LH. Μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών μετά από χορήγηση GnRH, δεν επηρεάστηκε από συνεχή έκθεση σε μη-ακυλιωμένη γκρελίνη, ωστόσο η γκρελίνη παρεμπόδιζε την έκκριση της LH, ως ανταπόκριση στη χορήγηση ανταγωνιστή των οπιοειδών (ναλοξόνη), πιθανότατα, μέσω κεντρικής δράσης στον υποθάλαμο (Lanfranco et al. 2008). Είναι γνωστό ότι η κεντρική απελευθέρωση της GnRH αναστέλλεται από ένα πολύπλοκο σύστημα οπιοειδών πεπτιδίων και των υποδοχέων τους (Estienne et al. 2009). Σε αντίθεση, μία εφάπαξ μεγάλη δόση γκρελίνης (bolus) είχε ουδέτερα αποτελέσματα στην έκκριση της LH (Muller et al. 2002), ενώ η συνεχής ενδοφλέβια έγχυση γκρελίνης κατέστειλε σημαντικά την έκκριση της LH (Kluge et al. 2012). Από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου αποδείχθηκε ότι 4 επανειλημμένες εγχύσεις ανθρώπινης ακυλιωμένης γκρελίνης περιόρισαν την προκαλούμενη από την GnRH επεισοδική έκκριση της LH σε πρόβατα (Donolou et al. 2013). Αυτές οι διαφορές, είναι πιθανόν να σχετίζονται με διαφορές ανάμεσα στα είδη ή/και στον τρόπο χορήγησης (μία ή πολλαπλές δόσεις). Έτσι φαίνεται ότι η μεγαλύτερης διάρκειας έκθεση σε μέτρια αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης καταστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό την έκκριση της LH σε σύγκριση με την έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για μικρότερο χρονικό διάστημα. Η παραπάνω υπόθεση έχει ακόμη στηριχθεί στα αποτελέσματα της ομάδας F-F, στα ζώα της οποίας, η έναρξη της αύξησης των συγκεντρώσεων της LH συνέπεσε με τις υψηλές συγκεντρώσεις της γκρελίνης που πολύ σύντομα μετά την κατανάλωση τροφής μειώθηκαν στα βασικά επίπεδα. Ο πειραματικός σχεδιασμός τόσο της παρούσας μελέτης, όσο και προηγούμενης του Εργαστηρίου (Donolou et

al. 2013), παρέχουν επαρκή στοιχεία ότι η ικανότητα της γκρελίνης να ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, δεν αφορά αποκλειστικά τον υποθάλαμο, αλλά η δράση της επεκτείνεται άμεσα και στην υπόφυση. Οι διαφορές στη συγκέντρωση της LH μεταξύ των διαφόρων ομάδων καταγράφηκαν, ενώ όλα τα ζώα είχαν δεχθεί την ίδια δόση του συνθετικού αναλόγου της υποθαλαμικής GnRH. Έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι η γκρελίνη επηρεάζει αρνητικά την έκκριση της LH, δρώντας πρωταρχικά σε επίπεδο υποθαλάμου (García et al. 2007), ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός επίδρασης δεν έχει πλήρως αποκωδικοποιηθεί. Στα πιθανά σενάρια περιλαμβάνεται η εμπλοκή του NPY που εμφανίζεται να έχει ανασταλτικό ρόλο στην έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών στα μηρυκαστικά (Barker-Gibb et al. 1995), ή/και η αναστολή της κισπεπτίνης, η οποία ρυθμίζει την απελευθέρωση της GnRH από τους νευρώνες του υποθαλάμου (Vulliémoz et al. 2008, Forbes et al. 2009). Όπως έχει προαναφερθεί, στον εγκέφαλο ενήλικων προβάτων, η γκρελίνη και ο GHSR-1α έχουν ανιχνευθεί με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας σε ορισμένα, πιθανότατα γοναδοτρόπα, κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, με τον GHSR-1α να εμφανίζει ξεκάθαρη κυτταροπλασματική και περιυψηνική χρώση (Miller et al. 2005). Επιπλέον, οι *Kiss1* και *Kiss1r* εκφράζονται στην υπόφυση (Gutiérrez-Pascual et al. 2007, Amstalden et al. 2014) και έχει αποδειχθεί η ικανότητα της κισπεπτίνης να προκαλεί την έκκριση της LH (Castellano et al. 2006, Smith et al. 2011). Προγενέστερες μελέτες, εστίασαν στην ικανότητα της γκρελίνης να περιορίζει την έκκριση της LH, καταστέλλοντας άμεσα τις επιδράσεις της κισπεπτίνης στον εγκέφαλο. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια νηστείας, η χορήγηση γκρελίνης μειώνει την έκφραση του mRNA της κισπεπτίνης στον πρόσθιο παρακουλιακό πυρήνα (Forbes et al. 2009), χωρίς να επηρεάζει το mRNA *Kiss1* στον τοξοειδή πυρήνα. Σύμφωνα με την παραπάνω παρατήρηση, φαίνεται ότι η γκρελίνη έχει την ιδιότητα να στοχεύει συγκεκριμένους νευρώνες κισπεπτίνης, ώστε να καταστέλλει την έκκριση της LH. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η γκρελίνη μειώνει τη διάρκεια δράσης της κισπεπτίνης-10 στην έκκριση της LH (Martini et al. 2006). Στην ομάδα F-F, η χορήγηση βουζερελίνης έλαβε χώρα σε χρόνο, όπου οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης ήταν ήδη αρκετά αυξημένες. Ωστόσο, 90 λεπτά αργότερα η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης επανήλθε στα βασικά επίπεδα. Συνεπώς, μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι επιδράσεις των αυξημένων συγκεντρώσεων

γκρελίνης στα μονοπάτια που ελέγχουν την έκκριση της LH, συνεχίζουν να υφίστανται και μετά την επιστροφή των συγκεντρώσεων γκρελίνης στις βασικές τιμές. Πρόσφατα, ερευνητές απέδειξαν ότι εγχύσεις υδροχλωρικής δοπαμίνης, στην τρίτη κοιλία του εγκεφάλου ποντικών, αύξησαν σημαντικά την έκκριση γκρελίνης με μία δόσο-εξαρτώμενη αντίδραση, ενώ, αντιθέτως *in* εγχύσεις κισπεπτίνης προκάλεσαν σημαντική καταστολή. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από την καταστολή του μονοπατιού της κισπεπτίνης/GRP54, έδειξαν ότι η δοπαμίνη πιθανόν διεγείρει την έκκριση γκρελίνης, μέσω της μερικής μείωσης της δράσης της κισπεπτίνης στον υποθάλαμο (Sadeghzadeh et al. 2018). Πιστεύεται ότι οι δράσεις της γκρελίνης στην έκκριση της LH, ασκούνται, κυρίως, μέσω της ρύθμισης των νευρώνων κισπεπτίνης.

Παρά τον αξιοσημείωτο όγκο συσσωρευμένης πληροφορίας, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της γκρελίνης στους νευρώνες της κισπεπτίνης, του NPY, καθώς και στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, δεν έχει ακόμη πλήρως εξακριβωθεί.

Πειραματισμός 2

Ένα ιδιαίτερος ενδιαφέρον εύρημα που προέκυψε από τον δεύτερο πειραματισμό του παρόντος κεφαλαίου, είναι ότι κατά τη διάρκεια του οίστρου, το πρότυπο έκκρισης της γκρελίνης διέφερε μεταξύ αγελάδων σε γαλακτοπαραγωγή και μοσχίδων της ίδιας φυλής. Οι αγελάδες παρουσίαζαν προοδευτική αύξηση και ταυτόχρονα αξιοσημείωτη ομοιομορφία στις συγκεντρώσεις της γκρελίνης, ενώ στις μοσχίδες παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της γκρελίνης, χωρίς την ύπαρξη προφανούς προτύπου έκκρισης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά στις ώριμες αγελάδες, έρχονται σε πλήρη συμφωνία με εκείνα των Honig και συνεργατών (2016), οι οποίοι ανέφεραν αυξημένες συγκεντρώσεις ακυλιωμένης και ολικής γκρελίνης, κατά την προ-ωοθυλακιορρηκτική περίοδο σε πολύτοκα ζώα, αλλά όχι σε πρωτότοκα. Η περιοριστική περίοδος χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση οιστρογόνων, τα οποία εκκρίνονται από το προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο. Αν και από προηγούμενες μελέτες, καταγράφηκε μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ οιστρογόνων και γκρελίνης (Clegg et al. 2007, Fang et al. 2012), από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν μελέτες που να

ποσοτικοποιούν τη συγκέντρωση της γκρελίνης σε αγελάδες και μοσχίδες, κατά τη διάρκεια του οίστρου. Στους ανθρώπους, έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις γκρελίνης δεν επηρεάζονται ούτε από εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, ούτε από ωοθηκεκτομή (Daforoulis et al. 2010). Στα ποντίκια, έχει αποδειχθεί η ανασταλτική επίδραση της οιστραδιόλης-17β στη γκρελίνη, διότι η χορήγηση της γκρελίνης διέγειρε την πρόσληψη τροφής σε αρσενικά και ωοθηκεκτομημένα θηλυκά ζώα, αλλά όχι σε αρσενικά ποντίκια, στα οποία είχαν χορηγηθεί οιστρογόνα, ούτε, επίσης, και σε ακέραια θηλυκά. Όταν σε ωοθηκεκτομημένα ή ακέραια θηλυκά ποντίκια χορηγήθηκε οιστραδιόλη-17β, η χορήγηση γκρελίνης είχε ισχυρά ορεξιογόνες επιδράσεις, κατά τις ημέρες χαμηλής συγκέντρωσης οιστρογόνων (δίοιστρος), αλλά είχε ουδέτερη επίδραση, κατά τη διάρκεια του οίστρου και του πρόοιστρου δηλαδή, σε περιόδους με υψηλές συγκεντρώσεις οιστρογόνων (Clegg et al. 2007). Σε αντίθεση, έχει αποδειχθεί ότι κατά τον οίστρο η πλειονότητα των αγελάδων παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη πρόσληψη ξηράς ουσίας (Reith et al. 2014). Στην παρούσα μελέτη, οι αγελάδες κατά τον οίστρο παρουσίαζαν, όπως αναμενόταν, μειωμένη πρόσληψη ξηράς ουσίας και γαλακτοπαραγωγής (τα στοιχεία δεν παρουσιάζονται), παρά τις αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης. Συνεπώς, για την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων, θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης-17β είναι ικανές να αμβλύνουν τις ορεξιογόνες δράσεις της γκρελίνης. Ωστόσο, κάτι αντίστοιχο δεν διαπιστώθηκε στις μοσχίδες, παρόλο που οι συγκεντρώσεις οιστραδιόλης-17β ήταν αυξημένες, όπως στις αγελάδες, με αποτέλεσμα να μην επηρεαστούν ούτε οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης, αλλά ούτε και η πρόσληψη τροφής.

Επομένως, άλλοι άγνωστοι, μέχρι στιγμής παράγοντες, εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων ή/και στο ρόλο της γκρελίνης κατά τον οίστρο, μεταξύ αγελάδων και μοσχίδων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι παράγοντες συσχετιζόμενοι με τη γαλακτοπαραγωγή ή τη ρύθμιση των οδών κατανομής της προσλαμβανόμενης ενέργειας, καθοδηγούν τη διαφοροποίηση αυτή. Η προλακτίνη είναι ένας πιθανός υποψήφιος παράγοντας, καθώς ρυθμίζεται από τη γκρελίνη (Messini et al. 2009, 2011), έχει ζωτικής σημασίας ρόλο στην ανάπτυξη του μαστικού αδένος στις μοσχίδες (Knight 2001), οι συγκεντρώσεις της

μεγιστοποιούνται κατά τη διάρκεια περιόδων, στις οποίες ο μαστικός αδένας είναι αδρανής (Hart et al. 1978) και λίαν προσφάτως έχει αποδειχθεί ο ρόλος της ως γαλακτοποιητικός παράγοντας στα μηρυκαστικά (Lacasse et al. 2016). Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα, μπορεί να υποτεθεί ότι ανεξάρτητοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση των δράσεων της γκρελίνης σε διαφορετικές ηλικιακές περιόδους και φάσεις γαλακτοπαραγωγής.

Για την πλήρη αποσαφήνιση πιθανόν ορμονικών αλληλεπιδράσεων που ελέγχουν τα διαφορετικά πρότυπα έκκρισης της γκρελίνης, κατά την περιοιστρική περίοδο, μεταξύ αγελάδων και μοσχίδων, είναι επιτακτική η διενέργεια στοχευμένης περαιτέρω ερευνητικής προσπάθειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Οι επιδράσεις της γκρελίνης στην ενεργοποίηση των μονοπατιών των Akt1 και ERK1/2, κατά τη διάρκεια της in vitro ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών

5.1. Εισαγωγή

Η *in vivo* ωρίμανση ωαρίων βοοειδών και προβάτων είναι μία αργή διαδικασία, κατά τη διάρκεια της οποίας η μετάβαση από το στάδιο της διπλοταινίας σε αυτό της GVBD, απαιτεί *de novo* σύνθεση αρκετών πρωτεϊνών (Gordon 2003). Σε συνθήκες *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες που προϋπάρχουν στο ωάριο, μπορούν να υποστηρίξουν τη Μείωση μέχρι τη φάση της συμπύκνωσης της χρωματίνης, η οποία ξεκινάει 6 ώρες μετά την εισαγωγή των ωαρίων στην *in vitro* ωρίμανση, μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα MPF (Sirard et al. 1989, Fissore et al. 1996). Η ενεργοποίηση του MPF συμβαίνει είτε αυτόματα, είτε ύστερα από την επίδραση εξωγενών ουσιών, όπως οι αυξητικοί παράγοντες ή οι ορμόνες που αποτελούν συστατικά του υποστρώματος ωρίμανσης. Η ενεργοποίηση του MPF προάγει τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνικών κινασών που εκφράζονται στο ωάριο και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο της ωρίμανσης του ωαρίου, μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται οι MAPK κινάσες ERK1/ERK2 (γνωστές και ως MAPK3 και MAPK1), οι Jun N-terminal κινάσες JNK1/2, η MAP κινάση p38 (γνωστή και ως MAPK14) και η AKT (γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B) (Vigneron et al. 2004, Salhab et al. 2011).

Η υπεροικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από τις MAPK, είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η ενεργοποίησή τους ρυθμίζει πολλούς πρωτεϊνικούς στόχους στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και επηρεάζει πολλές λειτουργίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση

Το κεφάλαιο αυτό δημοσιεύθηκε ως πλήρες άρθρο στο περιοδικό: Zygote, 25(2): 183-189, 2017

και απόπτωση, το σχηματισμό της πυρηνικής μεμβράνης, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, την αναδιοργάνωση των μικροσωληναρίων και τον τρόπο έκφρασης πολλών γονιδίων (Torner et al. 2001, Lee and McCubrey 2002, Bai et al. 2012). Το μονοπάτι των MAP κινασών, το οποίο έχει μελετηθεί σε μεγαλύτερη έκταση, είναι το βιοχημικό μονοπάτι Raf-MEK-ERK (Lee and McCubrey 2002). Σχετικά πρόσφατα, οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα (Extracellular Signal Regulated Kinases, ERKs) ταυτοποιήθηκαν ως μία νέα οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών, με δράση που αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rossomando et al. 1989, Boulton et al. 1990, 1991, Payne et al. 1991). Οι μελέτες που ακολούθησαν συνέβαλαν στην ταυτοποίηση των ενεργοποιών των ERK, την οικογένεια κινασών MEK (MAP/ERK Kinase). Οι MEK είναι κινάσες διπλής ειδικότητας που έχουν την ικανότητα φωσφορυλίωσης τόσο θέσεων σερίνης/θρεονίνης, όσο και τυροσίνης στις MAP κινάσες (Crews et al. 1992, Kosako et al. 1992, Seger et al. 1992). Μία κινάση υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των MEK, είναι η εξειδικευμένη πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που σχετίζεται με ογκογένεση από ρετροϊό (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, Raf) (Dent et al. 1992, Kyriakis et al. 1992). Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών αυτών, παρέχει διάφορα ερεθίσματα στον πυρήνα των κυττάρων, καθένα από τα οποία συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (McCubrey et al. 2000). Η ομάδα των MAP περιλαμβάνει, εκτός από την οικογένεια των ERK, την οικογένεια των κινασών p38 και την οικογένεια των κινασών JNK (c-Jun N-terminal), επίσης, γνωστές και ως πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από καταστάσεις στρες (Schaeffer and Weber 1999).

Οι ERK1/2 (ισομορφές ERK1 με 44 kDa και ERK2 με 42kDa), οι οποίες αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας των MAPK, εκφράζονται σε μη-ώριμα ωάρια θηλαστικών και μοιράζονται πολλές, αν όχι όλες τις λειτουργίες τους (Lloyd 2006). Μολονότι η συμμετοχή των δύο κινασών στις διάφορες βιολογικές διεργασίες έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, από τη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι η ERK2 έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο από ό,τι η ERK1. Η ακολουθία των ERK1 και ERK2 διαφέρει σε μεγαλύτερο βαθμό στο ίδιο είδος, από ό,τι σε διαφορετικά είδη (Roskoski 2012). Η φωσφορυλίωση των ERK1/2, ξεκινάει στη Μείωση, περί την GVBD, αλλά ο ακριβής χρόνος της ενεργοποίησης διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα

είδη. Στα ωάρια ποντικών και προβάτων, η φωσφορυλίωση της ERK λαμβάνει χώρα, μετά το στάδιο της GVBD, ενώ στα ωάρια χοίρων και βοοειδών αυτό συμβαίνει, κατά τη διάρκεια του παραπάνω σταδίου (Torner et al. 2001, Bai et al. 2012). Όλα τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι οι κυτταρικοί διεγέρτες του μονοπατιού ERK1/2 οδηγούν σε μία παράλληλη ενεργοποίηση τόσο του ERK1, όσο και του ERK2 (Lefloch et al. 2009). Το γονίδιο *erk1* είναι επουσιώδες για την ανάπτυξη των κυοφορούντων εμβρύων ποντικών, αντιθέτως η αφαίρεση του *erk2* οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο, καθώς αναφέρθηκε αδυναμία ανάπτυξης του μεσοδέρματος (Yao et al. 2003). Σε ποντίκια, με έλλειψη μόνο του *erk2*, η δημιουργία αγγείωσης του πλακούντα (Hatano et al. 2003), όπως, επίσης, και η ανάπτυξη της εμβρυϊκής τροφοβλάστης καθυστερεί σημαντικά (Saba-El-Leil et al. 2003). Αμφότερες οι καταστάσεις οδηγούν σε εμβρυϊκό θάνατο και αποδεικνύουν ότι η δράση της ERK1 δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσει την έλλειψη της ERK2. Οι Lefloch και συνεργάτες (2008), μετά από πειραματισμούς σε ποντίκια, απέδειξαν ότι κανένα ζώο δεν δύναται να επιζήσει μόνο με ένα *erk* αλληλόμορφο γονίδιο, αντιθέτως ζώα με δύο *erk2* αλληλόμορφα ή με ένα αλληλόμορφο *erk1* και ένα *erk2*, είναι σε θέση να επιβιώσουν. Εφόσον η έκφραση της ERK2 στα περισσότερα κύτταρα υπερέχει αυτής της ERK1, τα ευρήματα της σοβαρής επίδρασης που έχει η παντελής έλλειψη έκφρασης της ERK2, αποδόθηκαν περισσότερο στο ρόλο της μείωσης της ERK στο σύνολό της, παρά στη μειωμένη έκφραση μίας πρωτεΐνης με μοναδικές βιολογικές λειτουργίες (Lefloch et al. 2008).

Οι Fissore και συνεργάτες (1996) μελετώντας την κινητική της H1 κινάσης ιστόνης και των MAP κινασών σε ωάρια βοοειδών, απέδειξαν την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των δύο αυτών κινασών. Η διαδικασία ενεργοποίησης εξελίσσεται αργά κατά τις πρώτες 6 ώρες της ωρίμανσης και εν συνεχεία αυξάνεται σταθερά μέχρι την 15^η ώρα. Σε συμφωνία με την προηγούμενη έρευνα, αποδείχθηκε ότι η φωσφορυλίωση της κινάσης ERK1/2, συμβαίνει μεταξύ 6^{ης} και 8^{ης} ώρας και παραμένει στην ενεργή μορφή για 24 ώρες (Verlhac et al. 1994, Torner et al. 2001). Κατά την ίδια χρονική στιγμή ενεργοποιούνται και άλλες κινάσες, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των MPF και MAP κινασών και δρώντας, μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών, ελέγχουν και αυτές τη διαδικασία της ωρίμανσης και τη *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση.

Ανάμεσά τους, οι PI3/Akt/PKB φαίνεται να είναι οι πιο σημαντικές. Η Akt/PKB συναντάται σε αφθονία στα ωάρια των ποντικών και των βοοειδών (Vigneron et al. 2004, Tomek and Smiljakovic 2005) και η ενεργοποίησή της ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 308 και της σερίνης 473 (Tomek and Smiljakovic 2005). Οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν ότι στα στάδια GV και MII, η δραστηριότητα της Akt κυμαίνεται στα βασικά επίπεδα, ενώ φτάνει τα μέγιστα επίπεδα κατά τη διάρκεια των σταδίων GVBD και MI. Η Akt/PKB έχει αποδειχθεί ότι έχει κεντρικό ρόλο σε βιοχημικά μονοπάτια μετάδοσης σημάτων (signal transduction pathways), ανταποκρινόμενη είτε σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες, είτε στην ινσουλίνη. Ακόμη, πιστεύεται ότι συνεισφέρει σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού της γλυκόζης (Cross et al. 1995, Cohen 1999), της κυτταρικής συντήρησης (Hemmings 1997, Alessi and Cohen 1998, Downward 1998), της κυτταρικής αναπαραγωγής (Diehl et al. 1997, Medema et al. 2000), της κυτταρικής μετανάστευσης (Morales-Ruiz et al. 2000, Radisavljevic et al. 2000) και της αγγειογένεσης (Dimmeler et al. 1999, Fulton et al. 1999, Mitchell et al. 1999).

Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωαρίων, στην επανέναρξη της μειωτικής διαίρεσης και στην ωρίμανση του κυτταροπλάσματος, προστατεύοντας το ωάριο από το οξειδωτικό στρες και παρέχοντάς του ταυτόχρονα την απαραίτητη ενέργεια (Salhab et al. 2013). Όπως και στο ωάριο, η ενεργοποίηση διαφόρων μοριακών μονοπατιών στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Salhab et al. 2011). Στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου βοοειδών, ποντικών και χοίρων, βρέθηκε ότι η ERK εκφράζεται, καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης. Η αναστολή της ERK (ERK inhibition), κατά τη διάρκεια της IVM στα βοοειδή, είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση της ERK1/2, οδηγώντας σε μείωση της διάταξης των κύτταρων του ωοφόρου δίσκου και σε παραμονή των ωαρίων στο στάδιο της Προμετάφασης I (Tosca et al. 2007).

Παράλληλα, η ρύθμιση της λειτουργίας των κύτταρων του ωοφόρου δίσκου, η επιβίωση, καθώς και η αντιοξειδωτική και η αντιαποπτωτική προστασία τους, εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των PI3-Akt. Έτσι μετά από

αναστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού της Akt στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης, η πλειονότητα των ωαρίων βοοειδών σταμάτησε την ανάπτυξή της στο στάδιο της MI (Tomek and Smiljakovic 2005).

Όπως έχει προαναφερθεί, η γκρελίνη είναι ένα πεπτίδιο με πολυεπίπεδη δράση που συμπεριλαμβάνει τον έλεγχο της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης, τη ρύθμιση του μεταβολισμού, της όρεξης, της πρόσληψης τροφής, τη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH και των γοναδοτρόπων ορμονών και ασκεί μάλλον ανασταλτική δράση στην *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων και στην ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου (Veldhuis and Bowers 2010, Donolou et al. 2013, Donolou et al. 2014b). Σε μοριακό επίπεδο, η γκρελίνη ασκεί ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιαποπτωτική και μιτογόνο δράση και φαίνεται να υποστηρίζει την αξιοποίηση της γλυκόζης σε διάφορα κύτταρα, όπως οι οστεοβλάστες και τα πρόδρομα λιποκύτταρα. Αυτές οι δράσεις ασκούνται, κυρίως, μέσω της ενεργοποίησης των PI3/Akt και MAP/ERK1/2 μονοπατιών (Delhanty et al. 2006, Granata et al. 2007). Ιδιαίτερως, το μονοπάτι PI3/Akt εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης (Datta et al. 1999, Pearson et al. 2001), διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη προστατευτικών μηχανισμών που προάγονται από την γκρελίνη (Chung et al. 2007, Granata et al. 2007).

Οι γνώσεις μας σχετικά με τον τρόπο δράσης της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων είναι περιορισμένες, καθώς ο διαθέσιμος αριθμός δημοσιευμένων αναφορών, είναι πολύ μικρός. Σε γυναίκες, οι οποίες υποβάλλονται σε IVF, οι συγκεντρώσεις γκρελίνης στο αίμα αλλά και στο ωοθυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί αρνητικά τόσο με το ποσοστό πρώιμων εμβρύων με αυλάκωση, όσο και με τη βιωσιμότητα των εμβρύων την ημέρα 3 (Li et al. 2011). Σε πειραματισμούς IVM ωαρίων χοίρων, η γκρελίνη μείωσε τον ρυθμό ωρίμανσης ωαρίων που περιβάλλονταν από κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ωρίμανση απογυμνωμένων ωαρίων (Suzuki et al. 2010). Σε αντίθεση, βρέθηκε ότι η γκρελίνη προάγει την IVM ωαρίων προβάτων, μέσω του μοριακού μονοπατιού της ERK1/2 (Bai et al. 2012). Επιπλέον, οι Popelkova και συνεργάτες (2006) βρήκαν, ότι η γκρελίνη σε συγκέντρωση 5 ng ml^{-1} δεν βελτιώνει τον *in vitro* ρυθμό

ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών, αν και προκαλεί αύξηση της έκφρασης των ERK-MAPK.

Από προηγούμενα πειράματα στο Εργαστήριο έχει αποδειχθεί ότι η τροποποίηση του υποστρώματος της IVM, με προσθήκη 800 pg ml^{-1} βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης, επιταχύνει σημαντικά τον χρόνο ωρίμανσης των ωαρίων βοοειδών (Donolou et al. 2014a). Έτσι, *in vitro* ωρίμανση για 18 ώρες και έκθεση σε γκρελίνη αποδίδει τα ίδια ποσοστά ωρίμανσης ωαρίων και εν συνεχεία τα ίδια ποσοστά βλαστοκύστεων, με αυτά της ομάδας των μαρτύρων που ωρίμασαν για 24 ώρες, χωρίς την παρουσία γκρελίνης. Στο πείραμα αυτό η ωρίμανση επιβεβαιώθηκε άμεσα ύστερα από χρώση του πυρήνα και έμμεσα με την υπερέκφραση των *COX2*, *SOD2* και *GPX1* στα ωάρια και των *GREM1* και *COX2* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, μετά από qRT-PCR, καθώς και από τα αυξημένα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων. Σε αντίθεση, *in vitro* ωρίμανση για 24 ώρες υπό την παρουσία γκρελίνης, συντέλεσε στη γήρανση των ωαρίων, η οποία γινόταν εμφανής με την υπερβολική διάταση και διόγκωση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, την υπερέκφραση των *CCNB1* και *GADPH* στα ωάρια, και των *CCNB1*, *SLC2A1* και *LDHA* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και εν τέλει με τη μείωση του ποσοστού σχηματισμού βλαστοκύστεων (Donolou et al. 2014a).

Ο τρόπος δράσης της γκρελίνης που οδηγεί στην επιτάχυνση της ωρίμανσης των ωαρίων, δεν είναι γνωστός. Στόχος του παρόντος πειράματος ήταν να μελετήσουμε για πρώτη φορά, πιθανά μοριακά μονοπάτια, μέσω των οποίων η συγκεκριμένη ορμόνη θα μπορούσε να ασκήσει τις δράσεις της. Σε αυτή την κατεύθυνση, μελετήθηκε η φωσφορυλίωση δύο σημαντικών κινασών στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου βοοειδών. Η Akt1, το δεύτερο βήμα στο μονοπάτι της φωσφοϊνοσιτιδίου-3 κινάσης (PI3K) που ρυθμίζει την αντιοξειδωτική προστασία και την απόπτωση στα κύτταρα και οι ERK1/2 (κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα, Extracellular Signal Regulated Kinases, ERKs), αποτελούν μέρος του μονοπατιού των MAPKs (ενεργοποιούμενων από μιτογόνα κινασών σύστημα, Mitogen Activated Protein). Οι MAPKs ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκφραση των γονιδίων και τη λειτουργία του πυρήνα των κυττάρων.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

Εξωσωματική παραγωγή εμβρύων

Συλλογή ωοθηκών-ωαρίων

Οι διαδικασίες για την εξωσωματική παραγωγή εμβρύων είναι αυτές που έχουν τυποποιηθεί στο Εργαστήριο και περιγράφονται λεπτομερώς σε προηγούμενη διδακτορική διατριβή (Donoιου 2014).

Για τους πειραματισμούς, χρησιμοποιήθηκαν ωοθήκες αγελάδων που συλλέχθηκαν από το τοπικό σφαγείο. Αμέσως, μετά τον εκσπλαχνισμό των αγελάδων, οι ωοθήκες συλλέγονταν, ξεπλένονταν με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνταν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%, ΒΙΟΣΕΡ, Τρίκαλα, Ελλάδα) με 0,1% v/v γενταμυκίνη (Gentamycin sulphate 5% injection, BREMER PHARMA GMBH, Germany), σε θερμοκρασία 37 °C. Η συνήθης διάρκεια της διαδικασίας, από τη συλλογή της πρώτης ωοθήκης μέχρι την άφιξη στο Εργαστήριο, ήταν περίπου 1½ ώρα. Για τη μείωση του πιθανά αυξημένου μικροβιακού φόρτου των ωοθηκών, πριν από την συλλογή των ωαρίων, πραγματοποιούνταν διαδοχικές εκπλύσεις των ωοθηκών σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (37 °C) και στη συνέχεια διενεργούνταν επιφανειακή απολύμανσή τους, με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα 70% αιθανόλης. Καθ' όλη τη διάρκεια της αναρρόφησης, οι ωοθήκες διατηρούνταν σε γυάλινο δοχείο με φυσιολογικό ορό στους 37° C, μέσα σε υδατόλουτρο.

Στη συνέχεια, η αναρρόφηση των ωοθυλακίων (διαμέτρου 2-8 mm, με διαυγές τοίχωμα και εκτεταμένη αγγείωση) πραγματοποιούνταν με σύριγγα των 10 ml και βελόνα 18G x 1 1/2" (KDL®, Hamburg, Germany) και το ωοθυλακικό υγρό συλλεγόταν σε φιαλίδια τύπου falcon των 50 ml (Cellstar® Tubes, greiner bio-one, Germany) που είχαν τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο (37° C). Μετά την ολοκλήρωση της αναρρόφησης των ωοθυλακίων, το falcon με το ωοθυλακικό υγρό τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο 5% CO₂, στους 39 °C και μέγιστη υγρασία (SHEL LAB 5215, Oregon, U.S.A.) για 10-15 λεπτά, προκειμένου όλα τα συμπλέγματα ωαρίων-ωοφόρων δίσκων (Cumulus-Oocytes Complexes, COCs) να καθιζάνουν στον πυθμένα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό απομακρυνόταν προσεκτικά από το

σωλήνα, το ίζημα αναμειγνυόταν με PBS (phosphate buffered saline) και τοποθετούνταν σε μικροβιολογικό τρυβλίο (petri dish), διαμέτρου 9,4 cm (Greiner bio-one, Germany).

Όλες οι εργασίες που ακολούθησαν τη συλλογή των ωαρίων γινόταν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Horizontal laminar flow, Mini-H Telstar, Spain). Η επιλογή των καλής ποιότητας COCs γινόταν, υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (Stereoscopic Zoon Microscope SMZ1500, Nikon) και η συλλογή τους γινόταν με τη χρήση ειδικής γυάλινης πιπέτας (mouth pipet) που κατασκευαζόταν στο Εργαστήριο, μετά από πύρωση σε λύχνο Bunsen και ταυτόχρονη έλξη κοινής πιπέτας Pasteur.

Τα ωάρια που επιλέγονταν να χρησιμοποιηθούν στην εξωσωματική γονιμοποίηση, ήταν τα 1^{ης} και 2^{ης} κατηγορίας, σύμφωνα με τα κριτήρια των de Loos και συνεργατών (1989) και Younis και συνεργατών (1989). Ωάρια, με ωόπλασμα ομοιογενές και διάφανο ή ομοιόμορφο και σκοτεινόχρωμο, με συμπαγή ωοφόρο δίσκο αποτελούμενο από πολλές στοιβάδες κυττάρων, κατατάσσονταν στην 1^η κατηγορία. Στη 2^η κατηγορία κατατάσσονταν COCs με λιγότερο διαυγές ωόπλασμα που περιβαλλόταν από τουλάχιστον 3 συμπαγείς στοιβάδες κυττάρων. Μετά το πέρας της επιλογής, τα COCs τοποθετούνταν σε μικροβιολογικά τρυβλία, διαμέτρου 3,5 cm, τα οποία περιείχαν διάλυμα PBS, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα και κυτταρικά ράκη του ωοθυλακικού υγρού. Για το σκοπό αυτό, τα COCs υποβάλλονταν σε τρεις διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα PBS και δύο σε υπόστρωμα ωρίμανσης, εξασφαλίζοντας έτσι την πλήρη απομάκρυνση άλλων κυττάρων, αλλά και την αποφυγή εισαγωγής υπολειμμάτων PBS στο υπόστρωμα ωρίμανσης.

In vitro ωρίμανση των ωαρίων (IVM)

Η IVM γινόταν σε ομάδες των 50, μετά από τυχαία επιλογή, σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 4-βοθρίων (4-well dishes, Nunk Thermofisher Scientific, Denmark), στα οποία περιέχονταν 500 μl υποστρώματος ωρίμανσης M199 εμπλουτισμένου με

10 ng ml⁻¹ επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και 10% ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS). Η ωρίμανση των COCs γινόταν σε επωαστικό κλίβανο στους 39 °C με 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία για 24 ώρες.

Επεξεργασία σπέρματος και ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων

Σε όλες τις επαναλήψεις του πειραματισμού, χρησιμοποιήθηκε καταψυγμένο σπέρμα ταύρου φυλής Holstein, γνωστής *in vivo* και *in vitro* γονιμότητας, προερχόμενο από την ίδια εκσπερμάτιση. Για την αναβίωση των καταψυγμένων σπερματοζωαρίων, η διαδικασία περιελάμβανε την απόψυξη των σωληναρίων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, το σπέρμα τοποθετούνταν σε σωλήνα falcon των 15 ml που περιείχε 3 ml διαλύματος Sp-TALP και ακολουθούσε φυγοκέντρηση του δείγματος στα 1000 x g, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η αφαίρεση όλων των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την κατάψυξη του σπέρματος, με ταυτόχρονη καθίζηση των σπερματοζωαρίων.

Για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και τον εμπλουτισμό του διαλύματος σε σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση, ακολουθήθηκε η μέθοδος swim-up, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Parrish et al. 1986, 1988). Μετά τη διαδικασία έκπλυσης του σπέρματος, ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος από το falcon, κάλυψη του ιζήματος με 1 ml υποστρώματος *in vitro* γονιμοποίησης (IVF) και τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο CO₂, με γωνία 45°, για 1 ώρα, ώστε μόνο τα ζωντανά και με προοδευτική κίνηση σπερματοζωάρια να μετακινηθούν στην υπερκείμενη στιβάδα του υποστρώματος. Ακολουθούσε αναρρόφηση 800 μl του επιφανειακού υποστρώματος, χωρίς να διαταραχτεί το ίζημα· με τον τρόπο αυτό συλλέγονταν μόνο τα ζωντανά και καλής ποιότητας σπερματοζωάρια. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο προθερμασμένο στους 39 °C φιαλίδιο τύπου erpendorf (1,5 ml), το οποίο διατηρούταν στους 39 °C, μέχρι τη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου Neubauer, χρησιμοποιώντας αραιωμένο δείγμα (1/10) σε νερό. Η μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος γινόταν με οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar Plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany), χρησιμοποιώντας 10x/0.25 μεγεθυντικό φακό (Zeiss A-Plan, Germany). Στη συνέχεια το υπόστρωμα γονιμοποίησης με τα σπερματοζωάρια αραιωνόταν, με προσθήκη υποστρώματος IVF, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 1×10^6 σπερματοζωάρια ανά ml.

In vitro γονιμοποίηση (IVF)

Αμέσως μετά την 24^η ωρίμανση των ωαρίων και πριν από τη διαδικασία της γονιμοποίησης, προηγούνταν η έκπλυση των COCs, δύο φορές, με διάλυμα PBS και δύο, με τυποποιημένο υπόστρωμα IVF. Τα COCs τοποθετούνταν σε τρυβλίο 4-βοθρίων που περιείχε 250 μl τυποποιημένου υποστρώματος. Οι γαμέτες συνεπιάζονταν για 22-24 ώρες σε κλίβανο CO₂ (39 °C, 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία). Ο τελικός όγκος του υποστρώματος γονιμοποίησης, μετά την προσθήκη του σπέρματος, όλων των ομάδων ήταν 500 μl. Δεν απαιτούταν η κάλυψη με παραφινέλαιο τόσο κατά τη διάρκεια της IVM, όσο και της IVF.

In vitro καλλιέργεια των εμβρύων (IVC)

Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, όλα τα εν δυνάμει γονιμοποιημένα ωάρια (πιθανά ζυγωτά) αφαιρούνταν από το υπόστρωμα IVF και μεταφέρονταν σε φιαλίδια των 15 ml, τα οποία περιείχαν 2 ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια, γινόταν μηχανική αφαίρεση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, με ανατάραξη για 2-3 λεπτά σε ειδική συσκευή (vortex, FALC instruments, Treviglio, Italy). Η εύρεση όλων των πιθανών ζυγωτών γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση και ακολουθούσαν 3-4 διαδοχικές εκπλύσεις τους σε διάλυμα PBS και 2 φορές σε συνθετικό υπόστρωμα καλλιέργειας ωαγωγού (Synthetic Oviductal Fluid, SOF). Τέλος, τα έμβρυα, μετά από

τυχαία επιλογή, τοποθετούνταν σε ομάδες των 25 σε μικροσταγόνες των 25 μ l κάτω από παραφινέλαιο.

Τα τρυβλία ιστοκαλλιέργειας, τα οποία χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια των εμβρύων ήταν διαμέτρου 3,5 cm αποστειρωμένα, χωρίς DNAses, RNAses και ανθρώπινο εξωγενές DNA (CellStar, Greiner bio-one, Germany). Οι μικροσταγόνες με υπόστρωμα SOF (25 μ l), εμπλουτισμένου με 5% FCS, ετοιμάζονταν τουλάχιστον 15 ώρες νωρίτερα και καλύπτονταν με παραφινέλαιο, προκειμένου να εξισορροπηθεί το pH του υποστρώματος και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμισή του κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των εμβρύων.

Η επώαση των εμβρύων διαρκούσε 9 ημέρες και γινόταν σε κλίβανο τριών αερίων (SANYO MCO-5M, Osaka, Japan). Οι συνθήκες επώασης ήταν 39 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ και μέγιστη υγρασία. Η εκτίμηση του ποσοστού αυλάκωσης (cleavage rate) και παραγωγής βλαστοκύστεων γινόταν στις 48 ώρες, καθώς και στις 7, 8 και 9 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αντίστοιχα.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 872 COCs σε τρεις επαναλήψεις (632 COCs για *in vitro* παραγωγή εμβρύων, 120 COCs για την αξιολόγηση της ωρίμανσης του πυρήνα και 120 για την ανάλυση των πρωτεϊνών). Η διαδικασία της *in vitro* ωρίμανσης διαρκούσε 18 ή 24 ώρες και γινόταν είτε με προσθήκη 800 μ g ml⁻¹ γκρελίνης στο υπόστρωμα (Ghr18 n=170 και Ghr24, n=160), είτε χωρίς (μάρτυρες C18, n=150 και C24, n=152).

Εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα

Για την αξιολόγηση της ωρίμανσης του πυρήνα, 30 ωάρια (10 από κάθε επανάληψη) από κάθε ομάδα τοποθετούνταν επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού προηγουμένως είχαν πλήρως απομακρυνθεί τα περιβάλλοντα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου με ανατάραξη, με τη βοήθεια vortex. Ακολουθούσε η τοποθέτηση γυάλινης καλυπτρίδας που υποστηρίζονταν από τέσσερις σταγόνες μίγματος βαζελίνης:παραφίνης (40:1). Κάτω από ήπια συμπίεση, τα ωάρια μονιμοποιούνταν, για χρονικό διάστημα 48 ωρών, σε μίγμα αιθανικού οξέος:μεθανόλης (1:3). Στη

συνέχεια βάφονταν με αιθανο-ορκεΐνη (1% ορκεΐνη σε 45% αιθανικού οξέος) για να εξεταστούν εν τέλει σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase-contrast microscopy). Ένα ωάριο θεωρούνταν ώριμο, αν η διάταξη της χρωματίνης ανταποκρίνονταν σε αυτή της Τελόφασης I ή της Μετάφασης II.

Για την εκτίμηση των μονοπατιών των ERK1/2 και Akt, 30 COCs από κάθε ομάδα απομακρύνονταν από το μέσο ωρίμανσης, ύστερα από 0, 6, 10, 18 και 24 ώρες ωρίμανσης. Ακολουθούσε έκπλυση αυτών 3 φορές σε PBS, μηχανική απομάκρυνση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και άμεση κατάψυξή τους σε υγρό άζωτο, για να αποθηκευτούν στη συνέχεια στους -80 °C. Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που περιέβαλλαν τα παραπάνω ωάρια, συλλέγονταν, επίσης, και καταψύχονταν με τον ίδιο τρόπο, για την ανάλυση των πρωτεϊνών.

Δοκιμές φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών

Η απόσπαση ολόκληρων κυττάρων από ωάρια ή κύτταρα του ωοφόρου δίσκου προετοιμαζόταν με λύση στον πάγο, χρησιμοποιώντας το ακόλουθο ρυθμιστικό διάλυμα: 10 mM tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X- 100, 0,5% (w/v), δεοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate), το οποίο περιέχει μίγμα αναστολέων πρωτεασών (1:100, Sigma, Germany) και 1 mM ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate). Τα analyte-specific bead kits, καθώς και τα απαιτούμενα αντιδραστήρια προέρχονταν από την εταιρία EMD Millipore (Darmstadt, Germany) και οι δοκιμές εκτελέστηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα beadmates των κινασών φωσφο-Akt1/PKBα (Ser473) και φωσφο-ERK/MAP 1/3 (Thr185/Tyr187) (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) χρησιμοποιήθηκαν από κοινού. Η έκφραση των πρωτεϊνών μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός μηχανήματος Luminex 200 (Luminex Corporation). Οι τιμές που προέκυψαν, αντανakλούσαν την μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity, mFI), ως μέτρο αφθονίας των πρωτεϊνών. Μετρήθηκε η αναλογία φωσφοπρωτεϊνών mFI/ολικές πρωτεΐνες, σε ωάρια που είχαν ωριμάσει υπό την παρουσία γκρελίνης, σε ωάρια μάρτυρες, και σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Στατιστική ανάλυση

Η ωρίμανση του πυρήνα, το ποσοστό πρώιμων εμβρύων με αυλάκωση και το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων, αναλύθηκαν με το στατιστικό κριτήριο χ τετράγωνο. Έγινε προσδιορισμός της αναλογίας των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών mFI/ολικές πρωτεΐνες, σε ωάρια που είχαν ωριμάσει υπό την παρουσία γκρελίνης, σε ωάρια μάρτυρες και σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με την στατιστική μέθοδο Student's t-test (independent). Σε όλες τις περιπτώσεις η σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0,05$.

5.3. Αποτελέσματα

Χρώση του πυρήνα και *in vitro* παραγωγή εμβρύων

Τα στοιχεία που προέκυψαν από την ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων και την *in vitro* παραγωγή εμβρύων παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Την 18^η ώρα της ωρίμανσης, το ποσοστό των ώριμων ωαρίων στην ομάδα της γκρελίνης ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο της ομάδας των μαρτύρων (83,3% και 66,6%, αντίστοιχα, $p < 0,05$).

Πίνακας 3.

Στοιχεία από την πυρηνική ωρίμανση και την *in vitro* παραγωγή εμβρύων στις 4 ομάδες των COCs, οι οποίες ωρίμασαν για 18 και 24 ώρες, υπό την απουσία (ομάδα C) ή την παρουσία (ομάδα G) γκρελίνης.

Ομάδες	Πυρηνική ωρίμανση		In vitro παραγωγή εμβρύων		
	Αριθμός ωαρίων	Ώριμα ωάρια (%)	Αριθμός COCs	Ποσοστό αυλάκωσης (%)	Βλαστοκύστες ημέρα 7 (%)
C18	30	20 (66,6) ^α	150	102 (68,0)	44 (29,3) ^α
C24	30	27 (90,0) ^β	152	112 (73,7)	41 (26,9) ^α
G18	30	25 (83,3) ^β	170	118 (69,4)	51 (30,0) ^α
G24	30	26 (86,6) ^β	160	104 (64,4)	26 (16,3) ^β

Οι τιμές της ίδιας στήλης που σημειώνονται με διαφορετικό εκθέτη, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

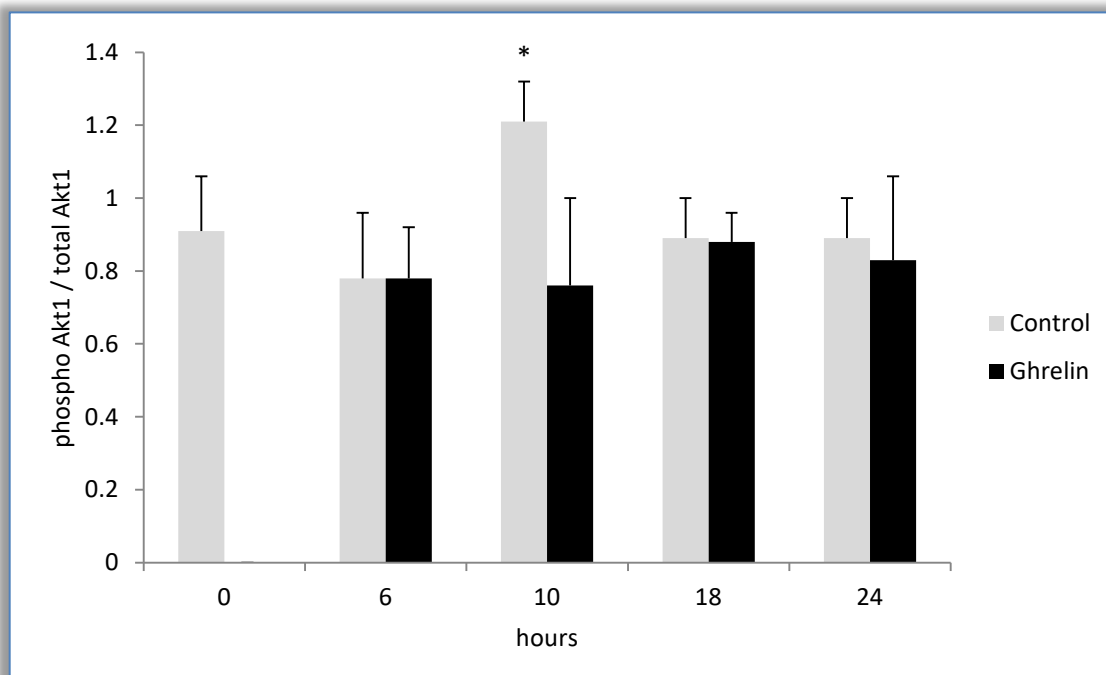
Ο ρυθμός σχηματισμού βλαστοκύστεων ήταν σημαντικά χαμηλότερος ($p<0.05$) στην ομάδα G24 σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, ενώ δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων ομάδων ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα του Εργαστηρίου, σύμφωνα με τα οποία η παρουσία γκρελίνης κατά τη διαδικασία της IVF, επηρεάζει τον *in vitro* ρυθμό παραγωγής εμβρύων (Donolou et al. 2014a).

Η Akt1 στα ωάρια

Τα στοιχεία της φωσφορυλίωσης της Akt1 στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της γκρελίνης παρουσιάζονται στο διάγραμμα 15. Την 10^η ώρα, η φωσφορυλίωση της Akt1 ήταν σημαντικά αυξημένη στα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης σε σύγκριση με τα ωάρια μάρτυρες ($p<0,05$), ενώ τις υπόλοιπες ώρες, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p>0,05$).

Διάγραμμα 15.

Η έκφραση της Akt1 στα ωάρια, ύστερα από ωρίμανση για 0, 6, 10, 18 και 24 ώρες, σε απλό μέσο ωρίμανσης (Control), ή σε μέσο ωρίμανσης, στο οποίο είχαν προστεθεί 800 pg ml⁻¹ ακυλιωμένης βόειας γκρελίνης (Ghrelin).



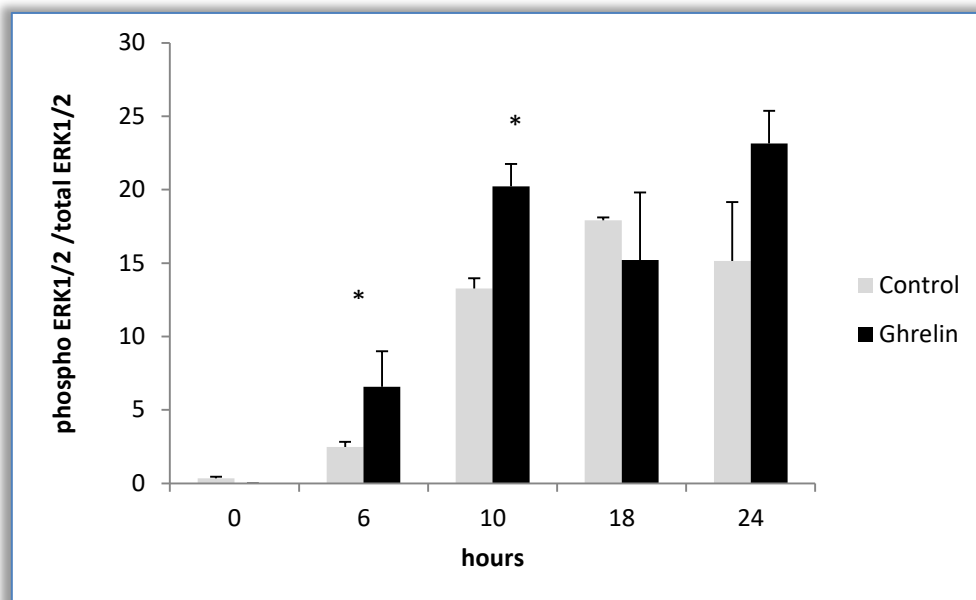
Οι στήλες του ίδιου ζεύγους που σημειώνονται με αστερίσκο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p<0,05$).

Η ERK1/2 στα ωάρια

Τα στοιχεία της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 στην ομάδα των ωαρίων μαρτύρων και σε αυτή των ωαρίων που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης, εμφανίζονται στο διάγραμμα 16. Την 6^η και τη 10^η ώρα της ωρίμανσης, η φωσφορυλίωση της ERK1/2 ήταν σημαντικά αυξημένη στα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης σε σύγκριση με τα ωάρια μάρτυρες (264,9% και 52,5%, αντίστοιχα, $p<0,05$), ενώ δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ίδιες ομάδες, κατά την 18^η και 24^η ώρα της ωρίμανσης ($p>0,05$).

Διάγραμμα 16.

Η έκφραση της ERK1/2 στα ωάρια, ύστερα από ωρίμανση για 0, 6, 10, 18 και 24 ώρες, σε απλό μέσο ωρίμανσης (Control), ή σε μέσο ωρίμανσης, στο οποίο είχαν προστεθεί 800 pg ml⁻¹ ακυλιωμένης βόειας γκρελίνης (Ghrelin).



Οι στήλες του ίδιου ζεύγους που σημειώνονται με αστερίσκο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p<0,05$).

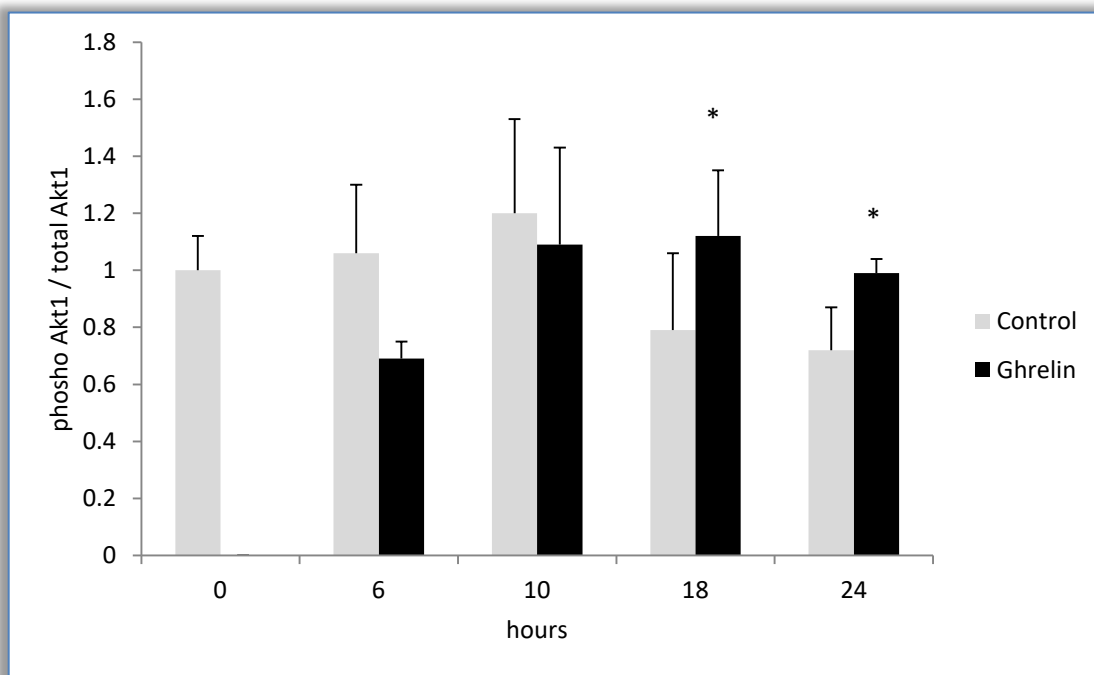
Η Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Τα δεδομένα της Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παρουσιάζονται στο διάγραμμα 17. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στη φωσφορυλίωση της Akt1, την 6^η και τη 10^η ώρα της ωρίμανσης ($p>0,05$). Σε αντίθεση, την 18^η και την 24^η ώρα, διαπιστώθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της

Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου στην ομάδα της γκρελίνης σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας των μαρτύρων (42,0% και 37,5%, αντίστοιχα, $p<0,05$).

Διάγραμμα 17.

Η έκφραση της Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, ύστερα από ωρίμανση για 0, 6, 10, 18 και 24 ώρες, σε απλό μέσο ωρίμανσης (Control), ή σε μέσο ωρίμανσης, στο οποίο είχαν προστεθεί 800 pg ml^{-1} ακυλιωμένης βόειας γκρελίνης (Ghrelin).



Οι στήλες του ίδιου ζεύγους που σημειώνονται με αστερίσκο, υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p<0,05$).

Η ERK1/2 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη φωσφορυλίωση της ERK1/2, ανάμεσα στις δύο ομάδες (6^η ώρα: $1,02 \pm 0,81$ και $0,68 \pm 0,19$, 10^η ώρα: $0,31 \pm 0,16$ και $0,37 \pm 0,12$, 18^η ώρα: $0,17 \pm 0,05$ και $0,23 \pm 0,14$, 24^η ώρα: $0,14 \pm 0,06$ και $0,24 \pm 0,15$, για την ομάδα των μαρτύρων και την ομάδα που δέχθηκε την επίδραση της γκρελίνης, αντίστοιχα, $p>0,05$). Η έκφραση της ERK στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου ήταν συνεχής κατά τη διάρκεια της IVM, ενώ η αναστολή της φωσφορυλίωσης με την χρήση UO126 (αναστολέας MEK), εκτός από μείωση της ανάπτυξης και διάτασης

των κυττάρων αυτών, προκάλεσε την παραμονή του ωαρίου στο στάδιο της Προμετάφασης I (Tosca et al. 2007).

5.4. Συζήτηση

Στον πειραματισμό αυτό, τα αποτελέσματα από την παραγωγή βλαστοκύστεων, μετά την τροποποίηση του υποστρώματος ωρίμανσης με προσθήκη γκρελίνης, επιβεβαίωσαν προηγούμενο εύρημα του Εργαστηρίου (Donolou et al. 2014b), ότι δηλαδή, υπό την παρουσία γκρελίνης, η ωρίμανση των ωαρίων επιταχύνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα, μετά από παραμονή των ωαρίων για 24 ώρες στο υπόστρωμα καλλιέργειας, να μειώνεται σημαντικά το ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων. Σημειώνεται ότι το συγκεκριμένο τμήμα του πειραματισμού, διενεργήθηκε, με αποκλειστικό στόχο να χρησιμοποιηθεί, ως σημείο εσωτερικού ελέγχου της εν συνεχεία μελέτης, της ανάλυσης των πρωτεϊνών.

Ο ρυθμός φωσφορυλίωσης της Akt στα ωάρια, τα οποία ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης, ήταν σημαντικά χαμηλότερος (59,2%) την 10^η ώρα της ωρίμανσης σε σύγκριση με τον αντίστοιχο των μαρτύρων. Έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση της Akt στα ωάρια είναι συνεχής, με το μέγιστο επίπεδο να παρατηρείται την 10^η ώρα της ωρίμανσης. Συγκεκριμένα, οι πιο αξιοσημείωτες αλλαγές στην κινητική των συγκεκριμένων διαδικασιών, συμβαίνουν 8-10 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας ωρίμανσης. Αυτό το χρονικό διάστημα δεν είναι τυχαίο, αλλά συσχετίζεται με την περίοδο μετάβασης από τη Μετάφαση I στη Μετάφαση II, αλλά και με την περισσότερο εκτεταμένη αύξηση του μεγέθους των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (10-22 ώρες). Υψηλότερα επίπεδα των SMAD2, AKT και MAP κινάση JNK1, αλλά όχι των MAP κινασών ERK1/ERK2 ή της P38, συσχετίστηκαν θετικά με την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων και την απελευθέρωση προγεστερόνης και αρνητικά με τον ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου. Αυτοί οι παράγοντες, όπως και τα σηματοδοτικά μονοπάτια, εμπλέκονται στον έλεγχο διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων, αλλά και στην απόκτηση της ικανότητας ανάπτυξής τους (Salhab et al. 2011). Στον πειραματισμό που διενεργήσαμε, η φωσφορυλίωση της Akt ακολούθησε το

παραπάνω πρότυπο έκφρασης στα ωάρια μάρτυρες, ενώ στα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης, η έκφρασή της ήταν χαμηλότερη και παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε και στα επερχόμενα στάδια ωρίμανσης. Καταλήξαμε συνεπώς στο συμπέρασμα ότι εφόσον η γκρελίνη επιταχύνει την ωρίμανση, τα ωάρια πέρασαν το στάδιο της 10^{ης} ώρας νωρίτερα και έτσι το μέγιστο επίπεδο ενεργοποίησης της Akt δεν κατέστη δυνατό να εντοπιστεί, εξαιτίας του πρωτοκόλλου δειγματοληψιών που ακολουθήθηκε.

Στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης, η παρουσία της γκρελίνης ενίσχυσε τη φωσφορυλίωση της ERK1/2, σε αντίθεση με τα τελευταία στάδια, στα οποία η δράση της ήταν ουδέτερη. Τα μη-ώριμα ωάρια βρίσκονται στο στάδιο GV. Η έναρξη της Μείωσης-ωρίμανσης γίνεται με τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης, η οποία *in vivo* προκαλείται από την αύξηση της LH, ενώ *in vitro* φαίνεται να ξεκινάει, αμέσως μετά την αναρρόφηση των ωαρίων και την απομάκρυνση των τοπικών αναστολέων που περιέχονται στο ωοθυλακικό υγρό. Το στάδιο του GVBD ξεκινάει 6-8 ώρες μετά την έναρξη της IVM, με την ενεργοποίηση του MPF και των MAP κινασών και συνεπώς με τη σύνθεση και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία ενεργοποίησης του MPF και των MAP κινασών ξεκινάει την 6^η ώρα της ωρίμανσης και φθάνει στα μέγιστα επίπεδα περίπου την 15^η ώρα περίπου, όπου και παραμένει σε ενεργό μορφή για 24 ώρες περίπου (Verlhac et al. 1994, Torner et al. 2001). Σε προηγούμενο πειραματισμό παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης B, κατά τη διάρκεια 18^{ωρης} ωρίμανσης ωαρίων, παρουσία γκρελίνης· το εύρημα αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη αυξημένης δραστηριότητας του MPF (Donolou et al. 2014a), η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει την επιτάχυνση του ρυθμού ωρίμανσης των ωαρίων. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της ERK1/2, κατά την 6^η και 10^η ώρα στην παρούσα μελέτη, θεωρούμε ότι προάγει την αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, συντελώντας στην πρώιμη έναρξη του GVBD και στην πρώιμη μετάβαση στη φάση της Μετάφασης Ι. Ο ρόλος της σύνθεσης πρωτεϊνών στη διαδικασία ωρίμανσης των ωαρίων έχει αποδειχθεί σε προηγούμενη μελέτη, στην οποία η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μετά την 6^η ώρα της ωρίμανσης, προκάλεσε ολοκληρωτική αναστολή της ανάπτυξης των ωαρίων στο GVBD στάδιο, ενώ η χρήση αναστολέων μετά την 9^η ώρα επέτρεψε στο 33% των ωαρίων να

μεταβεί στη Μετάφαση I (Sirard et al. 1989). Η αυξημένη φωσφορυλίωση της ERK, με τη χρήση Mos (proto-oncogene, serine/threonine kinase), μείωσε κατά περίπου 6 ώρες τον απαιτούμενο χρόνο, ώστε τα ωάρια να φθάσουν στη φάση MII, σε 18 αντί για 24 ώρες (Fissore et al. 1996). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την παρούσα έρευνα με τη χρήση της γκρελίνης. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της ERK1/2 στα ωάρια, εκτός από την επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης, πιθανότατα συνεισέφερε στην αύξηση του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων, μετά τις 18 ώρες της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων.

Η ολοκληρωμένη ωρίμανση των ωαρίων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την απρόσκοπτη επικοινωνία των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου με το ωάριο, δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχουν στα ωάρια απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και παράγοντες αντιοξειδωτικής προστασίας. Σε προηγούμενη έρευνα της Κλινικής, έχουν παρουσιασθεί στοιχεία για την αύξηση της έκφρασης του COX2, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε γκρελίνη για 18 ώρες (Donolou et al. 2014a). Η αυξημένη έκφραση του COX2 προκαλεί αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών, επιφέρει τροποποιήσεις στη σύνδεση/επικοινωνία στα συμπλέγματα ωαρίων και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ταυτόχρονα οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση του μονοπατιού PI3-Akt (Nuttinck et al. 2002). Τα αποτελέσματα αυτά ίσως εξηγούν την αυξημένη δραστηριότητα της Akt1, στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των ωαρίων, τα οποία δέχτηκαν την επίδραση της γκρελίνης κατά την 18^η και την 24^η ώρα της ωρίμανσης. Ωάρια που ωρίμασαν *in vitro*, εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό φωσφορυλίωσης της Akt σε σύγκριση με αντίστοιχα ωάρια που ωρίμασαν *in vivo* (Salhab et al. 2013). Με την εξέλιξη της ωρίμανσης των COCs, παρατηρείται σταθερή αύξηση του μεταβολισμού, οπότε προάγεται αναπόφευκτα το οξειδωτικό στρες (Sutton et al. 2003). Σε προηγούμενη μελέτη (Donolou et al. 2014a), μετρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα των γονιδίων *GPX1*, *SOD2* στα ωάρια, γεγονός που σημαίνει αυξημένη αντί-αποπτωτική και αντιοξειδωτική προστασία και αύξηση της αξιοποίησης γλυκόζης (αυξημένη έκφραση των *LDHA*, *SLC2A1*, *GAPDH*) στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Οι ισχυρές αντί-αποπτωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις της γκρελίνης έχουν αποδειχθεί σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, δράσεις οι οποίες

προάγονται, μέσω των μονοπατιών των Akt και ERK1/2. Για παράδειγμα, σε νευρικά κύτταρα ποντικών που καλλιιεργήθηκαν, υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και γλυκόζης, η γκρελίνη απέτρεψε την απόπτωση. Η δράση αυτή της γκρελίνης συσχετίστηκε, με αυξημένη δραστηριότητα των κινασών Akt1 και ERK1/2, καθώς και με αυξημένα επίπεδα των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών (Chung et al. 2007). Η ενεργοποίηση των ίδιων μονοπατιών έχει συνδεθεί με τις πολλαπλασιαστικές (μιτογόνες) δράσεις της γκρελίνης σε οστεοβλάστες ανθρώπων, καθώς και με τη μιτογόνο, αντί-αποπτωτική δράση και με την αυξημένη μεταφορά της γλυκόζης στα λιποκύτταρα και στα β-κύτταρα του παγκρέατος (Kim et al. 2004, Delhanty et al. 2006, Granata et al. 2007).

Η αυξημένη δραστηριότητα της Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των COCs που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης, θεωρούμε ότι δείχνει ότι η γκρελίνη ασκεί αντί-αποπτωτική και αντιοξειδωτική προστασία, ενώ ταυτοχρόνως βελτιώνει την αξιοποίηση της γλυκόζης από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, μέσω του συγκεκριμένου μοριακού μονοπατιού, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και για τους άλλους τύπους κυττάρων.

Η έκφραση της ERK στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου είναι συνεχής, κατά τη διάρκεια της IVM, ενώ η αναστολή της φωσφορυλίωσης με τη χρήση UO126 (αναστολέας MEK), εκτός από το ότι μειώνει την ανάπτυξη, προκαλεί και διάταση των κυττάρων αυτών, με αποτέλεσμα το ωάριο να παραμένει καθηλωμένο στο στάδιο της Προμετάφασης Ι (Tosca et al. 2007).

Είναι γνωστό ότι η προ-ωοθυλακιορρηκτική κορύφωση της LH, προκαλεί την επανέναρξη της Μείωσης στα ωάρια των θηλαστικών και ότι η δράση της επεκτείνεται και στα κύτταρα του ωοθυλακίου, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του κοκκώδους υμένα και των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Errig et al. 2004). Αρκετές μελέτες αποκάλυψαν ότι η ενεργοποίηση της MAPK στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, είναι πιθανόν απαραίτητη για την προκαλούμενη, από τις γοναδοτρόπες ορμόνες συνέχιση της διαδικασίας της Μείωσης στα ωάρια των θηλαστικών (Su et al. 2001, 2002, Villa-Diaz and Miyano 2004, Liang et al. 2005, 2007, Miyoshi et al. 2007).

Συμπερασματικά, η αρχική μας υπόθεση, η οποία στηρίχθηκε σε προηγούμενα ευρήματα, σχετικά με το πρότυπο έκφρασης διαφόρων γονιδίων, επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα αυτά, τα οποία αφορούν την ενεργοποίηση των Akt1 και ERK1/2 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, αλλά και στα ωάρια.

Το πιθανότερο σενάριο περιλαμβάνει την άμεση επίδραση της γκρελίνης στο ωάριο, μέσω της πρώιμης ενεργοποίησης του μονοπατιού της ERK1/2, ενώ η ενεργοποίηση της Akt1 στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου υποστηρίζει τη διαδικασία ωρίμανσης του ωαρίου, πιθανότατα, μέσω της αντιοξειδωτικής προστασίας και της παροχής θρεπτικών συστατικών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από τους πειραματισμούς που περιγράφηκαν και σχολιάσθηκαν ανωτέρω, συνοψίζονται ως ακολούθως:

1. Η δράση της γκρελίνης επεκτείνεται πέραν του υποθαλάμου και στην υπόφυση, εφόσον η έγχυση βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης στη δόση του $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ σωματικού βάρους, ταυτόχρονα με έγχυση GnRH, προκαλεί άμεση έκκριση GH και παράλληλα αμβλύνει την προ-ωοθυλακιορρηκτική έκκριση των LH και FSH.
2. Η άμβλυνση του εύρους της προ-ωοθυλακιορρηκτικής κορύφωσης των LH και FSH, εξαιτίας της έγχυσης γκρελίνης στην περιοριστική περίοδο, επηρεάζει την ωχρινοποίηση των κυττάρων του ωοθυλακίου, η οποία εκφράζεται, στη συνέχεια, από τη δημιουργία ενός νέου ωχρού σωματίου που χαρακτηρίζεται από μειωμένη εκκριτική δυνατότητα και περιορισμένο χρόνο ζωής.
3. Η στέρηση της τροφής για 24 ώρες αποτελεί σημαντικό παράγοντα στρες, ο οποίος ερμηνευόμενος, υπό το πρίσμα της δυναμικής της έκκρισης της κορτιζόλης, υποδεικνύει ότι η εν γένει καταπόνηση συνδέεται πρωτίστως με την ένταση του παράγοντα στρες και δευτερευόντως με τη συνολική ενεργειακή κατάσταση του ζώου.
4. Η δράση της γκρελίνης στην καταστολή της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών είναι χρόνο-εξαρτώμενη. Έτσι, η μακροπρόθεσμη έκθεση σε μέτρια αυξημένες συγκεντρώσεις γκρελίνης, καταστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό την έκκριση της LH σε σύγκριση με την έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για συντομότερο χρονικό διάστημα.
5. Η γκρελίνη αποτελεί, αναμφισβήτητα, ένα ισχυρό ορεξιογόνο σήμα για τα μηρυκαστικά. Όμως, κατά την περίοδο του οίστρου, παρατηρείται, μία τρόπο τινά, ανοχή στη γκρελίνη, η οποία εκδηλώνεται μόνο στις αγελάδες που βρίσκονται σε φάση γαλακτοπαραγωγής και όχι στις μοσχίδες και δεν συνδέεται με τη συγκέντρωση των οιστρογόνων. Επομένως, είναι πιθανόν ότι κάποιοι

άγνωστοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση των δράσεων της γκρελίνης σε διαφορετικές ηλικιακές περιόδους ή/και φάσεις ενεργειακής απορροής ή γαλακτοπαραγωγής. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται περεταίρω, από την τελείως διαφορετική εξέλιξη των συγκεντρώσεων της ολικής γκρελίνης κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, στις αγελάδες και στις μοσχίδες.

6. Οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, αποτυπώνονται ή καθοδηγούνται, μέσω ενός ενδογενούς μηχανισμού αυτοάμυνας, από τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη στέρηση τροφής, η οποία συνοδεύεται από ταχεία και μεγαλύτερης διάρκειας έκκριση γκρελίνης, στα έγκυα σε σύγκριση με τα μη-έγκυα ζώα.
7. Η γκρελίνη δρα με διαφορετικό χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των βοοειδών, τροποποιώντας τη φωσφορλίωση των Akt1 και ERK1/2, γεγονός που ερμηνεύει τον τρόπο δράσης της ορμόνης στην επιτάχυνση της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων των βοοειδών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adeghate E. and Ponery A.S. (2002): Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *Journal of Neuroendocrinology*, **14**: 555-560.
- Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E., Flier J.S. (1996): Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**: 250.
- Ahima R.S., Saper C.B., Flier J.S., Elmquist J.K. (2000): Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **21**: 263-307.
- Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E., Carabatsos M.J. (2001): Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, **121**: 647-653.
- Alessi D.R. and Cohen P. (1998): Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Current Opinion in Genetics and Development*, **8**: 55-62.
- Amstalden M., Cardoso R.C., Alves B.R.C., Williams G.L. (2014): Reproduction Symposium: hypothalamic neuropeptides and the nutritional programming of puberty in heifers. *Journal of Animal Science*, **92**: 3211-3222.
- Amstalden M., Garcia M.R., Williams S.W., Stanko R.L., Nizielski S.E., Morrison C.D., Keisler D.H. Williams G.L. (2000): Leptin gene expression, circulating leptin, and Luteinizing Hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biology of Reproduction*, **63**: 127-133.
- Amiridis G.S. (2017): The role of metabolic signals on reproduction of dairy cows. 4th Greek Veterinary Congress for Farm Animal Medicine and Food Safety (Volos, Greece, May, 2017, Organiser: Hellenic Veterinary Medical Society).
- Andrews P.L.R. and Sanger G.J. (2002): Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Current Opinion in Pharmacology*, **2**: 650-656.
- Armstrong D.G., McEvoy T.G., Baxter G., Robinson J.J., Hogg C.O., Woad K.J., Webb R., Sinclair D. (2001): Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction*, **64**: 1624-1632.
- Arvat E., Di Vito L., Broglio F., Papotti M., Muccioli G., Dieguez C., Casanueva F.F., Deghenghi R., Camanni F., Ghigo E. (2000). Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, **23**: 493-495.
- Arvat E., Maccario M., Di Vito L., Broglio F., Benso A., Gottero C., Papotti M., Muccioli G., Dieguez C., Casanueva F.F., Deghenghi R., Camanni F., Ghigo E. (2001): Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-

- releasing hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**: 1169-1174.
- Asakawa A., Inui A., Fujimiya M., Sakamaki R., Shinfuku N., Ueta Y., Meguid M.M., Kasuga M. (2005): Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, **54**: 18-24.
- Avram A.M., Jaffe C.A., Symons K.V., Barkan A.L. (2005): Endogenous circulating ghrelin does not mediate growth hormone rhythmicity or response to fasting. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**: 2982-2987.
- Aydin S., Aydin S., Ozkan Y., Kumru S. (2006): Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk. *Peptides*, **27**: 878-882.
- Backholer K., Bowden M., Gamber K., Bjorbaek C., Iqbal J., Clarke I.J. (2008): Propiomelanocortin, melanocortin, and reproductive function in lean body condition. *In*: San Francisco, CA, pp. 1-690.
- Backholer K., Smith J.T., Rao A., Pereira A., Iqbal J., Ogawa S., Li Q., Clarke I.J. (2010): Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, **151**: 2233-2243.
- Bai R., Zhao P., Cao G., Wen S., Li Q., Meng Q. (2012): Ghrelin promotion of oocyte maturation via ERK1/2 pathway in ovis aries. *Cellular and Molecular Biology*, **58 (Suppl. OL)**: 1797-1802.
- Baldanzi G., Filigheddu N., Cutrupi S., Catapano F., Bonisconi S., Fubini A., Malan D., Baj G., Granata R., Broglio F., Papotti M., Surico N., Bussolino F., Isgaard J., Deghenghi R., Sinigaglia F., Prat M., Muccioli G., Ghigo E., Graziani A. (2002): Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *The Journal of Cell Biology*, **159**: 1029-1037.
- Banks W.A., Tschöp M., Robinson S.M., Heiman M.L. (2002): Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **302**: 822-827.
- Barazzoni R., Zanetti M., Ferreira C., Vinci P., Pirulli A., Mucci M., Dore F., Fonda M., Ciocchi B., Cattin L., Guarnieri G. (2007): Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**: 3935-3940.
- Barker-Gibb M.L., Scott C.J., Boublik J.H., Clarke I.J. (1995): The role of neuropeptide Y (NPY) in the control of LH secretion in the ewe with respect to season, NPY receptor subtype and the site of action in the hypothalamus. *Journal of Endocrinology*, **147**: 565-579.
- Bauman D.E. and Currie B.W. (1980): Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, **63**: 1514-1529.
- Beam S.W. and Butler W.R. (1999): Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, **54 (Suppl. 1)**: 411-424.

- Bednarek M.A., Feighner S.D., Pong S.S., McKee K.K., Hreniuk D.L., Silva M.V., Warren V.A., Howard A.D., van Der Ploeg L.H., Heck J.V. (2000): Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**: 4370-4376.
- Bell A.W. (2005): Encyclopedia of animal science. In: A.W. Bell and W.G. Pond (Eds.), Marcel Dekker, New York, NY.
- Bellingham M., Fowler P.A., Amezcua M.R., Rhind S.M., Cotinot C., Mandon-Pepin B., Sharpe R.M., Evans N.P. (2009): Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. *Environmental Health Perspectives*, **117**: 1556-1562.
- Benso A., St-Pierre D.H., Prodam F., Gramaglia E., Granata R., van der Lely A.J., Ghigo E., Broglio F. (2012): Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *European Journal of Endocrinology*, **166**: 911-916.
- Berry D.P., Buckley F., Dillon P., Evans R.D., Rath M., Veerkamp R.F. (2003): Genetic parameters for body condition score, body weight, milk yield, and fertility estimated using random regression models. *Journal of Dairy Science*, **86**: 3704-3717.
- Blair J.A., McGee H., Bhatta S., Palm R., Casadesus G. (2015): Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis involvement in learning and memory and Alzheimer's disease: more than "just" estrogen. *Frontiers in Endocrinology*, **6**: 45.
- Block S.S., Butler W.R., Ehrhardt R.A., Bell A.W., Amburgh M.V., Boisclair Y.R. (2001): Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, **171**: 339-348.
- Blum J.W., Kunz P., Bachmann C., Colombo J.P. (1981): Metabolic effects of fasting in steers. *Research in Veterinary Science*, **31**: 127-129.
- Boland M.P., Lonergan P., O'Callaghan D. (2001): Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, **55**: 1323-1340.
- Bordi C., D'Adda T., Azzoni C., Ferraro G. (2000): Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. *Microscopy Research and Technique*, **48**: 258-271.
- Börner S., Derno M., Hacke S., Kautzsch U., Schäff C., Thanthan S., Kuwayama H., Hammon H.M., Röntgen M., Weikard R., Kühn C., Tuchscherer A., Kuhla B. (2013): Plasma ghrelin is positively associated with body fat, liver fat and milk fat content but not with feed intake of dairy cows after parturition. *Journal of Endocrinology*, **216**: 217-229.
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H., Yancopoulos G.D. (1991): ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65**: 663-675.

- Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J., Cobb M.H. (1990): An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, **249**: 64-67.
- Bradford B.J. and Allen M.S. (2008): Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, **34**: 196-203.
- Brockman R.P. and Laarveld B. (1986): Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. *Livestock Science*, **14**: 313-334.
- Broglio F., Benso A., Gottero C., Prodam F., Gauna C., Filtri L., Arvat E., van der Lely A.J., Deghenghi R., Ghigo E. (2003a): Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**: 192-196.
- Broglio F., Arvat E., Benso A., Gottero C., Muccioli G., Papotti M., van der Lely A.J., Deghenghi R., Ghigo E. (2001): Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**: 5083-5086.
- Broglio F., Gottero C., Prodam F., Gauna C., Muccioli G., Papotti M., Abribat T., Van Der Lely A.J., Ghigo E. (2004): Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**: 3062-3065.
- Broglio F., Gottero C., Arvat E., Ghigo E. (2003b): Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Hormone Research*, **59**: 109-117.
- Butler S.T. (2014): Nutritional management to optimize fertility of dairy cows in pasture-based systems. *Animal*, **8 (Suppl. 1)**: 15-26.
- Caminos J.E., Gualillo O., Lago F., Otero M., Blanco M., Gallego R., Garcia-Caballero T., Goldring M.B., Casanueva F.F., Gomez-Reino J.J., Dieguez C. (2005): The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology*, **146**: 1285-1292.
- Caminos J.E., Tena-Sempere M., Gaytán F., Sanchez-Criado J.E., Barreiro M.L., Nogueiras R., Casanueva F.F., Aguilar E., Diéguez C. (2003): Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*, **144**: 1594-1602.
- Campbell B.K., Gordon B.M., Tsonis C.G., Scaramuzzi R.J. (1995): The effect of acute immunoneutralisation of inhibin in ewes during the early luteal phase of the oestrous cycle on ovarian hormone secretion and follicular development. *Journal of Endocrinology*, **145**: 479-490.
- Campfield L.A., Hoffmann L.R.I., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. (1995): Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, **269**: 546-549.
- Casanueva F.F. and Dieguez C. (1999): Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **20**: 317-363.

- Castellano J.M., Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Castaño J.P., Malagón M.M., Aguilar E., Dieguez C., Magni P., Pinilla L., Tena-Sempere M. (2006): Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **257-258**: 75-83.
- Catzeflis C., Pierroz D.D., Rohner-Jeanrenaud F., Rivier J.E., Sizonenko P.C., Aubert M.L. (1993): Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotrophic axis in intact adult female rats. *Endocrinology*, **132**: 224-234.
- Cederberg H., Koivisto V.-M., Jokelainen J., Surcel H.-M., Keinänen-Kiukaanniemi S., Rajala U. (2012): Unacylated ghrelin is associated with changes in insulin sensitivity and lipid profile during an exercise intervention. *Clinical Endocrinology*, **76**: 39-45.
- Chelikani P.K., Ambrose J.D., Keisler D.H., Kennelly J.J. (2004): Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, **26**: 33-48.
- Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M. (1999): Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, **98**: 437-451.
- Chen A.S., Marsh D.J., Trumbauer M.E., Frazier E.G., Guan X.-M., Yu H., Rosenblum C.I., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger J.M., Strack A.M., Camacho R.E., Mellin T.N., Nunes C.N., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Van D.P. (2000): Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature Genetics*, **26**: 97-102.
- Chung H., Kim E., Lee D.H., Seo S., Ju S., Lee D., Kim H., Park S. (2007): Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. *Endocrinology*, **148**: 148-159.
- Clark J.T., Kalra P.S., Crowley W.R., Kalra S.P. (1984): Neuropeptide y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, **115**: 427-429.
- Clark R.G., Thomas G.B., Mortensen D.L., Won W.B., Ma Y.H., Tomlinson E.E., Fairhall K.M., Robinson I.C. (1997): Growth Hormone secretagogues stimulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and are diabetogenic in the zucker diabetic fatty rat. *Endocrinology*, **138**: 4316-4323.
- Clarke I.J. and Cummins J.T. (1982): The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, **111**: 1737-1739.
- Clarke I. (1999): Leptin and reproduction. *Reviews of Reproduction*, **4**: 48-55.
- Clarke I.J., Backholer K., Tilbrook A.J. (2005): Y2 receptor-selective agonist delays the estrogen-induced Luteinizing Hormone surge in ovariectomized ewes, but Y1-receptor-selective agonist stimulates voluntary food intake. *Endocrinology*, **146**: 769-775.

- Clarke I.J., Qi Y., Puspita Sari I., Smith J.T. (2009): Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **30**: 371-378.
- Clarke I.J., Sari I.P., Qi Y., Smith J.T., Parkington H.C., Ubuka T., Iqbal J., Li Q., Tilbrook A., Morgan K., Pawson A.J., Tsutsui K., Millar R.P., Bentley G.E. (2008): Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology*, **149**: 5811-5821.
- Clarkson J. and Herbison A.E. (2006): Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **147**: 5817-5825.
- Clegg D.J., Brown L.M., Zigman J.M., Kemp C.J., Strader A.D., Benoit S.C., Woods S.C., Mangiaracina M., Geary N. (2007): Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes*, **56**: 1051-1058.
- Cohen P. (1999): The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **354**: 485-495.
- Comin A., Gerin D., Cappa A., Marchi V., Renaville R., Motta M., Fazzini U., Prandi A. (2002): The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology*, **58**: 899-910.
- Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M., Cerdán M.G., Diano S., Horvath T.L., Cone R.D., Low M.J. (2001): Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411**: 480.
- Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D., Horvath T.L. (2003): The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, **37**: 649-661.
- Crawford J.L. and McNeilly A.S. (2002): Co-localisation of gonadotrophins and granins in gonadotrophs at different stages of the oestrous cycle in sheep. *Journal of Endocrinology*, **174**: 179-194.
- Crews C.M., Alessandrini A., Erikson R.L. (1992): The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, **258**: 478-480.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**: 785-789.
- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E. and Weigle D.S. (2001): A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**: 1714-1719.

- Currie R.J.W. and McNeilly A.S. (1995): Mobilization of LH secretory granules in gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH during the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, **147**: 259-270.
- Dafopoulos K., Chalvatzas N., Kosmas G., Kallitsaris A., Pournaras S., Messinis I.E. (2010): The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women. *Journal of Endocrinological Investigation*, **33**: 109-112.
- Dashtizad M., Wahid H., Mazni O.A., Rosnina Y., Daliri M., Hajarian H. (2011): Effects of ghrelin on *in vitro* nuclear maturation and subsequent embryo development of immature bovine oocytes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10**: 2797-2801.
- Dass N.B., Munonyara M., Bassil A.K., Hervieu G.J., Osbourne S., Corcoran S., Morgan M. Sanger G.J. (2003): Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience*, **120**: 443-453.
- Date Y., Kojima M., Hosoda H., Sawaguchi A., Mondal M.S., Suganuma T., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M. (2000b): Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, **141**: 4255-4261.
- Date Y., Murakami N., Kojima M., Kuroiwa T., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M. (2000a): Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **275**: 477-480.
- Date Y., Nakazato M., Hashiguchi S., Dezaki K., Mondal M.S., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Arima T., Matsuo H., Yada T., Matsukura S. (2002): Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, **51**: 124-129.
- Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. (1999): Cellular survival: a play in three Acts. *Genes and Development*, **13**: 2905-2927.
- De Vriese C., Gregoire F., Lema-Kisoka R., Waelbroeck M., Robberecht P., Delporte C. (2004): Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, **145**: 4997-5005.
- De Vriese C., Hacquebard M., Gregoire F., Carpentier Y., Delporte C. (2007): Ghrelin Interacts with Human Plasma Lipoproteins. *Endocrinology*, **148**: 2355-2362.
- Delhanty P.J.D., Huisman M., Baldeon-Rojas L.Y., van den Berge I., Grefhorst A., Aribat T., Leenen P.J.M., Themmen A.P.N., van der Lely A.J. (2013): Des-acyl ghrelin analogs prevent high-fat-diet-induced dysregulation of glucose homeostasis. *The FASEB Journal*, **27**: 1690-1700.
- Delhanty P.J.D., van der Eerden B.C.J., van der Velde M., Gauna C., Pols H. a. P., Jahr H., Chiba H., van der Lely A.J., van Leeuwen J.P.T.M. (2006): Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *Journal of Endocrinology*, **188**: 37-47.
- Delhanty P.J.D., Sun Y., Visser J.A., van Kerkwijk A., Huisman M., van Ijcken W.F.J., Swagemakers S., Smith R.G., Themmen A.P.N., van der Lely A.J. (2010): Unacylated

- ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signalling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PLoS ONE*, **5**: e11749.
- Dent P., Haser W., Haystead T.A., Vincent L.A., Roberts T.M., Sturgill T.W. (1992): Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and *in vitro*. *Science*, **257**: 1404-1407.
- Dhillon W.S., Chaudhri O.B., Patterson M., Thompson E.L., Murphy K.G., Badman M.K., McGowan B.M., Amber V., Patel S., Ghatei M.A., Bloom S.R. (2005): Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**: 6609-6615.
- Dhillon W.S., Chaudhri O.B., Thompson E.L., Murphy K.G., Patterson M., Ramachandran R., Nijher G.K., Amber V., Kokkinos A., Donaldson M., Ghatei M.A., Bloom S.R. (2007): Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**: 3958-3966.
- Dickin J.C., Thue T.D., Buchanan F.C. (2004): An alternative splice site in ghrelin is missing in ruminants. *Animal Genetics*, **35**: 411-412.
- Diehl J.A., Zindy F., Sherr C.J. (1997): Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes and Development*, **11**: 957-972.
- Dierschke D.J., Yamaji T., Karsch F.J., Weick R.F., Weiss G., Knobil E. (1973): Blockade by progesterone of estrogen-induced LH and FSH release in the rhesus monkey. *Endocrinology*, **92**: 1496-1501.
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**: 601-605.
- Diskin M.G. and Mackey D.R. (2003): Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, **78**: 345-370.
- Dobson H., Ghuman S., Prabhakar S., Smith R. (2003): A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*, **125**: 151-163.
- Dobson H., Smith R., Royal M., Knight C., Sheldon I. (2007): The high producing dairy cow and its reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**: 17-23.
- Dobson H., Tebble J.E., Smith R.F., Ward W.R. (2001): Is stress really all that important? *Theriogenology*, **55**: 65-73.
- Dorling A.A., Todman M.G., Korach K.S., Herbison A.E. (2003): Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology*, **78**: 204-209.
- Dornonville de la Cour C., Lindström E., Norlén P., Håkanson R. (2004): Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regulatory Peptides*, **120**: 23-32.

- Dovolou E. (2014): *In vitro* bovine embryo production in media modified with the addition of guaiazulene or ghrelin. PhD Thesis. University of Thessaly, School of Health Science, Faculty of Medicine.
- Dovolou E., Chadio S., Messinis I.E., Rekkas C.A., Deligiannis C., Kalogiannis D., Amiridis G.S. (2013): Human ghrelin decreases pituitary response to GnRH in superovulated ewes. *Theriogenology*, **80**: 262-268.
- Dovolou E., Messinis I., Periquesta E., Dafopoulos K., Gutierrez-Adan A., Amiridis G. (2014b): Ghrelin accelerates *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, **49**: 665-672.
- Dovolou E., Periquesta E., Messinis I.E., Tsiligianni T., Dafopoulos K., Gutierrez-Adan A., Amiridis G.S. (2014a): Daily supplementation with ghrelin improves *in vitro* bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*, **81**: 565-571.
- Downward J. (1998): Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**: 262-267.
- Du C., Li H., Cao G., null Xilingaowa, Wang C., Li C. (2010): Expression of the orexigenic peptide ghrelin and the type 1a growth hormone secretagogue receptor in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, **45**: 92-98.
- Dungan K.M., Braithwaite S.S., Preiser J.-C. (2009): Stress hyperglycaemia. *Lancet*, **373**: 1798-1807.
- Edwards L., Batt P., Williams D., Gardner D. (1999): pHi oscillations during bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, **51**: 369.
- Edwards R.G. (1965): Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, **208**: 349-351.
- Ehrhardt R.A., Slepatis R.M., Siegal-Willott J., Amburgh M.V., Bell A.W., Boisclair Y.R. (2000): Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal of Endocrinology*, **166**: 519-528.
- Eppig J.J., Viveiros M.M., Marin Bivens C., De La Fuente R. (2004): Regulation of mammalian oocyte maturation. In: "The ovary", Second Edition. Elsevier Academic, San Diego.
- Estienne M.J., Harper A.F., Speight S.M., Crawford R.J., Barb C.R. (2009): Effect of naloxone treatment on luteinizing hormone and testosterone concentrations in boars with high and low libido. *Reproductive Biology*, **9**: 241-252.
- Fahey G.C.J. and Berger L.L. (1988): The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. D.C. Church (Ed.), Waveland Press, Prospect Heights, Ill, pp. 269-297.
- Fan H.-Y. and Sun Q.-Y. (2004): Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*, **70**: 535-547.

- Fang F., Wang L., Zhang Y., Li Y., Su S., Zhang X. (2012): Role of ghrelin on estrogen and progesterone secretion in the adult rat ovary during estrous cycle. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **58**: 116-119.
- Fantone J.C. and Ward P.A. (1982): Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American Journal of Pathology*, **107**: 397-418.
- Fernández-Fernández R., Navarro V.M., Barreiro M.L., Vigo E.M., Tovar S., Sirotkin A.V., Casanueva F.F., Aguilar E., Dieguez C., Pinilla L., Tena-Sempere M. (2005a): Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology*, **146**: 3018-3025.
- Fernández-Fernández R., Tena-Sempere M., Aguilar E., Pinilla L. (2004): Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters*, **362**: 103-107.
- Fernández-Fernández R., Tena-Sempere M., Barreiro M.L., Castellano J.M., Aguilar E., Pinilla L. (2005b): Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Neuroendocrinology*, **82**: 245-255.
- Ferrell C.L., Garrett W.N., Hinman N. (1976): Growth, development and composition of the udder and gravid uterus of beef heifers during pregnancy. *Journal of Animal Science*, **42**: 1477-1489.
- Fissore R.A., He C.L., Vande Woude G.F. (1996): Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, **55**: 1261-1270.
- Flynn M.C., Plata-Salamán C.R., French-Mullen J.M. (1999): Neuropeptide Y-related compounds and feeding. *Physiology and Behavior*, **65**: 901-905.
- Foote A.P., Hales K.E., Freetly H.C. (2016): Changes in acyl and total ghrelin concentrations and their association with dry matter intake, average daily gain, and feed efficiency of finishing beef steers and heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, **57**: 100-107.
- Foote A.P., Hales K.E., Lents C.A., Freetly H.C. (2014): Association of circulating active and total ghrelin concentrations with dry matter intake, growth, and carcass characteristics of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, **92**: 5651-5658.
- Forbes J.M. (1995): Voluntary food intake and diet selection in farm animals. *In*: First Edition, CABI, Wallingford, pp. 55-80
- Forbes S., Li X.F., Kinsey-Jones J., O'Byrne K. (2009): Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neuroscience Letters*, **460**: 143-147.
- Fortune J.E., Rivera G.M., Evans A.C., Turzillo A.M. (2001): Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, **65**: 648-654.
- Foster D.L. and Nagatani S. (1999): Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction*, **60**: 205-215.

- Friedman J.M. and Halaas J.L. (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**: 763-770.
- Fuglsang J., Skjaerbaek C., Espelund U., Frystyk J., Fisker S., Flyvbjerg A., Ovesen P. (2005): Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clinical Endocrinology*, **62**: 554-559.
- Fukumori R., Mita T., Sugino T., Hasegawa Y., Kojima M., Kangawa K., Obitsu T., Taniguchi K. (2013): Effects of intravenous ghrelin injection on plasma growth hormone, insulin and glucose concentrations in calves at weaning. *Animal Science Journal*, **84**: 310-315.
- Fukusumi S., Habata Y., Yoshida H., Iijima N., Kawamata Y., Hosoya M., Fujii R., Hinuma S., Kitada C., Shintani Y., Suenaga M., Onda H., Nishimura O., Tanaka M., Ibata Y., Fujino M. (2001): Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1540**: 221-232.
- Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C. (1999): Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**: 597-601.
- Fürll M., Kirbach H., Knobloch B. (1993): Glukokortikosteroideinfluss auf die fastenstimulierte Lipolyse und die Leberfunktion bei Kühen. *Tierärztliche Praxis*, 399-403.
- Furuta M., Funabashi T., Kimura F. (2001): Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile Luteinizing Hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **288**: 780-785.
- Gantz I. and Fong T.M. (2003): The melanocortin system. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **284**: E468-E474.
- Gantz I., Konda Y., Tashiro T., Shimoto Y., Miwa H., Munzert G., Watson S.J., DelValle J., Yamada T. (1993): Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 8246-8250.
- García M.C., López M., Alvarez C.V., Casanueva F., Tena-Sempere M., Diéguez C. (2007): Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*, **133**: 531-540.
- Garcia-Garcia R.M. (2012): Integrative control of energy balance and reproduction in females. *ISRN Veterinary Science*, **2012**: 121389.
- Gauna C., Meyler F.M., Janssen J. a. M.J.L., Delhanty P.J.D., Abribat T., van Koetsveld P., Hofland L.J., Broglio F., Ghigo E., van der Lely A.J. (2004): Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**: 5035-5042.
- Gaytan F., Barreiro M.L., Caminos J.E., Chopin L.K., Herington A.C., Morales C., Pinilla L., Paniagua R., Nistal M., Casanueva F.F., Aguilar E., Diéguez, C., Tena-Sempere M. (2004): Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a Growth Hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**: 400-409.

- Gaytan F., Barreiro M.L., Chopin L.K., Herington A.C., Morales C., Pinilla L., Casanueva F.F., Aguilar E., Diéguez C., Tena-Sempere M. (2003): Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a Growth Hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**: 879-887.
- Gaytan F., Morales C., Barreiro M.L., Jeffery P., Chopin L.K., Herington A.C., Casanueva F.F., Aguilar E., Dieguez C., Tena-Sempere M. (2005): Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**: 1798-1804.
- Gazal O.S., Leshin L.S., Stanko R.L., Thomas M.G., Keisler D.H., Anderson L.L., Williams G.L. (1998): Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. *Biology of Reproduction*, **59**: 676-683.
- Gibson E.M., Humber S.A., Jain S., Williams W.P., Zhao S., Bentley G.E., Tsutsui K., Kriegsfeld L.J. (2008): Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, **149**: 4958-4969.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. (2000a): Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biology of Reproduction*, **62**: 920-927.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. (2000b): Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biology of Reproduction*, **63**: 383-389.
- Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. (1989): Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, **87**: 223-230.
- Ginther O.J., Kot K., Kulick L.J., Martin S., Wiltbank M.C. (1996): Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **108**: 271-279.
- Gluckman P.D. and J.E. Harding (1997): The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation. *Hormone Research*, **48**: 11-16.
- Gnanapavan S., Kola B., Bustin S.A., Morris D.G., McGee P., Fairclough P., Bhattacharya S., Carpenter R., Grossman A.B., Korbonits M. (2002): The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**: 2988-2988.
- Gong J.G., Bramley T.A., Gutierrez C.G., Peters A.R., Webb R. (1995): Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, **105**: 263-270.
- Gordo A.C., He C.L., Smith S., Fissore R.A. (2001): Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of

- maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, **59**: 106-114.
- Gordon I. (2003): Laboratory production of cattle embryos. In: Second Edition, CABI, Wallingford.
- Goto K., Inui A., Takimoto Y., Yuzuriha H., Asakawa A., Kawamura Y., Tsuji H., Takahara Y., Takeyama C., Katsuura G., Kasuga M. (2003): Acute intracerebroventricular administration of either carboxyl-terminal or amino-terminal fragments of agouti-related peptide produces a long-term decrease in energy expenditure in rats. *International Journal of Molecular Medicine*, **12**: 379-383.
- Goto M., Arima H., Watanabe M., Hayashi M., Banno R., Sato I., Nagasaki H., Oiso Y. (2006): Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology*, **147**: 5102-5109.
- Gottero C., Broglio F., Prodham F., Destefanis S., Bellone S., Benso A., Gauna C., Arvat E., van der Lely A.J., Ghigo E. (2004): Ghrelin: a link between eating disorders, obesity and reproduction. *Nutritional Neuroscience*, **7**: 255-270.
- Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. (2009): From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, **30**: 4-9.
- Gottsch M.L., Cunningham M.J., Smith J.T., Popa S.M., Acohido B.V., Crowley W.F., Seminara S., Clifton D.K., Steiner R.A. (2004): A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **145**: 4073-4077.
- Govoni N., Parmeggiani A., Galeati G., Penazzi P., De lasio R., Pagotto U., Pasquali R., Tamanini C., Seren E. (2007): Acyl ghrelin and metabolic hormones in pregnant and lactating sows. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**: 39-43.
- Granata R., Settanni F., Biancone L., Trovato L., Nano R., Bertuzzi F., Destefanis S., Annunziata M., Martinetti M., Catapano F., Ghè C., Isgaard J., Papotti M., Ghigo E., Muccioli G. (2007): Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology*, **148**: 512-529.
- Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J.M., Argos P., Chambon P. (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, **320**: 134-139.
- Gualillo O., Caminos J.E., Blanco M., García-Caballero T., Kojima M., Kangawa K., Dieguez C., Casanueva F.F. (2001): Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*, **142**: 788-794.
- Gualillo O., Caminos J.E., Nogueiras R., Seoane L.M., Arvat E., Ghigo E., Casanueva F.F., Dieguez C. (2002): Effect of food restriction on ghrelin in normal-cycling female rats and in pregnancy. *Obesity Research*, **10**: 682-687.

- Gualillo O., Lago F., Gómez-Reino J., Casanueva F.F., Dieguez C. (2003): Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Letters*, **552**: 105-109.
- Guan X.M., Yu H., Palyha O.C., McKee K.K., Feighner S.D., Sirinathsinghji D.J., Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D. (1997): Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, **48**: 23-29.
- Guerriero K.A., Keen K.L., Millar R.P., Terasawa E. (2012): Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology*, **153**: 825-836.
- Gutierrez C.G., Oldham J., Bramley T.A., Campbell B.K., Gong J.G., Webb R. (1995): Effect of nutrition on ovarian follicular recruitment in cattle. *Journal of Animal Science*, **73** (Suppl. 1): 230.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., Webb R. (2000): Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, **62**: 1322-1328.
- Gutierrez J.A., Solenberg P.J., Perkins D.R., Willency J.A., Knierman M.D., Jin Z., Witcher D.R., Luo S., Onyia J.E., Hale J.E. (2008): Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**: 6320-6325.
- Gutiérrez-Pascual E., Martínez-Fuentes A.J., Pinilla L., Tena-Sempere M., Malagón M.M., Castaño J.P. (2007): Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, **19**: 521-530.
- Hagan M.M., Rushing P.A., Pritchard L.M., Schwartz M.W., Strack A.M., van Der Ploeg L.H., Woods S.C., Seeley R.J. (2000): Long-term orexigenic effects of AgRP-(83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **279**: R47-52.
- Hahn T.M., Breininger J.F., Baskin D.G., Schwartz M.W. (1998): Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, **1**: 271-272.
- Harrison J.L., Adam C.L., Brown Y.A., Wallace J.M., Aitken R.P., Lea R.G., Miller D.W. (2007): An immunohistochemical study of the localization and developmental expression of ghrelin and its functional receptor in the ovine placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **5**: 25.
- Harrison J.L., Miller D.W., Findlay P.A., Adam C.L. (2008): Photoperiod influences the central effects of ghrelin on food intake, GH and LH secretion in sheep. *Neuroendocrinology*, **87**: 182-192.
- Hart I.C., Bines J.A., Morant S.V., Ridley J.L. (1978): Endocrine control of energy metabolism in the cow: comparison of the levels of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in the plasma of high- and low-yielding cattle at various stages of lactation. *Journal of Endocrinology*, **77**: 333-345.

- Hashizume T., Horiuchi M., Nonaka S., Kasuya E., Kojima M., Hosoda H., Kangawa K. (2005): Effects of ghrelin on growth hormone secretion *in vivo* in ruminants. *Regulatory Peptides*, **126**: 61-65.
- Hatano N., Mori Y., Oh-hora M., Kosugi A., Fujikawa T., Nakai N., Niwa H., Miyazaki J., Hamaoka T., Ogata M. (2003): Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to Cells*, **8**: 847-856.
- Hataya, Y., Akamizu T., Takaya K., Kanamoto N., Ariyasu H., Saijo M., Moriyama K., Shimatsu A., Kojima M., Kangawa K., Nakao K. (2001): A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**: 4552-4552.
- Hayashida T., Murakami K., Mogi K., Nishihara M., Nakazato M., Mondal M.S., Horii Y., Kojima M., Kangawa K., Murakami N. (2001): Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology*, **21**: 17-24.
- Hemmings B.A. (1997): Update: PtdIns(3,4,5)P3 gets its message across. *Science*, **277**: 534-534.
- Herbison A.E. and Pape J.-R. (2001): New Evidence for Estrogen Receptors in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **22**: 292-308.
- Herbison A.E., d'Anglemont de Tassigny X., Doran J., Colledge W.H. (2010): Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **151**: 312-321.
- Herbison A.E. and Theodosis D.T. (1992): Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, **50**: 283-298.
- Hillier S.G. (1994): Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction*, **9**: 188-191.
- Honig H., Ofer L., Elbaz M., Kaim M., Shinder D., Gershon E. (2016): Seasonal and parity effects on ghrelin levels throughout the estrous cycle in dairy cows. *General and Comparative Endocrinology*, **235**: 64-69.
- Horvath T.L., Diano S., Sotonyi P., Heiman M., Tschöp M. (2001): Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance: A hypothalamic perspective. *Endocrinology*, **142**: 4163-4169.
- Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. (2000): Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **279**: 909-913.
- Houseknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L., Spurlock M.E. (1998): The biology of leptin: A review. *Journal of Animal Science*, **76**: 1405-1420.
- Howard A.D., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberato P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D.L., Palyha O.C., Anderson J., Paress P.S., Diaz C., Chou M., Liu K.K., McKee K.K., Pong S.-S., Chaung L.-Y., Elbrecht A., Dashkevich M., Heavens R., Rigby M., Sirinathsinghji D.J.S., Dean D.C., Melillo D.G., Patchett A.A., Nargund R., Griffin P.R., DeMartino J.A.,

- Gupta S.K., Schaeffer J.M., Smith R.G., der Ploeg L.H.T.V. (1996): A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in Growth Hormone release. *Science*, **273**: 974-977.
- Hruby V.J., Sharma S.D., Al-Obeidi F.A., Hadley C. de, M.E., Lu D., Kesterson R.A., Cone R.D. (1995): CyclicLactam α -Melanotropin analogues of Ac-Nle4-cyclo[Asp5, D-Phe7, Lys10] α -Melanocyte-Stimulating Hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **38**: 3454-3461.
- Ibrahim N., Bosch M.A., Smart J.L., Qiu J., Rubinstein M., Ronnekleiv O.K., Low M.J., Kelly M.J. (2003): Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express KATP channels. *Endocrinology*, **144**: 1331-1340.
- Iglesias M.J., Pineiro R., Blanco M., Gallego R., Dieguez C., Gualillo O., Gonzalez-Juanatey J.R., Lago F. (2004): Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, **62**: 481-488.
- Inoue M., Naito K., Aoki F., Toyoda Y., Sato E. (1995): Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*, **3**: 265-271.
- Iqbal J., Kurose Y., Canny B., Clarke I.J. (2006): Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology*, **147**: 510-519.
- Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T., Acohido B.V., Popa S.M., Cunningham M.J., Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. (2004): Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, **80**: 264-272.
- Israel D. and Chua S. (2010): Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **21**: 10-16.
- Itoh F., Komatsu T., Kushibiki S., Hodate K. (2006): Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular and Integrative Physiology*, **143**: 97-102.
- Itoh F., Komatsu T., Yonai M., Sugino T., Kojima M., Kangawa K., Hasegawa Y., Terashima Y., Hodate K. (2005): GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, **28**: 34-45.
- Johnson M.A., Tsutsui K., Fraley G.S. (2007): Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and Behavior*, **51**: 171-180.
- Kageyama H., Funahashi H., Hirayama M., Takenoya F., Kita T., Kato S., Sakurai J., Lee E.Y., Inoue S., Date Y., Nakazato M., Kangawa K., Shioda S. (2005): Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regulatory Peptides*, **126**: 67-71.
- Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., Xu B., Horvath T.L., Kalra P.S. (1999): Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, **20**: 68-100.

- Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H., Wakabayashi I. (2001): Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, **50**: 2438-2443.
- Kaneko H., Noguchi J., Kikuchi K., Todoroki J., Hasegawa Y. (2002): Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biology of Reproduction*, **67**: 38-45.
- Kasa-Vubu J.Z., Dahl G.E., Evans N.P., Thrun L.A., Moenter S.M., Padmanabhan V., Karsch F.J. (1992): Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, **131**: 208-212.
- Kawczynska-Drozdz A., Olszanecki R., Jawien J., Brzozowski T., Pawlik W.W., Korbut R., Guzik T.J. (2006): Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, **19**: 764-767.
- Kaynard A.H., Pau K.Y., Hess D.L., Spies H.G. (1990): Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology*, **127**: 2437-2444.
- Kendall N.R., Gutierrez C.G., Scaramuzzi R.J., Baird D.T., Webb R., Campbell B.K. (2004): Direct *in vivo* effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction*, **128**: 757-765.
- Kim M.S., Rossi M., Abbott C.R., AlAhmed S.H., Smith D.M., Bloom S.R. (2002): Sustained orexigenic effect of Agouti related protein may be not mediated by the melanocortin 4 receptor. *Peptides*, **23**: 1069-1076.
- Kim M.S., Yoon C.Y., Jang P.G., Park Y.J., Shin C.S., Park H.S., Ryu J.W., Pak Y.K., Park J.Y., Lee K.U., Kim S.Y., Lee H.K., Kim Y.B., Park K.S. (2004): The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*, **18**: 2291-2301.
- Kirsch K., Szczesna M., Molik E., Misztal T., Zięba D.A. (2017): Induction of the secretion of LH and GH by orexin A and ghrelin is controlled *in vivo* by leptin and photoperiod in sheep. *Annals of Animal Science*, **17**: 155-168.
- Kluge M., Schüssler P., Schmidt D., Uhr M., Steiger A. (2012): Ghrelin suppresses secretion of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **97**: E448-E451.
- Kluge M., Uhr M., Bleninger P., Yassouridis A., Steiger A. (2009): Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. *Clinical Endocrinology*, **70**: 920-923.
- Knight C.H. (2001): Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livestock Production Science*, **70**: 87-93.
- Knobil E., Plant T.M., Wildt L., Belchetz P.E., Marshall G. (1980): Control of the rhesus monkey menstrual cycle: Permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, **207**: 1371-1373.
- Koegler F.H., Grove K.L., Schiffmacher A., Smith M.S., Cameron J.L. (2001): Central melanocortin receptors mediate changes in food intake in the rhesus macaque. *Endocrinology*, **142**: 2586-2592.

- Kogawa K., Nakamura T., Sugino K., Takio K., Titani K., Sugino H. (1991): Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology*, **128**: 1434-1440.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**: 656-660.
- Kojima M. and Kangawa K. (2005): Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, **85**: 495-522.
- Korbonits M., Goldstone A.P., Gueorguiev M., Grossman A.B. (2004): Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **25**: 27-68.
- Korner J., Savontaus E., Chua S.C., Leibel R.L., Wardlaw S.L. (2001): Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, **13**: 959-966.
- Kosako H., Gotoh Y., Matsuda S., Ishikawa M., Nishida E. (1992): Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *The EMBO journal*, **11**: 2903-2908.
- Kubelka M., Motlik J., Fulka J.J., Prochazka R., Rimkevichova Z., Fulka J. (1988): Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Research*, **19**: 423-431.
- Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**: 5925-5930.
- Kyriakis J.M., App H., Zhang X.F., Banerjee P., Brautigan D.L., Rapp U.R., Avruch J. (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**: 417-421.
- Lacasse P., Ollier S., Lollivier V., Boutinaud M. (2016): New insights into the importance of prolactin in dairy ruminants. *Journal of Dairy Science*, **99**: 864-874.
- Lanfranco F., Bonelli L., Baldi M., Me E., Broglio F., Ghigo E. (2008): Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to Naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**: 3633-3639.
- Lanfranco F., Bonelli L, Me E, Baldi M, di Bisceglie C, Tagliabue M, Manieri C, Ghigo E. (2006): Ghrelin inhibits LH pulsatility in humans. *Proceedings of the 88th Endocrine Society Meeting*, pp. 3-807.
- Larsen P.J., Tang-Christensen M., Stidsen C.E., Madsen K., Smith M.S., Cameron J.L. (1999): Activation of central neuropeptide Y Y1 receptors potently stimulates food intake in male Rhesus monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**: 3781-3791.
- Leblanc, S. (2010): Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development*, **56**:S1–S7.
- Lee H.-M., Wang G., Englander E.W., Kojima M., Greeley G.H. (2002): Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution,

- ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*, **143**: 185-190.
- Lee J.H., Miele M.E., Hicks D.J., Phillips K.K., Trent J.M., Weissman B.E., Welch D.R. (1996): KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **88**: 1731-1737.
- Lee J.T. and McCubrey J.A. (2002): The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, **16**: 486-507.
- Lefloch R., Pouyssegur J., Lenormand P. (2008): Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and Cellular Biology*, **28**: 511-527.
- Lefloch R., Pouyssegur J., Lenormand P. (2009): Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle*, **8**: 705-711.
- Leroy J.L.M.R., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I.G.F., Bols P.E.J. (2008): Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 612-622.
- Li L., Ferin M., Sauer M.V., Lobo R.A. (2011): Serum and follicular fluid ghrelin levels negatively reflect human oocyte quality and *in vitro* embryo development. *Fertility and Sterility*, **96**: 1116-1120.
- Liang C.-G., Huo L.-J., Zhong Z.-S., Chen D.-Y., Schatten H., Sun Q.-Y. (2005): Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in cumulus cells is essential for Germinal Vesicle Breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology*, **146**: 4437-4444.
- Liang C.-G., Su Y.-Q., Fan H.-Y., Schatten H., Sun Q.-Y. (2007): Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, **21**: 2037-2055.
- Liefers S.C., Veerkamp R.F., te Pas M.F.W., Delavaud C., Chilliard Y., van der Lende T. (2003): Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **86**: 799-807.
- Liu X., Jiang J., Gui C., Hu X., Xiang M., Wang J. (2008): Angiopoietin-1 protects mesenchymal stem cells against serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, **29**: 815-822.
- Lloyd A.C. (2006): Distinct functions for ERKs? *Journal of Biology*, **5**: 13.
- Lopez H., Satter L.D., Wiltbank M.C. (2004): Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, **81**: 209-223.
- Loucks A.B. and Thuma J.R. (2003): Luteinizing hormone pulsatility is disrupted at a threshold of energy availability in regularly menstruating women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**: 297-311.

- Lowell B.B., S-Susulic V., Hamann A., Lawitts J.A., Himms-Hagen J., Boyer B.B., Kozak L.P., Flier J.S. (1993): Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, **366**: 740.
- Lu S., Guan J.-L., Wang Q.-P. Uehara K., Yamada S., Goto N., Date Y., Nakazato M., Kojima M., Kangawa K., Shioda S. (2002): Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, **321**: 157-160.
- Lucy M.C. (2007): Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, **64**: 237-254.
- Lumeng C.N. and Saltiel A.R. (2011): Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**: 2111-2117.
- Makino Y., Hosoda H., Shibata K., Makino I., Kojima M., Kangawa K., Kawarabayashi T. (2002): Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension*, **39**: 781-784.
- Malagón M.M., Luque R.M., Ruiz-Guerrero E., Rodríguez-Pacheco F., García-Navarro S., Casanueva F.F., Gracia-Navarro F., Castaño J.P. (2003): Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated Growth Hormone release in somatotropes. *Endocrinology*, **144**: 5372-5380.
- Martini A.C., Fernández-Fernández R., Tovar S., Navarro V.M., Vigo E., Vazquez M.J., Davies J.S., Thompson N.M., Aguilar E., Pinilla L., Wells T., Dieguez C., Tena-Sempere M. (2006): Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*, **147**: 2374-2382.
- Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K. (2000): Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **276**: 905-908.
- Matthias A., Ohlson K.B.E., Fredriksson J.M., Jacobsson A., Nedergaard J., Cannon B. (2000): Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 25073-25081.
- McCann S.M., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., Rettori V., Yu W.H. (1998): Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, Cytokines, Leptin and Nitric Oxide. *Neuroimmunomodulation*, **5**: 193-202.
- McCubrey J.A., May W.S., Duronio V., Mufson A. (2000): Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, **14**: 9-21.
- Mcdonald J.K., Lumpkin M.D., Depaolo L.V. (1989): Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of Luteinizing Hormone in ovariectomized rats: possible site of action. *Endocrinology*, **125**: 186-191.
- McShane T.M., Petersen S.L., McCrone S., Keisler D.H. (1993): Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*, **49**: 831-839.

- Medema R.H., Kops G.J., Bos J.L., Burgering B.M. (2000): AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, **404**: 782-787.
- Mermillod P., Tomanek M., Marchal R., Meijer L. (2000): High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and Development*, **55**: 89-95.
- Messenger S., Chatzidaki E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge I., Lomet D., Carlton M.B.L., Colledge W.H., Caraty A., Aparicio S.A.J.R. (2005): Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 1761-1766.
- Messini C.I., Dafopoulos K., Chalvatzas N., Georgoulas P., Anifandis G., Messinis I.E. (2011): Effect of ghrelin and metoclopramide on prolactin secretion in normal women. *Journal of Endocrinological Investigation*, **34**: 276-279.
- Messini C.I., Dafopoulos K., Chalvatzas N., Georgoulas P., Messinis I.E. (2009): Growth hormone and prolactin response to ghrelin during the normal menstrual cycle. *Clinical Endocrinology*, **71**: 383-387.
- Meunier H., Rivier C., Evans R.M., Vale W. (1988): Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**: 247-251.
- Michell B.J., Griffiths J.E., Mitchelhill K.I., Rodriguez-Crespo I., Tiganis T., Bozinovski S., de Montellano P.R., Kemp B.E., Pearson R.B. (1999): The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology*, **9**: 845-848.
- Miglior F. (2005): Overview of different breeding objectives in various countries. *Proceedings of the 11th WHFF Meeting, Session*, **4**: 7-11.
- Millar R.P., Lu Z.-L., Pawson A.J., Flanagan C.A., Morgan K., Maudsley S.R. (2004): Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews*, **25**: 235-275.
- Miller D.W., Harrison J.L.Brown., Y.A., Doyle U., Lindsay A., Adam C.L., Lea R.G. (2005): Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**: 60.
- Miura H., Hojo N., Takahashi R., Kikuchi M., Kojima M., Kangawa K., Hasegawa Y., Sakaguchi M. (2014): The influence of feeding pattern on changes in plasma ghrelin in the Holstein cow. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **76**: 1137-1139.
- Miura H., Tsuchiya N., Sasaki I., Kikuchi M., Kojima M., Kangawa K., Hasegawa Y., Ohnami Y. (2004): Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *Journal of Animal Science*, **82**: 1329-1333.
- Miyoshi T., Otsuka F., Inagaki K., Otani H., Takeda M., Suzuki J., Goto J., Ogura T., Makino H. (2007): Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte

- actions in Follicle-Stimulating Hormone-induced estrogen production. *Endocrinology*, **148**: 337-345.
- Mizuno T.M., Kleopoulos S.P., Bergen H.T., Roberts J.L., Priest C.A., Mobbs C.V. (1998): Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, **47**: 294-297.
- Moenter S.M., Caraty A., Locatelli A., Karsch F.J. (1991): Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, **129**: 1175-1182.
- Morales-Ruiz M., Fulton D., Sowa G., Languino L.R., Fujio Y., Walsh K., Sessa W.C. (2000): Vascular endothelial Growth Factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circulation Research*, **86**: 892-896.
- Muccioli D.G., Papotti M., Locatelli V., Ghigo E., Deghenghi R. (2001): Binding of ¹²⁵I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**: RC7-RC9.
- Mudroň P., Rehage J., Sallmann H.P., Höltershinken M., Scholz H. (2005): Stress response in dairy cows related to different blood glucose. *Acta Veterinaria Brno*, **74**: 37-42.
- Muller A.F., Lamberts S.W., Janssen J.A., Hofland L.J., Koetsveld P.V., Bidlingmaier M., Strasburger C.J., Ghigo E., der Lely A.V. (2002): Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. *European Journal of Endocrinology*, **146**: 203-207.
- Nakahara K., Nakagawa M., Baba Y., Sato M., Toshinai K., Date Y., Nakazato M., Kojima M., Miyazato M., Kaiya H., Hosoda H., Kangawa K., Murakami N. (2006): Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*, **147**: 1333-1342.
- Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S. (2001): A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, **409**: 194-198.
- Navarro V.M. and Tena-Sempere M. (2011): Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction. *Frontiers in Bioscience*, **3**: 267-275.
- Nazoury M., Hosseini-Zijoud S.-M., Soukhtanloo M., Mashkani B., Hashemy S.I. (2014): Determination of *in vitro* and *in vivo* protective effects of Ghrelin against oxidative stress: Experimental Study.
- Norman H.D., Wright J.R., Hubbard S.M., Miller R.H., Hutchison J.L. (2009): Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of Dairy Science*, **92**: 3517-3528.
- Novaira H.J., Ng Y., Wolfe A., Radovick S. (2009): Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **311**: 126-134.
- Nuttinck F., Reinaud P., Tricoire H., Vigneron C., Peynot N., Mialot J.P., Mermillod P., Charpigny G. (2002): Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, **61**: 93-101.

- Obay B.D., Taşdemir E., Tümer C., Bilgin H.M., Atmaca M. (2008): Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides*, **29**: 448-455.
- Obay B.D., Tasdemir E., Tümer C., Bilgin H.M., Sermet A. (2007): Antiepileptic effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Peptides*, **28**: 1214-1219.
- Oberley L.W. (1988): Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, **5**: 113-124.
- Oddy V.H., Gooden J.M., Hough G.M., Teleni E., Annison E.F. (1985): Partitioning of nutrients in merino ewes. II. Glucose utilization by skeletal muscle, the pregnant uterus and the lactating mammary gland in relation to whole body glucose utilization. *Australian Journal of Biological Sciences*, **38**: 95-108.
- Ohashi S., Naito K., Sugiura K., Iwamori N., Goto S., Naruoka H., Tojo H. (2003): Analyses of Mitogen-Activated Protein kinases function in the maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, **68**: 604-609.
- Ollmann M.M., Wilson B.D., Yang Y.K., Kerns J.A., Chen Y., Gantz I., Barsh G.S. (1997): Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science*, **278**: 135-138.
- O’Rahilly S., Farooqi I.S., Yeo G.S.H., Challis B.G. (2003): Minireview: Human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology*, **144**: 3757-3764.
- Osterstock G., Escobar P., Mitutsova V., Gouty-Colomer L.-A., Fontanaud P., Molino F., Fehrentz J.-A., Carmignac D., Martinez J., Guerinneau N.C., Robinson I.C.A.F., Mollard P., Méry P.-F. (2010): Ghrelin Stimulation of Growth Hormone-Releasing Hormone Neurons Is Direct in the Arcuate Nucleus. *PLoS ONE*, **5**: e9159.
- Padmanabhan V. and McNeilly A.S. (2001): Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*, **121**: 21-30.
- Parker K.I., Robertson D.M., Groome N.P., Macmillan K.L. (2003): Plasma concentrations of inhibin a and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **68**: 822-828.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J., Winer M.A., First N.L. (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, **38**: 1171-1180.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **25**: 591-600.
- Patterson M., Murphy K.G., le Roux C.W., Ghatei M.A., Bloom S.R. (2005): Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**: 2205-2211.
- Payne D.M., Rossomando A.J., Martino P., Erickson A.K., Her J.H., Shabanowitz J., Hunt D.F., Weber M.J., Sturgill T.W. (1991): Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO Journal*, **10**: 885-892.

- Pearson G., Robinson F., Beers-Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, **22**: 153-183.
- Peeters T.L. (2005): Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut*, **54**: 1638-1649.
- Peino R., Baldelli R., Rodriguez-Garcia J., Rodriguez-Segade S., Kojima M., Kangawa K., Arvat E., Ghigo E., Dieguez C., Casanueva F.F. (2000): Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *European Journal of Endocrinology*, **143**: R11-14.
- Peng X.R., Hsueh A.J., LaPolt P.S., Bjersing L., Ny T. (1991): Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, **129**: 3200-3207.
- Pettersson I., Muccioli G., Granata R., Deghenghi R., Ghigo E., Ohlsson C., Isgaard J. (2002): Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *Journal of Endocrinology*, **175**: 201-209.
- Picton H.M. (2001): Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, **55**: 1193-1210.
- Pierroz D.D., Catzeflis C., Aebi A.C., Rivier J.E., Aubert M.L. (1996): Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology*, **137**: 3-12.
- Pincus S.M., Padmanabhan V., Lemon W., Randolph J., Rees Midgley A. (1998): Follicle-stimulating hormone is secreted more irregularly than luteinizing hormone in both humans and sheep. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**: 1318-1324.
- Pinilla L., González D., Tena-Sempere M., Aguilar E. (1998): Nitric Oxide (NO) stimulates gonadotropin secretion *in vitro* through a calcium-dependent, cGMP-Independent mechanism. *Neuroendocrinology*, **68**: 180-186.
- Plachta H., Bartnikowska E., Obara A. (1992): Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, **211**: 101-112.
- Plant T.M. and Ramaswamy S. (2009): Kisspeptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Peptides*, **30**: 67-75.
- Plant T.M. and Zeleznik A.J. (2014): In: Knobil and Neill's (Eds.) "*Physiology of Reproduction*", Academic Press, pp. 2708.
- Plat L., Byrne M.M., Sturis J., Polonsky K.S., Mockel J., Féry F., Van Cauter E. (1996): Effects of morning cortisol elevation on insulin secretion and glucose regulation in humans. *The American Journal of Physiology*, **270**: E36-42.
- Ponderato N., Crotti G., Turini P., Duchi R., Galli C., Lazzari G. (2002): Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. *Molecular Reproduction and Development*, **62**: 513-518.

- Ponderato N., Lagutina I., Crotti G., Turini P., Galli C., Lazzari G. (2001): Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Molecular Reproduction and Development*, **60**: 579-585.
- Popelkova M., Sirotkin A.V., Bezakova A. Makaveric, A.V., Pivko J., Kacmarik J., Kovac G. (2006): Effect of IGF-I, Leptin, Ghrelin and MARK-ERK on the nuclear maturation of bovine oocytes. *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy*, **50**: 179-181.
- Poretsky L., Cataldo N.A., Rosenwaks Z., Giudice L.C. (1999): The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Reviews*, **20**: 535-582.
- Pryce J.E., Royal M.D., Garnsworthy P.C., Mao I.L. (2004): Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science*, **86**: 125-135.
- Pryce J.E., Simm G., Robinson J.J. (2002): Effects of selection for production and maternal diet on maiden dairy heifer fertility. *Animal Science*, **74**: 415-421.
- Purcell S.H. and Moley K.H. (2011): The impact of obesity on egg quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **28**: 517-524.
- Qi Y., Oldfield B.J., Clarke I.J. (2009): Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*, **21**: 690-697.
- Radisavljevic Z., Avraham H., Avraham S. (2000): Vascular endothelial Growth Factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 20770-20774.
- Rak-Mardyla A. (2013): Ghrelin role in hypothalamus-pituitary-ovarian axis. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, **64**: 695-704.
- Rance N.E., Young W.S., McMullen N.T. (1994): Topography of neurons expressing luteinizing hormone-releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, **339**: 573-586.
- Ravussin E. and Galgani J.E. (2011): The implication of brown adipose tissue for humans. *Annual Review of Nutrition*, **31**: 33-47.
- Reimer M.K., Pacini G., Ahrén B. (2003): Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **144**: 916-921.
- Reith S., Pries M., Verhülsdonk C., Brandt H., Hoy S. (2014): Influence of estrus on dry matter intake, water intake and BW of dairy cows. *Animal*, **8**: 748-753.
- Rensis F.D. and Scaramuzzi R.J. (2003): Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. *Theriogenology*, **60**: 1139-1151.
- Rigault C., Le Borgne F., Georges B., Demarquoy J. (2007): Ghrelin reduces hepatic mitochondrial fatty acid beta oxidation. *Journal of Endocrinological Investigation*, **30**: RC4-8.

- Rindi G., Necchi V., Savio A., Torsello A., Zoli M., Locatelli V., Raimondo F., Cocchi D., Solcia E. (2002): Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, **117**: 511-519.
- Roa J., García-Galiano D., Castellano J.M., Gaytan F., Pinilla L., Tena-Sempere M. (2010): Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **324**: 87-94.
- Roche J.F. (2006): The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, **96**: 282-296.
- Rometo A.M., Krajewski S.J., Voytko M.L., Rance N.E. (2007): Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**: 2744-2750.
- Roselli-Reh fuss L., Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T., Low M.J., Tatro J.B., Entwistle M.L., Simerly R.B., Cone R.D.. (1993): Identification of a receptor for γ melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 8856-8860.
- Rosenbaum M. and Leibel R.L. (1998): Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **9**: 117-124.
- Roskoski R. (2012): ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, **66**: 105-143.
- Rossi M., Kim M.S., Morgan D.G.A., Small C.J., Edwards C.M.B., Sunter D., Abusnana S., Goldstone A.P., Russell S.H., Stanley S.A., Smith D.M., Yagaloff K., Ghatei M.A., Bloom S.R. (1998): A C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone *in vivo*. *Endocrinology*, **139**: 4428-4431.
- Rossomando A.J., Payne D.M., Weber M.J., Sturgill T.W. (1989): Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**: 6940-6943.
- de Roux N., Genin E., Carel J.-C., Matsuda F., Chaussain J.-L., Milgrom E. (2003): Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 10972-10976.
- Royal M., Mann G.E., Flint A.P.F. (2000): Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, **160**: 53-60.
- Saba-El-Leil M.K., Vella F.D.J., Vernay B., Voisin L., Chen L., Labrecque N., Ang S.-L., Meloche S. (2003): An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Reports*, **4**: 964-968.

- Sadeghzadeh A., Bayrami A., Mahmoudi F., Khazali H., Asadi A. (2018): The effects of interaction of Dopaminergic and Kisspeptin neural pathways on Ghrelin secretion in rats. *Journal of Paramedical Sciences*, **9**: 29-35.
- Sahu A. (2003): Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **24**: 225-253.
- Sahu A. (2004): Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology*, **145**: 2613-2620.
- Sakata I., Yamazaki, M. Inoue K., Hayashi Y., Kangawa K., Sakai T. (2003): Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neuroscience Letters*, **342**: 183-186.
- Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. (1998): Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, **92**: 573-585.
- Salhab M., Tosca L., Cabau C., Papillier P., Perreau C., Dupont J., Mermillod P., Uzbekova S. (2011): Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology*, **75**: 90-104.
- Salhab, M. Dhorne-Pollet S., Auclair S., Guyader-Joly C., Brisard D., Dalbies-Tran R., Dupont J., Ponsart C., Mermillod P., Uzbekova S. (2013): *In vitro* maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development*, **80**: 166-182.
- Sartin J.L., Bartol F.F., Kemppainen R.J., Dieberg G., Buxton D., Soyoola E. (1988): Modulation of growth hormone-releasing factor stimulated growth hormone secretion by plasma glucose and free fatty acid concentrations in sheep. *Neuroendocrinology*, **48**: 627-633.
- Savio J.D., Boland M.P., Roche J.F. (1990): Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, **88**: 581-591.
- Scaramuzzi R.J. and Murray J.F. (1995): The nutrient requirements for the optimum production of gametes in assisted reproduction in ruminant animals. *Proceedings of the 10th Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France*, pp. 85-103,
- Schaeffer H.J. and Weber M.J. (1999): Mitogen-Activated Protein Kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*, **19**: 2435-2444.
- Schams D., Graf F., Graule B., Abele M., Prokopp S. (1991): Hormonal changes during lactation in cows of three different breeds. *Livestock Production Science*, **27**: 285-296.
- Schiöth H.B., Kakizaki Y., Kohsaka A., Suda T., Watanobe H. (2001): Agouti-related peptide prevents steroid-induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. *Neuroreport*, **12**: 687-690.

- Schiöth H.B., Muceniece R., Mutulis F., Prusis P., Lindeberg G., Sharma S.D., Hruby V.J., Wikberg J.E.S. (1997): Selectivity of cyclic [d-Nal7] and [d-Phe7] substituted MSH analogues for the melanocortin receptor subtypes. *Peptides*, **18**: 1009-1013.
- Schiöth H.B., Mutulis F., Muceniece R., Prusis P., Wikberg J.E.S. (1998): Discovery of novel melanocortin4 receptor selective MSH analogues. *British Journal of Pharmacology*, **124**: 75-82.
- Schiöth H.B. and Watanobe H. (2002): Melanocortins and reproduction. *Brain Research Reviews*, **38**: 340-350.
- Schneider J.E. (2004): Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior*, **81**: 289-317.
- Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D., Seeley R.J., Baskin D.G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**: 661-671.
- Seeger R., Seeger D., Lozeman F.J., Ahn N.G., Graves L.M., Campbell J.S., Ericsson L., Harrylock M., Jensen A.M., Krebs E.G. (1992): Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**: 25628-25631.
- Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno J.S., Shagoury J.K., Bo-Abbas Y., Kuohung W., Schwino K.M., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Kaiser U.B., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F., O'Rahilly S., Carlton M.B.L., Crowley W.F., Aparicio S.A.J.R., Colledge W.H. (2003): The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, **349**: 1614-1627.
- Shahab M., Mastronardi C., Seminara S.B., Crowley W.F., Ojeda S.R., Plant T.M. (2005): Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 2129-2134.
- Shibata K., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Makino Y., Makino I., Kawarabayashi T., Futagami K., Gomita Y. (2004): Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*, **25**: 279-287.
- Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayashi T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K., Nakao K. (2001): Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, **50**: 227-232.
- Sirard M.A., Florman H.M., Leibfried-Rutledge M.L., Barnes F.L., Sims M.L., First N.L. (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, **40**: 1257-1263.
- Sirois J. and Fortune J.E. (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, **39**: 308-317.
- Sirotkin A.V., Bezáková A., Laurinčík J., Matejovičová B. (2011): Involvement of the metabolic hormones leptin, ghrelin, obestatin, IGF-I and of MAP kinase in control of porcine oocyte maturation. *Animal*, **5**: 94-99.

- Sirotkin A.V., Rafay J., Kotwica J., Darlak K., Valenzuela F. (2009): Role of ghrelin in regulating rabbit ovarian function and the response to LH and IGF-I. *Domestic Animal Endocrinology*, **36**: 162-172.
- Sisk C.L. and Bronson F.H. (1986): Effects of food restriction and restoration on gonadotropin and growth hormone secretion in immature male rats. *Biology of Reproduction*, **35**: 554-561.
- Smith, J.T. Li Q., Yap K.S., Shahab M., Roseweir A.K., Millar R.P., Clarke I.J. (2011): Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*, **152**: 1001-1012.
- Spicer L.J. (2001): Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, **21**: 251-270
- Squires E.J. (2011): Applied animal endocrinology. *In*: Second Edition, CABI, Wallingford, Oxfordshire, Cambridge, MA, pp. 108-114 and pp. 165-168.
- Su Y.-Q., Rubinstein S., Luria A., Lax Y., Breitbart H. (2001): Involvement of MEK-Mitogen-Activated Protein kinase pathway in Follicle-Stimulating Hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, **65**: 358-365.
- Su Y.-Q., Wigglesworth K., Pendola F.L., O'Brien M.J., Eppig J.J. (2002): Mitogen-Activated Protein Kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, **143**: 2221-2232.
- Sugino T., Hasegawa Y., Kikkawa Y., Yamaura J., Yamagishi M., Kurose Y., Kojima M., Kangawa K., Terashima Y. (2002): A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **295**: 255-260.
- Sun Y., Asnicar M., Smith R.G. (2007): Central and peripheral roles of ghrelin on glucose homeostasis. *Neuroendocrinology*, **86**: 215-228.
- Sunderland S.J., Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. (1994): Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, **101**: 547-555.
- Sutton M.L., Cetica P.D., Beconi M.T., Kind K.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. (2003): Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, **126**: 27-34.
- Suzuki H., Sasaki Y., Shimizu M., Matsuzaki M., Hashizume T., Kuwayama H. (2010): Ghrelin and leptin did not improve meiotic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, **45**: 927-930.
- Swart I., Overton J.M., Houpt T.A. (2001): The effect of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels. *Peptides*, **22**: 2175-2179.
- Takada R., Satomi Y., Kurata T., Ueno N., Norioka S., Kondoh H., Takao T., Takada S. (2006): Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: Its role in Wnt secretion. *Developmental Cell*, **11**: 791-801.

- Takahashi H., Kurose Y., Kobayashi S., Sugino T., Kojima M., Kangawa K., Hasegawa Y., Terashima Y. (2006): Ghrelin enhances glucose-induced insulin secretion in scheduled meal-fed sheep. *Journal of Endocrinology*, **189**: 67-75.
- Takaya K., Ariyasu H., Kanamoto N., Iwakura H., Yoshimoto A., Harada M., Mori K., Komatsu Y., Usui T., Shimatsu A., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Kojima M., Kangawa K., Nakao K. (2000): Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**: 4908-4911.
- Tanaka K., Minoura H., Isobe T., Yonaha H., Kawato H., Wang D.F., Yoshida T., Kojima M., Kangawa K., Toyoda N. (2003): Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**: 2335-2340.
- Tannenbaum G.S., Lapointe M., Beaudet A., Howard A.D. (1998): Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*, **139**: 4420-4423.
- de Tassigny A. d'Anglemont A. Berdeaux R. Souktani P. Henry, Ghaleh B. (2008): The volume-sensitive chloride channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3kinase, Akt and Erk 1/2. *European Journal of Heart Failure*, **10**: 39-46.
- Tena-Sempere M. (2007): Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*, **86**: 229-241.
- Tena-Sempere M., Barreiro M.L., González L.C., Gaytán F., Zhang F.-P., Caminos J.E., Pinilla L., Casanueva F.F., Diéguez C., Aguilar E. (2002): Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*, **143**: 717-725.
- Tesauro M., Schinzari F., Iantorno M., Rizza S., Melina D., Lauro D., Cardillo C. (2005): Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation*, **112**: 2986-2992.
- ThidarMyint H., Yoshida H., Ito T., Kuwayama H. (2006): Dose-dependent response of plasma ghrelin and growth hormone concentrations to bovine ghrelin in Holstein heifers. *Journal of Endocrinology*, **189**: 655-664.
- Thompson E.L., Patterson M., Murphy K.G., Smith K.L., Dhillo W.S., Todd J.F., Ghatei M.A., and Bloom S.R. (2004): Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, **16**: 850-858.
- Tolle V., Zizzari P., Tomasetto C., Rio M.-C., Epelbaum J., Bluet-Pajot M.-T. (2001): *In vivo* and *in vitro* effects of ghrelin/motilin-related peptide on Growth Hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, **73**: 54-61.
- Tomek W. and Smiljakovic T. (2005): Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*, **130**: 423-430.
- Tong J., Dave N., Mugundu G.M., Davis H.W., Gaylinn B.D., Thorner M.O., Tschöp M.H., D'Alessio D., Desai P.B. (2013): The pharmacokinetics of acyl, des-acyl, and total ghrelin in healthy human subjects. *European Journal of Endocrinology*, **168**: 821-828.

- Torner H., Kubelka M., Heleil B., Tomek W., Aim H., Kuzmina T., Guiard V. (2001): Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology*, **55**: 885-899.
- Tosca L., Uzbekova S., Chabrolle C., Dupont J. (2007): 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*, **77**: 452-465.
- Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L. (2000): Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**: 908-913.
- Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C. (2001): Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**: RC19-21.
- Tsutsui K., Saigoh E., Ukena K., Teranishi H., Fujisawa Y., Kikuchi M., Ishii S., Sharp P.J. (2000): A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **275**: 661-667.
- Ubuka T., Son Y.L., Bentley G.E., Millar R.P., Tsutsui K. (2013): Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *General and Comparative Endocrinology*, **190**: 10-17.
- Uenoyama Y., Inoue N., Pheng V., Homma T., Takase K., Yamada S., Ajiki K., Ichikawa M., Okamura H., Maeda K.-I., Tsukamura H. (2011): Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *Journal of Neuroendocrinology*, **23**: 863-870.
- Vale W., Rivier C., Hsueh A., Campen C., Meunier H., Bicsak T., Vaughan J., Corrigan A., Bardin W., Sawchenko P. (1987): Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Progress in Hormone Research*, **44**: 1-34.
- Van der Lely A.J., Tschöp M., Heiman M.L., Ghigo E. (2004): Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews*, **25**: 426-457.
- Van der Walt J.G., Hattingh J., Petty D.B., Grobler M.J., Ganhao M.F. (1993): Effect of a 72 hour fast on physiological stress indicators in feedlot cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*, **64**: 39-42.
- Veldhuis J.D. and Bowers C.Y. (2010): Integrating GHS into the Ghrelin System. *International Journal of Peptides*, 2010:e879503.
- Verlhac M.H., Kubiak J.Z., Clarke H.J., Maro B. (1994): Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, **120**: 1017-1025.
- Vestergaard E.T., Hansen T.K., Gormsen L.C., Jakobsen P., Moller N., Christiansen J.S., Jorgensen J.O.L. (2007): Constant intravenous ghrelin infusion in healthy young men: clinical pharmacokinetics and metabolic effects. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, **292**: E1829-1836.

- Viani I., Vottero A., Tassi F., Cremonini G., Sartori C., Bernasconi S., Ferrari B., Ghizzoni L. (2008): Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**: 1476-1481.
- Vignerot C., Perreau C., Dupont J., Uzbekova S., Prigent C., Mermillod P. (2004): Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, **69**: 466-474.
- Villa-Diaz L.G. and Miyano T. (2004): Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, **71**: 691-696.
- Vulliémoz N.R., Xiao E., Xia-Zhang L., Germond M., Rivier J., Ferin M. (2004): Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized Rhesus monkey. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**: 5718-5723.
- Vulliémoz N.R., Xiao E., Xia-Zhang L., Rivier J., Ferin M. (2008): Astressin B, a nonselective Corticotropin-Releasing hormone receptor antagonist, prevents the inhibitory effect of ghrelin on Luteinizing Hormone pulse frequency in the ovariectomized Rhesus monkey. *Endocrinology*, **149**: 869-874.
- Vulliémoz N.R., Xiao E., Xia-Zhang L., Wardlaw S.L., Ferin M. (2005): Central infusion of agouti-related peptide suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*, **146**: 784-789.
- Walsh S.W., Williams E.J., Evans A.C.O. (2011): A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, **123**: 127-138.
- Wang Z., Lin P., Yu S. (2013): Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized ovine embryos. *Theriogenology*, **79**: 695-701.
- Wathes D.C., Clempson A.M., Pollott G.E. (2012): Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. *Reproduction, Fertility and Development*, **25**: 48-61.
- Wauters M., Considine R.V., Van Gaal L.F. (2000): Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *European Journal of Endocrinology*, **143**: 293-311.
- Wertz-Lutz A.E., Daniel J.A., Clapper J.A., Trenkle A., Beitz D.C. (2007): Prolonged, moderate nutrient restriction in beef cattle results in persistently elevated circulating ghrelin concentrations. *Journal of Animal Science*, **86**: 564-575.
- Whisnant C.S. and Harrell R.J. (2002): Effect of short-term feed restriction and refeeding on serum concentrations of leptin, luteinizing hormone and insulin in ovariectomized gilts. *Domestic Animal Endocrinology*, **22**: 73-80.
- Willesen M.G., Kristensen P., Romer J. (1999): Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, **70**: 306-316.
- Williams G.L., Amstalden M., Garcia M.R., Stanko R.L., Nizielski S.E., Morrison C.D., Keisler D.H. (2002): Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, **23**: 339-349.

- Wintermantel T.M., Campbell R.E., Porteous R., Bock D., Gröne H.-J., Todman M.G., Korach K.S., Greiner E., Pérez C.A., Schütz G., Herbison A.E. (2006): Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*, **52**: 271-280.
- Wójcik-Gładysz A. and Polkowska J. (2006): Neuropeptide Y - a neuromodulatory link between nutrition and reproduction at the central nervous system level. *Reproductive Biology*, **6 (Suppl. 2)**: 21-28.
- Wolfenson D., Roth Z., Meidan R. (2000): Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, **60-61**: 535-547.
- Wood K.M., Awda B.J., Fitzsimmons C., Miller S.P., McBride B.W., Swanson K.C. (2013): Influence of pregnancy in mid-to-late gestation on circulating metabolites, visceral organ mass, and abundance of proteins relating to energy metabolism in mature beef cows. *Journal of Animal Science*, **91**: 5775-5784.
- Wren A. M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillo W.S., Ghatei M.A., Bloom S.R. (2001a): Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**: 5992.
- Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillo W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A., Bloom S.R. (2001b): Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, **50**: 2540-2547.
- Wu D. and Cederbaum A.I. (2003): Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, **27**: 277-284.
- Wu Q., Kazantzis M., Doege H., Ortegon A.M., Tsang B., Falcon A., Stahl A. (2006): Fatty acid transport protein 1 is required for nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes*, **55**: 3229-3237.
- Xiao S., Findlay J.K., Robertson D.M. (1990): The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells, *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **69**: 1-8.
- Xu X., Jhun B.S., Ha C.H., Jin Z.-G. (2008): Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Endocrinology*, **149**: 4183-4192.
- Yamanaka A., Beuckmann C.T., Willie J.T., Hara J., Tsujino N., Mieda M., Tominaga M., Ichi Yagami K., Sugiyama F., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. (2003): Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, **38**: 701-713.
- Yamashita Y., Hishinuma M., Shimada M. (2009): Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during *in vitro* maturation of porcine COCs. *Journal of Ovarian Research*, **2**: 20.
- Yao Y., Li W., Wu J., Germann U.A., Su M.S.S., Kuida K., Boucher D.M. (2003): Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**: 12759-12764.

- Yoshida H., Habata Y., Hosoya M., Kawamata Y., Kitada C., Hinuma S. (2003): Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1593**: 151-157.
- Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., McCann S.M. (1997): Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 1023-1028.
- Zhang K., Wei H.-X., Zhang Y.-H., Wang S.-H., Li Y., Dai Y.-P., Li N. (2007): Effects of ghrelin on *in vitro* development of porcine *in vitro* fertilized and parthenogenetic embryo. *Journal of Reproduction and Development*, **53**: 647-653.
- Zhang W., Chai B., Li J.Y., Wang H., Mulholland M.W. (2008a): Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*, **149**: 4710-4716.
- Zhang W., Lei Z., Su J., Chen S. (2008b): Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, **109**: 356-367.
- Zhang W., Lin T.R., Hu Y., Fan Y., Zhao L., Stuenkel E.L., Mulholland M.W. (2004): Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *The Journal of Physiology*, **559**: 729-737.
- Zhao T.-J., Liang G., Li R.L., Xie X., Sleeman M.W., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2010): Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**: 7467-7472.
- Zigman J.M. and Elmquist J.K. (2003): Minireview: from anorexia to obesity - the Yin and Yang of body weight control. *Endocrinology*, **144**: 3749-3756.