



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΩΑΓΩΓΟΥ ΣΕ ΑΓΕΛΑΔΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μαγκριώτη Κωνσταντίνα του Δημητρίου
Λάρισα 2023

**«Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στη
μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών
κυττάρων του ωαγωγού σε αγελάδες
γαλακτοπαραγωγής»**

**«Effect of heat stress on transcriptional activity of
ovarian epithelial cells in dairy cows»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιαννούλης Θεμιστοκλής (επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη, Βιοποικιλότητα, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης (συνεπιβλέπων)

Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μούτου Αικατερίνη

Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη, Επίκουρο Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη, Βιοποικιλότητα.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γιαννούλη (για να μη μας κιάξουν) για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για τη βοήθεια και τη καθοδήγησή του. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Μούτου Αικατερίνη και τον Καθηγητή κ. Μαμούρη Ζήση που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους Διδάκτορες Αγγελακόπουλο Ραφαήλ, Φυτσιλή Αλεξία – Ευαγγελία και Τσιπουρλιάνο Ανδρέα για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου, καθώς και για την υποστήριξη, τον χρόνο, τις πληροφορίες και την πολύτιμη βοήθειά τους για οτιδήποτε χρειάστηκε, καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την προθυμία τους να λυθεί οποιαδήποτε απορία μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κλιματική αλλαγή, και ιδίως η αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγεί σε θερμικό στρες, το οποίο αποτελεί σημαντική απειλή για τη γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής λόγω των επαγόμενων μεταβολών της ενδοκρινικής κατάστασης, των αυξημένων φαινομένων οξειδωτικού στρες, της μειωμένης γονιμοποιητικής ικανότητας των ωαρίων και των αυξημένων θανάτων εμβρύων. Ο ωαγωγός και οι εκκρίσεις του (το ωοθυλακικό υγρό) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη γονιμότητα και την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η χωροχρονική επίδραση στην έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια μιας θερμοουδέτερης και μιας περιόδου θερμικής καταπόνησης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν ήταν από τη μεριά του ωχρού σωματίου (ipsilateral) και από την αντίθετη (contralateral). Απομονώθηκε ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή, και στην συνέχεια μελετήθηκαν μέσω ποσοτικής qPCR εικοσιδύο (22) γονίδια που εμπλέκονται σε μονοπάτια του οξειδωτικού στρες, Unfolded Protein Response (UPR), απόπτωσης, διέγερσης του ανοσοποιητικού, ρύθμισης της μετάφρασης υπό συνθήκες στρες και απόκρισης στο θερμικό στρες. Τα αποτελέσματα από το two – way ANOVA test και το post – hoc Tukey έδειξαν πως υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του *SOD2*, *EIF2A*, *TLR4* και *PTGS2*. Τα πρώτα τρία (3) γονίδια συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική δράση του κυττάρου, στην καθολική αναστολή της μετάφρασης και στην γραμμική άμυνα του κυττάρου, αντίστοιχα. Το τελευταίο γονίδιο, όμως, ενισχύει τη φλεγμονή και διαταράσσει τον οιστρικό κύκλο της αγελάδας. Συμπερασματικά, δεν ενεργοποιούνται μόνο μονοπάτια κατά του θερμικού στρες, αλλά διεγείρονται και αυτά που μειώνουν την αναπαραγωγική ικανότητα των αγελάδων Holstein κατά την καλοκαιρινή περίοδο.

ABSTRACT

Climate change, and especially the rise of temperature leads to heat stress, which is a major threat for dairy cows' fertility due to induced alterations of the endocrine status, increased oxidative stress phenomena, reduced fertilizing capacity of the oocyte and increased embryo deaths. The oviduct and its secretions (the oviductal fluid) play a crucial role in fertility and early embryo development. In this study, the spatiotemporal effect on gene expression during a thermoneutral and a heat stress period was examined. The cells were collected from the ipsilateral and contralateral to the corpus luteum oviducts was pooled. Total RNA was extracted and reversed transcribed and Real Time PCR was performed in twenty – two (22) genes that are involved in oxidative stress pathways, Unfolded Protein Response (UPR), apoptosis, immune stimulation, regulation of translation under stress conditions, and thermal stress response. Results from the two-way ANOVA test and post-hoc Tukey test indicated statistically significant differences in the expression of SOD2, EIF2A, TLR4, and PTGS2. The first three (3) genes participate in the cell's antioxidant action, global translation inhibition, and cellular defense line, respectively. However, the last gene enhances inflammation and disrupts the estrous cycle of Holstein cows. In conclusion, not only are pathways activated against thermal stress, but those that reduce the reproductive capacity of Holstein cows during the summer period are also stimulated.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Κλιματική αλλαγή	8
1.2 Holstein Cow	10
1.3 Heat stress (HS)	11
1.3.1 Heat shock proteins (HSP) και Heat shock factors (HSF)	13
1.3.2 Μοριακή απόκριση στο θερμικό στρες – οξειδωτικό στρες	14
1.3.3 Η επιρροή του θερμικού στρες στον μεταβολισμό	16
1.3.4 Επιρροή του θερμικού στρες στην αναπαραγωγική ικανότητα των Holstein αγελάδων	17
1.4 Μονοπάτι UPR	18
2. ΣΚΟΠΟΣ	21
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
3.1 Δείγματα	22
3.2 Απομόνωση RNA και cDNA synthesis	22
3.3 Quantitative Polymeric Chain Reaction (qPCR)	23
3.3.1 Αρχή της μεθόδου	23
3.3.2 Γονίδια αναφοράς (Housekeeping genes)	25
3.4 Κανονικοποίηση των δεδομένων	26
3.5 Προετοιμασία αντίδρασης για τα δείγματα	27

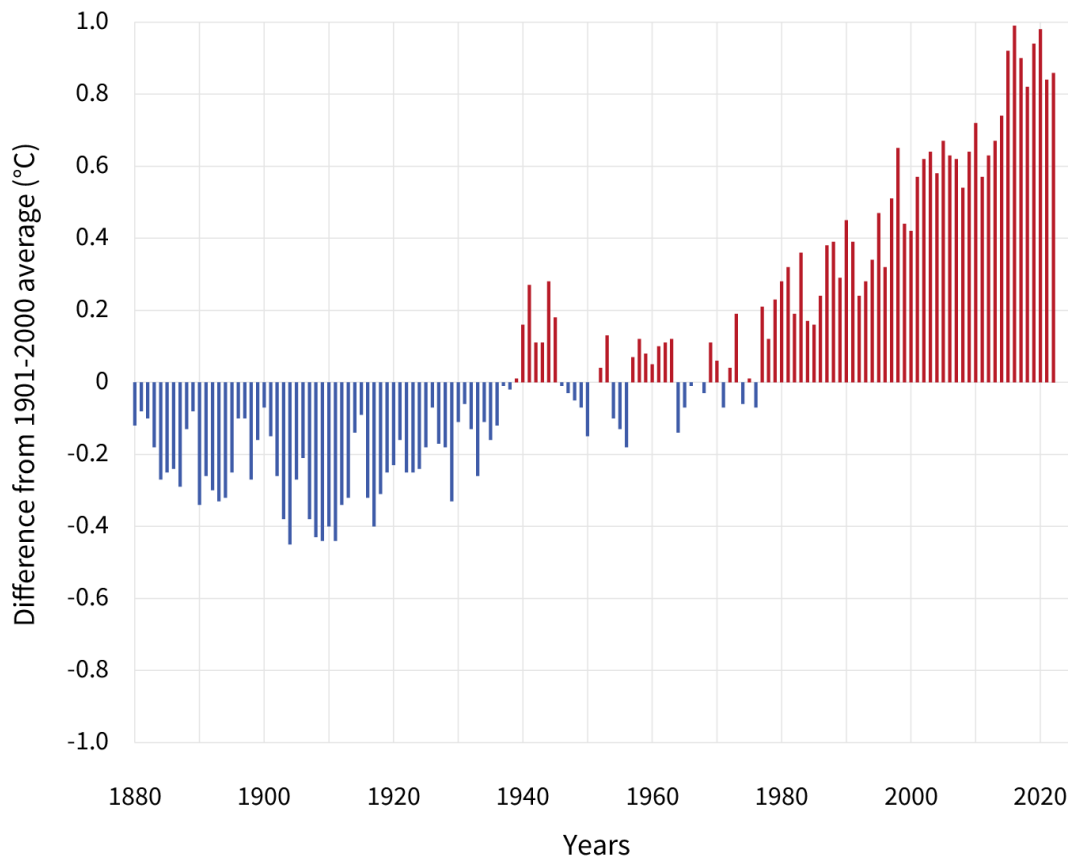
3.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time PCR.....	29
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
4.1 Διαγράμματα απεικόνισης επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ εποχών και ιστών	30
4.2 Αποτελέσματα από two – way ANOVA test και post – hoc Tukey test των γονιδίων με στατιστικά σημαντική διαφορά	52
4.3 Αποτελέσματα από Pearson correlation	53
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κλιματική αλλαγή

Η κλιματική αλλαγή αναφέρεται στις μακροπρόθεσμες αλλαγές στο κλίμα του πλανήτη μας που προκαλούνται από ανθρώπινες δραστηριότητες, κυρίως από τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Οι βασικοί παράγοντες που συνδέονται με την κλιματική αλλαγή είναι οι ανθρώπινες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), μεθανίου (CH₄), οξειδίου του αζώτου (N₂O) και άλλων αερίων που αυξάνουν το θερμοκηπιακό αέριο στην ατμόσφαιρα. Σύμφωνα με την Πέμπτη Έκθεση Αξιολόγησης (AR5) σχετικά με την κλιματική αλλαγή της Διακυβερνητικής Επιτροπής για την Κλιματική Αλλαγή (IPCC) η θέρμανση του πλανήτη είναι αδιαμφισβήτητη. Το ενεργειακό ισοζύγιο της γης είναι σε ανισορροπία, με μεγαλύτερο ποσό ακτινοβολίας να εισέρχεται στην ανώτερη ατμόσφαιρα από αυτό που εξέρχεται. Η συνολική αύξηση της θερμοκρασίας τα τελευταία 30 έτη (1988-2017) συγκριτικά με τη μέση τιμή της περιόδου 1881–1910 είναι της τάξης των 0.80 °C, ενώ σύμφωνα με την έκθεση της πρώτης ομάδας εργασίας του AR5, η περίοδος 1983-2012 ήταν κατά πάσα πιθανότητα η θερμότερη τριακονταετής περίοδος των τελευταίων 800 χρόνων και, πιθανώς, η θερμότερη τριακονταετής περίοδος των τελευταίων 1.400 ετών στο βόρειο ημισφαίριο. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας από το 1981 ανά δεκαετία αντιστοιχεί σε 0.18 °C. Το 2022 ήταν το έκτο πιο ζεστό έτος καταγεγραμμένο στο NOAA, βάσει των δεδομένων θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία στην επιφάνεια του 2022 ήταν 0.86 °C υψηλότερη από το μέσο όρο του 20ου αιώνα, που ήταν 13.9 °, και 1.06 °C υψηλότερη από την προ-βιομηχανική περίοδο (1880-1900) (Εικόνα 1.). Η μέση παγκόσμια θερμοκρασία είναι σήμερα 0.95 έως 1.20 °C υψηλότερη από ότι στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Οι επιστήμονες θεωρούν ως όριο με επικίνδυνες και καταστροφικές συνέπειες για το κλίμα και το περιβάλλον, την αύξηση κατά 2°C σε σύγκριση με τα προβιομηχανικά επίπεδα.

GLOBAL AVERAGE SURFACE TEMPERATURE



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των θερμοκρασιών της επιφάνειας του πλανήτη ανά τα χρόνια (1880 – 2020). (NOAA, 2023)

Αυτή η μεταβολή στη θερμοκρασία επηρεάζει και τη διαβίωση των ζώων, πέρα από του ανθρώπου. Μία αλλαγή που έχει επέλθει είναι στα πρότυπα κίνησης και μετανάστευσης κάποιων ειδών ζώων που ενδεχομένως να αναγκάζονται να αλλάξουν τις πορείες μετανάστευσής τους λόγω μειωμένης διαθεσιμότητας τροφής. Ακόμη, οι αλλαγές της θερμοκρασίας μπορούν να διαταράξουν σημαντικά την ισορροπία ενός οικοσυστήματος: μεταβάλλεται η κατανομή και πληθυσμιακή δομή των ειδών και ως εκ τούτου προκαλούνται ανισορροπίες στην τροφική αλυσίδα και στις διαδρομές διασποράς. Οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στον τομέα του ζωικού βασιλείου είναι σημαντικές, όμως, αξίζει να σημειωθεί ότι επιδεινώνονται οι συνθήκες αναπαραγωγής, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες προκαλούν στρες στα ζώα και επηρεάζουν την αναπαραγωγική τους ικανότητα οδηγώντας σε απειλητική μείωση ζωικών πληθυσμών καθιστώντας είδη ζώων «υπό εξαφάνιση» (ΜΕ.Κ.Δ.Ε. Ε.Μ.Π., 2023).

1.2 Holstein Cow

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)

Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)

Κλάση: Θηλαστικά (*Mammalia*)

Τάξη: Αρτιοδάκτυλα (*Artiodactyla*)

Οικογένεια: *Bovinae*

Γένος: *Bos*

Είδος: *Bos taurus*



Εικόνα 2: Holstein cow

Η φυλή Holstein προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την Ολλανδία, από δύο επαρχίες της Βόρειας Ολλανδίας και της Φρίσλαντ, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του ποταμού Zuider Zee. Οι γηγενείς πληθυσμοί εξέτρεφαν και διάλεγαν με αυστηρά κριτήρια τα ζώα που θα αναπαραχθούν, βάσει της ικανότητας αξιοποίησης του γρασιδιού και απόδοσής τους. Έτσι, ύστερα από χιλιάδες χρόνια, η ανάμειξη αυτών των ζώων οδήγησαν στην εξέλιξη μία αποδοτικής, υψηλής παραγωγικότητας αγελάδα γαλακτοπαραγωγής. Οι Holsteins είναι μεγαλόσωμα βοοειδή με συνδυασμό χρωμάτων λευκό με κόκκινο ή λευκό με μαύρο (Εικ. 3). Μία υγιής ώριμη αγελάδα Holstein ζυγίζει περίπου 1500 κιλά και έχει ύψος περίπου 1.5 μέτρο· ένα υγιές μοσχάρι κατά τη γέννηση ζυγίζει τουλάχιστον 90 κιλά. Οι αγελάδες



Εικόνα 3: Δεξιά Holstein αγελάδα με λευκό και κόκκινο χρωματισμό – αριστερά Holstein αγελάδα με λευκό και μαύρο χρωματισμό.

αυτής της φυλής μπορούν σε ζευγαρώσουν σε ηλικία 15 μηνών, όταν ζυγίζουν περίπου

800 κιλά. Η κύηση των Holstein διαρκεί περίπου 9 μήνες, ενώ η παραγωγική ζωή μίας αγελάδας αντιστοιχεί, κατά μέσο όρο, στα 6 χρόνια.

Οι αγελάδες Holstein έχουν την υψηλότερη παραγωγή γάλακτος στον κόσμο. Διαθέτουν μία γενετικά εδραιωμένη ικανότητα επίδοσης που δεν έχει βιολογικό ανώτατο όριο. Προσαρμόζονται σε όλα τα συστήματα, καθώς είναι κατάλληλες και για βόσκηση αλλά και για ανατροφή σε στάβλο. Για αυτή τη φυλή αγελάδων δεν αποτελεί παράγοντα στην εκτροφή τους το υψόμετρο. Ωστόσο, δεν παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες, σε αντίθεση με φυσικές φυλές. Οι αγελάδες της συγκεκριμένης φυλής, εκτός από την γαλακτοπαραγωγική προσφορά στην αγορά, συμβάλλουν και στην παγκόσμια προμήθεια κρέατος: η διασταύρωση των αγελάδων Holstein με φυλές βοοειδών επιτυγχάνεται η ανάπτυξη ζώων με υψηλό ποσοστό πάχυνσης και παραγωγής κρέατος με λεπτές ίνες.

Επί του παρόντος, η φυλή παράγει κατά μέσο όρο 7,655 λίτρα/έτος σε 3.2 γαλακτικές περιόδους, ενώ τα καθαρόαιμα ζώα κατά μέσο όρο 8,125 λίτρα/έτος σε 3.43 γαλακτικές περιόδους κατά μέσο όρο (The Cattle Site, 2022)).

1.3 Heat stress (HS)

Η κτηνοτροφία είναι μία βασική πηγή εισοδήματος για μεγάλη μερίδα ατόμων, αφού απασχολούνται περίπου 1.3 δισεκατομμύρια άτομα σε αυτόν τον τομέα, ενώ παράλληλα η κτηνοτροφία συμβάλλει περίπου στο 40% του παγκόσμιου γεωργικού ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος (world's agricultural gross domestic product – GDP). Απειλή αποτελεί το θερμικό στρες (Heat stress – HS) για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, αφού η παραγωγή γάλακτος επηρεάζεται άμεσα από το περιβάλλον και τις μεταβολές του. Οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής επηρεάζονται από την κλιματική αλλαγή με τέτοιον τρόπο που μειώνεται σημαντικά η παραγωγή γάλακτος, αλλάζει η ποιότητά του, η διαθεσιμότητα της τροφής των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής μειώνεται, αλλά και η αναπαραγωγική τους ικανότητα ελαττώνεται. Το θερμικό στρες είναι μία κατάσταση που προκαλείται από την υπερβολική έκθεση ενός οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό συμβαίνει όταν ο οργανισμός δεν μπορεί να αντισταθμίσει τη θερμότητα από απορρέει από το περιβάλλον ή από τη διαδικασία του μεταβολισμού. Αναφορικά, κάποιες από τις

δυσμενείς συνέπειες του θερμικού στρες είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών των κυττάρων, οι ανισόρροπες ενδοκρινικές αντιδράσεις και η εξάντληση και απώλεια υγρών. Το θερμικό στρες συμβαίνει όταν η πραγματική θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι πιο υψηλή από τη θερμο – ουδέτερη ζώνη του ζώου ή το εύρος θερμοκρασιών που ο οργανισμός αποκρίνεται φυσιολογικά (comfort zone). Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος μπορεί να επηρεαστεί από έναν συνδυασμό παραγόντων: θερμοκρασία του αέρα, σχετική υγρασία (relative humidity – RH), κίνηση του αέρα, ηλιακή ακτινοβολία. Ένας τρόπος αξιολόγησης και εντοπισμού του θερμικού στρες είναι βάσει του δείκτη θερμοκρασίας υγρασίας. Ο κλιματολογικός δείκτης της θερμικής καταπόνησης είναι ο δείκτης συσχετισμού της θερμοκρασίας/υγρασίας (temperature humidity index -THI) ο οποίος λαμβάνει υπόψη του τη συνδυασμένη επίδραση της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας στα ζώα. Όταν αυτός ο δείκτης είναι ίσος ή μικρότερος του 72 ($THI \leq 72$) δεν θεωρείται ότι συμβαίνει θερμικό στρες· τιμή του δείκτη ίση με τιμή στο εύρος 73 – 77 θεωρείται ήπιο θερμικό στρες ($73 > THI > 77$)· τιμή που αντιστοιχεί τιμή ανάμεσα στις τιμές 78 με 89 θεωρείται ότι συμβαίνει μέτριο HS ($78 > THI > 89$) και τιμές άνω των 90 θεωρείται οξύ HS ($THI > 90$). Βάσει προηγούμενων μελετών, οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αντιδρούν φυσιολογικά στο θερμικό στρες, καθώς η θερμοκρασία του σώματος και ο ρυθμός αναπνοής (respiratory rates – RRs) αυξήθηκαν όταν η τιμή του THI ξεπέρασε το 75. Ο Collier et al. απέδειξαν πως η παραγωγή γάλακτος μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της τιμής του THI, της θερμοκρασίας του ορθού (RTs) και της απαγωγής της θερμότητας με εξάτμιση (Lim, et al., 2021).

Το θερμικό στρες, επίσης, επηρεάζει την έκφραση γονιδίων και κατ' επέκταση την παραγωγή πρωτεϊνών. Από αυτήν την οπτική, ανιχνεύονται σε βιοχημικό επίπεδο οι συνέπειες της συνεχόμενης έκθεσης των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε υψηλές θερμοκρασίες με τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και της HSP70. Ο οργανισμός της αγελάδας όταν η έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία είναι μακρά, απελευθερώνει κορτιζόλη ως απόκριση στο στρες. Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης οδηγούν σε μείωση της πρόσληψης τροφής καθώς ελαττώνεται η επιθυμία πρόσληψης τροφής και εν τέλει η παραγωγή γάλακτος. Η Heat Shock Protein 70 είναι μία πρωτεΐνη – συνοδός (chaperone) που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση. Ανήκει στην οικογένεια των heat shock proteins που παράγονται στα κύτταρα ως απόκριση στο στρες που διαταράσσει τη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως είναι η υψηλή

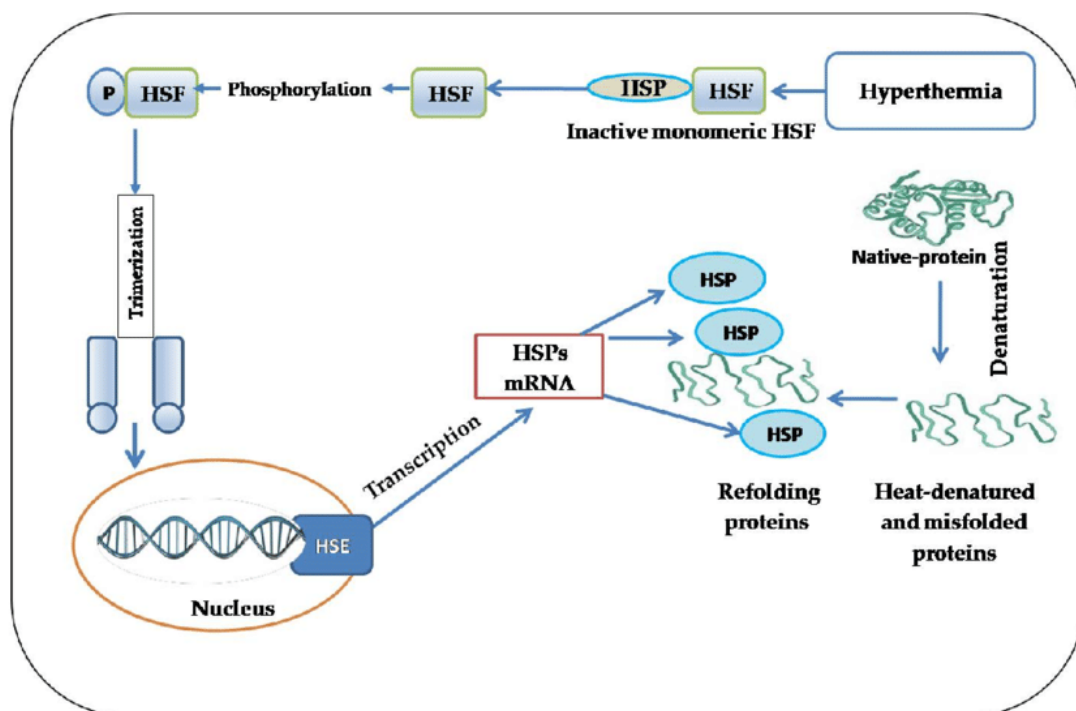
θερμοκρασία, οι τοξίνες, το οξειδωτικό στρες και άλλοι παράγοντες. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τη σωστή αναδίπλωση, μεταφορά των πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας έτσι να μην συσσωματωθούν μετουσιωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που θα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Έτσι, υπολογίζοντας τα υψηλά επίπεδα της κορτιζόλης και της HSP70 μπορεί να αναγνωριστεί αν το κύτταρο υπόκειται σε θερμικό στρες (Stamperna, et al., 2021).

1.3.1 Heat shock proteins (HSP) και Heat shock factors (HSF)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παράγονται ακόμα και υπό συνθήκες υψηλής περιβαλλοντικής θερμοκρασίας, σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες, των οποίων η έκφραση μειώνεται υπό τις ίδιες συνθήκες. Οι heat shock proteins (HSP) είναι μία ετερογενή ομάδα μοριακών συνοδών (molecular chaperones) με διαφορετικό μοριακό βάρος και λειτουργίες. Οι HSP χωρίζονται σε 1) μικρές HSP (μοριακό βάρος > 40) και στις οικογένειες πρωτεϊνών Hsp60, Hsp70, Hsp90 και Hsp100. Το κοινό χαρακτηριστικό στη δράση τους είναι πως διευκολύνουν την αναδίπλωση, το ξεδίπλωμα και τη σωστή αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών που υπέστησαν βλάβη από την υψηλή θερμοότητα. Έτσι, αποτρέπουν την ακατάλληλη διαμόρφωσή τους στον χώρο και την αποικοδόμησή τους. Οι HSP δεσμεύονται – μη επιλεκτικά – σε υδροφοβικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες μετουσιωμένων πρωτεϊνών για να αποτραπεί η μη αναστρέψιμη αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες, αποφεύγοντας έτσι τη απώλεια λειτουργίας των γειτονικών πρωτεϊνών.

Η ενεργοποίηση των HSP επάγεται από την ενεργοποίηση των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων (heat shock factors – HSF). Οι τελευταίοι, βρίσκονται στο κυτοσόλιο σε ανενεργή κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από μονομερή και μη δεσμευτική για το DNA μορφή, υπό φυσιολογικές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος. Η υπερφωσφορυλίωσή τους από πρωτεϊνικές κινάσες οδηγεί στην ενεργοποίησή τους και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου έχοντας τη δομή τριμερούς. Τα τριμερή σύμπλοκα HSF προσδέονται σε ειδικές περιοχές των υποκινητών των γονιδίων των HSP, γνωστών ως heat shock elements (HSE). Ακολούθως, το mRNA των HSP μεταγράφεται και μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτοσόλιο όπου και συντίθεται η νέα HSP (Εικ.4).

Ύστερα από μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι οι HSP μπορούν να επαχθούν ως μηχανισμός κυτταρικής άμυνας, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση της αντίστροφης σχέσης μεταξύ της επαγόμενης από τη θερμότητα κυτταροτοξικότητας και της επαγωγής των HSP. Ακόμη, αποδείχθηκε ότι υπό συνθήκες έλλειψης σύνθεσης των Hsp27 και Hsp70 κατά τη διάρκεια έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες, τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση (Belhadj, et al., 2014).



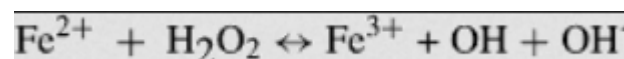
Εικόνα 4: Δράση των heat shock proteins υπό συνθήκες υψηλής περιβαλλοντικής θερμοκρασίας (ενεργοποιημένες). (Shehata, et al., 2020)

1.3.2 Μοριακή απόκριση στο θερμικό στρες – οξειδωτικό στρες

Η υπερπαραγωγή ROS οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, δηλαδή στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των οξειδωτικών. Αντίθετα, όταν οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αποκρίσεις όπως στην άμυνα έναντι μολυσματικών παραγόντων, στην κυτταρική σηματοδότηση και την επαγωγή μιτογόνου απόκρισης. Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με αποτέλεσμα να ενισχύεται η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Επομένως, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από:

- αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών με φυσιολογική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού
- φυσιολογική παραγωγή ελεύθερων ριζών, αλλά μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας
- συνδυασμό των δύο παραπάνω (Angelaki, 2023)

Η θερμική καταπόνηση των κυττάρων λόγω υψηλής θερμοκρασίας είναι υπεύθυνη και για την επαγωγή του οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών στα ζώα κτηνοτροφίας, όπως στις αγελάδες Holstein. Βάσει πολλών μελετών έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία μπορεί να προωθήσει την παραγωγή ROS που είναι υπεύθυνα για το οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε κυτταροτοξικότητα. Ο Zuo et al. και ο Mujahid et al. απέδειξαν την αύξηση των ROS και κυρίως του ανιόντος του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) λόγω της θερμότητας. Η θερμική καταπόνηση οδηγεί σε υπερπαραγωγή ιόντων μετάπτωσης (TMI) μέσω της αύξησης του ρυθμού απελευθέρωσης σιδήρου από τη φερριτίνη. Τα TMI μπορούν να δώσουν ηλεκτρόνια στο οξυγόνο, σχηματίζοντας ανιόν υπεροξειδίου και/ή υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Καθώς είναι εξαιρετικά δραστικό, το $O_2^{\cdot-}$ είναι ο πρόδρομος των περισσότερων ROS και μεσολαβητής στις αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις. Το H_2O_2 ανάγεται περαιτέρω στην εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH \cdot) μέσω της αντίδρασης του Fenton:



Τα δραστικά είδη οξυγόνου παράγονται επίσης από την οξειδάση του φωσφορικού δινουκλεοτιδίου του νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADPH οξειδάση) κατά τη μετατροπή του NADPH σε NADP $^+$. Το θερμικό στρες ενεργοποιεί την οξειδάση NADPH και αυξάνει την αναλογία NADP $^+$ /NADPH. Οι ανεξέλεγκτες αυξήσεις των συγκεντρώσεων ROS οδηγούν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με τη μεσολάβηση ελεύθερων ριζών που στοχεύουν τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τους πολυσακχαρίτες και το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Με αυτόν τον τρόπο, οι αυξημένες θερμοκρασίες περιβάλλοντος συνδέονται με αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα αντιδραστικά είδη του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) και η μηλονδιαλδεϋδη (MDA) είναι τα κύρια προϊόντα της υπεροξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η αυξημένη θερμοκρασία του περιβάλλοντος που προκαλείται από τις υψηλές θερμοκρασίες φάνηκε

ότι αυξάνει τόσο τα επίπεδα TBARS όσο και τα επίπεδα MDA σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Η αντίδραση του οργανισμού στα αυξημένα επίπεδα παραγωγής οξειδωτικών είναι η θετική ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, δηλαδή της υπεροξειδωτικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Η πρώτη, είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή των υπεροξειδίων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε πιο ασφαλές προϊόν για το κύτταρο. Η καταλάση, αναλαμβάνει τον ρόλο της αποσύνθεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Τέλος, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης βοηθά στην μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου με συμπαράγοντα την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οποία αποτελεί βασικό «όπλο» του αντιοξειδωτικού συστήματος. Η ανηγμένη γλουταθειόνη οξειδώνεται στη δισουλφιδική της μορφή (GSSG) καθώς αντιδρά με και υπεροξειδία. Έπειτα με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης μετατρέπεται η GSSG σε GSH χρησιμοποιώντας NADPH – έναν αναγωγικό παράγοντα. Αυτή η αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης της επιτρέπει να συνεχίσει να εξουδετερώνει υπεροξειδία, μετριάζοντας το οξειδωτικό στρες (Belhadj, et al., 2016).

1.3.3 Η επιρροή του θερμικού στρες στον μεταβολισμό

- Μεταβολή της επιθυμίας πρόσληψης τροφής

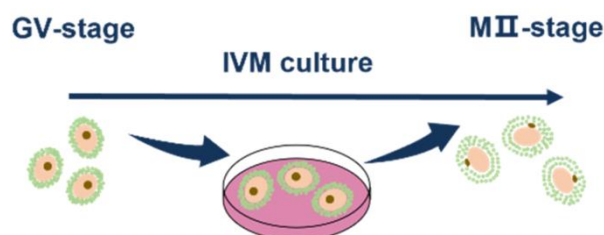
Το HS ρυθμίζει θετικά την έκκριση δύο λιποκινών: της λεπτίνης και της αδιπονεκτίνης, ενώ παράλληλα και την έκφραση του υποδοχέα τους. Η λεπτίνη διεγείρει τον υποθαλαμικό άξονα και οδηγεί σε μειωμένη επιθυμία πρόσληψης τροφής. Η αδιπονεκτίνη ρυθμίζει τη συμπεριφορά σίτισης μέσω περιφερικών και κεντρικών μηχανισμών και λειτουργεί ως «σήμα πείνας». Υπό συνθήκες που προκαλούν θερμικό στρες, τα επίπεδα λεπτίνης και αδιπονεκτίνης αυξάνονται με τη διέγερση του υποθαλάμου και ως εκ τούτου μειώνεται η πρόσληψη τροφής. Αυτή η μορφή θερμικού περιορισμού επιτρέπει στα ζώα που υπόκεινται θερμικό στρες να μειώσουν την παραγωγή θερμότητας (Belhadj, et al., 2016).

- Μεταβολισμός πρωτεϊνών

Η διάρκεια έκθεσης σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία επιφέρει διαφορετικές συνέπειες στον πρωτεϊνικό μεταβολισμό. Η σύντομη θερμική καταπόνηση αυξάνει τον πρωτεϊνικό καταβολισμό, που σηματοδοτείται από τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στο πλάσμα· μειώνονται οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα του ασπαρτικού οξέος (Asp), της σερίνης (Ser), της τυροσίνης (Tyr) και της κυστεΐνης (Cys) αμινοξέων που συμμετέχουν ενεργά στη διαμόρφωση πρωτεϊνών στον χώρο ή στη ενεργοποίηση/καταστολή τους. Από την άλλη, η χρόνια έκθεση στη θερμότητα μειώνει τη σύνθεση πρωτεϊνών σε διάφορους μύες, μειώνει τη διάσπαση πρωτεϊνών που περιέχουν αμινοξέα του πλάσματος (κυρίως αμινοξέα με θείο ή διακλαδισμένη αλυσίδα) και υψηλότερα επίπεδα ασπαρτικού οξέος (Asp), γλουταμινικού οξέος (Glu) και φαινυλαλανίνης (Phe) στον ορό (Belhadj, et al., 2016).

1.3.4 Επιρροή του θερμικού στρες στην αναπαραγωγική ικανότητα των αγελάδων Holstein

Κατά τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες οι αγελάδες Holstein, οι σύγχρονες φάρμες, παρέχουν εκσυγχρονισμένα συστήματα ρύθμισης της θερμοκρασίας, ώστε η θερμοκρασία του περιβάλλοντος εκτροφής να μην ξεπερνάει τα επίπεδα που επιτρέπουν τη φυσιολογική ανάπτυξη των αγελάδων. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, που η θερμοκρασία είναι αρκετά αυξημένη, η γονιμότητα παραμένει χαμηλή. Οι επιπτώσεις έκθεσης σε HS επηρεάζουν τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τις ωοθήκες, οδηγώντας σε καταστολή της έκκρισης γοναδοτροπινών, εξασθένησης της ανάπτυξης των ωοθηλακίων, μείωση της ωρίμανσης των ωαρίων και σε ανεπαρκή ωχρινική ικανότητα έκκρισης. Το στάδιο του ωοκυττάρου κατά το οποίο επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό και είναι περισσότερο ευαίσθητο σε εξωτερικά ερεθίσματα είναι κατά την ωρίμανση. Αυτό το στάδιο – της ωρίμανσης – είναι αρκετά αργό και η *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση κατά τη διάρκεια της επαγωγικής φάσης για το



Εικόνα 5: In vitro maturation (IVM) του ωοκυττάρου.

GVBD (germinal vesicle breakdown) (6η με 8η ώρα της IVM – *in vitro* maturation) απαιτείται. Η ωρίμανση των ωοκυττάρων, όμως, μπορεί να παρεμποδιστεί από αρκετούς παράγοντες, με κύριο την αυξημένη θερμοκρασία που μπορεί να διαταράξει την πρωτεϊνοσύνθεση, την ακεραιότητα των πρωτεϊνών ή τη φωσφορυλίωσή τους.

Έχει παρατηρηθεί, ακόμα, πως όταν εκτίθενται σύμπλεγμα ωοκυττάρων με σπερματοκύτταρα (COC) για 6 – 12 ώρες σε υψηλές θερμοκρασίες, μειώνεται το αναπτυξιακό δυναμικό των ωοκυττάρων ωρίμανσης οδηγώντας σε πολύ χαμηλή απόδοση της βλαστοκύστης. Οι αρνητικές συνέπειες ακόμη και των σύντομων διάρκειας έκθεσης των COCs σε αυξημένες θερμοκρασίες σχετίζονται με την αλλοίωση του ωοκυττάρου, των σπερματοκυττάρων, τα οποία αντικατοπτρίζονται στο πρώιμο έμβρυο που αναπτύσσεται υπό κανονική θερμοκρασία. Η HS συμβάλλει στη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ελεύθερες ρίζες, ιόντα) στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, οδηγώντας σε κατακερματισμό του DNA και αυξημένη απόπτωση. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την μη φυσιολογική ωρίμανση, αφού τα ωοκύτταρα ωριμάζουν πολύ γρήγορα ή αποτυγχάνουν να προχωρήσουν στη μετάφαση II. Η *in vitro* έκθεση των COCs στους 41° C για 6 έως 12 ώρες διαταράσσει τη φυσιολογική έκφραση πολλών γονιδίων που επηρεάζουν τη διαδικασία ωρίμανσης και την αναπτυξιακή επάρκεια του ωοκυττάρου που βασίζεται στην ανεμπόδιση ανταλλαγή μεταβολικών υποστρωμάτων και δεύτερων αγγελιοφόρων. Οι αγελάδες Holstein έχουν κατά μέσο όρο υψηλά επίπεδα γονιμότητας σε σχέση με άλλες φυλές αγελάδων, ωστόσο, τα επίπεδα αυτά μειώνονται σημαντικά κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Αυτό καθιστά την επιστημονική κοινότητα υπεύθυνη για τον προσδιορισμό των γενετικών στοιχείων που καθιστά τη φυλή αγελάδων Holstein λιγότερο ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες (Stamperna, et al., 2021).

1.4 Μονοπάτι UPR

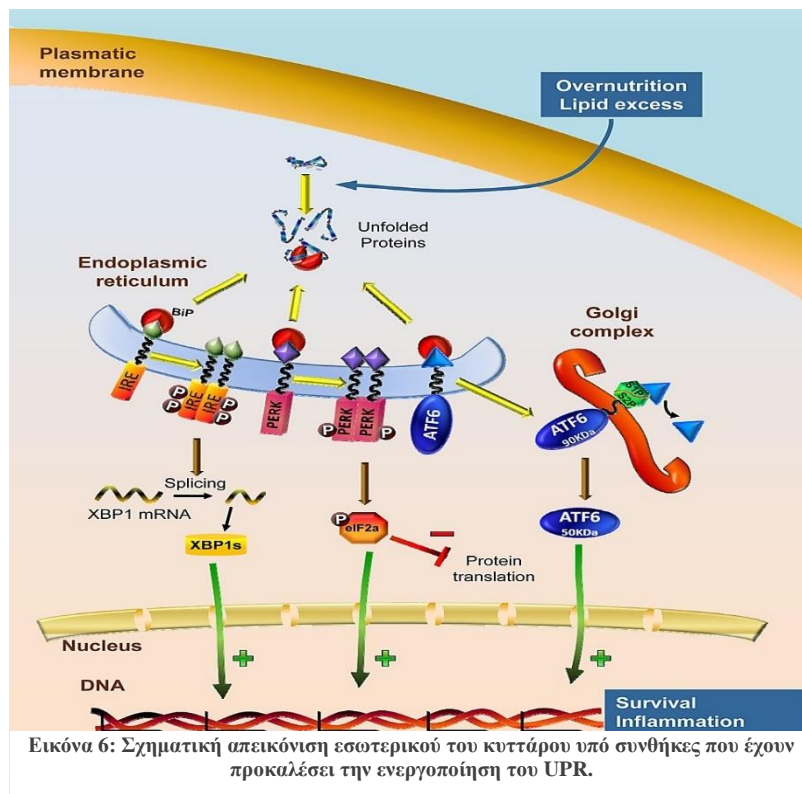
Το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum – ER) είναι ένα οργανίδιο του κυττάρου που περιβάλλεται από μεμβράνη και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση, την τροποποίηση και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία σύνθεσης και τροποποίησης είναι ευαίσθητη στη διαταραχή του περιβάλλοντος του

ενδοπλασματικού δίκτυο, σε κατάσταση στρες. Πολλοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε στρες του ER, κάποιοι από αυτούς είναι:

1. Εξάντληση του Ca^{2+}
2. Υποξία
3. Γλυκοζυλίωση
4. Ιογενής λοίμωξη
5. Αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση
6. Οξειδωτικό στρες (ROS, NO)

Όταν το ενδοπλασματικό δίκτυο βρίσκεται σε κατάσταση στρες, αυτό σημαίνει πως έχουν συσσωρευτεί σε αυτό πρωτεΐνες οι οποίες είναι μη αναδιπλωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες. Για την αντιμετώπιση αυτής της κατάστασης, το κύτταρο έχει αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς για την αποτροπή της συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων ή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης είναι γνωστό ως unfolded protein response (UPR). Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει την ικανότητα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης του ενδοπλασματικού δικτύου.

Το UPR στα κύτταρα των θηλαστικών είναι πολύπλοκη και λειτουργεί μέσω τριών κύριων διαμεμβρανικών υποδοχέων του ER: α) type I transmembrane protein inositol requiring 1 (*IRE1α*), στα θηλαστικά αναφέρεται ως *ERN1* β) eukaryotic



initiation factor 2α (*eIF2α*) kinase (*PERK*) γ) activating transcription factor 6 (*ATF6*). Μέσω του μονοπατιού UPR, ρυθμίζεται αρνητικά η έκφραση των πρωτεϊνών για τη μείωση των πρωτεϊνών που συσσωρεύονται στο ER. Παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνών που απομακρύνονται από το ER οι οποίες έχουν αναδιπλωθεί λανθασμένα ή αναδιπλώνονται με αργούς ρυθμούς και αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αποικοδόμησης που συνδέεται με το ER (ER – associated degradation – ERAD) ή της λυσοσωμικής αποικοδόμησης. Ακόμη, το UPR είναι υπεύθυνο για την αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνών – συνοδών (*chaperones*) και των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την αναδίπλωση (*foldases*). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσης του ER. Στη περίπτωση που μέσω του UPR εξισορροπηθούν τα επίπεδα των πρωτεϊνών που δεν είναι σωστά αναδιπλωμένες ή μη αναδιπλωμένες, τότε το μονοπάτι αυτό απενεργοποιείται. Ωστόσο, σε περίπτωση που το κύτταρο δεν μπορεί να ανταποκριθεί στο αυξημένο φορτίο των πρωτεϊνών που δεν είναι λειτουργικές, μέσω του UPR, τότε ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση JNK και των κασπασών 3, 7 και 12, οι οποίες τελικά οδηγούν στην απόπτωση του κυττάρου (Read, et al., 2021). (Εικ. 6)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Οι αγελάδες Holstein αποτελούν σημαντικό κομμάτι της παραγωγής και οικονομίας του γαλακτοκομικού τομέα της κτηνοτροφίας, καθώς παράγουν μεγάλες ποσότητες γάλατος την ημέρα και η αναπαραγωγική τους ικανότητα είναι αρκετά αυξημένη. Έχει παρατηρηθεί, ανάμεσα και σε άλλες φυλές αγελάδων, πως οι Holstein αν και μπορούν να αναπτυχθούν βέλτιστα τόσο σε υψηλά όσο και σε χαμηλά υψόμετρα, πως δεν έχουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μέσα σε ένα κοπάδι αγελάδων Holstein, κατά τους θερμούς καλοκαιρινούς μήνες, ορισμένες αγελάδες να μην καταφέρνουν να επιβιώσουν λόγω του θερμικού στρες στο οποίο υπόκεινται, ενώ άλλες να μπορούν να αντισταθούν σε αυτό.

Έτσι, η επιστημονική κοινότητα δραστηριοποιείται λόγω των καιρικών μεταβολών του περιβάλλοντος και της αύξησης της θερμοκρασίας του πλανήτη και μελετά εκτενέστερα τις συνέπειες αυτών στα οικοσυστήματα και στους οργανισμούς που τα απαρτίζουν. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετώνται τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών από κύτταρα του ωαγωγού αγελάδων Holstein από δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Συγκεκριμένα, από περίοδο που η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκή για τη φυσιολογική ανάπτυξη των αγελάδων και από χρονική περίοδο κατά την οποία τα ζώα υπόκεινται σε θερμικό στρες. Περαιτέρω, μελετάται και η συσχέτιση των πρωτεϊνών βάσει εποχής, αλλά και λειτουργίας τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης στη μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και στην επίδραση των αλλαγών στην αναπαραγωγική ικανότητα των αγελάδων αυτών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα

Οι οιστρικοί κύκλοι δέκα αγελάδων Holstein συγχρονίστηκαν κατά τη διάρκεια μιας θερμικής ουδέτερης και HS περιόδου. Την 3η ημέρα του κύκλου, οι αγελάδες σφάχτηκαν σε ομάδες των 3 ή τεσσάρων, οι ωαγωγοί αφαιρέθηκαν αμέσως και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός δύο ωρών. Σε κάθε περίοδο, τα επιθηλιακά κύτταρα συλλέγονταν με απόξεση των επιθηλίου του ωαγωγού με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και το περιεχόμενο συλλέχθηκε από την ίδια (ipsilateral) και αντίθετη (contralateral) πλευρά προς το ωχρό σωματίο. Οι αγελάδες των οποίων τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος προορίζονταν για σφαγή και κανένα ζώο δεν θανατώθηκε για τις ανάγκες του πειράματος.

3.2 Απομόνωση RNA και cDNA synthesis

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε δείγμα με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος E.Z.N.A total RNA kit (Omega) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η πέψη με DNάση είναι το επόμενο βήμα μετά την εκχύλιση του RNA που αποσκοπεί στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση του γενωμικού DNA, έτσι ώστε το δείγμα RNA που παραλαμβάνεται να είναι πλήρως απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση με γενωμικό DNA. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DNA-free™ DNase treatment Kit της εταιρείας Invitrogen. Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA μετά τη χρήση της DNase χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε δείγμα και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm. Παράλληλα, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Το άθικτο ολικό RNA που ηλεκτροφορείται υπό αποδιατακτικές συνθήκες εμφανίζει διακριτές ζώνες 28S και 18S rRNA (ευκαρυωτικά δείγματα). Ακολούθησε η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA είναι το High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) με την χρήση τυχαίων εκκινητών (random primers), η οποία

πραγματοποιήθηκε παράλληλα για όλα τα δείγματα ώστε να εξασφαλιστεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης.

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες, βάσει του πρωτοκόλλου του RNAase^{inh}:

Component	Volume/Reaction (μl)	Master Mix
10x RT Buffer	2×10	20 μl
25x dNTP Mix (100mM)	$0,8 \times 10$	8 μl
10x RT Random primers	2×10	20 μl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1×10	10 μl
RNAase Inhibitor	1×10	10 μl
Nuclease – free H ₂ O	$10,2 \times 10$	102 μl

Πίνακας 1: Ποσότητες των επιμέρους συστατικών των αντιδράσεων

Σε κάθε tube τοποθετήθηκαν 3 μl RNA και από το Master Mix που δημιουργήθηκε 40 μl. Έπειτα, τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα PCR επιλέγοντας το πρόγραμμα σύνθεσης cDNA.

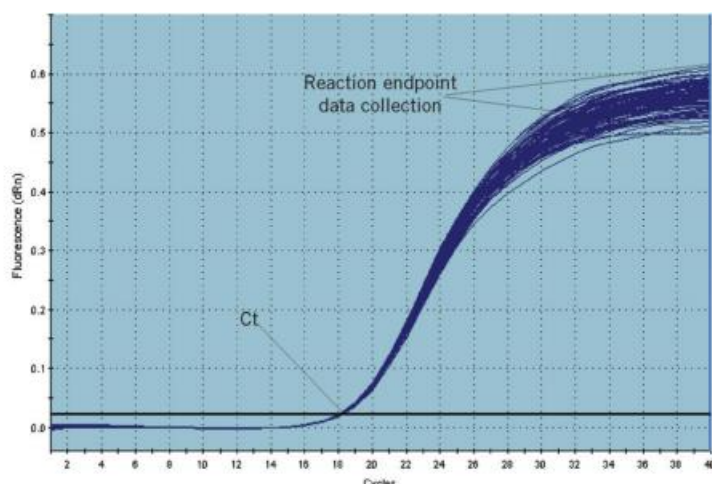
3.3 Quantitative Polymeric Chain Reaction (qPCR)

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να εξετάσει τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων. Ο τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι με τη βοήθεια της qPCR ή αλλιώς ποσοτικής PCR. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται σε ολοένα και περισσότερες αριθμό ερευνητικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της ποσοτικοποίησης της γονιαδιακής έκφρασης, προφίλ έκφρασης, single nucleotide polymorphism (SNP) και διάκριση αλληλομόρφων, επικύρωση δεδομένων μικροσυστοιχιών, γενετικά τροποποιημένα οργανισμών (ΓΤΟ), παρακολούθηση του ιικού φορτίου και άλλων εφαρμογές ανίχνευσης παθογόνων.

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνολογία PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA επειδή η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου επιτρέπει την μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης από ό,τι θα μπορούσε να επιτευχθεί. Σε μια βελτιστοποιημένη αντίδραση, η ποσότητα-στόχος θα περίπου διπλασιάζεται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ενίσχυσης. Στην ποσοτική PCR (QPCR), η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος συνδέεται με την ένταση του φθορισμού χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον μόριο αναφοράς. Το σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού μετράται προκειμένου να υπολογιστεί το αρχικό πρότυπο ποσότητα μπορεί να είναι είτε στο τέλος της αντίδρασης (τελικό σημείο ημιποσοτική PCR) είτε ενώ η ενίσχυση ακόμα εξελίσσεται (QPCR πραγματικού χρόνου). Στην ημιποσοτική PCR τελικού σημείου, τα δεδομένα φθορισμού συλλέγονται αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση ενίσχυσης συνήθως μετά από 30-40 κύκλους, και αυτός ο τελικός φθορισμός χρησιμοποιείται για τον εκ των υστέρων υπολογισμό της ποσότητας της προτύπου που υπήρχε πριν από την PCR. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης μπορεί να δώσει κάπως ασυνεπή αποτελέσματα, ωστόσο, επειδή η απόδοση της αντίδρασης PCR μπορεί να μειωθεί κατά τη διάρκεια μεταγενέστερων κύκλων ενίσχυσης, καθώς τα αντιδραστήρια καταναλώνονται και συσσωρεύονται αναστολές της αντίδρασης. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα, γεγονός που θα οδηγήσει σε διαφορές στις τελικές τιμές φθορισμού που δεν σχετίζονται με τις αρχικές συγκεντρώσεις του προτύπου. Τα δεδομένα που συλλέγονται στο τελικό σημείο της αντίδρασης δεν είναι ομοιόμορφα ακόμη και όταν ενισχύονται πανομοιότυπα δείγματα (Εικ. 7). Η διασπορά των δεδομένων των τιμών του τελικού σημείου καταδεικνύει ότι τα δεδομένα που μετρήθηκαν μετά την ενίσχυση δεν είναι ομοιόμορφα ή αξιόπιστα ώστε να είναι χρήσιμα για τις ακριβείς μετρήσεις που απαιτούνται για την ποσοτική ανάλυση. Για τις εφαρμογές που δεν απαιτούν μεγάλο αριθμό αντιγράφων, όπως ποιοτικές μελέτες που επιδιώκουν απλώς να προσδιορίσουν αν μια αλληλουχία-στόχος – ενδιαφέροντος είναι παρούσα ή όχι, οι μετρήσεις τελικού σημείου είναι γενικά επαρκείς. Η πιο ευαίσθητη μέθοδος του πραγματικού χρόνου qPCR μετρά τον φθορισμό σε κάθε κύκλο όσο η ενίσχυση εξελίσσεται. Αυτό επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του προτύπου να βασίζεται στο σήμα φθορισμού κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της ενίσχυσης, πριν αρχίσουν οι παρακάτω παράγοντες να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης: περιορισμός των αντιδραστηρίων, συσσώρευση αναστολέων, αδρανοποίηση της πολυμεράσης. Οι μετρήσεις φθορισμού σε αυτούς τους προηγούμενους κύκλους της αντίδρασης θα μετρήσουν την ενισχυμένη ποσότητα του

προτύπου, που η αντίδραση είναι πολύ πιο αναπαραγωγίμη από δείγμα σε δείγμα απ' ό,τι στο τελικό σημείο.



Εικόνα 7: Διαγράμματα ενίσχυσης σε qPCR. Ακόμα και σε ίδια δείγματα φαίνεται ότι το τελικό σημείο (για παράδειγμα μετά από 40 κύκλους) δεν είναι ταυτόσημο.

Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι η SYBR Green I. Αυτή η χρωστική όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα δεν παρουσιάζει φθορισμό, ενώ όταν ενσωματωθεί στο δίκλωνο προϊόν της PCR, φθορίζει (Argy et al., 2005).

Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης των γονιδίων βασίζεται στον προσδιορισμό της τιμής Ct ανά αντίδραση. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει μία συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι είτε απόλυτη, στην οποία γίνεται ποσοτικοποίηση βάσει μιας πρότυπης καμπύλης η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να προσδιοριστεί, είτε σχετική. Στη δεύτερη μέθοδο γίνεται μέτρηση της σχετικής συγκέντρωσης του γονιδίου ενδιαφέροντος σε άγνωστα δείγματα σε σύγκριση με ένα δείγμα ελέγχου με γονίδια αναφοράς. Στη παρούσα πτυχιακή εργασία η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και κανονικοποιήθηκε με την βοήθεια γονιδίων αναφοράς (Argy et al., 2005).

3.3.2 Γονίδια αναφοράς (Housekeeping genes)

Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δεδομένων είναι συνήθως " housekeeping " γονίδια (HKG) των οποίων η έκφραση θα πρέπει να είναι σταθερή υπό τις πειραματικές συνθήκες της ανάλυσης. Αυτό το σταθερό επίπεδο έκφρασης πρέπει να επαληθεύεται πειραματικά, καθώς η έκφραση των γονιδίων housekeeping μπορεί να ποικίλλουν υπό ορισμένες συνθήκες.

Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν τα παρακάτω γονίδια με ιδιοστατικά χαρακτηριστικά:

1. *UBA52* (Ubiquitin A-52 Residue Ribosomal Protein Fusion Product 1)
2. *EEF1A1* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1)

Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων ελέγχθηκε και ήταν ιδιαίτερα σταθερή στα δείγματα που μελετήθηκαν.

3.4 Κανονικοποίηση των δεδομένων

Από τις μετρήσεις της qPCR για να κανονικοποιηθούν τα δεδομένα και να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους. Με τη βοήθεια του προγράμματος LinRegPCR υπολογίστηκε η απόδοση (e) της αντίδρασης κάθε δείγματος για κάθε ένα ζευγάρι primer που χρησιμοποιήθηκε. Ο προσδιορισμός της αρχική ποσότητας του cDNA χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος Comparative Ct Method και προσδιορίζεται το Ct στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Στη συνέχεια, αφού έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος των Cts με Threshold = 0,15 των διπλοτύπων των δειγμάτων, μαζί με τα δεδομένα που συλλέχτηκαν από τις μετρήσεις των housekeeping genes γίνεται η κανονικοποίηση βάσει του τύπου:

$R_0 = \frac{Threshold}{e^{Ct}}$ και ορίζεται ως το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA

- Ct είναι ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης

Εξαιτίας της ευαισθησίας της Real – Time PCR και της εμφάνισης πειραματικού σφάλματος είναι πιθανό να υπάρξει απόκλιση των πειραματικών δεδομένων από δείγμα σε δείγμα. Συνεπώς, η χρήση των γονιδίων αναφοράς αμβλύνει τις διαφορές

από δείγμα σε δείγμα. Η έκφραση των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

Κανονικοποιημένη έκφραση= R_0 γονιδίου στόχου / Παράγοντας Κανονικοποίησης

Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος της έκφρασης των δυο πιο σταθερών γονιδίων αναφοράς σε κάθε δείγμα (Vandesompele et al., 2002).

3.5 Προετοιμασία αντίδρασης για τα δείγματα

Αρχικά, οι primers που συνολικά χρησιμοποιήθηκαν είναι για τα παρακάτω γονίδια:

1. *SOD2* (Superoxide Dismutase 2)
2. *BAX* (BCL2 Associated X)
3. *IGF2* (Insulin Like Growth Factor 2)
4. *XBPI* (X-Box Binding Protein 1)
5. *PPP1R15B* (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15B)
6. *EIF2AK3* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3)
7. *ATF6* (Activating Transcription Factor 6)
8. *PPP1R15A* (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A)
9. *EIF2A* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A)
10. *ERN1* (Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1)
11. *HSP90AA1* (Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1)
12. *HSPA1A* (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A)
13. *HSF1* (Heat Shock Transcription Factor 1)
14. *DNMT3A* (DNA Methyltransferase 3 Alpha)
15. *DNMT1* (DNA Methyltransferase 1)
16. *G6PD* (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase)
17. *TLR2* (Toll Like Receptor 2)
18. *BCL2* (BCL2 Apoptosis Regulator)
19. *GSTP1* (Glutathione S-Transferase Pi 1)
20. *PLAC8* (Placenta Associated 8)

21. *PTGS2* (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2)

22. *TLR4* (Toll Like Receptor 4)

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα γονίδια και οι αντίστοιχοι εκκινητές forward και reverse) που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

Gene	Forward primer	Reverse primer
UBA52	CCGCAAGAAGAAGTGTGGC	GCAAAGGAGAAGCAGGTGGA
EEF1A1	CCCCAGGACACAGAGACTTC	ATTCACCAACACCAGCAGCA
HSPA1A	GGACCTGCTGTTGCTGGAC	TTCGTGGGGATGGTGGAGTT
BAX	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	CGCTTCAGACACTCGCTCAG
G6PD	ACCAACCGCCTCTTCTACCT	ACGGCTTCTCCACGATGAT
HSP90AA1	CTGGAAGGAGACGACGACAC	ACACACTGGAGGGAATGGAG
SOD2	GCAGCAAGTAAACCGTCAGC	ACACTACAACAGAGCAGCGT
IGF2	GGACTACAGGCATCAGGACG	AACACGAAGGGGAACACACA
PTGS2	AGTCTTTGGTCTGGTGCCTG	AACAACCTGCTCATCGCCCC
DNMT3A	GAAGGAGCATTTGGGAACAG	GTTATTGCGTGAGCCTGGAT
XBP1	CCTGTTGGGCATTCTGTTCA	CAGGGATGGAGAAGGGGAG
PPP1R15B	TTGGATTGGAAAGACAGGGC	TCTGGCAGAAATGGGAAGGT
EIF2AK3	AGCAAAGAGGAGCCCAGAAT	TGGTTGGTCTTGACGGAGAA
ATF6	ACTGAAGGAAGACAAGCCCA	TTTGAGTCTTGGGTGCTGCT
PPP1R15A	GGAAGCAGTAACCGAAGCAG	CCACTGTCTTTGGTCTCCTCT
EIF2A	CTACTATGGGGAACAGACGCT	ACCCATACACGGCACA AAAAC
ERN1	CTCTGCCCATCAACCTCTCT	CATCTTGTAGTCCCCACCGT
HSF1	ATGAAGCACGAGAACGAGGC	GCACCAGCGAGATGAGGAACT
TLR2	GCTGCCATTCTGATTCTGCT	GCCACTCCAGGTAGGTCTTG
BCL2	CCCTGTTTGATTTCTCCTGGC	CTGTGGGCTTCACTTATGGC
GSTP1	TGGAAGGAGGAGGTGGTGAC	CAGGTGACGCAGGATGGTATTG
TLR4	AGGTAGCCCAGACAGCATTT	GAGCGAGTGGAGTGGTTCA
PLAC8	GTTTCACAGCCAGGTTACAGC	AGAGCCCCACAGAGACAGAT

Πίνακας 2: Gene IDs και αλληλουχία των αντίστοιχων primers

Αραιώθηκαν 4μl σε 36μl H₂O.

Ακολούθως, παρασκευάστηκε το master mix που περιείχε SYBR Green I, ενέσιμο ύδωρ (ddH₂O), forward εκκινητή και reverse εκκινητή. Για κάθε δείγμα υπολογίζεται 18,5 μl από το master mix και 1,5 μl cDNA. Για κάθε δείγμα έγινε και μία επανάληψη (duplicate) για πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ο

θερμοκυκλοποιητής StepOne™ Real-Time PCR System της εταιρίας Applied Biosystems με τις εξής συνθήκες: δυο αρχικά στάδια αποδιάταξης, πρώτα στους 95°C για 5min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος περιλαμβάνει από 20sec στους 95°C και 20sec στους 60°C) ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κύριου προϊόντος, και τέλος, ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης τήξης (melting curve) (15sec στους 95°C, 1min στους 50°C και 15sec στους 95°C).

Αναλυτικότερα, οι ποσότητες των συστατικών για κάθε δείγμα:

Component	Volume/Reaction (μl)
cDNA	1,5
SYBR Green I	10
Primer forward	0,8
Primer reverse	0,8
H ₂ O	6,9

Πίνακας 3: Ποσότητες επιμέρους συστατικών των αντιδράσεων

3.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time PCR

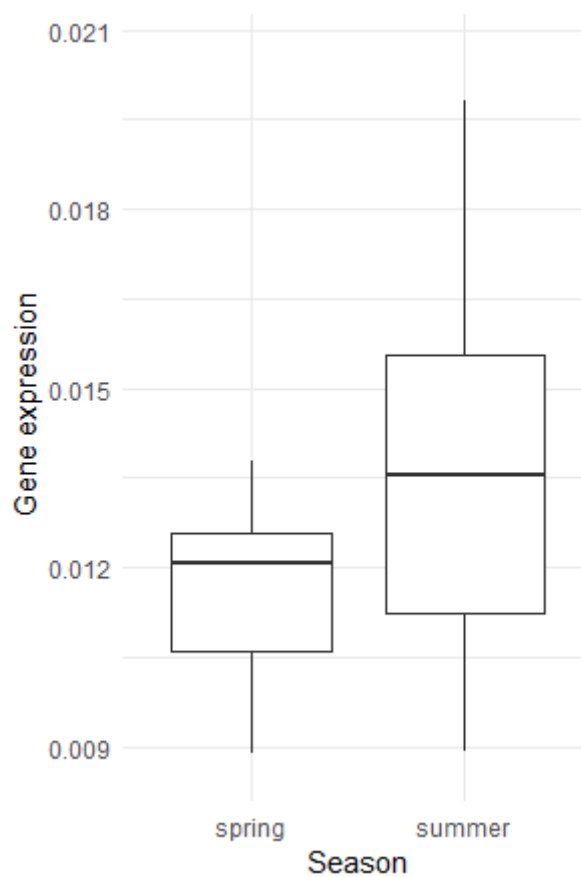
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σε περιβάλλον R με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών πακέτων. Η ανάλυση περιλάμβανε:

1. Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων με τη χρήση Shapiro test. Σε περίπτωση απόκλισης από την κανονική κατανομή (p value < 0.05) επιλέγονται μη παραμετρικά tests για την συνέχεια
2. Χρήση παραμετρικού test (t.test)
3. Χρήση two – way ANOVA test
4. Χρήση post – hoc Tukey test
5. Υπολογισμός Pearson correlation

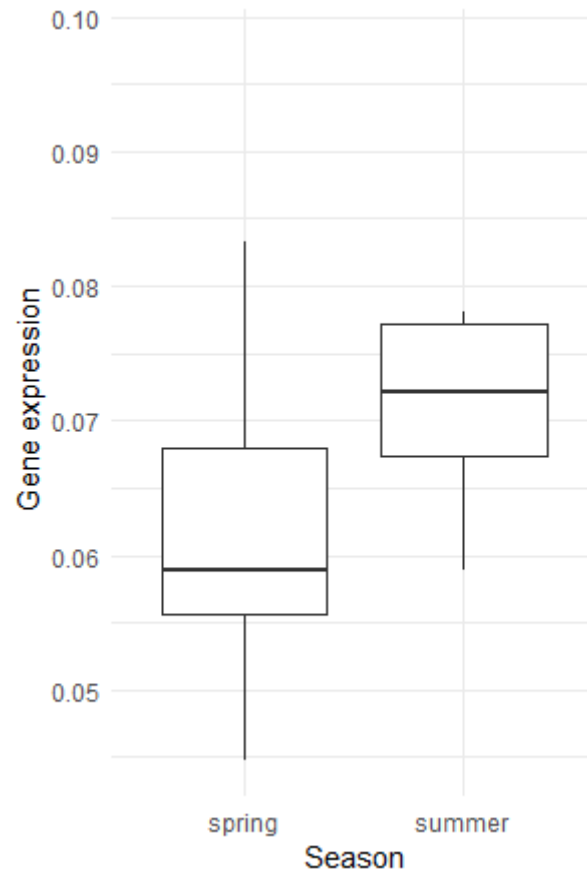
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Διαγράμματα απεικόνισης επιπέδων έκφρασης των γονιδίων μεταξύ εποχών και ιστών

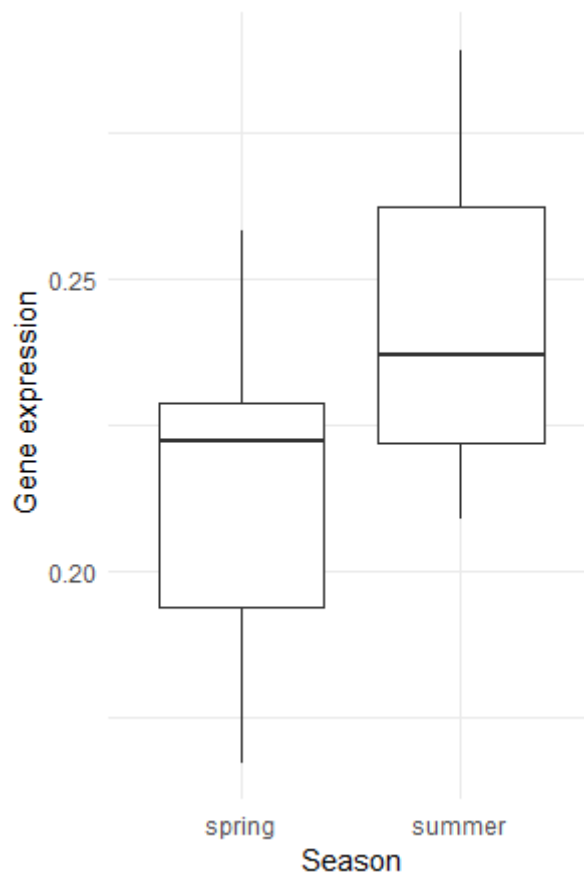
Αρχικά, ετοιμάστηκαν διαγράμματα στα οποία συγκρίνονται τα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου για τις δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους που λήφθηκαν τα δείγματα (άνοιξη – καλοκαίρι):



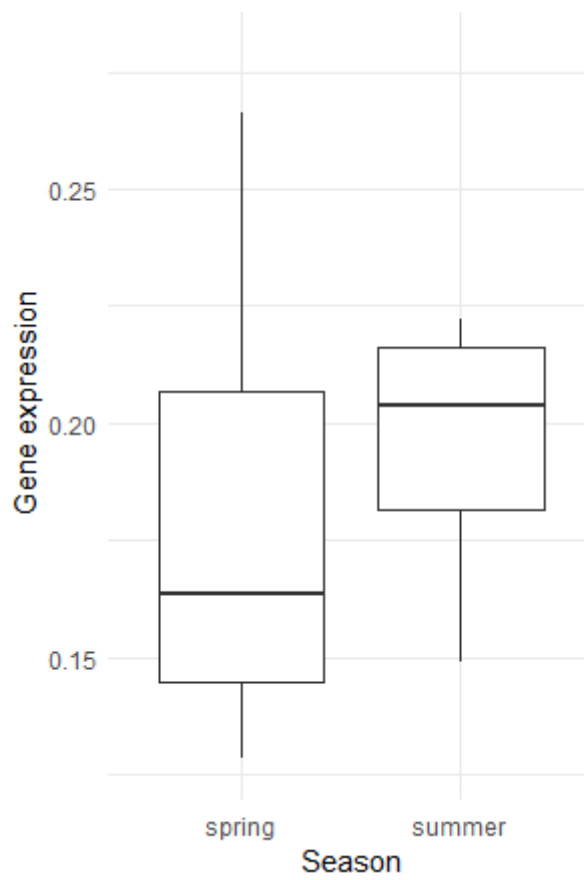
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *ERN1* έχει τιμή p-value = 0.6726



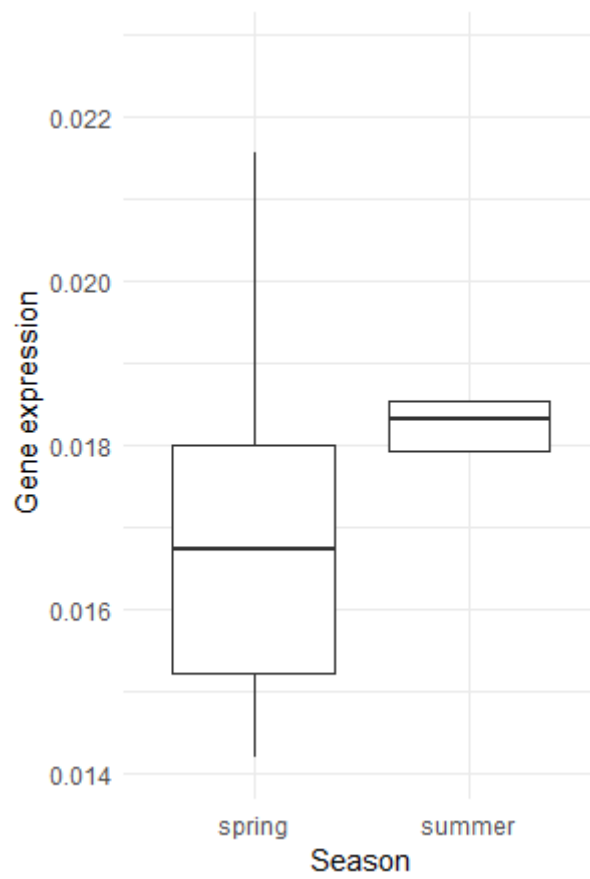
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *SOD2* έχει τιμή p-value = 0.02081, p-value < 0.05, επομένως είναι στατιστικά σημαντικό



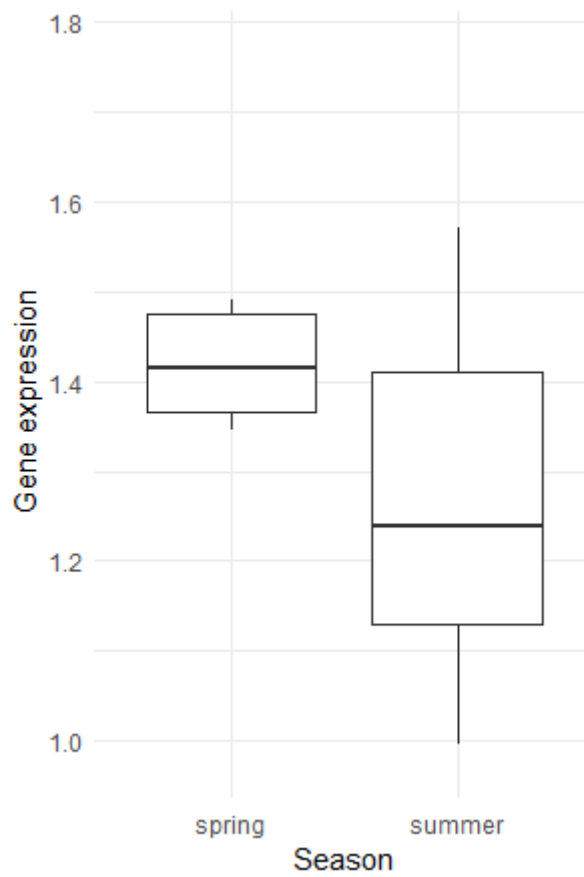
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *EIF2AK3* έχει τιμή p-value = 0.08698



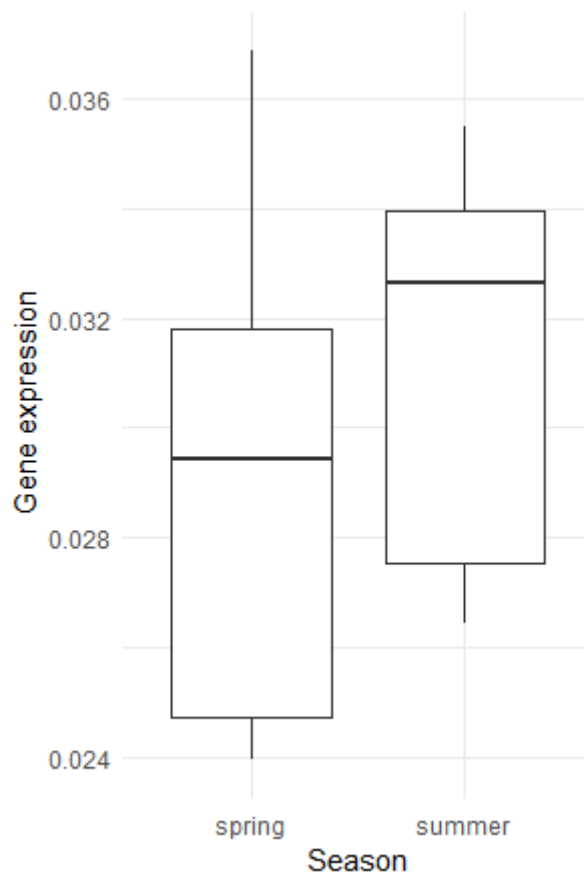
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *HSP90AA1* έχει τιμή p-value = 0.1095



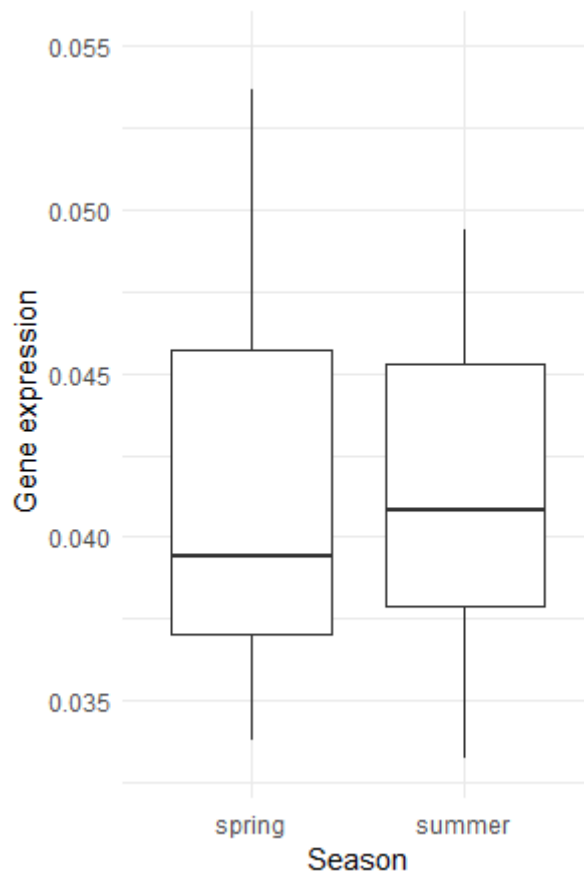
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *HSF1* έχει τιμή p-value = 0.1376



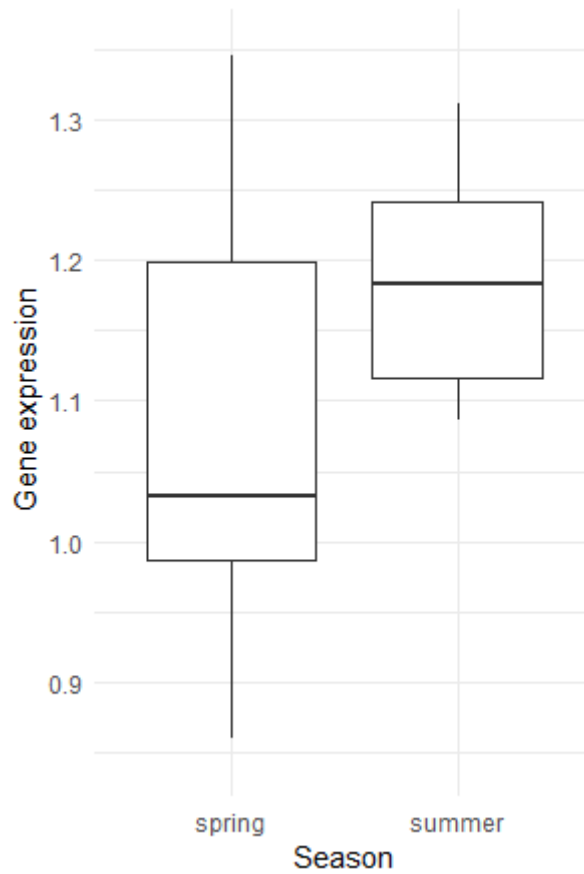
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *HSPA1A* έχει τιμή p-value = 0.7724



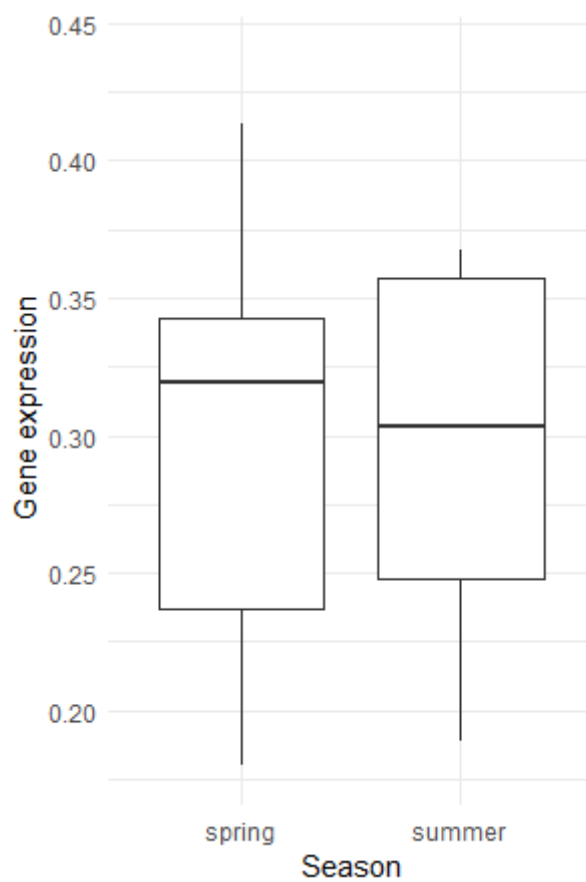
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *BAX* έχει τιμή p-value = 0.3804



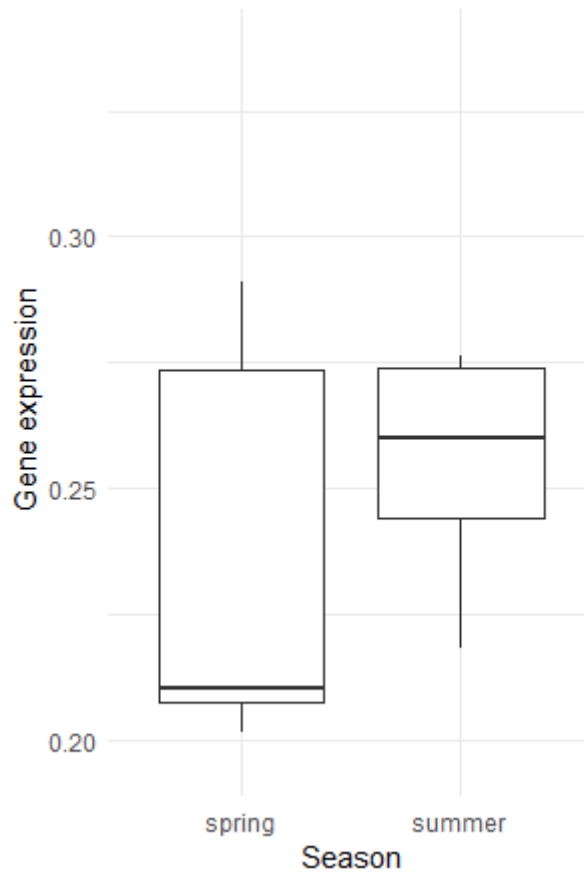
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *IGF2* έχει τιμή p-value = 0.3978



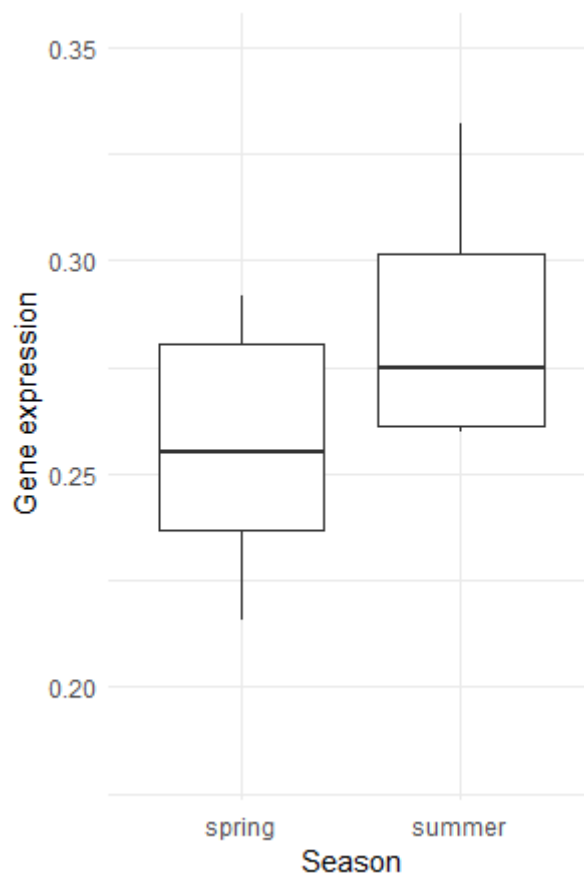
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *PPP1R15B* έχει τιμή p-value = 0.02396, p-value < 0.05, επομένως είναι στατιστικά σημαντικό



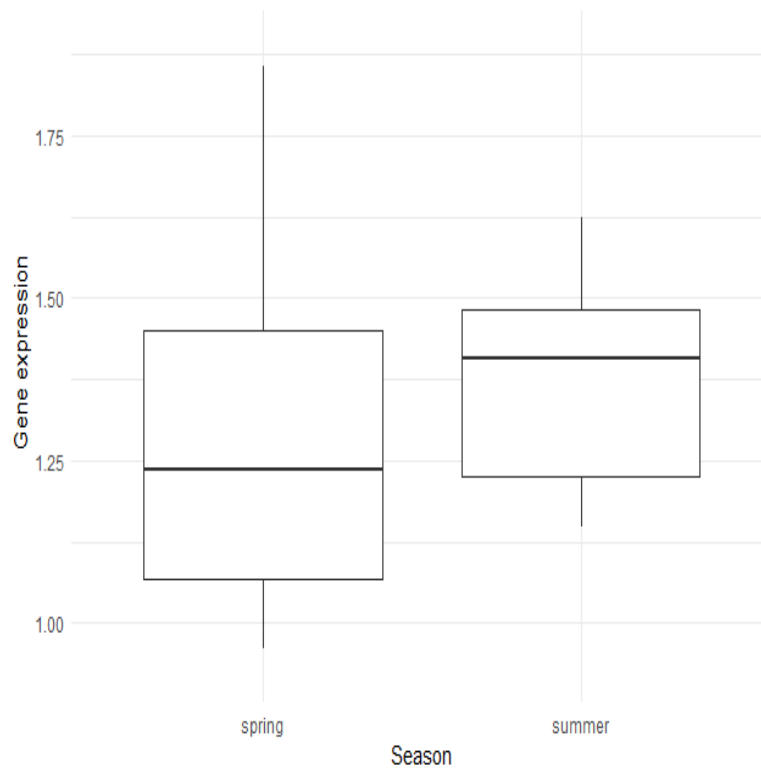
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *PPP1R15A* έχει τιμή p-value = 0.3778



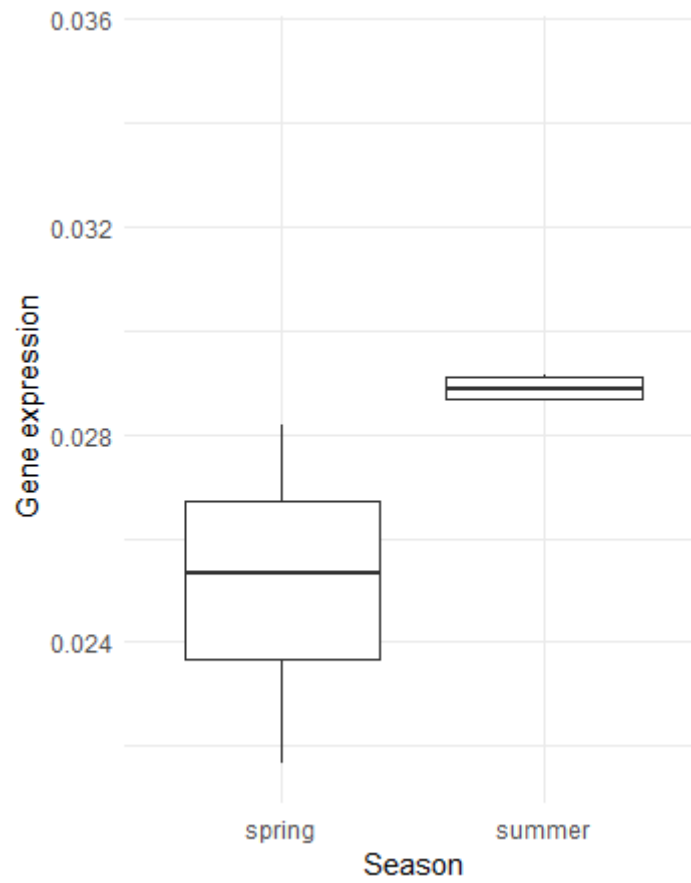
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *XBPI* έχει τιμή p-value = 0.2421



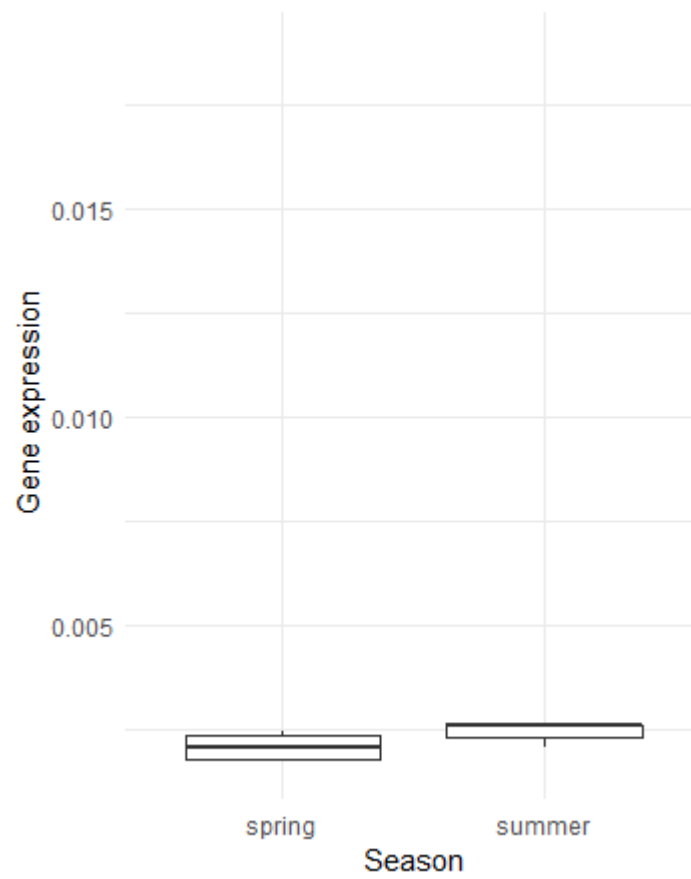
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *ATF6* έχει τιμή p-value = 0.1938



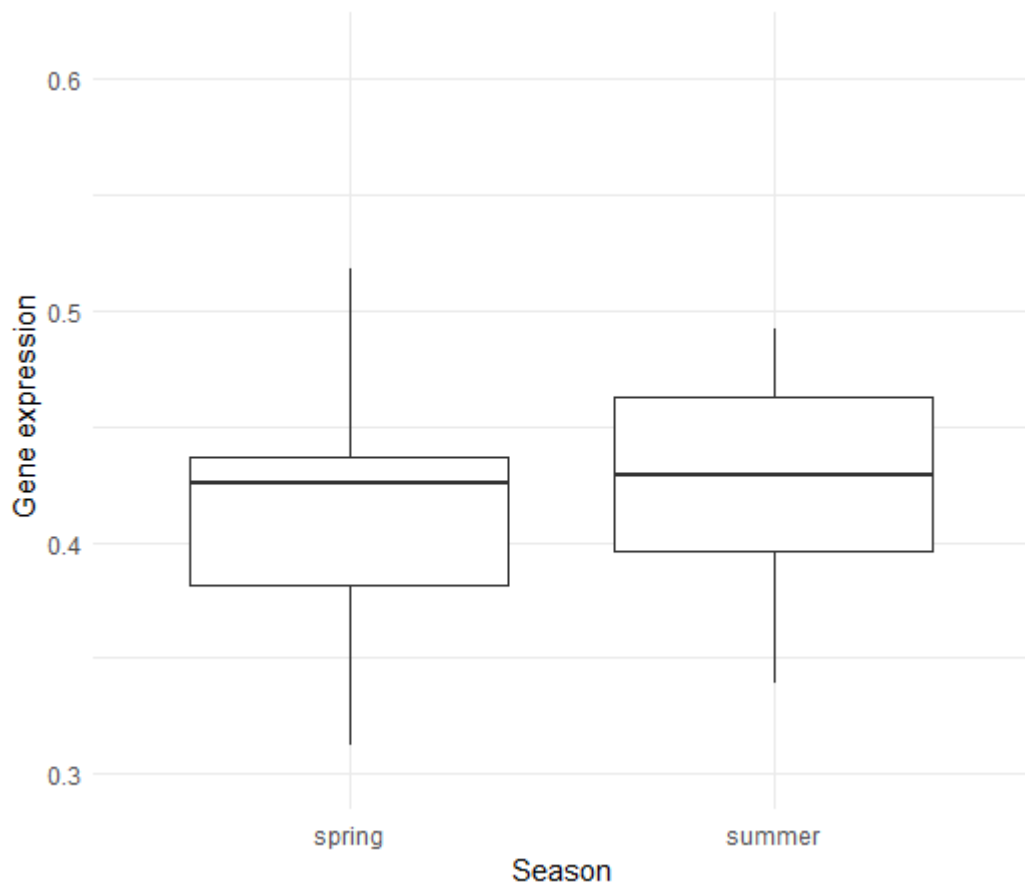
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *G6PD* έχει τιμή p-value = 0.5487



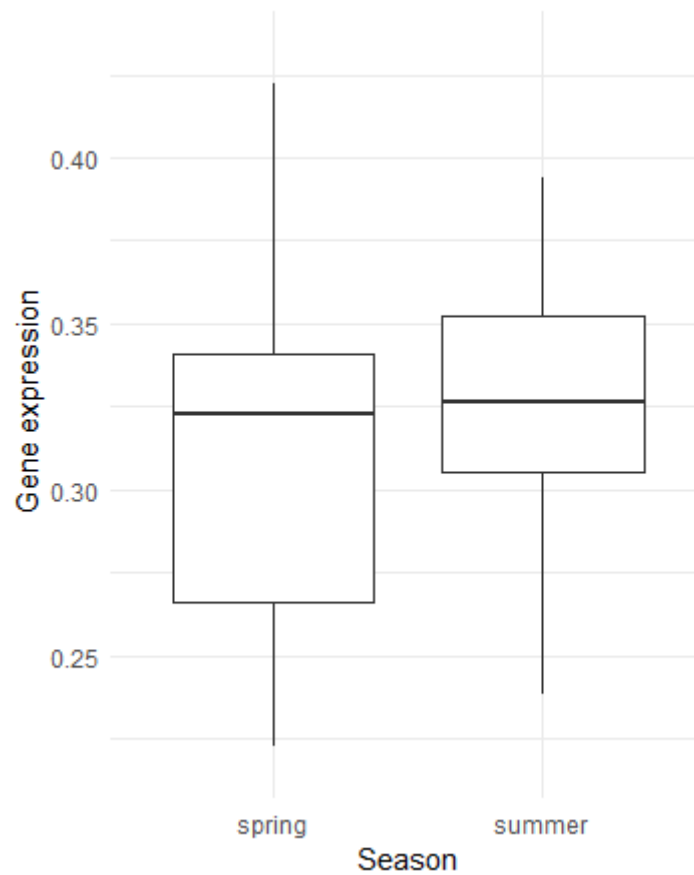
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *EIF2A* έχει τιμή p-value = 0.02342, p-value < 0.05, επομένως είναι στατιστικά σημαντικό



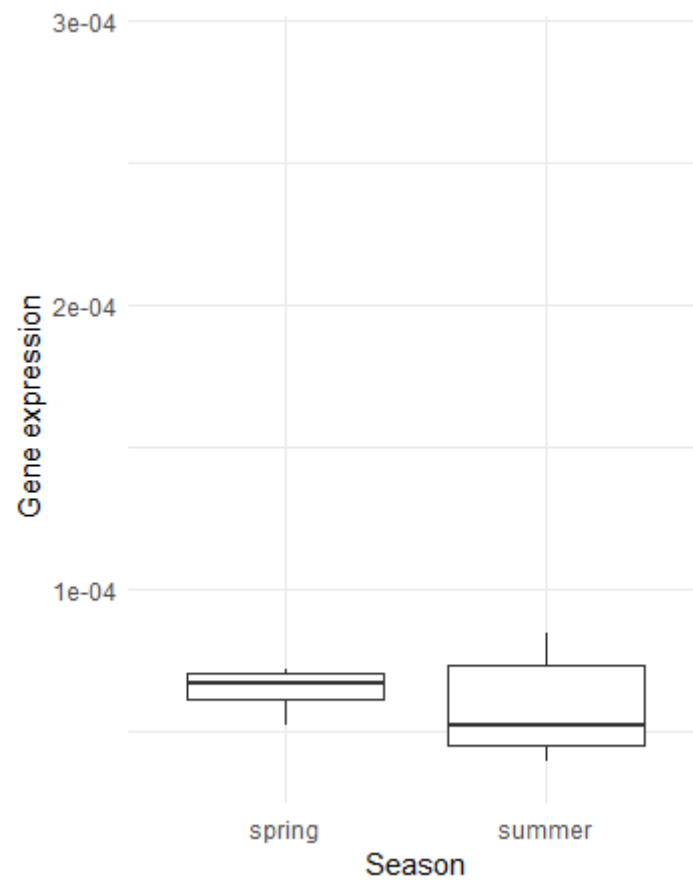
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *BCL2* έχει τιμή p-value = 0.3802



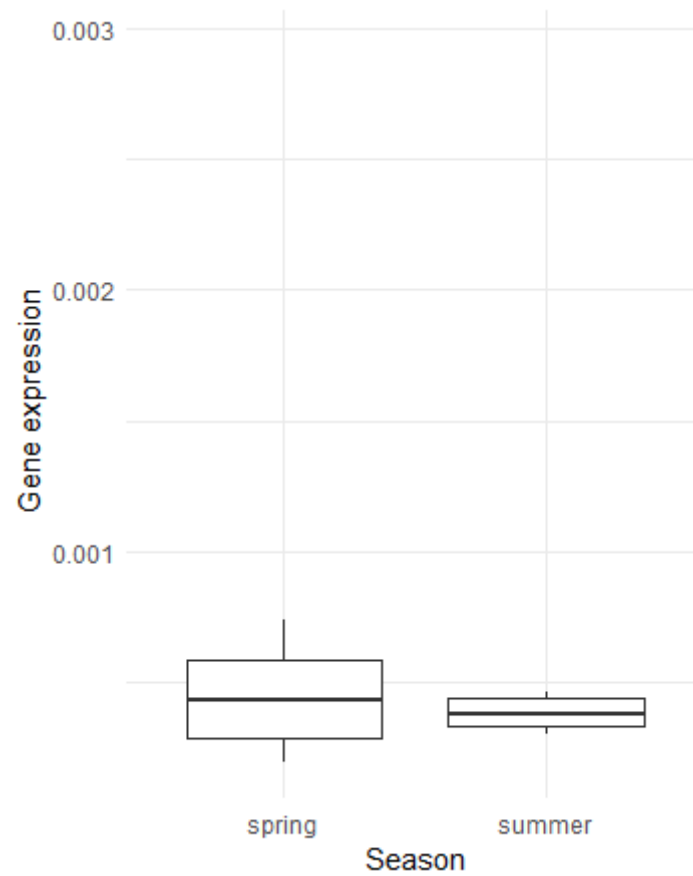
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *DNMT1* έχει τιμή p-value = 0.9364



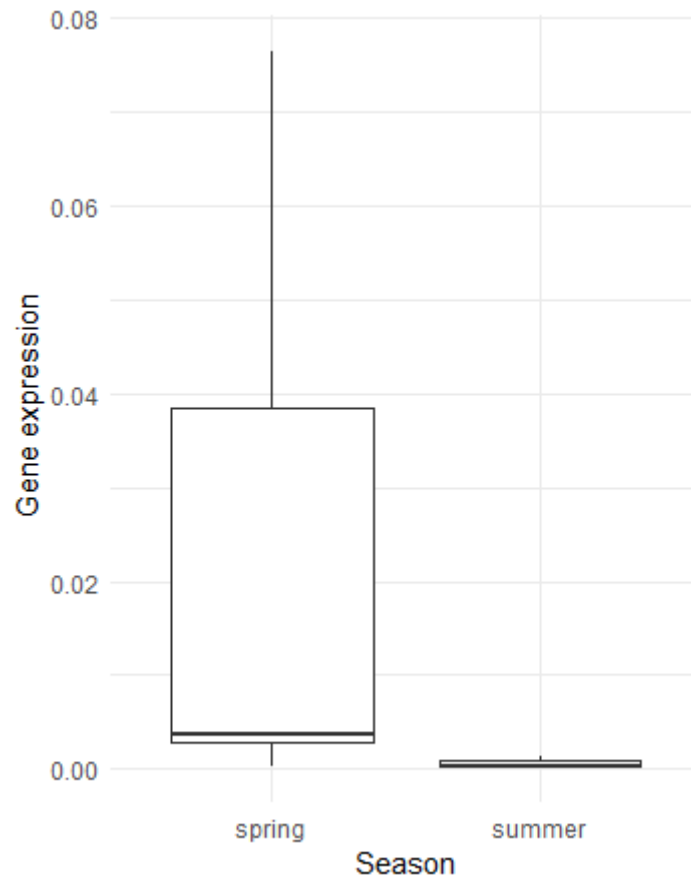
- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *DNMT3A* έχει τιμή p-value = 0.6905



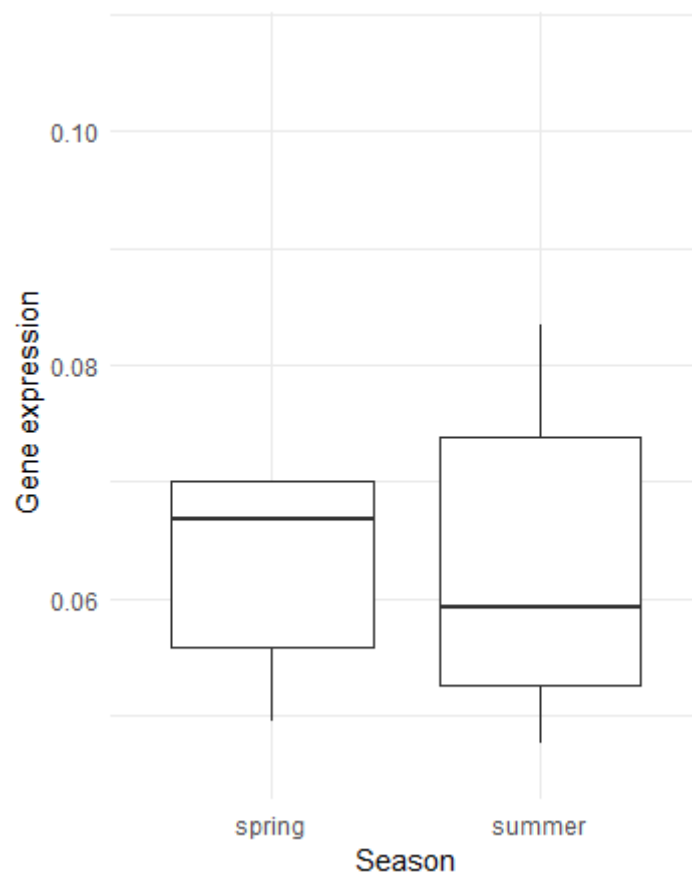
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *GSTP1* έχει τιμή p-value = 0.2191



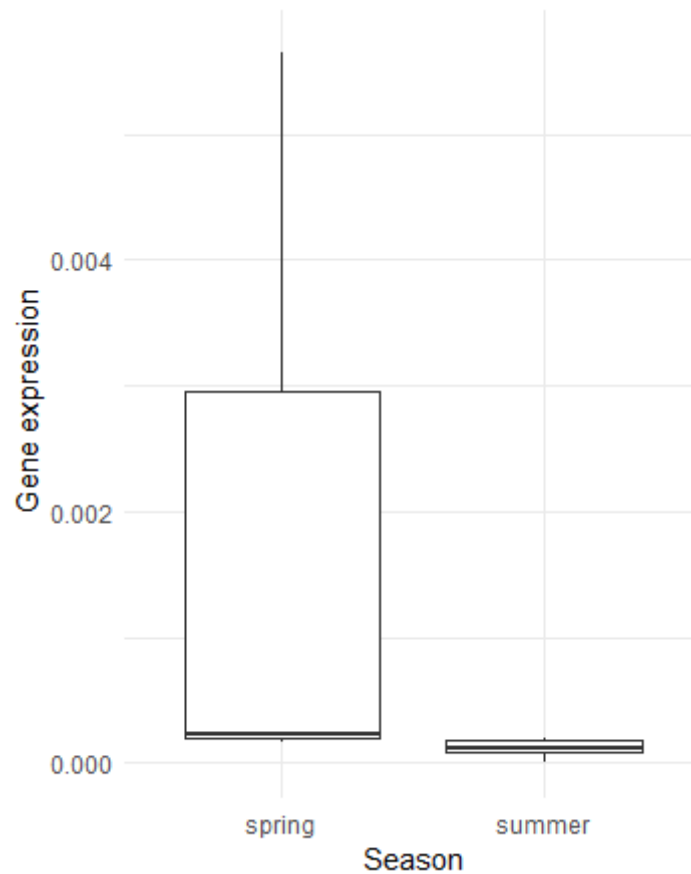
➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *PLAC8* έχει τιμή p-value = 0.3039



- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *PTGS2* έχει τιμή $p\text{-value} = 0.008576$, $p\text{-value} < 0.05$, επομένως είναι στατιστικά σημαντικό



➤ Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *TLR2* έχει τιμή p-value = 0.5449



- Βάσει αποτελεσμάτων t.test, το γονίδιο *TLR4* έχει τιμή p-value = 0.01299, p-value < 0.05, επομένως είναι στατιστικά σημαντικό

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται συγκεντρωμένες οι τιμές p – value των γονιδίων:

Γονίδια	Τιμές p – value
ERN1	0.6726
SOD2	0.02081
EIF2AK3	0.08698
HSP90AA1	0.1095
HSF1	0.1376
HSPA1A	0.7724
BAX	0.3804
IGF2	0.3978
PPP1R15B	0.02396

PPP1R15A	0.3378
XBP1	0.2421
ATF6	0.1938
G6PD	0.5487
EIF2A	0.02342
BCL2	0.3802
DNMT1	0.9364
DNMT3A	0.6905
GSTP1	0.2191
PLAC8	0.3039
PTGS2	0.008576
TLR2	0.5449
TLR4	0.01299

Πίνακας 4: Γονίδια και οι αντίστοιχες τιμές p – value. Οι τιμές < 0.05 είναι μαρκαρισμένες (στατιστικώς σημαντικές διαφορές)

4.2 Αποτελέσματα από two – way ANOVA test και post – hoc Tukey test των γονιδίων με στατιστικά σημαντική διαφορά

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε two – way ANOVA test και τα αποτελέσματα αυτού έδειξαν πως τα γονίδια που παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα είναι τα εξής:

1. *SOD2*, με p-value = 0.0236 όταν συγκρίθηκαν οι εποχές μεταξύ τους (summer – spring), ενώ το p-value στη σύγκριση των τύπων ιστών (ipsi – contra) > 0.05

Βάσει του post – hoc Tukey test, το γονίδιο αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

2. *EIF2A*, με p-value = 0.0103 όταν συγκρίθηκαν οι εποχές μεταξύ τους (summer – spring), ενώ το p-value στη σύγκριση των τύπων ιστών (ipsi – contra) > 0.05

Βάσει του post – hoc Tukey test, το γονίδιο είναι στατιστικά σημαντικό με p-value = 0.037 μεταξύ των εποχών (καλοκαίρι – άνοιξη) στον τύπου ιστού ipsi.

3. *TLR4*, με p value = 0.002 όταν συγκρίθηκαν οι εποχές μεταξύ τους (summer – spring) και με p-value = 0.00117 όταν έγινε σύγκριση των τύπων ιστών (ipsi – contra)

Βάσει του post – hoc Tukey test, το γονίδιο είναι στατιστικά σημαντικό με p-value = 0.00077 στη σύγκριση των ιστών (ipsi – contra) την άνοιξη και με p-value = 0.0007 στη σύγκριση του ίδιου τύπου ιστού (ipsi) με τις δύο εποχές. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στη σύγκριση των δύο τύπων ιστών τις δύο διαφορετικές εποχές με p-value = 0.0012.

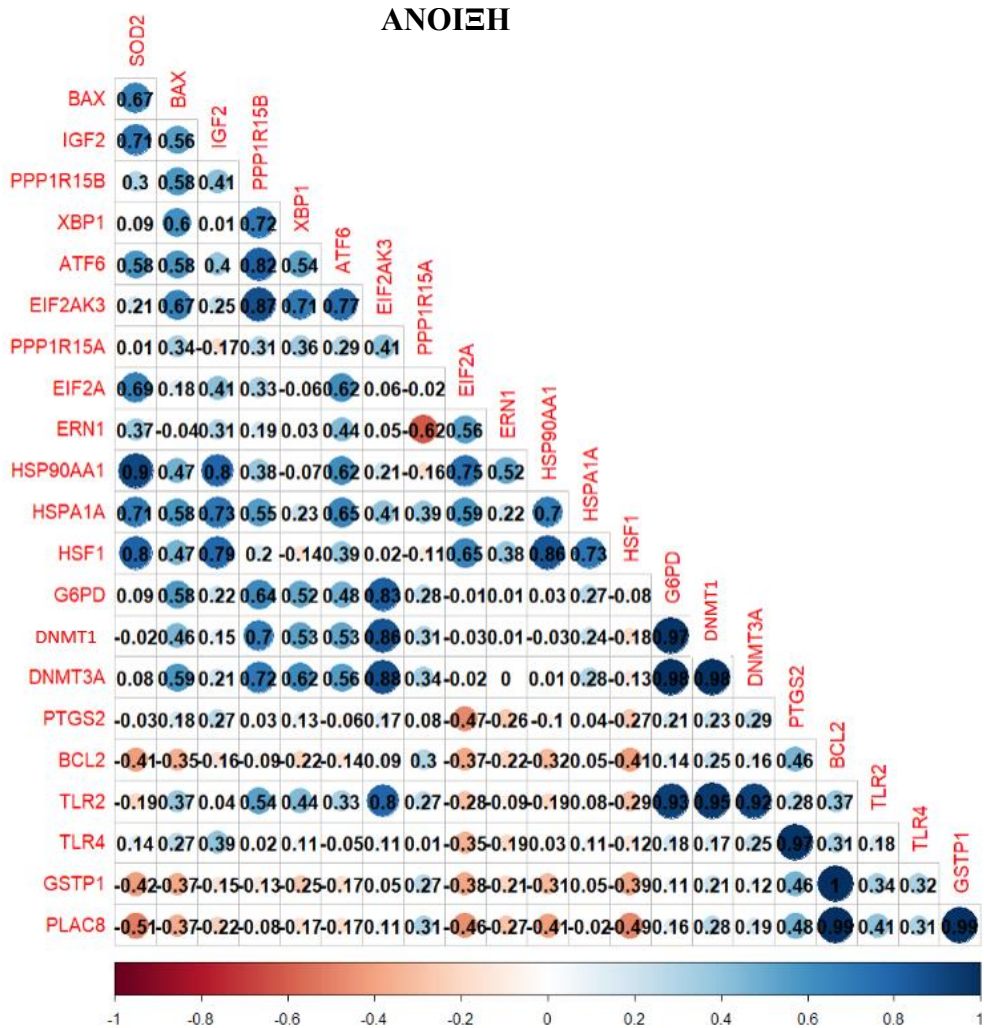
4. *PTGS2*, με p-value = 0.001215 όταν συγκρίθηκαν οι εποχές μεταξύ τους (summer – spring) και με p-value = 0.001 όταν έγινε σύγκριση των τύπων ιστών (ipsi – contra)

Βάσει του post – hoc Tukey test, το γονίδιο είναι στατιστικά σημαντικό με p-value = 0.0008 στη σύγκριση των ιστών κατά την άνοιξη και με p-value = 0.00063 στη σύγκριση του ίδιου τύπου ιστού (ipsi) με τις δύο εποχές. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στη σύγκριση των δύο τύπων ιστών τις δύο διαφορετικές εποχές με p-value = 0.00075.

4.3 Αποτελέσματα από Pearson correlation

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ποσοτικής PCR, με τη βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού R, έδωσαν τα παρακάτω διαγράμματα:

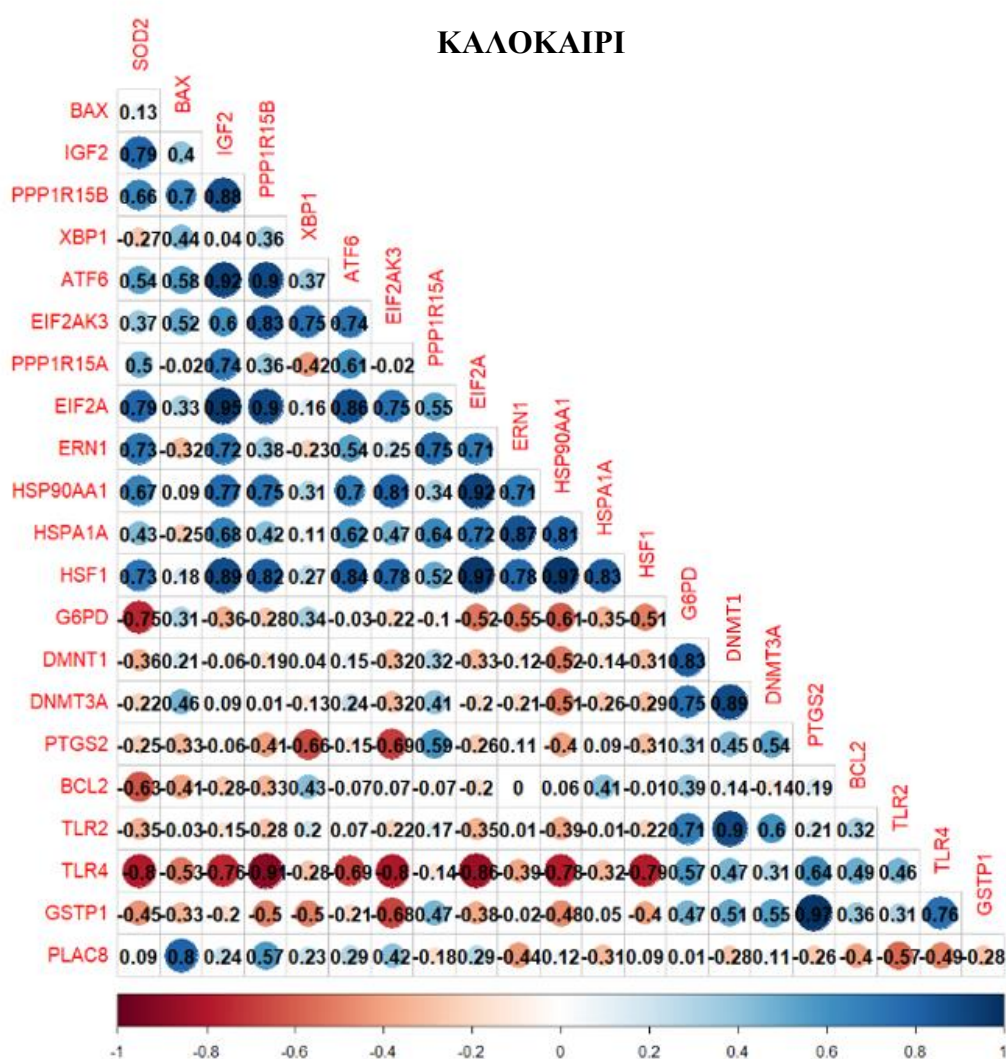
ANOIEH



Εικόνα 8: Διάγραμμα συσχέτισης γονιδίων κατά την περίοδο της άνοιξης - όσο πιο έντονο το χρώμα τόσο μεγαλύτερη η συσχέτιση

- Κατά την περίοδο της άνοιξης η συσχέτιση των γονιδίων είναι μεγαλύτερη μεταξύ άλλων: *GSTP1 – PLAC8*, *BCL2 – GSTP1*, *BCL2 – PLAC8*, *DNMT3A – TLR2*, *DNMT1 – DNMT3A*, *DNMT1 – TLR2*, *G6PD – DNMT1*, *G6PD – DNMT3A*, *G6PD – TLR2*, *HSP90AA1 – HSF1*, *EIF2AK3 – DNMT3A*, *EIF2AK3 – DNMT1*, *PPP1R15B – EIF2AK3*, *SOD2 – HSP90AA1*

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ



Εικόνα 9: Διάγραμμα συσχέτισης γονιδίων κατά την καλοκαιρινή περίοδο - όσο πιο έντονο το χρώμα τόσο μεγαλύτερη η συσχέτιση

- Κατά την περίοδο του καλοκαιριού η συσχέτιση των γονιδίων είναι μεγαλύτερη μεταξύ άλλων: *PTGS2 – GSTP1*, *DNMT1 – DNMT3A*, *DNMT1 – TLR2*, *HSP90AA1 – HSF1*, *ERN1 – HSPA1A*, *EIF2A – HSP90AA1*, *EIF2A – HSF1*, *ATF6 – EIF2A*, *PPP1R15B – ATF6*, *PPP1R15B – EIF2A*, *IGF2 – PPP1R15B*, *IGF2 – ATF6*, *IGF2 – HSF1*

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης στη μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του ελέγχου του μεταγραφικού ρυθμού των γονιδίων ενδιαφέροντος, με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση μεταξύ τύπου του ιστού που λήφθηκε (ipsilateral, contralateral) και της εποχής (άνοιξη, καλοκαίρι) καθοριστικά ήταν τα box plots και διαγράμματα που έγιναν.

Η θερμική καταπόνηση ή αλλιώς θερμικό στρες είναι η αντίδραση του ανθρώπινου οργανισμού στην εξωτερική θερμοκρασία, όταν αυτή είναι υψηλότερη ή χαμηλότερη από την επιθυμητή. Δεδομένου της κλιματικής αλλαγής που συμβαίνει στον πλανήτη, η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει σημαντικά τα οικοσυστήματα. Οι αγελάδες υψηλής γαλακτοπαραγωγής ικανότητας επηρεάζονται περισσότερο σε σύγκριση με άλλα ζώα. Στις κυριότερες ενδείξεις θερμικής καταπόνησης των ζώων αυτών στη συμπεριφορά τους, συμπεριλαμβάνονται η επίδειξη ανησυχίας, ο συνωστισμός σε ποτίστρες ή υπό σκιά, η ασθμαίνουσα αναπνοή, η αύξηση του εκκρινόμενου σιέλου, η ληθαργική συμπεριφορά, η μείωση της κατανάλωσης τροφής και η μείωση της γαλακτοπαραγωγής.

Η μειωμένη όρεξη λόγω της θερμικής καταπόνησης συνδέεται με μία προσαρμοστική μείωση του μεταβολικού ρυθμού, που οδηγεί σε δραματικό περιορισμό του μηρυκασμού. Η συρρίκνωση της κατανάλωσης ξηρής ουσίας εκτιμάται σε 26.3% (σε θερμοκρασία 40°C προσεγγίζει το 56%) με ταυτόχρονη αύξηση των αναγκών συντήρησης κατά 30% περίπου. Η ένταση και η διάρκεια του μηρυκασμού ελαττώνονται, ασκώντας άμεση επίδραση στο pH της μεγάλης κοιλίας, το οποίο μειώνεται, με τη μεταβολή της αναλογίας οξικού: προπιονικού οξέος να παρεκκλίνει σημαντικά της φυσιολογικής.

Παράλληλα, οι αγελάδες μεταβάλλουν τη στάση του σώματός τους, παραμένοντας όρθιες για περισσότερες ώρες (>13 ώρες ημερησίως) και υιοθετώντας κάθετη στάση προς τον ήλιο, προσπαθώντας να μειώσουν την εκτιθέμενη επιφάνεια

σώματος στην ηλιακή ακτινοβολία. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ακόμη και σε μικρή αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, οι αγελάδες αυξάνουν το χρόνο παραμονής τους σε όρθια στάση.

Εκτός από την υγεία και την ευζωία των αγελάδων, η θερμική καταπόνηση έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ποσότητα και την ποιότητα του γάλακτος. Οι υψιπαραγωγές αγελάδες επηρεάζονται περισσότερο από άλλα ζώα, καθώς το άνω κρίσιμο όριο θερμοκρασίας μετατοπίζεται χαμηλότερα όταν αυξάνονται η γαλακτοπαραγωγή, η κατανάλωση τροφής και η παραγωγή θερμότητας. Ταυτόχρονα, οι αγελάδες που υφίστανται θερμική καταπόνηση, μειώνουν την κατανάλωση τροφής και βασίζονται στην αξιοποίηση της γλυκόζης ως κύριας πηγής ενέργειας. Η ποσότητα γλυκόζης που διοχετεύεται στον μαστικό αδένα μειώνεται, ενώ ίδια πορεία ακολουθεί και η γαλακτοπαραγωγή. Η γαλακτοπαραγωγή υψιπαραγωγών αγελάδων μειώνεται κατά 26.2% τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ στα ζώα χαμηλής παραγωγικότητας η μείωση περιορίζεται στο 15.2%. Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, κατά το οποίο η αγελάδα υποβάλλεται σε θερμική καταπόνηση, είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη συνολική γαλακτοπαραγωγή της. Οι αρνητικές επιδράσεις των κλιματολογικών συνθηκών μεγιστοποιούνται κατά τις πρώτες 60 ημέρες της γαλακτικής περιόδου, οπότε οι αγελάδες βρίσκονται σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο και αναπληρώνουν το έλλειμμα κινητοποιώντας τα σωματικά τους αποθέματα.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι κυριότερες επιδράσεις της θερμικής καταπόνησης στη γαλακτοπαραγωγή και στην ποιότητα του γάλακτος, όπως έχουν προσδιοριστεί πειραματικά.

Μεταβολή	Επίδραση στη γαλακτοπαραγωγή και στην ποιότητα του γάλακτος
Αύξηση Δ.Θ.Κ. κατά 1 μονάδα	Μείωση γαλακτοπαραγωγής κατά 0,3 κιλά
Αύξηση θερμοκρασίας ορθού κατά 0,55°C	Μείωση γαλακτοπαραγωγής κατά 1,8 κιλά
Θερμοκρασία περιβάλλοντος άνω των 30°C	Μείωση γαλακτοπαραγωγής κατά 22-38%
	Μείωση λίπους γάλακτος κατά 39,7%
	Μείωση ολικών στερεών ουσιών γάλακτος κατά 18,9%
	Μείωση πρωτεΐνης γάλακτος κατά 16,9%
	Μείωση καζεΐνης γάλακτος κατά 0,6%
	Αύξηση σωματικών κυττάρων γάλακτος

Πίνακας 5: Συσχέτιση μεταβολής θερμοκρασίας και Δ.Θ.Κ. και επίδρασης σε ποιότητα και ποσότητα γάλακτος

* Δ.Θ.Κ. (Δείκτης Θερμικής Καταπόνησης) είναι δείκτης που μετρά την ένταση θερμικής καταπόνησης και υπολογίζεται με βάση τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και τη σχετική υγρασία περιβάλλοντος. Η κρίσιμη τιμή για τον Δ.Θ.Κ. στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες είναι ίση με 68 μονάδες.

Σε ό,τι αφορά τις επιπτώσεις που έχει η θερμική καταπόνηση των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων στην αναπαραγωγική τους ικανότητα, τα προβλήματα που παρατηρούνται συχνότερα έχουν σχέση με το υψηλό ποσοστό σιωπηλών οίστρων και άνοιστρων, το οποίο οφείλεται στην ατελή ανάπτυξη των ωοκυττάρων, την ανεπαρκή έκκριση ωχρινοτρόπου και ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης κατά τον οιστρικό κύκλο και την αύξηση των πρόωρων εμβρυικών θανάτων. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η μείωση του ποσοστού σύλληψης κατά 20%, καθώς η διάρκεια του οίστρου βραχύνεται, η έντασή του μειώνεται και το μεσοδιάστημα τοκετών επιμηκώνεται. Αξίζει να σημειωθεί, πως η εκδήλωση συμπτωμάτων θερμικής καταπόνησης κατά την κυοφορία επιβραδύνει την ανάπτυξη του εμβρύου.

Όλες οι παραπάνω δυσμενείς επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων στην υγεία, τη συμπεριφορά, την ευζωία και τις αποδόσεις τους, είναι υπεύθυνες για σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στις εκτροφές. Ειδικότερα, οι οικονομικές επιπτώσεις έχουν υπολογιστεί σε 1 έως 5 δισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ. Το τεράστιο αυτό ποσό αντικατοπτρίζει, εκτός από την επίδραση

της μείωσης της γαλακτοπαραγωγής, το κόστος των αναπαραγωγικών απωλειών, των αυξημένων περιστατικών χωλοτήτων και οξείας δυσπεπτικής οξέωσης, της πρόωμης αντικατάστασης ζώων στην αγέλη, της μείωσης της λιποπερικτικότητας του γάλακτος, των πρόωρων τοκετών, των κατακρατημένων εμβρυικών υμένων και διάφορων άλλων επιπλοκών, που αποδίδονται στη θερμική καταπόνηση. Το μέσο ετήσιο κόστος των άμεσων και έμμεσων επιπτώσεων της θερμικής καταπόνησης στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες έχει εκτιμηθεί σε 417.3€/ζώο/έτος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η χρονική περίοδος μετά τη θερμική καταπόνηση χαρακτηρίζεται επίσης από χαμηλότερη της αναμενόμενης γαλακτοπαραγωγή και από αναπαραγωγική προβλήματα. Ζώα τα οποία υπέφεραν από θερμική καταπόνηση παράγουν την επόμενη γαλακτική περίοδο 450 – 900 χιλ. λιγότερο γάλα (Sossidou, et al., 2014).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν με την βοήθεια της qPCR, υπέδειξαν τις πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται σημαντικά κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, καθώς και τη συσχέτιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες.

Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που:

- a. συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (*SOD2*, *PPP1R15A*, *PPP1R15B*, *G6PD*, *GSTP1*, *PTGS2*)
- b. ενεργοποιούνται με τη συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων και μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (UPR pathway) (*ERN1*, *EIF2AK3*, *XBPI*, *ATF6*)
- c. λειτουργούν ως απόκριση στην αυξημένη θερμοκρασία (heat stress) (*HSP90AA1*, *HSF1*, *HSPA1A*)
- d. αναστέλλουν ή προάγουν την απόπτωση, συμβάλλουν στο ανοσοποιητικό του οργανισμού (*BAX*, *IGF2*, *TLR2*, *TLR4*, *BCL2*, *PLC8*)
- e. εμπλέκονται στην έναρξη και ολοκλήρωση της μετάφρασης (*EIF2A*, *DNMT3A*, *DNMT1*)

Συγκεκριμένα, τα γονίδια που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά με p -value < 0.05 όταν πραγματοποιήθηκε το two – way ANOVA test είναι τα: *SOD2*, *EIF2A*, *TLR4*, *PTGS2*.

Το *SOD2* γονίδιο είναι γνωστό και ως MnSOD και κωδικοποιεί τη δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου, μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ομοτετραμερές και αποτελείται συνολικά από 222 αμινοξέα. Κάθε μονομερές χρειάζεται ένα ιόν μαγγανίου ως συμπαράγοντα. Δεδομένου ότι η *SOD2* καταλύει την αποδιάταξη της ρίζας του O₂ που παράγεται από την αλυσίδα μεταφοράς οξυγόνου (Electron Transport Chain) σε υπεροξείδιο (H₂O₂) με παραγωγή οξυγόνου (O₂) τόσο στη μιτοχονδριακή μήτρα όσο και στο μεσομεμβρανικό χώρο, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση από mtROS (Qin S., 2022). Η πρωτεΐνη *SOD2* έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιείται με την από – ακετυλίωση της λυσίνης 68 (K68) επιλεκτικά από την αποακετυλάση SIRT3 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-3) (Chen Y., 2011). Όπως έχει επισημανθεί προηγουμένως, το θερμικό στρες προκαλεί οξειδωτικό στρες οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Έτσι, είναι αναμενόμενη η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου αυτού, καθώς αποτελεί παράγοντα μείωσης του οξειδωτικού στρες και περιορισμού των επιπτώσεων στο κύτταρο, ειδικότερα στα μιτοχόνδρια.

Το γονίδιο *EIF2A* κωδικοποιεί έναν ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης που καταλύει τον σχηματισμό των ευαίσθητων στην πουρομυκίνη 80 S συμπλόκων προ – έναρξης και την ελεγχόμενη από poly(U) σύνθεση της πολυφαινυλαλανίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις Mg²⁺. Σκοπός της πρωτεΐνης που εκφράζεται είναι η δέσμευση του εναρκτήριου tRNA στη ριβοσωμική υπομονάδα 40S με τρόπο εξαρτώμενο από το κωδικόνιο AUG (εναρκτήριο κωδικόνιο). Ο παράγοντας αυτός όταν εκφράζεται υπό συνθήκες στρες φωσφορυλιώνεται από την κινάση EIF2AK3. Η πρωτεϊνική κινάση αυτή είναι γνωστή ως protein kinase R – like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK) και ενεργοποιείται από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου λόγω συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Έτσι, ενεργοποιείται η δράση του *EIF2A* υπό στρεσογόνες συνθήκες με αποτέλεσμα να μειώνεται η καθολική παραγωγή πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα διαμορφώνεται μία σειρά προτεραιότητας έκφρασης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, αναστέλλεται η κωδικοποίηση γονιδίων για εξοικονόμηση ενέργειας, επιτρέποντας, όμως, την έκφραση πρωτεϊνών που μεταφέρονται στον πυρήνα (activating transcription factor 4 – ATF4) και ενεργοποιούν μεταγραφικά μονοπάτια που συμβάλλουν στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες στρες. Για παράδειγμα, προωθώντας την έκφραση

πρωτεϊνών συνοδών (chaperones) που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και προκαλώντας την απομάκρυνση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Humeau, J, 2020). Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται εντατικά όταν το κύτταρο υπόκειται θερμικό στρες, καθώς είναι απαραίτητη η ρύθμιση και έλεγχος της μετάφρασης, δηλαδή της ρύθμισης δαπάνης ενέργειας.

Επίσης, το *TLR4* γονίδιο κωδικοποιεί τον Toll – like receptor 4, που αποτελείται από 841 αμινοξέα και εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Γενικότερα, οι υποδοχείς της οικογένειας TLR4 είναι ρυθμιστές της ανοσοποιητικής απόκρισης του κυττάρου. Η σηματοδότηση των TLR ξεκινάει από τη στρατολόγηση πρωτεϊνών προσαρμογής που περιέχουν επικράτεια TIR (toll/interleukin -1 receptor/ resistance protein) προσδίδοντας τη λειτουργία της πρωτεΐνης – σκαλωσιάς. Η στρατολόγηση μίας ή περισσότερων τέτοιων πρωτεϊνών σε έναν υποδοχέα TLR δίνει το έναυσμα για την διέγερση σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν τον NF – κB και μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού. Συγκεκριμένα, ο Tang *et al.* απέδειξαν πως ο υποδοχέας ενδιαφέροντος προκαλώντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF – κB υπό συνθήκες θερμικού στρες, προωθεί την αυξημένη έκφραση της κυτοκίνης. Οι κυτοκίνες είναι στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού καθώς ενεργοποιείται η έκφρασή τους όταν διεγείρεται το ανοσοποιητικό σύστημα και με τη σειρά τους προκαλούν τη δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και των ερυθρών κυττάρων (Tang Lu-Ping, 2021). Υπό συνθήκες στρες, λοιπόν, είναι απαραίτητη η ενεργός δράση των κυτοκινών, του μεταγραφικού παράγοντα NF – κB και συνεπώς και του υποδοχέα TLR4 που ενεργοποιεί το παραπάνω σηματοδοτικό καταρράκτη.

Το τελευταίο γονίδιο του οποίου η κωδικοποίηση κατά τους καλοκαιρινούς μήνες παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (p -value < 0.05), είναι το *PTGS2* που είναι και γνωστό ως *COX-2* (cyclooxygenase 2).. Η πρωτεΐνη που εκφράζεται είναι η συνθάση 2 της προσταγλανδίνης G/H (Prostaglandin G/H synthase 2). Η πρωτεΐνη αυτή καταλύει την παραγωγή προσταγλανδινών που προκαλούν φλεγμονή. Οι προσταγλανδίνες μπορούν να αναστείλουν την απόπτωση και να προωθήσουν την αγγειογένεση (Martin O., 2016). Το ενδομήτριο της μήτρας

εκκρίνει προσταγλανδίνες (PGs), οι οποίες εμπλέκονται στην εμφύτευση, στον τοκετό, την ωχρινόλυση και την αναγνώριση της εγκυμοσύνης στα θηλαστικά. Η παραγωγή των PGs, πέρα από την κυκλοοξυγενάση 2 ελέγχεται και από τη φωσφολιπάση A2 (PLA2). Το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια στην πλασματική μεμβράνη από την PLA2. Στη συνέχεια, η COX2 το μετατρέπει σε PGH2, το οποίο αποτελεί πρόδρομο όλων των PGs, συμπεριλαμβανομένων των PGF2α και PGE2. Επιπλέον, η PGH2 μετατρέπεται σε PGF2α και PGE2 από τη συνθάση της προσταγλανδίνης F (PGFS) και τη συνθάση της προσταγλανδίνης E (PGES), αντίστοιχα. Η PGE2 μετατρέπεται στη συνέχεια σε PGF2α από την καρβονυλική αναγωγάση 1 (CBR1). Στις αγελάδες, η PGE2 είναι γνωστή ως ωχρότροφος παράγοντας, καθώς επάγει την έκκριση προγεστερόνης (P4) από το ωχρό σωματίο (CL) αυξάνοντας την ενδοκυττάρια κυκλική AMP. Αντίθετα, η PGF2α που εκκρίνεται από το ενδομήτριο επάγει την ωχρινόλυση στις αγελάδες. Το ενδομήτριο αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα, τα οποία και τα δύο παράγουν PGE2 και PGF2α. Τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν κυρίως PGF2α. Κατά τη διάρκεια της ωχρινόλυσης των βοοειδών, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) α επάγει την έκκριση PGF2α από τα στρωματικά κύτταρα και στη συνέχεια επάγει την παραγωγή ωκυτοκίνης (OT) από την CL. Στη συνέχεια, η OT ενισχύει περαιτέρω την έκκριση PGF2α από τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτός ο μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης μεταξύ της PGF2α που εκκρίνεται από το ενδομήτριο και της OT που εκκρίνεται από το CL επάγει την ωχρινόλυση. Έτσι, η ενδοκρινική λειτουργία των επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του οιστρικού κύκλου στις αγελάδες. Οι ενδοκρινικές λειτουργίες του ενδομητρίου των βοοειδών επηρεάζονται από το HS. Ο Sakai *et al.* απέδειξε πως η έκθεση των ιστών του ενδομητρίου σε HS αυξάνει την έκκριση PGF2α. Η αύξηση έκφρασης των προσταγλανδίνων αυτών μπορεί να διαταράξει τον φυσιολογικό κύκλο του οίστρου και να προκαλέσει στειρότητα στις αγελάδες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Αυτή είναι μία από τις ανησυχητικές επιπτώσεις της αύξησης της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στη φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή των αγελάδων.

Όπως έχει φανεί και στα διαγράμματα (Εικ. 8,9) τα γονίδια εμφανίζουν μικρές αλλά και μεγάλες συσχετίσεις μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει καθώς συμμετέχουν σε

αλληλένδετα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως στο UPR. Σε αυτό το μονοπάτι που ενισχύεται κατά το θερμικό στρες, οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν τρεις υποδοχείς στη μεμβράνη του ER. Ο πρώτος, ο IRE1, κόβει το pre – mRNA του μεταγραφικού παράγοντα XBP1, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση του XBP1, ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων – στόχων της UPR. Ο δεύτερος υποδοχέας, ο ATF6, πέπτει και προκύπτει ο ενεργός μεταγραφικός παράγοντας ATF6. Ο τρίτος υποδοχέας, ο PERK, είναι μία πρωτεϊνική κινάση που φωσφορυλιώνει τον μεταφραστικό παράγοντα eIF2. Η φωσφορυλίωση οδηγεί στην αδρανοποίησή του και σε γενικευμένη καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μειώνοντας έτσι την ποσότητα των πρωτεϊνών που εισέρχονται στο ER. Έτσι, μέσω της ενεργοποίησης ενός μονοπατιού, υπό συνθήκες στρες, ενισχύεται η παράλληλη έκφραση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος αυξάνοντας τον βαθμό συσχέτισής τους. Ακόμα, οι heat shock proteins έχουν μεγάλο βαθμό συσχέτισης μεταξύ τους, καθώς επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες, αλλά και με τον heat shock factor που συνδέονται άμεσα. Ακόμη, αυξάνεται η συσχέτιση των γονιδίων *PPP1R15B* – *EIF2A* κατά την καλοκαιρινή περίοδο, αφού όπως αναλύθηκε παραπάνω, ενεργοποιείται ο μεταφραστικός παράγοντας όταν φωσφορυλιωθεί· η φωσφορυλίωση του EIF2A επιτυγχάνεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση που κωδικοποιεί το γονίδιο *PPP1R15B*.

Προηγούμενες μελέτες συμπεριλαμβανομένου και της συγκεκριμένης, δείχνουν ότι το θερμικό στρες που προκαλείται λόγω της κλιματικής αλλαγής επιφέρει δυσμενείς και καταστροφικές συνέπειες στη φυσιολογική λειτουργία των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Οι οργανισμοί δεν είναι εξοικειωμένοι με θερμοκρασίες υψηλότερες των 38°C, με αποτέλεσμα, ορισμένες φορές, την αδυναμία επιτυχούς απόκρισης στο θερμικό στρες. Έχει παρατηρηθεί πως μέσα σε ένα κοπάδι αγελάδων Holstein, στις ίδιες συνθήκες, κάποια από τα ζώα να οδηγούνται θάνατο λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Αυτό οδηγεί την επιστημονική κοινότητα στην διερεύνηση των διεργασιών των κυττάρων ως αποκρίσεις στο θερμικό στρες, θέτοντας το μοριακό υπόβαθρο.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης στη μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων του ωαγωγού σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Τα

αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η μεταγραφική δραστηριότητα ορισμένων γονιδίων περιορίστηκε, ενώ άλλων που συσχετίζονται με την απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες αυξήθηκαν. Ειδικότερα, αυξήθηκε σημαντικά η μεταγραφική δραστηριότητα των heat shock proteins, των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην αποσυμφόρηση του ενδοπλασματικού δικτύου από μη αναδιπλωμένες ή/και λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, αλλά και των πρωτεϊνών που αποσκοπούν στην ελάττωση του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη μεταγραφή των ενζύμων που προκαλούν στείρωση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, που αιτιολογεί τη μείωση στην αναπαραγωγική ικανότητα των αγελάδων Holstein κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Οι περαιτέρω μελέτες επί του θέματος κρίνονται αναγκαίες, ώστε να βρεθούν τρόποι επίλυσής του το συντομότερο, αφού το ζήτημα της αύξησης της θερμοκρασίας του πλανήτη συνεχώς αυξάνεται και τα οικοσυστήματα που τον απαρτίζουν αποκτούν ολοένα και περισσότερα προβλήματα επιβίωσης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. “Κλιματική Αλλαγή.” *ΜΕ.Κ.Δ.Ε. Ε.Μ.Π.*, Jan. 2023, <https://www.mirc.ntua.gr/natural-disasters-metsovo/>.
2. Lim, Dong-Hyun, et al., ‘Evaluation of heat stress responses in Holstein and Jersey cows by analyzing physiological characteristics and milk production in Korea’. *Journal of Animal Science and Technology*, τ. 63, τχ. 4, Ιούλιος 2021, σσ. 872–83. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e62>.
3. Stamperna, Konstantina, et al., ‘Developmental competence of heat stressed oocytes from Holstein and Limousine cows matured in vitro’. *Reproduction of Domestic Animals*, Ιούλιος 2021.
4. ‘Holstein’. *The Cattle Site*, 29 September 2022, <https://www.thecattlesite.com/breeds/dairy/22/holstein>.
5. Angelaki Meropi. *Assessment of the antioxidant activity of native honey samples through the evaluation of redox biomarkers in human gastric cancer cells (MKN45)*. 2023. University of Thessaly, <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/82172/27547.pdf?sequence=4&isAllowed=y>.
6. Belhadj Slimen, I., et al., ‘Heat Stress Effects on Livestock: Molecular, Cellular and Metabolic Aspects, a Review’. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, τ. 100, τχ. 3, Ιούνιος 2016, σσ. 401–12. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>.
7. Belhadj Slimen Imen, et al., ‘Reactive Oxygen Species, Heat Stress and Oxidative-Induced Mitochondrial Damage. A Review’. *International Journal of Hyperthermia*, τ. 30, τχ. 7, November 2014, σσ. 513–23. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.
8. Read, Adam, Martin Schröder. ‘The Unfolded Protein Response: An Overview’. *Biology*, τ. 10, τχ. 5, April 2021, σ. 384. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.3390/biology10050384>.
9. Fitsili Alexia-Evangelia. *The effect of climate change on animal circadian rhythms - the paradigm of teleosts and ecological implications*. 2022. University of Thessaly,

<https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/60310/26217.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

10. Evangelia N. Sossidou και Maria-Anastasia Karatzia. Παθαίνουν και οι αγγελάδες θερμοπληξία; σ. 3, https://www.elgo.gr/images/pdf/publications/demeter_magazine/t8p9-11.pdf.
11. *National Center for Biotechnology Information*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
12. Qin, S., Wang, R., Tang, D. *et al.* Manganese Mitigates Heat Stress–Induced Apoptosis by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Activating the NRF2/SOD2 Pathway in Primary Chick Embryonic Myocardial Cells. *Biol Trace Elem Res* 200, 2312–2320 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02810-2>
13. Infantino, Vittoria *et al.*, ‘1 - Mitochondrial physiology: An overview’. *Mitochondrial Intoxication*, editor Marcos Roberto de Oliveira, Academic Press, 2023, *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88462-4.00001-8>.
14. Chen, Yaohui *et al.*, ‘Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS’. *EMBO Reports*, June 2011, σσ. 534–41. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.1038/embor.2011.65>.
15. Humeau, J., Leduc, M., Cerrato, G. *et al.* Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) in autophagy. *Cell Death Dis* 11, 433 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2642-6>
16. Komar AA, Merrick WC. A Retrospective on eIF2A-and Not the Alpha Subunit of eIF2. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 17;21(6):2054. doi: 10.3390/ijms21062054. PMID: 32192132; PMCID: PMC7139343.
17. Tang, Lu-Ping, κ.ά. ‘Heat stress aggravates intestinal inflammation through TLR4-NF- κ B signaling pathway in Ma chickens infected with Escherichia coli O157:H7’. *Poultry Science*, τ. 100, τχ. 5, Μάιος 2021, σ. 101030. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101030>.
18. UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35354/entry>.
19. Ve T, Williams SJ, Kobe B. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis*. 2015 Feb;20(2):250-61. doi: 10.1007/s10495-014-1064-2. PMID: 25451009.
20. ‘Regulation of eIF2’. *Cell Signaling Technology*, <https://www.cellsignal.com/pathways/regulation-of-eif2-pathway>.